

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Importado e Distribuído por: BioSys Ltda
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
Cep: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
MS – nº 10350840121
SAC: (21) 3907-2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

VITAMINA B₆ (PIROXAL-5 FOSFATO PIRIDOXAL) EM SORO/PLASMA/SANGUE TOTAL POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B₆ em soro/plasma/sangue total por HPLC. Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.

Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
31000/S	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₆ em Soro/Plasma/Sangue Total, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitamina B₆ em soro/plasma e sangue total por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este kit permite a determinação rápida, simples e específica da vitamina B₆ (piridoxal-5'-fosfato, PLP), num sistema HPLC isocrático com detecção por fluorescência.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção por fluorescência.

PRINCÍPIO

A usual derivatização pós-coluna, com maior exigência técnica, é aqui substituída por uma simples derivatização pré-coluna. O procedimento de preparo da amostra inclui uma efetiva precipitação de proteínas e um passo de extração em condições otimizadas para liberar o PLP do estado ligado (recuperação 88%). Posterior derivatização (banho-maria, 60°C) produz o PLP derivado fluorescente. Uma coluna HPLC selecionada e fase móvel otimizada para esta separação resultam em quantificação exata e confiável. Extratos altamente estáveis são adquiridos por este simples procedimento de preparo, permitindo a análise de grandes lotes.

REAGENTES

Componentes e composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de fosfato de potássio	1000 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de ácido perclórico	1 x 30 mL
Reagente de Derivatização (Derivatisation Reagent)	Solução de fosfato de potássio e cianeto de potássio	1 x 10 mL
Reagente de Neutralização (Neutralisation Reagent)	Solução de fosfato de potássio	1 x 25 mL
Soro padrão de calibração (Iiof.) (Calibration Standard)	Soro humano contendo vitamina B ₆	5 x 1 mL
Frascos de Reação (âmbar) (Reaction vials)	-	2 x 100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de validade indicada no rótulo, desde que as condições de armazenamento estabelecidas sejam obedecidas. A tabela abaixo mostra a temperatura de armazenagem para os reagentes do kit, e para os demais reagentes Chromsystems utilizados na realização da análise.

Artigo	Produto	Armazenamento
31001	Fase móvel	2 a 30 °C
31004	Reagente de Precipitação	2 a 30 °C
31005	Reagente de Neutralização	2 a 30 °C
31006	Reagente de Derivatização	2 a 30 °C
36005	Padrão de Calibração de Vitamina B ₆ em Soro	< -18 °C
0031	Controle de Vitamina B ₆ em Soro, Bi- Nível (I+ II)	< -18 °C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Por favor, consulte a ficha de segurança dos reagentes e tome as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto e as instruções nela contidas devem ser rigorosamente cumpridas. A confiabilidade dos resultados do ensaio não poderá ser garantida em caso de desvio às instruções.

DESCARTE

O Reagente de Precipitação, a sobra das amostras preparadas, e a Fase Móvel após o uso **contêm cianeto** e devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Reagente de Precipitação: pronto para uso.

Reagente de Neutralização: pronto para uso.

Reagente de Derivatização: pronto para uso.

Padrão de Calibração de Vitamina B₆ em Soro/Plasma:

O calibrador em soro/plasma (artigo 36005) e rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir o calibrador liofilizado, pipetar exatamente 1,0 mL de água destilada no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição, agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

Controle de Vitamina B₆ em Soro, Nível I + II:

Os controles em soro (artigo 0031) são submetidos a todo o processo de preparo das amostras, do mesmo modo que as amostras de pacientes. Os controles são incluídos em cada série analítica, para monitorar a exatidão e a precisão do sistema. **Para reconstituir o soro controle liofilizado, pipetar exatamente 2,0 mL de água destilada no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição, agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os controles.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art.31100)

Padrão de Calibração de Vitamina B₆ em Soro (Chromsystems art.36005)

Controle de Vitamina B₆ em Soro, Nível I + II (Chromsystems art.0031)

Centrífuga para micotubos.

Água tipo I ou HPLC.

Metanol grau HPLC.

Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

Plasma/soro/sangue total são utilizados para análise. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. As amostras devem ser mantidas refrigeradas e protegidas da luz durante o transporte.

Estabilidade da amostra: as amostras são estáveis por até 1 dia entre 2 a 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar em temperatura < -18 °C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): As amostras preparadas são estáveis em temperatura ambiente por até 2 dias ou refrigeradas entre 2° a 8°C por aproximadamente 1 semana (protegidas da luz). Por períodos maiores, armazenar em temperatura < -18 °C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: volume de injeção 25-50 µL
tempo de corrida analítica < 8 min
Razão de fluxo: 1,0 – 1,2 mL/min.
Temperatura da coluna temperatura ambiente (aprox. 25°C)
Detector de fluorescência EX = 320 nm, EM = 415 nm
Limpeza do injetor: água destilada com 5 – 10 % (máximo) de metanol.

Procedimento de Preparo das Amostras:

Num frasco de reação âmbar, pipetar:

- 200 µL de plasma/soro ou sangue total (amostra, calibrador, controle) + 300 µL de Reagente de Precipitação, agitar por 30 s (vórtex).
- Incubar por 10 min. a +4°C, centrifugar por 5 min. a 16.000 g.
- Transferir 250 µL do sobrenadante para um novo frasco âmbar.
- Adicionar 250 µL Reagente de Neutralização, agitar brevemente (precipitação irá se formar, não centrifugue!).
- Adicione 100 µL de Reagente de Derivatização (contém cianeto), agitar brevemente.
- Incubar 20 min. a 60°C (banho-maria ou placa aquecedora).
- Resfriar as amostras em água gelada, então incubar por 10 min. a +4°C; centrifugar por 2 min. a 16.000 g.
- Transferir o sobrenadante para frasco do amostrador automático protegido da luz, injetar 25-50 µL no sistema HPLC.

Tempo de Retenção Esperado:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Piridoxal-5'-fosfato	4,0

CÁLCULOS

$$C_{\text{Analito, Amostra}} [\mu\text{g/L}] = \frac{A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Calibrador}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A_{amostra}

Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = A_{calibrador}

Concentração C do analito A no calibrador (veja o folheto de informações) = C_{calibrador}

Fatores de conversão

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Piridoxal-5'-fosfato	x 4,047	x 0,2471

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibrar e monitorar a precisão e exatidão das análises:

Artigo	Produto	Apresentação
36005	Padrão de Calibração de Vitamina B ₆ em Soro	5 x 1 mL
0031	Controle de Vitamina B ₆ em Soro, Bi- Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Plasma	102,0%
Sangue Total	88,0%

Linearidade e limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação aproximado (µg/L)	Limite máximo de linearidade (µg/L)
Piridoxal-5'-fosfato	1,0	250

Precisão intra-ensaio:

DP (PLP) n = 8	Concentração (µg/L)
6,9%	1,9
2,8% (n = 4)	16,7
2,6%	19,3
2,4%	47,4
1,7%	101,4
2,1%	227,4

Precisão inter-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)	
	n = 20	
Piridoxal-5'-fosfato	2,5 (7,7)	3,2 (21,1)

VALORES DE REFERÊNCIA

	[µg/L]	[nmol/L]
Vitamina B₆ (piridoxal-5'-fosfato) em plasma-EDTA	3,6 - 18	15 - 73
Vitamina B₆ (piridoxal-5'-fosfato) em sangue total heparinizado:	8,7 - 27,2	35 - 110

LITERATURA

- Brönstrup A., Pietrzik, K.: Vitaminspur, 11:85 (1996).
- Leklem J. E.: Clinical and Physiological Applications of Vitamin B₆, 3 – 28 (1988).
- Reynolds T. M., Brain A., J of Liquid Chromatography, 15(5): 897 (1992).
- Tryfiates G. P., Bishop R. E., Murgo A. J., Anticancer Research, 11:1281 (1991).
- Biesalski H., Schrezenmeir J., Weber P., Weiß H. (Editor): Vitamine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997).
- Yasuda K., Okuda K., Endo N., Ishiwatari Y., Ikeda R., Hayashi H., Yokozeki K., Kobayashi S., Irie Y., Gastroenterology, 109:1295 (1995).
- Wilson R. G., Davis R. E., Advances in Clinical Chemistry, 23, 1 (1983).
- Bertelsmann Stiftung (Editor); Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse; Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh (1997).
- Greiling H., Gressner A. M., Lehrbuch d. Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Verlag Schattauer, 3rd Ed. (1995).

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munique, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de