

Instruções de Uso

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

VITAMINS A AND E IN SERUM/PLASMA
VITAMINAS A/E NO SORO/PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* das Vitaminas A e E em Soro/Plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
34000	Kit Reagente para Análise de Vitaminas A/E em Soro/Plasma, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitaminas A/E em Soro/Plasma por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios de análises clínicas para a determinação quantitativa das vitaminas A e E em amostras de soro ou plasma. É indicado como um teste para pacientes com suspeita de deficiência de Vitamina A ou Vitamina E.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção UV.

PRINCÍPIO

Este kit permite a análise simultânea das vitaminas A e E em uma corrida isocrática de HPLC. O preparo rápido e fácil de amostras consiste de dois passos de precipitação, seguidos da análise do sobrenadante em sistema HPLC-UV.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução metanólica	1000 mL
Reagente de Precipitação 1 (Precipitation Reagent I)	Solução metanólica + sulfato de zinco	1 x 2,5 mL
Reagente de Precipitação 2 (Precipitation Reagent II)	Propanol 80%	1 x 40 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução de acetato de tocoferol 1%	1 x 2 mL
Frascos de Reação (âmbar) (Reaction vials)	-	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 durante a análise.

Artigo	Produto	Armazenamento
34001	Fase móvel	+18 a +30°C
34008	Padrão Interno	+2 a +8 °C
34006	Reagente de Precipitação I	+18 a +30°C
34003	Reagente de Precipitação II	+18 a +30°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

A Fase Móvel, o Reagente de Precipitação II, o Padrão Interno e os resíduos das amostras preparadas **contêm solventes orgânicos** e devem ser descartados como resíduo livre de halogênio. O Reagente de Precipitação I contém uma substância perigosa ao meio ambiente. Descarte os resíduos do produto em um contêiner para soluções salinas. Descarte de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Padrão Interno: pronto para uso.

Reagente de Precipitação I: pronto para uso.

Reagente de Precipitação II: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 34100)
Padrão de Calibração de Vitaminas A/E em Soro (Chromsystems art. 34004)

Controle de Vitaminas A/E em Soro, Bi-Nível (I + II) (Chromsystems art. 0032)

Centrífuga para microtubos.

Água tipo I ou grau HPLC.

Metanol PA.

Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

A amostra pode ser soro ou plasma. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A amostra deve ser extraída com garroteamento leve e com cuidado para prevenir a hemólise. Baseado na experiência de diferentes grupos de trabalho, recomendamos o seguinte para a coleta da amostra:

- Colete aproximadamente 1-2 ml de sangue;
- Após centrifugação (2000 x g, 5 min) o plasma/soro obtido deve ser separado o mais rápido possível e armazenado abaixo de -18°C. Proteja as amostras da luz.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatós):

Preparadas como descrito, as amostras são estáveis protegidas da luz entre +2º a +8ºC por até 12 horas.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção 50 µL, tempo de corrida analítica 9 min. A refrigeração da amostra é recomendada, manter o compartimento protegido da luz.
Razão de fluxo:	1,5 ml/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (20-25°C)
Detector UV:	Iniciar em λ_{max} = 325 nm, após 3,5 min. mudar para 295 nm.
Limpeza do injetor:	Água/metanol (1:1)

Procedimento de Preparo das Amostras:

Num frasco de reação âmbar, pipetar:

- 200 µL de amostra (soro/ plasma, calibrador, controle) + 20 µL de Padrão Interno + 25 µL de Reagente de Precipitação I
- Agitar por 30 s (vórtex).
- Adicionar 400 µL do Reagente de Precipitação II, vórtex por 30 s.
- Centrifugar por 10 min a 9.000 g.
- Injetar 50 µL de sobrenadante no sistema HPLC.

Tempo de Retenção Esperado:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Vitamina A	2,3
Padrão Interno	4,7
Vitamina E	7,7

CÁLCULOS

$$C_{\text{Amostra}} (\mu\text{g/l}) = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = $A_{\text{Calibrador}}$

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{Amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = $IS_{\text{Calibrador}}$

Concentração C do analito A no calibrador = $*C_{\text{Calibrador}}$

Fatores de conversão

Analito	mg/L para µmol/L	µmol/L para mg/L
Vitamina A	x 3,49	x 0,286
Vitamina E	x 2,32	x 0,431

CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
34004	Padrão de Calibração de Vitaminas A/E em Soro (liofilizado)	5 x 1mL
0032	Controle de Vitaminas A/E Soro, Bi-Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Substância	Recuperação em soro [%]	Recuperação em plasma [%]
Vitamina A	106	111
Vitamina E	101	104
Padrão Interno	114	109

Linearidade e limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação aproximado (mg/L)*	Limite máximo de linearidade (mg/L)
Vitamina A	0,02	5,0
Vitamina E	0,25	45,00

*O limite de quantificação depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)		
	n = 10		
Vitamina A	2,5 (0,466)	0,8 (0,666)	0,9 (1,27)
Vitamina E	2,4 (8,86)	1,6 (12,9)	2,2 (24,9)

Precisão inter-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)	
	n = 80	
Vitamina A	3,8 (0,400)	5,0 (0,982)
Vitamina E	2,7 (6,93)	4,9 (16,9)

VALORES DE REFERÊNCIA

Vitamina A

Adultos

Detalhes	Faixa de referência	Fonte
Retinol em soro	1,05 – 2,45 µmol/l 0,3 – 0,7 mg/l	[5]
Faixa tóxica	A partir de 1,4 mg/l	[8]
Deficiência	Iniciando: 0,1 – 0,19 mg/l Severa: <0,1 mg/l	[8]

Recém-nascidos, crianças e adolescentes

Detalhe	Faixa etária	Faixa de referência	Fonte
Retinol em soro/plasma	Adolescentes	1,0 – 2,1 µmol/l 0,3 – 0,6 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Crianças (até 10 anos)	0,66 – 1,7 µmol/l 0,2 – 0,5 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Bebês (até um ano)	0,53 – 1,4 µmol/l 0,15 – 0,4 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Recém-nascidos	0,35 – 1,0 µmol/l 0,1 – 0,3 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Ao nascimento	0,49 – 1,81 µmol/l 0,14 – 0,52 µg/l	[10]
Retinol em soro	1-6 anos	0,7 – 1,5 µmol/l 0,20 – 0,49 µg/l	[10]
Retinol em soro	7-12 anos	0,9 – 1,7 µmol/l 0,20 – 0,49 µg/l	[10]
Retinol em soro	13-19 anos	0,9 – 1,7 µmol/l 0,26 – 0,72 µg/l	[10]
Retinol em soro/plasma	Neonatos a termo (>37 semanas)	0,63 – 1,75 µmol/l 0,18 – 0,50	[10]
Retinol em soro/plasma	Neonatos pré-termo (<36,6 semanas)	0,46 – 1,61 µmol/l 0,13 – 0,46 µg/l	[10]

Vitamina E

Adultos

Detalhes	Taxa de referência	Fonte
D- α -tocoferol em soro	11,6 – 46,4 $\mu\text{mol/l}$ 5,0 – 20,0 mg/l	[9]
Vitamina E em soro/plasma	12 – 42 $\mu\text{mol/l}$ 5 – 18 mg/l	[8]
D- α -tocoferol em soro	22 $\mu\text{mol/l}$	[6]
Deficiência	<11,6 $\mu\text{mol/l}$ <5 mg/l	[8]
Limite padrão abaixo de	11,6 $\mu\text{mol/l}$	[6]

Recém-nascidos, crianças e adolescentes

Detalhe	Faixa etária	Faixa de referência	Fonte
Vitamina E em soro/plasma	Adolescentes (13-19 anos)	14 – 23 $\mu\text{mol/l}$ 6 – 10 mg/l	[8]
Vitamina E em soro/plasma	Crianças (1-12 anos)	7 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 3 – 9 mg/l	[8]
Vitamina E em soro/plasma	Neonatos pré-termo	2,3 – 11,6 $\mu\text{mol/l}$ 1 – 5 mg/l	[8]
Vitamina E em soro	1-6 anos	7 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 3,0 – 9,0 mg/l	[8]
Vitamina E em soro	7-12 anos	10 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 4,0 – 9,0 mg/l	[10]
Vitamina E em soro	13-19 anos	13 – 24 $\mu\text{mol/l}$ 6,0 – 10,1 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	Prematuro	1 – 8 $\mu\text{mol/l}$ 0,5 – 3,5 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	Termo completo	2 – 8 $\mu\text{mol/l}$ 1,0 – 3,5 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	2 – 5 meses	5 – 14 $\mu\text{mol/l}$ 0,18 – 6,0 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	6 – 24 meses	0,46 – 1,61 $\mu\text{mol/l}$ 3,5 – 8,0 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	2 – 12 anos	13 – 21 $\mu\text{mol/l}$ 5,5 – 9,0 mg/l	[10]

LITERATURA

- Vuilleumier JP, Keller HE, Gysel D, Hunziker F. (1983) Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. Part I: The fat-soluble vitamins A and E, and β -carotene. *Int J Vitam Nutr Res* **53**(3): 265-72.
- Reinards R, Vitaminstoffwechsek, in: Greiling H, Gressner AM (Hrsg) *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*; 3. Aufl, Verlag Schattauer Stuttgart/NewYork (1987) 344-6.
- Milne DB, Botnen J. (1986) Retinol, α -tocopherol, lycopene, and α - and β -carotene simultaneously determined in plasma by isocrativ liquid chromatography. *Clin Chem* **32**(5): 874-6.
- Lehmann J, Martin HL. (1982) Improved direct determination of alpha- and gamma-tocopherols in plasma and platelets by liquid chromatography, with fluorescende detection. *Clin Chem* **28**(8):1784-7.
- Bertelsmann Stifug *Hrsg). *Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse*. Verlag Bertelsmann Stitung Gütersloh (1997).
- Biesalski HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß H. *Vitamine – Physiologie, Pathophysiologies, Therapie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York (1997).
- Baltes W. *Lebensmittelchemie*. 2. Aufl, Springer Verlag Berlin (1989).
- Gressner AM, Arndt T. *Katecholamine*, in: Gressner AM, Arndt T, *Lexikon der Laboratoriumsdiagnostik*. 2. Aufl, 1390 und 1405, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2013).
- Greiling H, Gressner AM (Hrsg) *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*; 3. Aufl, Verlag Schattauer Stuttgart/New York (1987).

- Soldin SJ, Wong EC, Brugnara C, Soldin OP (Hrsg) *Pediatric Reference Intervals*; 7. Aufl, AACCC Press Washington (2011) 238, 242.

Símbolos Usados



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 10350840119
SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br