

VITAMIN B1 IN WHOLE BLOOD AND VITAMIN B6 IN WHOLE BLOOD/PLASMA - HPLC VITAMINA B1 EM SANGUE TOTAL E VITAMINA B6 EM SANGUE TOTAL/PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B1 em Sangue total e Vitamina B6 em Sangue total/Plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
52052	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₁ em Sangue Total e Vitamina B ₆ em Sangue Total /Plasma, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções Análise de Vitamina B1 em sangue total e Vitamina B6 em sangue total/plasma por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Até hoje, estas duas vitaminas podiam apenas ser determinadas por HPLC em duas corridas separadas com dois preparos de amostra distintos ou com uma complexa derivatização pós-coluna.

Este kit oferece a possibilidade de determinar as formas fisiologicamente ativas das Vitaminas B1 e B6, TTP (tiamina pirofosfato) e PLP (piridoxal-5'-fosfato) em uma única corrida, com uma preparação de amostra e sem uma derivatização complexa pós-coluna.

A análise é realizada num sistema HPLC com bomba binária e detector de fluorescência programável.

MÉTODO

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

PRINCÍPIO

O preparo da amostra se restringe a um único passo de precipitação seguido da derivatização das vitaminas no frasco de reação. A amostra derivatizada é analisada utilizando detector de fluorescência com comprimento de onda variável, e, a separação cromatográfica é realizada com duas fases móveis em menos de 9 minutos. A inclusão de dois padrões internos feito sob medida no método garante alta precisão e segurança na quantificação dos analitos.

REAGENTES

Componentes e Composição:

Componente	Composição	Apresentação
Fase Móvel A (Mobile Phase 1)	Solução de metanol	1000 mL
Fase Móvel B (Mobile Phase 2)	Solução de metanol	1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa de piridina e sais de sulfato contendo azida sódica	
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de ácido perclórico	1 x 10 mL
Reagente de Neutralização (Neutralisation Reagent)	Solução de fosfato de potássio dibásico	1 x 30 mL
Reagente de Derivatização 1 (Derivatisation Reagent 1)	Solução aquosa de hexacianoferrato de potássio III e fosfato de sódio monobásico	1 x 25 mL

Reagente de Derivatização 2 (Derivatisation Reagent 2)	Solução aquosa de fosfato de potássio dibásico	2 x 0,3 mL
Frascos de Reação (âmbar) (Reaction vials)	-	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO 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 dos reagentes do kit.

Artigo	Produto	Armazenamento
52001	Fase Móvel A	18 - 30°C
52022	Fase Móvel B	2 - 8°C
52044	Padrão Interno	18 - 30°C
52005	Reagente de Precipitação	18 - 30°C
52006	Tampão de Neutralização	18 - 30°C
52007	Reagente de Derivatização 1	18 - 30°C
52008	Reagente de Derivatização 2	18 - 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 contém solventes orgânicos e deve ser descartada como resíduo livre de halogênio de acordo com os regulamentos locais. O Reagente de Derivatização 1 e 2 e a sobra das amostras preparadas contém cianeto e devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais. O Reagente de Precipitação contém um ácido forte. As soluções devem ser neutralizadas e descartadas em um recipiente para soluções salinas.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Fase Móvel A: pronto para uso.
- Fase Móvel B: pronto para uso.
- Padrão Interno: pronto para uso.
- Reagente de Precipitação: pronto para uso.
- Reagente de Neutralização: pronto para uso.

- Reagente de Derivatização 1: reconstitua o conteúdo do frasco do Reagente de Derivatização 1 (art. 52007) com exatamente 0,3 mL de água destilada. Sob refrigeração (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de aproximadamente 4 semanas.
- Reagente de Derivatização 2: pronto para uso.

Mix de Derivatização:

Misture 50 µL do Reagente de Derivatização 1 reconstituído com 1,0 mL do Reagente de Derivatização 2 (art. 52008). A proporção é 1:20. Esta mistura (= mix de derivatização) está pronta para o uso no preparo das amostras. A estabilidade é de 4 dias quando mantido protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C).

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art.52100)
- Padrão de Calibração de Vitaminas B1/B6 em Sangue Total (Chromsystems art.52003) ou Controle de Vitamina B1/B6 em Sangue Total, Bi-Nível (I + II) (Chromsystems art. 0164)
- Centrífuga para microtubos.
- Água grau HPLC.
- Metanol grau HPLC.
- Material Geral de Laboratório

AMOSTRA

O material utilizado é sangue total ou plasma. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A coleta deve ser realizada com garroteamento leve e com cuidado para prevenir a hemólise.

Estabilidade das amostras: Proteger as amostras da luz. Em frasco fechado, as amostras são estáveis por 1 semana entre 2 a 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (até duas semanas), as amostras devem ser mantidas em temperatura < -18 °C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): As amostras preparadas são estáveis em temperatura ambiente por 1 dia ou refrigeradas entre 2° a 8°C por até 7 dias. Por períodos maiores (até 2 semanas), armazenar em temperatura <-18°C.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção 150 µL
 Tempo de corrida analítica: 7 - 9 min.
 Temperatura da coluna: Temp. ambiente (aprox. 20°C)
 Detector de fluorescência: EX = 320 nm, EM = 415 nm após aprox. 3,8 min. mudar para: EX = 367 nm, EM 435 nm.
 Solução de limpeza do injetor: Água/metanol = 95/5

Perfil de gradiente:

Gradiente para a determinação de Vitamina B1/B6 em sangue total:

Tempo (min)	% A	% B	Taxa de fluxo [mL/min]
0	100	0	1,5
2,40	100	0	
2,50	50	50	
3,50	50	50	
3,60	100	0	
6,70	100	0	2,3
6,71	100	0	
8,00	100	0	
8,01	100	0	
8,90	100	0	
8,91	100	0	1,3

Gradiente para a determinação de Vitamina B6 em plasma:

Tempo (min)	% A	% B	Taxa de fluxo [mL/min]
0	100	0	1,5
2,40	100	0	
2,50	50	50	
3,50	50	50	
3,60	0	100	
5,50	0	100	
5,51	100	0	
7,00	100	0	

Procedimento de Preparação das Amostras:

Num frasco de reação âmbar, pipetar:

1. 200 µL de sangue total ou plasma (ou calibrador ou controle reconstituído)
 - + 100 µL de Padrão Interno
 - + 300 µL de Reagente de Precipitação
2. Agitar por 30 s (vórtex).
3. Centrifugar por 5 min. a 14.000 g
4. Num novo frasco âmbar, pipetar 250 µL do Reagente de Neutralização +100 µL do mix de derivatização
5. Adicionar 250 µL do sobrenadante e agitar brevemente.
6. Incubar 25 min. a 60±1°C (banho-maria ou placa aquecedora).
7. Incubar por pelo menos 10 min. entre + 2 e + 8°C, centrifugar por 2 min. A 14.000 g.
8. Transferir o sobrenadante para frasco do amostrador automático protegido da luz, injetar 25-50 µL no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Pico	Analito	Tempo de retenção (aprox. min)	Concentração (µg/L)
1	Padrão Interno 1 (PLP)	1,2	1
2	Vitamina B6 (PLP)	2,5	Ver folheto informações
3	3 Vitamina B1 (TPP)	5,1	
4	Padrão Interno 2 (TPP)	6,1	1

CÁLCULOS

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

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

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

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

Fatores de conversão

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Vitamina B1 (Tiamina pirofosfato, TPP)	x 2,357	x 0,424
Vitamina B6 (Piridoxal-5'-fosfato, PLP)	x 4,046	x 0,247

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibração e monitoramento da precisão e exatidão das análises:

Artigo	Produto	Apresentação
52003	Padrão de Calibração de Vitaminas B1/B6 em Sangue Total (liof.)	5 x 1mL
0164	Controle de Vitaminas B1/B6 em Sangue Total, Bi-Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Analito	Matriz	Recuperação [%]
Vitamina B6 (PLP)	Sangue total	88
	Plasma	102
Vitamina B1 (TPP)	Sangue total	92
	Plasma	104
Padrão Interno 2	Sangue total	119

A recuperação foi determinada em amostras de sangue total fortificadas e diluições de padrões.

Linearidade/limite de quantificação:

Análito	Matriz	Limite de quantificação ($\mu\text{g/L}$)	Faixa linear (até pelo menos) ($\mu\text{g/L}$)
Vitamina B6 (PLP)	Sangue total	4,5	500
	Plasma	0,5	500
Vitamina B1 (TPP)	Sangue total	2,0	750

*O limite de quantificação depende do detector utilizado.

Precisão intra-ensaio:

Análito	Matriz	Coeficiente de variação (%) (concentração em $\mu\text{g/L}$)		
PLP	Sangue total	0,7 (11,4)	1,7 (17,0)	0,8 (25,5)
	Plasma	1,5 (6,26)	1,6 (12,0)	2,3 (19,7)
TPP	Sangue total	1,3 (24,2)	2,1 (39,3)	0,9 (93,6)

Precisão inter-ensaio:

Análito	Matriz	Coeficiente de variação (%) (concentração em $\mu\text{g/L}$)		
PLP	Sangue total	2,3 (11,4)	1,5 (17,0)	2,9 (25,5)
	Plasma	5,2 (6,26)	1,8 (12,0)	3,0 (19,7)
TPP	Sangue total	2,0 (24,2)	1,7 (39,3)	2,3 (93,6)

VALORES DE REFERÊNCIA

	[$\mu\text{g/L}$]	[nmol/L]
Vitamina B1 (TPP) em sangue total	28 - 85	66,5 - 200
Vitamina B6 (PLP) em plasma-EDTA	5 - 30	20 - 121
Vitamina B6 (PLP) em sangue total heparinizado	8,7 - 27,2	35 - 110

LITERATURA

- Bertelsmann Stiftung (Hrsg). Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine - Klinische Aspekte und chemische Analyse, Verlag Bertelsmann Stiftung Gütersloh (1997)
- Isler O, Brubacher G, Ghisla S, Kräutler B. Vitamine II. 2. Aufl, Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1988).
- Greiling H, Gressner AM (Hrsg). Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Aufl, Schattauer Verlag Stuttgart (1995).
- Baltes W. Lebensmittelchemie. 2. Aufl, Springer Verlag Berlin (1989).
- Brönstrup A, Pietrzik K. (1996) The role of homocysteine and Bvitamins in the development of atherosclerosis. VitAminSpur 11: 85-90.
- Leklem JE. In: Leklem JE, Reynolds RD (eds) Clinical and physiological applications of vitamin B6. Current topics in nutrition and disease, vol 19: 3-28, Alan R. Liss Inc New York (1988).
- Reynolds TM, Brain A. (1992) A simple internally-standardised isocratic HPLC assay for vitamin B6 in human serum. J Liq Chromatogr Relat Technol 15(5): 897-914.
- Tryfiates GP, Bishop RE, Murgo AJ. (1991) Vitamin B6 and cancer: a novel pyridoxal 5-phosphate conjugate in tumor cells and blood of cancer patients. Anticancer Res 11(3): 1281-4.
- Biesalski H, Schrezenmeir J, Weber P, Weiß H (Hrsg). Vitamine. Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1997).
- Yasuda K, Okuda K, Endo N, Ishiwatari Y, Ikeda R, Hayashi H, Yokozeki K, Kobayashi S, Irie Y. (1995) Hypoaminotransferasemia in patients undergoing long-term hemodialysis: clinical and biochemical appraisal. Gastroenterology 109(4): 1295-300.
- Wilson RG, Davis RE. Clinical Chemistry of Vitamin B6. In: Schwartz, MK (ed.) Advances in Clinical Chemistry, vol 23: 1-68, Academic Press New York, London (1983).

- Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, Band 1, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2013).
- Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).
- den Ottolander. Diagnostisch Kompas. Ziekenfondsraad Amstelveen, Holland (1997).

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 10350840189

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

www.biosys.com.br