

## 25-OH-VITAMIN D3 / D2 IN SERUM / PLASMA – HPLC

### VITAMINAS D3/D2 EM SORO/PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitaminas D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> em Soro/Plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
38038	Kit Reagente para Análise de Vitaminas D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> em Soro/Plasma (100 análises)

**Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitaminas D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> em Soro/Plasma por HPLC no site [www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br).**

#### SUMÁRIO

Este Kit Chromsystems permite uma análise segura e simultânea dos principais metabólitos das Vitaminas D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> em soro ou plasma, empregando um sistema isocrático de HPLC com detector UV. É uma ferramenta importante no diagnóstico clínico de osteoporose e de problemas de mineralização óssea, assim como na monitoração de terapias por deficiência de Vitamina D. O preparo da amostra é simples e eficiente, garantindo a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

#### MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV.

#### PRINCÍPIO

Os interferentes presentes na amostra são eliminados por uma eficiente etapa de precipitação, com adição de reagente específico, além de uma seletiva etapa de aplicação em colunas de preparação de amostras. A aplicação em coluna também promove a concentração dos analitos em solução antes da análise cromatográfica. Após a injeção no sistema de HPLC, a detecção UV permite a leitura de absorbância de 25-OH-Vitamina D<sub>3</sub> e 25-OH-Vitamina D<sub>2</sub> em comprimento de onda selecionado (265 nm).

#### REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Acetonitrila	1 x 1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Metanol <50%, pH 5-7	1 x 5 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Acetonitrila e ácido tricloracético	1 x 50 mL
Tampão de Lavagem 1 (Wash Buffer 1)	Metanol	1 x 200 mL
Tampão de Lavagem 2 (Wash Buffer 2)	Metanol e acetonitrila	1 x 7,5 mL
Tampão de Eluição (Elution Buffer)	Metanol	1 x 20 mL
Colunas de preparação (Sample Clean Up Columns)	Dióxido de silício modificado. Pó seco.	2 x 50 unidades
Frascos de reação (Reaction vials)	-	1 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 outros reagentes Chromsystems disponíveis separadamente:

Artigo	Produto	Temperatura
38031	Fase móvel	+18 a +30°C
38004	Padrão Interno	Abaixo de -18°C
38005	Reagente de Precipitação	+18 a +30 °C
38006	Tampão de Lavagem 1	+18 a +30 °C
38007	Tampão de Lavagem 2	+18 a +30 °C
38009	Tampão de Eluição	+18 a +30 °C
38008	Colunas de preparo	+18 a +30 °C

#### MATERIAIS REQUERIDOS, MAS, NÃO FORNECIDOS

38033	Padrão de Calibração de 25-OH-Vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> em Soro (liofilizado)	Abaixo de -18°C
0028	Controle de 25-OH-Vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> em Soro, Bi-Nível (I+II)	Abaixo de -18°C

#### CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

#### GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. 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, os tampões de lavagem 1 e 2, o tampão de eluição e os resíduos de preparação das amostras contêm solventes orgânicos e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

#### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

**Fase Móvel:** pronto para uso.

**Reagente de Precipitação:** pronto para uso.

**Tampão de Lavagem 1:** pronto para uso.

**Tampão de Lavagem 2:** pronto para uso.

**Tampão de Eluição:** pronto para uso.

**Padrão Interno:** pronto para uso.

## MATERIAIS REQUERIDOS MAS, NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 38130).  
Padrão de Calibração em Soro, liofilizado (Chromsystems art. 38033).

Controle de 25-OH-Vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub> em Soro, Bi-Nível (I+II) (Chromsystems art. 0028).

Água grau HPLC.

Acetonitrila e Metanol grau HPLC.

Centrífuga.

Material geral de laboratório.

## AMOSTRA

São usadas amostras de soro ou plasma para esta análise. Não é recomendado o uso de tubos de coleta contendo separadores em gel para a coleta do sangue. Alguns tipos de géis podem absorver os analitos e diminuir suas concentrações em amostras de soro. Alguns géis também podem causar picos interferentes.

**Estabilidade das amostras:** as amostras coletadas (soro ou plasma) são estáveis por 3 dias em temperatura ambiente e por até 1 semana se mantidas refrigeradas (+2 a +8°C). Recomenda-se manter as amostras refrigeradas durante o transporte. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 1 ano), conservar em temperatura abaixo de -18°C.

**Estabilidade das amostras preparadas:** as amostras preparadas são estáveis por 1 semana em temperatura ambiente ou por aproximadamente 2 semanas refrigeradas (+2 a +8°C), ou abaixo de -18°C, protegidas da luz e armazenadas em tubos de vidro.

## PROCEDIMENTOS DO TESTE

### Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção de 25µL (10-50µL)  
Tempo de corrida de 12 min.  
Detector UV: 265 nm  
Fluxo: 0,7 mL/min  
Temperatura da Ambiente (aprox. 25 °C)  
coluna:  
Limpeza do injetor: Acetonitrila 1:1 Água grau HPLC

### Procedimento de preparo de amostras:

O preparo das amostras deve ser realizado sem interrupção. Utilizar os frascos de reação que acompanham o kit, para que as amostras sejam protegidas da exposição à luz ambiente.

1. Transferir 500µL de soro/plasma (calibradores, controles e amostras) e 50µL de padrão interno para frascos de reação âmbar (protegidos da luz), misturar brevemente.
2. Adicionar 500µL de reagente de precipitação, misture (vortex) por 20 s.
3. Incubar por 10 minutos a +4°C.
4. Centrifugar por 5 min a 15000 x g.
5. Aplicar imediatamente todo o sobrenadante em uma coluna de preparo identificada e elua por centrifugação (400 x g, por 1 min) ou sucção, descartando o efluente.
6. Lavar a coluna com 2 x 1mL do Tampão de Lavagem 1 e eluir por vácuo ou centrifugação (400 x g, por 1 min), descartando o efluente.
7. Lavar a coluna com 75 µL do Tampão de Lavagem 2 e eluir o conteúdo por vácuo ou centrifugação (400 x g, por 1 min), descartando o efluente.
8. Troque o frasco de coleta, e aplique 200µL do Tampão de Eluição na coluna, eluindo por centrifugação (400 x g, por 1 min) ou sucção. O eluato deve ser coletado em tubos de vidro.
9. Diluir o eluato com 20µL de água grau HPLC e misturar.
10. Injetar 25µL do eluato diluído no sistema de HPLC.

Controles devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
25-OH-Vitamina D <sub>3</sub>	4,2
25-OH-Vitamina D <sub>2</sub>	4,6
Padrão Interno	7,1

## CÁLCULOS

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A<sub>amostra</sub>

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = Calibrador

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS<sub>Amostra</sub>

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS<sub>Calibrador</sub>

Concentração C do analito A no calibrador = \*C<sub>Calibrador</sub>

\* A concentração do analito no calibrador depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto. Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao padrão de calibração e às amostras de pacientes, a concentração do padrão interno pode ser considerada como "1" para fins de cálculo.

Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
25-OH-vitamina D <sub>3</sub>	x 2,496	x 0,4007
25-OH-vitamina D <sub>2</sub>	x 2,423	x 0,4127

## CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
38033	Padrão de Calibração de 25-OH-Vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> em Soro (liofilizado)	5 x 2 mL
0028	Controle de 25-OH-Vitamina D <sub>3</sub> /D <sub>2</sub> em Soro, Bi-Nível (I+II)	2 x 5 x 2 mL

## DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

### Recuperação:

25-OH-Vitamina D <sub>3</sub>	86%
25-OH-Vitamina D <sub>2</sub>	87%
Padrão Interno	79%

Linearidade / limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação [µg/l] aprox.*	Faixa linear de pelo menos até [µg/l]
25-OH-Vitamina D <sub>3</sub>	1,4	250
25-OH-Vitamina D <sub>2</sub>	1,1	250

\*O limite de quantificação depende do detector empregado!

### Precisão intra-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação [%] (concentração µg/l)		
	n=10		
25-OH-Vitamina D <sub>3</sub>	3,0 (24,9)	0,9 (58,9)	1,9 (89,9)
25-OH-Vitamina D <sub>2</sub>	1,8 (22,6)	0,8 (57,5)	1,9 (84,3)

## Precisão inter-ensaio:

Análito	Coeficiente de variação [%] (concentração µg/l)		
	n=100		
25-OH-Vitamina D <sub>3</sub>	3,3 (25,2)	0,9 (58,9)	2,3 (90,4)
25-OH-Vitamina D <sub>2</sub>	4,6 (23,2)	0,8 (57,5)	1,9 (84,5)

## VALORES DE REFERÊNCIA

A concentração de 25-OH-Vitamina D<sub>3</sub> depende de muitos fatores, por exemplo local de residência (latitude), estação do ano, camada de ozônio, idade, sexo e pigmentação da pele, sendo assim difícil estabelecer um valor de referência. Os valores apresentados abaixo são sugestões baseadas na literatura.

Valor de referência	Concentração em soro (µg/L)
Reserva de armazenamento suficiente	41 - 100
Reserva insuficiente	21 - 40
Suprimento insuficiente	10 - 20
Deficiência	< 10
Tóxico	> 100

Geralmente, nenhuma concentração significativa de 25-OH-Vitamina D<sub>2</sub> é encontrada em amostras de soro de pacientes que não estejam em tratamento com suplementos de vitamina D.

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características de sua população analisada.

## INTERFERENTES CONHECIDOS

Em amostras de soro/plasma de bebês e crianças abaixo de 1 ano de idade, as formas diastereoisoméricas (epímeros C3) de 25-OH-vitamina D3 e 25-OH-vitamina D2 foram determinadas em concentrações significantes [7]. Para crianças mais velhas e adultos, este fenômeno não foi observado. Este método não pode distinguir estas formas descritas. Assim, a co-determinação dos epímeros C3 pode levar, em alguns casos, a falsos níveis altos de 25-OH Vitamina D em bebês e crianças abaixo de 1 ano de idade.

## LITERATURA

1. Biesalski H. K., Scherezenmeir J., Weber P., Weiß H., Vitamin: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, ISBN 3-13-118401-9 (1997).
2. Collins D., Jasaní C., Fogelman I., Swaminathan R., Osteoporos. Int. 8, 110-114 (1998).
3. Lips P. Vitamina D physiology, progress in Biophysics and molecular biology, 92(1), 4-8 (2006).
4. Hart G. R., Furniss J. L., Laurie D., Durham S. K. Measurement of vitamin D status: background, clinical use and methodologies, Clinical Laboratory, 52(7-8), 335-343 (2006).
5. Goltzman D, Bikle DD, Drezner MK. (2006) Plenary symposium: Vitamin D: From bench to Bedside. The American Society for Bone and Mineral Research, 28<sup>th</sup> Annual Meeting Webcast.
6. Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zawta B. Die Qualität diagnostischer Proben, Empfehlungen der Arbeitsgruppe Präanalytik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 5<sup>th</sup> edition (2005).
7. Singh R. J., Taylor R. L., Reddy G. S., Grebe S. K. G. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 91(8), 3055-3061 (2006).
8. Thomas L. Labor und Diagnose, 8. Aufl, Verlag TH-Books, Frankfurt/Main (2012).

## 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 10350840162

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

[www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br)