

**β-CAROTENE IN SERUM/PLASMA - HPLC****β-CAROTENO EM SORO/PLASMA – HPLC**

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de β-caroteno em soro/plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
32000	Kit Reagente para Análise de β-Caroteno em Soro/Plasma (100 análises)

**Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de β-Caroteno em soro/plasma por HPLC no site [www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br).**

**SUMÁRIO**

O kit de reagentes da Chromsystems para análise de β-caroteno em soro/plasma é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usada em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de α-, cis-β- e trans-β-caroteno totais em amostras de soro e plasma através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O kit é designado para o teste em pacientes cujo nível de β-caroteno requer monitoramento.

O procedimento de preparo das amostras combina uma rápida etapa de precipitação e de extração. A elevada estabilidade das amostras permite a realização de vários lotes de análises, sem comprometer a confiabilidade dos resultados.

**MÉTODO**

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

**PRINCÍPIO**

O β-caroteno é extraído da amostra de soro por uma precipitação/extração combinada. O resultado da extração é solúvel na fase móvel e pronto para ser injetado, portando não é necessária etapa de evaporação.

Para uma determinação precisa, um padrão interno derivado de carotenoide é utilizado. Somente um comprimento de onda é utilizado para detecção.

**REAGENTES**

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano	1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução de dimetil-beta-caroteno 250 nmol/L em etanol	1 x 5 mL
Padrão de Calibração (Calibration Standard)	Soro humano contendo β-caroteno	5 x 0,5 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de etanol	1 x 5 mL
Tampão de Extração (Extraction Buffer)	Solução de butanol e acetato de etila	1 x 20 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:

Artigo	Produto	Temperatura
32001	Fase móvel	+18 – 30°C
32003	Padrão de Calibração de β-Caroteno em Soro (liofilizado)	Abaixo de -18°C
32004	Padrão Interno	Abaixo de -18°C
32005	Reagente de Precipitação	+18 – 30 °C
32006	Tampão de Extração	+18 – 30°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, o tampão de extração 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.

**Padrão Interno:** pronto para uso.

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

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

**Padrão de Calibração de β-Caroteno em Soro (liofilizado):**

O calibrador (artigo 32003) é rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir, pipetar exatamente 0,5 mL de água tipo I 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. Evitar a exposição direta à luz. O calibrador reconstituído é estável por 5 dias se protegido da luz e mantido refrigerado, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 2 meses), conservar a -18°C. A concentração real depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto.

### MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 32100).  
Padrão de calibração de  $\beta$ -Caroteno em Soro (Iiof.) (Chromsystems art. 32003)  
Controle de  $\beta$ -Caroteno em Soro, Bi-Nível (I+II) (Chromsystems art. 0025).  
Água tipo I ou grau HPLC.  
Centrífuga.  
Metanol ou Acetonitrila grau HPLC.  
Material geral de laboratório.

### AMOSTRA

Deverão ser analisadas amostras de soro ou plasma. Antes de coletar o sangue, evite o consumo de cenouras e laranjas. Níveis aumentados podem ser encontrados após o uso de bronzeadores e níveis diminuídos após a utilização de canamicina, metformina neomicina e contraceptivos orais. O soro deve ser enviado protegido da luz e não deve ser hemolítico. O envio e a análise devem ser feitos no mesmo dia, ou então congele as amostras e faça o envio com as amostras congeladas.

**Estabilidade da amostra:** as amostras coletadas desta forma são estáveis por 5 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre +2 e +8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a -18 °C.

**Estabilidade das amostras preparadas (eluatos):** as amostras preparadas são estáveis por 2 dias em temperatura ambiente e por até 1 semana se mantidas refrigeradas, em temperatura entre +2 e +8°C, protegidas da luz e em frascos de vidro. Para maiores períodos de armazenagem, (até 4 semanas) congelar à -18°C.

### PROCEDIMENTOS DO TESTE

#### Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção de 50 $\mu$ L, tempo de corrida analítica 10 min.
Detector UV:	Comprimento de onda de 453 nm
Fluxo:	1,5 – 1,8 ml/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aprox. 25 °C)
Solução de limpeza da agulha do injetor:	Metanol puro ou acetonitrila

#### Procedimento de preparo de amostras:

Utilizar os tubos de reação que acompanham o kit, para que as amostras sejam protegidas da exposição à luz ambiente. Em um frasco de reação âmbar, pipetar:

1. 100  $\mu$ L do soro/plasma (calibrador, controle, amostra)
2. + 50  $\mu$ L de padrão interno, homogeneizar,
3. + 50  $\mu$ L de reagente de precipitação, misturar com vórtex, (não centrifugar!),
4. + 200  $\mu$ L de tampão de extração, misturar com vórtex por 30s.,
5. Centrifugar por 10 min a 16.000 g,
6. Transferir o sobrenadante para um frasco de vidro\* protegido da luz, injetar 50  $\mu$ L no sistema de HPLC.

A precisão e exatidão da análise devem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais a cada corrida.

\*Nem todo frasco de plástico é adequado para armazenar o extrato, utilizar frasco de vidro se houver dúvida.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Criptoxantina	3.1
Padrão Interno	3.8
Isômeros de licopeno	5.2
$\alpha$ -Caroteno	7.7
trans- $\beta$ -Carotenos totais	8.3
cis- $\beta$ -Caroteno	9.0

### CÁLCULOS

$$C_{\text{Analito}} [\text{ng/mL}] = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times *C_{\text{Calibrador}}$$

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = Aamostra

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 = ISAmostra

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = ISCalibrador

Concentração C do analito A no calibrador = \*CCalibrador

\* A concentração do analito depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador. 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	ng/mL para nmol/l	nmol/l para ng/ml
Trans- $\beta$ -Caroteno	x 1.863	x 0.537

### CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
32003	Padrão de calibração de $\beta$ -Caroteno em soro (liofilizado)	5 x 0,5mL
32004	Padrão Interno	5mL
0025	Controle de $\beta$ -Caroteno em Soro, bi-Nível (I+II)	2 x 5 x 2mL

### DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

#### Linearidade e Limite de Quantificação:

O método é linear a partir do limite designado de quantificação até o limite superior.

Analito	Limite de quantificação aprox. [ng/ml]	Faixa linear até pelo menos [ng/ml]
trans- $\beta$ -caroteno totais	10	3000

#### Recuperação:

A taxa de recuperação de trans- $\beta$ -carotenos totais e do padrão interno é maior ou igual a 90%.

#### Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio e inter-ensaio foi realizada a partir da média de múltiplas amostras, analisadas em diferentes concentrações.

Precisão intra-ensaio n = 8	Coeficiente de variação (%) / Concentração (mg/L)		
	trans-β-Carotenos totais	4,6 / 68	2,1 / 181
	1,7 / 643	1,8 / 1987	1,9 / 3667
Precisão inter-ensaio n = 20	Coeficiente de variação (%) / Concentração (ng/mL)		
	trans-β-Carotenos totais	4,2 / 326	4,1 / 995

#### VALORES DE REFERÊNCIA

Substância	Matriz	Faixa de Referência	Fonte
β-caroteno	Soro	40-322 ng/ml	[7]
β-caroteno	Soro	67-228 ng/ml (25º e 75º percentis da população de estudo)	[8]

Também existem valores altos citados (acima de 1250 ng/mL). Por um lado, isso ocorre devido a diferenças da população e por outro lado devido as diferentes metodologias para sua determinação além do HPLC, por exemplo ensaios fotométricos, que não são adequados os trans-β-carotenos seletivamente na amostra com outros carotenoides.

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

#### LITERATURA

1. H. Faure, V. Fayol, C. Galabert, F. Nabet et al. Ann Biol Clin (Paris), 1999, 57(2), 169-83.
2. J. E. Mason, J. M. Gaziano et al. Journal of the American College of Nutrition, 1993, 12(4), 426-32.
3. G. S. Omenn, G. E. Goodman, M. D. Thornquist et al. The New England Journal of Medicine, 1996, 334(18), 1150-55.
4. D. A. Hughes, A. J. Wright, P. M. Finglas et al. J Lab Clin Med, 1997, 129(3), 309-17.
5. H. Biesalski, J. Schrezenmeier, P. Weber, H. Weiß (Herausg.), Vitamine, 1997, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
6. Deutsches Ärzteblatt, April 2000, 97(16), C-810.
7. F. E. Krapf, W. P. Bieger, F. W. Tiller. LaborDatenBuch (1995) Urban & Schwarzenberg, Munich.
8. S. Mayne, B. Cartmel, F. Silva et al. American Journal of Clinical Nutrition, 1998, 68(3), 642-647.

#### 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 10350840180**

**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)**