

VITAMIN B1 (THIAMINDIPHOSPHATE) IN WHOLE BLOOD-HPLC VITAMINA B1 EM SANGUE TOTAL – HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B₁ em Sangue Total por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
35000	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₁ em Sangue Total por HPLC, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitamina B₁ em Sangue Total por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este kit de reagentes permite uma determinação rápida, simples e específica da tiamina pirofosfato (TPP), forma fisiologicamente ativa da Vitamina B₁, empregando um sistema isocrático de HPLC com detector de fluorescência. O preparo da amostra inclui uma etapa de precipitação após extração e uma subsequente derivatização, para permitir a detecção por fluorescência, sem o uso de colunas de preparação.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência.

PRINCÍPIO

O preparo da amostra se restringe a etapas de extração e de precipitação, seguida da derivatização da vitamina B₁ no frasco de reação. A amostra derivatizada é analisada utilizando detector de fluorescência com comprimento de onda variável.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase Móvel (Mobile Phase)	Metanol	1 x 1000 mL
Tampão de Extração (Extraction Buffer)	Metanol	1 x 10 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Ácido perclórico	1 x 30 mL
Reagente de Derivatização 1 (Derivatization Reagent 1)	Hexacianoferrato tripotássico	5 x 0,3 mL
Reagente de Derivatização 2 (Derivatization Reagent 2)	Metanol Hidróxido de sódio	1 x 20 mL
Tampão de Estabilização (Stabilization Buffer)	Metabisulfito de sódio	1 x 10 mL
Tampão de Neutralização (Neutralization Buffer)	Ácido fosfórico	1 x 10 mL
Frascos de Reação (Reaction vials)	Frascos vazios	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 apresenta a temperatura de armazenagem dos reagentes do kit.

Artigo	Produto	Armazenamento
35021	Fase Móvel	+18° a +30°C
37003	Tampão de Extração	+18° a +30°C
37004	Reagente de Precipitação	+18° a +30°C
35005	Reagente de Derivatização 1 (liofilizado)	+18° a +30°C
35006	Reagente de Derivatização 2	+18° a +30°C
35007	Tampão de Estabilização	+2° a +8°C
35009	Tampão de Neutralização	+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 e o Reagente de Derivatização 2 contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livres de halogênio. O Reagente de Precipitação, o Tampão de Neutralização e os resíduos de amostras preparados contêm ácidos fortes. Neutralize as soluções e descarte em um contêiner para soluções salinas. As soluções mencionadas não devem ser descartadas juntamente com lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com as exigências locais e nacionais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Tampão de Extração: pronto para uso.

Reagente de Precipitação: pronto para uso.

Tampão de Neutralização: pronto para uso.

Tampão de Estabilização: pronto para uso.

Reagente de Derivatização 1: reconstitua o conteúdo do frasco do Reagente de Derivatização 1 (art. 35005) com exatamente 0.3 ml de água destilada. Sob refrigeração (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de aproximadamente 2 semanas.

Reagente de Derivatização 2: pronto para uso.

Mix de Derivatização:

Misture 100 µl do Reagente de Derivatização 1 com 2.0 ml do Reagente de Derivatização 2 (art. 35006). Esta mistura (mix de derivatização) na proporção 1:20 está pronta para o uso para o preparo das amostras.

Para cada amostra, 200 µl da mistura de derivatização são usados no preparo.

Nota: O mix de derivatização deve ser preparado imediatamente antes do preparo das amostras. A temperatura ambiente, a estabilidade é de pelo menos 12 horas.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art.35110)
Padrão de Calibração de Vit. B₁/B₂ em Sangue Total (Chromsystems art. 37008)
Controle de Vit. B₁/B₂ em Sangue Total, Bi-Nível (I + II) (Chromsystems art. 0033)
Centrífuga para microtubos.
Água tipo I ou HPLC.
Metanol grau HPLC.
Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

O material utilizado é sangue total-EDTA, suspensão de eritrócitos. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A coleta deve ser realizada com garroteamento leve, tendo o cuidado de evitar hemólise.

Estabilidade das amostras: Em frascos fechados e protegidos da exposição à luz, as amostras são estáveis por 24 horas entre +2° a +8°C. Amostras não analisadas imediatamente devem ser mantidas em temperatura <-18 °C e são estáveis por até 6 meses.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatoss): As amostras preparadas são estáveis em temperatura entre +2° a +8°C por aproximadamente 3 dias.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção 50 µl, tempo de corrida analítica 6 min. O compartimento deve ser protegido da luz.
Razão de fluxo:	1.0 ml/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (aprox. 20°C)
Detector fluorescência:	EX=367 nm, EM 435 nm
Solução de limpeza da agulha (injetor):	Água destilada com no máximo 5% de metanol

Procedimento de Preparo das Amostras:

Em um frasco de reação âmbar, pipetar:

1. 200 µL de amostra (sangue total-EDTA, calibrador ou controle)
+ 100 µL de Tampão de Extração.
2. Agitar por 2 seg. (vortex).
3. Acrescentar 300 µL de Reagente de Precipitação.
4. Agitar por 30 seg. (vortex).
5. Centrifugar por 5 min. a 9.000 g

Nota: Importante! Para obter uma derivatização satisfatória, não altere a seqüência dos passos seguintes.

6. Em um novo frasco de reação âmbar (protegido da luz), pipetar 200 µL do mix de derivatização (veja Preparo dos Reagentes).
7. Adicionar 100 µL do sobrenadante e agitar brevemente.
8. Acrescentar 100 µL do Tampão de Neutralização.
9. Acrescentar 100 µL do Tampão de Estabilização e agitar brevemente.
10. Deixar em repouso por 20 min.
11. Injetar 50 µL no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção
Vitamina B ₁ (tiamina pirofosfato)	Aprox. 3.2 min

CÁLCULOS

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

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_{calibrador}

Concentração do analito A no calibrador = C_{calibrador}

Valores de referência:

As seguintes faixas de referência foram retiradas da literatura [5].

Analito	Faixa de Referência	
	[µg/l]	[nmol/l]
Tiamina pirofosfato (TPP) *	28-85	66,5-200

*Valores convertidos a partir da tiamina

Fatores de conversão:

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Vitamina B ₁ (Tiamina pirofosfato, TPP)	x 2,357	x 0,424

CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
37008	Padrão de Calibração de Vitaminas B ₁ /B ₂ em Sangue Total	5 x 1mL
0033	Controle bi-nível de Vitaminas B ₁ /B ₂ em sangue total	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir do slope da curva de calibração de amostras de sangue total e soluções de padrão diluídas.

Analito	Recuperação [%]
Tiamina pirofosfato	91

Linearidade e menor limite de quantificação (LLOQ):

A linearidade foi determinada por múltiplos preparos da amostra de sangue. O limite de quantificação foi determinado pela diluição definida do controle nível I (0034) com solução de fosfato tamponada com cloreto de sódio. Este método é linear a partir do menor limite de quantificação (LLOQ) a concentração indicada.

Analito	LLOQ [µg/l]	Faixa linear [µg/l]
Tiamina pirofosfato	0.8	Até pelo menos 750

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada a partir da média e coeficiente de variação de múltiplos preparos (n=10) de uma mesma amostra e a determinação da concentração de tiamina pirofosfato em 3 diferentes concentrações:

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg /)		
	n=10	n=10	n=10
Tiamina pirofosfato	2.8 (24.5)	4.0 (93.3)	4.9 (35.6)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir de 10 preparos e determinação da concentração do analito em *pool* de sangue total em 10 diferentes séries de testes.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg / L)		
	n = 99	n = 99	n = 100
Tiamina pirofosfato	4.6 (24.0)	4.7 (96.0)	4.3 (36.5)

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 10350840142

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

www.biosys.com.br

LITERATURA

1. Bertelsmann Stiftung (Hrsg). Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse, Verlag Bertelsmann Stiftung Gütersloh (1997).
2. Isler O, Brumacher G, Ghisla S, Kräuter B. Vitamine II. 2. Aufl, Georg Thieme Verlag Stuttgart, (1988).
3. Greiling H, Gressner AM (Hrsg). Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. Schattauer Verlag Stuttgart, (1987).
4. Baltes W. Lebensmittelchemie. 2. Aufl, Springer Verlag Berlin (1989).
5. Krapf PE, Bieger WP, Tiller FW. Labordaten-Buch S. 361. Verlag Urban & Schwarzenber München (1995).

Símbolos Usados

Fabricante



Limites de temperatura



Diagnóstico in vitro



Cuidado, consulte documentos anexos



Consulte instruções de uso



Material Reciclável



Não rejeitar diretamente para o ambiente



Lote



Data de Fabricação



Validade



Risco Biológico



Altamente tóxico



Corrosivo



Nocivo