

Instruções de Uso

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

VITAMIN B1 AND VITAMIN B6 IN WHOLE BLOOD – AUTOMATED SAMPLE PREPARATION - UHPLC

VITAMINA B₁ E B₆ EM SANGUE TOTAL – PREPARO AUTOMATIZADO DE AMOSTRAS - UHPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B₁ e Vitamina B₆ em Sangue total por UHPLC com preparo automatizado de amostras.

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

Artigo	Apresentação
52952/UHPLC/F	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₁ e Vitamina B ₆ em Sangue Total, 960 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitamina B₁ e Vitamina B₆ em sangue total – preparo automatizado de amostras - UHPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

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 sangue total numa única corrida, com o mesmo preparo de amostra e sem derivatização pós-coluna.

A análise é realizada num sistema UHPLC com bomba binária e detector de fluorescência programável. A utilização de dois padrões internos garante alta precisão e segurança na quantificação dos analitos.

O preparo de amostra é completamente realizado em placas de 96 poços; assim, é possível a análise de até 96 amostras em menos de 2 horas.

MÉTODO

Cromatografia líquida de ultra alto desempenho (UHPLC) 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 3 minutos. A inclusão de um padrão interno feito sob medida no método garante alta precisão e segurança na quantificação dos analitos.

REAGENTES

Componentes e composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase Móvel A (Mobile Phase 1)	Solução de metanol	2 x 1000 mL
Fase Móvel B (Mobile Phase 2)	Solução de metanol	1 x 1000 mL
Reagente de Extração (Extraction Reagent)	Ácido perclórico	2 x 75 mL
Solução de Preparo (Prep Solution)	Solução aquosa de fosfato de potássio dibásico	3 x 25 mL
Finalizador 1 (liof.) (Finalizer 1)	Hexacianoferrato de potássio III	2 x 5 x 0,25 mL
Finalizador 2 (Finalizer 2)	Solução aquosa de cianeto de potássio	1 x 50 mL
Tampão de Diluição (Dilution Buffer)	Solução aquosa com conservante microbiológico	1 x 100 mL

Reagente necessário, fornecido separadamente (MS: 10350840309)

Mix de Padrão Interno (Internal Standard Mix)	Solução ácida com piridoxamina e sulfato tiamina	1 x 50 mL
---	--	-----------

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.

Artigo	Produto	Armazenamento
52911	Fase Móvel A	+18 a +30 °C
52922	Fase Móvel B	+18 a +30 °C
52705	Reagente de Extração	+18 a +30 °C
52706	Solução de Preparo	+18 a +30 °C
52707	Finalizador 1	+18 a +30 °C
52708	Finalizador 2	+18 a +30 °C
52709	Tampão de Diluição	+18 a +30 °C

Reagente necessário, fornecido separadamente (MS: 10350840309)

52744	Mix Padrão Interno	+2 a +8°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 e de acordo com os regulamentos locais.

Os Finalizadores 1 e 2 contêm cianeto. O Reagente de Extração contém ácido forte. As soluções devem ser neutralizadas e descartadas em um recipiente para soluções salinas. Resíduos de amostras de pacientes, eluatos de amostras, controles e calibradores devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel A: pronto para uso.

Fase Móvel B: pronto para uso.

Reagente de Extração: pronto para uso.

Solução de preparo: pronto para uso.

Reagente Finalizador 1: reconstitua o conteúdo do frasco do Finalizador 1 (artigo 52707) com exatamente 250 µl de água destilada. Mantenha refrigerado (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de aproximadamente 4 semanas.

Reagente Finalizador 2: pronto para uso.

Tampão de Diluição: pronto para uso.

Solução Finalizadora:

Primeiro reconstitua o conteúdo do frasco do Finalizador 1. Subsequentemente, adicione 5.0 ml do Finalizador 2 (artigo 52708) e misture (proporção 1:20).

Para o preparo de amostra, 50 µl desta mistura (=solução finalizadora) são usados por amostra. A solução é suficiente para exatamente uma placa de 96 poços.

A solução finalizadora deve ser preparada imediatamente antes do preparo de amostras. Esta solução é estável por até 2 dias se mantida protegida da luz e refrigerada (+2 a +8°C). Se a solução é aberta e não refrigerada no dispositivo de manuseio de líquidos, ela é estável durante o período de uma sequência do programa. Se várias placas forem preparadas de uma só vez, a solução finalizadora deverá ser preparada frescamente para cada placa.

Reagente necessário, fornecido separadamente (MS: 10350840309)

Mix Padrão Interno: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica UHPLC equilibrada (Chromsystems art.52210)

Padrão de Calibração de Vitaminas B₁/B₆ em Sangue Total (Chromsystems art. 52003)

Controle de Vitamina B₁/B₆ em Sangue Total, Bi-Nível (I + II) (Chromsystems art. 0164)

Água tipo I ou HPLC

Metanol grau HPLC

Material Geral de Laboratório

Placa de filtro com 96 poços

Placa de coleta com 96 peças

Selos adesivos perfuráveis para placa de 96 poços

Preparo de amostras com dispositivo de manuseio de líquidos:	Preparo de amostras com pipeta multicanal:
Dispositivo de manuseio de líquidos com: - Agitador para placa de 96 poços - Centrífuga com rotor para placa de 96 poços (velocidade mínima de 2000 x g) - Incubadora para placa de 96 poços - Detector de coágulos	- Pipeta multicanal (8-canaís ou 12-canaís) - Dispensador manual (Multi) - Agitador para placa de 96 poços - Centrífuga com rotor para placa de 96 poços (velocidade mínima de 2000 x g) - Incubadora para placa de 96 poços

AMOSTRA

O material utilizado é sangue total-EDTA ou plasma-EDTA. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A coleta deve ser realizada com garroteamento leve.

Atenção: Apesar da adição de anticoagulantes (EDTA), amostras de sangue total podem conter coágulos. A presença de coágulos pode alterar o volume de pipetagem. Quando dispositivos automáticos de manuseio de líquidos são utilizados pode ocorrer falsos resultados se o sistema não possuir ferramentas de detecção de coágulos disponíveis. Sistemas configurados com pressão monitorada tem demonstrado vantagens práticas sobre

sistemas baseados em medida de condutividade. Contate o fabricante do sistema, uma vez que a Chromsystems não pode se responsabilizar pela adequabilidade do mesmo. O kit de reagentes da Chromsystems não pode produzir resultados confiáveis ao menos que seja garantido que o volume correto de amostra é utilizado.

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 abaixo de -18 °C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): Se as placas coletoras estiverem seladas com o selo adesivo perfurável (artigo 52059), as amostras preparadas são estáveis por 1 dia a +18 a 30°C e por 7 dias a +2 a +8°C. Para armazenamento em -18°C (máximo de 7 dias) as placas de coleta devem estar bem fechadas ou o eluato deve ser transferido para um frasco de vidro que possa ser fechado.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: volume de injeção 2.5-5.0 µL

Corrida analítica de 3 min.,

Razão de fluxo: 0.7 ml/min

Temperatura da coluna: temperatura ambiente (20-25°C)

Detector de fluorescência: EX = 320 nm, EM = 415 nm; após aprox. 1.6 min. mudar para: EX = 367 nm, EM 435 nm.

Limpeza da agulha (injetor): água/metanol =95/5

Procedimento de Preparo das Amostras

A tabela abaixo indica os volumes dos reagentes utilizados para cada amostra:

Reagente	Quantidade por amostras
Amostra / Calibrador / Controle	100 µl
Mix de Padrão Interno	50 µl
Reagente de Extração	150 µl
Solução de Preparo	75 µl
Solução Finalizadora (ver cap. 5.4)	50 µl
Tampão de diluição	100 µl

Mantenha a ordem de pipetagem!

1. Pipete 100 µl de sangue total (calibrador, controle, amostras) em uma placa de coleta de 96 poços
2. Adicione 50 µl do Mix de Padrão Interno
3. Adicione 150 µl do Reagente de Extração
4. Misture por 4 minutos (1200 rpm, a 2 mm de órbita)
5. Separe o precipitado por centrifugação (3 min, 2000 x g)
6. Transfira 75 µl do supernadante para uma placa de filtro de 96 poços
7. Adicione 75 µl da Solução de Preparo
8. Adicione 50 µl na solução finalizadora (ver cap. 5.4)
9. Misturar 30 s (1200 rpm, a 2 mm de órbita)
10. Separe o precipitado por centrifugação (2.5 min, 1500 x g)
11. Incube a solução obtida a 60°C por 45 min
12. Adicione 100 µl do Tampão de Diluição, misture 30 s (1200 rpm, a 2 mm de órbita)
13. Sele a placa e transfira para o amostrador
14. Injete 2.5-5 µl do eluato no sistema de UHPLC

A pipetagem de todos os reagentes pode ser feita através do modo de multipipetagem. Para a lavagem de pipetas dedicadas é recomendado água ultrapura (0.055µS/cm, 18.2 MΩ).

Notas adicionais:

O Finalizador 2 e a solução finalizadora contém pequenas quantidades de cianeto (KCN) e devem ser usados exclusivamente para os propósitos estabelecidos neste manual.

Evitar qualquer contato direto com ácidos, já que neste caso existe o risco de formação de HCN gasoso. Assim, o Finalizador 2

e a solução finalizadora não devem ser misturados diretamente na amostra precipitada ou no Reagente de Extração.

Tenha certeza de que a temperatura das soluções atinge +60°C. Somente assim o preparo de amostras funcionará adequadamente.

Dependendo do agitador, a velocidade deva ser reduzida, se necessário, com o objetivo de prevenir vazamento. Previamente, confira a melhor velocidade com o uso de placas com água.

Gradiente:

Devido às diferenças de volume morto dos sistemas UHPLC individuais, o perfil de gradiente pode precisar de modificações e é projetado como base para otimização.

Fluxo de 0.7ml/min

Tempo (min)	% A	% B
0	100	0
0.86	100	0
0.87	50	50
1.29	50	50
1.30	0	100
2.50	0	100
2.51	0	100
3.00	0	100

Tempo de Retenção Esperado:

Analito	Tempo de Retenção (min. aprox.)
Padrão Interno 1 (PLP)	0.5
Vitamina B ₆ (PLP)	1.0
Vitamina B ₁ (TPP)	1.9
Padrão interno 2 (TPP)	2.6

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
Vitamina B ₆ (Piridoxal-5'-fosfato, PLP)	x 4.046	x 0.247

CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
52003	Padrão de Calibração de Vitaminas B ₁ /B ₆ em Sangue Total (liofilizado)	5 x 1ml
0164	Controle de Vitaminas B ₁ /B ₆ em Sangue Total, Bi-Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 ml

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Hamilton ML-Starlet IVD & Shimadzu Nexera UHPLC	
Analito	Recuperação [%]
Vitamina B ₆ (PLP)	80
Vitamina B ₁ (TPP)	96
Padrão Interno 1	104
Padrão Interno 2	104

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

Linearidade e limite de quantificação:

Hamilton ML-Starlet IVD & Shimadzu Nexera UHPLC		
Analito	Limite de quantificação ca. [µg/L]	Faixa linear Até pelo menos µg/L]
Vitamina B ₆ (PLP)	2.5	500
Vitamina B ₁ (TPP)	4	750

*O limite de detecção depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

Hamilton ML-Starlet IVD & Shimadzu Nexera UHPLC			
Analito	Coeficiente de variação [%] (na concentração em µg / L)		
	n = 10		
Vitamina B ₆ (PLP)	3.4 (9.9)	3.6 (16.4)	3.4 (25.7)
Vitamina B ₁ (TPP)	3.1 (24.6)	2.3 (43.7)	2.5 (89.7)

Tecan Evo 100 & Agilent 1290 UHPLC			
Analito	Coeficiente de variação [%] (na concentração em µg / L)		
	n = 10		
Vitamina B ₆ (PLP)	4.6 (10.8)	4.1 (19.5)	3.0 (29.1)
Vitamina B ₁ (TPP)	2.0 (26.1)	1.1 (45.1)	1.1 (99.4)

Precisão inter-ensaio:

Hamilton ML-Starlet IVD & Shimadzu Nexera UHPLC			
Analito	Coeficiente de variação [%] (na concentração em µg / L)		
	n = 100		
Vitamina B ₆ (PLP)	4.4 (10.1)	4.5 (19.4)	5.1 (27.4)
Vitamina B ₁ (TPP)	3.2 (26.6)	3.1 (48.5)	3.5 (99.4)

Tecan Evo 100 & Agilent 1290 UHPLC			
Analito	Coeficiente de variação [%] (na concentração em µg / L)		
	n = 10		
Vitamina B ₆ (PLP)	4.2 (10.8)	5.3 (19.5)	5.0 (29.1)
Vitamina B ₁ (TPP)	3.2 (26.1)	3.6 (45.1)	3.8 (99.4)

VALORES DE REFERÊNCIA

Substância	Matriz	Valores de referência	Fonte
Vitamina B ₁ (TPP)	Sangue Total	28 – 85 µg/L 66.5 – 200 nmol/L	[12]
Vitamina B ₆ (PLP)	Sangue total heparinizado	8.7 – 27.2 µg/L 35-110 nmo/L	[14]

LITERATURA

- Bertelsmann Stiftung (Editor): Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und Chemische Analyse; Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh (1997).
- Isler O., Brubacher G., Ghisla S., Kräutler B., Vitamine (2nd Ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart (1988).
- Greiling H., Gressner A. M., Lehrbuch d. Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Verlag Stuttgart (1987).
- Baltes W., Lebensmittelchemie (2nd Ed.), Springer Verlag Berlin (1989).
- Brönstrup A., Pietrzik K., Vitaminspur, 11:85 (1996).
- Leklem J. E.: Clinical and Physiological Applications of Vitamin B₆, 3 – 28 (1988).
- Reynolds T. M., Brain A., J of Liquid Chromatography, 15(5): 897 (1992).
- Tryfiates G. P., Bishop R. E., Murgo A. J., Anticancer Research, 11:1281 (1991).
- Biesalski H., Schrezenmeir J., Weber P., Weiß H. (Editor) : Vitamine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997).
- Yasuda K., Okuda K., Endo N., Ishiwatari Y., Ikeda R., Hayashi H., Yokozeki K., Kobayashi S., Irie Y., Gastroenterology, 109:1295 (1995).
- Wilson R. G., Davis R. E., Advances in Clinical Chemistry, 23, 1 (1983).
- Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, Band 1, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2013).

13. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).
14. 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 10350840309
SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br