

VITAMIN B2 (FAD, FMN, Riboflavin total) IN WHOLE BLOOD – HPLC (Vitamina B₂ em sangue total por HPLC)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B₂ (Riboflavina total, FAD e FMN) em Sangue Total por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
37000	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₂ em Sangue Total por HPLC, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções Vitamina B₂ em Sangue Total por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este método permite a simples, rápida e específica determinação do todo o status de vitamina B2 (riboflavina) e seus metabólitos ativos (Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e Flavina-5-fosfato (FMN)) em sangue total usando um sistema isocrático HPLC. Devido à sua fluorescência natural, os analitos podem ser detectados diretamente, sem desvios. A preparação da amostra é restrita a uma etapa de precipitação de proteínas eficaz imediatamente após a adição do tampão de extração e subsequente estabilização dos analitos. Uma coluna de HPLC dedicada e uma fase móvel, otimizada para a separação específica, permitem a quantificação segura e confiável

MÉTODO

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

PRINCÍPIO

A preparação da amostra se restringe a uma única etapa de precipitação de proteínas eficaz, após a adição do tampão de extração seguido da estabilização da amostra. Uma coluna HPLC selecionada e fase móvel otimizada especificamente para esta separação garantem alta precisão e segurança na quantificação dos analitos.

REAGENTES

Componentes e Composição:

Componente	Composição	Apresentação
Fase Móvel (Mobile Phase)	Solução de metanol e ácido fosfórico	1000 mL
Tampão de Extração (Extraction Buffer)	Solução de cloreto de sódio contendo titriplex III	1 x 20 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de ácido tricloracético	1 x 40 mL
Tampão de Neutralização (Neutralisation Buffer)	Solução de cloreto de sódio e acetato de sódio	1 x 10 mL
Frascos de Reação (âmbar) (Reaction vials)	-	100 unidades

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Consultar as fichas de segurança dos reagentes e tomar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

BL3155 – REV01 – 10/2021

VITAMIN B2 (FAD, FMN, Riboflavin total) IN WHOLE BLOOD – HPLC

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.

A estabilidade dos frascos em uso apresenta estabilidade garantida por pelo menos 1 ano após abertura dos mesmos, armazenados nas condições descritas abaixo:

Artigo	Produto	Armazenamento
37011	Fase Móvel	18 a 30°C
37005	Tampão de Extração	18 a 30°C
37007	Reagente de Precipitação	18 a 30°C
37099	Tampão de Neutralização	18 a 30°C
33005	Frascos de Reação	18 a 30°C

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 Precipitação e os resíduos das amostras preparadas contém ácidos inorgânicos e devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais.

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.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art.37100)
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 destilada.

Metanol grau HPLC.

Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

O material utilizado é sangue total-EDTA. 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.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): As amostras preparadas são estáveis em temperatura entre 2º a 8°C por até 2 dias.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção 50 µL
 Tempo de corrida analítica: Aprox. 9 min., protegido da luz
 Fluxo: 1,2 mL/min.
 Temperatura da coluna: Temp. ambiente (aprox. 20°C)
 Detector de fluorescência: EX = 465 nm, EM = 525 nm
 Solução de limpeza do injetor: Água grau HPLC com no máx. 5% metanol

Procedimento de Preparação das Amostras:

Em um frasco de reação âmbar:

- Pipetar as soluções a seguir em um frasco de reação âmbar e homogeneizar imediatamente por 30 segundos (vortex)
 200 µL de sangue total (ou calibrador/controle reconstituído)
 + 200 µL de Tampão de Extração
 + 400 µL de Reagente de Precipitação
- Centrifugar por 10 min. a 9.000 g
- Pipetar 100 µL de Tampão de Neutralização em um frasco para amostrador automático, e então adicionar 500 µL do sobrenadante e homogeneizar bem (vortex).
- Injetar 50 µL desta mistura no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. (minutos)
FAD	3,0 ± 0,3
FMN	4,9 ± 0,4
Riboflavina	7,9 ± 0,7

CÁLCULOS

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

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
FAD	x 1,273	x 0,7856
FMN	x 2,192	x 0,4563
Riboflavina	x 2,657	x 0,3764

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibração e monitoramento da 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

Linearidade/limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação (µg/L)*	Faixa linear (µg/L) (até pelo menos)
FAD	3	1000
FMN	1	500
Riboflavina	2	500

*O limite de quantificação depende do detector utilizado.

Recuperação:

FAD	106%
FMN	100%
Riboflavina	108%

Limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação (µg/L)
FAD	25
FMN	2
Riboflavina	2

Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada em 3 concentrações pela média de 10 análises da mesma amostra.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)		
	n = 10	n=10	n=10
FAD	0,8 (121)	1,4 (365)	1,6 (164)
FMN	2,3 (4,38)	3,0 (6,96)	1,9 (7,16)
Riboflavina	2,1(8,48)	1,4 (27,1)	1,9 (17,5)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada a partir da determinação da concentração dos analitos em pool de sangue total em 10 diferentes séries de testes.

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)	
	n = 100	n = 100
FAD	2,3 (120)	2,5 (359)
FMN	5,9 (4,30)	5,8 (6,81)
Riboflavina	5,6 (8,08)	5,2 (25,7)

VALORES DE REFERÊNCIA

	[µg/L]
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD, PM 785,5 g/mol) em sangue total	137 – 370

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).
- Verlag W. de Gruyter, W. Friedrich, Vitamins, New York (1988).

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

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 10350840186

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

www.biosys.com.br