

VITAMINA B₆ (PIRIDOXAL-5'-FOSFATO) EM SORO/PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B₆ em soro/plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
31000/S	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₆ em Soro/Plasma, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitamina B₆ em soro/plasma por HPLC no site www.biosvs.com.br.

SUMÁRIO

Este kit de reagentes para a análise de Vitamina B₆ em soro/plasma e sangue total é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser utilizada em laboratórios de análises clínicas para a detecção quantitativa da forma fisiologicamente ativa da Vitamina B₆ (piridoxal-5'-fosfato, PLP) em amostras de plasma, soro ou sangue total por HPLC. Este kit é utilizado como um teste para monitoramento dos níveis de Vitamina B₆ em pacientes.

MÉTODO

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

PRINCÍPIO

A usual derivatização pós-coluna, com maior exigência técnica, é aqui substituída por uma simples derivatização pré-coluna. O procedimento de preparo da amostra inclui uma efetiva precipitação de proteínas e um passo de extração em condições otimizadas para liberar o PLP do estado ligado (recuperação 88%). Posterior derivatização (banho-maria, 60°C) produz o PLP derivado fluorescente. Uma coluna HPLC selecionada e fase móvel otimizada para esta separação resultam em quantificação exata e confiável. Extratos altamente estáveis são adquiridos por este simples procedimento de preparo, permitindo a análise de grandes lotes.

REAGENTES

Componentes e composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de fosfato de potássio	1000 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de ácido perclórico	1 x 30 mL
Reagente de Derivatização (Derivatisation Reagent)	Solução de fosfato de potássio e cianeto de potássio	1 x 10 mL
Reagente de Neutralização (Neutralisation Reagent)	Solução de fosfato de potássio	1 x 25 mL
Frascos de Reação (âmbar) (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.

Artigo	Produto	Armazenamento
31001	Fase móvel	+18 a +30 °C
31004	Reagente de Precipitação	+18 a +30 °C
31005	Reagente de Neutralização	+18 a +30 °C
31006	Reagente de Derivatização	+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

O Reagente de Derivatização, os restos das amostras preparadas e a Fase Móvel após o uso **contêm cianeto**. O Reagente de Precipitação é um ácido forte. Neutralize as soluções e descarte em um contêiner para soluções salinas. Descarte de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

PREPARO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Reagente de Precipitação: pronto para uso.

Reagente de Neutralização: pronto para uso.

Reagente de Derivatização: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art.31100)
Padrão de Calibração de Vitamina B₆ em Soro (Chromsystems art.36005)
Controle de Vitamina B₆ em Soro, Nível I + II (Chromsystems art.0031)
Centrífuga para micotubos.
Água tipo I ou HPLC.
Metanol grau HPLC.
Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

Sangue total, contendo EDTA ou heparina como inibidor de coagulação, ou plasma/soro são utilizados para análise. As amostras devem ser mantidas refrigeradas e protegidas da luz durante o transporte.

Estabilidade da amostra: as amostras são estáveis por até 1 semana entre +2 e +8°C protegidos da luz. Para períodos maiores de armazenamento, conservar em temperatura abaixo de -18°C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): As amostras preparadas são estáveis em temperatura ambiente por até 2 dias ou refrigeradas entre +2° a +8°C por aproximadamente 1 semana (protegidas da luz). Para períodos maiores de armazenamento (até 2 semanas), armazenar em temperaturas abaixo de -18°C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: volume de injeção 25-50 µL
Tempo de corrida analítica: < 8 min
Razão de fluxo: 1,0 – 1,2 mL/min.
Temperatura da coluna: temperatura ambiente (aprox. 25°C)
Detector de fluorescência: EX = 320 nm, EM = 415 nm
Limpeza do injetor: água destilada com 5 – 10 % (máximo) de metanol.

Procedimento de Preparo das Amostras:

Num frasco de reação âmbar, pipetar:

1. 200 µL de plasma/soro (amostra, calibrador, controle) + 300 µL de Reagente de Precipitação, agitar por 30 s (vórtex).
2. Incubar por 10 min a + 4°C, centrifugar por 5 min. a 16000 g.
3. Transferir 250 µL do sobrenadante para um novo frasco âmbar.
4. Adicionar 250 µL Reagente de Neutralização, agitar brevemente (precipitação irá se formar, não centrifugue!).
5. Adicione 100 µL de Reagente de Derivatização (contém cianeto), agitar brevemente.
6. Incubar 20 min a 60°C (banho-maria).
7. Resfriar as amostras em água gelada, então incubar por 10 min a + 4°C; centrifugar por 2 min a 16000 g.
8. Transferir o sobrenadante para frasco do amostrador automático protegido da luz, injetar 25-50 µL no sistema HPLC.

Tempo de Retenção Esperado:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Piridoxal-5'-fosfato	4,0

CÁLCULOS

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

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 (veja o folheto de informações) = $C_{\text{Calibrador}}$

Fatores de conversão

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Piridoxal-5'-fosfato	x 4,047	x 0,2471

CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
36005	Padrão de Calibração de Vitamina B ₆ em Soro	5 x 1 mL
0031	Controle de Vitamina B ₆ em Soro, Bi- Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Analito (Matriz)	Taxa de recuperação [%]
Piridoxal-5'-fosfato (plasma)	102

Linearidade e limite de quantificação:

Analito (Matriz)	Limite de quantificação [µg/L]	Limite máximo de linearidade [µg/L]
Piridoxal-5'-fosfato (sangue total)	1,0	250

Precisão intra-ensaio:

DP (PLP) n = 8	Concentração (µg / L)
6,9%	1,9
2,8% (n = 4)	16,7
2,6%	19,3
2,4%	47,4
1,7%	101,4
2,1%	227,4

Precisão inter-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg / L)	
	n = 20	
Piridoxal-5'-fosfato	2,5 (7,7)	3,2 (21,1)

VALORES DE REFERÊNCIA

	[µg/L]	[nmol/L]
Vitamina B ₆ (piridoxal-5'-fosfato) em plasma-EDTA	3,6 - 18	15 - 73

LITERATURA

1. Bleklem JE. In: Leklem JE, Reynolds RD (eds) Clinical and physiological applications of vitamin B₆. Current topics in nutrition and disease, vol 19: 3-28, Alan R. Liss Inc New York (1988).
2. Reynolds TM, Brain A. (1992) A simple internally-standardised isocratic HPLC assay for vitamin B₆ in human serum. J Liq Chromatogr Relat Technol 15(5): 897-914.
3. Tryfiates G. P., Bishop R. E., Murgo A. J., Anticancer Research, 11:1281 (1991).
4. Biesalski H., Schrezenmeier J., Weber P., Weiß H. (Editor): Vitamine, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1997).
5. Yasuda K., Okuda K., Endo N., Ishiwatari Y., Ikeda R., Hayashi H., Yokozeki K., Kobayashi S., Irie Y., Gastroenterology, 109:1295 (1995).
6. Wilson R. G., Davis R. E., Advances in Clinical Chemistry, 23, 1 (1983).

7. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 7. Aufl, S. 616. Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2008).
8. den Ottolander GJH. Diagnostisch Kompas. Ziekenfondsraad Amstelveen, Holland (1997).
9. Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, Band 1 – Klinische Chemie. 1. Aufl, S. 1345. Springer Medizin Verlag Heidelberg (2007).

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 10350840121

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

www.biosys.com.br