

VITAMIN B1 IN WHOLE BLOOD AND VITAMIN B6 IN WHOLE BLOOD/PLASMA - HPLC
VITAMINA B1 EM SANGUE TOTAL E VITAMINA B6 EM SANGUE TOTAL/PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B1 em Sangue total e Vitamina B6 em Sangue total/Plasma por HPLC.

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

Artigo	Apresentação
52052	Kit Reagente para Análise de Vitamina B ₁ em Sangue Total e Vitamina B ₆ em Sangue Total /Plasma, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções Análise de Vitamina B1 em sangue total e Vitamina B6 em sangue total/plasma por HPLC no site www.biosys.com.br.

FINALIDADE

Este kit oferece a possibilidade de determinar as formas fisiologicamente ativas de Vitamina B1 (tiamina pirofosfato, TPP) em amostras de sangue total humano e vitamina B6 (piridoxal-5'-fosfato, PLP) em sangue total humano ou amostras de plasma, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em uma única corrida, com uma preparação de amostra e sem uma derivatização complexa pós-coluna.

A análise é realizada num sistema HPLC com bomba binária e detector de fluorescência programável.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) 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 9 minutos. A inclusão de dois padrões internos feito sob medida no método garante alta precisão e segurança na quantificação dos analitos.

REAGENTES

Componentes e Composição:

Componente	Composição	Apresentação
Fase Móvel A (Mobile Phase 1)	Solução de metanol	1 x 1000 mL
Fase Móvel B (Mobile Phase 2)	Solução de metanol	1 x 1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa de piridina e sais de sulfato contendo azida sódica	1 x 10 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de ácido perclórico	1 x 30 mL
Reagente de Neutralização (Neutralisation Reagent)	Solução de fosfato de potássio dibásico contendo Hidróxido de potássio	1 x 25 mL
Reagente de Derivatização 1 (Derivatisation Reagent 1)	Solução aquosa de hexacianoferrato de potássio III	2 x 0,3 mL (liof)
Reagente de Derivatização 2 (Derivatisation Reagent 2)	Solução aquosa de fosfato de potássio dibásico	1 x 15 mL
Frascos de Reação (âmbar) (Reaction vials)	-	2 x 100 unidades

Instruções De Armazenamento 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 dos reagentes do kit.

Artigo	Produto	Armazenamento
52001	Fase Móvel A	18 - 30°C
52022	Fase Móvel B	18 - 30°C
52044	Padrão Interno	2 - 8°C
52005	Reagente de Precipitação	18 - 30°C
52006	Tampão de Neutralização	18 - 30°C
52007	Reagente de Derivatização 1	18 - 30°C
52008	Reagente de Derivatização 2	18 - 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 contém solventes orgânicos e deve ser descartada como resíduo livre de halogênio de acordo com os regulamentos locais. O Reagente de Derivatização 1 e 2 e a sobra das amostras preparadas contém cianeto e devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais. O Reagente de Precipitação contém um ácido forte que pode provocar fogo e o Reagente de neutralização contém uma base forte. As soluções devem ser neutralizadas e descartadas em um recipiente para soluções salinas.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Fase Móvel A: pronto para uso.
- Fase Móvel B: pronto para uso.
- Padrão Interno: pronto para uso.
- Reagente de Precipitação: pronto para uso.
- Reagente de Neutralização: pronto para uso.
- Reagente de Derivatização 1: reconstitua o conteúdo do frasco do Reagente de Derivatização 1 (art. 52007) com exatamente 0,3 mL de água destilada. Sob refrigeração (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de aproximadamente 4 semanas.
- Reagente de Derivatização 2: pronto para uso.

Mix de Derivatização:

Misture 50 µL do Reagente de Derivatização 1 reconstituído com 1,0 mL do Reagente de Derivatização 2 (art. 52008).

A proporção é 1:20. Esta mistura (= mix de derivatização) está pronta para o uso no preparo das amostras. A estabilidade é de 4 dias quando mantido protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C).

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art.52100)
- Padrão de Calibração de Vitaminas B1/B6 em Sangue Total (Chromsystems art.52003) e Controle de Vitamina B1/B6 em Sangue Total, Bi-Nível (I + II) (Chromsystems art. 0164)
- Sistema HPLC de gradiente binário
- Autosampler
- Detector de fluorescência programável
- Vórtex
- Centrifugar para frascos de reação de 1,5 ml
- Banho-maria

AMOSTRA

O material utilizado é sangue total ou plasma. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A coleta deve ser realizada com garroteamento leve e com cuidado para prevenir a hemólise.

Níveis elevados de ácido ascórbico (vitamina C) podem interferir na análise de vitamina B1 e levar a níveis falsamente elevados resultados da medição (consulte o item "Interferentes").

Estabilidade das amostras: Proteger as amostras da luz. Em frasco fechado, as amostras são estáveis por 1 semana entre 2 - 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (até duas semanas), as amostras devem ser mantidas em temperatura < -18 °C.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatós):

Temperatura de armazenamento	Tempo de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a + 25°C	1 dia	Protegido da luz, bem fechado, em frasco de vidro
+2 a +8°C	7 dias	Protegido da luz, bem fechado, em frasco de vidro
Abaixo de -18°C	2 semanas	Protegido da luz, bem fechado, em frasco de vidro

PROCEDIMENTO DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção 25-50 µL
 Tempo de corrida analítica: 7 - 9 min.
 Temperatura da coluna: Temp. ambiente (aprox. 20°C)
 Detector de fluorescência: EX = 320 nm, EM = 415 nm após aprox. 3,8 min. mudar para: EX = 367 nm, EM 435 nm.

Solução de limpeza do injetor: Água/metanol = 95/5

Perfil de gradiente:

Gradiente para a determinação de Vitamina B1/B6 em sangue total:

Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B	Taxa de fluxo [mL/min]
0	100	0	1,5
2,40	100	0	
2,50	50	50	
3,50	50	50	
3,60	0	100	
6,70	0	100	2,3
6,71	0	100	
8,00	0	100	
8,01	100	0	
8,90	100	0	1,5
8,91	100	0	

Gradiente para a determinação de Vitamina B6 em plasma:

Tempo (min)	% Fase móvel A	% Fase móvel B	Taxa de fluxo [mL/min]
0	100	0	1,5
2,40	100	0	
2,50	50	50	
3,50	50	50	
3,60	0	100	
5,50	0	100	
5,51	100	0	
7,00	100	0	

Procedimento de Preparação das Amostras:

Em um frasco de reação âmbar, pipetar:

1. 200 µL de sangue total ou plasma (ou calibrador ou controle reconstituído)
 - + 100 µL de Padrão Interno
 - + 300 µL de Reagente de Precipitação
2. Agitar por 30 s (vórtex).
3. Centrifugar por 5 min. a 14.000 g
4. Em um novo frasco âmbar, pipetar 250 µL do Reagente de Neutralização +100 µL do mix de derivatização
5. Adicionar 250 µL do sobrenadante e agitar brevemente.
6. Incubar 25 min. a 60±1°C (banho-maria).
7. Incubar por pelo menos 10 min. entre + 2 e + 8°C, centrifugar por 2 min. a 14.000 g.
8. Transferir o sobrenadante para o frasco do amostrador automático protegido da luz, injetar 25-50 µL no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção (aprox. min)
Padrão Interno 1 (PLP)	1,2
Vitamina B6 (PLP)	2,5
Vitamina B1 (TPP)	5,1
Padrão Interno 2 (TPP)	6,1

CÁLCULOS

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

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A_{Amostra}

Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = $A_{\text{Calibrador}}$

Área/altura do pico do Padrão Interno (IS) no cromatograma da amostra = I_{Amostra}

Área/altura do pico do Padrão Interno (IS) no cromatograma do calibrador = $I_{\text{Calibrador}}$

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
Vitamina B1 (Tiamina pirofosfato, TPP)	x 2,357	x 0,424
Vitamina B6 (Piridoxal-5'-fosfato, PLP)	x 4,046	x 0,247

CALIBRADORES E CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos para calibração e monitoramento da precisão e exatidão das análises:

Artigo	Produto	Apresentação
52003	Padrão de Calibração de Vitaminas B1/B6 em Sangue Total (Iiof.)	5 x 1mL
0164	Controle de Vitaminas B1/B6 em Sangue Total, Bi-Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Analito	Matriz	Recuperação [%]
Vitamina B6 (PLP)	Sangue total	88
	Plasma	102
Vitamina B1 (TPP)	Sangue total	92
	Plasma	102
Padrão Interno 1	Sangue total	102
	Plasma	104
Padrão Interno 2	Sangue total	119

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

Linearidade/limite de quantificação:

Analito	Matriz	Limite de quantificação (µg/L)	Faixa linear (até pelo menos) (µg/L)
Vitamina B6 (PLP)	Sangue total	4,5	500
	Plasma	0,5	500
Vitamina B1 (TPP)	Sangue total	2,0	750

*O limite de quantificação depende do detector utilizado.

Precisão intra-ensaio:

Analito	Matriz	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)		
		0,7 (11,4)	1,7 (17,0)	0,8 (25,5)
Vitamina B6 (PLP)	Sangue total	0,7 (11,4)	1,7 (17,0)	0,8 (25,5)
	Plasma	1,5 (6,26)	1,6 (12,0)	2,3 (19,7)
Vitamina B1 (TPP)	Sangue total	1,3 (24,2)	2,1 (39,3)	0,9 (93,6)

Precisão inter-ensaio:

Analito	Matriz	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)		
		2,3 (11,4)	1,5 (17,0)	2,9 (25,5)
Vitamina B6 (PLP)	Sangue total	2,3 (11,4)	1,5 (17,0)	2,9 (25,5)
	Plasma	5,2 (6,26)	1,8 (12,0)	3,0 (19,7)
Vitamina B1 (TPP)	Sangue total	2,0 (24,2)	1,7 (39,3)	2,3 (93,6)

VALORES DE REFERÊNCIA

Vitamina B1 (TPP) em sangue total	
Faixa de valores	33,1-60,7 µg/L 78 - 143 mmol/L
No. Resultados obtidos	254
Método estatístico da faixa de referência	Média ± 2x desvio padrão
Correlação entre os resultados obtidos e a idade	nenhuma
Correlação entre os resultados obtidos e o gênero	nenhuma
Literatura	5, 6

Vitamina B6 (PLP) em sangue total	
Faixa de valores	12,6 - 45,2 µL 51 - 183 mmol/L
No. Resultados obtidos	256

Método estatístico da faixa de referência	Remoção de 2,5% dos resultados superiores e inferiores
Correlação entre os resultados obtidos e a idade	Decréscimo com a idade: 18-30 anos: 129±34 nmol/L >70 anos: 90±31 nmol/L Efeito fraco: nenhum intervalo de referência relacionado à idade foi introduzido
Correlação entre os resultados obtidos e o gênero	nenhum
Literatura	5, 6

Vitamina B6 (PLP) em plasma	
Faixa de valores	5,7 - 55,1 µg/L 23 - 223 mmol/L
No. Resultados obtidos	120
Método estatístico da faixa de referência	Remoção de 2,5% dos resultados superiores e inferiores
Correlação entre os resultados obtidos e a idade	Nenhuma influência na faixa de valor superior, mas decréscimo na faixa inferior com aumento da idade. Efeito fraco: nenhum intervalo de referência relacionado à idade foi introduzido
Correlação entre os resultados obtidos e o gênero	Nenhuma influência na faixa de valor inferior, mas influência na faixa superior devido ao gênero (homens>mulheres). Efeito fraco: nenhum intervalo de referência relacionado ao gênero foi introduzido
Literatura	7

Interferentes

As amostras foram enriquecidas com os seguintes medicamentos comumente usados e suplementos alimentares nas maiores concentrações esperadas e, em seguida, testadas quanto à interferência:

Acetazolamida, acetilcisteína, ácido acetilsalicílico, aciclovir, alopurinol, amicacina, amlodipina, amoxicilina, ampicilina, ácido ascórbico (vitamina C), azatioprina, azitromicina, bisoprolol, captopril, carbamazepina, cefradina, cloranfenicol, clordiazepóxido, cimetidina, ciprofloxacina, claritromicina, dexametasona, diazepam, diclofenaco, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, disopiramida, enalaprilato, eritromicina, furosemida, ganciclovir, gentamicina, hidroclorotiazida, ibuprofeno, isoniazida, isossorbida dinitrato, itraconazol, cetoconazol, levofloxacina, levotiroxina, lidocaína, lorazepam, metformina HCl (1,1-dimetilbiguanida), meticilina, metilprednisolona, metoclopramida, metoprolol, ácido micofenólico, ácido micofenólico glicuronídeo, N-acetilprocainamida, nadolol, fluoreto de sódio, N-desmetildiazepam, neomicina, nifedipina, norverapamil, omeprazol, oxazepam, oxipurinol, paracetamol (4-acetamidofenol / Acetaminofeno), penicilina G, penicilina V, fenitoína, prazosina, prednisolona, prednisona, procainamida, (±)-propranolol, piridoxina, ranitidina, rifampicina, risperidona, salbutamol (albuterol), ácido salicílico (ácido 2-OH benzóico), estreptomina, sulfametoxazol, tramadol, triantereno, trimetoprim, ácido valpróico, vancomicina, verapamil.

As seguintes interferências influenciam os resultados quantitativos:

A carbamazepina-10,11-epóxido, um metabólito ativo da droga anticonvulsivante carbamazepina, resulta em atividade subjacente que interfere com o padrão interno 2 e, portanto, produz vitamina B1 falsamente baixa (TPP).

A isoniazida, um antibiótico bactericida, interfere com a vitamina B6 (PLP) e leva a uma determinação falsamente baixa de vitamina B6 (PLP).

A piridoxina, como um vitâmero da vitamina B6, é geralmente administrada em associação com a isoniazida. Mesmo os níveis endógenos mais altos esperados desta substância não influenciam significativamente no resultado quantitativo, mas a piridoxina pode ser convertida em vitamina B6 (PLP) por reações enzimáticas. Não é, portanto, uma interferência analítica, mas uma interferência farmacocinética.

A presença de ácido ascórbico (vitamina C) leva a uma diminuição do sinal de vitamina B1 (TPP), bem como o correspondente padrão interno IS 2. Por ser mais prejudicado, o padrão interno não compensa totalmente a deterioração do analito, levando a resultados falsamente altos para a vitamina B1 (TPP). Nas concentrações de ácido ascórbico acima de 125 mg/l, isso pode afetar a precisão dos resultados do teste em >15%.

LITERATURA

1. Gressner AM, Arndt T (Hrsg). Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, Band 1, Springer Medizin Verlag Heidelberg (2013).
2. Kennedy DO. (2016) B Vitamins and the brain: mechanisms, dose and efficacy – a review. *Nutrients* **8**(2):68. doi:10.3390/nu8020068
3. Nix WA, Zirwes R, Bangert V, Kaiser RP, Schilling M, Hostalek U, Obeid R. (2015) Vitamins B status in patients with type 2 diabetes mellitus with and without incipient nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* **107**(1):157-165. doi:10.106/j.diabres.2014.09.058
4. Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH-Books Frankfurt/Main (2012).
5. Steen G, Vlasveld L Th, Poot CC, van der Slot-Verhoeven AJ, Castel A. (2009) Onderzoek naar referentiewaarden van laboratoriumonderzoek in een algemeen ziekenhuis: resultaten en bevindingen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* **34**(1): 35-43
6. Steen G, van der Zwaal M. (2007) Reference values for vitamin B1 and vitamin B6 in whole blood. *Dialog* 2/07:3-4, <https://www.chromsystems.com/publications/dialog.html>.
7. Panton KK, Farup PG, Sagen E, Sirum UF, Asberg A. (2013) Vitamin B6 in plasma – sample stability and the reference limits. *Scand J Clin Lab Invest.* **73**(6):476-479

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 10350840189

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

www.biosys.com.br

Símbolos Usados

