VITAMINAS A/E NO SORO OU PLASMA (HPLC)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* das Vitaminas A e E em Soro/Plasma por HPLC.
Nº de lote, data de fabricação e validade: vide rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
34000	Kit Reagente para Análise de Vitaminas A/E em Soro/Plasma, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitaminas A/E em Soro/Plasma por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit permite a determinação simultânea das vitaminas A e E em soro ou plasma em sistema HPLC isocrático com detecção UV, auxiliando no diagnóstico das insuficiências e deficiências destas vitaminas, bem como, no acompanhamento do tratamento.

MÉTODO

Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) com detecção UV.

PRINCÍPIO

A preparação rápida e fácil da amostra consiste de dois passos de precipitação, seguidos da análise do sobrenadante em sistema HPLC-UV.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução metanólica	1000 mL
Reagente de Precipitação 1 (Precipitation Reagent I)	Solução aquosa de sulfato de zinco	1 x 2,5 mL
Reagente de Precipitação 2 (Precipitation Reagent II)	Propan-2-ol	1 x 40 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Propan-2-ol tocoferol acetato 1%	1 x 2 mL
Frascos de Reação (âmbar) (Reaction vials)	-	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, e para os demais reagentes Chromsystems utilizados durante a análise.

Artigo	Produto	Armazenamento
34001	Fase móvel	+18 a +30ºC
34008	Padrão Interno	+2 a +8 ºC
34006	Reagente de Precipitação I	+18 a +30ºC
34003	Reagente de Precipitação II	+18 a +30ºC

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 os resíduos das amostras preparadas **contêm solventes orgânicos** e devem ser descartados como resíduo livre de halogênio de acordo com os regulamentos locais.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.
Padrão Interno: pronto para uso.
Reagente de Precipitação I: pronto para uso.
Reagente de Precipitação II: pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 34100)
Padrão de Calibração de Vitaminas A/E em Soro (Chromsystems art. 34004)
Controle de Vitaminas A/E em Soro, Bi-Nível (I + II) (Chromsystems art. 0032)
Centrífuga para microtubos.
Água tipo I ou grau HPLC.
Metanol PA.
Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

A amostra pode ser soro ou plasma. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A amostra deve ser extraída com garroteamento leve e com cuidado para prevenir a hemólise. Baseado na experiência de diferentes grupos de trabalho, recomendamos o seguinte para a coleta da amostra:

- Colete aproximadamente 1-2 ml de sangue;
- Após centrifugação (2000 x g, 5 min) o plasma/soro obtido deve ser separado o mais rápido possível e armazenado abaixo de -18°C. Proteja as amostras da luz.

Amostras hemolisadas podem falsificar os resultados dos testes de vitamina E, e, portanto, não devem ser utilizadas para análise desse parâmetro.

Para vitamina A, amostras hemolisadas até uma concentração de hemoglobina de 500 md/dL podem ser usadas sem restrições; entretanto em concentrações mais elevadas de hemoglobina, as amostras devem ser excluídas.

Não há restrições quanto ao uso de amostras ictéricas e lipêmicas.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos):

As amostras preparadas para análise, apresentam os seguintes prazos de validade:

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento	Outras condições de armazenamento
+20 a +25 °C	12 horas	proteção contra luz, bem fechado, frascos de vidro
+2 a +8 °C	12 horas	proteção contra luz, bem fechado, frascos de vidro

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção 50 µL, tempo de corrida analítica 9 min., manter o compartimento protegido da luz.
Razão de fluxo:	1,5 mL/min.
Temperatura da coluna:	temperatura ambiente (20 - 25ºC)
Detector UV	programável: iniciar em λ_{max} = 325 nm, após 3,5 min. mudar para 295 nm.
Limpeza do injetor:	água/metanol (1:1)

Procedimento de Preparo das Amostras:
Num frasco de reação âmbar, pipetar:

1. 200 µL de amostra (soro/ plasma, calibrador, controle)
   + 20 µL de Padrão Interno
   + 25 µL de Reagente de Precipitação I
2. Agitar por 30 s (vórtex).
3. Adicionar 400 µL do Reagente de Precipitação II, vórtex por 30 s.
4. Centrifugar por 10 min a 9.000 g.
5. Injetar 50 µL de sobrenadante no sistema HPLC.

Tempo de Retenção Esperado:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Vitamina A	2,3
Padrão Interno	4,7
Vitamina E	7,7

CÁLCULOS

$$C_{Analito,Amostra}\,[mg/L] = \frac{A_{Amostra} \times IS_{Calibrador}}{A_{Calibrador} \times IS_{Amostra}} \times C_{Calibrador}$$

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = Aamostra

Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = ACalibrador

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = ISAmostra

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = ISCalibrador

Concentração C do analito A no calibrador = *CCalibrador
*(veja o folheto de informações)

Fatores de conversão

Analito	mg/L para µmol/L	µmol/L para mg/L
Vitamina A	x 3,49	x 0,286
Vitamina E	x 2,32	x 0,431

CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
34004	Padrão de Calibração de Vitaminas A/E em Soro (liofilizado)	5 x 1mL
0032	Controle de Vitaminas A/E Soro, Bi-Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Substância	Recuperação em soro [%]	Recuperação em plasma [%]
Vitamina A	106	111
Vitamina E	101	104
Padrão Interno	114	109

Linearidade e limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação aproximado (mg/L)*	Limite máximo de linearidade (mg/L)
Vitamina A	0,02	5,0
Vitamina E	0,25	45,00

*O limite de quantificação depende do detector empregado.

Precisão intra-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)		
	n = 10		
Vitamina A	2,5 (0,466)	0,8 (0,666)	0,9 (1,27)
Vitamina E	2,4 (8,86)	1,6 (12,9)	2,2 (24,9)

Precisão inter-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)	
	n = 80	
Vitamina A	3,8 (0,400)	5,0 (0,982)
Vitamina E	2,7 (6,93)	4,9 (16,9)

VALORES DE REFERÊNCIA

Vitamina A

Adultos

Detalhes	Faixa de referência	Fonte
Retinol em soro	1,05 – 2,45 µmol/l 0,3 – 0,7 mg/l	[5]
Faixa tóxica	A partir de 1,4 mg/l	[8]
Deficiência	Iniciando: 0,1 – 0,19 mg/l Severa: <0,1 mg/l	[8]

Recém-nascidos, crianças e adolescentes

Detalhe	Faixa etária	Faixa de referência	Fonte
Retinol em soro/plasma	Adolescentes	1,0 – 2,1 µmol/l 0,3 – 0,6 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Crianças (até 10 anos)	0,66 – 1,7 µmol/l 0,2 – 0,5 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Bebês (até um ano)	0,53 – 1,4 µmol/l 0,15 – 0,4 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Recém-nascidos	0,35 – 1,0 µmol/l 0,1 – 0,3 mg/l	[8]
Retinol em soro/plasma	Ao nascimento	0,49 – 1,81 µmol/l 0,14 – 0,52 mg/l	[10]
Retinol em soro	1-6 anos	0,7 – 1,5 µmol/l 0,20 – 0,43 mg/l	[10]
Retinol em soro	7-12 anos	0,9 – 1,7 µmol/l 0,26 – 0,49 mg/l	[10]
Retinol em soro	13-19 anos	0,9 – 2,5 µmol/l 0,26 – 0,72 mg/l	[10]

Retinol em soro/plasma	Neonatos a termo (>37 semanas)	0,63 – 1,75 µmol/l 0,18 – 0,50 mg/l	[10]
Retinol em soro/plasma	Neonatos pré-termo (<36,6 semanas)	0,46 – 1,61 µmol/l 0,13 – 0,46 mg/l	[10]

Vitamina E

Adultos

Detalhes	Faixa de referência	Fonte
D-α-tocoferol em soro	11,6 – 46,4 µmol/l 5,0 – 20,0 mg/l	[9]
Vitamina E em soro/plasma	12 -42 µmol/l 5 – 18 mg/l	[8]
D-α-tocoferol em soro	22 µmol/l	[6]
Deficiência	<11,6 µmol/l <5 mg/l	[8]
Limite padrão abaixo de	11,6 µmol/l	[6]

Recém-nascidos, crianças e adolescentes

Detalhe	Faixa etária	Faixa de referência	Fonte
Vitamina E em soro/plasma	Adolescentes (13-19 anos)	14 – 23 µmol/l 6 – 10 mg/l	[8]
Vitamina E em soro/plasma	Crianças (1-12 anos)	7 – 21 µmol/l 3 – 9 mg/l	[8]
Vitamina E em soro/plasma	Neonatos pré-termo	2,3 – 11,6 µmol/l 1 – 5 mg/l	[8]
Vitamina E em soro	1-6 anos	7 - 21 µmol/l 3,0 – 9,0 mg/l	[10]
Vitamina E em soro	7-12 anos	10 – 21 µmol/l 4,0 – 9,0 mg/l	[10]
Vitamina E em soro	13-19 anos	13 – 24 µmol/l 6,0 – 10.1 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	Prematuro	1 – 8 µmol/l 0,5 – 3,5 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	Termo completo	2 – 8 µmol/l 1,0 – 3,5 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	2 – 5 meses	5 – 14 µmol/l 2,0 – 6,0 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	6 – 24 meses	8 – 19 µmol/l 3,5 – 8,0 mg/l	[10]
Vitamina E em soro/plasma	2 – 12 anos	13 – 21 µmol/l 5,5 – 9,0 mg/l	[10]

LITERATURA

1. Vuilleumier, J. P., Keller, H.E., Gysel, D., Hunziker, F.: Clinical chemical methods for the routine assessment of the vitamin status in human populations. Part I: The fat-soluble vitamins A and E, and β-carotene; Int. J. Vitam. Nutr. Res.; 53 (3), 265-272; 1983.
2. Reinards, R. in: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie; 3nd Ed., Verlag Schattauer Stuttgart/New York; 344-346; 1987.
3. Milne, D. B., Botnen, J.: Retinol, α-tocopherol, lycopene, and α- and β-carotene simultaneously determined in plasma by isocratic liquid chromatography; Clin. Chem.; 32: 874-876; 1986.
4. Lehmann, J., Martin, H. L.: Improved direct determination of alpha- and gamma-tocopherols in plasma and platelets by liquid chromatography, with fluorescence detection; Clin. Chem.; 28: 1784-1787; 1982.
5. Bertelsmann Stiftung (Editor): Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse; Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh; 1997.
6. Biesalski, J., Schrezenmeier, J., Weber, P., Weiß, H. E.: Vitamine – Physiologie, Pathophysiologie, Therapie; Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York; 1997.
7. Baltes, W.: Lebensmittelchemie; 2nd Ed., Springer Verlag Berlin; 1989.
8. Gressner AM, Arndt T. Katecholamine, in: Gressner AM, Arndt T, Lexikon der Laboratoriumsdiagnostik. 2. Aufl, 1390 und 1405, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2013).
9. Greiling H, Gressner AM (Hrsg) Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie; 3. Aufl, Verlag Schattauer Stuttgart/New York (1987).
10. Soldin SJ, Wong EC, Brugnara C, Soldin OP (Hrsg) Pediatric Reference Intervals; 7. Aufl, AACC Press Washington (2011) 238, 242.

Símbolos utilizados:

	Fabricante
REF	Número de catálogo
Σ	Quantidade suficiente para <n> ensaios
LOT	Código do lote
	Validade
	Limite de temperatura
	Consultar as instruções para utilização
IVD	Produto para a saúde para diagnóstico *in vitro*
	Cuidado
	Atenção
	Perigo
	Perigo
	Perigo
	Atenção
CE	Este produto cumpre as exigências da Diretiva 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*

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 10350840119
SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br