

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.

FINALIDADE PRETENDIDA

Este conjunto de reagentes é um dispositivo médico de diagnóstico *in vitro* para a determinação quantitativa da forma fisiologicamente ativa da Vitamina B₆ (piridoxal-5'-fosfato, PLP) em amostras de soro ou plasma.

Este kit se destina ao uso para triagem e/ou monitoramento dos níveis de Vitamina B₆ quando indicado:

- em pacientes com suspeita de deficiência de vitamina B₆,
- em pacientes com suspeita de excesso de vitamina B₆,
- em pacientes em terapia com suplementação de vitamina B₆.

MÉTODO

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

PRINCÍPIO

O presente kit de reagentes permite a determinação rápida, fácil e específica de vitamina B₆ (piridoxal 5'-fosfato, PLP) usando um sistema HPLC isocrático simples. Em vez da derivatização pós-coluna habitual e tecnicamente exigente, é utilizada a derivatização pré-coluna simples. Amostras de plasma/soro, são adequadas para este kit.

O procedimento de **clean-up** inclui uma etapa eficaz de precipitação e extração de proteínas em condições otimizadas para liberar o PLP de seu status vinculado. A derivatização subsequente (banho-maria, 60°C) produz um derivado PLP fluorescente. A determinação cromatográfica é realizada em um sistema HPLC isocrático com detecção por fluorescência. Através deste procedimento de limpeza de amostras são obtidos extratos altamente estáveis, permitindo a análise de grandes lotes.

REAGENTES

Componentes e composições:

Componente	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de fosfato de potássio	1 x 1000mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de ácido perclórico	1 x 30 mL
Reagente de Derivatização (Derivatisation Reagent)	Solução de fosfato 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)	-	2 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 Precipitação contém um ácido forte e inflamável. Neutralize os resíduos do produto e despeje dentro de um coletor para soluções salinas. Resíduos de amostras de paciente, amostras preparadas, controles e calibradores utilizados, assim como os consumíveis do laboratório contaminados com material humano devem ser coletados e despejados como lixo potencialmente infectante. Resíduos perigosos não devem ser despejados junto com lixo doméstico. Não circule no abastecimento de água principal. Descarte em conformidade com as diretrizes e regulamentos locais em vigor. As embalagens com descarte devem ser armazenadas apropriadamente e seu acesso permitido somente a pessoas autorizadas. Resíduos não perigosos como a Fase móvel, Reagente de Neutralização, Reagente de Derivatização e os consumíveis de laboratório não contaminados não são classificados como perigosos. Descarte em conformidade 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

Sistema HPLC isocrático - Autosampler - Detector de fluorescência

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 adequada; Agitador (vórtex); Banho maria

AMOSTRA

Plasma e soro são utilizados para análise. As amostras devem ser mantidas refrigeradas e protegidas da luz durante o transporte.

- As amostras devem ser colhidas pela manhã em jejum, antes de qualquer medicação e em ausência de consumo recente de álcool [10].

- É recomendado uma separação rápida do plasma após a coleta de amostra de sangue e armazenamento congelado para uma dosagem confiável de PLP [3].

- Em algumas doenças como a hipofosfatasia, um nível alterado de vitamina B₆ é indicativo. Nesses casos a ingestão de suplementação de vitamina B₆ deve ser evitado por pelo menos 2 semanas antes da coleta de sangue, pois níveis elevados de PLP causados pela suplementação podem ser enganosos [9].

- Deve ser considerado também que níveis de PLP no plasma ou no soro podem ser mais baixos em pacientes com albumina diminuída (ex: durante estados de aumento de inflamação) ou atividade alterada de fosfatase alcalina e usuários de antiinflamatórios não esteroides de longa data [3,8].

- Tanto o EDTA (K3-EDTA e K2-EDTA) como a heparina (lítica, sódica e heparina de amônio) são adequados como anticoagulantes.

Estabilidade da amostra:

Temperatura de armazenamento	Plasma EDTA	Plasma heparina	Soro
+20 a +25°	7 dias	2 dias	2 dias
+2 a +8° C	4 semanas	7 dias	7 dias
Abaixo -18° C	3 meses	1 mês	1 mês
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	1 ciclo	1 ciclo

Estabilidade das amostras preparadas (eluatoss):

Temperatura de armazenamento	Vida útil de armazenamento	Outras condições
+20 a +25°C	5 dias	Proteção contra luz, bem fechado
+2 a +8°C	7 dias	Proteção contra luz, bem fechado
abaixo de -18°C	2 semanas	Proteção contra luz, bem fechado
Ciclos de congelamento/descongelamento	1 ciclo	-

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Configurações do instrumento:

Amostrador:	volume de injeção 50 µL
Tempo de corrida analítica:	8 min
Razão de fluxo:	1,0 mL/min.
Temperatura da coluna:	temperatura ambiente (20-25°C)
Detector de fluorescência:	EX = 320 nm, EM = 415 nm
Limpeza do injetor:	água ultrapura (grau HPLC) com 5 - 10 % (máximo) de metanol.

Procedimento de Preparo das Amostras:

Num frasco de reação âmbar, pipetar:

1. Para 200 µL de amostra (plasma/soro/calibrador/controle reconstituído), adicionar 300 µL de Reagente de Precipitação em um frasco de reação âmbar, agitar por 30 s (vórtex).
2. Incubar por 10 min a +2-8°C, centrifugar por 5 min a 16000 x g.
3. Transferir 250 µL do sobrenadante para um novo frasco de reação.
4. Adicionar 250 µL Reagente de Neutralização, agitar brevemente (irá se formar precipitação, não centrifugue!).
5. Adicione 100 µL de Reagente de Derivatização, agitar brevemente.
6. Incubar 20 min a 60°C (banho-maria).
7. Resfriar as amostras em água gelada, então incubar por 10 min a +2-8°C;
8. Centrifugar por 2 min a 16.000 g.
9. Transferir o sobrenadante para o frasco do amostrador automático protegido da luz, injetar 50 µL no sistema HPLC.

Tempo de Retenção Esperado:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Piridoxal-5'-fosfato	3,1

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_{calibrador}

Concentração C do analito A no calibrador (veja o folheto de informações) = C_{calibrador}

Fatores de conversão

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

CONTROLE DE QUALIDADE

A precisão e exatidão das análises podem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica.

Se a análise destes controles fornecer valores fora do intervalo indicado nas Instruções de Uso desses produtos, o sistema deve ser verificado e, se necessário, recalibrado.

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
36005	Plasma Calibration Standard Vitamin B ₆ in plasma/serum (Padrão de Calibração de Vitamina B ₆ em Soro)	5 x 1 mL
0031	Plasma Control Vitamin B ₆ in plasma/serum - Bi-Level (I+II) (Controle de Vitamina B ₆ em Soro, Bi-Nível (I+ II))	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

determinadas com Shimadzu FLD RF-20A

Analito (Matriz)	Taxa de recuperação [%]	
Piridoxal-5'-fosfato (plasma)	96,6% (10 µg/L)	105% (200 µg/L)
Piridoxal-5'-fosfato (soro)	95,3% (10 µg/L)	102% (200 µg/L)

Linearidade e limite de quantificação:

determinado com Shimadzu FLD RF-20A¹ (LLOQ em plasma e soro e ULOQ em soro) e com Waters FLD 2474² (ULOQ em plasma)

Análito (Matriz)	Limite de quantificação (LLOQ)	Limite máximo de linearidade (ULOQ)
Piridoxal-5'-fosfato (plasma)	0,7 µg/L ¹	250 µg/L ²
Piridoxal-5'-fosfato (soro)	0,9 µg/L ¹	250 µg/L ¹

Precisão intra-ensaio:

determinada com Waters FLD 2474

Matriz	Matriz Coeficiente de variação (concentração do analito)		
plasma	1,0% (7,67 µg/L)	0,6% (13,5 µg/L)	0,9% (21,2 µg/L)

Precisão inter-ensaio:

determinada com Waters FLD 2474

Matriz	Matriz Coeficiente de variação (concentração do analito)		
plasma	2,0% (7,53 µg/L)	1,0% (13,6 µg/L)	1,9% (21,7 µg/L)

INTERFERENTES

Interferências detectadas

Metabólitos

A isoniazida, um antibiótico, interage com o piridoxal 5'-fosfato (PLP) e leva a uma determinação falsamente baixa de piridoxal 5'-fosfato (PLP).

Substâncias de eluição tardia podem estar presentes em amostras de sangue total nativo, levando potencialmente a interferências em análises subsequentes (por exemplo, na forma de picos amplos ou linha de base elevada).

Interferências não detectadas

As seguintes substâncias foram testadas e apresentam uma influência insignificante nos resultados quantitativos (desvio ≤ 15%).

Metabólitos

Isopiridoxal, piridoxal*, piridoxamina*, piridoxamina 5'-fosfato*, ácido 4-piridoxico, piridoxina*, piridoxina 5'-fosfato*.

*Esses metabólitos podem ser convertidos entre si e em PLP por meio de reações enzimáticas. Eles não são analíticos, mas antes interferências farmacocinéticas.

Vitaminas solúveis em água

Ácido ascórbico (vitamina C), biotina (vitamina B7), cobalamina (vitamina B12), folato (vitamina B9), niacina (ácido nicotínico, vitamina B3), ácido pantotênico (vitamina B5), riboflavina (vitamina B2).

Substâncias medicamentosas

Paracetamol, ácido acetilsalicílico, alopurinol, alprazolam, amlodipina, amoxicilina, anfetamina/dexanfetamina, apixabana, atenolol, atorvastatina, azitromicina, bisoprolol, brivaracetam, bupropiona, candesartana, carbamazepina, 10-OH-carbamazepina, carbamazepina-diol, carbamazepina-10,11-epóxido, carvedilol, cefuroxima, citalopram, clonazepam, clopidogrel, ciclobenzaprina, N-desmetilmesuximida, diclofenaco, duloxetina, edoxabana, empaglifozina, enalaprilato, etossuximida, felbamato, fenoterol, fluoxetina, fluticasona, formoterol, furosemida, gabapentina, glimepirida, glipizida, hidroclorotiazida, hidrocodona, ibuprofeno, brometo de ipratrópio, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, lercanidipina, levotiroxina, lisinopril, lorazepam, losartan, meloxicam, metamizol/dipirona como 4-metilaminoantipirina, metformina, metocarbamol, metilfenidato, metoclopramida, metoprolol, montelucaste, nebivolol, noscapina, omeprazol/esomeprazol, oxcarbazepina, pantoprazol, perampanel, fenobarbital, fenprocumon, feniletilmalonamida (PEMA), fenitoína, pravastatina, prednisolona, prednisona, pregabalina, primidona, propranolol, ramipril, ranitidina, retigabina, rivaroxabana,

rosuvastatina, rufinamida, salbutamol/albuterol, sertralina, sinvastatina, sitagliptina, espironolactona, estiripentol, sultiame, tansulosina, teofilina, tiagabina, tilidina como nortilidina, topiramato, torasemida, tramadol, trazodona, ácido valpróico, valsartan, venlafaxina, vigabatrina, zolpidem, zonisamida.

Análise sem interferência é possível nas seguintes condições de amostra:

Hemólise

Amostras de plasma e soro foram enriquecidas com hemoglobina até uma concentração de hemoglobina de 10g/L. Concentrações do analito foram comparadas com aquelas da amostra original: Não houve nenhuma interferência significativa (desvio ≤15%).

Lipemia

Amostras de plasma e soro foram enriquecidas com diferentes concentrações de uma emulsão lipêmica (0,67 a 10 g/L) e as concentrações do analito foram comparadas com aquelas da amostra original: Não houve nenhuma interferência significativa (desvio ≤15%).

Icterícia

Amostras de plasma e soro foram enriquecidas com bilirrubina conjugada e não-conjugada (cada uma 0,4 g/L) e as concentrações do analito foram comparadas com aquelas da amostra original: Não houve nenhuma interferência significativa (desvio ≤15%).

VALORES DE REFERÊNCIA

Os intervalos de referência declarados a seguir são baseados na literatura [11,12]. Eles podem diferir de outros dados publicados. Como os níveis variam dependendo da população de pacientes e do método de medição, determine intervalos de referência para o seu laboratório. Ao determinar os intervalos, certifique-se de cumprir as normas e requisitos locais e nacionais.















	Vitamina B6 (PLP) em plasma Soro	Vitamina B6 (PLP) em plasma Soro
Intervalos de referência	5,7-55,1 µg/l 23-223 nmol/l	2,8-75 µg/L; deficiência <4,9 µg/L 11,3-302 nmol/L; deficiência <20nmol/L
Número de resultados obtidos	120	8311
Método estatístico do intervalo de referência	Remoção de 2,5% dos resultados superior e inferior	Remoção de 2,5% dos resultados superior e inferior
Correlação entre resultados obtidos e idade	Nenhuma influência no intervalo de referência superior, mas diminuição do intervalo de referência inferior com o aumento da idade <i>Efeito fraco:</i> não foram introduzidos intervalos de referência relacionados com a idade	Valores de referência detalhados por idade são fornecidos. Não há deficiência de concentração relacionada à idade
Correlação entre resultados obtidos e gênero	Nenhuma influência no intervalo de referência inferior, mas influência no intervalo de referência superior por gênero (homens > mulheres) <i>Efeito fraco:</i> não foram introduzidos intervalos de referência relacionados com o gênero	Valores de referência relacionados ao gênero são fornecidos. Não há deficiência de concentração relacionado ao gênero.
	[12]	[13]

LITERATURA

- Gressner AM, Arndt T (ed): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer, Berlin, Heidelberg, 2019.
- Talwar D, Catchpole A, Wadsworth JM, Toole BJ, McMillan DC: The relationship between plasma albumin, alkaline phosphatase and pyridoxal phosphate concentrations in plasma and red cells: Implications for assessing vitamin B6 status. *Clin Nutr* 2020; 39:2824–2831.
- Berger MM, Shenkin A, Schweinlin A, Amrein K, Augsburg M, Biesalski H-K, et al.: ESPEN micronutrient guideline. *Clin Nutr* 2022; 41:1357–1424.
- Himmelreich N, Montioli R, Bertoldi M, Carducci C, Leuzzi V, Gemperle C, et al.: Aromatic amino acid decarboxylase deficiency: Molecular and metabolic basis and therapeutic outlook. *Mol Genet Metab* 2019; 127:12–22.
- Kennedy DO: B Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy--A Review. *Nutrients* 2016; 8:68.
- Nix WA, Zirwes R, Bangert V, Kaiser RP, Schilling M, Hostalek U, et al.: Vitamin B status in patients with type 2 diabetes mellitus with and without incipient nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2015; 107:157–165.
- Marcé-Grau A, Martí-Sánchez L, Baide-Mairena H, Ortigoza-Escobar JD, Pérez-Dueñas B: Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical phenotypes, genetics, and functional studies. *J Inherit Metab Dis*. 2019; 581–597.
- Zhou J, Effiong U: Isolated Pyridoxine Deficiency Presenting as Muscle Spasms in a Patient With Type 2 Diabetes: A Case Report and Literature Review. *Am J Med Sci* 2021; 361:791–794.
- Jandl NM, Volk A, Barvencik F: Hypophosphatasie – eine klinisch und genetisch variable Erkrankung. *Medizinische Genetik* 2019; 31:364–371.
- Rojas-Hernandez CM OT: The Unusual Nutritional and Toxin-related Underproduction Anemias Approaching the Riddle Beyond Iron_Cobalamin and Folate. *Discov Med* 2018; 67–74.
- Steen G, Vlasveld LTh, Poot CC, Slot-Verhoeven AJ van, Castel A: Onderzoek naar referentiewaarden van laboratoriumonderzoek in een algemeen ziekenhuis: resultaten en bevindingen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2009; 34:35–43.
- Panton KK, Farup PG, Sagen E, Sirum UF, Asberg A: Vitamin B6 in plasma - sample stability and the reference limits. *Scand J Clin Lab Invest* 2013; 73:476–479.
- U.S. Centers for Disease Control and Prevention: Second National Report on Biochemical Indicators of Diet and Nutrition in the U.S. Population 2012. Atlanta (GA): National Center for Environmental Health, April 2012.
- Castro J, Deulofeu R, Gila A, Puig J, Toro J: Persistence of nutritional deficiencies after short-term weight recovery in adolescents with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 2004; 35:169–178.
- Looman M, Geelen A, Samlal RAK, Heijligenberg R, Klein Gunnewiek JMT, Balvers MGJ, et al.: Changes in Micronutrient Intake and Status, Diet Quality and Glucose Tolerance from Preconception to the Second Trimester of Pregnancy. *Nutrients* 2019; 11.
- Bévier A, Novel-Catin E, Blond E, Pelletier S, Parant F, Koppe L, et al.: Water-Soluble Vitamins and Trace Elements Losses during On-Line Hemodiafiltration. *Nutrients* 2022; 14(17):3454.
- O'Leary F, Flood VM, Petocz P, Allman-Farinelli M, Samman S: B vitamin status, dietary intake and length of stay in a sample of elderly rehabilitation patients. *J Nutr Health Aging* 2011; 15:485–489.
- Hepp N, Folkestad L, Møllebæk S, Frederiksen AL, Duno M, Jørgensen NR, et al.: Bonemicroarchitecture and bone-strength in a sample of adults with hypophosphatasia and a matched reference population assessed by HR-pQCT and impact microindentation. *Bone* 2022; 160:116420.
- Saraff V, Narayanan VK, Lawson AJ, Shaw NJ, Preece MA, Högl W: A Diagnostic Algorithm for Children with Low Alkaline Phosphatase Activities: Lessons Learned from Laboratory Screening for Hypophosphatasia. *The Journal of Pediatrics* 2016; 172:181-186.e1.
- Aasheim ET, Hofsø D, Hjølmesæth J, Kare B, Bohmer T: Vitamin status in morbidly obese patients a cross-sectional study 2008.

- Aasheim ET, Johnson LK, Hofsø D, Bøhmer T, Hjølmesæth J: Vitamin status after gastric bypass and lifestyle intervention: a comparative prospective study. *Surg Obes Relat Dis* 2012; 8:169–175.
- Ventura P, Corradini E, Di Pierro E, Marchini S, Marcacci M, Cuoghi C, et al.: Hyperhomocysteinemia in patients with acute porphyrias: A potentially dangerous metabolic crossroad? *Eur J Intern Med* 2020; 79:101–107.
- Ventura P, Panini R, Verlatto C, Scarpetta G, Salvioli G: Hyperhomocysteinemia and related factors in 600 hospitalized elderly subjects. *Metabolism* 2001; 50:1466–1471.
- Ventura P, Panini R, Emiliani S, Salvioli G: Plasma homocysteine after insulin infusion in type II diabetic patients with and without methionine intolerance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004; 112:44–51.
- Desborough R, Nicklin P, Gossiel F, Balasubramanian M, Walsh JS, Petryk A, et al.: Clinical and biochemical characteristics of adults with hypophosphatasia attending a metabolic bone clinic. *Bone* 2021; 144:115795.
- Chew S-C, Khor G-L, Loh S-P: Association between dietary folate intake and blood status of folate and homocysteine in Malaysian adults. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2011; 57:150–155.

Símbolos utilizados:

	Fabricante
	Número de catálogo
	Quantidade suficiente para <n> ensaios
	Código do lote
	Validade
	Limite de temperatura
	Consultar as instruções para utilização
	Produto para a saúde para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Cuidado
	Atenção
	Perigo
	Perigo
	Perigo
	Este produto cumpre as exigências da Regulation (EU) 2017/746 relativa aos dispositivos médicos para uso em diagnóstico <i>in vitro</i>

Fabricante: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Regularizado por: BioSys Ltda
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
Anvisa: 10350840121
SAC: sac@biosys.com.br – 0800 015 1414 / (21) 3907-2534
www.biosys.com.br