

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 10350840180  
SAC: (21) 3907-2534 – [sac@biosys.com.br](mailto:sac@biosys.com.br)  
[www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br)

**CHROMSYSTEMS**  
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

## **β-CAROTENE IN SERUM/PLASMA– HPLC** **(β-CAROTENO EM SORO/PLASMA POR HPLC)**

**Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de β-Caroteno em Soro/Plasma por HPLC. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**

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

<b>Artigo</b>	<b>Apresentação</b>
<b>32000</b>	Kit Reagente para Análise de β-Caroteno em Soro/Plasma (100 análises)

**Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de β-Caroteno em soro/plasma por HPLC no site [www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br).**

### **SUMÁRIO**

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para a determinação simples e segura de β-Caroteno em soro/plasma, utilizando um sistema isocrático de HPLC com detector UV. O procedimento de preparação das amostras combina uma rápida etapa de precipitação e de extração. A elevada estabilidade das amostras permite a realização de vários lotes de análises, sem comprometer a confiabilidade dos resultados.

### **MÉTODO**

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV.

### **PRINCÍPIO**

Os possíveis interferentes presentes na amostra são eliminados por uma etapa combinada de precipitação e extração, com adição de reagentes específicos. Após a injeção no sistema de HPLC, a detecção UV permite a leitura de absorbância dos analitos em comprimento de onda selecionado (453 nm).

### **REAGENTES**

Componentes e Composição:

<b>Produto</b>	<b>Composição</b>	<b>Apresentação</b>
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução de acetonitrila, metanol e tetrahidrofurano	1000 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução de dimetil-beta-caroteno 250 nmol/L em etanol	1 x 5 mL
Padrão de Calibração (Calibration Standard)	Soro humano contendo β-caroteno	5 x 0,5 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução de etanol	1 x 5 mL
Tampão de Extração (Extraction Buffer)	Solução de butanol e acetato de etila	1 x 20 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 estabilidade dos reagentes em uso (Fase Móvel, Reagente de Precipitação, Tampão de Extração) apresenta estabilidade garantida por pelo menos 1 ano após abertura dos mesmos, armazenados nas condições descritas abaixo.

O Padrão de calibração reconstituído é estável por até 5 dias quando mantido fechado, protegido da luz e refrigerado (+2 a +8°C). Por períodos maiores (até 2 meses), armazenar abaixo de -20°C.

<b>Artigo</b>	<b>Produto</b>	<b>Temperatura</b>
32001	Fase móvel	18 – 30°C
32003	Padrão de Calibração de β-Caroteno em Soro (liofilizado)	< -18°C
32004	Padrão Interno	< -18°C
32005	Reagente de Precipitação	18 – 30 °C
32006	Tampão de Extração	18 – 30°C

### **CUIDADOS E PRECAUÇÕES**

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

### **GARANTIA**

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. 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, o reagente de precipitação, o tampão de extração e os resíduos de preparação das amostras contêm solventes orgânicos e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.

### **PREPARAÇÃO DOS REAGENTES**

**Fase Móvel:** pronto para uso.

**Padrão Interno:** pronto para uso.

**Reagente de Precipitação:** pronto para uso.

**Tampão de Extração:** pronto para uso.

## Padrão de Calibração de $\beta$ -Caroteno em Soro (Iiofilizado):

O calibrador (artigo 32003) é rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir, pipetar exatamente 0,5 mL de água tipo I no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição. Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. Evitar a exposição direta à luz. O calibrador reconstituído é estável por 5 dias se protegido da luz e mantido refrigerado, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento (máximo de 2 meses), conservar a - 20 °C A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto.

### MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 32100).

Controle de  $\beta$ -Caroteno em Soro, Bi-Nível (I+II) (Chromsystems art. 0025).

Água tipo I ou grau HPLC.

Centrífuga.

Metanol ou Acetonitrila grau HPLC.

Material geral de laboratório.

### AMOSTRA

Deverão ser analisadas amostras de soro ou plasma.

**Estabilidade da amostra:** as amostras coletadas desta forma são estáveis por 5 dias se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a - 20°C.

**Estabilidade das amostras preparadas (elutos):** as amostras preparadas são estáveis por 2 dias em temperatura ambiente e por até 1 semana se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C, protegidas da luz e em frascos de vidro. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a - 20 °C.

### PROCEDIMENTOS DO TESTE

#### Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção de 50 $\mu$ L, tempo de corrida analítica 10 min.
Detector UV:	Comprimento de onda de 453 nm
Fluxo:	1,5 - 1,8 mL/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aprox. 25 °C)

#### Procedimento de preparação de amostras:

Utilizar os tubos de reação que acompanham o kit, para que as amostras sejam protegidas da exposição à luz ambiente.

1. Transferir 100  $\mu$ L de soro/plasma (padrões, controles e amostras) e 50  $\mu$ L de Padrão Interno para tubos de reação devidamente identificados e agitar.
2. Adicionar 50  $\mu$ L de reagente de precipitação e agitar rapidamente (vortex), sem centrifugar.
3. Adicionar 200  $\mu$ L de tampão de estabilização e agitar por 30 seg (vortex).
4. Centrifugar por 10 min a 13000 rpm.
5. Transferir o sobrenadante para um frasco de vidro, protegido da luz.
6. Injetar 50  $\mu$ L do sobrenadante no sistema de HPLC.

Controles devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema.

Tempos de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Criptoxantina	3,1
Padrão Interno	3,8
Licopenos (isômeros)	5,2
$\alpha$ -Caroteno	7,7
trans- $\beta$ -Carotenos totais	8,3
cis- $\beta$ -Caroteno	9,0

## CÁLCULOS

$$C_{\text{Analito}} [\text{ng/mL}] = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Calibrador}}}{A_{\text{Calibrador}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{Calibrador}}$$

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

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

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra =  $IS_{\text{Amostra}}$

Área/altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador =  $IS_{\text{Calibrador}}$

Concentração C do analito A no calibrador =  $C_{\text{Calibrador}}$

\* A concentração do analito depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador. Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao padrão de calibração e às amostras de pacientes, a concentração do padrão interno pode ser considerada como "1" para fins de cálculo.

Fatores de conversão:

Analito	ng/mL para nmol/L	nmol/L para ng/mL
$\beta$ -Caroteno	x 1,863	x 0,537

### CONTROLES

A Chromsystems disponibiliza os seguintes produtos:

Artigo	Produto	Apresentação
0025	Controle de $\beta$ -Caroteno em Soro, bi-Nível (I+II)	2 x 5 x 2mL

### DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

#### Linearidade e Limite de Quantificação:

O limite de quantificação do método é de 10 ng/mL. O método é considerado linear do limite de quantificação até um valor de concentração de 3000 ng/mL.

#### Recuperação:

A taxa de recuperação de trans- $\beta$ -carotenos totais e do padrão interno é maior ou igual a 90%.

#### Precisão:

A determinação da precisão intra-ensaio e inter-ensaio foi realizada a partir da média de múltiplas amostras, analisadas em diferentes concentrações.

Precisão intra-ensaio n = 8	Coeficiente de variação (%) / Concentração (mg/L)		
	4,6 / 68	2,1 / 181	1,8 / 353
trans- $\beta$ -Carotenos totais	1,7 / 643	1,8 / 1987	1,9 / 3667
Precisão inter-ensaio n = 20	Coeficiente de variação (%) / Concentração (ng/mL)		
	4,2 / 326	4,1 / 995	
trans- $\beta$ -Carotenos totais			

### VALORES DE REFERÊNCIA

Analito	Faixa de concentração (ng/mL)	
$\beta$ -Caroteno em soro	40 a 332*	67 a 228**

\* Referência: Krapf, F.E.; Bieger, W.P.; Tiller, F.W. LaborDatenBuch, 1995.

\*\* Referência: Mayne, S. et al. Am J Clin Nut, 68(3):642-47, 1998.

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características da população.

#### **LITERATURA**

1. H. Faure, V. Fayol, C. Galabert, F. Nabet et al. Ann Biol Clin (Paris), 1999, 57(2), 169-83.
2. J. E. Mason, J. M. Gaziano et al. Journal of the American College of Nutrition, 1993, 12(4), 426-32.
3. G. S. Omenn, G. E. Goodman, M. D. Thornquist et al. The New England Journal of Medicine, 1996, 334(18), 1150-55.
4. D. A. Hughes, A. J. Wright, P. M. Finglas et al. J Lab Clin Med, 1997, 129(3), 309-17.
5. H. Biesalski, J. Schrezenmeir, P. Weber, H. Weiß (Herausg.), Vitamine, 1997, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
6. Deutsches Ärzteblatt, April 2000, 97(16), C-810.
7. F. E. Krapf, W. P. Bieger, F. W. Tiller. LaborDatenBuch (1995) Urban & Schwarzenberg, Munich.
8. S. Mayne, B. Cartmel, F. Silva et al. American Journal of Clinical Nutrition, 1998, 68(3), 642-647.

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH  
Am Haag 12  
D-82166 Gräfelfing  
Munique, Alemanha  
Fone: +49 89 18930-0  
Fax: +49 89 18930-199  
[www.chromsystems.de](http://www.chromsystems.de)