

VITAMINAS A/E NO SORO/PLASMA POR HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* das Vitaminas A e E 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.

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 metanólica + sulfato de zinco	1 x 2,5 mL
Reagente de Precipitação 2 (Precipitation Reagent II)	Propanol 80%	1 x 40 mL
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução de acetato de tocoferol 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	2 a 30°C
34008	Padrão Interno	2 a 8°C
34006	Reagente de Precipitação I	2 a 8°C
34003	Reagente de Precipitação II	2 a 8°C
34004	Padrão de Calibração de Vitaminas A/E em Soro (liofilizado)	< -18°C
0032	Controle de Vitaminas A/E Soro, Bi-Nível (I+ II)	< -18°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 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.

Padrão de Calibração de Vitaminas A/E em Soro:

O calibrador (artigo 34004) é rastreável a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir o soro calibrador liofilizado, pipetar exatamente 1,0 mL de água destilada 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. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

Controle de Vitaminas A/E em Soro, Nível I + II:

Os controles em soro nível I + nível II (artigo 0032) são submetidos ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. Os controles são incluídos em cada série analítica, para monitorar a exatidão e a precisão do sistema. **Para reconstituir o soro controle liofilizado, pipetar exatamente 2,0 mL de água destilada 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. A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os controles.

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 é coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A amostra deve ser extraída com garroteamento leve e cuidado para prevenir a hemólise.

Estabilidade da amostra: Após a centrifugação o soro/plasma obtido deve ser separado o mais rápido possível e armazenado em temperatura < -18°C. Proteger a amostra da luz.

Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): Preparadas como descrito, as amostras são estáveis protegidas da luz entre 2° a 8°C por até 12 horas.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador: volume de injeção 50 µL, tempo de corrida analítica 9 min.,
A refrigeração da amostra é recomendada, manter o compartimento protegido da luz.

Razão de fluxo: 1,5 mL/min.

Temperatura da coluna: temperatura ambiente (20 - 25°C)

Detector UV programável: iniciar em $\lambda_{\text{max}} = 325 \text{ nm}$, 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:

- 200 µL de amostra (soro/ plasma, calibrador, controle)
+ 20 µL de Padrão Interno
+ 25 µL de Reagente de Precipitação I
- Agitar por 30 s (vórtex).
- Adicionar 400 µL do Reagente de Precipitação II, vórtex por 30 s.
- Centrifugar por 10 min a 9.000 g.
- 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

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

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

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

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

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 1 mL
0032	Controle de Vitaminas A/E Soro, Bi-Nível (I+ II)	2 x 5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Recuperação:

Vitamina A 103,9%

Vitamina E 97,5%

Linearidade e limite de quantificação:

Analito	Limite de quantificação aproximado (mg/L)*	Limite máximo de linearidade (mg/L)
Vitamina A	0,02	2,25
Vitamina E	0,50	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 (1,266)
Vitamina E	2,4 (8,86)	1,6 (12,86)	2,2 (24,86)

Precisão inter-ensaio:

Analito	Coeficiente de variação (%) (para a concentração em mg/L)		
	n = 20		
Vitamina A	2,6 (0,506)	3,0 (1,062)	
Vitamina E	3,1 (8,05)	2,7 (16,07)	

VALORES DE REFERÊNCIA

	[mg/L]	[µmol/L]
Vitamina A em soro: (adultos)	0,3 – 0,7	1,05 – 2,45
Vitamina E em soro: (D- α -tocoferol, adultos)	5,0 – 20,0	11,6 - 46,4

LITERATURA

- 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.
- Reinards, R. in: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie; 3nd Ed., Verlag Schattauer Stuttgart/New York; 344-346; 1987.
- 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.
- 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.
- Bertelsmann Stiftung (Editor): Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und chemische Analyse; Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh; 1997.
- Biesalski, J., Schrezenmeier, J., Weber, P., Weiß, H. E.: Vitamine – Physiologie, Pathophysiologie, Therapie; Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York; 1997.
- Baltes, W.: Lebensmittelchemie; 2nd Ed., Springer Verlag Berlin; 1989.

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