

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 10350840142  
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

## VITAMINA B<sub>1</sub> EM SANGUE TOTAL POR HPLC

### VITAMIN B1 (THIAMINDIPHOSPHATE) IN WHOLE BLOOD-HPLC

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Vitamina B<sub>1</sub> em Sangue Total 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
35000	Kit Reagente para Análise de Vitamina B <sub>1</sub> em Sangue Total por HPLC, 100 análises

**Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Vitamina B<sub>1</sub> em Sangue Total por HPLC no site [www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br).**

#### SUMÁRIO

Este kit de reagentes permite uma determinação rápida, simples e específica da tiamina pirofosfato (TPP), forma fisiologicamente ativa da Vitamina B<sub>1</sub>, empregando um sistema isocrático de HPLC com detector de fluorescência. O preparo da amostra inclui uma etapa de precipitação após extração e uma subsequente derivatização, para permitir a detecção por fluorescência, sem o uso de colunas de preparação.

#### MÉTODO

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

#### PRINCÍPIO

O preparo da amostra se restringe a etapas de extração e de precipitação, seguida da derivatização da vitamina B<sub>1</sub> no frasco de reação. A amostra derivatizada é analisada utilizando detector de fluorescência com comprimento de onda variável.

#### REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase Móvel (Mobile Phase)	Solução aquosa de fosfato de potássio	1 x 1000 mL
Tampão de Extração (Extraction Buffer)	Solução de metanol e HClO <sub>4</sub>	1 x 10 mL
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução aquosa de ácido perclórico	1 x 30 mL
Reagente de Derivatização 1 (Derivatisation Reagent 1)	Solução de fosfato de potássio	5 x 0,3 mL
Reagente de Derivatização 2 (Derivatisation Reagent 2)	Solução aquosa de NaOH	1 x 20 mL
Tampão de Estabilização (Stabilisation Buffer)	Solução aquosa de bissulfito	1 x 10 mL
Tampão de Neutralização (Neutralisation Buffer)	Ácido fosfórico	1 x 10 mL
Frascos de Reação (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, e para os demais reagentes Chromsystems utilizados na realização da análise.

Artigo	Produto	Armazenamento
35021	Fase Móvel	2 a 30°C
37003	Tampão de Extração	2 a 30°C
37004	Reagente de Precipitação	2 a 8°C
35005	Reagente de Derivatização 1 (liofilizado)	2 a 30°C
35006	Reagente de Derivatização 2	2 a 30°C

35007	Tampão de Estabilização	2 a 8°C
35009	Tampão de Neutralização	2 a 8°C
37008	Padrão de Calibração de Vitaminas B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> em Sangue Total	< -18 °C
0033	Controle de Vitaminas B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> em Sangue Total, 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 contém solventes orgânicos e deve ser descartada como resíduo livre de halogênio de acordo com os regulamentos locais.

O Reagente de Precipitação e os resíduos das amostras preparadas contêm ácidos inorgânicos e devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais.

#### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

**Fase Móvel:** pronto para uso.

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

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

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

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

**Reagente de Derivatização 1:** reconstitua o conteúdo do frasco do Reagente de Derivatização 1 (art. 35005) com exatamente 0,3 mL de água grau HPLC. Sob refrigeração (+2 a +8°C), a estabilidade desta solução é de aproximadamente 2 semanas.

**Reagente de Derivatização 2:** pronto para uso.

#### Mix de Derivatização:

Misture 100 µL do Reagente de Derivatização 1 com 2,0 mL do Reagente de Derivatização 2 (art. 35006). Esta mistura (mix de derivatização) na proporção 1:20 está pronta para o uso no preparo das amostras. A estabilidade é de 12 horas em temperatura ambiente.

#### Padrão de Calibração em Sangue Total:

O calibrador de Vitaminas B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> em sangue total (art. 37008) é rastreável a substâncias de referência adquiridas de fornecedor certificado. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir o calibrador liofilizado em sangue total, pipetar exatamente 1,0 mL de água grau HPLC no frasco.** Deixar repousar a temperatura ambiente por 10-15 minutos, 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.

### Controles em Sangue Total:

Os controles de vitaminas B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> em sangue total (art. 0033) 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 controle liofilizado, pipetar exatamente 2,0 mL de água grau HPLC no frasco.** Deixar repousar a temperatura ambiente por 10-15 minutos, 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.35110)  
Padrão de Calibração de Vit. B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> em Sangue Total (Chromsystems art. 37008)  
Controle de Vit. B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> em Sangue Total, Bi-Nível (I + II) (Chromsystems art. 0033)  
Centrífuga para microtubos.  
Água tipo I ou HPLC.  
Metanol grau HPLC.  
Material Geral de Laboratório.

### AMOSTRA

O material utilizado é sangue total-EDTA. O sangue deve ser coletado pela manhã em jejum e antes de qualquer medicação. A coleta deve ser realizada com garroteamento leve, tendo o cuidado de evitar hemólise.

**Estabilidade das amostras:** Em frascos fechados e protegidos da exposição à luz, as amostras são estáveis por 24 horas entre 2 a 8°C. Amostras não analisadas imediatamente devem ser mantidas em temperatura < -18 °C e são estáveis por até 6 meses.

**Estabilidade das amostras preparadas (eluatoss):** As amostras preparadas são estáveis em temperatura entre 2° a 8°C por até 4 dias.

### PROCEDIMENTOS DO TESTE

#### Ajustes do instrumento:

Amostrador: Volume de injeção 50 µL, tempo de corrida analítica aprox. 6 min.  
Fluxo: 1,0 mL/min.  
Temperatura da coluna: Temperatura ambiente (aprox. 20°C)  
Detector de fluorescência: EX = 367 nm, EM = 435 nm  
Solução de limpeza do injetor: Água grau HPLC com no máx. 5% metanol

#### Procedimento de Preparo das Amostras:

Em um frasco de reação âmbar, pipetar:

- 200 µL de amostra (sangue total-EDTA, calibrador ou controle) + 100 µL de Tampão de Extração.
- Agitar por 2 seg. (vortex).
- Acrescentar 300 µL de Reagente de Precipitação.
- Agitar por 30 seg. (vortex).
- Centrifugar por 5 min. a 9.000 g
- Em um novo frasco de reação, pipetar 200 µL do mix de derivatização (veja Preparação dos Reagentes).
- Adicionar 100 µL do sobrenadante obtido acima.
- Acrescentar 100 µL do Tampão de Neutralização.
- Acrescentar 100 µL do Tampão de Estabilização e misturar.
- Deixar em repouso por 20 min.
- Injetar 50 µL no sistema HPLC.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. (minutos)
Vitamina B <sub>1</sub> (tiamina pirofosfato)	3,2

### CÁLCULOS

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

Área/altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A<sub>Amostra</sub>

Área/altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = A<sub>Calibrador</sub>

Concentração C do analito A no calibrador (veja o folheto de informações) = C<sub>Calibrador</sub>

Fatores de conversão

Analito	µg/L para nmol/L	nmol/L para µg/L
Vitamina B <sub>1</sub> (Tiamina pirofosfato, TPP)	x 2,351	x 0,4253

### CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
37008	Padrão de Calibração de Vitaminas B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> em Sangue Total	5 x 1mL
0033	Controle bi-nível de Vitaminas B <sub>1</sub> /B <sub>2</sub> em sangue total	2 x 5 x 2 mL

### DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

#### Linearidade:

O método é linear em uma faixa de concentração de tiamina pirofosfato (TPP) que varia de 10,15 a 203,06 µg/L.

#### Recuperação:

A taxa de recuperação média da tiamina pirofosfato (TPP) é de 93%.

#### Limite de quantificação:

O limite de quantificação para a tiamina pirofosfato (TPP) é 15,23 µg/L.

#### Precisão intra-ensaio:

A precisão intra-ensaio foi determinada em 10 análises da mesma amostra, fornecendo um coeficiente de variação de 4%.

#### Precisão inter-ensaio:

A precisão inter-ensaio foi determinada em duas diferentes concentrações, fornecendo os resultados da tabela seguinte:

Analito	Coeficiente de variação (%) (concentração em µg/L)	
	n=20	n=20
Vitamina B <sub>1</sub> (TPP)	5,4% (29)	5,7% (94)

### VALORES DE REFERÊNCIA

	[µg/L]	[nmol/L]
Vitamina B <sub>1</sub> (TPP) em sangue total	28 - 85	66,5 - 200

### LITERATURA

- Bertelsmann Stiftung (Editor): Mineralstoffe, Spurenelemente und Vitamine – Klinische Aspekte und Chemische Analyse; Verlag Bertelsmann Stiftung, Gütersloh (1997).
- Isler O., Brubacher G., Ghisla S., Kräutler B., Vitamine (2<sup>nd</sup> Ed.), Georg Thieme Verlag Stuttgart (1988).
- Greiling H., Gressner A. M., Lehrbuch d. Klinischen Chemie und Pathobiochemie, Schattauer Verlag Stuttgart (1987).
- Baltes W., Lebensmittelchemie (2<sup>nd</sup> 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