VITAMINA B6 SU SANGUE INTERO in FLUORIMETRIA - FAST – Codice Z85610

INTRODUZIONE

La vitamina B_6 è una vitamina idrosolubile che fa parte del gruppo B. Le vitamine di questo gruppo prendono parte al metabolismo dei carboidrati, dei grassi e delle proteine e sono quindi essenziali per la produzione di energia e per il normale funzionamento di diversi organi e apparati. Con il termine vitamina B6 si indicano tre derivati piridinici presenti in natura: piridossina, piridossammina e piridossale (**PL**), nonché i loro rispettivi esteri 5' fosforici: piridossina-5'-fosfato, piridossammina-5'-fosfato e la forma attiva piridossale-5'-fosfato (**PLP**). La vitamina B_6 è presente sia nei prodotti animali che vegetali. Generalmente nei primi vi è una maggior quantità di piridossamina e piridossale fosforilati mentre nei secondi prevale la piridossina. Nei vegetali, tuttavia, vi può anche essere una quota di piridossamina glicosilata che non viene idrolizzata dagli enzimi intestinali e che per tanto è inutilizzabile. Le forme della vitamina B_6, detta anche adermine, sono stabili al calore soprattutto in ambiente acido ma vengono decomposti dalla luce o da sostanze ossidanti.

Sembra che l'assorbimento della vitamina B_6 avvenga a livello del digiuno tramite un processo di diffusione passiva. Dalle cellule dell'epitelio intestinale la vitamina passa nel sangue ove si può trovare legata all'albumina oppure all'emoglobina (in quest'altro caso si trova all'interno dei globuli rossi). La piridossina viene trasformata in piridossale e/o piridossamina le quali, una volta fosforilate, costituiscono la forma biologicamente attiva della vitamina B6, funzionando come coenzimi. Le reazioni in cui queste due sostanze sono coinvolte, riguardano sia il metabolismo degli amminoacidi che di vari altri composti. Dato il diretto coinvolgimento nella conversione dell'omocisteina, amminoacido altamente tossico, in cisteina, il deficit di vitamina B6 favorisce un innalzamento della concentrazione di omocisteina e quindi un drastico aumento del rischio di arteriosclerosi.

Tra i sintomi che possono indicare una carenza di vitamina B6 ci sono depressione con nausea, vomito, dermatite seborroica, lesioni delle mucose, glossite e cheilosi e neuropatie periferiche.

Visto che la buona utilizzazione delle proteine assunte con la dieta dipende molto dalla presenza di vitamina B6 si è deciso di regolare i livelli di assunzione consigliati a seconda dell'apporto proteico giornaliero. Al momento per l'adulto si consiglia un quantitativo di vitamina pari a 1,5 mg/ 100 g di proteine assunte.

Nei bambini si consiglia una dose giornaliera compresa tra 0,3 - 0,8 mg.

In gravidanza o durante l'allattamento si consiglia di aumentare la dose di vitamina B6 del 20 e del 30%, rispettivamente.

Si è visto che quantitativi superiori a 50 mg/die per periodi di tempo prolungati possono provocare delle neuropatie periferiche per cui si consiglia di non arrivare ad assumere queste dosi.

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail:info@eurekaone.com
www.eurekaone.com

eureka Lab Division

Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579

CE

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo : La forma attiva, Piridossale-5'-fosfato (**PLP**), viene dosato nel sangue dopo deproteizzazione, derivatizzazione ed iniezione del surnatante opportunamente trattato.

Recupero del Metodo : >99%

Sensibilità del Metodo (LLOD): 0.33 ng/ml

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ): 1.0 ng/ml

Linearità del metodo : 1 – 500 ng/ml

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
34,65 ng/ml	84,6 ng/ml
17,8%	15,0%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	CA
18 ng/ml	51,3 ng/ml	351,3 ng/ml
7,4%	2,8%	4,1%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	CA
18 ng/ml	51,3 ng/ml	351,3 ng/ml
12,6%	8,6%	7,0%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. std: 0,9663 ± 0,0084

Range di normalità nel sangue : Piridossale-5'-fosfato (**PLP**) 8,7 – 27,2 ng/ml

G.J. den Ottolander, Diagnostisch Kompas1997, S.441

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C. Il Calibratore liofilo è stabile 24 mesi se conservato a -20°C.

Reagente A – Soluzione Diluente, **1 x 30 ml**

Reagente B – Soluzione Derivatizzante, **1 x 4,5 ml**

Reagente C – Soluzione Deproteinizzante, **1 x 5 ml**

Reagente D – Soluzione Stabilizzante, **1 x 3 ml**

Reagente E – Soluzione Test, **1 x 1 ml**

Calibratore liofilo, 4 x 1 ml

Codice Z85616
Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Reagente G – Soluzione Standard interno, **1 x 6 ml**

Reagente M – Fase Mobile, **4 x 500 ml**

200 Eppendorf ambrate

Dotazione strumentale minima richiesta: Strumento HPLC isocratico con loop da 10 µl
Detector Fluorimetrico **λ_{EX}=380 nm** **λ_{EM}=450 nm**

Modalità di prelievo ematico:

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta con EDTA come anticoagulante. Il campione di sangue intero deve essere stoccato immediatamente al riparo dalla luce in un contenitore chiuso a una temperatura di 2 – 8 °C (stabile 1 settimana). I campioni che non vengono analizzati subito devono essere congelati a – 20°C. Evitare il ricongelamento.

Indice Riferimenti Bibliografici

1- G.J. den Ottolander, Diagnostisch Kompas1997, S.441(*)
2-Piridoxal Phosphate decreases in plasma but not Erythrocytes during sistemi inlammatory response. Taiwar-Quasim-Mcmillan
3- A simple and effective Method for HPLC quantification of simultaneous vitamin B1 and vitamin B6 from whole blood. Wei-Orlowicz-Pike

ATTENZIONE: LA VITAMINA B6 E' FOTOSENSIBILE! UTILIZZARE PROVETTE E VIAL AMBRATE.

PROCEDURA PREANALITICA

In una provetta dispensare :

- 900 µl di H_2O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente E** - Soluzione Test
- 50 µl di **Reagente G** - Soluzione Standard interno
- 40 µl di **Reagente B** - Soluzione Derivatizzante

Al vortex per 20 secondi

Incubare a temperatura ambiente, al riparo dalla luce per 30 minuti

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 10 µl di questa soluzione nel sistema HPLC per identificare il tempo di ritenzione dell' analita che deve essere simile a quello riportato in Fig. 1.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei Campioni

Dispensare in provette coniche da 1,5 ml tipo Eppendorf ambrate con tappo (fornite nel kit) :

	Bianco	**Calibratore**	**Campione**
Acqua di grado HPLC	300 µl		
Calibratore		300 µl	
Campione			300 µl
Reagente A – Soluzione Diluente	300 µl	300 µl	300 µl
Reagente G – Soluzione Standard Interno	50 µl	50 µl	50 µl

Al vortex per 30 secondi

FASE 2 : Aggiungere a ciascuna provetta 40 µl di **Reagente B -** Soluzione Derivatizzante

Al vortex per 20 secondi

Incubare a temperatura ambiente, al riparo dalla luce per 30 minuti

FASE 3 : Aggiungere a ciascuna provetta 50 µl di **Reagente C –** Soluzione Precipitante

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 20 secondi

Incubare a 2-8 °C, al riparo dalla luce per 30 minuti

FASE 4 : Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti.

FASE 5 : Trasferire 300 µl del sovranatante in una eppendorf ambrata (se pescando il surnatante si preleva del precipitato, l'eluato va centrifugato nuovamente)

FASE 6 : Aggiungere a ciascuna vial 24 µl di **Reagente D –** Soluzione Stabilizzante

Al vortex per 10 secondi

FASE 7 : Trasferire circa 200 µl del sovranatante in una vial di vetro ambrata provvista di insert

N.B.: il campione così preparato è stabile 1 giorno a 2-8 °

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel cromatografo HPLC.

VITAMINA B6 SU SANGUE INTERO in FLUORIMETRIA – Avvertenze

REAGENTE E: SOLUZIONE TEST

PIRIDOSSAL-5-FOSFATO (PLP)	10.000 ng/ml

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ_{EX}	380 nm
λ_{EM}	450 nm

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µ) è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* ZORBAX Eclipse Plus C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µ) .
Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare 30 ml di una soluzione di **H2O : Acetonitrile (20 : 80 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**. Far passare 30 ml di una soluzione di **H_2O : Acetonitrile (80 : 20 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. **Non è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.**
Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 15 ml di **H2O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v / v)** al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Flussare una soluzione di **H2O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v / v)** per 30 minuti scaricandola. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica.** La colonna va stoccata in una soluzione di **H2O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v / v)**

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua / Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).

PARAMETRI HPLC

LOOP	10 µl
Flusso di lavoro consigliato	0,7/1,5 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 70-150 bar

SETTAGGIO DEI FLUSSI

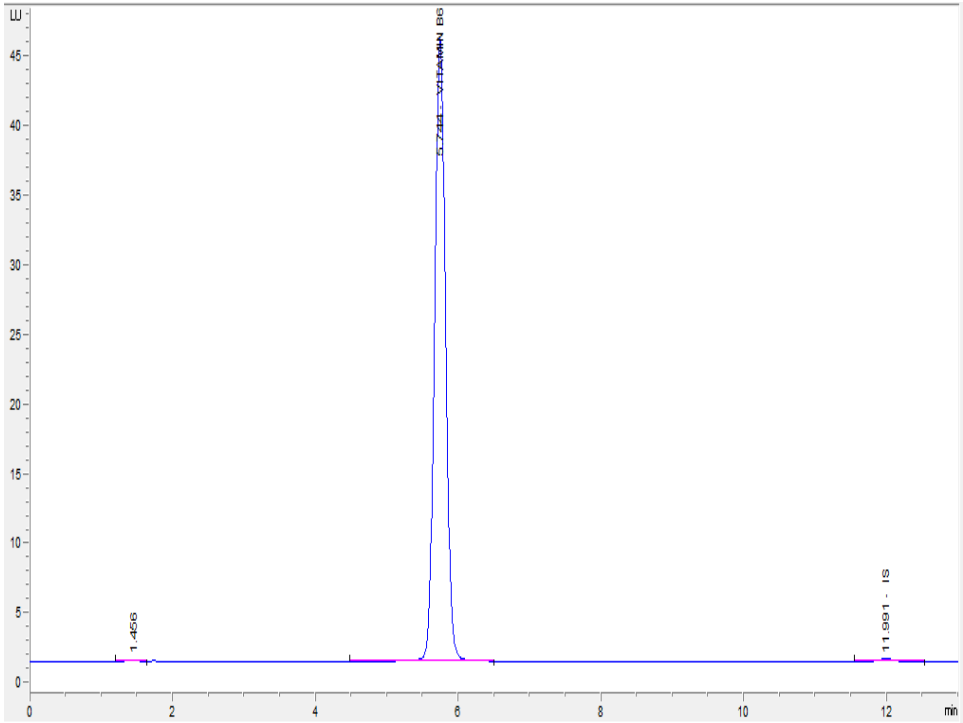
Tempo (min)	Flusso (ml/min)
0	0.7
7.1	0.7
7.2	1.5
12.0	1.5
12.1	0.7
13.0	0.7

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z85616	Calibratore su sangue intero per Vitamina B6	4 x 1 ml
Z85017	Controllo su sangue intero per Vitamine B1/B2/B6 – Livello 1	5 x 1 ml
Z85018	Controllo su sangue intero per Vitamine B1/B2/B6 – Livello 2	5 x 1 ml
Z85019	Controllo su sangue intero per Vitamine B1/B2/B6 – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Z959961902	Colonna Analitica Zorbax Eclipse Plus C 18 (100 x 4,6mm –3,5 um)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S29004U	Vial ambrate di vetro da 2 ml	1 x 100 PZ
S24717	Riduttori per Vial di vetro ambrate da 2 ml	1 x 100 PZ
S51820717	Tappi per vial ambrate di vetro da 2 ml	1 x 100 PZ

VITAMINA B6 SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi di riferimento)



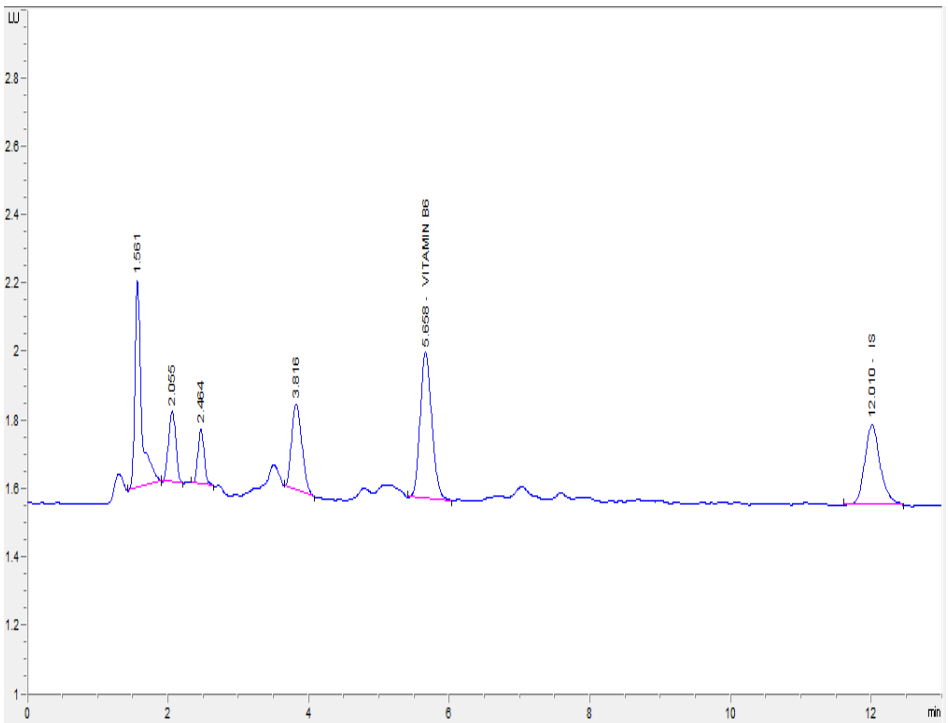
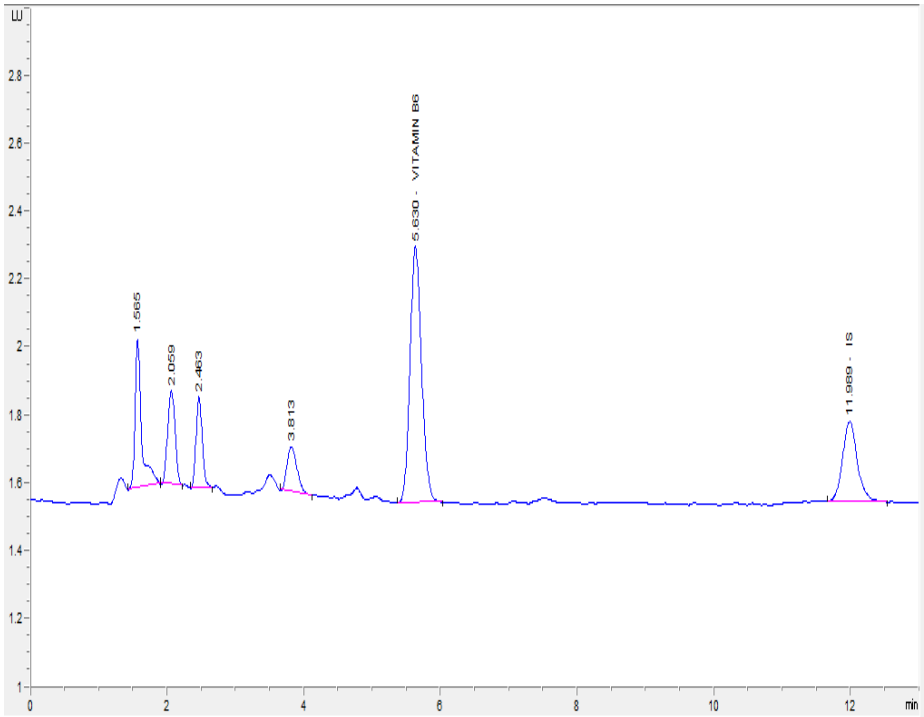


Fig. 1 :	***Soluzione Test***
	R.T. 5.7 Vitamina B6 (PLP)
	R.T. 11.9 Standard interno

Fig. 2 :	***Calibratore su sangue intero***
	R.T. 5.6 Vitamina B6 (PLP) 26 ng/ml
	R.T. 12.0 Standard interno

VITAMINA B6 SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi di riferimento)



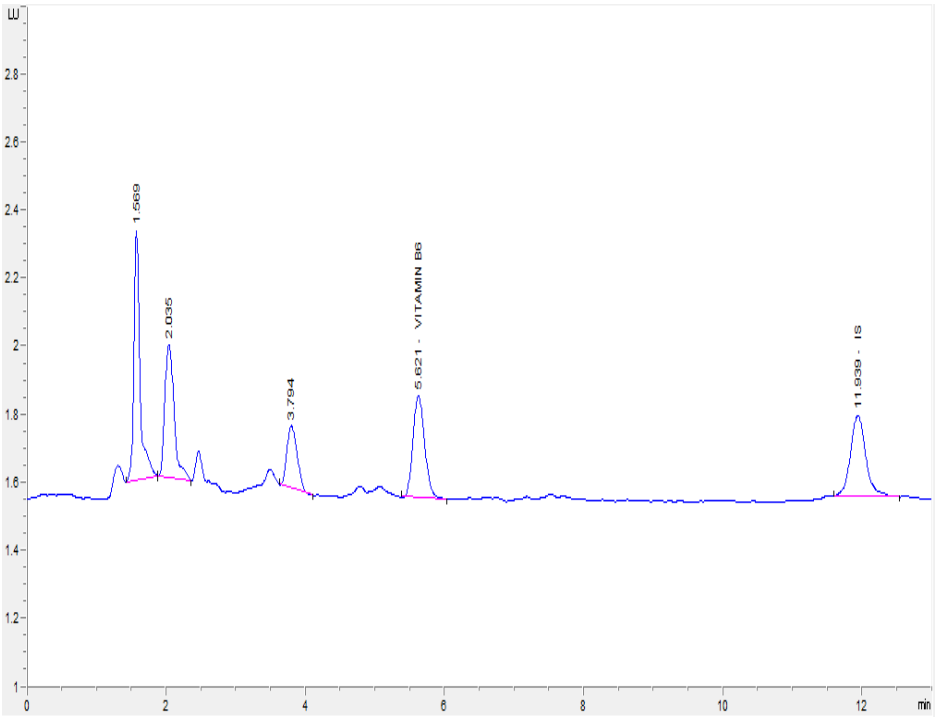


Fig. 3 :	***Controllo su sangue intero***		
	R.T. 5.6	Vitamina B6 (PLP)	50 ng/ml
	R.T. 11.9	Standard interno	

Fig. 4 :	***Campione su sangue intero***		
	R.T. 5.6	Vitamina B6 (PLP)	18 ng/ml
	R.T. 11.9	Standard interno	