

VITAMINA B2 SU SANGUE INTERO in FLUORIMETRIA - FAST – **Codice Z85110**

INTRODUZIONE

La **riboflavina** (o **vitamina B₂**) venne isolata per la prima volta nel 1927 ad opera di Paul Gyorgy. Successivamente si vide anche che il latte presenta elevate concentrazioni di tale sostanza che, per tale motivo, all'inizio venne denominata lattoflavina. In un primo tempo era stata denominata **vitamina G**.

Il chiarimento della sua struttura chimica e la constatazione della presenza di una molecola di ribitolo fece sì che il nome della vitamina venne cambiato in quello di riboflavina.

La riboflavina è un composto eterociclico ottenuto da una molecola di flavina cui è legata una catena formata da ribitolo. È un composto di colore giallo poco solubile in acqua, stabile al calore (la cottura ne determina l'inattivazione di solo il 10-20% del quantitativo totale) e fluorescente qualora sottoposto a luce ultravioletta.

Se colpito dalla luce, si determina una reazione di fotolisi che produce il distacco di un radicale ribitolo e conseguente perdita dell'azione vitaminica.

La riboflavina si trova negli alimenti principalmente come forma fosforilata. Essa, per essere assorbita, viene defosforilata da specifiche fosfatasi che si trovano nell'intestino tenue. Successivamente la vitamina viene assorbita tramite un sistema di trasporto facilitato.

La riboflavina viene trasportata nel sangue legata ad alcune proteine plasmatiche, soprattutto albumina ed altre globuline quali IgA, IgG ed IgM. Dal sangue essa raggiunge il fegato ed altri tessuti dove viene successivamente trasformata in flavin-mononucleotide (FMN) e flavin-adenin-dinucleotide (FAD), le due forme coenzimatiche.

Le due forme coenzimatiche sono componenti essenziali degli enzimi flavinici, funzionando da gruppi prostetici. Essi intervengono in varie reazioni di ossidoriduzione del metabolismo dei carboidrati, proteine e lipidi tra cui: decarbossilazione ossidativa del piruvato, ossidazione di acidi grassi ed aminoacidi, trasporto degli elettroni durante la fosforilazione ossidativa.

La riboflavina, in natura, è abbondantemente presente. Si trova nelle verdure, nel lievito e soprattutto nel latte, nel fegato, nel cuore, nel rene e nell'albume dell'uovo. Nelle verdure il contenuto della vitamina è presente soprattutto nelle parti a crescita attiva e diminuisce allorché la pianta smette di crescere. Anche nel latte la quantità di riboflavina può essere variabile a seconda del tipo di alimentazione degli animali produttori. Nei tessuti dei mammiferi la vitamina è presente nella forma coenzimatica.

La riboflavina è coinvolta in moltissime reazioni metaboliche che possono riguardare anche altre vitamine. Ciò significa che uno stato carenziale di riboflavina può portare ad uno stato pluricarenziale di altre vitamine.

In corso di carenza di riboflavina si rilevano tra l'altro: alterazioni mitocondriali, inibizione della conversione della vitamina B₆ nelle sue forme coenzimatiche (con conseguente pellagra), aumento della perossidazione

lipidica, anemia da carenza di ferro, aumento della sintesi di glutatione e conseguente diminuzione degli aminoacidi coinvolti in questo processo.

A livello macroscopico si rileva arresto della crescita e comparsa di una sindrome simile alla pellagra caratterizzata da lesioni delle mucose e dell'epitelio dell'occhio (vascolarizzazione bilaterale della cornea, congiuntivite ed opacità), dell'apparato gastrointestinale e delle zone di passaggio tra cute e mucose (caratteristica è la stomatite angolare).

Si ha dolore e/o bruciore alle labbra, alla lingua od alla bocca e difficoltà a deglutire e masticare, pallore, formazione di screpolature e ragadi dolorose, dermatite seborroica. Si può anche avere lacrimazione, bruciore e prurito oculari e diminuzione dell'acutezza visiva.



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



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.

N° 004	Vitamina B2 su sangue intero in Fluorimetria - FAST	06/2024
--------	---	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo : La vitamina B2 viene dosata nel sangue dopo deproteizzazione ed iniezione del surnatante opportunamente trattato.

Recupero del Metodo : >99%

Sensibilità del Metodo (LLOD):
8 ng/ml FAD
0,6 ng/ml FMN
0,6 ng/ml Riboflavina

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ):
25 ng/ml FAD
2 ng/ml FMN
2 ng/ml Riboflavina

Linearità del metodo :
25 – 2500 ng/ml FAD
2 – 500 ng/ml FMN
2 – 50 ng/ml Riboflavina

Accuratezza intra serie (errore relativo %) FAD:

Ci	Cs
152 ng/ml	627 ng/ml
2,3%	2,0%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) FAD:

Ci	Cs
152 ng/ml	627 ng/ml
4,0%	3,7%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) FAD:

C LLOQ	Cm	Cs
127 ng/ml	177 ng/ml	1127 ng/ml
3,9%	2,8%	2,5%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) FAD:

C LLOQ	Cm	Cs
127 ng/ml	177 ng/ml	1127 ng/ml
6,0%	6,2%	3,1%

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9948 ± 0,0018 FAD

Accuratezza intra serie (errore relativo %) FMN:

Ci	Cs
5,0 ng/ml	7,3 ng/ml
2,3%	5,6%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) FMN:

Ci	Cs
5,0 ng/ml	7,3 ng/ml
1,9%	8,1%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) FMN:

C LLOQ	Cm	Cs
4,8 ng/ml	5,3 ng/ml	9,8 ng/ml
14,1%	6,6%	2,8%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) FMN:

C LLOQ	Cm	Cs
4,8 ng/ml	5,3 ng/ml	9,8 ng/ml
2,9%	2,4%	3,9%

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9694 ± 0,0110 FMN

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Riboflavina:

Ci	Cs
4,6 ng/ml	6,9 ng/ml
2,3%	6,0%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Riboflavina:

Ci	Cs
4,6 ng/ml	6,9 ng/ml
2,9%	4,7%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Riboflavina:

C LLOQ	Cm	Cs
4,4 ng/ml	4,9 ng/ml	9,4 ng/ml
13,3%	3,0%	1,4%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Riboflavina:

C LLOQ	Cm	Cs
4,4 ng/ml	4,9 ng/ml	9,4 ng/ml
2,2%	2,7%	1,4%

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9790 ± 0,0057 Riboflavina

Range di normalità nel sangue :

FAD	137 – 370 ng/ml
FMN	n.d.
Riboflavina	n.d.

Indice Riferimenti Bibliografici

- 1- F.Fidanza et al. (1989), *Methods for Thiamine and Riboflavin Nutriture*, *Internat.J.Vit.Nutr.Res.*, 59, 40-47
2- *Liquid Chromatographic Determination of B2Vitamins in Human Plasma and Whole Blood*
Jean-Yves Hautem, Claire Morel, Rémy Couderc and Fathi Moussa

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 Precipitante, 1 x 30 ml

Reagente B – Soluzione Diluente, 1 x 30 ml

Calibratore liofilo, 2 x 1 ml

Codice Z85116
Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Reagente M – Fase Mobile, 3 x 500 ml

200 Eppendorf ambrate

Dotazione strumentale minima richiesta:

Strumento HPLC isocratico con loop da 20 µl
Detector Fluorimetrico $\lambda_{EX}=465\text{ nm}$ $\lambda_{EM}=525\text{ nm (B2)}$

Modalità di prelievo ematico:

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta con EDTA come anticoagulante.

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	200 µl		
Calibratore		200 µl	
Campione			200 µl
Reagente A – Soluzione Precipitante	300 µl	300 µl	300 µl

Al Vortex per almeno 30 secondi

FASE 2 : lasciar riposare a 2-8 °C per 10 minuti.

FASE 3 : Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti.

FASE 4 : Trasferire 300 µl di sovranatante in una eppendorf ambrata.

FASE 5 : Aggiungere a ciascuna eppendorf 300 µl di **Reagente B - Soluzione Diluente.**

Al vortex per 10 secondi

FASE 6 : Trasferire circa 200 µl di sovranatante in una vial di vetro ambrata provvista di insert

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

INIEZIONE :

- Iniettare 20 µl della soluzione nel cromatografo HPLC.

VITAMINA B2 SU SANGUE INTERO in FLUORIMETRIA – Avvertenze

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ_{EX}	465 nm
λ_{EM}	525 nm
SENSIBILITA'	HIGH

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 **H₂O : 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	20 μ l
Flusso di lavoro consigliato	0,8 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 60 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z85116	Calibratore su sangue intero per Vitamina B2	4 x 1 ml
Z85019	Controllo su sangue intero per Vitamina B1/B2/B6 – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Z85111	Fase Mobile	4 x 500 ml
Z959961902	Colonna Analitica Zorbax Eclipse Plus C 18 (100 x 4,6mm –3,5 μ m)	1 PZ
S29004U	Vial di vetro ambrate 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 di vetro ambrate da 2 ml	1 x 100 PZ

VITAMINA B2 SU SANGUE INTERO

(Cromatogrammi di riferimento)

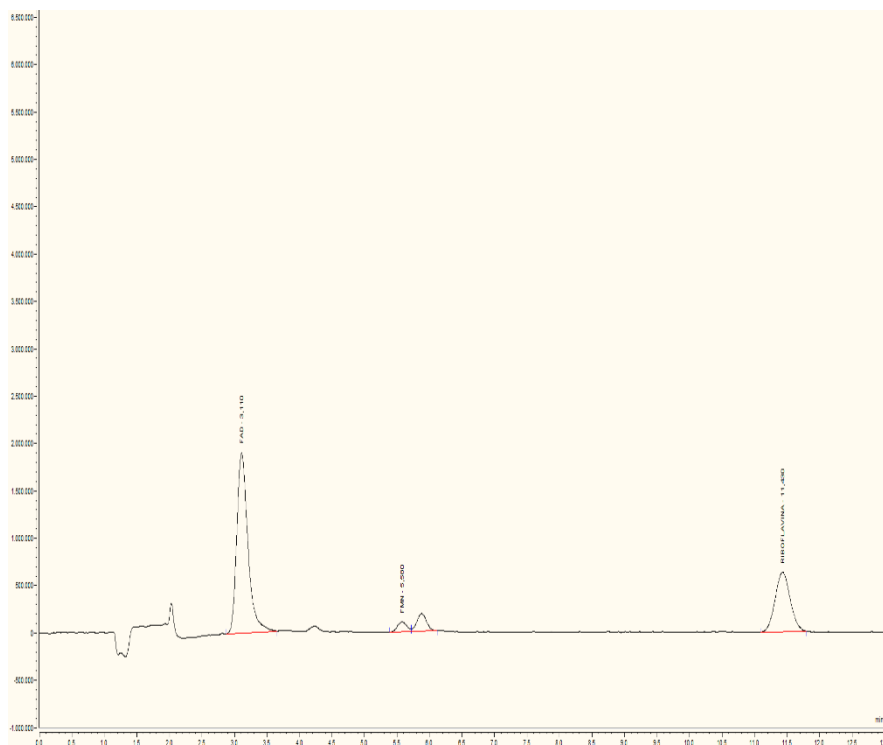


Fig. 1 :	Calibratore su sangue intero		
	R.T. 3.1 FAD	150 ng/ml	
	R.T. 5.5 FMN	5 ng/ml	
	R.T. 11.4 Riboflavina (B2)	17 ng/ml	

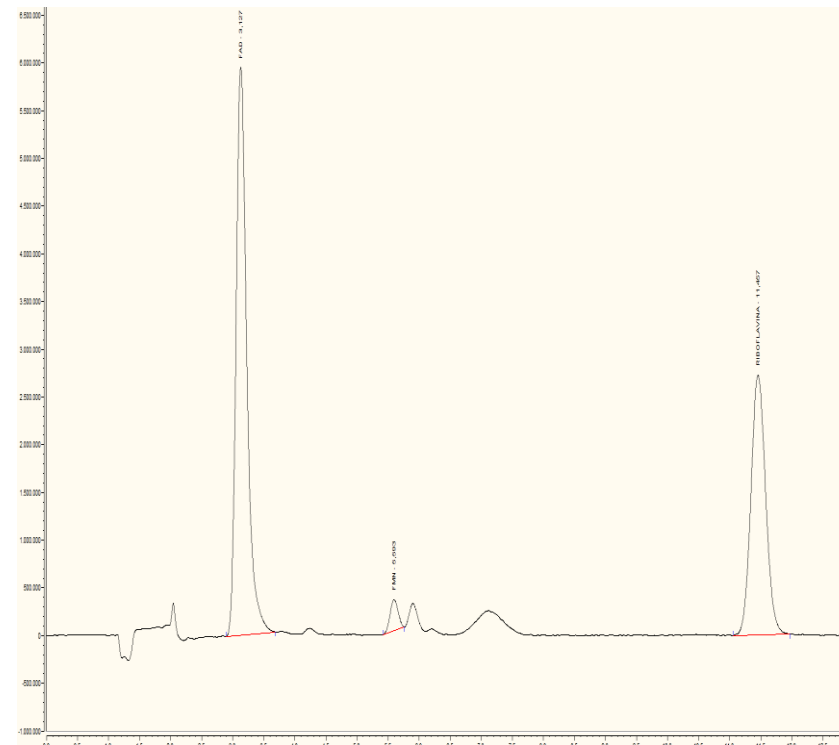


Fig. 2 :	Controllo su sangue intero – Livello 2		
	R.T. 3.1 FAD	350 ng/ml	
	R.T. 5.5 FMN	8 ng/ml	
	R.T. 11.4 Riboflavina (B2)	28 ng/ml	