

25-OH VITAMINA D₃ e 25-OH VITAMINA D₂ PLASMATICHE IN UV / VIS - FAST –
Codice Z19810

INTRODUZIONE

La *vitamina D* ha un ruolo fondamentale nel controllo delle concentrazioni di calcio e fosforo nel liquido extracellulare e quindi nel controllo dei processi di mineralizzazione ossea e nel mantenimento dell'integrità scheletrica. Insieme al *Paratormone (PTH)* e alla *Calcitonina* è responsabile del mantenimento dell'omeostasi di Ca⁺⁺ e Fosforo. La *Vitamina D* più importante è la *Vitamina D₃ o colecalciferolo*, la quale, per essere attiva, deve subire una serie di trasformazioni metaboliche di idrossilazione.

In una prima fase il colecalciferolo subisce una idrossilazione in posizione 25 formando il primo metabolita attivo, il 25-Idrossicolecalciferolo o *Vitamina 25-OH-D₃*.

La *Vitamina 25-OH-D₃* costituisce la forma circolante di *Vitamina D₃* più rappresentata. Basse concentrazioni di 25-OH-D₃ possono anche concorrere all'aumento della concentrazione sierica di PTH, stimolando il riassorbimento di Ca⁺⁺ dall'osso e intensificando i processi osteoporotici.

La sua concentrazione plasmatica dipende dal grado di esposizione dell'individuo ai raggi ultravioletti e , normalmente, è compresa tra 20 e 120 ng/ml.

In un secondo tempo questo metabolita subisce una seconda idrossilazione in posizione 1 alfa con produzione di *1,25 Diidrossi D₃* ed anche una ulteriore idrossilazione in posizione 24 con produzione di *24,25 Diidrossi D₃*.

Il test della *25-OH-D₃* ha assunto un'importanza rilevante quale marker della quantità di ormone circolante disponibile per la produzione dei metaboliti diidrossilati.

 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° 003	Vitamina 25-OH-D3 e Vitamina 25-OH-D2 FAST plasmatiche in UV	06/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

Questo metodo consente di determinare le concentrazioni plasmatiche della **25-OH VITAMINA D₃** e della **25-OH VITAMINA D₂**.

A 0,5 ml di plasma viene aggiunto 0,75 ml del reagente di precipitazione contenente lo Standard Interno, vortexando vigorosamente per 30 secondi.

Dopo centrifugazione a 10.000 rpm, tutto il surnatante (circa 1,25 ml) viene versato su una colonna di clean-up e, dopo un lavaggio neutro, le due vitamine vengono estratte con 200 µl di soluzione estraente. 25-50 µl della soluzione estratta vengono iniettati in HPLC isocratico.

Recupero del metodo : 100%

Sensibilità del metodo : 1.5 ng/ml

Linearità del metodo : 2 - 500 ng/ml

Range di normalità : 20 - 120 ng/ml

CV%: **25-OH-Vitam. D₃** 2,6% intra serie 3,4% inter serie
25-OH-Vitam. D₂ 10,4% intra serie 10,7% inter serie

Contenuto della Confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 - 8 °C eccetto il Calibratore sierico (si rimanda alle schede tecniche).

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interno, **1 x 90 ml**

Reagente B – Sol. di Condizionamento 1, **1 x 130 ml**

Reagente C – Sol. di Condizionamento 2, **1 x 120 ml**

Reagente D – Soluzione di Lavaggio, **1 x 70 ml**

Reagente E – Soluzione Eluente, **1 x 40 ml**

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

Calibratore Liofilo Sierico, **1 x 5 ml**

Codice Z19116
Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Colonne Clean-up, **100 pz**

Reagente M – Fase Mobile, **3 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

HPLC isocratico con loop da 25-50 µl
Detector spettrofotometrico $\lambda = 265 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Preparatore Automatico del Campione
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

5 ml di Sangue in Provetta con EDTA come anticoagulante.

Fase pre-analitica :

Se non si analizza subito congelare a -20 °C.
Stabile per circa 3 mesi.

IMPORTANTE: UTILIZZARE PER OGNI STEP OPERATIVO UNICAMENTE PROVETTE IN VETRO!
NON utilizzare assolutamente provette in plastica!

PROCEDURA PREANALITICA

In una **provetta di vetro** pipettare :

- 400 µl di Fase Mobile
- 100 µl di **Reagente F** - Soluzione Test

Iniettare 50 µl della Soluzione Test ottenuta e verificare che i picchi della Vitamina 25-OH-D₃ e della Vitamina 25-OH-D₂ abbiano un tempo di ritenzione (RT) compreso fra 4,0 e 6,0 minuti.

Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione del Calibratore e dei Campioni

Dispensare in **provetta di vetro**:

	Calibratore	Campione
Calibratore	0,5 ml	
Campione		0,5 ml
Reagente A – Sol. Deproteinizzante	0,75 ml	0,75 ml

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 30 secondi
Stoccare a 2-8 °C per almeno 10 minuti

FASE 2 : Centrifugare a 10.000 rpm per 15 minuti.

FASE 3 : Trasferire il surnatante (circa 1,0 ml) in una **provetta di vetro pulita**.
Aggiungere 0,25 ml di H₂O di grado HPLC.

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 4 : Attivazione della colonna di clean-up con:

- 1,0 ml di **Reagente B** – Sol. di Condizionamento 1 e scaricare
- 1,0 ml di **Reagente C** – Sol. di Condizionamento 2 e scaricare

FASE 5 : Caricamento del Calibratore, Campioni e Controlli nelle colonne di clean-up:

- Versare tutto il surnatante (circa 1,25 ml) nella colonna di clean-up.
(Questa operazione, poiché la colonna ha un volume di applicazione di 1 ml, va effettuata versando o pipettando 1 ml di surnatante per volta).

Lasciar percolare, anche con l'ausilio di un vuoto moderato, e gettare.

Se non si dispone di un sistema di produzione di vuoto si può usare una centrifuga ponendo le colonne di clean-up in provette di plastica da 10 ml e centrifugare a 200 rpm.

FASE 6 : Lavaggio della colonne di clean-up:

- Pipettare nelle colonne clean-up 0,5 ml di **Reagente D – Sol. di Lavaggio**, scaricando il percolato. Portare a secco con un leggero flusso d'aria.

FASE 7 : Eluizione delle Vitamine :

- Pipettare nelle colonne di clean-up 200 µl di **Reagente E – Sol. Eluente** e portare a secco con un leggero flusso d'aria.
- Raccogliere l'eluato in una **provetta di vetro**
- Aggiungere all'eluato 25µl di H₂O per HPLC

Agitare al vortex per qualche secondo

N.B.: il campione così preparato è stabile 7 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 25-50 µl nel Cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

25-OH-VITAMINA D₃ e 25-OH-VITAMINA D₂ - FAST- Avvertenze

REAGENTE F : SOLUZIONE TEST

25-OH-VITAMINA D ₃	10.000 ng/ml
25-OH-VITAMINA D ₂	10.000 ng/ml

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	265 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase Poroshell EC 4,6 x 50 mm, 2,7 μ , è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511. I prefiltri vanno sostituiti ogni 70 - 100 iniezioni.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* Reverse Phase Poroshell EC 4,6 x 50 mm, 2,7 μ . Non connettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) e al flusso di 0,8 ml/minuto.
Non riciclare i liquidi di lavaggio.
Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 0,8 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti **anche a ricircolo di fase**. Al termine, iniettare la soluzione test e verificare la congruità della separazione.
NON è possibile lavorare anche a ricircolo di fase mobile.

PULIZIA DELLA COLONNA

Alla fine della seduta di analisi far fluire una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola. La colonna è di nuovo pronta per la successiva seduta di analisi. Stoccare in una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v).

PULIZIA DELL'AGO DI INIEZIONE

Lavare con una soluzione di H₂O : Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).

PARAMETRI HPLC

LOOP	25-50 μ l
Flusso di lavoro consigliato	0,8 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 80 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z19116	Calibratore liofilo per 25-OH-Vitamina D ₃ e Vitamina D ₂	4 x 5 ml
Z19119	Controllo liofilo per 25-OH-Vitamina D ₃ e Vitamina D ₂ - Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell EC (50 x 4,6mm -2,7 μ)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 PZ
Z1636/26	Provette in Pirex da 10 ml con Tappo SWL (per idrolisi, fino 300 °C)	1 x 40 PZ

25-OH-VITAMINA D₃ e 25-OH-VITAMINA D₂ PLASMATICHE
 (Cromatogrammi di riferimento)

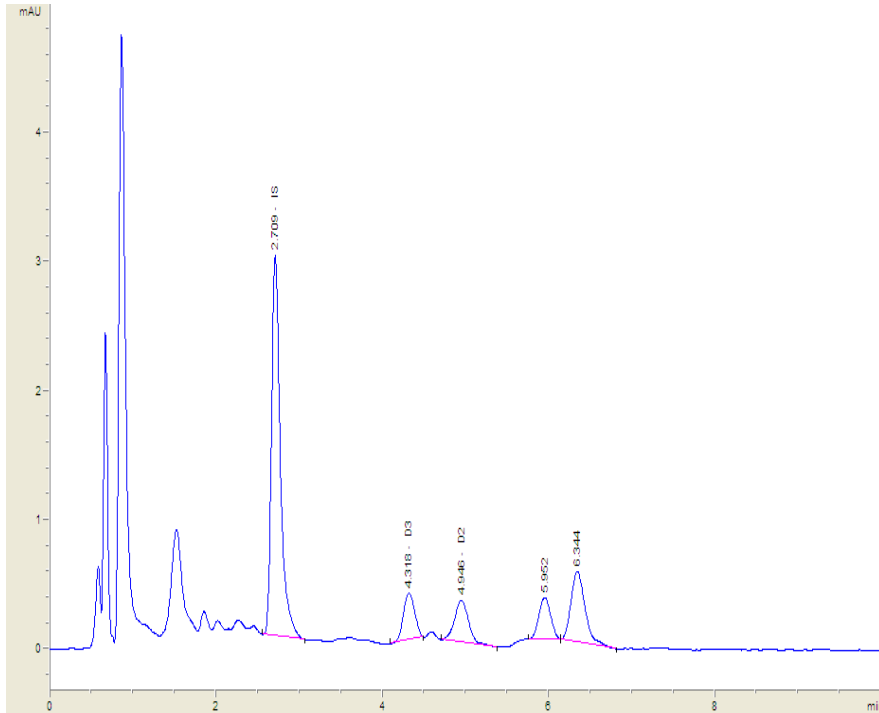


Fig. 1:	Calibratore liofilo plasmatico	
	R.T. 2.7	Standard interno
	R.T. 4.3	25-OH D ₃ 26,0 ng/ml
	R.T. 4.9	25-OH D ₂ 29,6 ng/ml

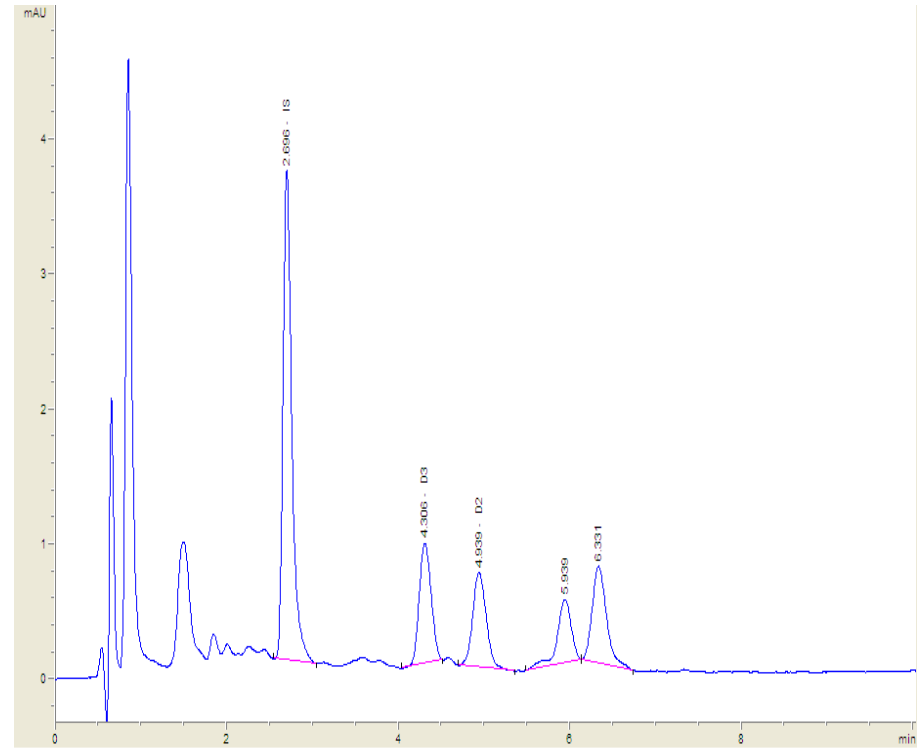


Fig. 2:	Controllo alto plasmatico	
	R.T. 2.7	Standard interno
	R.T. 4.3	25-OH D ₃ 64,1 ng/ml
	R.T. 4.9	25-OH D ₂ 63,3 ng/ml