

CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

ARBEITSMEDIZIN
OCCUPATIONAL MEDICINE
MÉDECINE DU TRAVAIL
MEDICINA DEL LAVORO
MEDICINA OCUPACIONAL



Manual de Instruções para Análise por HPLC de Ácido trans, trans-Mucônico em urina

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Ácido trans, trans-mucônico em urina por HPLC.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 47000



**ÁCIDO T, T-MUCÔNICO EM URINA - HPLC
MS: 10350840302**

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH é certificada de acordo com o DIN EN ISO 9001 e DIN EN ISO 13485 e ISO 13485 CMDR. Os produtos são produzidos e colocados em circulação seguindo as diretrizes do IVD 98/79/EC.

© Este documento é protegido pelos direitos autorais. Todos os direitos reservados.

Importado e Distribuído por: BioSys Ltda.
Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ
CEP: 24020-112
CNPJ: 02.220.795/0001-79
SAC: (21) 3907 2534 – sac@biosys.com.br
www.biosys.com.br

Fabricado por: 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

Conteúdo

1	Informações para requisição	3
2	Introdução	5
3	Sistema HPLC	7
3.1	Parâmetros do equipamento	7
3.2	Coluna HPLC	7
3.3	Shut down.....	8
4	Separação cromatográfica.....	8
5	Preparo da amostra	8
5.1	Coleta e armazenamento das amostras de pacientes	8
5.2	Reconstituição do calibrador	9
5.3	Reconstituição dos controles	9
5.4	Procedimento de preparo das amostras	10
5.5	Estabilidade das amostras preparadas	10
6	Resultados e avaliação	11
6.1	Calibração do sistema de análise.....	11
6.2	Avaliação de quantificação por padrão interno.....	11
7	Controle de Qualidade	11
8	Valores de referência	12
9	Fatores de Conversão.....	12
10	Armazenamento e validade dos reagentes	13
11	Descarte de resíduos.....	13
12	Exemplos de cromatogramas	14
12.1	Cromatograma de um calibrador em urina	14
12.2	Cromatograma de uma amostra de paciente	14
13	Problemas e Soluções.....	15
14	Literatura.....	16
	Apêndice I Preparo automatizado de amostras com o Gilson® ASPEC™.....	17
	Configuração:.....	19
	Apêndice II Informações de segurança	20
	Apêndice III: Cálculo Manual.....	21
	Apêndice IV: Validação.....	22
	Apêndice IV: Declaração de Conformidade	23

1 Informações para requisição

Nº da ordem	Produto
47000	<p>Kit reagente para determinação de Ácido t, t-mucônico em urina, para 100 determinações por HPLC</p> <p>Conteúdo para 100 análises:</p> <p>Fase Móvel 1000 ml Tampão de Lavagem 1 100 mL Tampão de Lavagem 2 100 mL Tampão de Lavagem 3 100 mL Tampão de Eluição 100 mL Colunas de preparo de amostra 2 x 50 peças Tubos de reação, âmbar 100 unidades</p> <p>Componentes disponíveis separadamente:</p> <p>47001 Fase Móvel 1000 mL 47002 Fase Móvel 10 x 1000 mL 47003 Padrão de Calibração em Urina 5 x 1,0 mL (liof.) 47004 Padrão Interno 75 mL 47005 Tampão de Lavagem 1 100 mL 47006 Tampão de Lavagem 2 100 mL 47007 Tampão de Lavagem 3 100 mL 47009 Tampão de Eluição 100 mL 47008 Colunas de preparo de amostra 50 peças 33005 Tubos de reação, âmbar 100 peças</p>
47000/A1	<p>Kit reagente para determinação de Ácido t, t-mucônico em urina, para 100 determinações</p> <p>Aplicação para Gilson ASPEC XL</p> <p>Fase Móvel 1000 mL Tampão de Lavagem 1 150 mL Tampão de Lavagem 2 150 mL Tampão de Lavagem 3 150 mL Tampão de Eluição 150 mL Colunas de preparo de amostra com tampa DEC 100 unidades</p>
47000/A5	<p>Kit reagente para determinação de Ácido t, t-mucônico em urina, para 500 determinações</p> <p>Aplicação para Gilson ASPEC XL</p> <p>Fase Móvel 3 x 1000 mL 3 x 5 x 1,0 mL (liof.) Padrão de Calibração em Urina 2 x 200 mL Padrão Interno 2 x 300 mL Tampão de Lavagem 1 2 x 300 mL Tampão de Lavagem 2 2 x 300 mL Tampão de Lavagem 3 2 x 300 mL Tampão de Eluição 5 x 100 unidades Colunas de preparo de amostra com tampa DEC</p>
47000/A9	<p>Kit reagente para determinação de Ácido t, t-mucônico em urina, para 1000 determinações</p> <p>Aplicação para Gilson ASPEC XL</p>

	Fase Móvel	6 x 1000 mL
	Tampão de Lavagem 1	1000 mL
	Tampão de Lavagem 2	1000 mL
	Tampão de Lavagem 3	1000 mL
	Tampão de Eluição	1000 mL
	Colunas de preparo de amostra com tampa DEC	10 x 100 unidades
Componentes disponíveis separadamente para Gilson ASPEC XL		
47001	Fase Móvel	1000 mL
47003	Padrão de Calibração em Urina	5 x 1,0 mL (liof.)
47003/T	Padrão de Calibração em Urina	1,0 mL (liof.)
47004/A1	Padrão Interno	100 mL
47004/A5	Padrão Interno	200 mL
47004/A9	Padrão Interno	800 mL
47005/A1	Tampão de Lavagem 1	150 mL
47005/A5	Tampão de Lavagem 1	300 mL
47005/A9	Tampão de Lavagem 1	1000 mL
47006/A1	Tampão de Lavagem 2	150 mL
47006/A5	Tampão de Lavagem 2	300 mL
47006/A9	Tampão de Lavagem 2	1000 mL
47007/A1	Tampão de Lavagem 3	150 mL
47007/A5	Tampão de Lavagem 3	300 mL
47007/A9	Tampão de Lavagem 3	1000 mL
47009/A1	Tampão de Eluição	150 mL
47009/A5	Tampão de Eluição	300 mL
47009/A9	Tampão de Eluição	1000 mL
47008/A	Colunas de preparo de amostra com tampa DEC	100 peças
Acessórios		
47100	Coluna HPLC (equilibrada, com cromatograma teste)	1 unidade
15009	Pré-filtro revestido em PEEK, 5 µm	5 unidades
15010	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 unidade
18001	Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 unidade
18047	Cartucho de pré-coluna 4/10	1 unidade
Controles e Calibradores de Vitaminas B₁/B₆ em Sangue Total		
0161	Urine Control Bi-Level (I + II)	2 x 5 x 2,0 mL (liof.)
0162	Urine Control Level I	5 x 2,0 mL (liof.)
0163	Urine Control Level II	5 x 2,0 mL (liof.)

2 Introdução

O objetivo da vigilância biológica no âmbito da toxicologia ocupacional e ambiental é avaliar a exposição a substâncias perigosas e os resultados dos perigos para a saúde no trabalho. Isso envolve a determinação de substâncias perigosas ou os seus metabólitos em fluidos corporais tais como sangue ou urina, no caso do benzeno, por exemplo, ácido trans, trans-mucônico na urina. O tempo ótimo de amostragem depende da meia-vida do respectivo biomarcador: para a coleta de amostra de benzeno é recomendado o final de um turno de trabalho.

O benzeno é produzido em escala industrial como aditivo de combustível e solvente, bem como um material de partida para sínteses químicas, química fina e produtos farmacêuticos. Devido à sua toxicidade, não é permitido colocar o benzeno em circulação em concentrações acima de 0,1% (de acordo com o Regulamento Alemão de substâncias perigosas), com exceção de combustíveis (na Alemanha é permitido 1% em volume), produtos para a pesquisa e preparações, que são utilizados em sistemas fechados. A maioria das fontes antropogênicas de benzeno incluem escape de automóveis, as operações de reabastecimento de automóveis e indústria emissões. Outra fonte potencial de exposição fora do local de trabalho é a fumaça do cigarro. A fumaça convencional de cigarros sem filtro fornece cerca de 12-48 µg de benzeno [1].

O benzeno é absorvido principalmente através do trato respiratório e, em menor grau por via cutânea ou gastrointestinalmente. Ao realizar uma atividade física, a quantidade absorvida aumenta consideravelmente devido ao aumento do volume respiratório por minuto. Dado que o benzeno exibe uma pressão de vapor relativamente elevada, 10-50% é respirado novamente.

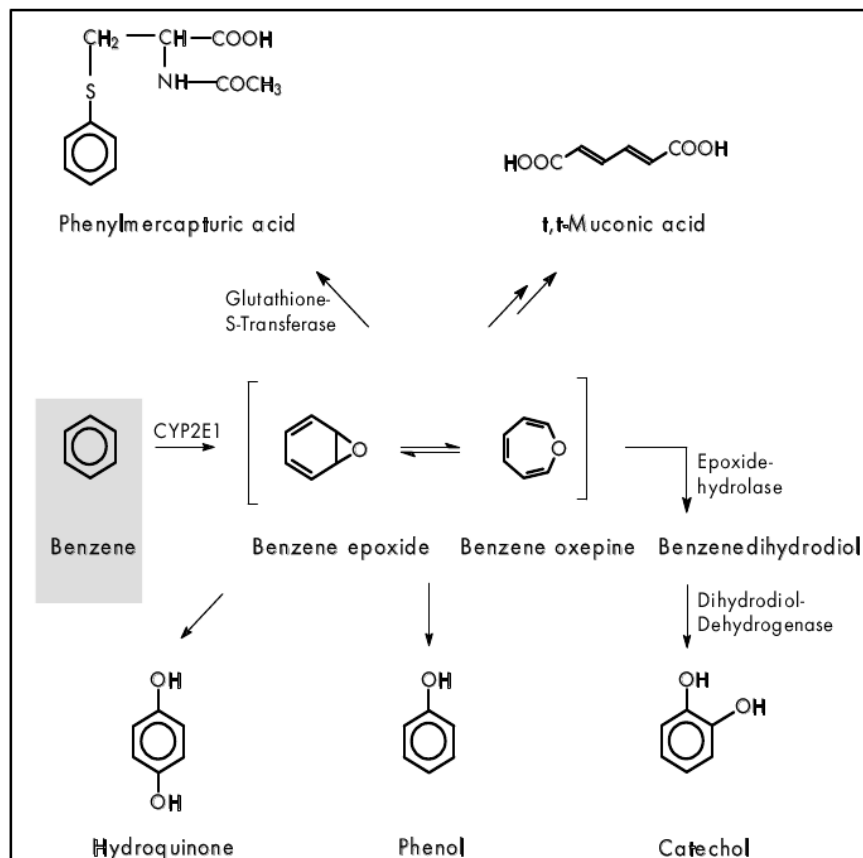


Figura 1: Metabolismo do benzeno (esquema)

O benzeno retido é metabolizado por uma enzima hepática citocromo P-450 em um composto epóxido (ver Fig. 1), o qual sofre rapidamente outras alterações metabólicas. O metabólito mais predominante na urina é o fenol, juntamente com os seus metabólitos hidroquinona, catecol, hidroxihidroquinona (todos na forma livre e conjugado como sulfatos e glucuronidos), bem como ácido fenilmercaptúrico e ácido t, t-mucônico. Ácido t,t-mucônico representa um parâmetro específico para monitoramento biológico. Ácido sórbico (E200) e seus sais (E202, E203) são também precursores do ácido t, t-mucônico. A contribuição do ácido t,t-mucônico da urina proveniente de ácido sórbico, não desempenha nenhum papel relevante pelo ponto de vista da medicina do trabalho, porque o seu conteúdo é muito inferior aos equivalentes de exposição para substâncias cancerígenas (EKA, Expositionäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe). Alguns países estabeleceram regulamentos legais para monitoramento ocupacional, definindo os marcadores e intervalos de amostragem [2].

O benzeno tóxico pode causar riscos ou prejuízos à saúde devido à exposição aguda, bem como por exposição crônica. Uma vasta gama de efeitos adversos foi relatada. Os principais sintomas de uma intoxicação aguda por benzeno estão relacionados ao sistema nervoso central (SNC). Normalmente dor de cabeça, fadiga, tontura e vertigem ocorrem em baixas concentrações ou sob exposição crônica a longo prazo. Os efeitos mais severos se desenvolvem com concentrações mais altas, afetando as funções mais complexas do cérebro (euforia, amênia, ataxia, visão turva, e até mesmo colapso do SNC).

O benzeno, por outro lado, apresenta toxicidade para o sistema hematopoiético, levando a alterações do hemograma e até mesmo a indução de leucemia [3, 4]. Suas propriedades cancerígenas em humanos têm sido demonstradas e existe evidência suficiente para atividade mutagênica.

Com substâncias cancerígenas, geralmente nenhum valor de tolerância Biológica (BAT) (Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte) e concentrações máximas permitidas (MAK, Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen) são definidos. A Comissão de Investigação de Riscos de Saúde de Compostos Químicos na área de trabalho da Fundação Alemã de Pesquisa (DFG, Germany Research Foundation) estabeleceu valores EKA para os agentes cancerígenos [5]. O Comitê alemão em substâncias perigosas (AGS, Ausschuss für Gefahrstoffe) delibera sobre a aceitação do valor limite do ar da CE, de 1 ppm de acordo com a Directiva 2004/37/ CE. O valor correspondente do EKA representa 2 mg/L de ácido t,t-mucônico em urina (tabela no cap. 8).

Uso pretendido:

O kit de reagentes para análise HPLC de ácido t, t-mucônico em urina é um dispositivo de diagnóstico *in vitro* a ser utilizado em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa de ácido t, t-mucônico em amostras de urina de pacientes via HPLC (Cromatografia Líquida de alta eficiência) com detecção UV. O kit destina-se como um teste para pacientes que necessitam de monitorização do produto metabolizado ácido t, t-mucônico, como um indicador da exposição ao benzeno em um contexto de exames de saúde ocupacional

Princípio do kit:

O kit reagente ácido t, t-mucônico em urina foi concebido para uma rápida e confiável determinação cromatográfica do ácido t,t-mucônico em um simples sistema HPLC isocrático com detector UV. O preparo da amostra é baseado em uma extração de fase sólida eficiente e seletiva. A homogeneização da amostra com o padrão interno proporciona um ajuste de pH automático para a extração de fase sólida seguinte. Substâncias potencialmente interferentes são eliminadas por 3 etapas de lavagem com 3 tampões de lavagem diferentes. O tampão de eluição empregado estabiliza o ácido t, t-mucônico na amostra preparada. A inclusão do padrão interno feito sob medida no método, assegura alta precisão e confiabilidade na quantificação do analito.

3 Sistema HPLC

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no Apêndice II.

3.1 Parâmetros do equipamento

A análise do ácido t, t-mucônico requer um sistema simples, isocrático, com bomba de HPLC, injetor e detector de UV. Para prevenir mudanças na composição da fase móvel, esta deve ser mantida tampada mesmo durante a operação. O uso de um forno de coluna é necessário para assegurar uma estabilidade e reprodutibilidade ótima da separação cromatográfica e também evita as variações de temperatura.

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção 20 µL (5-50 µL)
Tempo de corrida:	17 min,
Razão de fluxo:	1.2 mL/min (1.1-1.3 mL/min)
Temperatura da coluna:	35°C (33- 37°C)
Detector UV:	264 nm
Solução de limpeza do injetor:	Água/Metanol = 90/10

3.2 Coluna HPLC

A coluna HPLC para análise do ácido t, t-mucônico é fornecida equilibrada e testada, e está pronta para o uso. **Ela não deve ser lavada com nenhuma outra solução.** A contrapressão de uma coluna nova na razão de fluxo de 1,2 ml/min e temperatura de 35°C é cerca de 120 bar e pode aumentar com a idade ou uso da coluna. Enquanto as separações estiverem satisfatórias, a contrapressão elevada não tem consequências. Para prolongar a vida da coluna, um pré-filtro (no. ordem 15009 e 15010) ou uma pré-coluna (no. Ordem 18047 e no. 18001) devem ser utilizados.

Antes de iniciar uma análise:

1. Antes de instalar a coluna HPLC, lavar o sistema com aproximadamente 30 ml de fase móvel com razão de fluxo de 1.5 ml/min.;
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com razão de fluxo de 1.2 ml/min por aproximadamente 15 - 20 min até que a linha de base esteja estabilizada;
3. Injetar o calibrador preparado repetidamente até que dois cromatogramas sucessivos apresentem tempos de retenção e picos de área/altura idênticos.
4. Em seguida, a fase móvel pode ser recirculada.

3.3 Shut down

Para período de desuso de até 3 dias, bombeie a fase móvel numa razão de fluxo baixa (aprox. 0.2 ml/min) através do sistema para prevenir a cristalização de sais nos selos da bomba. A coluna HPLC permanece conectada, mas, para aumentar o tempo de vida da lâmpada, o detector deve ser desligado.

Para longos períodos de desuso, a coluna HPLC deve ser desconectada. Limpeza ou conservação não é necessária. Armazenar a coluna na fase móvel (**a temperatura ambiente**). A coluna deve ser substituída por uma união e o sistema HPLC limpo com cerca de 50 ml de H₂O/metanol (80/20 vol/vol).

4 Separação cromatográfica

A tabela a seguir mostra os tempos de retenção dos analitos e padrão interno na razão de fluxo de 1.2 ml/min e uma temperatura da coluna de 35°C.

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Ácido t, t-mucônico	4.7
Padrão Interno	7.4

A separação cromatográfica dura aproximadamente 17 min (ver cromatogramas no capítulo 12). Pequenas variações nos tempos de retenção podem ocorrer, por exemplo, devido a flutuações na temperatura. Se um novo lote de fase móvel é utilizado ou a coluna HPLC é substituída, o tempo de retenção pode mudar levemente. Se necessário, os tempos de retenção devem ser ajustados.

5 Preparo da amostra

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no Apêndice II

As amostras também podem ser preparadas de forma automatizada com Gilson® ASPEC™. Por favor, remeta-se ao apêndice I.

5.1 Coleta e armazenamento das amostras de pacientes

A urina nativa (não acidificada) é utilizada na análise. O tempo de armazenamento é de até 3 dias a temperatura ambiente, a +2 a +8 por até 2 semanas. Para períodos maiores de armazenamento (até 3 meses) as amostras devem ser mantidas abaixo de -18 °C.

5.2 Reconstituição do calibrador

O calibrador (artigo 47003) são rastreáveis as substâncias de referência adquiridas de fornecedor certificado. Após reconstituição, o calibrador é submetido ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. O calibrador preparado é utilizado para calibrar o sistema HPLC. **Para reconstituir o calibrador de urina liofilizado pipetar exatamente 1.0 ml de água destilada no frasco.** Deixar repousar a temperatura ambiente por 10-15 minutos, agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. Evite exposição direta a luz solar! A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o calibrador.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de urina. Cada doador que contribui para este produto é constantemente submetido a um controle médico e julgado como livres de doenças infecciosas. No entanto, este produto ainda traz um risco residual de infecção porque não existem métodos de ensaio absolutamente seguros. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Nós assim recomendamos considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do calibrador reconstituído:

O calibrador reconstituído é estável por até 1 semana quando mantido protegido da luz e tampado em temperatura ambiente e por até 2 semanas em +2 a +8°C. Por períodos maiores (até 3 meses), armazenar abaixo de -18 °C.

5.3 Reconstituição dos controles

Os controles de urina level I (artigo 0162) e level II (artigo 0163), são submetidos a todo o processo de preparo das amostras, do mesmo modo que as 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 em urina, pipetar exatamente 2.0 ml de água destilada em cada frasco.** Deixar repousar a temperatura ambiente por 10-15 minutos, agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo. Evite exposição direta a luz solar! A concentração atual depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os controles.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de urina humana. Cada doador contribui para este produto é constantemente submetido a um controle médico e julgado como livres de doenças infecciosas. No entanto, este produto ainda traz um risco residual de infecção porque não existem métodos de ensaio absolutamente seguros. Este produto também pode conter agentes desconhecidos e outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Nós assim recomendamos considerar todos os produtos contendo material de fonte humana como potencialmente infeccioso e manipulá-lo com o mesmo cuidado destinado a amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do controle reconstituído:

O reconstituído é estável por até 1 semana quando mantido protegido da luz e tampado em temperatura ambiente, e por até 2 semanas a+2 a +8°C. Por períodos maiores (até 3 meses), armazenar abaixo de -18 °C.

5.4 Procedimento de preparo das amostras

1. Pipetar em um tubo de reação 250 µl de urina (ou controle/calibrador reconstituído), mais 750 µl de Padrão Interno e homogeneizar rapidamente.
2. Aplicar toda a amostra de urina na coluna de preparação da amostra, extraia por centrifugação (ca. 250 x g, ca. 1 min, verifique se cada coluna correu completamente) ou sucção. Descarte o efluente.
3. Aplicar 1 ml de Tampão de Lavagem 1 na coluna de preparação da amostra, extraia por centrifugação (ca. 250 x g, ca. 1 min) ou sucção. Descarte efluente.
4. Aplicar 1 ml de Tampão de Lavagem 2 na coluna de preparação da amostra, extraia por centrifugação (ca. 250 x g, ca. 1 min) ou sucção. Descarte efluente.
5. Aplicar 1 ml de Tampão de Lavagem 3 na coluna de preparação da amostra, extraia por centrifugação (ca. 250 x g, ca. 1 min) ou sucção. Descarte efluente.
6. Alterar o frasco de coleta. Aplicar 1 ml do Tampão de Eluição na coluna de preparação da amostra, por centrifugação (ca. 250 x g, ca. 1 min) ou sucção.
7. Homogeneizar o eluato rapidamente. Injetar 20 µL da amostra preparada no sistema HPLC.
8. Precisão e exatidão das análises devem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica.

5.5 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas são estáveis em temperatura ambiente por 4 dias, refrigeradas entre +2° a +8°C por até 2 semanas ou abaixo de -18 °C.

6 Resultados e avaliação

6.1 Calibração do sistema de análise

A concentração dos analitos individuais no calibrador depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha os calibradores. Antes de iniciar a análise quantitativa de amostras de pacientes, é recomendado correr um cromatograma de calibração contendo todas as substâncias de interesse. Com este propósito, injete repetidamente o calibrador preparado, até que dois cromatogramas sucessivos apresentem picos com tempo de retenção, resolução e área/altura praticamente idênticos. Esses cromatogramas podem ser utilizados para definir corretamente os parâmetros de integração. O cromatograma da última injeção teste é usado para calibrar o sistema de análise de dados (software, integrador). Entre com o tempo de retenção obtido e a concentração do calibrador (veja folheto de informações) na tabela de análise.

Nº do Pico	Analito	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)	Concentração (µg/L)
1	Ácido t, t-mucônico	4.7	Veja folheto de informações
2	Padrão Interno	7.4	1

Para assegurar que nem a calibração nem as condições do HPLC (tempos de retenção, etc.) modificaram-se no decorrer da corrida analítica, o calibrador preparado deve ser injetado no curso da corrida e novamente no final. Para avaliação selecione “Método padrão interno”

6.2 Avaliação de quantificação por padrão interno

O uso de um padrão interno permite que potenciais perdas durante o preparo da amostra sejam compensadas. Uma quantidade conhecida de padrão interno é adicionada a cada amostra (calibrador, controles, amostras de pacientes). O pico apropriado é identificado na tabela de componentes como padrão interno a partir da corrida do calibrador (veja cromatogramas no cap.12) para correta integração. Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao plasma calibrador e as amostras de pacientes, a concentração do padrão interno pode ter a entrada como “1”.

7 Controle de Qualidade

Precisão e exatidão podem ser monitoradas pela adição de controles adicionais em cada corrida analítica (Chromsystems Controles de Urina (artigo 0162 e 0163). Caso a análise desses controles mostre resultados fora do intervalo fornecido nos folhetos de informação, o sistema deve ser avaliado, e, se necessário, recalibrado.

8 Valores de referência

Dependendo do país o limite ocupacional diferente pode ser válido. A tabela a seguir mostra os limites de exposição ocupacional no ar pela EC.

Analito	Limite de exposição ocupacional no ar [7]
Benzeno	1 ppm (3.25 mg/m ³)

A EKA (exposition equivalentes for carcinogenic substances) é caracterizada pela relação entre exposição no ar no local de trabalho e o biomarcador de exposição.

Benzeno Ar		EKA [5] Ácido t, t-mucônico em urina
Ppm (ml/m ³)	mg/m ³	(mg/l)
0.6	1.95	1.6
1.0	3.25	2
2	6.5	3
4	13	5
6	19.5	7

9 Fatores de Conversão

A tabela a seguir lista os fatores de conversão entre massa e concentrações molares e vice-versa.

Analito	µg/l para µmol/l	µmol/l para mg/l
Ácido t, t-mucônico	x 7.037	x 0.1421

10 Armazenamento e validade dos reagentes

Reagentes não abertos podem ser utilizados até a data de validade estabelecida no rótulo, desde que as condições de estocagem indicadas no rótulo sejam obedecidas.

Condições de armazenamento dos reagentes:

Produto	Armazenamento
Fase Móvel	+18 a +30 °C
Padrão Interno	+2 a +8°C
Tampão de Lavagem 1	+18 a +30 °C
Tampão de Lavagem 2	+18 a +30 °C
Tampão de Lavagem 3	+18 a +30 °C
Tampão de Eluição	+18 a +30 °C
Colunas de preparação de amostra	+18 a +30 °C
Calibrador em urina	Abaixo de -18°C
Controles em urina, Level I e Level II	Abaixo de -18°C

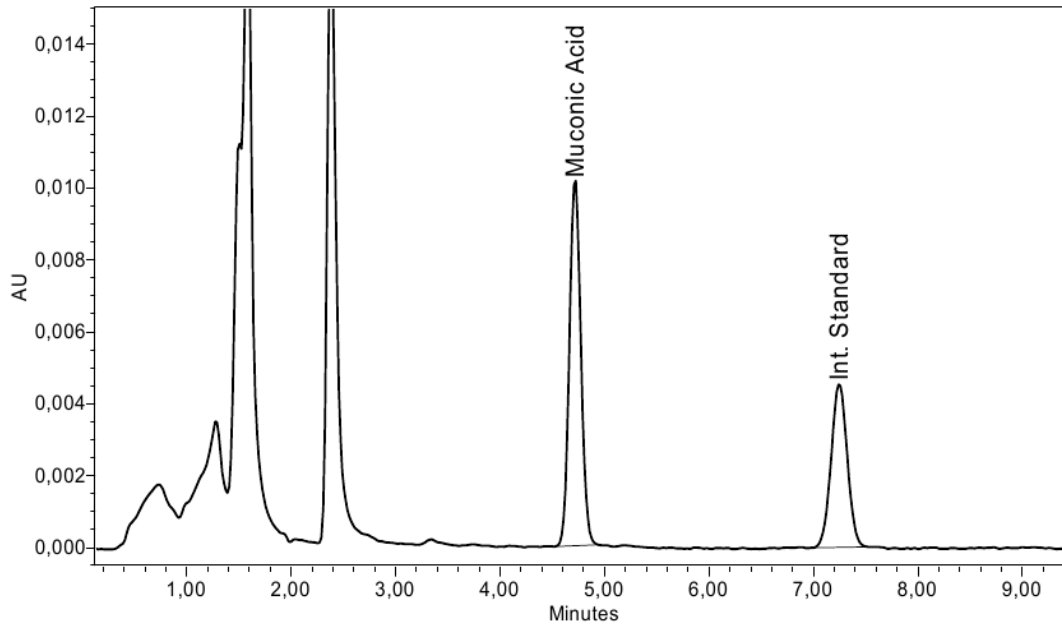
Os reagentes devem ser adequadamente fechados e armazenados nas condições estabelecidas imediatamente após o uso. Desde que nada além tenha sido estipulado, a estabilidade será de 1 ano após a data da abertura, mas, não excederá o prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2 e 5.3.

11 Descarte de resíduos

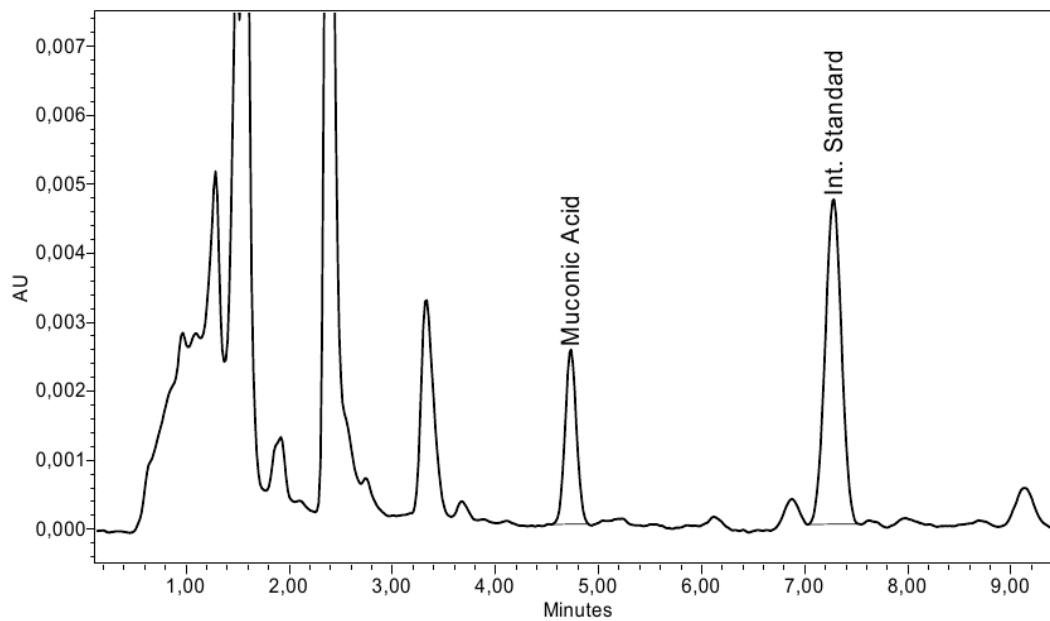
A fase móvel e tampão de lavagem 1 contêm solventes orgânicos livres de halogênio. As soluções não devem ser descartadas junto com o lixo doméstico. O produto não deve ser circulado para o abastecimento de água principal. Descartar em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio. Descartar de acordo com a Diretiva 2008/98 / EC sobre os resíduos e as exigências nacionais e locais. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados de forma adequada e o acesso deve ser permitido somente a pessoas autorizadas.

12 Exemplos de cromatogramas

12.1 Cromatograma de um calibrador em urina



12.2 Cromatograma de uma amostra de paciente



Ácido t, t-mucônico: 0,40 mg/L

13 Problemas e Soluções

Problema	Possível causa	Solução
Flutuações na linha de base	Lâmpada do detector ainda não aquecida	Aguardar
	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Sistema ainda não equilibrado	Repetir a injeção do padrão até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos
	Variação de temperatura	Utilizar o forno de coluna
Linha de base instável	Fluxo inconstante	Verificar a bomba do HPLC
	Bomba do HPLC	Verificar a bomba do HPLC (ar, selos)
Picos interferentes	Ar no sistema	Degaseificar a fase móvel (purga)
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Injetor contaminado	Limpar o injetor
	Frascos do amostrador automático contaminados	Usar frascos novos ou limpá-los com metanol
	Sistema de injeção contaminada	Limpar o sistema com metanol ou injetar a fase móvel 10 x.
Alargamento de picos, cauda	Coluna HPLC contaminada	Substituir a coluna
	Coluna HPLC velha	Substituir a coluna
Picos duplicados	Volume morto nas conexões	Substituir as conexões
	Volume morto na coluna HPLC	Substituir a coluna
	Volume de injeção de grandes dimensões	Volume de injeção inferior
	Solução de lavagem de agulha	Use a solução adequada de lavagem da agulha (indicado no capítulo 3.1)
Sem picos	Vazamento no sistema	Verificar o injetor
Sem pico do Padrão Interno	Amostra muito acidificada	Reduzir o volume de amostra para 100 µl ou ajustar o pH da urina para 4,5-8,0
Sensibilidade diminuindo	Lâmpada do detector velha	Substituir a lâmpada
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Válvula de injeção defeituosa	Avaliar o injetor
Mudanças no tempo de retenção	Variações de temperatura	Usar forno de coluna
	Razão de fluxo instável	Avaliar bomba do HPLC, ajustar o fluxo
	Sistema não está equilibrado	Bombear fase móvel por cerca de 15 min pelo sistema; injetar o calibrador repetidamente
Sem sinal	Conexão com integrador ou impressora defeituosa ou interrompida	Verificar o sinal do cabo e as conexões
	Lâmpada do detector	Verificar a voltagem da lâmpada, substituir se necessário

14 Literatura

1. Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg). Lehrbuch der Toxikologie. 1. Aufl, Spektrum Akademischer Verlag (1997).
2. Landesgesetzblatt für Wien, 16. Stück, (2002).
3. Yin SN, Hayes RB, Linet MS, Li GL, Dosemeci M, Travis LB, Li CY, Zhang ZN, Li DG, Chow WH, Wacholder S, Wang YZ, Jiang ZL, Dai TR, Zhang WY, Chao XJ, Ye PZ, Kou QR, Zhang XC, Lin XF, Meng JF, Ding CY, Zho JS, Blot WJ. (1996) A cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China: overall results. *Am J Ind Med* 29(3): 227-35.
4. Wong O. (1995) Risk of acute myeloid leukaemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene. *Occup Environ Med* 52(6): 380-4.
5. Deutsche Forschungsgemeinschaft (Hrsg). MAK- und BAT-Werte-Liste 2013: Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 49, Wiley-VCH Verlag (2013).
6. Popp W, Rauscher D, Müller G, Angerer J, Norpoth K. (1994) Concentrations of benzene in blood and S-phenylmercapturic and t,t-muconic acid in urine in car mechanics. *Int Arch Occup Environ Health* 66(1): 1-6.
7. Richtlinie 2004/37/EG des Europäischen Parlaments und des Rates über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch Karzinogene oder Mutagene bei der Arbeit (Sechste Einzelrichtlinie im Sinne von Artikel 16 Absatz 1 der Richtlinie 89/391/EWG des Rates). Version 02/2014.

Apêndice I Preparo automatizado de amostras com o Gilson® ASPEC™

ASPEC™ Racks

Os arquivos Chromsystems ASPEC para ácido t,t-mucônico em urina exigem as seguintes amostras e estantes de reagente:

- 2 estantes de amostras, código 21 (1 estante para amostras, 1 estante para frascos vazios ("resultado"))
- Estante de solvente, código 61
- Estante DEC móvel, código 101 (até 2), com estantes de coleta adequados e frascos de coleta

Configurando as estantes

Reagente	Estante	Posição
Amostras	Estante de amostra	1 – 55
Padrão Interno (47004/A)	Estante de amostra	56 – 60
Tampão de Lavagem 1 (47005/A)	Estante de solvente	121
Tampão de Lavagem 2 (47006/A)	Estante de solvente	122
Tampão de Lavagem 3 (47007/A)	Estante de solvente	123
Tampão de eluição (47009/A)	Estante de solvente	124
Colunas de preparo de amostra (49008/A)	Estante (s) DEC	125 – 196
Frascos vazios	Estante de amostra	61 – 115 Mesmo número que as amostras
Frascos de coleta	Estante de coleta	Mesmo número que cartuchos SPE
Água HPLC	Reservatório	

Antes de iniciar uma sequência de análise o diluidor deve ser lavado manualmente com solvente a partir do reservatório (Menu MANUAL - diluidor Prime)

Volumes necessários de reagentes:

Para cada amostra, são necessários os seguintes volumes de reagentes:

Reagente	Volume
Padrão Interno (47004/A)*	750 µl
Tampão de Lavagem 1 (47005/A)	1 ml
Tampão de Lavagem 2 (47006/A)	1 ml
Tampão de Lavagem 3 (47007/A)	1 ml
Tampão de eluição (47009/A)	1 ml

*Para o padrão interno:

Dependendo do número de amostras primeiro preencher o frasco n. 56 com até 9.5 ml. Se mais do que 12 amostras forem processadas, preencha adicionalmente o volume necessário de padrão interno em frasco n. 57-60.

Cada frasco de solvente deve conter o volume de tampão suficiente para o número de amostras a serem preparadas mais um volume adicional de cerca de 30 ml. As garrafas devem ser equipadas com as tampas de vedação adequadas para evitar a evaporação dos componentes orgânicos dos tampões.

Princípio dos Arquivos de Trabalho ASPEC™

Antes de iniciar o ASPEC, transferir 0.5 ml de cada amostra de urina manualmente para um frasco de amostra de vidro e colocá-lo na posição apropriada da estante de amostras.

ASPEC irá executar a preparação da amostra completa (ou seja, misturar 250 µL da amostra com o padrão interno em um frasco vazio, extração com SPE, lavagem e etapas de eluição). Os eluatos preparados estão prontos para serem injetados no sistema de HPLC.

O disco de arquivo de trabalho contém 2 arquivos diferentes:

"ttMA":

ASPEC™ deve ser devidamente conectado ao sistema de HPLC. Estes arquivos controlam a preparação da amostra. Os eluatos preparados são automaticamente injetados no sistema de HPLC, e a cromatografia é iniciada. Durante a corrida HPLC a próxima amostra é preparada.

O volume de injeção é ajustado a 20 µl; que podem ser alterados na etapa INJEÇÃO (# 18).

A etapa ESPERAR do programa (# 20) é usada para coordenar os intervalos de injeção de acordo com o tempo de execução da cromatografia e o tempo de preparação da amostra; ele deve ser alterado, se necessário.

"ttM_N":

ASPEC realiza apenas a preparação da amostra; as amostras não são injetadas no sistema HPLC

Configuração:

Esses arquivos de trabalho são projetados para controle ASPEC™ através do seu teclado.

Alguns itens no menu de configuração devem ser verificados e, se necessário, adaptados à configuração real do dispositivo ASPEC.

Configuração do amostrador:

Modelo

Braço

Estação de lavagem em profundidade: por exemplo 80 mm

Posições das estações de lavagem: A e/ou B, C

Ciclo de injeção (s): posição e o volume

Calibragem. volume de tubulação

Número de identidade

Configuração do diluente

Tipo

Volume da seringa esquerda



Volume da seringa direita

Tubo de transferência

Número de identidade

Apêndice II Informações de segurança

A informação apresentada a seguir deverá ser observada e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. Mais informações podem ser obtidas a partir das respectivas fichas de dados de segurança do material. Folhetos com dados de segurança estão disponíveis mediante solicitação.

Produto/ Símbolos de perigo	Risco e informações de precaução
Fase móvel (artigo 47001, 47002) 	Perigo H226 Líquido e vapor inflamável H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele H370 Causa danos aos órgãos P280 Utilizar luva de proteção/ roupas de proteção/ proteção para os olhos/ proteção para o rosto P301+P312 NO CASO DE INGESTÃO: buscar auxílio médico se sentir-se mal. P302+P352 SE HOUVER CONTATO COM A PELE: Lavar com sabonete e água P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.
Tampão de Lavagem 1 (artigo 47005) 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamável H319 Provoca irritação ocular grave H351 Suspeito de provocar câncer H335 Pode provocar irritação das vias respiratórias P210 Manter afastado do calor / faísca / chama aberta / superfícies quentes. - Proibido fumar P240 Utilizar luva de proteção/ roupas de proteção/ proteção para os olhos/ proteção para o rosto P305+P351+P338 NO CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Lavar cuidadosamente com água durante vários minutos. Remover as lentes de contato, se presentes e fáceis de retirar. Continuar a enxaguar. P308+P313 Em caso de exposição ou preocupação: consulte um médico P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Européia: Padrão de calibração em urina (artigo 47003) Padrão interno (artigo 47004) Tampão de lavagem 2 (artigo 47006) Tampão de lavagem 3 (artigo 47007) Tampão de eluição (artigo 47009) Controles em urina (artigo 0161, 0162, 0163)	

Apêndice III: Cálculo Manual

Para o cálculo manual os seguintes dados são necessários:

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 folheto de informações)	= $C_{\text{Calibrador}}$

A concentração do analito A na amostra $C_{\text{Analito, Amostra}}$ é então calculada como a seguir:

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

Apêndice IV: Validação

Para verificar a linearidade e validar o método, amostras de urina foram fortificadas com quantidades definidas de ácido t, t-mucônico. Múltiplas alíquotas foram submetidas ao processo de preparo.

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do coeficiente angular da curva de calibração das amostras de urina fortificadas e de diluições de soluções padrão.

Ácido t, t-mucônico	93%
Padrão Interno	98%

Linearidade / limite de quantificação:

O método é linear a partir do limite de quantificação até o limite superior de quantificação estabelecido:

Analito	Limite de quantificação (mg/L) aproximadamente	Faixa linear Até pelo menos [mg/L]
Ácido t, t-mucônico	0.02	10

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi realizada em 3 concentrações pela média e coeficiente de variação de múltiplos preparos (n=10) de uma mesma amostra.

Analito	Coeficiente de variação [%] (na concentração em µg /L)		
	n=10		
Ácido t, t-mucônico	1.7 (0.105)	1.5 (0.736)	1.7 (1.75)

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi realizada por múltiplos preparos e determinação (10 x) de concentrações de analitos em pool de urina em 10 séries diferentes de testes (duas concentrações diferente):

Analito	Coeficiente de variação [%] (na concentração em µg /L)	
	n=100	
Ácido t, t-mucônico	3.4 (0.105)	2.9 (1.68)

Apêndice IV: Declaração de Conformidade

CHROMSYSTEMS
DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

COPY

EC-Declaration of Conformity

according to directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices

We, as manufacturer

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing, Germany

declare on our own responsibility, that herein after called in vitro diagnostic medical devices for the HPLC determination of:

Nomenclature term: Other Other Clinical Chemistry Reagents
Nomenclature code: 11-90-01-90-00
Classification: other product

Product name: **trans,trans-Muconic Acid in Urine**
Controls: **t,t-Muconic Acid Urine Control**

meets all applicable requirements of the directive 98/79/EC

Conformity assessment procedure:
Annex III of the directive 98/79/EC

Applied harmonized standards:
EN ISO 9001, EN ISO 13485, EN ISO 14971, EN 18113-2, EN 980, EN 13640,
EN 13641

Notified body: -

Munich, February 02, 2012

Michael Meier
Managing Director

Vers. 2.0

Chromsystems
Instruments & Chemicals GmbH

Am Haag 12
82166 Gräfelfing/Germany

Telefon: +49 89 18930-0
Telefax: +49 89 18930-199

mailbox@chromsystems.de
www.chromsystems.de



Zertifiziert nach: DIN EN ISO 9001,
DIN EN ISO 13485, ISO 13485 CMDR