

Instruções de Uso

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

T, t-muconic Acid in Urine
(ÁCIDO T, T-MUCÔNICO EM URINA)

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

Nº de lote, data de fabricação e validade: ver rótulos dos frascos e da embalagem.

Artigo	Apresentação
47000	Kit Reagente para Análise de Ácido trans, trans-mucônico em urina, 100 análises

Para informações detalhadas sobre o método e procedimento, favor consultar o Manual de Instruções Acid t, t-muconic in urine no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit permite a detecção quantitativa do ácido t, t-mucônico em amostras de pacientes através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um sistema HPLC isocrático com detector UV, auxiliando no monitoramento dos produtos metabolizados pelo ácido t, t-mucônico, como um indicador da exposição ao benzeno em um contexto de exames de saúde ocupacional

MÉTODO

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção UV.

PRINCÍPIO

A preparação da amostra é baseada em uma extração de fase sólida eficiente e seletiva. Homogeneizando a 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.

REAGENTES

Componentes e Composições:

Componente	Composição	Apresentação
Fase móvel (<i>Mobile Phase</i>)	Metanol (10-20%) e acetonitrila (3 < 10%)	1000 mL
Tampão de lavagem 1 (Wash buffer 1)	Tetrahidrofurano - 50 - 100%	100 mL
Tampão de lavagem 2 (Wash buffer 2)	Tampão acetato de sódio	100 mL
Tampão de lavagem 3 (Wash buffer 3)	Tampão fosfato de potássio monobásico	100 mL
Tampão de eluição (<i>Elution Buffer</i>)	Solução aquosa de ácido fórmico (1 < 2%)	100 mL
Coluna de preparação da amostra (<i>Sample Clean Up Columns</i>)	-	2 x 50 peças
Frascos de reação âmbar (Reaction vials, amber colour)	-	100 peças

Reagente necessário, fornecido separadamente (MS: 10350840302)

Padrão Interno (<i>Internal Standard</i>)	Tampão fosfato de potássio monobásico contendo ácido dicarbônico (0,1 - 1µg/mL)	75 mL
--	---	-------

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO 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 dos reagentes do kit.

Produto	Armazenamento
Fase móvel	Temperatura ambiente (18-30°C)
Padrão Interno	2-8°C
Tampão de lavagem 1	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de lavagem 2	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de lavagem 3	Temperatura ambiente (18-30°C)
Tampão de eluição	Temperatura ambiente (18-30°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 e o tampão de lavagem 1 contêm solventes orgânicos livres de halogênios. As soluções não devem ser descartadas juntamente do lixo doméstico. Não circular o produto dentro do abastecimento de água principal. Descartar em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênios. Os resíduos devem ser descartados de acordo com a Directiva 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.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.

Padrão interno: pronto para uso.

Tampão de lavagem 1: pronto para uso.

Tampão de lavagem 2 : pronto para uso.

Tampão de lavagem 3 : pronto para uso.

Tampão de eluição : pronto para uso.

MATERIAIS REQUERIDOS, MAS NÃO FORNECIDOS

Coluna Cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 47100)
Padrão de Calibração de Urina (Chromsystems art. 47003)
Urine Control Bi-level (I + II) (Chromsystems art. 0161)
Urine Control Level I (Chromsystems art. 0162)
Urine Control Level II (Chromsystems art. 0163)
Centrífuga para microtubos.
Água grau HPLC.
Metanol.
Material Geral de Laboratório.

AMOSTRA

A amostra a ser utilizada na análise é urina não acidificada.

Estabilidade da amostra: Até 3 dias a temperatura ambiente, a +2 +8 por até 2 semanas. Para períodos maiores de armazenamento congelar a amostra abaixo de -18°C (máximo de 3 meses)

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador automático:	volume de injeção 20 µl (5-50 µl) Tempo de corrida analítica 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
Limpeza do injetor:	água/metanol – 90/10

Procedimento de Preparação das Amostras:

- Pipetar em um tubo de reação 250 µl de urina (ou controle/calibrador reconstituído), e 750 µl de Padrão Interno e homogeneizar rapidamente.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Homogeneizar o eluato rapidamente. Injetar 20 µl da amostra preparada no sistema HPLC.
- A precisão e exatidão das análises devem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica.

Tempo de Retenção Esperado:

Substância	Tempo de Retenção (min. aproximadamente)
Ácido t,t mucônico	4,7
Padrão Interno	7,4

CÁLCULOS

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra = A_{amostra}

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador = C_{calibrador}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra = IS_{amostra}

Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador = IS_{calibrador}

Concentração C do analito A no calibrador = *C_{calibrador}

Fatores de conversão:

Analito	mg/l para µmol/l	µmol/l para mg/l
Ácido t, t-mucônico	x 7,037	x 0,1421

CALIBRADORES E CONTROLES

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

Artigo	Produto	Apresentação
47003	Urine Calibration Standard (liof.)	5 x 1mL
0161	Urine Control Bi-Level (I + II) (liof.)	2 x 5 x 2 mL
0162	Urine Control Level I (liof.)	5 x 2 mL
0163	Urine Control Level II (liof.)	5 x 2 mL

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

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.

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

Linearidade e limite de quantificação:

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

Analito	Limite de quantificação aproximado (mg/l) *	Limite máximo de linearidade (mg/l)
Ácido t,t-mucônico	0,02	10

*O limite de quantificação depende do detector empregado.

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 (%) (para a concentração em mg/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 (%) (para a concentração em mg/L)	
	n = 100	
Ácido t,t-mucônico	3.4 (0.105)	2.9 (1.68)

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

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.

Símbolos Usados



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 10350840302
SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br