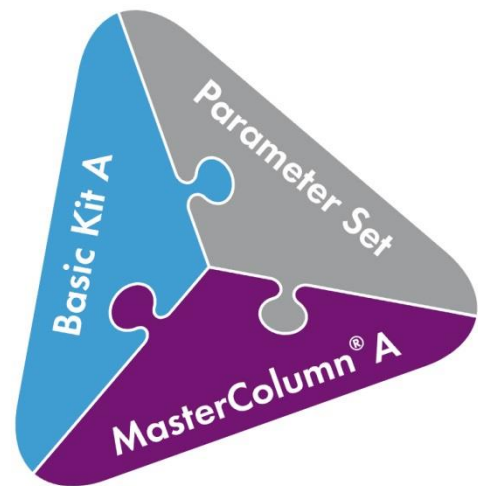


CHROMSYSTEMS

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

MassTox[®] TDM Series A



Manual de instruções para a análise por LC-MS/MS

MassTox[®] TDM Series A BASIC Kit

Artigo 92111

CE IVD

MassTox[®] TDM Series A BASIC Kit – LC-MS/MS

MS 10350840349

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

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

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
82166 Gräfelfing
Germany

Phone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-299
www.chromsystems.com

Conteúdo

1Informações Gerais.....	4
2Introdução	6
3Sistema LC-MS/MS	7
	3.1 Equipamento e parâmetros do LC-MS/MS.....	7
	3.2.... Operação do MS/MS	7
	3.3.... Inicializando o sistema	8
	3.4.... Encerrando o sistema	8
4Preparo de Amostras.....	8
	4.1 Preparo manual de amostras	8
	4.2.... Preparo automatizado de amostras	10
	4.3.... Guia de diluição	10
	4.4Equipamentos requeridos adicionalmente, não incluídos no kit:10	
5Calibração do sistema de análise de dados.....	10
6Controle de Qualidade	11
7Armazenamento e validade dos reagentes	11
8Descarte.....	12
9Problemas e Soluções	12
	Apêndice I:.. Preparo automatizado de amostras.....	13
	Apêndice II:.. Informações de Risco.....	17
	Apêndice III: Cálculo Manual.....	19
	Apêndice IV:Declaração de Conformidade.....	20

Este manual é complementado pelos manuais de instruções dos parâmetros específicos dos **MassTox®** TDM PARAMETER Sets correspondentes.

1 Informações Gerais

Artigo	Produto	
92111/200	MassTox ® TDM Basic Kit A Conteúdo para 200 análises:	
	Fase Móvel 1	1 x 1000 ml
	Fase Móvel 2	1 x 1000 ml
	Reagente de Precipitação	1 x 50 ml
	Reagente de Extração	1 x 5 ml
	Tampão de Diluição 1	1 x 50 ml
	Tampão de Diluição 2	1 x 50 ml
	Solução de Lavagem	1 x 1000 ml
	Frascos de reação, transparentes	2 x 100 pcs.
92111/1000	MassTox ® TDM Basic Kit A Conteúdo para 1000 análises:	
	Fase Móvel 1	3 x 1000 ml
	Fase Móvel 2	3 x 1000 ml
	Reagente de Precipitação	5 x 50 ml
	Reagente de Extração	5 x 5 ml
	Tampão de Diluição 1	5 x 50 ml
	Tampão de Diluição 2	5 x 50 ml
	Solução de Lavagem	2 x 1000 ml
	Frascos de reação, transparentes	10 x 100 pcs.
92111/1000/F	MassTox ® TDM Basic Kit A Para preparo automatizado de amostras com placa de 96 poços com filtro Conteúdo para 1000 análises:	
	Fase Móvel 1	3 x 1000 ml
	Fase Móvel 2	3 x 1000 ml
	Reagente de Precipitação para preparo automatizado de amostras	1 x 250 ml
	Reagente de Extração	5 x 5 ml
	Tampão de Diluição 1	5 x 50 ml
	Tampão de Diluição 2	5 x 50 ml
	Solução de Lavagem	2 x 1000 ml
	Placa de 96 poços com filtro	4 x 3 pcs.
	Placa de coleta de 96 poços	8 x 3 pcs.
	Selos adesivos perfuráveis, para placa de 96 poços	4 x 3 pcs.
	Componentes disponíveis separadamente:	
92001	Fase Móvel 1	1000 ml
92002	Fase Móvel 2	1000 ml
92003	Reagente de Precipitação	50 ml
92005	Reagente de Extração	5 ml
92007	Tampão de Diluição 1	50 ml
92008	Tampão de Diluição 2	50 ml
92009	Solução de Lavagem	1000 ml
33006	Frascos de reação, transparentes	100 pcs.

	Acessórios para o preparo de amostras com placa de 96 poços com filtro:	
92012	Reagente de Precipitação para preparo automatizado de amostras 250 ml	
92057	Placa de 96 poços com filtro	3 pcs.
92058	Placa de coleta de 96 poços	3pcs.
92059	Selos adesivos perfuráveis, para placa de 96 poços	3 pcs.
	Acessórios de inicialização	
92110	MassTox [®] TDM Master Column [®] Series A	1 pc.
15010	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 pc.
15011	Pré-filtro encapsulado em PEEK, 2 µm	5 pcs.

Com a finalidade de medir drogas individuais, além do **MassTox**[®] TDM Basic Kit A, também são requeridos o **MassTox**[®] TDM PARAMETER Set específico e a coluna **MassTox**[®] MasterColumn Series A.

Favor verificar o manual de instruções separado para o **MassTox**[®] TDM PARAMETER Set específico para informações de compra dos padrões internos, tuning mixes, calibradores e controles.

2 Introdução

Em termos gerais, o monitoramento de drogas terapêuticas, na sigla em inglês TDM (Therapeutic Drug Monitoring) se refere a determinação da concentração de drogas em uma matriz biológica, usualmente sangue, com o objetivo de otimizar o regime de tratamento do paciente. Muitos estudos e publicações confirmam a necessidade de dosagem individual de drogas associado ao monitoramento de concentrações alvo no sangue.

Vinks et al.^[1] sumariza três partes importantes de informações que tem contribuído para o estabelecimento de TDM:

1. nível de drogas no sangue se correlaciona melhor com o efeito terapêutico do que com a dose administrada.
2. Há diferenças significativas entre os indivíduos com relação a absorção, metabolização e excreção de uma droga (farmacocinética). A combinação de TDM com a individualização da dose pode reduzir esta variabilidade e, assim, atingir um efeito máximo.
3. ajuste dos níveis sanguíneos para uma faixa terapêutica definida reduz a toxicidade e, ao mesmo tempo, garante a concentração necessária para o efeito da droga no sítio de ação.

Uma condição para o sucesso do uso do TDM é o ajuste preciso entre todas as partes envolvidas (paciente, médico, hospital farmácia, laboratório clínico), uma vez que as condutas em todas estas áreas podem trazer consigo consequências para a concentração da droga no sítio de ação. A determinação do nível de drogas é recomendada pelas seguintes razões (modificado de acordo com Vinks et al. ^[1]):

- Nenhum efeito pode ser verificado apesar da administração.
- A dose usual máxima da droga está excedida.
- A composição ou formulação da droga foi alterada.
- Há efeitos colaterais graves ou persistentes.
- A droga é potencialmente tóxica (faixa terapêutica estreita).
- São esperadas interações com drogas administradas em paralelo.
 - paciente não segue o regime de tratamento definido (falta de conformidade)
- Há complicações suspeitas devido a comorbidade.

O TDM tem sido provado como benéfico em muitas áreas onde é realizado como um procedimento de rotina. Ele é comum e útil no tratamento pediátrico de epilepsia e asma, assim como para medicação de recém-nascidos. Para adultos, o TDM também é usado em terapia com imunossuppressores, psicotrópicos, drogas antivirais e antineoplásicas, e para o tratamento cardíaco ^[1].

Uso pretendido:

O kit da Chromsystems **MassTox**[®] TDM BASIC – sendo parte de um sistema modular – é uma ferramenta de diagnóstico *in vitro* para ser usado em laboratórios clínicos para a determinação quantitativa de inúmeras medicações pertencentes a várias classificações de drogas: antidepressivos, neurolépticos, psicoestimulantes, benzodiazepínicos, antiepiléticas, antiarrítmicas, anti-HIV, antidepressivos tricíclicos, imunossuppressores e antimicóticos em amostras de soro ou plasma humanos através de espectrometria de massas (LC-MS/MS). Seu uso é pretendido como um teste de monitoramento para pacientes tratados com uma ou mais drogas especificadas no conjunto individual de parâmetros com o objetivo de assegurar os níveis de drogas dentro da faixa terapêutica.

Princípio do kit reagente:

O kit de reagentes **MassTox**[®] TDM Series A permite a rápida determinação quantitativa de múltiplas drogas em soro ou plasma por LC-MS/MS. Para realizar a análise, você vai precisar do **MassTox**[®] TDM BASIC kit A, o conjunto específico para as substâncias **MassTox**[®] TDM PARAMETER Set e a coluna **MassTox**[®] MasterColumn Series A. O preparo de amostras é o mesmo para todos

os parâmetros, baseado em um simples e eficiente processo de precipitação de proteínas. O uso de padrões internos com isótopos marcados (deuterados) estáveis garantem uma quantificação reproduzível e confiável dos analitos em menos de quatro minutos.

3 Sistema LC-MS/MS

Atenção:

Ao usar os reagentes, favor observar as informações de segurança recomendadas no apêndice II.

3.1 Equipamento e parâmetros do LC-MS/MS

A análise de substâncias do **MassTox**[®] TDM Series A requer um HPLC com sistema gradiente, um amostrador e um espectrômetro de massas em tandem com sensibilidade suficiente. É recomendado o uso de amostradores com refrigeração para garantir a estabilidade das amostras preparadas. As fases móveis devem ser mantidas fechadas, mesmo durante o uso. A separação ocorre em uma coluna analítica usando gradiente.

Configurações do instrumento:

Volume padrão de injeção:	0.2 a 50 µl (depende do equipamento operado)
Tempo de corrida:	≤ 3.5 min
Taxa de fluxo:	0.6 ml/min
Solução de lavagem da agulha para o injetor:	Solução de lavagem (artigo 92009)

Favor atentar para as informações especiais no manual dos respectivos conjuntos de parâmetros, se houver.

3.2 Operação do MS/MS

Princípio de operação:

Um espectrômetro de massas mede as moléculas de acordo com a sua relação massa para carga (m/z). Como um pré-requisito, as moléculas devem ser ionizadas positivamente ou negativamente, ou carregadas. A tecnologia de ionização por eletrospray foi determinada para ser um modo especialmente suave de produção de íons e é o mais frequentemente usado atualmente em aplicações LC-MS.

O espectrômetro de massas em tandem consiste de dois espectrômetros de massas conectados um ao outro através de uma célula de colisão. No primeiro espectrômetro de massas (MS 1), íons são separados de acordo com sua relação massa para carga. Estes íons "mãe" são então passados para a célula de colisão onde são fragmentados por uma colisão física com um gás, normalmente nitrogênio ou argônio. Estes fragmentos ou íons "filhos" são então introduzidos no segundo espectrômetro de massas (MS 2) e analisados. O padrão de íon mãe/filho é extremamente seletivo para uma dada substância.

O **MassTox**[®] TDM Series A depende do Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM, do inglês Multiple Reaction Monitoring) onde um par de íons mãe/filho para cada substância é medido.

Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM):

O Monitoramento de Reações Múltiplas é o modo de medida mais seletivo de todos. Um íon mãe é selecionado no MS 1 e é então fragmentado na célula de colisão. A partir destes

fragmentos ou dos íons filhos, somente um é analisado no MS 2. Todos os outros fragmentos e substâncias interferentes não são detectados. O resultado é seletividade e sensibilidade extremamente altos. Teoricamente, todas as substâncias devem ser detectadas no modo MRM.

Entretanto, a principal desvantagem deste método é o consumo de tempo na otimização do sistema MS/MS para cada MRM individual.

3.3 Inicializando o sistema

Antes de iniciar uma sequência:

1. Garanta que as bombas de vácuo estejam em funcionamento por pelo 8 horas e que o vácuo esteja adequadamente forte.
2. Equilibre o sistema completo por 10 minutos. Para fazer isso, inicie os parâmetros de gradiente do HPLC e ative o espectrômetro de massas.
3. Injete uma amostra preparada repetidamente (exemplo **MassCheck**[®] controle) ou, se disponível, o System Check Solution (ver manual do **MassTox**[®] TDM PARAMETER-Set) até que os tempos de retenção e as intensidades dos sinais estejam constantes.
4. A sequência pode ser iniciada agora.

Favor consultar o manual de operações do seu sistema LC-MS/MS e contatar o fabricante para o treinamento apropriado.

3.4 Encerrando o sistema

As bombas devem ser completamente desligadas para que nenhum sal possa precipitar fora da fase móvel. Nenhuma lavagem é necessária. O sistema de vácuo do MS/MS deve permanecer em funcionamento. O MS/MS em si deve ser configurado para o modo stand-by para ampliar o tempo de serviço da fonte e multiplicador.

4 Preparo de Amostras

Atenção:

Ao usar os reagentes, favor observar as informações de segurança recomendadas no apêndice II.

4.1 Preparo manual de amostras

Reconstitua os calibradores multiníveis, controles **MassCheck**[®], e padrões internos – se liofilizados – de acordo com o manual do respectivo conjunto **MassTox**[®] TDM PARAMETER Sets.

1. Pipete 50 µl de amostra/calibrador/controle em um frasco de reação de 1.5 ml
2. Adicione 25 µl do Tampão de Extração, misture brevemente (vortex) e incube por 2 minutos a temperatura ambiente (não centrifugue!)
3. Adicione 250 µl do Mix de Padrão Interno reconstituído (contém Reagente de Precipitação, ver manual do **MassTox**[®] TDM PARAMETER Sets, capítulo 4) e misture (vortex) por pelo menos 30 segundos.
4. Centrifugue por 5 minutos a 15000 x g

5. Dilua o sobrenadante com o tampão de diluição de acordo com a sensibilidade do instrumento MS/MS e o conjunto de parâmetros (veja abaixo).

4.2 Preparo automatizado de amostras

As amostras podem ser preparadas, se estabelecido no manual do respectivo **MassTox**[®]TDM PARAMETER Set, com automação completa ou parcial em um dispositivo de manuseio de líquidos. O preparo manual de amostras com placas de 96 poços com filtro também pode ser realizado manualmente usando uma pipeta multicanal.

Siga as instruções no Apêndice I.

4.3 Guia de diluição

Se nenhuma informação a mais for descrita no manual do respectivo **MassTox**[®]TDM PARAMETER Set:

- Dilua as amostras para assegurar que os calibradores com os menores e os maiores níveis estejam dentro da faixa linear de operação do sistema MS (dependente do sistema MS operado)
- Use 100% do Tampão de Diluição 1 (artigo 92007) para diluições entre 1:2.5 e 1:4
- Use uma mistura de 50% do Tampão de Diluição 1 e 50% do Tampão de Diluição 2 para diluições entre 1:5 e 1:8
- Use 100% do Tampão de Diluição 2 (artigo 92008) para diluições maiores do que 1:8

Favor atentar para as informações especiais no manual dos respectivos conjuntos de parâmetros, se houver.

Para determinar o fator de diluição ótimo, dilua o calibrador preparo de nível 1 várias vezes e analise com aumentando a concentração até que todas as substâncias sejam bem detectadas. Então analise o calibrador com o maior nível de concentração na diluição determinada e confirme se nenhuma substância excede a faixa linear de operação do sistema MS/MS.

4.4 Equipamentos requeridos adicionalmente, não incluídos no kit:

Os seguintes equipamentos que não estão incluídos no kit são necessários para realizar a análise com os kits reagentes **MassTox**[®]TDM Series A:

- Espectrômetro de massas em tandem com software para avaliação
- Sistema de HPLC gradiente e com amostrador (preferencialmente com função de refrigeração)
- Pipetas e ponteiras para pipetas
- Centrífuga de bancada
- Vortex[™]

5 Calibração do sistema de análise de dados

As concentrações no calibrador dependem do lote e podem ser encontradas na bula de informações que acompanha o produto. Nós recomendamos fortemente a calibração do sistema MS/MS com cada nova sequência de análise. Além disso, o ajuste regular assegura a

precisão de massa e a intensidade máxima do sinal. Para mais informações, favor consultar os manuais de operação e/ou contate o fabricante.

Para garantir a estabilidade do sistema LC-MS/MS, os controles **MassCheck**[®] preparados devem ser analisados no começo e no final de cada sequência analítica.

Favor consultar o guia de usuário do fabricante para o uso correto do software.

Notas sobre o cálculo manual podem ser encontradas no apêndice III.

6 Controle de Qualidade

A precisão e acurácia da análise podem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais **MassCheck**[®] em cada corrida analítica (veja o manual do conjunto de parâmetros).

Se a análise dos controles **MassCheck**[®] gerar valores fora da faixa fornecida na bula que acompanha o produto, o sistema deve ser verificado e, se necessário, calibrado novamente.

7 Armazenamento e validade dos reagentes

Os reagentes fechados podem ser utilizados até a data de validade estabelecida no rótulo, desde que as condições de armazenamento indicadas no rótulo sejam cumpridas.

Condições de armazenamento:

Produto	Condições de Armazenamento
Fase Móvel 1	+18 a +30°C
Fase Móvel 2	+18 a +30°C
Reagente de Precipitação	+18 a +30°C
Reagente de Precipitação para preparo automatizado de amostras	+18 a +30°C
Tampão de Extração	+18 a +30°C
Tampão de Diluição 1	+18 a +30°C
Tampão de Diluição 2	+18 a +30°C
Solução de Lavagem	+18 a +30°C
Coluna Analítica	+18 a +30°C

Os reagentes devem ser bem fechados e devidamente armazenados diretamente após o uso. Desde que nada mais tenha sido estipulado, o tempo de vida seria de um montante de um ano após a data de abertura, mas não poderá exceder o prazo de validade.

8 Descarte

As Fases Móveis 1 e 2, Reagente de Precipitação, Reagente de Precipitação para o preparo automatizado de amostras, Tampão de Diluição 2 e a Solução de Lavagem contêm solventes orgânicos. Descarte os resíduos dos produtos em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio.

Resíduos de amostras de pacientes, eluatos de amostras, controles e calibradores devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso.

As soluções mencionadas não devem ser descartadas junto com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento principal de água. Descarte de acordo com a diretiva 2008/98/EC e de acordo com as exigências locais e nacionais. Os contêineres de lixo devem ser armazenados apropriadamente e o acesso só deve ser permitido a pessoas autorizadas.

9 Problemas e Soluções

Problema	Possível causa	Solução
	Sistema MS/MS não está pronto	Verificar o sistema MS/MS
Baixa sensibilidade	Fonte iônica contaminada	Limpar fonte iônica
	Espectrômetro de massa contaminado	Limpar espectrômetro de massa
	Vazamento na válvula de injeção	Verificar injetor
	Mudanças na calibração do massas	Calibrar novamente o sistema MS/MS
	MRMs não ideais	Otimizar novamente os MRMs
	Condições para ionização não ideais	Otimizar condições de fonte iônica
	Resolução de massa muito alta	Otimizar o sistema
Sinal instável	Spray instável	Verificar capilaridade do spray e limpar se necessário
	Fluxo instável	Verificar bombas do HPLC
	Fluxo de gás instável	Verificar linhas de gás
Sem vácuo	Bomba de vácuo defeituosa	Verificar todas as bombas de vácuo
	Vazamentos no sistema de vácuo	Verificar tubos de vácuo e conexões
Sem suprimento de gás	Gerador de nitrogênio defeituoso	Verificar gerador de nitrogênio
	Compressor defeituoso	Verificar compressor
	Cilindro de gás vazio	Substituir o cilindro de gás
	Pressão do gás fora do valor nominal	Ajustar pressão do gás

Apêndice I: Preparo automatizado de amostras

1 Equipamentos adicionais requeridos, não incluídos no kit:

Preparo de amostras com dispositivo de manuseio de líquidos:

Contendo:

- Agitador de Placa de Micro titulação
- Centrífuga com rotor para placa de 96 poços

Preparo de amostras com pipeta multicanal:

- Pipeta multicanal (8 canais ou 12 canais)
- Agitador de Placa de Micro titulação
- Centrífuga com rotor para placa de 96 poços

2 Preparo automatizado com dispositivo de manuseio de líquidos

Antes de iniciar o preparo automatizado de amostras, a tubulação do dispositivo de manuseio de líquidos deve ser lavada abundantemente com o líquido do sistema (água ultrapura, 0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 18.2 $\text{M}\Omega$) com o objetivo de remover as bolhas de ar e impurezas do sistema. O volume de lavagem depende do volume da tubulação do dispositivo de manuseio de líquidos relevante. Normalmente um volume de 15 a 20 ml é suficiente. Se ponteiros fixos forem usadas, é recomendada uma lavagem diária com metanol antes de iniciar a rotina de preparo de amostras.

Para evitar contaminação antimicrobiana uma rotina mensal de lavagem é necessária. Nós recomendamos lavar o sistema e as agulhas do dispositivo de manuseio de líquidos com metanol/água (80/20) regularmente. Então o sistema é lavado com o líquido do sistema (água ultrapura, 0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, 18.2 $\text{M}\Omega$).

Atenção:

O conteúdo de metanol deve ser adaptado ao sistema com o objetivo de evitar danos ao dispositivo de manuseio de líquidos. Favor consultar o manual de instruções do seu dispositivo.

2.1 Quantidade de reagente

A tabela abaixo indica os volumes de reagentes usados para cada amostra:

Reagente	Quantidade por amostra
Amostra/calibrador/controle	50 μL
Tampão de Extração	25 μL
Mix de Padrão Interno Reconstituído (ver nota abaixo)	250 μL

2.2 Procedimento de preparo de amostra

Mantenha a ordem de pipetagem descrita!

1. Pipete 25 µL do Tampão de Extração em uma placa de 96 poços com filtro (art. 92057)
2. Adicione 50 µL de amostra/calibrador/ **MassCheck**[®] control
3. Agite por 2 min (1200 rpm)
4. Adicione 250 µL do Padrão Interno reconstituído (contém Reagente de Precipitação, art. 92012, veja nota abaixo)
5. Agite por 40 segundos (700 rpm)
6. Separe o precipitado por centrifugação (2000 x g, 1 min) e colete o eluato em uma placa de coleta (art. 92058)
7. Dilua o eluato com o Tampão de Diluição, específico para o instrumento e o conjunto de parâmetros, em uma placa de coleta adicional (ver cap. 4.3)
8. Sele a placa de coleta com o selo adesivo perfurável (art. 92059) e transfira para o amostrador automático
9. Injete o eluato no sistema de LC-MSMS

Nota para a reconstituição do Mix de Padrão Interno:

Para o preparo de amostras com placas de 96 poços com filtro, o uso do Reagente de Precipitação para o preparo automatizado de amostras (art. 92012) é obrigatório, enquanto o Reagente de Precipitação (art. 92003) deve ser usado para o preparo de amostras sem placas de 96 poços com filtro.

As instruções para a reconstituição do Mix de Padrão Interno podem ser encontradas no capítulo 4 dos manuais dos **MassTox**[®] TDM PARAMENTER Set.

O Tampão de Extração e o Mix de Padrão Interno reconstituído podem ser pipetados usando o modo de multipipetagem. Água ultrapura (0.055 µS/cm, 18.2 MΩ) é adequada para lavagem das agulhas.

2.3 Encerrando o sistema

Para longos períodos de desuso (mais de duas semanas), lave os canais de pipetagem abundantemente com metanol/água (80/20) com o objetivo de remover impureza microbianas. Então, lave o sistema com o sistema líquido (água ultrapura, grau LC/MS).

Atenção:

O conteúdo de metanol deve ser adaptado ao sistema com o objetivo de evitar danos ao dispositivo de manuseio de líquidos. Favor consultar o manual de instruções do seu dispositivo.

3 Preparo manual de amostras com pipeta multicanal ou multipipeta

3.1 Quantidade de reagente

A tabela abaixo indica os volumes de reagentes usados para cada amostra:

Reagente	Quantidade por amostra
Amostra/calibrador/controle	50 µL
Tampão de Extração	25 µL
Mix de Padrão Interno Reconstituído (ver nota abaixo)	250 µL

3.2 Procedimento de preparo de amostra

Mantenha a ordem de pipetagem descrita!

1. Pipete 25 µL do Tampão de Extração em uma placa de 96 poços com filtro (art. 92057)
2. Adicione 50 µL de amostra/calibrador/**MassCheck**® control
3. Agite por 2 min (1200 rpm)
4. Adicione 250 µL do Padrão Interno reconstituído (contém Reagente de Precipitação, art. 92012, veja nota abaixo)
5. Agite por 40 segundos (700 rpm)
6. Separe o precipitado por centrifugação (2000 x g, 1 min) e colete o eluato em uma placa de coleta (art. 92058)
7. Dilua o eluato com o Tampão de Diluição, específico para o instrumento e o conjunto de parâmetros, em uma placa de coleta adicional (ver cap. 4.3)
8. Sele a placa de coleta com o selo adesivo perfurável (art. 92059) e transfira para o amostrador automático
9. Injete o eluato no sistema de LC-MSMS

Nota para a reconstituição do Mix de Padrão Interno:

Para o preparo de amostras com placas de 96 poços com filtro, o uso do Reagente de Precipitação para o preparo automatizado de amostras (art. 92012) é obrigatório, enquanto o Reagente de Precipitação (art. 92003) deve ser usado para o preparo de amostras sem placas de 96 poços com filtro.

As instruções para a reconstituição do Mix de Padrão Interno podem ser encontradas no capítulo 4 dos manuais dos **MassTox**® TDM PARAMENTER Set.

4 Problemas e Soluções


Problema	Possível causa	Solução
	Sistema MS/MS não está pronto	Verificar o sistema MS/MS
Placa de 96 poços com filtro entupida	Ordem errada das etapas de pipetagem	Ordem de pipetagem: 1. Tampão de Extração 2. Amostra 3. Mix de Padrão Interno reconstituído
	Reagente de Precipitação errado	Usar Reagente de Precipitação para preparo automatizado de amostras
Grande variação da área do Padrão Interno (PI)	Perda de solução do PI devido a alta pressão do vapor	Preparar 50 µL adicionais ao volume total requerido
	Contaminação da amostra pelo uso de selo adesivo com cola na área perfurável	Use o selo recomendado e validado pela Chromsystems
	Deteção incorreta do nível de líquido no frasco de armazenamento do PI	Use a deteção do nível de líquido com somente uma agulha
	Agulha do amostrador automático encostando no fundo da placa de coleta	Reduzir o ajuste de profundidade da agulha do amostrador automático
Sem sinal analítico	A amostra não foi transferida para o LC-MS/MS	Verificar agulha e ajustes de profundidade da agulha do

		amostrador automático
	Contaminação da amostra pelo uso de selo adesivo com cola na área perfurável	Use o selo recomendado e validado pela Chromsystems
	Evaporação da amostra no amostrador automático	Resfriar estante do amostrador automático ou usar selo adesivo recomendado
Carryover	Contaminação do dispositivo de manipulação de líquidos	Lavar agulhas e tubulação
	Contaminação do amostrador automático	Lavar amostrador automático

Apêndice II: Informações de Risco

As seguintes informações devem ser observadas e as medidas de segurança relevantes devem ser tomadas. Mais informações podem ser obtidas a partir das respectivas fichas de segurança. Elas estão disponíveis por requisição.

Produto	Risco
Fase Móvel 1 (artigo 92001)	
  	<p>Perigo</p> <p>H226 Líquido e vapor inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
Fase Móvel 2 (artigo 92002)	
  	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele, ou inalado. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P301+P310 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P301+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
Reagente de Precipitação (artigo 92003)	
 	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos. H336 Pode causar tonteira ou enjoo.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P233 Manter bem fechado. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos, lavar cautelosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil</p>

Produto	Risco
	remoção. Continue lavando.
Reagente de Precipitação (artigo 92012)	
 	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa sérios danos aos olhos. H336 Pode causar tonteira ou enjoo.</p> <p>P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P261 Evite respirar poeira / fumaça / gás / névoa / vapor / spray. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática. P305+P351+P338 Em caso de contato com os olhos, lavar cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e de fácil remoção. Continue lavando. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
Tampão de Diluição 2 (artigo 92008)	
  	<p>Perigo</p> <p>H226 Líquido e vapor inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P301+P312 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
Solução de Lavagem (artigo 92009)	
  	<p>Perigo</p> <p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico se ingerido, em contato com a pele, ou inalado. H370 Causa danos aos órgãos.</p> <p>P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P210 Manter longe do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas ou outras fontes de ignição. Não fumar. P301+P310 Em caso de ingestão: ligue imediatamente para um centro de intoxicação ou médico. P302+P352 Em caso de contato com a pele: lave abundantemente com sabão e água. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter bem fechado.</p>
Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da	

Produto	Risco
União Europeia:	
Tampão de Extração (artigo 92005)	
Tampão de Diluição 1 (artigo 92007)	

Apêndice III: Cálculo Manual

Os coeficientes das intensidades dos sinais dos analitos divididos pelas intensidades dos sinais do padrão interno plotados contra as concentrações dos analitos produzem uma curva de calibração por regressão linear. A equação resultante é aplicada para cada substância.

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos.

- Área do pico do analito no cromatograma do MRM = $A_{amostra}$
- Área do pico do padrão interno no cromatograma do MRM = $I_{amostra}$
- Slope da curva de calibração = a
- Intersecção Y da curva de calibração = b

A concentração do analito na amostra $C_{amostra}$ é calculada como a seguir:

$$C_{amostra} = \frac{(A_{amostra} / I_{amostra}) - b}{a}$$

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 LC-MS/MS determination of:

Nomenclature term: Other Central Nervous System TDM
Nomenclature code: 12-08-02-90
Classification: other product

Product name: **MassTox® TDM Serie A BASIC-Kit**

Controls: - -


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, January 20, 2012



Michael Meier
General Manager

Vers. 1.2