

CHROMSYSTEMS®

DIAGNOSTICS BY HPLC & LC-MS/MS

MONITORIZAÇÃO DE DROGAS TERAPÊUTICAS
MEDIKAMENTSPIEGEL (TDM)
THERAPEUTIC DRUG MONITORING
SUIVI THÉRAPEUTIQUE DE MÉDICAMENTS
MONITORAGGIO DEI FARMACI
MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS



Manual de Instruções para Análise por HPLC de Benzodiazepínicos e Antidepressivos Tricíclicos em Soro/Plasma

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Benzodiazepínicos e Antidepressivos tricíclicos em soro ou plasma por HPLC.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Artigo 49000

CE

**BENZODIAZEPÍNICOS E ANTIDEPRESSIVOS TRICÍCLICOS EM
SORO/PLASMA POR HPLC
MS 10350840116**

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 / 0800 015 1414 – 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 aquisição.....	3
2	Introdução	4
3	Sistema HPLC	6
3.1	Parâmetros do equipamento	6
3.2	Coluna HPLC.....	6
3.3	Intervalos de funcionamento	6
4	Separação Cromatográfica	7
5	Preparo da amostra	8
5.1	Coleta e armazenamento de amostras de pacientes	8
5.2	Reconstituição do padrão de calibração	8
5.3	Reconstituição dos controles	8
5.4	Procedimento de preparo das amostras	9
5.5	Estabilidade das amostras preparadas.....	10
6	Quantificação.....	10
6.1	Calibração do sistema de análise	10
6.2	Quantificação por Padrão Interno.....	11
7	Controle de Qualidade.....	11
8	Nível terapêutico das drogas antiepiléticas	12
9	Fatores de conversão	13
10	Armazenamento e validade dos reagentes	14
11	Descarte de resíduos	14
12	Exemplos de cromatogramas	15
12.1	Cromatograma de benzodiazepínicos	15
12.2	Cromatograma de antidepressivos tricíclicos.....	15
12.3	Cromatograma de uma amostra de paciente	16
12.4	Cromatograma de um calibrador de Clozapina/Norclozapina com padrão interno artigo 49041	16
13	Interferentes conhecidos	17
14	Problemas e Soluções.....	18
15	Literatura	19
	Apêndice I: Preparo automatizado de amostras com Gilson® ASPEC™	20
	Apêndice II: Informações de segurança	22
	Apêndice III: Cálculo manual	24
	Apêndice IV: Dados de Validação	25
	Apêndice V: Declaração de conformidade	29

1 Informações para aquisição

Artigo	Produto	
49000	Kit para análise de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos incluindo clozapina em soro/plasma por HPLC. Para 100 análises.	
	Componentes do Kit:	
	Fase móvel	1000 ml
	Padrão de Calibração em plasma (BZD+TCA) liof.	5 x 2,5 ml
	Padrão Interno	10 ml
	Tampão de equilíbrio 1	100 ml
	Tampão de equilíbrio 2	100 ml
	Tampão de lavagem	200 ml
	Tampão de eluição 1	40 ml
	Tampão de eluição 2	40 ml
	Colunas de preparo de amostras	2 x 50 pcs
	Componentes disponíveis separadamente:	
49001	Fase móvel	1000 ml
49002	Fase móvel	10 x 1000 ml
49003	Padrão de Calibração em plasma (BZD+TCA) liof.	5 x 2,5 ml
49031	Padrão de Calibração em plasma (BZD) liof.	5 x 2,5 ml
49032	Padrão de Calibração em plasma (TCA) liof.	5 x 2,5 ml
49004	Padrão Interno	10 ml
49041	Padrão Interno para análise de Clozapina/Norclozapina	10 ml
49005	Tampão de equilíbrio 1	100 ml
49006	Tampão de equilíbrio 2	100 ml
49007	Tampão de lavagem	200 ml
49009	Tampão de eluição 1	40 ml
49010	Tampão de eluição 2	40 ml
49008	Colunas de preparo de amostras	50 pcs
	Acessórios	
49100	Coluna para HPLC. Equilibrada, com cromatograma teste.	1 peça
15009	Pré-filtro em PEEK	5 peças
15010	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça
17001	Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
17049	Cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
	Controles (liofilizados)	
0051	Controle de benzodiazepínicos em plasma, bi-nível (I + II)	2 x 5 x 5 ml
0054	Controle de antidepressivos tricíclicos em plasma, bi-nível (I + II)	2 x 5 x 5 ml
	Calibradores	
49033	Padrão de Calibração em plasma Clozapina/Norclozapina	5 x 2,5 ml
0057	Controle de Clozapina/Norclozapina, bi-nível (I + II)	2 x 5 x 5 ml
49034	Padrão de Calibração em plasma Clobazam/Norclobazam	5 x 2,5 ml
0061	Controle de Clobazam/Norclobazam, bi-nível	2 x 5 x 5 ml
49035	Padrão de Calibração em plasma Alprazolam/Trazodon	5 x 2,5 ml
0062	Controle de Alprazolam/Trazodon, bi-nível (I + II)	2 x 5 x 5 ml

2 Introdução

Os benzodiazepínicos (BZD) são um enorme grupo de psicofármacos com estrutura química similar pertencentes à classe dos tranquilizantes. Os representantes mais conhecidos desse grupo são: diazepam (Valium), oxazepam e clordiazepóxido (Librium). Por virtude da sua alta lipofilicidade, eles atravessam a barreira hemato-encefálica rapidamente e logo após a absorção seu sítio de ação é alcançado (receptores do sistema nervoso central), onde eles aumentam a inibição do neurotransmissor GABA (γ -ácido aminobutírico).

Além de efeitos ansiolítico e sedativo (indutor de sono), os benzodiazepínicos têm propriedades anti-agressiva, sonífera, relaxante muscular e anticonvulsivante; o alprazolam é também um antidepressivo. O predomínio de efeitos individuais varia com o agente e a dose administrada. Ao contrário dos barbitúricos, que também são usados como soníferos, os benzodiazepínicos têm menos efeitos colaterais quanto à pressão sanguínea e respiração. A administração crônica (por mais de 4 meses) pode levar ao desenvolvimento de dependência, com sintomas de abstinência na descontinuação repentina, principalmente quando são empregadas altas doses.

No sangue, a maioria dos benzodiazepínicos está presente formando ligações inespecíficas com proteínas plasmáticas e são metabolizados principalmente pelo fígado, e seus metabólitos primários são os componentes N-1-desalquilados e C-3-hidroxilados. O último é excretado na urina como ácido glicurônico altamente solúvel em água ou ésteres de sulfato via renal. Os metabólitos por si mesmos são na maior parte ativos farmacologicamente, e em alguns casos eles apresentam o princípio ativo (por exemplo, o clorazepato é metabolizado em nordiazepam). O tempo de eliminação do plasma é altamente variável: desde poucas horas (oxazepam) a alguns dias (clobazam). Os metabólitos frequentemente têm a meia-vida mais longa do que a substância que o originou (por exemplo, o clordiazepóxido tem meia vida de poucas horas e o nordiazepam de muitos dias).

Os antidepressivos tricíclicos (TCA) são usados no tratamento de distúrbios mentais tal como ansiedade, síndromes de dor e fobias. Seu efeito farmacológico é derivado do bloqueio e da recaptção dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina da fenda sináptica. Devido a esses efeitos farmacológicos, o antidepressivo tetracíclico maprotilina, que inibe especificamente a recaptção da noradrenalina, é também classificado nesse grupo. A clozapina é um neuroepilético tricíclico atípico com propriedade indutora de sono e anti-psicótica, que inibe seletivamente a recaptção da serotonina na sinapse.

Os antidepressivos tricíclicos são altamente lipofílicos e são absorvidos rapidamente pelo trato gastrointestinal após a administração oral. Mesmo antes de alcançarem o sítio de ligação no cérebro, uma fração já é metabolizada no fígado (efeito de primeira passagem). Existem etapas importantes acima dos N-desalquilados e hidroxilados. Alguns dos metabólitos do N-desmetil são também diretamente empregados terapeuticamente (por exemplo, desipramina = “desmetil-imipramina”).

As determinações regulares dos níveis de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em plasma podem reduzir os riscos de overdose e um melhor controle dos efeitos colaterais. Adicionalmente, permite o monitoramento e a manutenção da condição do paciente, garantindo assim um tratamento adequado.

Uso pretendido:

O kit de reagentes Chromsystems de Benzodiazepínicos e Antidepressivos Tricíclicos em soro/plasma é uma ferramenta de diagnóstico in vitro para ser usado em laboratórios clínicos para a detecção quantitativa dos benzodiazepínicos alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clobazam, clonazepam, Diazepam, flunitrazepam, nitrozepam, nordazepam, e oxazepam, assim como os antidepressivos tricíclicos amitriptilina, clomipramina, clozapina, desipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, norclomipramina, norclozapina, nordoxepina, nortriptilina e trimipramina em amostras de soro/plasma de pacientes através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). É indicado como teste de

monitoramento de pacientes tratados com um ou diferentes drogas citadas acima e como uma assistência para assegurar os níveis de droga dentro da faixa terapêutica.

Princípio do kit de reagentes:

Os benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos são extraídos de uma amostra de soro/plasma em uma única etapa de preparação por passagem através de uma coluna de extração em fase sólida. O padrão interno, adicionado antes da extração, contém 2 padrões sintetizados, um para cada grupo de substância. As 2 etapas de eluição seletiva separam os benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em eluatos separados. Os componentes individuais de ambos os grupos de substâncias podem ser medidos por um sistema de HPLC sem a necessidade de trocar as condições do HPLC (fase móvel, fluxo, temperatura, detector UV), portanto a sequência analítica completa pode ser feita em um turno.

Para a análise exclusiva da **clozapina e norclozapina** está disponível um padrão interno (artigo 49041), então o tempo de retenção deverá ser reduzido em aproximadamente 11 minutos (ver cromatograma adiante).

Os fármacos a seguir e seus metabólitos podem ser determinados quantitativamente com esse kit:

Benzodiazepínicos:

Alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clobazam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, nitrazepam, nordiazepam, oxazepam.

Antidepressivos tricíclicos:

Amitriptilina, clomipramina, clozapina, desipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, norclomipramina, narclozapina, nordoxepina, nortriptilina, trimipramina.

3 Sistema HPLC

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

3.1 Parâmetros do equipamento

Para a análise de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos é necessário um simples sistema isocrático de HPLC, equipado com bomba, injetor e detector UV. Para prevenir alterações de composição, a fase móvel não deve ser degaseificada e deve ser mantida coberta durante a operação. O uso de termostato na coluna pode evitar variações de temperatura e melhorar a estabilidade da separação.

Ajustes do equipamento:

(igual para benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos)

Volume de injeção:	50µl
Tempo de corrida:	28 min (benzodiazepínicos), 25 min (TCA)
Fluxo:	0,6 ml/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aproximadamente 25°C)
Detector UV:	Comprimento de onda de 210 nm
Solução de limpeza da agulha de injeção:	Água/acetona: 75/25

3.2 Coluna HPLC

A coluna para HPLC, utilizada na análise de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos, é fornecida equilibrada (pronta para uso) e testada. **Não deve ser tratada com nenhuma outra solução antes do uso.** O valor da pressão de uma coluna nova, em um fluxo de 0,6 mL/min é de aproximadamente 130 bar. Estes valores de pressão podem aumentar com o tempo ou uso da coluna. Desde que a separação cromatográfica seja satisfatória, variações da pressão da coluna são irrelevantes. Para garantir o tempo máximo de vida da coluna, **deve ser utilizada um pré-filtro em PEEK (artigos 15009 e 15010) ou uma pré-coluna (nº art. 17049 e 17001).**

Antes de começar uma análise:

1. Antes de instalar a coluna no sistema de HPLC, lavar o sistema com aproximadamente 30 ml de fase móvel, em um fluxo de 1,5 mL/min
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com um fluxo de 0,6 ml/min durante 15 - 20min, até que a linha de base esteja estabilizada.
3. Injetar o padrão de calibração previamente preparado repetidas vezes, até que dois cromatogramas sucessivos mostrem tempos de retenção e área/altura idênticos.
4. A partir deste momento, a fase móvel pode ser recirculada.

3.3. Intervalos de funcionamento

Caso o equipamento não seja usado por um período de até 3 dias, deixar a fase móvel circulando através do sistema em um fluxo baixo (0,2 mL/min) para prevenir cristalização de sal nos selos da bomba. A coluna de HPLC deverá permanecer conectada. Para aumentar o tempo de vida da lâmpada, o detector deve ser desligado.

Para períodos maiores de tempo sem utilizar o equipamento, desconectar e guardar a coluna de HPLC. Não é necessário procedimento de lavagem da coluna. Armazene a coluna em fase móvel a temperatura ambiente, bem selada. A coluna deverá ser substituída por uma união e o sistema lavado com cerca de 50mL de água/metanol (80/20 vol/vol).

4 Separação Cromatográfica

Tempo de retenção das substâncias analisadas e do padrão interno nas separações cromatográficas em um fluxo de 0.6 ml/min:

Cromatograma do primeiro eluato: Benzodiazepínicos

Analitos	Tempo de retenção (min)
Clordiazepóxido	5,0
Bromazepam	5,5
Padrão Interno	7,8
Oxazepam	9,2
Nitrazepam	9,9
Alprazolam	10,8
Clonazepam	11,4
Flunitrazepam	14,5
Nordiazepam	15,3
Clobazam	18,2
Diazepam	25,9

Cromatograma do segundo eluato: Antidepressivos tricíclicos (Inc. clozapina)

Analitos	Tempo de retenção (min)
Norclozapina	4,6
Clozapina	5,4
Nordoxepina	6,9
Doxepina	7,5
Desipramina	10,6
Imipramina	11,8
Nortriptilina	12,6
Maprotilina	13,2
Amitriptilina	14,0
Trimipramina	16,1
Padrão Interno	17,1
Norclomipramina	20,2
Clomipramina	22,8
ISTD para análise de Clozapina/Norclozapina	9,6

A separação cromatográfica leva aproximadamente 28 min (BZD), 25 min (TCA) ou 11 min (Clozapina/Norclozapina) (ver cromatograma adiante). Pequenas variações nos tempos de retenção podem ocorrer devido a mudanças de temperatura. Se for usado um novo lote da fase móvel ou se a coluna HPLC for reposta, os tempos de retenção podem sofrer pequenas alterações.

5 Preparo da amostra

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

5.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes

Deverá ser utilizado soro ou plasma para a análise.

De acordo com o grupo de trabalho para neuropsicofarmacologia e farmacopsiquiatria, amostras de soro e plasma são estáveis por pelo menos 24 horas se armazenadas em ambiente escuro e refrigerado (4°C). Se armazenado por mais de 24 horas, as amostras devem ser mantidas a aproximadamente -20°C. As amostras podem geralmente ser transportadas sem refrigeração [3]. Frascos de polipropileno devem ser usados para transporte, uma vez que antidepressivos tricíclicos podem adsorver em superfícies de vidro.

Atenção: É de responsabilidade individual dos laboratórios usar todas as referências disponíveis e/ou seus próprios estudos para determinar critérios específicos de estabilidade.

5.2 Reconstituição do padrão de calibração

Os padrões de calibração (artigos 49003, 49031, 49032, 49033, 49034, 49035) são rastreáveis a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após a reconstituição o padrão de calibração é submetido a todo o procedimento de preparo das amostras, como se fosse uma amostra de paciente deverá ser utilizado para calibrar o sistema de HPLC. **Para reconstituir o padrão de calibração liofilizado, pipetar exatamente 2,5 mL de água destilada para o frasco.** Deixar o frasco em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente 10 – 15 minutos para permitir a completa reconstituição, homogeneizando gentil e ocasionalmente. O valor atual de concentração depende do lote e será encontrado no folheto de informações que acompanha o padrão.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de soro humano testado, fornecendo resultados negativos para anticorpos HIV1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e TPHA. Como não existem métodos que deem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. 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 padrão reconstituído:

O padrão reconstituído é estável por até 1 semana se mantido fechado, protegido da luz e refrigerado entre +2 e +8°C. Para períodos maiores de armazenamento (no máximo 3 meses), fracionar e congelar abaixo de -18°C.

5.3 Reconstituição dos controles

Depois de reconstituídos, os controles (artigos 0052 E 0053 (BZD), 0055 E 0056 (TCA)), devem ser submetidos a todo o procedimento de preparo das amostras, como se fossem uma amostra de paciente. **Para reconstituir o controle liofilizado, pipetar exatamente 5,0 mL de água destilada no frasco.** Deixar o frasco em repouso à temperatura ambiente por 10 – 15 minutos para permitir a completa reconstituição, homogeneizando gentil e ocasionalmente. Evite exposição a luz solar direta. O valor atual

de concentração depende do lote e será encontrado no folheto de informações que acompanha o controle.

Atenção: Este produto foi fabricado a partir de *pool* de soro humano testado, fornecendo resultados negativos para anticorpos HIV1+2, HIV-, HCV- e HBV-DNA (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e TPHA. Como não existem métodos que tem segurança absoluta de que produtos contendo materiais de fonte humana serão livres de agentes infecciosos, um possível risco de infecção deve ser levado em conta. 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 controle reconstituído é estável por até 1 semana se mantido fechado, protegido da luz e refrigerado entre +2 e +8°C. Para períodos maiores de armazenamento (no máximo 3 meses), fracionar e congelar abaixo de -18°C.

5.4 Procedimento de preparo das amostras

Importante: antes da preparação, centrifugar a amostra por 10 min, 2700 x g.

1. Condicionamento da amostra na coluna de preparação:

Identificar as colunas de limpeza, colocar 1 ml de Tampão de Estabilização 1 e centrifugar (190 a 400 x g, aprox. 30-60s) ou usar sucção para retirar o tampão da coluna. Repetir com 1 ml do Tampão de Estabilização 2. **A coluna não deve funcionar a seco!**

2. Inserção da amostra:

Inserir 1 ml de soro/plasma, então adicionar 100 µL de Padrão Interno na coluna de limpeza; homogeneizar bastante com a pipeta e secar a coluna por centrifugação (190 a 400 x g, aprox. 1 min, checar se cada coluna secou completamente!) ou sucção. Descartar o eluído.

3. Lavagem:

Colocar 2 x 1 ml do Tampão de Lavagem na coluna de limpeza, secar por centrifugação (190 a 400 x g, aprox. 1 min) ou sucção. Descartar o eluído.

Após a segunda lavagem a coluna deve ser centrifugada (1200 x g, aprox. 2 min.) ou sucção.

4. Eluição:

Importante: as etapas de eluição devem ser seguidas rigorosamente. A etapa de eluição 1 (benzodiazepínicos) deve ser realizada somente na determinação de TCA (nesse caso a primeira eluição deve ser considerada como segunda etapa de lavagem e o eluído deve ser descartado).

4.1 Eluição dos benzodiazepínicos

Utilizando um frasco de vidro, colocar 400 µL do Tampão de Eluição 1 na coluna, secar completamente por centrifugação (190 a 400 x g, por aproximadamente 1 minuto, depois 1200 x g por aproximadamente 1 minuto) ou sucção. **Os benzodiazepínicos estão no primeiro eluato.**

4.2 Eluição dos antidepressivos tricíclicos

Utilizando um frasco de vidro, colocar 400 µL do Tampão de Eluição 2 na coluna, secar completamente por centrifugação (190 a 400 x g, por aproximadamente 1 minuto, depois 1200 x g por aproximadamente 1 minuto) ou sucção. **Os antidepressivos tricíclicos estão no segundo eluato.**

5. Injeção

Adicionar 200 µL de água destilada em cada eluato, homogenizar brevemente.
Injetar 50 µL do eluato no sistema HPLC.

6. Controle de qualidade

A precisão e exatidão das análises deverão ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica.

5.5 Estabilidade das amostras preparadas

As amostras preparadas/eluatos podem ser mantidas em temperatura ambiente por 3 dias ou refrigerados (+2° a +8°C) por aproximadamente 5 dias em recipientes de vidro e protegidos da luz. Para períodos maiores de armazenamento, congelar abaixo de -18°C (até 2 semanas).

6 Quantificação**6.1 Calibração do sistema de análise**

As concentrações individuais dos anaitos no padrão de calibração dependem do lote e poderão ser encontradas no folheto de informações que acompanha o padrão.

Antes de iniciar a análise quantitativa das amostras dos pacientes, é recomendável que um cromatograma de calibração, contendo todas as substâncias de interesse, seja rodado. Para esse propósito, injete o padrão de calibração preparado repetidamente no sistema, até que dois cromatogramas sucessivos mostrem tempos de retenção, resolução e área/altura de picos praticamente idênticos. Estes cromatogramas podem ser utilizados para ajustar corretamente os parâmetros de integração. O cromatograma do último teste de injeção é utilizado para calibrar o sistema de avaliação (Software PC, integrador).

Insira os tempos de retenção obtidos e as concentrações (ver folheto de informações) do padrão na tabela de análise.

Benzodiazepínicos:

Pico nº	Substância analisada	Tempo de retenção (min)	Concentração (ng/ml)
1	Clordiazepóxido	5,0	Folheto de informação
2	Bromazepam	5,5	Folheto de informação
3	Padrão Interno	7,8	1
4	Oxazepam	9,2	Folheto de informação
5	Nitrazepam	9,9	Folheto de informação
6	Alprazolam	10,8	Folheto de informação
7	Clonazepam	11,4	Folheto de informação
8	Flunitrazepam	14,5	Folheto de informação
9	Nordiazepam	15,3	Folheto de informação
10	Clobazam	18,2	Folheto de informação
11	Diazepam	25,9	Folheto de informação

Antidepressivos tricíclicos:

Pico nº	Substância analisada	Tempo de retenção (min)	Concentração (ng/ml)
1	Norclozapina	4,6	Folheto de informação
2	Clozapina	5,4	Folheto de informação
3	Nordoxepina	6,9	Folheto de informação
4	Doxepina	7,5	Folheto de informação
5	Desipramina	10,6	Folheto de informação
6	Imipramina	11,8	Folheto de informação
7	Nortriptilina	12,6	Folheto de informação
8	Maprotilina	13,2	Folheto de informação
9	Amitriptilina	14,0	Folheto de informação
10	Trimipramina	16,1	Folheto de informação
11	Padrão Interno	17,1	1
12	Norclomipramina	20,2	Folheto de informação
13	Clomipramina	22,8	Folheto de informação

Para garantir que nem o calibrador nem as condições do HPLC (tempo de retenção, etc.) tenham mudado durante a análise, o padrão preparado deve ser injetado durante a análise e novamente no final. Para avaliação dos resultados selecione “método por padrão interno”.

6.2 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 em cada amostra (padrão de calibração, controles, amostra de paciente). **Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno adicionada ao padrão de calibração e às amostras de pacientes é mesma, a concentração do padrão interno pode ser inserida como “1”.**

7 Controle de Qualidade

A exatidão e precisão das análises podem ser monitoradas pela inclusão de controles adicionais em cada corrida analítica (artigos 0052, 0053 (benzodiazepínicos), 0055, 0056 (antidepressivos tricíclicos).

Se a análise dos controles fornecer resultado fora do intervalo que consta no folheto de informações, o sistema deve ser checado e, se necessário, recalibrado.

8 Nível terapêutico das drogas antiepilépticas

As seguintes faixas terapêuticas são dadas na literatura como referência para drogas antiepilépticas em soro:

Benzodiazepínicos:

Analito	Faixa terapêutica 1 ^[5]	Faixa terapêutica 2 ^[6]	Faixa crítica a partir de (µg/ml)
Alprazolam	5 – 20 µg/l	5 – 50 µg/l	100-400 ^[5] , 100 ^[6]
Bromazepam	80 – 200 µg/l	50 – 200 µg/l	300 ^{[4],[6]} , 300-400 ^[5] (tóxico)
Clordiazepóxido	400 – 2000 µg/l	400 – 3000 µg/l	3000 ^[5] , 3500 ^[6]
Clobazam	100 – 600 µg/l	30 – 300 µg/l	500 ^[6]
Norclozabam	2000 – 4000 µg/l	300 – 3000 µg/l	5000 ^[6]
Clonazepam	10 – 80 µg/l	4 – 80 µg/l*	100 ^{[4],[5],[6]} (tóxico)
Diazepam	125 – 250 µg/l	200 – 2500 µg/l**	3000 ^{[4],[6]} , 1500 ^[5] (tóxico)
Nordiazepam	20 – 800 µg/l	20 – 800 µg/l	2000 ^{[4],[6]} , 1500 ^[5] (tóxico)
Flunitrazepam	5 – 15 µg/l	5 – 15 µg/l	50 ^{[4],[5],[6]} (tóxico)
Nitrazepam	30 – 50 µg/l	30 – 100 µg/l	200 ^{[4],[5],[6]} (tóxico)
Oxazepam	200 – 1500 µg/l	200 – 1500 µg/l	2000 ^{[4],[5],[6]} (tóxico)
Trazodona	800 – 1600 µg/l	700 – 1000 µg/l	4000 ^[5] , 1200 ^[6]

*ansiolíticos

Antidepressivos tricíclicos:

Analito	Faixa terapêutica 1 ^[5]	Faixa terapêutica 2 ^[6]	Faixa terapêutica 3 ^[7]
Amitriptilina	50 – 200 µg/l	80 – 200 µg/l**	50 – 300 µg/l
Nortriptilina	20 – 200 µg/l	70 – 170 µg/l	20 – 200 µg/l
Clomipramina	20 – 250 µg/l	230 – 450 µg/l**	90 – 250 µg/l
Norclomipramina	150 – 300 µg/l	0.8 – 2.6 x Clomipramina	---
Clozapina	300 – 800 µg/l	350 – 600 µg/l	100 – 600 µg/l
Norclozapina	150 – 300 µg/l	0.4 – 0.7 x Clozapina	0.4 – 1.0 x Clozapina
Doxepina	30 – 400 µg/l	50 – 150 µg/l**	10 – 200 µg/l
Nordoxepina		0.6 – 1.6 x Doxepina	---
Imipramina	50 – 150 µg/l	175 – 300 µg/l **	50 – 350 µg/l
Desipramina	10 – 500 µg/l	0.6 – 3.2 x Imipramina	10 – 500 µg/l
Maprotilina	100 – 250 µg/l	75 – 130 µg/l	75 – 130 µg/l
Trimipramina	10 – 250 µg/l	150 – 300 µg/l	10 – 300 µg/l

*Soma da droga e do metabólito

9 Fatores de conversão

Benzodiazepínicos:

Analito	ng/mL para nmol/L	nmol/L para ng/mL
Alprazolam	x 3,2386	x 0,3088
Bromazepam	x 3,1630	x 0,3162
Clordiazepóxido	x 3,3360	x 0,2998
Clobazam	x 3,3251	x 0,3007
Clonazepam	x 3,1674	x 0,3157
Diazepam	x 3,5119	x 0,2847
Flunitrazepam	x 3,1920	x 0,3133
Nitrazepam	x 3,5553	x 0,2813
Nordiazepam	x 3,6939	x 0,2707
Oxazepam	x 3,4877	x 0,2867

Antidepressivos tricíclicos:

Analito	ng/mL para nmol/L	nmol/L para ng/mL
Amitriptilina	x 3,6048	x 0,2774
Clomipramina	x 3,1760	x 0,3149
Clozapina	x 3,0597	x 0,3268
Desipramina	x 3,7539	x 0,2664
Doxepina	x 3,5793	x 0,2794
Imipramina	x 3,5661	x 0,2804
Maprotilina	x 3,6048	x 0,2774
Norclomipramina	x 3,3241	x 0,3008
Norclozapina	x 3,1969	x 0,3128
Nordoxepina	x 3,7685	x 0,2654
Nortriptilina	x 3,7967	x 0,2634
Trimipramina	x 3,3963	x 0,2944

10 Armazenamento e validade dos reagentes

Os reagentes não abertos podem ser utilizados até a data de validade estabelecida no rótulo, desde que as condições de armazenamento indicadas no mesmo sejam obedecidas.

Condições de armazenamento dos reagentes:

Produto	Condição
Fase móvel	+18 a +30°C
Padrão Interno	+2 a +8°C
Tampão de estabilização 1	+18 a +30°C
Tampão de estabilização 2	+18 a +30°C
Tampão de lavagem	+18 a +30°C
Tampão de eluição 1	+18 a +30°C
Tampão de eluição 2	+18 a +30°C
Colunas de lavagem	+18 a +30°C
Padrão de calibração	+2 a +8°C
Soros controles, níveis I e II	+2 a +8°C

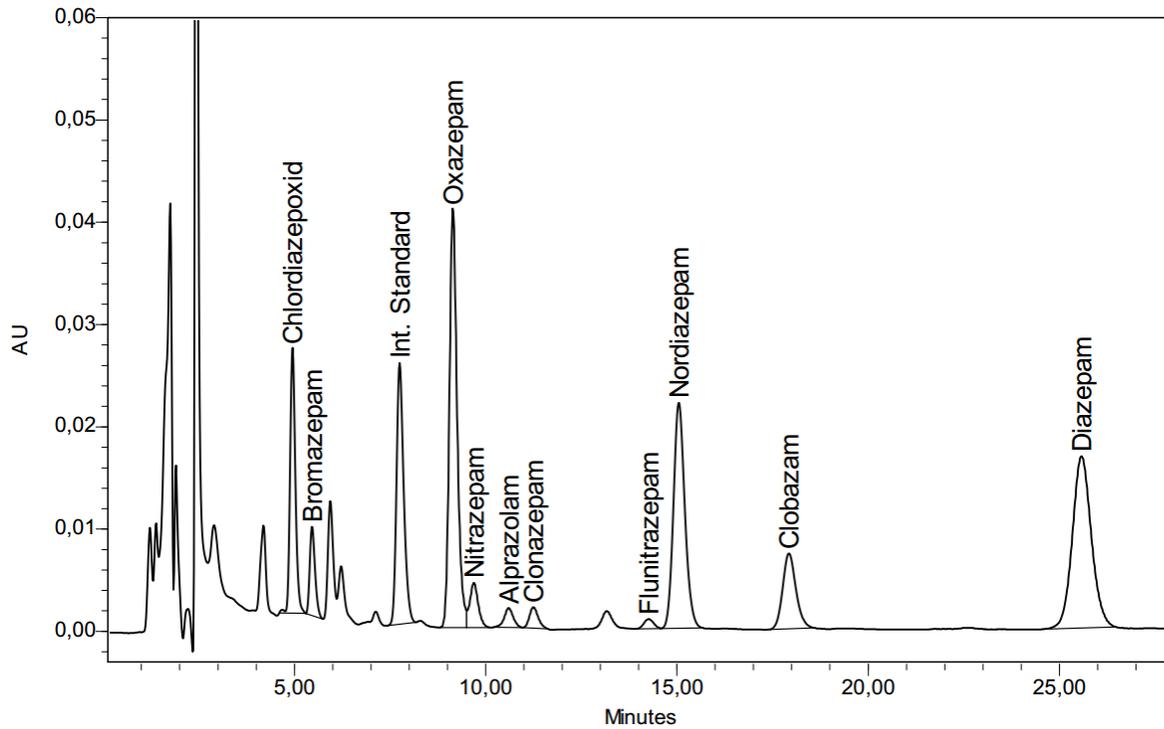
Os reagentes devem ser fechados e armazenados nas condições estabelecidas tão logo sejam utilizados. Se nada tiver sido previamente determinado, a validade de um reagente em uso deverá ser de 1 ano após sua abertura, não excedendo o seu respectivo prazo de validade. Para calibradores e controles, ver os capítulos 5.2 e 5.3 deste manual.

11 Descarte de resíduos

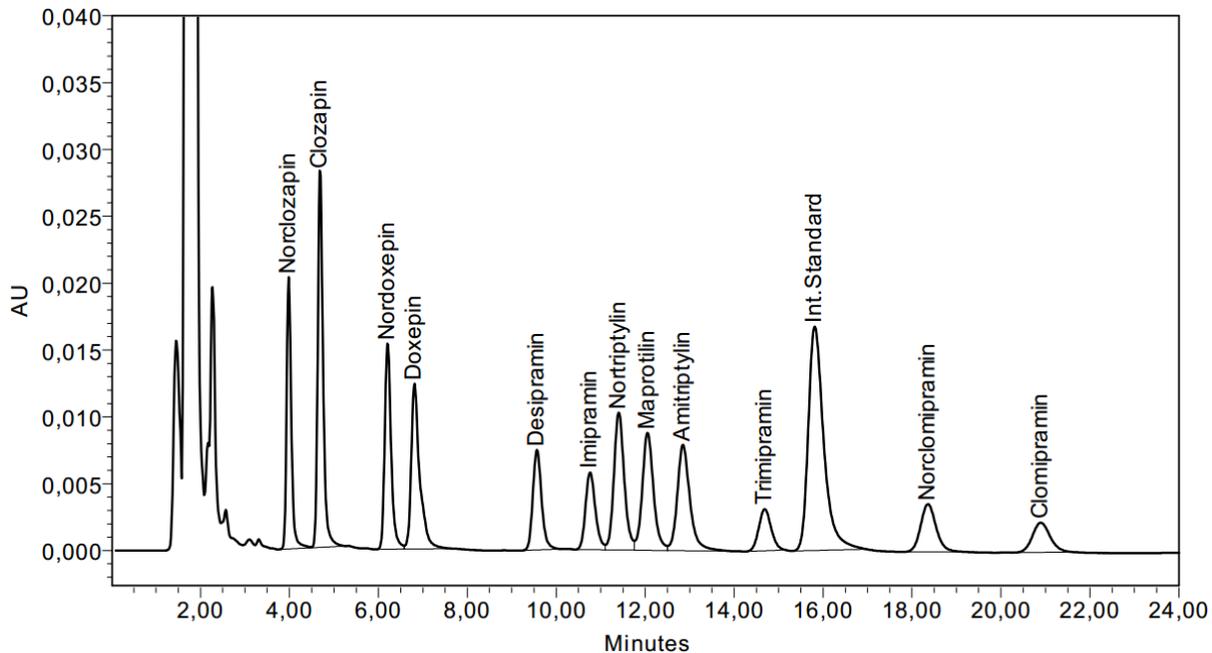
A Fase Móvel, o Padrão Interno, o Tampão de Estabilização 1, o Tampão de Estabilização 2, o Tampão de Lavagem, o Tampão de Eluição 1, o Tampão de Eluição 2 e os resíduos dos espécimes preparados contêm solventes. Descarte os resíduos dos produtos em um contêiner para solventes orgânicos livres de halogênio. Estes produtos não devem ser descartados juntamente com 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.

12 Ejemplos de cromatogramas

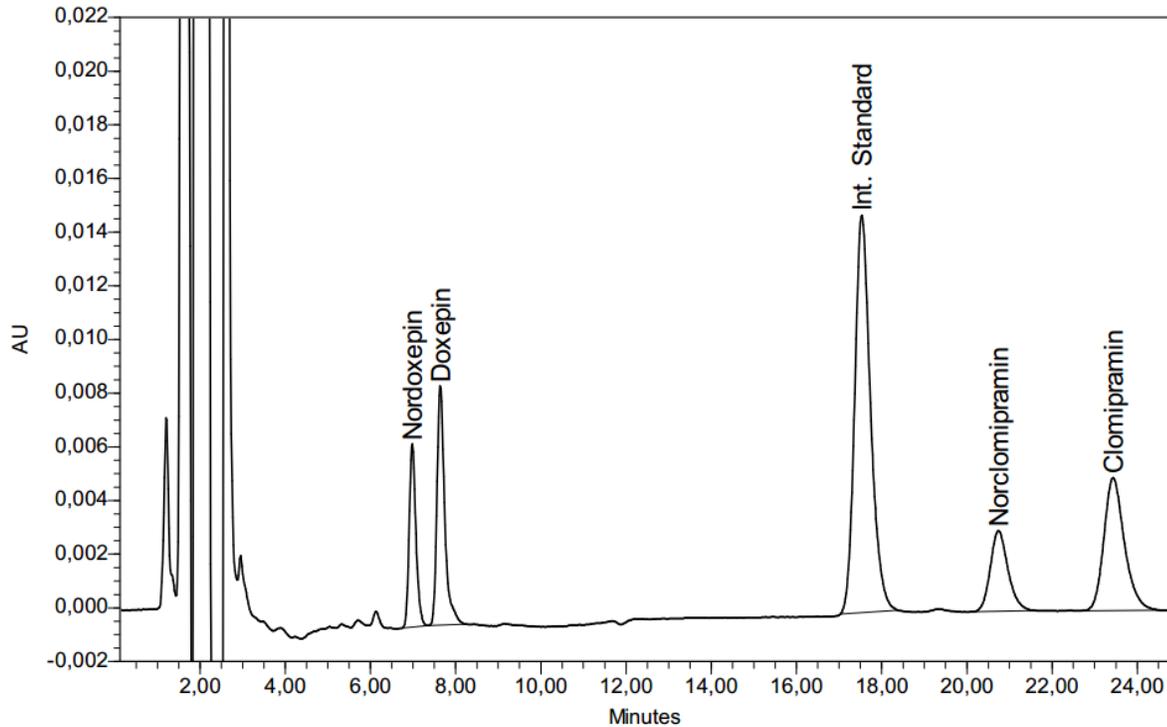
12.1 Cromatograma de benzodiazepínicos



12.2 Cromatograma de antidepresivos tricíclicos

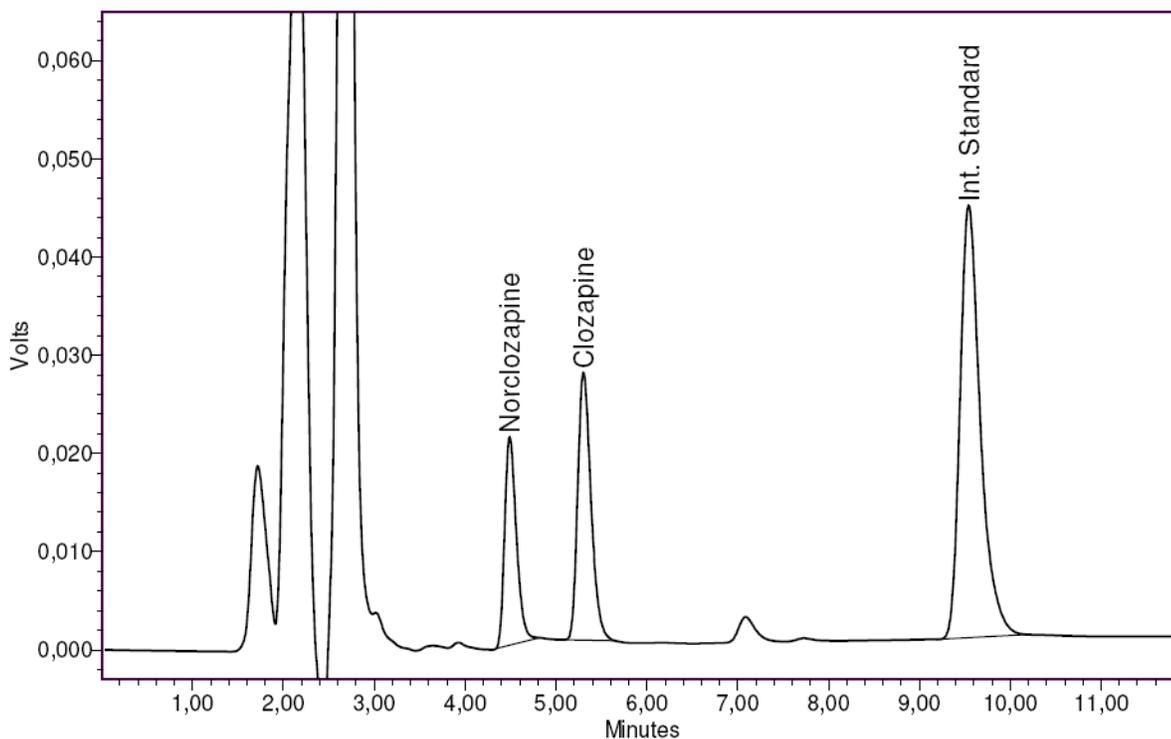


12.3 Cromatograma de uma amostra de paciente



Doxepina:	109 ng/ml	Clomipramina:	302 ng/mL
Nordoxepina:	69,5 ng/mL	Norclomipramina	147 ng/mL.

12.4 Cromatograma de um calibrador de Clozapina/Norclozapina com padrão interno artigo 49041



13 Interferentes conhecidos

Nota:

- Com a utilização do clobazam, o metabólito norclobazam (faixa esperada: 1000 – 3000 ng/mL) poderá aparecer também no cromatograma dos benzodiazepínicos no tempo de retenção de aproximadamente 11 minutos. No caso da rara utilização de uma combinação de clobazam e clonazepam pode ocorrer interferência da determinação do clonazepam.
- Amostras contendo a droga antiepilética carbamazepina devem apresentar grande interferência do Padrão Interno (muitas vezes o tamanho do pico) da carbamazepina no cromatograma dos benzodiazepínicos. Nesse caso deve ser utilizado um calibrador externo (sem incluir o Padrão Interno) para avaliação quantitativa.
- Com a utilização do flurazepam, o metabólito desalquil-flurazepam (faixa esperada: 30 – 80 ng/mL) poderá aparecer também no cromatograma dos benzodiazepínicos no tempo de retenção de aproximadamente 14 minutos, e interfere na determinação do flunitrazepam. Neste caso, um pico entre a clozapina e nordoxepina aparecerá no cromatograma dos antidepressivos tricíclicos. Isto não interfere nos antidepressivos tricíclicos.
- Amostras de pacientes com altos níveis de clozapina pode conter também o metabólito clozapina-N-óxido, que aparece no cromatograma dos antidepressivos tricíclicos no tempo de retenção de aproximadamente 6 minutos.
- O metabólito da trimipramina, desmetiltrimipramina, aparece no cromatograma dos antidepressivos tricíclicos no tempo de retenção de aproximadamente 14,5 minutos, e pode se sobrepor ao pico da amitriptilina.
- As amostras que contém aripiprazol, a nortriptilina pode co-eluir parcialmente no cromatograma dos antidepressivos tricíclicos.

Para qualquer dúvida sobre possíveis interferências, favor contactar a BioSys - SAC: (21) 3907 2534, ou e- mail: sac@biosys.com.br.

14 Problemas e Soluções

Problema	Possível causa	Solução
Ruídos de linha de base	Lâmpada do detector ainda está fria	Esperar
	Lâmpada do detector está muito velha	Trocar a lâmpada
	Sistema ainda não está em equilíbrio	Injetar repetidamente o padrão de calibração, até que dois cromatogramas sejam idênticos.
	Variação de temperatura	Usar forno para coluna
Linha de base instável	Fluxo inconstante	Checar a bomba
	Bomba de HPLC	Checar bomba (ar, vazamentos)
	Ar no sistema	Desgaseificar o Sistema de HPLC (purgar)
Picos de interferência	Célula do detector contaminada	Limpar célula do detector
	Ar no sistema	Desgaseificar o Sistema de HPLC (purgar)
	Injetor contaminado	Limpar injetor
	Amostrador automático contaminado	Limpar as vias com metanol
	Sistema de injeção contaminado	Limpar com metanol ou injetar fase móvel 10x
Picos com cauda (Tailing)	Coluna de HPLC contaminada	Trocar a coluna
	Coluna de HPLC muito velha	Renovar a coluna
Picos duplos	Volume morto nas junções e tubulações	Renovar junções e tubulações
	Volume morto na coluna de HPLC	Renovar colunas
Sem picos	Vazamento no injetor	Checar injetor
Sensibilidade reduzida	Lâmpada do detector envelhecida	Recolocar a lâmpada
	Célula do detector contaminada	Limpar a célula
	Válvula de injeção com defeito	Checar injetor
Alteração nos tempos de retenção	Variações de temperatura	Usar forno para coluna
	Fluxo irregular	Checar bomba de HPLC Ajustar o fluxo
	Sistema ainda não está em equilíbrio	Bombear a fase móvel por cerca de 15 minutos através do sistema e injetar padrão repetidamente
Sem sinal	Conexão com o integrador/software com defeito ou interrompida	Checar sinal do cabo e conexão

Lâmpada do detector

Checar fornecimento de voltagem, trocar a lâmpada se necessário

15Literatura

1. Benkert O, Hippus H. Psychiatrische Erkrankungen Springer-Verlag berlin (1992).
2. Krapf FE, Bieger WP, Tiller FW. LaborDatenBuch. Urban & Schwarzenberg München (1995).
3. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmokologie und Toxikologie. 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1986).
4. Woggon B. Depressionen und Psychopharmaka – Medizin 2000. Pmi Verlagsgruppe Frankfurt/Maim (1997).
5. Ludewig R, Regenthal R (Hrsg). Akute Vergiftungen und Arzneimittelüberdosierungen. 10. Aufl., WWG Stuttgart (2007).
6. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, Fric M, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Jaquenout Sirot E, Kirchherr H, Lauz G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schopekk B, Stingl J, Uhr M, Ulrich S, Waschgler R, Zernig G. (2011) AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011. *Pharmacopsychiatry* **44**(6): 195-235.
7. Schulz M, Iwersen-Bergmann S, Andressen H, Schmoldt A. (2012) Therapeutic and Toxic Blood Concentrations of Nearly 1,000 Drugs and other xenobiotics. *Crit Care* **16**(4): R136.

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

ASPEC™_Racks

Os arquivos Chromsystems ASPEC™ para benzodiazepínicos e ácidos tricíclicos em soro/plasma requerem as seguintes estantes de amostras e reagentes:

- Estante de amostras, código 28
- Estante de solventes, código 61
- Estantes móveis DEC, código 101 (até 3), com vials de coleta e estantes de coleta adequados

Configurando as estantes:

Reagente	Estante	Posição
Amostras	Estante de amostras	1-52
Padrão Interno (49004/A)	Estante de amostras	55-106 (mesmos números das amostras)
Tampão de Equilíbrio 1 (49005/A)	Estante de solventes	107-108
Tampão de Equilíbrio 2 (49006/A)	Estante de solventes	109
Tampão de Eluição 1 (49009/A para benzodiazepínicos)	Estante de solventes	110
Tampão de Eluição 2 (49010/A) para antidepressivos tricíclicos*	Estante de solventes	111
Colunas de preparo de amostras (49008/A)	Estantes DEC	113-120
Vials de Coleta	Estante de coleta	Mesmos números dos cartuchos SPE
Tampão de Lavagem	Reservatório	

*Não requerido se os benzodiazepínicos estão sendo analisados.

Antes de se iniciar uma sequência de análises, o diluidor deve ser lavado manualmente com solvente do reservatório (Menu Manual – Prime dilutor)!

Volumes de reagentes requeridos:

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

Reagente	Volume
Padrão Interno (49004/A)	100 µl
Tampão de Equilíbrio 1 (49005/A)	1.0 ml
Tampão de Equilíbrio 2 (49006/A)	1.0 ml
Tampão de Eluição 1 (49009/A)	0.45 ml
Tampão de Eluição 2 (49010/A) *	0.45 ml
Tampão de Lavagem (49007/A)	9 ml + vol. Adicionado para priming

*Não requerido se os benzodiazepínicos estão sendo analisados.

Cada garrafa de solvente deve conter o volume de solvente suficiente para o número de amostras a ser preparada **mais** um volume adicional de aproximadamente 30 ml. As garrafas devem ser fechadas com as tampas adequadas para evitar evaporação de componentes orgânicos dos tampões.

Princípio dos arquivos de trabalho do ASPEC™

Antes de iniciar o ASPEC™, pipete exatamente 1 ml de cada espécimen de soro/plasma manualmente em um vial de amostra de vidro e coloque na posição apropriada na estante de amostras.

ASPEC™ irá realizar o preparo de amostra completo (isto é, misturar a amostra com o padrão interno, SPE com etapas de lavagem e eluição, diluição dos eluatos). Os eluatos preparados estão prontos para a injeção no sistema de HPLC.

O disco de arquivos de trabalho contém os seguintes arquivos:

“BZD”/“TCA”:

ASPEC™ deve ser adequadamente conectado ao sistema de HPLC! Estes arquivos controlam o preparo das amostras para benzodiazepínicos (“BZD”) ou antidepressivos tricíclicos (“TCA”), respectivamente. Os eluatos preparados são automaticamente injetados no sistema de HPLC, e a cromatografia é iniciada. Durante a corrida de HPLC as próximas amostras são preparadas.

O volume de injeção é ajustado para 50 µl; isto pode ser alterado na etapa INJECT (#14 em “BZD”, #16 em “TCA”).

A etapa WAIT da programação (#17 em “BZD”, #19 em “TCA”) é usada para coordenar os intervalos de injeção de acordo com o tempo de corrida do cromatograma e o tempo de preparação das amostras; isto deve ser alterado se necessário. Note que o tempo de preparo das amostras para benzodiazepínicos é um pouco mais curto (cerca de 1-2 nin) do que para antidepressivos tricíclicos!

“BZD_NI”/ “TCA_NI”:

ASPEC™ realiza somente o preparo de amostras para benzodiazepínicos (“BZD_NI”) ou antidepressivos tricíclicos (“TCA_NI”), respectivamente; as amostras **não** são injetadas no sistema de HPLC!

Ajustes de configuração:

Estes arquivos de trabalho são designados para controle do ASPEC™ via teclado.

Alguns itens no menu CONFIG devem ser checados e, se necessário, adaptados a atual configuração do equipamento ASPEC™.

Configuração do SAMPLER:

Model

Arm

Rinsing station depth: e.g. 80mm

Rinsing station positions: A and/or B, C

Injection loop(s): position and volume

Calib. tubing volume

ID number

Configuração do DILUTOR

Type

Left syringe volume

Right syringe volume

Transfer tubing

ID number

Apêndice II: Informações de segurança

As seguintes informações devem ser observadas e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. Maiores informações podem ser obtidas nos folhetos de segurança dos materiais disponíveis no endereço eletrônico www.chromsystems.de ou mediante solicitação.

Pictogramas	Risco/Segurança
Fase Móvel (artigo 49001, 49002)  	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa séria irritação na pele. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática.
Padrão Interno (artigo 49004, 49041)   	Perigo H226 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa irritação séria aos olhos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. 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.
Tampão de Estabilização 1 (artigo 49005) 	Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de

 	<p>ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. 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>
<p>Tampão de Estabilização 2 (artigo 49006)</p> 	<p>Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática.</p>
<p>Tampão de Lavagem (artigo 49007)</p> 	<p>Perigo H226 Líquido e vapor inflamáveis. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática.</p>
<p>Tampão de Eluição 1 (artigo 49009)</p>  	<p>Perigo H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por inalação, ingestão e contato com a pele. H319 Causa séria irritação aos olhos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P241 Usar equipamentos elétricos/de ventilação/iluminação à prova de explosão. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. P243 Tomar medidas de precaução contra descarga estática.</p>
<p>Tampão de Eluição 2 (artigo 49010)</p>	<p>Perigo</p>

	<p>H225 Líquido e vapor altamente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por inalação, ingestão e contato com a pele. H370 Causa danos aos órgãos. P210 Manter longe de aquecimento, superfícies quentes, faíscas, chamas, ou outras fontes de ignição. Não fumar. P280 Utilizar roupa de proteção, luvas adequadas, proteção nos olhos e na face. 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>
<p>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia: Padrão de Calibração em Plasma (artigo 49003, 49031, 49032, 49033, 49034, 49035) Controles em Plasma (artigo 0051, 0052, 0053, 0054, 0055, 0056, 0057, 0061, 0062)</p>	

Apêndice III: Cálculo manual

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

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

Área ou altura do pico da substância A no cromatograma do padrão de calibração = $A_{\text{Padrão}}$

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 padrão de calibração = $IS_{\text{Padrão}}$

A concentração C da substância A no padrão de calibração = $C_{\text{Padrão}}$

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

$$C_{\text{Analito, Amostra}} \text{ (ng/ml)} = \frac{A_{\text{Amostra}} \times IS_{\text{Padrão}}}{A_{\text{Padrão}} \times IS_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{Padrão}}$$

Apêndice IV: Dados de Validação

Para validar o método, foram utilizadas amostras de soro fortificadas com quantidades definidas de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos. Alíquotas múltiplas dessas amostras foram submetidas ao procedimento descrito neste manual.

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir do *slope* das curvas de calibração das amostras fortificadas e soluções de padrões diluídos. As tabelas seguintes mostram as taxas de recuperação das substâncias individualmente.

Benzodiazepínicos:

Analito	Taxas de recuperação no plasma [%]	Taxas de recuperação no soro [%]
Alprazolam	122	92
Bromazepam	86	106
Clordiazepóxido	96	86
Clobazam	88	90
Clonazepam	97	97
Diazepam	86	81
Flunitrazepam	88	105
Nitrazepam	92	100
Norclobazam	97	102
Nordiazepam	93	102
Oxazepam	91	93
Trazodona	95	91
Padrão Interno	87	107

Antidepressivos tricíclicos:

Analito	Taxas de recuperação no plasma [%]	Taxas de recuperação no soro [%]
Amitriptilina	96	97
Clomipramina	97	102
Clozapina	105	107
Desipramina	105	103
Doxepina	101	103
Imipramina	105	104
Maprotilina	101	103
Norclomipramina	73	78
Norclozapina	104	103
Nordoxepina	107	106
Nortriptilina	104	104
Trimipramina	100	106
Padrão Interno	103	89

Linearidade/ limite de quantificação

O método é linear desde o limite de quantificação designado até o limite superior.

Benzodiazepínicos:

Analito	Limite de quantificação aprox. * (ng/mL)	Limite linearidade (mg/L)
Alprazolam	4.5	65
Bromazepam	15	600
Clordiazepóxido	27	5000
Clobazam	9.0	2500
Clonazepam	2.0	250
Diazepam	7.0	3500
Flunitrazepam	1.5	250
Nitrazepam	4.5	540
Norclobazam	5.0	6000
Nordiazepam	5.0	2400
Oxazepam	12	2500
Trazodona	10	5000

Antidepressivos tricíclicos:

Analito	Limite de quantificação aprox. * (ng/mL)	Limite linearidade (mg/L)
Amitriptilina	3.0	1000
Clomipramina	2.0	1000
Clozapina	5.0	2000
Desipramina	4.0	1000
Doxepina	19	1000
Imipramina	4.5	1000
Maprotilina	8.0	1000
Norclomipramina	3.0	1000
Norclozapina	8.5	2000
Nordoxepina	9.0	1000
Nortriptilina	3.0	1000
Trimipramina	2.5	1000

*O limite de quantificação depende do detector utilizado!

Precisão intra-ensaio

A determinação da precisão intra-ensaio foi feita em três concentrações a partir da média de múltiplos preparos (n = 10) e da mesma amostra.

Benzodiazepínicos:

Analito	Coeficiente de variação (%) (Concentração ng/mL)		
	n = 10	n = 10	n = 10
Alprazolam	3,5 (11,8)	2,6 (75,2)	3,3 (42,3)
Bromazepam	1,7 (64,1)	1,1 (221)	1,5 (135)
Clordiazepóxido	2,9 (294)	1,6 (1759)	2,5 (1005)
Clobazam	1,4 (148)	1,5 (572)	1,9 (347)
Clonazepam	3,3 (25,1)	1,1 (72,7)	3,0 (49,6)
Diazepam	3,9 (147)	3,4 (1445)	3,6 (860)
Flunitrazepam	2,7 (17,6)	2,4 (62,2)	3,9 (42,8)
Nitrazepam	1,6 (46,0)	1,3 (148)	4,5 (106)
Norclobazam	1,8 (1030)	1,1 (4415)	2,8 (2814)
Nordiazepam	2,3 (83,1)	2,2 (897)	2,2 (515)
Oxazepam	3,8 (140)	2,3 (1452)	2,8 (833)
Trazodona	3,4 (411)	2,8 (2618)	3,1 (1323)

Antidepressivos tricíclicos:

Analito	Coeficiente de variação (%) (Concentração ng/mL)		
	n = 10	n = 10	n = 10
Amitriptilina	0.8 (192)	1.0 (52.4)	1.3 (273)
Clomipramina	0.9 (171)	2,6 (41,1)	1,7 (222)
Clozapina	1,7 (473)	2,7 (83,5)	2,0 (677)
Desipramina	0.8 (199)	1,1 (55,0)	1,2 (289)
Doxepina	1,4 (156)	2,9 (45,9)	1,4 (213)
Imipramina	0,7 (194)	0,7 (52,9)	1,2 (276)
Maprotilina	0,7 (205)	0,9 (56,2)	1,2 (281)
Norclomipramina	0,9 (180)	1,3 (55,9)	1,3 (286)
Norclozapina	2,2 (293)	3,5 (87,9)	2,6 (440)
Nordoxepina	1,1 (173)	1,7 (53,5)	1,4 (267)
Nortriptilina	0,7 (198)	0,9 (53,5)	1,2 (287)
Trimipramina	0,9 (167)	3,5 (42,0)	2,2 (210)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão inter-ensaio foi feita a partir do preparo de amostras de três pools de plasma cinco vezes, e a determinação da concentração do analito em 20 diferentes séries de teste:

Benzodiazepínicos:

Analito	Coeficiente de variação (%) / (Concentração ng/ml)		
	n = 100	n = 100	n = 100
Alprazolam	4,0 (12,7)	4,0 (80,7)	3,5 (43,4)
Bromazepam	5,9 (62,3)	5,9 (211)	5,8 (135)
Clordiazepóxido	4,9 (290)	4,6 (1669)	4,3 (964)
Clobazam	4,5 (145)	3,8 (595)	3,4 (348)
Clonazepam	5,6 (23,2)	3,6 (76,1)	4,3 (49,1)
Diazepam	6,0 (123)	5,1 (1431)	4,6 (836)
Flunitrazepam	5,8 (24,1)	5,8 (69,1)	6,0 (44,7)
Nitrazepam	5,7 (45,6)	3,4 (157)	3,4 (104)
Norclozabam	4,5 (1041)	4,7 (4164)	3,4 (2691)
Nordiazepam	5,5 (78,9)	3,2 (900)	3,2 (513)
Oxazepam	5,7 (129)	4,6 (1405)	3,5 (807)
Trazodona	3,9 (472)	3,8 (2590)	4,9 (1378)

Antidepressivos tricíclicos:

Analito	Coeficiente de variação (%) / (Concentração ng/ml)		
	n = 100	n = 100	n = 100
Amitriptilina	4,6 (55,6)	4,9 (286)	3,9 (194)
Clomipramina	5,3 (44,1)	4,5 (234)	2,9 (172)
Clozapina	5,8 (102)	3,6 (763)	2,8 (490)
Desipramina	3,1 (60,4)	3,5 (309)	3,1 (203)
Doxepina	5,9 (56,8)	5,0 (230)	4,0 (161)
Imipramina	3,6 (55,3)	4,5 (282)	3,2 (195)
Maprotilina	3,5 (60,2)	3,4 (297)	2,9 (207)
Norclomipramina	3,0 (58,6)	2,6 (299)	1,9 (180)
Norclozapina	5,0 (103)	5,9 (479)	4,7 (299)
Nordoxepina	3,7 (58,2)	3,6 (280)	2,8 (174)
Nortriptilina	2,8 (58,7)	3,1 (309)	2,1 (199)
Trimipramina	4,2 (44,3)	4,0 (228)	2,2 (128)

Apêndice V: 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: Benzodiazepine
Nomenclature code: 12-09-01-04-00
Classification: other product

Product name: **Benzodiazepines and Tricyclic Antidepressants in Serum/Plasma**
Controls: **Benzodiazepines or Tricyclic Antidepressants Plasma 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 23640, EN 13641

Notified body: -

Munich, November 20, 2012



Michael Meier
General Manager

Vers. 2.1

Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH	Am Haag 12 82166 Gräfelfing/Germany	Telefon: +49 89 18930-3 Telefax: +49 89 18930-199	mailto:info@chromsystems.de www.chromsystems.de
			 Zertifiziert nach: DIN EN ISO 9001 DIN EN ISO 13485, ISO 13485 CNDR