DROGAS ANTIEPILÉTICAS NO SORO OU PLASMA (HPLC)

Reagente diagnóstico para determinação quantitativa *in vitro* de Drogas Antiepiléticas em Soro/Plasma por HPLC. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

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

Artigo	Apresentação
22000/HR	Kit Reagente para Análise de Drogas Antiepiléticas em Soro/Plasma (100 análises)

Para informações detalhadas sobre o método e procedimentos, favor consultar o Manual de Instruções para Análise de Drogas Antiepilépticas em soro/plasma por HPLC no site www.biosys.com.br.

SUMÁRIO

Este Kit de reagentes foi desenvolvido para análise e monitoração terapêutica de drogas antiepilépticas, incluindo etossuximida, zonisamida, primidona, fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, trileptal e sultiam, além dos metabólitos carbamazepina-10,11-epóxido e 10-hidroxicarbamazepina. A análise é aplicada em amostras de soro ou plasma, empregando um sistema isocrático de HPLC com detector UV. O preparo da amostra é baseado em uma simples e eficiente etapa de precipitação, que garante a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

MÉTODO

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

PRINCÍPIO

Os possíveis interferentes presentes na amostra são eliminados por precipitação com adição de reagente específico e uma etapa de centrifugação. Após a injeção no sistema de HPLC, a detecção UV permite a leitura de absorbância dos analitos em comprimento de onda selecionado (204 nm).

REAGENTES

Componentes e Composições:

Produto	Composição	Apresentação
Fase móvel (Mobile Phase)	Solução aquosa de fosfato de sódio, metanol e acetonitrila	1000 ml
Reagente de Precipitação (Precipitation Reagent)	Solução metanólica contendo sulfato de zinco	1 x 5 ml
Padrão de calibração (Standard Calibration)	Soro humano liofilizado contendo benzodiazepínicos	5 x 1 ml
Padrão Interno (Internal Standard)	Solução aquosa de acetonitrila contendo 5-metil-5-(p-hidroxifenil)-5-fenilhidantoina	1 x 15 ml
Tampão de Estabilização (Stabilisation Buffer)	Solução aquosa de fosfato de sódio	1 x 10 ml
Frascos de reação (Reaction vials)	-	100 unidades

INSTRUÇÕES DE ARMAZENAGEM 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.
Após abertura dos frascos os reagentes são estáveis por até 12 meses com exceção do Padrão de calibração que após reconstituíção é estável por 2 semanas, se protegido da luz e mantido refrigerado em temperatura entre 2 e 8°C, ou no máximo por 3 meses conservado a < –18°C.

Artigo	Produto	Temperatura
22001/HR	Fase móvel	18 – 30°C
22005/HR	Padrão de Calibração em Soro (liofilizado)	2 – 8 °C
22004	Padrão Interno	2 – 8 °C
22003	Reagente de Precipitação	18 – 30 °C
22006	Tampão de Estabilização	2 – 8 °C

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Favor consultar a ficha de segurança dos reagentes e adotar as precauções necessárias para o manuseio de reagentes de laboratório.

GARANTIA

Estas instruções de uso devem ser lidas atentamente antes da utilização do produto. 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, o reagente de precipitação e o padrão interno contêm solventes orgânicos e devem ser descartados como resíduos químicos livres de halogênio, de acordo com as diretrizes e regulamentos locais em vigor.
Resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, assim como controles e calibradores devem ser coletados e descartados como lixo potencialmente infeccioso.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Fase Móvel: pronto para uso.
Padrão Interno: pronto para uso.
Reagente de Precipitação: pronto para uso.
Tampão de Estabilização: pronto para uso.
Padrão de Calibração em soro (liofilizado):
O calibrador (artigo 22005/HR) é rastreável à substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após reconstituição, são submetidos ao mesmo processo de preparo das amostras de pacientes. **Para reconstituir, pipetar exatamente 1,0 ml de água destilada no frasco.** Deixar repousar em temperatura ambiente por cerca de 10-15 minutos, para permitir a completa reconstituição. Agitar ocasional e gentilmente até que o conteúdo esteja homogêneo.

A concentração depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto.

MATERIAIS REQUERIDOS E DISPONÍVEIS, NÃO FORNECIDOS

Coluna cromatográfica equilibrada (Chromsystems art. 22100/HR).
Controle em soro bi-nível (I+II) (Chromsystems art. 0166).
Água tipo I ou grau HPLC.
Centrífuga para microtubos.
Metanol grau HPLC.
Material geral de laboratório.

AMOSTRA
Deverão ser analisadas amostras de soro ou plasma, coletadas durante o intervalo entre as administrações do medicamento. As amostras devem ser refrigeradas para transporte.
Tempos recomendados para coleta:

Etossuximida	Durante intervalo de aplicação
Fenobarbital	Durante intervalo de aplicação
Lamotrigina	-
Fenitoína	Durante intervalo de aplicação
Primidona	Máximo de 2-4 horas depois da última ou imediatamente antes da próxima aplicação
Carbamazepina	Máximo de 6-18 horas depois da última ou imediatamente antes da próxima administração

Estes tempos são recomendados somente em casos de terapia controlada. Se qualquer tipo de abuso for suspeito, analise o sangue imediatamente.

Estabilidade da amostra: as amostras coletadas desta forma são estáveis por 1 semana se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C. Para períodos maiores de armazenamento, conservar a – 20 °C.
Estabilidade das amostras preparadas (eluatos): as amostras preparadas são estáveis por até 1 semana se mantidas refrigeradas, em temperatura entre 2 e 8°C, e protegidas da luz. Para períodos maiores de armazenamento (até 14 dias), conservar a – 18°C.

PROCEDIMENTOS DO TESTE

Ajustes do instrumento:

Amostrador:	Volume de injeção de 20µl, tempo de corrida 20 min.
Detector UV:	Comprimento de onda de 204 nm
Fluxo:	1,2 ml/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aprox. 25 ºC)
Solução de lavagem da agulha:	Água/metanol = 90/10

Procedimento de preparo de amostras:

Utilizar os tubos de reação que acompanham o kit, para que as amostras sejam protegidas da exposição à luz ambiente.
1. Transferir 100µl de soro/plasma (padrões, controles e amostras) e 150µl de Padrão Interno para tubos de reação devidamente identificados e agitar.
2. Adicionar 50µl de reagente de precipitação e agitar por 1 min (vortex).
3. Centrifugar por 10-15 min a pelo menos 9000 x g.
4. Misturar 100µl de sobrenadante com 100 µl de tampão de estabilização.
5. Injetar 20µl da mistura no sistema de HPLC.

Controles devem ser incluídos em todas as séries de análise para monitorar a exatidão e precisão do sistema.

Tempo de retenção esperado:

Analito	Tempo de retenção aprox. em minutos
Sultiam	3,8
Etossuximida	4,2
Zonisamida	4,6
Primidona	5,1
Lamotrigina	6,9
10-Hidroxicarbamazepina	7,6
Fenobarbital	8,0
Carbamazepina-epóxido	9,0
Trileptal	11,1
Padrão interno	14,5
Fenitoína	17,9
Carbamazepina	19,4

No caso de terapia com carbamazepina, o metabólito terapeuticamente não ativo 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (DIOL) aparecerá adicionalmente em 6.0 min. Entretanto, este pico é cromatograficamente bem separado dos outros picos das outras drogas antiepiléticas.

No caso raro de combinação de primidona e sultiam, o metabólito da primidona 2-etil-2-fenilmalondiamida (PEMA) pode afetar a quantificação do sultiam devido a sobreposição dos picos.

Se um novo lote de fase móvel for usado ou se a coluna de HPLC for substituída, os tempos de retenção podem mudar levemente. Dessa forma, os tempos de retenção devem ser adaptados apropriadamente.

CÁLCULOS

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

Área ou altura do pico do analito A no cromatograma da amostra	= Aamostra
Área ou altura do pico do analito A no cromatograma do calibrador	= Calibrador
Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma da amostra	= ISAmostra
Área ou altura do pico do padrão interno no cromatograma do calibrador	= ISCalibrador
Concentração C do analito A no calibrador	= *CCalibrador

* A concentração dos analitos individuais depende do lote e será encontrada no folheto de informações que acompanha o produto. Uma vez que a mesma quantidade de padrão interno é adicionada ao padrão de calibração e às amostras de pacientes, a concentração do padrão interno pode ser considerada como "1" para fins de cálculo.

Fatores de conversão:

Analito	mg/l para µmol/l	µmol/l para mg/l
Carbamazepina	4,23	0,236
Carbamazepina-epóxido	3,96	0,252
Etossuximida	7,08	0,141
Lamotrigina	3,90	0,256
Fenobarbital	4,31	0,232
Fenitoína	3,96	0,252
Primidona	4,56	0,218
Sultiam	3,44	0,290
Trileptal	3,96	0,252
Zonisamida	4,71	0,212
10-Hidroxicarbamazepina	3,93	0,254

DESEMPENHO / CARACTERÍSTICAS

Para verificar a linearidade e validar o método, espécimes de soro foram fortificadas com quantidades definidas de drogas antiepiléticas. Múltiplas alíquotas desses preparos foram submetidas ao procedimento de preparo.

Linearidade / limite de quantificação:

A linearidade foi determinada pela coleta de amostras de soros em diversos intervalos. O menor limite de quantificação foi avaliado pelo uso de diluições pré-definidas do controle em soro nível I (0060, 0063/I, 0064/I). O método se mostro linear a partir do limite designado de quantificação até o limite superior.

Analito	Limite de quantificação (mg/l)	Limite linearidade (até pelo menos mg/l)
Sultiam	0,7	50
Etossuximida	4,5	250
Zonisamida	0,3	100
Primidona	0,2	40
Lamotrigina	0,2	30
10-Hidroxicarbamazepina	2,0	40
Fenobarbital	0,6	150
Carbamazepina-10,11-Epóxido	0,2	40
Oxcarbamazepina	0,6	50
Fenitoína	0,3	50
Carbamazepina	0,3	50

Recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir do *slope* das curvas de calibração das amostras fortificadas e soluções de padrões diluídos. A tabela seguinte mostra as taxas de recuperação das substâncias individuais.

Analito	Taxas de recuperação em soro (%)	Taxas de recuperação em plasma (%)
Sultiam	85	88
Etossuximida	99	101
Zonisamida	88	89
Primidona	95	96
Lamotrigina	91	94
10-OH-Carbamazepina	85	86
Fenobarbital	95	97
Carbamazepina-10,11-Epóxido	95	98
Oxacarbazepina (sin. Oxacarbamazepina)	84	84
Fenitoína	94	96
Carbamazepina	95	97
Padrão Interno	103	101

Precisão intra-ensaio:

A determinação da precisão intra-ensaio foi feita a partir da média de múltiplos preparos (n = 8) e determinação do analito na mesma amostra em três diferentes concentrações.

Analito	Coeficiente de variação (%), n = 8 (Conc. mg/l)		
Sultiam	2,9 (4,2)	0.9 (8,2)	1,7 (9,0)
Etossuximida	1,1 (27,5)	1,2 (44,6)	1,7 (61,8)
Zonisamida*	0,9 (9,1)	0,6 (21,6)	0,6 (50,9)
Primidona	0,5 (4,6)	1,2 (9,1)	1,5 (13,6)
Lamotrigina	1,4 (1,3)	1,7 (2,3)	1,2 (4,3)
10-Hidroxicarbamazepina	1,1 (3,4)	1,0 (7,0)	1,3 (12,9)
Fenobarbital	0,8 (11,3)	1,1 (17,4)	1,5 (21,9)
Carbamazepina-epóxido	1,1 (3,5)	1,0 (4,6)	1,4 (5,5)
Oxcarbamezapina	0,8 (3,7)	1,3 (7,2)	1,4 (13,9)
Fenitoína	2,1 (5,4)	2,4 (8,6)	1,5 (13,1)
Carbamazepina	2,0 (4,5)	1,0 (6,8)	1,4 (9,2)

*n = 10

Precisão inter-ensaio:

A determinação da precisão inter-ensaio foi feita a partir de três preparos e determinação da concentração do analito em quintuplicata em *pool* de soro em 20 diferentes séries de teste em três diferentes concentrações.

Analito	Coeficiente de variação (%), n = 100 (Concentração mg/L)		
Sultiam	3,3 (4,61)	3,6 (11,3)	2,9 (7,91)
Etossuximida	2,6 (45,9)	3,6 (84,9)	5,0 (117)
Zonisamida*	3,2 (12,5)	3,0 (40,5)	3,5 (26,8)
Primidona	3,6 (4,49)	3,2 (20,6)	4,0 (30,8)
Lamotrigina	5,7 (2,92)	4,8 (11,1)	4,3 (15,9)
10-Hidroxicarbamazepina	2,9 (7,55)	3,0 (24,7)	3,3 (16,3)
Fenobarbital	3,0 (9,47)	2,6 (39,0)	3,0 (48,9)
Carbamazepina-10,11-Epóxido	5,9 (2,00)	3,8 (5,59)	5,3 (8,16)
Oxcarbamezapina	5,6 (1,73)	5,0 (8,40)	5,1 (5,10)
Fenitoína	3,6 (4,86)	2,7 (19,9)	3,1 (30,5)
Carbamazepina	5,9 (4,91)	4,0 (14,9)	4,6 (20,4)

VALORES DE REFERÊNCIA

As seguintes faixas de referência para drogas antiepiléticas são encontradas na literatura:

Analito	Concentração (mg/l)
Carbamazepina	2 – 8 [7]
Carbamazepina-epóxido	0,2 – 2 [7]
Etossuximida	30 – 100 [7]
Lamotrigina	3 – 14 [7]
Fenobarbital	10 – 30 [7]
Fenitoína	10 – 20 [7, 9]
Primidona	4 – 12 [7]
Sultiam	0,5 – 12,5 [7]
Zonisamida	15 – 40 [8]
10-Hidroxicarbamazepina	13 – 30 [7]

Cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência para adaptar o método às características do tratamento e da monitoração terapêutica.

INTERFERENTES CONHECIDOS

Amostras contendo a droga antiepiléptica felbamato (faixa terapêutica de 10 – 100 mg/l) mostram uma forte interferência no tempo de retenção da primidona tanto no cromatograma HR quanto no FE.
Devido aos graves efeitos colaterais (vários casos de morte por anemia aplástica e falência hepática), o felbomato tem o uso limitado e é prescrito raramente.

No raro caso de combinação da primidona e sultiam o metabólito da primidona, 2-etil-2-fenilmalondiamida (PEMA) pode afetar a quantificação por sobreposição do pico.

Quando benzoato de sódio é administrado para o tratamento de hiperglicemia não-cetônica, a cromatografia com o método de alta-resolução (22000/HR) apresenta interferência de co-eluição com uma intensidade excedendo a do fenobarbital muitas vezes.

LITERATURA

1. Friedlander WJ, (1986) Who was 'the father of bromide treatment of epilepsy'? *Arch Neurol* **43**(5): 505-7.
2. Boenigk H.E., Lorenz J.H., Jürgens U.; Epilepsie 84, Einhorn-Presse Verlag GmbH, Reinbeck (1985).
3. May T., Stenzel E., Rambeck B. (1982) Notwendkeit einer individuellen Phenytoin-Dosierung: Einflüssen von Dosierung, physiologischen Faktoren und Comedikation auf die Phenytoin-Serumkonzentration bei erwachsenen stationären und ambulanten Epilepsie-Patienten. *Nevernarzt* **53**:291-296.
4. Rambeck B., May T., Jürgens U. (1987) Serum concentrations of carbamazepine and its epoxide and diol metabolites in epileptic patients: the influence of dose and comedication. *Ther Drug Monit* **9**:298-303.
5. Rambeck B., Sälke-Treumann A., May T., Boenigk H.E. (1990) Valproic acid-induced carbamazepine-epoxide toxicity in children and adolescent. *Eur Neurol* 30:79-83.

6. H. Greiling, A. M. Gressner, Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. Auflage, 1995, Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, ISBN 3-7945-1548-X.
7. Schulz M, Schmoldt A. (2003) Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* **58**(7): 447-474.
8. Clement HW, Fleischhaker C, Schulz E, (2006) Serum-Spiegel Bestimmung von Zonisamid, Chromsystems DIALOG 1/06, 5-6.
9. TIAFT reference blood level list of therapeutic and toxic substances, September 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 10350840118
SAC: sac@biosys.com.br – (21) 3907-2534 / 0800 015 1414
www.biosys.com.br