

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 Instrução para a Análise em HPLC de
Drogas Antiepilépticas
Em Soro/Plasma

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

Número de artigo 22000/F

Número de artigo 22000/HR

CE

DROGAS ANTIEPILÉPTICAS EM SORO/PLASMA POR HPLC
ANVISA 10350840118 (HIGH RESOLUTION)
ANVISA 10350840403 (FAST ELUTION)

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

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

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

Fabricado por: Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH
Am Haag 12
D-82166 Gräfelfing
Munique, Alemanha
Fone: +49 89 18930-0
Fax: +49 89 18930-199
www.chromsystems.de

Conteúdo

1	Informações para aquisição	3
2	Introdução.....	5
3	Sistema HPLC	7
3.1	Parâmetros do equipamento.....	7
3.2	Coluna HPLC.....	7
3.3	Intervalos de funcionamento.....	7
4	Separação Cromatográfica	8
5	Preparação da amostra	8
5.1	Coleta e armazenamento de amostras de pacientes	8
5.2	Reconstituição do padrão de calibração	9
5.3	Reconstituição dos controles	9
5.4	Procedimento de preparação das amostras.....	9
5.5	Estabilidade das amostras preparadas	10
6	Aquisição e avaliação de dados.....	10
6.1	Calibração do sistema de análise	10
6.2	Quantificação por Padrão Interno	10
7	Controle de Qualidade	11
8	Nível terapêutico das drogas antiepiléticas	11
9	Fatores de conversão	11
10	Armazenamento e validade dos reagentes	12
11	Descarte de resíduos.....	12
12	Exemplos de cromatogramas	13
12.1	Cromatograma de eluição rápida de um padrão de calibração em soro.....	13
12.2	Cromatograma de alta resolução de um padrão de calibração HR em soro	14
12.3	Cromatograma de alta resolução de um padrão de calibração HR em soro, com adição de Zonisamida.....	14
13	Interferentes conhecidos.....	15
14	Problemas e Soluções	15
15	Literatura	16
Apêndice I	Informações sobre substâncias perigosas	17
Apêndice II	Notas sobre cálculo manual.....	18
Apêndice III	Dados de Validação.....	19

1 Informações para aquisição

O artigo 22000/F é para análise de drogas antiepiléticas no soro/plasma por ELUIÇÃO RÁPIDA em HPLC, para 100 análises.

O artigo 22000/HR é para análise de drogas antiepiléticas no soro/plasma por ALTA RESOLUÇÃO em HPLC, para 100 análises.

Para monitoramento específico das drogas antiepiléticas: etossuximida, zonisamida, primidona, fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, trileptal e sultiame em soro/plasma. Adicionalmente, os metabólitos carbamazepina-10,11-epóxido e 10-hidroxi-carbamazepina são analisados.

Nº do artigo	Produto	
	Componentes do Kit:	
	Fase móvel	1000 mL
	Reagente de precipitação	1 x 5 mL
	Padrão Interno	1 x 15 mL
	Padrão de Calibração em soro (liof.)	5 x 1 mL
	Solução tampão de estabilização	1 x 10 mL
	Colunas de preparação de amostras	100 unidades
	Componentes disponíveis separadamente:	
22001/F	Fase móvel, ELUIÇÃO RÁPIDA	1000 mL
22001/HR	Fase móvel, ALTA RESOLUÇÃO	1000 mL
22003	Reagente de precipitação	5 mL
22004	Padrão Interno	15 mL
22005	Padrão de calibração em soro (liofilizado)	5 x 1 mL
22005/HR	Padrão de calibração de ALTA RESOLUÇÃO	5 x 1 mL
22006	Tampão de estabilização	10 mL
3006	Colunas de preparação de amostras	100 unidades
	Acessórios	
22100/F	Coluna para HPLC. ELUIÇÃO RÁPIDA. Equilibrada, com cromatograma teste.	1 peça
22100/HR	Coluna para HPLC. ALTA RESOLUÇÃO. Equilibrada, com cromatograma teste.	1 peça
15009	Pré-filtro em PEEK, 5 µm	5 peças
15010	Suporte para pré-filtro em PEEK	1 peça
18001	Suporte para cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
18022/FHR	Cartucho de pré-coluna 4/10	1 peça
	Calibrador e controles Chromsystems para medicamentos antiepiléticos em soro/plasma	
22005	Padrão de Calibração em soro (liof.) (carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, etossuximida, lamotrigina, fenobarbital, fenitoína, primidona)	5 x 1 mL
	Padrão de Calibração em soro (liof.) (carbamazepina, carbamazepina-10,11-epóxido, etossuximida, lamotrigina, oxcarbazepina, 10-hidroxicarbamazepina, sultiame, fenobarbital, fenitoína, primidona)	5 x 1 mL
0060	Controle de drogas antiepiléticas em soro, nível I	10 x 2 mL
0160	Controle de drogas antiepiléticas em soro, nível I	10 x 5 mL

0070	Controle de drogas antiepiléticas em soro, nível II	10 x 2 mL
0170	Controle de drogas antiepiléticas em soro, nível II	10 x 5 mL
0080	Controle de drogas antiepiléticas em soro, nível III	10 x 2 mL
0180	Controle de drogas antiepiléticas em soro, nível III	10 x 5 mL
0166	Controle de drogas antiepiléticas em soro, Bi-nível (I+II)	2 x 5 x 5 mL
0188	Controle de drogas antiepiléticas em soro, Tri-nível (I+II+III) –	2 x 3 x 5 mL 1 x 4 x 5 mL
Calibrador e controles Chromsystems para trileptal®, zonisamida em soro/plasma		
28005	Padrão de calibração em soro (liof.) (oxcarbamazepina, 10-hidroxi-carbamazepina, zonisamida)	5 x 1 mL
0063	Controle em soro, bi-nível (I+II) (oxcarbamazepina, 10-hidroxi-carbamazepina, zonisamida)	2 x 5 x 2 mL
Calibrador e controles Chromsystems para sultiam, lamotrigina em soro/plasma		
29004	Padrão de Calibração em soro, bi-nível (I+II) (sultiam, lamotrigina, carbamazepina10, 11-epóxido, desmetilmesuximida)	5 x 1 mL
0064	Controle em soro, bi-nível (I+II) (sultiam, lamotrigina, carbamazepina10, 11-epóxido, desmetilmesuximida)	2 x 5 x 2 mL

2 Introdução

A epilepsia é caracterizada pela ocorrência repetitiva crônica de ataques espontâneos, sem uma situação desencadeante imediata para ataques individuais. Vários tipos diferentes de ataques têm sido classificados, cada um requerendo um tratamento específico. Apesar de a predisposição genética variar enormemente para essa doença, a possibilidade de sofrer de epilepsia existe em toda a população. Fatores exógenos podem ocorrer nos períodos pré, peri e pós-natal (acidente, trombose, tumor, meningite, etc). Cerca de 0,5 -0,6% da população na Alemanha sofre de epilepsia. Para a maioria desses pacientes, o tratamento com medicação anticonvulsivante pode reduzir a incidência das crises ou até mesmo permitir que o paciente fique livre delas. Geralmente, o pré-requisito para o efeito terapêutico positivo das drogas antiepilépticas é a colaboração do paciente através da aderência ao tratamento médico.

Nos meados do século XIX descobriu-se o efeito anticonvulsivante do brometo de potássio [1]. Subseqüentemente, os efeitos anticonvulsivantes de vários componentes orgânicos foram descobertos, dentre os quais o fenobarbital, primidona, etossuximida, fenitoína e a carbamazepina que se tornaram medicamentos padrões no tratamento da epilepsia. Em anos recentes, uma nova droga antiepiléptica, a lamotrigina, chegou ao mercado. Seu mecanismo de ação é baseado na estabilização de canais de sódio nas membranas neurais.

Por mais de 20 anos, o monitoramento regular das concentrações no sangue desses agentes antiepilépticos tem sido um importante componente da terapia. Além disso, há inúmeras razões para o monitoramento rotineiro dos níveis de drogas antiepilépticas no soro de pacientes:

1. Para garantir que o medicamento esteja sendo tomado regularmente pelo paciente (aderência).
2. Para garantir que os níveis das drogas estejam dentro da chamada “faixa terapêutica”. Uma vez que o tratamento da epilepsia perdura ao longo da vida, o monitoramento da medicação de uso contínuo é importante para evitar níveis associados a sérios efeitos colaterais ou toxicidade. Por outro lado, no caso de resistência à terapia, também é importante estabelecer se o nível da droga no plasma não se encontra muito baixo para exercer seu efeito anticonvulsivante.
3. Outras doenças e/ou medicamentos podem fazer com que a droga antiepiléptica esteja fora da faixa terapêutica desejada. Distúrbios funcionais dos rins têm grande influência no metabolismo das drogas antiepilépticas.
4. O monitoramento é especialmente importante nos casos de alteração da dosagem de drogas como a fenitoína, para qual a cinética do metabolismo é não-linear (Michaelis-Menten). Para esse agente, é absolutamente essencial o ajuste de dosagens individuais para cada paciente visto que a “saturação do fígado” pode ser atingida e aumentos pequenos na dose como $\frac{1}{4}$ ou $\frac{1}{2}$ comprimido, podem causar elevações drásticas nos níveis de fenitoína [3].

Análise cromatográfica de drogas antiepilépticas

Até recentemente, os métodos imunológicos eram os mais empregados na rotina dos laboratórios clínicos para medir a concentração de drogas antiepilépticas no soro. A vantagem desses métodos está na simplicidade e relativa velocidade, contudo, uma grave desvantagem é a freqüente especificidade inadequada dos anticorpos com os metabólitos das drogas e com as próprias drogas presentes no plasma.

Apesar dos laboratórios de pesquisas farmacológicas virem utilizando há muito tempo os procedimentos cromatográficos para a determinação de drogas antiepilépticas, graças ao desenvolvimento de kits analíticos completos, este método está sendo crescentemente utilizado nos laboratórios clínicos. Devido à simplicidade no preparo da amostra e à separação de metabólitos termolábeis, a análise por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) tem se mostrado especialmente confiável para a determinação de drogas antiepilépticas no soro. Isto é particularmente verdadeiro no caso da carbamazepina-10,11-epóxido (CBZ-EPO), um metabólito da carbamazepina (CBZ) que provavelmente contribui na ação terapêutica e efeitos colaterais da CBZ. Embora a concentração de CBZ no plasma seja substancialmente maior do que a concentração do CBZ-EPO nos casos de mono-medicação, a concentração do metabólito pode exceder claramente a da CBZ nos casos de co-medicação [4]. Isso pode resultar em efeitos colaterais substanciais, particularmente em crianças [5].

Os outros principais metabólitos da carbamazepina, o 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina (DIOL) e o 2-etil-2-fenil-malondiamida (PEMA), que, junto com o fenobarbital, aparecem durante a transformação metabólica da primidona, não são de importância direta na terapia da epilepsia. Entretanto, um aumento significativo na concentração de PEMA (2-5 vezes maior do que a da primidona) pode indicar um distúrbio funcional dos rins. De qualquer forma, a análise por HPLC deve garantir que o metabólito PEMA é separado adequadamente da primidona e da etossuximida, já que a presença destes no plasma é inevitável nas terapias com primidona ou carbamazepina.

Resumo

Como regra geral, o tratamento com drogas antiepiléticas implica numa medicação contínua durante toda a vida do paciente. É absolutamente essencial checar regularmente se as concentrações das drogas anticonvulsivantes no sangue estão na faixa terapêutica desejada. Tanto a superdosagem, que pode levar a sérios efeitos colaterais, quanto à subdosagem, na qual a concentração terapêutica efetiva da droga não é atingida, devem ser evitadas.

A relevância clínica dos metabólitos da carbamazepina tanto na ação terapêutica quanto nos efeitos colaterais tem sido reconhecida há algum tempo. Os métodos imunológicos aplicados até hoje na determinação dos anticonvulsivantes não podem ser utilizados para determinar a carbamazepina-10,11-epóxido já que não existem anticorpos comercialmente disponíveis que sejam seletivos a este metabólito. Além disso, em inúmeros métodos baseados na ligação com anticorpos, a reatividade-cruzada entre anticorpos e metabólitos interfere na determinação da carbamazepina, e no caso de altas concentrações do epóxido, os resultados na concentração da carbamazepina são consideráveis.

Por outro lado, com o HPLC, tanto a carbamazepina quanto a carbamazepina-10,11-epóxido podem ser cromatografadas e quantificadas com confiabilidade e precisão, mesmo na presença de outras drogas antiepiléticas.

Uso Específico:

Este kit de reagentes Chromsystems destina-se ao monitoramento, em soro ou plasma, das drogas antiepiléticas etossuximida, primidona, fenobarbital, fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, trileptal e sultiam. Em adição, os metabólitos carbamazepina-10,11-epóxido, 10,11-dihidro-10,11-dihidroxicarbamazepina, 10-OH-carbazepina e 2-etil-2-fenilmalondiamida (PEMA) são analisados.

Princípio do kit de reagentes:

O preparo da amostra é baseado numa simples, mas eficiente etapa de precipitação. Para quantificar os analitos, a cromatografia de alta velocidade (ELUIÇÃO RÁPIDA - FE, em menos de 5 minutos) e alternativamente a cromatografia de ALTA RESOLUÇÃO (HR) estão disponíveis.

3 Sistema HPLC

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no capítulo 10.

3.1 Parâmetros do equipamento

Para a análise das drogas antiepilépticas é necessário um simples sistema isocrático de HPLC, equipado com bomba, injetor e detector UV.

Alternativamente podem ser realizadas cromatografias de ELUIÇÃO RÁPIDA (em menos de 5 minutos) ou de ALTA RESOLUÇÃO. Como **solução para limpeza da agulha do injetor**, água destilada com 10% de metanol é recomendada. O uso de termostato na coluna pode evitar variações de temperatura e melhorar a estabilidade da separação.

Ajustes do equipamento:

Amostrador automático: Volume de injeção:	20µl
Tempo de corrida:	ELUIÇÃO RÁPIDA: 5 min aprox. ALTA RESOLUÇÃO: 22 min aprox.
Fluxo:	ELUIÇÃO RÁPIDA: 2,0mL/min ALTA RESOLUÇÃO: 1,2mL/min
Temperatura da coluna:	Ambiente (aproximadamente 25°C)
Detector UV:	Comprimento de onda de 204nm
Solução de limpeza de agulha para o injetor:	água/metanol = 90/10

3.2 Coluna HPLC

A coluna para HPLC, utilizada na análise das drogas antiepilépticas, 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 1,2mL/min (ALTA RESOLUÇÃO) é de aproximadamente 160 (± 15) bar. Com um fluxo de 2,0mL/min (ELUIÇÃO RÁPIDA), a pressão é de aproximadamente 170 (± 15) 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 uma pré-coluna (nº art. 18001 e 18022).**

Antes de começar uma análise:

1. Antes de instalar a coluna no sistema de HPLC, lavar o sistema com aproximadamente 50 mL de água/metanol (50:50), seguidos de 30 mL de fase móvel, em um fluxo de 1,2 mL/min ou 2,0 mL/min; injetar água grau HPLC e fase móvel várias vezes no sistema cromatográfico.
2. Instalar a coluna e equilibrar o sistema com um fluxo de 1,2 mL/min ou 2,0 mL/min durante 15 - 20min, até que a linha de base esteja estabilizada.
3. Injetar o padrão de calibração previamente preparados 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. Shut-down

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 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 (50:50).

4 Separação Cromatográfica

Tempo de retenção das substâncias analisadas e do padrão interno nas separações cromatográficas:

Analitos	Eluição Rápida	Alta Resolução
Sultiam	-	3,8 min
Etossuximida	1,2 min	4,2 min
Zonizamida	1,3 min	4,6 min
Primidona	1,4 min	5,1 min
Lamotrigina	1,8 min	6,9 min
10-OH-Carbamazepina	2,0 min	7,6 min
Fenobarbital	2,0 min	8,0 min
Carbamazepina-epóxido	2,3 min	9,0 min
Oxcarbazepina (sin. oxcarbamazepina)	2,7 min	11,1 min
Padrão interno	3,5 min	14,5 min
Fenitoína	4,1 min	17,9 min
Carbamazepina	4,8 min	19,4 min

Em amostras de pacientes submetidos à terapia com carbamazepina, o metabólito 10,11-dihidro-10,11-dihidrocarbamazepina (DIOL), terapeuticamente inativo, poderá aparecer adicionalmente em 6.0 min e 1.6 min nos cromatogramas Alta Resolução e de Eluição Rápida respectivamente. Contudo, este pico é cromatograficamente bem separado dos picos de outras drogas antiepiléticas.

No caso de uma combinação muito rara de primidona e sultiam, o metabólito 2-etil-2-fenilmalondiamida (PEMA) pode afetar a quantificação do Sultiam devido à sobreposição de picos.

Se for usado um novo lote da fase móvel ou se a coluna HPLC for repostada, os tempos de retenção podem sofrer pequenas alterações.

5 Preparação da amostra

Atenção: Ao utilizar os reagentes, favor verificar as informações de segurança contidas no capítulo 10.

5.1 Coleta e armazenamento de amostras de pacientes

Deverá ser utilizado soro ou plasma para a análise. As amostras devem ser mantidas refrigeradas durante o transporte. Os seguintes tempos são recomendados para a coleta das amostras:

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

Esses tempos são recomendados somente para terapias controladas. Na suspeita de qualquer abuso, analisar o sangue imediatamente.

(Ref: H. Greiling, A. M. Gressner: Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie (1995) Schattauer, Stuttgart).

Nota: É da responsabilidade de cada laboratório utilizar todas as referências disponíveis e/ou os seus próprios estudos para determinar critérios de estabilidade específicos para o seu laboratório.

5.2 Reconstituição do padrão de calibração

Os padrões de calibração (nº art. 22005, 22005/HR, 28005, 29004) são rastreáveis a substância de referência adquirida de fornecedor certificado. Após a reconstituição o padrão de calibração é submetido a todo o procedimento de preparação 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 1,0 mL de água destilada para o frasco.** Deixar o frasco em repouso à temperatura ambiente por aproximadamente 10 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 um pool de soro humano testado e considerado não reativo contra anticorpos HIV 1+2, DNA de HIV, HCV e HBV (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e por TPHA. Devido ao facto de não existir nenhum método de ensaio que dê garantia absoluta de que os produtos que contêm materiais de origem humana estarão isentos de agentes infecciosos, deve ser tido em conta um possível perigo de infecção. Este produto também pode conter agentes desconhecidos ou outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Recomendamos, portanto, considerar todos os produtos que contenham material de origem humana como potencialmente infecciosos. Como consequência, tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do padrão reconstituído:

O padrão reconstituído é estável por até 2 semanas 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 a -18°C.

5.3 Reconstituição dos controles

Depois de reconstituídos, os controles (nº art. 0060, 0160, 0070, 0170, 0080, 0180, 0166, 0188, 0063 e 0064) devem ser submetidos a todo o procedimento de preparação das amostras, como se fossem uma amostra de paciente. **Para reconstituir o controle liofilizado, pipetar exatamente 2,0 ml ou 5,0 mL (favor ver o rótulo) 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 um pool de soro humano testado e considerado não reativo contra anticorpos HIV 1+2, DNA de HIV, HCV e HBV (PCR), antígeno HBs, anticorpos HBc, anticorpos HCV e por TPHA. Devido ao facto de não existir nenhum método de ensaio que dê garantia absoluta de que os produtos que contêm materiais de origem humana estarão isentos de agentes infecciosos, deve ser tido em conta um possível perigo de infecção. Este produto também pode conter agentes desconhecidos ou outros patógenos para os quais não existem testes aprovados. Recomendamos, portanto, considerar todos os produtos que contenham material de origem humana como potencialmente infecciosos. Como consequência, tenha o mesmo cuidado no manuseamento deste produto e no manuseamento de amostras de pacientes potencialmente infecciosas.

Estabilidade do controle reconstituído:

O controle reconstituído é estável por até 2 semanas 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 a -18°C.

5.4 Procedimento de preparação das amostras

1. Num frasco de reação pipetar:
100 µL de soro/plasma (calibrador, controles, amostras)
+ 150 µL de Padrão Interno, homogeneizar brevemente
2. Adicionar 50 µL do Reagente de Precipitação, agitar por 1 min (vórtex)
3. Centrifugar por 10 – 15 min a 13.000 rpm
4. Misturar 100 µL do sobrenadante com 100 µL do Tampão de Estabilização

5. Injetar 20 µL da mistura no sistema HPLC.
6. 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 podem ser mantidas refrigeradas (2° a 8°C) por aproximadamente 1 semana. Para períodos maiores de armazenamento (maiores de 14 dias), congelar e armazenar a -18°C.

6 Aquisição e avaliação de dados

6.1 Calibração do sistema de análise

As concentrações de drogas antiepiléticas 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:

Pico nº	Substância analisada	ELUÇÃO RÁPIDA	ALTA RESOLUÇÃO	Concentração
1	Sultiam	-	3,8 min	Folheto de informação
2	Etossuximida	1,2 min	4,2 min	Folheto de informação
3	Primidona	1,4 min	5,1 min	Folheto de informação
4	Lamotrigina	1,8 min	6,9 min	Folheto de informação
5	10-OH-Carbazepina	2,0 min	7,6 min	Folheto de informação
6	Fenobarbital	2,0 min	8,0 min	Folheto de informação
7	Cabamazepina-10,11-epóxido	2,3 min	9,0 min	Folheto de informação
8	Oxcarbazepina (sin. oxcarbamazepina)	2,7 min	11,1 min	Folheto de informação
9	Padrão Interno	3,5 min	14,5 min	1
10	Fenitoína	4,1 min	17,9 min	Folheto de informação
11	Carbamazepina	4,7 min	19,4 min	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 (nº art. 0060, 0160, 0070, 0170, 0080, 0180, 0166, 0188, 0063, 0064).

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 antiepiléticas

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

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 como o metabólito ativo do Trileptal®	13 – 30 [7]

9 Fatores de conversão

A seguinte tabela mostra os fatores de conversão da unidade de concentração de mg/L para µmol/L e de µL para mg/L:

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

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 transportes dos reagentes:

Produto	Condição
Kit de Reagente	Temperatura ambiente

Desembale imediatamente os reagentes após o transporte e armazene-os individualmente conforme indicado abaixo:

Condições de armazenamento dos reagentes:

Produto	Condição
Fase móvel	Temperatura ambiente
Padrão Interno	2 a 8°C
Reagente de precipitação	Temperatura ambiente
Solução tampão de estabilização	2 a 8°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

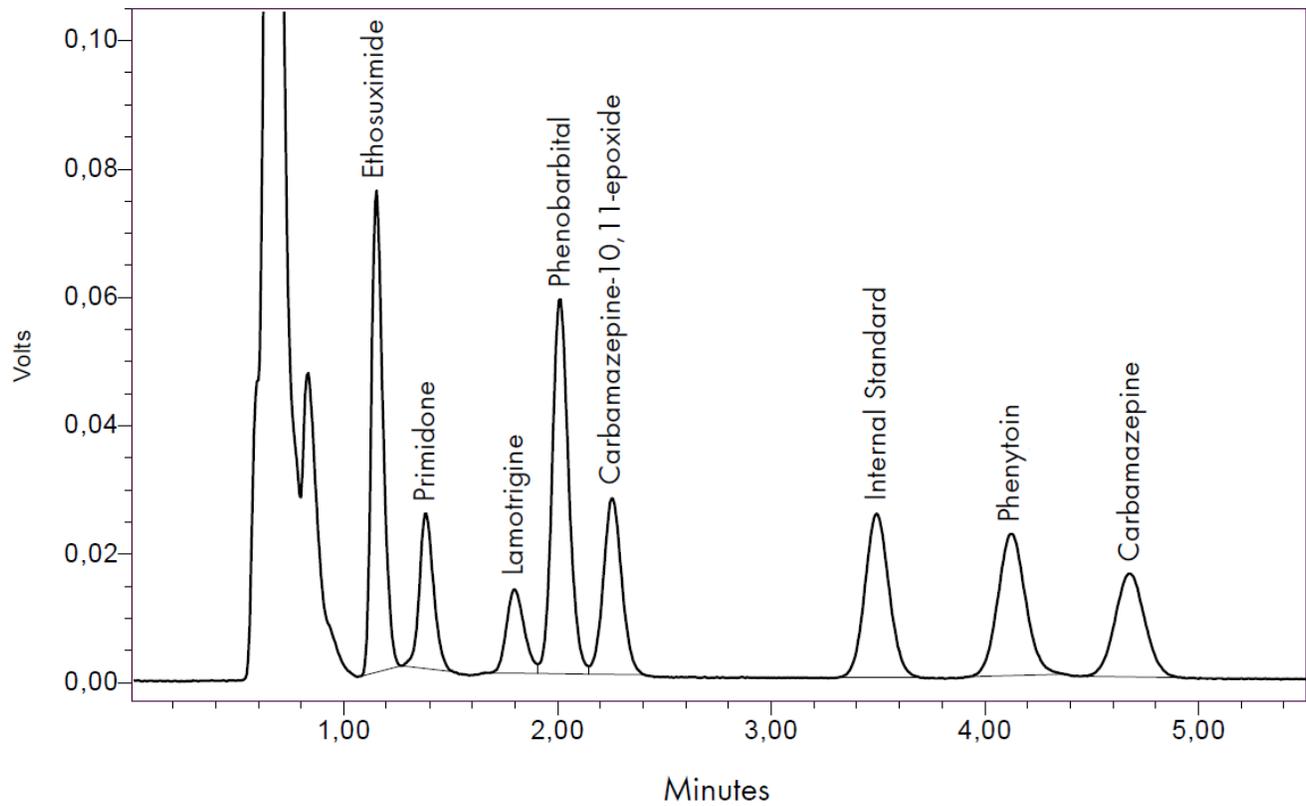
As Fases Móveis, o Reagente de Precipitação e o Padrão Interno contêm solventes orgânicos. Dispor os resíduos do produto em um recipiente para solventes orgânicos livres de halogênio.

Os resíduos de amostras de pacientes e amostras preparadas, bem como controles e calibradores devem ser recolhidos e eliminados como resíduos potencialmente infecciosos.

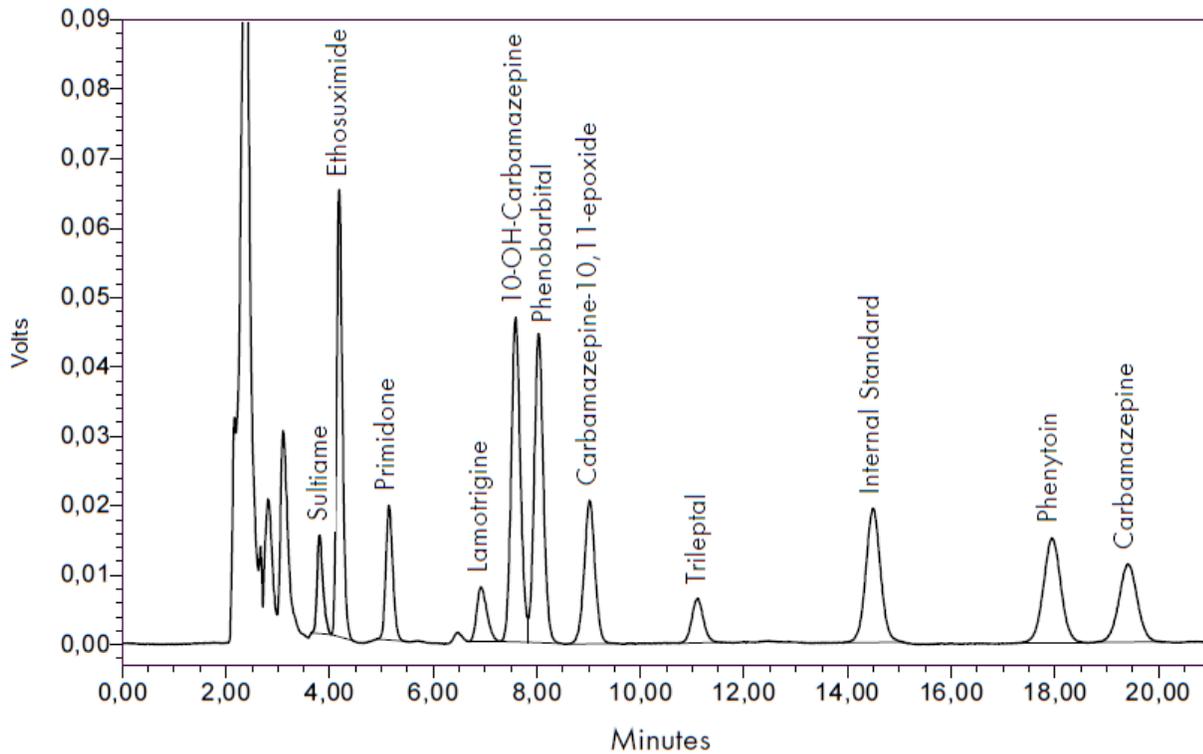
As soluções mencionadas não devem ser eliminadas juntamente com o lixo doméstico. Não circule no abastecimento de água principal. Descarte em conformidade com as diretrizes 2008/98/EC sobre Resíduos e com os requisitos nacionais e locais. Os recipientes de resíduos devem ser armazenados de forma adequada e somente o acesso permitido a pessoas autorizadas.

12 Exemplos de cromatogramas

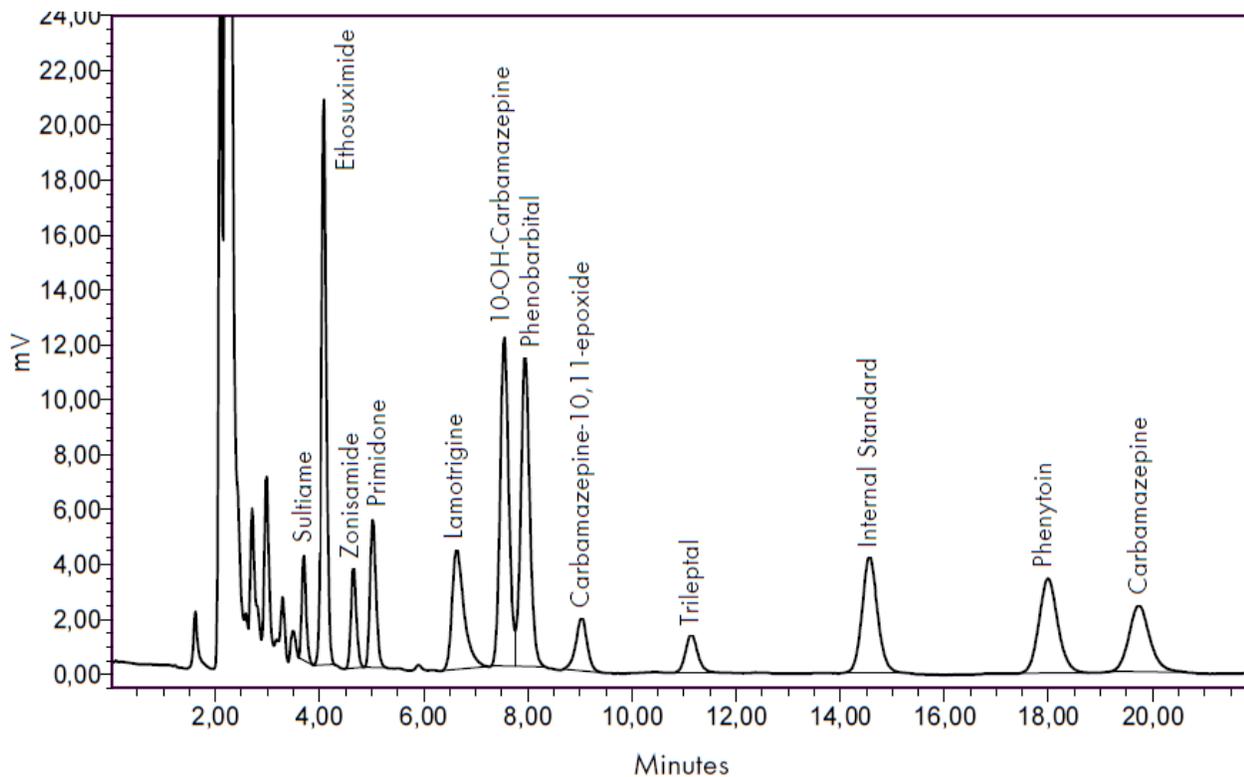
12.1 Cromatograma de eluição rápida de um padrão de calibração em soro



12.2 Cromatograma de alta resolução de um padrão de calibração HR em soro



12.3 Cromatograma de alta resolução de um padrão de calibração HR em soro, com adição de Zonisamida



13 Interferentes conhecidos

Nota:

- Amostras contendo o medicamento antiepiléptico felbamato (por exemplo, Felbatol®, faixa terapêutica 10–100 mg/l) mostram uma interferência grave no tempo de retenção da primidona no cromatograma HR e FE. Devido a efeitos colaterais graves (vários casos de morte por anemia aplásica e insuficiência hepática), o felbamato, entretanto, tem aprovação limitada e raramente é prescrito.
- No caso da combinação muito rara de primidona e sultiame, o metabolito da primidona 2-etil-2-fenilmalondiamida (PEMA) pode afetar a quantificação do sultiame por sobreposição de picos.
- Quando o benzoato de sódio é administrado para o tratamento da hiperglicinemia não cetótica, a cromatografia com o Método de Alta Resolução (22000/HR) apresenta a interferência coeluída com uma intensidade que excede muitas vezes a do Fenobarbital. O Método de Eluição Rápida (22000/F) não é afetado por esta interferência.

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
Picos com cauda (Tailing)	Sistema de injeção contaminado	Limpar com metanol ou injetar fase móvel 10x
	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
	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
Alta pressão na coluna	Pré-coluna envelhecendo	Trocar o cartucho da pré-coluna

15 Literatura

1. Friedlander WJ. (1986) Who was 'the father of bromide treatment of epilepsy'? Arch Neurol 43(5): 505-7.
2. Boenigk HE, Lorenz JH, Jürgens U. Epilepsie 84, Einhorn-Press Verlag GmbH, Reinbeck (1985).
3. May T, Stenzel E, Rambeck B. (1982) Notwendigkeit einer individuellen Phenytoin-Dosierung: Einflüsse von Dosierung, physiologischen Faktoren und Comedikation auf die Phenytoin-Serumkonzentration bei erwachsenen stationären und ambulanten Epilepsie-Patienten. Nervenarzt 53: 291-96.
4. Rambeck B, May TW, 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 TW, Boenigk HE. (1990) Valproic acid-induced carbamazepine-epoxide toxicity in children and adolescents. Eur Neurol 30: 79-83.
6. Greiling H, Gressner AM. Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Aufl., Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1995).
7. Schulz M, Schmoltdt A. (2003) Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. Pharmazie 58(7): 447-74.
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

Apêndice I Informações sobre substâncias perigosas

As seguintes informações devem ser observadas e as respectivas medidas de segurança deverão ser adotadas. Maiores informações podem ser obtidas nos respectivos folhetos de segurança dos materiais (www.chromsystems.de) ou mediante solicitação.

Produto	Risco
Fase Móvel (Rápida eluição) (artigo 22001/F)   	Perigo H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por ingestão, contato com a pele ou inalação. H370 Provoca danos aos órgãos. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Proibido fumar. P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P302+P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com bastante água e sabão. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.
Fase Móvel (Alta Resolução) (artigo 22001/HR)   	Perigo H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por ingestão, contato com a pele ou inalação. H319 Provoca irritação ocular grave. H370 Provoca danos aos órgãos. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Proibido fumar. P241 Utilize equipamento eléctrico/de ventilação/de iluminação à prova de explosão. P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P302+P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com bastante água e sabão. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.
Reagente de precipitação (artigo 22003)  	Perigo H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico por ingestão, contato com a pele ou inalação. H319 Provoca irritação ocular grave. H370 Provoca danos aos órgãos. H412 Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção

	<p>ocular/proteção facial. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Proibido fumar. P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P302+P352 SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com bastante água e sabão. P403+P233 Armazenar em local bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.</p>
<p>Padrão Interno (artigo 22004)</p>  	<p>Perigo H225 Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo por ingestão, contacto com a pele ou inalação. H319 Provoca irritação ocular grave.</p> <p>P280 Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. P210 Manter afastado do calor, superfícies quentes, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Proibido fumar. P241 Utilize equipamento eléctrico/de ventilação/de iluminação à prova de explosão. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas estáticas.</p>
<p>Esses componentes não são classificados como perigosos de acordo com a legislação da União Europeia: Padrões de calibração de soro (artigos 22005, 22005/HR, 28005, 29004) Tampão de estabilização (artigo 22006) Controles de soro (artigos 0060, 0160, 0070, 0170, 0080, 0180, 0166, 0188, 0063, 0064)</p>	

Apêndice II Notas sobre cálculo manual

Para o cálculo manual, os seguintes dados são requeridos:

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

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

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

Área/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:

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

Apêndice III Dados de Validação

Para verificar a linearidade e validar o método, as amostras de soro foram fortificadas com quantidades definidas de medicamentos antiepiléticos. Múltiplas alíquotas destas preparações foram submetidas ao procedimento de preparação.

Apêndice IIIa:

Dados determinados com cromatografia de ALTA RESOLUÇÃO

Recuperação

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação das curvas de calibração de amostras de soro/plasma enriquecidas e soluções padrão diluídas. A tabela a seguir mostra as taxas de recuperação das substâncias individuais:

Analito	Taxas de recuperação sérica (%)	Taxas de recuperação plasmática (%)
Sultiam	85	88
Etossuximida	99	101
Zonisamida	88	89
Primidona	95	96
Lamotrigina	91	94
10-Hidroxycarbamazepina	85	86
Fenobarbital	95	97
Carbamazepina-epóxido	95	98
Oxcarbamazepina	84	84
Fenitoína	94	96
Carbamazepina	95	97
Padrão Interno	103	101

Linearidade/ limite de quantificação

A linearidade foi determinada aumentando as amostras de soro em vários intervalos. O limite inferior de quantificação foi avaliado utilizando diluições pré-definidas de um Soro Controle Nível I (0060, 0063/I, 0064/I). O método mostra-se linear desde o limite de quantificação designado até o limite superior.

Analito	Limite de quantificação (mg/L)	Limite linearidade (mg/L)
Sultiam	0,7	50
Etossuximida	4,5	250
Zonisamida	0,3	100
Primidona	0,3	40
Lamotrigina	0,3	30
10-Hidroxycarbamazepina	2,0	40
Fenobarbital	0.6	150
Carbamazepina-epóxido	0,2	40
Oxcarbamazepina	0,6	50
Fenitoína	0,3	50
Carbamazepina	0,3	50

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.

Precisão intra-ensaio (n = 8)	Coefficiente de variação (%) / (Concentração 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-Hidroxycarbamazepina	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)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão interensaio foi realizada limpando amostras de três conjuntos de soro cinco vezes e determinando as concentrações do analito em 20 séries de testes diferentes:

Precisão inter-ensaio (n = 20)	Coefficiente de variação (%) / (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	3,1 (12,5)	3,0 (49,5)	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-Hidroxycarbamazepina	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-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)

Apêndice IIIb:**Dados determinados com cromatografia de RÁPIDA ELUIÇÃO****Recuperação**

A recuperação analítica foi determinada a partir da inclinação das curvas de calibração de soro enriquecido, amostras de plasma e soluções padrão diluídas. A tabela a seguir mostra as taxas de recuperação das substâncias individuais:

Analito	Taxas de recuperação sérica (%)	Taxas de recuperação plasmática (%)
Etossuximida	106	107
Primidona	111	109
Lamotrigina	111	111
Fenobarbital	107	106
Carbamazepina-epóxido	109	108
Fenitoína	111	110
Carbamazepina	112	110
Padrão Interno	107	114

Linearidade/ limite de quantificação

A linearidade foi determinada aumentando as amostras de soro em vários intervalos. O limite inferior de quantificação foi avaliado utilizando diluições pré-definidas de um Soro Controle Nível I (0060). O método mostra-se linear desde o limite de quantificação designado até o limite superior.

Analito	Limite de quantificação (mg/L)	Limite linearidade (mg/L)
Etossuximida	2,7	250
Primidona	1,0	40
Lamotrigina	0,2	30
Fenobarbital	0,6	150
Carbamazepina-epóxido	0,2	40
Fenitoína	0,5	50
Carbamazepina	0,3	50

Precisão intra-ensaio

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

Precisão intra-ensaio (n = 10)	Coeficiente de variação (%) / (Concentração mg/L)		
Etossuximida	2,6 (41,7)	1,9 (86,2)	2.4 (103)
Primidona	2,1 (3,82)	2,1 (16,1)	2.5 (24.6)
Lamotrigina	2,4 (2,21)	1,9 (8,44)	4.0 (11.8)
Fenobarbital	2,3 (8,59)	1,9 (38,3)	2.3 (47.1)
Carbamazepina-epóxido	2,2 (1,65)	2,4 (4,78)	2.3 (6.79)
Fenitoína	2,6 (4,69)	2,1 (19,8)	3.3 (28.5)
Carbamazepina	2,4 (4,45)	2,8 (14,7)	2.5 (18.9)

Precisão inter-ensaio

A determinação da precisão interensaio foi realizada limpando amostras de três conjuntos de soro cinco vezes e determinando as concentrações do analito em 20 séries de testes diferentes:

Precisão inter-ensaio (n = 20)	Coeficiente de variação (%) / (Concentração mg/L)		
Etossuximida	5.2 (43.9)	4.0 (82.4)	4.4 (112)
Primidona	5.9 (4.66)	5.2 (18.5)	5.7 (28.4)
Lamotrigina	4.9 (2.60)	5.4 (10.2)	5.9 (14.8)
Fenobarbital	4.6 (8.84)	4.3 (37.9)	5.0 (47.5)
Carbamazepina-epóxido	4.3 (1.76)	5.9 (5.38)	5.5 (7.76)
Fenitoína	6.0 (4.44)	2.5 (18.9)	4.5 (29.2)
Carbamazepina	3.5 (4.33)	5.6 (14.5)	5.5 (19.9)

EC-Declaration of Conformity

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

We, as manufacturer

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

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

Nomenclature term: Other Central Nervous System TDM
Nomenclature code: 12-08-02-90-00
Classification: other product

Product name: **Antiepileptic Drugs in Serum/Plasma**
Controls: **AED Serum 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 ISO 18113-2, EN 980,
EN ISO 23640, EN 13641

Notified body: -

Munich, June 06, 2012



Michael Meier
Managing Director

Vers. 2.1