

# CHROMSYSTEMS

THERAPEUTISCHES DRUG MONITORING  
THERAPEUTIC DRUG MONITORING  
SUIVI THÉRAPEUTIQUE DE MÉDICAMENTS  
MONITORAGGIO DEI FARMACI  
MONITORIZACIÓN DE FÁRMACOS



Manual de instruções para a análise por HPLC

## **Benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em soro e plasma**

somente para uso diagnóstico *in vitro*

Número de artigo 49000



Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH está certificada de acordo com as normas ISO 9001 e ISO 13485 (incluindo MDSAP). Os produtos são produzidos e distribuídos de acordo com a Normativa 98/79/CE sobre produtos sanitários para diagnóstico in vitro.

A declaração de conformidade segundo a Diretriz 98/79/CE pode ser baixada no centro de downloads de nosso site.

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

**Importado e Distribuído por: Biosys Ltda.**

Rua Coronel Gomes Machado, 358, Centro, Niterói, RJ  
CEP: 24020-112  
Brasil

Tel.: (21) 3907 2534  
CNPJ: 02.220.795/0001-79  
[www.biosys.com.br](http://www.biosys.com.br)

**Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH Am**

Haag 12  
82166 Gräfelfing  
Alemanha

Tel.: +49 89 18930-0  
Fax: +49 89 18930-299  
[www.chromsystems.com](http://www.chromsystems.com)

Conteúdo	Página
1 <b>Informação sobre o pedido</b> .....	3
2 <b>Introdução</b> .....	6
3 <b>Sistema HPLC</b> .....	8
3.1 Equipamento e parâmetros do sistema .....	8
3.2 Coluna de HPLC .....	8
3.3 Pausas no funcionamento .....	9
4 <b>Separação cromatográfica</b> .....	9
5 <b>Preparo da amostra</b> .....	10
5.1 Coleta e armazenamento das amostras dos pacientes .....	10
5.2 Reconstituição dos padrões de calibração em plasma .....	10
5.3 Reconstituição dos controles .....	11
5.4 Processo de preparo de amostras .....	12
5.5 Estabilidade das amostras preparadas .....	12
6 <b>Registro de dados e cálculo</b> .....	13
6.1 Calibração do sistema de cálculo .....	13
6.2 Cálculo quantitativo com padrão interno .....	14
7 <b>Controle de qualidade</b> .....	14
8 <b>Faixas terapêuticas</b> .....	15
9 <b>Fatores de conversão</b> .....	16
10 <b>Armazenamento e validade dos reagentes</b> .....	17
11 <b>Descarte</b> .....	17
12 <b>Exemplos de cromatogramas</b> .....	19
12.1 Cromatograma dos benzodiazepínicos .....	19
12.2 Cromatograma dos antidepressivos tricíclicos .....	19
12.3 Cromatograma da amostra de um paciente .....	20
12.4 Cromatograma de um padrão de calibração de clozapina/ norclozapina com o padrão interno 49041 .....	20
13 <b>Interferências conhecidas</b> .....	21
14 <b>Problemas e soluções</b> .....	22
15 <b>Bibliografia</b> .....	23
<b>Anexo I: Preparo automatizado de amostras com Gilson® ASPEC™</b> .....	24
ASPEC™-Racks .....	24
Princípio do programa ASPEC™ .....	25
Requisitos de configuração .....	26
<b>Anexo II: Observações sobre as substâncias perigosas</b> .....	27
<b>Anexo III: Nota para o cálculo manual</b> .....	29
<b>Anexo IV: Dados de validação</b> .....	30

# 1 Informação sobre o pedido

Nº de pedido Produto

49000	<p><b>Kit de reagentes por HPLC</b>  <b>Benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em soro/ plasma</b>            Conteúdo do kit para 100 análises:</p>	
	Fase Móvel	1000 mL
	Padrão de Calibração em Plasma	5 x 2,5 mL (liof.)
	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 <i>Clean Up</i> de Amostra	2 x 50 unidades
49000/A1	<p><b>Kit de reagentes por HPLC</b>  <b>Benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em soro/ plasma</b>  <b>Aplicação por Gilson® ASPEC™ XL</b>            Conteúdo do kit para 100 análises:</p>	
	Fase Móvel	1000 mL
	Padrão de Calibração em Plasma	3 x 2,5 mL (liof.)
	Padrão Interno	11 mL
	Padrão de Equilíbrio 1	150 mL
	Padrão de Equilíbrio 2	150 mL
	Tampão de Lavagem	1000 mL
	Tampão de Eluição 1	75 mL
	Tampão de Eluição 2	75 mL
	Colunas de <i>Clean Up</i> com tampa DEC	100 unidades
49000/A5	<p><b>Kit de reagentes por HPLC</b>  <b>Benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em soro/ plasma</b>  <b>Aplicação por Gilson® ASPEC™ XL</b>            Conteúdo do kit para 500 análises:</p>	
	Fase Móvel	3 x 1000 ml
	Padrão de Calibração em Plasma	3 x 5 x 2,5 mL (liof.)
	Padrão Interno	5 x 10 mL
	Padrão de Equilíbrio 1	2 x 300 mL
	Padrão de Equilíbrio 2	2 x 300 mL
	Tampão de Lavagem	5 x 1000 mL
	Tampão de Eluição 1	300 mL
	Tampão de Eluição 2	300 mL
	Colunas de <i>Clean Up</i> com tampa DEC	5 x 100 unidades

49000/A9	<b>Kit de reagentes por HPLC</b> <b>Benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em soro/plasma</b> <b>Aplicação por Gilson® ASPEC™ XL</b> Conteúdo do kit para 1000 análises:	
	Fase Móvel	6 x 1000 mL
	Padrão de Calibração em Plasma Padrão Interno	5 x 5 x 2,5 mL (liof.) 100 mL
	Tampão de Equilíbrio 1	1000 mL
	Tampão de Equilíbrio 2	1000 mL
	Tampão de Lavagem	10 x 1000 mL
	Tampão de Eluição 1	2 x 300 mL
	Tampão de Eluição 2	2 x 300 mL
	Colunas de <i>Clean Up</i> de Amostra com tampa DEC	10 x 100 unidades

**Componentes disponíveis separadamente**

49001	Fase Móvel	1000 mL
49002	Fase Móvel	10 x 1000 mL
49003	Padrão de Calibração em Plasma (BZD + TCA)	5 x 2,5 mL (liof.)
49003/T	Padrão de Calibração em Plasma (BZD + TCA)	2,5 mL (liof.)
49031	Padrão de Calibração em Plasma (BZD)	5 x 2,5 mL (liof.)
49032	Padrão de Calibração em Plasma (TCA)	5 x 2,5 mL (liof.)
49004	Padrão Interno	10 mL
49004/A1	Padrão Interno	11 mL
49004/A9	Padrão Interno	100 mL
49041	Padrão Interno para a analítica da clozapina/norclozapina	10 mL
49005	Tampão de Equilíbrio 1	100 mL
49005/A1	Tampão de Equilíbrio 1	150 mL
49005/A5	Tampão de Equilíbrio 1	300 mL
49005/A9	Tampão de Equilíbrio 1	1000 mL
49006	Tampão de Equilíbrio 2	100 mL
49006/A1	Tampão de Equilíbrio 2	150 mL
49006/A5	Tampão de Equilíbrio 2	300 mL
49006/A9	Tampão de Equilíbrio 2	1000 mL
49007	Tampão de Lavagem	200 mL
49007/A1	Tampão de Lavagem	1000 mL
49009	Tampão de Eluição 1	40 mL
49009/A1	Tampão de Eluição 1	75 mL
49009/A5	Tampão de Eluição 1	300 mL
49010	Tampão de Eluição 2	40 mL
49010/A1	Tampão de Eluição 2	75 mL
49010/A5	Tampão de Eluição 2	300 mL
49008	Colunas de <i>Clean Up</i> de amostra	50 unidades
49008/A	Colunas de <i>Clean Up</i> de amostra com tampa DEC	100 unidades

**Acessórios**

49100	Coluna de HPLC, equilibrada e certificada com cromatograma	1 unidade
15009	Pré-filtro com revestimento de PEEK, 5 µm	5 unidades
15010	Carcaça de PEEK para o pré-filtro	1 unidade
17001	Suporte para cartuchos de pré-coluna 4/10	1 unidade
17049	Cartucho de pré-coluna 4/10	1 unidade

**Controles Chromsystems**

0051	Controle Bi-Nível (I + II) de Benzodiazepínicos em Plasma	2 x 5 x 5,0 mL (liof.)
0052	Controle Nível I de Benzodiazepínicos em Plasma	10 x 5,0 mL (liof.)
0053	Controle Nível II de Benzodiazepínicos em Plasma	10 x 5,0 mL (liof.)
0054	Controle Bi-Nível (I + II) de Antidepressivos Tricíclicos em Plasma	2 x 5 x 5,0 mL (liof.)
0055	Controle Nível I de Antidepressivos Tricíclicos em Plasma	10 x 5,0 mL (liof.)
0056	Controle Nível II de Antidepressivos Tricíclicos em Plasma	10 x 5,0 mL (liof.)
49033	Padrão de Calibração de Clozapina, Norclozapina em Plasma	5 x 2,5 mL (liof.)
0057	Controle Bi-Nível (I + II) de Clozapina, Norclozapina em Plasma	2 x 5 x 5,0 mL (liof.)
49034	Padrão de Calibração de Clobazam, Norclobazam em Plasma	5 x 2,5 mL (liof.)
0061	Controle Bi-Nível (I + II) de Clobazam, Norclobazam em Plasma	2 x 5 x 5,0 mL (liof.)
49035	Padrão de Calibração de Alprazolam, Trazodona em Plasma	5 x 2,5 mL (liof.)
0062	Controle Bi-Nível (I + II) de Alprazolam, Trazodone em Plasma	2 x 5 x 5,0 mL (liof.)

## 2 Introdução

Os **benzodiazepínicos (BZD)** são um grande grupo de drogas psicotrópicas com estrutura química semelhante, classificadas como tranquilizantes. Entre os mais conhecidos estão, por exemplo, o diazepam (Valium), o oxazepam e o clordiazepóxido (Librium). Devido à sua alta lipofilicidade, são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir rapidamente seu alvo (receptores) no sistema nervoso central após a absorção, onde potencializam a ação inibitória do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico). Além do efeito ansiolítico e sedativo (sonoro), os benzodiazepínicos também possuem propriedades antiagressivas, hipnóticas, relaxantes musculares e anticonvulsivantes; Alprazolam também é um antidepressivo. A ponderação de cada um dos efeitos varia dependendo do medicamento e da dose administrada. Ao contrário dos barbitúricos, os benzodiazepínicos, também usados como pílulas para dormir, têm menos efeitos colaterais na pressão arterial e na função pulmonar. Em caso de uso prolongado (a partir de cerca de 4 meses) é possível desenvolver dependência com sintomas de abstinência quando o tratamento é interrompido abruptamente, principalmente se tiverem sido administradas doses elevadas.

No sangue, os benzodiazepínicos estão presentes em grandes quantidades, ligando-se de forma inespecífica às proteínas plasmáticas. Seu metabolismo ocorre principalmente no fígado. Os metabólitos primários formados são compostos alquilados em N-1 e hidroxilados em C3. Finalmente, eles são eliminados na urina através dos rins na forma de ácido glucônico solúvel em água ou éster sulfato. A maioria dos metabólitos também são farmacologicamente ativos, em alguns casos eles são até mesmo o verdadeiro ingrediente ativo (por exemplo, clorazepato → nordiazepam). Os tempos de depuração plasmática variam amplamente, variando de algumas horas (oxacepam) a vários dias (clobazam). Frequentemente, a meia-vida dos metabólitos é maior que a da substância original (por exemplo, clordiazepóxido: algumas horas, nordiazepam: vários dias).

Os **antidepressivos tricíclicos (TCA)** são usados para tratar distúrbios psicológicos, como estados de ansiedade, síndrome da dor regional complexa e fobias. Seu efeito farmacológico consiste em impedir a absorção dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina na fenda sináptica. O antidepressivo tetracíclico maprotilina também deve ser incluído neste grupo, devido à sua ação: inibe especificamente a recaptação da norepinefrina. A **clozapina** é um neuroléptico tricíclico atípico, pois possui propriedades sedativas e antipsicóticas. Neste caso, o ingrediente ativo é uma inibição seletiva da recaptação da serotonina na sinapse.

Os TCAs são substâncias muito lipofílicas, após administração oral são rapidamente absorvidos no trato gastrointestinal. Antes de atingir seu verdadeiro alvo no cérebro, uma porção é metabolizada no fígado (efeito de primeira passagem). Neste processo, as etapas mais importantes são a N-desalquilação e a hidroxilação. Alguns dos metabólitos N-desmetil também têm aplicação terapêutica direta (por exemplo, desipramina = "desmetilimipramina").

Ao analisar regularmente o nível de benzodiazepinas e/ou ACT no plasma, o risco de sobredosagem pode ser reduzido e possíveis efeitos secundários melhor controlados. Além disso, desta forma a adesão do paciente ao tratamento é controlada e garantida, otimizando o sucesso da terapia.

### **Finalidade pretendida:**

O Kit de Reagentes Benzodiazepínicos e Antidepressivos Tricíclicos da Chromsystems é um produto de diagnóstico *in vitro* para uso em laboratórios clínicos para a análise quantitativa dos benzodiazepínicos alprazolam, bromazepam, clordiazepóxido, clobazam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, nitrazepam, nordiazepam e oxazepam e os antidepressivos tricíclicos amitriptilina, clomipramina, clozapina, desipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, norclomipramina, norclozapina, nordoxepina, nortriptilina e trimipramina em amostras de soro e plasma de pacientes em uso de HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). O kit é utilizado como teste em pacientes tratados com uma ou mais das substâncias citadas acima, para controlar o nível de medicamentos no sangue e ajustá-lo à faixa terapêutica.

**Princípio do kit de reagentes:**

Os benzodiazepínicos e os antidepressivos tricíclicos são extraídos do soro/plasma por processamento em uma coluna de extração em fase sólida. O Padrão Interno adicionado anteriormente contém, para cada um dos grupos de substâncias, uma substância padrão especialmente sintetizada, que não representa nenhum medicamento. Através de duas etapas de eluição seletiva, os benzodiazepínicos e os antidepressivos tricíclicos são obtidos em eluatos separados. Ambos os grupos de substâncias podem então ser medidos em um aparelho de HPLC, sem a necessidade de variar as condições cromatográficas (fase móvel, vazão, temperatura, regulação do detector UV), desta forma podem ser obtidas séries completas de análises de um dia para o outro.

Existe um padrão interno exclusivo para análise de **clozapina e norclozapina** (nº de artigo 49041), que permite reduzir a duração da análise em cerca de 11 minutos (ver cromatograma no capítulo 12).

Com este kit é possível determinar quantitativamente os seguintes medicamentos e metabólitos:

**Benzodiazepínicos**

Alprazolam, Bromazepam, Clordiazepam, Clobazam, Clonazepam, Diazepam, Flunitrazepam, Nitrazepam, Nordiazepam, Oxacepam

**Antidepressivos tricíclicos**

Amitriptilina, Clomipramina, Clozapina, Desipramina, Doxepina, Imipramina, Maprotilina, Norclomipramina, Norclozapina, Nordoxepina, Nortriptilina, Trimipramina.



## 3 Sistema HPLC

**Nota:** No manuseio dos reagentes, prestar atenção às observações sobre as substâncias perigosas mencionadas no anexo II.

### 3.1 Equipamento e parâmetros do sistema

Um sistema isocrático simples com bomba HPLC, injetor e detector UV é necessário para a análise de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos. Não utilize degaseificador (a vácuo), pois pode causar alterações na composição da fase móvel! Mantenha a fase móvel o mais fechada ou coberta possível também durante a operação. Utilize um forno de coluna termostaticado para evitar flutuações de temperatura e otimizar a estabilidade e reprodutibilidade da separação cromatográfica.

**Configurações do dispositivo:** (idênticas para benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos)

Injetor automático:	Volume de injeção 50 µl
Duração das análises:	28 min (benzodiazepínicos), 25 min (ATC)
Velocidade de fluxo:	0,6 mL/min
Temperatura da coluna:	Temperatura ambiente (25°C aprox.)
Detector UV:	Comprimento de onda de medição 210 nm
Fluído de limpeza da agulha para o injetor:	Água/acetoneitrila= 75/25

### 3.2 Coluna de HPLC

A coluna HPLC para análise de benzodiazepínicos/TCA é enviada equilibrada e testada, pronta para uso. Não deve ser lavada com outras soluções. A uma vazão de 0,6 mL/min, a contrapressão de uma nova coluna é de aproximadamente 130 bar e pode aumentar com o tempo. Desde que as separações sejam satisfatórias, o aumento da pressão não é relevante. Para aumentar a durabilidade, pode ser utilizado um pré-filtro PEEK (nº de artigo 15009 e 15010) ou uma pré-coluna (nº de artigo 17049 e 17001).

**Antes de iniciar a série de análises:**

1. Antes de montar a coluna de HPLC, lavar o sistema com 30 mL de fase móvel, com uma velocidade de fluxo de 1,5 mL/min.
2. A seguir, montar a coluna e equilibrar o sistema durante 15-20 min com uma velocidade de fluxo de 0,6 mL/min, até que se estabilize a linha de base.
3. Depois injetar várias vezes o padrão de calibração preparado até que dois cromatogramas sejam idênticos em seus tempos de retenção e alturas de pico.
4. Bombear então a fase móvel no circuito.

### 3.3 Pausas no funcionamento

Se o equipamento não for utilizado por no máximo três dias, a fase móvel deverá fluir em baixa velocidade (aproximadamente 0,2 mL/min), para evitar a cristalização de sais nas vedações do pistão da bomba HPLC. A coluna HPLC permanece conectada ao sistema. Para preservar a lâmpada, desconecte o detector. Para pausas mais longas na operação, desmonte a coluna HPLC. Não é necessário realizar procedimento de preservação ou lavagem da coluna. Mantenha a coluna na fase móvel (temperatura ambiente). Uma peça de conexão será montada em vez da coluna. Em seguida, lave o sistema HPLC com aprox. 50 ml de água/metanol = 80/20.

## 4 Separação cromatográfica

As seguintes tabelas contêm os tempos de retenção dos analitos a uma velocidade de fluxo de 0,6 mL/min.

#### Cromatograma do 1º eluato: Benzodiazepínicos

Substância	Tempo de retenção (min. aprox.)
Clordiacepóxido	5,0
Bromazepam	5,5
Padrão Interno	7,8
Oxacepam	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 2º eluato: Antidepressivos tricíclicos (incluída a clozapina)

Substância	Tempo de retenção (min. aprox.)
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 a análise de clozapina/norclozapina	9,6

A duração da separação cromatográfica é de cerca de 28 min (benzodiazepínicos), 25 min (ATC) ou 11 min (clozapina/norclozapina) (compare os cromatogramas no Capítulo 12). Oscilações nos tempos de retenção podem ser causadas por mudanças na temperatura. Ao usar um novo lote de fase móvel ou trocar a coluna de HPLC, os tempos de retenção podem ser minimamente alterados. Portanto, os tempos de retenção atuais devem ser definidos com base em um cromatograma de calibração.

## 5 Preparo da amostra

**Nota:** No manuseio dos reagentes, prestar atenção às observações sobre as substâncias perigosas mencionadas no anexo II.

### 5.1 Coleta e armazenamento das amostras dos pacientes

O objeto a ser analisado é soro ou plasma.

Segundo a Associação Profissional de Neuropsicofarmacologia e Farmacopsiquiatria, as amostras de soro e plasma armazenadas em local escuro e frio (4°C) permanecem estáveis por pelo menos 24 horas. Se for necessário armazená-los por mais de 24 horas, recomenda-se congelá-los a aproximadamente -20°C. Normalmente, as amostras podem ser enviadas sem refrigeração [3]. Use recipientes de polipropileno, pois os antidepressivos tricíclicos podem ser adsorvidos em superfícies de vidro!

**Nota:** É responsabilidade de cada laboratório fazer uso de todas as referências disponíveis e/ou de realizar estudos próprios para estabelecer os critérios de estabilidade específicos para seu laboratório.

### 5.2 Reconstituição dos padrões de calibração em plasma

O padrão de calibração (nº de artigo 49003, 49031, 49032) é rastreável a padrões de referência. Após a reconstituição, será submetido, assim como as amostras dos pacientes, a todo o processo de preparo da amostra. O padrão preparado é utilizado para calibração do sistema HPLC. **Para reconstituição do padrão de calibração de plasma liofilizado, pipete exatamente 2,5 mL de água destilada no recipiente.** Deixe descansar de 10 a 15 min. aproximadamente. a temperatura ambiente, agite o recipiente várias vezes até que o conteúdo fique homogêneo. Evite a luz solar direta! As concentrações dependem do lote e devem ser lidas no folheto de instruções do padrão de calibração correspondente.

**Atenção!**

Este produto foi produzido a partir de um *pool* de plasma humano que foi testado para detectar anticorpos HIV 1/2, DNA de HIV, HCV e BHV (PCR), antígenos HBs, anticorpos HBc e um ensaio TPHA, sendo o resultado da análise negativo. Porém, não é possível descartar completamente o risco de infecção ao utilizar este produto, uma vez que não existe um método de análise absolutamente seguro, nem métodos de análise para todas as doenças, além de conter patógenos potencialmente desconhecidos. Por estas razões, recomendamos que todos os produtos que contenham materiais humanos sejam considerados potencialmente infecciosos. Ao utilizar estes produtos, devem ser seguidas as mesmas medidas de precaução utilizadas no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infecciosos.

**Estabilidade do padrão de calibração reconstituído:**

O padrão reconstituído dura até uma semana, se protegido da luz, selado e armazenado no frio (+2 a +8°C). Em caso de armazenamento mais longo (máx. 3 meses), o padrão deve ser armazenado em porções e congelado abaixo de -18°C.

### 5.3 Reconstituição dos controles

Os controles de plasma para o Nível I (nº de artigo 0052 (benzodiazepínicos), 0055 (antidepressivos tricíclicos)) e para o Nível II (nº de artigo 0053 (benzodiazepínicos), 0056 (antidepressivos tricíclicos)) são submetidos aos mesmos processos no preparo de amostras que as amostras dos pacientes. Em cada serie são realizados controles processados para o controle da exatidão e a precisão do sistema.

**Para a reconstituição dos controles liofilizados, pipetar exatamente 5,0 mL de água destilada no recipiente correspondente.** Deixar descansar durante 10 a 15 min. aprox. a temperatura ambiente, agitar várias vezes o recipiente até que seu conteúdo seja homogêneo. Evitar a luz direta do sol! As concentrações dependem do lote e devem ser lidas no folheto de instruções do controle correspondente.

**Atenção!**

Este produto foi produzido a partir de um *pool* de plasma humano que foi testado para detectar anticorpos HIV 1/2, DNA de HIV, HCV e BHV (PCR), antígenos HBs, anticorpos HBc e um ensaio TPHA, sendo o resultado da análise negativo. Porém, não é possível descartar completamente o risco de infecção ao utilizar este produto, uma vez que não existe um método de análise absolutamente seguro, nem métodos de análise para todas as doenças, além de conter patógenos potencialmente desconhecidos. Por estas razões, recomendamos que todos os produtos que contenham materiais humanos sejam considerados potencialmente infecciosos. Ao utilizar estes produtos, devem ser seguidas as mesmas medidas de precaução utilizadas no manuseio de amostras de pacientes potencialmente infecciosos.

**Estabilidade dos controles de plasma reconstituídos:**

Os controles reconstituídos podem durar até uma semana, protegidos da luz, bem fechados e armazenados refrigerados (+2 até +8°C). Em caso de armazenamento mais prolongado (máx. 3 meses), os controles deverão ser armazenados aliquotados e congelados abaixo de -18 °C.

## 5.4 Processo de preparo de amostras

**Nota:** Centrifugar as amostras antes de processá-las (2700 x g, 10 min)!

### 1. Condicionamento da coluna de preparo de amostras:

Verter na coluna de preparo de amostras etiquetada: primeiro 1 mL de Tampão de Equilíbrio 1, a seguir, 1 mL de Tampão de Equilíbrio 2, extrair respectivamente centrifugando (190-400 x g, 30-60 s aprox.) ou aspirando. A coluna não deve secar!

### 2. Introdução da amostra:

Adicionar 1 mL de soro/plasma e, a seguir, 100 µL de Padrão Interno na coluna de preparo de amostras condicionada, misturar várias vezes com a pipeta e extrair centrifugando (190-400 x g, 1 min aprox.) (comprovar que a extração tenha sido completa em cada coluna!) ou aspirando, eliminar os resíduos.

### 3. Limpeza:

Verter 2 x 1 mL de Tampão de Lavagem na coluna de preparo de amostras, extrair centrifugando (190-400 x g, 1 min) ou aspirando, eliminar os resíduos; depois do segundo passo de lavagem, centrifugar (1200 x g, 2 min aprox.) ou aspirar até secá-la.

### 4. Eluição:

**Importante:** Executar sempre os passos de eluição na mesma ordem! Levar a cabo o passo de eluição 1, mesmo se só forem ser analisados os ATCs! (Neste caso, o primeiro passo de eluição é feito como um passo adicional de lavagem, são eliminados os

#### 4.1. Eluição dos benzodiazepínicos

Trocar os tubos de coleta (vidro!), adicionar 400 µL de Tampão de Eluição 1 na coluna, esvaziá-la completamente centrifugando (190-400 x g, 1 min aprox.; a seguir 1200 x g, 1 min aprox.) ou aspirando.

**Neste primeiro eluato encontram-se os benzodiazepínicos**

#### 4.2. Eluição dos antidepressivos tricíclicos

Trocar os tubos de coleta (vidro!), adicionar 400 µL de Tampão de Eluição 2 na coluna, esvaziá-la completamente centrifugando (190-400 x g, 1 min aprox.; a seguir 1200 x g, 1 min aprox.) ou aspirando.

**Neste segundo eluato encontram-se os antidepressivos tricíclicos.**

### 5. Injeção:

Adicionar a cada eluato 200 µL de água ultrapura (grau HPLC), misturar brevemente; injetar 50 µL do eluato no sistema de HPLC.

### 6. Controle de qualidade:

Em cada série de análises deveriam ser realizados controles para documentar a precisão e exatidão.

## 5.5 Estabilidade das amostras preparadas

Os eluatos/amostras processadas obtidos são conservados 3 dias a temperatura ambiente, e até 5 dias refrigerados de +2 até +8°C (**em vials de vidro e protegidos da luz**). Para armazená-las mais tempo (até 2 semanas), as amostras devem ser conservadas congeladas abaixo de -18°C.

## 6 Registro de dados e cálculo

### 6.1 Calibração do sistema de cálculo

As concentrações de cada um dos analitos no padrão de calibração dependem do lote e devem ser lidos no folheto de instruções correspondente. Para a verificação da capacidade de separação deveria ser realizado um ciclo de testes antes da análise das amostras dos pacientes. Para isso, injetar várias vezes uma alíquota do padrão de calibração processado, até que dois cromatogramas consecutivos sejam quase idênticos em seus tempos de retenção e alturas de pico. Os cromatogramas resultantes permitem o correto ajuste dos parâmetros de integração. O cromatograma da última injeção de teste se utiliza para a calibração do sistema de cálculo (software do PC, integrador). No quadro de cálculo, introduzir os tempos de retenção e as concentrações (ver o folheto de instruções) do padrão de calibração assim obtidos.

#### Benzodiazepínicos:

Pico nro.	Analito	Tempo de retenção [min. aprox.]	Concentração [ng/mL]
1	Clordiacepóxido	5,0	ver folheto de instruções
2	Bromazepam	5,5	- " -
3	Padrão Interno	7,8	1
4	Oxacepam	9,2	ver folheto de instruções
5	Nitrazepam	9,9	- " -
6	Alprazolam	10,8	- " -
7	Clonazepam	11,4	- " -
8	Flunitrazepam	14,5	- " -
9	Nordiazepam	15,3	- " -
10	Clobazam	18,2	- " -
11	Diazepam	25,9	- " -

#### Antidepressivos tricíclicos:

Pico nro.	Analito	Tempo de retenção [min. aprox.]	Concentração [ng/mL]
1	Norclozapina	4,6	ver folheto de instruções
2	Clozapina	5,4	- " -
3	Nordoxepina	6,9	- " -
4	Doxepina	7,5	- " -
5	Desipramina	10,6	- " -
6	Imipramina	11,8	- " -
7	Nortriptilina	12,6	- " -
8	Maprotilina	13,2	- " -
9	Amitriptilina	14,0	- " -
10	Trimipramina	16,1	- " -
11	Padrão Interno	17,1	1
12	Norclomipramina	20,2	ver folheto de instruções
13	Clomipramina	22,8	- " -

Para garantir que não tenha sido modificada a calibração e as condições do HPLC (tempo de retenção etc.), deve-se injetar novamente o padrão de calibração preparado durante e ao final de uma série de amostras. Para a calibração, escolher no sistema de cálculo em "método padrão interno".

## 6.2 Cálculo quantitativo com padrão interno

Com a ajuda do padrão interno são compensadas as perdas que podem ocorrer durante o preparo das amostras. Para isso se adiciona à amostra (padrão de calibração, controle, amostra de paciente) uma quantidade definida do padrão interno. Será definido ao integrador um pico (ver cromatograma no capítulo 12) do processo de calibração como padrão interno na tabela de componentes. **Já que são adicionadas quantidades idênticas de padrão interno no padrão de calibração do plasma como às amostras dos pacientes, pode ser inserido o valor "1" para a concentração dele.**

## 7 Controle de qualidade

Para verificar a precisão e a exatidão das análises, realizar paralelamente controles adicionais em cada série de amostras (controles de plasma da Chromsystems, nº de artigo 0052, 0053 (benzodiazepínicos); 0055,0056 (antidepressivos tricíclicos)).

Se os valores se encontram fora dos intervalos indicados no folheto de instruções dos controles, deve-se verificar o sistema, e calibrar de novo se for necessário.

## 8 Faixas terapêuticas

Estas faixas terapêuticas são valores indicativos, extraídas de fontes bibliográficas.

### Benzodiazepínicos:

Analito	Faixa terapêutica 1 <sup>[5]</sup>	Faixa terapêutica 2 <sup>[6]</sup>	Faixa crítica [µg/L] <sup>[7]</sup>
Alprazolam	5-20 µg/L	5-50 µg/L	100-400 <sup>[5]</sup> , 100 <sup>[6]</sup>
Bromazepam	80-200 µg/L	50-200 µg/L	300 <sup>[4],[6]</sup> , 300-400 <sup>[5]</sup> (tóxico)
Clordiazepóxido	400-2000 µg/L	400-3000 µg/L	3000 <sup>[5]</sup> , 3500 <sup>[6]</sup>
Clobazam	100-600 µg/L	30-300 µg/L	500 <sup>[6]</sup>
Norclobazam	2000-4000 µg/L	300-3000 µg/L	5000 <sup>[6]</sup>
Clonazepam	10-80 µg/L	4-80 µg/L*	100 <sup>[4],[5],[6]</sup> (tóxico)
Diazepam	125-250 µg/L*	200-2500 µg/L**	3000 <sup>[4],[6]</sup> , 1500 <sup>[5]</sup> (tóxico)
Nordiazepam	20-800 µg/L	20-800 µg/L	2000 <sup>[4],[6]</sup> , 1500 <sup>[5]</sup> (tóxico)
Flunitrazepam	5-15 µg/L	5-15 µg/L	50 <sup>[4],[5],[6]</sup> (tóxico)
Nitrazepam	30-50 µg/L*	30-100 µg/L	200 <sup>[4],[5],[6]</sup> (tóxico)
Oxacepam	200-1500 µg/L	200-1500 µg/L	2000 <sup>[4],[5],[6]</sup> (toxisch)
Trazodona	800-1600 µg/L	700-1000 µg/L	4000 <sup>[5]</sup> , 1200 <sup>[6]</sup>

\* ansiolítico

### Antidepressivos tricíclicos:

Analito	Faixa terapêutica 1 <sup>[5]</sup>	Faixa terapêutica 2 <sup>[6]</sup>	Faixa crítica [µg/L] <sup>[7]</sup>
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	100-300 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 do medicamento e do metabólito



## 9 Fatores de conversão

A seguinte tabela contém os fatores de conversão entre concentrações em massa e concentrações molares, e vice-versa. Os fatores de conversão referem-se às substâncias como bases livres.

### Benzodiazepínicos:

Analito	ng/L en nmol/L:	nmol/L en ng/mL
Alprazolam	x 3,2386	x 0,3088
Bromazepam	x 3,1630	x 0,3162
Clordiacepóxido	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
Oxacepam	x 3,4877	x 0,2867

### Antidepressivos tricíclicos:

Analito	ng/L en nmol/L:	nmol/L en 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 fechados têm validade até a data indicada no rótulo, enquanto sejam cumpridas as condições de armazenamento indicadas no mesmo.

### Condições de armazenamento:

Produto	Armazenamento
Fase Móvel	+18 até +30 °C
Tampão de Equilíbrio 1	+18 até +30 °C
Tampão de Equilíbrio 2	+18 até +30 °C
Tampão de Lavagem	+18 até +30 °C
Tampão de Eluição 1	+18 até +30 °C
Tampão de Eluição 2	+18 até +30 °C
Padrão Interno	+2 até +8 °C
Colunas de <i>Clean Up</i> de Amostra	+18 até +30 °C
Padrão de Calibração em Plasma	+2 até +8 °C
Controles de plasma, Nível I e II	+2 até +8 °C

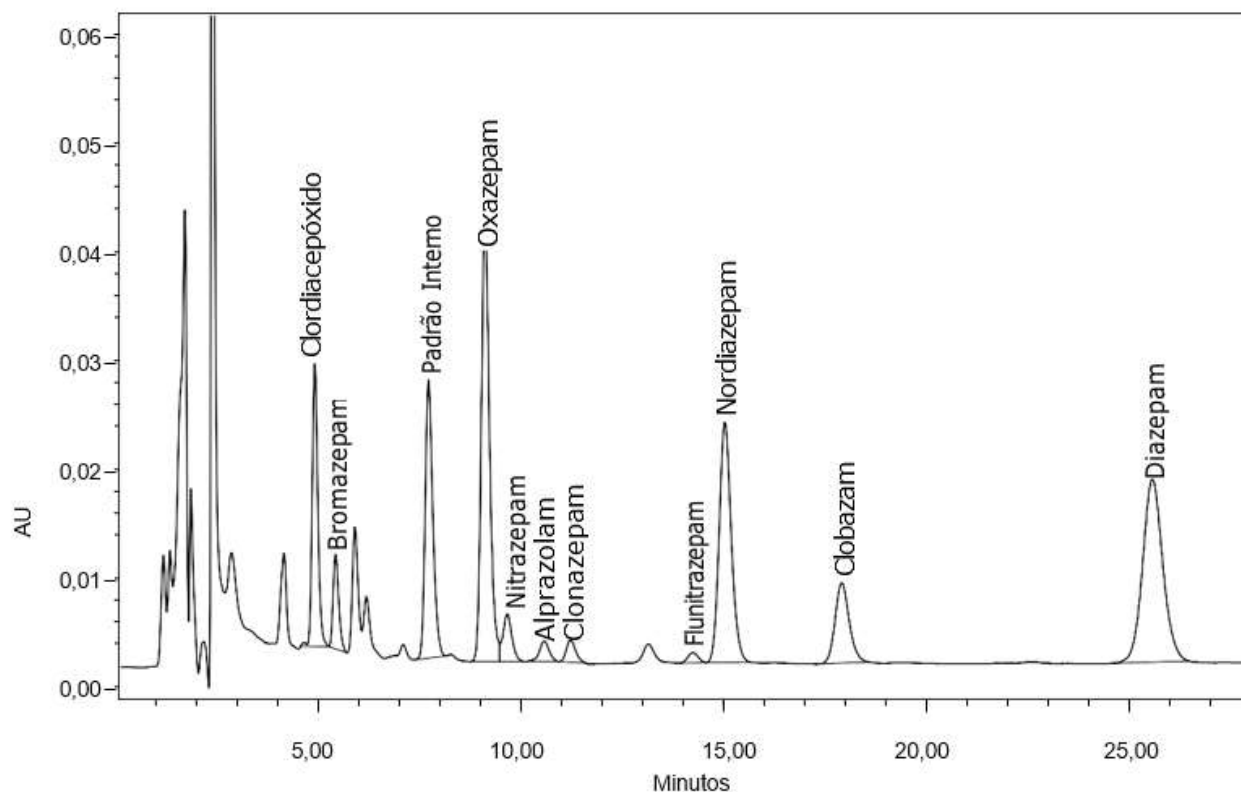
Os reagentes têm de ser fechados e armazenados corretamente imediatamente após seu uso. A estabilidade é de um ano após a data de abertura se não houver outra indicação, embora, nunca além da data de validade indicada. Para o padrão de calibração e os controles, ver os capítulos 5.2 e 5.3.

## 11 Descarte

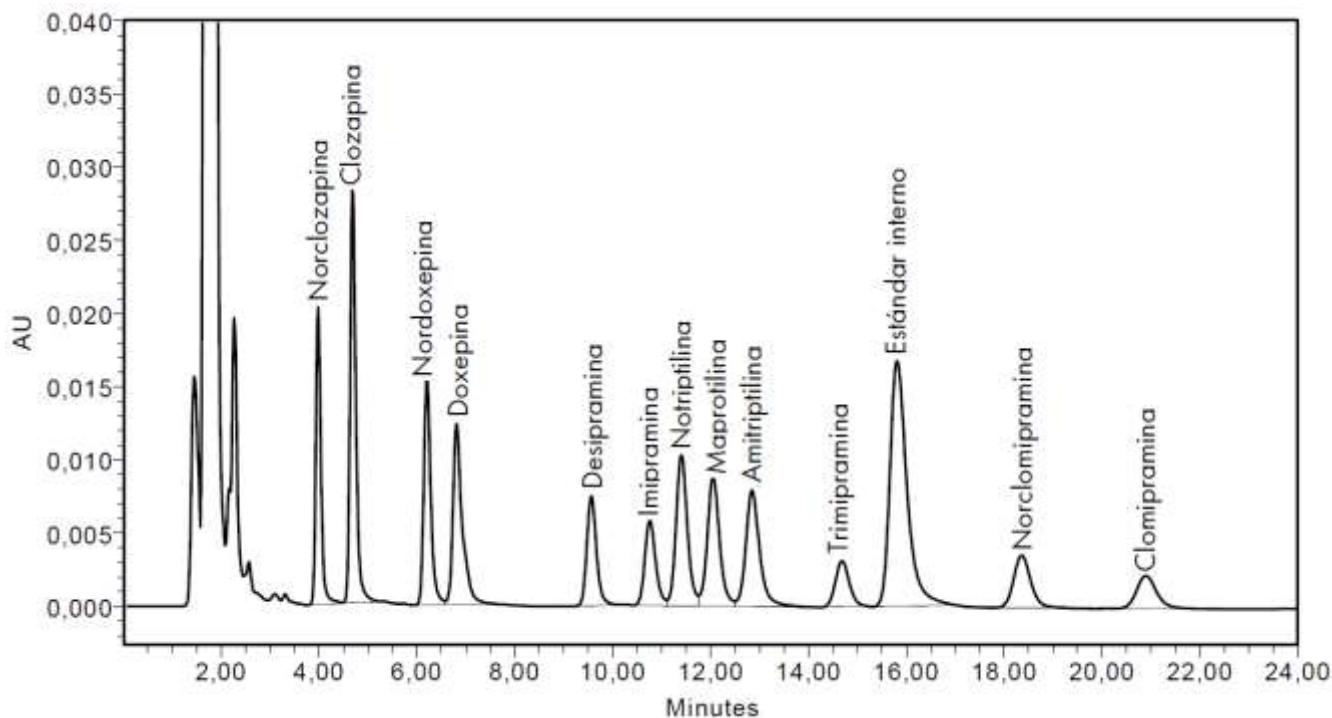
A Fase Móvel, Padrão Interno, Tampão de Equilíbrio 1, Tampão de Equilíbrio 2, Tampão de Lavagem, Tampão de Eluição 1 e Tampão de Eluição 2, assim como os resíduos das amostras preparadas contêm solventes orgânicos. Descartar os resíduos no contêiner para solventes orgânicos não halogenados. Os resíduos não devem ser descartados junto com os resíduos domésticos. Não devem ser descartados no esgoto. Eliminar conforme a Normativa sobre os resíduos 2008/98/CE, assim como às normativas nacionais y regionais. Deve-se garantir que somente o pessoal autorizado tenha acesso aos recipientes coletores.

## 12 Exemplos de cromatogramas

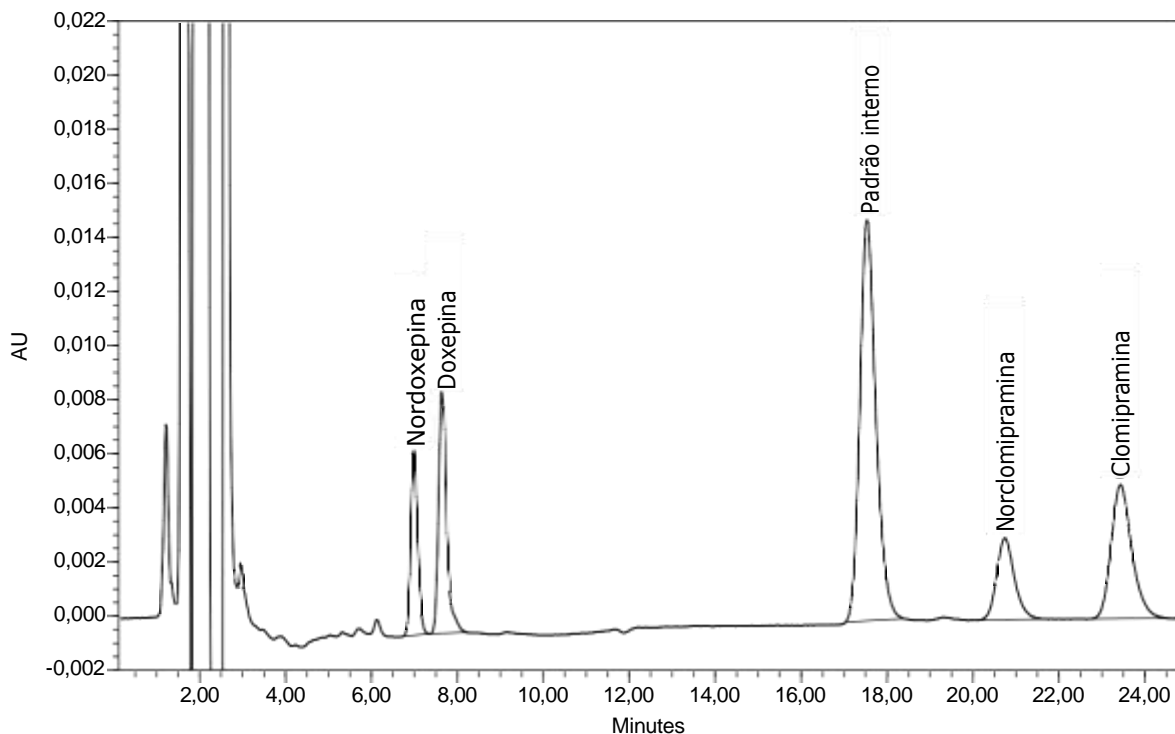
### 12.1 Cromatograma dos benzodiazepínicos



### 12.2 Cromatograma dos antidepressivos tricíclicos



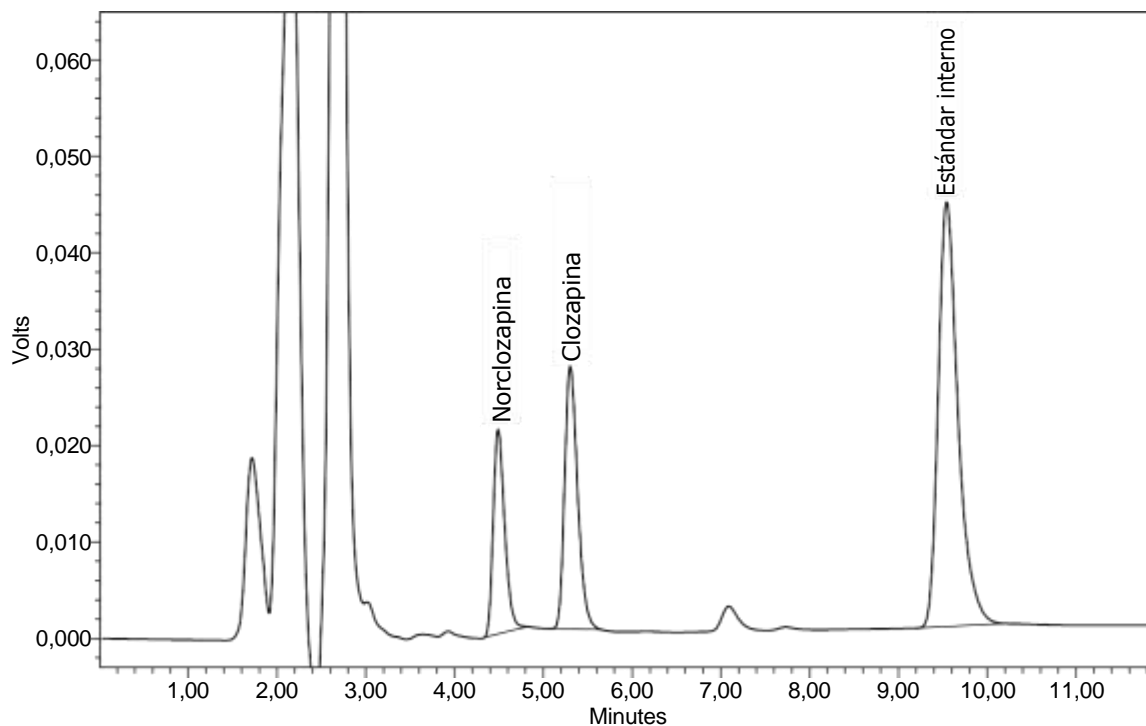
### 12.3 Cromatograma da amostra de um paciente



Doxepina: 109 ng/ml  
Nordoxepina: 69,5 ng/ml

Clomipramina: 302 ng/ml  
Norclomipramina: 147 ng/ml

### 12.4 Cromatograma de um padrão de calibração de clozapina/norclozapina com o padrão interno 49041



## 13 Interferências conhecidas

### Ter em consideração, por favor:

- Ao tomar clobazam, no cromatograma dos benzodiazepínicos aparece adicionalmente o metabólito norclobazam (faixa esperada: 1000-3000 ng/mL aprox.) com um tempo de retenção de 11 min. Em caso de que se estivesse administrando a extremamente inusual combinação de fármacos clobazam + clonazepam, isto provocaria erros na análise do clonazepam!
- Nas amostras que também contêm o antiepilético carbamazepina, é possível que no cromatograma dos benzodiazepínicos o padrão interno aumente consideravelmente devido à carbamazepina (várias vezes sua altura de pico normal). Tendo em conta as proporções entre os tamanhos de pico que são esperadas, esta interferência se identifica inequivocamente como tal. Neste caso, avalie a medição por meio de uma "calibração externa" (sem integrar o padrão interno).
- Ao tomar flurazepam, no cromatograma dos benzodiazepínicos aparece adicionalmente o metabólito desalquilflurazepam (faixa esperada: 30-80 ng/mL aprox.) com um tempo de retenção de 14 min, y pode interferir na análise do flunitrazepam. No cromatograma dos antidepressivos tricíclicos aparece neste caso um pico entre a clozapina e a nordoxepina. Este pico não interfere na análise dos antidepressivos tricíclicos.
- Nos pacientes com um nível muito alto de clozapina, é possível que no cromatograma dos antidepressivos tricíclicos apareça o metabólito clozapina-N-óxido (tempo de retenção 6 min aprox.).
- O metabólito desmetil-trimipramina da trimipramina aparece no cromatograma dos antidepressivos tricíclicos em um tempo de retenção de 14,5 min aprox. e pode se introduzir no pico da amitriptilina.
- Se as amostras também contêm o neuroléptico aripiprazol, a nortriptilina pode aumentar no cromatograma dos antidepressivos tricíclicos.
- Nas amostras que também contêm o antidepressivo tricíclico protriptilina, o sinal da desipramina pode ficar oculto e, portanto, a determinação deste analito pode estar alterada.

Se tiver dúvidas sobre as interferências, contate nosso serviço externo ou diretamente ao serviço de atenção ao cliente da Chromsystems, tanto ligando a nosso telefone +49 89 18930-111 como enviando um correio eletrônico a [support@chromsystems.com](mailto:support@chromsystems.com).

## 14 Problemas e soluções

Problema	Causa possível	Reparo
A linha de base oscila	A lâmpada do detector ainda está fria	Esperar
	Lâmpada do detector gasta	Trocar a lâmpada
	O sistema ainda não está equilibrado	Injetar várias vezes o padrão de calibração, até obter dois cromatogramas consecutivos idênticos
	Variação de temperatura	Usar um forno para colunas.
	A velocidade do fluxo não é constante	Verificar a bomba
Linha de base irregular	Bomba de HPLC	Verificar a bomba (ar, estanqueidade)
	Ar no sistema	Degaseificar (purgar) o aparelho de HPLC
	Célula do detector suja	Limpar a célula do detector
Picos parasitas	Ar no sistema	Desgaseificar (purgar) o aparelho de HPLC
	Impurezas no injetor	Limpar o injetor
	<i>Vials</i> do injetor automático sujos	Usar <i>vials</i> novos ou limpá-los com metanol
	Sistema de injeção sujo	Limpar com metanol, ou injetar 10 vezes Fase Móvel
	Coluna de HPLC contaminada	Trocar a coluna
Picos largos, caudas	Coluna de HPLC gasta	Renovar a coluna
Picos duplos	Volumes mortos nas conexões	Renovar as conexões
	Volume morto na coluna de HPLC	Renovar a coluna
Sem picos	O injetor tem vazamentos	Verificar o injetor
Diminuição na sensibilidade	Lâmpada do detector gasta	Trocar a lâmpada
	Célula do detector suja	Limpar a célula
	Válvula do injetor danificada	Verificar o injetor

Problema	Causa possível	Reparo
Tempos de retenção modificados	Variação da temperatura	Usar um forno para colunas
	Velocidade de fluxo irregular	Verificar a bomba de HPLC e ajustar a velocidade de fluxo
	O sistema ainda não está equilibrado	Bombear durante 15 min aprox. a Fase Móvel no sistema; injetar repetidamente o padrão de calibração
Sem sinal	Conexão inexistente ou defeituosa com o integrador/registrator	Verificar o cabo do sinal e a conexão
	Lâmpada do detector	Verificar a alimentação da corrente; se necessário, trocar a lâmpada

## 15 Bibliografia

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 Pharmakologie und Toxikologie. 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1986).
4. Woggon B. Depressionen und Psychopharmaka – Medizin 2000. pmi Verlagsgruppe Frankfurt/Main (1997).
5. Ludwig R, Regenthal R (Hrsg). Akute Vergiftungen und Arzneimittelüberdosierungen. 10. Aufl, WVG 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, Jaquenoud Sirot E, Kirchherr H, Laux G, Lutz UC, Messer T, Müller MJ, Pfuhlmann B, Rambeck B, Riederer P, Schoppek 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, Andresen H, Schmoltdt A. (2012) Therapeutic and Toxic Blood Concentrations of Nearly 1,000 Drugs and other xenobiotics. *Crit Care* 16(4): R136.

# Anexo I: Preparo automatizado de amostras com Gilson® ASPEC™

## ASPEC™-Racks

O programa de Chromsystems ASPEC™ para benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos em soro/plasma precisa dos seguintes racks de amostras e de reagentes:

- Rack de amostras, código 28
- Solvent Rack, código 61
- DEC Racks móveis, código 101 (máx. 3 unidades) com seus correspondentes Collect Racks e *vials* coletores

### Ocupação das racks

Reagente	Suporte	Posição\
Amostras	Rack de amostras	1-107
Padrão Interno (49004/A)	Rack de amostras	108
Tampão de Equilíbrio 1 (49005/A)	Suporte de solventes	109
Tampão de Equilíbrio 2 (49006/A)	Suporte de solventes	110
Tampão de Eluição 1 (49009/A) para benzodiazepínicos	Suporte de solventes	111
Tampão de Eluição 2 (49010/A) para antidepressivos tricíclicos*	Suporte de solventes	112
Colunas de <i>Clean Up</i> de Amostra (49008/A)	Suporte(s) DEC	113-220
Tubos vazios ("Collect")	Suporte(s) coletor(es)	segundo o número de cartuchos SPE
Tampão de Lavagem (49007/A)	Depósito	

\* Não é necessário quando se analisam benzodiazepínicos!

Antes de começar uma sequência de análise é necessário lavar manualmente o diluidor com o líquido do depósito (Comando do menu: MANUAL – Prime dilutor)!



Volume necessário de reagentes:

Para cada amostra são necessários os seguintes volumes de reagentes:

Reagente	Volume
Padrão Interno (49004/A)	100 µL
Tampão de Equilíbrio 1 (49005/A)	1 mL
Tampão de Equilíbrio 2 (49006/A)	1 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 + quantidade adicional para lavar

\* Não é necessário quando analisados benzodiazepínicos!

Cada uma das garrafas ASPEC™ de reagentes devem conter, no mínimo, o volume do reagente necessário para o número de amostras que vão ser processadas mais um volume de 30 mL adicional. Selas as garrafas com um fechamento adequado para evitar que os componentes orgânicos do tampão evaporem.

## Princípio do programa ASPEC™

Antes de iniciar o programa ASPEC™, pipetar manualmente de maneira exata 1 mL de soro/plasma no correspondente recipiente (de vidro) e colocá-lo na posição correspondente do rack de amostras.

ASPEC™ realizará toda o preparo das amostras (misturar a amostra com padrão interno, SPE com todos os passos de lavagem e eluição). Os eluatos preparados com este método podem ser injetados diretamente no sistema de HPLC.

O disquete ASPEC™ contém 4 programas:

Arquivos de programa "BZD" / "TCA":

O ASPEC™ deve estar corretamente conectado ao sistema de HPLC! Estes arquivos de programa controlam o preparo de amostras de benzodiazepínicos (BZD) e antidepressivos tricíclicos (TCA). Os eluatos preparados são injetados automaticamente no sistema de HPLC e se inicia a cromatografia. Durante a análise, é preparada a amostra seguinte.

O volume de injeção é de 50 µL por padrão, mas pode ser mudado caso necessário no ponto do programa "INJECT" (# 14 BZD, # 16 TCA).

No ponto de programa "WAIT" (# 17 BZD, # 19 TCA) se coordenam os intervalos de injeção com a duração de cromatografia e o tempo de preparo de amostras; deve ser ajustado caso necessário. Lembre-se que o tempo de preparo de amostras de benzodiazepínicos é ligeiramente mais curto que o de antidepressivos tricíclicos (entre 1 e 2 minutos).

Arquivos de programa "BZD\_NI" / "TCA\_NI":

ASPEC™ realiza o preparo de amostras para os benzodiazepínicos ("BZD\_NI") ou os antidepressivos tricíclicos ("TCA\_NI"); as amostras não são injetadas no sistema HPLC!

## Requisitos de configuração

Este programa requer um comando ASPEC™ mediante teclado.

Verificar os seguintes pontos no comando CONFIG do menu e ajustá-los, se necessário, à configuração real do aparelho ASPEC™.

### Configuração SAMPLER:

Model

Arm

Rinsing station depth: normalmente 80 mm

Rinsing station positions: A y/o B, C

Injection loop(s): Posição e volume

Calib. tubing volume

ID number

### Configuração DILUTOR:

Tipo

Left syringe volume

Right syringe volume

Transfer tubing

ID number

## Anexo II: Observações sobre as substâncias perigosas

Prestar atenção às seguintes observações sobre as substâncias perigosas e tomar as medidas de segurança apropriadas. Nossas fichas de segurança contêm informação adicional. Estas obtêm-se sob pedido ou podem ser baixadas de nosso site: [www.chromsystems.com](http://www.chromsystems.com).

Pictogramas	Informações de risco e conselhos de prudência
Fase Móvel (nº de artigo 49001, 49002)	
	<p>Risco</p> <p>H225 Líquido e vapores muito inflamáveis.</p> <p>H302+H312+H332 Nocivo em caso de ingestão, contato com a pele ou inalação.</p> <p>H319 Provoca irritação ocular grave.</p> <p>P210 Manter afastado do calor, de superfície quente, de faíscas, de chamas e de qualquer outra fonte de ignição. Não fumar.</p> <p>P241 Utilizar um material elétrico, de ventilação ou de iluminação/antideflagrante.</p> <p>P280 Usar luvas/roupas/óculos/máscara de proteção.</p> <p>P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas.</p>
Padrões Internos (nº de artigo 49004, 49041)	
	<p>Risco</p> <p>H226 Líquidos e vapores inflamáveis.</p> <p>H301+H311+H331 Tóxico em caso de ingestão, contato com a pele ou inalação.</p> <p>H370 Provoca danos no sistema nervoso central e os órgãos visuais.</p> <p>P210 Manter afastado do calor, de superfície quente, de faíscas, de chamas e de qualquer outra fonte de ignição. Não fumar.</p> <p>P280 Usar luvas/roupas/óculos/máscara de proteção.</p> <p>P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: Ligar imediatamente a um CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA/médico</p> <p>P302+P352 EM CASO DE CONTATO COM A PELE: Lavar com água e sabão abundantes.</p> <p>P403+P233 Armazenar em um lugar bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.</p>
Tampão de Equilíbrio 1 (nº de artigo 49005)	
	<p>Risco</p> <p>H225 Líquido e vapores muito inflamáveis.</p> <p>H301+H311+H331 Tóxico em caso de ingestão, contato com a pele ou inalação.</p> <p>H370 Provoca danos no sistema nervoso central e os órgãos visuais.</p> <p>P210 Manter afastado do calor, de superfície quente, de faíscas, de chamas e de qualquer outra fonte de ignição. Não fumar.</p> <p>P280 Usar luvas/roupas/óculos/máscara de proteção.</p> <p>P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: Ligar imediatamente a um CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA/médico</p> <p>P302+P352 EM CASO DE CONTATO COM A PELE: Lavar com água e sabão abundantes.</p> <p>P403+P233 Armazenar em um lugar bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.</p>

Pictogramas	Informações de risco e conselhos de prudência
Tampão de Equilíbrio 2 (nº de artigo 49006)	
	<p>Atenção H226 Líquidos e vapores inflamáveis.</p> <p>P210 Manter afastado do calor, de superfície quente, de faíscas, de chamas e de qualquer outra fonte de ignição. Não fumar. P241 Utilizar um material elétrico, de ventilação ou de iluminação/antideflagrante. P280 Usar luvas/roupas/óculos/máscara de proteção. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas.</p>
Tampão de Lavagem (nº de artigo 49007)	
	<p>Atenção H226 Líquidos e vapores inflamáveis.</p> <p>P210 Manter afastado do calor, de superfície quente, de faíscas, de chamas e de qualquer outra fonte de ignição. Não fumar. P241 Utilizar um material elétrico, de ventilação ou de iluminação/antideflagrante. P280 Usar luvas/roupas/óculos/máscara de proteção. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas.</p>
Tampão de Eluição 1 (nº de artigo 49009)	
 	<p>Risco H225 Líquido e vapores muito inflamáveis. H302+H312+H332 Nocivo em caso de ingestão, contato com a pele ou inalação. H319 Provoca irritação ocular grave.</p> <p>P210 Manter afastado do calor, de superfície quente, de faíscas, de chamas e de qualquer outra fonte de ignição. Não fumar. P241 Utilizar um material elétrico, de ventilação ou de iluminação/antideflagrante. P280 Usar luvas/roupas/óculos/máscara de proteção. P243 Tomar medidas de precaução contra descargas eletrostáticas.</p>
Elution Buffer 2 (nº de pedido 49010)	
  	<p>Risco H225 Líquido e vapores muito inflamáveis. H301+H311+H331 Tóxico em caso de ingestão, contato com a pele ou inalação. H370 Provoca danos no sistema nervoso central e os órgãos visuais.</p> <p>P210 Manter afastado do calor, de superfície quente, de faíscas, de chamas e de qualquer outra fonte de ignição. Não fumar. P280 Usar luvas/roupas/óculos/máscara de proteção. P301+P310 EM CASO DE INGESTÃO: Ligar imediatamente a um CENTRO DE INFORMAÇÃO TOXICOLÓGICA/médico P302+P352 EM CASO DE CONTATO COM A PELE: Lavar com água e sabão abundantes. P403+P233 Armazenar em um lugar bem ventilado. Manter o recipiente bem fechado.</p>

Estes elementos têm sido classificados como não perigosos de acordo à legislação da União Europeia:

Padrões de Calibração em Plasma (nº de artigo 49003, 49031, 49032, 49033, 49034, 49035)

Controles em Plasma (nº de artigo 0051, 0052, 0053, 0054, 0055, 0056, 0057, 0061, 0062)

## Anexo III: Nota para o cálculo manual

Para o cálculo manual são necessários os seguintes dados:

- Área de pico ou altura de pico da substância A no cromatograma da amostra =  $A_{\text{Amostra}}$
- Área de pico ou altura de pico da substância A no cromatograma do padrão de calibração =  $A_{\text{Padrão}}$
- Área de pico ou altura de pico do padrão interno no cromatograma da amostra =  $EI_{\text{Amostra}}$
- Área de pico ou altura de pico do padrão interno no cromatograma do padrão de calibração =  $EI_{\text{Padrão}}$
- Concentração da substância A no padrão de calibração =  $C_{\text{Padrão}}$

A concentração da substância A na amostra ( $C_{\text{Amostra}}$ ) se calcula da seguinte forma:

$$C_{\text{Amostra}} [\text{ng/ml}] = \frac{A_{\text{Amostra}} \times EI_{\text{Padrão}}}{A_{\text{Padrão}} \times EI_{\text{Amostra}}} \times C_{\text{Padrão}}$$

## Anexo IV: Dados de validação

Dentro do marco da verificação de linearidade e da validação, foram adicionadas às amostras de plasma e soro sem processar quantidades definidas de benzodiazepínicos e antidepressivos tricíclicos e foram processadas várias vezes.

### Taxas de recuperação:

A recuperação analítica foi determinada a partir das inclinações das linhas de calibração de várias amostras de plasma e soro e de diluições de soluções padrão. A seguinte tabela mostra as taxas de recuperação de cada uma das substâncias:

#### Benzodiazepínicos:

Substância	Taxas de recuperação plasma [%]	Taxas de recuperação 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
Oxacepam	91	93
Trazodona	95	91
Internal Standard	87	107

#### Antidepressivos tricíclicos:

Substância	Taxas de recuperação plasma [%]	Taxas de recuperação 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
Internal Standard	103	89

**Linearidade/Limite de quantificação inferior:**

O método se desenvolve linearmente a partir do limite de quantificação inferior (LLOQ) e durante toda a faixa terapêutica, até, pelo menos, o limite superior indicado (ULOQ).

**Benzodiazepínicos:**

<b>Analito</b>	<b>Limite de quantificação inferior [ng/mL] aprox.*</b>	<b>Intervalo linear até pelo menos [ng/mL]</b>
Alprazolam	4,5	65
Bromazepam	15	600
Clordiacepóxido	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
Oxacepam	12	2500
Trazodona	10	5000

**Antidepressivos tricíclicos:**

<b>Analito</b>	<b>Limite de quantificação inferior [ng/mL] aprox.*</b>	<b>Intervalo linear até pelo menos [ng/mL]</b>
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

\*Os limites da análise dependem do detector utilizado!

**Reprodutibilidade intra-ensaio:**

Os coeficientes de variação foram calculados para 3 concentrações diferentes, processando várias vezes (n = 10) a mesma amostra:

**Benzodiazepínicos:**

Analito	Coeficiente de variação [%] (com uma concentração em 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)
Clordiacepóxido	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)
Oxacepam	3,8 (140)	2,3 (1452)	2,8 (833)
Trazodona	3,4 (441)	2,8 (2618)	3,1 (1323)

**Antidepressivos tricíclicos:**

Analito	Coeficiente de variação [%] (com uma concentração em 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 (42,1)	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)



**Reprodutibilidade inter-ensaio:**

A reprodutibilidade inter-ensaio foi determinada por meio de um processamento quádruplo e uma medição das concentrações dos analitos em três pools ou concentrados de plasma, em 20 séries de análises diferentes:

**Benzodiazepínicos:**

Analito	Coeficiente de variação [%] (com uma concentração em 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)
Norclobazam	4,5 (1041)	4,7 (4164)	3,4 (2691)
Nordiazepam	5,5 (78,9)	3,2 (900)	3,2 (513)
Oxacepam	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 [%] (com uma concentração em 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 (57,8)	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 (168)