

## **ANTIEPILETTICI 2 SIERICI e/o PLASMATICI in UV – Codice Z04110**

### **INTRODUZIONE**

Il trattamento del paziente epilettico richiede il contributo multidisciplinare di competenze mediche, farmacologiche, psicologiche e sociali. In questo contesto pertanto, la terapia farmacologica e il conseguente monitoraggio rivestono un ruolo decisivo nel controllo immediato delle crisi epilettiche e nella prevenzione a medio e lungo termine delle ricadute.

Attualmente, grazie al monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche dei farmaci antiepilettici, è in molti casi possibile modellare la terapia sul singolo paziente.

Il presente metodo consente di determinare simultaneamente le concentrazioni sieriche e/o plasmatiche dei seguenti farmaci antiepilettici :

1. *Etosuccimide*
2. *Primidone*
3. *Lamotrigina*
4. *Felbamato*

EUREKA srl – LAB DIVISION  
VAT N° 01547310423  
E-mail: info@eurekaone.com  
www.eurekaone.com



Head Quarter:  
Via Enrico Fermi 25  
60033 Chiaravalle (AN) ITALY  
Tel. +39 071 7450790  
Fax + 39 071 7496579



## CARATTERISTICHE DEL METODO

### Principio del Metodo :

Gli Antiepilettici vengono isolati trattando il plasma o il siero con un opportuno deproteinizzante. Dopo l'aggiunta di uno stabilizzante, la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

**Recupero del Metodo :** 100 %

**Sensibilità del Metodo :** 0,2 µg/ml

**Range dinamico del metodo :** 0,2 – 200 µg/ml

<b><u>Range terapeutico nel plasma :</u></b>	<i>Etosuccimide</i>	40 – 100 µg/ml
	<i>Primidone</i>	8 – 12 µg/ml
	<i>Lamotrigina</i>	3 – 14 µg/ml
	<i>Felbamato</i>	30 – 80 µg/ml

**Contenuto della confezione :** Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C

**Reagente A** – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interno, **1 x 20 ml**

**Reagente B** – Soluzione Stabilizzante, **1 x 20 ml**

**Reagente C** – Soluzione Test, **1 x 1 ml**

**Reagente D** – Calibratore liofilo plasmatico, **2 x 2 ml** **Vedi Avvertenze**

**Reagente M** – Fase Mobile, **6 x 500 ml**

**Dotazione strumentale minima richiesta :** Strumento HPLC isocratico con loop da 50 µl  
Detector spettrofotometrico UV / VIS  $\lambda=205$  nm  
Registratore di cromatogrammi

**Dotazione opzionale :** Autocampionatore  
Computer gestionale

**Modalità di prelievo ematico :** Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel e con Eparina come anticoagulante. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il siero e stoccarlo a – 20 °C. Stabile 4 settimane.

## **PROCEDURA PREANALITICA**

In una provetta pipettare :

- 950 µl di H<sub>2</sub>O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente C - Soluzione Test**

**NOTA** : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 50 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione dei singoli Antiepilettici che deve essere simile a quello riportato in fig. 1. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

## **PROCEDURA ANALITICA**

**FASE 1** : Preparazione dei Campioni

Dispensare in provette coniche da 1,5 ml tipo Eppendorf con tappo :

	<b>Bianco</b>	<b>Calibratore</b>	<b>Campione</b>
<b>Acqua di grado HPLC</b>	200 µl		
<b>Reagente D – Calibratore plasmatico</b>		200 µl	
<b>Campione</b>			200 µl
<b>Reagente A - Deproteinizzante con Standard Interno</b>	200 µl	200 µl	200 µl

**Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 10 secondi**

**FASE 2** : Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti.

**FASE 3** : Trasferire 200 µl del sovranatante limpido in una provetta.

- Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di **Reagente B – Sol. Stabilizzante**

**Al vortex per 10 secondi**

**N.B.: il campione così preparato è stabile 3 giorni a 2-8 °C**

**INIEZIONE** :

- Iniettare 50 µl della soluzione nel cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

## ANTIEPILETTICI 2 - Avvertenze

### REAGENTE C: SOLUZIONE TEST

<b>ANTIEPILETTICI :</b>	
<b>Etosuccimide</b>	circa 681,0 µg/ml
<b>Primidone</b>	circa 93,0 µg/ml
<b>Lamotrigina</b>	circa 91,0 µg/ml
<b>Felbamato</b>	circa 361,2 µg/ml

### REAGENTE D: CALIBRATORE LIOFILO PLASMATICO Lot. 003

<b>Etosuccimide</b>	116 µg/ml
<b>Primidone</b>	15,92 µg/ml
<b>Lamotrigina</b>	9,82 µg/ml
<b>Felbamato</b>	67,60 µg/ml
<b>Modalità d'uso e Ricostituzione:</b> i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 2 ml di H <sub>2</sub> O di grado HPLC e agitare delicatamente per 10 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.	
<b>Conservazione e stabilità :</b> i Calibratori liofilici sono stabili 18 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Almeno 7 giorni se conservati a 2–8 °C e 1 mese a –20 °C una volta ricostituiti. Non usarli dopo la data di scadenza.	
<b>Confezionamento :</b> 2 x 2 ml	
<b>Precauzioni :</b> questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.	

### PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

$\lambda$	205 nm
<b>GAIN</b>	0,001 AUFS
<b>TEMPO DI INTEGRAZIONE</b>	10 secondi

### PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 µ, è tassativo l'uso del Metaguard - Guard Column (1 x 3 pz), cod. ZA600MG e del Metasaver Precolumn Filter 0.5 µm (1 x 10 pz.) cod. ZA6005.

### CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H<sub>2</sub>O : Metanolo ( 20 : 80 v/v ) e successivamente 30 ml di H<sub>2</sub>O per HPLC, al flusso di 1,2 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,2 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche a ricircolo di fase. **NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.** Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

### PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 30 ml di H<sub>2</sub>O e scaricare. Flussare una soluzione di H<sub>2</sub>O : Metanolo o Acetonitrile ( 20 : 80 v/v ) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo far passare 30 ml di H<sub>2</sub>O prima di condizionala con la Fase Mobile.

### PARAMETRI HPLC

<b>LOOP</b>	50 µl
<b>Flusso di lavoro consigliato</b>	1,2 ml/minuto
<b>Pressione corrispondente</b>	Circa 100 bar

### PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

<b>ATTENUAZIONE</b>	8
---------------------	---

**PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE**

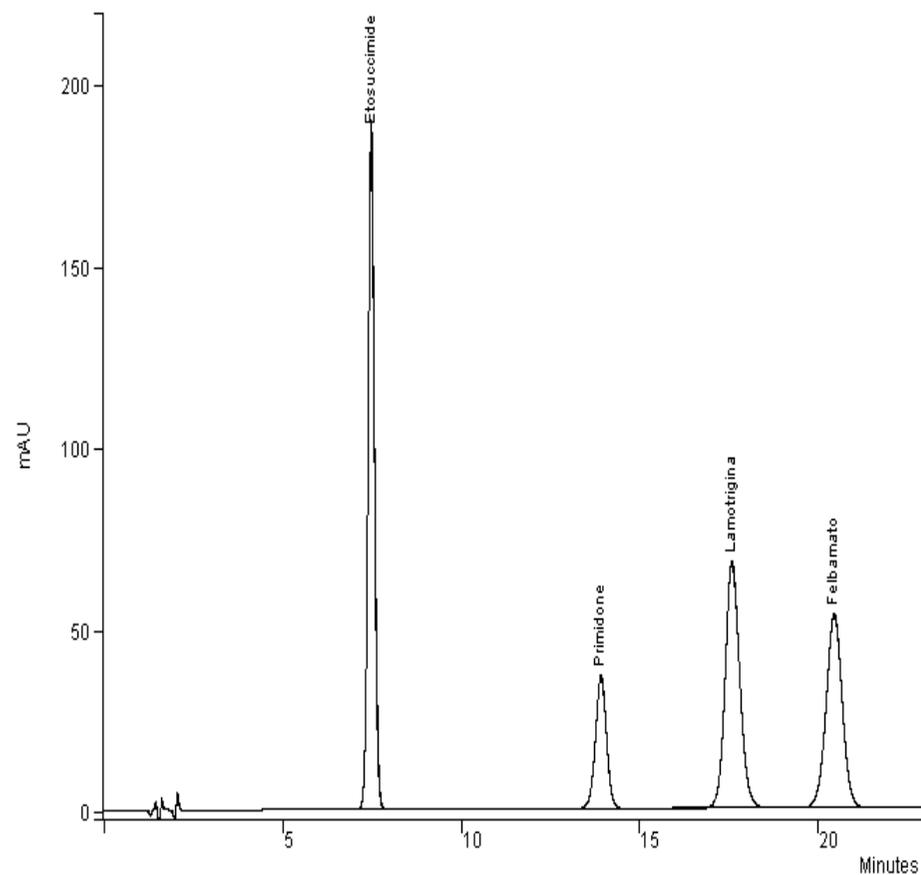
**SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE**

**ACCESSORI E CONSUMABILI**

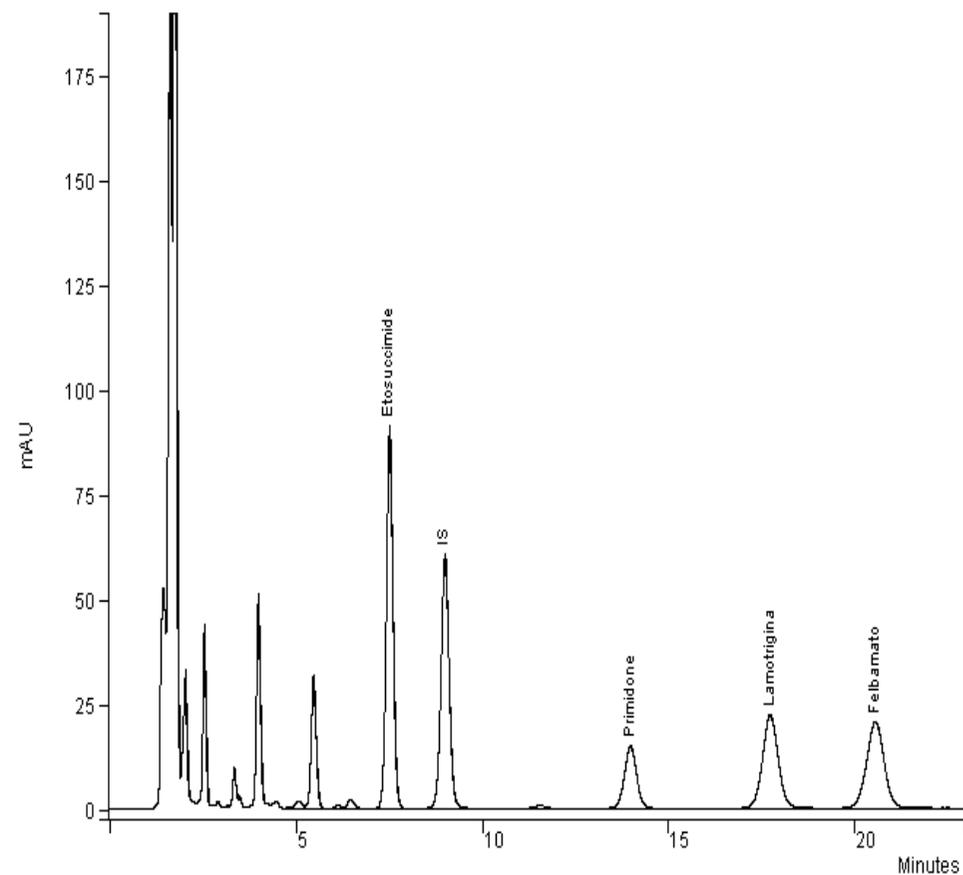
<b>CODICE</b>	<b>DESCRIZIONE</b>	<b>CONFEZIONE</b>
<b>Z-04116</b>	Calibratore liofilo plasmatico per Antiepilettici 2	4 x 2 ml
<b>Z-04117</b>	Controllo liofilo plasmatico per Antiepilettici 2, Livello 1	5 x 2 ml
<b>Z-04118</b>	Controllo liofilo plasmatico per Antiepilettici 2, Livello 2	5 x 2 ml
<b>Z-04119</b>	Controllo liofilo plasmatico per Antiepilettici 2, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
<b>ZFM15960E</b>	Colonna Analitica Genesis C 18 (150 x 4,6mm -4 um)	1 PZ
<b>ZA600MG</b>	Metaguard – Guard Column	1 x 3 PZ
<b>ZA6005</b>	Metasaver Precolumn Filter 0.5 um	1 x 10 PZ
<b>ZITC4000V1</b>	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
<b>ZITC400054B</b>	Tappi neri per vial di vetro a volume ridotto	1 x 100 PZ



## ANTIEPILETTICI 2 SIERICI e/o PLASMATICI ( Cromatogrammi di Riferimento )

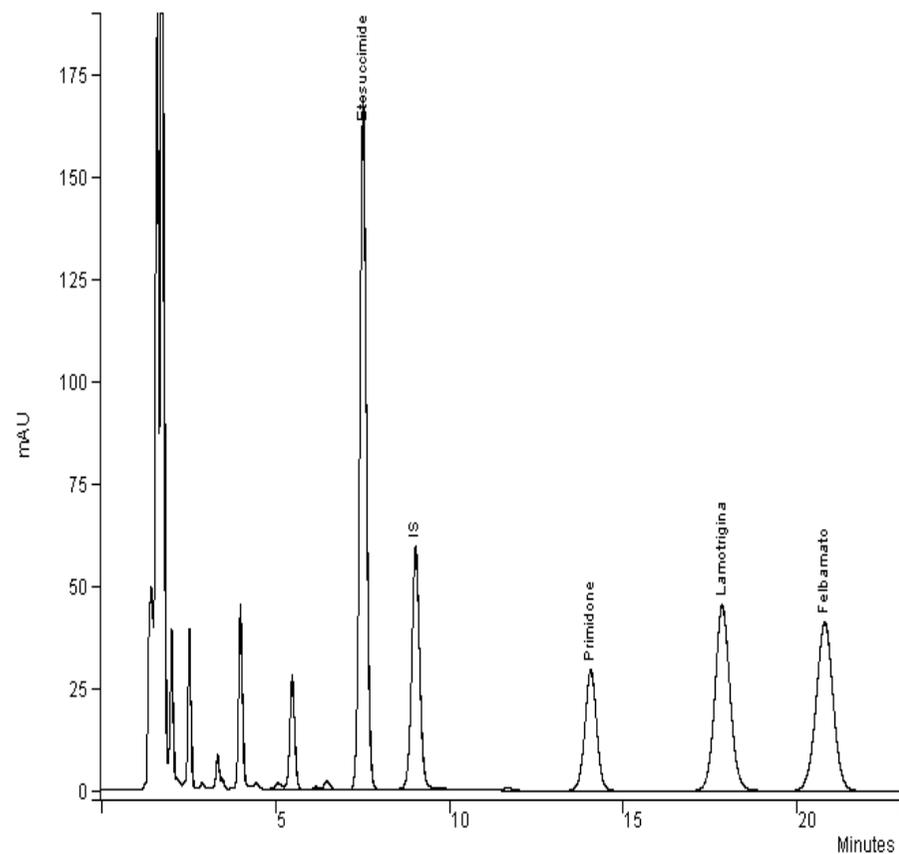


<b>Fig. 1 : Soluzione Test</b>	
R.T.	7.463 Etosuccimide
R.T.	13.899 Primidone
R.T.	17.564 Lamotrigina
R.T.	20.430 Felbamato



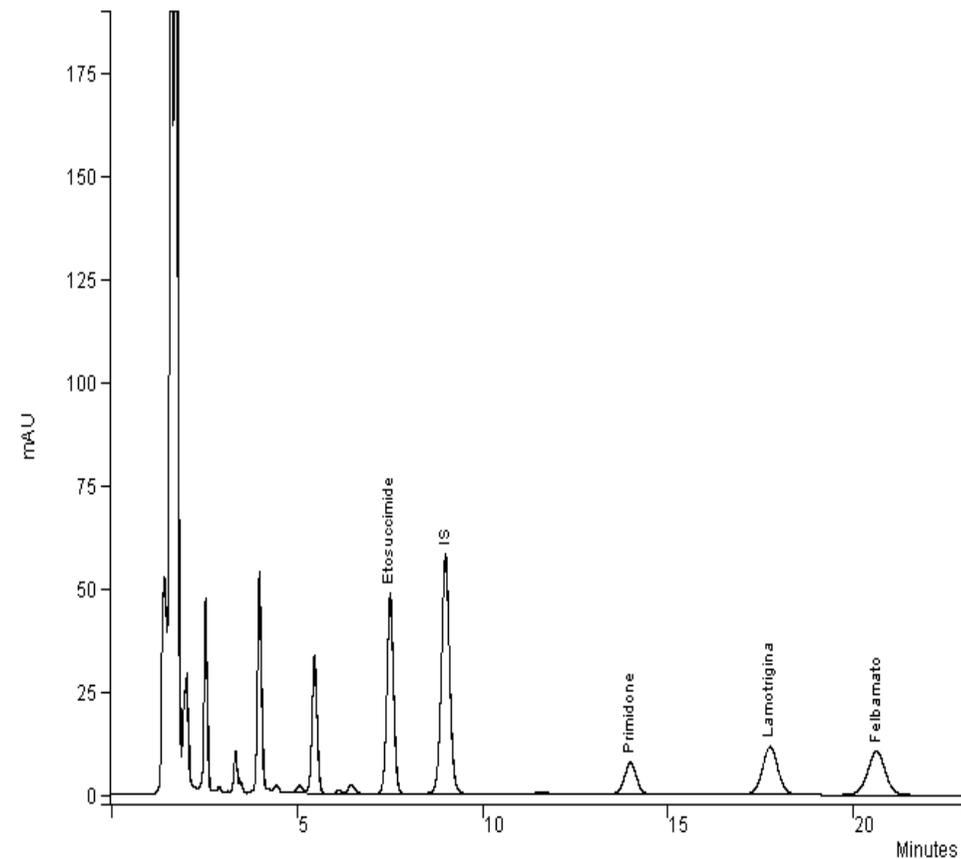
<b>Fig. 2 : Standard di calibrazione plasmatico</b>		
R.T.	7.495 Etosuccimide	68,10 µg/ml
R.T.	8.981 Standard interno	
R.T.	13.961 Primidone	9,30 µg/ml
R.T.	17.709 Lamotrigina	9,10 µg/ml
R.T.	20.533 Felbamato	39,90 µg/ml

**ANTIEPILETTICI 2 SIERICI e/o PLASMATICI**  
( Cromatogrammi di Riferimento )



**Fig. 3 : Campione di plasma arricchito**

R.T.	7.502	Etosuccimide	127,35 µg/ml
R.T.	9.014	Standard interno	
R.T.	14.051	Primidone	17,98 µg/ml
R.T.	17.827	Lamotrigina	18,27 µg/ml
R.T.	20.776	Felbamato	78,92 µg/ml



**Fig. 4 : Campione di plasma arricchito**

R.T.	7.496	Etosuccimide	37,56 µg/ml
R.T.	8.985	Standard interno	
R.T.	13.974	Primidone	4,65 µg/ml
R.T.	17.736	Lamotrigina	4,55 µg/ml
R.T.	20.604	Felbamato	19,95 µg/ml