

ANTIEPILETTICI 3 SIERICI e/o PLASMATICI in UV – Codice Z04710

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 e dei loro principali metaboliti:

1. *Etosuccimide*
2. *Primidone*
3. *Lamotrigina*
4. *Felbamato*
5. *Monoidrossicarbamazepina*
6. *Epossido della Carbamazepina*
7. *Oxcarbazepina*

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

CE

Release N° 008	Antiepilettici 3 sierici e/o plasmatici in UV	Marzo 2010
----------------	-----------------------------------------------	------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo :

Gli Antiepilettici vengono isolati trattando il plasma o il siero con un opportuno precipitante. 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

Range terapeutico nel plasma :

<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
<i>Mono-idrossi-carbamazepina</i>	3 – 40 µg/ml
<i>Epossido della Carbamazepina</i>	3 – 40 µg/ml
<i>Oxcarbazepina</i>	3 – 40 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 5 ml**

Reagente B – Soluzione Precipitante, **1 x 5 ml**

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

Reagente D – Soluzione Test 7 parametri, **1 x 1 ml**

Reagente E – Soluzione Test Etosuccimide, **1 x 3 ml**

Reagente F – Soluzione Test Primidone, **1 x 3 ml**

Reagente G – Soluzione Test Lamotrigina, **1 x 3 ml**

Reagente H – Calibratore liofilo plasmatico, **2 x 2 ml**

Reagente M – Fase Mobile, **7 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 o 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 H₂O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente D** - Soluzione Test 7 parametri

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. **Identica procedura se si utilizzando i Reagenti E, F o G che servono esclusivamente per identificare i tempi di ritenzione degli analiti, e non vanno usati come calibratori.**

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione del Calibratore, dei Controlli e dei Campioni

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

	Bianco	Calibratore	Controllo	Campione
Acqua di grado HPLC	200 µl			
Reagente H – Calibratore plasmatico		200 µl		
Controllo			200 µl	
Campione				200 µl
Reagente A - Deproteinizzante con Standard Interno	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

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

FASE 2 : Aggiungere a ciascuna provetta 50 µl di **Reagente B** – Sol. Precipitante

Al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti.

FASE 4 : Trasferire 200 µl del sovranatante limpido in una provetta.

- Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di **Reagente C** – 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.

Release N° 008	Antiepilettici 3 sierici e/o plasmatici in UV	Marzo 2010
----------------	-----------------------------------------------	------------

ANTIPILETTICI 3 - Avvertenze

REAGENTE D: SOLUZIONE TEST (7 PARAMETRI)

ANTIPILETTICI :	
Etosuccimide	613,0 µg/ml
Primidone	76,0 µg/ml
Lamotrigina	63,0 µg/ml
Felbamato	375,0 µg/ml
Mono-idrossi-carbamazepina	45,0 µg/ml
Epossido della Carbamazepina	51,0 µg/ml
Oxcarbazepina	260,0 µg/ml

REAGENTE E: SOLUZIONE TEST ETOSUCCIMIDE

Etosuccimide	613,0 µg/ml
---------------------	-------------

REAGENTE F: SOLUZIONE TEST PRIMIDONE

Primidone	76,0 µg/ml
------------------	------------

REAGENTE G: SOLUZIONE TEST LAMOTRIGINA

Lamotrigina	63,0 µg/ml
--------------------	------------

REAGENTE H: CALIBRATORE LIOFILO PLASMATICO Lot. 002

Etosuccimide	90,87 µg/ml
Primidone	11,15 µg/ml
Lamotrigina	10,54 µg/ml
Felbamato	58,24 µg/ml
Mono-idrossi-carbamazepina	24,29 µg/ml
Epossido della Carbamazepina	50,92 µg/ml
Oxcarbazepina	21,24 µg/ml
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 2 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente per 10 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.	
Conservazione e stabilità : i Calibratori liofilici sono stabili 18 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Almeno 5 ore a T Ambiente, 24 ore se conservati a 2–8 °C e 1 mese a –20 °C una volta ricostituiti. Non usarli dopo la data di scadenza.	
Confezionamento : 2 x 2 ml	
Precauzioni : questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.	

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	205 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	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 H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di H₂O 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 H₂O e scaricare. Flussare una soluzione di H₂O : Metanolo o Acetonitrile (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo far passare 30 ml di H₂O prima di condizionala con la Fase Mobile.

PARAMETRI HPLC

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

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

ATTENUAZIONE	8
--------------	---

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZION E
Z-04716	Calibratore plasmatico per Antiepilettici 3	4 x 2 ml
Z-04717	Controllo plasmatico per Antiepilettici 3, Livello 1	5 x 2 ml
Z-04718	Controllo plasmatico per Antiepilettici 3, Livello 2	5 x 2 ml
Z-04719	Controllo plasmatico per Antiepilettici 3, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C18 (150 x 4,6mm -4 um)	1 PZ
ZA600MG	Metaguard – Guard Column	1 x 3 PZ
ZA6005	Metasaver Precolumn Filter 0.5 um	1 x 10 PZ
ZITC4000V1	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
ZITC400054B	Tappi neri per vial di vetro a volume ridotto	1 x 100 PZ



ANTIEPILETTICI 3 SIERICI e/o PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

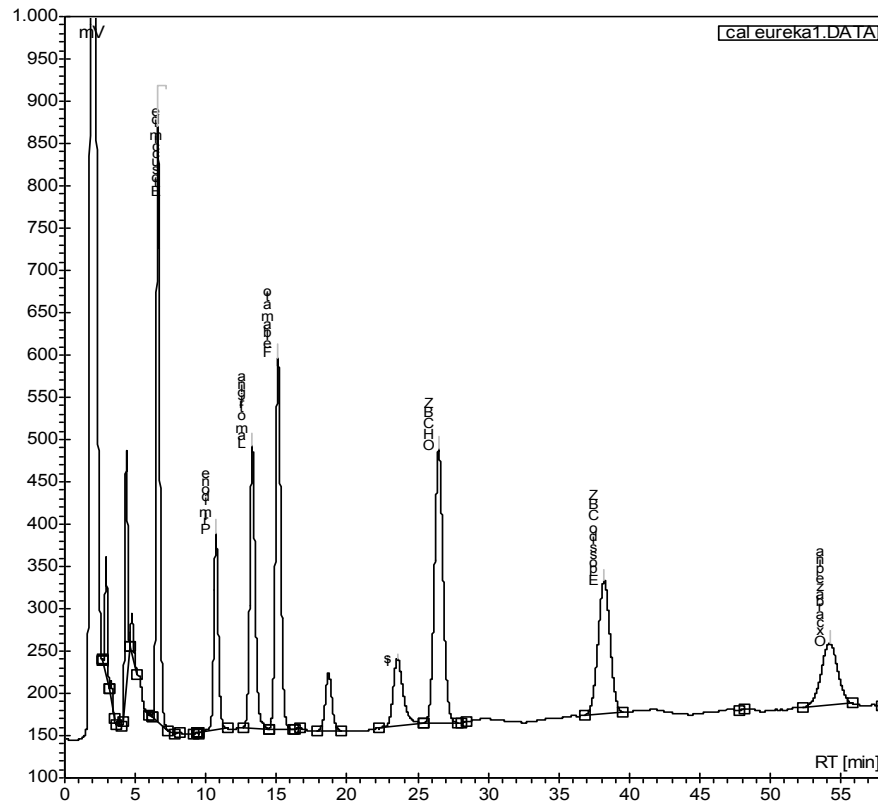


Fig. 1 : Calibratore liofilo plasmatico		
R.T.	6.39 Etosuccimide	120 mg/l
R.T.	10.21 Primidone	33,79 mg/l
R.T.	12.41 Lamotrigina	22,99 mg/l
R.T.	13.95 Felbamato	150,76 mg/l
R.T.	23.59 Standard Interno	
R.T.	26.68 Mono-idrossi-Carbamazepina	60,05 mg/l
R.T.	38.14 Epossido della Carbamazepina	45,56 mg/l
R.T.	53.91 Oxcarbazepina	44,41 mg/l

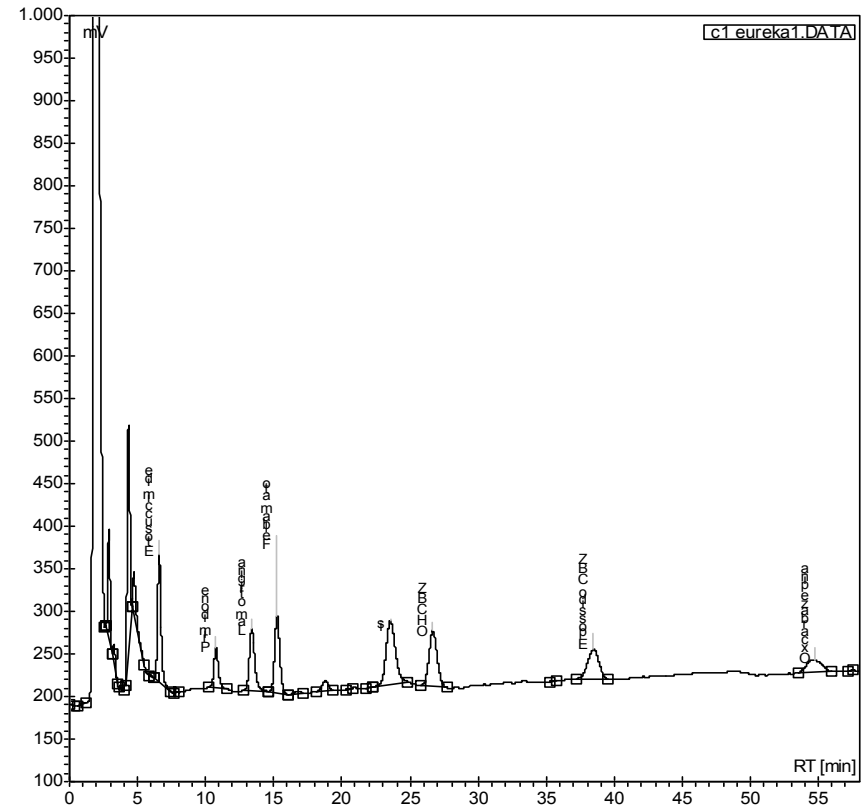


Fig. 2 : Controllo liofilo plasmatico livello 1		
R.T.	6.35 Etosuccimide	26 mg/l
R.T.	10.13 Primidone	7,5 mg/l
R.T.	12.24 Lamotrigina	5,4 mg/l
R.T.	13.84 Felbamato	33,9 mg/l
R.T.	23.53 Standard Interno	
R.T.	25.95 Mono-idrossi-Carbamazepina	13,1 mg/l
R.T.	38.05 Epossido della Carbamazepina	11,1 mg/l
R.T.	54.11 Oxcarbazepina	9,7 mg/l