

LEVETIRACETAM PLASMATICO in UV – Codice Z04310

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 le concentrazioni plasmatiche del seguente farmaco antiepilettico:

1. Levetiracetam

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



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

Release N° 008	Levetiracetam plasmatico in UV	Marzo 2010
----------------	--------------------------------	------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo :

Il **Levetiracetam** viene isolato trattando il plasma 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

Range Terapeutico nel plasma :

Levetiracetam 10 – 37 µg/ml

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C. Il Calibratore liofilo è stabile 24 mesi se conservato 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 5 ml**

Reagente D – Calibratore liofilo, **1 x 2 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente M – Fase Mobile, **2 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 H₂O 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 dell' analita 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 :

	Bianco	Calibratore	Campione
Acqua di grado HPLC	200 µl		
Reagente D - Calibratore		200 µl	
Campione			200 µl
Reagente A - Deproteinizzante con Standard Interno	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 di sovranatante in una provetta pulita.

- 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.

Release N° 008	Levetiracetam plasmatico in UV	Marzo 2010
----------------	--------------------------------	------------

LEVETIRACETAM - Avvertenze

REAGENTE C: SOLUZIONE TEST

LEVETIRACETAM	500 µg/ml
---------------	-----------

REAGENTE D: CALIBRATORE LIOFILO Lot.001

LEVETIRACETAM	23,4 µg/ml
Modalità d'uso : il Calibratore deve essere usato per calibrare il sistema HPLC. Deve essere preparato come un plasma campione.	
Ricostituzione : aggiungere esattamente 2 ml di acqua di grado HPLC, rimettere il tappo e mescolare per inversione. Lasciare riposare per 5-10 minuti.	
Conservazione e stabilità : sottoforma di liofilo il calibratore è stabile 24 mesi dalla data di preparazione se conservato a 2-8 °C. Dopo la ricostituzione la stabilità è di 1 mese a 2-8 °C o 6 mesi a -20 °C se ben chiuso e conservato al buio. Non usarlo dopo la data di scadenza.	
Confezionamento : 1 x 2 ml	
Precauzioni : Il plasma umano usato per la costruzione di questo calibratore va considerato come potenzialmente infetto e quindi trattato con cura.	

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 Metasaver Precolumn Filter 0.5 µm (1 x 10 pz.) cod. ZA6005.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di H ₂ O per HPLC, al flusso di 1,2 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Filtrare la fase mobile con pompa da vuoto e filtro idoneo da 0,22 µ o 0,45 µ. 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. E' possibile effettuare analisi a ricircolo di fase, purchè si abbia l'accortezza di filtrare la stessa Fase Mobile con filtro da 0,22 µ prima di ogni seduta analitica. 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 ₂ O e scaricare. Flussare una soluzione di H ₂ 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 ₂ O prima di condizionarla 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	CONFEZIONE
Z04316	Calibratore plasmatico per Levetiracetam	4 x 2 ml
Z04317	Controllo plasmatico per Levetiracetam – Livello 1	5 x 2 ml
Z04318	Controllo plasmatico per Levetiracetam – Livello 2	5 x 2 ml
Z04319	Controllo plasmatico per Levetiracetam – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C 18 (150 x 4,6mm -4 um)	1 PZ
ZA6005	Metasaver Precolumn Filter 0.5 um	1 x 10 PZ
S29307U	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul + tappini	1 x 100 PZ



LEVETIRACETAM PLASMATICO

(Cromatogrammi di riferimento)

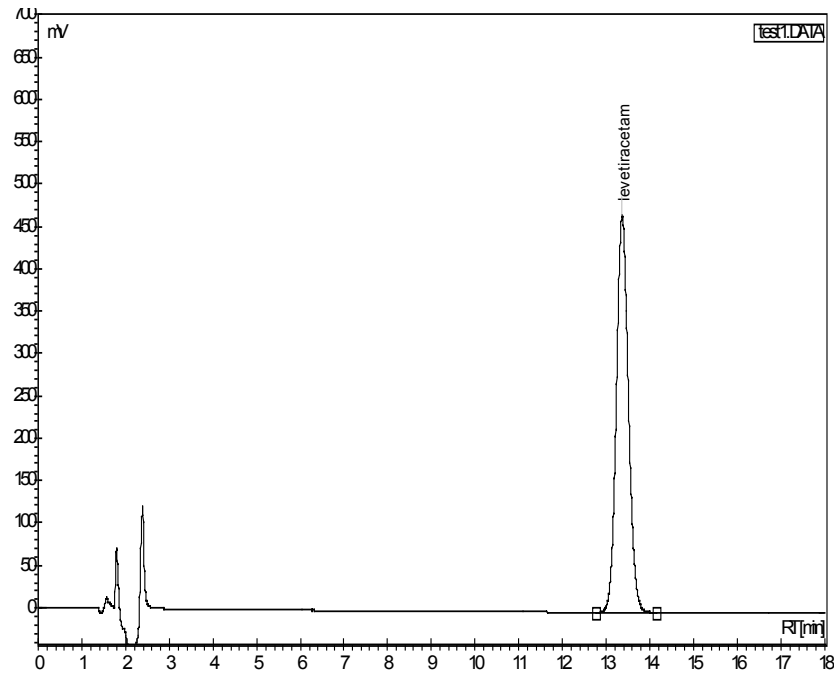


Fig. 1 :	Soluzione Test
	R.T. 13.37 Levetiracetam

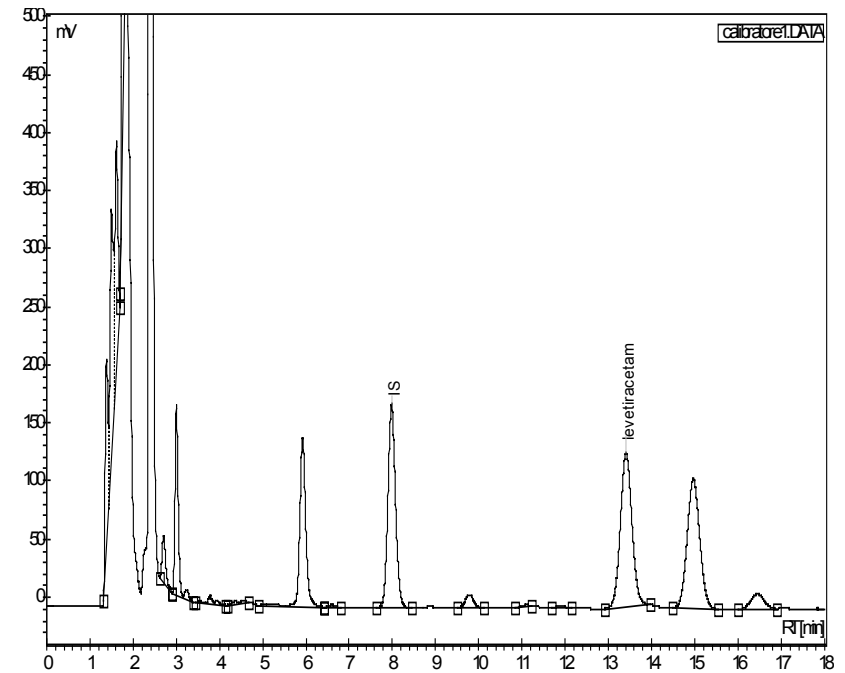


Fig. 2 :	Calibratore liofilo plasmatico
	R.T. 7.98 Standard interno
	R.T. 13.41 Levetiracetam 26,57 µg/ml

LEVETIRACETAM PLASMATICO

(Cromatogrammi di riferimento)

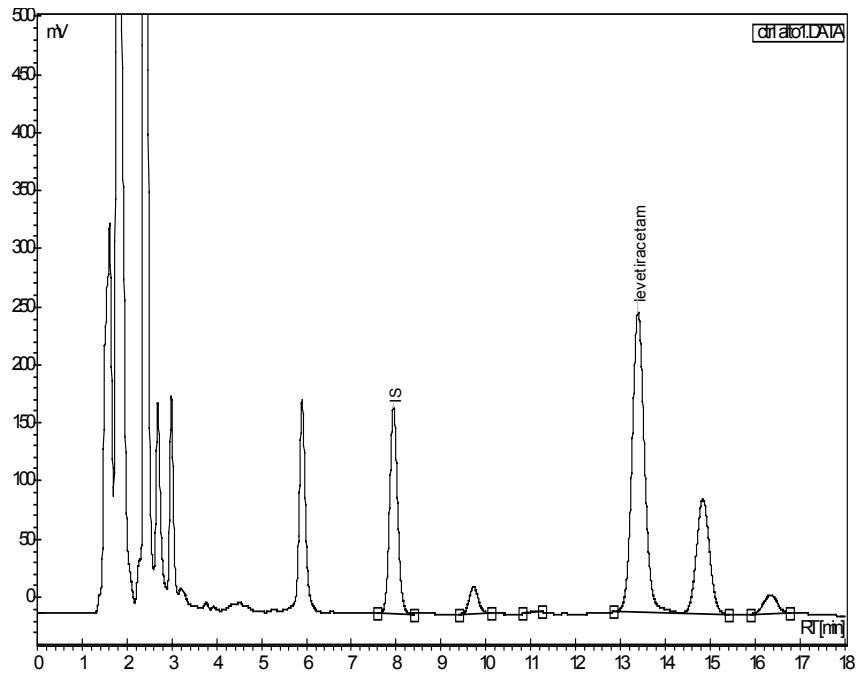


Fig. 3 :	Controllo liofilo plasmatico livello 2		
	R.T. 7.97	Standard interno	
	R.T. 13.39	Levetiracetam	48,17 µg/ml

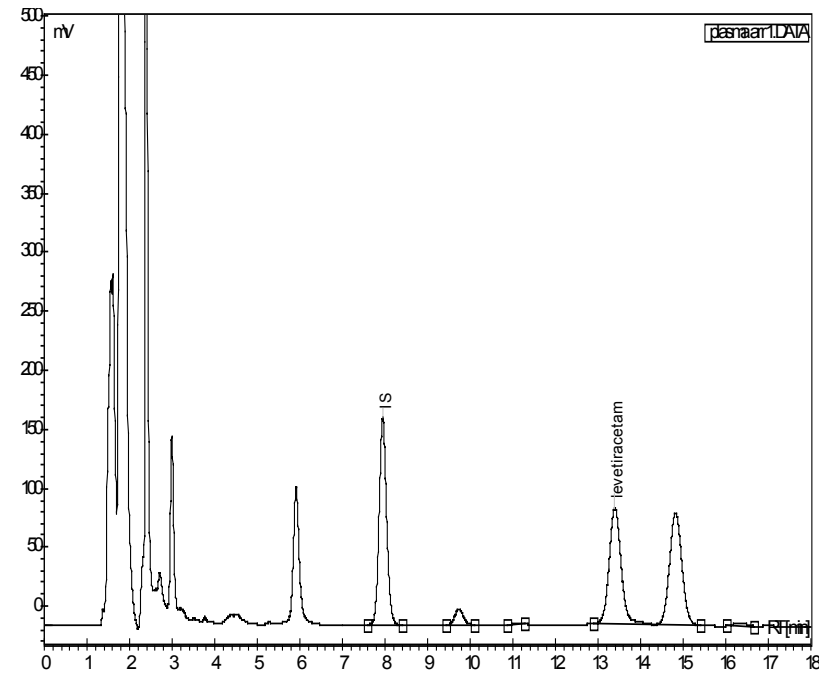


Fig. 4 :	Campione di plasma arricchito		
	R.T. 7.98	Standard interno	
	R.T. 13.04	Levetiracetam	18,80 µg/ml