

**AMIODARONE e DESETILAMIODARONE SIERICI e/o PLASMATICI in UV – Codice
Z33010**

INTRODUZIONE

L' Amiodarone {Butil-2-(diedro-3,5 β -N-dietilaminoetossi-4-benzoil)-3-benzofurano)} di PM=654,32 è un farmaco antiaritmico usato per il trattamento delle aritmie sopraventricolari e ventricolari, laddove altre molecole antiaritmiche siano inefficaci.

L'Amiodarone ha la capacità di bloccare gli α e β adrenorecettori.

Esiste una correlazione tra la dose orale assunta e le concentrazioni nei tessuti bersaglio e nel plasma, ma le concentrazioni plasmatiche in pazienti diversi che assumono la stessa dose possono variare sensibilmente.

L' efficienza dell' Amiodarone si esplica a concentrazioni prossime a 1,0 mg/litro, mentre a concentrazioni > di 2,5 mg/litro risulta tossico.

L'Amiodarone è legato alle proteine plasmatiche per circa il 96%.

Il suo maggior metabolita attivo è l'N-desetil-amiodarone.

E' una molecola altamente instabile; prove eseguite ponendo 5 μ g/ml di Amiodarone in una soluzione fisiologica a pH=7,4 in provette di plastica, hanno dimostrato, dopo 12 minuti, a temperatura ambiente, una diminuzione di concentrazione pari al 20%; la stessa soluzione dopo 4 giorni a 5°C conteneva solo il 10% del farmaco immodificato.

L'Amiodarone risulta invece stabile in una soluzione etanolica al 50%.

Risulta inoltre stabile per oltre 6 settimane se conservato in provette di vetro, a -20 °C.

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° 009	Amiodarone/desetilamiodarone sierici e/o plasmatici in UV	Aprile 2012
-----------------------	--	--------------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

L'Amiodarone e il Desetilamiodarone vengono isolati deproteinizzando il plasma con un reagente selettivo contenente lo Standard interno. 100 µl dell'estratto vengono direttamente iniettati in HPLC.

Recupero del Metodo : > 96 %

Sensibilità del Metodo : < 0,05 mg/l

Range dinamico del metodo : 0,05 – 10,0 mg/l

<u>Range terapeutico nel plasma :</u>	Amiodarone	0,25 – 2,00 mg/l
	Desetilamiodarone	0,25 – 2,00 mg/l

<u>CV%:</u>	Amiodarone	2,2 intra serie 3,4 inter serie
	Desetilamiodarone	4,2 intra serie 4,6 inter serie

<u>Contenuto della confezione :</u>	Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8° C. Il Calibratore è stabile 18 mesi a 2-8 °C.
--	--

Reagente A – Deproteinizzante con Standard interno, **1 x 40 ml**

Reagente B – Soluzione Test, **1 x 2 ml**

Reagente C – Calibratore Liofilo, **1 x 2 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente M – Fase Mobile, **2 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta : HPLC isocratico con loop da 100 µl.
Detector spettrofotometrico UV/VIS $\lambda=242$ nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale : Autocampionatore.
Computer gestionale

Modalità per il prelievo ematico : Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta con EDTA come anticoagulante.
Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il siero in provetta di vetro e stoccarlo a – 20 °C.
Stabile 6 settimane.

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test

In una provetta pipettare :

- 900 µl di Acqua grado HPLC
- 100 µl di **Reagente B – Soluzione Test**

INIEZIONE :

- Iniettare 100 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia tempi di ritenzione simili a quelli riportati 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 e dello Standard di Calibrazione

Dispensare in provetta conica da 1,5 ml con tappo:

	Calibratore	Campione
Calibratore	200 µl	
Campione		200 µl
Reagente A – Sol. Deproteinizzante	400 µl	400 µl

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

FASE 2 : Centrifugare a 10.000 rpm per 5 minuti

FASE 3 : Prelevare 300 µl di sovrnatante limpido

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

INIEZIONE :

- Iniettare 100 µl della Soluzione così ottenuta nel cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

AMIODARONE / DESETILAMIODARONE - Avvertenze

REAGENTE B : SOLUZIONE TEST

Amiodarone	Circa 16,9 mg/l
Desetilamiodarone	Circa 7,6 mg/l

REAGENTE C : CALIBRATORE PLASMATICO Lot. N° 005

Amiodarone	1,9 mg/l
Desetilamiodarone	1,8 mg/l
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. Conservare al buio. Non usarli dopo la data di scadenza.	
Confezionamento : 1 x 2 ml	
Precauzioni : questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.	

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	242 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 μ m (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. <u>Non riciclare i liquidi di lavaggio.</u> 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. 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	100 (o 50) μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 98 bar

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE
--

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z33016	Calibratore plasmatico per Amiodarone/Desetilamiodarone	4 x 5 ml
Z33017	Controllo plasmatico per Amiodarone/Desetilamiodarone, Livello 1	5 x 5 ml
Z33018	Controllo plasmatico per Amiodarone/Desetilamiodarone, Livello 2	5 x 5 ml
Z33019	Controllo plasmatico per Amiodarone/Desetilamiodarone, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C18 (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



AMIODARONE e DESETILAMIODARONE PLASMATICI in UV

Cromatogrammi di riferimento

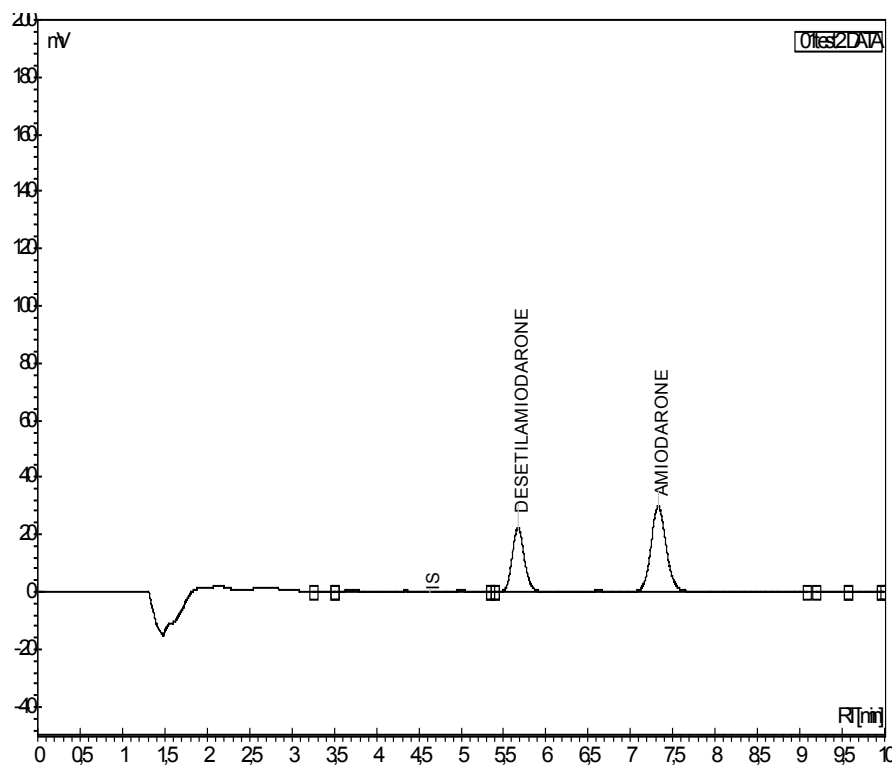


Fig. 1 Soluzione Test

R.T. 5.56	Desetilamiodarone
R.T. 7.30	Amiodarone

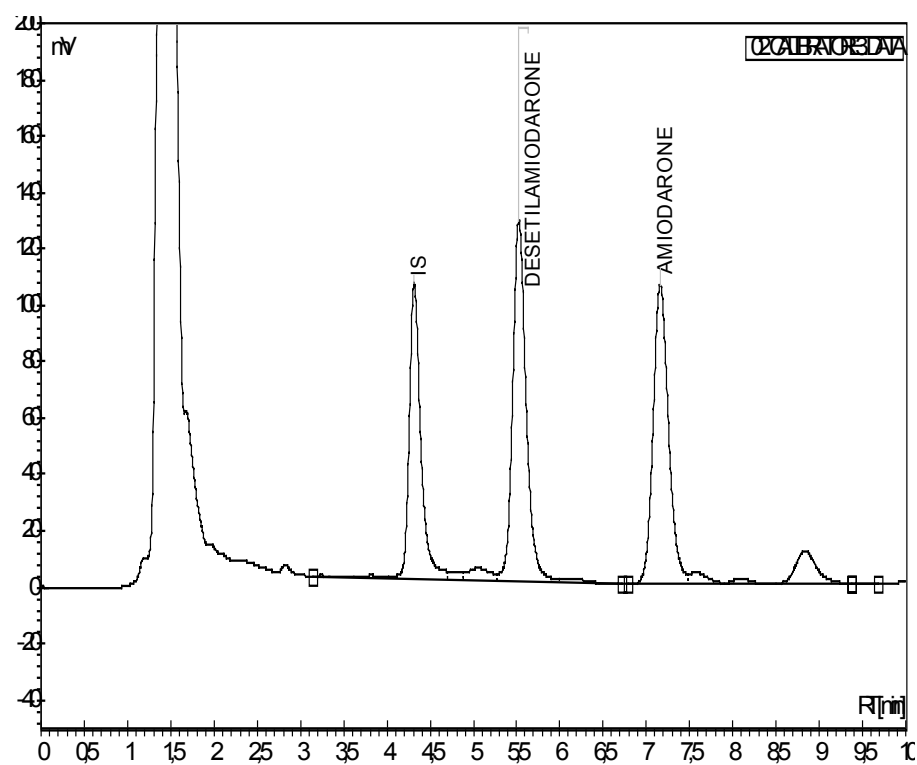


Fig. 2 Calibratore liofilo plasmatico

R.T. 4.31	Std Interno
R.T. 5.52	Desetilamiodarone 4,25 mg/l
R.T. 7.16	Amiodarone 4,25 mg/l

AMIODARONE e DESETILAMIODARONE PLASMATICI in UV

Cromatogrammi di riferimento

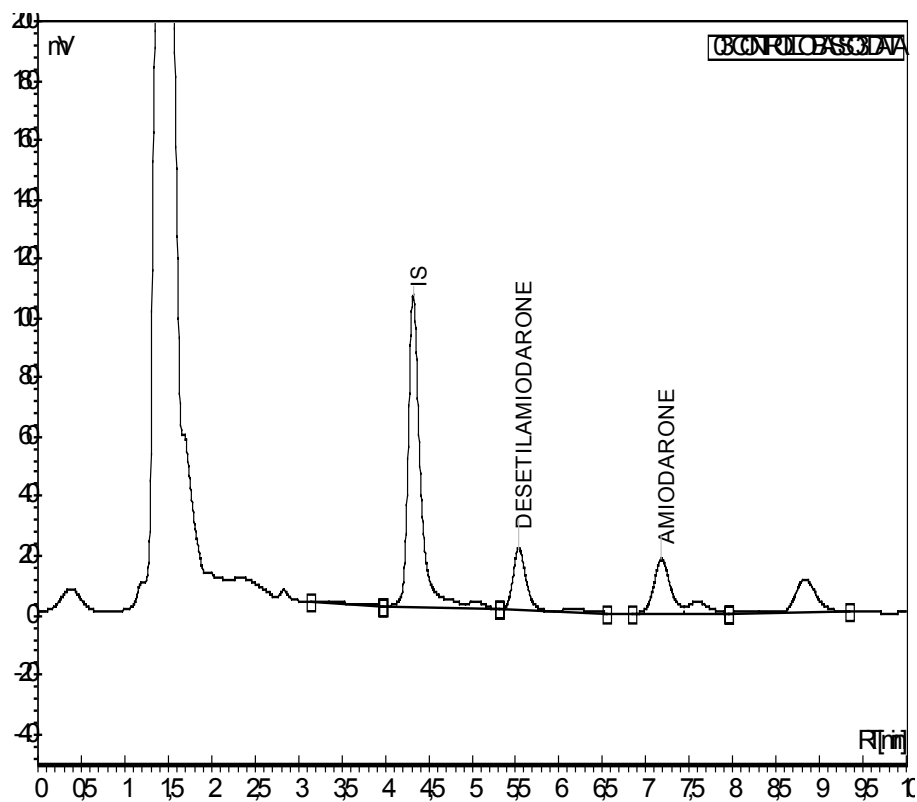


Fig. 3	Controllo liofilo plasmatico livello 1
	R.T. 4.32 Std Interno
	R.T. 5.54 Desetilamiodarone 0,69 mg/l
	R.T. 7.18 Amiodarone 0,73 mg/l

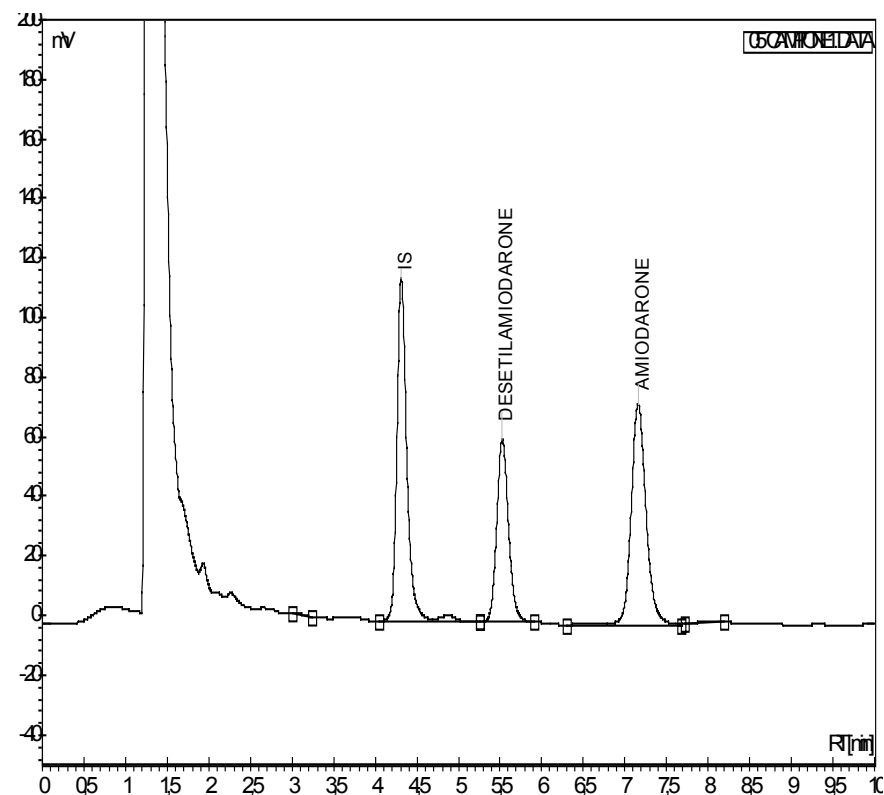


Fig. 4	Campione di plasma arricchito
	R.T. 4.31 Std Interno
	R.T. 5.53 Desetilamiodarone 3,80 mg/l
	R.T. 7.16 Amiodarone 8,45 mg/l