

BENZODIAZEPINE 1 SIERICHE e/o PLASMATICHE in UV – Codice Z34010
(Bromazepam, Lorazepam, Clonazepam, Flunitrazepam e Clordemetildiazepam)

INTRODUZIONE

Le Benzodiazepine sono i farmaci elettivi nella terapia delle sindromi ansiose. Ogni Benzodiazepina ha in proporzioni diverse azione ansiolitica, ipnotica, sedativa, miorilassante e anticonvulsivante.

Tutte le Benzodiazepine sono efficaci nell'ansia e nell'insonnia e la rapidità d'azione dipende dalla velocità con cui si raggiungono le concentrazioni efficaci nel S.N.C.

Il recettore delle Benzodiazepine è un particolare sito del recettore per il GABA- α , il *Flumazenil* è affine al recettore delle Benzodiazepine e quindi annulla l'attività anti-convulsivante delle Benzodiazepine.

Il trattamento protratto delle Benzodiazepine induce tolleranza e dipendenza.

Nel prevedere l'intensità e la durata dell'azione clinica nonché nell'effettuare il dosaggio del farmaco su liquidi biologici bisogna tener conto del fatto che le Benzodiazepine danno origine a metaboliti farmacologicamente attivi. Le Benzodiazepine sono molecole cicliche costituite da un anello benzenico condensato con un anello eterociclico eptatomico azotato in 1,4 oppure in 1,5 (diazepina). L'anello eptatomico lega in posizione 5 un fenile. Nelle triazol-Benzodiazepine c'è anche l'anello del triazolo. Le differenze fra le varie Benzodiazepine dipendono dai sostituenti sugli anelli.

Hanno una struttura molecolare idrofobica e quindi sono ben assorbite per via orale. Si distribuiscono in tutti i tessuti e superano facilmente la barriera ematocerebrale.

Le benzodiazepine così come tali e i loro metaboliti si legano alle proteine plasmatiche e sono metabolizzate a livello epatico. I loro metaboliti si formano per dealchilazione dell'atomo di azoto in posizione 1 e idrossilazione dell'atomo di carbonio in posizione 3, trasformandosi in composti meno idrofobici.

Molti di questi metaboliti sono successivamente coniugati con le proteine ed eliminati con le urine come glucoronati o solforati.

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° 015	Benzodiazepine 1 sieriche e/o plasmatiche in UV	Giugno 2014
----------------	---	-------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

Le Benzodiazepine vengono isolate purificando il siero/plasma con una colonna clean-up. Dopo l'aggiunta di uno stabilizzante l'estratto viene direttamente iniettato in HPLC.

Recupero del Metodo : > 92 %

Sensibilità del Metodo : < 10 µg/l

Range dinamico del metodo : 10 - 5000 µg/l

<u>Range terapeutico nel siero :</u>	<i>Bromazepam :</i>	10 – 250 µg/l
	<i>Lorazepam :</i>	10 – 100 µg/l
	<i>Clonazepam :</i>	10 – 100 µg/l
	<i>Flunitrazepam :</i>	5 – 50 µg/l
	<i>Clordemetildiazepam :</i>	10 – 100 µg/l

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

Reagente A – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 50 ml**

Reagente B – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 50 ml**

Reagente C – Soluzione di Lavaggio, **1 x 100 ml**

Reagente D – Soluzione Eluente, **1 x 30 ml**

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

Reagente F – Soluzione Test + Standard interno, **1 x 1 ml** **Stoccare a – 20 °C**

Reagente G – Calibratore sierico liofilo, **1 x 5 ml**

Reagente H – Soluzione Diluente, **1 x 100 ml**

Reagente I – Soluzione Standard interno, **1 x 5 ml** **Stoccare a – 20 °C**

Colonne clean-up, 100 Pz

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

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 100 µl.
Detector spettrofotometrico UV/VIS $\lambda=230$ nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore.
Computer gestionale

Modalità per il prelievo ematico :

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

PROCEDURA PREANALITICA : Preparazione e analisi delle Soluzioni Test

In una provetta di vetro pipettare:

- 900 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente F - Soluzione Test + Standard interno**

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 100 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione delle singole Benzodiazepine 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.

Importante : Questa soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparare un numero di colonne Clean-up pari al numero dei campioni da analizzare più lo Standard di Calibrazione e gli eventuali Controlli.

- Condizionare le colonne Clean-up facendo passare 500 µl di **Reagente A – Sol. di condizionamento 1**
non portare a secco
- Condizionare le colonne Clean-up facendo passare 500 µl di **Reagente B – Sol. di condizionamento 2**
non portare a secco

FASE 2 : Dispensare in provette di plastica 1 ml di Campione/Calibratore/Controlli e aggiungere 1 ml di **Reagente H – Soluzione Diluente** + 50 µl di **Reagente I – Standard interno**

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Caricare 2 ml di Campione/Calibratore/Controlli come preparati nella FASE 2 nelle colonne Clean up

Non portare a secco!

FASE 4 : Lavare le colonne Clean-up con 1 ml di **Reagente C – Sol. di Lavaggio** (*portare a secco con un leggero flusso d'aria*)

FASE 5 : Eluire con 300 µl di **Reagente D – Sol. Eluente**

FASE 6 : Aggiungere all' eluato 200 µl di **Reagente E – Sol. Stabilizzante**

Agitare al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 7 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

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

BENZODIAZEPINE - Avvertenze

REAGENTE F : SOLUZIONE TEST

BENZODIAZEPINE :	
Bromazepam	circa 10000 µg/l
Lorazepam	circa 10000 µg/l
Clonazepam	circa 10000 µg/l
Flunitrazepam	circa 10000 µg/l
Clordemetildiazepam	circa 10000 µg/l

REAGENTE G : CALIBRATORE LIOFILO SIERICO Lot. 002

Bromazepam	142,3 µg/l
Lorazepam	82,1 µg/l
Clonazepam	64,5 µg/l
Flunitrazepam	49,7 µg/l
Clordemetildiazepam	108,0 µg/l
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 5 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 7 giorni se conservati a 2-8 °C e 1 mese a -20 °C una volta ricostituiti. Non usarli dopo la data di scadenza.	
Confezionamento : 1 x 5 ml	
Precauzioni : questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.	

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	230 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 dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.
--

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> 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. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione. 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	100 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 80 bar

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE
--

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z34016	Calibratore liofilo sierico per Benzodiazepine 1	4 x 5 ml
Z34017	Controllo liofilo sierico per Benzodiazepine 1 – Livello 1	5 x 5 ml
Z34018	Controllo liofilo sierico per Benzodiazepine 1 – Livello 2	5 x 5 ml
Z34019	Controllo liofilo sierico per Benzodiazepine 1 – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C 18 (150 x 4,6mm -4 um)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ



BENZODIAZEPINE SIERICHE e/o PLASMATICHE

(Cromatogrammi di Riferimento)

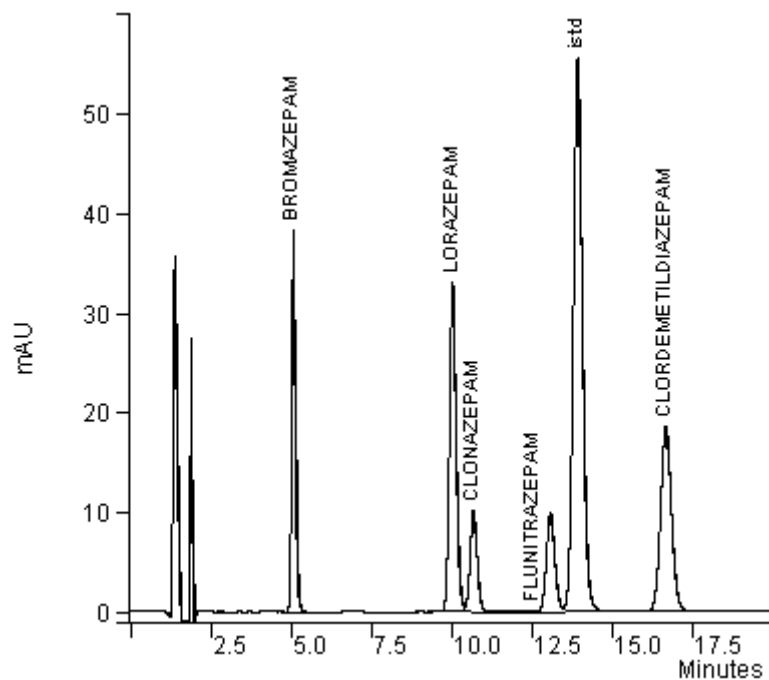


Fig. 1 : Soluzione Test	
R.T. 5.03	Bromazepam
R.T. 9.99	Lorazepam
R.T. 10.64	Clonazepam
R.T. 12.52	Flunitrazepam
R.T. 13.89	Standard interno
R.T. 16.63	Clordemetildiazepam

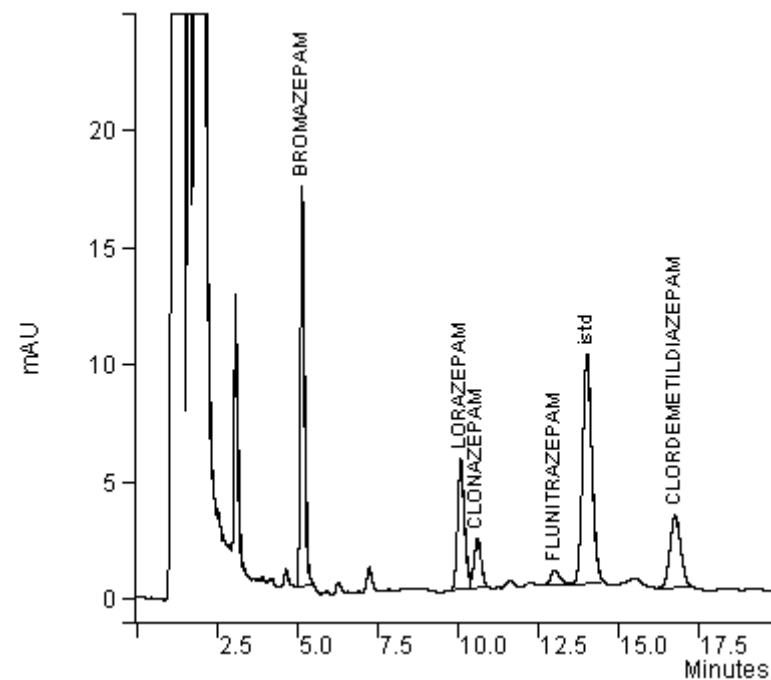


Fig. 2 : Calibratore plasmatico		
R.T. 5.10	Bromazepam	261,7 µg/l
R.T. 10.10	Lorazepam	90,0 µg/l
R.T. 10.86	Clonazepam	113,9 µg/l
R.T. 12.55	Flunitrazepam	31,1 µg/l
R.T. 14.05	Standard interno	
R.T. 16.81	Clordemetildiazepam	89,6 µg/l

Attenzione: i cromatogrammi degli Standard di Calibrazione hanno valori di concentrazione diversi da quelli riportati nelle Avvertenze

LE BENZODIAZEPINE

N°	Nome del Principio Attivo	Nome della specialità Commerciale			
1	Clordemetildiazepam	1	EN		
2	Clordiazepossido	1	Endequil	8	Psicoterina
		2	Equibral	9	Reliberan
		3	Labican	10	Seren-vita
		4	Librium	11	Smail
		5	Lixin	12	Ansiacal
		6	Philcorium	13	Benzodiapin
		7	Psicofar		
3	Diazepam	1	Aliseum	16	Apozepam
		2	Ansioli	17	AspaserineB ₆ Tranq
		3	Avex	18	Atensine
		4	Eridan	19	Benzopin
		5	Noan	20	Betapam
		6	Qetinil	21	Calmaven
		7	Quievita	22	Calmigen
		8	Tranquirit	23	Complutine
		9	Valitran	24	Diaceplex
		10	Valium	25	Dialar
		11	Vatran	26	Diaquel
		12	Alupran	27	Diazemuls
		13	Aneurol	28	Ansium
		14	Antenex	29	Anxicalm
		15	Vivol		
4	Flunitrazepam	1	Rohypnol	6	Roipnol
		2	Rohipnol	7	Darkene
		3	Hypnodorm	8	Hypnor
		4	Narcozep	9	Noriel
		5	Valsera		
5	Lorazepam	1	Temesta	13	Lorans
		2	Tran-Qil	14	Tranqipam
		3	Somagerol	15	Novolorazem
		4	Pro-Dorm	16	Duralozam
		5	Orfidal	17	Idalprem
		6	Donix	18	Tolid
		7	Securit	19	Sedizepam
		8	Tavor	20	Almazine
		9	Somnium	21	Ativan
		10	Temesta	22	Quait
		11	Punktyl	23	Lorax
		12	Control	24	Laubeel
6	N-Demetildiazepam	1	Madar		
7	Clobazam	1	Clarmyl	5	Sederlona
		2	Clopax	6	Urbadan
		3	Frisium	7	Urbanol
		4	Noiafren	8	Urbanyl

	Nome del Principio Attivo	Nome della specialità Commerciale			
8	Nitrazepam	1	Somnite	15	Ipersed
		2	Pelson	16	Mitidin
		3	Remnos	17	Mogadon
		4	Paxadorm	18	Surem
		5	Eatan-N	19	Mitidin
		6	Imeson	20	Dormo-Purem
		7	Insoma	21	Serenade
		8	Dormigen	22	Somnipar
		9	Nitrados	23	Ormodon
		10	Mogadan	24	Alodorm
		11	Somnibel-N	25	Apodorm
		12	Unisomnia	26	Arem
		13	Pelsonfilina	27	Persopir
		14	Novanox	28	Tri
9	Flurazepam	1	Staurodorm New		
10	Flurazepam Dihydrochloride	1	Dalmadorm	5	Midorm
		2	Dalmane	6	Novoflupam
		3	Dormodor	7	Remdue
		4	Irdal		
11	Flurazepam Monohydrochloride	1	Dalmadorm	5	Paxane
		2	Dalmane	6	Somnol
		3	Felison	7	Valdorm
		4	Flunox		
12	Clonazepam	1	Iktorivil	3	Rivotril
		2	Klonopin		
13	Delorazepam	1	Briantum	2	EN
14	Bromazepam	1	Bromazanil	8	Lexil
		2	Brozam	9	Lexomil
		3	Compendium	10	Lexotan
		4	Durazanil	11	Lexotanil
		5	Gityl	12	Neo-OPT
		6	Lectopam	13	Normoc
		7	Lexatin		
15	Lormetazepam	1	Ergocalm	4	Loretam
		2	Lembrol	5	Minias
		3	Loramet	6	Noctamid
16	Brotizolam	1	Lendormin	2	Lendormine
17	Midazolam	1	Dormicum	2	Hypnovel
18	Midazolam Hydrochloride	1	Dormicum	3	Versed
		2	Hypnovel		

	Nome del Principio Attivo	Nome della specialità Commerciale			
19	Midazolam Maleate	1	Dormicum		
20	Aprazolam	1	Tafil	4	Xanax
		2	Trankimazin	5	Xanor
		3	Valeans		
21	Oxazepam	1	Adumbram	6	Sedotin
		2	Isodin	7	Serpax
		3	Limbial	8	Serax
		4	Quen	9	Serenid
		5	Quilibrex		
22	Prazepam	1	Prazene	5	Mono-demetrin
		2	Centrax	6	Reapam
		3	Demetrin	7	Trepaidam
		4	Lysanxia		
23	Triazolam	1	Halcion	4	Novodorm
		2	Apo-Diazo	5	Songar
		3	Dumozolam		
24	Temazepam	1	Restoril	3	Levanxol
		2	Euhypnos		