

ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 SIERICI e/o PLASMATICI in UV – Codice Z57010
(Doxepina, Amitriptilina e Nortriptilina)

INTRODUZIONE

Gli Antidepressivi Triciclici (TCA) hanno soppiantato quasi del tutto gli Antidepressivi inibitori delle monoammino ossidasi (IMAO). L'efficacia di questi farmaci è stata ampiamente dimostrata da una serie di studi clinici effettuati negli ultimi 25 anni. Alcuni TCA come l'Amitriptilina e la Doxepina possiedono una maggiore attività sedativa rispetto ad altri TCA, infatti vengono impiegati negli episodi depressivi con una forte componente ansiosa e/o insonnia. I TCA vengono usati nella terapia della depressione, a fronte di questi sintomi: disinteresse, stanchezza, sensi di colpa, insonnia, perdita dell'appetito, idee di suicidio.

Il sovradosaggio di TCA può dare un'intossicazione acuta, che va valutata sulla base della quantità di farmaco assunta e dei livelli plasmatici di principio attivo. L'ingestione di alte dosi di TCA provoca una sintomatologia da intossicazione acuta e può essere mortale. L'intossicazione acuta da TCA interessa in particolare il cuore ed il sistema nervoso centrale, i sintomi tipici sono: dilatazione pupillare, stato confusionale, disartria e convulsioni, paralisi respiratoria ed intestinale, gravi aritmie cardiache, coma.

Le interazioni dei TCA con altri psicofarmaci sono molto pericolose. In particolare, l'interazione fra TCA ed antidepressivi IMAO deve essere evitata per l'insorgere di convulsioni, ipertensione arteriosa, collassi cardio-circolatori, morte improvvisa. Anche l'associazione di TCA con antiparkinsoniani, antistaminici, alcuni antispastici, deve essere evitata. I TCA aumentano inoltre l'effetto sedativo di molte sostanze che deprimono il sistema nervoso centrale: alcol, barbiturici, benzodiazepine e altre ancora. I TCA possono anche potenziare gli effetti delle amfetamine e di farmaci amfetamino-simili. Sono stati riportati casi di crisi ipertensiva ed emorragie cerebrali talvolta fatali nei casi di tali interazioni farmacologiche.

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° 005	Antidepressivi triciclici 2 sierici e/o plasmatici in UV	Marzo 2010
----------------	--	------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

Gli Antidepressivi triciclici vengono isolati 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 : 97 %

Sensibilità del Metodo : 5 µg/l

Range dinamico del metodo : 5 - 2000 µg/l

<u>Range terapeutico nel siero :</u>	<i>Doxepina :</i>	110 – 250 µg/l
	<i>Amitriptilina :</i>	100 – 250 µg/l
	<i>Nortriptilina :</i>	50 – 150 µg/l

Contenuto della confezione : Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C. I Calibratori sono stabili 24 mesi a 2-8 °C.

Reagente A – Soluzione Diluente, **1 x 40 ml**

Reagente B – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 300 ml**

Reagente C – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 300 ml**

Reagente D – Soluzione di Lavaggio 1, **1 x 300 ml**

Reagente E – Soluzione di Lavaggio 2, **1 x 300 ml**

Reagente F – Soluzione Eluente, **1 x 50 ml**

Reagente G – Soluzione Standard Interno Clomipramina, **1 x 2 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente H – Soluzione Test, **1 x 5 ml**

Reagente P – Calibratore plasmatico liofilo Doxepina, **1 x 5 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente Q – Calibratore plasmatico liofilo Amitriptilina e Nortriptilina, **1 x 5 ml** **Vedi Avvertenze**

Colonne clean-up, 100 Pz

Reagente M – Fase Mobile, **5 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 100 µl
Detector spettrofotometrico UV/VIS $\lambda=216$ nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità per il prelievo ematico :

Prelevare 5 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 della Soluzione Test a circa 1850 µg/l.

In una provetta pipettare :

- 400 µl di Acqua grado HPLC
- 430 µl di Metanolo
- 50 µl di **Reagente H – Sol. Test**
- 20 µl di **Reagente G – Sol. Standard Interno**

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. ***Importante*** : Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

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

Dispensare in provetta :

	Bianco	Campione	Calibratore
Acqua di grado HPLC	1000 µl		
Campione		1000 µl	
Reagente P o Reagente Q – Calibratore			1000 µl
Reagente A – Sol. Diluente	400 µl	400 µl	400 µl
Reagente G – Sol. Standard Interno	20 µl	20 µl	20 µl

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 2 : Condizionamento delle colonne Clean-up.

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

- Versare in colonna 3 ml di **Reagente B – Sol. di Condizionamento 1** *Non portare a secco !*
- Versare in colonna 3 ml di **Reagente C – Sol. di Condizionamento 2** *Non portare a secco !*

FASE 3 : Caricamento del Campione

Versare 1,420 ml di campione precedentemente preparato nelle colonne Clean-up e lasciar percolare tutto il liquido di ogni colonna Clean-up, anche con l'ausilio di un vuoto moderato, alla velocità di circa 1 ml/minuto (goccia a goccia).

FASE 4 : Lavaggio

- Lavare con 3 ml di **Reagente D – Sol. di Lavaggio 1** *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato* *Scartare l'eluato*

Release N° 005	Antidepressivi triciclici 2 sierici e/o plasmatici in UV	Marzo 2010
-----------------------	---	-------------------

- Lavare con 0,8 ml di **Reagente E – Sol. di Lavaggio 2** *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato* *Scartare l'eluato*

FASE 5 : Eluizione

- Eluire con 0,5 ml di **Reagente F – Sol. Eluente** *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato*
- Diluire l'eluato con 0,4 ml di H₂O di grado HPLC

Al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 1 giorno a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 100 µl della soluzione nel Cromatografo e attendere la stampa del cromatogramma.

ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 - Avvertenze

REAGENTE G – SOLUZIONE STANDARD INTERNO CLOMIPRAMINA

L'assunzione di Clomipramina, contemporanea agli analiti TAD2, determina una errata determinazione quantitativa.
--

REAGENTE H : SOLUZIONE TEST

ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 :	
Doxepina	33,33 mg/l
Amitriptilina	33,33 mg/l
Nortriptilina	33,33 mg/l

REAGENTE P : CALIBRATORE PLASMATICO LIOFILO - Lot.N°9226 (Doxepina)

ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 :	
Doxepina	400 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 grado HPLC e agitare delicatamente per 15 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.	
Conservazione e stabilità : i Calibratori liofilici sono stabili 24 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Almeno 25 giorni se conservati a 2–8 °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.	

REAGENTE Q : CALIBRATORE PLASMATICO LIOFILO - Lot.N°9224 (Amitriptilina,Nortriptilina)

ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 :	
Amitriptilina	400 µg/l
Nortriptilina	400 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 grado HPLC e agitare delicatamente per 15 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.	
Conservazione e stabilità : i Calibratori liofilici sono stabili 24 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Almeno 30 giorni se conservati a 2–8 °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	216 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Synergi MAX RP 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 Synergi MAX RP 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 0,8 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 0,8 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.

NON è consigliato 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 condizionarla con la Fase Mobile.

PARAMETRI HPLC

LOOP	100 µl
Flusso di lavoro consigliato	0,8 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 90 bar

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

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

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z71924	Calibratore per Antidepressivi Triciclici (Amitriptilina, Nortriptilina)	5 x 5 ml
Z88116	Calibratore per Antidepressivi Triciclici (Doxepina, Nordoxepina)	5 x 5 ml
Z71925	Controllo per Antidepressivi Triciclici (Amitriptilina, Nortriptilina)-Livello 1	5 x 5 ml
Z88117	Controllo per Antidepressivi Triciclici (Doxepina, Nordoxepina)	5 x 5 ml
ZPH00F4337EO	Colonna Analitica Synergi Max-RP (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
S394983500	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 144 PZ



ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 SIERICI e/o PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

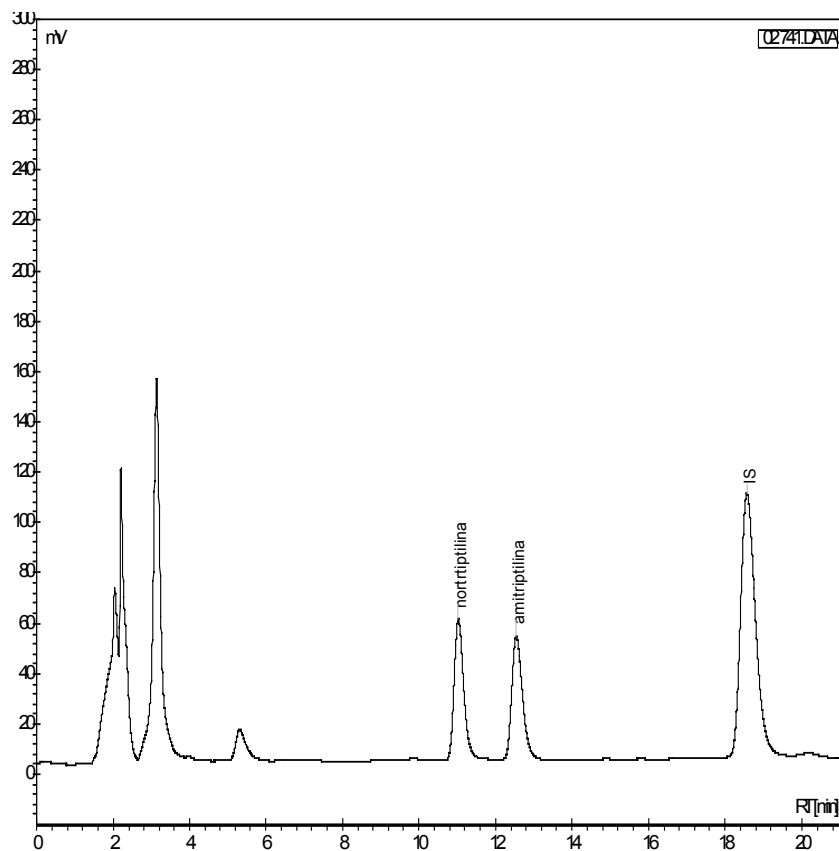


Fig. 1	Calibratore plasmatico liofilo
R.T. 11.29	Nortriptilina 400 ng/ml
R.T. 12.75	Amitriptilina 400 ng/ml
R.T. 18.96	Standard interno Clomipramina

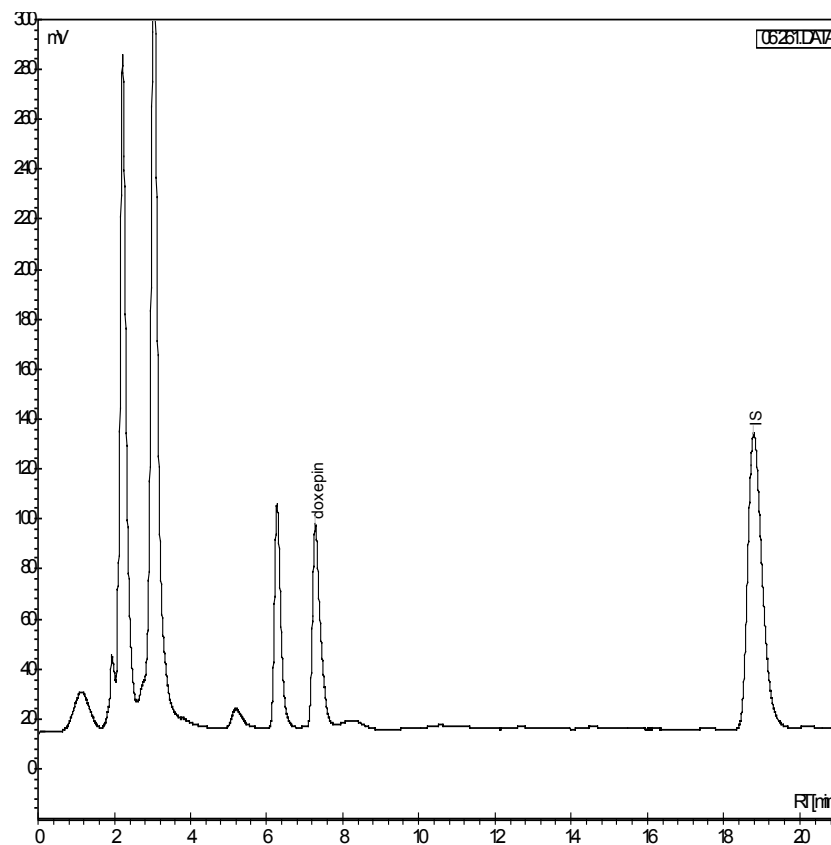


Fig. 2	Calibratore plasmatico liofilo
R.T. 7.49	Doxepina 400 ng/ml
R.T. 18.92	Standard interno Clomipramina

ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 SIERICI e/o PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

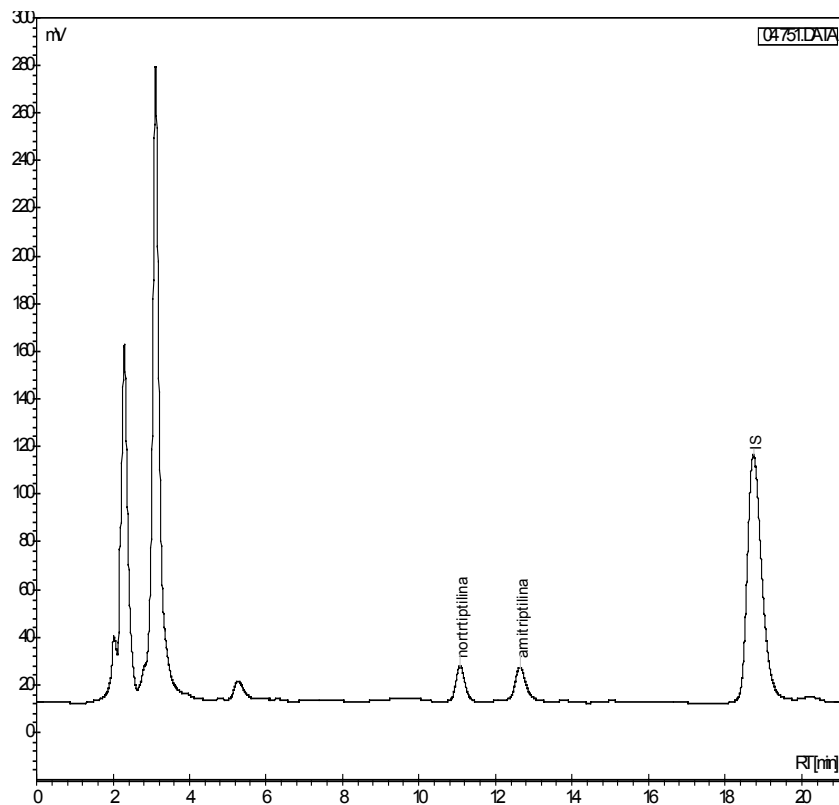


Fig. 3 *Controllo plasmatico liofilo*

R.T. 11.25	Nortriptilina	100 ng/ml
R.T. 12.72	Amitriptilina	100 ng/ml
R.T. 18.88	Standard interno Clomipramina	

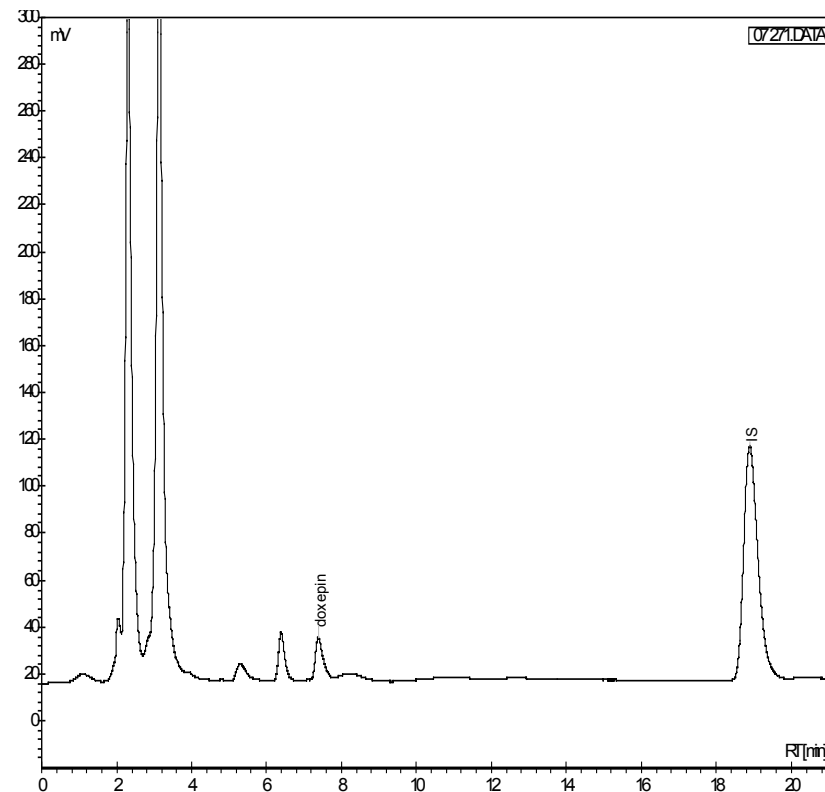


Fig. 4 *Controllo plasmatico liofilo*

R.T. 7.52	Doxepina	100 ng/ml
R.T. 19.10	Standard interno Clomipramina	

ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI 2 SIERICI e/o PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

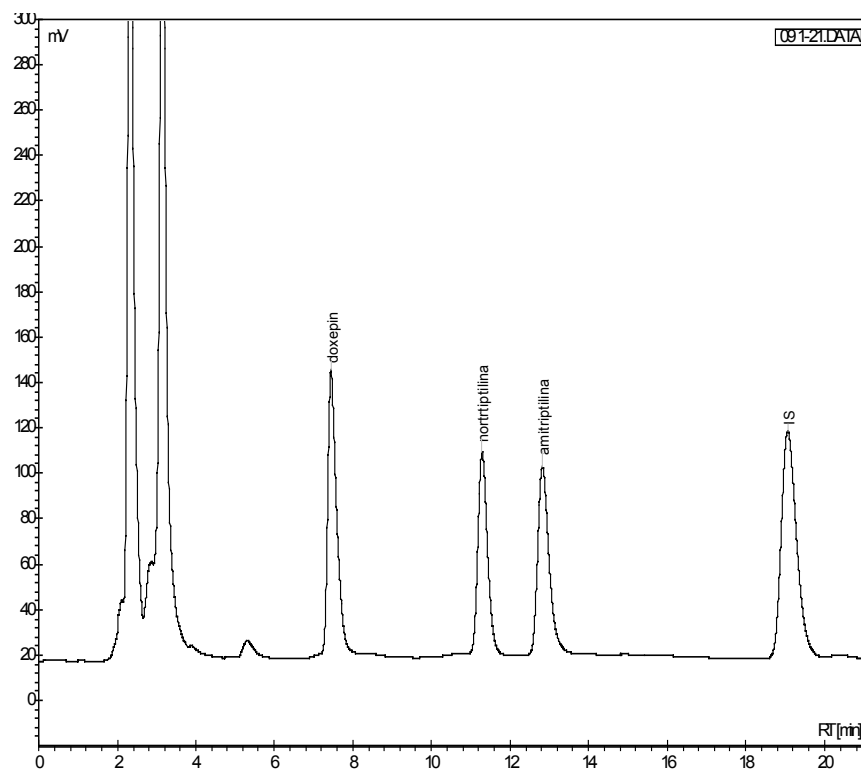


Fig. 5	Campione arricchito alto
R.T. 7.50	Doxepina 650 ng/ml
R.T. 11.30	Nortriptilina 650 ng/ml
R.T. 12.80	Amitriptilina 650 ng/ml
R.T. 19.06	Standard interno Clomipramina

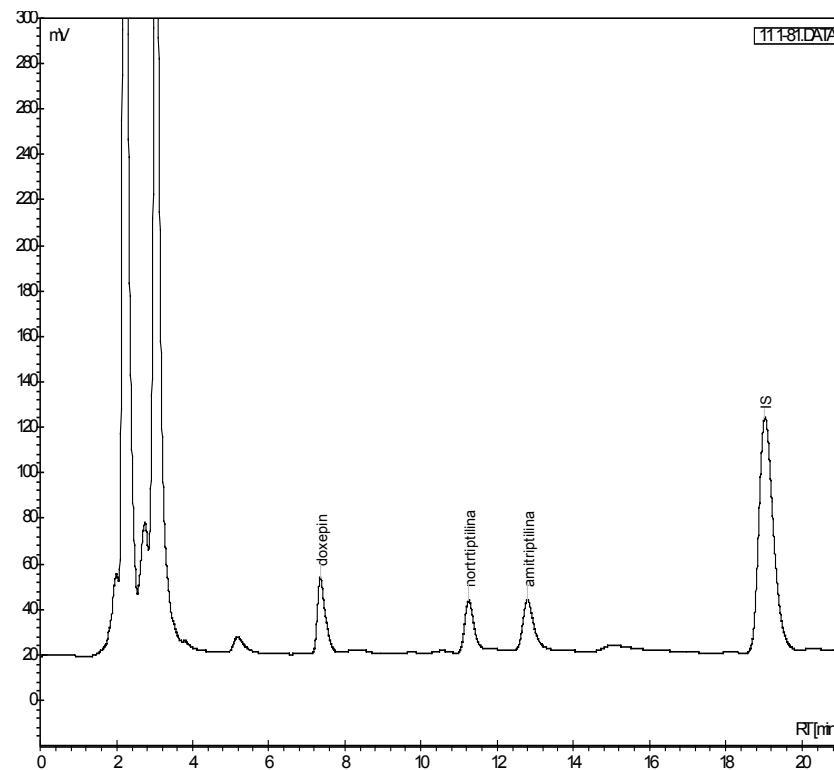


Fig. 6	Campione arricchito basso
R.T. 7.51	Doxepina 150 ng/ml
R.T. 11.34	Nortriptilina 150 ng/ml
R.T. 12.86	Amitriptilina 150 ng/ml
R.T. 19.14	Standard interno Clomipramina