

CLOZAPINA & NORCLOZAPINA SIERICHE e/o PLASMATICHE IN UV– Codice
Z76010

INTRODUZIONE

La clozapina (*Leponex®*, *Clozapina®*) è un farmaco neurolettico atipico appartenente alla classe chimica delle di-benzodiazepine, ampiamente usato nel trattamento della schizofrenia refrattaria. A differenza di altri neurolettici, non induce effetti collaterali extrapiramidali; nonostante la sua efficacia, il suo uso è limitato perché può potenzialmente causare agranulocitosi. L'assorbimento per via orale di Leponex è del 90-95%; dalla letteratura risulta che è possibile che i livelli plasmatici di clozapina e norclozapina siano influenzati da vari fattori quali sesso, età, compliance, assunzione di caffeina, fumo ed interazioni farmacologiche.

Il monitoraggio migliora l'uso di questo neurolettico poiché, concentrazioni sufficientemente alte, aumentano la risposta ed, inoltre, sembra che gli effetti collaterali (convulsioni, sedazione, ipersalivazione, ecc...) siano relativi a concentrazioni sopratherapeutiche. E' consigliato il monitoraggio periodico della conta leucocitaria.

Il seguente metodo permette di determinare nella stessa corsa cromatografica sia la clozapina che il suo metabolita principale, la norclozapina o N-desmetil clozapina, il quale non ha un range terapeutico di riferimento ma da un'indicazione di quanto il paziente metabolizzi il farmaco.

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° 006	Clozapina e Norclozapina sieriche e/o plasmatiche in UV	Luglio 2012
----------------	---	-------------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare le concentrazioni plasmatiche della **Clozapina** e del suo metabolita, la **Norclozapina**.

Ad una aliquota di plasma (250 µl) viene aggiunto un Reagente di Precipitazione ed un Coprecipitante e dopo centrifugazione, il sovranatante viene trasferito in provetta ed iniettato in HPLC.

Recupero del Metodo :

100%

Sensibilità del Metodo :

15 ng/ml

Range Dinamico del Metodo :

15 – 20.000 ng/ml

CV% inter serie:

Clozapina: 2,8%
Norclozapina: 2,9%

CV% intra serie:

Clozapina: 2,2%
Norclozapina: 2,4%

Range di normalità :

Clozapina : 300 – 700 ng/ml

Contenuto della Confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura ambiente. Il Calibratore liofilo 36 mesi dalla data di preparazione a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interno, **1 x 25 ml**

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

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

Reagente D – Calibratore Plasmatico liofilo, **1 x 2 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente M – Fase Mobile, **7 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 50 µl
Detector spettrofotometrico UV/VIS $\lambda = 254 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Preparatore automatico del campione
Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

Al mattino, prima della successiva somministrazione del farmaco. Plasma: provette con Litio Eparina o EDTA. Siero: provette senza gel.

Il campione è stabile 1 settimana a 2-8 °C e 2 mesi a – 20 °C.

PROCEDURA PREANALITICA

In una provetta pipettare :

- 800 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente C** - Soluzione Test
- 100 µl di **Reagente A** – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interno

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 50 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione della Clozapina 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 provetta:

	Calibratore	Campione	Controllo
Reagente D – Calibratore Plasmatico	250 µl		
Campione		250 µl	
Controllo			250 µl
Reagente A – Sol. Deproteinizzante	100 µl	100 µl	100 µl
Reagente B – Sol. Coprecipitante	50 µl	50 µl	50 µl

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 30 secondi

FASE 2 : Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti.

FASE 3 : Trasferire tutto il sovranatante in una provetta pulita.

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

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Release N° 006	Clozapina e Norclozapina sieriche e/o plasmatiche in UV	Luglio 2012
-----------------------	--	--------------------

CLOZAPINA E NORCLOZAPINA SIERICHE e/o PLASMATICHE – Avvertenze

REAGENTE C : SOLUZIONE TEST

CLOZAPINA	10.000 µg/l
NORCLOZAPINA	10.000 µg/l

REAGENTE D : CALIBRATORE PLASMATICO LIOFILO Lot. 004

CLOZAPINA	515,9 µg/l
NORCLOZAPINA	496,4 µg/l
Modalità d'uso : i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Per la ricostituzione aggiungere 2 ml di acqua di grado HPLC. Devono essere mescolati per 15 minuti e quando tutto il materiale è dissolto sono pronti per l'uso.	
Conservazione e stabilità : i Calibratori sono stabili 36 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Dopo la ricostituzione sono stabili 1 giorno a 2–8 °C e 7 giorni a – 20 °C. Non usarli dopo la data di scadenza.	
Confezionamento : 1 x 2 ml	
Precauzioni : il plasma umano usato per la costruzione di questi Calibratori è esente da virus dell'epatite B e HIV. In ogni caso va considerato come potenzialmente infettivo e trattato con cura.	

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	254 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo Genesis C18 (150 x 4,6 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 C18 (150 x 4,6 mm - 4 µm). Disconnettere il detector e far passare una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) per 20 minuti al flusso di 1 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche 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. NON è possibile lavorare a ricircolo di fase mobile.

PULIZIA DELLA COLONNA e DELL'AGO DI INIEZIONE

Disconnettere il detector. Flussare H ₂ O per 20 minuti a l flusso di 1 ml/min, poi soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) per 20 minuti al flusso di 1 ml/minuto e scaricare. La colonna va stoccata in una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v). L'ago di iniezione va lavato con una soluzione di H ₂ O : Etanolo o Acetonitrile (80 : 20 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 130 bar

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE
--

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z76016	Calibratore liofilo in siero per Clozapina e Norclozapina	4 x 2 ml
Z76017	Controllo liofilo in siero per Clozapina e Norclozapina, Livello 1	5 x 2 ml
Z76018	Controllo liofilo in siero per Clozapina e Norclozapina, Livello 2	5 x 2 ml
Z76019	Controllo liofilo in siero per Clozapina e Norclozapina, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 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 + tappi	1 x 100 PZ



CLOZAPINA E NORCLOZAPINA PLASMATICHE (Cromatogrammi di riferimento)

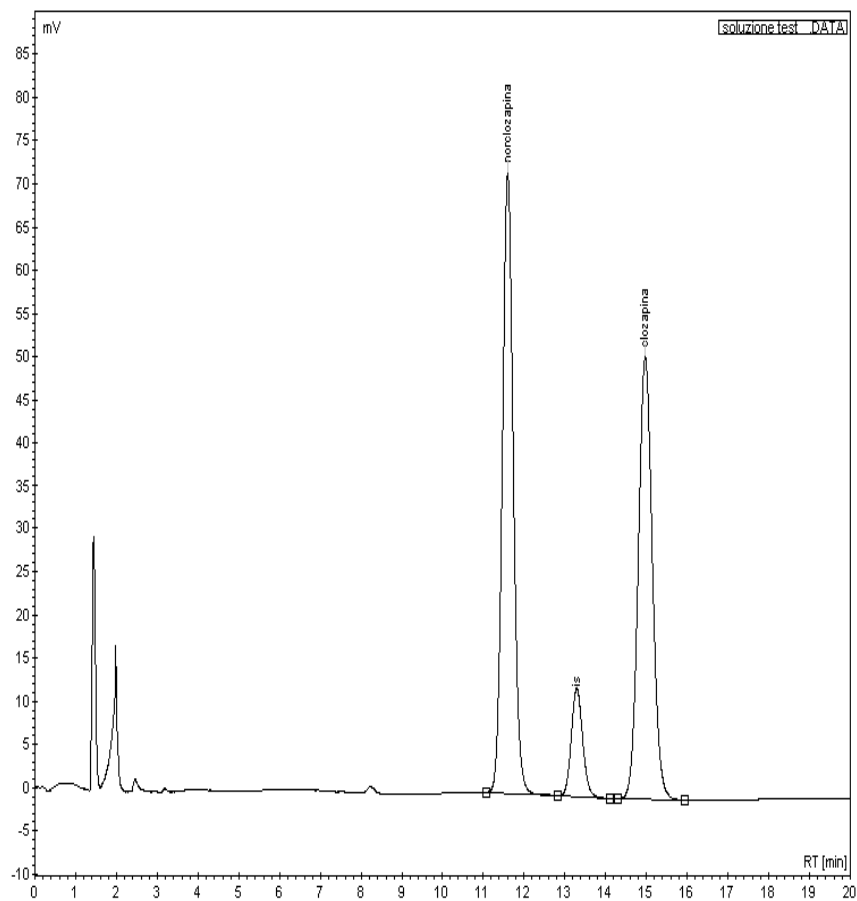


Fig. 1 : *Soluzione Test*

	R.T. 11.6 Norclozapina
	R.T. 13.3 Standard Interno
	R.T. 14.9 Clozapina

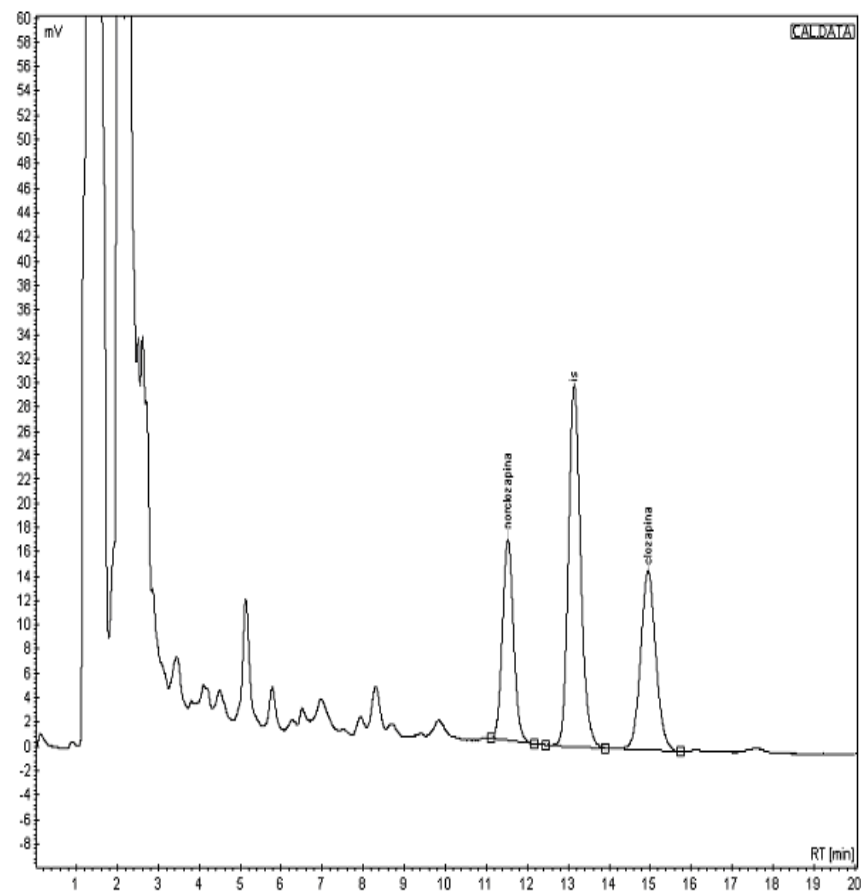


Fig. 2 : *Calibratore plasmatico*

	R.T. 11.5 Norclozapina	497 µg/l
	R.T. 13.1 Standard Interno	
	R.T. 14.9 Clozapina	538 µg/l

CLOZAPINA E NORCLOZAPINA PLASMATICHE (Cromatogrammi di riferimento)

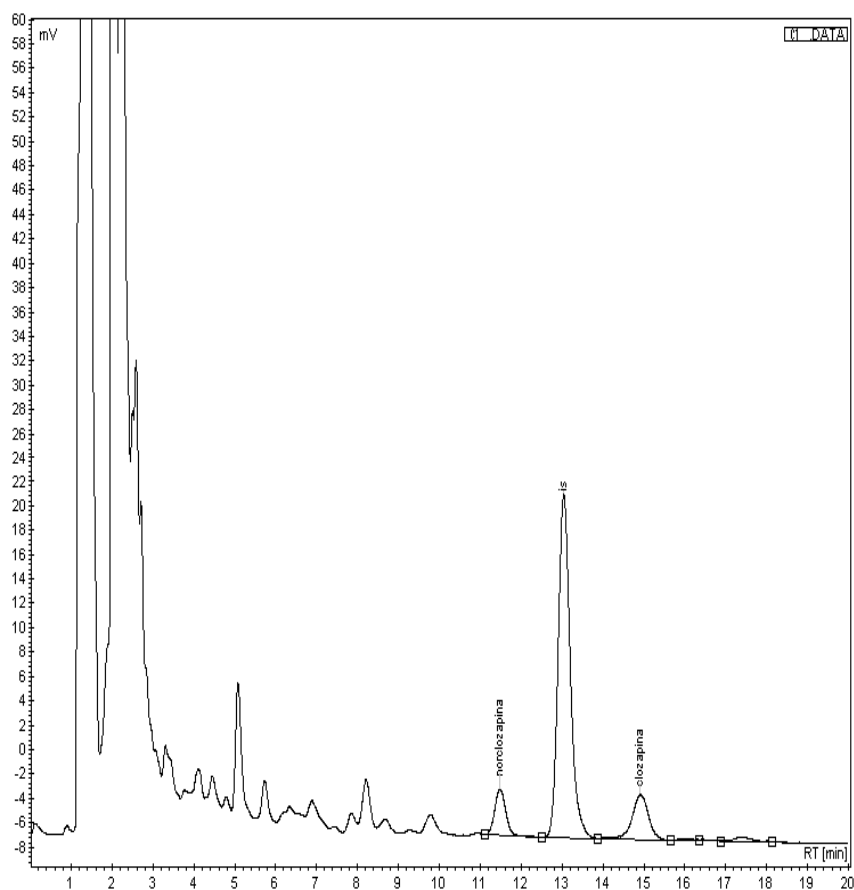


Fig. 3 :	Controllo basso		
	R.T. 11.5	Norclozapina	122 µg/l
	R.T. 13.0	Standard Interno	
	R.T. 14.9	Clozapina	154 µg/l

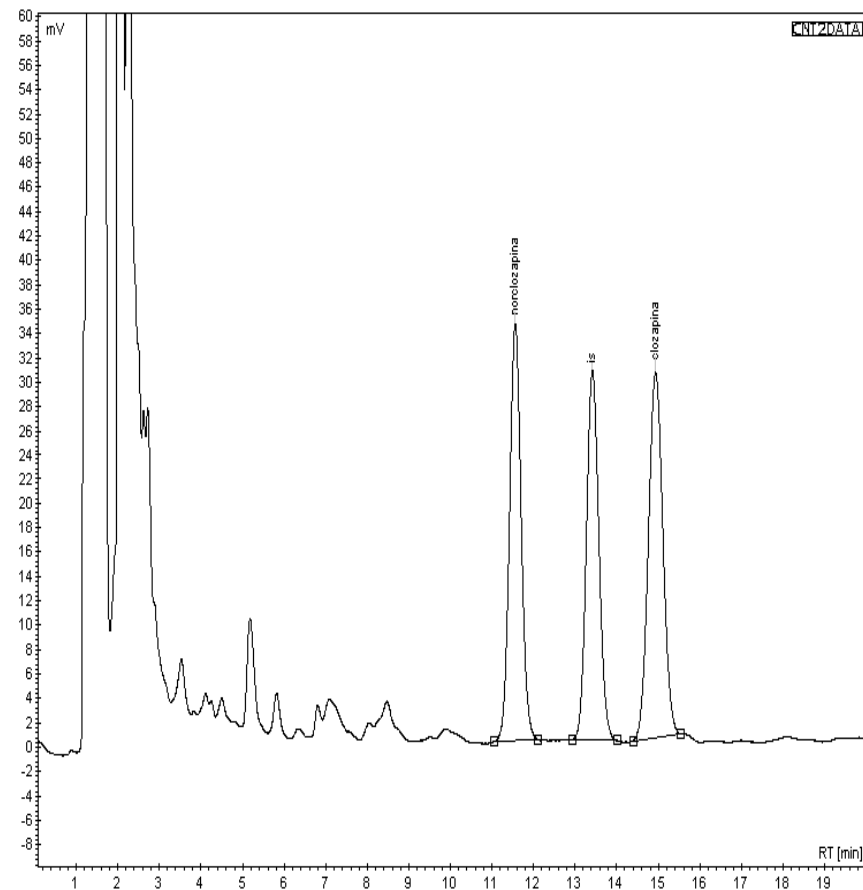


Fig. 4 :	Controllo alto		
	R.T. 11.6	Norclozapina	1034 µg/l
	R.T. 13.4	Standard Interno	
	R.T. 14.9	Clozapina	1000 µg/l