

ANTIEPILETTICI plasmatici in LC-MS – Standard interni deuterati - Codice LC05015
(Levetiracetam, Lamotrigina, Primidone, Oxcarbazepina, Carbamazepina Epossido, Monoidrossicarbamazepina, Carbamazepina, Felbamato, Desmetilsuccimide, Rufinamide, Fenitoina, Metosuccimide, Topiramato, Fenobarbital, Acido Valproico, Etosuccimide, Lacosamide, Zonisamide, Perampanel)

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 simultaneamente le concentrazioni sieriche e/o plasmatiche dei seguenti farmaci antiepilettici : *Levetiracetam, Lamotrigina, Primidone, Oxcarbazepina, Carbamazepina Epossido, Monoidrossicarbamazepina, Carbamazepina, Felbamato, Desmetilsuccimide, Rufinamide, Fenitoina, Metosuccimide, Topiramato, Fenobarbital, Acido Valproico, Etosuccimide, Lacosamide, Zonisamide, Perampanel.*

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° 002	Antiepilettici plasmatici in LC/MS – Std interni deuterati	Febbraio 2017
----------------	--	---------------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo :

Gli Antiepilettici vengono isolati trattando il plasma o il siero con un opportuno deproteinizzante. Dopo l'aggiunta di uno stabilizzante, la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Sensibilità del Metodo :

Levetiracetam	0,07 µg/ml
Lamotrigina	0,03 µg/ml
Primidone	0,07 µg/ml
Oxcarbazepina	0,03 µg/ml
Carbamazepina Epossido	0,02 µg/ml
Monoidrossicarbamazepina	0,07 µg/ml
Carbamazepina	0,01 µg/ml
Felbamato	0,1 µg/ml
Rufinamide	0,02 mg/l
Desmetilsuccimide	0,3 mg/l
Fenitoina	0,3 mg/l
Metosuccimide	0,3 mg/l
Topiramato	0,1 mg/l
Fenobarbital	1,5 µg/ml
Ac. Valproico	2,5 mg/l
Etosuccimide	5,0 µg/ml
Lacosamide	0,03 mg/l
Zonisamide	0,07 µg/ml
Perampanel	0,001 µg/ml

Range dinamico del metodo :

Levetiracetam	0,2 – 100 µg/ml
Lamotrigina	0,1 – 30 µg/ml
Primidone	0,2 – 30 µg/ml
Oxcarbazepina	0,1 – 100 µg/ml
Carbamazepina Epossido	0,5 – 100 µg/ml
Monoidrossicarbamazepina	0,1 – 100 µg/ml
Carbamazepina	0,02 – 30 µg/ml
Felbamato	0,3 – 150 µg/ml
Rufinamide	0,05 – 100 mg/l
Desmetilsuccimide	1 – 100 mg/l
Fenitoina	0,8 – 50 mg/l
Metosuccimide	1 – 100 mg/l
Topiramato	0,3 – 100 mg/l
Fenobarbital	5 – 100 µg/ml
Ac. Valproico	10 – 200 mg/l
Etosuccimide	20 – 150 µg/ml
Lacosamide	0,1 – 30 mg/l
Zonisamide	0,2 – 100 µg/ml
Perampanel	0,003 – 5 µg/ml

CV% :

Levetiracetam	4,36% intra serie	7,60% inter serie
Lamotrigina	5,40% intra serie	6,50% inter serie
Primidone	5,65% intra serie	5,70% inter serie
Oxcarbazepina	4,79% intra serie	6,50% inter serie
Carbamazepina Epossido	5,76% intra serie	6,90% inter serie
Monoidrossicarbamazepina	5,87% intra serie	7,90% inter serie
Carbamazepina	4,84% intra serie	7,40% inter serie
Felbamato	5,68% intra serie	6,30% inter serie
Rufinamide	6,59% intra serie	7,90% inter serie
Desmetilsuccimide	5,52% intra serie	9,20% inter serie
Fenitoina	5,84% intra serie	9,90% inter serie
Metosuccimide	5,56% intra serie	9,20% inter serie
Topiramato	6,50% intra serie	7,80% inter serie
Fenobarbital	6,17% intra serie	6,30% inter serie
Ac. Valproico	4,79% intra serie	5,40% inter serie
Etosuccimide	4,43% intra serie	5,10% inter serie
Lacosamide	4,59% intra serie	9,20% inter serie

Zonisamide	4,09% intra serie	4,90% inter serie
Perampanel	4,61% intra serie	4,89% inter serie

<u>Range terapeutico nel plasma :</u>	Levetiracetam	10 – 37 µg/ml
	Lamotrigina	3 – 14 µg/ml
	Primidone	5 – 12 mg/l
	Oxcarbazepina	0 – 4 mg/l
	Carbamazepina Epossido	2 – 4 mg/l
	Monoidrossicarbamazepina	3 – 40 µg/ml
	Carbamazepina	6 – 12 mg/l
	Felbamato	10 – 80 mg/l
	Rufinamide	1 – 50 mg/l
	Desmetilsuccimide	10 – 40 mg/l
	Fenitoina	10 – 20 mg/l
	Metosuccimide	10 – 40 mg/l
	Topiramato	2 – 25 mg/l
	Fenobarbital	10 – 40 mg/l
	Ac. Valproico	40 – 100 mg/l
	Etosuccimide	40 – 100 µg/ml
	Lacosamide	1 – 10 mg/l
	Zonisamide	10 – 38 µg/ml
	Parempanel	0,1 – 1 µg/ml

<u>Accuratezza:</u>	Levetiracetam	96,4%
	Lamotrigina	100,7%
	Primidone	116,8%
	Oxcarbazepina	100,1%
	Carbamazepina Epossido	89,3%
	Monoidrossicarbamazepina	101,8%
	Carbamazepina	91,3%
	Felbamato	95,3%
	Rufinamide	105,5%
	Desmetilsuccimide	110,7%
	Fenitoina	94,3%
	Metosuccimide	105,9%
	Topiramato	100,1%
	Fenobarbital	91,3%
	Ac. Valproico	103,1%
	Etosuccimide	97,1%
	Lacosamide	96,3%
	Zonisamide	116,6%
	Perampanel	103,5%

Recupero : 100%

Contenuto della confezione (500 test): Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 - 8 °C, eccetto il **Reagente A.**

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interni, **1 x 250 ml** **Stoccare a -20 °C**

Reagente B – Soluzione Stabilizzante, **1 x 250 ml**

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 0, 3 x 1 ml **Codice LC04916 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica**

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 1, 3 x 1 ml **Codice LC04916 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica**

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 2, 3 x 1 ml **Codice LC04916 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica**

Calibratore liofilo plasmatico – Livello 3, 3 x 1 ml	<u>Codice LC04916 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica</u>
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 4, 3 x 1 ml	<u>Codice LC04916 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica</u>
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 5, 3 x 1 ml	<u>Codice LC04916 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica</u>
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 6, 3 x 1 ml	<u>Codice LC04916 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica</u>
Reagente M1 – Fase Mobile A, 4 x 500 ml	
Reagente M2 – Fase Mobile B, 4 x 500 ml	
<u>Dotazione strumentale minima richiesta :</u>	Strumento LC-MS triplo quadrupolo – Modalità di lavoro MRM, ESI positivo/negativo Computer gestionale
<u>Dotazione opzionale :</u>	Autocampionatore
<u>Modalità di prelievo ematico :</u>	Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel per il siero o con Eparina come anticoagulante per il plasma. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il siero e stoccarlo a – 20 °C. Stabile 4 settimane.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei Campioni

Dispensare in provette coniche da 1,5 ml tipo Eppendorf con tappo :

	Calibratore	Campione	Controllo
Calibratore	50 µl		
Campione		50 µl	
Controllo			50 µl
Reagente A - Deproteinizzante con Standard Interni	500 µl	500 µl	500 µl

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 20 secondi

FASE 2 : Incubare le eppendorf a 2-8 °C per 15 minuti.

FASE 3 : Centrifugare a 13.000 rpm per 15 minuti.

FASE 4 : Trasferire 50 µl del sovranatante limpido in una vial di vetro da 2 ml.

- Aggiungere a ciascuna provetta 450 µl di **Reagente B** – Sol. Stabilizzante (o un volume adeguato per la sensibilità strumentale)

Al vortex per 10 secondi

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

INIEZIONE :

- Iniettare 1-10 µl della soluzione nel cromatografo e attendere la stampa del cromatogramma.

ANTIEPILETTICI - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova HYPERSIL GOLD C18 50 x 2,1 mm – 1,9 µm. Termostatare a 40 °C. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di Acetonitrile : H₂O (95 : 5 v/v) al flusso di 400 µl / minuto per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (98 : 2 v/v) al flusso di 400 µl / minuto per 15 minuti. Effettuare due iniezioni di Acqua di grado HPLC prima di procedere con la serie analitica.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Lavare con una soluzione contenente Fase Mobile M2 : M1 (95 : 5 v/v) al flusso di 400 µl / minuto per 15 minuti. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della Colonna Analitica alla fine di ogni seduta analitica.** La colonna va stoccata in una soluzione contenente Fase Mobile M2 : M1 (95 : 5 v/v).

LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa con una soluzione di Etanolo o Metanolo o Acetonitrile

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0	98	2	400
0.50	98	2	400
0.80	75	25	400
2.00	65	35	400
3.00	2	98	400
4.00	2	98	400
4.10	98	2	400

PARAMETRI ESI+ (ottimizzato su triplo quadrupolo Sciex 4500)

Curtain Gas (CUR): 40
Collision Gas (CAD): 8
Ion Spray Voltage: (IS): 5500 V
Temperature (TEM): 600°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 40
Ion Source Gas 2 (GS2): 30

PARAMETRI ESI- (ottimizzato su triplo quadrupolo Sciex 4500)

Curtain Gas (CUR): 40
Collision Gas (CAD): 8
Ion Spray Voltage: (IS): -4500 V
Temperature (TEM): 600°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 30
Ion Source Gas 2 (GS2): 30

SOLUZIONE DEPROTEINIZZANTE CONTENENTE GLI STANDARD INTERNI:

Soluzione contenente: Levetiracetam-d6, Zonisamide-d4, Lacosamide-d3, Felbamato-d4, Etosuccimide-d3, Desmetilsuccimide-d5. Stoccare a – 20 °C.		
Ionizzazione	Analita	Standard Interno consigliato per la calibrazione
Positiva	Levetiracetam	Levetiracetam-d6
	Lamotrigina	Lacosamide-d3
	Primidone	Lacosamide-d3
	Oxcarbazepina	Lacosamide-d3
	Carbamazepina epossido	Lacosamide-d3
	OH-carbamazepina	Lacosamide-d3
	Carbamazepina	Lacosamide-d3
	Felbamato	Felbamato-d4
	Rufinamide	Lacosamide-d3
	Desmetilsuccimide	Desmetilsuccimide-d5
	Fenitoina	Lacosamide-d3
	Metosuccimide	Desmetilsuccimide-d5
	Topiramato	Lacosamide-d3
	Lacosamide	Lacosamide-d3
	Perampanel	Lacosamide-d3
Negativa	Fenobarbital	Zonisamide-d4
	Acido Valproico	Zonisamide-d4
	Etosuccimide	Etosuccimide-d3
	Zonisamide	Zonisamide-d4

FRAMMENTAZIONI (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO Sciex 4500)

ANALITA	Q1	Q3	ENERGIA DI COLLISIONE
Levetiracetam	171.1	69.2	37.0
Lamotrigina	256.1	211.1 – 159.1	30.0 – 39.0
Primidone	219.2	162.2 – 91.2	17.0 – 40.0
Oxcarbazepina	253.2	236.2 – 180.2	18.0 – 38.0
Carbamazepina Epossido	253.0	210.0 – 180.0	30.0 – 30.0
Monoidrossicarbamazepina	255.2	237.2 – 194.1	15.0 – 27.0
Carbamazepina	237.2	194.2	26.0
Felbamato	239.3	178.2	10.0
Rufinamide	239.3	127.2	29.0
Desmetilsuccimide	190.2	120.0 – 91.1	12.0 – 36.0
Fenitoina	253.1	104.3 – 182.3	48.0 – 23.0
Metosuccimide	204.1	126.2 – 79.2	21.0 – 26.0
Topiramato	357.1	264.1	20.0
Lacosamide	251.2	91.2 – 108.2	30.0 – 14.0
Fenobarbital	231.0	188.1	-18.0
Acido Valproico	143.0	143.0	-12.0
Etosuccimide	140.1	140.1	-12.0
Zonisamide	211.0	119.0 – 147.0	-22.0 – -17.0
Perampanel	350.1	219.0	47.0
Levetiracetam- <i>d6</i>	177.0	132.1	24.0
Felbamato- <i>d4</i>	265.0	204.0	19
Desmetilsuccimide- <i>d5</i>	195.1	120.0 – 125.1	29.0 – 24.0
Lacosamide- <i>d3</i>	255.0	220.0 – 178.0	11.5 – 18.0
Etosuccimide- <i>d3</i>	142.9	142.9	-13.0
Zonisamide- <i>d4</i>	215.0	151.0 – 123.0	-14.0 - -21.0

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC04916	Calibratore per Antiepilettici plasmatici	6 x 2 x 1 ml
LC04917	Controllo per Antiepilettici plasmatici – Livello 1	5 x 1 ml
LC04918	Controllo per Antiepilettici plasmatici - Livello 2	5 x 1 ml
LC04919	Controllo per Antiepilettici plasmatici - Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
Z25002052130	Colonna Analitica Hypersil Gold C 18 (50 x 2,1 mm –1,9 um)	1 PZ
S51843550	Vial di vetro a volume ridotto	1 x 100 Pz
S51820717	Tappi per vial a volume ridotto	1 x 100 Pz
SK05010	Starter kit per Antiepilettici	1 Pz



ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

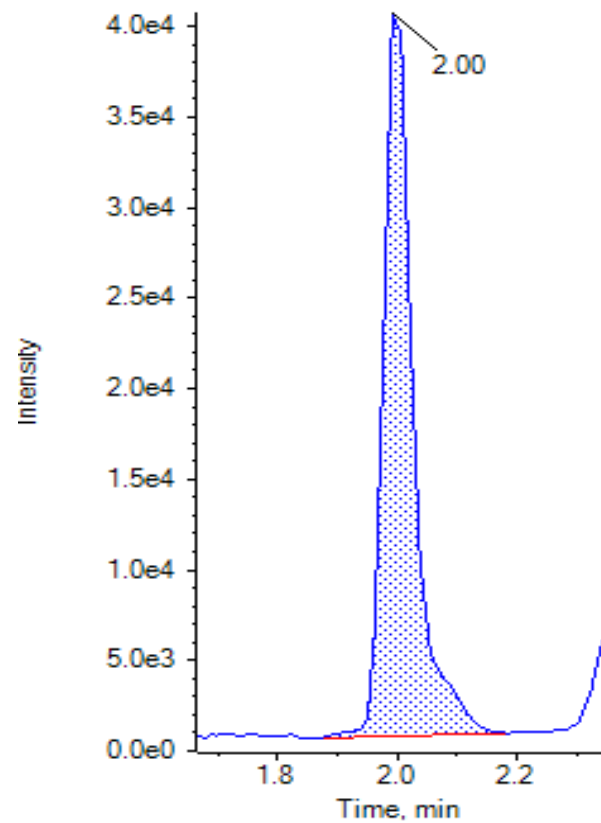


Fig. 1 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.0 Levetiracetam-D6

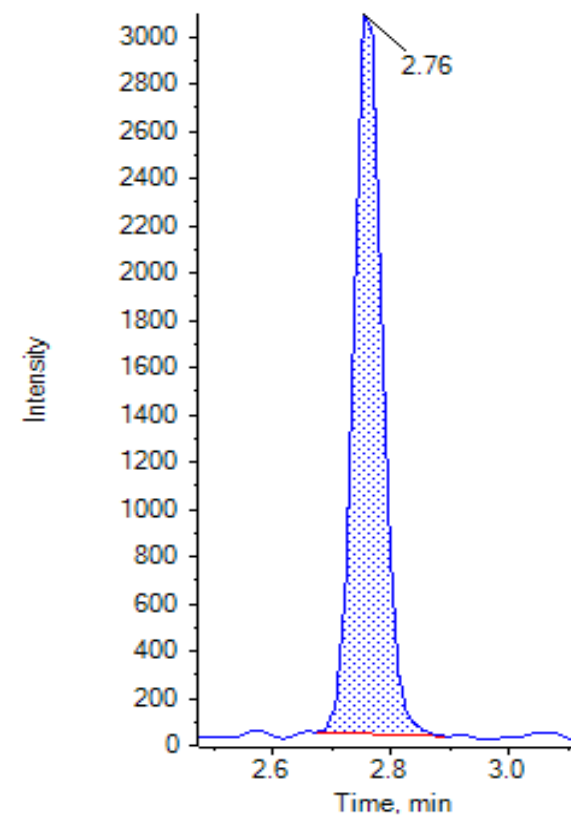


Fig. 2 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.76 Desmetilsuccimide-D5

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

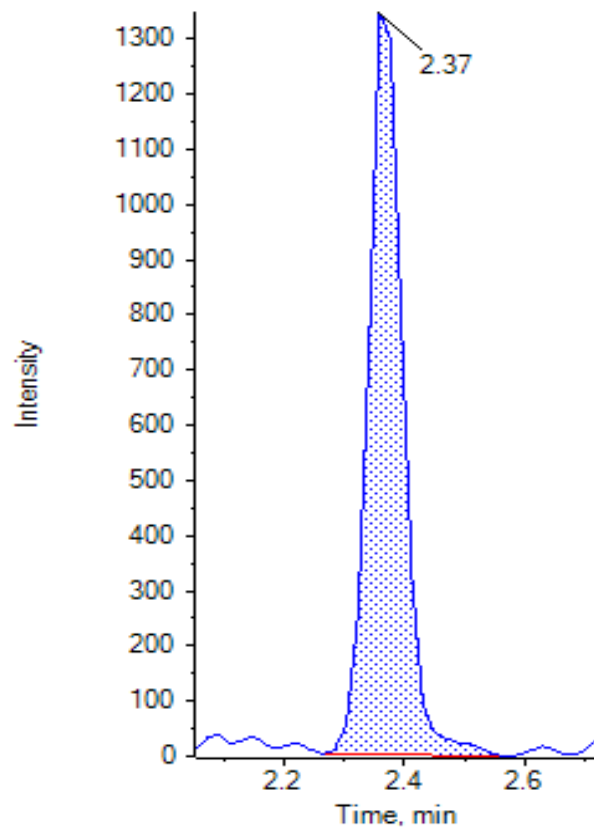


Fig. 3 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.37 Felbamato-D3

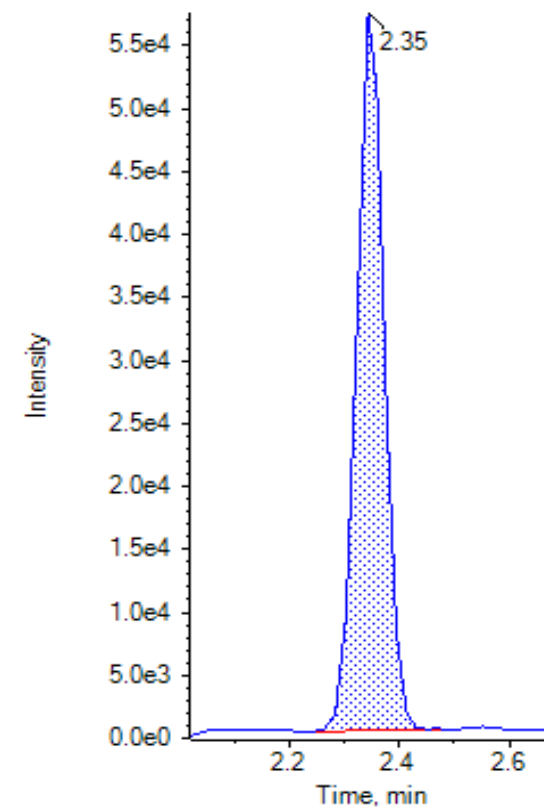


Fig. 4 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.35 Lacosamide-D3

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

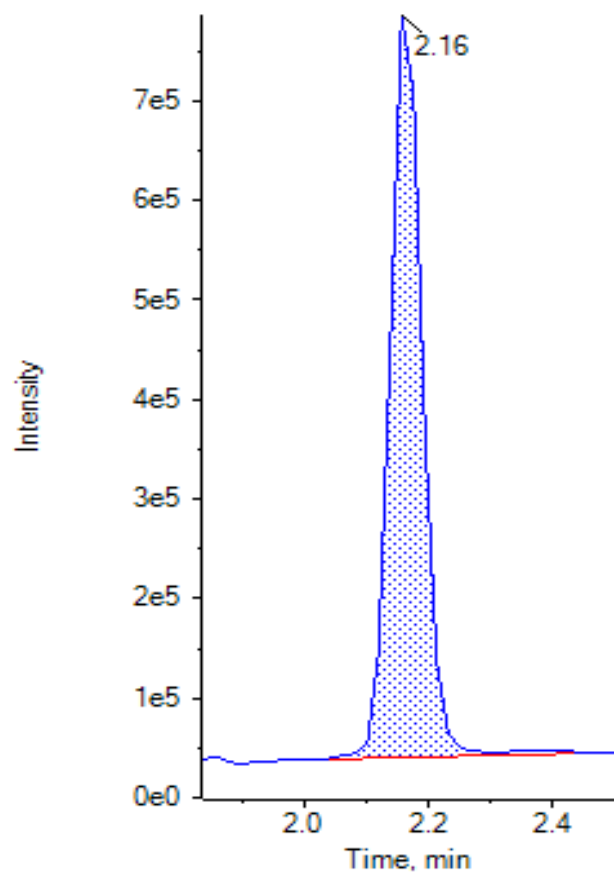


Fig. 5 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.16 Etosuccimide-D3

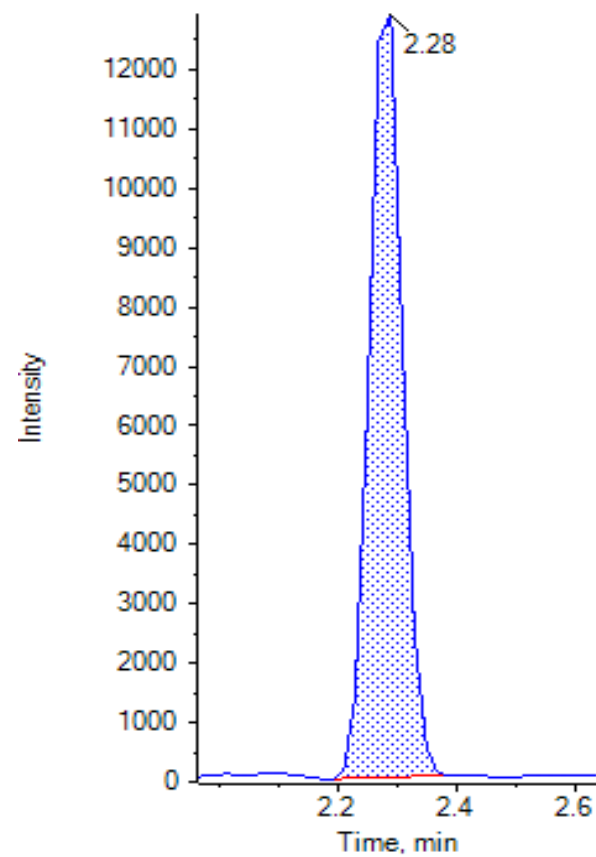


Fig. 6 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.28 Zonisamide-D4

ANTIEPILETTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento)

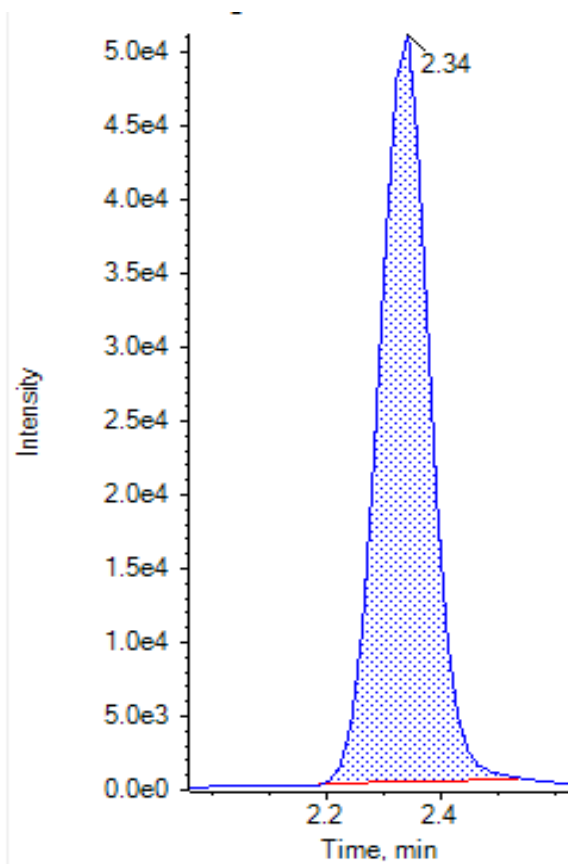


Fig. 7 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.34 Lamotrigina

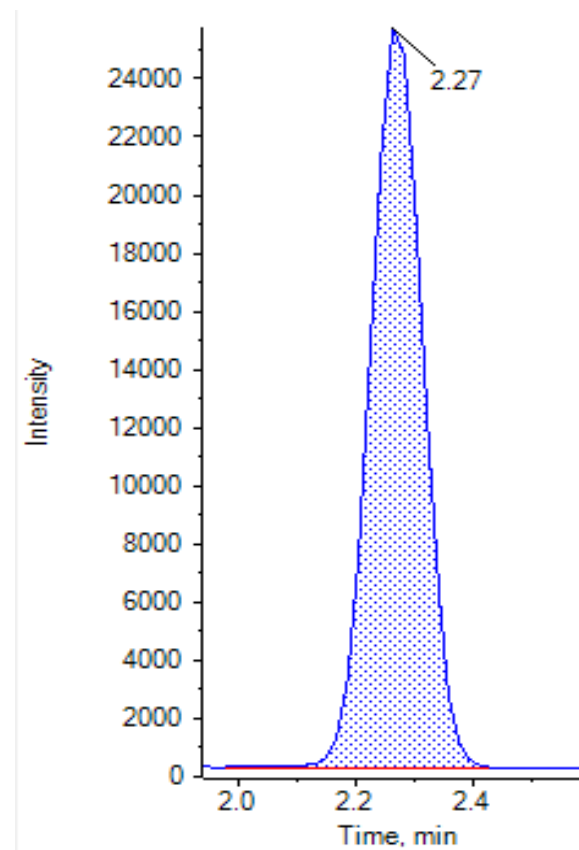


Fig. 8 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.27 Primidone

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

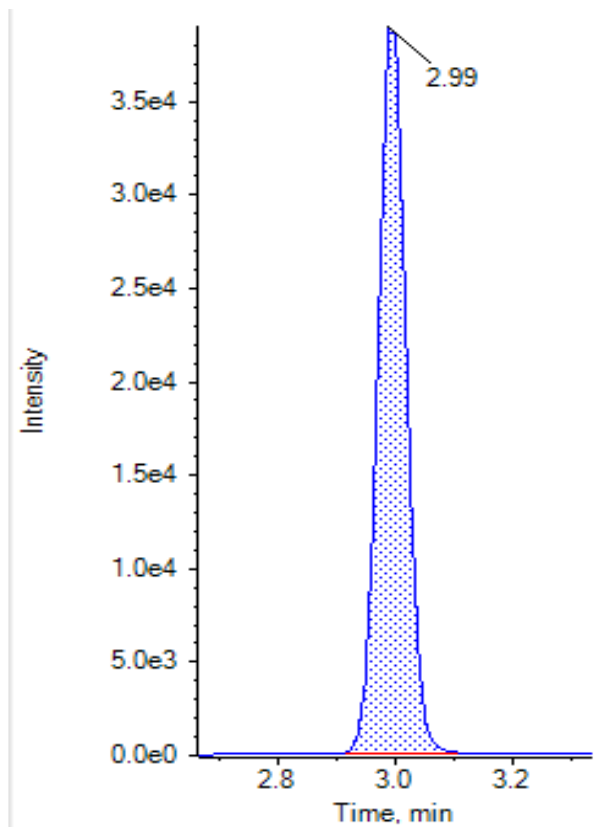


Fig. 9 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.99 Topiramato

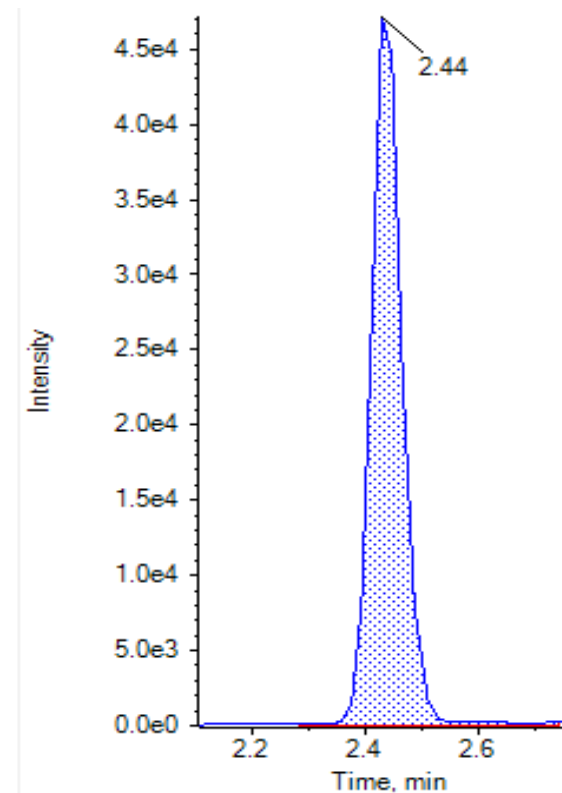


Fig. 10 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.44 Rufinamide

ANTIEPILETTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento)

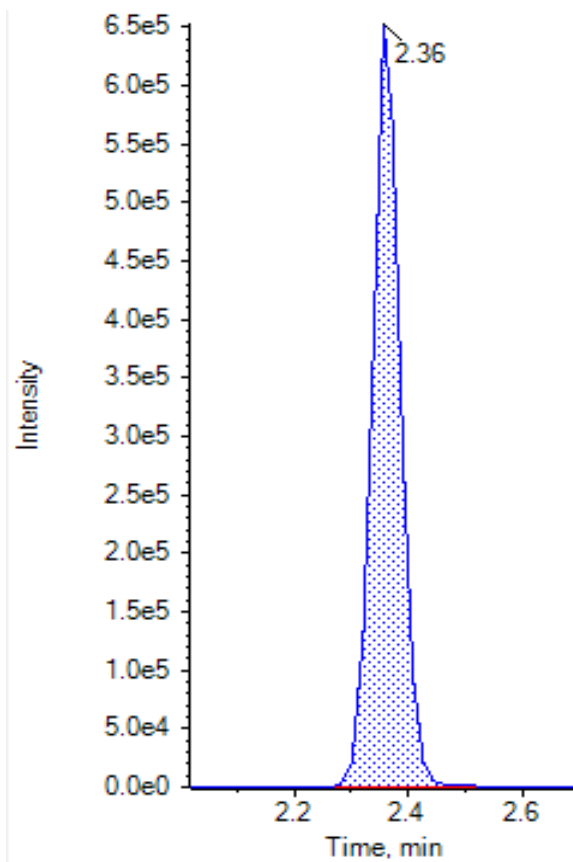


Fig. 11 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.36 Lacosamide

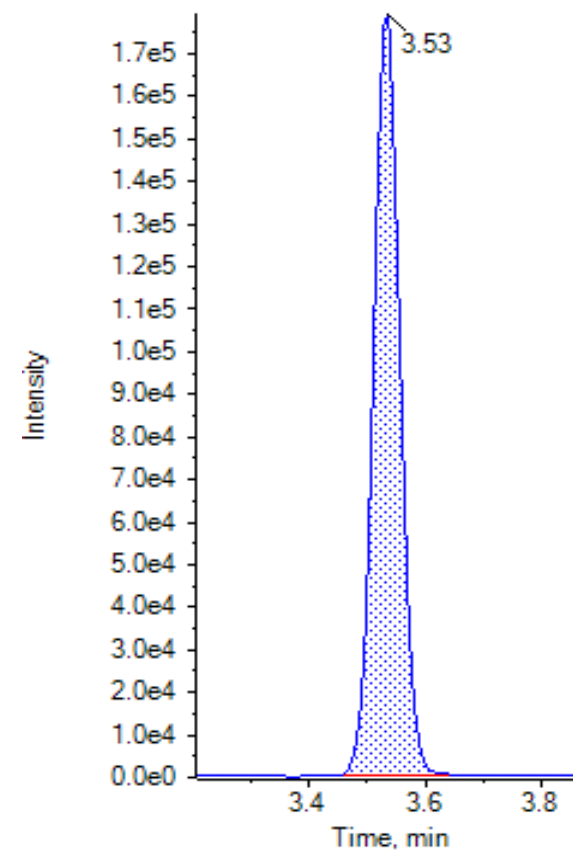


Fig. 12 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 3.53 Fenitoina

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

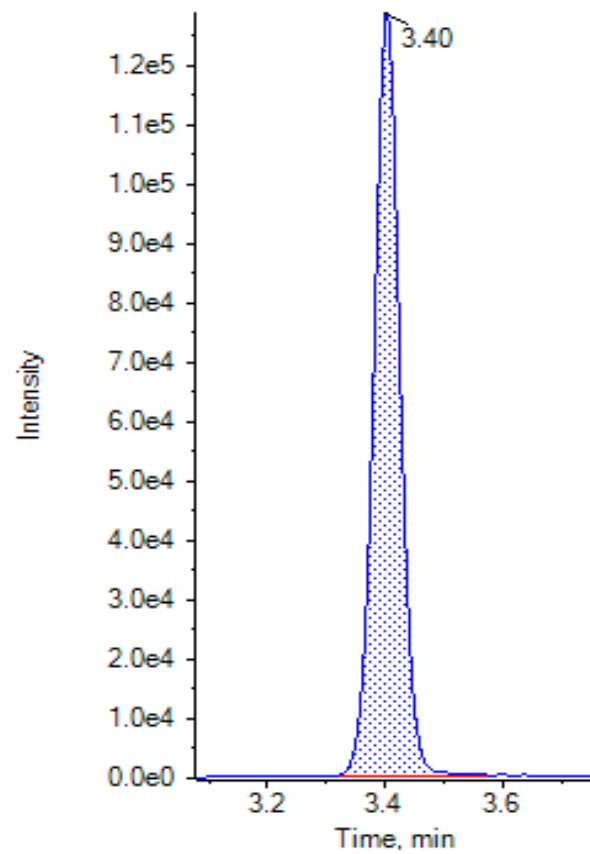


Fig. 13 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 3.40 Metosuccimide

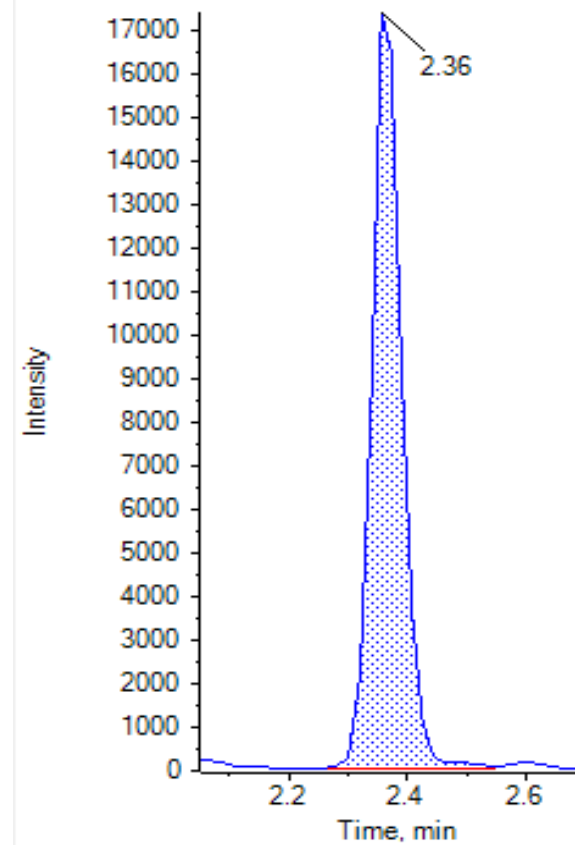


Fig. 14 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.36 Felbamato

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

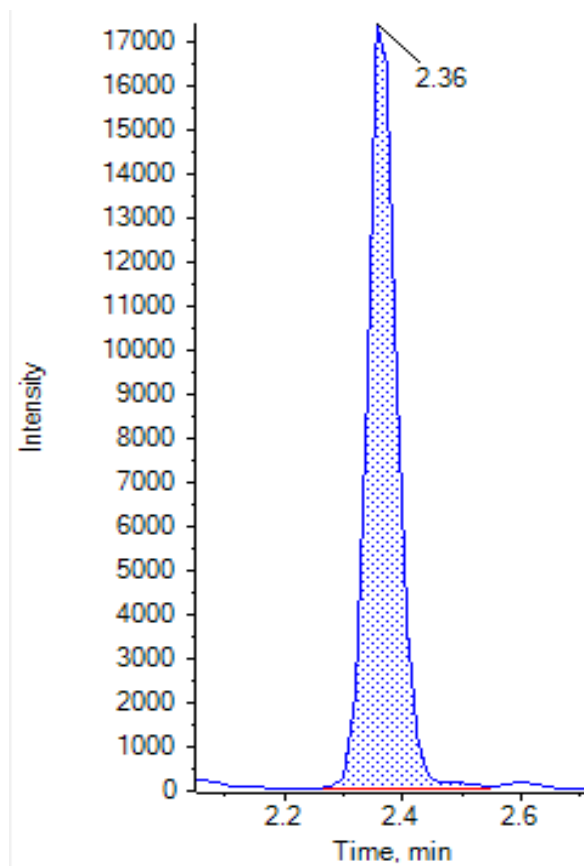


Fig. 15 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.36 Etosuccimide

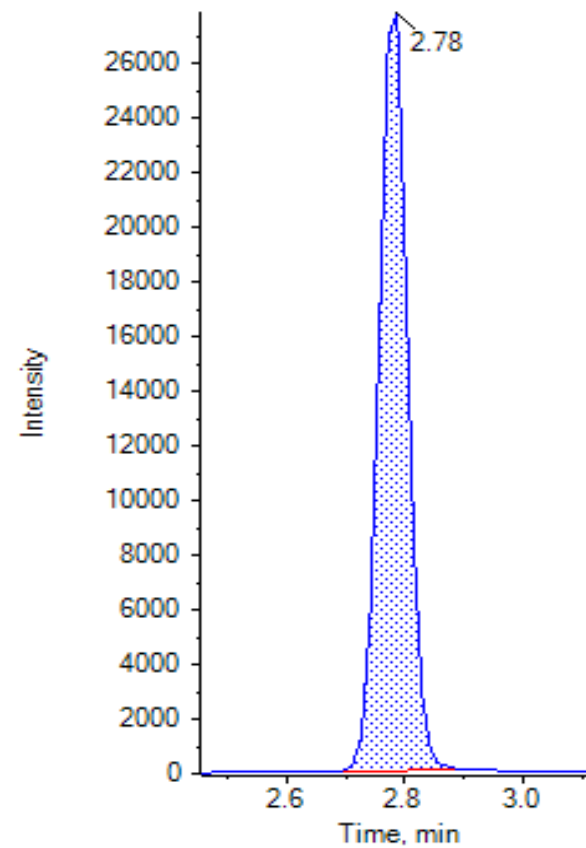


Fig. 16 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.78 Desmetilsuccimide

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

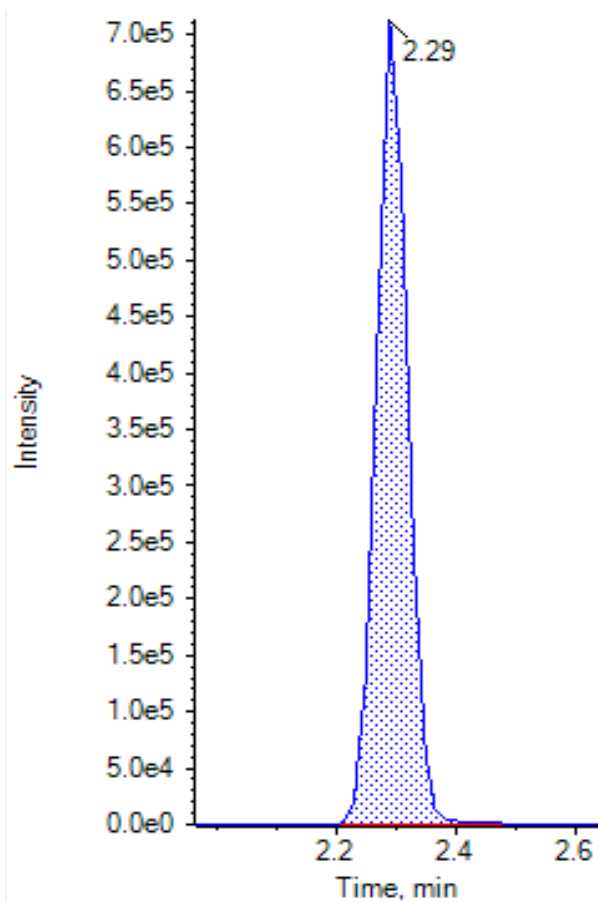


Fig. 17 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.29 Zonisamide

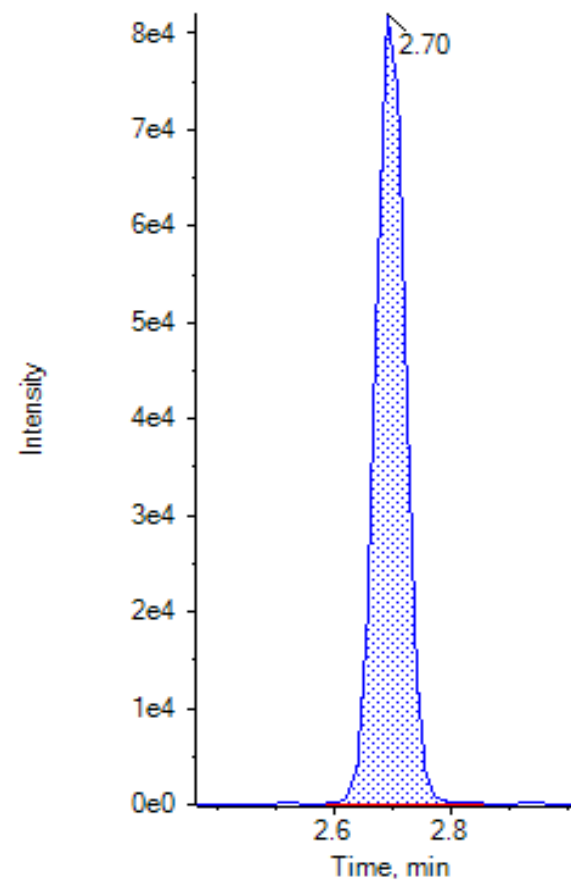


Fig. 18 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.70 Fenobarbital

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

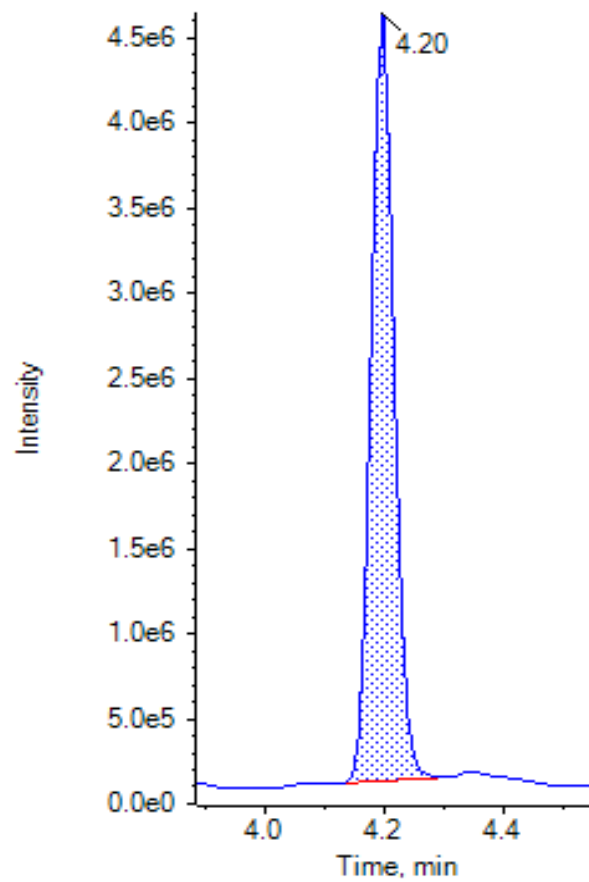


Fig. 19 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 4.20 Acido Valproico

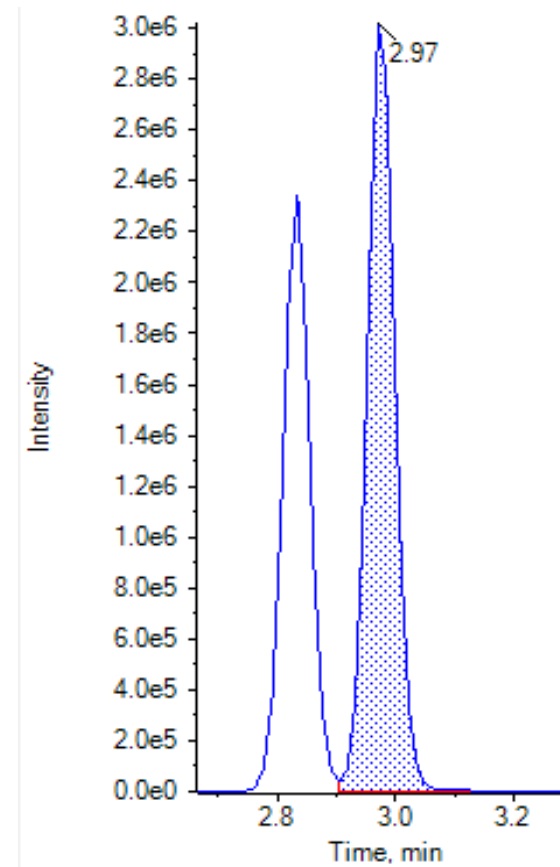


Fig. 20 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.97 Oxacarbazepina

ANTIEPILETTICI PLASMATICI (Cromatogrammi di Riferimento)

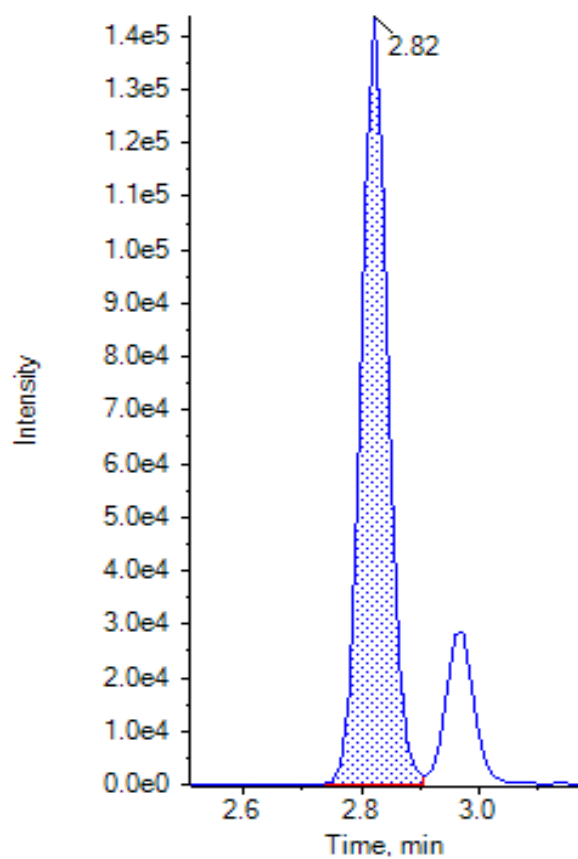


Fig. 21 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.82 Epossido della Carbamazepina

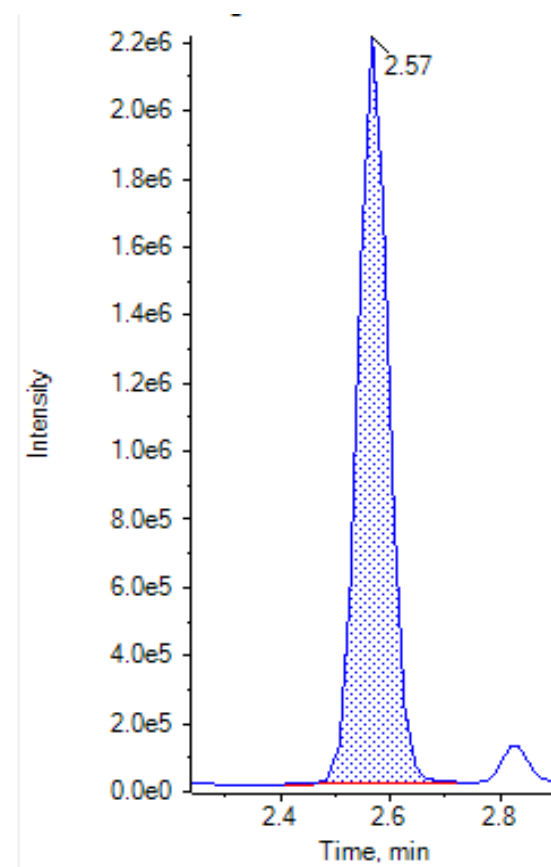


Fig. 22 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.57 Monoidrossicarbamazepina

ANTIEPILETTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento)

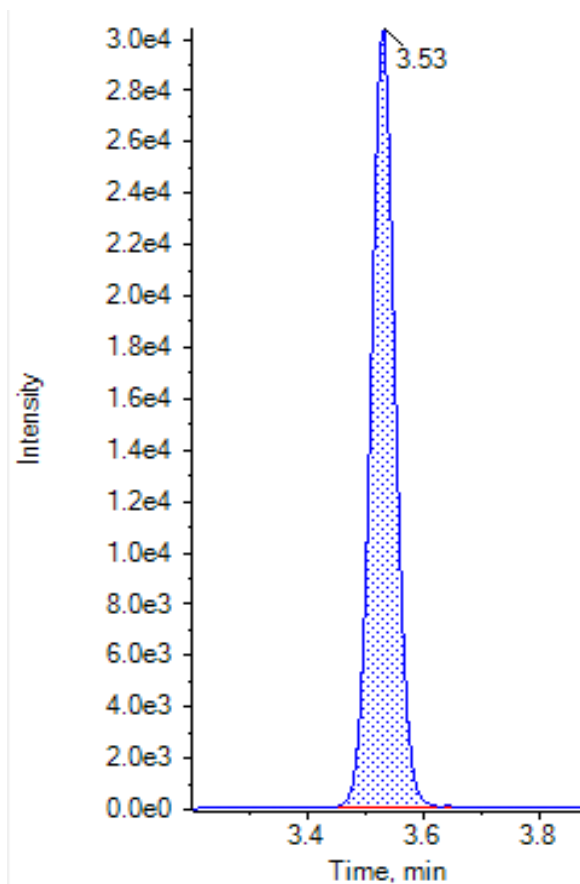


Fig. 23 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 3.53 Carbamazepina

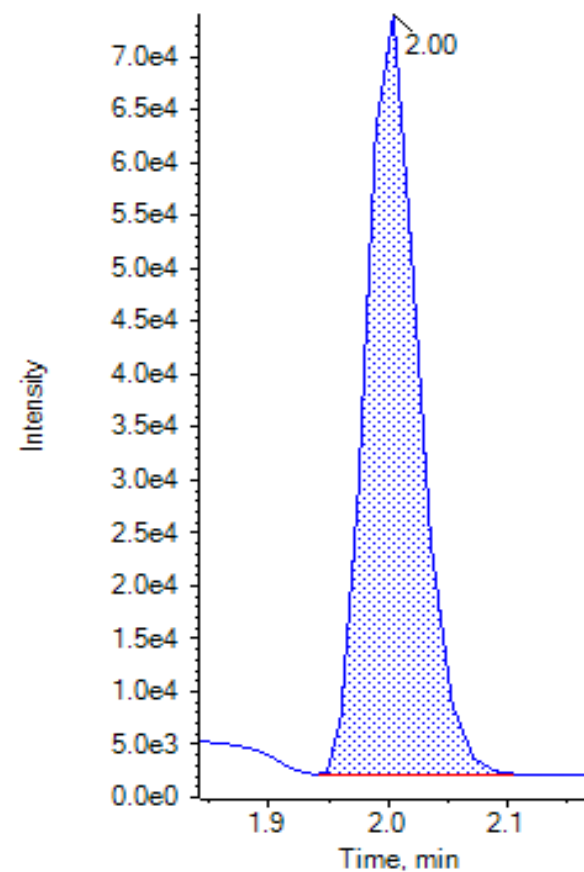


Fig. 24 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 2.00 Levetiracetam

ANTIEPILETTICI PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento)

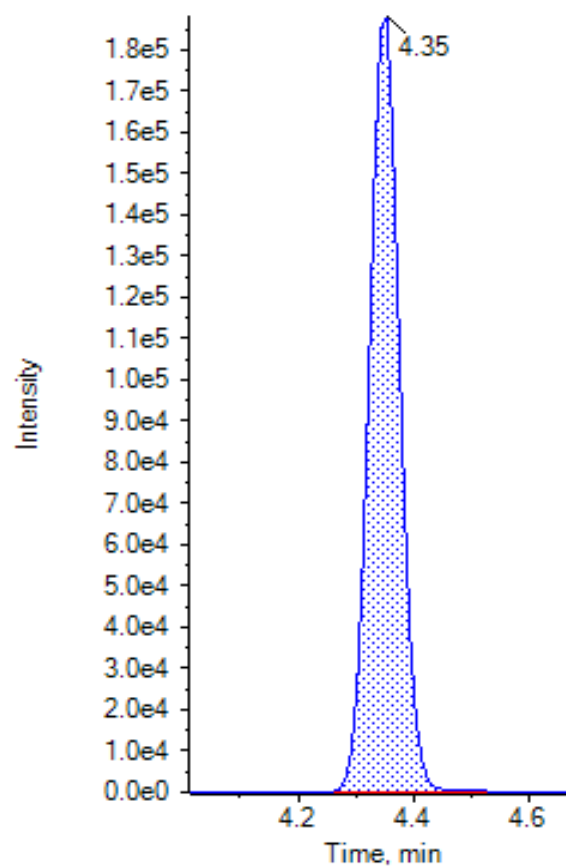


Fig. 25 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 4.35 Perampanel