

BENZODIAZEPINE 2 SIERICHE e/o PLASMATICHE in UV – FAST – Codice Z35610
(Nordiazepam, Clobazam, Diazepam, Midazolam e Nitrazepam)

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 S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



CE

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.

N° 003	Benzodiazepine 2 sieriche e/o plasmatiche in UV - FAST	09/2024
--------	--	---------

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:

100 %

Sensibilità del metodo (LLOD):

Nordiazepam : 3,33 µg/l
Clobazam : 3,33 µg/l
Diazepam : 6,66 µg/l
Midazolam : 3,3 µg/l
Nitrazepam : 3,3 µg/l

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ):

Nordiazepam : 10 µg/l
Clobazam : 10 µg/l
Diazepam : 20 µg/l
Midazolam : 10 µg/l
Nitrazepam : 10 µg/l

Linearità:

Nordiazepam : 10 – 5.000 µg/l
Clobazam : 10 – 5.000 µg/l
Diazepam : 20 – 5.000 µg/l
Midazolam : 10 – 5.000 µg/l
Nitrazepam : 10 – 1.000 µg/l

Range terapeutico nel siero:

Nordiazepam : 100 – 2.000 µg/l
Clobazam : 200 – 1.000 µg/l
Diazepam : 100 – 1.500 µg/l
Midazolam : 100 – 1.000 µg/l
Nitrazepam : 20 – 120 µg/l

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

Nordiazepam :

C1	C2
50 µg/L	312,5 µg/L
4,99%	3,65%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

Nordiazepam :

Ci	Cs
50 µg/L	312,5 µg/L
6,56%	4,91%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Nordiazepam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	125 µg/L	625 µg/L
7,41%	2,68%	2,35%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Nordiazepam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	15 µg/L	80 µg/L
9,59%	3,09%	2,98%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. Std

Nordiazepam 0,9990 + 0,0007

Accuratezza intra serie (errore relativo %)
Clobazam :

C1	C2
50 µg/L	312,5 µg/L
3,08%	1,61%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)
Clobazam :

Ci	Cs
50 µg/L	312,5 µg/L
5,71%	3,89%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Clobazam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	125 µg/L	625 µg/L
8,71%	4,86%	3,51%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Clobazam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	125 µg/L	625 µg/L
15,62%	5,44%	3,67%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. Std

Clobazam 0,9975 + 0,0008

Accuratezza intra serie (errore relativo %)
Diazepam :

C1	C2
50 µg/L	312,5 µg/L
5,61%	3,03%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)
Diazepam :

Ci	Cs
50 µg/L	312,5 µg/L
6,46%	3,18%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Diazepam :

C LLOQ	Cm	Cs
20 µg/L	125 µg/L	625 µg/L
8,56%	6,14%	2,58%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Diazepam :

C LLOQ	Cm	Cs
20 µg/L	125 µg/L	625 µg/L
7,78%	6,26%	4,23%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. Std

Diazepam 0,9958 + 0,0022

Accuratezza intra serie (errore relativo %)
Midazolam :

C1	C2
50 µg/L	312,5 µg/L
3,93%	2,81%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)
Midazolam :

Ci	Cs
50 µg/L	312,5 µg/L
6,00%	3,25%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Midazolam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	125 µg/L	625 µg/L
6,22%	4,56%	2,36%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Midazolam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	125 µg/L	625 µg/L
6,80%	4,83%	2,00%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. Std

Midazolam 0,9976 + 0,0014

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Nitrazepam :

C1	C2
20 µg/L	125 µg/L
9,52%	4,07%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Nitrazepam :

Ci	Cs
20 µg/L	125 µg/L
6,86%	2,99%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Nitrazepam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	50 µg/L	250 µg/L
10,59%	5,01%	3,41%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Nitrazepam :

C LLOQ	Cm	Cs
10 µg/L	50 µg/L	250 µg/L
8,68%	5,24%	3,89%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. Std

Nitrazepam 0,9976 + 0,0003

Contenuto della confezione :

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

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

Reagente C – Soluzione Diluente, **1 x 50 ml**

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

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

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

Reagente G – Soluzione Standard interno, **1 x 5 ml**

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

Calibratore liofilo sierico, **1 x 5 ml**

Colonne clean-up, **100 Pz**

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

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8 °C.

Stoccare a – 20 °C

Stoccare a – 20 °C

Codice Z35016

Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 μ l.
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 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

In una provetta pipettare:

- 350 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente H** - Soluzione Test
- 50 µl di **Reagente G** - Soluzione Standard interno

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 10 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 : Preparare in provette di plastica:

	Campione	Calibratore	Controllo
Campione	500 µl		
Calibratore		500 µl	
Controllo			500 µl
Reagente C – Sol. Diluente	500 µl	500 µl	500 µl
Reagente G – Standard interno	50 µl	50 µl	50 µl

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 3 : Caricare il Campione e lo Standard di Calibrazione precedentemente preparati nelle colonne Clean up.

Non portare a secco!

FASE 4 : Lavare le colonne Clean-up con 1 ml di **Reagente D – Sol. di Lavaggio**

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

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

Agitare al vortex per 10 secondi

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

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione così ottenuta nel cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

BENZODIAZEPINE 2 - Avvertenze

REAGENTE H : SOLUZIONE TEST

BENZODIAZEPINE	
Nordiazepam	20.000 µg/l
Clobazam	10.000 µg/l
Diazepam	20.000 µg/l
Midazolam	10.000 µg/l
Nitrazepam	2.600 µg/l

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 POROSHELL C18 4,6 x 50 mm, 2,7 µ, è tassativo l'uso dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* Reverse Phase POROSHELL C18 4,6 x 50 mm, 2,7 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (20 : 80 v/v)** e successivamente 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v/v)** al flusso di 1,0 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,4 ml/minuto per 15 minuti. 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 µm 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 15 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v)** al flusso di 1,4 ml/minuto e scaricare. La colonna va stoccata in una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v)**. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della colonna alla fine di ogni seduta analitica.**

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Flussare 15 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v/v)** al flusso di 1,4 ml/minuto.

PARAMETRI HPLC

LOOP	10 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 160 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z35016	Calibratore sierico per Benzodiazepine 2	4 x 5 ml
Z35019	Controllo liofilo sierico per Benzodiazepine 2 – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120 EC-C18 (50 x 4,6mm -2,7 µm)	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 2 SIERICHE e/o PLASMATICHE

(Cromatogrammi di Riferimento)

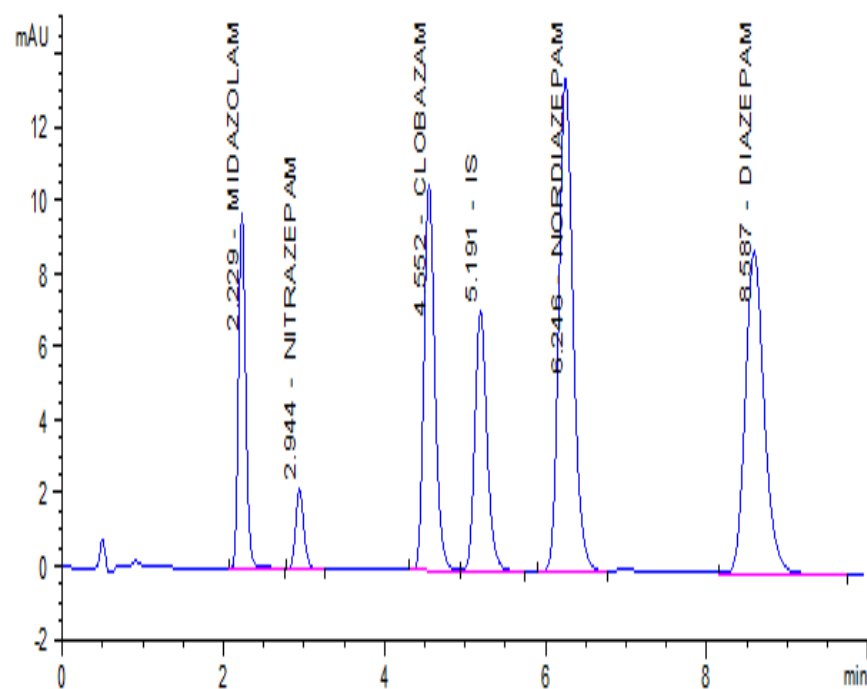


Fig. 1:	Soluzione Test		
	R.T.	2.22	Midazolam
	R.T.	2.94	Nitrazepam
	R.T.	4.55	Clobazam
	R.T.	5.19	Standard Interno
	R.T.	6.24	Nordiazepam
	R.T.	8.58	Diazepam

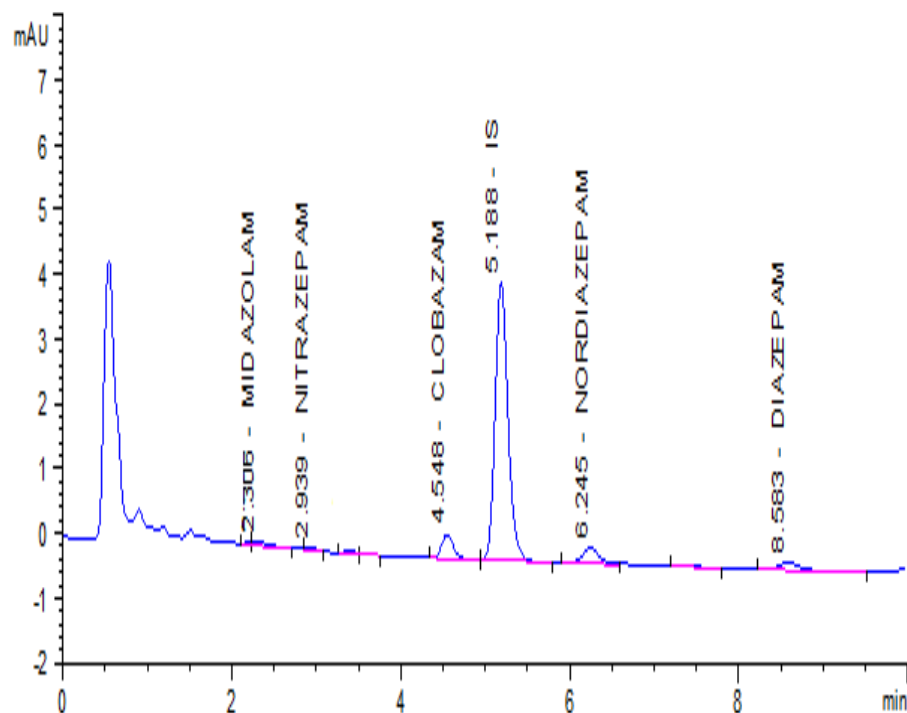


Fig. 2:	Controllo sierico basso			
	R.T.	2.30	Midazolam	96,5 µg/L
	R.T.	2.93	Nitrazepam	19,0 µg/L
	R.T.	4.54	Clobazam	111,9 µg/L
	R.T.	5.18	Standard Interno	
	R.T.	6.24	Nordiazepam	110,4 µg/L
	R.T.	8.58	Diazepam	98,1 µg/L

BENZODIAZEPINE 2 SIERICHE e/o PLASMATICHE (Cromatogrammi di Riferimento)

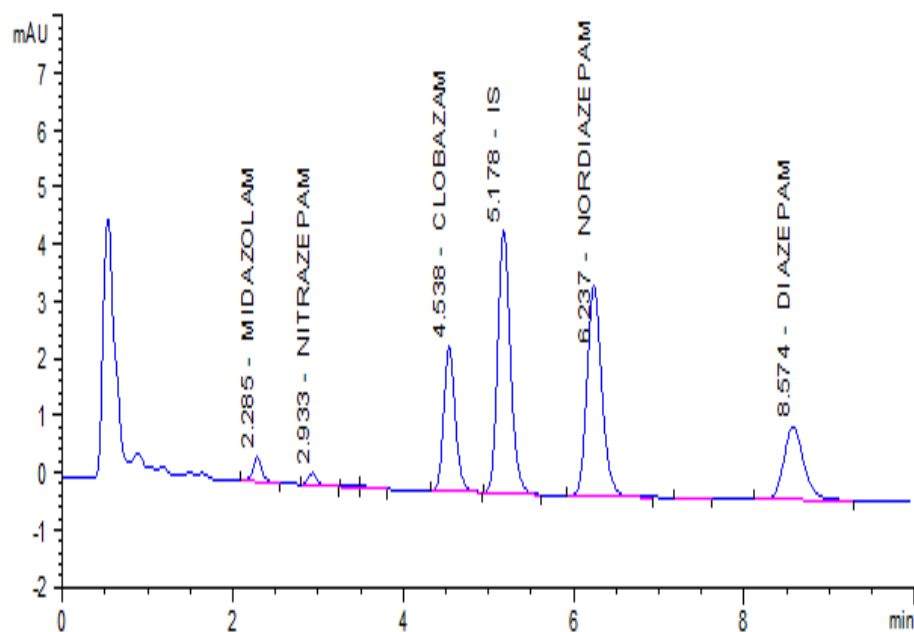


Fig. 3:	Calibratore liofilo sierico			
	R.T.	2.28	Midazolam	645,1 µg/L
	R.T.	2.93	Nitrazepam	71,8 µg/L
	R.T.	4.53	Clobazam	681,4 µg/L
	R.T.	5.17	Standard Interno	
	R.T.	6.23	Nordiazepam	1346,3 µg/L
	R.T.	8.57	Diazepam	1109,9 µg/L

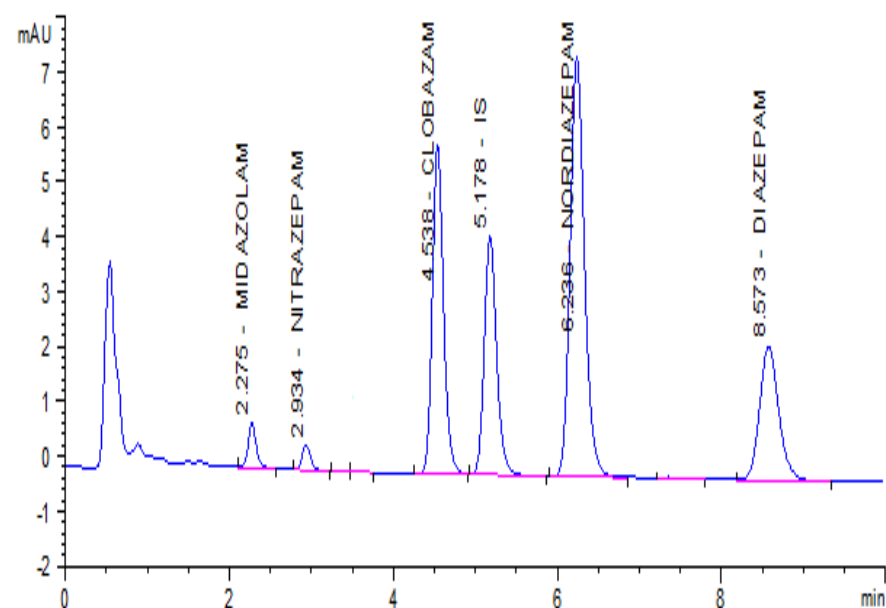


Fig. 4:	Controllo sierico alto			
	R.T.	2.27	Midazolam	1191,3 µg/L
	R.T.	2.93	Nitrazepam	143,1 µg/L
	R.T.	4.53	Clobazam	1561,7 µg/L
	R.T.	5.17	Standard Interno	
	R.T.	6.23	Nordiazepam	2789,2 µg/L
	R.T.	8.57	Diazepam	2212,7 µg/L

BENZODIAZEPINE 2 SIERICHE e/o PLASMATICHE (Cromatogrammi di Riferimento)

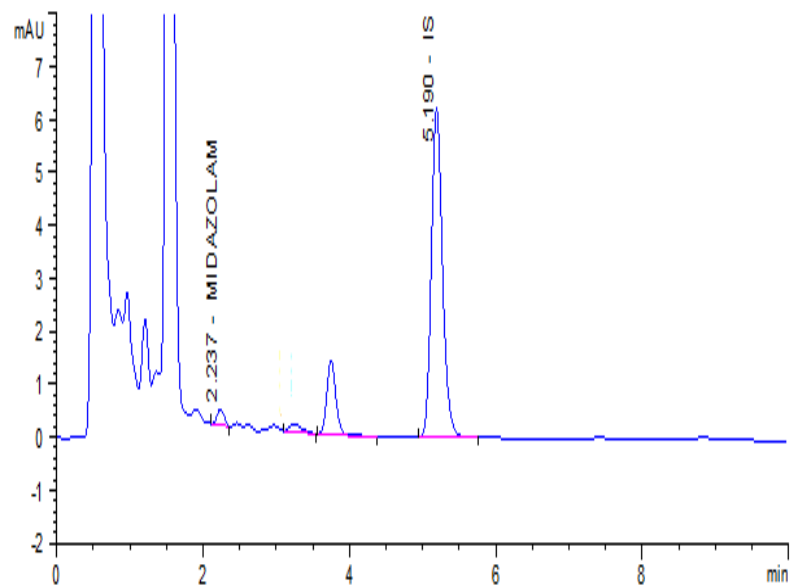


Fig. 5:	Campione di Midazolam			
	R.T.	2.23	Midazolam	301,4 µg/L
	R.T.	5.19	Standard Interno	

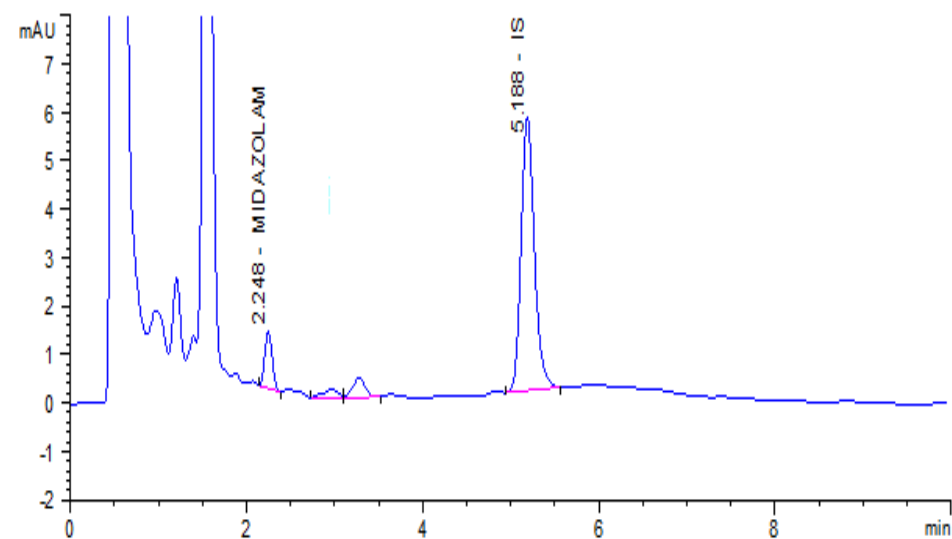


Fig. 6:	Campione di Midazolam			
	R.T.	2.24	Midazolam	1.062 µg/L
	R.T.	5.18	Standard Interno	

BENZODIAZEPINE 2 SIERICHE e/o PLASMATICHE
(Cromatogrammi di Riferimento)

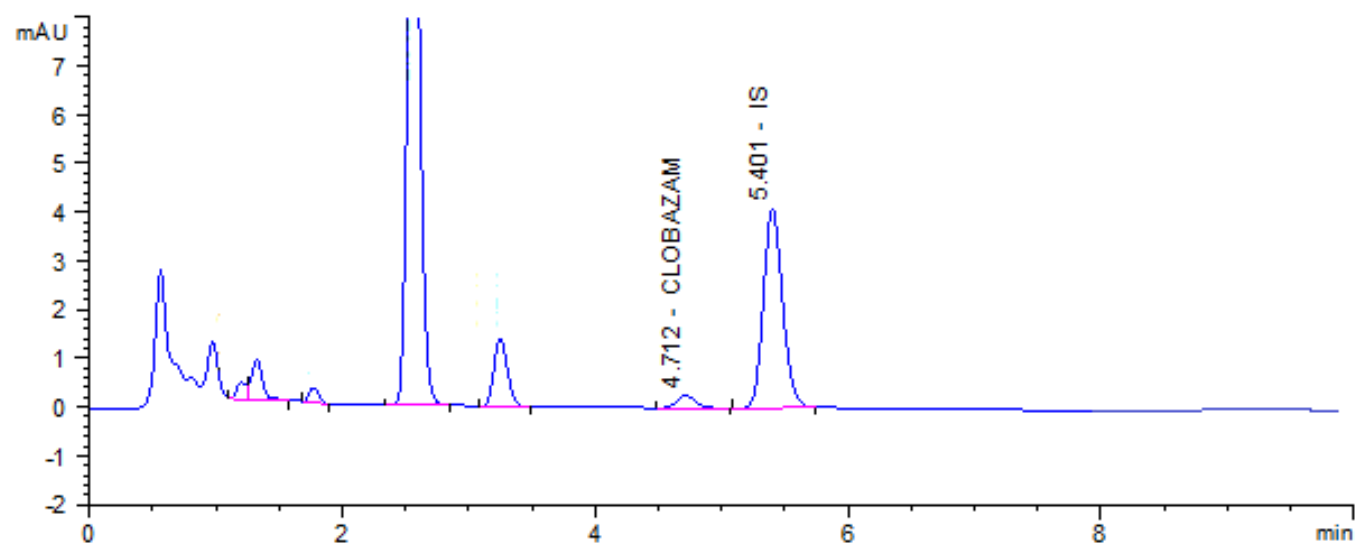


Fig. 7:	Campione di Clobazam		
	R.T. 4.71	Clobazam	102,64 µg/L
	R.T. 5.40	Standard Interno	

LE BENZODIAZEPINE					
N°	Nome del Principio Attivo	Nome della specialità Commerciale			
1	Clordemetildiazepan	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	Diazepan	1	Aliseum	16	Apozepam
		2	Ansioli	17	AspaserineB ₆ Tranq
		3	Avex	18	Atensine
		4	Eridan	19	Benzopin
		5	Noan	20	Betapam
		6	Qetnil	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	Tè mesta	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		