

ANTIEPILETTICI 1 SIERICI e/o PLASMATICI in UV – FAST – Codice Z80010

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 e dei loro principali metaboliti:

1. *Fenobarbital*
2. *Carbamazepina*
3. *Fenitoina (Difenilidantoina)*

 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° 002	Antiepilettici 1 sierici e/o plasmatici in UV - FAST	06/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo :

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

Recupero del Metodo :

>98 %

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

0,06 µg/ml Fenobarbital e Carbamazepina
0,1 µg/ml Fenitoina

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

0,2 µg/ml Fenobarbital e Carbamazepina
0,3 µg/ml Fenitoina

Linearità:

0,2 – 300 µg/ml Fenobarbital
0,2 – 200 µg/ml Carbamazepina
0,3 – 300 µg/ml Fenitoina

Range Terapeutico nel siero :

<i>Fenobarbital</i>	10 – 40 µg/ml
<i>Carbamazepina</i>	6 – 12 µg/ml
<i>Fenitoina</i>	10 – 20 µg/ml

Accuratezza intra serie (errore relativo %) FENOBARBITAL :

Ci	Cs
5 µg/ml	30 µg/ml
6,3%	3,6%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) FENOBARBITAL :

Ci	Cs
5 µg/ml	30 µg/ml
6,4%	4,9%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) FENOBARBITAL :

Cl	Cm	Ch
0,2 µg/ml	15 µg/ml	80 µg/ml
6,6%	6,0%	2,1%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) FENOBARBITAL :

Cl	Cm	Ch
0,2 µg/ml	15 µg/ml	80 µg/ml
6,5%	4,8%	2,1%

Coefficiente di Correlazione + Dev Std

0,9976 ± 0,0019 Fenobarbital

Accuratezza intra serie (errore relativo %) CARBAMAZEPINA :

Ci	Cs
3 µg/ml	15 µg/ml
8,5%	3,9%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) CARBAMAZEPINA :

Ci	Cs
3 µg/ml	15 µg/ml
10,7%	4,2%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) CARBAMAZEPINA :

Cl	Cm	Ch
0,2 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
9,8%	4,8%	1,5%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) CARBAMAZEPINA :

Cl	Cm	Ch
0,2 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
8,6%	4,9%	2,9%

Coefficiente di Correlazione + Dev Std

0,9976 ± 0,0005 Carbamazepina

Accuratezza intra serie (errore relativo %) FENITOINA :

Ci	Cs
5 µg/ml	30 µg/ml
8,3%	1,9%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) FENITOINA :

Ci	Cs
5 µg/ml	30 µg/ml
10,7%	6,6%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) FENITOINA :

Cl	Cm	Ch
0,3 µg/ml	15 µg/ml	50 µg/ml
7,4%	3,1%	1,8%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) FENITOINA :

Cl	Cm	Ch
0,3 µg/ml	15 µg/ml	50 µg/ml
10,6%	3,0%	2,7%

Coefficiente di Correlazione + Dev Std

0,9953 ± 0,0030 Fenitoina

Contenuto della confezione :

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

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante con Standard Interno, **1 x 40 ml**

Reagente B – Soluzione Stabilizzante, **1 x 80 ml**

Calibratore liofilo plasmatico, **1 x 2 ml**

Codice Z04016

Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

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

Vedi Avvertenze

Reagente M – Fase Mobile, **4 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 µl
Detector spettrofotometrico UV / VIS $\lambda=212$ nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel o con Eparina 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 :

- 800 µl di H₂O di grado HPLC
- 200 µl di **Reagente F - Soluzione Test**

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 10 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione dei singoli Antiepilettici 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, dello Standard e dei Controlli

Dispensare in provetta :

	Calibratore	Campione
Calibratore	200 µl	
Campione		200 µl
Reagente A – Sol. deproteinizzante	400 µl	400 µl

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 10 secondi

FASE 2 : Centrifugare a 14.000 rpm per 10 minuti.

FASE 3 : Trasferire 400 µl del sovranatante limpido in una provetta

FASE 4 : Aggiungere a ciascuna provetta 400 µl di **Reagente B – Sol. stabilizzante**

Al vortex per 10 secondi

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

INIEZIONE :

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

ANTIPILETTICI - Avvertenze

REAGENTE F: SOLUZIONE TEST

Fenobarbital	Circa 52,4 µg/ml
Fenitoina	Circa 8,4 µg/ml
Carbamazepina	Circa 5,0 µg/ml

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	212 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica POROSHELL 120 EC-C18 4,6 x 50 mm, 2,7 µm, è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* POROSHELL 120 EC-C18 4,6 x 50 mm, 2,7 µm. 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 1,0 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il Test chimico e verificare la congruità della separazione. **NON è possibile 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 15 ml di una soluzione di **H₂O : Metanolo (80 : 20 v/v)** o di **H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v/v)** al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Flussare una soluzione di **H₂O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v/v)** per 30 minuti scaricandola. **Si raccomanda di eseguire il lavaggio della colonna alla fine di ogni seduta analitica.**

STOCCAGGIO DELLA COLONNA

Stoccare la colonna pulita nella soluzione di lavaggio **H₂O : Metanolo o Acetonitrile (30 : 70 v/v)**.

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

L'ago di iniezione va lavato con una soluzione di **H₂O : Metanolo o Acetonitrile o Etanolo (80 : 20 v/v)**.

PARAMETRI HPLC

LOOP	10 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,0 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 150 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z04016	Calibratore liofilo per Antiepilettici 1	4 x 2 ml
Z04019	Controllo liofilo per Antiepilettici 1 – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
Z699975902	Colonna Analitica POROSHELL 120 EC-C18 (4,6 x 50 mm, 2.7 µm)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ

ANTIEPILETTICI PLASMATICI e/o SIERICI (Cromatogramma di Riferimento)

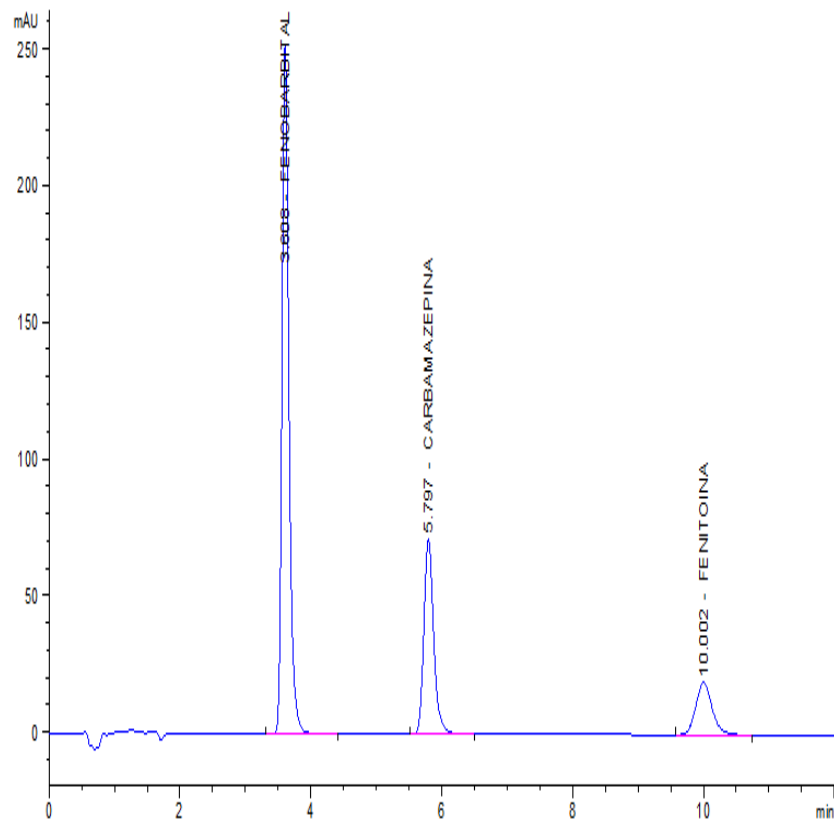


Fig. 1: *Soluzione Test*

R.T.	3.60	Fenobarbital
R.T.	5.79	Carbamazepina
R.T.	10.00	Fenitoina

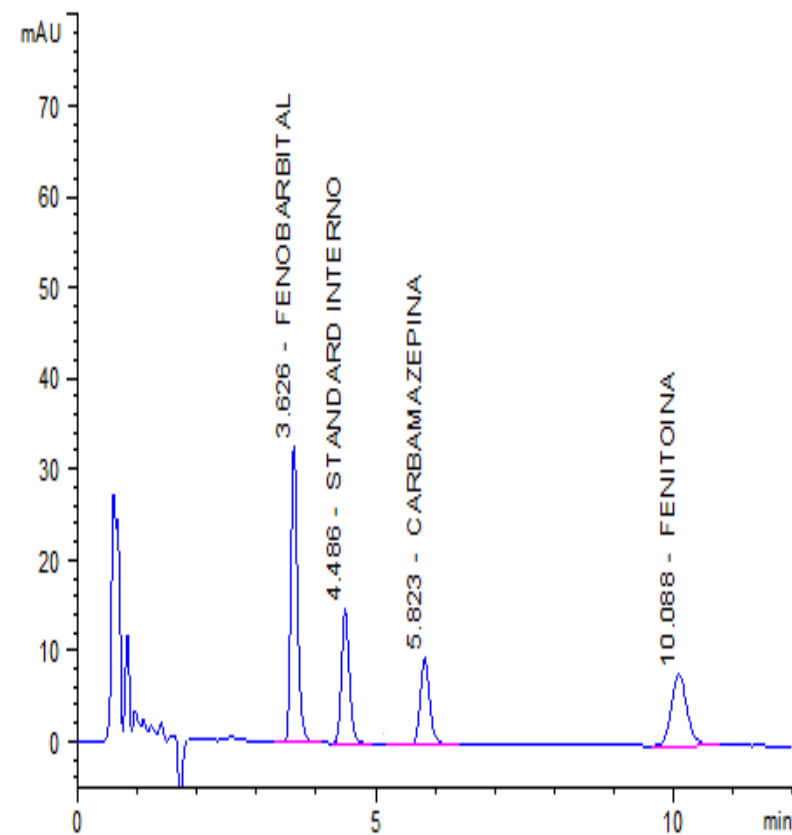


Fig. 2: *Calibratore plasmatico*

R.T.	3.62	Fenobarbital	39,3 µg/ml
R.T.	4.48	Standard interno	
R.T.	5.82	Carbamazepina	8,3 µg/ml
R.T.	10.08	Fenitoina	21,3 µg/ml

ANTIEPILETTICI PLASMATICI e/o SIERICI
(Cromatogramma di Riferimento)

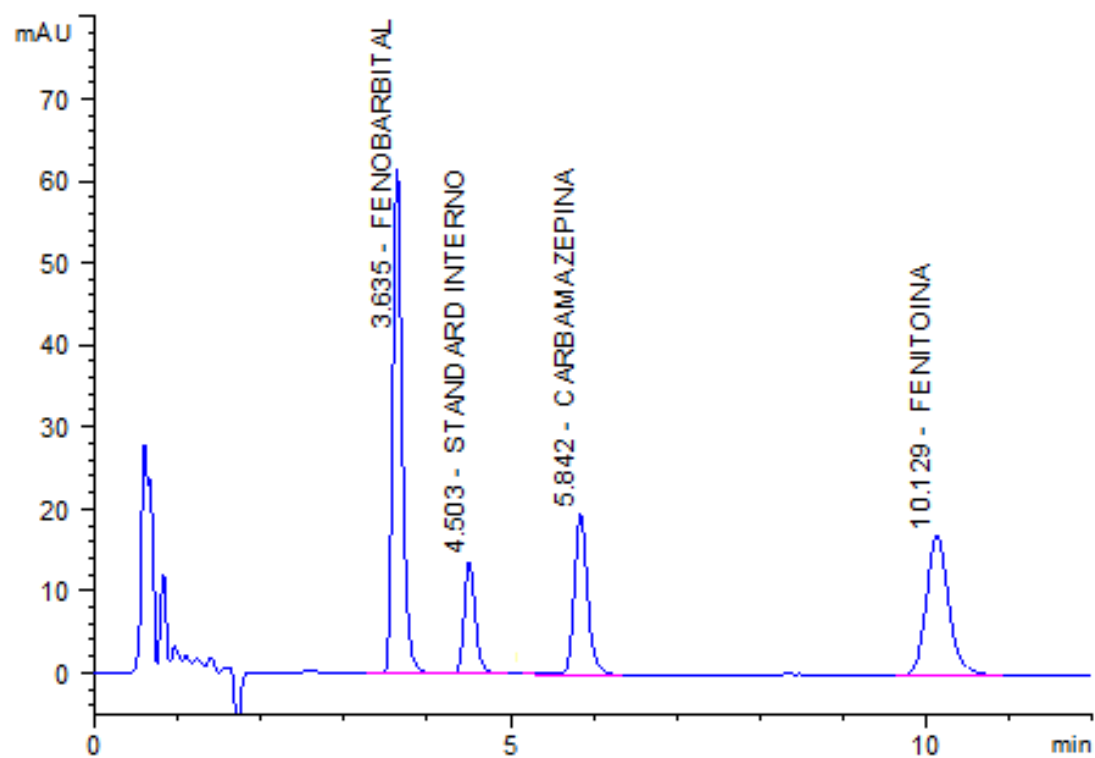


Fig. 3:	Controllo basso		
	R.T. 3.63	Fenobarbital	74,1 µg/ml
	R.T. 4.50	Standard interno	
	R.T. 5.84	Carbamazepina	16,3 µg/ml
	R.T. 10.12	Fenitoina	46,2 µg/ml