

CLOZAPINA & NORCLOZAPINA SIERICHE e/o PLASMATICHE IN UV - FAST –
Codice Z76610

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 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° 005	Clozapina e Norclozapina sieriche e/o plasmatiche in UV - FAST	08/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare le concentrazioni plasmatiche della **Clozapina** e del suo metabolita, la **Norclozapina** dopo purificazione su SPE e trattamento con opportuni reagenti.

Recupero del Metodo :

>98%

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

10 ng/ml

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

31 ng/ml

Linearità :

31 – 1.000 ng/ml

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

CLOZAPINA :

Ci	Cs
62 ng/ml	500 ng/ml
4,33%	2,05%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

CLOZAPINA :

Ci	Cs
62 ng/ml	750 ng/ml
6,46%	5,66%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) CLOZAPINA :

C LLOQ	Cm	Cs
31 ng/ml	250 ng/ml	750 ng/ml
2,41%	1,60%	2,34%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) CLOZAPINA :

C LLOQ	Cm	Cs
31 ng/ml	250 ng/ml	750 ng/ml
6,98%	6,72%	5,36%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,9980 ± 0,0022 Clozapina

Accuratezza intra serie (errore relativo %)

NORCLOZAPINA :

Ci	Cs
62 ng/ml	500 ng/ml
5,2%	4,9%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)

NORCLOZAPINA :

Ci	Cs
62 ng/ml	750 ng/ml
7,2%	5,5%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) NORCLOZAPINA :

C LLOQ	Cm	Cs
31 ng/ml	250 ng/ml	750 ng/ml
2,3%	2,1%	2,4%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) NORCLOZAPINA :

C LLOQ	Cm	Cs
31 ng/ml	250 ng/ml	750 ng/ml
4,7%	3,0%	3,5%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,9967 ± 0,0019 Norclozapina

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 Diluente, **1 x 150 ml****Reagente B** – Soluzione Standard Interno, **1 x 5,5 ml****Reagente C** – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 100 ml****Reagente D** – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 100 ml****Reagente E** – Soluzione di Lavaggio, **1 x 100 ml****Reagente F** – Soluzione di Eluizione, **1 x 30 ml****Reagente G** – Soluzione Stabilizzante, **1 x 60 ml****Reagente H** – Soluzione Test, **1 x 1 ml****Calibratore Plasmatico liofilo**, **2 x 2 ml****Codice Z76016****Confezionato a parte - vedi scheda tecnica****Reagente M** – Fase Mobile, **3 x 500 ml****Colonne di Clean up**, **100 pz****Dotazione strumentale minima richiesta :**

Strumento HPLC isocratico con loop da 10/20 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 :

- 900 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente H - Soluzione Test**

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 10/20 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
Calibratore	500 µl		
Campione		500 µl	
Controllo			500 µl
Reagente A – Sol. Diluente	1500 µl	1500 µl	1500 µl
Reagente B – Sol. Std Interno	50 µl	50 µl	50 µl

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 1 ml di **Reagente C – Sol. di condizionamento 1** *Non portare a secco !*
- Versare in colonna 1 ml di **Reagente D – Sol. di condizionamento 2** *Non portare a secco !*

Scartare l'eluato

FASE 3 : Caricamento del Campione

- Versare tutto il campione precedentemente preparato nelle colonne Clean-up (in due step da 1 ml ciascuno) 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). Non portare a secco.

FASE 4 : Lavaggio

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

FASE 5 : Eluizione

- Eluire con 300 µl di **Reagente F – Sol. eluente** *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato*

FASE 6:

- Aggiungere all'eluato 600 µl di **Reagente G – Sol. Stabilizzante**

Al vortex per 10 secondi

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

INIEZIONE :

- Iniettare 10/20 µl nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

CLOZAPINA E NORCLOZAPINA SIERICHE e/o PLASMATICHE – Avvertenze

REAGENTE C : SOLUZIONE TEST

CLOZAPINA	circa 10.000 µg/l
NORCLOZAPINA	circa 10.000 µg/l

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

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

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

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

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica Poroshell 120 EC-CN 4,6 x 50 mm, 2,7 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) ad un flusso di 1 ml/min. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Far passare 30 ml di una soluzione di H ₂ O : Metanolo (80 : 20 v/v) ad un flusso di 1 ml/min. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. Al termine, iniettare il test e verificare la congruità della separazione. NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase. Se la temperatura 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 e DELL'AGO DI INIEZIONE

Disconnettere il detector. Flussare 15 ml di una soluzione di H ₂ O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v/v) a 1 ml/min per 30 minuti scaricandola. Flussare una soluzione di H ₂ O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v/v) per 30 minuti scaricandola. Si raccomanda di eseguire il lavaggio della colonna analitica alla fine di ogni seduta analitica. La colonna va stoccata in una soluzione di H ₂ O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v/v). L'ago di iniezione va lavato con una soluzione di H ₂ O : Etanolo (80 : 20 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	10 o 20 µl
Flusso di lavoro consigliato	1 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 80 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z76016	Calibratore liofilo in siero per Clozapina e Norclozapina	4 x 2 ml
Z76019	Controllo liofilo in siero per Clozapina e Norclozapina, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
Z699975905	Colonna Analitica Poroshell 120 EC-CN 4,6 x 50 mm, 2,7 µ	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

CLOZAPINA E NORCLOZAPINA PLASMATICHE

(Cromatogrammi di riferimento)

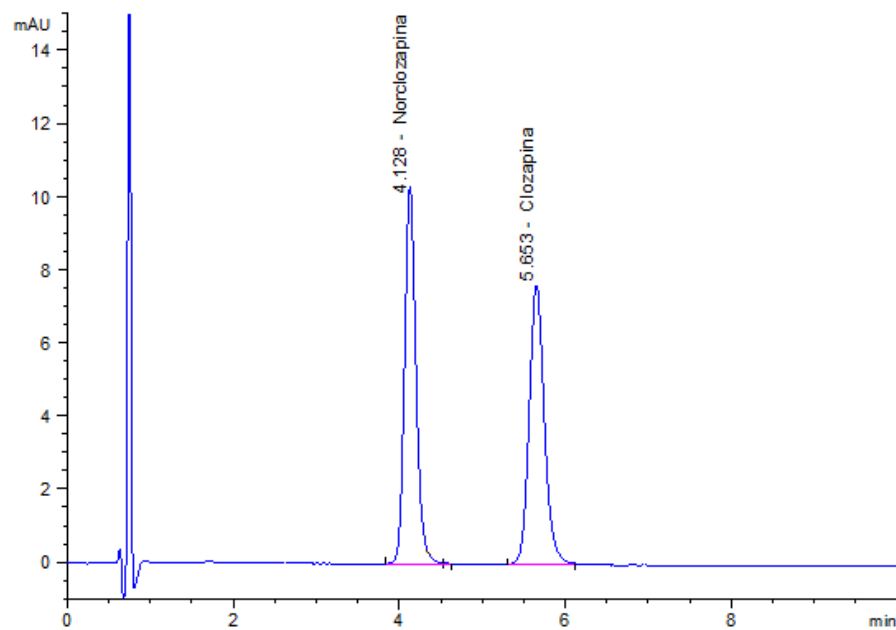


Fig. 1 :	Soluzione Test
	R.T. 4.12 Norclozapina
	R.T. 5.65 Clozapina

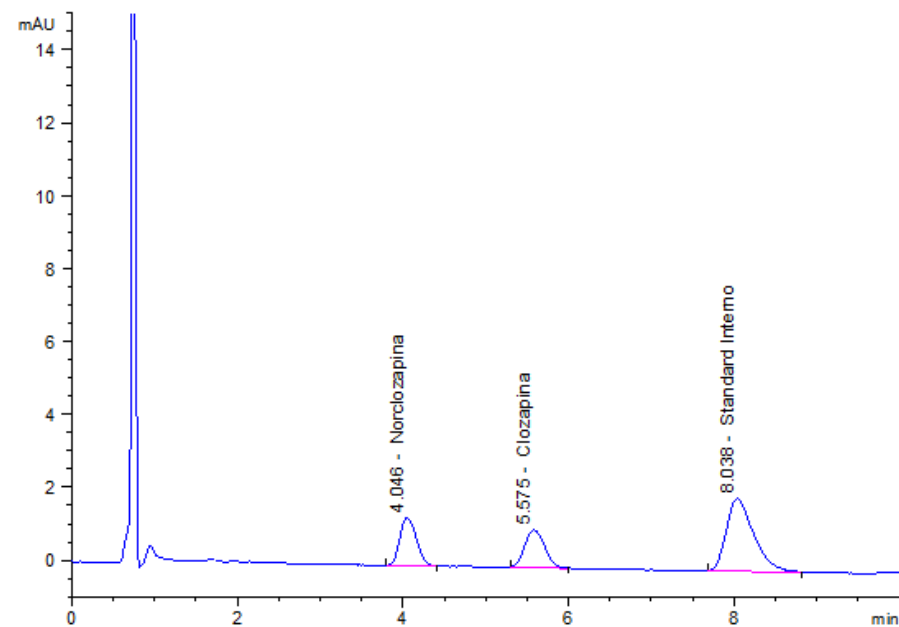


Fig. 2 :	Calibratore Plasmatico
	R.T. 4.04 Norclozapina 400,0 ng/ml
	R.T. 5.57 Clozapina 495,0 ng/ml
	R.T. 8.03 Standard Interno

CLOZAPINA E NORCLOZAPINA PLASMATICHE

(Cromatogrammi di riferimento)

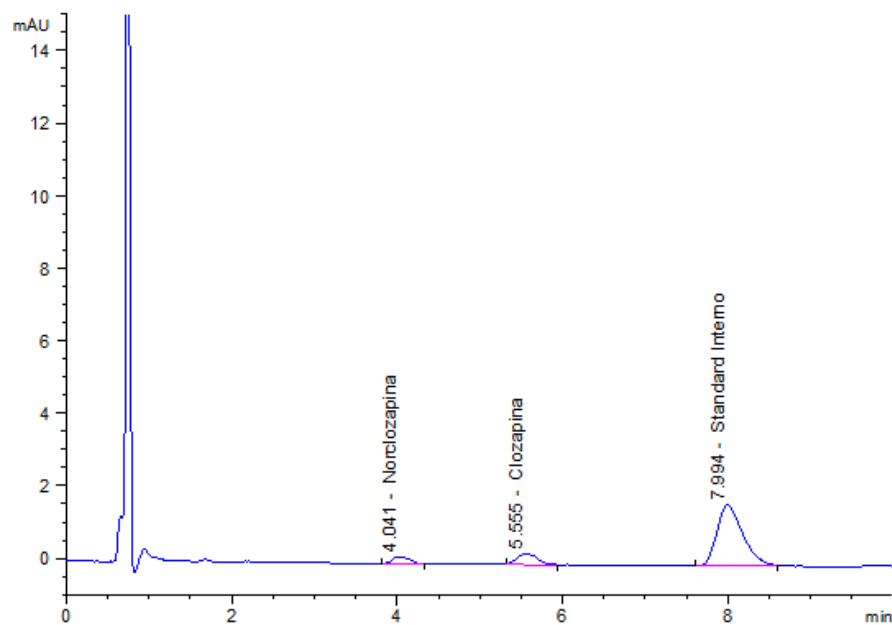


Fig. 3 : *Controllo Basso Plasmatico*

R.T.	4.04	Norclozapina	95,0 ng/ml
R.T.	5.55	Clozapina	120,0 ng/ml
R.T.	7.99	Standard Interno	

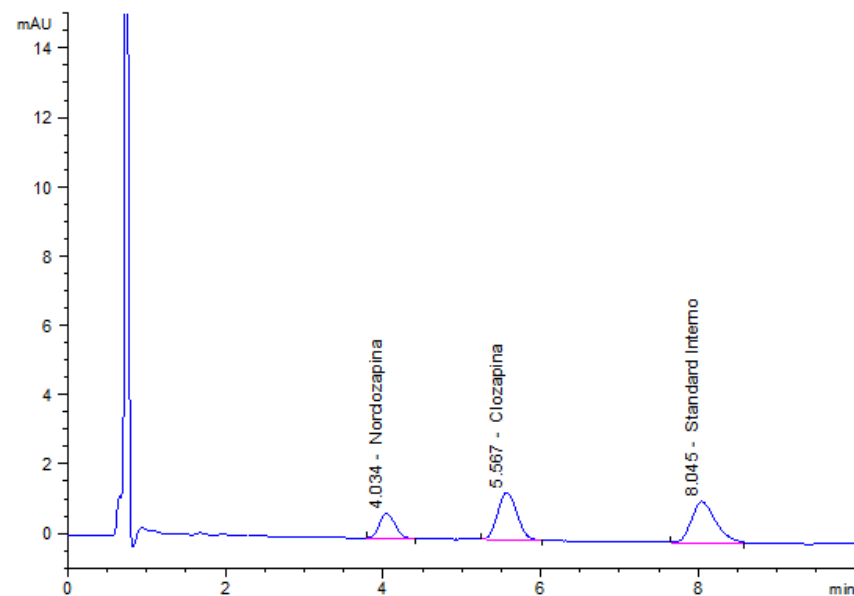


Fig. 4 : *Controllo Alto Plasmatico*

R.T.	4.03	Norclozapina	800,0 ng/ml
R.T.	5.56	Clozapina	900,0 ng/ml
R.T.	8.04	Standard Interno	