

TOPIRAMATO PLASMATICO in FLUORIMETRIA – Codice Z77010

BIOCHIMICA

Il *topiramato* è un monosaccaride sulfamato sostituito con alcuni meccanismi di azione che provocano il blocco dell'insorgenza delle convulsioni: i principali sono la modulazione dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, il potenziamento dell'attività inibitoria del neurotrasmettitore GABA e l'attenuazione della attività eccitatoria dei neurotrasmettitori AMPA-Kainato. Il profilo farmacocinetico del *topiramato*, rispetto a quello di altri farmaci antiepilettici, dimostra una lunga emivita plasmatica, proprietà farmacocinetiche lineari, escrezione prevalentemente per via renale, assenza di significativi legami con le proteine plasmatiche e mancanza di metaboliti attivi clinicamente rilevanti. Vi è una differenza tra sessi nel volume di distribuzione: i valori nelle femmine sono mediamente pari al 50% di quelli nei maschi. Questo viene attribuito alla maggiore presenza di grasso corporeo nelle femmine senza conseguenze cliniche. Il cibo non ha effetti clinici sulla biodisponibilità del topiramato.

Interferenze: la contemporanea somministrazione di topiramato e fenitoina e/o carbamazepina comporta una diminuzione della concentrazione di topiramato.

Il *topiramato* è approvato per l'uso nell'uomo sia negli adulti sia nei pazienti pediatrici per la sua attività a spettro relativamente ampio contro molti tipi di crisi convulsive e per gli effetti collaterali minimi.

 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° 009	Topiramato plasmatico in Fluorimetria	2024
--------	---------------------------------------	------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

Il presente metodo consente di determinare le concentrazioni plasmatiche del **Topiramato** dopo purificazione SPE e derivatizzazione del plasma con un opportuno reagente; dopo una doppia incubazione a 50 °C il campione viene iniettato nel cromatografo HPLC.

Recupero del Metodo : 98,7 %

Sensibilità del Metodo : 2 µg/l

Range Dinamico : 10 – 40.000 µg/l

Valori di Riferimento: 2.000 – 25.000 µg/l

CV%: 6,8 intra serie
6,6 inter serie

Contenuto della confezione : Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C. Eccetto il **Reagente G** che va stoccato a – 20 °C.

Reagente A - Soluzione Diluente, **1 x 55 ml**

Reagente A1 – Soluzione Diluente per Standard Interno, **1 x 50 ml**

Reagente B - Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 140 ml**

Reagente C - Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 105 ml**

Reagente D – Soluzione di Lavaggio 1, **1 x 105 ml**

Reagente E - Soluzione di Lavaggio 2, **1 x 105 ml**

Reagente F – Soluzione Eluente, **1 x 70 ml**

Reagente G – Soluzione Standard Interno, **1 x 6 ml** **Stoccare a – 20 °C**

Reagente H – Soluzione Derivatizzante, **1 x 15 ml**

Reagente I – Soluzione Stabilizzante, **1 x 3 ml**

Reagente L – Soluzione Test, **1 x 5 ml** **Vedi Avvertenze**

Calibratore liofilo plasmatico, **1 x 5 ml** **Codice Z77016 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica**

Reagente M - Fase Mobile, **9 x 500 ml**

Colonne di Clean up, **100 pz**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 50 o 100µl
Detector Fluorimetrico $\lambda_{EX}=260\text{ nm}$ $\lambda_{EM}=315\text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta con Eparina come anticoagulante per il plasma.
Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti.
Separare il plasma e stoccarlo a – 20 °C. Stabile 4 settimane. E' possibile utilizzare siero (senza gel) in alternativa al plasma con Eparina.

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione dello Standard Interno

Diluire il **Reagente G** – Sol. Standard Interno 1:100 in **Reagente A1** – Sol. Diluente per Standard Interno preparando il volume sufficiente per coprire i campioni della seduta analitica

N.B.: tale diluizione va preparata fresca ad ogni seduta analitica

Preparazione della Soluzione Test

FASE 1: In una vial da 2 ml inserire :

- 100 µl di **Reagente H** – Soluzione Derivatizzante
- 90 µl di Acetonitrile (non fornito nel kit)
- 40 µl di Sol.Standard Interno diluito come indicato precedentemente
- 10 µl di **Reagente L** – Soluzione Test

Chiudere le vials con il tappo e vortexare per 10 sec.

FASE 2: Incubare per 15 minuti a 50 °C

FASE 3: Raffreddare ed aggiungere 20 µl di **Reagente I** – Soluzione Stabilizzante

Chiudere le vials con il tappo e vortexare per 10 sec.

FASE 4: Incubare per 5 minuti a 50 °C

FASE 5: Raffreddare ed aggiungere 200 µl di Acqua di grado HPLC

Al vortex per 10 secondi

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 20 - 50 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione del Topiramato 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 :** Questo Test così ottenuto non deve essere usato come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei Campioni, dello standard e dei controlli

Dispensare in provetta :

	Calibratore	Controllo	Campione
Calibratore	500 µl		
Controllo		500 µl	
Campione			500 µl
Reagente A – Sol. Diluente	500 µl	500 µl	500 µl

Al vortex per almeno 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 B – Sol. di condizionamento 1** *Non portare a secco !*
- Versare in colonna 1 ml di **Reagente C – Sol. di condizionamento 2** *Non portare a secco !*

Scartare l'eluato

FASE 3 : Caricamento del Campione

- Versare 1,0 ml di campione precedentemente preparato nelle colonne Clean-up 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).

FASE 4 : Lavaggio

- Lavare con 1 ml di **Reagente D – Sol. di lavaggio 1** *Non portare a secco !*
- Lavare con 1 ml di **Reagente E – Sol. di lavaggio 2** *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato* *Scartare l'eluato*

FASE 5 : Eluizione

- Eluire con 0,5 ml di **Reagente F – Sol. eluente** *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato*

Al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 2 settimane a - 20 °C

Diluire il **Reagente G – Sol. Standard Interno 1:100** in **Reagente A1 – Sol. Diluente per Standard Interno** preparando il volume sufficiente per coprire i campioni della seduta analitica

N.B.: tale diluizione va preparata fresca ad ogni seduta analitica

FASE 6: In una vial da 2 ml inserire :

- 100 µl di eluato ottenuto nella FASE 5
- 40 µl di Sol.Standard Interno diluito come indicato precedentemente
- 100 µl di Reagente H – Soluzione Derivatizzante

Chiudere le vials con il tappo e vortexare per 10 sec.

FASE 7: Incubare per 15 minuti a 50 °C

FASE 8: Raffreddare ed aggiungere 20 µl di Reagente I – Soluzione Stabilizzante

Chiudere le vials con il tappo e vortexare per 10 sec.

FASE 9: Incubare per 5 minuti a 50 °C

FASE 10: Raffreddare ed aggiungere 200 µl di Acqua di grado HPLC

Al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 2 giorni a - 20 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 20 - 50 µl della soluzione nel Cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

TOPIRAMATO - Avvertenze

REAGENTE L : SOLUZIONE TEST

TOPIRAMATO	100.000 µg/l
------------	--------------

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ_{Ex}	260 nm
λ_{Em}	315 nm
GAIN	Low

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Hypersil Gold CN 4,6 x 150 mm, 5 µ, è tassativo l'uso della protezione colonna Javelin Colfilter.
--

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Hypersil Gold CN 4,6 x 150 mm, 5 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H ₂ O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) ad un flusso di 1 ml/min. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 2 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. 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 per 15 minuti H ₂ O a 2 ml/min e scaricare. Flussare una soluzione di H ₂ O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) a 2 ml/min per 30 minuti scaricandola. La colonna va stoccata in una soluzione di H ₂ O : Acetonitrile (20 : 80 v/v). L'ago di iniezione va lavato con una soluzione di H ₂ O : Acetonitrile o Etanolo (80 : 20 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 o 100 µl
Flusso di lavoro consigliato	2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 100 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z77016	Calibratore plasmatico per Topiramato	4 x 5 ml
Z77019	Controllo plasmatico per Topiramato – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
TF2580515463	Colonna Analitica Hypersil Gold CN (150 x 4,6mm -5 µm)	1 PZ
TF88400	Javelin Colfilter - Superchrom	1 x 4 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ

TOPIRAMATO PLASMATICO

(Cromatogrammi di Riferimento)

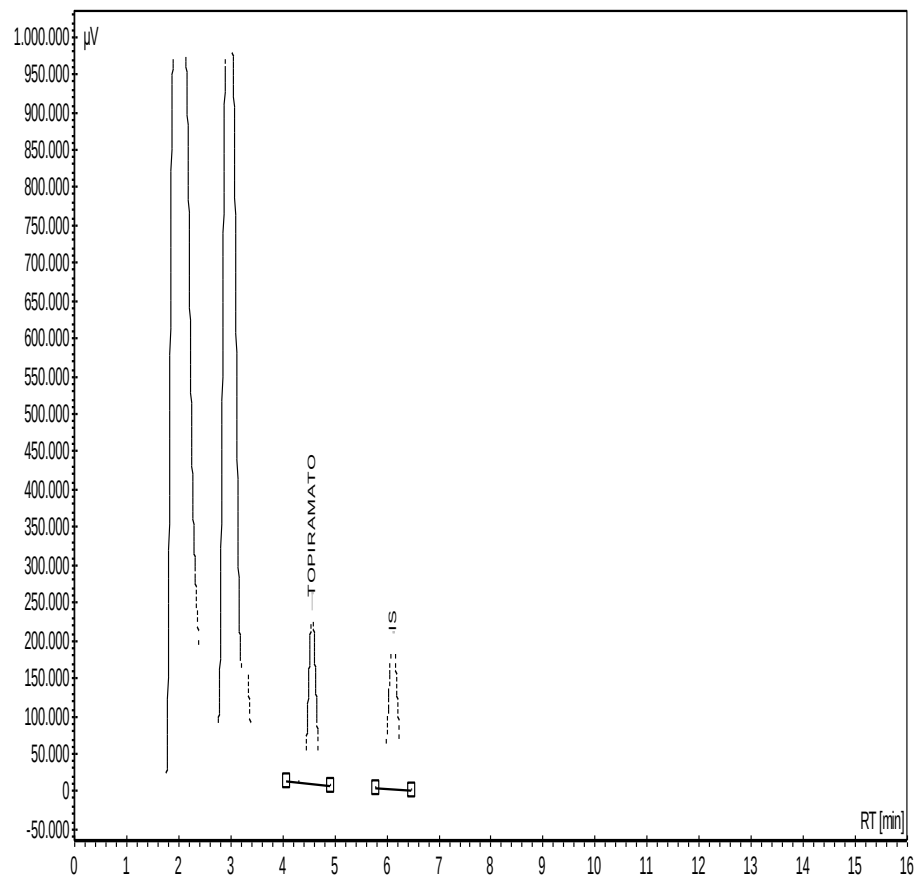


Fig. 1	Soluzione Test
	R.T. 4.56 Topiramato
	R.T. 6.11 Standard Interno

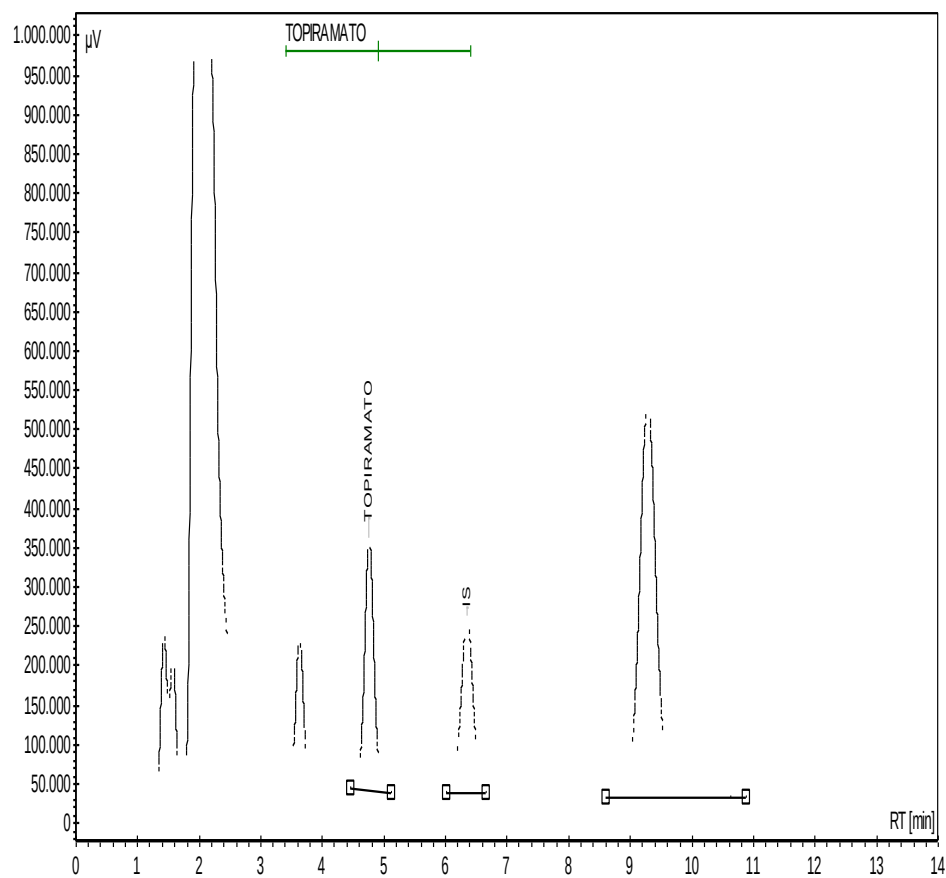


Fig. 2	Calibratore plasmatico
	R.T. 4.62 Topiramato 8.800 µg/l
	R.T. 6.19 Standard Interno

TOPIRAMATO PLASMATICO

(Cromatogrammi di Riferimento)

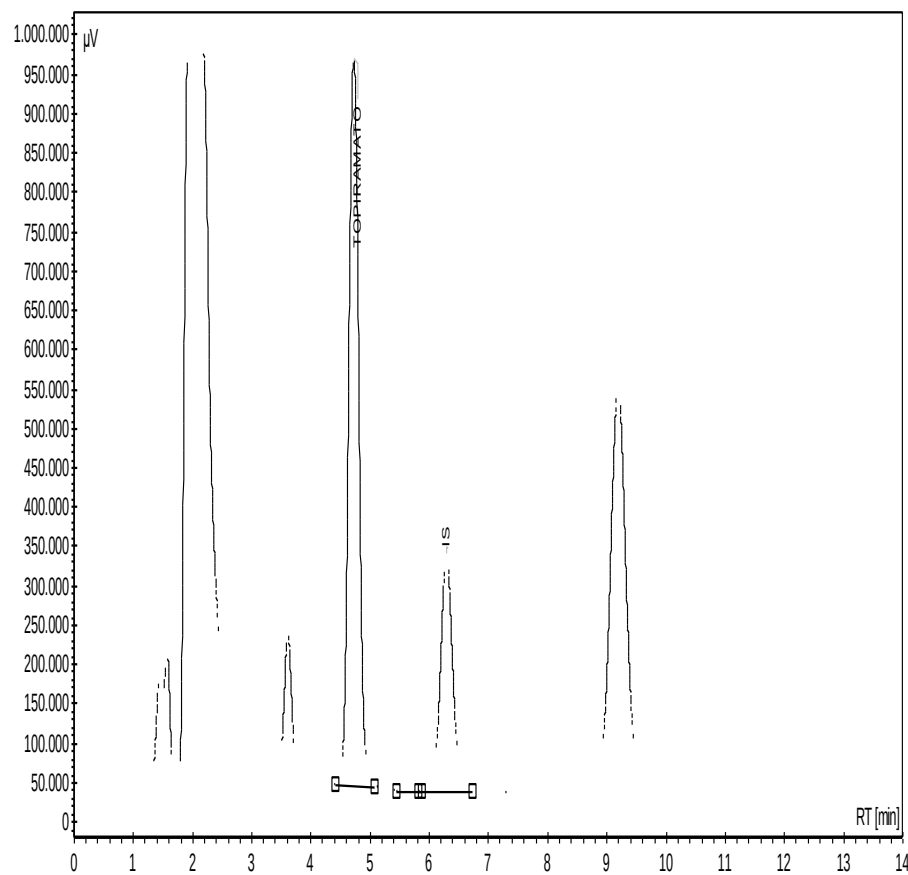


Fig. 3	Controllo plasmatico livello 2
	R.T. 4.60 Topiramato 17.400 µg/l
	R.T. 6.10 Standard Interno

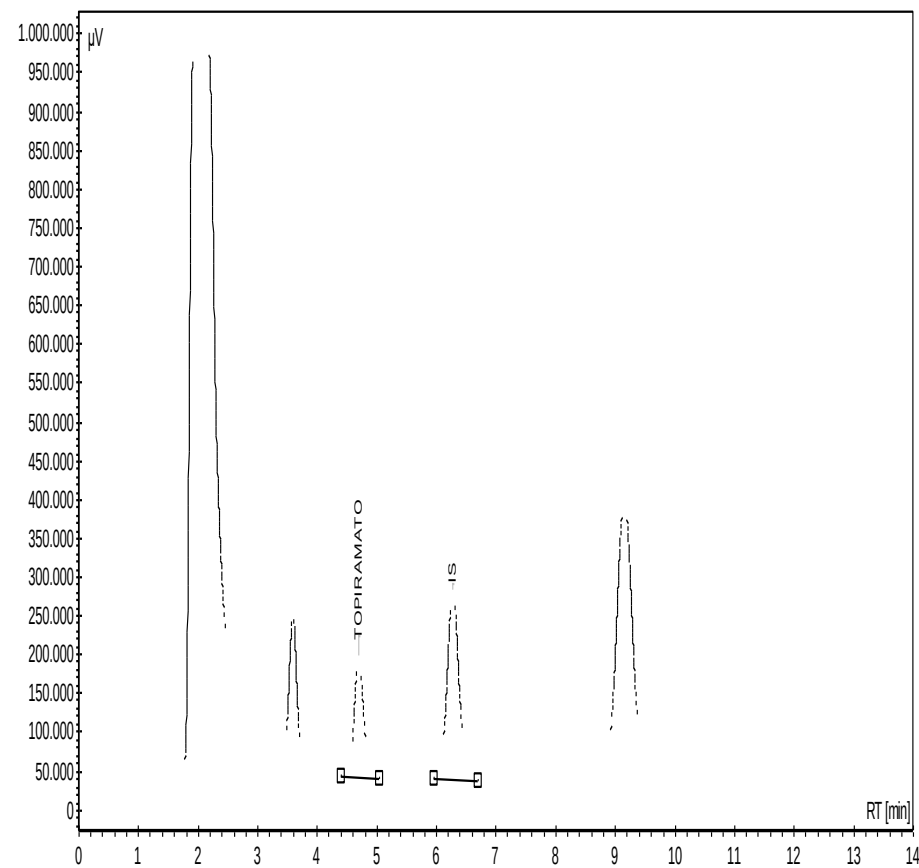


Fig. 4	Campione plasmatico
	R.T. 4.69 Topiramato 6.490 µg/l
	R.T. 6.27 Standard Interno