

LEVETIRACETAM PLASMATICO in UV - FAST – Codice Z84010

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 le concentrazioni plasmatiche del seguente farmaco antiepilettico:

1. Levetiracetam



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	Levetiracetam plasmatico in UV - FAST	07/2024
--------	---------------------------------------	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo :

Il **Levetiracetam** viene isolato trattando il plasma con un opportuno deproteinizzante. Dopo l'aggiunta di uno stabilizzante, la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Recupero del Metodo : >98%

Sensibilità del Metodo (LLOD): 0,75 µg/ml

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ): 2 µg/ml

Linearità del metodo : 2 – 200 µg/ml

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

C1	C2
7,5 µg/ml	37,5 µg/ml
7,0%	1,1%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

C1	C2
7,5 µg/ml	37,5 µg/ml
10,0%	3,5%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	CUP
2 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
7,6%	3,4%	2,3%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	CUP
2 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml
9,8%	4,3%	3,7%

Coefficiente di Correlazione + DS : 0,9937 ± 0,0036

Range Terapeutico nel plasma : *Levetiracetam* 10 – 37 µg/ml

Contenuto della confezione :

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

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante, **1 x 20 ml**

Reagente A1 – Standard Interno, **6 x 400 µl**

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

Reagente C – Soluzione Test, **1 x 2 ml**

Calibratore liofilo, **1 x 2 ml**

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

Codice Z04316

Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 µl
Detector spettrofotometrico UV / VIS $\lambda=205$ nm
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta con gel separatore OPPURE 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 :

- 950 µl di H₂O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente C - Soluzione Test**

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 5 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione dell' analita 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 : Ricostituzione dello Standard interno

Ad ogni flacone di **Reagente A1 – Standard interno**, aggiungere 3 ml di **Reagente A – Soluzione Deproteinizzante** (**stabile 3 mesi a 2-8 °C**)

Al vortex per 10 secondi

FASE 2 : Preparazione dei Campioni

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

	Bianco	Calibratore	Campione
Acqua di grado HPLC	200 µl		
Calibratore		200 µl	
Campione			200 µl
Reagente A1 - Deproteinizzante con Standard Interno (dopo ricostituzione FASE 1)	200 µl	200 µl	200 µl

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

FASE 3 : Centrifugare a 10000 rpm per 5 minuti.

FASE 4 : Trasferire 200 µl di sovranatante in una vial di vetro.

- Aggiungere a ciascuna provetta 200 µl di **Reagente B – Sol. Stabilizzante**

Al vortex per 5 secondi

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

INIEZIONE :

- Iniettare 5 µl della soluzione nel cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

LEVETIRACETAM - Avvertenze

REAGENTE C: SOLUZIONE TEST

LEVETIRACETAM	500 µg/ml
---------------	-----------

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	205 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µ) è tassativo l'uso del Prefiltri Javelin (1 x 10 pz), cod. S90199511.
--

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µ). Disconnettere il detector Fluorimetrico e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : 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 ml/minuto e scaricare i primi 20 ml. 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 µ prima di ogni seduta analitica. Il segnale che la fase mobile deve essere cambiata è dato dal significativo innalzamento del rumore di fondo del detector Fluorimetrico. 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 H₂O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v / v) al flusso di 1,0 ml/minuto e scaricare. Flussare una soluzione di H₂O : 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 H₂O : Acetonitrile o Metanolo (30 : 70 v / v)
--

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua / Etanolo o Metanolo o Acetonitrile (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
Z04316	Calibratore plasmatico per Levetiracetam	4 x 2 ml
Z04319	Controllo plasmatico per Levetiracetam – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
Z84011	Fase Mobile	4 x 500 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120-EC-C 18 (50 x 4,6mm –2,7 um)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
S51820717	Tappi per Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ

LEVETIRACETAM PLASMATICO

(Cromatogrammi di riferimento)

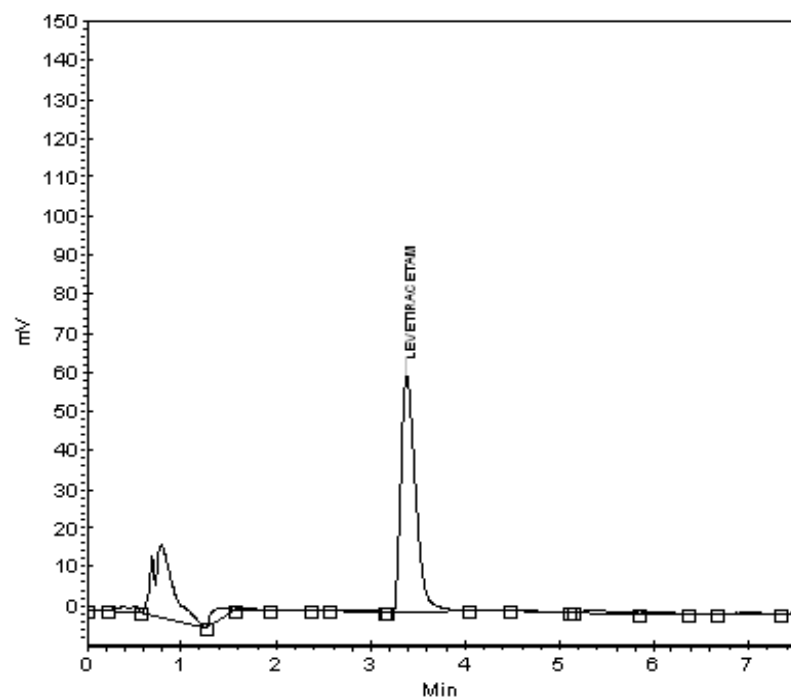


Fig. 1 :	Soluzione Test
	R.T. 3.39 Levetiracetam

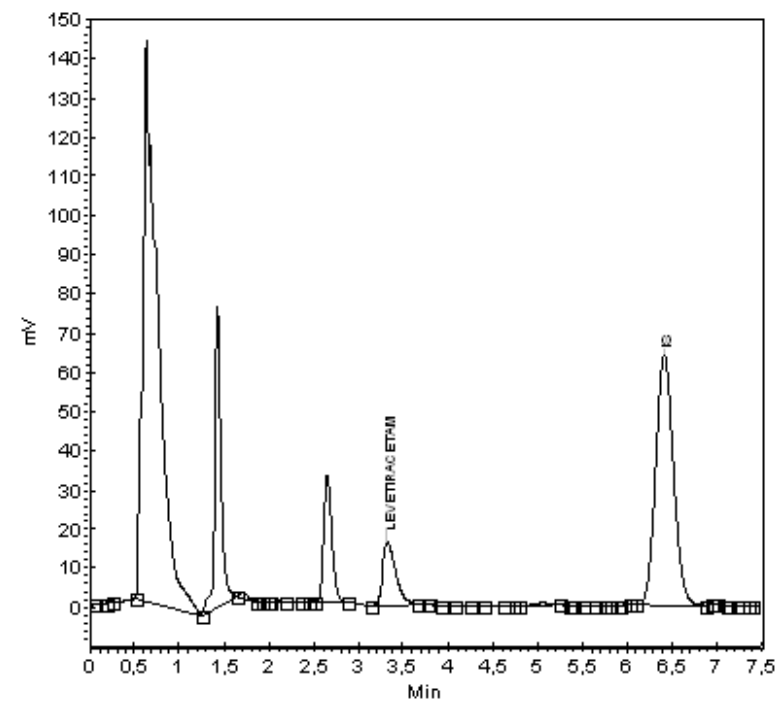


Fig. 2 :	Calibratore liofilo plasmatico
R.T. 3.33	Levetiracetam 23,9 µg/ml
R.T. 6.42	Standard interno

LEVETIRACETAM PLASMATICO

(Cromatogrammi di riferimento)

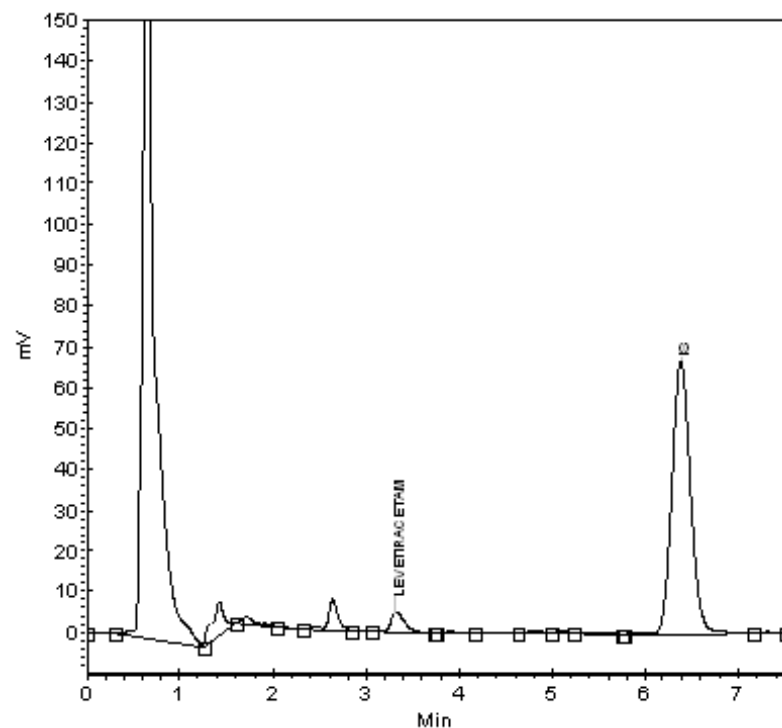


Fig. 3 :	Controllo liofilo plasmatico livello 1
R.T. 3.32	Levetiracetam 6,8 µg/ml
R.T. 6.42	Standard interno

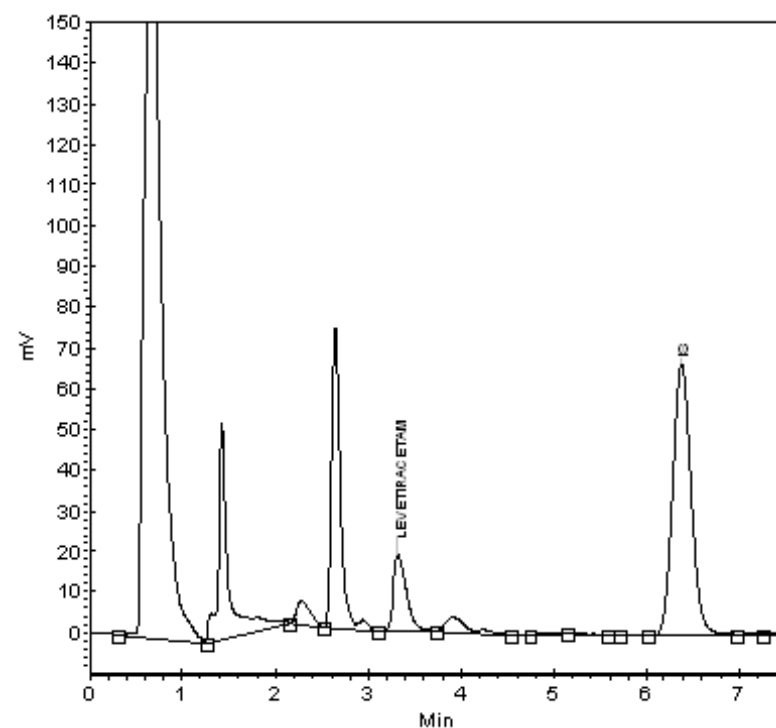


Fig. 4 :	Campione di plasma
R.T. 3.33	Levetiracetam 28,0 µg/ml
R.T. 6.38	Standard interno