

ANTIEPILETTICI 6 plasmatici in UV - FAST - Codice Z87010

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 :

1. *Etosuccimide*
2. *Zonisamide*
3. *Lacosamide*
4. *Primidone*
5. *Lamotrigina*
6. *Monoidrossicarbamazepina*



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



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 6 plasmatici in UV - FAST	07/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo :

Gli Antiepilettici vengono isolati trattando il plasma o il siero 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) :

0,66 mg/l Etosuccimide
0,06 mg/l Zonisamide
0,06 mg/l Lacosamide
0,06 mg/l Primidone
0,06 mg/l Lamotrigina
0,06 mg/l Monoidrossicarbamazepina

Minima Concentrazione Analizzabile (LLOQ):

2,0 mg/l Etosuccimide
0,2 mg/l Zonisamide
0,2 mg/l Lacosamide
0,2 mg/l Primidone
0,2 mg/l Lamotrigina
0,2 mg/l Monoidrossicarbamazepina

Linearità del Metodo :

2 - 200 mg/l Etosuccimide
0,2 - 200 mg/l Zonisamide
0,2 - 200 mg/l Lacosamide
0,2 - 200 mg/l Primidone
0,2 - 200 mg/l Lamotrigina
0,2 - 200 mg/l Monoidrossicarbamazepina

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Etosuccimide:

Ci	Cs
15 mg/l	60 mg/l
6,64%	3,18%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Etosuccimide:

Ci	Cs
15 mg/l	60 mg/l
11,22%	3,68%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Etosuccimide:

Cl	Cm	Cs
2 mg/l	30 mg/l	100 mg/l
11,01%	7,75%	2,87%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Etosuccimide:

Cl	Cm	Cs
2 mg/l	30 mg/l	100 mg/l
10,19%	8,48%	4,72%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,9950 ± 0,0030 Etosuccimide

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Zonisamide:

Ci	Cs
6,25 mg/l	25 mg/l
5,64%	1,81%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Zonisamide:

Ci	Cs
6,25 mg/l	25 mg/l
7,43%	3,66%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Zonisamide:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	12,5 mg/l	50 mg/l
8,96%	4,07%	2,45%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Zonisamide:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	12,5 mg/l	50 mg/l
11,86%	5,15%	4,42%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,9963 ± 0,0021 Zonisamide

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Lacosamide:

Ci	Cs
3,125 mg/l	12,5 mg/l
9,92%	8,08%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Lacosamide:

Ci	Cs
3,125 mg/l	12,5 mg/l
6,66%	5,32%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Lacosamide:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	6,25 mg/l	25 mg/l
4,49%	2,17%	1,89%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Lacosamide:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	6,25 mg/l	25 mg/l
8,31%	6,86%	2,79%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,997 ± 0,0026 Lacosamide

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Primidone:

Ci	Cs
3,125 mg/l	12,5 mg/l
4,55%	3,31%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Primidone:

Ci	Cs
3,125 mg/l	12,5 mg/l
3,97%	3,04%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Primidone:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	6,25 mg/l	25 mg/l
6,46%	2,47%	1,4%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Primidone:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	6,25 mg/l	25 mg/l
13,42%	6,82%	2,66%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,997 ± 0,0017 Primidone

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Lamotrigina:

Ci	Cs
3,125 mg/l	12,5 mg/l
3,76%	1,16%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Lamotrigina:

Ci	Cs
3,125 mg/l	12,5 mg/l
3,67%	2,07%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Lamotrigina:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	6,25 mg/l	25 mg/l
4,07%	1,88%	1,96%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Lamotrigina:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	6,25 mg/l	25 mg/l
12,05%	8,8%	2,57%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,997 ± 0,0010 Lamotrigina

Accuratezza intra serie (errore relativo %) Monoidrossicarbamazepina:

Ci	Cs
6,25 mg/l	25 mg/l
4,26%	2,21%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) Monoidrossicarbamazepina:

Ci	Cs
6,25 mg/l	25 mg/l
3,73%	2,55%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Monoidrossicarbamazepina:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	12,5 mg/l	50 mg/l
2,03%	3,07%	1,92%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Monoidrossicarbamazepina:

Cl	Cm	Cs
0,2 mg/l	12,5 mg/l	50 mg/l
9,18%	7,38%	6,47%

Coefficiente di correlazione R² + Dev Std

0,9910 ± 0,0053 Monoidrossicarbamazepina

Range terapeutico nel plasma :

Etosuccimide	40 – 100 mg/l
Zonisamide	10 – 38 mg/l
Lacosamide	1 – 10 mg/l
Primidone	5 – 12 mg/l
Lamotrigina	3 – 14 mg/l
Monoidrossicarbamazepina	3 – 40 mg/l

Contenuto della confezione :

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

Reagente A – Soluzione Deproteinizzante + Standard Interno, 1 x 30 ml

Reagente B – Soluzione Stabilizzante, 1 x 10 ml

Reagente C – Soluzione Test, 1 x 2 ml

Vedere Avvertenze

Calibratore liofilo plasmatico, 1 x 2 ml

Codice Z87016 Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Reagente M – Fase Mobile, 3 x 500 ml

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 10 µl
Detector spettrofotometrico UV / VIS λ=205 nm

Modalità di prelievo ematico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel per il siero e con Eparina come anticoagulante per il plasma.
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**

Al Vortex per 20 secondi

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 nelle fig. sottostanti. 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 provette coniche da 1,5 ml tipo Eppendorf con tappo :

	Bianco	Calibratore	Campione	Controllo
Acqua di grado HPLC	100 µl			
Calibratore		100 µl		
Campione			100 µl	
Controllo				100 µl
Reagente A – Deproteinizzante con Standard Interno	300 µl	300 µl	300 µl	300 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 100 µl del sovranatante limpido in una provetta.

- Aggiungere a ciascuna provetta 100 µl di **Reagente B – Sol. Stabilizzante**

Al vortex per 5 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 1 giorno a 2-8 °C

INIEZIONE :

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

ANTIEPILETTICI 6 - Avvertenze

REAGENTE C: SOLUZIONE TEST

ANTIEPILETTICI :	Circa
Etosuccimide	400 mg/l
Zonisamide	200 mg/l
Lacosamide	200 mg/l
Primidone	200 mg/l
Lamotrigina	200 mg/l
Monoidrossicarbamazepina	200 mg/l

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	205 nm
GAIN	0,001 AUFS

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 nuova POROSHELL 120 EC-C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 μ).
Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di **H₂O : Acetonitrile (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 : Acetonitrile (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.
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 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1,0 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 115 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z87016	Calibratore per Antiepilettici 6 sierici e/o plasmatici	4 x 2 ml
Z87019	Controllo per Antiepilettici 6 sierici e/o plasmatici - Livelli 1 e 2	2 x 5 x 2 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120-EC-C 18 (50 x 4,6mm -2,7 μ m)	1 PZ
S90199511	Javelin Colfilter	1 x 10 PZ
S51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 PZ
S51820717	Tappi per Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 μ l	1 x 100 PZ

ANTIEPILETTICI 6 PLASMATICI

(Cromatogrammi di Riferimento)

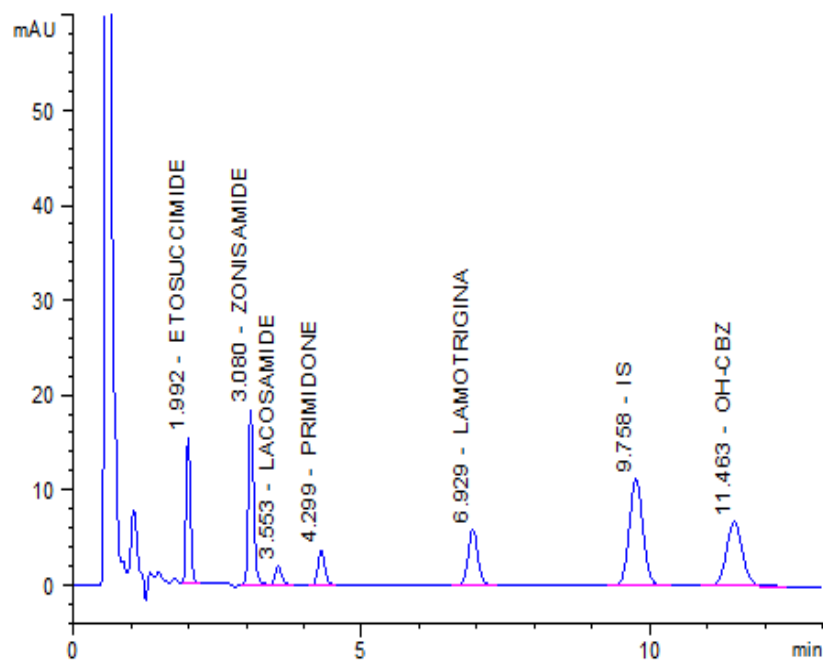


Fig. 1 :	Calibratore plasmatico
	R.T. 1.99 Etosuccimide
	R.T. 3.08 Zonisamide
	R.T. 3.55 Lacosamide
	R.T. 4.29 Primidone
	R.T. 6.92 Lamotrigina
	R.T. 9.75 Standard Interno
	R.T. 11.46 Monoidrossicarbamazepina

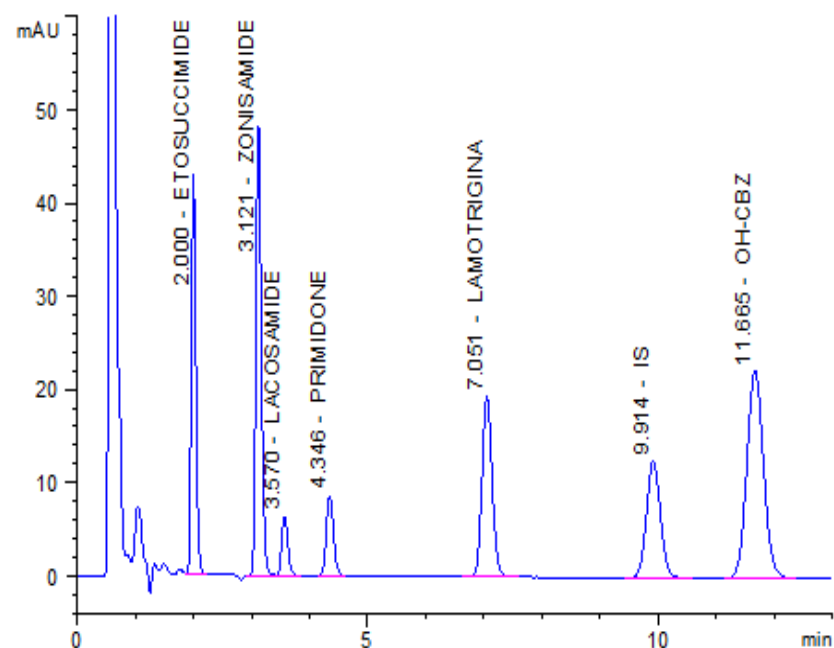


Fig. 2 :	Controllo plasmatico – Livello 2
	R.T. 2.00 Etosuccimide
	R.T. 3.12 Zonisamide
	R.T. 3.57 Lacosamide
	R.T. 4.34 Primidone
	R.T. 7.05 Lamotrigina
	R.T. 9.91 Standard Interno
	R.T. 11.66 Monoidrossicarbamazepina