

SERIES GV-65 DE GRAVEDAD "NO VACÍO" PARA EL ANALISIS DE 6-MONOACETIL MORFINA EN ORINA POR GC/MS.

Este método es un procedimiento preliminar, solamente para uso en investigación, aunque ha dado buenos resultados en nuestro laboratorio. El método tiene que ser validado por nuestro laboratorio antes de ser usado para reportar valores de pacientes. Apreciaremos sus comentarios sobre su funcionamiento y serán bienvenidas las sugerencias para su mejora y complemento.

Revisado: Marzo 2002

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA- (Favor de leer las notas y la información complementaria antes de continuar).

- 1.-Agregar 3.0 ml de orina a un tubo desechable de vidrio de borosilicato de 16x100 mm con un tapón roscado inerte.
- 2.-Agregar 50 ng de 6-MAM-d3 para cada muestra (Ver la nota a).
- 3.-Opcional: (Ver la nota a) pretratar las muestras adicionando de 1.0 ml de una solución saturada de bisulfito de sodio (Ver la nota b). Preparar disolviendo 25 g de bisulfito de sodio en 100 ml de una mezcla (1:1) de H₂O: 0.25M Buffer Fosfato, pH 6.0. Preparar mensualmente. (Almacenar en refrigeración).
4. - Mezclar cuidadosamente e incubar las muestras a 55°C por 15 min.
5. - Agregar 1.0 ml, 1% de HCl en agua desionizada.
6. - Si hay turbiedad o precipitados centrifugar por 3 minutos a 3000 RPM.

Nota a:

El paso de reducción bisulfito de sodio, cuando se combina con el paso de derivatización única elimina la interferencia de codones y morfones sin afectar la morfina y la codeína o 6-MAM. Si esta interferencia no concierne, este paso de reducción deberá ser eliminado y podrá continuar al paso 5 (arriba). La columna aún tiene que ser pretratada con bisulfito de sodio para activar el intercambio medio en la resina.

INSTALACIÓN DEL HARDWARE – Favor de consultar las instrucciones de instalación del Hardware Detectabuse

ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA

1. -Lavar la columna con 1.0 ml de metanol. Llevar a flujo por gravedad.
2. -Agregar 1.0 ml de solución de bisulfito de sodio a cada columna. Llevar a flujo por gravedad. Preparar disolviendo 25 g de bisulfito de sodio en 100 ml de una mezcla (1:1) de H₂O: 0.25M buffer Fosfato, pH 6.0. Preparar Mensualmente.
3. - Proceder a la extracción dentro de 60 min. del acondicionamiento de la columna.

EXTRACCIÓN DE A MUESTRA-(Favor de ver las notas al final de la sección antes de proceder)

- 1.-Verter las muestras dentro de la columna preacondicionada. Llevar a flujo por gravedad. Las muestras fluirán a través de la columna a un flujo de 1-2 ml/min.
2. -Lavar la columna con 3.0 ml de agua desionizada.
- 3.-Lavar la columna con 2.0 ml de metanol. Llevar la columna a flujo por gravedad.
- 4.-Lavar la columna con 1.0 ml de etil acetato. Llevar la columna a flujo por gravedad. Proceder a la elución de la muestra.

Nota: Si los líquidos no eluten libremente por flujo de gravedad, Probablemente haya aire atrapado en el lecho de la columna. Golpeando ligeramente el plato montado sobre la columna la caja de vacío iniciará el flujo.

ELUCIÓN DE LA MUESTRA

1. -La elución de la muestra se hará fuera de la caja de vacío.
2. -Colocar la columna montando el plato sobre el rack de elución cargado con el número apropiado de tubos de prueba de vidrio borosilicato de 12x75mm ó 15x85 mm. Asegurarse que el agujero patrón del plato ajuste con el agujero patrón del rack.
3. -Agregar 1.5 ml de n-Butil Cloruro:acetonitrilo (80:20) w/4% Trietilamina (TEA)* para cada columna y llevar el solvente a flujo a través de la columna por gravedad dentro de los tubos de prueba.
4. -Secar con N₂ ó Argón a menos de 50°C.

*La elución del solvente con 4% TEA, (4 ml de TEA se agregan a 96 ml de una mezcla 80:20 de n-Butil Cloruro: Acetonitrilo) es estable por lo menos un mes almacenado en un recipiente de vidrio con un

tapón de teflón o polipropileno lineal. Cerrar fuertemente cuando no se use.

Nota: Si la muestra no elute libremente por flujo de gravedad, es probable que se encuentre aire atrapado en el lecho de la columna. En la mayoría de los casos, golpeando ligeramente la columna iniciará el flujo. Si no trabaja, usar una varilla de hule para empujar cuidadosamente un par de gotas de solvente en elución y aire atrapado dentro del tubo colector. Llevar el resto de solvente a flujo por gravedad.

DERIVATIZACIÓN-

Usando TMSI/MBTFA

- 1.-Para cada extracto seco agregar 70 uL de Acetonitrilo y 15 uL de Trimetilsilimidizol (TMSI).
2. -Mezclar el contenido de los tubos, tapar e incubar a temperatura ambiente. Por al menos 5 minutos.
- 3.-Agregar 15 uL de N-Metil-bis (trifluoroacetamida) (MBTFA), mezclar el contenido de los tubos, arrastrar con nitrógeno o argón, tapar el tubo o transferir el contenido dentro de viales de reacción de 100 uL y sellar.
4. -Inyectar 1-2.0 uL

SUPLEMENTO- Cuando se use un sistema robótico automatizado.

Todos los líquidos deberán llevarse a flujo sin ayuda a través de la columna o deberán ser empujados a través de la columna con vacío o empujados a través de ella con presión positiva. Los parámetros para flujo con ayuda deberán colocarse como sigue:

Acondicionamiento de la columna- Pasar a través de la columna en aproximadamente 20 segundos (+/- 20%).

La muestra, la muestra lavada y el solvente en elución - Pasar a través de la columna en aproximadamente 60 segundos (+/- 20 %).

ANALISIS GC/MS

GC/MS: Equipo Hewlett-Packard con detector selectivo de masas.

Columna GC: H.P. Columna Capilar (o equivalente), 15 x 0.25, película 0.25 um de espesor.

Modo de adquisición: SIM

Temperatura de Inyector: 285 °C

Detector temperatura de interfase: 295°C

Temperatura de Programa:

Inicial: 110°C programar a 300°C a 25°C/min.

Tiempo de equilibrio: 1.0 min.

Separación:

Flujo de He: 1.0 ml/min. a 200 °C

Purga: 2 ml/min.

Tiempo de salida de purga: 1 min.

Solvente retraso: 5.0 min.

Arranque: 5.0 min.

Alto corrida: 9.0 min.

MSD PROGRAM

Componente	Iones Monitoreados	Tiempo de retención
	TMSI/MBTFA	
6-Monoacetilmorfina	340,399,400	7.33 min.
6-Monoacetilmorfina-d3	290,343,402	7.32 min.
6-Monoacetilmorfina-d6	290,343,405	7.31 min.

Nota: El tiempo de retención y la gamma de iones variará algo de instrumento a instrumento.