

DETECTABUSE™

SERIES DE GRAVEDAD METODO PARA EL ANALISIS DE BARTITURICOS EN ORINA POR GC/MS.

Este es un procedimiento preliminar para uso en investigación solamente, Aunque ha dado buenos resultados en nuestro laboratorio. La realización del procedimiento tiene que ser validada por nuestro laboratorio antes de ser usado para reportar valores de pacientes. Apreciaremos sus comentarios y serán bienvenidas sus sugerencias para su mejora y complemento.

Revisado: Mayo,2001

Subsituye:Marzo,1997

Preparación de la muestra- (Favor de leer las notas y suplementos de información antes de proceder)

1. - Agregar 1.0 ml de orina a tubos desechables de vidrio de 16x100 mm.
2. - Agregar 150 ng de Fenobarbital-d5 para cada muestra como estadar interno.
3. - Agregar 3.0 ml de Fosfato Buffer 0.25M, pH 9.1. Agitar Mezclando.
4. – Si la muestra ajustada tiene precipitaciones o turbiedad se debe centrifugar por 3 minutos a 3000 RPM.

Nota: Cuando se agregue un estandar interno disuelto en un solvente orgánico a una muestra de orina o muestra de sangre. El volumen de solvente no deberá exceder del 3% en volumen de la muestra buffer. Las altas concentraciones de solvente podrían producir pérdidas en la extracción.

HARDWARE SETUP- Favor de consultar las instrucciones de instalación del hardware.

ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA-

1. - Lavar la columna con 1 ml de metanol. Llevar a flujo por gravedad.
2. - Proceder a la extracción de la muestra en menos de 30 minutos del acondicionamiento de la columna.

EXTRACCION DE LA MUESTRA- (Favor de leer las notas al final de la sección antes de proceder)

1. - Verter las muestras preparadas dentro de columnas preacondicionadas. Llevar a flujo por gravedad. Las muestras fluirán a través de la columna a un flujo de 1-2 ml/min.
2. - Agregar 3.0 ml de agua desionizada a cada columna. Llevar la columna a flujo por gravedad.

3. – Agregar 1.0 ml de agua:metanol (60:40) para cada columna. Llevar a flujo por gravedad.
4. – Secar la columna aplicando vacío ajustado al menos 7” Hg por 5 minutos.(Probar colocando momentaneamente la palma de la mano sobre la columna. Se deberá sentir una fuerte extracción a través de la columna).

Nota: Si la muestra no elute libremente por flujo de gravedad, es probable que se encuentre aire atrapado dentro del lecho de la columna, en la mayoría de los casos, golpear ligeramente la columna iniciará el flujo. Algunas columnas que no tienen que vaciarse en 5 o 6 min. pueden ser inducidas a vacío bajo con una pequeña bomba de vacío.

ELUCIÓN DE LAS MUESTRAS- (Favor de leer la nota al final de la sección antes de proceder)

1. - La elución de la muestra se hace fuera de la caja de vacío.
2. - Colocar la columna montando el plato sobre el rack de elución cargado con el número adecuado de tubos de ensayo de vidrio borosilicato de 12x75 mm ó 15 x 85 mm. Asegurarse que el agujero del plato coincida con el agujero patrón del rack.
3. - Agregar 1.0 ml de n-Butil conteniendo) 2% (v/v) Trietilamina (TEA)* para cada columna y llevar el solvente a flujo por gravedad través de la columna dentro de los tubos de ensayo.
4. - Secar con Nitrógeno o Argón a menos de 60° C.

La elución del solvente sin TEA, puede ser almacenada en un recipiente de vidrio con botella de teflón o polipropileno. La elución de solvente sin TEA es estable al menos por un mes. Cerrar el recipiente fuertemente cuando no se use.

DERIVATIZACION EN COLUMNA

- 1. –Disolver residuos de hidroxido trimetilfenil amonio (TMPAH) 0.2M en 100 uL de Metanol.**
- 2. Tapar los tubos o transferir el contenido dentro de viales de reacción de 100 uL y sellar.**
3. - Inyectar 2.0 uL dentro de la columna para derivatización GC-MS.

SUPLEMENTO.- Cuando use un sistema robótico automatizado.

Todos los líquidos podrán ser llevados a flujo sin ayuda a través de la columna, con vacío o empujados a través de ella con presión positiva.

Los parámetros de ayuda pueden ser colocados como sigue:

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

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

Pasos de secado de la columna- Use 12-15 PSI de presión positiva por 40 segundos de o colocar el vacío a 15”Hg por 30 segundos (Estos parámetros de secado son para columnas individuales).

ANALISIS GC/MS

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

Columna GC: Columna de Capilaridad H.P. Ultra 2 (o equivalente), 15 x 0.25, película 0.25 um de espesor.

Modo de adquisición: SIM

Temperatura de Inyector: 280 °C

Temperatura de Detector: 295°C

Inicial:90°C, mantener por 1.0 min., programar a 20°C/min. a 205°C

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: 3.0 min.

Arranque: 3.0 min.

Alto corrida: 9.0 min.

MSD SIM PROGRAM**MTBSTFA**

Droga	Iones Monitoreados	Tiempo de retención
Butalbital	181,195,196,237	4.53
Butabarbital	112,169,184,211	4.82
Amobarbital	112,169,184,239	5.10
Pentobarbital	112,169,184,225	5.27
Secobarbital	181,195,196,266	5.52
Fenobarbital	117,175,232,260	6.57
Fenobarbital-d6	122,180,237,265	6.56
Difenilhidantoina	118,194,203,280	8.15