

"NO VACÍO" SERIES DE GRAVEDAD MÉTODO GV-65 PARA EL ANALISIS DE PENCICLIDINA (PCP) EN ORINA POR GC/MS.

-

Aunque este método ha dado buenos resultados en nuestro laboratorio. Este 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: Octubre 2001

PREPARACION DE LA MUESTRA- (Favor de ver la nota y la información suplementaria antes proceder).

1. - Pipetear 2.0 ml de orina a un tubo de vidrio desechable de 16x100 mm con un tapón roscado inerte.
2. - Agregar 25 ng de PCP-D5 por ml de muestra como estándar interno.
3. - Agregar 1.0 ml, 1% HCl en agua desionizada. Mezclar agitando.
4. - Si la muestra ajustada es turbia o tiene precipitados centrifugar por 3 minutos a 3000 R.P.M.

Nota: Cuando agregue un estándar interno disuelto en un solvente orgánico a una muestra de orina o de sangre, el volumen de solvente no debe de exceder del 3% del volumen de la muestra buffer. Las altas concentraciones de solvente podrían ocasionar perdidas en la extracción.

INSTALACIÓN DEL HARDWARE - Favor de consultar las instrucciones de instalación del hardware.

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 para cada columna. Preparar por disolución de 25 g de bisulfito de sodio en 100 ml de una mezcla (1:1) de agua: 0.25 M de buffer fosfato, pH 6.0

Preparar mensualmente

3. -Proceder a la extracción de la muestra dentro de 60 minutos de acondicionada la columna.

EXTRACCION DE LA MUESTRA (Favor de ver las notas al final de esta sección antes de proceder)

1. - Verter las muestras sobre la columna preacondicionada. Llevar las muestras 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. Llevar a flujo por gravedad.

3. - Lavar la columna con 2.0 ml de metanol. Llevar a flujo por gravedad

4. - Lavar la columna con 1.0 ml de Etil Acetato. Llevar a flujo por gravedad. Proceder a la disolución de la muestra.

DILUCIÓN DE LA MUESTRA

1. - La dilución de la muestra se hace fuera de la caja de vacío

2. - Colocar la columna montando el plato sobre el rack cargado con el número apropiado de tubos de ensayo de vidrio borosilicato de 12 x 75 mm o 15 x 85 mm conteniendo las muestras de dilución. Asegúrese que el hoyo estructural del plato coincida sobre el hoyo estructural del rack.

3. - Agregar 1.5 ml de n-butyl cloruro: Etil acetato (80:20) w/4 Trietilamina (TEA)* para cada columna llevar el solvente a flujo a través de la columna por gravedad dentro de los tubos de prueba.

4. -Secar bajo N2 con Argón a menos de 50 °C.

*El solvente en elución con 4% TEA (4 ml de TEA son agregados a 96 ml de n-Butil cloruro: Etil acetato 80:20) es estable por al menos un mes almacenado en un frasco de vidrio con un tapón de teflón o polipropileno. Cerrar el frasco fuertemente cuando no se use.

Nota: Si los líquidos no fluyen libremente por flujo de gravedad. Probablemente haya aire atrapado dentro del lecho de la columna. Golpear ligeramente el plato montado sobre la columna la bomba de vacío deberá iniciar el flujo.

RECONSTITUCIÓN

1. - Para cada extracto secado agregar 100 uL de Etil Acetato, mezclar agitando y arrastrar con Nitrógeno o Argón.
2. -Mezclar el contenido de los tubos, y tapar el tubo o transferir el contenido dentro de viales de reacción de 100 uL y sellar.
3. -Inyectar 2.0 uL.

SUPLEMENTO- Cuando se esté usando un sistema automático robotizado, todos los líquidos deberán ser llevados a flujo sin ayuda a través de la columna o podría ser llevado a través de la columna con vacío o empujar a través con presión positiva.

Los parámetros de ayuda de flujo pueden ser colocados como sigue:

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

ANALISIS GC/MS

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

Columna GC: H.P. ultra 2 columna de capilaridad (o equivalente) 15x25, espesor de película 0.25 um.

Modo de adquisición: SIM

Temperatura del inyector: 250°C

Detector de la temperatura de la interfase: 280°C

Temperatura del Programa:

Inicial: 110°C mantener por 1 min. Programar a 20°C/min. a 210°C

Final: programar a 30°C/min. a 275 °C

Tiempo de equilibrio: 1.0 min.

División :

Flujo He: 1.0 ml/min. a 200°C

Purga: 2 ml/min

Tiempo de Purga: 1 min

Retraso de solvente: 3.5 min.

Inicio de secuencia: 3.5 min.

Detener: 8.25 min.

PROGRAMA MSD

<u>Droga</u>	<u>Iones monitoreados</u>	<u>Tiempo de Retención</u>
Penciclidina:	200,242,243	5.50 min.
D5-PCP:	205,247,248	5.48 min.

Nota. El tiempo de retención y el espectro de ión variarán de instrumento a instrumento.

