



DEVOR DIAGNOSTICOS S.A de C.V.

Corporativo Lázaro Cárdenas 3260-3 Guadalajara, Jal. México
Tel./Fax 333-121-8770
D.E. Morelos 159-103 México, D.F. Tel.555-740-4151/Fax 555-740-3308

**BIOCHEMICAL DIAGNOSTICS, INC.
(DETECTABUSE®) SERIES "NO VACIO" GV-65 INTERCAMBIO CATIONICO- METODO PARA EL ANALISIS GC/MS DE ANFETAMINAS, METAMFETAMINAS, 3,4 METILENODIOXIANFETAMINAS (MDA), METILENODIOXIMETANFETAMINAS (MDMA) Y METILENODIOXIETILANFETAMINAS (MDEA) EN ORINA POR GC/MS.**

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

Revisado: agosto, 2002

Nota: Esta revisión elimina el reporte de interferencias causadas por un artefacto que se forma cuando la oxidación del periodato se hace bajo condiciones ácidas o de pH neutro en la presencia de grandes cantidades de efedrina o pseudoefedrina.

PREPARACION DE LA MUESTRA

SIN OXIDACIÓN PERIODATO- (Favor de ver las notas y la información complementaria antes de proceder)

1. Agregar 1.0 ml de orina de un tubo desechable de vidrio 16x100 mm con un tapón roscado inerte.
2. Agregar 500 ng de D-amfetamina-d5 y 500 ng de D-metanfetamina-d5 a cada muestra. (Incluir deuterado MDA, MDMA y si se analiza MDEA).
3. Agregar 1.0 ml de HCl 1% en agua desionizada.
4. Las muestras ocasionales con turbidez o precipitados deberán centrifugarse por 3 minutos a 3000 RPM.

Nota: Cuando se agregue un estándar interno disuelto en un solvente orgánico a una muestra de sangre o de orina, el volumen de solvente no deberá exceder del 5% de la muestra buffer. Las altas concentraciones de solvente podrían producir pérdidas en la extracción.

CON OXIDACIÓN PERIODATO (OPCIONAL)

1. Agregar 2.0 ml de Fosfato Buffer pH 9.1 (0.25 M) a 1 ml de orina con picos tan altos como el estándar interno.
2. Agregar 0.4 ml de una solución al 10% de metaperyodato de sodio en agua a orina con un pico como estándar interno (el pH deberá estar entre 8-9) Mezclar bien.

Preparación de metaperyodato de sodio: agregar 10 g de metaperyodato de sodio a 100 ml de agua desionizada, mezclar bien hasta que la solución esté clara.

3. Incubar a temperatura ambiente por 20 min.
4. Agregar 0.4 ml, 10% de HCl en agua desionizada. Una orina muy básica podría requerir más ácido (el pH final deberá estar entre 2-3)
5. Las ocasionales muestra turbias o con precipitados deberán centrifugarse a 3000 RPM por 3 minutos.
6. Proceder a la extracción de la muestra.

INSTALACIÓN DEL HARDWARE

Favor de consultar las instrucciones de instalación del Equipo Multiprep.

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 (Preparar disolviendo 25g de bisulfito de sodio en 100 ml de una mezcla 1:1 de H₂O:0.25M Buffer Fosfato pH 6.0, 0.25M Preparar mensualmente (almacenar en refrigeración).
3. Proceder a la extracción de la muestra en menos de 60 minutos del acondicionamiento de la columna.

EXTRACCION DE LA MUESTRA

(Favor de ver la nota al final de la sección antes de proceder)

- 1- Vaciar las muestras preparadas dentro de las columnas preacondicionadas. Llevar a flujo por gravedad. Las muestras deberán fluir a través de la columna a un flujo de 1-2 ml/min.
- 2- Lavar la columna con 2.0 ml de ácido acético glacial 0.1M Llevar a flujo por gravedad. Este lavado podría ser eliminado si la oxidación no se ha realizado.
- 3- Lavar cada columna con 3.0 ml de agua desionizada. Llevar a flujo por gravedad.
- 4- Lavar la columna con 1.0 ml de Metanol. Llevar a flujo por gravedad.
- 5- Lavar la columna con 1 ml de Etil Acetato. Llevar a flujo por gravedad. Proceder a la elución de la muestra.

Nota: Si los líquidos no eluten libremente por flujo a gravedad es probable que haya aire atrapado dentro del lecho de la columna. Golpeando ligeramente el plato donde esta montada la columna, sobre la caja de vacío, se deberá iniciar 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 vidrio de 12x75mm ó 15x85mm.

Asegúrese de que el agujero patrón del plato coincida con el agujero patrón del rack.

3. Agregar 1.5 ml de n-Butil Cloruro: Etil Acetato (80:20) w/4% trietilamina (TEA)* a cada columna y llevar el solvente a flujo a través de la columna por gravedad dentro de los tubos de prueba.

4. Agregar 100 µL de Ácido Tartárico en Etil Acetato (1mg/ml) para cada tubo, seguido por mezclado suave.

5. Secar con Nitrógeno ó Argón a menos de 50°C.

*La elución del solvente con 4% TEA (4ml de TEA se agregan a 96 ml de n-Butil Cloruro: Etil Acetato 80:20) es estable por lo menos un mes, almacenado en un frasco de vidrio con tapa de teflón o polipropileno. Cerrar el frasco fuertemente cuando no se use.

DERIVATIZACIÓN

Usando HFBA

1-Agregar 50 µL de Etil acetato y 50 µL de Anhídrido Heptafluorobutírico (HFBA) para cada eluyente secado en la columna. Tapar los tubos y mezclar el contenido suavemente.

2-Agregar 100 µL de Ácido Tartárico en Etil Acetato (1 mg/ml) a cada tubo, seguido de un mezclado suave.

3-Secar los eluyente a menos de 50°C y reconstituir con 100 µL de Etil acetato.

4-Inyectar 1.0 µL o transferir a un vial automuestreador.

Usando el Derivativo 4-CB

1-Agregar 100 µL 4-Carboxihexafluorobutiril Cloruro que ha sido diluido 1:10 con n-Butil Cloruro para cada eluyente seco en la columna y tapar los tubos. Mezclar cuidadosamente el contenido e incubar a 65°C por 20 minutos.

2-Agregar 300 µL de Etanol Absoluto (puro o especialmente desnaturalizado fórmula 3A) e incubar a 65°C por 15 minutos.

3-Secar el eluyente con Argón o Nitrógeno a menos de 50°C. Reconstituir con 100 µL de Etil-Acetato.

4-Inyectar 1-2 µL o transferir a un vial.

SUPLEMENTO. Cuando se use un sistema robótico automatizado.

Todos los líquidos serán llevados a flujo sin ayuda a través de la columna con vacío o empujados a través con presión positiva. Para flujo con ayuda los parámetros se colocarán como sigue:

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

ANÁLISIS GC/MS

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

Columna GC: Columna de capilaridad Ultra 2 H.P (o equivalente) 15m x 0.25mm, 0.25µm de espesor de film. Modo de adquisición: SIM

Temperatura de Programa:

Inyec. temp.: 175°C

Detector temp.: 250°C

Colocando: (HFBA)

Inicial: 75°C, mantener por 0.5 min. incrementar a 20°C/min. a 200°C

Final: Incrementar de 200°C-275°C a 40°C/min.

Colocando : (4-CB)

Inicial: 120°C, incrementar a 20°C/min. a 225°C,

Final: Incrementar de 275°C a 20°C/min.

Equil. Time: 1.0 min.

Split ratio: Splitless

He flow: 1.0 ml/min. a 200 °C

Setup Purge: 2 ml/min.

Purge off time: 1 min.

Dwell: 30

Solvent delay: 3.0 min.

Start Acq.: 3.0 min.

Stop run: 9.0

MSD PROGRAM

	Derivativo 4-CB		Derivativo HFBA	
	lonas Monitoreados	tiempo de retención	lonas Monitoreados	tiempo de retención
Amfetamina-D5	298,270	3.90 min.	123,244	3.50 min.
Anfetamina	294,266,248	3.93 min.	91,118,240	3.55 min.
Metanfetamina-D5	312,284	4.36 min.	213,258	4.19 min.
Metanfetamina	308,280,262	4.39 min.	118,210,254	4.21 min.
MDA-D5	167,270	5.56 min.	167,244	5.50 min.
MDA*	162,248,266	5.59 min.	162,240,375	5.53 min.
MDMA-D5	167,284	5.95 min.	213,258	6.12 min.
MDMA**	162,280,308	5.98 min.	162,210,254	6.15 min.
MDEA-D5	-	-	274,409	6.71 min.
MDEA***	-	-	162,240,268,403	6.77 min.

*3,4 Metilendioxiacetanfetamina (MDA)

** 3,4 Metilendioxiacetanfetamina (MDMA)

***3,4 Metilendioxiacetanfetamina (MDEA)