



DEVOR DIAGNOSTICOS S.A de C.V.
Corporativo, Lázaro Cárdenas 3260-3 Guadalajara, Jal.
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 GV-65 METODO PARA EL ANÁLISIS DE BENZODIACEPINAS URINARIAS 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 validado por su laboratorio antes de ser usado para reportar valores de pacientes. Apreciaremos sus comentarios y serán bienvenidas sus sugerencias para su mejora y complemento.

Revisado: Febrero 2001

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

(Favor de ver la nota de información suplementaria antes de proceder)

1. Agregar 2.0 ml de orina a un tubo desechable de vidrio de 16x100 mm.
2. Agregar 250 ng de los estándares deuterados adecuados para cada ml de muestra de orina.

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

HIDRÓLISIS DE LA MUESTRA

1. Agregar 0.5 ml de Buffer Acetato 0.2M, pH 5.0 para cada muestra preparada. (el pH deberá estar entre 4.5-5.0)
2. Agregar 10,000 unidades de Beta Glucuronidasa, tipo sigma H-25 de Helix Pomatia (Cat. #G2887) a cada muestra.
3. Mezclar cuidadosamente e incubar a 55°C por dos horas o 4 horas a 37°C. La hidrólisis completa se alcanza en 16 horas a temperatura ambiente (15-30 °C).
4. Agregar 5.0 ml de Buffer Fosfato 0.25M, pH 6.0.
5. Centrifugar por 3 minutos a 4000 RPM.

HARDWARE SETUP

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 0.5 ml de solución de bisulfito de sodio (50 g/100 ml de H₂O preparada semanalmente) a cada columna.
3. Proceder a la extracción de la muestra antes de 60 minutos del acondicionamiento de la columna.

EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

(Favor de leer las notas al final de esta sección antes de proceder).

- 1.-Vaciar las muestras sobre la columna preacondicionada. Llevar a flujo por gravedad. Las muestras pasarán a través de la columna a un flujo de 1-2 ml/min.
- 2.-Agregar 2 ml de agua:metanol (60:40). Llevar la columna a flujo por gravedad.
- 3.-Agregar 1.0 ml de Hexano a cada columna y proceder inmediatamente al paso 4.
- 4.-Secar las columnas aplicando vacío, ajustado al menos a 7" Hg por 5 minutos. (Probar colocando momentáneamente la palma de la mano sobre la columna. Se deberá sentir una fuerte extracción a través de la columna.)

Nota: Si los líquidos no fluyen libremente por flujo a gravedad probablemente haya aire atrapado dentro del lecho de la columna. Golpeando ligeramente el plato de la caja de vacío donde esta montada la columna, deberá iniciarse el flujo. Algunas columnas que no se vacían en 5-6 min. Podrían ser inducidas con poco vacío, con una pequeña bomba de vacío.

ELUCIÓN DE MUESTRAS

1. La elución de muestras se hace fuera de la caja de vacío
2. Colocar la columna montando el plato sobre el rack cargado con un número apropiado tubos de ensayo de vidrio de 12x75 mm ó de 15x85 mm. Asegúrese que el agujero patrón coincida con el agujero patrón del rack.
3. Agregar 1.5 ml de elución básica de solvente (Etil acetato:isopropanol, 95:5) w/2% trietilamina (TEA)* a cada columna y llevar el solvente a flujo a través de la columna por gravedad dentro de los tubos de ensayo.
4. Secar con N₂ o Argón a 55°C.

*Elución del solvente sin trietilamina-Etil acetato:isopropanol (95:5), deberá ser preparada y almacenada en un recipiente de vidrio con tapón roscado de teflón o polipropileno. La elución del solvente con 2% TEA (2 ml TEA se agregan a una mezcla de 98 ml de etil acetato:isopropanol) es estable al menos por un mes. Cerrar el recipiente fuertemente cuando no se use.

Nota: Si la muestra no fluye libremente por flujo de gravedad, es probable que se encuentre aire atrapado dentro del lecho de la columna. En la mayoría de los casos golpeando ligeramente la columna reiniciará el flujo. Si no trabaja usar una varilla de hule redondeada para empujar suavemente y provocar la caída del solvente en elución y el aire atrapado dentro del tubo de recolección. Deje que el remanente de solvente fluya por gravedad.

DERIVATIZACION

1. Para cada extracto seco, agregar 70 µL de Acetonitrilo, mezclar agitando. Después agregar 30 µL de MTBSTFA y 15 µL de trimetilsilimidazol (TSMI). Mezclar el contenido de los tubos, arrastrar con Nitrógeno o Argón y tapar el tubo o transferir el contenido dentro de viales de 100 µL y sellar.
2. Incubar la mezcla a 70°C por 30 minutos.
3. Llevar la mezcla a temperatura ambiente. Inyectar 1.0 µL.

SUPLEMENTO -Cuando se use un sistema robótico automatizado, todos los líquidos fluirán sin ayuda a través de la columna, o empujados a través con vacío o presión positiva.

PARÁMETROS DE AYUDA

Serán colocados como sigue:

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

Las muestras, muestras lavadas y solventes de elución, pasan a través de la columna en aproximadamente 60 segundos (+/- 20%).

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

ANÁLISIS GC/MS

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

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

Modo de adquisición: SIM

Temperatura de Inyector: 275 °C

Detector temperatura de interfase: 285°C

Temperatura de Programa:

Initial:180°C for 1 min. Program at 20°C/min.

Final:320°C hold for 1 min

Equil.: 1.0 min.

Splitless

He Flow: 1.0 ml/min a 200 °C

Septum Purge: 2 ml/min

Purge off time: 1 min.

Solvent delay: 4.0 min.

Dwell:30

Start Acq.: 4.0 min.

Stop Run: 9.0 min.

MSD PROGRAM

Droga	Iones Monitoreados	Tiempo de retención
Desalkylflurazepam	345,346,347	5.42 min
Nordiazepam	327,328,329	5.50 min.
Temazepam	343,344,245	5.90 min.
2-Hidroxiethylflurazepam	287,288,389	6.19 min.
7-Aminoflunitrazepam	354,355,356	6.32 min.
Desmetilflunitrazepam	310,356,357	6.42 min.
7-Aminonitrazepam	380,381,382	6.47 min.
Oxazepam	457,458,459	6.52 min.
7-Aminoclonazepam	414,415,416	6.98 min.
Lorazepam	491,492,493	7.00 min.
a-Hidroxiaprazolam	381,382,383	7.60 min.
a-Hidroxitriazolam	415,416,417	8.00 min.