



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 "NO VACIO" GV-65 INTERCAMBIO CATIONICO, MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE BENZOILECGONINA, COCAÍNA Y COCAETILENO EN ORINA POR GC/MS.

Revisado: Junio 2002
Substituye: Abril, 2002

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 con una tapa roscada inerte.
2. Agregar 150 ng/ml de Benzoylecgonina-d3 y cocaína-d3 a cada muestra.
3. Agregar 1.0 ml de HCl 1% en agua desionizada. Mezclar.
4. Si hay turbiedad o precipitaciones se debe centrifugar por 3 minutos a 3000 RPM.

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

INSTALACIÓN DEL EQUIPO

Favor de consultar las instrucciones de instalación del Equipo Multiprep.

ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA-

1. Lavar la columna con 1 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, mezclar. 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 leer las notas al final de la sección antes de proceder)

1. Vaciar 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. Llevar la columna flujo por gravedad.
3. Agregar 0.5 ml de metanol a cada columna. Llevar a flujo por gravedad.

4. Agregar 1.0 ml de Etil Acetato a cada columna. Llevar a flujo por gravedad.

Nota: Si los líquidos no fluyen libremente por gravedad es probable que se encuentre aire atrapado dentro del lecho de la columna. Golpeando ligeramente el plato donde esta montada la columna contra la caja de vacío deberá iniciarse el flujo.

ELUCION 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 bomba 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 de 12x75 mm ó 15 x 85 mm. Asegurarse que el agujero 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 por gravedad través de la columna dentro de los tubos de ensayo.
4. Secar con Nitrógeno o Argón a menos de 50° C.

1.* La elución del solvente sin Trietilamina-n-Butil Cloruro:Etil Acetato (80-20) puede ser preparada y almacenada en un frasco de vidrio con una tapa de teflón o polipropileno.

La elución con TEA 4% (4 ml de TEA se agregan a una mezcla 96 ml de n-Butil Cloruro: Etil Acetato) es estable por lo menos un mes. Cierre el recipiente fuertemente cuando no se use.

Nota: Si la muestra no fluye libremente por flujo a 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.

DERIVATIZACION-MTBSTFA

1. Para cada extracto seco agregar 75 µL de acetronitrilo, agitar la mezcla, después agregar 25 µL MTBSTFA. Mezclar el contenido del tubo, arrastrar con nitrógeno o Argón, tapar el tubo o transferir el contenido dentro de viales de 100 µL y sellar.
2. Incubar la mezcla a 70°C por 20 min.
3. Llevar la muestra a temperatura ambiente. Inyectar 1.0 µL.

Nota: Cuando se esté usando MTBSTFA para derivatización, es buena idea inyectar 2 µL de Diclorometano seguido por 2 µL de metanol después de cada 20-30 inyecciones. Esto prevendrá el acortamiento en la vida de la columna frecuentemente asociado con el uso de reactivos utilizados en derivatización.

DERIVATIZACION-BSTFA

- 1.- Para cada extracto seco agregar 50 µL de n-Butil Cloruro y 50 µL de BSTFA conteniendo 1% de TMCS. Agitar cuidadosamente el contenido de los tubos, arrastrar con nitrógeno o Argón, tapar el tubo o transferir el contenido dentro de viales y sellar.
2. - Incubar la mezcla a 70°C por 20 min.
3. - Llevar la muestra a temperatura ambiente. Inyectar 2.0 µL.

SUPLEMENTO

Cuando se use un sistema robótico automatizado.

Todos los líquidos podrán fluir sin ayuda a través de la columna, o con vacío 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%).

ANALISIS 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

MTBSTFA

Temperatura de Inyector: 270 °C

Detector temp.: 290°C

Temperatura de programa:

Inicial : 130°C mantener por 0.5 min., programar a 280°C a 30°C/min. Mantener por un minuto.

Equil. Time: 1.0 min.

Split Ratio: Splitless

He Flow: 1.0 ml/min a 200°C

Septum Purge: 2 ml/min

Purge off time: 1.0 min.

Solvent Delay: 4.0 min.

Dwell: 30

Solvent Delay: 4.0 min.

Start Acq.: 4.0 min

Stop Run: 7.5 min

BSTFA

Temperatura de Inyector: 270 °C

Temperatura de detector : 280°C

Temperatura del programa:

Inicial : 140°C mantener por 2.0 min., después programar a 220°C a 20°C/min.

Final: 220°C-275°C a 30 °C /min.

Equil. Time: 1.5 min.

Split Ratio: Splitless

He Flow: 1.0 ml/min a 200°C

Septum Purge: 2 ml/min

Purge off time: 0.5 min.

Dwell: 30

Solvent Delay: 5.0 min.

Start Acq.: 5.25 min

Stop Run: 8.0 min

MSD PROGRAM

MTBSTFA

<u>Druga</u>	<u>Iones Monitoreados</u>	<u>Tiempo de retención</u>
Benzoylcegonina	282,346,403	5.73
Benzoylcegonina-D3	285,349,406	5.70
Cocaína	182,198,303	4.80
Cocaína-D3	185,201,306	4.78
Cocaetileno	196,272,317	4.96
Cocaetileno-D3	199,275,320	4.94

MSD PROGRAM

BSTFA

<u>Druga</u>	<u>Iones Monitoreados</u>	<u>Tiempo de retención</u>
Benzoylcegonina	240,256,361	5.83
Benzoylcegonina-D3	243,259,364	5.82
Cocaína	182,198,303	5.45
Cocaína-D3	185,201,306	5.43
Cocaetileno	196,272,317	5.57
Cocaetileno-D3	199,275,320	5.55

Nota: El tiempo de retención y el espectro de los iones variará de instrumento a instrumento.

Precaución: 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 su laboratorio antes de ser usado para reportar valores de pacientes.