



DEVOR DIAGNOSTICOS S.A. de C.V.
Corporativo: Lázaro Cárdenas 3260-3 Guadalajara, Jal. México
Tel./Fax 333-121-8770
D.F. Morelos 159-103 México, D.F. Tel. 555-740-4151/Fax 555-740-3308

Biochemical Diagnostics, Inc. (Detectabase)
SERIES DE GRAVEDAD GV-65 “NO VACÍO”
MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE OPIACEOS
HIDROLIZADOS O “LIBRES” EN ORINA POR
GC-MS.

Aunque este método ha funcionado bien en nuestro laboratorio, este 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 las sugerencias para su mejora y complemento.

Revisado: Abril 2002

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

(Favor de leer las notas de información complementaria antes de proceder).

A.- Hidrólisis ácida

1. Pipetear 1.0 ml de muestra de orina dentro de un tubo de vidrio de 16x100 mm con una tapa roscada de teflón.
2. Pipetear 0.2 ml de HCl concentrado dentro de cada tubo.
3. Agregar 100 ng de morfina-d3 y 100 ng de codeína-d3 dentro de cada tubo. (Ver la nota B al final de la sección de preparación de muestras.)

FORMACIÓN OPCIONAL DE OXIMA

Para eliminar la interferencia de codones y morfones

(Ver la nota sobre Derivatización)

- A. Agregar 100 µL (10% w/v) Hidroxilamina (1g Hidroxilamina HCl/10 ml de agua desionizada)
- B. Agitar y proseguir al paso 4
4. Tapar los tubos y calentar en autoclave o en bloque. (Ver la nota C al final de la sección de preparación de muestras)
5. Enfriar los tubos
6. Agregar 1 ml de hidróxido de potasio diluido al 12% en agua por ml de muestra y mezclar. Agregar 12 g de KOH (assay 87%) a un matraz de 100 ml y llenar cuidadosamente con agua desionizada. (Ver precauciones al final de esta sección)
7. Agregar 1.0 ml de una solución al 20% de fosfato monobásico a cada muestra y mezclar (20 g/100 ml de agua preparar mensualmente). El pH final deberá estar entre 2.5 y 3.5. Si es necesario, ajustar el pH con un par de gotas de KOH 1N ó HCL 1N.

8. Las muestras deberán ser centrifugadas por 3 minutos a 3000 RPM.

Precaución: Absorción se debe hacer con un pH ácido de aproximadamente 2.5-3.5. El 1.0 ml de KOH y el buffer agregado en los pasos 6 y 7 generalmente establecen el óptimo pH para absorción. Sin embargo, si el pH es alto. Es decir mayor de 4.0, la recuperación de drogas disminuirá con el incremento del pH. Si el pH es demasiado bajo, el lavado de la columna no eliminará el ácido hidrolizado remanente en la columna. El exceso de ácido puede causar que el solvente básico de la elución llegara a ser débilmente básico o ácido que impediría la parcial o completa elución de la droga. Con un papel para medir pH se puede probar el pH del eluyente, mojando el papel con el solvente seguido por un enjuague con agua que permitirá reaccionar al color. Esto solo deberá hacerse para la primera corrida para asegurar que las condiciones del pH son correctas a través de la corrida. Si tuviera problemas con el procedimiento favor de contactarnos para asesoría.

B.- HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

1. - Agregar 0.1 ml de acetato buffer 0.2 M, pH 5.0 a 1 ml de orina conteniendo 100 ng de morfina-d3 y 100 ng de codeína-d3 como estándares internos. (El pH deberá estar entre 4.5-5.0)
2. - Agregar aproximadamente 5000 unidades de Beta-Glucuronidasa, sigma tipo L-2, de Patella Vulgata, a cada muestra.
3. - Mezclar suavemente e incubar a 50°C por 2.5 horas ó 37°C por 4 horas. La hidrólisis completa se alcanza en 16 horas a temperatura ambiente (15-30 °C).

FORMACIÓN OPCIONAL DE OXIMA

A.- Agregar 100 µL (10% w/v) Hidroxilamina.

B.- Agitar e incubar a 50°C por 30 min. proceder al paso 4.

4. - Agregar 1.0 ml de 1% de HCl en agua y mezclar.

5. - Las muestras deberán ser centrifugadas por 3 min. a 3500 RPM.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SIN HIDRÓLISIS “MEDICIÓN DE OPIÁCEOS LIBRES”

(Ver la nota D al final de la sección de preparación de muestras).

1.- Pipetear 1.0 ml de orina de la muestra dentro de un tubo de vidrio de 16 x 100 mm con tapón roscado de teflón.

2. - Agregar 100 ng de morfina-d3 y 100 ng de codeína-d3 dentro de cada tubo.

FORMACIÓN OPCIONAL DE OXIMA

(no puede ser usado para la prueba 6-MAM)

A-Agregar 100 µL de hidroxilamina (10% w/v acuosa) para preparar las muestras.

B-Agitare e incubar a 50°C por 30 min. Proceder al paso 4

4-Agregar 1.0 ml de HCl 1% en agua y mezclar.

5-Si hay turbiedad o precipitados, centrifugar por 3 min. a 3000 RPM.

Notas:

A. Tampoco las enzimas o ácidos hidrolizados podrán ser usados cuando se cuantifiquen opiáceos urinarios.

B. Cuando se agreguen estándares internos disueltos en un solvente orgánico a una muestra de sangre o de orina, el volumen de solvente no deberá exceder el 3% de

volumen de la muestra. Las altas concentraciones de solventes podrían producir pérdidas en la extracción.

C. 1. -Autoclave a 150°C por 15 min. a 15 PSI.

2. -Calentamiento en bloque a 120°C por al menos 30 min. La hidrólisis completa requiere al menos 2 horas.

D. Un apartado del método 6 MAM dispone que se usen 4 ml de orina para una mayor sensibilidad.

INSTALACIÓN DEL HARDWARE

Favor de consultar las instrucciones de instalación del Equipo Multiprep.

ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA Y ACTIVACIÓN DE LA FUNCIÓN CATION.

1.Lavar la columna con 1.0 ml de metanol. Llevar a flujo por gravedad.

2.Agregar 1.0 ml de una solución de bisulfito de sodio para cada columna. Preparar disolviendo 25g de bisulfito de sodio en 100 ml de una mezcla (1:1) de agua:Buffer Fosfato 0.25M, pH 6.0. Preparar mensualmente (almacenar en refrigeración).

3. - Proceder a la extracción de la muestra en menos 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 dentro de la columna preacondicionada. Las muestras hidrolizadas deberán ser vaciadas cuidadosamente para prevenir la transferencia de restos hidrolizados dentro de la columna. Llevar a flujo por gravedad. Las muestras fluirán a través de la columna a una velocidad de 1-2 ml/min.

2.Lavar la columna con 3.0 ml de agua desionizada.

Llevar la columna a flujo por gravedad.

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

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

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, se deberá iniciar el flujo.

ELUCION DE LA MUESTRA

1.La elución de la muestra deberá hacerse fuera de la caja de vacío.

2.Colocar la columna montada sobre el plato del rack de elución cargado con un número apropiado de tubos de ensayo de vidrio de 12 x 75 mm o 15 x 85 mm. Asegúrese que el agujero patrón del plato coincida con el agujero del rack.

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

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

*La elución del solvente con 4% TEA, (a 4 ml de TEA se agregan 96 ml de una mezcla 80:20 de n-butilcloruro:Etil acetato). Es estable al menos por un mes almacenada en un

recipiente de vidrio con tapa de teflón o polipropileno. Cerrar el recipiente fuertemente cuando no se use.

Nota: Si una muestra no fluye libremente por gravedad, es probable que haya aire atrapado en el lecho de la columna. En la mayoría de los casos golpeando ligeramente la columna se iniciará el flujo. Si no trabaja, usar una varilla de hule para llevar cuidadosamente unas gotas de solvente en elución al aire atrapado dentro del tubo colector. Llevar los remanentes de solvente a flujo por gravedad.

DERIVATIZACION SENCILLA TMS

Usando BSTFA con 1% de TMCS

1.Para cada extracto seco agregar 50µL de acetronitrilo, agitar la mezcla, después agregar 50 µL de BSTFA.

3.Mezclar el contenido de los tubos, arrastrar con Nitrógeno o Argón y tapar el tubo o transferir el contenido dentro de un tubo o vial de 100 µL y sellar.

4.Incubar la mezcla a 70°C por 20 minutos.

5.Llevar la mezcla a temperatura ambiente. Inyectar 2.0 µL.

-6-

DERIVATIZACION USANDO TMSI/MBTFA

(Esta derivatización solo es recomendada para 6-MAM para ayudar a eliminar la interferencia de codones y morphones)

1.Para cada extracto seco agregar 70 µL de Acetronitrilo y 15 µL de Trimetilsililimidisol (TMSI).

2.Mezclar el contenido de los tubos, tapar e incubar a temperatura ambiente, por lo menos 5 minutos.

3.Agregar 15 µL de N-metil-bis (Trifluoroacetamida)(MBTFA), mezclar el contenido de los tubos, arrastrar con Nitrógeno o Argón, tapar el tubo o transferir el contenido de dentro de viales de 100 µL y sellar.

4.Inyectar 1.0-2.0 µL.

Nota:

Los iones para Codeína y Morfina serán los mismos como cuando usamos BSTFA para derivatización.

Doble Derivatizado-Oxime /TMS

1. -Seguir las instrucciones para formación opcional oxime.

2. -Seguir las instrucciones para derivación TMS.

Nota:

El uso de la derivatización opcional de oximas convierte las posiciones morphone y codone 6 keto a sus correspondientes oximas para evitar la formación directa de silanos vía enolización a este lugar. El subsiguiente tratamiento de extractos con BSTFA o MSTFA formas de los derivados TMS de la codeína y la función hidroxil morfina y los derivados TMS/Oxima a las funciones Keto-Oxima de los codones y morphones. Esta técnica doble derivada produce significativas diferencias de espectro y tiempo de retención para los codones y morphones sin afectar la codeína y la morfina. La mejora en la separación por cromatografía producida por esta técnica resulta en la separación completa de 6-Hidroxil opiaceos de 6 keto opiaceos en una columna de 12 metros DB-1 ó DB-5.

Suplemento.- Cuando se use un sistema robótico automatizado, todos los líquidos pueden ser llevados a flujo sin ayuda a través de la columna o extraídos a través de la columna con vacío o empujados a través de la columna con una presión positiva.

ACONDICIONAMIENTO DE LA COLUMNA

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

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

LOS PARÁMETROS DE AYUDA DE FLUJO

pueden ser colocados como sigue:

ANALISIS GC/MS

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

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

Modo de adquisición: SIM

Temperatura Program:

Temp. Inyector: 260 °C

Temp. Detector: 300 °C

Initial: 140°C, program at 20°C/min. to 260°C

Program from 260°C-275°C at 5° C/min

Program from 275°C-280°C at 25° C/min

Equil. time: 1.0 min

Split Ratio : Splitless

Flow He: 1.0 ml/min. at 200 °C

Septum purge: 2 ml/min.

Purge off time: 1.0 ml/min.

D well: 30

Solvent Delay: 3.5 min.

Start Acq.: 3.5 min.

Stop Run: 9.0 min.

PROGRAMA MDS SIM

Drug	Iones Monitoreados	Tiempo de retención
Codeína-TMS	343,371,372	6.75 min.
Codeína-D3-TMS	346,374	6.72 min.
Oxycodone-TMS	387,372,330 229	6.73 min.
Hydrocodone-TMS	234,356,371	6.78 min.
Hydromorphone-TMS	357,414,429	7.04 min.
Morfina-TMS	236,414,429	7.08 min.
Morfina-D3-TMS	417,432	7.05 min.
Hidrocodone-Oxime/TMS	297,386	7.40 min.
Hidromorphone-Oxime/TMS	355,429,444	7.52 min.
Oxycodone-Oxime/TMS	402	7.95 min.