

AMFETAMINE urinarie in Fluorimetria - Cod. Z43010
(3,4-MDMA (Ecstasy), 3,4-MDA e 3,4-MDE)

Metodo di conferma HPLC

INTRODUZIONE

La MDMA (Ecstasy) è una droga sintetica psicoattiva con una lunga storia di uso ed abuso.

La sua determinazione di screening nei liquidi biologici (soprattutto in urina) viene generalmente effettuata usando tecniche immunometriche con l'ausilio di anticorpi monoclonali e successiva marcatura con vari reagenti.

Poiché tali tecniche non possono escludere falsi positivi, le positività allo screening devono essere confermate con tecnica alternativa, generalmente con tecnica cromatografia sia Gassosa (GC) che Liquida (LC) entrambe accoppiate con detector specifici e selettivi (UV, Fluorescenza, MS).

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579

CE

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

Release N° 013	Amfetamine urinarie in Fluorimetria	Settembre 2010
----------------	-------------------------------------	----------------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare la **3,4-MDMA** urinaria previa estrazione SPE e lettura in Fluorimetria. E' possibile separare anche i metaboliti **3,4-MDA** e **3,4-MDE** urinari. (Vedi Fig.2)

Recupero del Metodo :

98%

Sensibilità del Metodo :

circa 5,0 ng/ml

Valori di cut-off :

3,4- MDMA 250 ng/ml

3,4- MDA 250 ng/ml

3,4- MDE 250 ng/ml

Rif. Procedure applicative del procedimento n.99/cu 30 ottobre 2007

Contenuto della Confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C.

Reagente A – Soluzione Condizionamento 1, **1 x 100 ml**

Reagente B – Soluzione Condizionamento 2, **1 x 100 ml**

Reagente C – Soluzione Tampone, **1 x 100 ml**

Reagente D – Soluzione di Lavaggio, **1 x 200 ml**

Reagente E – Soluzione di Eluizione, **1 x 100 ml**

Reagente F – Soluzione di Diluizione, **1 x 20 ml**

Reagente G – Soluzione Test, **1 x 0,5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente H1 – Calibratore Urinario Liofilo – Livello 1, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente H2 – Calibratore Urinario Liofilo – Livello 2, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente H3 – Calibratore Urinario Liofilo – Livello 3, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente H4 – Calibratore Urinario Liofilo – Livello 4, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente H5 – Calibratore Urinario Liofilo – Livello 5, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente M – Fase Mobile, **3 x 500 ml**

Colonne di Clean-up, 100 pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 100 µl
Detector Fluorimetrico $\lambda_{EX} = 288 \text{ nm}$ $\lambda_{EM} = 324 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo urinario :

Prelevare 10 ml urina

Fase pre-analitica :

Se non si analizza subito, congelare a -20°C.
Stabile per circa 3 mesi

PROCEDURA PREANALITICA:

In una provetta pipettare :

- 450 µl di H₂O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente G** – Soluzione Test

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 100 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione dei 3 analiti che deve essere simile a quello riportato in Fig. 1. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico.

PROCEDURA ANALITICA**FASE 1** : Condizionamento delle colonne di Clean-up

- Versare in colonna 1 ml di **Reagente A** – Soluzione di Condizionamento 1 *Scartare l'eluato*
- Versare in colonna 1 ml di **Reagente B** – Soluzione di Condizionamento 2 *Scartare l'eluato*

FASE 2 : Preparazione del Campione

Fare una Curva di Calibrazione su 5 punti :

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controllo
Reagente H1 – Calibratore – Livello 1	1000 µl						
Reagente H2 – Calibratore – Livello 2		1000 µl					
Reagente H3 – Calibratore – Livello 3			1000 µl				
Reagente H4 – Calibratore – Livello 4				1000 µl			
Reagente H5 – Calibratore – Livello 5					1000 µl		
Campione						1000 µl	
Controllo							1000 µl
Reagente C – Sol. Tampone	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Controllare che il pH sia compreso tra 7 e 7,8 – Eventualmente correggerlo

Agitare al Vortex

FASE 3 : Versare tutti i campioni precedentemente preparati (mediante due aggiunte successive da 1 ml ognuna) nelle colonne di Clean-up e scaricare ad un flusso di 1 ml/ minuto.

Scartare l'eluato

FASE 4 : Lavaggio delle colonne di Clean-up:

- Lavare con 2 ml di **Reagente D** – Soluzione di Lavaggio
Scartare l'eluato e portare a secco con un leggero flusso d'aria

FASE 5 : Eluizione

- Eluire con 1 ml di **Reagente E** – Soluzione di Eluizione, ad un flusso di 1 ml/minuto.

Release N° 013	Amfetamine urinarie in Fluorimetria	Settembre 2010
----------------	-------------------------------------	----------------

Raccogliere l'eluato ed agitare accuratamente al vortex

Se si crea un intorbidimento o un precipitato nell'eluato, centrifugare a 4000 rpm per 2 minuti.

FASE 6 : Diluizione

- Prelevare 200 µl di eluato e aggiungere 200 µl di **Reagente F** – Soluzione di Diluizione

Agitare accuratamente al Vortex

N.B.: il campione così preparato è stabile 2-3 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 100 µl nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Release N° 013	Amfetamine urinarie in Fluorimetria	Settembre 2010
----------------	-------------------------------------	----------------

AMFETAMINE urinarie - Avvertenze

Reagente G: SOLUZIONE TEST

MDMA	~5.000 ng/ml
MDA	~5.000 ng/ml
MDE	~5.000 ng/ml

Reagenti H1-H2-H3-H4-H5: CALBRATORI URINARI LIOFILI – Lotto N°002

	Livello 1 ng/ml	Livello 2 ng/ml	Livello 3 ng/ml	Livello 4 ng/ml	Livello 5 ng/ml
MDMA	0	87.9	223.8	458.8	962.2
MDA	0	78.3	134.5	346.2	716.5
MDE	0	91.6	244.2	472.7	969.1
Modalità d'uso e ricostituzione: i calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere 5 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente fino a quando tutto il materiale non è dissolto. Prima del campionamento rimiscolare gentilmente per assicurarne l'omogeneità.					
Conservazione e stabilità: I calibratori liofili sono stabili 36 mesi se conservati a 2 – 8°C. Una volta ricostituiti 7 giorni se conservati a 2 – 8° C e 1 mese a – 20° C. Non usarli dopo la data di scadenza.					
Confezionamento: 5 x 1 x 5 ml					
Precauzioni: questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.					

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO Varian

λ_{EX}	288 nm
λ_{EM}	324 nm
SENSIBILITA' STRUMENTALE	2 - MEDIUM
TEMPO DI INTEGRAZIONE	5 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare il sistema completo PURSUIT XR_s C18 (50 x 4,6 mm, 3 µ) è tassativo l'uso del Metasaver Precolumn Filter 0.5 µm (1 x 10 pz), cod. ZA6005.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Reverse Phase Pursuit XR_s C18 4,6 mm x 50 mm, 3 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di H₂O per HPLC, al flusso di 1,2 ml / minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1 ml / minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche a ricircolo di fase.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare 30 ml di H₂O e scaricare. Flussare una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo far passare 30 ml di H₂O prima di condizionarla con la Fase Mobile.

IMPORTANTE : PULIZIA DELLA COLONNA DOPO L'USO DEL KIT

Flussare nella colonna H₂O a pH=3 per 3 ore ad un flusso di 1 ml/min e scaricare. Flussare una soluzione di Metanolo : Isopropanolo : Esano (75 : 15 : 10 v/v/v) per 3 ore ad un flusso di 1 ml/min scaricandola. Flussare una soluzione di Metanolo : H₂O pH=3 (80 : 20 v/v) per 4 ore ad un flusso di 1 ml/min scaricandola.

PARAMETRI HPLC

LOOP	100 µl
Flusso di lavoro consigliato	1 ml / minuto
Pressione corrispondente	Circa 140 bar

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
CC43016	Calibratore urinario per Amfetamine	5 x 2 x 5 ml
CC43017	Controllo multiparametrico per Droghe d'abuso – Livello 1	6 x 5 ml
CC43018	Controllo multiparametrico per Droghe d'abuso – Livello 2	6 x 5 ml
CC43019	Controllo multiparametrico per Droghe d'abuso – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 5 ml
ZA6001050C046	Sistema completo Colonna Analitica Pursuit XRs C18 (50 x 4,6mm -3 µm)	1 PZ
ZA6001050R046	Colonna interna Pursuit XRs C18	1 PZ
ZA6001CG3	Precolonna interna per Pursuit XRs C18	1 x 3 PZ
ZA6005	Metasaver Precolumn Filter 0.5 µm	1 x 10 PZ
S29307U	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 µl + tappini	1 x 100 PZ



AMFETAMINE urinarie in Fluorimetria

(Cromatogrammi di riferimento)

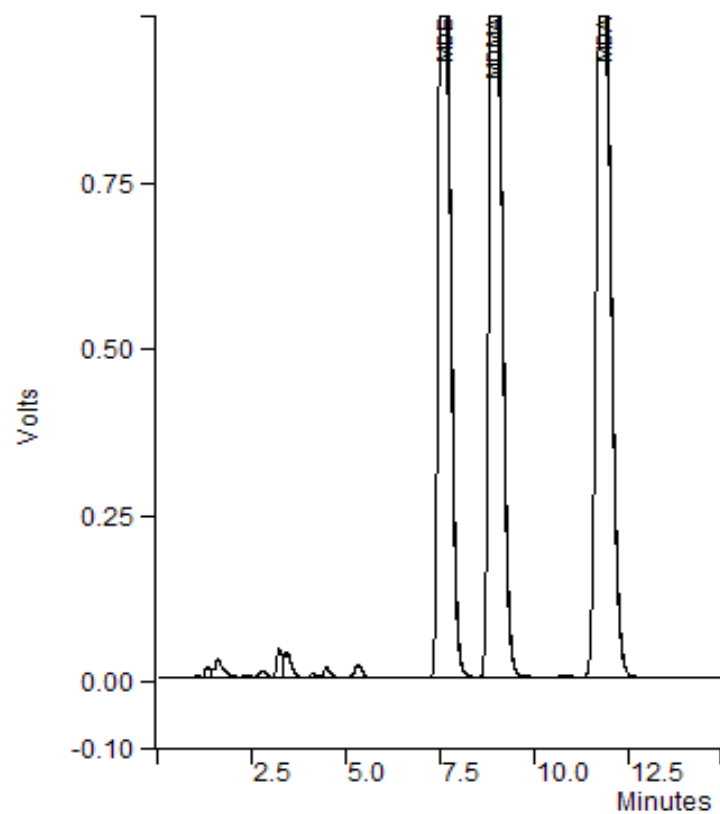


Fig. 1 :	Soluzione Test
R.T. 7.66	3,4-MDE
R.T. 9.30	3,4-MDMA
R.T. 12.00	3,4-MDA

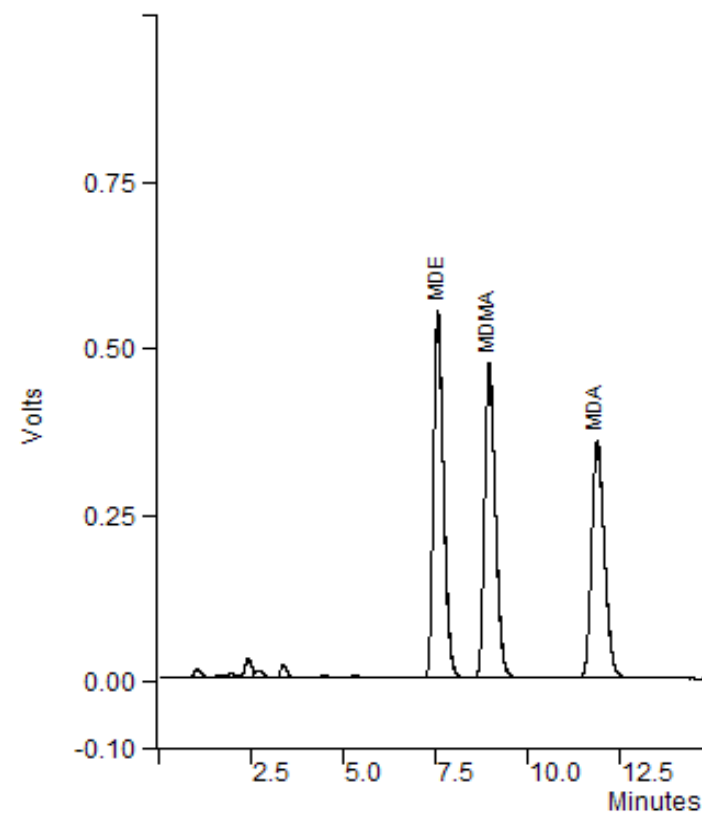


Fig. 2 :	Calibratore urinario
R.T. 7.60	3,4-MDE 500 ng/ml
R.T. 9.50	3,4-MDMA 500 ng/ml
R.T. 12.00	3,4-MDA 500 ng/ml

AMFETAMINE urinarie in Fluorimetria
(Cromatogrammi di riferimento)

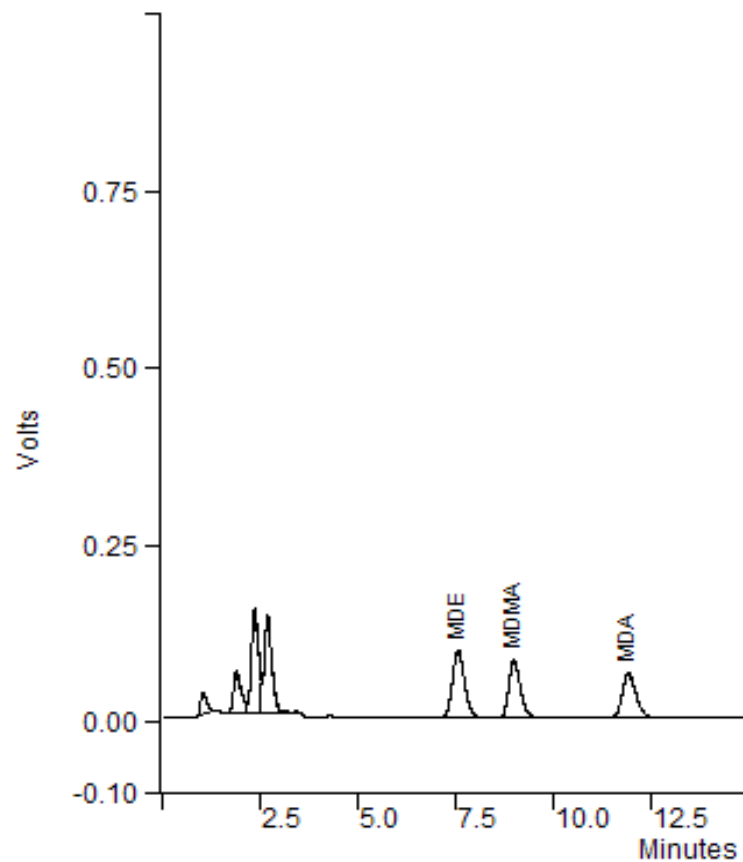


Fig. 3 :	Controllo urinario basso
R.T. 7.55	3,4-MDE 87 ng/ml
R.T. 9.00	3,4-MDMA 86 ng/ml
R.T. 12.10	3,4-MDA 87 ng/ml

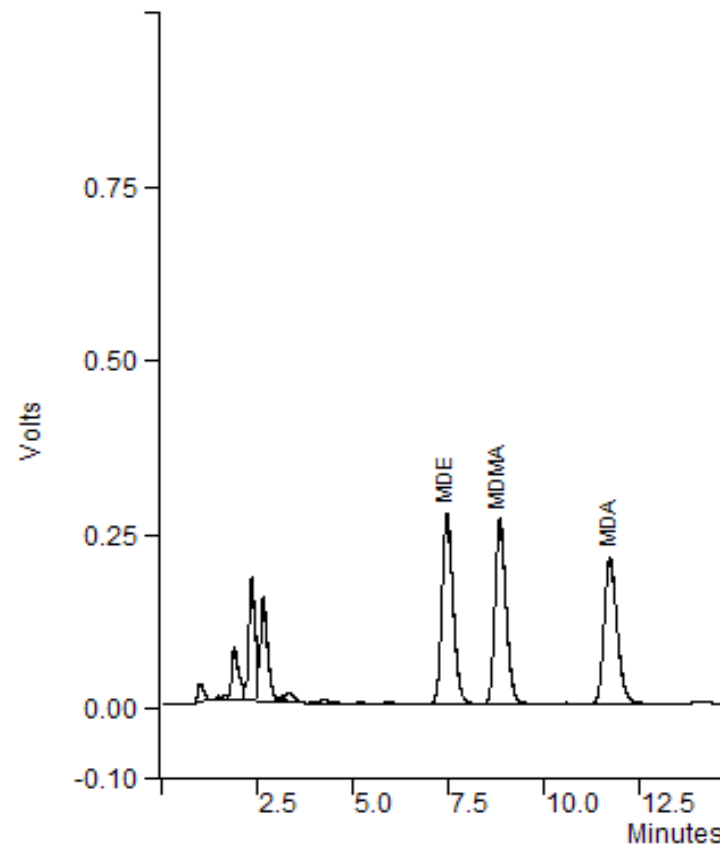


Fig. 4 :	Controllo urinario alto
R.T. 7.50	3,4-MDE 246 ng/ml
R.T. 9.20	3,4-MDMA 274 ng/ml
R.T. 12.20	3,4-MDA 286 ng/ml