

**NORBUPRENORFINA (Metabolita della Buprenorfina) urinaria in Fluorimetria –
Cod. Z44010**

Metodo di conferma in HPLC

INTRODUZIONE

La Buprenorfina è un analgesico con un lungo tempo di azione, dalle 25 alle 40 volte più potente della morfina; viene utilizzato in molti casi come farmaco sostitutivo nella terapia di disintossicazione dei tossicomani da eroina con dosaggi da 0,2 a 2 mg. Dal 1996 sono state osservate un elevato numero di morti per l'assunzione di buprenorfina, spesso associata con altre droghe psicotrope.

La Buprenorfina è metabolizzata attraverso una N-dealchilazione a Norbuprenorfina, la quale viene glucoronidata ed escreta nelle urine.

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 cromatografica sia Gassosa (GC) che Liquida (LC) entrambe accoppiate con detector specifici e selettivi (UV, Fluorescenza, MS).

Il presente metodo consente di determinare la Norbuprenorfina urinaria (il maggiore metabolita della Buprenorfina) previa estrazione SPE e lettura in Fluorimetria.

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



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.

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare la **Norbuprenorfina** urinaria (il maggiore metabolita della Buprenorfina) previa estrazione SPE e lettura in Fluorimetria.

Recupero del Metodo : 100 %

Sensibilità del Metodo : circa 1 ng/ml

Valore di cut-off: 5 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 – Enzima di idrolisi, **2 x 1 ml**

Da ricostituire con 9,0 ml di Reagente B. Quando ricostituito, l'enzima è stabile 1 anno a 2 – 8 °C.

Reagente B – Soluzione Tampone per idrolisi, **1 x 20 ml**

Reagente C – Soluzione Condizionamento 1 e Lavaggio 3, **1 x 350 ml**

Reagente D – Soluzione Condizionamento 2, **1 x 200 ml**

Reagente E – Soluzione Tampone, **1 x 300 ml**

Reagente F – Soluzione Lavaggio 1, **1 x 200 ml**

Reagente G – Soluzione Lavaggio 2, **1 x 200 ml**

Reagente H – Soluzione Eluente, **1 x 100 ml**

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

Vedi Avvertenze

Reagente N1 – Calibratore liofilo urinario – Livello 1, **2 x 6 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente N2 – Calibratore liofilo urinario – Livello 2, **2 x 6 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente N3 – Calibratore liofilo urinario – Livello 3, **2 x 6 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente N4 – Calibratore liofilo urinario – Livello 4, **2 x 6 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente N5 – Calibratore liofilo urinario – Livello 5, **2 x 6 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente M – Fase Mobile, **2 x 500 ml**

Colonne di Clean-up, 100 pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 100 µl
Detector Fluorimetrico $\lambda_{EX} = 215 \text{ nm}$ $\lambda_{EM} = 350 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo urinario :

Prelevare 10 ml urina

Fase pre-analitica :

Stabile per circa 3 mesi a –20° C

FASE PREANALITICA:

In una provetta pipettare :

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

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 100 µl di questa soluzione nel sistema cromatografico per identificare il tempo di ritenzione della Norbuprenorfina 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 : Ricostituzione dell'enzima

Aggiungere al **Reagente A** – enzima di idrolisi (contenente 1 ml) 9 ml di **Reagente B** – soluzione Tampone per idrolisi.

Agitare per inversione

FASE 2 : Idrolisi enzimatica dei campioni

Fare una Curva di Calibrazione su 5 punti.

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controlli
Reagente N1 – Calibratore – Livello 1	2,5 ml						
Reagente N2 – Calibratore – Livello 2		2,5 ml					
Reagente N3 – Calibratore – Livello 3			2,5 ml				
Reagente N4 – Calibratore – Livello 4				2,5 ml			
Reagente N5 – Calibratore – Livello 5					2,5 ml		
Campione						2,5 ml	
Controlli							2,5 ml
Reagente A – Enzima ricostituito	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

Controllare che il pH sia $\cong$ 5,0 – Eventualmente correggerlo

Al vortex per 20 secondi

Release N° 014	Norbuprenorfina urinaria in Fluorimetria	Settembre 2012
-----------------------	---	-----------------------

FASE 3 : Porre in stufa a 60°C per 3 ore.

FASE 4 : Condizionamento delle colonne di Clean-up

- Pipettare in colonna 1,5 ml di **Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 3**
Scartare l'eluato
- Pipettare in colonna 2 ml di **Reagente D – Soluzione di Condizionamento 2**
Scartare l'eluato

FASE 5 : Preparazione del Campione

Dispensare in provetta :

	Calibratore idrolizzato – Livello 1	Calibratore idrolizzato – Livello 2	Calibratore idrolizzato – Livello 3	Calibratore idrolizzato – Livello 4	Calibratore idrolizzato – Livello 5	Campione idrolizzato	Controlli idrolizzati
Calibratore idrolizzato – Livello 1	2700 µl						
Calibratore idrolizzato – Livello 2		2700 µl					
Calibratore idrolizzato – Livello 3			2700 µl				
Calibratore idrolizzato – Livello 4				2700 µl			
Calibratore idrolizzato – Livello 5					2700 µl		
Campione idrolizzato						2700 µl	
Controlli idrolizzati							2700 µl
Reagente E – Sol. Tampone	3000 µl	3000 µl	3000 µl	3000 µl	3000 µl	3000 µl	3000 µl

Agitare al Vortex

FASE 6 : Versare tutti i campioni precedentemente preparati, mediante due aggiunte successive da 3 ml ognuna, nelle colonne di Clean-up e scaricare ad un flusso di 1 ml/ minuto (goccia a goccia) anche con l'ausilio di un vuoto moderato.

FASE 7 : Lavaggio delle colonne di Clean-up:

- Lavare con 2 ml di **Reagente F – Soluzione di Lavaggio 1**
Scartare l'eluato
- Lavare con 2 ml di **Reagente G – Soluzione di Lavaggio 2**
Scartare l'eluato
- Lavare con 2 ml di **Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 3**
Scartare l'eluato e portare a secco con un leggero flusso d'aria

Release N° 014	Norbuprenorfina urinaria in Fluorimetria	Settembre 2012
----------------	--	----------------

FASE 8 : Eluizione

- Eluire con 0,9 ml di **Reagente H – Soluzione di Eluizione**
Raccogliere l'eluato

Agitare accuratamente al Vortex

N.B.: il campione così preparato è stabile 7 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

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

NORBUPRENORFINA urinaria - Avvertenze

REAGENTE L: SOLUZIONE TEST

Norbuprenorfina	circa 10.000 ng/ml
-----------------	--------------------

REAGENTE N1-N2-N3-N4-N5 : CALIBRATORI LIOFILURI URINARI Lot 002H

	Livello 1 ng /ml	Livello 2 ng/ml	Livello 3 ng/ml	Livello 4 ng/ml	Livello 5 ng/ml
NORBUPRENORFINA	0	9,4	29,4	62,1	136,6
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 6 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente per 20 min. fino a quando tutto il materiale non è dissolto. Prima del campionamento rimescolare gentilmente per assicurarne l'omogeneità.					
Conservazione e stabilità: i Calibratori 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 : 2 x 5 x 6 ml					
Precauzioni: questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.					

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO Varian

λ_{EX}	215 nm
λ_{EM}	350 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 1,0 ml / minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,0 ml / minuto e scaricare i primi 30 ml. Al termine, iniettare il test chimico e verificare la congruità della separazione.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Il segnale che la fase mobile deve essere cambiata è dato dal significativo innalzamento del rumore di fondo del detector Fluorimetrico. 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 condizionala con la Fase Mobile.

PARAMETRI HPLC

LOOP	100 µl
Flusso di lavoro consigliato	1 ml / minuto
Pressione corrispondente	Circa 120 bar

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

ATTENUAZIONE	7 o 8
--------------	-------

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
CC44016	Calibratore urinario per Norbuprenorfina e Buprenorfina	5 x 2 x 6 ml
CC44017	Controllo multiparametrico per Norbuprenorfina e Buprenorfina – Livello 1	6 x 6 ml
CC44018	Controllo multiparametrico per Norbuprenorfina e Buprenorfina – Livello 2	6 x 6 ml
CC44019	Controllo multiparametrico per Norbuprenorfina e Buprenorfina – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 6 ml
ZA6001050C046	Sistema completo Colonna Analitica Pursuit XRs C18 (50 x 4,6mm -3 um)	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 um	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ



Norbuprenorfina urinaria
(Cromatogrammi di riferimento)

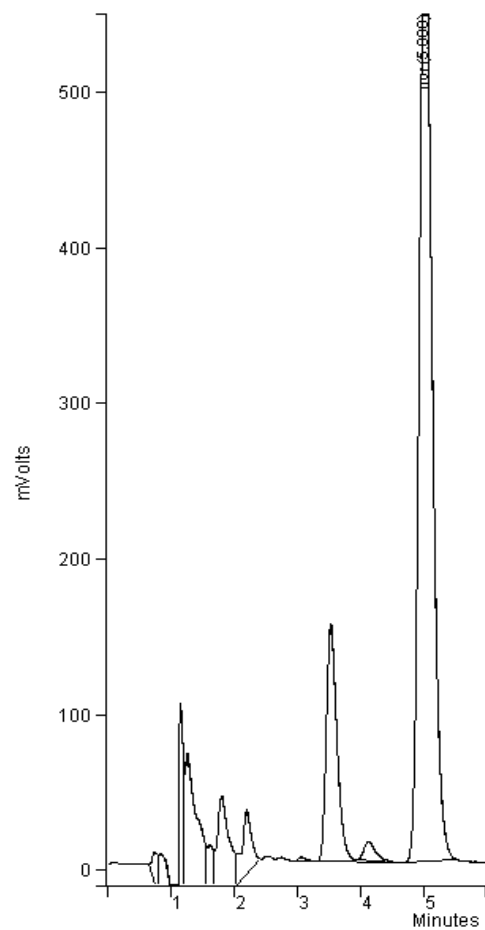


Fig. 1	Soluzione Test
	R.T. 5.000 Norbuprenorfina

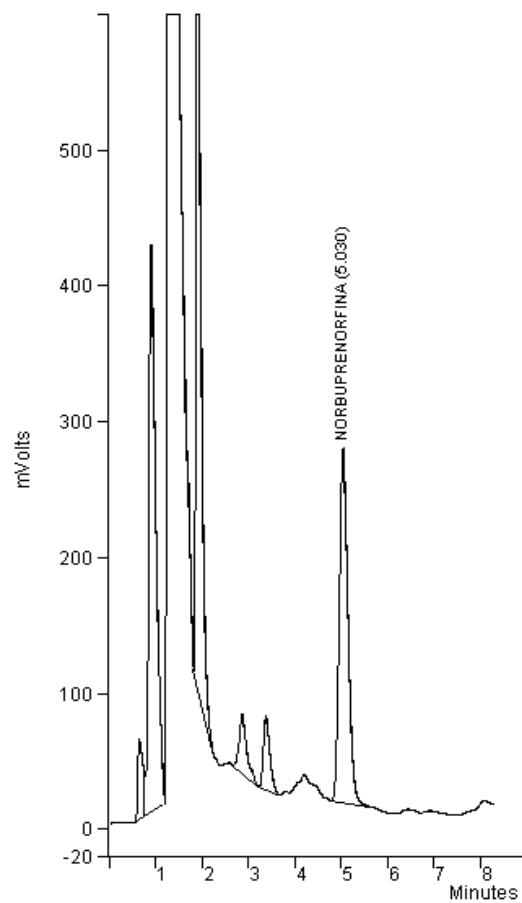


Fig. 2	Calibratore non in matrice
	R.T. 5.030 Norbuprenorfina 100 ng/ml

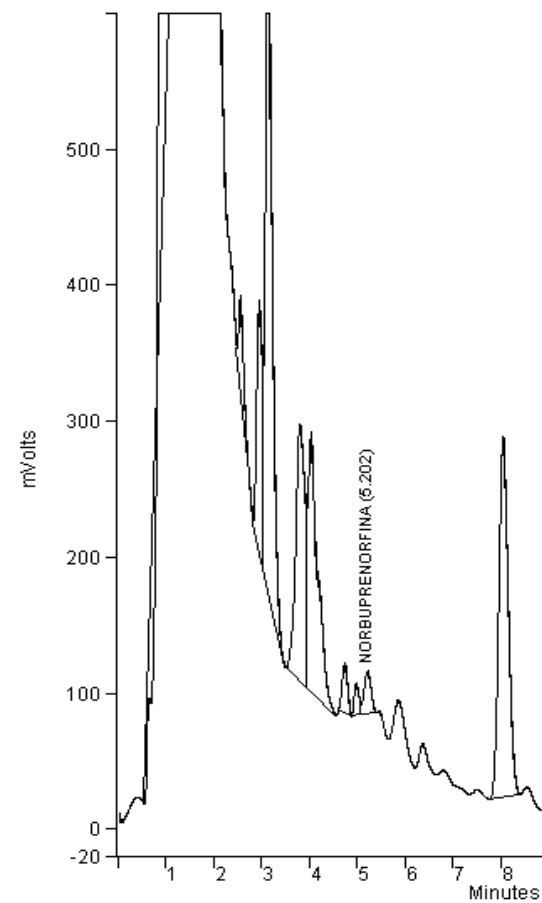


Fig. 3	Campione urinario basso
	R.T. 5.202 Norbuprenorfina 12,8 ng/ml