

OPPIACEI urinari in Fluorimetria – Cod. Z45010
(Morfina, Codeina, Diidrocodeina e 6-Monoacetilmorfina)

Metodo di conferma in HPLC

INTRODUZIONE

Gli Oppiacei sono alcaloidi con una lunga storia di uso ed abuso. La loro 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 Morfina, la Codeina, la 6-Monoacetilmorfina e la Diidrocodeina urinari 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 **Morfina** (il maggiore metabolita dell'Eroina), la **Diidrocodeina**, la **Codeina** e la **6-Monoacetilmorfina** urinarie previa estrazione SPE e lettura in Fluorimetria.

Recupero del Metodo :

93 %

Sensibilità del Metodo :

Morfina 20,0 ng/ml

Diidrocodeina 20,0 ng/ml

Codeina 20,0 ng/ml

6-MAM 80,0 ng/ml

Valore di cut-off:

Morfina 100 ng/ml

Diidrocodeina 100 ng/ml

Codeina 100 ng/ml

6-Monoacetilmorfina 100 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 400 ml**

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

Reagente E – Soluzione Tampone, **1 x 200 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 80 ml**

Reagente I – Soluzione Stabilizzante, **1 x 20 ml**

Reagente L1 – Soluzione Test Morfina, **1 x 0,5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente L2 – Soluzione Test Diidrocodeina, **1 x 0,5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente L3 – Soluzione Test 6-MAM, **1 x 0,5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente L4 – Soluzione Test Codeina, **1 x 0,5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente N1 – Calibratore liofilo urinario – Livello 1, **1 x 5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente N2 – Calibratore liofilo urinario – Livello 2, **1 x 5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente N3 – Calibratore liofilo urinario – Livello 3, **1 x 5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente N4 – Calibratore liofilo urinario – Livello 4, **1 x 5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente N5 – Calibratore liofilo urinario – Livello 5, **1 x 5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente P1 – Calibratore liofilo urinario 6-MAM- Livello 1, **1 x 5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente P2 – Calibratore liofilo urinario 6-MAM- Livello 2, **1 x 5 ml**

Vedere Avvertenze

Reagente P3 – Calibratore liofilo urinario 6-MAM- Livello 3, 1 x 5 ml	<u>Vedere Avvertenze</u>
Reagente P4 – Calibratore liofilo urinario 6-MAM- Livello 4, 1 x 5 ml	<u>Vedere Avvertenze</u>
Reagente P5 – Calibratore liofilo urinario 6-MAM- Livello 5, 1 x 5 ml	<u>Vedere Avvertenze</u>
Reagente M – Fase Mobile, 8 x 500 ml	
Colonne di Clean-up, 100 pz	

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 100 μ l
 Detector Fluorimetrico $\lambda_{EX} = 215 \text{ nm}$ $\lambda_{EM} = 345 \text{ nm}$

Dotazione opzionale :

Registratore di cromatogrammi
 Autocampionatore
 Computer gestionale

Modalità di prelievo urinario :

Prelevare 10 ml urina

Fase pre-analitica :

Stabile per circa 3 mesi a -20°C

PROCEDURA PREANALITICA:

In una provetta pipettare :

- 450 µl di H₂O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente L1 – Soluzione Test Morfina** (oppure **L2** o **L3** o **L4** a seconda dell'analita che si vuole ricercare)

Vortex per 10 sec.

Se si vuole invece preparare un Test Mix:

- 380 µl di H₂O di grado HPLC
- 30 µl di **Reagente L1 – Soluzione Test Morfina**
- 30 µl di **Reagente L2 – Soluzione Test Diidrocodeina**
- 30 µl di **Reagente L3 – Soluzione Test 6-Monoacetilmorfina**
- 30 µl di **Reagente L4 – Soluzione Test Codeina**

Vortex per 10 sec.

INIEZIONE :

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

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 100 µl di questa soluzione sul sistema cromatografico per identificare il tempo di ritenzione della Morfina 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 N1 + P1	Calibratore N2 + P2	Calibratore N3 + P3	Calibratore N4 + P4	Calibratore N5 + P5	Campione	Controlli + Controlli 6-MAM
Reagente N1 – Calibratore urinario - Livello 1	500 µl						
Reagente P1 – Calibratore urinario 6-MAM - Livello 1	500 µl						
Reagente N2 – Calibratore urinario – Livello 2		500 µl					
Reagente P2 – Calibratore urinario 6-MAM - Livello 2		500 µl					
Reagente N3 – Calibratore urinario – Livello 3			500 µl				
Reagente P3 – Calibratore urinario 6-MAM - Livello 3			500 µl				
Reagente N4 – Calibratore urinario – Livello 4				500 µl			
Reagente P4 – Calibratore urinario 6-MAM - Livello 4				500 µl			
Reagente N5 – Calibratore urinario - Livello 5					500 µl		
Reagente P5 – Calibratore urinario 6-MAM - Livello 5					500 µl		
Campione						1,0 ml	
Controlli							500 µl
Controlli 6- MAM							500 µl
Reagente A – Enzima ricostituito	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl

*Controllare che il pH sia $\approx 5,0$ – Eventualmente correggerlo****Al vortex per 20 secondi***

N.B. I valori dei Calibratori Morfina, Codeina, Diidrocodeina e 6-MAM mixati insieme avranno come concentrazione la META' di quella riportata nella tabella delle Avvertenze!!!

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

FASE 4 : Condizionamento delle colonne di Clean-up

- Versare in colonna 1,5 ml di **Reagente C – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 3**
Scartare l'eluato
- Versare in colonna 2 ml di **Reagente D – Soluzione di Condizionamento 2** **Eseguire questa fase lentamente**
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	Controlli
Calibratore idrolizzato – Livello 1	1200 µl						
Calibratore idrolizzato – Livello 2		1200 µl					
Calibratore idrolizzato – Livello 3			1200 µl				
Calibratore idrolizzato – Livello 4				1200 µl			
Calibratore idrolizzato – Livello 5					1200 µl		
Campione idrolizzato						1200 µl	
Controlli							1200 µl
Reagente E – Sol. Tampone	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl

Agitare al Vortex

FASE 6 : Versare tutti i campioni ed il Calibratore precedentemente preparati 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

FASE 8 : Eluizione

- Eluire con 800 µl di **Reagente H – Soluzione di Eluizione**
Portare a secco, raccogliere l'eluato ed agitare al vortex

FASE 9 : Aggiungere all'eluato 200 µl di **Reagente I – Sol. Stabilizzante**

Agitare accuratamente al Vortex

INIEZIONE :

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

OPPIACEI urinari - Avvertenze

REAGENTE L1: SOLUZIONE TEST MORFINA

MORFINA	circa 10.000 ng/ml
----------------	--------------------

REAGENTE L2: SOLUZIONE TEST DIIDROCODEINA

DIIDROCODEINA	circa 10.000 ng/ml
----------------------	--------------------

REAGENTE L3: SOLUZIONE TEST 6-MAM

6-MONOACETILMORFINA	circa 10.000 ng/ml
----------------------------	--------------------

REAGENTE L4: SOLUZIONE TEST CODEINA

CODEINA	circa 10.000 ng/ml
----------------	--------------------

REAGENTE N1-N2-N3-N4-N5 : CALIBRATORI LIOFILURI URINARI Lot. 003

	Livello 1 (ng/ml)	Livello 2 (ng/ml)	Livello 3 (ng/ml)	Livello 4 (ng/ml)	Livello 5 (ng/ml)
Morfina	0	123,3	239,8	461,3	1100,4
Diidrocodeina	0	130,7	236,0	410,7	1061,0
Codeina	0	122,4	215,3	387,8	1000,5
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 5 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 : 1 x 5 x 5 ml					
Precauzioni: questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo. N.B.: una volta ricostituiti i calibratori vanno stoccati separatamente.					

REAGENTE P1-P2-P3-P4-P5 : CALIBRATORI LIOFILI URINARI – 6 MAM Lot. 004

	Livello 1 (ng/ml)	Livello 2 (ng/ml)	Livello 3 (ng/ml)	Livello 4 (ng/ml)	Livello 5 (ng/ml)
6-Monoacetilmorfina	0 ng /ml	90,4 ng /ml	172,8 ng /ml	338,3 ng/ml	777,0 ng/ml
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 5 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 : 1 x 5 x 5 ml					
Precauzioni: questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo. N.B.: una volta ricostituiti i calibratori vanno stoccati separatamente.					

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO Varian

λ_{EX}	215 nm
λ_{EM}	345 nm
SENSIBILITA' STRUMENTALE	2-Medium per Morfina High per le altre
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 C18 4,6 mm x 50 mm, 3 µm. 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 condizionarla con la Fase Mobile.

PARAMETRI HPLC

LOOP	100 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,8 ml / minuto
Pressione corrispondente	Circa 180 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
CC45016	Calibratore urinario per Oppiacei	5 x 2 x 5 ml
CC45017	Controllo multiparametrico per Oppiacei urinari – Livello 1	6 x 5 ml
CC45018	Controllo multiparametrico per Oppiacei urinari – Livello 2	6 x 5 ml
CC45019	Controllo multiparametrico per Oppiacei urinari – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 5 ml
CC45116	Calibratore per 6-MAM urinaria	5 x 2 x 5 ml
CC48017	Controllo per EDDP, 6-MAM e Cocaina urinari – Livello 1	6 x 5 ml
CC48018	Controllo per EDDP, 6-MAM e Cocaina urinari – Livello 2	6 x 5 ml
CC48019	Controllo per EDDP, 6-MAM e Cocaina urinari – 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

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi di riferimento)

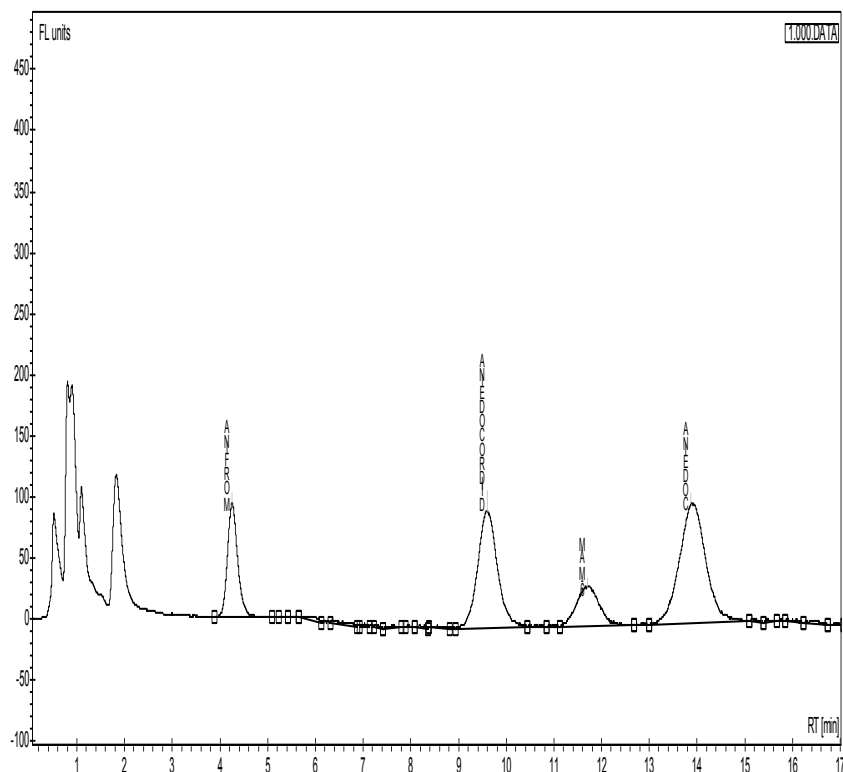


Fig. 1 :	Soluzione Test
	R.T. 4.20 MORFINA
	R.T. 9.60 DIIDROCODEINA
	R.T. 11.70 6-MONOACETILMORFINA
	R.T. 13.88 CODEINA

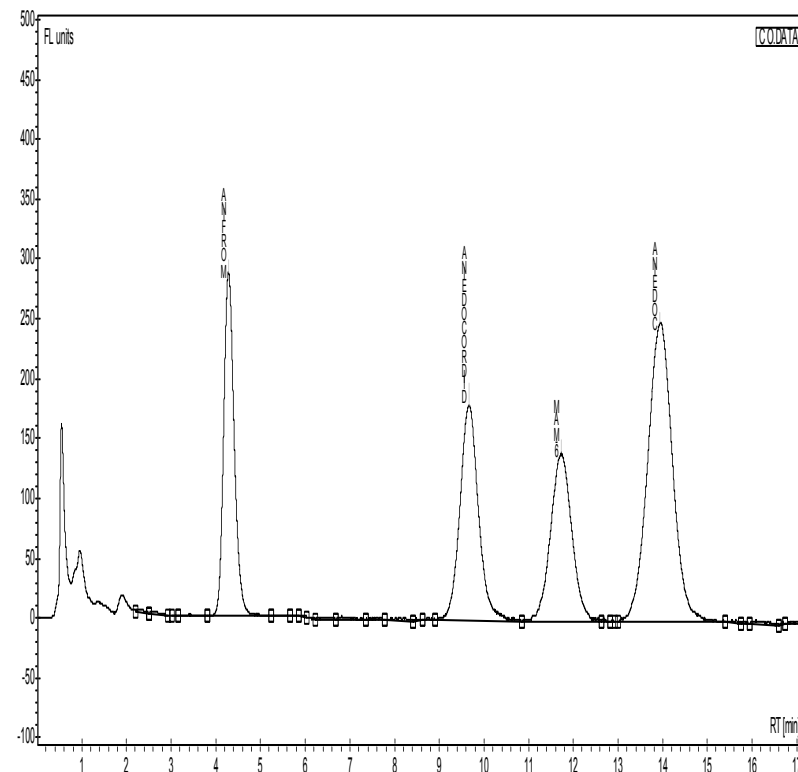


Fig. 2 :	Calibratore urinario
	R.T. 4.28 MORFINA 1747 ng/ml
	R.T. 9.66 DIIDROCODEINA 831 ng/ml
	R.T. 11.74 6-MONOACETILMORFINA 3147 ng/ml
	R.T. 13.94 CODEINA 1424 ng/ml

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi di riferimento)

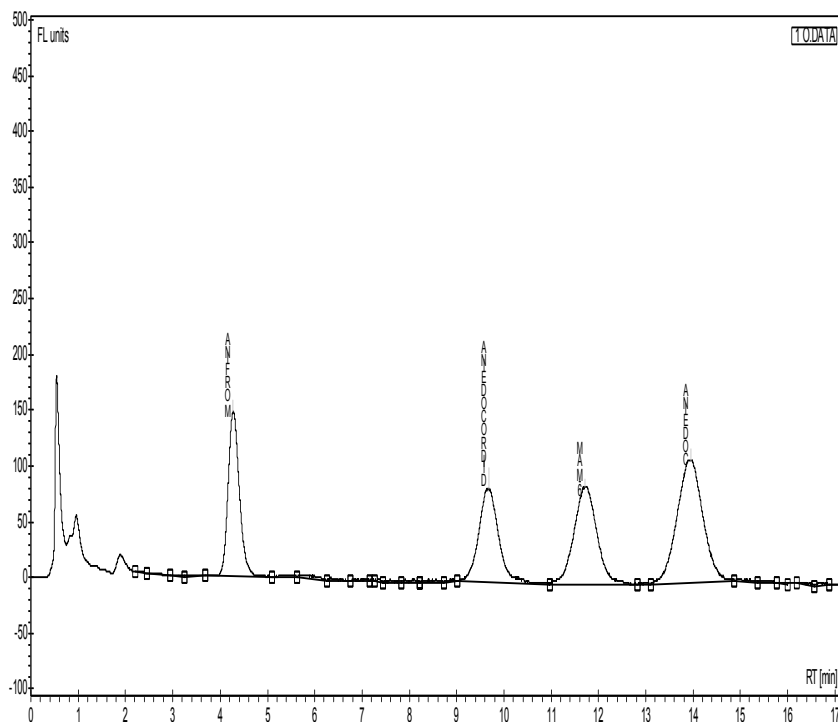


Fig. 3 :	Controllo basso		
	R.T. 4.28	MORFINA	910 ng/ml
	R.T. 9.68	DIIDROCODEINA	395 ng/ml
	R.T. 11.71	6-MONOACETILMORFINA	2033 ng/ml
	R.T. 13.95	CODEINA	613 ng/ml

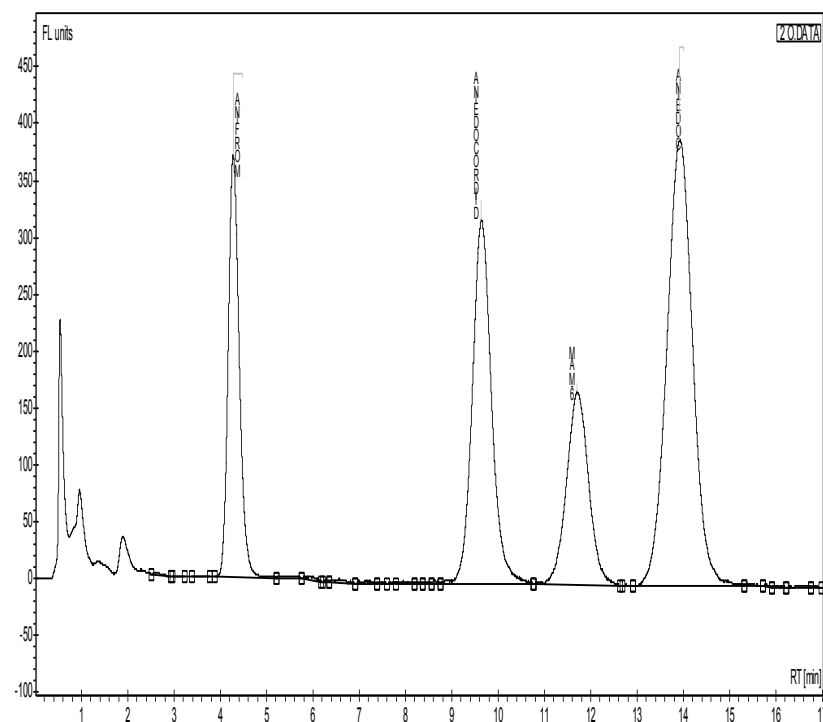


Fig. 4 :	Controllo alto		
	R.T. 4.28	MORFINA	2284 ng/ml
	R.T. 9.64	DIIDROCODEINA	1475 ng/ml
	R.T. 11.70	6-MONOACETILMORFINA	3854 ng/ml
	R.T. 13.92	CODEINA	2224 ng/ml