

METADONE urinario in UV – Cod. Z48010

Metodo di conferma HPLC

INTRODUZIONE

Il Metadone è una sostanza con una lunga storia di sostituto dell'eroina. 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).

Il presente metodo consente di determinare il Metadone ed il suo metabolita primario, l'EDDP, previa estrazione solido-liquido e lettura in UV.

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.

Release N° 013	Metadone ed EDDP urinari in UV	Settembre 2010
----------------	--------------------------------	----------------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare il **Metadone** ed il suo metabolita primario, **EDDP**, previa estrazione solido-liquido e lettura in UV.

Recupero del Metodo :

circa 98 %

Sensibilità del Metodo :

circa 50 ng/ml

Valore di cut-off :

Metadone 100 ng/ml

EDDP 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 – 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 Lavaggio, **1 x 100 ml**

Reagente E – Soluzione di Eluizione, **1 x 80 ml**

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

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

Vedi Avvertenze

Reagente H – Soluzione Test EDDP, **1 x 0,5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente I1 – Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 1, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente I2 – Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 2, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente I3 – Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 3, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente I4 – Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 4, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente I5 – Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 5, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente J1 – Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 1, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente J2 – Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 2, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente J3 – Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 3, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente J4 – Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 4, **1 x 5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente J5 – Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 5, **1 x 5 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 UV/Vis $\lambda = 210 \text{ nm}$
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 :

- 400 µl di H₂O di grado HPLC
- 50 µl di **Reagente G** – Soluzione Test Metadone
- 50 µl di **Reagente H** – Soluzione Test EDDP

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 100 µl di questa soluzione in HPLC per identificare il tempo di ritenzione del Metadone 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*

Release N° 013	Metadone ed EDDP urinari in UV	Settembre 2010
----------------	--------------------------------	----------------

FASE 2 : Preparazione del Campione

Fare una Curva di Calibrazione su 5 punti :

	Calibratore I1 + J1	Calibratore I2 + J2	Calibratore I3 + J3	Calibratore I4 + J4	Calibratore I5 + J5	Campione	Controllo Metadone + EDDP
Reagente I1 – Calibratore Metadone – Livello 1	500 µl						
Reagente J1 – Calibratore EDDP – Livello 1	500 µl						
Reagente I2 – Calibratore Metadone – Livello 2		500 µl					
Reagente J2 – Calibratore EDDP – Livello 2		500 µl					
Reagente I3 – Calibratore Metadone – Livello 3			500 µl				
Reagente J3 – Calibratore EDDP – Livello 3			500 µl				
Reagente I4 – Calibratore Metadone – Livello 4				500 µl			
Reagente J4 – Calibratore EDDP – Livello 4				500 µl			
Reagente I5 – Calibratore Metadone – Livello 5					500 µl		
Reagente J5 – Calibratore EDDP – Livello 5					500 µl		
Campione						1000 µl	
Controllo Metadone							500 µl
Controllo EDDP							500 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 6,5 e 7,5 – Eventualmente correggerlo***Agitare al Vortex**

N.B. I valori dei Calibratori Metadone ed EDDP mixati insieme avranno come concentrazione la META' di quella riportata nella tabella delle Avvertenze!!!

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 (goccia a goccia) anche con l'ausilio di un vuoto moderato.
Scartare l'eluato

FASE 4 : Lavaggio delle colonne di Clean-up:

- Lavare con 1 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 800 µl di **Reagente E** – Soluzione di Eluizione, ad un flusso di 1 ml/minuto.

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

- Aggiungere all'eluato 200 µl di **Reagente F** – Soluzione di Diluizione. *Agitare 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.

METADONE ed EDDP urinari - Avvertenze

REAGENTE G – SOLUZIONE TEST METADONE

Metadone	~ 50.000 ng/ml
-----------------	----------------

REAGENTE H – SOLUZIONE TEST EDDP

EDDP	~ 10.000 ng/ml
-------------	----------------

REAGENTE I1-I2-I3-I4-I5 – CALBRATORI LIOFILI URINARI METADONE Lot. 005

	Livello 1	Livello 2	Livello 3	Livello 4	Livello 5
METADONE	0 ng /ml	128,8 ng/ml	217,3 ng/ml	439,1 ng/ml	1064,0 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.					

REAGENTE J1-J2-J3-J4-J5 – CALBRATORI LIOFILI URINARI EDDP Lot. 004

	Livello 1	Livello 2	Livello 3	Livello 4	Livello 5
EDDP	0 ng /ml	113,9 ng/ml	195,8 ng/ml	398,3 ng/ml	975,9 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 UV/Vis Varian

λ	210 nm
AUFS	0.001
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 (50 x 4,6mm -3 u). 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.

PARAMETRI HPLC

LOOP	100 µl
Flusso di lavoro consigliato	1 ml / minuto
Pressione corrispondente	Circa 98 bar

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

ATTENUAZIONE	3 o 4
--------------	-------

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
CC48016	Calibratore urinario per Metadone	5 x 2 x 5 ml
CC48116	Calibratore urinario per EDDP	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
CC48017	Controllo urinario per EDDP, 6-MAM e Cocaina – Livello 1	6 x 5 ml
CC48018	Controllo urinario per EDDP, 6-MAM e Cocaina – Livello 2	6 x 5 ml
CC48019	Controllo urinario per EDDP, 6-MAM e Cocaina – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 5 ml
ZA6001050C046	Sistema completo Colonna Analitica Pursuit XR _s C18 (50 x 4,6mm -3 µm)	1 PZ
ZA6001050R046	Colonna interna Pursuit XR _s C18	1 PZ
ZA6001CG3	Precolonna interna per Pursuit XR _s 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



Metadone e metabolita urinari
(Cromatogrammi di riferimento)

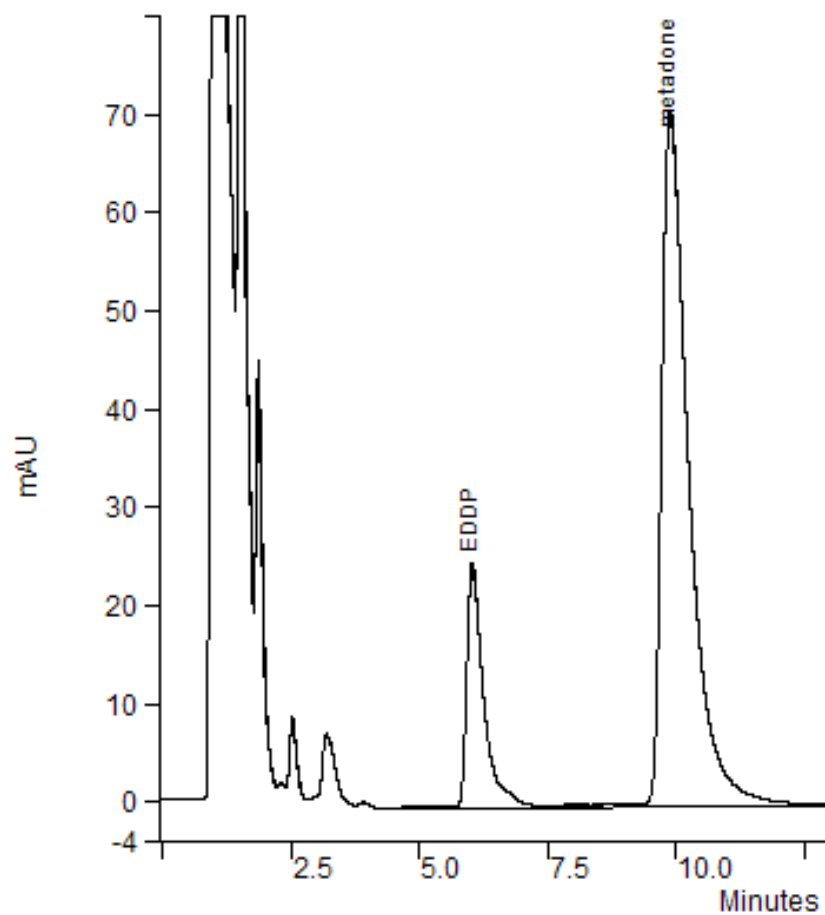


Fig. 1	Soluzione Test
	R.T. 6.00 EDDP
	R.T. 10.00 Metadone

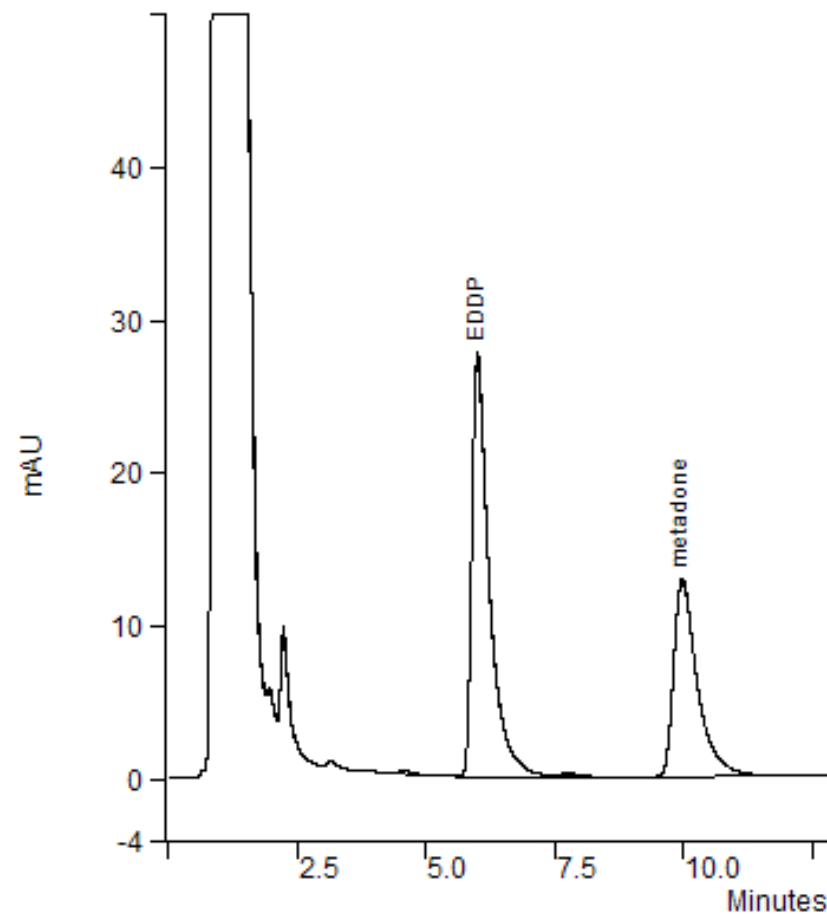


Fig. 2	Calibratore liofilo
	R.T. 6.00 EDDP 4630 ng/ml
	R.T. 10.00 Metadone 2600 ng/ml

Metadone e metabolita urinari
(Cromatogrammi di riferimento)

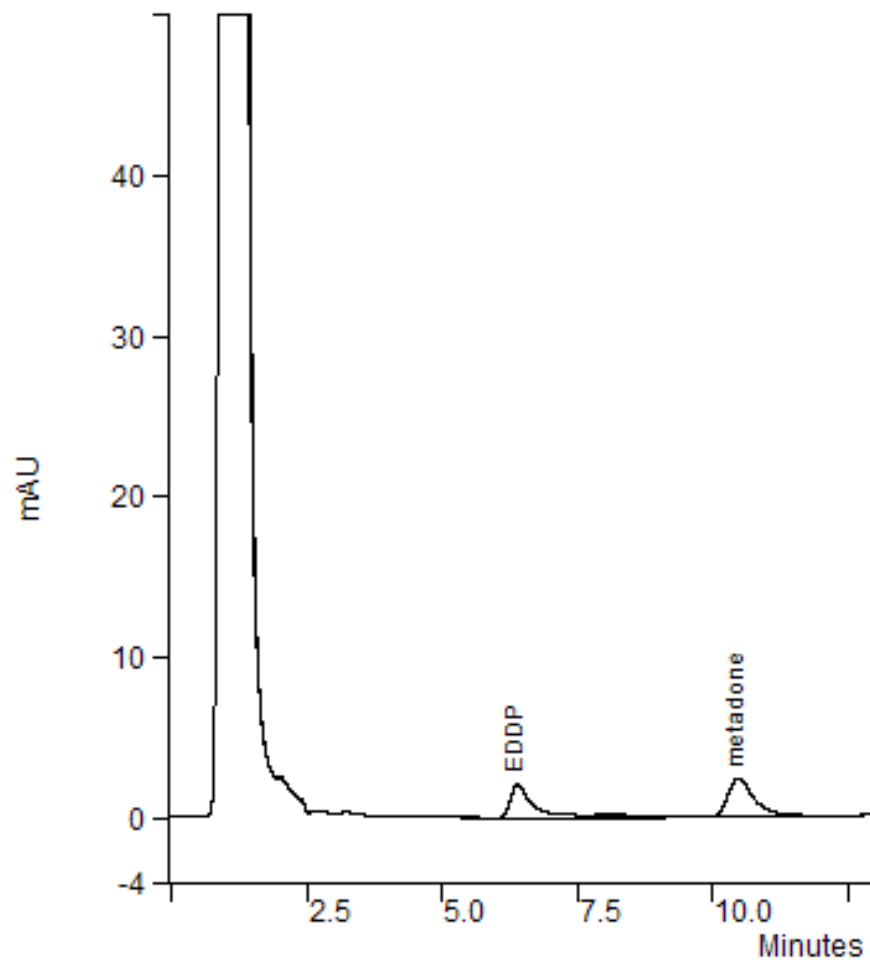


Fig. 3	Controllo basso
	R.T. 6.20 EDDP 477 ng/ml
	R.T. 10.20 Metadone 489 ng/ml

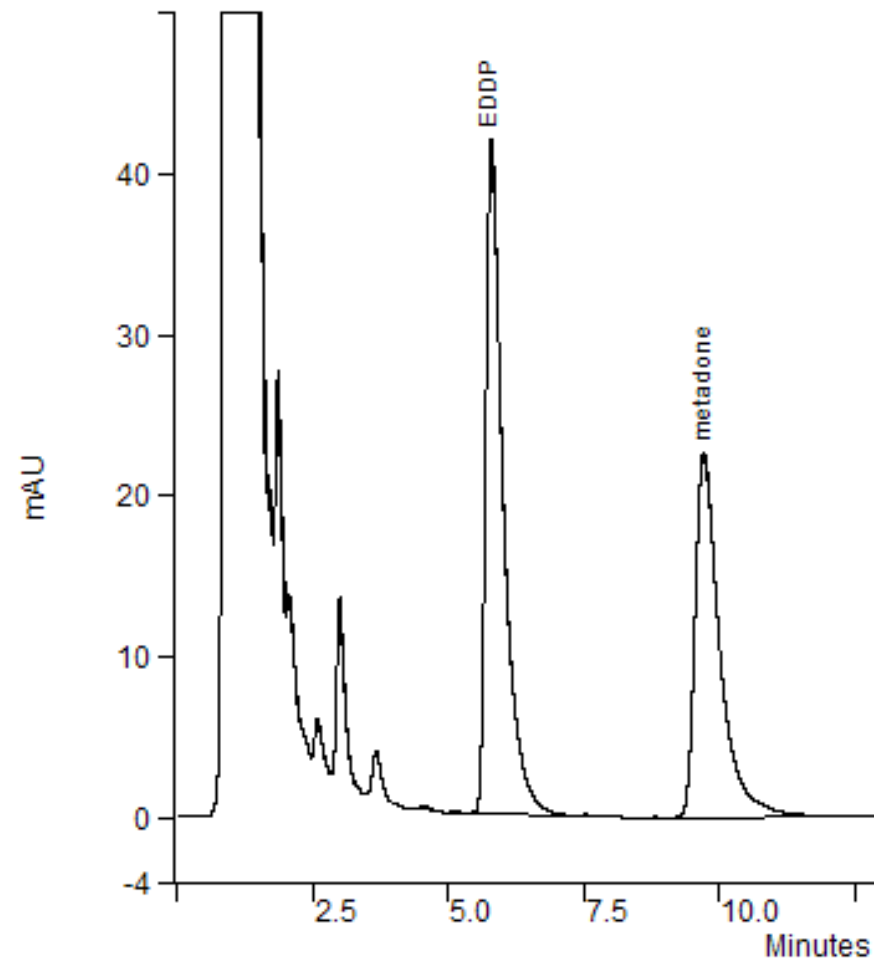


Fig. 4	Controllo alto
	R.T. 6.20 EDDP 6700 ng/ml
	R.T. 10.20 Metadone 4480 ng/ml