

NORBUPRENORFINA (Metabolita della Buprenorfina) – BUPRENORFINA urinarie in GC/MS – Cod. GC44010

Metodo di conferma in GC/MS

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 Buprenorfina e la Norbuprenorfina (suo maggior metabolita) urinarie previa estrazione SPE e lettura in Fluorimetria.

 EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



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.

N° 013	Norbuprenorfina e Buprenorfina urinarie in GC/MS	10/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare la **Norbuprenorfina** (il maggiore metabolita della Buprenorfina) e la **Buprenorfina** urinarie previa estrazione in fase solida e lettura in GC/MS.

Recupero del Metodo : 100 %

Sensibilità del Metodo : 2 ng/ml

LOD: Buprenorfina 0,16 ng/ml
Norbuprenorfina 0,3 ng/ml

LOQ: Buprenorfina 0,5 ng/ml
Norbuprenorfina 1,0 ng/ml

Valore di cut-off: 5 ng/ml

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

Contenuto della Confezione (50 test):

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

Reagente A – Enzima di idrolisi, **1 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 10 ml**

Reagente C – Soluzione Condizionamento 1 e Lavaggio 3, **1 x 200 ml**

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

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

Reagente F – Soluzione Lavaggio 1, **1 x 100 ml**

Reagente G – Soluzione Lavaggio 2, **1 x 100 ml**

Reagente H – Soluzione Eluente, **1 x 50 ml**

Reagente I – Soluzione Diluente, **1 x 25 ml**

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

Vedi Avvertenze

Reagente P – Soluzione Standard Interno, **1 x 1 ml**

Da diluire 1:50 in H2O prima dell'uso

Calibratore liofilo urinario – Livello 1, 2 x 6 ml

Codice CC44016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 2, 2 x 6 ml

Codice CC44016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 3, 2 x 6 ml

Codice CC44016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 4, 2 x 6 ml

Codice CC44016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 5, 2 x 6 ml

Codice CC44016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Reagente M – Soluzione Derivatizzante, **4 x 1 ml (4 ampolle da 1 ml)**

Vedi Avvertenze

Colonne di Clean-up, 50 pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento GC-MS
Computer gestionale

Dotazione opzionale :

Autocampionatore

Modalità di prelievo urinario :

Prelevare 10 ml urina

Se non si analizza subito, congelare a -20°C.

Stabile per circa 3 mesi

PROCEDURA PREANALITICA:

FASE 1 : In una provetta di vetro con tappo in teflon pipettare

- 450 µl di **Reagente I – Sol. Diluente**
- 50 µl di **Reagente L – Soluzione Test**

Al vortex per 20 secondi

FASE 2 : Portare a secco l'eluato con l'ausilio di un flusso elio o azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C).

FASE 3 : Riprendere con 70 µl di **Reagente M - Soluzione Derivatizzante**

Al vortex per 20 secondi

FASE 4: Porre in stufa a 70 °C per 30 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 5 : Trasferire tutto il campione in vials con riduttore di volume.

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 2 µl di questa soluzione in GC per identificare il tempo di ritenzione della Norbuprenorfina e della Buprenorfina che devono essere simili a quelle riportate nelle Fig. sottostanti. 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 e diluizione dello Standard Interno

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

Agitare per inversione

N.B: Diluire il **Reagente P – Sol. Standard interno** 1:50 con H₂O, preparando il volume sufficiente per coprire i campioni della seduta analitica.

N.B.: tale diluizione va preparata fresca ad ogni seduta analitica

FASE 2 : Idrolisi enzimatica dei campioni

Fare la Curva di Calibrazione su 5 punti:

	Calibratore Livello 1	Calibratore Livello 2	Calibratore Livello 3	Calibratore Livello 4	Calibratore Livello 4	Campione	Controlli
Calibratore liofilo urinario – Livello 1	2,0 ml						
Calibratore liofilo urinario – Livello 2		2,0 ml					
Calibratore liofilo urinario – Livello 3			2,0 ml				
Calibratore liofilo urinario – Livello 4				2,0 ml			
Calibratore liofilo urinario – Livello 5					2,0 ml		
Campione						2,0 ml	
Controlli							2,0 ml
Reagente P – Soluzione Standard Interno (diluito 1:50 in H ₂ O di grado HPLC)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
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

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	Controlli
Calibratore idrolizzato – Livello 1	2200 µl						
Calibratore idrolizzato – Livello 2		2200 µl					
Calibratore idrolizzato – Livello 3			2200 µl				
Calibratore idrolizzato – Livello 4				2200 µl			
Calibratore idrolizzato – Livello 5					2200 µl		
Campione idrolizzato						2200 µl	
Controlli idrolizzati							2200 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 precedentemente preparati, mediante due aggiunte successive da circa 2 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

FASE 8 : Eluizione **rigorosamente in provette di vetro con tappo in pyrex**

- Eluire con 1 ml di **Reagente H – Soluzione di Eluizione**
Raccogliere l'eluato in provette di vetro ed agitare al vortex

FASE 9 : Portare a secco l'eluato con l'ausilio di un flusso elio o azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C).

FASE 10 : Riprendere con 70 µl di **Reagente M - Soluzione Derivatizzante**
Al vortex per 20 secondi

FASE 11: Porre in stufa a 70 °C per 30 minuti
Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 12 : Trasferire tutto il campione in vials con riduttore di volume.
Al vortex per 20 secondi

INIEZIONE :

- Iniettare 2 µl della soluzione nel GC.

NORBUPRENORFINA urinaria – Avvertenze

REAGENTE L: SOLUZIONE TEST

Norbuprenorfina	circa 10.000 ng/ml
Buprenorfina	circa 10.000 ng/ml

REAGENTE M: SOLUZIONE DERIVATIZZANTE

Una volta aperta un'ampolla trasferire tutto il contenuto, 1 ml, in una vial di vetro. Chiudere bene il tappo e conservare a Temperatura Ambiente.

SETTAGGIO DEL GAS-CROMATOGRAFO :

- Colonna VF-5ms Factor Four 30mx0.25mmx0.25um
- Temperatura iniettore 280 °C
- Rapporto di Splittaggio Inizio: ON split 20
0 min: OFF
1 min: ON split 100
3 min: ON split 20
- Temperatura 100 °C x 2 minuti + 30 °C/min fino a 220 °C x 0 minuto + 15 °C/min fino a 310 °C x 18 minuti (corsa 30 minuti)
- Gas Elio 1 ml/min

SETTAGGIO DETECTOR DI MASSA (4000) :

- Range di Massa 350 - 540
- Temperatura della Massa: 180 °C;
- Temperatura Transfer Line: 270 °C;
- Temperatura Manifold: 80 °C
- Filamento on: 6 minuti

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA VF-5ms Factor Four

Seguire le prescrizioni del costruttore.
All'inizio di ogni seduta analitica effettuare la calibrazione delle masse e delle RF.

PULIZIA DELLA COLONNA E DELLA SIRINGA

Iniettare ACETONE prima e dopo la seduta analitica.
Lavare la siringa prima dell'iniezione con ACETONE. Al termine di ogni seduta analitica effettuare la pulizia del Liner dell'iniettore ed eseguire il backout della trappola ionica.
Al termine di ogni seduta analitica portare il gradiente alla massima temperatura della colonna (consigliata dal costruttore) con velocità di 30 °C/minuto.
Vedere istruzioni del costruttore.

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
CC44016	Calibratore urinario per Norbuprenorfina e Buprenorfina	5 x 2 x 6 ml
CC44019	Controllo urinario per Norbuprenorfina e Buprenorfina – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 6 ml
ZRE13623	Colonna Capillare Rxi-Sil 5MS (30 m x 0,25 mm) ID, DF=0,25	1 Pz
SCP8944	Colonna VF-5ms (30 m x 0,25 mm) ID DF=0,25	1 Pz
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 Pz
S29046U	Tappi per Vial standard di vetro da 2 ml	1 x 100 PZ
S24717	Riduttori di volume per vials da 2 ml	1 x 100 Pz

Norbuprenorfina e Buprenorfina urinarie
(Spettri di Massa di riferimento)

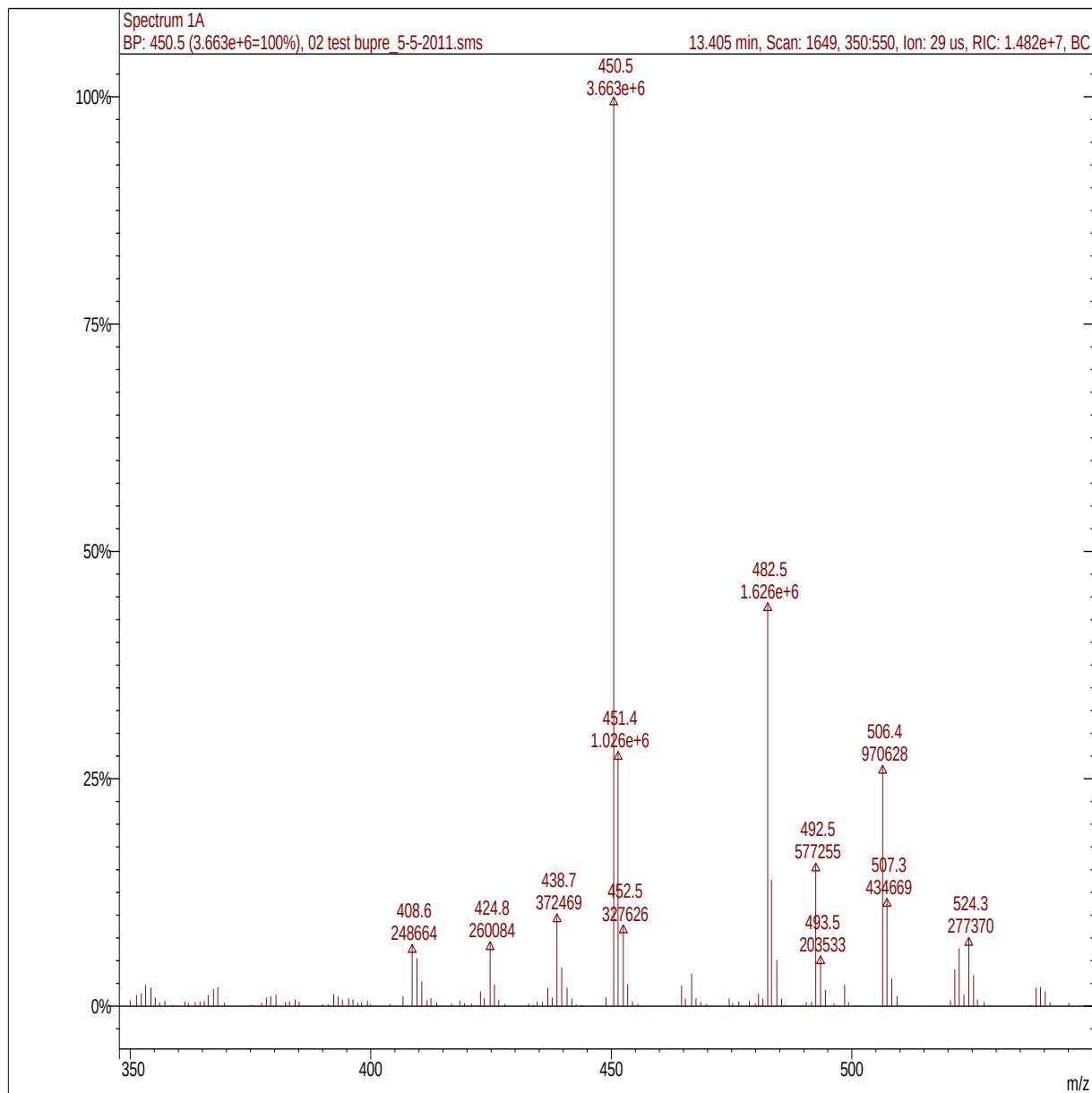


Fig. 1 :	Spettro di Massa della Buprenorfina
	IONI MOLECOLARI : 450-482-506

Norbuprenorfina e Buprenorfina urinarie
(Spettri di Massa di riferimento)

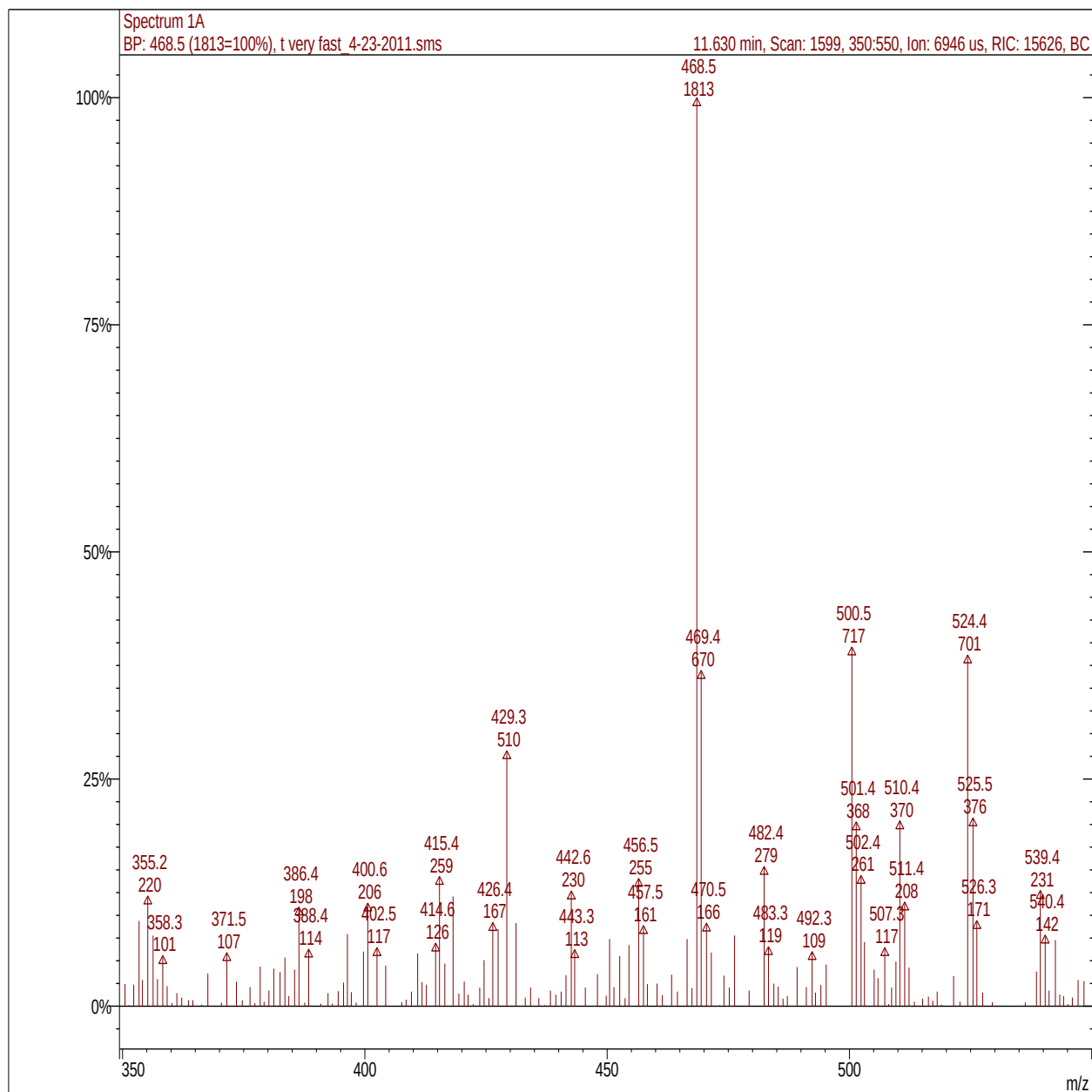


Fig. 2 :	Spettro di Massa della Norbuprenorfina
	IONI MOLECOLARI : 468-500-524

Norbuprenorfina e Buprenorfina urinarie
(Spettri di Massa di riferimento)

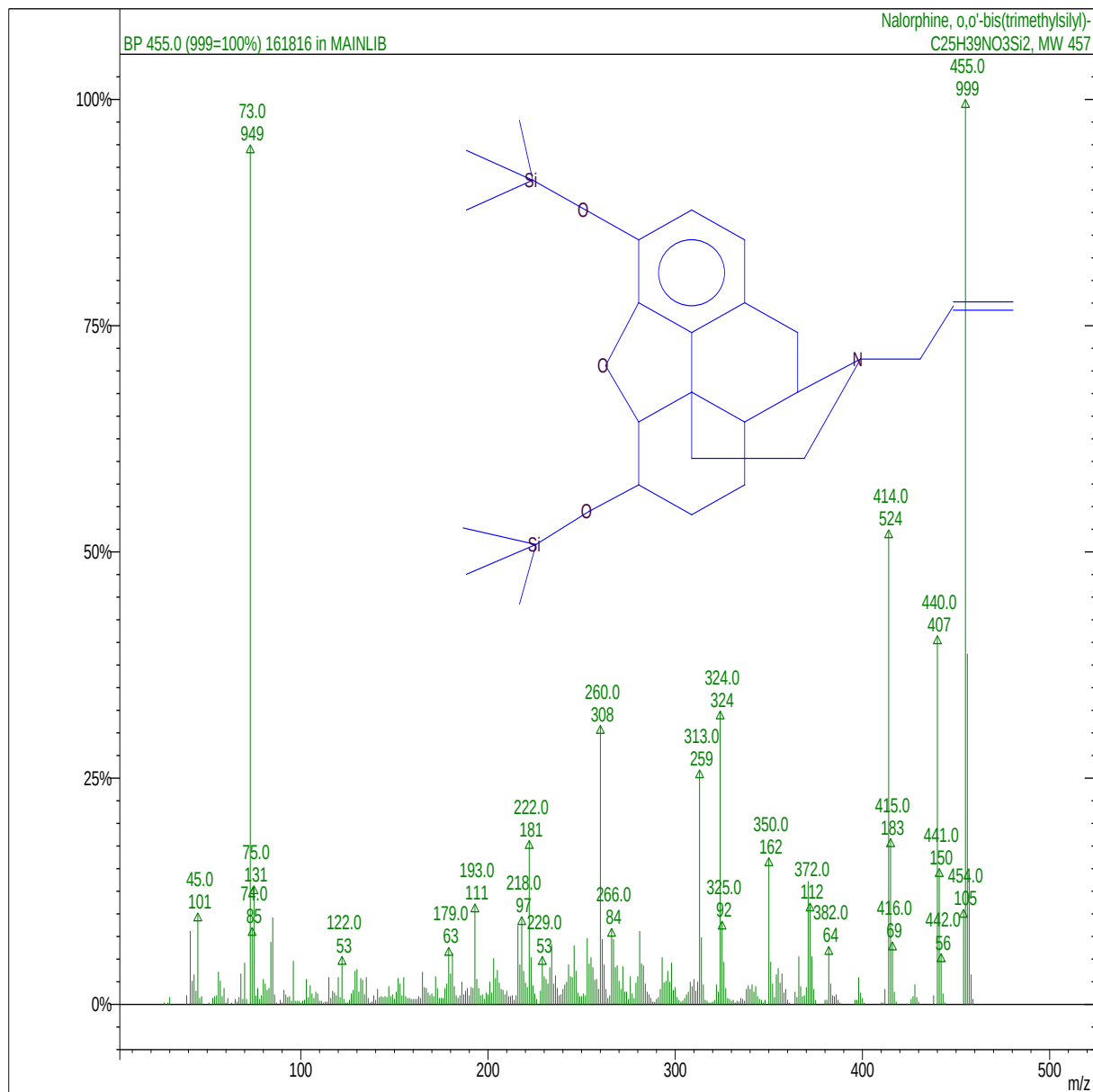


Fig. 3 :	Spettro di Massa dello Standard Interno
	IONI MOLECOLARI : 455-440-414