

Δ^9 -TETRAIDROCANNABINOLO-COOH urinario in UV – Cod. Z47010

Metodo di conferma in HPLC

INTRODUZIONE

Il Δ^9 -THC-COOH è il metabolita urinario principale della Cannabis. 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 il Δ^9 -THC-COOH urinario previa estrazione SPE 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	THC urinario in UV	Settembre 2010
----------------	--------------------	----------------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare il Δ^9 - **Tetraidrocannabinolo-COOH** (il maggiore metabolita della Cannabis) previa estrazione SPE e lettura in UV.

Recupero del Metodo : > 85 %

Sensibilità del Metodo : < 15 ng/ml

Valore di cut-off: 15 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 – Reagente di Idrolisi, **1 x 30 ml**

Reagente B – Soluzione Condizionamento 1, **1 x 200 ml**

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

Reagente D – Soluzione Lavaggio , **1 x 300 ml**

Reagente E – Soluzione di Eluizione, **1 x 50 ml**

Reagente F – Soluzione di Diluizione, **1 x 40 ml**

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

Reagente L1 – Calibratore liofilo – Livello 1, **1 x 10 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente L2 – Calibratore liofilo – Livello 2, **1 x 10 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente L3 – Calibratore liofilo – Livello 3, **1 x 10 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente L4 – Calibratore liofilo – Livello 4, **1 x 10 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente L5 – Calibratore liofilo – Livello 5, **1 x 10 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 $\lambda = 212 \text{ nm}$
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 sul sistema cromatografico per identificare il tempo di ritenzione del Δ^9 -Tetraidrocannabinolo-COOH 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 : Idrolisi del Campione

Dispensare in una provetta di vetro:

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controlli
Reagente L1 – Calibratore urinario – Livello 1	3000 µl						
Reagente L2 – Calibratore urinario – Livello 2		3000 µl					
Reagente L3 – Calibratore urinario – Livello 3			3000 µl				
Reagente L4 – Calibratore urinario – Livello 4				3000 µl			
Reagente L5 – Calibratore urinario – Livello 5					3000 µl		
Campione						3000 µl	
Controlli							3000 µl
Reagente A – Reagente di idrolisi	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Agitare al Vortex

FASE 2 : Porre le provette in stufa a 60 °C per 20 minuti.

FASE 3 : Portare i campioni a pH neutro (5<pH<7) con Acido acetico.

FASE 4 : Condizionamento delle colonne di Clean-up

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

FASE 5 : Versare tutto il Calibratore, i Campioni ed i Controlli 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 6 : Lavaggio:

- Lavare con 3 ml di **Reagente D** – Soluzione di Lavaggio
Scartare l'eluato e portare a secco con un leggero flusso d'aria

FASE 7 : Eluizione

- Eluire con 500 µl di **Reagente E** – Soluzione di Eluizione
Raccogliere l'eluato ed agitare al vortex

FASE 8 : Aggiungere all'eluato 400 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.

Δ^9 -TETRAIDROCANNABINOLO-COOH urinario- AVVERTENZE

REAGENTE G: SOLUZIONE TEST

Δ^9-Tetraidrocannabinolo-COOH	~ 10.000 ng/ml
--	----------------

REAGENTE L1-L2-L3-L4-L5 : CALBRATORI URINARI LIOFILI Lot. 002

	Livello1 ng/ml	Livello2 ng/ml	Livello3 ng/ml	Livello4 ng/ml	Livello5 ng/ml
Δ^9-Tetraidrocannabinolo-COOH	0	8,7	15,4	32,2	103,4
Modalità d'uso e Ricostituzione: il Calibratore deve essere usato per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 10 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente per 20 minuti 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 - 20 °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 10 ml					
Precauzioni: questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.					

PARAMETRI DEL DETECTOR UV/Vis Varian

λ	212 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 μ m (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 1,2 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.

Il segnale che la fase mobile deve essere cambiata è dato dal significativo innalzamento del rumore di fondo del detector UV/Vis. 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 μ l
Flusso di lavoro consigliato	1 ml / minuto
Pressione corrispondente	Circa 110 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
CC47016	Calibratore per THC urinario	5 x 2 x 10 ml
CC47017	Controllo per THC urinario – Livello 1	6 x 10 ml
CC47018	Controllo per THC urinario – Livello 2	6 x 10 ml
CC47019	Controllo per THC urinario – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 10 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



Δ^9 -TETRAIDROCANNABINOLO-COOH
(Cromatogrammi di riferimento)

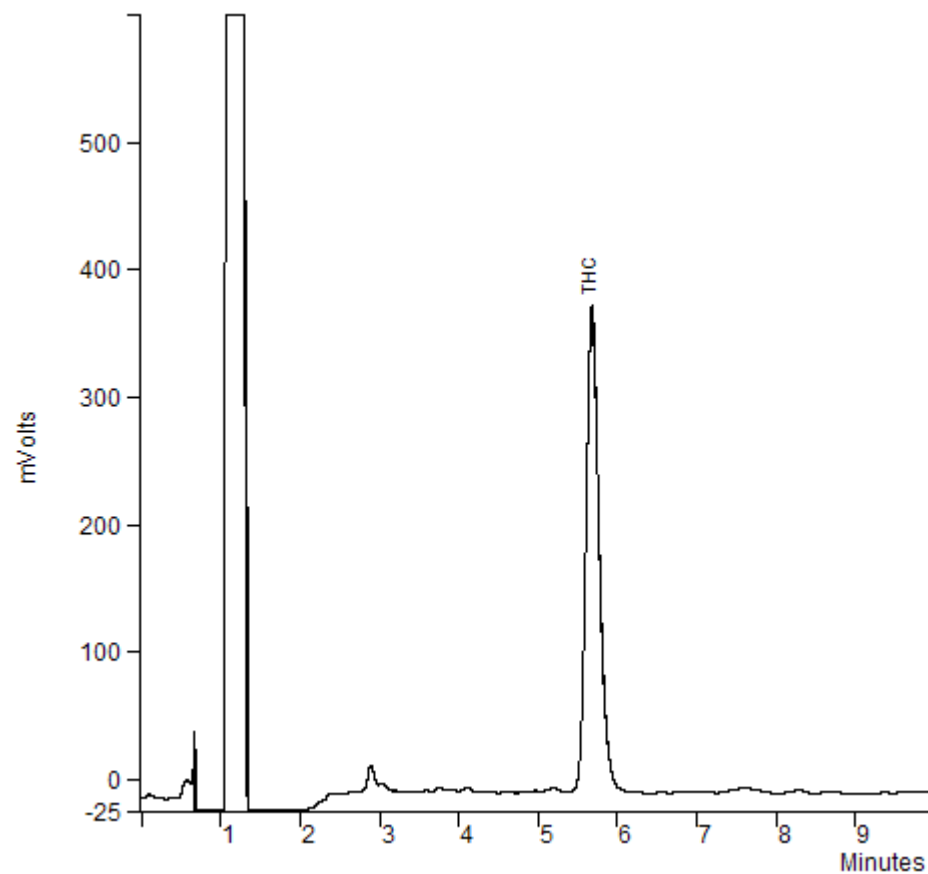


Fig. 1	Soluzione Test
R.T. 5.66	Δ^9 -THC-COOH

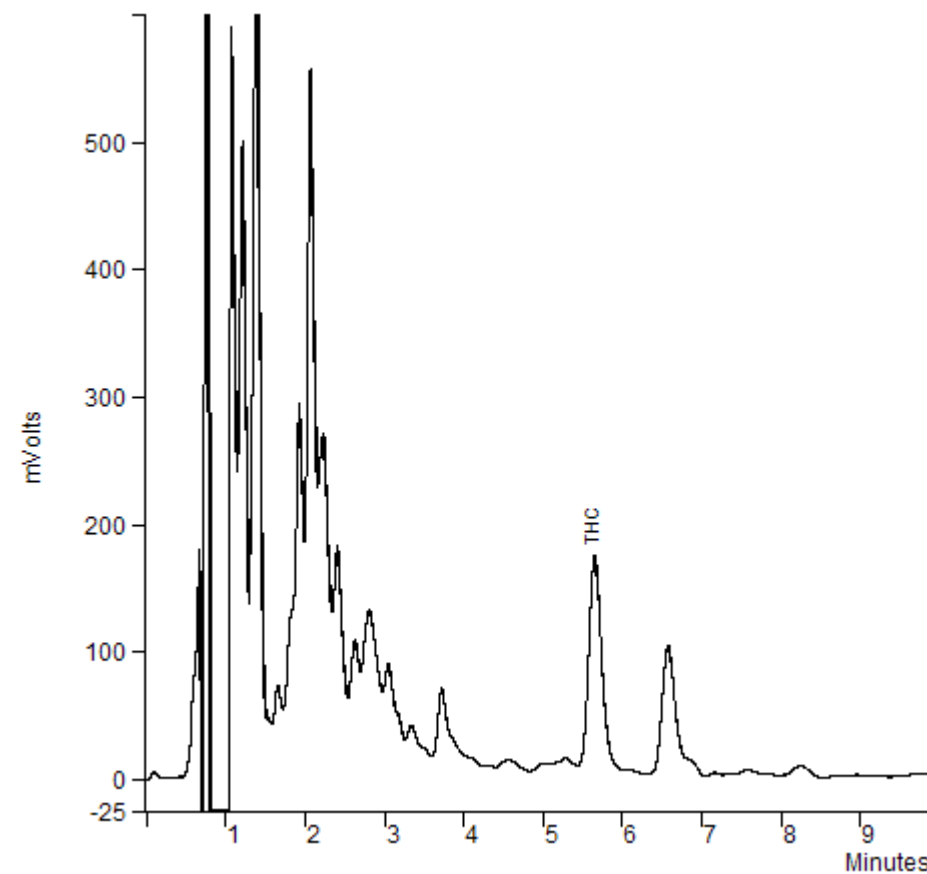


Fig. 2	Calibratore liofilo urinario
R.T. 5.64	Δ^9 -THC-COOH 170 ng/ml

Δ^9 -TETRAIDROCANNABINOLO-COOH
(Cromatogramma di riferimento)

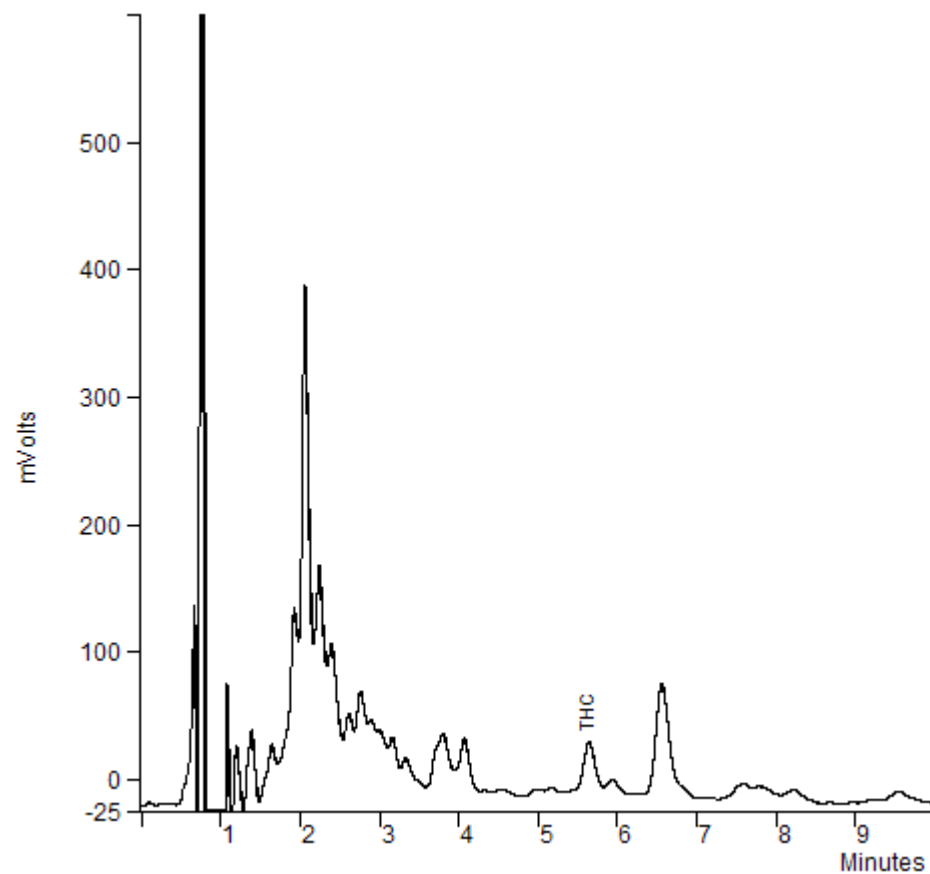


Fig. 3	Controllo liofilo urinario
R.T. 5.63	Δ^9 -THC-COOH 37,3 ng/ml

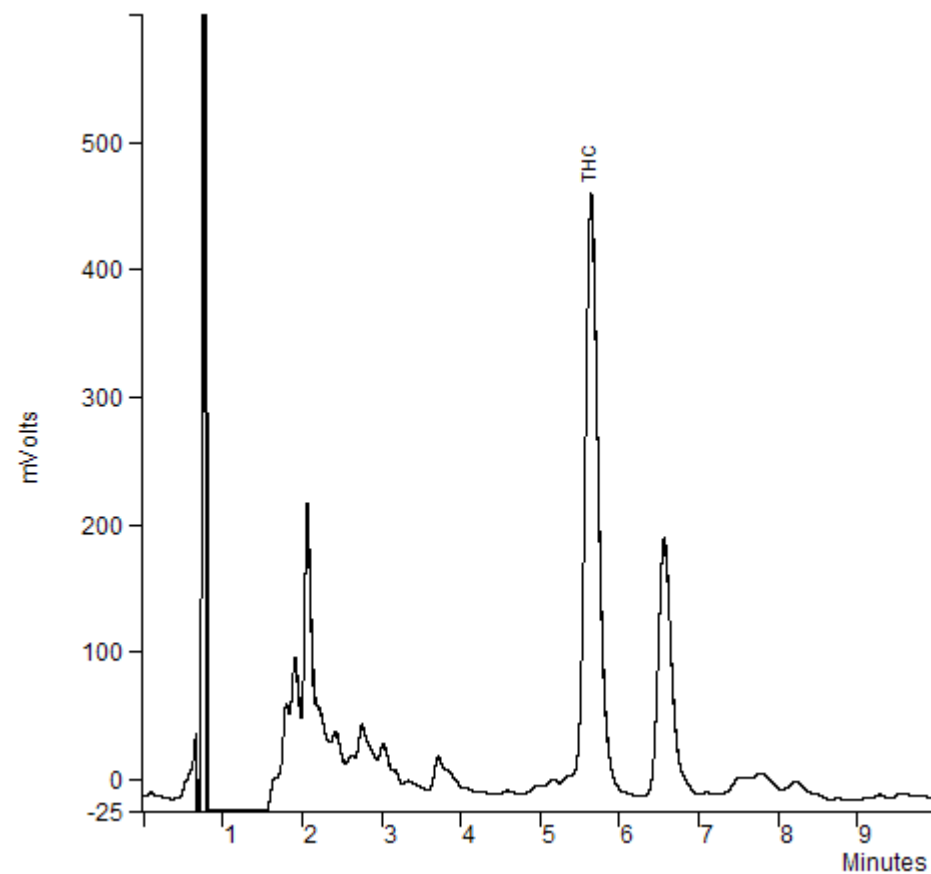


Fig. 4	Campione urinario arricchito
R.T. 5.63	Δ^9 -THC-COOH 470 ng/ml