

METADONE ed EDDP urinari in GC-MS – Cod. GC48010

Metodo di conferma in GC-MS

INTRODUZIONE

Il metadone è un oppioide sintetico utilizzato come farmaco di elezione nella disintossicazione da eroina (e/o oppiacei). All'interno dell'organismo il metadone viene metabolizzato a 2-etiliden-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), metabolita che si ritrova insieme al farmaco parente nelle urine.

Le metodiche di screening misurano generalmente, attraverso una reazione antigene-anticorpo il metadone. Poiché queste metodologie possono dare dei risultati falsi positivi per la presenza di sostanze estranee che eventualmente interferiscono nella reazione antigene-anticorpo è SEMPRE necessaria un'analisi di conferma.

Quindi qualora l'analisi di screening risulti positiva (cut-off > o = 300 ng/ml) è necessaria un'analisi di conferma con tecnica di separazione cromatografica sia gassosa che liquida, entrambe accoppiate con un rivelatore in spettrometria di massa.

Il metodo riportato consente di determinare il Metadone e l'EDDP previa estrazione in fase solida e successiva determinazione in gas cromatografia – spettrometria di massa (Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS).



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



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° 010	Metadone ed EDDP urinari in GC/MS	07/2025
--------	-----------------------------------	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare il **Metadone** ed il suo metabolita primario, l'**EDDP**, previa estrazione SPE e lettura in GC/MS.

Recupero del Metodo :

circa 98 %

Sensibilità del Metodo :

circa 20 ng/ml

Range Dinamico del Metodo :

20 – 10.000 ng/ml

Valore di cut-off :

Metadone 100 ng/ml
EDDP 100 ng/ml

LOD:

Rif. Provvedimento Gazzetta Ufficiale 236 del 18-09-2008
7 ng/ml

LOQ:

20 ng/ml

Contenuto della Confezione (50 test):

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

Reagente A – Soluzione Condizionamento 1, **1 x 50 ml**

Reagente B – Soluzione Condizionamento 2, **1 x 50 ml**

Reagente C – Soluzione Tampone, **1 x 50 ml**

Reagente D – Soluzione Lavaggio, **1 x 50 ml**

Reagente E – Soluzione di Eluizione, **1 x 100 ml**

Reagente F – Soluzione Diluente, **1 x 10 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 K – Soluzione Standard Interno, **1 x 300 ul**

Da diluire 1:10 in H₂O prima dell'uso

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

Codice CC48016
(confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 2, 2 x 5 ml

Codice CC48016
(confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 3, 2 x 5 ml

Codice CC48016
(confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 4, 2 x 5 ml

Codice CC48016
(confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario Metadone – Livello 5, 2 x 5 ml

Codice CC48016
(confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

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

Codice CC48116
(confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 2, 2 x 5 ml	<u>Codice CC48116</u> <u>(confezionato a parte – vedi</u> <u>scheda tecnica)</u>
Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 3, 2 x 5 ml	<u>Codice CC48116</u> <u>(confezionato a parte – vedi</u> <u>scheda tecnica)</u>
Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 4, 2 x 5 ml	<u>Codice CC48116</u> <u>(confezionato a parte – vedi</u> <u>scheda tecnica)</u>
Calibratore liofilo urinario EDDP – Livello 5, 2 x 5 ml	<u>Codice CC48116</u> <u>(confezionato a parte – vedi</u> <u>scheda tecnica)</u>
Reagente M – Soluzione Derivatizzante, 5 x 1 ml (5 ampolle da 1 ml)	<u>Conservare a T° Ambiente.</u>
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
Stabile per circa 3 mesi a
-20°C

PROCEDURA PREANALITICA:

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

- 400 µl di **Reagente F** – Soluzione Diluente
- 50 µl di **Reagente G** – Soluzione Test Metadone
- 50 µl di **Reagente H** – Soluzione Test EDDP

Agitare al Vortex per 20 sec.

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

FASE 3: Riprendere con 100 µl di **Reagente M** – Soluzione Derivatizzante

Agitare al Vortex per 20 sec.

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 1µl di questa soluzione in GC per identificare sia il tempo di ritenzione che gli spettri di massa del Metadone e dell' EDDP che devono essere simili a quelli riportati 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*

FASE 2: Diluire il **Reagente K** – Soluzione Standard interno 1:10 con Acqua di grado HPLC

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

FASE 3 : Preparazione del Campione

Fare una Curva di Calibrazione su 5 punti :

	Campione	Calibratore Metadone + EDDP Livello 1	Calibratore Metadone + EDDP Livello 2	Calibratore Metadone + EDDP Livello 3	Calibratore Metadone + EDDP Livello 4	Calibratore Metadone + EDDP Livello 5	Controllo Metadone + EDDP
Campione	1000 µl						
Calibratore Metadone – Livello 1		500 µl					
Calibratore EDDP – Livello 1		500 µl					
Calibratore Metadone – Livello 2			500 µl				
Calibratore EDDP – Livello 2			500 µl				
Calibratore Metadone – Livello 3				500 µl			
Calibratore EDDP – Livello 3				500 µl			
Calibratore Metadone – Livello 4					500 µl		
Calibratore EDDP – Livello 4					500 µl		
Calibratore Metadone – Livello 5						500 µl	
Calibratore EDDP – Livello 5						500 µl	
Controllo Metadone							500 µl
Controllo EDDP							500 µl
Reagente K – Soluzione Std interno (diluito 1:10 con H ₂ O)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 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 4 : 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 5 : 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 6 : Eluizione **rigorosamente in provette di vetro con tappo in pyrex**

- Eluire con 2 ml di **Reagente E** – Soluzione di Eluizione

Raccogliere l'eluato in provette di vetro ed agitare accuratamente al vortex

Se si crea un intorbidimento o un precipitato nell'eluato, centrifugare a 4000 rpm per 2 minuti.

FASE 7 : Portare a secco l'eluato con l'ausilio di un flusso di elio o di azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C)

FASE 8: Riprendere con 100 µl di **Reagente M** – Soluzione Derivatizzante

Agitare al Vortex per 20 sec.

FASE 9: Porre in stufa a 70 °C per 30 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 10: Trasferire tutto il campione in vials con riduttore di volume.

N.B.: il campione così preparato è stabile 1 giorno a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 1 µl nel sistema GC.

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
-------------	----------------

SETTAGGIO DEL GAS-CROMATOGRAFO

• Colonna VF-5ms 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm (condizionata) • Temperatura iniettore 280 °C • Rapporto di Splittaggio Iniziale: ON 20 0 min: OFF 1 min: ON 100 3 min : ON 20 • Temperatura forno colonna 50 °C x 1 minuto + 20 °C/min fino a 180 °C x 0 minuti + 10 °C/min fino a 300 °C x 1.5 minuti (corsa 21 minuti) • Flusso in Colonna: 1 ml/min
--

SETTAGGIO DETECTOR DI MASSA

• Range di Massa 80 – 600 • Temperatura della Massa: 180 °C; • Temperatura Transfer Line: 270 °C; • Temperatura Manifold: 80 °C • Filamento on: 6 minuti • Modo operativo in Impatto Elettronico (EI)

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA VF-5 MS E DELLA SIRINGA

Lavare la siringa prima e dopo dell'iniezione con ACETONE. Per la colonna seguire le prescrizioni del costruttore. Non condizionare la (le) colonna/e se attaccata al Detector di Massa. All'inizio di ogni seduta analitica effettuare la calibrazione delle masse e delle RF.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Al termine di ogni seduta analitica portare il gradiente alla massima temperatura della colonna (consigliata dal costruttore) con una velocità di 30 °C/minuto. (Vedere istruzioni del costruttore)

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
CC43019	Controllo multiparametrico per Droghe d'abuso – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 5 ml
CC48019	Controllo urinario per EDDP, 6-MAM e Cocaina – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 5 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

Metadone ed EDDP urinari
(Cromatogrammi e Spettri di riferimento)

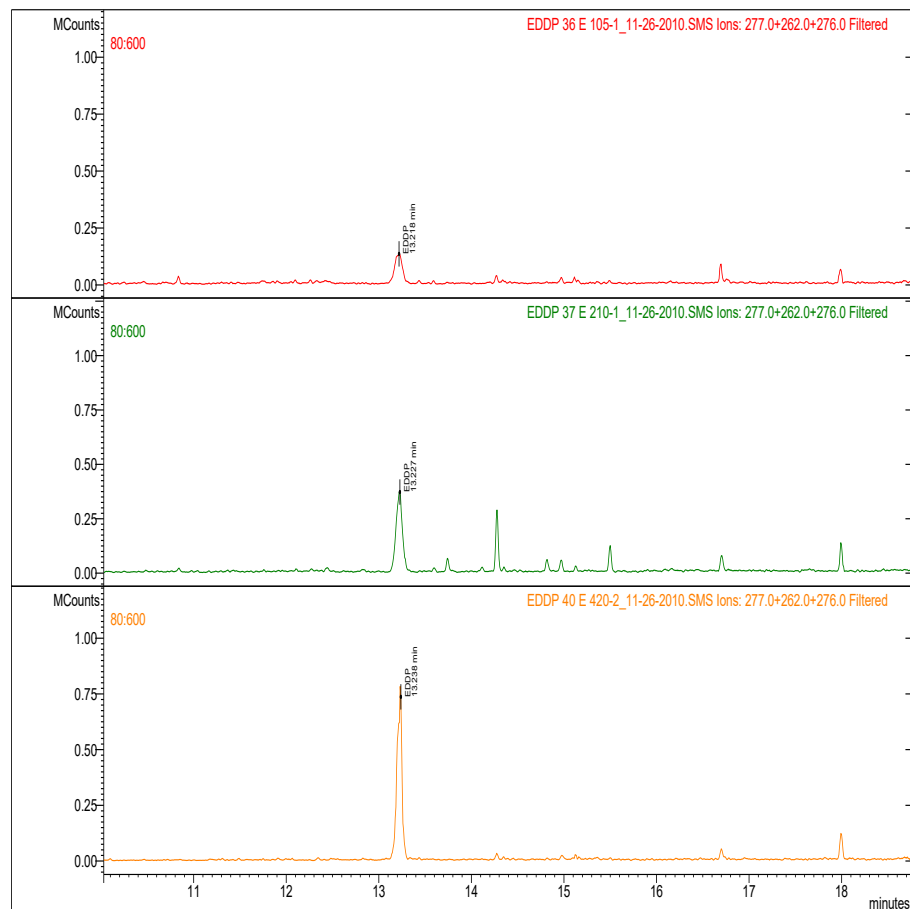


Fig. 1	Campioni urinari EDDP
	R.T. 13.7 EDDP 105-210-420 ng/ml

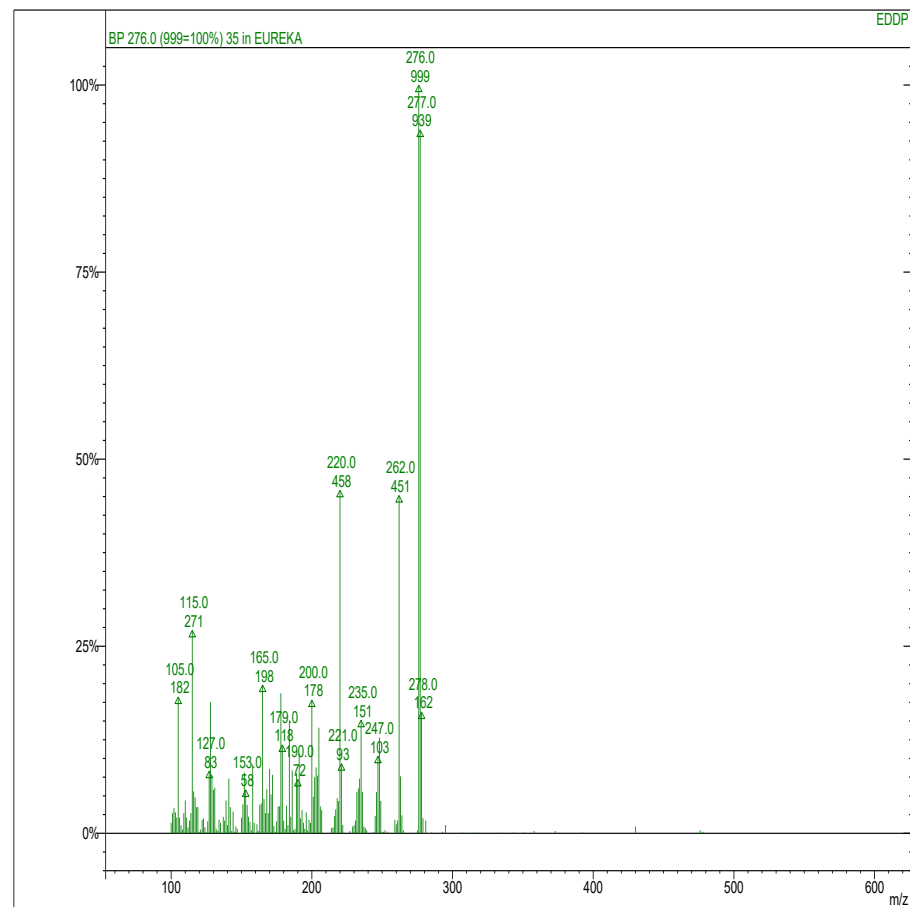


Fig. 2	Spettro di Massa dell'EDDP
	IONI MOLECOLARI: 277-262-276

Metadone ed EDDP urinari
(Cromatogrammi e Spettri di riferimento)

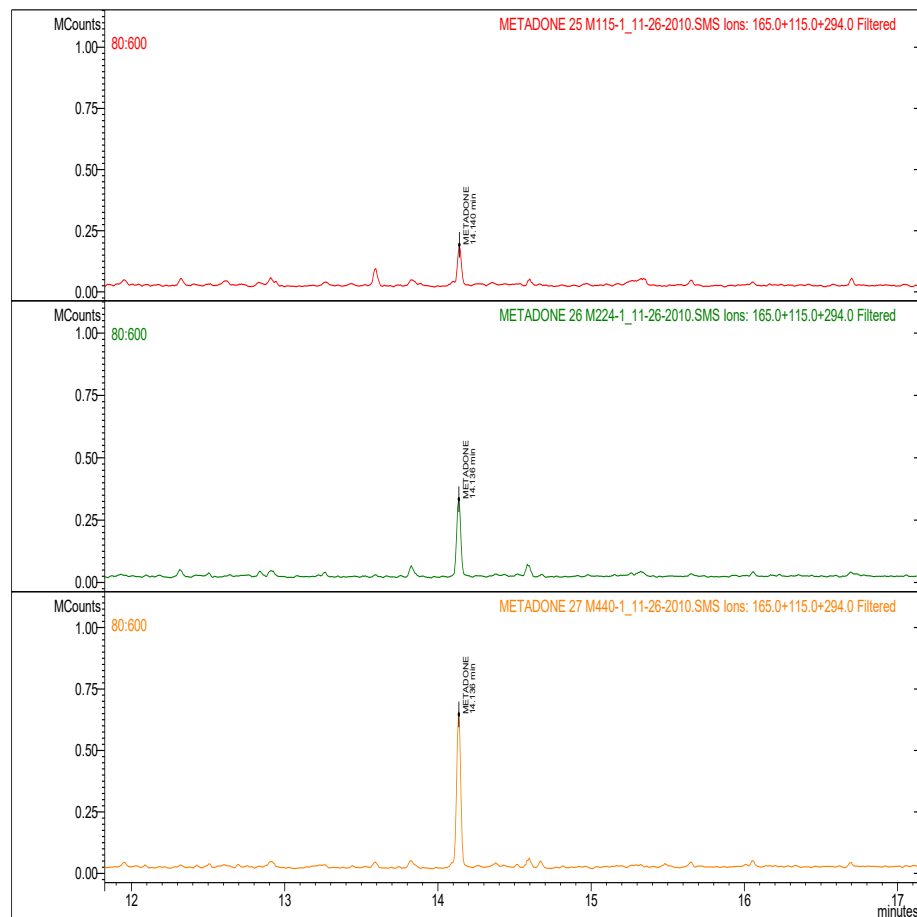


Fig. 3	Campioni urinari Metadone
	R.T. 14.6 Metadone 115-224-440 ng/ml

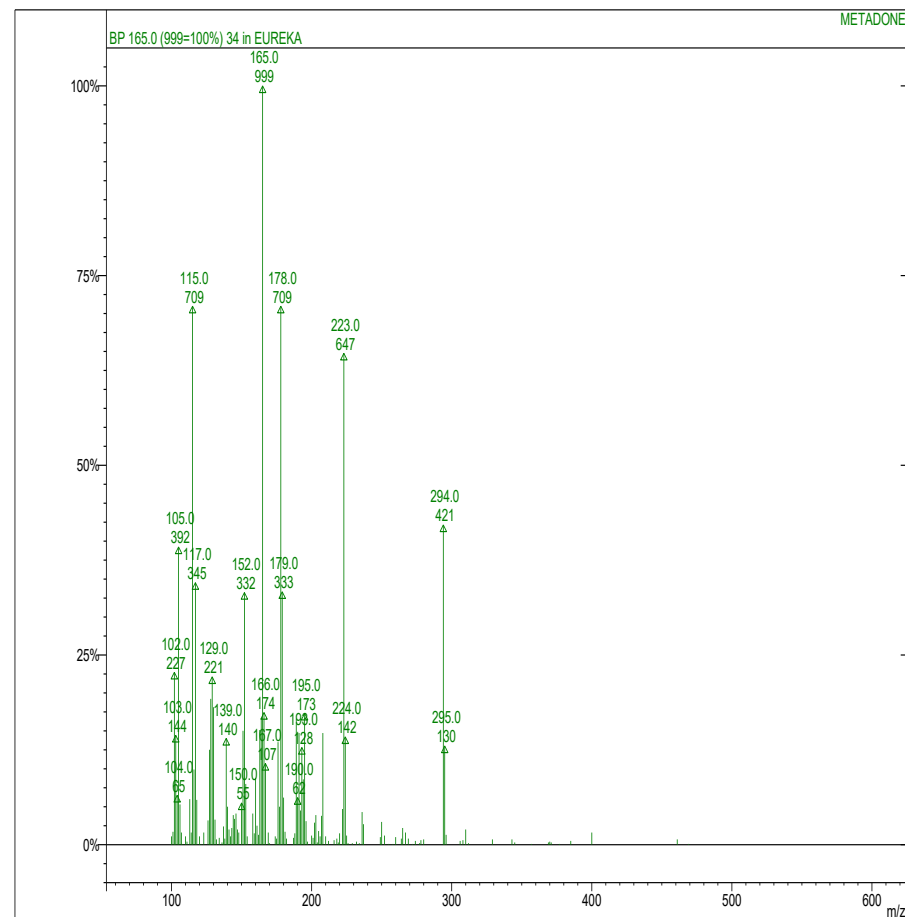


Fig. 4	Spettro di Massa del Metadone
	IONI MOLECOLARI: 115-165-294

Metadone ed EDDP urinari
(Cromatogrammi e Spettri di riferimento)

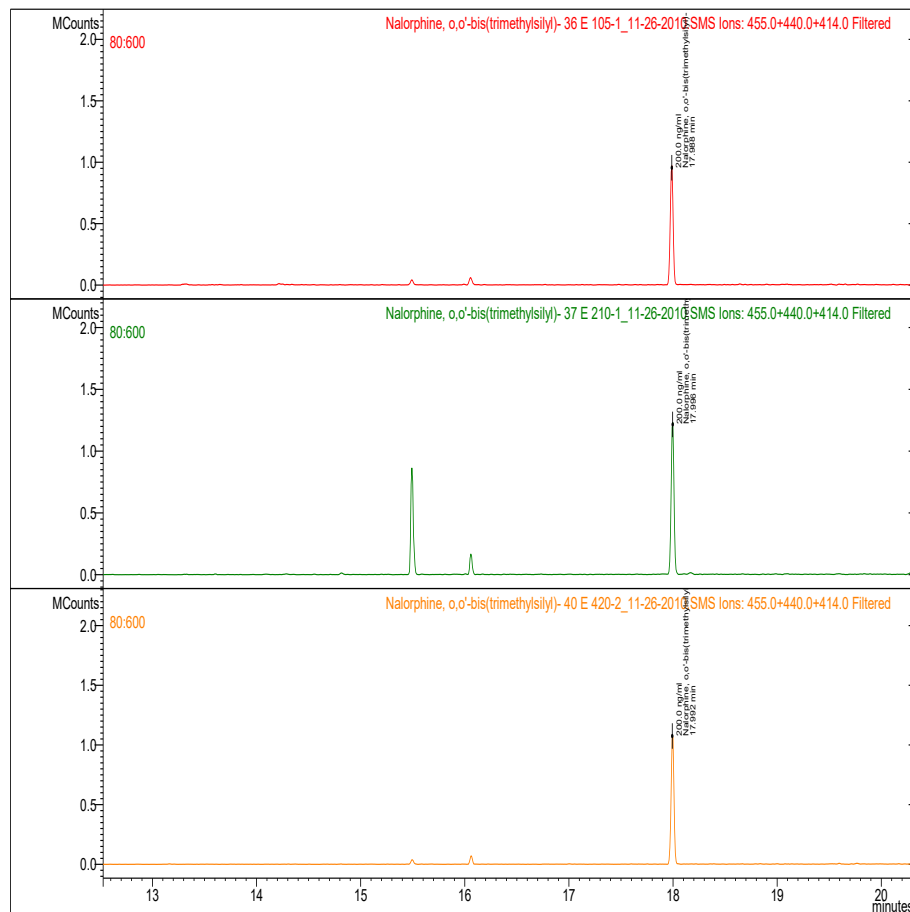


Fig. 5	Campioni urinari con Std Interno
	R.T. 18.8 Standard Interno

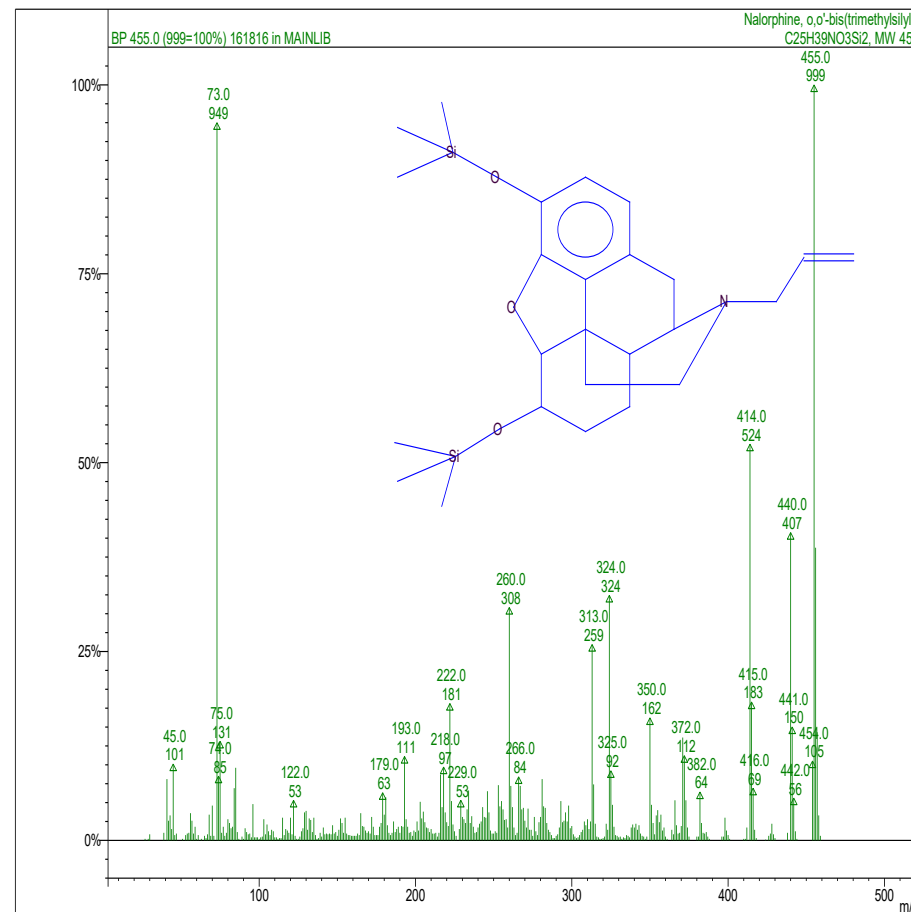


Fig. 6	Spettro di Massa dello Std Interno
	IONI MOLECOLARI: 455-440-414