

OPPIACEI urinari in GC-MS – Cod. GC45010
(Morfina, Diidrocodeina, Codeina, Etilmorfina, 6-Monoacetilmorfina)
Metodo di conferma in GC-MS

INTRODUZIONE

L'eroina (diacetilmorfina) è una sostanza d'abuso semisintetica ottenuta dalla morfina, uno dei principali alcaloidi dell'oppio, per reazione con l'anidride acetica.

All'interno dell'organismo, l'eroina viene rapidamente idrolizzata a 6-monoacetilmorfina e quindi a morfina. Successivamente quest'ultima viene coniugata con acido glucuronico in posizione 3 e 6 della molecola formando morfina 3 e 6 glucoronide. Questi ultimi due metaboliti vengono escreti nelle urine insieme ad una piccola percentuale di morfina libera. E' possibile anche ritrovare minime quantità di codeina presente insieme alla morfina nell'oppio ed acetilcodeina che si ottiene per acetilazione della codeina durante la preparazione dell'eroina. Le metodiche di screening misurano, attraverso una reazione antigene-anticorpo la classe di sostanze degli oppiacei.

Qualora l'analisi di screening risulti positiva (cut-off > 0 = a 300ng/ml) è necessaria un'analisi di conferma, generalmente con tecnica cromatografica sia gassosa che liquida entrambe accoppiate con un rivelatore in spettrometria di massa.

Il presente metodo consente di determinare la morfina totale urinaria (dopo idrolisi dei glucuronidi), la codeina e la 6-monoacetilmorfina eventualmente presenti in minime quantità, previa estrazione di tali sostanze dalla matrice urinaria in micro colonne di estrazione in fase solida. Il metodo consente anche la determinazione della diidrocodeina e dell'etilmorfina. Queste due sostanze oppioidi, che forniscono un risultato positivo alle metodiche di screening per la classe degli oppiacei, sono in realtà i principi attivi di alcune preparazioni farmaceutiche antitussive (es. la diidrocodeina è il principio attivo della paracodina) o si trovano in associazione con altri principi attivi in preparazioni farmaceutiche ad azione analgesico-antipiretica (es. Mindolmerk contiene etilmorfina con propifenazone e caffeina). E' importante quindi che il metodo di analisi permetta di identificare anche queste due sostanze e differenziarle dalle altre molecole sopra riportate.



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° 019	Oppiacei urinari in GC/MS	08/2024
--------	---------------------------	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare la **Morfina** (il maggiore metabolita dell'Eroina), la **Diidrocodeina**, la **Codeina**, l'**Etilmorfina** e la **6-Monoacetilmorfina** urinarie previa idrolisi delle urine per liberare la morfina dai glucuronidi, estrazione SPE e lettura in GC-MS.

Recupero del Metodo : > 95 %

Sensibilità del Metodo : < 10,0 ng/ml

Range dinamico del Metodo : 10 – 10.000 ng/ml

LOD: 2 ng/ml

LOQ: 6 ng/ml

<u>Valore di cut-off:</u>	Morfina	100 ng/ml
	Diidrocodeina	100 ng/ml
	Codeina	100 ng/ml
	Etilmorfina	100 ng/ml
	6-Monoacetilmorfina	100 ng/ml

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

Contenuto della Confezione (50 test) :

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

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

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 15 ml**

Reagente C – Soluzione Condizionamento 1 e Lavaggio 3, **1 x 250 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 N – Soluzione Test, **1 x 0,5 ml**

Reagente S – Soluzione Standard Interno, **1 x 300 µl**

Calibratore liofilo urinario – Livello 1, 2 x 5 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 2, 2 x 5 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 3, 2 x 5 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 4, 2 x 5 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 5, 2 x 5 ml

Vedi Avvertenze

Da diluire 1:10 in H₂O prima dell'uso

Codice CC45016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC45016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC45016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC45016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC45016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario 6-MAM – Livello 1, 2 x 5 ml	<u>a parte – vedi scheda tecnica)</u> <u>Codice CC45116 (confezionato</u>
Calibratore liofilo urinario 6-MAM – Livello 2, 2 x 5 ml	<u>a parte – vedi scheda tecnica)</u> <u>Codice CC45116 (confezionato</u>
Calibratore liofilo urinario 6-MAM – Livello 3, 2 x 5 ml	<u>a parte – vedi scheda tecnica)</u> <u>Codice CC45116 (confezionato</u>
Calibratore liofilo urinario 6-MAM – Livello 4, 2 x 5 ml	<u>a parte – vedi scheda tecnica)</u> <u>Codice CC45116 (confezionato</u>
Calibratore liofilo urinario 6-MAM – Livello 5, 2 x 5 ml	<u>a parte – vedi scheda tecnica)</u> <u>Codice CC45116 (confezionato</u>
Reagente M – Soluzione Derivatizzante, 3 x 1 ml (3 ampolle da 1 ml)	<u>a parte – vedi scheda tecnica)</u> <u>Vedi Avvertenze</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 :

- 450 µl di **Reagente I** – Sol. Diluente
- 50 µl di **Reagente N** – 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 50 µl di **Reagente M** - Soluzione Derivatizzante

Al vortex per 20 secondi

FASE 4: Porre in stufa a 70 °C per 20 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 1 µl di questa soluzione in GC per identificare il tempo di ritenzione degli Oppiacei che deve essere simile a quello riportato 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 S** – Sol. Standard interno 1:10 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	Calibratore	Calibratore	Calibratore	Calibratore	Campione	Controlli + Controlli 6-MAM
Calibratore iofilo urinario – Livello 1	500 µl						
Calibratore iofilo urinario 6- MAM – Livello 1	500 µl						
Calibratore iofilo urinario – Livello 2		500 µl					
Calibratore iofilo urinario 6- MAM – Livello 2		500 µl					
Calibratore iofilo urinario – Livello 3			500 µl				
Calibratore iofilo urinario 6- MAM – Livello 3			500 µl				
Calibratore iofilo urinario – Livello 4				500 µl			
Calibratore iofilo urinario 6- MAM – Livello 4				500 µl			
Calibratore iofilo urinario – Livello 5					500 µl		
Calibratore iofilo urinario 6- MAM – Livello 5					500 µl		
Campione						1,0 ml	
Controlli							500 µl
Controlli 6- MAM							500 µl
Reagente S – Sol.Std interno (diluito 1:10 in Acqua 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 $\approx 5,0$ – Eventualmente correggerlo

Al vortex per 20 secondi

N.B. I valori dei Calibratori Morfina, Codeina, Diidrocodeina, Etilmorfina 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
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 idrolizzati							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 tutto il campione 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 **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 50 µl di **Reagente M - Soluzione Derivatizzante**

Al vortex per 20 secondi

FASE 11: Porre in stufa a 70 °C per 20 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 12 : Trasferire tutto il campione in vials con riduttore di volume

INIEZIONE :

- Iniettare 1 µl della soluzione nel GC

OPPIACEI urinari - Avvertenze

REAGENTE N: SOLUZIONE TEST

Morfina	circa 10.000 ng/ml
Diidrocodeina	circa 10.000 ng/ml
Codeina	circa 10.000 ng/ml
Etilmorfina	circa 10.000 ng/ml
6-Monoacetilmorfina	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 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm (condizionata)
- 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 120 °C x 3,25 minuti + 20 °C/min fino a 250 °C x 1 minuto + 40 °C/min fino a 300 °C x 3 minuti (corsa 15 minuti)
- Gas Elio 1 ml/min

SETTAGGIO DETECTOR DI MASSA (4000) :

- Range di Massa 60 – 500
- Temperatura della Massa: 180 °C;
- Temperatura Transfer Line: 270 °C;
- Temperatura Manifold: 80 °C
- Filamento on: 5 minuti

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA VF-5 MS E DELLA SIRINGA

Lavare la siringa prima dell'iniezione con ACETONE.
Per la colonna seguire le prescrizioni del costruttore.
Non condizionare la (le) colonna/e se attaccata al Detector di Massa.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Tenerla alla massima temperatura per il tempo consigliato.
(Vedi istruzioni del costruttore)

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
CC45016	Calibratore per Oppiacei urinari	5 x 2 x 5 ml
CC45019	Controllo 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
CC48019	Controllo per EDDP, 6-MAM e Cocaina urinari – 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

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento GC-MS)

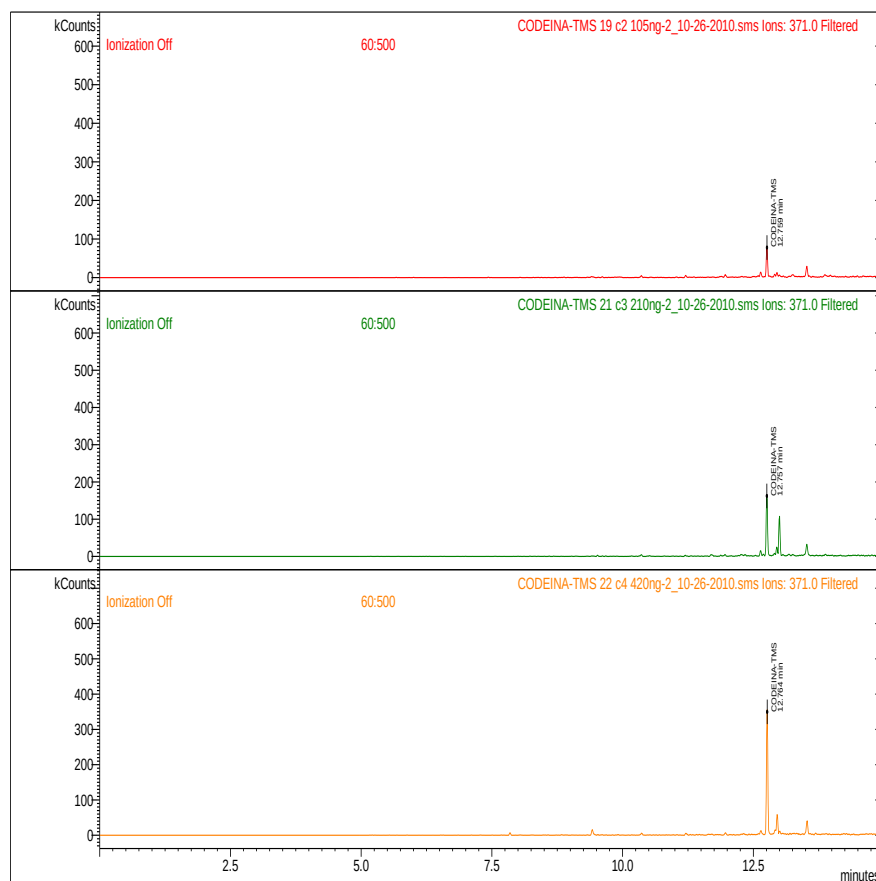


Fig. 1 :	Campione urinario Codeina
	R.T. 12.76 CODEINA

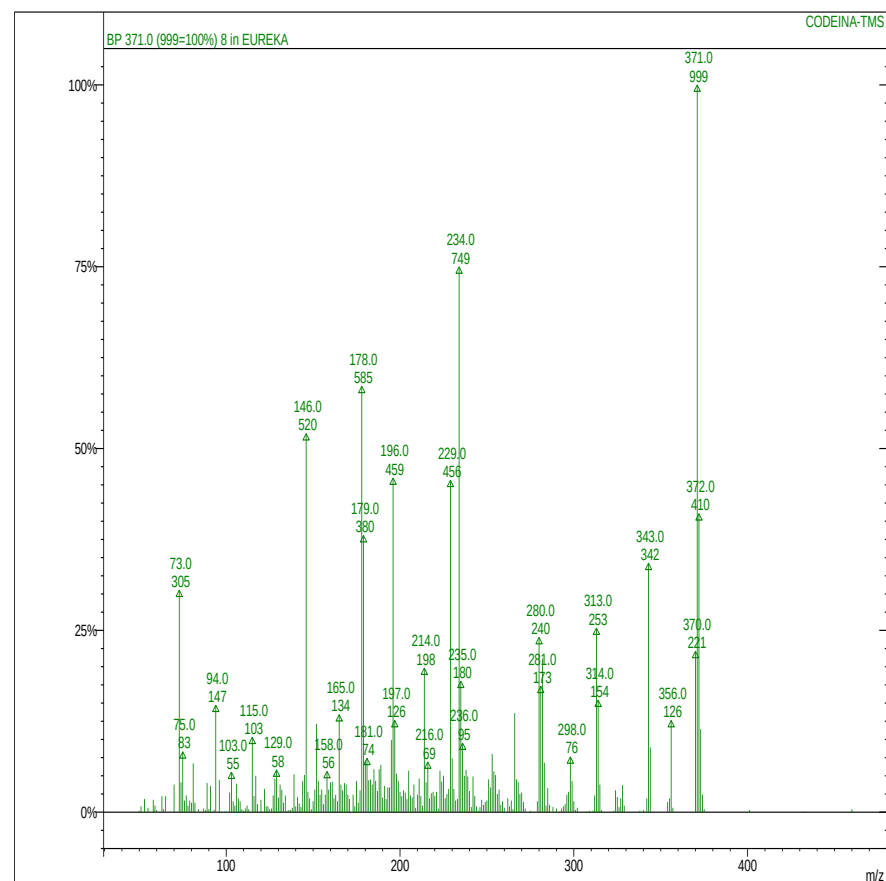


Fig. 2 :	Spettro di Massa Codeina
	IONI MOLECOLARI: 371 – 234 - 343

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento GC-MS)

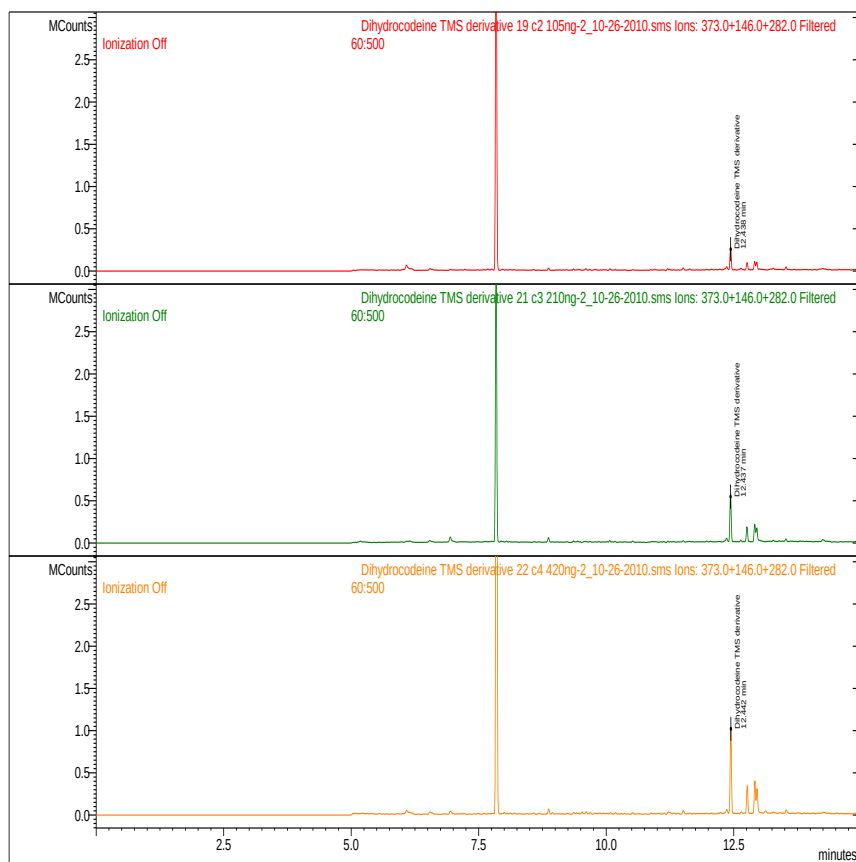


Fig. 3 :	Campione urinario Diidrocodeina
	R.T. 12.44 DIIDROCODEINA

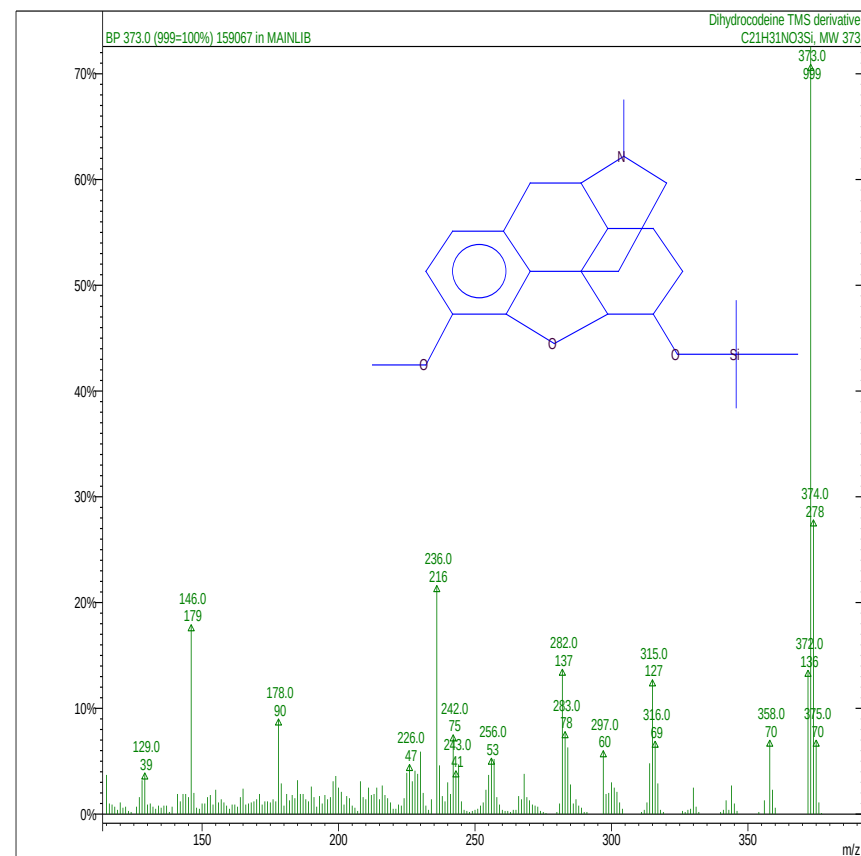


Fig. 4 :	Spettro di Massa Diidrocodeina
	IONI MOLECOLARI: 373 – 146 - 282

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento GC-MS)

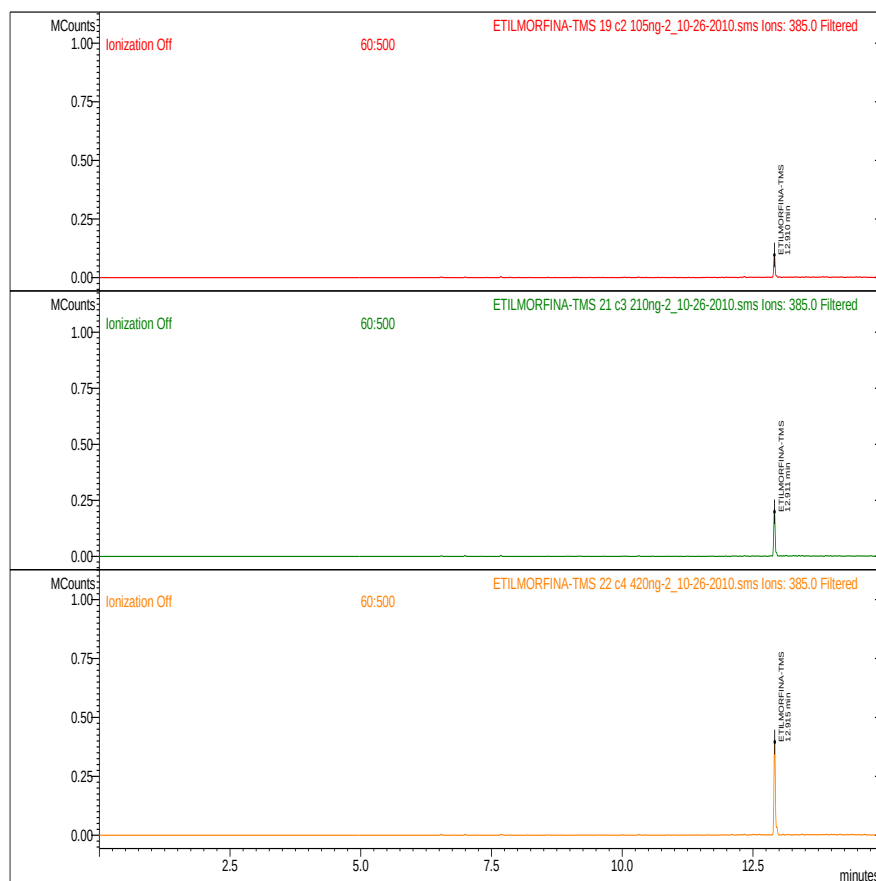


Fig. 5 :	Campione urinario Etilmorfina
	R.T. 12.91 ETILMORFINA

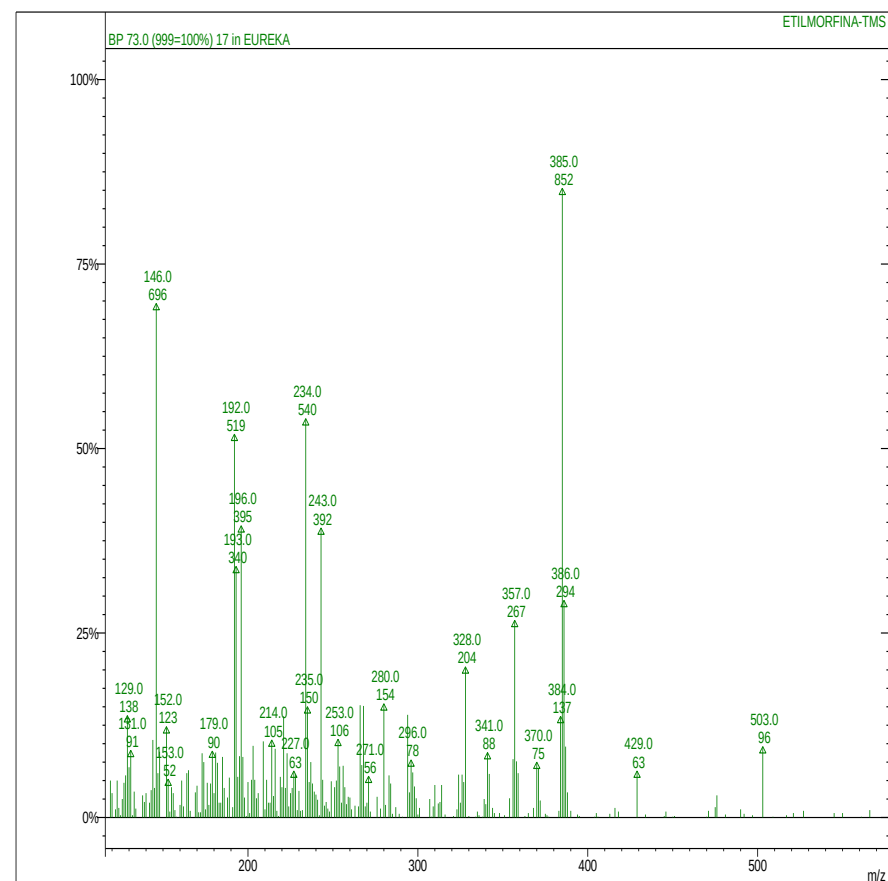


Fig. 6 :	Spettro di Massa Etilmorfina
	IONI MOLECOLARI: 385 – 146 - 73

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento GC-MS)

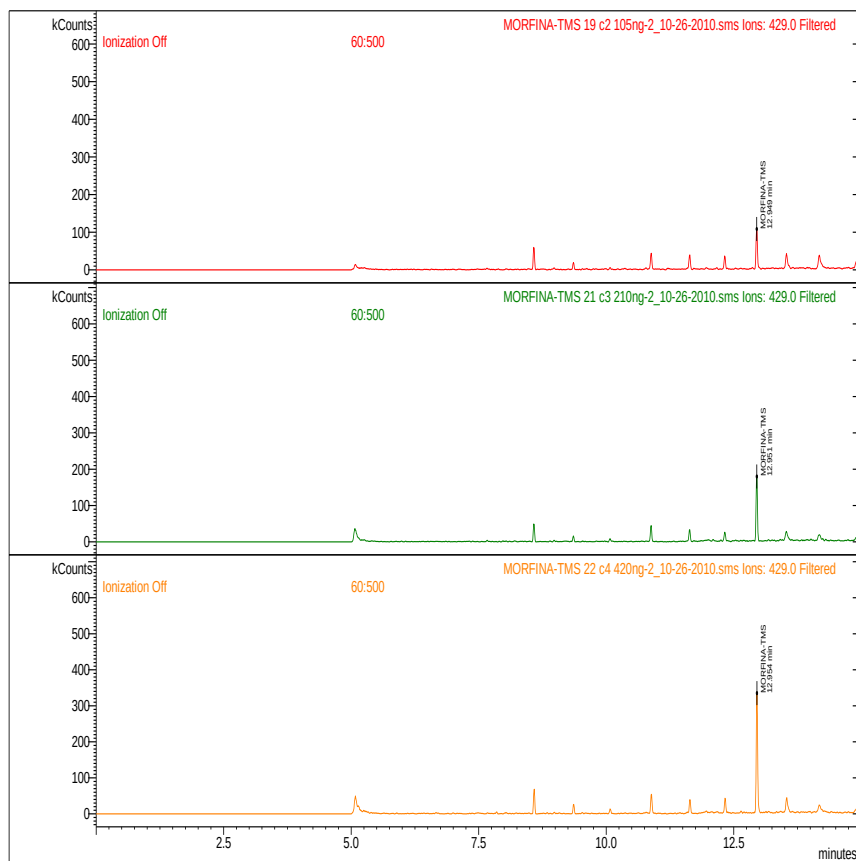


Fig. 7 :	Campione urinario Morfina
	R.T. 12.95 MORFINA

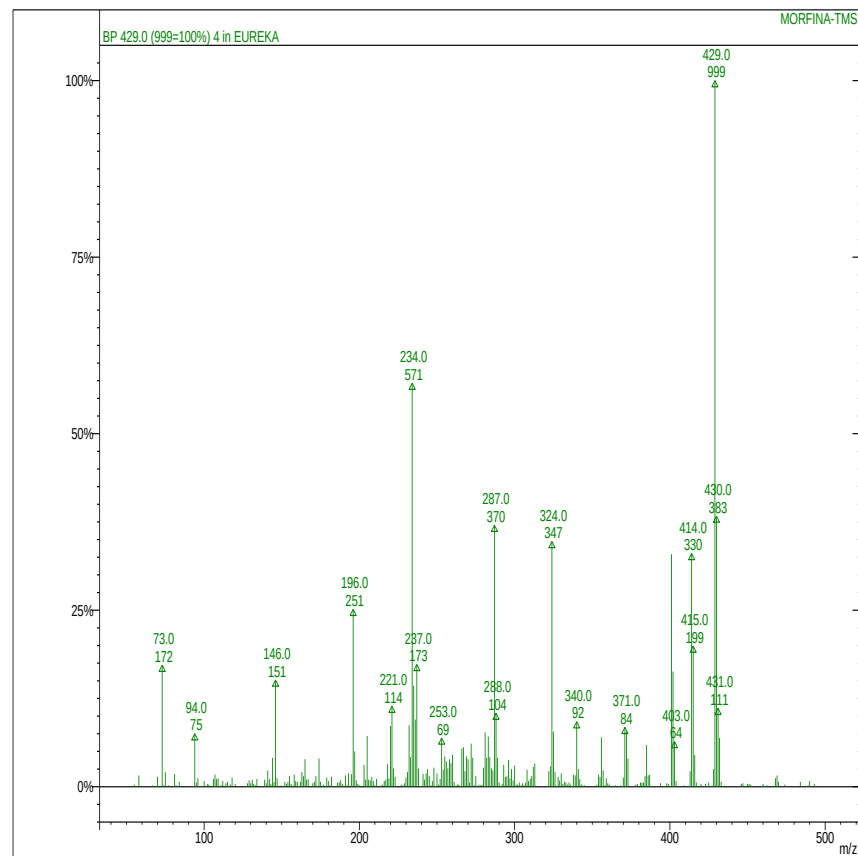


Fig. 8 :	Spettro di Massa Morfina
	IONI MOLECOLARI: 429 – 414 - 234

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento GC-MS)

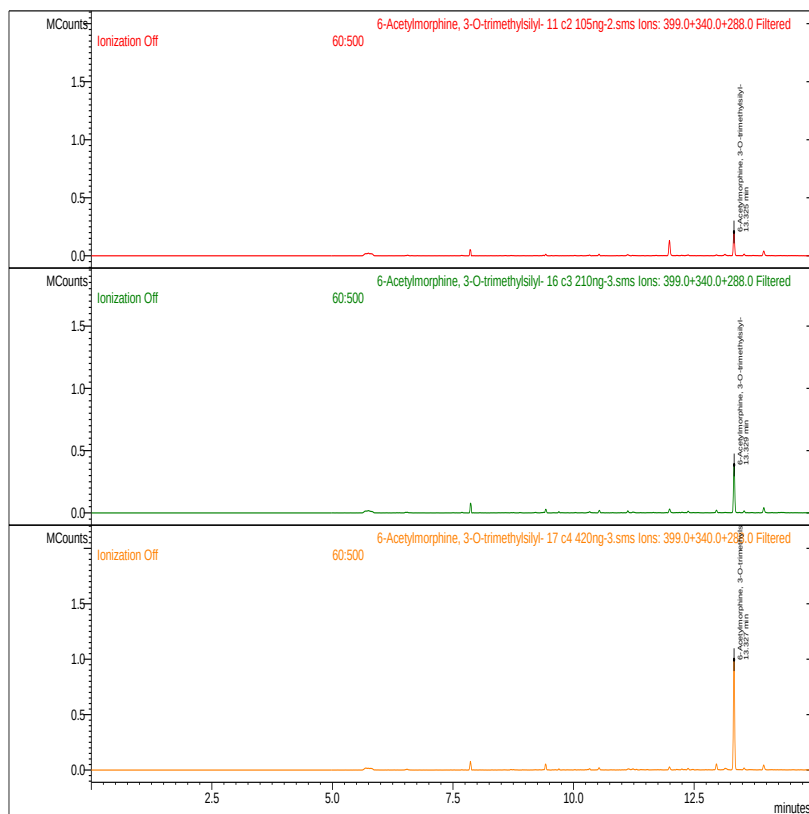


Fig. 9 :	Campione urinario 6-Monoacetilmorfina
	R.T. 13.32 6-MONOACETILMORFINA

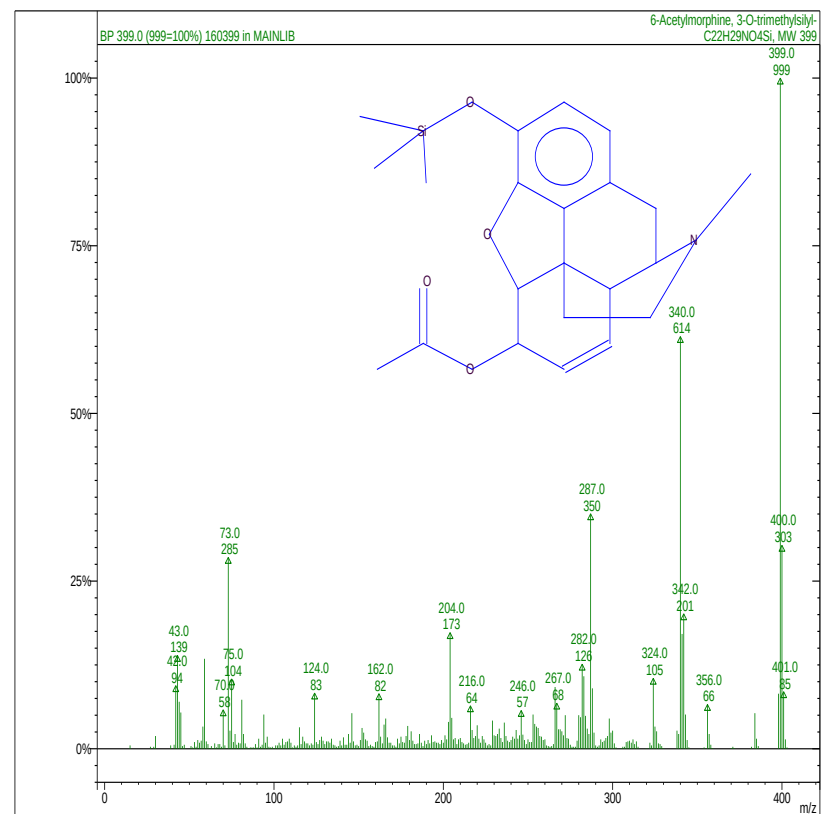


Fig. 10 :	Spettro di Massa 6-Monoacetilmorfina
	IONI MOLECOLARI: 399 – 340 - 288

Oppiacei urinari

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento GC-MS)

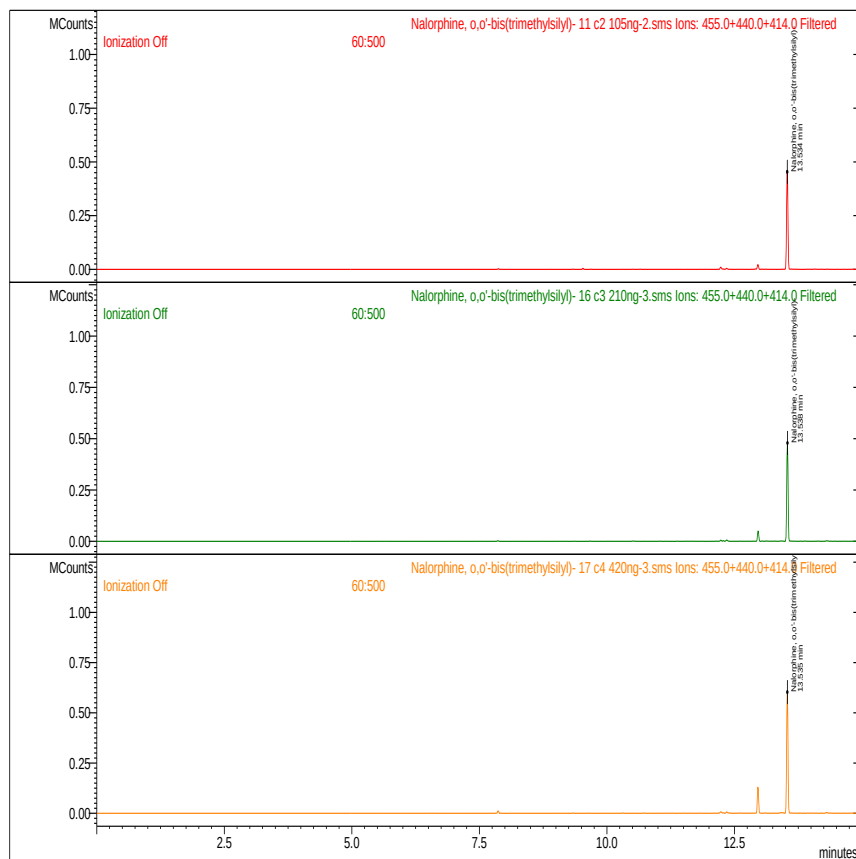


Fig. 11 : *Campioni urinari con Standard Interno*

R.T. 13.52 STANDARD INTERNO

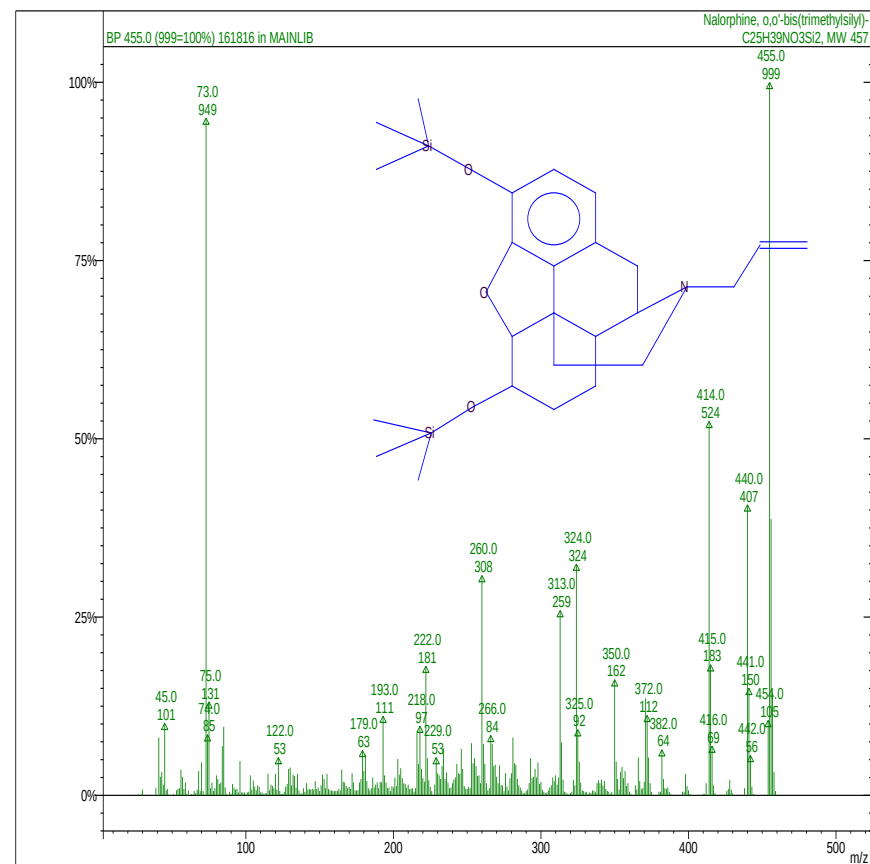


Fig. 12 : *Spettro di Massa Standard Interno*

IONI MOLECOLARI: 455 – 440 - 414