

**BENZOILECGONINA (Metabolita della Cocaina) - COCAETILENE - COCAINA urinarie
in GC-MS – Cod. GC46010**

Metodo di conferma GC-MS

INTRODUZIONE

La Cocaina, sostanza d'abuso psicostimolante, è un alcaloide che si ottiene dalle foglie della coca (*Erythroxylum Coca*), pianta originaria del sud America, per estrazione di queste con idrossido di calcio o ammoniaca. All'interno dell'organismo, la cocaina viene rapidamente idrolizzata a Benzoilecgonina. Questo metabolita viene escreto nell'urina e la sua determinazione in questo liquido biologico è prova di assunzione di cocaina. Le metodiche di screening misurano, attraverso una reazione antigene-anticorpo, la Benzoilecgonina.

Poiché queste metodologie possono dare falsi risultati 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 = 300 ng/ml) è necessaria un'analisi di conferma, generalmente con tecnica cromatografica sia gassosa che liquida entrambe accoppiate con un rivelatore in spettrometria di massa.

Inoltre nei liquidi biologici dei soggetti assuntori sia di cocaina che di alcol è possibile determinare il metabolita cocaetilene.

Il presente metodo consente di determinare sia la cocaina, ove eventualmente presente, la benzoilecgonina e la cocaetilene urinari previa estrazione delle sostanze dalla matrice urinaria in colonne di estrazione in fase solida e successiva determinazione in gas cromatografia-spettrometria di massa.

 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° 022	Benzoilecgonina – Cocaetilene - Cocaina urinarie in GC/MS	08/2024
--------	---	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare la **Benzoilecgonina**, il maggiore metabolita della Cocaina, la **Cocaetilene** e la **Cocaina** previa estrazione in fase solida (Solid Phase Extraction, SPE) e lettura in Gas Cromatografia – Spettrometria di Massa (GC-MS).

Il metodo è stato validato secondo i criteri stabiliti a livello internazionale dalla FDA e dall'ICH.

ANALITA	(Coefficiente di correlazione R2) + deviazione standard	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
BEG	0,9979 ± 0,0014	5	20
COCAETILENE	0,9977 ± 0,0026	8	20
COCAINA	0,9986 ± 0,0024	6	20

ANALITA	Accuratezza intra-giorno			Precisione inter-giorno			Accuratezza inter-giorno		
	(Errore %)			(CV%)			(Errore %)		
	Calibratore			Calibratore			Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore
BEG									
COCAETILENE	8,6	11,66	6,75	20,21	15,07	13,05	15	12,46	10,87
COCAINA	10	8,28	7,11	15,95	9,35	9,56	11,5	10,09	10,58
	17,4	5,73	5,9	25,91	11,6	13,19	21,2	10,49	12,87

ANALITA	Recupero (%)		
	Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore
BEG			
COCAETILENE	78,22	84,29	95,07
COCAINA	65,14	91,19	105,17
	83,46	92,99	104,05

La tabella sottostante riporta, per ogni analita, le concentrazioni corrispondenti ai Calibratori i cui valori Inferiore, Medio e Superiore citati sopra fanno riferimento.

ANALITA	Concentrazioni ng/ml		
	Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore
BEG			
COCAETILENE	75,00	200,00	500,00
COCAINA	75,00	200,00	500,00
	75,00	200,00	500,00

Range Dinamico del Metodo Benzoilecgonina, Cocaina, Cocaetilene:

20 - 1000 ng/ml

Valore di cut-off Benzoilecgonina, Cocaina, Cocaetilene:

100 ng/ml

Rif. Gazzetta Ufficiale n°236 – 8 ott 2008

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 e Lavaggio 2, **1 x 200 ml**

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

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

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

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

Reagente F – Soluzione Diluente, **1 x 5 ml**

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

Vedi Avvertenze

Reagente I – Soluzione Test Cocaetilene, **1 x 0,5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente K – Soluzione Test Cocaina, **1 x 0,5 ml**

Vedi Avvertenze

Reagente J – Soluzione Standard interno, **1 x 200 µl**

Vedi Avvertenze

Calibratore liofilo urinario - Livello 1, 2 x 5 ml

Codice CC46016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario - Livello 2, 2 x 5 ml

Codice CC46016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario - Livello 3, 2 x 5 ml

Codice CC46016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario - Livello 4, 2 x 5 ml

Codice CC46016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario - Livello 5, 2 x 5 ml

Codice CC46016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Reagente M – Soluzione Derivatizzante, **3 x 1 ml (3 ampolle da 1 ml)**

Vedi Avvertenze - Per il prelievo del Reagente M, utilizzare la siringa Hamilton da 50 µl Cod. ZRE24533

Colonne per estrazione SPE, 50 pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento GC-MS
Computer gestionale
Autocampionatore

Dotazione opzionale :

Modalità di prelievo urinario :

Prelevare 10 ml urina

NB: Qualora l'analisi non venga immediatamente eseguita, l'urina, previamente aliquotata nel rispetto della catena di custodia, deve essere conservata a -20°C. Il tempo di conservazione a -20°C va verificato **da parte del laboratorio** con opportune prove di stabilità su differenti aliquote di uno stesso campione urinario arricchito con la sostanza d'abuso.

La letteratura internazionale riporta che le principali sostanze d'abuso non subiscono una degradazione statisticamente significativa nell'arco dei 3-6 mesi, se mantenute a condizioni controllate a -20°C.

PROCEDURA PREANALITICA :

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

- 350 µl di **Reagente F** – Sol. Diluente
- 50 µl di **Reagente H** – Soluzione Test Benzoilecgonina
- 50 µl di **Reagente I** – Soluzione Test Cocaetilene
- 50 µl di **Reagente K** – Soluzione Test Cocaina

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Al vortex per 20 secondi

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 50 µl di **Reagente M** - Soluzione Derivatizzante utilizzando l'apposita siringa Hamilton da 50 µl (cod. ZRE24533)

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Al vortex per 20 secondi

FASE 4: Porre in stufa a 70 °C per 20 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

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

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 1 µl della soluzione appena preparata in GC per identificare il tempo di ritenzione e lo spettro di massa sia per la Benzoilecgonina che per la Cocaetilene che per la Cocaina. Essi devono essere simili a quelli riportati nelle Figure 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 : Condizionamento delle colonnine SPE

Preparare un numero di colonnine corrispondenti alla somma dei calibratori, controlli e campioni incogniti

- Aggiungere 1,5 ml di **Reagente A** – Soluzione di Condizionamento 1 e Lavaggio 2
Far passare in colonnina e scartare l'eluato
- Aggiungere 2 ml di **Reagente B** – Soluzione di Condizionamento 2
Far passare in colonnina e scartare l'eluato

FASE 2 : Preparazione dei Calibratori, Controlli e Campioni incogniti

Il reagente J è costituito da 200µl di Standard Interno e va diluito 1:100 in H₂O prima dell'utilizzo. Poiché sono necessari 20 µl per ogni campione analizzato e per ogni campione del test di validazione, bisogna calcolare il volume necessario per ogni seduta analitica e contemporaneamente diluire il reagente.

ES. per una seduta analitica con 20 campioni incogniti e 5 calibratori sono necessari 500 µl di reagente J diluito. Pertanto si prelevano 5 µl di reagente J e si diluiscono con 495 µl di H₂O. Al vortex per almeno 10 sec. La soluzione è ora pronta per l'uso.

Il reagente J non diluito e non utilizzato si richiude ermeticamente e si conserva la quantità residua in congelatore a -20°C.

Inserire in un porta provette un numero di tubi in vetro corrispondente ai 5 calibratori, 2 controlli ed n campioni incogniti. In ogni tubo inserire il volume di calibratori, controlli e campioni incogniti indicato nella tabella sottostante.

	Campione INCOGNITO	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Controllo
Campione	1000 µl						
Calibratore liofilo urinario - Livello 1		1000 µl					
Calibratore liofilo urinario – Livello 2			1000 µl				
Calibratore liofilo urinario – Livello 3				1000 µl			
Calibratore liofilo urinario – Livello 4					1000 µl		
Calibratore liofilo urinario – Livello 5						1000 µl	
Controllo							1000 µl
Reagente J– Sol. Std interno (diluito come sopra indicato)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Reagente C – Sol. Tampone	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl	2000 µl

Controllare che il pH sia $\cong 6,0$ con cartine indicatrici di pH (immergere la punta di una pipetta pasteur o di un puntale nel tubo; utilizzare una pipetta diversa per ogni tubo).

Nel caso eventuale (<1% dei campioni incogniti) che il pH non sia compreso tra 5.5 e 6.5, si possono effettuare delle correzioni con pochi µl di HCl 0.1 M o NaOH 0.1 M miscelando e ricontrollando il pH dopo ogni aggiunta.

N.B: Qualora si volesse determinare anche la cocaina, è necessario preparare la curva di calibrazione su 5 punti utilizzando gli appositi liofili (cod. CC46116) che non sono inclusi nel kit ma che sono fornibili a parte. Per la loro preparativa è sufficiente utilizzare la stessa modalità dei reagente P1, P2, P3, P4, P5 della tabella sopra riportata.

Agitare al Vortex

FASE 3 : Aggiungere i calibratori, i controlli ed i campioni incogniti, preparati nella fase 2, nelle colonnine condizionate e scaricare ad un flusso di 1 ml/ minuto (goccia a goccia) anche con l'ausilio di un vuoto moderato.

FASE 4 : Lavaggio delle colonne SPE:

- Lavare con 2 ml di Acqua di grado HPLC (non fornita nel kit)
Far passare in colonnina e scartare l'eluato
- Lavare con 2 ml di **Reagente D – Soluzione di Lavaggio 1**
Far passare in colonnina e scartare l'eluato
- Lavare con 2 ml di **Reagente A – Soluzione Condizionamento 1 e Lavaggio 2**
Far passare in colonnina, scartare l'eluato e portare a secco la colonnina SPE con un leggero flusso d'aria

FASE 5 : Eluizione **rigorosamente in provette di vetro in pyrex con tappo**

Portare a secco con un leggero flusso d'aria

- Eluire con 1 ml di **Reagente E – Soluzione Eluente**

*Raccogliere l'eluato nelle **provette di vetro pyrex** ed agitare al vortex*

FASE 6 : 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 7 : Riprendere con 50 µl di **Reagente M - Soluzione Derivatizzante** utilizzando l'apposita siringa Hamilton da 50 µl (cod. ZRE24533)

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Al vortex per 20 secondi

FASE 8: Porre in stufa a 70 °C per 20 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 9 : Trasferire tutto il campione in vials con riduttore di volume

N.B: l'eluato è stabile 24 h a 2-8°C

INIEZIONE :

- Iniettare 1 µl della soluzione nel GC

BENZOILECGONINA - COCAETILENE – COCAINA urinarie - Avvertenze

REAGENTE H: SOLUZIONE TEST BENZOILECGONINA

Benzoilecgonina	circa 10.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE I: SOLUZIONE TEST COCAETILENE

Cocaetilene	circa 10.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE K: SOLUZIONE TEST COCAINA

Cocaína	circa 10.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE J: SOLUZIONE STANDARD INTERNO

Atropina	1 mg/ml
Conservazione: il reagente va stoccato a – 20 °C	

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.
--

CONDIZIONI DETECTOR DI MASSA (4000) : (tali condizioni possono essere variate in funzione dello strumento utilizzato)

• Range di Massa 78 – 400 m/z • Temperatura della Massa: 180 °C; • Temperatura Transfer Line: 270 °C; • Temperatura Manifold: 80 °C • Filamento on: 3 minuti
--

CONDIZIONI DEL GAS-CROMATOGRAFO : (tali condizioni possono essere variate in funzione dello strumento utilizzato)

• Colonna VF-5ms 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm (dopo averla condizionata seguendo le indicazioni del fornitore) • Temperatura iniettore 280 °C • Rapporto di Splittaggio Inizio: ON split 20 0 min: OFF 1 min: ON split 100 3 min: ON split 20 NB: Il rapporto di splittaggio può essere variato a seconda dello strumento utilizzato • Programmata Termica: 120 °C x 3,25 minuti 120-250°C a 20 °C/min 250°C x 1 minuto, 250-300°C a 40 °C/min 300 °C x 3 minuti (corsa 15 minuti) • Flusso Gas Elio 1 ml/min

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA VF-5 MS

Seguire le prescrizioni del costruttore.

PULIZIA DELLA COLONNA VF-5 MS

Qualora le performance analitiche subiscano rilevanti modifiche (es. scarsa sensibilità o presenza di interferenti nei cromatogrammi), è necessario effettuare la pulizia della colonna come riportato secondo le indicazioni del fornitore.

LAVAGGIO DELL'AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa prima di ogni iniezione con ACETONE.

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
CC46016	Calibratore urinario per Benzoilecgonina e Cocaetilene	5 x 2 x 5 ml
CC46116	Calibratore urinario per Cocaina	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 per EDDP, 6-MAM e Cocaina urinarie – 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

Benzoilecgonina (metabolita della cocaina) – Cocaetilene - Cocaina urinarie
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento in GC-MS)

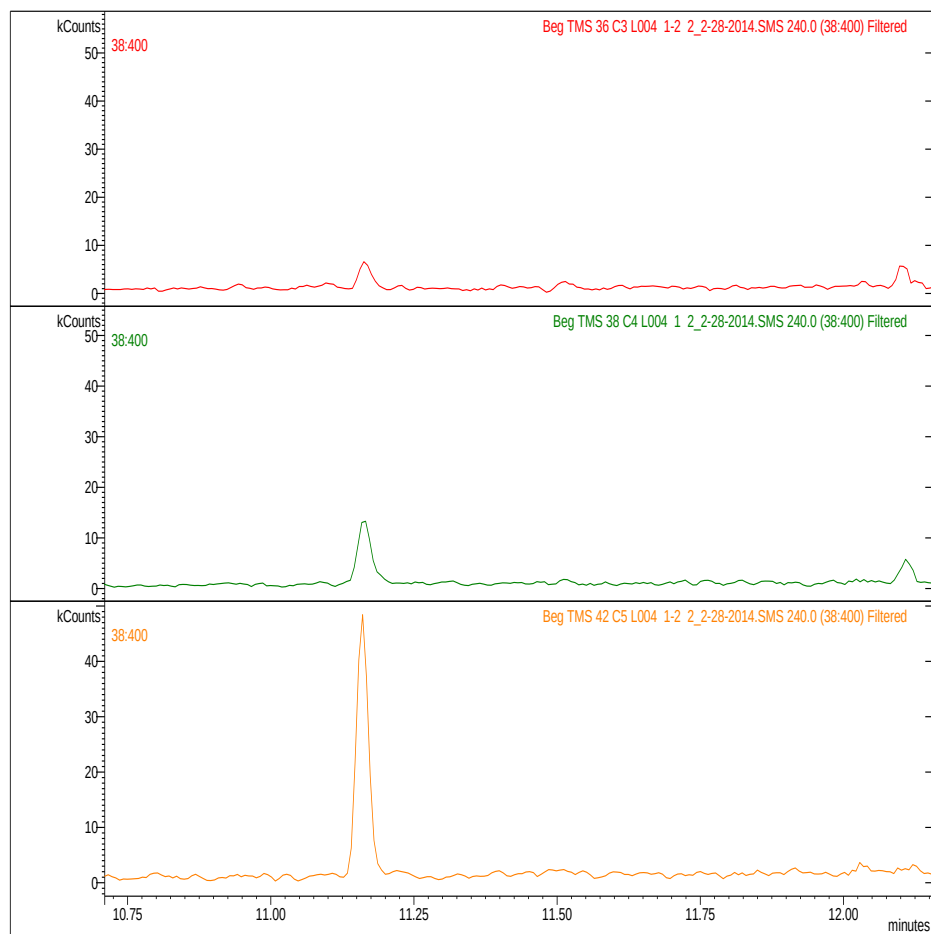


Fig. 1 :	Campioni urinari Benzoilecgonina
	R.T. 11.17 Benzoilecgonina 50 – 100 – 200 ng/ml

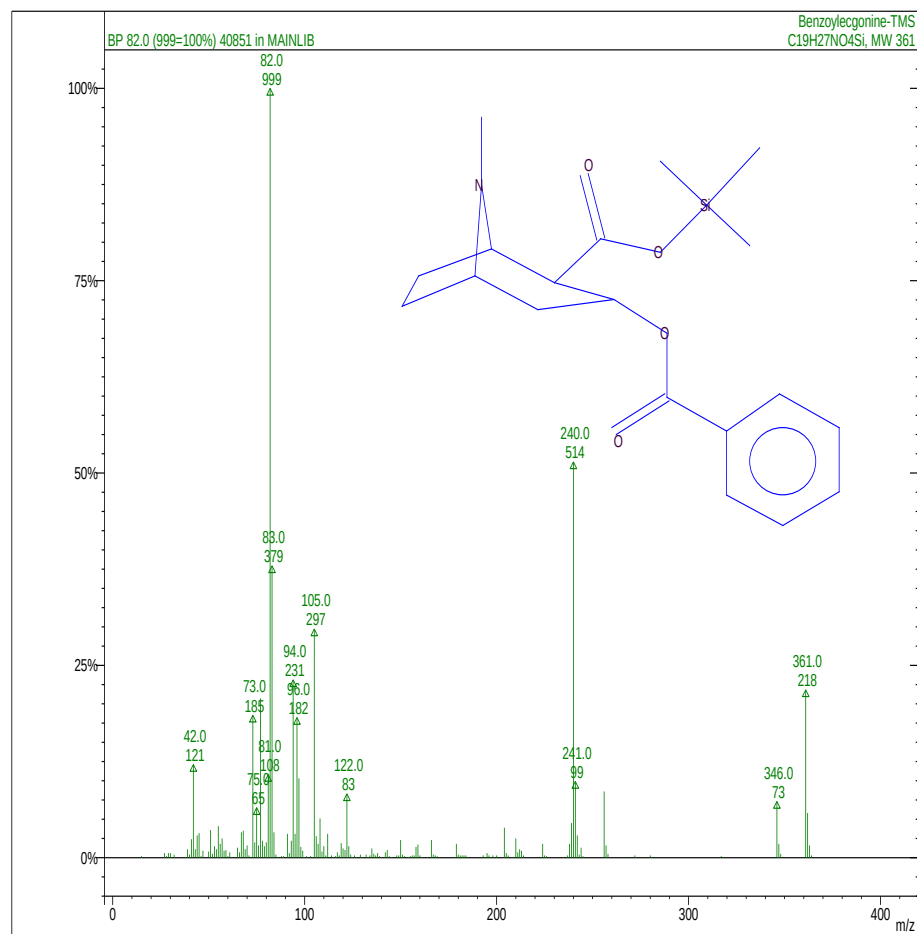


Fig. 2 :	Spettro di Campioni urinari Benzoilecgonina
	IONI MOLECOLARI : 82 - 240 - 361

Benzoilecgonina (metabolita della cocaina) – Cocaetilene - Cocaina urinarie
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento in GC-MS)

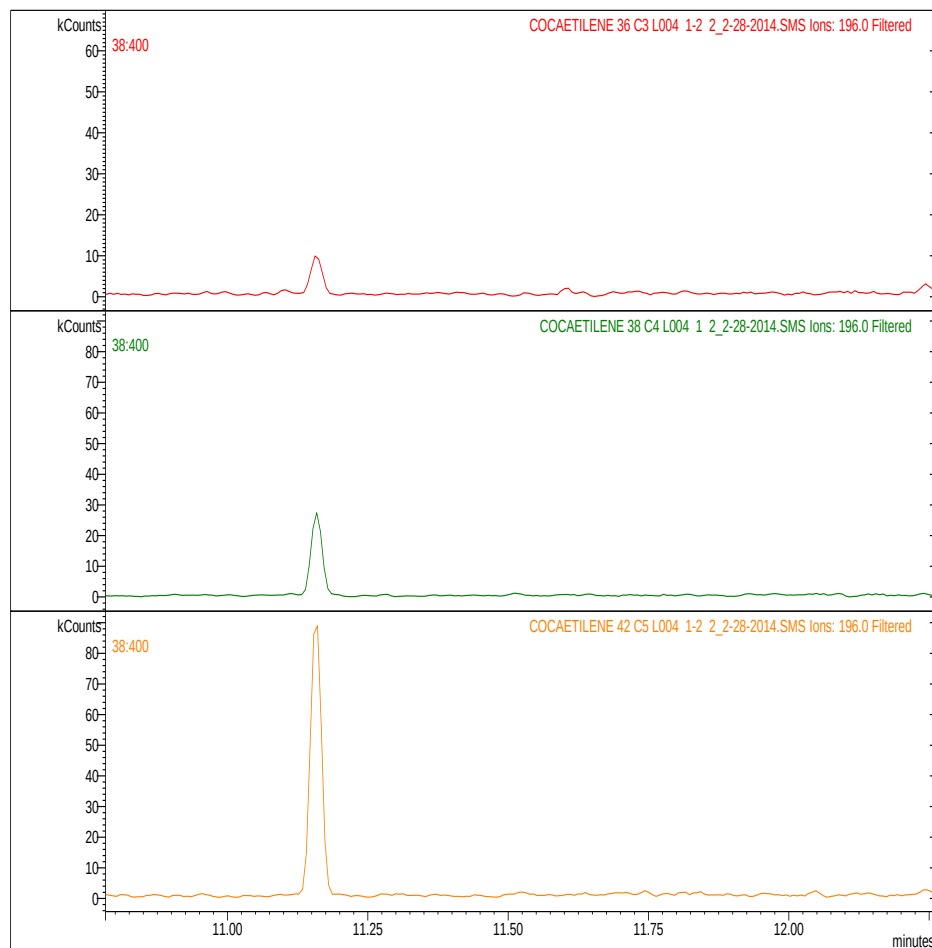


Fig. 3 :	Campioni urinari Cocaetilene
	R.T. 11.16 Cocaetilene 50 – 100 – 200 ng/ml

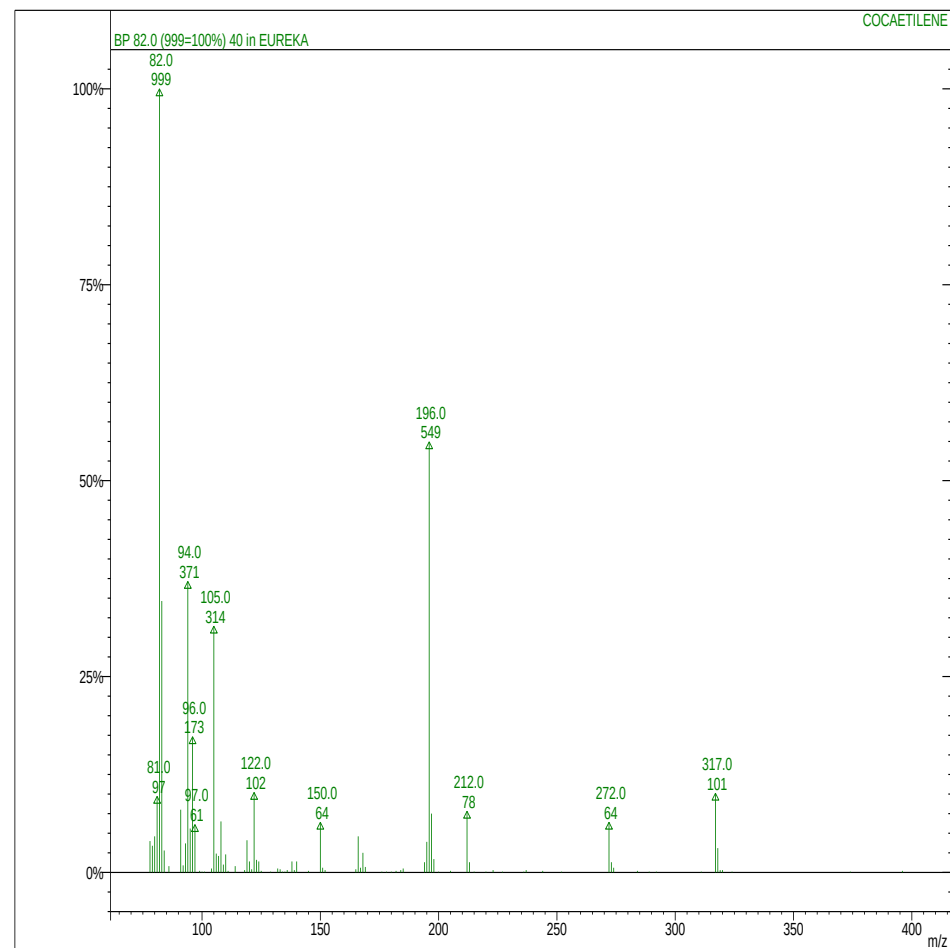


Fig. 4 :	Spettro di Campioni urinari Cocaetilene
	IONI MOLECOLARI : 82 - 94 - 196

Benzoilecgonina (metabolita della cocaina) – Cocaetilene - Cocaina urinarie
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento in GC-MS)

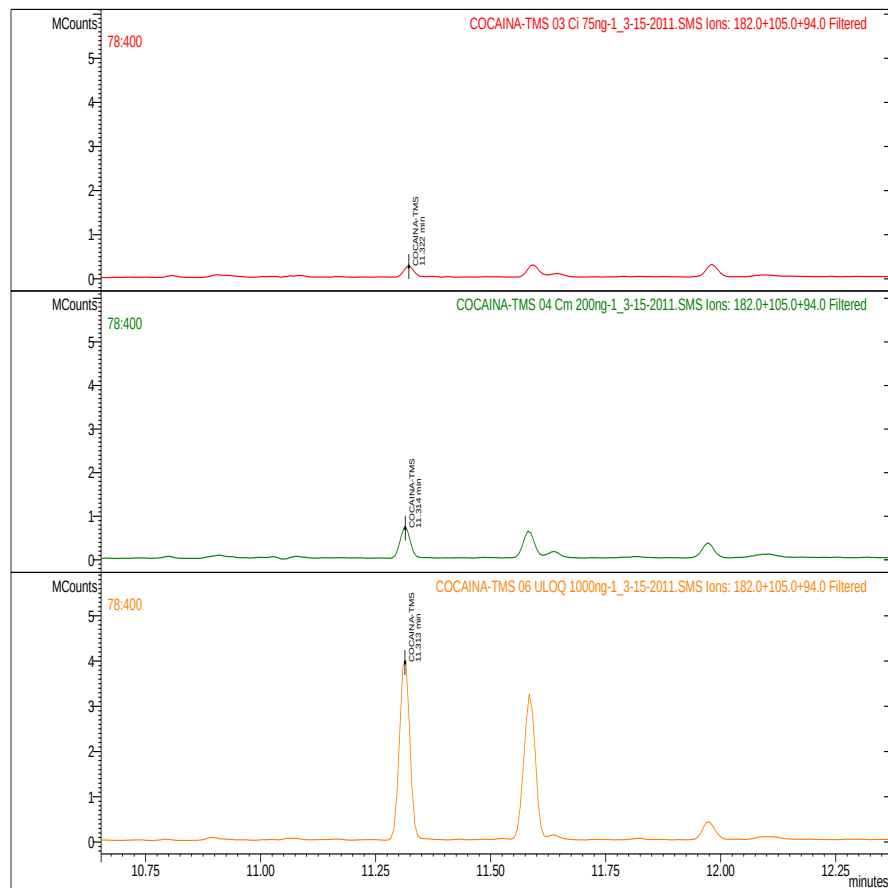


Fig. 5 :	Campioni urinari Cocaina
	R.T. 11.30 Cocaina 75 –200 – 1000 ng/ml

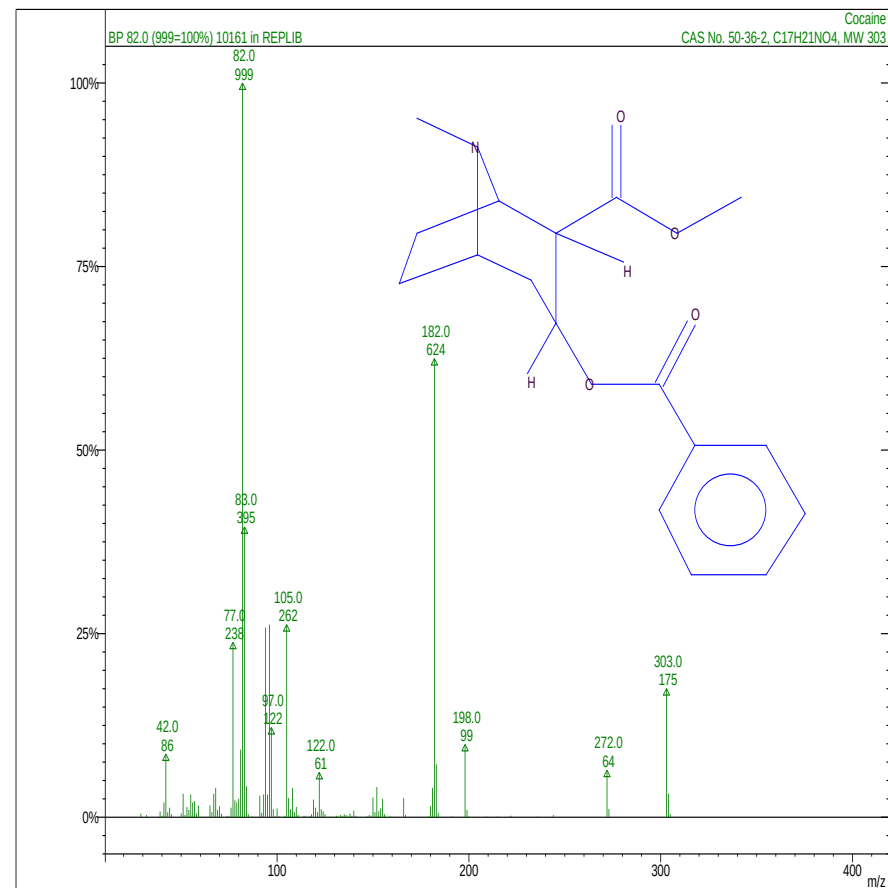


Fig. 6 :	Spettro di Campioni urinari Cocaina
	IONI MOLECOLARI : 82 - 182 - 94

Benzoilecgonina (metabolita della cocaina) – Cocaetilene - Cocaina urinarie
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento in GC-MS)

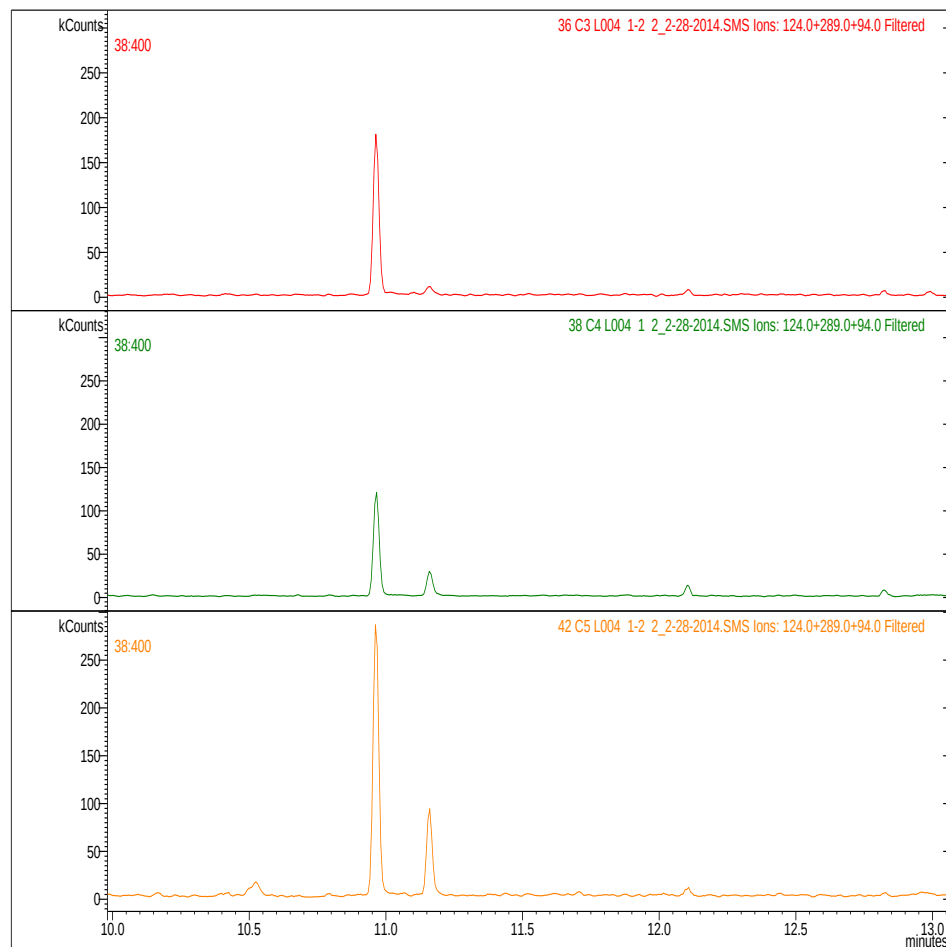


Fig. 7 :	Campioni urinari Standard Interno
	R.T. 10.90 STANDARD INTERNO

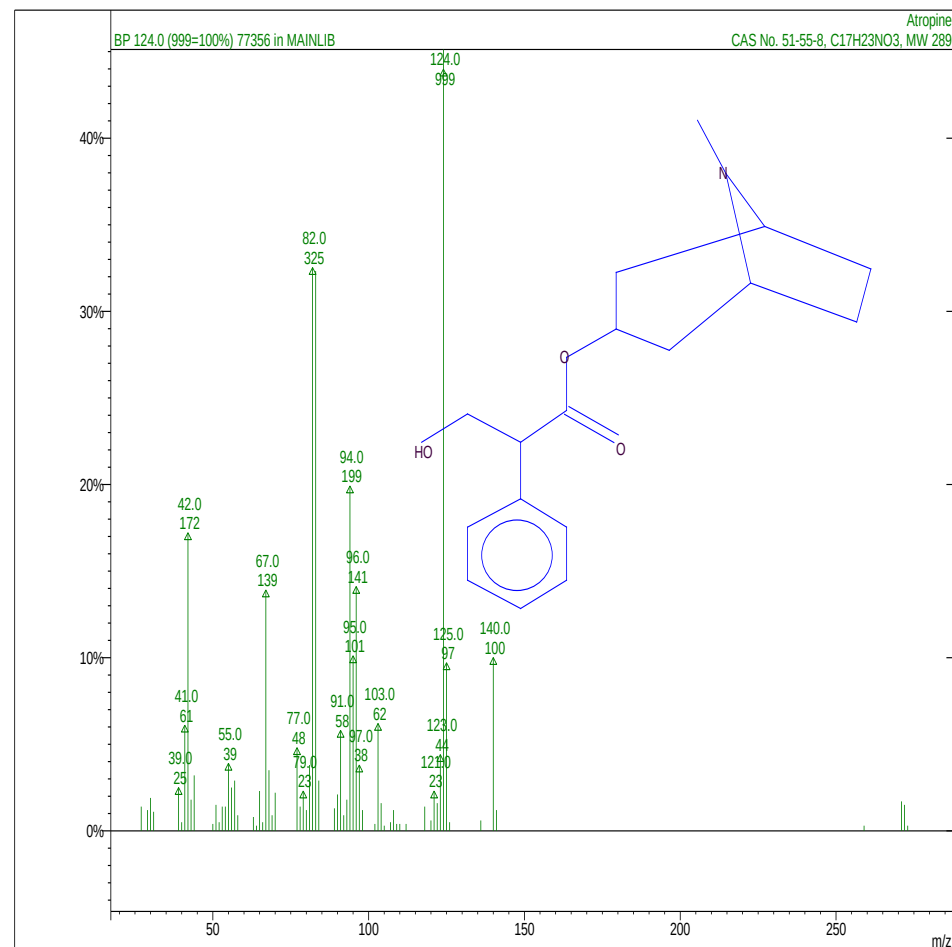


Fig. 6 :	Spettro di Massa dello Standard Interno
	IONI MOLECOLARI : 124 – 94 - 289