

Δ^9 - TETRAIDROCANNABINOLO-COOH urinario in GC-MS – Cod. GC47010

Metodo di conferma in GC-MS

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 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° 017	THC urinario in GC/MS	08/2024
--------	-----------------------	---------

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 GC-MS.

Recupero del Metodo : > 90 %

Sensibilità del Metodo : 2 ng/ml

Valore di cut-off: 15 ng/ml
Rif. Procedure applicative del procedimento n.99/cu 30 ottobre 2007

Range dinamico del Metodo : 2 – 2.000 ng/ml

LOD: 1 ng/ml

LOQ: 3 ng/ml

Contenuto della Confezione (50 test): Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C.

Reagente A – Reagente di Idrolisi, **1 x 20 ml**

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

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

Reagente D – Soluzione Lavaggio, **1 x 150 ml**

Reagente E – Soluzione di Eluizione, **1 x 25 ml**

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

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

Reagente H – Soluzione Standard Interno, **1 x 200 µl**

Calibratore liofilo urinario – Livello 1, 2 x 10 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 2, 2 x 10 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 3, 2 x 10 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 4, 2 x 10 ml

Calibratore liofilo urinario – Livello 5, 2 x 10 ml

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

Colonne di Clean-up, 50 pz

Vedi Avvertenze

Da diluire 1:100 in H₂O prima dell'uso

Codice CC47016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC47016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC47016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC47016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Codice CC47016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Vedi Avvertenze

Dotazione strumentale minima richiesta : Strumento GC/MS
Computer gestionale

Dotazione opzionale : Autocampionatore

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:

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

- 450 µl di **Reagente F – Soluzione Diluente**
- 50 µl di **Reagente G – 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 2 µl di questa soluzione in GC per identificare il tempo di ritenzione e lo spettro di massa del Δ^9 - Tetraidrocannabinolo-cooh che devono essere simili a quelli riportati nelle figure sottostanti 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

N.B: Diluire il **Reagente H – Sol. Standard interno** 1:100 con H₂O, preparando il volume sufficiente per coprire i campioni della seduta analitica.

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

Fare una Curva di Calibrazione su 5 punti:

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controlli
Calibratore – Livello 1	3000 µl						
Calibratore – Livello 2		3000 µl					
Calibratore – Livello 3			3000 µl				
Calibratore – Livello 4				3000 µl			
Calibratore – Livello 5					3000 µl		
Campione						3000 µl	
Controlli							3000 µl
Reagente H – Sol. Std interno (diluito 1:100 in Acqua grado HPLC)	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 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 ($5 < \text{pH} < 7$) 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 **rigorosamente in provette di vetro con tappo in pyrex**

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

FASE 8 : Portare a secco l'eluato con l'ausilio di un flusso elio o azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere $< 40\text{ }^{\circ}\text{C}$)

FASE 9 : Riprendere con 50 µl di **Reagente M - Soluzione Derivatizzante**

Al vortex per 20 secondi

FASE 10: Porre in stufa a 70 °C per 20 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

FASE 11 : Trasferire tutto il campione in vials con riduttore di volume

INIEZIONE :

- Iniettare 2 µl della soluzione nel GC

Δ^9 - TETRAIDROCANNABINOLO-COOH urinario- AVVERTENZE

REAGENTE G: SOLUZIONE TEST

Δ^9- Tetraidrocannabinolo-COOH	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 μ m (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 + 20 °C/min fino a 300 °C x 1.75 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
CC47016	Calibratore per THC urinario	5 x 2 x 10 ml
CC47019	Controllo per THC urinario – Livelli 1 e 2	2 x 6 x 10 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

Δ^9 - TETRAIDROCANNABINOLO-COOH
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento in GC-MS)

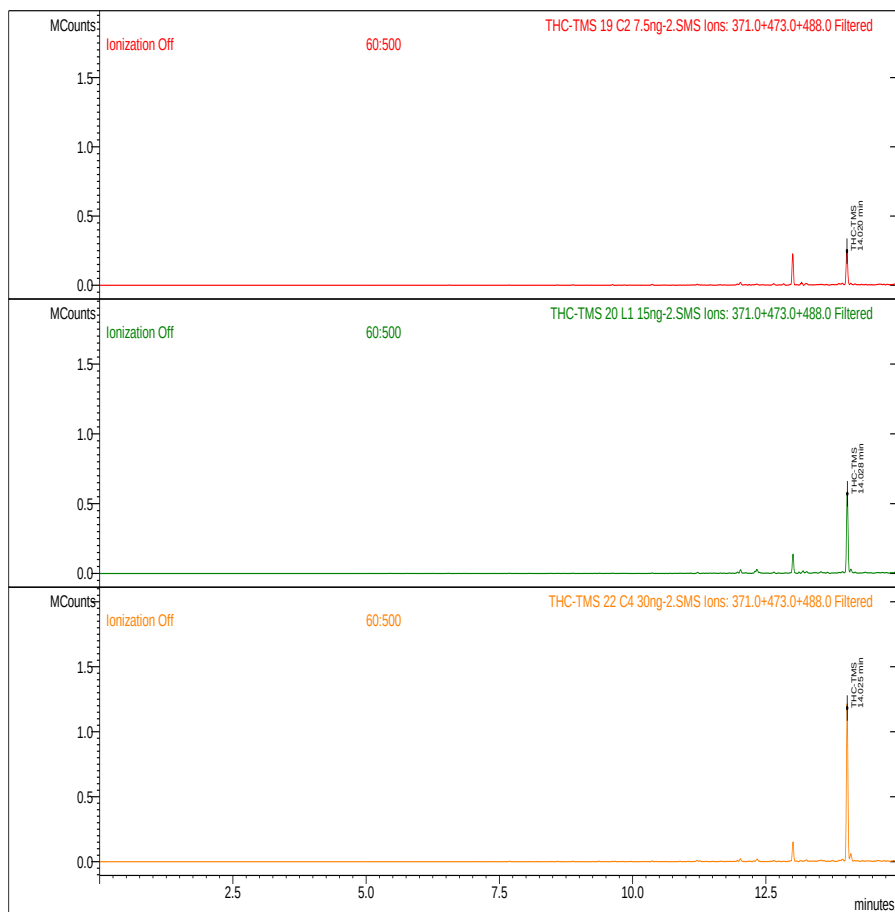


Fig. 1 :	Campioni urinari
	R.T. 14.00 THC 7,5 – 15 – 30 ng/ml

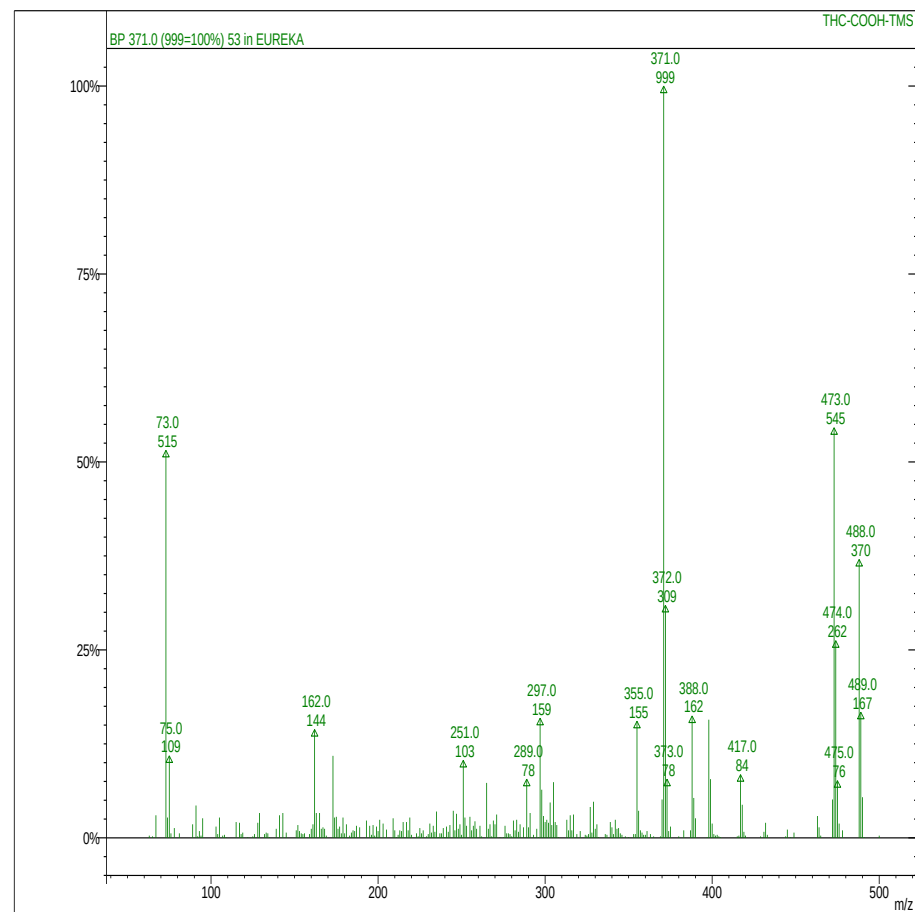


Fig. 2 :	Spettro di Massa del THC
	IONI MOLECOLARI : 371 – 473 - 488

Δ^9 - TETRAIDROCANNABINOLO-COOH
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento in GC-MS)

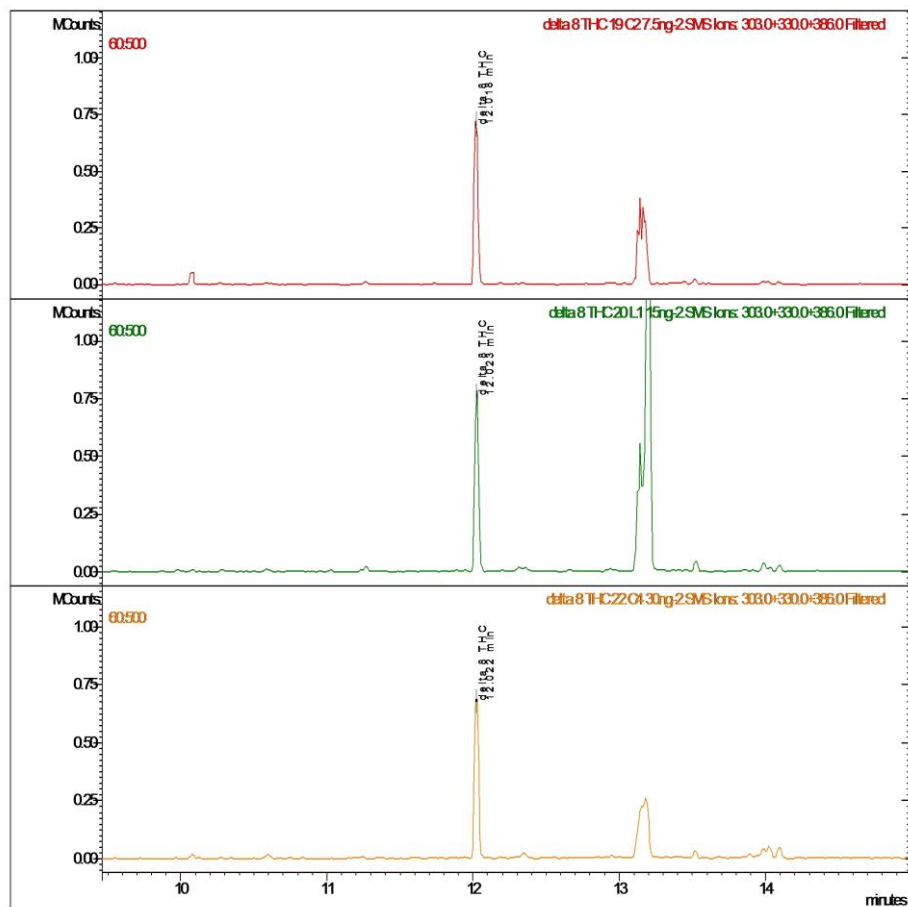


Fig. 3 : *Campioni urinari con Standard Interno*

R.T. 12.00 Standard Interno

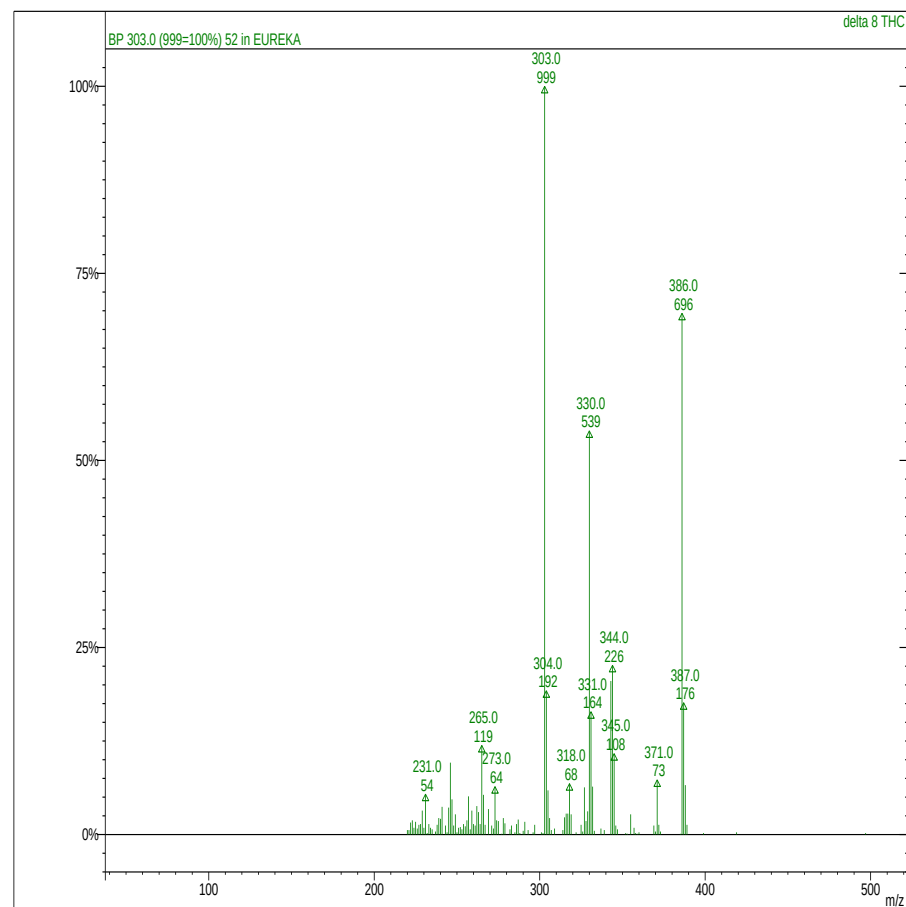


Fig. 4 : *Spettro di Massa dello Standard Interno*

IONI MOLECOLARI : 303 – 330 – 386