

**CANNABINOIDI su sangue intero in GC-MS – Cod. GC90010**

**Metodo di conferma in GC-MS**

**INTRODUZIONE**

La determinazione delle sostanze d'abuso nei liquidi biologici viene generalmente effettuata in prima istanza usando tecniche immunometriche che si avvalgono della reazione antigene-Anticorpo e successiva marcatura con vari reagenti. Queste metodologie sono considerate di screening. 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 di Massa (MS).

Il presente metodo consente di determinare il Delta-9-THC, il Delta-9-THC-COOH e l'11-OH-THC con 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](mailto:eureka-support@sentinel.it)  
[www.eurekakit.com](http://www.eurekakit.com)



CE

|        |                                        |         |
|--------|----------------------------------------|---------|
| N° 005 | Cannabinoidi su sangue intero in GC/MS | 08/2024 |
|--------|----------------------------------------|---------|

## **CARATTERISTICHE DEL KIT**

### **Principio del metodo :**

Il presente metodo consente di determinare i Cannabinoidi previa estrazione in fase liquida e lettura in GC-MS.

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

### **Recupero del Metodo :**

>90 %

### **Sensibilità analitica (LLOD) :**

0,008 ng/ml

### **Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :**

0,025 ng/ml

### **Linearità :**

0,025 – 2.500 ng/ml

| ANALITA          | Accuratezza intra-giorno |               |                | Precisione intra-giorno |               |                | Accuratezza inter-giorno |               |                |
|------------------|--------------------------|---------------|----------------|-------------------------|---------------|----------------|--------------------------|---------------|----------------|
|                  | (Errore %)               |               |                | (CV%)                   |               |                | (Errore %)               |               |                |
|                  | Calibratore              |               |                | Calibratore             |               |                | Calibratore              |               |                |
|                  | Inferiore                | Medio         | Superiore      | Inferiore               | Medio         | Superiore      | Inferiore                | Medio         | Superiore      |
|                  | Ci 1,5<br>ng/ml          | Cm 5<br>ng/ml | Cs 20<br>ng/ml | Ci 1,5<br>ng/ml         | Cm 5<br>ng/ml | Cs 20<br>ng/ml | Ci 1,5<br>ng/ml          | Cm 5<br>ng/ml | Cs 20<br>ng/ml |
| Delta-9-THC      | 4,6                      | 10,5          | 4,5            | 4,6                     | 1,7           | 2,7            | 7,3                      | 12,7          | 6,3            |
| 11-OH-THC        | 7,5                      | 5,0           | 4,8            | 10,4                    | 2,1           | 2,8            | 10,4                     | 6,8           | 8,3            |
| Delta-9-THC-COOH | 3,1                      | 5,3           | 4,9            | 1,9                     | 3,6           | 3,8            | 8,5                      | 7,3           | 7,3            |

| ANALITA          | Recupero (%) |       |           |
|------------------|--------------|-------|-----------|
|                  | Calibratore  |       |           |
|                  | Inferiore    | Medio | Superiore |
|                  |              |       |           |
| Delta-9-THC      | 90,9         | 96,8  | 89,2      |
| 11-OH-THC        | 80,1         | 94,5  | 92,8      |
| Delta-9-THC-COOH | 80,5         | 84,1  | 84,9      |

| ANALITA          | (Coefficiente di correlazione R <sup>2</sup> ) ± deviazione standard | LOD (ng/ml) | LOQ (ng/ml) |
|------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| Delta-9-THC      | 0,9992 ± 0,0007                                                      | 0,16        | 0,5         |
| 11-OH-THC        | 0,9991 ± 0,0006                                                      | 0,16        | 0,5         |
| Delta-9-THC-COOH | 0,9996 ± 0,0002                                                      | 0,16        | 0,5         |

Concentrazioni di sostanze in urina e sangue che definiscono i **REQUISITI MINIMI DI PRESTAZIONE** per l'analisi di conferma, a scopo tossicologico-forense, mediante tecniche cromatografiche abbinate alla spettrometria di massa.

| Classe di sostanze o sostanza                      | Il metodo deve essere in grado di confermare (ng/ml) |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Oppiacei</b>                                    |                                                      |
| <i>morfina totale*</i>                             | 2                                                    |
| <i>codeina totale*</i>                             | 2                                                    |
| <i>6-acetilmorfina</i>                             | 2                                                    |
| <b>Cocaina</b>                                     |                                                      |
| <i>cocaina</i>                                     | 2                                                    |
| <i>benzoilecgonina</i>                             | 2                                                    |
| <i>cocaetilene</i>                                 | 2                                                    |
| <i>nor-cocaina</i>                                 | 2                                                    |
| <b>Amfetamina e congeneri</b>                      |                                                      |
| <i>amfetamina</i>                                  | 2                                                    |
| <i>metamfetamina</i>                               | 2                                                    |
| <b>3,4-Metilendirossimetamfetamina e congeneri</b> |                                                      |
| <i>MDMA</i>                                        | 2                                                    |
| <i>MDA</i>                                         | 2                                                    |
| <i>MDEA</i>                                        | 2                                                    |
| <i>MBDB</i>                                        | 2                                                    |
| <b>Metadone</b>                                    |                                                      |
| <i>metadone</i>                                    | 2                                                    |
| <i>EDDP</i>                                        | 2                                                    |
| <b>Cannabinoidi</b>                                |                                                      |
| <i>THC</i>                                         | 1                                                    |
| <i>11-OH-THC</i>                                   | 0,1                                                  |
| <i>THC-COOH</i>                                    | 2                                                    |
| <b>Buprenorfina</b>                                |                                                      |
| <i>buprenorfina totale*</i>                        | 2                                                    |
| <i>norbuprenorfina totale*</i>                     | 2                                                    |

\* il valore è riferito al campione sottoposto a idrolisi.

Linee Guida per Strutture dotate di Laboratori per gli accertamenti di Sostanze d'Abuso con Finalità Tossicologico-Forensi e Medico-Legali  
Revisione n. 5 del 29 maggio 2017.

**Contenuto della Confezione (50 test) :**

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

**Reagente A** – Standard Interni deuterati, **1 x 750 ul**

**Stoccare a -20°C**

**Reagente B** – Soluzione Estraeante, **1 x 300 ml**

**Reagente C** – Soluzione Stabilizzante, **1 x 13 ml**

**Reagente D** – Soluzione Derivatizzante, **4 x 1000 ul**

**Vedi Avvertenze**

**Reagente E** – Soluzione Test THC, **1 x 500 ul**

**Vedi Avvertenze**

**Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 0, 3 x 1 ml**

**Codice LC89016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)**

**Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 1, 3 x 1 ml**

**Codice LC89016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)**

**Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 2, 3 x 1 ml**

**Codice LC89016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)**

**Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 3, 3 x 1 ml**

**Codice LC89016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)**

**Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 4, 3 x 1 ml**

**Codice LC89016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)**

**Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 5, 3 x 1 ml**

**Codice LC89016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)**

**Calibratore liofilo su sangue intero – Livello 6, 3 x 1 ml**

**Codice LC89016 (confezionato a parte - vedi scheda tecnica)**

**Dotazione strumentale minima richiesta :**

Strumento GC-MS  
Computer gestionale

**Dotazione opzionale :**

Autocampionatore

**Modalità di prelievo ematico :**

Provetta con anticoagulante EDTA  
**Stabile per circa 4 settimane a 2 – 8 °C o 4 mesi a -20°C.**

## **PROCEDURA PREANALITICA**

**FASE 1** : In una provetta in pyrex con tappo a vite prelevare 50 µl di **Reagente E – Soluzione Test THC**

**Conservazione Test: una volta aperta la vial prelevarne il volume necessario, richiuderla e conservarla a -20 °C.**

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

**FASE 3** : Aggiungere nella provetta 40 µl di **Reagente D – Soluzione Derivatizzante**

**Chiudere ermeticamente la provetta**

**Porre al vortex per 30 secondi**

**FASE 4** : Porre in stufa a 70°C per 30 minuti

**Raffreddare a temperatura ambiente**

**Aprire la provetta di vetro**

**FASE 5** : Trasferire tutto il campione in vials di vetro con riduttore di volume per auto campionatore

NOTA : Prima di iniziare la seduta analitica è consigliabile iniettare 2 µl di questa soluzione appena preparata nel Gas Cromatografo per identificare il tempo di ritenzione e lo spettro di massa di THC, OH-THC e THC-COOH che devono essere simili a quelli riportati 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**

Diluire il **Reagente A – Standard interni deuterati** 1:1 con Acqua di grado HPLC, preparando il volume sufficiente per coprire i campioni della seduta analitica. E' possibile modulare, all'occorrenza, il fattore di diluizione a seconda della sensibilità dello strumento in uso.

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

### **FASE 1** : Preparazione del Campione

Dispensare nelle provette in pyrex con tappo a vite da 10 ml in sequenza:

|                                                                      | Calibratore Lev0 | Calibratore Lev1 | Calibratore Lev2 | Calibratore Lev3 | Calibratore Lev4 | Calibratore Lev5 | Calibratore Lev6 | Controlli | Campione |
|----------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|----------|
| Calibratore Lev0                                                     | 1000 µl          |                  |                  |                  |                  |                  |                  |           |          |
| Calibratore Lev1                                                     |                  | 1000 µl          |                  |                  |                  |                  |                  |           |          |
| Calibratore Lev2                                                     |                  |                  | 1000 µl          |                  |                  |                  |                  |           |          |
| Calibratore Lev3                                                     |                  |                  |                  | 1000 µl          |                  |                  |                  |           |          |
| Calibratore Lev4                                                     |                  |                  |                  |                  | 1000 µl          |                  |                  |           |          |
| Calibratore Lev5                                                     |                  |                  |                  |                  |                  | 1000 µl          |                  |           |          |
| Calibratore Lev6                                                     |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 1000 µl          |           |          |
| Controlli                                                            |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  | 1000 µl   |          |
| Campione                                                             |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |           | 1000 µl  |
| Reagente A – Std interni deuterati (diluito 1:1 in Acqua grado HPLC) | 10 µl            | 10 µl            | 10 µl            | 10 µl            | 10 µl            | 10 µl            | 10 µl            | 10 µl     | 10 µl    |
| Reagente B – Soluzione Estraeante                                    | 5000 µl          | 5000 µl          | 5000 µl          | 5000 µl          | 5000 µl          | 5000 µl          | 5000 µl          | 5000 µl   | 5000 µl  |
| Reagente C – Soluzione Stabilizzante                                 | 250 µl           | 250 µl           | 250 µl           | 250 µl           | 250 µl           | 250 µl           | 250 µl           | 250 µl    | 250 µl   |

**Tappare la provetta e porre al Vortex per 30 sec.**

**FASE 2** : Centrifugare a 4.000 giri per 30 minuti per la separazione completa delle due fasi

**FASE 3** : Trasferire il surnatante in una provetta in **pyrex da 10 ml con tappo a vite pulita**.

**Portare a secco il solvente di estrazione con evaporatore o flusso di azoto (Temperatura massima 50°C)**

### **DERIVATIZZAZIONE DEGLI ANALITI**

**FASE 4** : Aggiungere in ogni provetta 40 µl di **Reagente D – Soluzione Derivatizzante**

**Tappare ermeticamente la provetta e porre al Vortex per 30 sec.**

**Porre in stufa a 70°C x 30 min**

**Raffreddare a temperatura ambiente**

**Aprire la provetta di vetro**

**FASE 5** : Trasferire il derivatizzato nelle vial con riduttore di volume ed iniettare 2 µl nel GC-MS

**N.B.:** Il campione è stabile 24 ore a 2-8 °C

## **CANNABINOIDI su sangue intero - Avvertenze**

### **REAGENTE E : SOLUZIONE TEST**

|                                                                                                                                                      |                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Delta-9-THC</b><br><b>Delta-9-THC-COOH</b><br><b>11-OH-THC</b>                                                                                    | Circa 10.000 ng/ml |
| <b>Conservazione:</b><br>Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C. |                    |

### **REAGENTE D: 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 Rxi-5Sil MS 30 m x 0,25 mm 0,25 um (condizionata)
- Temperatura iniettore 250 °C
- Rapporto di Splittaggio Inizio: ON split 20  
0 min: OFF  
1 min: ON split 100  
3 min: ON split 20
- Temperatura 130 °C x 2 minuti + 20 °C/min fino a 300 °C x 5 minuti (corsa 15.50 minuti)
- Flusso in colonna (Elio): 1 ml/min

### **SETTAGGIO DETECTOR DI MASSA (4000) :**

- Range di Massa 180 – 520
- Temperatura della Massa: 190 °C;
- Temperatura Transfer Line: 270 °C;
- Temperatura Manifold: 80 °C
- Filamento on: 5 minuti - Filamento off: 15.40 minuti

### **CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA Rxi-5Sil MS 30 m x 0,25 mm 0,25 um**

Seguire le prescrizioni del costruttore.  
Non condizionare la (le) colonna/e se attaccata al Detector di Massa.

### **PULIZIA DELLA COLONNA E DELLA SIRINGA**

Iniettare ACETONE prima e dopo la seduta analitica. Lavare la siringa prima dell'iniezione con ACETONE (4 volte) e dopo l'iniezione con ACETONE (4 volte).  
**CONTROLLARE LA BUONA FUNZIONALITA' DELLA SIRINGA PRIMA DI OGNI SEDUTA.**

### **ACCESSORI E CONSUMABILI**

| <b>CODICE</b>    | <b>DESCRIZIONE</b>                                                 | <b>CONFEZIONE</b> |
|------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <b>LC89016</b>   | Calibratore su sangue per Sostanze D'abuso                         | 7 x 2 x 1 ml      |
| <b>LC89019</b>   | Controllo multiparametrico per Sostanze d'abuso – Livelli 1, 2 e 3 | 3 x 5 x 1 ml      |
| <b>S29057U</b>   | Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite                    | 1 x 100 Pz        |
| <b>S29046U</b>   | Tappi per Vial standard di vetro da 2 ml                           | 1 x 100 Pz        |
| <b>S24717</b>    | Riduttori di volume per vials da 2 ml                              | 1 x 100 Pz        |
| <b>Z-1636/26</b> | Provette in Pyrex da 10 ml con tappo SWL                           | 1 x 40 Pz         |
| <b>S13623</b>    | Colonna Restek Rxi-5SILms (30 m x 0,25 mm – 0,25 um)               | 1 Pz              |
| <b>ZRE24533</b>  | Siringa Hamilton da 50 ul                                          | 1 Pz              |

## CANNABINOIDI su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

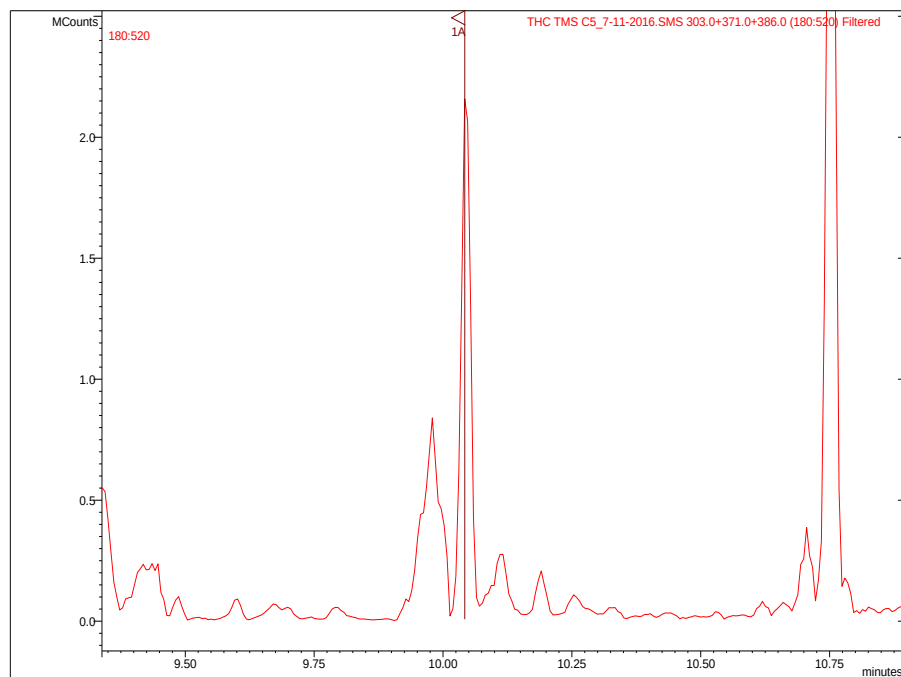


**Figura 1:** THC; RT 10.042

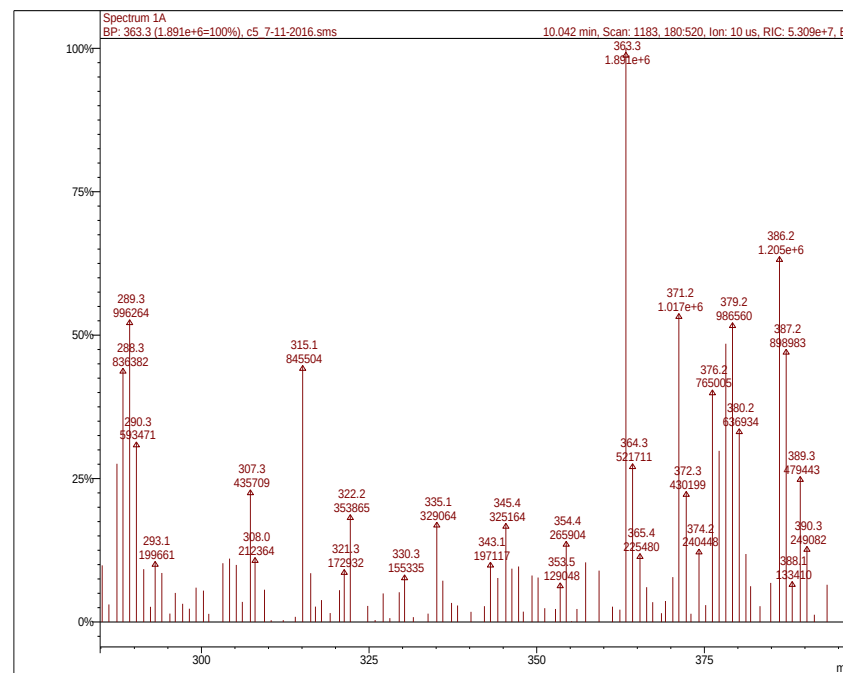


**Figura 2:** Spettro di massa THC; Ioni molecolari 303 - 371 - 386

## CANNABINOIDI su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

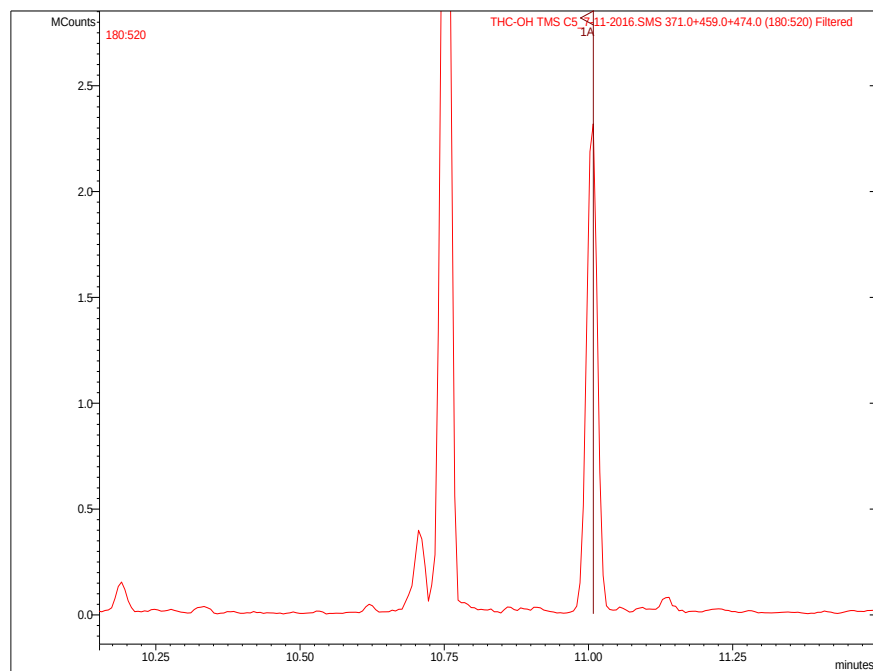


**Figura 3:** OH-THC; RT 11.008

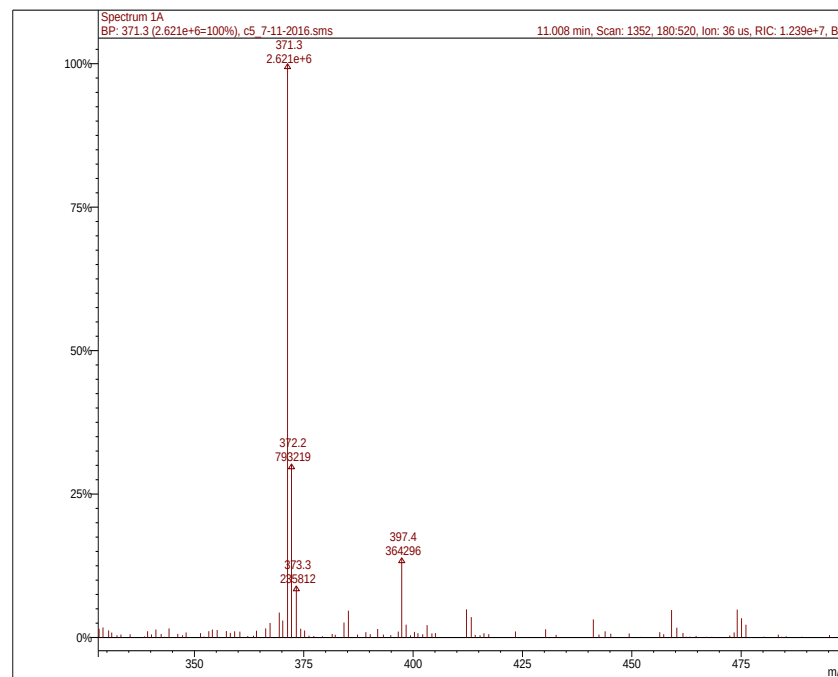


**Figura 4:** Spettro di massa OH-THC; Ioni molecolari 371 - 459 - 474

# CANNABINOIDI su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

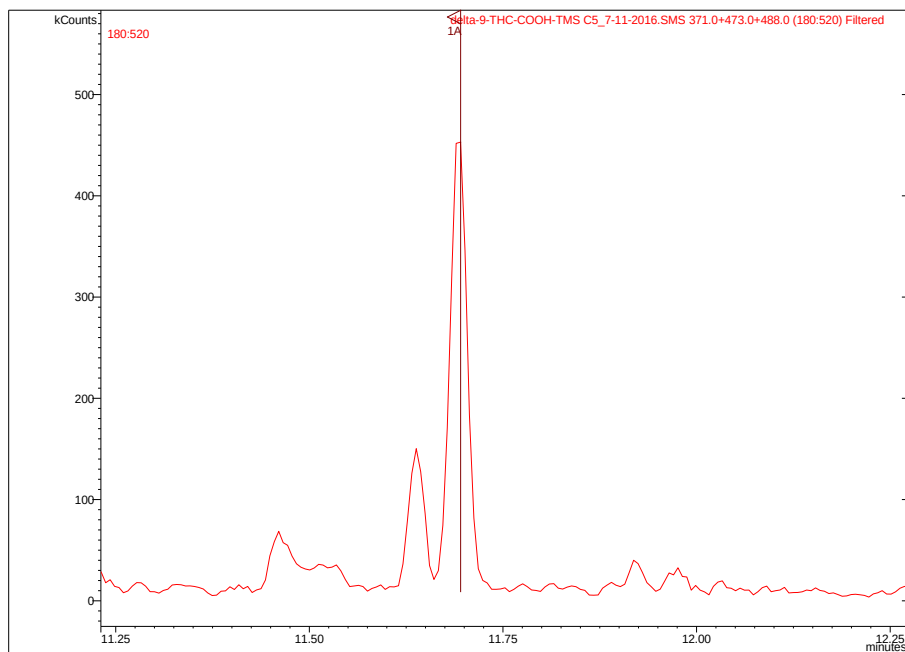


**Figura 5:** THC-COOH; RT 11.695

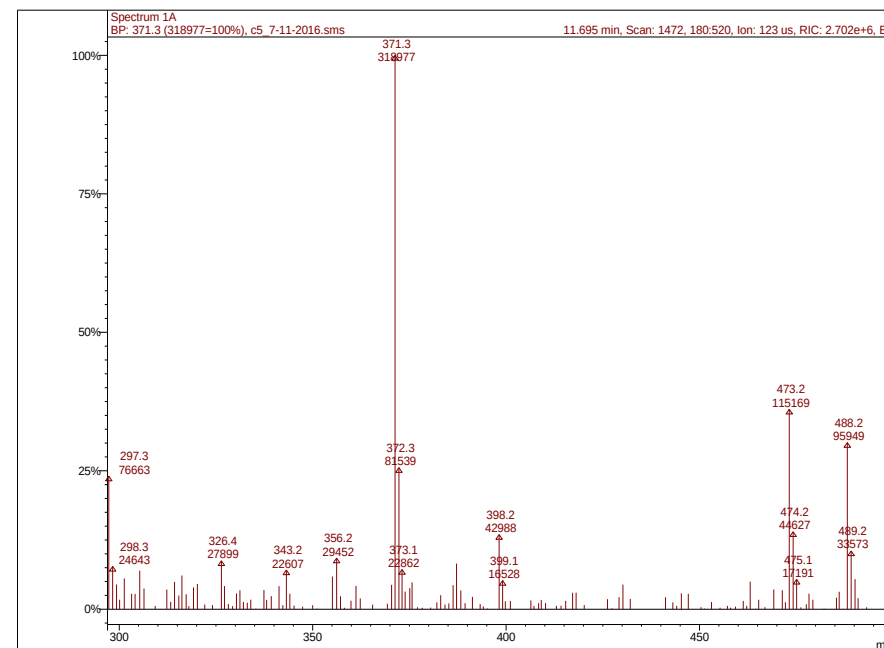


**Figura 6:** Spettro di massa THC-COOH; Ioni molecolari  
371 - 473 - 488

# CANNABINOIDI su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

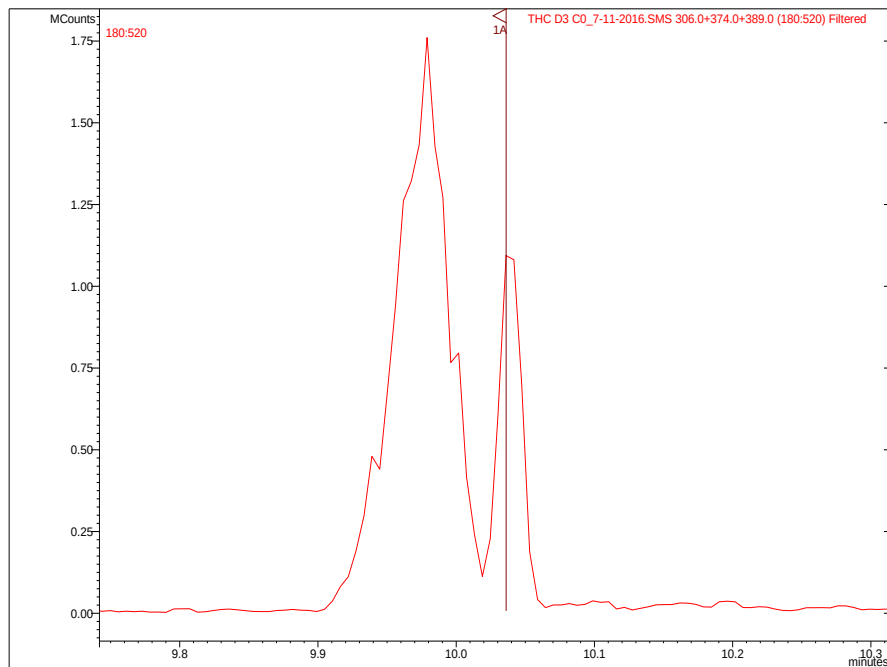


**Figura 7:** THC D3 (IS deuterato); RT 10.036

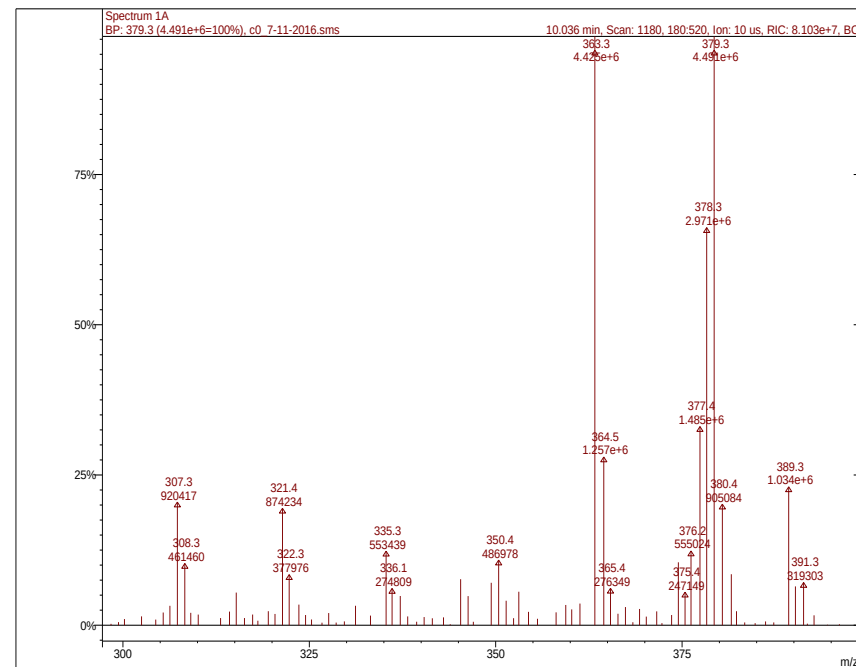


**Figura 8:** Spettro di massa THC D3 (IS deuterato); Ioni molecolari 306 - 374 - 389

## CANNABINOIDI su sangue intero

(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

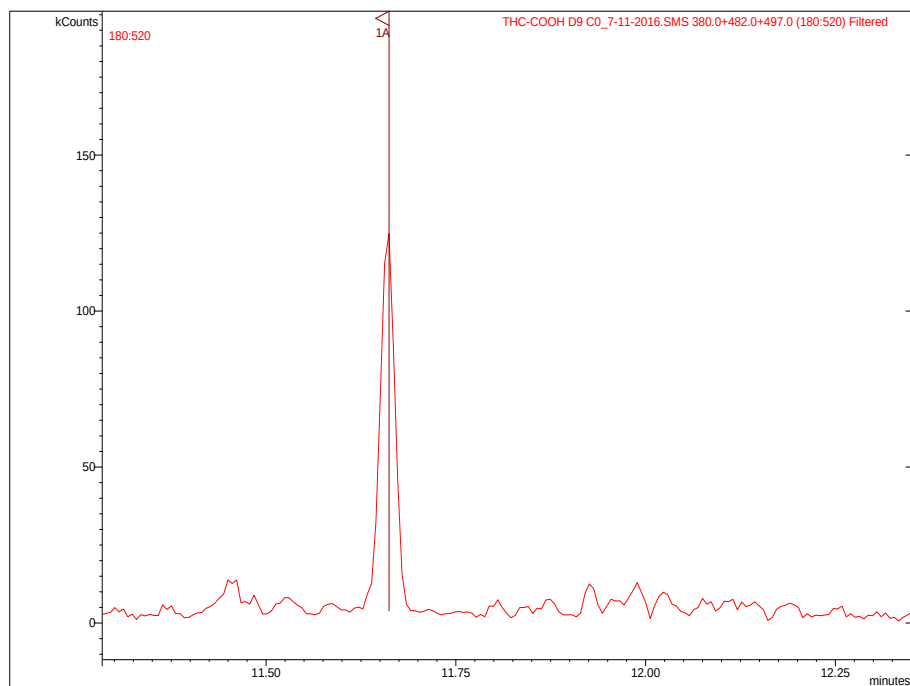


**Figura 9:** THC-COOH D9 (IS deuterato); RT 11.662

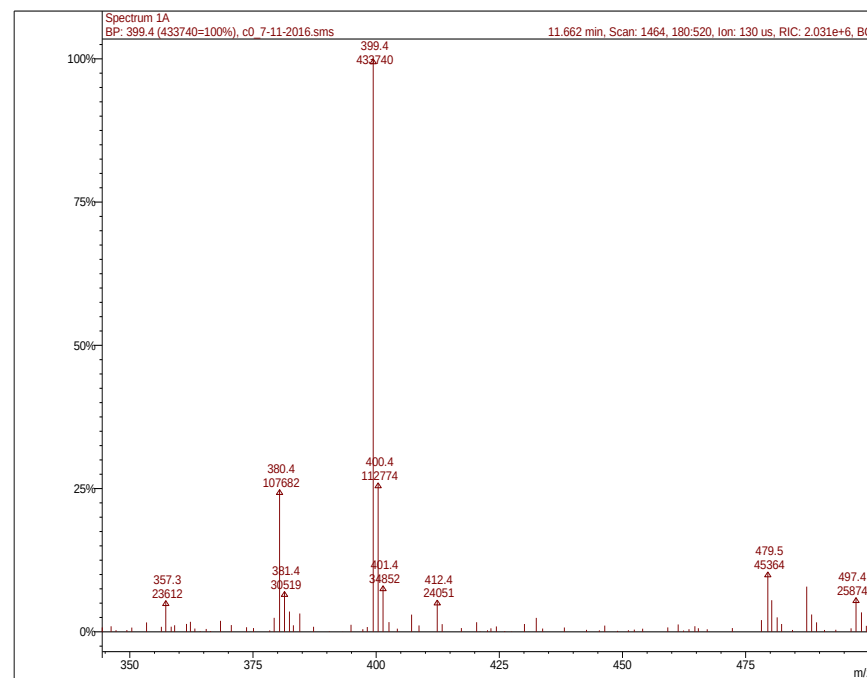


**Figura 10:** Spettro di massa THC-COOH D9 (IS deuterato); Ioni molecolari 380 - 482 - 497