

Metodo di conferma in LC-MS/MS

INTRODUZIONE

Nei primi anni '80 iniziarono una serie di studi sulla possibilità di determinare sostanze d'abuso nella matrice cheratinica e quindi utilizzare l'analisi dei capelli come strumento per individuare l'uso pregresso di tali sostanze. Una volta incorporate nel capello, sia dalla circolazione sistemica, che dal contributo del sudore e del sebo, le sostanze d'abuso rimangono sequestrate nella matrice cheratinica in funzione della loro lipofilità, del peso molecolare, della pKa e dell'ingombro sterico in maniera stabile nel tempo.

L'analisi delle sostanze d'abuso in matrice cheratinica è un *addendum* ideale all'analisi del sangue o delle urine in quanto fornisce informazioni riguardanti una finestra di tempo precedente a quella delle altre matrici biologiche e si riferisce ad uno spazio temporale più ampio (uno o più mesi) in funzione della lunghezza del capello.

Considerando infatti una crescita media di 1 cm/mese, è possibile conoscere la storia del consumo passato analizzando il capello segmentato per cm o per frazioni o multipli di cm. E' anche possibile evidenziare contaminazioni esterne effettuando l'esame dei solventi di lavaggio in paragone ai risultati ottenuti nel capello digerito.

La ricerca di sostanze d'abuso nei capelli può essere utilizzata per provare un uso, un abuso o un misuse protratto nel tempo e per caratterizzarne l'intensità e la sua storia e fornire quindi dati analitici con valore medico-legale. Per questo motivo la determinazione nei capelli può essere richiesta in caso di: morti correlate all'uso di sostanze d'abuso, valutazione della idoneità alla guida, responsabilità criminale, affidamento custodia minori, esposizione prenatale a sostanze d'abuso.

I test immunochimici possono essere utilizzati come metodi iniziali, al fine di analizzare in poco tempo un gran numero di campioni in maniera economica, efficace e standardizzata e di escludere i campioni che risultano negativi, ossia i campioni che non contengono la sostanza o la classe di sostanze oppure quelli in cui la concentrazione è al di sotto di un valore soglia (cut-off).

Le analisi di conferma sono definite come quelle analisi che servono a verificare che non ci siano stati risultati falsi positivi dovuti alla non specificità dei test iniziali. Nel caso della matrice cheratinica, poiché non esistono veri e propri test di screening neanche si può parlare di vere e proprie “analisi di conferma”. La “Society of Hair Testing” (SOHT) raccomanda l'utilizzo di metodologie separative cromatografiche accoppiate alla rivelazione in spettrometria di massa.

Il presente metodo consente di determinare il delta-9-THC ed il suo metabolita delta-9-THC-COOH previa estrazione dalla matrice cheratinica (capelli o peli) e successiva estrazione liquido-liquido (per eliminare la presenza di interferenti della matrice complessa) e determinazione in Cromatografia Liquida/Spettrometria di Massa (LC-MS/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



CE

N° 007	Delta-9-THC e metabolita in matrice cheratinica	06/2024
--------	---	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare il **delta-9-THC ed il suo metabolita** (Delta-9-THC-COOH) previa idrolisi dei capelli, estrazione in fase liquida e lettura in LC-MS/MS.

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

ANALITA	(Coefficiente di correlazione R2) $\pm$ deviazione standard	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
Delta-9-THC	0,9993 $\pm$ 0,0007	0,01	0,02
Delta-9-THC-COOH	0,9998 $\pm$ 0,0002	0,001	0,002

ANALITA	Accuratezza intra-giorno			Precisione intra-giorno			CV% inter-giorno		
	(Errore %)			(CV%)			(Errore %)		
	Calibratore			Calibratore			Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore	Inferiore	Medio	Superiore
Delta-9-THC	8,11	5,76	6,43	6,49	6,67	6,97	7,91	5,76	6,1
Delta-9-THC-COOH	11,1	8,99	9,33	9,26	8,67	10,42	10,62	8,99	9,35

ANALITA	Efficienza (%)		
	Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore
Delta-9-THC	91,1	62,9	75,1
Delta-9-THC-COOH	61,9	74,9	66,8

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

ANALITA	Concentrazione (ng/mg)		
	Calibratore		
	Inferiore	Medio	Superiore
Delta-9-THC	0,1	1	10
Delta-9-THC-COOH	0,005	0,05	0,5

Valore di cut-off :

Rif. Gazzetta Ufficiale n°236 – 8 ott 2008

CANNABINOIDI METABOLITI:
0.1 ng/mg

Contenuto della Confezione (50 test) :

Reagente A – Soluzione Diluente, **1 x 10 ml**

Reagente B – Soluzione di Digestione, **1 x 50 ml**

Reagente C – Standard Interni deuterati, **1 x 0,2 ml**

Reagente D – Soluzione Lavaggio del capello, **1 x 250 ml**

Reagente S – Capello bianco, **1 x 2000 mg**

Reagente F – Sol. Standard Chimico, **1 x 500 µl**

Reagente G – Soluzione di Estrazione, **1 x 420 ml**

Reagente H – Soluzione Stabilizzante 1, **1 x 10 ml**

Reagente I – Soluzione Stabilizzante 2, **1 x 10 ml**

Reagente L – Soluzione Acidificante, **1 x 2 ml**

Reagente M1 – Fase Mobile M1, **1 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **1 x 500 ml**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8 °C, eccetto i Reagenti C e F che vanno stoccati a -20°C

Vedere Avvertenze
Stoccare a -20 °C

Codice CC53016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo (modalità MRM)
Interfaccia ESI (+/-)
Pompa binaria
Sistema evaporazione solventi (essiccatore)

Modalità di prelievo dei capelli :

Lunghezza raccomandata: 5 cm, partendo dal cuoio capelluto. Viene recisa una ciocca, non strappata (il bulbo non ha nessuno scopo al fine dei presenti accertamenti) nella regione del vertice posteriore del capo, di almeno 200 mg che viene suddivisa in 2 aliquote di simile peso (A e B) di ognuna delle quali viene fissata l'estremità prossimale. Tali aliquote vengono inserite in contenitori separati non trasparenti recanti tappi a chiusura ermetica e sigillati con nastro inamovibile e conservati a temperatura ambiente. Il taglio del capello deve essere eseguito con forbici pulite con una piccola quantità di alcol e ben asciutte.

Modalità di prelievo del pelo :

E' necessario tagliare 200 mg di peli dalla regione pubica; i peli così raccolti vengono suddivisi in due aliquote (A e B).

PROCEDURA ANALITICA:

A) PREPARAZIONE dei Campioni incogniti

FASE 1 : Lavare i capelli/peli integri dentro una provetta di vetro da 10 ml con 2 ml di **Reagente D – Soluzione Lavaggio del capello**

Chiudere ermeticamente la provetta con il tappo

Vortexare per 1 minuto

Centrifugare a 3.500 rpm per 5 minuti

Aprire la provetta di vetro

FASE 2 : Portare a secco il solvente con l'ausilio di un leggero flusso di elio o di azoto ponendo attenzione a far rimanere il capello/pelo sul fondo della provetta. In alternativa prelevare, con una pinza pulita con Acetone (non fornito nel kit), il capello/pelo dalla provetta ed appoggiarlo su carta assorbente finché non è completamente asciutto. In questo ultimo caso la carta assorbente va cambiata per ogni campione.

Ripetere le Fasi 1 e 2 per due volte consecutive

FASE 3 : Tagliare i capelli/peli, lavati ed asciugati, in segmenti di 1-2 cm con forbici pulite con Acetone (non fornito nel kit)

FASE 4 : Pesare 50 mg di campione in una provetta di vetro in pyrex con tappo a vite pulita e precedentemente denominata.

B) PREPARAZIONE dei CALIBRATORI SU 5 LIVELLI

FASE 5 : Preparazione degli Standard Chimici:

Preparare 1 provetta di vetro, denominarla A e diluirvi lo Standard Chimico (**Reagente F**) con il **Reagente A – Soluzione Diluente** come riportato nella tab. sotto:

Provette	Reagente F - Sol. Standard Chimico	Reagente A – Sol. Diluente
A	20 µl	1.980 µl

Chiudere la provetta con il tappo – Vortexare per 1 minuto

Preparare 6 provette di vetro da 10 ml denominate C0-C1-C2-C3-C4-C5.

Aggiungere in ciascuna provetta da 10 ml (C0-C1-C2-C3-C4-C5) lo standard chimico appena preparato (Provetta A) o il **Reagente A** o il **Reagente F**, facendo riferimento alla tabella riportata sotto:

Calibratore C0	Calibratore C1	Calibratore C2	Calibratore C3	Calibratore C4	Calibratore C5
20 µl Reagente A – Sol. Diluente	40 µl di A	100 µl di A	500 µl di A	20 µl di Standard Chimico (Reagente F)	40 µl di Standard Chimico (Reagente F)

Portare a secco ogni calibratore appena preparato con l'ausilio di un flusso elio o azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C).

Aggiungere ad ogni provetta dei calibratori 50 mg di **Reagente S – Capello bianco** (fornito nel kit).

A questo punto i Calibratori su 6 punti sono pronti e le concentrazioni da utilizzare per la curva di calibrazione saranno:

Analita	Calibratore C0	Calibratore C1	Calibratore C2	Calibratore C3	Calibratore C4	Calibratore C5
Delta-9-THC	0 ng/mg	0.02 ng/mg	0.05 ng/mg	0.25 ng/mg	1 ng/mg	2 ng/mg
Delta-9-THC- COOH	0 pg/mg	0.2 pg/mg	0.5 pg/mg	2.5 pg/mg	10 pg/mg	20 pg/mg

C) PREPARAZIONE DELLO STANDARD INTERNO

FASE 6 : Il **Reagente C – Sol. Standard interno** fornito nel kit va diluito 1:10 con acqua prima di ogni utilizzo, nella quantità necessaria per l'intera seduta analitica.

ES. per una seduta analitica con 20 campioni incogniti e 5 calibratori sono necessari 500 µl dello Standard Interno diluito (**Reagente C – diluito**). Pertanto si prelevano 50 µl di **Reagente C – Sol. Standard interni deuterati** e si diluiscono con 450 µl di H₂O in una provetta di vetro. Al vortex per almeno 10 sec. La soluzione è ora pronta per l'uso.

Il **Reagente C – Sol. Standard interno** non diluito e non utilizzato si richiude ermeticamente e si conserva la quantità residua in congelatore a -20°C.

D) DIGESTIONE DELLA MATRICE CHERATINICA

FASE 7 : In ogni tubo precedentemente preparato (FASE A e FASE B) dispensare:

	Calibratore C0 (preparato nella FASE B)	Calibratore C1 (preparato nella FASE B)	Calibratore C2 (preparato nella FASE B)	Calibratore C3 (preparato nella FASE B)	Calibratore C4 (preparato nella FASE B)	Calibratore C5 (preparato nella FASE B)	Campioni (preparati nella FASE A)	Controlli (non forniti nel kit)
Reagente C diluito – (Sol. Std interni diluito come indicato nella FASE C)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Reagente B – Sol. Di Digestione	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Chiudere ermeticamente le provette con il tappo – Agitare delicatamente senza capovolgere le provette per 10 secondi

FASE 8 : Porre in stufa a 90 °C per 1 ora

Raffreddare a Temperatura ambiente.

E) ESTRAZIONE dell'aliquota DELTA-9-THC

- 1) Ad ogni provetta preparata nella FASE 6 aggiungere 4 ml di Reagente G – Soluzione di Estrazione

Chiudere ermeticamente le provette con il tappo

Vortex per 1 min

Centrifugare a 3.500 rpm per 10 min

- 2) Trasferire tutto il surnatante (FASE ORGANICA) in provette di vetro PULITE denominate C0, C1, C2, C3, C4, C5, Campione 1, Campione 2, etc
(N.B. Non buttare la fase acquosa rimasta nella provetta!)

Agitare al vortex per 30 sec

F) ESTRAZIONE dell'aliquota DELTA-9-THC-COOH

- 1) Alla soluzione acquosa rimasta dopo l'estrazione del delta-9-THC (FASE E, PUNTO 1) aggiungere 30 µl di Reagente L – Soluzione Acidificante

Agitare al vortex per 10 sec

- 2) Aggiungere in ogni provetta 4 ml di Reagente G – Soluzione di Estrazione

Chiudere ermeticamente le provette con il tappo

Vortex per 1 min

Centrifugare a 3.500 rpm per 10 min

- 3) Trasferire tutto il surnatante (FASE ORGANICA) nelle provette di vetro denominate C0, C1, C2, C3, C4, C5, Campione 1, Campione 2, etc, a cui era stata aggiunta la fase organica nello step precedente (FASE E, PUNTO 2), ottenendo un volume totale di circa 8 ml
- 4) 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)

G) DILUIZIONE ED INIEZIONE

- 1) Aggiungere ad ogni provetta portata a secco 200 µl di Reagente H - Soluzione Stabilizzante 1

Agitare al vortex per 10 sec

- 2) Aggiungere ad ogni provetta 200 µl di Reagente I - Soluzione Stabilizzante 2

Agitare al vortex per 30 sec

- 3) Iniettare 10-20 µl della soluzione nel sistema LC

La soluzione è stabile 24 ore a 2-8 °C

CONSIDERAZIONI GENERALI sul CALCOLO QUANTITATIVO dei CAMPIONI INCOGNITI

Il calcolo dei campioni sconosciuti viene eseguito in funzione dell'equazione ottenuta per la curva di calibrazione dove si riporta sull'asse delle ascisse la concentrazione in ng/mg e sull'asse delle ordinate il rapporto tra le aree dell'analita/standard interno.

Per il calcolo della concentrazione in ng/mg capello nel caso dei campioni reali, si ricorda che una volta ottenuto il valore di concentrazione sulla retta, esso va moltiplicato per i mg di capello con cui si è costruita la retta di calibrazione (50 mg) e diviso per il peso effettivo del campione in esame (es. 10 mg qualora si sia pesata questa quantità di capello).

Δ⁹- TETRAIDROCANNABINOLO cheratinico e metabolita - Avvertenze

REAGENTE C: SOLUZIONE STANDARD INTERNI DEUTERATI

Soluzione contenente Delta-9-THC-D3, Delta-9-THC-COOH-D9	
Sostanze d'Abuso:	Standard interno da utilizzare per la calibrazione:
DELTA-9-THC	Delta-9-THC-D3
DELTA-9-THC-COOH	Delta-9-THC-COOH-D9
Conservazione: il reagente va stoccato a – 20 °C	

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Accucore C18 (30 x 2.1 mm, 2.6 µm) o Zorbax RRHD C18 (50 x 2,1 mm. 1.8 µm), entrambe termostatate a 50°C. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di H₂O : ACN o CH₃OH (10 : 90 v/v) al flusso 300 µl/min per 15 minuti. Condizionare con Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (95 : 5 v/v) al flusso di 400 µl/min per 15 minuti.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare una soluzione di H₂O : ACN o CH₃OH (5 : 95 v/v) al flusso di 300 µl/min per 15 minuti scaricandola. Stoccare la colonna in una soluzione di H₂O : ACN o CH₃OH (5 : 95 v/v).

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Metanolo

GRADIENTE PER SISTEMI HPLC (ACCUCORE C18)

Tempo	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0	95	5	400
0.30	95	5	400
1.00	40	60	400
3.00	5	95	400
4.30	5	95	400
4.31	95	5	400
5.30	95	5	400

GRADIENTE PER SISTEMI UHPLC (ZORBAX RRHD C18)

Tempo	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (ml/min)
0.00 min	60%	40%	0.5
0.30 min	60%	40%	0.5
0.35 min	40%	60%	0.5
3.00 min	0%	100%	0.5
4.00 min	0%	100%	0.5
4.01 min	60%	40%	0.5
5.00 min	60%	40%	0.5

PARAMETRI SETTATI SU TRIPLO QUADRUPOLO SCIEX 4500

Parametri Cannabinoidi ESI Positivo

Curtain Gas (CUR): 40
Collision Gas (CAD): 10
Ion Spray Voltage: (IS): 4500 V
Temperature (TEM): 650°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 45
Ion Source Gas 2 (GS2): 55

Parametri Cannabinoidi ESI Negativo

Curtain Gas (CUR): 40
Collision Gas (CAD): 10
Ion Spray Voltage: (IS): -4500 V
Temperature (TEM): 600°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 45
Ion Source Gas 2 (GS2): 55

FRAMMENTAZIONI

ANALITA	PARENT ION
Delta 9-THC	315.2 (+)
delta 9-THC-COOH	343.1 (-)
STANDARD INTERNI DEUTERATI	
Delta 9-THC-D3	318.2 (+)
Delta-9-THC-COOH-D9	352.1 (-)

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
CC53016	Calibratore in matrice cheratinica per delta-9-THC e delta-9-THC-COOH	1 x 2000 mg/ 1 x 0,5 ml / 1 x 10 ml
CC53019	Controllo in matrice cheratinica per delta-9-THC THC e delta-9-THC-COOH – Livelli 1 e 2	1 x 1000 mg/ 1 x 0,5 ml / 1 x 12,5 ml
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
Colonna analitica per sistemi HPLC		
TF17126032130	Colonna Accucore C-18 (30 m x 2.1 mm – 2.6 µm)	1 Pz
Colonna analitica per sistemi UHPLC		
Z959757902	Colonna analitica RRHD C18 (50 x 2,1 mm. 1.8 um)	1 Pz

Δ^9 - TETRAIDROCANNABINOLO cheratinico e metabolita
(Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

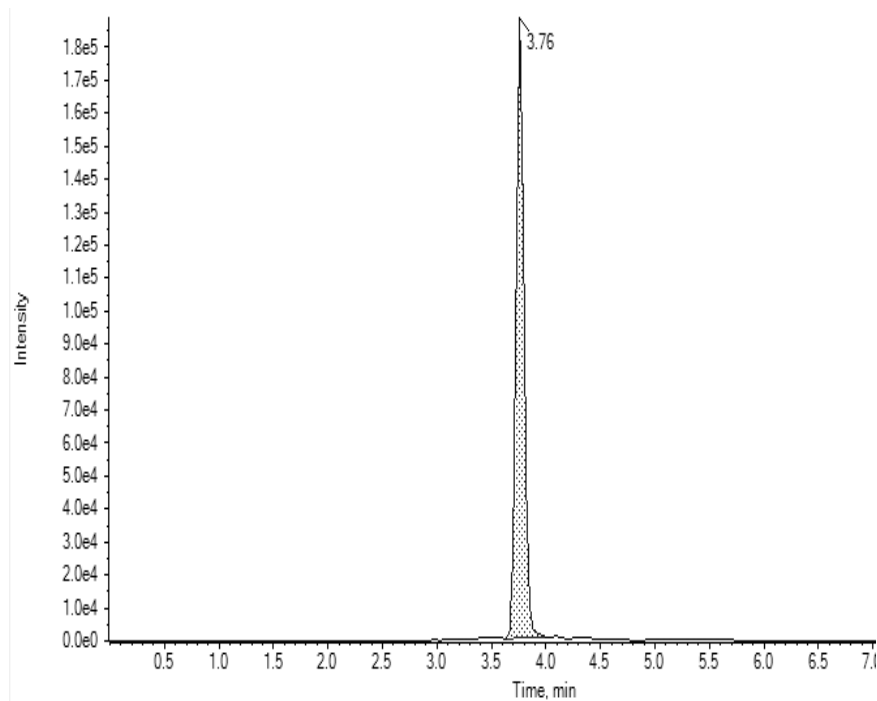


Fig. 1 :	Calibratore cheratinico
	R.T. 3.76 Delta-9-THC

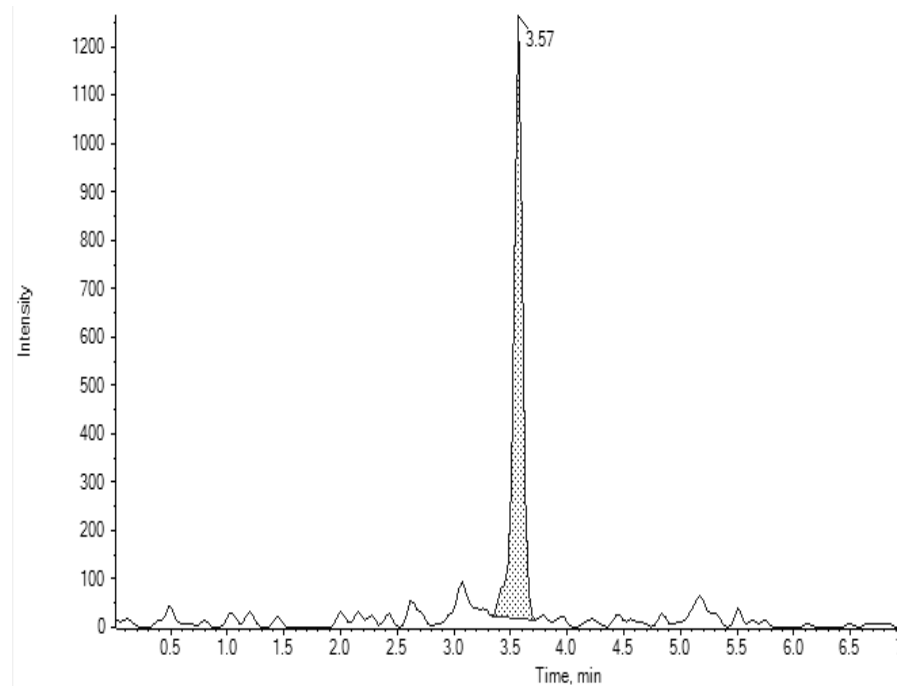


Fig. 2 :	Calibratore cheratinico
	R.T. 3.57 Delta-9-THC-COOH