

INTRODUZIONE

L'Etilglucuronide è una molecola non volatile, polare, relativamente stabile, formata dalla coniugazione dell'etanolo con l'acido glucuronico con la mediazione delle UDP-glucuronil transferasi (UGT), una superfamiglia di enzimi altamente polimorfici. L'Etilglucuronide sembra essere sintetizzato da varie isoforme delle UGT cosicché differenze funzionali individuali non debbano risultare in una distorsione del dato analitico. Di conseguenza, la mancanza in un individuo di una isoforma dell'enzima non fa supporre variazioni significative nella formazione di Etilglucuronide, e quindi individui appartenenti a etnie differenti sintetizzano con ogni probabilità la stessa percentuale del composto in seguito all'assunzione di alcol. In generale, è stato stimato che lo 0.02-0.06% dell'etanolo assunto sia trasformato in Etilglucuronide.

Il dosaggio dell'Etilglucuronide cheratinico permette di monitorare l'abuso acuto di alcol.

Il presente metodo fornisce l'analisi dell'Etilglucuronide in 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



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° 004	Etilglucuronide in matrice cheratinica in LC-MS/MS	06/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare l' **Etilglucuronide** previa idrolisi dei capelli, estrazione in fase liquida e lettura in LC-MS.

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

Recupero : 109,5 %

Sensibilità del Metodo (LLOD) : 0,2 pg/mg

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) : 2 pg/mg

Linearità : 2 – 2000 pg/mg

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
10 pg/mg	100 pg/mg
6,4%	2,1%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
10 pg/mg	100 pg/mg
8,0%	3,2%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %) :

Cl	Cm	Ch
2 pg/mg	40 pg/mg	200 pg/mg
6,9%	2,7%	2,3%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

Cl	Cm	Ch
2 pg/mg	40 pg/mg	200 pg/mg
9,7%	4,5%	3,8%

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std : 0,9973 ± 0,0012

Cut off : < 7 pg/mg valutazione astinenza
<30 pg/mg consumo cronico

Indice Riferimenti Bibliografici

1- J Mass Spectrom. 2006 Jan;41(1):34-42. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. Morini L, Politi L, Groppi A, Stramesi C, Poletti A.
2- Ethylglucuronide Determination in Urine and Hair from Alcohol Withdrawal Patients. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33, April 2009. Marta Concheiro, Angelines Cruz, Marisol Mon, Ana de Castro, Oscar Quintela, Angeles Lorenzo and Manuel López-Rivadulla. Forensic Toxicology Service, Institute of Legal Medicine, University of Santiago de Compostela, C/ San Francisco s/n, 15782. Santiago de Compostela, Spain and Alcoholism Treatment Unit (UTA), Department of Psychiatry, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Contenuto della Confezione (50 test) :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente, eccetto il **Reagente B** ed i **Reagenti D** che vanno stoccati a -20 °C.

Reagente A – Soluzione Estraiante, **1 x 35 ml**

Reagente B – Soluzione Standard Interno, **1 x 150 µl**

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

Reagente D0 – Sol. Standard Chimico – Livello 0, **1 x 250 µl**

Reagente D1 – Sol. Standard Chimico – Livello 1, **1 x 250 µl**

Reagente D2 – Sol. Standard Chimico – Livello 2 **1 x 250 µl**

Reagente D3 – Sol. Standard Chimico – Livello 3, **1 x 250 µl**

Reagente D4 – Sol. Standard Chimico – Livello 4, **1 x 250 µl**

Reagente D5 – Sol. Standard Chimico – Livello 5, **1 x 250 µl**

Reagente S – Capello bianco, **1 x 4000 mg**

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

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

Vedere Avvertenze
Stoccare a -20 °C

Codice LC95016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Codice LC95016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Codice LC95016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Codice LC95016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Codice LC95016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Codice LC95016 (Confezionato a parte - vedi scheda tecnica)

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo
Pompa binaria
Modalità MRM
Esi negativo
Bagno ad ultrasuoni (sonicatore)

Modalità di prelievo dei capelli :

Lunghezza raccomandata: 3-5 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) LAVAGGIO dei Campioni incogniti

FASE 1 : Lavare i capelli/peli integri dentro una provetta di vetro da 10 ml con 2 ml di **Reagente C – 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 un'aliquota di campione, 100 mg (o una quantità differente a seconda della disponibilità del campione) in una provetta di vetro in pyrex con tappo a vite pulita e precedentemente denominata.

B) PREPARAZIONE DELLO STANDARD INTERNO

FASE 5 : Il **Reagente B – Sol Standard interno** fornito nel kit va diluito 1:20 con acqua di grado HPLC prima di ogni utilizzo, nella quantità necessaria per l'intera seduta analitica.

ES. per una seduta analitica con 10 campioni incogniti e 6 calibratori sono necessari 320 µl dello Standard Interno diluito (**Reagente B-diluito**). Pertanto si prelevano 16 µl di **Reagente B – Sol Standard interno** e si diluiscono con 304 µl di H₂O in una provetta di vetro. Al vortex per almeno 10 sec. La soluzione è ora pronta per l'uso.

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

B) PREPARAZIONE dei CALIBRATORI SU 6 LIVELLI

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

Aggiungere ad ogni provetta dei calibratori C0-C1-C2-C3-C4-C5 100 mg di **Reagente S – Capello bianco** (fornito nel kit).

FASE 7: Preparare un numero di provette pari al numero di campioni a cui sono stati aggiunti i capelli incogniti come da Fase 4.

FASE 8: Aggiungere in tutte le provette preparate nelle Fasi 6 e 7 (calibratori, controlli e campioni) 700 µl di **Reagente A - Sol. Estraeante**

FASE 9: Aggiungere in tutte le provette preparate nelle Fasi 6 e 7 (calibratori, controlli e campioni) 20 µl di **Reagente B diluito** (come indicato nella FASE B)

FASE 10: Aggiungere in ciascuna provetta dei calibratori (C0-C1-C2-C3-C4-C5) gli standard chimici **Reagente D** facendo riferimento alla tabella riportata sotto:

Calibratore C0	Calibratore C1	Calibratore C2	Calibratore C3	Calibratore C4	Calibratore C5
20 µl di Reagente D0	20 µl di Reagente D1	20 µl di Reagente D2	20 µl di Reagente D3	20 µl di Reagente D4	20 µl di Reagente D5

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

Analita	Calibratore C0 (pg/mg)	Calibratore C1 (pg/mg)	Calibratore C2 (pg/mg)	Calibratore C3 (pg/mg)	Calibratore C4 (pg/mg)	Calibratore C5 (pg/mg)
EtG	0	2	10	20	40	200

Chiudere ermeticamente tutte le provette con il tappo – Centrifugare per 3 minuti a 3500 rpm in modo da far immergere il capello nel liquido

FASE 11: Porre tutte le provette a 25 °C overnight

FASE 12 : Porre in bagno ad ultrasuoni (sonicatore) per 2 ore

Aprire la provetta di vetro

FASE 13 : Prelevare tutto il liquido facendo attenzione a non prelevare il capello e trasferire in provette di tipo eppendorf.

Centrifugare per 10 minuti a 14000 rpm

FASE 14 : Prelevare un'aliquota del surnatante e trasferire in vial di vetro.

E) INIEZIONE :

FASE 15 : Iniettare 12 µl della soluzione nel sistema LC

ETILGLUCURONIDE cheratinico - Avvertenze

REAGENTE B: SOLUZIONE STANDARD INTERNO

Etilglucuronide-D5	10.000 ng/ml
Conservazione: il reagente va stoccato a – 20 °C	

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Polaris 3u C18 A (100 x 2 mm, 3 µm) termostata a 40 °C. Disconnettere il detector e far passare per 10 minuti una soluzione di H₂O : Acetonitrile (10 : 90 v/v) al flusso di 300 ul/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare ulteriormente con una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (99 : 1 v/v) al flusso di 600 ul/minuto per 10 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 : Acetonitrile (5 : 95 v/v) per 10 minuti al flusso di 600 ul/minuto scaricandola. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Acetonitrile (5 : 95 v/v).

LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

Lavaggio dell'ago dell'autocampionatore intra - serie con Acqua.

Parametri interfaccia ESI Sciex 4500

Curtain Gas (CUR): 40
Collision Gas (CAD): 8
Ion Spry Voltage: (IS): -4500 V
Temperature (TEM): 650°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 60
Ion Source Gas 2 (GS2): 60

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO Sciex 4500)

Analita	Q1	Q3	ENERGIA DI COLLISIONE
Etilglucuronide	221.1	75/85	-19/-21
Etilglucuronide-D5	226.1	75/85	-20/-21

SETTAGGIO DEI FLUSSI

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0.00	99	1	600
2.00	99	1	600
2.01	10	90	600
4.50	10	90	600
4.51	99	1	600
7.00	99	1	600

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC95016	Calibratore cheratinico per Etilglucuronide	6 x 250 ul x 4.000 mg
LC95019	Controllo cheratinico per Etilglucuronide – Livelli 1 e 2	2 x 250 ul x 1500 mg
SK95010	Starter kit per Etilglucuronide	1 Pz
L-30-210	Provette tipo eppendorf con tappo	1 x 100 Pz
Z-1636/26	Provette in pyrex da 10 ml	1 x 40 Pz
ZA2001100X020	Colonna analitica Polaris C18 A100 (100 x 2,0 mm, 3 um)	1 Pz
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

ETILGLUCURONIDE CHERATINICO

(Cromatogrammi di riferimento)

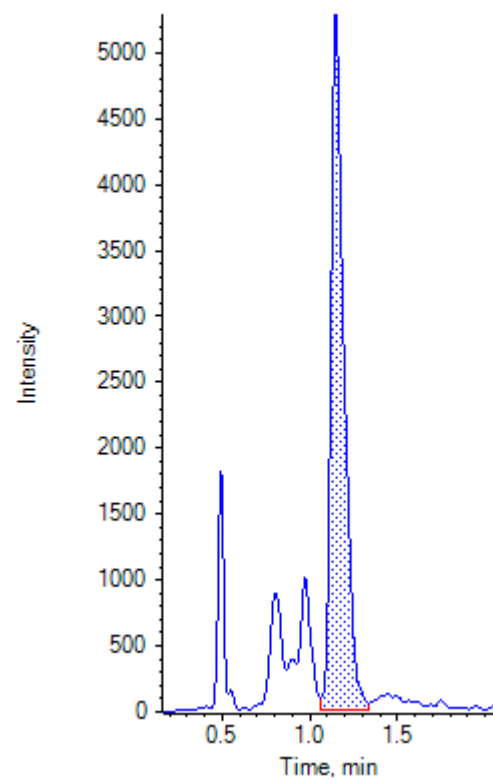


Fig. 1 :	Calibratore 20 pg/mg
	R.T. 1.15 Ettilglucuronide

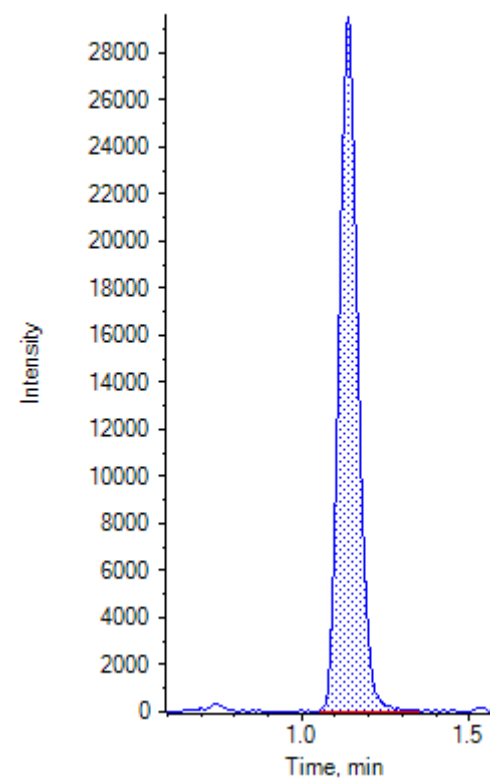


Fig. 2 :	Calibratore 20 pg/mg
	R.T. 1.15 Ettilglucuronide-D5