

Metodo di conferma in GC-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 lipofilicità, 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 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 Gas Cromatografia/spettrometria di massa (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



CE

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo consente di determinare il **delta-9-THC** previa idrolisi dei capelli, 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/mg

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) : 0,025 ng/mg

Linearità : 0,025 – 2.500 ng/mg

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
0,1 ng/mg	1 ng/mg
9,0%	7,5%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
0,5 ng/mg	5 ng/mg
9,9%	9,0%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/mg	0,5 ng/mg	5 ng/mg
10,5%	7,5%	4,2%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
0,05 ng/mg	0,5 ng/mg	5 ng/mg
8,7%	9,5%	9,9%

Coefficiente di correlazione R² + Dev. std: 0,9948 ± 0,0018

Valore di cut-off :
delta-9-THC:

0.1 ng/mg

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 Diluente, **1 x 120 ml**

Reagente B – Soluzione Test delta-9-THC, **1 x 500 µl**

Vedi Avvertenze

Reagente C – Soluzione Standard Interno, **1 x 1 ml**

Vedi Avvertenze

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

Reagente E – Soluzione Estraiante, **1 x 250 ml**

Reagente F - Capello bianco, **1 x 2000 mg**

Reagente G – Sol. Standard Chimico, **2 x 250 µl**

Codice GC53016 (Confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Reagente H – Sol. Di Digestione, **1 x 50 ml**

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

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento GC-MS
Computer gestionale

Dotazione opzionale :

Autocampionatore

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 2 aliquote di simile peso (A e B).

PROCEDURA PREANALITICA

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

- 50 µl di **Reagente B – Soluzione Test**

Conservazione **Reagente B**: Una volta aperta la vial, prelevarne il vol. necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C

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 40 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 75 °C per 30 minuti

Raffreddare a Temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

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

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 del delta-9-THC 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:

A) PREPARAZIONE dei Campioni incogniti

FASE 1 : Lavare i capelli 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 sul fondo della provetta. In alternativa prelevare, con una pinza pulita con Acetone (non fornito nel kit), il capello dalla provetta ed appoggiarlo su carta assorbente finché non è completamente asciutto.

Ripetere le Fasi 1 e 2 per due volte consecutive

FASE 3 : Tagliare i capelli, 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, compresa tra 30 e 50 mg a seconda della disponibilità del campione, in una provetta di vetro in pyrex con tappo a vite

B) PREPARAZIONE dei CALIBRATORI SU 5 LIVELLI

Preparazione degli Standard Chimici per arricchimento:

Preparare 3 provette di vetro, denominarle A; B; C e diluirvi il **Reagente G – Standard Chimico** con il **Reagente A – Soluzione Diluente** come riportato nella tab. sotto:

Provette	Reagente G – Stand. Chimico	Reagente A – Sol. Diluente
A	10 µl	9990 µl
B	10 µl	990 µl
C	20 µl	180 µl

Chiudere le provette con il tappo – Vortexare per 1 minuto

Preparare 5 provette di vetro da 10 ml denominate C0-C1-C2-C3-C4.

Aggiungere in ciascuna provetta da 10 ml (C0-C1-C2-C3-C4) gli standard chimici appena preparati (A, B, C) facendo riferimento alla tabella riportata sotto:

Calibratore C0	Calibratore C1	Calibratore C2	Calibratore C3	Calibratore C4
100 µl Reagente A – Sol. Diluente	100 µl di A	200 µl di A	200 µl di B	100 µl di C

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 F – Capello bianco** (fornito nel kit).

A questo punto i Calibratori su 5 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
Delta-9- THC	0 ng/mg	0.05 ng/mg	0.1 ng/mg	1 ng/mg	5 ng/mg

C) PREPARAZIONE DELLO STANDARD INTERNO

Il reagente Standard Interno Diluito, da utilizzare nella tabella sottostante, consiste in una soluzione acquosa diluita di **Reagente C - Standard Interno** e va preparato fresco ogni volta su una provetta di vetro, prima dell'utilizzo, nella quantità necessaria da utilizzare per l'intera seduta analitica.

Poiché, per ogni campione e per ogni Calibratore/Controlli, sono necessari 20ul dello Standard Interno diluito, bisogna calcolare il volume del reattivo 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 dello Standard Interno diluito (**Reagente C-diluito**). Pertanto si prelevano 50 µl di **Reagente C** 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 5 : 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)	Controlli	Campioni (preparato nella FASE A)
Reagente C diluito - (Sol. Std interno diluito come indicato nella FASE C)	20 ul	20 ul	20 ul	20 ul	20 ul	20 ul	20 ul
Reagente H - Sol. Di Digestione	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Chiudere ermeticamente le provette con il tappo – Vortexare per 20 secondi

FASE 6 : Centrifugare 5 minuti a 10.000 rpm

FASE 7 : Porre in stufa a 90 °C per 1 ora

Raffreddare a Temperatura ambiente.

FASE 8 : Trasferire il digerito in provette di vetro nuove

E) ESTRAZIONE del DELTA-9-THC

FASE 9 : Aprire le provette di vetro preparate nella FASE D

Aggiungere 5 ml di **Reagente E - Sol. Estraeante** ad ogni Calibratore, Campioni ed eventuali Controlli preparati sopra

Chiudere ermeticamente le provette con il tappo – Vortexare 20 sec. A velocità intermedia

Centrifugare a 3.500 rpm per 15 min

Aprire le provette di vetro con il tappo

Trasferire 4 – 4,5 ml di surnatante in provette di vetro denominate C0, C1, C2, C3, C4, Campione 1, Campione 2, etc. con l'aggiunta della dicitura "THC"

F) DERIVATIZZAZIONE DEL DELTA-9-THC

Portare a secco tutte le provette preparate nella FASE E con l'ausilio di un flusso di elio o di azoto (in questo step la Temperatura di lavoro deve essere < 40 °C)

Derivatizzazione: Aggiungere in ogni provetta 40 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 30 sec.

Porre in stufa a 75°C x 30 min

Raffreddare a temperatura ambiente

Aprire la provetta di vetro

Iniezione: Trasferire il derivatizzato nelle vial con riduttore di volume ed iniettare 2 µl nel Gascromatografo.

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 (20 mg) e diviso per il peso effettivo del campione in esame (es. 10 mg qualora si sia pesata questa quantità di capello).

DELTA-9-THC in matrice cheratinica - Avvertenze

REAGENTE B : SOLUZIONE TEST

Delta-9-THC	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 G : STANDARD CHIMICO

Delta-9-THC	25.000 ng/ml
Conservazione: Una volta aperta la vial, prelevarne il volume necessario, richiuderla con il reagente non utilizzato e conservare a -20°C.	

REAGENTE 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.
--

REAGENTE C : SOLUZIONE STANDARD INTERNO

Delta-8-THC	250.000 ng/ml
Conservazione: il reagente va stoccato a – 20 °C	

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

• Range di Massa 280 – 420 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 Restek Rxi-5Sil 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 2,42 minuti 120-250°C a 40 °C/min 250-300°C a 15 °C/min 300 x 2,0 minuti (corsa 11 minuti) • Flusso Gas Elio 1 ml/min Gas

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA Restek Rxi-5Sil

Seguire le prescrizioni del costruttore.
--

PULIZIA DELLA COLONNA Restek Rxi-5Sil

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
GC53016	Calibratore in matrice cheratinica per delta-9-THC	1 Cf
GC53019	Controllo in matrice cheratinica per delta-9-THC – Livelli 1 e 2	1 Cf
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
Z1636/26	Provette in Pyrex da 10 ml con tappo SWL	1 x 40 Pz
S13623	Colonna Restek Rxi-5SILms (30 m x 0,25 mm – 0,25 µm)	1 Pz
ZRE24533	Siringa Hamilton da 50 µl	1 Pz

Delta-9-THC IN MATRICE CHERATINICA (Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

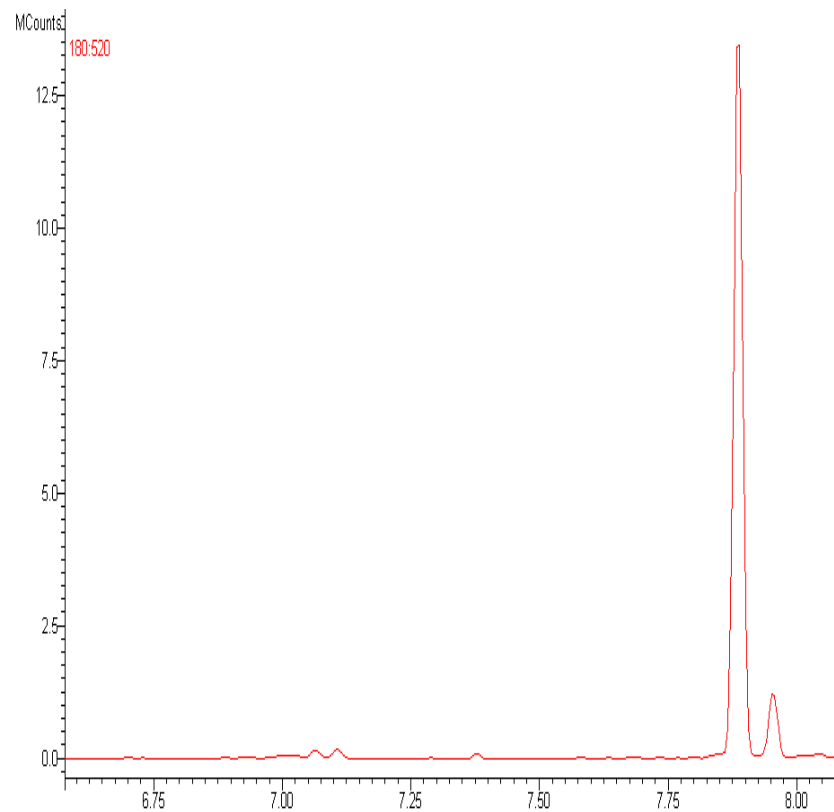


Fig. 1 :	Soluzione Test delta-9-THC
	R.T. 7.96 delta-9-THC

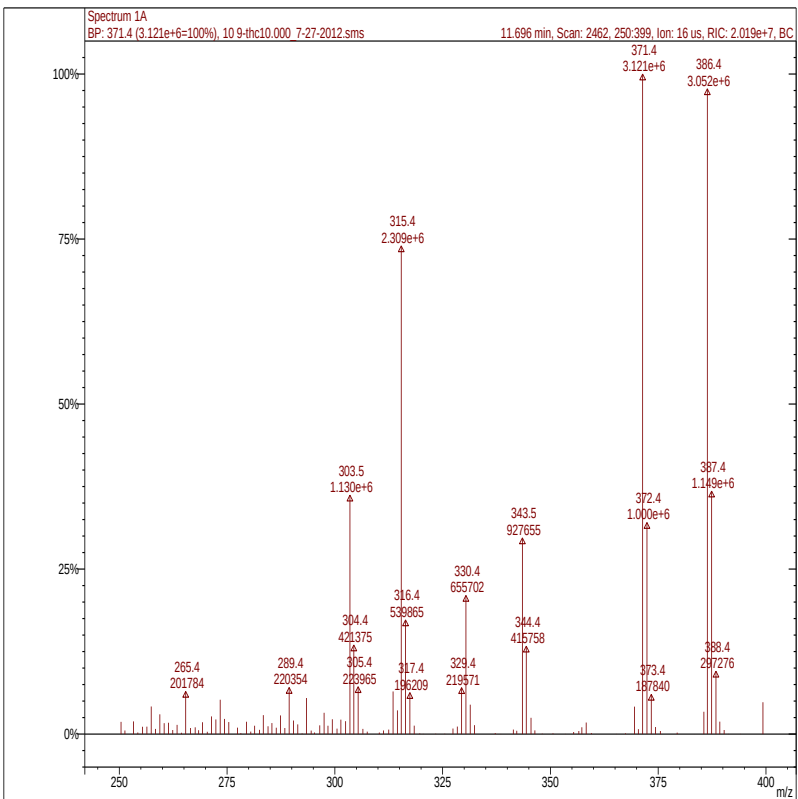


Fig. 2 :	Spettro di Massa del delta-9-THC
	IONI MOLECOLARI: 303-371-386

Delta-9-THC IN MATRICE CHERATINICA (Cromatogrammi/Spettri di riferimento)

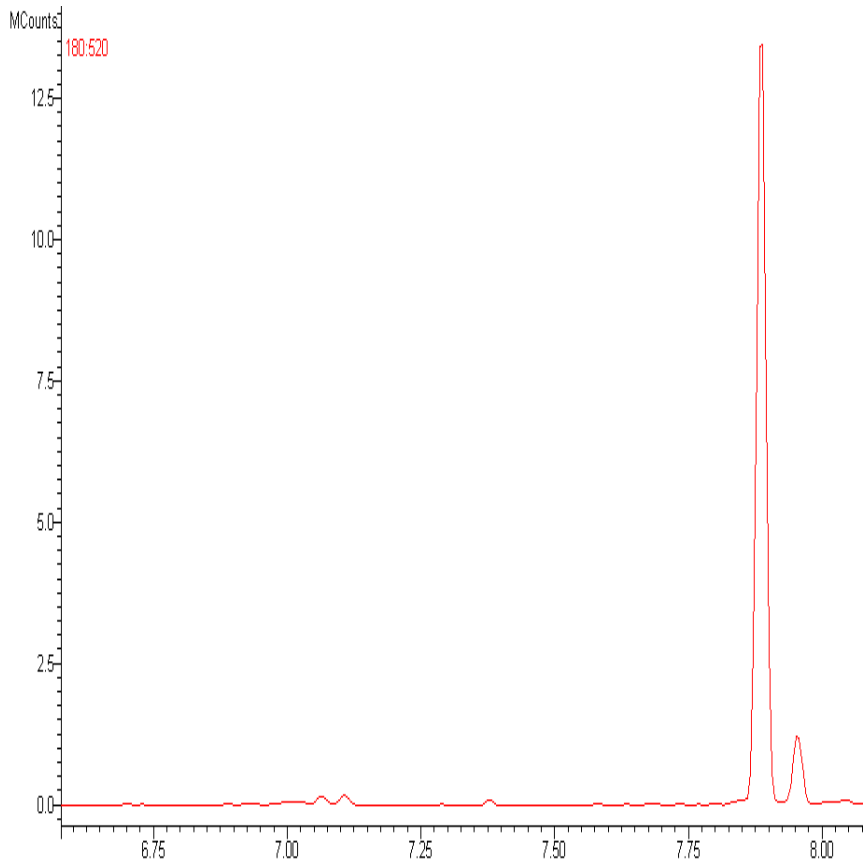


Fig. 3 :	Soluzione Standard Interno
	R.T. 7.88 Standard Interno

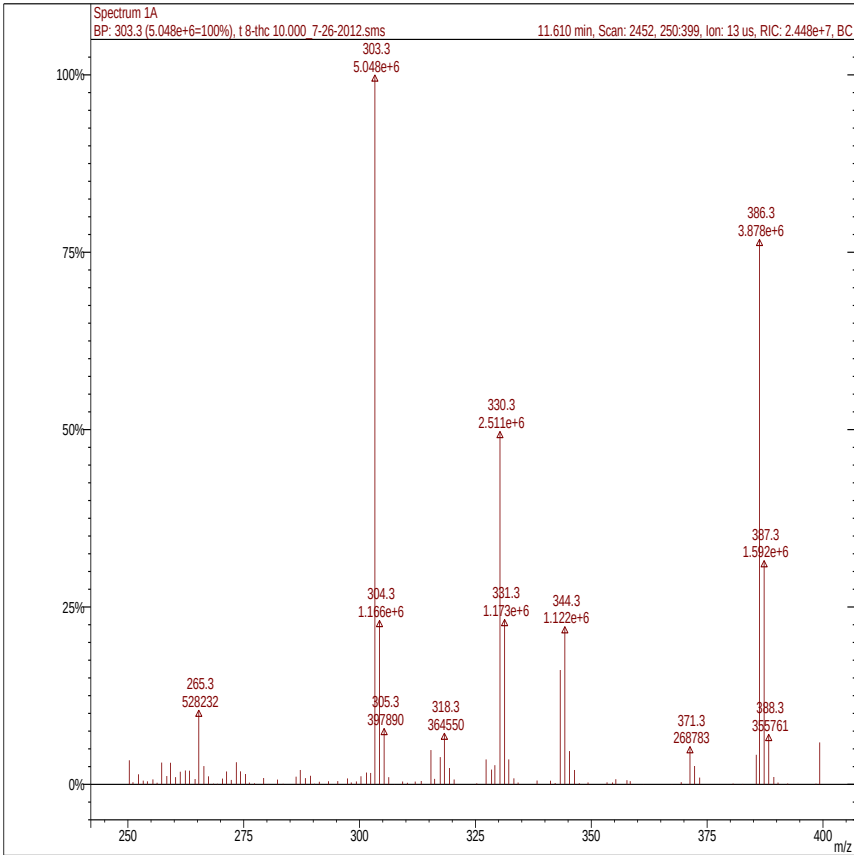


Fig. 4 :	Spettro di Massa dello Standard Interno
	IONI MOLECOLARI: 303-330-386