

COMPARAÇÃO DA EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM A PRECIPITAÇÃO PROTEICA NA DETERMINAÇÃO DE CANNABINÓIDES EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

Beatriz Martinho¹, Helena M. Teixeira^{2,3}, João Miguel Franco¹, Francisco Corte-Real³, Paula Proença¹

¹Serviço de de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF (Coimbra, Portugal)
²Departamento de Investigação, Formação e Documentação do INMLCF (Coimbra, Portugal)
³Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (Coimbra, Portugal)

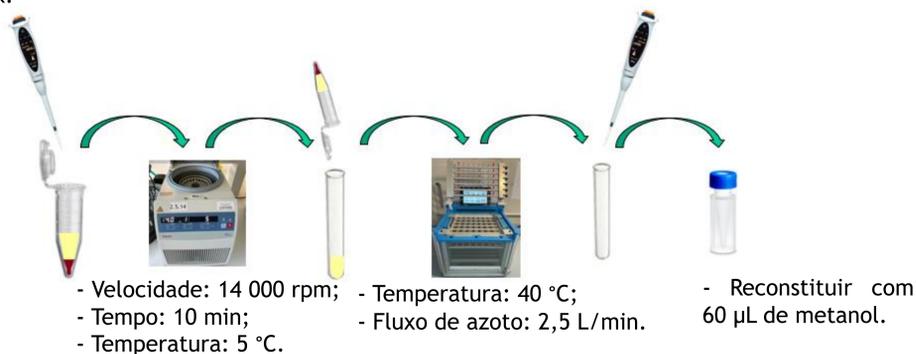
Introdução

A extração em fase sólida (SPE) tem sido uma das técnicas extrativas mais utilizadas no laboratório do Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) na confirmação e quantificação de canabinóides, estando este procedimento acreditado. No entanto, importa sempre procurar metodologias analíticas que possam apresentar mais vantagens e suprimir aspetos menos satisfatórios, como por exemplo, custos, processos laboriosos, entre outros. Neste sentido, a introdução da precipitação proteica como técnica extrativa na rotina laboratorial pode demonstrar-se uma mais valia para o SQTF.

Material e Métodos

1º Preparação da amostra- Precipitação proteica

- 100 µL de amostra;
- 100 µL de metanol:água (1:1, V/V) ou 100 µL de soluções de referência de diferentes concentrações;
- 30 µL de padrão interno (THC-d₃; THC-OH-d₃; THC-COOH-d₃);
- 900 µL de acetonitrilo (2-8) °C;
- Vortex.



2º Preparação da amostra- Extração em fase sólida

- De acordo com o procedimento acreditado no SQTF (Simões, Ajenjo, & Dias, 2011);

Extração em fase sólida

- Cartuchos Waters Oasis HLB® de 3 mL;
 - Acondicionamento: 2 mL de metanol LC-MS/MS;
2 mL de água LC-MS/MS;
 - Aplicação da amostra;
 - Lavagem: 2 mL de água:acetonitrilo:NH₄OH (90:10:1, V/V/V)
 - Secagem das colunas: 20 min sob vácuo;
 - 1º passo de eluição: 2 mL de acetato de etilo;
 - Secagem das colunas: 10 min sob vácuo;
 - 2º passo de eluição: n-hexano:acetato de etilo:ácido acético (88:10:2, V/V/V)
- Evaporação das amostras sob corrente de azoto a 40 °C;
- Reconstituir com 60 µL de metanol.

2º LC-MS/MS



- Equipamentos: Waters UPLC e Waters TQD;
- Coluna: Acquity UPLC HSS T3 (2,1x50 mm, 1,8 µm)
- Volume de injeção: 10 µL



- Equipamento: Sciex ExionLC e Sciex QTRAP 6500*
- Coluna: Acquity UPLC HSS T3 (2,1x100 mm, 1,8 µm)
- Volume de injeção: 5 µL

Condições LC Gerais

- Temperatura da coluna (°C): 45
- Temperatura das amostras (°C): 15
- Fluxo: 0,4 mL/min
- Fases móveis, em modo gradiente:

- A- Metanol/ Formato de amónio 2 mM (ác. fórmico 0,1%) (95:5, v/v)
- B- Formato de amónio 2 mM (ác. fórmico 0,1%) / Metanol (95:5, v/v)

Condições MS/MS

- ESI, modo positivo
- Gás de colisão (CAD): Medium
- Temperatura (°C): 250
- Curtain Gas: 25
- Ion Spray Voltage (IS): 5500

Resultados e Discussão

- **Waters:** Ruído de fundo, intensidade e área do sinal semelhantes nos resultados obtidos entre os dois procedimentos aplicados (Fig. 1).
- **Sciex:** Menor ruído de fundo e maior intensidade e área do sinal do resultado obtido das amostras preparadas por precipitação proteica (Fig 2).

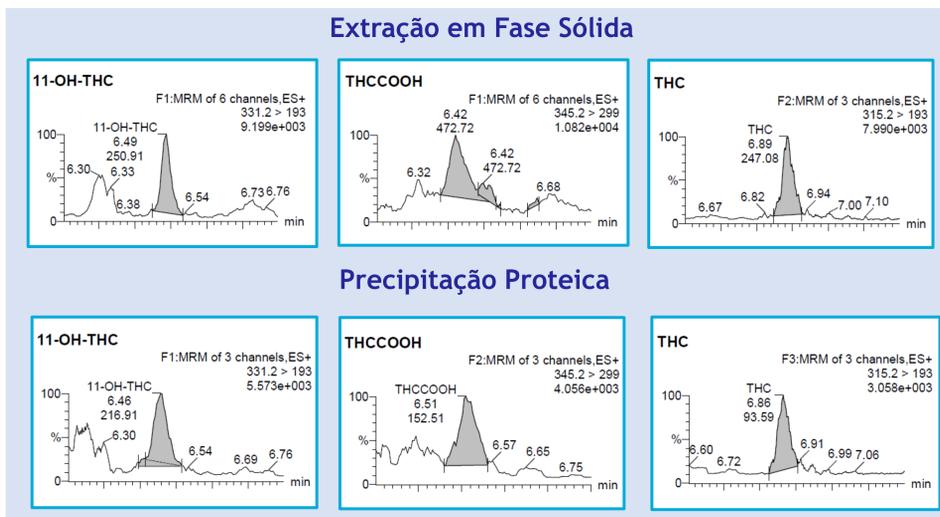


Figura 1. Cromatogramas dos controles a 5 ng/mL preparados por extração em fase Sólida e por precipitação proteica e analisados no equipamento da marca Waters.

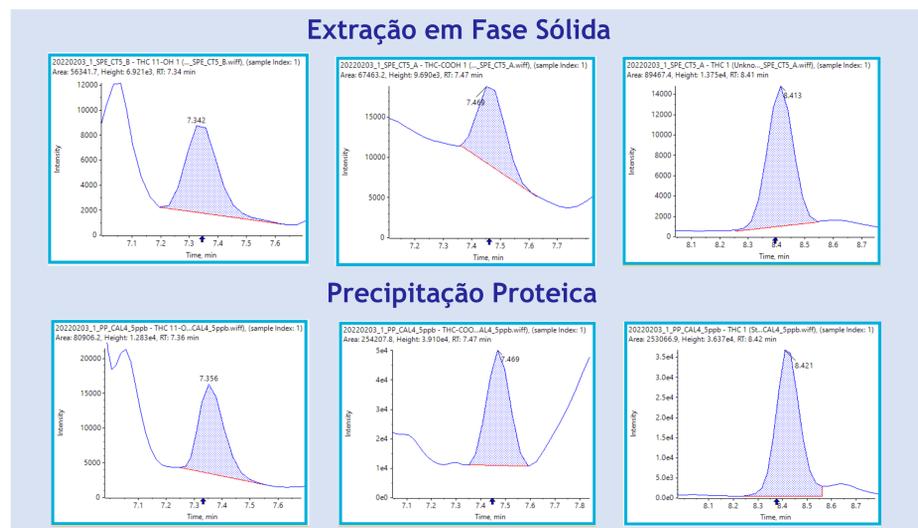


Figura 2. Cromatogramas dos controles a 5 ng/mL preparados por extração em fase Sólida e por precipitação proteica e analisados no equipamento da marca Sciex.

- **Validação:** Repetibilidade, precisão intermédia e exatidão (n=5) com CV < 20%;
 Reprodutibilidade: Resultados satisfatórios em dois ensaios interlaboratoriais;
 Recuperação entre 80,7 e 108,4 (Tabela 1);
 Linearidade: R² > 0,998 (Fig. 3);
 O LD e LQ foi considerado a concentração mínima alvo do SQTF (0,5 ng/mL) (Fig.4).

Tabela 1. Repetibilidade, precisão intermédia, exatidão e recupera a três níveis de concentração (1, 5 e 50 ng/mL).

Análito	Amostra Controlo (ng/mL)	Repetibilidade CV (%)	Precisão intermédia CV (%)	Exatidão CV (%)	Recuperação (%)
THC	1	14,6	5,8	10,3	92,8
	5	3,4	5,0	7,2	92,9
	50	1,3	3,0	4,9	97,3
THC-OH	1	6,7	8,8	13,9	96,1
	5	10,9	7,8	9,1	94,0
	50	5,6	4,3	11,0	95,7
THC-COOH	1	11,2	6,8	18,8	80,7
	5	3,1	8,6	14,1	98,3
	50	6,9	6,8	7,9	108,4

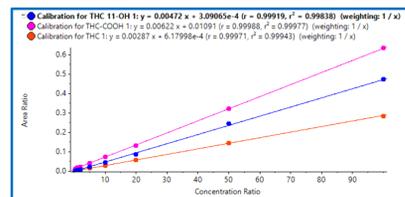


Figura 3. Curvas de calibração dos canabinóides estudados.

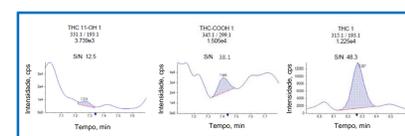


Figura 4. Cromatogramas obtidos a partir de um CAL a 0,5 ng/mL preparados por precipitação proteica com respetiva razão S/N.

Conclusões

A substituição da técnica de extração em fase sólida de 0,5 mL de amostra pela de precipitação proteica de 0,1 mL de sangue no procedimento laboratorial de confirmação e quantificação de canabinóides, torna-o mais simples, rápido e com um menor custo associado. O método validado demonstrou ser seletivo, específico, exato, preciso, robusto e linear na gama de trabalho, cumprindo todos os critérios de aceitação estabelecidos para a análise de canabinóides em amostras de sangue por LC-MS/MS.

Referências: Simões, S. S., Ajenjo, A. C., & Dias, M. J. (2011). Qualitative and quantitative analysis of THC, 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in whole blood by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(18), 2603-2610. doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.5165>