

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DE CANABINÓIDES EM URINA POR MICROEXTRACÇÃO EM SERINGA EMPACOTADA E GC-MS

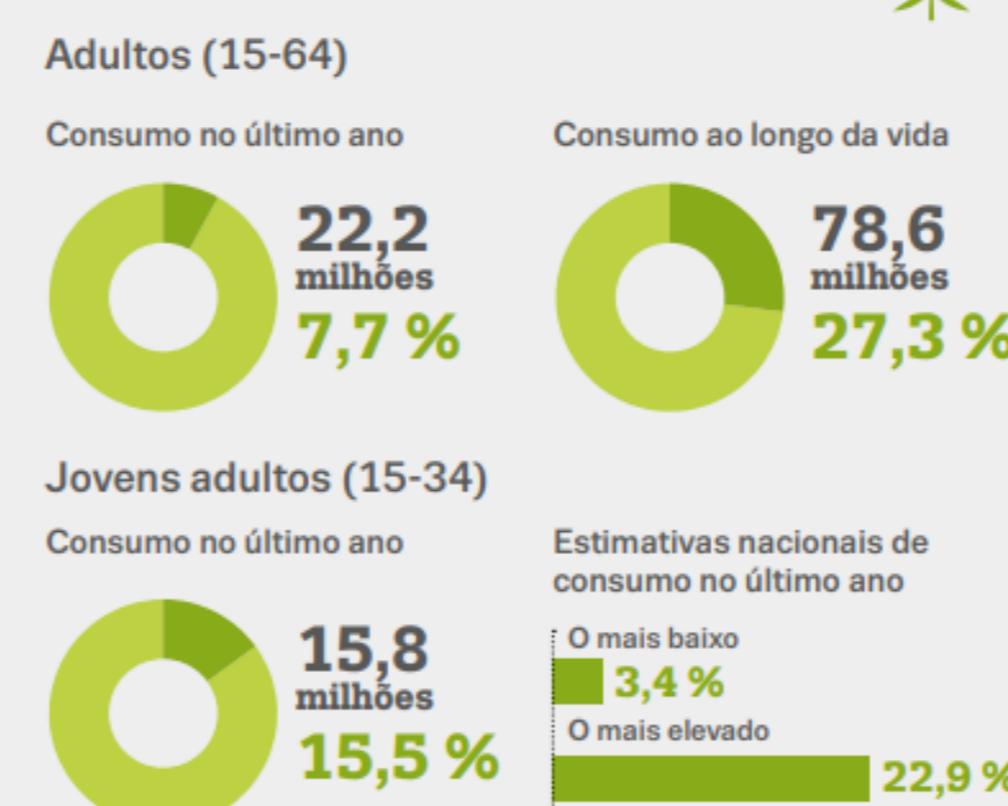
L. M. Rosendo<sup>1</sup>, T. Rosado<sup>1,2</sup>, P. Oliveira<sup>1</sup>, A.Y. Simão<sup>1,2</sup>, C. Margalho<sup>3</sup>, S. Costa<sup>4</sup>, L.A. Passarinha<sup>1,2,5,6</sup>, E. Gallardo<sup>1,2</sup>, M. Barroso<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade da Beira Interior, Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS-UBI), Covilhã; <sup>2</sup>Universidade da Beira Interior, Laboratório de Farmaco-Toxicologia, Ubimedical, Covilhã; <sup>3</sup>Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação Centro, Coimbra; <sup>4</sup>Serviço de Química e Toxicologia Forenses, Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Delegação Sul, Lisboa; <sup>5</sup>UCIBIO-Applied Molecular Bioscience Unit, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica; <sup>6</sup>Associate Laboratory i4HB-Institute for Health and Bioeconomy, Faculdade Superior de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica.

## Introdução

A canábis é a droga ilícita mais consumida em todo o mundo e o seu estatuto legal é atualmente uma fonte de preocupação global. De acordo com o Observatório Europeu da Droga e da Toxicodpendência, no último ano (dados de junho de 2022) existiam aproximadamente 22,2 milhões consumidores de canábis na Europa. A microextração em seringa empacotada (MEPS) é uma versão miniaturizada da SPE e tem várias vantagens, como rapidez, possibilidade de reutilização dos cartuchos e utilização de volumes reduzidos de amostra e solventes orgânicos.

## Canábis



## Objetivo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método com aplicação de MEPS em combinação com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) para a determinação de canabidiol (CBD), canabinol (CBN),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hidroxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), tetrahydrocannabinol (THC-COOH) e 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) em amostras de urina.

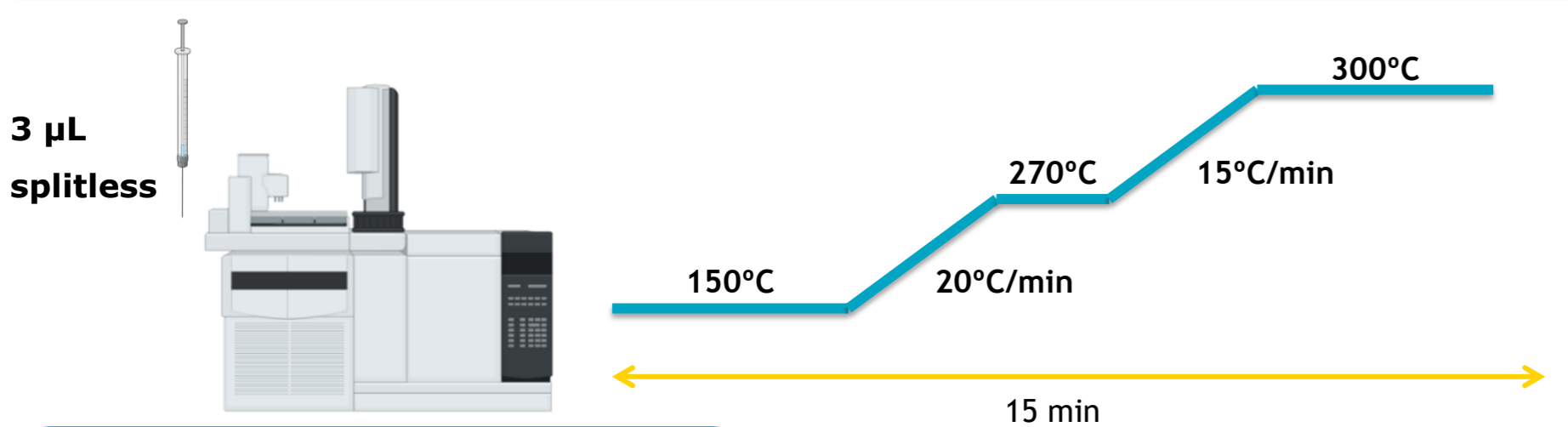
## Materiais e Método

### Reagentes e Instrumentação

- Padrões Analíticos: CBD; THC; CBN; 11-OH-THC; THC-COOH (Sigma-Aldrich)
- Padrões: THC-d3, 11-OH-THC-d3, THC-COOH-d3 (Sigma-Aldrich)
- Matriz Biológica: Urina
- MEPS: Seringa (250  $\mu$ L) e adsorvente (4 mg; 80% C8 and 20% SCX) (SGE Analytical Science)
- Cromatógrafo de gases acoplado a um espectrômetro de massa (GC/MS): Agilent Technologies modelo 5977B operado no modo de ionização por impacto electrónico (EI)
- Coluna Capilar (30m  $\times$  0,25-mm I.D., 0,25- $\mu$ m) with 5% filmetilsiloxano (HP-5 MS)

### Condições Cromatográficas

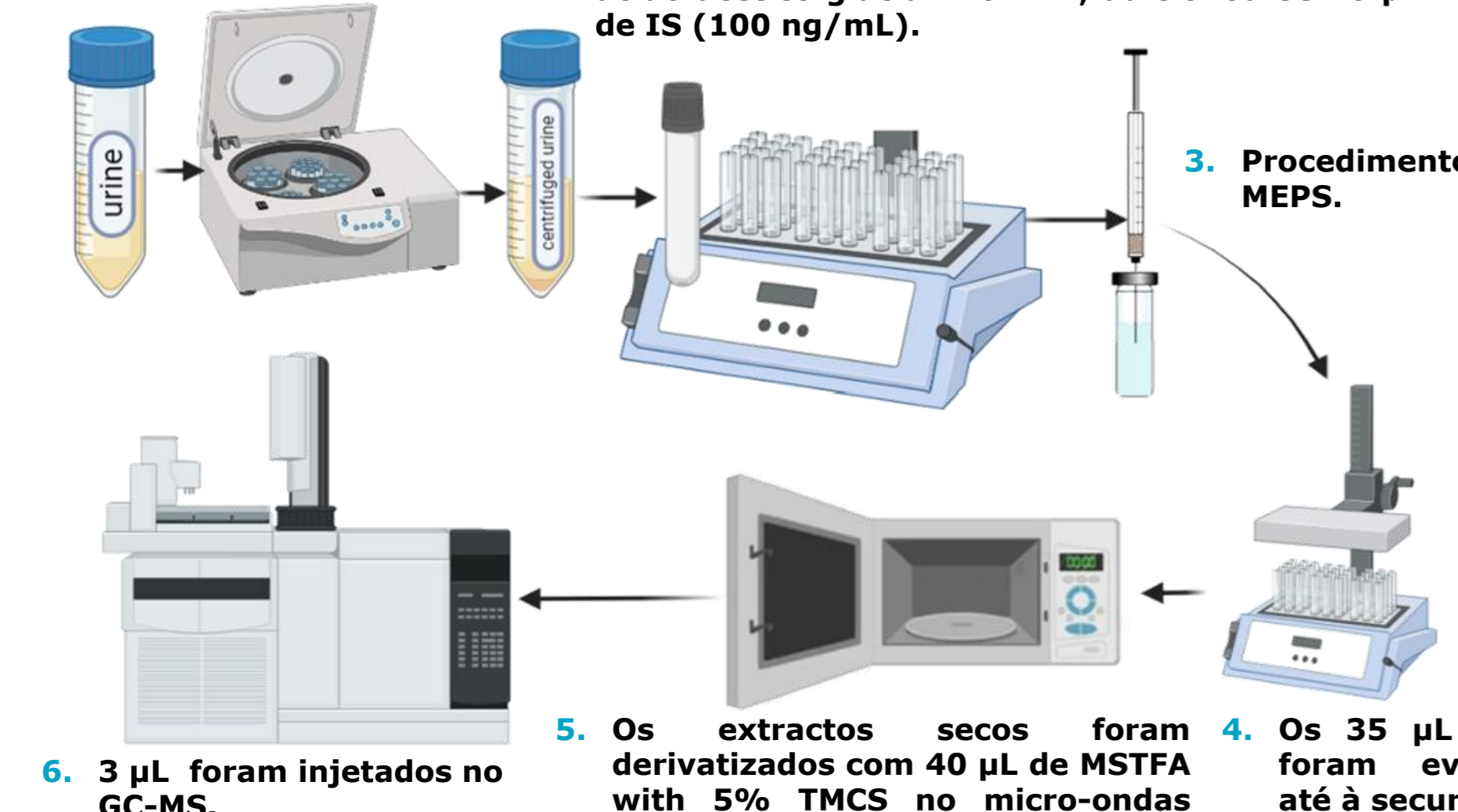
Análito	Tempo de Retenção (min)	Ião Quantificador	Iões Qualificadores
CBD	8,84	390	337; 301
THC	9,57	371	386; 315
THC-d3	9,53	374	-
CBN	10,20	367	382; 310
11-OH-THC	11,56	371	449; 403
11-OH-THC-d3	11,54	374	449; 403
THC-COOH	13,20	371	488; 473
THC-COOH-d3	13,17	374	-



Fluxo de Hélio: 1,0 mL/min  
Temperatura do injetor: 220°C  
Temperatura da fonte: 230°C  
Temperatura do detetor: 280°C  
EI: 70 eV

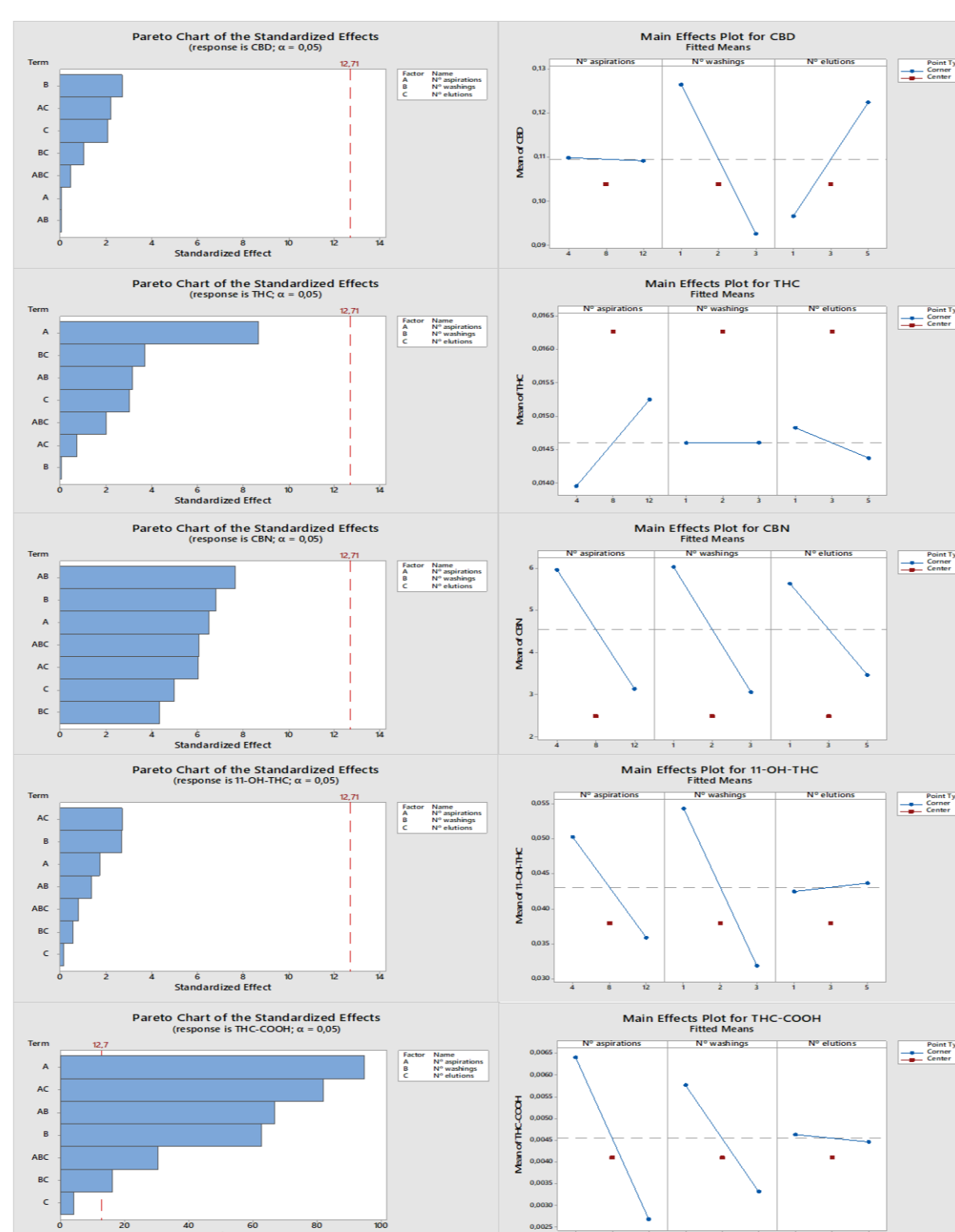
### Procedimento

- Centrifugar a 4500 rpm durante 15 min.
- Hidrólise: a 250  $\mu$ L de urina adicionou-se 10  $\mu$ L de 10M NaOH, que foram incubados a 60°C durante 15 min. Após o arrefecimento a temperatura ambiente, adicionou-se 100  $\mu$ L de ácido acético glacial. Por fim, adicionou-se 20  $\mu$ L de IS (100 ng/mL).
- Procedimento MEPS.
- Os 35  $\mu$ L eluídos foram evaporados até à secura.
- Os extractos secos foram derivatizados com 40  $\mu$ L de MSTFA with 5% TMCS no micro-ondas (800W) durante 2 min.
- Os 3  $\mu$ L foram injetados no GC-MS.

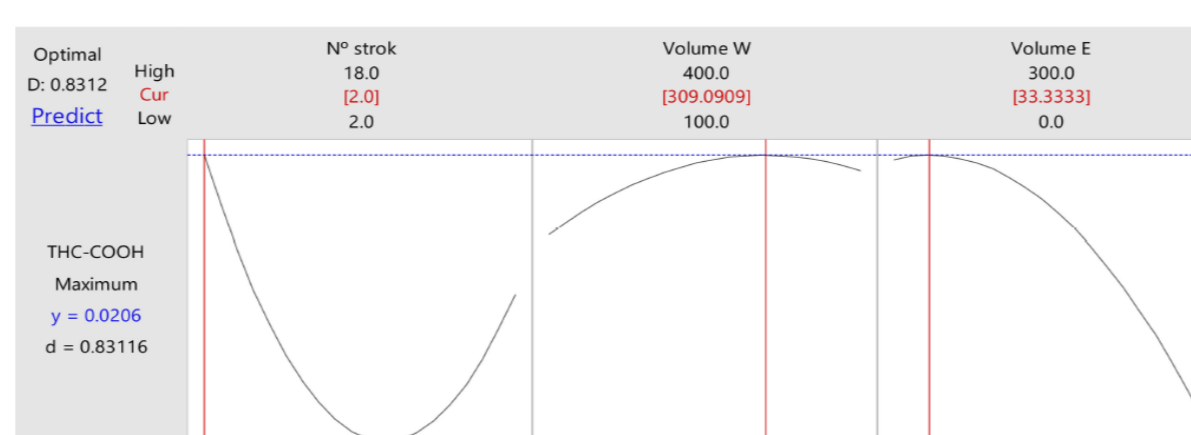


- Procedimento MEPS:**
- Acondicionamento: 1 x 50  $\mu$ L metanol; 1 x 50  $\mu$ L água;
  - Aspiração de amostra: 2 x 150  $\mu$ L amostra de urina;
  - Lavagem: 1 x 310  $\mu$ L 0,1% ácido fórmico em água com 5% isopropanol; 2 x 150  $\mu$ L de ar
  - Eluição: 1 x 35  $\mu$ L de 0,1% hidróxido de amónia em metanol;
  - Lavagem (reconstituição do adsorvente): 4 x 100  $\mu$ L de 0,1% hidróxido de amónia em metanol; acetoneitrilo (1:1); 4 x 100  $\mu$ L de 0,1% ácido fórmico em isopropanol; água (9:1).

### Otimização do Procedimento



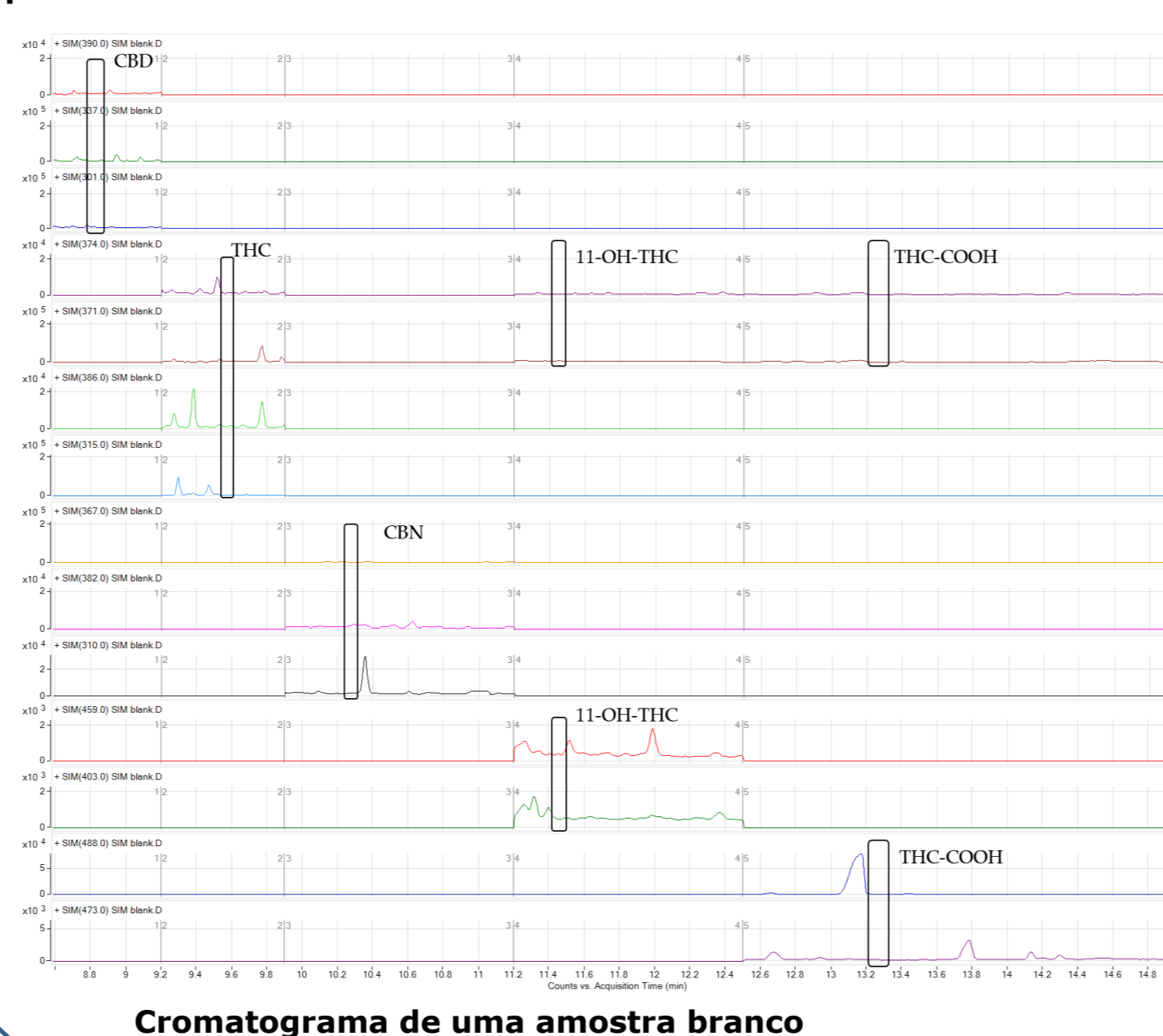
Todos os fatores foram significativos para THC-COOH. Uma vez que, este metabolito é o principal para a confirmação de consumo de canábis, foi necessário realizar uma nova otimização através da metodologia de superfície de resposta.



A reamostra, 309  $\mu$ L de solução de lavagem e 33  $\mu$ L de solução de eluição, que foram arredondados para 310  $\mu$ L e 35  $\mu$ L, respetivamente.

### Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da análise de dez amostras brancas de urina. Além disso, foi verificada a existência de interferências endógenas nos tempos de retenção e iões selecionados para os analitos em estudo



## Resultados

### Linearidade

Compostos	Regressão	Intervalo linearidade (ng/mL)		R <sup>2</sup> *	LOD (ng/mL)	LLOQ (ng/mL)
		Declive <sup>a</sup>	Ordenada na origem <sup>a</sup>			
CBD	1/x	1-400	0,1118 ± 0,0136	2,9449 ± 4,0245	0,9980 ± 0,0014	1
		10	0,0488 ± 0,0089	0,6771 ± 0,1433	0,9990 ± 0,0008	1
		5-400	0,2855 ± 0,0275	0,1373 ± 0,0117	0,9967 ± 0,0030	5
CBN	1/x	1-400	0,0678 ± 0,0033	0,1373 ± 0,0107	0,9983 ± 0,0012	5
		10-400	0,0588 ± 0,0065	0,3577 ± 0,2330	0,9984 ± 0,0010	5
		10-400	0,0588 ± 0,0065	0,3577 ± 0,2330	0,9984 ± 0,0010	5

### Precisão (Inter-dia, intra-dia, e intermédia) e exatidão

Análito	Concentração (ng/mL)	Inter-dias (n = 5)		Intra-dias (n = 5)		Intermédia (n = 15)	
		CV(%)	RE(%)	CV(%)	RE(%)	CV(%)	RE(%)
CBD	1	10,27	6,68	7,67	7,38	-	-
	5	14,26	1,80	10,50	9,06	-	-
	10	9,02	6,34	-	-	-	-
	15	1,04	1,04	10,08	3,04	2,80	1,46
	100	3,13	3,13	9,10	9,55	-	-
	200	1,68	1,68	-	-	9,12	0,43
	240	-	-	-	-	-	-
	300	3,51	3,51	-	-	7,84	4,87
	360	-	-	-	-	-	-
	400	0,49	0,49	9,81	6,98	-	-
THC	1	8,71	0,88	7,27	3,94	-	-
	5	9,23	0,76	5,00	7,51	-	-
	10	9,61	1,39	-	-	-	-
	15	10,00	2,89	9,03	0,76	7,01	3,91
	50	4,49	1,39	9,56	8,52	-	-
	100	2,89	0,79	-	-	7,14	1,35
	240	-	-	-	-	-	-
	300	1,75	1,10	-	-	-	-
	360	-	-	-	-	-	-
	400	1,45	0,79	5,08	7,39	-	-
CBN	5	9,39	4,17	11,37	-	-	-
	10	7,37	0,74	-	-	-	-
	15	0,40	14,69	14,57	6,36	11,71	1,78
	100	0,21	5,01	8,57	9,38	-	-
	200	6,08	0,15	-	-	8,08	6,95
	240	-	-	-	-	-	-
	300	6,44	2,87	-	-	-	-
	360	-	-	-	-	-	-
	400	2,55	2,61	14,72	5,05	-	-
	5	4,54	9,68	3,21	9,83	-	-
11-OH-THC	5	5,60	1,41	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-
	50	6,33	8,67	5,62	2,68	12,11	1,39
	100	2,86	13,80	2,24	0,81	-	-
	200	1,91	0,93	-	-	-	-
	240	-	-	-	-	9,99	2,61
	300	1,01	0,23	-	-	-	-
	360	-	-	-	-	10,52	3,77
	400	2,06	1,34	12,92	1,24	-	-
	10	10,15	3,07	1,48	14,00	-	-
THC-COOH	50	13,26	13,26	12,80	1,77	8,15	4,74
	100	14,41	14,41	3,55	0,08	-	-
	200	1,09	1,15	-	-	-	-
	240	-	-	-	-	-	-
	300	1,71	0,37	-	-	10,95	0,86
	360	-	-	-	-	7,92	5,95
	400	1,45	0,36	13,53	0,94	-	-

### Eficiência de extração $r=3$

Análito	Recuperação (%)		
	50 ng/mL	100 ng/mL	400 ng/mL
CBD	37,9 ± 3,8	42,6 ± 8,1	51,1 ± 7,6
THC	28,0 ± 2,9	30,6 ± 5,8	26,7 ± 3,8
CBN	30,7 ± 3,5	33,7 ± 5,7	57,3 ± 4,7
11-OH-THC	47,7 ± 6,3	66,5 ± 7,2	74,7 ± 12,6
THC-COOH	63,4 ± 12,1	85,8 ± 11,5	82,6 ± 14,9

### Estabilidade

Análito	Concentração (ng/mL)	Amostras processadas (n = 3)		Curto-prazo (n = 3)		Congelamento/descongelamento (n = 3)		
		CV(%)	RE(%)	CV(%)	RE(%)	CV(%)	RE(%)	
CBD	15	1,64	5,01	1,83	10,62	1,69	11,82	
	240	13,36	13,32	1,85	0,27	1,00	14,02	
	360	9,48	0,04	9,22	0,89	5,14	12,45	
	THC	15	0,33	13,40	2,28	12,27	1,95	5,93
	240	2,09	9,09	9,06	6,91	6,45	5,70	
CBN	360	3,91	2,29	6,97	14,36	1,55	3,46	
	15	12,06	3,07	0,86	13,71	6,41	4,89	
	240	9,87	1,59	0,50	13,54	6,36	9,39	
	360	7,29	2,26	0,18	14,52	3,45	8,74	
	11-OH-THC	15	5,14	4,29	6,42	11,98	5,69	6,15
THC-COOH	240	6,65	5,69	6,03	7,62	1,81	13,23	
	360	5,45	2,86	5,67	5,05	1,83	2,27	
	15	14,20	2,70	2,41	12,66	0,21	13,55	
	240	1,12	13,10	0,05	5,90	9,84	2,06	
	360	1,43	0,96	1,43	13,69	6,42	7,92	

### Aplicabilidade do Método

O presente método foi aplicado com sucesso a amostras reais obtidas de consumidores de canábis.

Número da amostra	Concentração (ng/mL)				
	CBD	THC	CBN	11-OH-THC	THC-COOH
1	Negativo	Negativo	4,84	0,04	115,61
2	Negativo	Negativo	6,58	0,30	90,32
3	0,29	Negativo	5,01	0,53	63,56
4	8,36	Negativo	5,11	0,60	21,89
5	1,86	Negativo	4,70	0,43	29,59
6	1,96	Negativo	2,03	5,54	556,18
7	0,90	Negativo	1,00	3,58	6,66



Cromatograma relativo à amostra 6 [CBD (1,96 ng/mL); CBN (2,03 ng/mL); 11-OH-THC (5,54 ng/mL) e THC-COOH (556,18 ng/mL)].

## Conclusão

- Os limites de quantificação obtidos oscilaram entre 1 a 10 ng/mL e as recuperações variaram entre 26-85%.
- O método foi validado com sucesso de acordo com directrizes internacionais e aplicado a amostras reais.
- Esta técnica, juntamente com a sua facilidade de operação, é economicamente apelativa para laboratórios de toxicologia clínica e forense.
- Este é o primeiro método a utilizar a MEPS em combinação com a GC-MS para identificar e quantificar os principais canabinóides na urina (Molecules 2022, 27(17), 5503; <https://doi.org/10.3390/molecules27175503>).