SERVIÇO DE QUÍMICA E TOXICOLOGIA FORENSES - DELEGAÇÃO DO CENTRO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METOLOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE α-PHP EM SANGUE POR GC-MS-EI

Francisca Machado*, João Franco*, Duarte Nuno Vieira, Cláudia Margalho***

*Serviço de Química e Toxicologia Forenses da Delegação do Centro (SQTF-C) do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, INMLCF, I.P..

**Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC).

INTRODUÇÃO

As Novas Substâncias Psicoativas (NSP) são alvo de grande preocupação a nível global, apesar dos contínuos esforços empregues pelos sistemas de controlo nacionais e internacionais para limitar a disseminação destas substâncias. A alfa-pirrolidinohexanofenona (α-PHP) é uma NSP recente, pertencente ao grupo das catinonas sintéticas (o segundo maior grupo de substâncias monitorizadas na Europa), com um reduzido número de estudos publicados acerca da substância. Embora exista uma baixa incidência de consumo de NSP em Portugal, houve um notório aumento recente de doses apreendidas de α-PHP e um consequente aumento de casos detetados da substância em matrizes biológicas durante a realização de análises toxicológicas forenses de rotina de drogas de abuso no SQTF-C DO INMLCF, I.P..

OBJETIVO

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a determinação e quantificação de α-PHP em sangue.

MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento analítico foi devidamente validado segundo a norma publicada pela American Academy of Forensic Sciences (AAFS) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology (ANSI/ASB Standard 036, 2019). Foram usados volumes de 500 µL de amostra de sangue periférico (SP) e cardíaco (SC) aos quais se adicionou o padrão interno, cocaína-d3. Seguidamente foi empregue a extração em fase sólida (SPE) com colunas de troca catiónica de modo misto (Oasis MCX®). Após secagem, os extratos foram reconstituídos em 60 µL de metanol e posteriormente analisados por GC-MS-EI com monitorização de iões (77, 105 e 140) previamente selecionados em modo full-scan (Figura 1).

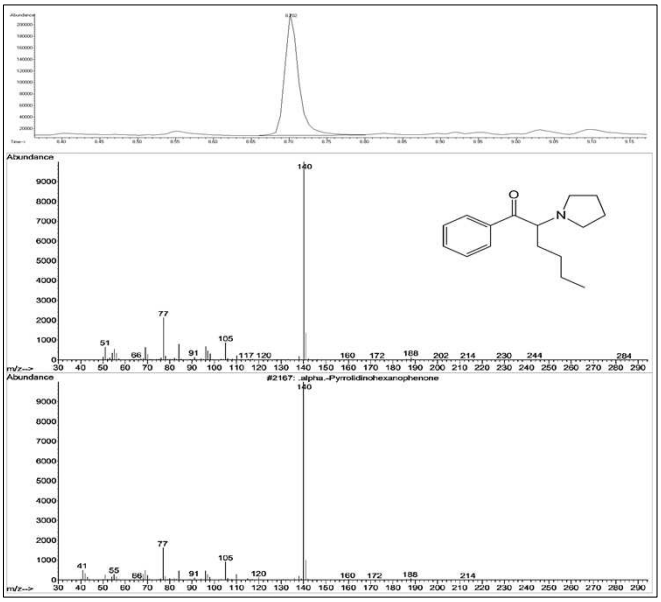

Figura 1. TIC, espetro em *full-scan* e estrutura de α-PHP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método apresentou linearidade entre 10 e 1000 ng/mL, com coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0.999, exatidão de cada calibrador dentro do intervalo de aceitação de ±20% e uma distribuição aleatória dos valores dos residuais em torno da linha zero (Figura 2). Foi alcançado um limite de deteção de 5 ng/mL e um limite de quantificação de 10 ng/mL, tendo a eficiência da extração variado entre 98.5% e 103.3%. O fenómeno de *carryover* não foi observado.

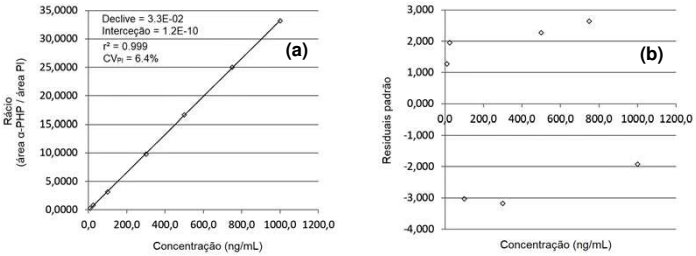

Figura 2. (a) Curva de calibração (n=7) de α-PHP; **(b)** gráfico de distribuição de residuais.

Foram cumpridos os critérios de aceitação para a precisão intra-dia e intermédia (<20%) e para o *bias* (±20%): CV <17.7% e bias <11.6% (Tabela 1). A estabilidade da substância, estudada em amostras reais, foi aceitável por um período de 6h, quando as amostras de sangue foram mantidas à temperatura do laboratório; até 48h, quando as amostras processadas foram mantidas no amostrador automático à temperatura da sala dos equipamentos de GC-MS; e por 21 dias após 5 ciclos de congelamento/descongelamento (Tabela 2).

Tabela 1. Precisão intra-dia (n = 5) e precisão intermédia (n = 20).

	NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO (ng/mL)											
	10			25			100			500		
	Concentração obtida (ng/mL)	CV (%)	*Bias* (%)	Concentração obtida (ng/mL)	CV (%)	*Bias* (%)	Concentração obtida (ng/mL)	CV (%)	*Bias* (%)	Concentração obtida (ng/mL)	CV (%)	*Bias* (%)
PRECISÃO INTRA-DIA	11.2	16.7	11.6	26.3	2.5	5.1	106.0	2.8	6.0	516.1	1.7	3.2
PRECISÃO INTERMÉDIA	10.4	2.4	4.3	26.3	7.0	5.3	105.8	7.6	5.8	520.8	7.3	4.2

Tabela 2. Resultados do estudo da estabilidade de α-PHP (% de diferença) realizado com amostras reais.

Concentração (ng/mL)	Matriz	Bancada (temp. ambiente) (6 horas)	Amostrador automático (48 horas)	Congelamento/Descongelamento (-15ºC) 14 dias (5 ciclos)	Congelamento/Descongelamento (-15ºC) 21 dias (5 ciclos)
27.2	SC	-8.1	1.7	-11.1	-18.3
53.0	SC	-6.8	5.6	-12.3	-18.2
60.9	SC	-8.2	2.2	-10.2	-17.5
76.0	SC	-9.3	-9.8	-9.2	-17.7
100.2	SP	-5.4	9.5	-7.3	-12.3
127.2	SP	-1.7	14.7	-2.5	-4.2
132.7	SP	-1.9	13.9	-1.3	-3.1
170.4	SC	-0.6	6.9	-9.5	-10.0
226.4	SC	-1.1	17.4	-2.3	-3.4

CONCLUSÃO

A técnica analítica GC-MS-EI revelou-se suficientemente sensível para a determinação qualitativa e quantitativa de α-PHP em sangue, apresentando uma grande utilidade para ser usada em qualquer laboratório de toxicologia forense, com ou sem tecnologia mais sofisticada. Este é o primeiro procedimento analítico que combina SPE e GC-MS-EI para a determinação de α-PHP em sangue.