

# VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTIDEPRESSIVOS EM AMOSTRAS DE SANGUE POR LC-MS/MS

Maria Coelho<sup>1</sup>, Teresa Pinho e Melo<sup>2</sup>, João Miguel Franco<sup>1</sup>, Francisco Corte-Real<sup>3,4</sup>, Paula Proença<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF (Coimbra, Portugal)  
<sup>2</sup>Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Departamento de Química (Coimbra, Portugal)  
<sup>3</sup>Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (Coimbra, Portugal)  
<sup>4</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra (Coimbra, Portugal)

## INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

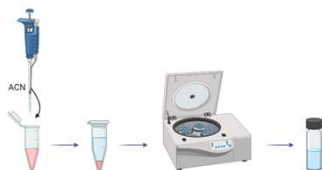
O consumo dos antidepressivos (ADs) tem aumentado drasticamente nos últimos anos, levando a que este grupo de substâncias estivesse incluído no grupo de substâncias que mais causou intoxicações medicamentosas em 2021, revelando o seu grande interesse médico-legal. Este trabalho consistiu na validação de um método analítico para a determinação e quantificação de 20 ADs (amitriptilina, bupropiona, citalopram, clomipramina, dosulepina, duloxetine, fluvoxetina, fluvoxetina, imipramina, maprotilina, mianserina, mirtazapina, nortriptilina, paroxetina, reboxetina, sertralina, tianeptina, trazodona, trimipramina, venlafaxina e vortioxetina) e 10 dos seus metabolitos em amostras de sangue por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS).

### METODOLOGIAS ANALÍTICAS

- 100 µL de amostras biológica;
- 20 µL de padrão interno (PI) (clomipramina-d<sub>3</sub>);
- 100 µL de MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) ou 100 µL de uma mistura padrão com concentração diferente de cada AD.

#### Precipitação proteica:

- 900 µL acetonitrilo (ACN) gelado;
- Agitar no vortex;
- Centrifuga a 14 000 rpm, 5 °C, durante 10 min;
- Diluição do extrato com uma solução de fase móvel nas condições iniciais (1:4, v/v).



#### LC-MS/MS:

- Cromatografia líquida: Sciex ExionLC;
  - Coluna (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)
  - Temperatura da coluna a 45 °C
  - Temperatura do injetor a 15 °C
  - Fase móvel, em modo gradiente:
    - Metanol/ Formato de amónio 2 mM (ác. fórmico 0,1%) (95:5, v/v)
    - Formato de amónio 2 mM (ác. fórmico 0,1%) / Metanol ( 95:5, v/v)
    - Fluxo de 0,4 mL, volume de injeção de 10 µL
- Espectrometria de massa sequencial: Sciex QTRAP 6500\*
  - MRM em modo positivo



Tabela 1: Tempo de retenção e parâmetros de MRM dos ADs.

| Substância                  | Tempo de retenção (min) | Q1 m/z | Q3 m/z       | DP (V)   | EP (V) | CE (V) | CXP (V) |
|-----------------------------|-------------------------|--------|--------------|----------|--------|--------|---------|
| Amitriptilina               | 6,30                    | 278,1  | 233,3/ 91,2  | 80/ 80   | 10/ 10 | 25/ 35 | 10/ 10  |
| Bupropiona                  | 4,80                    | 240,1  | 184,0/ 131,0 | 60/ 60   | 10/ 10 | 25/ 45 | 10/ 10  |
| Citalopram                  | 5,43                    | 325,1  | 109/ 262,1   | 91/ 91   | 10/ 10 | 33/ 27 | 12/ 10  |
| Citalopram-M                | 5,47                    | 311,0  | 109/ 262,0   | 71/ 71   | 10/ 10 | 29/ 23 | 12/ 28  |
| Clomipramina                | 6,71                    | 315,1  | 86,1/ 58,0   | 96/ 96   | 10/ 10 | 23/ 65 | 10/ 8   |
| Clomipramina-M              | 6,77                    | 301,0  | 72,2/ 44,1   | 66/ 66   | 10/ 10 | 19/ 65 | 8/ 20   |
| Dosulepina                  | 5,93                    | 296,1  | 223,0/ 218,1 | 90/ 90   | 10/ 10 | 33/ 33 | 10/ 12  |
| Dosulepina-M                | 6,00                    | 282,0  | 225,0/ 202,0 | 56/ 56   | 10/ 10 | 23/ 67 | 12/ 20  |
| Duloxetine                  | 6,20                    | 298,1  | 154,0/ 44,1  | 30/ 30   | 10/ 10 | 9/ 67  | 10/ 6   |
| Fluoxetina                  | 6,39                    | 310,1  | 44,1/ 148,2  | 60/ 60   | 10/ 10 | 73/ 11 | 6/ 12   |
| Fluoxetina-M                | 6,40                    | 296,0  | 134,1/ 30,2  | 30/ 30   | 10/ 10 | 9/ 45  | 16/ 14  |
| Fluvoxetina                 | 6,34                    | 319,0  | 71,1/ 258,1  | 50/ 50   | 10/ 10 | 19/ 15 | 8/ 10   |
| Imipramina                  | 6,16                    | 281,1  | 86,0/ 58,0   | 61/ 61   | 10/ 10 | 21/ 57 | 10/ 8   |
| Maprotilina                 | 6,21                    | 278,1  | 250,1/ 191,1 | 100/ 100 | 10/ 10 | 25/ 49 | 10/ 12  |
| Mianserina                  | 5,48                    | 265,1  | 208,1/ 58,1  | 91/ 91   | 10/ 10 | 29/ 49 | 12/ 8   |
| Mianserina-M                | 5,59                    | 251,1  | 208,1/ 118,0 | 86/ 86   | 10/ 10 | 29/ 39 | 12/ 14  |
| Mirtazapina                 | 4,25                    | 266,1  | 195,0/ 72,0  | 101/ 101 | 10/ 10 | 33/ 23 | 12/ 8   |
| Mirtazapina-M               | 4,27                    | 252,1  | 195,0/ 209,1 | 141/ 141 | 10/ 10 | 29/ 33 | 18/ 16  |
| Nortriptilina               | 6,38                    | 264,1  | 233,1/ 91,0  | 70/ 70   | 10/ 10 | 19/ 29 | 14/ 10  |
| Paroxetina                  | 6,00                    | 330,4  | 192,3/ 70,2  | 120/ 120 | 10/ 10 | 30/ 49 | 10/ 10  |
| Reboxetina                  | 5,86                    | 314,1  | 176,1/ 90,9  | 40/ 40   | 10/ 10 | 17/ 39 | 8/ 10   |
| Sertralina                  | 6,61                    | 306,0  | 275,1/ 158,9 | 30/ 30   | 10/ 10 | 17/ 33 | 10/ 10  |
| Sertralina-M                | 6,71                    | 291,9  | 158,9/ 129,2 | 10/ 10   | 10/ 10 | 29/ 27 | 18/ 14  |
| Tianeptina                  | 5,63                    | 437,0  | 228,1/ 292,0 | 30/ 30   | 10/ 10 | 49/ 21 | 14/ 10  |
| Trazodona                   | 4,83                    | 372,2  | 176,3/ 148,2 | 81/ 81   | 10/ 10 | 35/ 48 | 10/ 10  |
| m-CPP                       | 4,14                    | 197,1  | 118,1/ 119,0 | 40/ 40   | 10/ 10 | 50/ 34 | 10/ 10  |
| Trimipramina                | 6,36                    | 295,1  | 100,1/ 58,1  | 46/ 46   | 10/ 10 | 23/ 59 | 12/ 14  |
| Trimipramina-M              | 6,16                    | 281,1  | 86,1/ 208,1  | 66/ 66   | 10/ 10 | 21/ 29 | 10/ 24  |
| Venlafaxina                 | 5,14                    | 278,1  | 260,2/ 58,0  | 46/ 46   | 10/ 10 | 17/ 57 | 10/ 8   |
| Venlafaxina-M               | 4,10                    | 264,1  | 58,1/ 107,1  | 46/ 46   | 10/ 10 | 51/ 39 | 26/ 12  |
| Vortioxetina                | 6,86                    | 299,0  | 150,0/ 109,0 | 76/ 76   | 10/ 10 | 33/ 47 | 16/ 12  |
| Clomipramina-d <sub>3</sub> | 6,66                    | 318,1  | 89,0/ 61,0   | 96/ 96   | 10/ 10 | 23/ 65 | 10/ 8   |

### RESULTADOS

- Ausência de interferências no tempo de retenção (TR) dos ADs e no TR do PI, à exceção da amitriptilina e maprotilina que interagem entre si na 2ª transição iónica.
- Nenhum arrastamento nem efeito matriz foi observado para as substâncias estudadas.
- O método demonstrou ser preciso e exato, com um valor de coeficiente de variação (CV) < 20 % (tabela 2).
- A gama de trabalho escolhida para cada AD demonstrou ser adequada e o método linear, com a aplicação do fator de ponderação de 1/x para todos os ADs, exemplo na figura 1. Os limiares analíticos foram calculados a partir das curvas de calibração (tabela 2).

Tabela 2: Repetibilidade, precisão intermédia e exatidão para três controlos (CT1: baixo, CT2: médio e CT3: alto) e limiares analíticos para os ADs estudados.

| Substância     | Repetibilidade CV (%) |      |      | Precisão Intermédia CV (%) |      |      | Exatidão (%) |      |      | LD (ng/mL) | LQ (ng/mL) |
|----------------|-----------------------|------|------|----------------------------|------|------|--------------|------|------|------------|------------|
|                | CT1                   | CT2  | CT3  | CT1                        | CT2  | CT3  | CT1          | CT2  | CT3  |            |            |
| Amitriptilina  | 14,7                  | 13,3 | 9,8  | 16,2                       | 17,7 | 11,1 | -3,8         | 2,6  | 6,2  | 11,5       | 34,8       |
| Bupropiona     | 10,4                  | 9,5  | 11,2 | 11,3                       | 13,6 | 16,5 | -0,4         | 4,1  | 4,5  | 3,7        | 11,1       |
| Citalopram     | 11,3                  | 12,2 | 9,8  | 13,8                       | 16,2 | 12,9 | 2,3          | 0,0  | 6,5  | 12,2       | 36,9       |
| Citalopram-M   | 13,0                  | 13,0 | 10,5 | 14,9                       | 16,8 | 14,4 | 1,0          | -2,2 | 2,6  | 3,2        | 9,7        |
| Clomipramina   | 9,6                   | 11,7 | 5,0  | 12,8                       | 19,3 | 12,4 | 3,4          | 1,6  | 2,2  | 3,3        | 9,9        |
| Clomipramina-M | 11,7                  | 5,0  | 5,0  | 12,5                       | 19,3 | 12,4 | 6,0          | 1,5  | 2,3  | 4,3        | 12,9       |
| Dosulepina     | 15,3                  | 13,2 | 9,8  | 16,5                       | 16,5 | 12,6 | 4,6          | 2,1  | 4,4  | 3,8        | 11,5       |
| Dosulepina-M   | 13,9                  | 13,1 | 11,5 | 15,2                       | 18,4 | 15,7 | 6,6          | -0,7 | 3,1  | 3,5        | 10,5       |
| Duloxetine     | 14,2                  | 11,2 | 7,4  | 19,6                       | 16,7 | 10,7 | 4,5          | -0,4 | 3,2  | 11,8       | 35,6       |
| Fluoxetina     | 12,9                  | 11,2 | 9,0  | 12,5                       | 15,3 | 12,2 | -1,5         | 6,5  | 4,7  | 15,0       | 45,6       |
| Fluoxetina-M   | 17,8                  | 12,5 | 7,8  | 17,9                       | 16,4 | 10,7 | -8,2         | 2,8  | 4,3  | 13,8       | 41,8       |
| Fluvoxetina    | 10,0                  | 12,2 | 8,1  | 12,9                       | 15,7 | 10,8 | 0,0          | 3,7  | 2,6  | 18,7       | 56,7       |
| Imipramina     | 10,0                  | 11,9 | 9,8  | 13,3                       | 15,2 | 13,2 | 3,3          | 3,4  | 4,0  | 10,2       | 30,9       |
| Maprotilina    | 10,9                  | 11,4 | 4,3  | 14,9                       | 16,0 | 8,1  | 5,5          | 5,7  | 2,1  | 9,9        | 30,0       |
| Mianserina     | 13,9                  | 12,5 | 11,8 | 15,6                       | 16,4 | 16,0 | -2,2         | 1,4  | 3,3  | 3,9        | 11,8       |
| Mianserina-M   | 11,6                  | 11,9 | 9,5  | 15,5                       | 15,0 | 11,8 | 1,0          | 7,9  | 6,9  | 2,8        | 8,4        |
| Mirtazapina    | 11,4                  | 13,3 | 12,5 | 13,6                       | 15,8 | 16,8 | 1,6          | 2,4  | 3,2  | 2,3        | 6,9        |
| Mirtazapina-M  | 12,4                  | 12,8 | 11,7 | 14,2                       | 18,7 | 15,7 | 1,0          | 0,1  | 4,6  | 2,7        | 8,1        |
| Nortriptilina  | 11,6                  | 15,3 | 15,6 | 14,2                       | 16,4 | 14,4 | 2,9          | 13,4 | 11,8 | 16,1       | 48,8       |
| Paroxetina     | 16,4                  | 13,1 | 6,8  | 18,1                       | 15,7 | 13,5 | -5,1         | 1,1  | 2,5  | 15,5       | 47,1       |
| Reboxetina     | 9,6                   | 11,8 | 12,3 | 15,1                       | 15,9 | 16,1 | 6,0          | 3,2  | 4,3  | 10,7       | 32,6       |
| Sertralina     | 10,4                  | 11,9 | 10,2 | 14,3                       | 14,8 | 19,2 | 2,4          | 7,6  | 12,8 | 13,6       | 41,1       |
| Sertralina-M   | 15,2                  | 18,2 | 11,8 | 18,4                       | 19,7 | 14,8 | 0,3          | -7,2 | 2,2  | 2,9        | 8,8        |
| Tianeptina     | 11,8                  | 9,9  | 11,8 | 15,1                       | 15,4 | 13,4 | -1,8         | -1,1 | 4,7  | 14,9       | 45,0       |
| Trazodona      | 11,7                  | 14,1 | 11,6 | 16,0                       | 20,0 | 16,7 | 0,6          | -1,6 | 0,6  | 40,1       | 121,6      |
| m-CPP          | 13,1                  | 14,4 | 11,4 | 14,5                       | 18,5 | 16,9 | 2,5          | -0,6 | 3,2  | 2,9        | 8,8        |
| Trimipramina   | 10,8                  | 12,7 | 12,7 | 13,9                       | 15,8 | 15,6 | -0,1         | 5,2  | 7,1  | 10,1       | 30,5       |
| Trimipramina-M | 11,0                  | 11,7 | 10,5 | 15,3                       | 16,6 | 15,5 | 0,2          | 4,5  | 0,3  | 13,9       | 42,1       |
| Venlafaxina    | 11,1                  | 13,0 | 10,5 | 15,1                       | 18,3 | 13,4 | 1,7          | 1,1  | 2,5  | 13,5       | 40,8       |
| Venlafaxina-M  | 10,1                  | 13,2 | 13,3 | 16,5                       | 17,4 | 20,0 | 2,2          | 0,2  | 3,7  | 13,9       | 42,1       |
| Vortioxetina   | 9,2                   | 12,9 | 7,6  | 11,7                       | 18,7 | 12,3 | 2,6          | 3,9  | 6,7  | 2,5        | 7,66       |

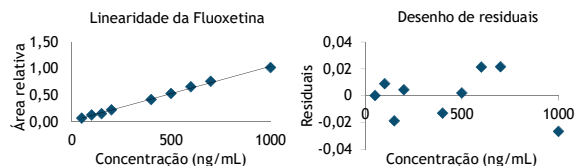


Figura 1: Curva de calibração e gráfico dos resíduos parciais da fluoxetina.

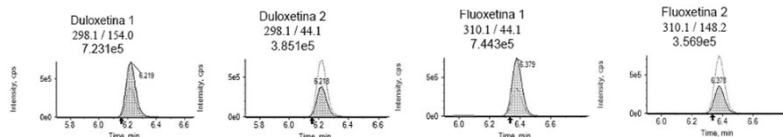


Figura 2: Exemplos de cromatogramas em modo MRM de um controlo alto.

## CONCLUSÕES

O método analítico foi validado seguindo as diretrizes da *Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology da American Academy of Forensic Science (AAFS) Standards Board (ASB)* e pode, deste modo, ser integrado na rotina laboratorial do SQTF do INMLCF I.P. Utilizando apenas 100 µL de matriz biológica, as metodologias analíticas utilizadas neste trabalho tornaram a determinação e quantificação mais rápida, com menos custos associados e muito sensível.