

Separata de LabCiencia

A primeira seção reproduz a versão abreviada do trabalho tal como foi publicada na edição impressa.
A segunda seção (páginas 126 a 129) corresponde ao trabalho integral.



Encaixou!



A solução correta e exata

...para o seu preparo de amostras. Automatizada e configurada individualmente para as suas necessidades. As exclusivas soluções modulares GERSTEL aumentam a eficiência e o desempenho dos seus recursos analíticos GC/MS e LC/MS – de forma segura e sustentável.

- Séries de padrões e diluição
- SPE e SPE online (SPEXOS)
- Headspace dinâmico (DHS), HS e SPME
- Twister e termodessorção/-extração
- Alta produtividade graças à função PrepAhead
- Assistência competente: basta telefonar

O que podemos fazer por você?



Pergunte-nos como a tecnologia GERSTEL poderá ajudá-lo.

GERSTEL

www.gerstel.com

Determinação plenamente automatizada de Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) e de seus metabólitos em amostras de soro por meio de SPE-GC/MS

Introdução

O Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) é o principal composto psicoativo nas folhas de Cannabis. Após consumido, é metabolizado no corpo para o metabólito ativo 11-hidróxi-9-tetraidrocanabinol (THC-OH) e, em seguida, para o metabólito inativo 11-nor-9-carbóxi-9-tetraidrocanabinol (THC-COOH). Como o consumo de Cannabis influencia negativamente a capacidade de dirigir do ser humano [1], a direção sob a influência de THC é proibida na Alemanha e em muitos outros países. Se a concentração sérica ultrapassar 1 ng/mL, a habilitação do motorista pode ser cassada. O padrão de consumo também pode desempenhar um papel importante nesse contexto. Ele pode ser estimado com base nas concentrações do metabólito, uma vez que um alto nível de THC-OH revela um consumo recente de Cannabis, enquanto um nível elevado de THC-COOH indica consumo frequente de Cannabis. Por essas razões, a determinação de THC e dos seus metabólitos no soro sanguíneo é uma tarefa comum nos laboratórios forenses. Muitas vezes lança-se mão da extração de fase sólida para extrair material a analisar e para uma purificação adequada. Muitos laboratórios realizam análises GC/MS/(/MS) que requerem uma etapa de derivação com o fim de compatibilizar os compostos (especialmente o THC-COOH) com a GC [2-6]. Normalmente, o preparo da amostra compreende várias etapas manuais, o que implica uma considerável carga de trabalho com exposição a solventes e

reagentes potencialmente tóxicos e significa maior probabilidade de ocorrência de erros. Portanto, uma automação plena da análise será preferível.

Experimentação

Instrumentação: O preparo de amostra foi realizado em um amostrador MultiPurpose (MPS) na versão Dual Head (cabecote duplo) equipado com módulo de extração de fase sólida (SPE) e uma estação evaporadora MultiPosition mVAP (todas da GERSTEL), montados em um sistema GC/MS (figura A). O cabecote autoamostrador à direita foi equipado com uma seringa de 2,5 mL utilizada em todas as etapas de preparo de amostras (exceto a adição de MSTFA para derivação); a da esquerda foi equipada com uma seringa de 10 μ L utilizada para injeção no GC. Todos os solventes e amostras foram dosados pela seringa de 2,5 mL para proporcionar um fluxo controlado e repetitivo pelo cartucho de SPE. Para a extração utilizaram-se cartuchos SPE convencionais cortados no topo e equipados com adaptadores para transporte, bem como agulhas de seringa. Tais cartuchos são fornecidos comercialmente por várias empresas (Macherey & Nagel, Agilent, Sigma-Aldrich, Phenomenex, Bekolult, etc.). Um trabalho precedente mostrou ser possível transferir diretamente e automatizar procedimentos manuais de SPE desde que se apliquem dimensões padrão de leito adsorvente de cartuchos SPE. Todo o processo pode ser confortavelmente controlado por meio do software GERSTEL MAESTRO [7, 8]. A secagem do cartucho SPE pode ser feita por meio de uma linha de suprimento de gás conectada à seringa. Frascos e cartuchos selados minimizam o risco de contaminação da amostra e a perda de solventes. O módulo mVAP facilita a evaporação de eluatos sob condições controladas de vácuo, temperatura e agitação.

O MPS foi montado em um GC 6890 acoplado a um MSD 5973 para análise GC/MS. A amostra foi introduzida na coluna analítica por meio de um injetor hot split/splitless, VF-1 ms 25 m, di = 0,2 mm, df = 0,33 μ m (todas da Agilent Technologies).



Figura A: Instrumentário para a determinação automatizada de THC e metabólitos em soro sanguíneo. Amostrador Dual Head MultiPurpose (MPS) equipado com agitador, estação de lavagem padrão, bandejas para frascos de eluato, cartuchos de SPE e amostras, módulo SPE, duas estações de carregamento de solvente (SFS), estação evaporadora Multi-Position (mVAP) e estação de frascos de solvente (da esquerda para a direita). Cabecote esquerdo com seringa de 10 μ L para injeção, cabecote direito com seringa de 2,5 mL para as etapas de preparo de amostras. Sistema GC/MS: Agilent GC 7890 / MSD 5977 (Agilent Technologies).

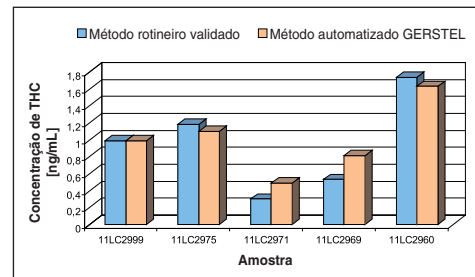


Figura B: Comparação dos resultados de análise obtidos por meio do método analítico rotineiro validado e o método automatizado GERSTEL para THC próximo do limite de quantificação.

Materiais, solventes e produtos químicos: As amostras foram extraídas com cartuchos de extração de fase sólida de 1 mL C18ec 100 mg (Macherey & Nagel, 730011MPS, Alemanha). Esses cartuchos de SPE padrão podem ser adquiridos diretamente com adaptador para transporte e agulha de seringa, o que facilita a automação de SPE.

Todos os solventes e sais eram de grau analítico. A N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) foi adquirida da Macherey & Nagel. Para enxaguar os frascos de eluato e de calibragem utilizou-se uma solução de silicone em isopropanol (Serva Electrophoresis, 35130, Alemanha), com subsequente secagem a temperatura ambiente ou em estufa antes da aplicação para análise.

Preparo de padrões e soluções: Os padrões de THC, THC-OH e THC-COOH, todos de 1 mg/mL em metanol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Prepararam-se três soluções de trabalho, de 500, 50 e 5 ng/mL em metanol por produto a analisar a partir das soluções primárias (com concentração 10 vezes superior!). Essas soluções de trabalho foram usadas para calibragem e amostras de controle aleatório.

Os padrões de 0,1 mg/mL de THC-D3 e THC-OH-D3 e de 1 mg/mL de THC-COOH-D3 foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Passando por uma diluição intermediária a 1:100, preparou-se uma solução padrão de trabalho interna respectivamente de 60 ng/mL de THC-D3 e THC-OH-D3, e de 600 ng/mL de THC-COOH-D3. Adicionou-se um volume de 50 µL dessa solução a cada amostra, calibrador e amostra de controle.

Resultados e Discussão

O método rotineiro validado original empregava cartuchos de SPE de 3 mL para 200 mg de C18ex da UCT

(EUA) e amostra de 1 mL de volume. Como esses cartuchos não estão prontamente disponíveis, testaram-se cartuchos de formato GERSTEL da Macherey & Nagel com nominalmente o mesmo material adsorvente e de mesmo peso. Os traços de produto em análise e de fundo foram equivalentes para todos os compostos e ambos os cartuchos. Também os resultados analíticos foram essencialmente equivalentes. Portanto, empregaram-se cartuchos Macherey & Nagel em todas as medições subsequentes.

Outra questão importante a esclarecer foi se os resultados analíticos do método plenamente automatizado e os do método rotineiro validado seriam comparáveis. Para provar isso, analisaram-se amostras aleatórias em baixas concentrações por meio de ambos os métodos. Da figura B depreende-se que os resultados obtidos por meio dos dois métodos com concentrações de THC próximas do limite de quantificação coincidem bem. Os resultados de análise dos dois metabólitos também apresentaram boa coincidência.

Uma questão importante para a validação de um sistema automático de análise é testar o arraste de amostra para amostra. O desempenho do sistema quanto ao arraste foi testado pela análise de seis amostras de soro aleatórias com altas concentrações dos produtos em análise (60 ng/mL de THC e THC-OH, 600 ng/mL de THC-COOH). Depois de cada amostra, analisou-se uma prova branca de soro. Não se detectou nenhum arraste relevante nos cromatogramas da prova branca.

Depois de se ter provado com sucesso esses pontos, passou-se a buscar uma otimização adicional do método automatizado: reduziu-se a escala do método mediante o uso de um cartucho C18ex de 1 mL para 100 mg em lugar do C18ex de 3 mL

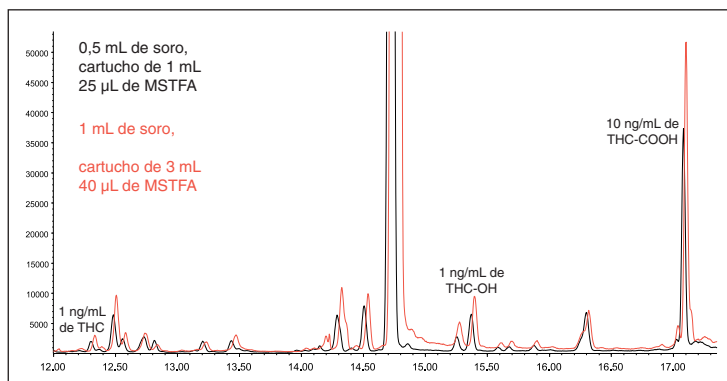


Figura C: O método plenamente automatizado otimizado (cromatograma preto) gera áreas de picos analíticos similares às do método de análise rotineiro original, com pouco menos de fundo.

Viene da página 13

Tabela: Dados de validação para o método de análise plenamente automatizado segundo as diretrizes GTFCh [9].

Produto em análise	Limite de detecção [ng/ml]	Limite de quantificação [ng/ml]	Repetitividade [%]			Repetitividade interdiária [%]			Eficiência de extração [%]		
			1.2	5.5	25	1.2	5.5	25	1.2	5.5	25
			ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
THC	0,3	0,7	5,2	7,2	3,8	7,8	7,2	6,7	75	74	70
THC-OH	0,3	0,9	3,5	10	3,5	16,3	10	6,9	93	82	86
THC-COOH	<1	5	3,7	6,6	3,3	8,6	7,1	7,1	83	79	87

para 200 mg, e reduzindo-se correspondentemente todos os volumes de solventes. O volume da amostra de soro foi reduzido de 1 mL para 0,5 ml. Após extração e limpeza, a amostra foi reconstituída em 25 µL de MSTFA em vez de 40 µL. Conforme se observa na figura C, os resultados obtidos com os dois métodos coincidiram bem. As alturas dos picos do produto em análise foram similares, enquanto os níveis do sinal de fundo apareceram levemente reduzidos com o emprego de volumes menores.

O método final foi validado (vide tabela). Os critérios de validação foram cumpridos – alguns dos dados constam da tabela. Atingiram-se limites de quantificação inferiores a 1 ng/mL com THC e THC-OH, eficiências extrativas entre 70 e 93 % e repetitividades entre 3,3 e 10 % (repetitividades interdiárias respectivamente entre 6,7 e 16,3 %). A calibragem foi realizada com emprego de padrões à base de solvente, o que se tornou possível porque em todos os produtos a analisar se utilizaram padrões internos deuterados. Além disso, já se havia provado antes que as linhas de calibragem de padrões aleatórios de soro e solvente são equivalentes. As linhas de calibragem e os resultados da análise foram calculados com

base na altura dos picos. Novamente isso foi possível porque se adotaram padrões internos. Quando se utilizam as alturas de picos para o cálculo, os patamares de coeluição e a ausência de separação na linha básica – muito prováveis quando se adota a detecção MS quádrupla simples para matrizes complexas – não influenciam negativamente os resultados das análises.

O software GERSTEL MAESTRO integrado na ChemStation ou MassHunter Agilent controla todo o processo de preparo de amostra. A sobreposição automática do preparo de amostra e de análise cromatográfica capacita o sistema GC/MS a operar com plena capacidade, uma vez que a próxima amostra sempre estará preparada e pronta para introdução assim que a etapa de GC/MS se completar.

Conclusão

- Um método de análise rotineiro semiautomático validado para THC e seus principais metabólitos foi transferido com sucesso para um sistema de análise plenamente automatizado.
- Os resultados analíticos do método plenamente automatizado são precisos, exatos e comparáveis

com o método analítico rotineiro semiautomático.

- Os dados de validação na tabela foram coletados segundo as diretrizes GTFCh e os critérios de validação foram cumpridos.
- O sistema é altamente flexível e abre a possibilidade de automatizar outros fluxos de trabalho de preparo de amostras estabelecidos em diferentes campos de aplicação.

Oliver Lerch, Susanne Rose
Gerstel GmbH & Co. KG,
Eberhard-Gerstel-Platz 1,
D-45473 Mühlheim an der Ruhr,
Alemanha

Lars Radünz, Hans-Werner Schütz,
Jasna Neumann, Gertrud Rochholz
Centro Médico Universitário de
Schleswig Holstein, Departamento
de Medicina Forense, Arnold-Heller-
Straße 3, 24105 Kiel, Alemanha

Gerstel, Alemanha

Nota do editor:

Esta é uma versão abreviada,
Consulte a versão completa em
www.labciencia.com.

Determinação plenamente automatizada de Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) e de seus metabólitos em amostras de soro por meio de SPE-GC/MS

Resumo

Esta nota apresenta um sistema analítico plenamente automatizado para a determinação de Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) e dos seus metabólitos em soro sanguíneo. A automação baseia-se no amostrador GERSTEL MultiPurpose (MPS) e em um módulo para evaporação automatizada de eluatos (estação de evaporação GERSTEL Multi-Position, mVAP).

Transferiu-se e automatizou-se por meio do sistema descrito um método de análise semiautomático validado utilizado em análises de rotina. Realizaram-se aperfeiçoamentos, como a redução do volume da amostra de soro de 1 para 0,5 mL e a adoção de cartuchos de SPE de menos de 1 mL. O método de análise foi validado segundo as diretrizes GTFCh (Sociedade de Química Toxicológica e Forense), tendo-se alcançado limites de quantificação inferiores a 1 ng/mL de THC e THC-OH, eficiências extrativas entre 70 e 93 % e desvio padrão relativo entre 3,3 e 10 %. O sistema SPE providencia o preparo de amostras em paralelo com a análise cromatográfica, habilitando o sistema GC/S a operar com máxima produtividade e plena capacidade.



Figura 1: Instrumentário para a determinação automatizada de THC e metabólitos em soro sanguíneo. Amostrador Dual Head MultiPurpose (MPS) equipado com agitador, estação de lavagem padrão, bandejas para frascos de eluato, cartuchos de SPE e amostras, módulo SPE, duas estações de carregamento de solvente (SFS), estação evaporadora Multi-Position (mVAP) e estação de frascos de solvente (da esquerda para a direita). Cabeçote esquerdo com seringa de 10 μ l para injeção, cabeçote direito com seringa de 2,5 ml para as etapas de preparo de amostras. Sistema GC/MS: Agilent GC 7890 / MSD 5977 (Agilent Technologies).

Termos-chave: THC, THC-OH, THC-COOH, soro, extração em fase sólida (SPE), automação, GC/MS

Introdução

O Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC) é o principal composto psicoativo nas folhas de Cannabis. Após consumido, é metabolizado no corpo para o metabólito ativo 11-hidróxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC-OH) e, em seguida, para o metabólito inativo 11-nor-9-carbóxi- Δ^9 -tetraidrocanabinol (THC-COOH). Como o consumo de Cannabis influencia negativamente a capacidade de dirigir do ser humano [1], a direção sob a influência de THC é proibida na Alemanha e em muitos outros países. Se a concentração sérica ultrapassar 1 ng/ml, a habilitação do motorista pode ser cassada. O padrão de consumo também pode desempenhar um papel importante nesse contexto. Ele pode ser estimado com base nas concentrações do metabólito, uma vez que um alto nível de THC-OH revela um consumo recente de Cannabis, enquanto um nível elevado de THC-COOH indica consumo frequente de Cannabis.

Por essas razões, a determinação de THC e dos seus metabólitos no soro sanguíneo é uma tarefa comum nos laboratórios forenses. Muitas vezes lança-se mão da extração em fase sólida para extrair material a analisar e para uma purificação adequada. Muitos laboratórios realizam análises GC/MS(/MS) que requerem uma etapa de derivatização com o fim de compatibilizar os compostos (especialmente o THC-COOH) com a GC [2-6]. Normalmente, o preparo da amostra compreende várias etapas manuais, o que implica uma considerável carga de trabalho com exposição a solventes e reagentes potencialmente tóxicos e significa maior probabilidade de ocorrência de erros. Portanto, uma automação plena da análise será preferível.

Experimentação

Instrumentação

O preparo de amostra foi realizado em um amostrador MultiPurpose (MPS) na versão Dual Head (cabeçote duplo) equipado com módulo de extração em fase sólida (SPE) e uma estação evaporadora MultiPosition mVAP (todos da GERSTEL), montados em um sistema GC/MS (figura 1). O cabeçote autoamostrador à direita foi equipado com uma seringa de 2,5 mL utilizada em todas as etapas de preparo de amostras (exceto a ad-



Figura 2: Acima: Cartucho de extração em fase sólida configurado para SPE GERSTEL automatizada. Abaixo: Cartucho de extração em fase sólida.

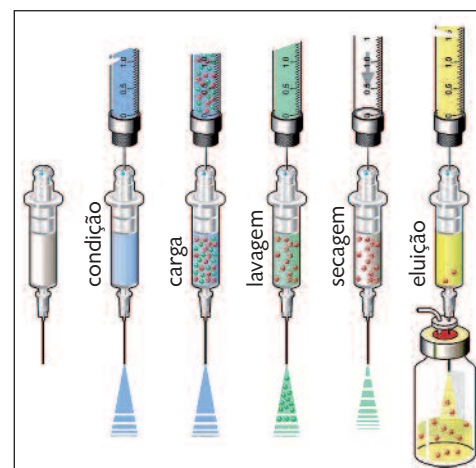


Figura 3: Fluxo de trabalho de SPE automatizada com o módulo SPE GERSTEL.

ção de MSTFA para derivatização); a da esquerda foi equipada com uma seringa de 10 μ l utilizada para injeção no GC. Todos os solventes e amostras foram dosados pela seringa de 2,5 mL para proporcionar um fluxo controlado e repetitivo pelo cartucho de SPE. Para a extração utilizaram-se cartuchos SPE convencionais cortados no topo e equipados com adaptadores para transporte, bem como agulhas de seringa (figura 2). Tais cartuchos são fornecidos comercialmente por várias empresas (Macherey & Nagel, Agilent, Sigma-Aldrich, Phenomenex, Bekolult, etc.). Um trabalho precedente mostrou ser possível transferir diretamente e automatizar procedimentos manuais de SPE desde que se apliquem dimensões padrão de leito adsorvente de cartuchos SPE. Todo o processo pode ser confortavelmente controlado por meio do software GERSTEL MAESTRO [7, 8].

A figura 3 mostra o fluxo de trabalho automatizado. A secagem do cartucho SPE pode ser feita por meio de uma linha de suprimento de gás conectada à seringa. Frascos e cartuchos selados minimizam o risco de contaminação da amostra e a perda de solventes. O módulo mVAP facilita a evaporação de eluatos sob condições controladas de vácuo, temperatura e agitação.

O MPS foi montado em um GC 6890 acoplado a um MSD 5973 para análise GC/MS. A amostra foi introduzida na coluna analítica por meio de um injetor hot split/splitless, VF-1 ms 25 m, $d_i = 0,2$ mm, $d_f = 0,33$ μ m (todos da Agilent Technologies).

Materiais, solventes e produtos químicos

As amostras foram extraídas com cartuchos de extração em fase sólida de 1 mL C18ec 100 mg (Macherey & Nagel, 730011MPS, Alemanha). Esses cartuchos de SPE padrão podem ser adquiridos diretamente com adaptador para transporte e agulha de seringa, o que facilita a automação de SPE. Todos os solventes e sais eram de grau analítico. A N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA) foi adquirida da Macherey & Nagel. Para enxaguar os frascos de eluato e de calibragem utilizou-se uma solução de silicone em isopropanol (Serva Electrophoresis, 35130, Alemanha), com subseqüente secagem a temperatura ambiente ou em estufa antes da aplicação para análise.

Preparo de padrões e soluções: Os padrões de THC, THC-OH e THC-COOH, todos de 1 mg/mL em metanol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Prepararam-se três soluções de trabalho, de 500, 50 e 5 ng/mL em metanol por produto a analisar a partir das soluções primárias (com concentração 10 vezes superior!). Essas soluções de trabalho foram usadas para calibragem e amostras de controle aleatório.

Os padrões de 0,1 mg/mL de THC-D3 e THC-OH-D3 e de 1 mg/mL de THC-COOH-D3 foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Passando por uma diluição intermediária a 1:100, preparou-se uma solução padrão de trabalho interna respectivamente de 60 ng/mL de THC-D3 e THC-OH-D3, e de 600 ng/mL de THC-COOH-D3. Adicionou-se um volume de 50 μ L dessa solução a cada amostra, calibrador e amostra de controle.

Condições de análise

MPS: volume injetado: 3 μ L
 Temperatura do revestimento: 280°C
 Material do revestimento: taper simples, desativado (Agilent)
 Modo de injeção: splitless, 2 min
 Sistema pneumático: He 134,5 kPa, pressão constante
 Estufa: 160 °C (1 min); 10 °C/min; 180 °C (8 min); 5 °C/min; 220 °C (4 min); 15 °C/min; 270 °C (5 min); 10 °C/min; 300 °C (5 min)
 Pós-passagem: 325 °C (2 min); 350 kPa
 Coluna: VF-1 ms (Agilent) 25 m, $d_i = 0,2$ mm, $d_f = 0,33$ μ m
 Linha de transferência: 300 °C
 Modo MSD: Monitoramento iônico selecionado (SIM)
 Temperatura da fonte: 230 °C

Massas de SIM:

m/z (THC): 386, 371, 303
 m/z (THC-D3): 389, 374, 306
 m/z (THC-OH): 371, 474, 459
 m/z (THC-OH-D3): 374, 477, 462
 m/z (THC-COOH): 371, 473, 488
 m/z (THC-COOH-D3): 374, 476, 491

Preparo das amostras

Etapas de preparo manual das amostras:

- Diluir uma amostra de 500 μ L de soro com 500 μ L de ácido acético a 10 % e 50 μ L de solução de trabalho de padrão interno.
- Se houver precipitado visível, centrifugar a mistura, transferir a parte sobrenadante para um frasco limpo e colocá-lo na bandeja do auto-amostrador.

Estas etapas também poderiam ter sido automatizadas, já que existe uma centrifuga adequada disponível para o MPS.

Etapas de preparo automatizado das amostras:

- Condicionar o cartucho do SPE com respectivamente 2 mL de metanol, água deionizada e ácido acético 0,1 M.
- Introduzir toda a amostra no cartucho do SPE.
- Lavar o cartucho do SPE com respectivamente 2 mL de ácido acético 0,1 M e uma mistura de água e acetonitrila (40/60 v/v).
- Secar o cartucho de SPE purgando-o por 1 min com uma corrente de nitrogênio.
- Eluir os produtos em análise com 2 x 200 μ L de acetonitrila.
- Evaporar o eluato a 60 °C e 100 mbar até secagem, agitando-o por 5 min a 250 rpm no módulo mVAP.
- Reconstituir em 25 μ L de MSTFA sob agitação (agitador a 750 rpm) por 5 min a temperatura ambiente.
- Injetar 3 μ L da solução no revestimento quente, resultando em simultânea sililação dos produtos em análise, e transferir o material para a coluna de GC.

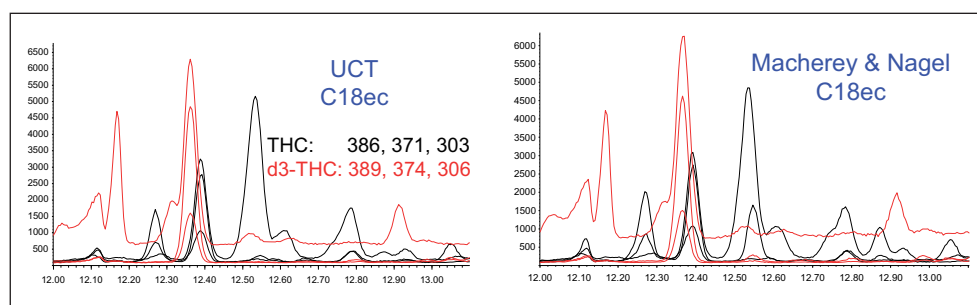


Figura 4: Comparação de cromatogramas com uso de absorventes UCT (esq.) e Macherey & Nagel C18ec para extração de THC (mostrado), THC-OH e THC-COOH. Os materiais absorventes são equivalentes.

Tabela 1: Comparação dos resultados analíticos com uso de absorventes UCT (esq.) e Macherey & Nagel C18ec para a extração de THC (mostrado), THC-OH e THC-COOH. Os materiais absorventes são equivalentes.

Produto em análise	THC [ng/mL]	THC-OH [ng/mL]	THC-COOH [ng/mL]	Produto em análise	THC [ng/mL]	THC-OH [ng/mL]	THC-COOH [ng/mL]
Amostra 1	1,7	1,8	17,5	Amostra 1	1,8	1,6	18,2
Amostra 2	1,7	1,6	18,9	Amostra 2	1,8	1,7	19
Amostra 3	1,9	2	20,5	Amostra 3	1,7	1,7	19,5
Amostra 4	1,8	1,7	19,4	Amostra 4	1,8	1,9	20,5
Amostra 5	1,8	1,7	17,5	Amostra 5	1,7	1,7	18,6
Mean	1,8	1,8	18,8	Mean	1,8	1,7	19,2
RSD [%]	4,4	8,6	6,8	RSD [%]	3,3	6,5	4,7

Resultados e Discussão

O método rotineiro validado original empregava cartuchos de SPE de 3 mL para 200 mg de C18ec da UCT (EUA) e amostra de 1 mL de volume. Como esses cartuchos não estão prontamente disponíveis, testaram-se cartuchos de formato GERSTEL da Macherey & Nagel com nominalmente o mesmo material absorvente e de mesmo peso. Os traços de produto em análise e de fundo foram equivalentes para todos os compostos e ambos os cartuchos (THC mostrado na figura 4). Também os resultados analíticos foram essencialmente equivalentes (tabela 1). Portanto, empregaram-se cartuchos Macherey & Nagel em todas as medições subsequentes.

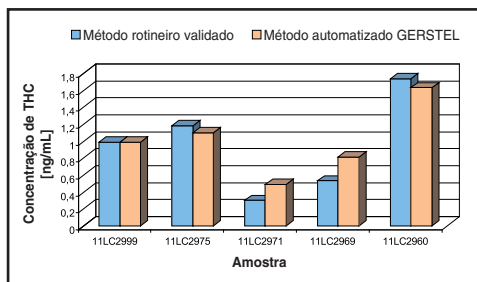


Figura 5: Comparação dos resultados de análise obtidos por meio do método analítico rotineiro validado e o método automatizado GERSTEL para THC próximo do limite de quantificação.

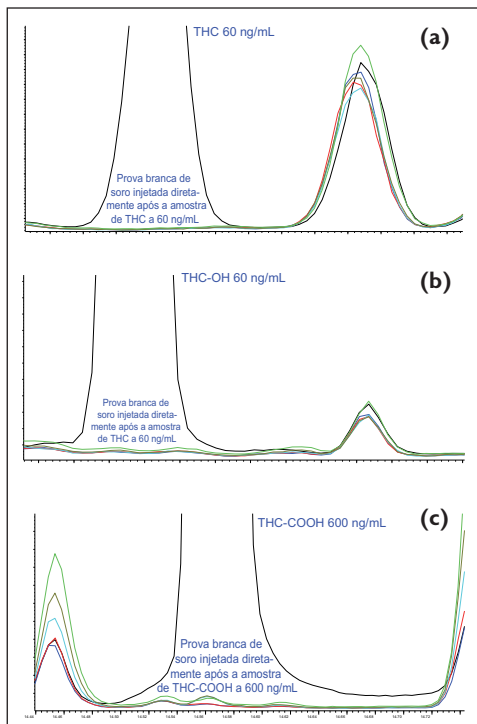


Figura 6: O método de análise plenamente automatizado não revela arraste de (a) THC, (b) THC-OH y (c) THC-COOH.

Outra questão importante a esclarecer foi se os resultados analíticos do método plenamente automatizado e os do método rotineiro validado seriam comparáveis. Para provar isso, analisaram-se amostras aleatórias em baixas concentrações por meio de ambos os métodos. Da figura 5 depreende-se que os resultados obtidos por meio dos dois métodos com concentrações de THC próximas do limite de quantificação coincidem bem. Os resultados de análise dos dois metabólitos também apresentaram boa coincidência.

Uma questão importante para a validação de um sistema automático de análise é testar o arraste de amostra para amostra. O desempenho do sistema quanto ao arraste foi testado pela análise de seis amostras de soro aleatórias com altas concentrações dos produtos em análise (60 ng/mL de THC e THC-OH, 600 ng/mL de THC-COOH). Depois de cada amostra, analisou-se uma prova

branca de soro. Nas figuras 6 a-c não se detectou nenhum arraste relevante nos cromatogramas da prova branca.

Depois de se ter provado com sucesso esses pontos, passou-se a buscar uma otimização adicional do método automatizado: reduziu-se a escala do método mediante o uso de um cartucho C18ec de 1 mL para 100 mg em lugar do C18ec de 3 mL para 200 mg, e reduzindo-se correspondentemente todos os volumes de solventes. O volume da amostra de soro foi reduzido de 1 mL para 0,5 mL. Após extração e limpeza, a amostra foi reconstituída em 25 µL de MSTFA em vez de 40 µL. Conforme se observa na figura 7, os resultados obtidos com os dois métodos coincidiram bem. As alturas dos picos do produto em análise foram similares, enquanto os níveis do sinal de fundo apareceram levemente reduzidos com o emprego de volumes menores.

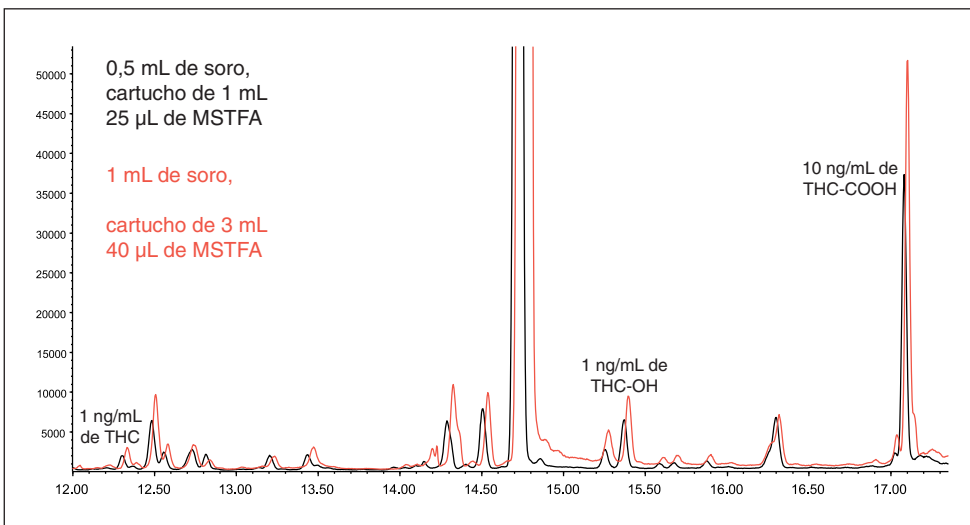


Figura 7: O método plenamente automatizado otimizado (cromatograma preto) gera áreas de picos analíticos similares às do método de análise rotineiro original, com pouco menos de fundo.

Tabela 2: Dados de validação para o método de análise plenamente automatizado segundo as diretrizes GTFCh [9].

Produto em análise	Limite de detecção [ng/mL]	Limite de quantificação [ng/mL]	Repetitividade [%]			Repetitividade interdiária [%]			Eficiência de extração [%]		
			1.2 ng/mL	5.5 ng/mL	25 ng/mL	1.2 ng/mL	5.5 ng/mL	25 ng/mL	1.2 ng/mL	5.5 ng/mL	25 ng/mL
THC	0,3	0,7	5,2	7,2	3,8	7,8	7,2	6,7	75	74	70
THC-OH	0,3	0,9	3,5	10	3,5	16,3	10	6,9	93	82	86
THC-COOH	<1	5	3,7	6,6	3,3	8,6	7,1	7,1	83	79	87

O método final foi validado (vide tabela 2). Os critérios de validação foram cumpridos – alguns dos dados constam da tabela 2. Atingiram-se limites de quantificação inferiores a 1 ng/mL com THC e THC-OH, eficiências extrativas entre 70 e 93 % e repetitividades entre 3,3 e 10 % (repetitividades interdiárias respectivamente entre 6,7 e 16,3 %). A calibragem foi realizada com emprego de padrões à base de solvente, o que se tornou possível porque em todos os produtos a analisar se utilizaram padrões internos deuterados. Além disso, já se havia provado antes que as linhas de calibragem de padrões aleatórios de soro e solvente são equivalentes. As linhas de calibragem e os resultados da análise foram calculados com base na altura dos picos. Novamente isso foi possível porque se adotaram padrões internos. Quando se utilizam as alturas de picos para o cálculo, os patamares de coelusão e a ausência de separação na linha básica – muito prováveis quando se adota a detecção MS quádrupla simples para matrizes complexas – não influenciam negativamente os resultados das análises.

O software GERSTEL MAESTRO integrado na ChemStation ou MassHunter Agilent controla todo o processo de preparo de amostra. A sobreposição automática do preparo de amostra e de análise cromatográfica capacita o sistema GC/MS a operar com plena capacidade, uma vez que a próxima amostra sempre estará preparada e pronta para introdução assim que a etapa de GC/MS se completar.

Conclusão

- Um método de análise rotineiro semiautomático validado para THC e seus principais metabólitos foi transferido com sucesso para um sistema de análise plenamente automatizado.
- Os resultados analíticos do método plenamente automatizado são precisos, exatos e comparáveis com o método analítico rotineiro semiautomático.
- Os dados de validação na tabela 2 foram coletados segundo as diretrizes GTFCh e os critérios de validação foram cumpridos.

- O sistema é altamente flexível e abre a possibilidade de automatizar outros fluxos de trabalho de preparo de amostras estabelecidos em diferentes campos de aplicação.

Referências bibliográficas

- [1] R.A. Sewell, J. Poling, M. Sofuoglu: „The Effect of Cannabis Compared with Alcohol on Driving”, *American Journal of Addiction* 18 (2009) 185
- [2] R.H. Lowe, E.L. Karschner, E.W. Schwilke, A.J. Barnes, M.A. Huestis: „Simultaneous quantification of Δ -9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy- Δ -9 tetrahydrocannabinol (11-OH-THC), and 11-nor- Δ -9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) in human plasma using twodimensional gaschromatography, cryofocusing, and electron impact-massspectrometry”, *Journal of Chromatography A* 1163 (2007) 318
- [3] E.L. Karschner, E.W. Schwilke, R.H. Lowe, W.D. Darwin, H.G. Pope Jr, R. Herning, J.L. Cadet, M.A. Huestis: „Do Δ 9-Tetrahydrocannabinol Concentrations Indicate Recent Use in Chronic Cannabis Users?”, *Addiction* 104 (2009) 2041
- [4] J. Röhrich, I. Schimmel, S. Zörntlein, J. Becker, S. Drobnik, T. Kaufmann, V. Kuntz, R. Urban: „Concentrations of Δ 9-Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9 Carboxytetrahydrocannabinol in Blood and Urine after Passive Exposure to Cannabis Smoke in a Coffee Shop”, *Journal of Analytical Toxicology* 34 (2010) 196
- [5] N. Roth, S. Kneisel, V. Auwärter: „Stabilität von Cannabinoiden in Serumproben nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen und Lagerung in Glas bzw. Kunststoffröhrchen“, *Toxichem Krimtech* 78 (2011) 36
- [6] A. Rickert, T. Gorn, T. Daldrup: „Stabilität von Δ 9-THC, 11-OH-THC und THC-COOH in tiefgekühlten, forensischen Serumproben”, *Toxichem Krimtech* 78 (2011) 373
- [7] F.D. Foster, J.R. Stuff, J.A. Whitecavage, E.A.

Pfannkoch: „Automation of Solid Phase Extraction Methods using a Robotic X-Y-Z Coordinate Autosampler with Software Control”, *GERSTEL AppNote* 03/2009

- [8] F.D. Foster, J.R. Stuff, E.A. Pfannkoch: „Automated Solid Phase Extraction (SPE)-LC-MS/MS Method for the Determination of Acrylamide in Brewed Coffee Samples”, *GERSTEL AppNote* 13/2012
- [9] F.T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, F. Mußhoff, L.D. Paul, B. Aebi, V. Auwärter, T. Kraemer, G. Skopp: „Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden“, *Toxichem Krimtech* 76 (2009) 185

Nota dos autores: "Apenas para fins de pesquisa. Não se destina a procedimentos diagnósticos." As informações proporcionadas para este produto destinam-se apenas a fins referenciais e de pesquisa. A GERSTEL não oferece garantia sobre a qualidade e adequação destes dados para aplicações específicas. As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a alterações sem prévio aviso.

GERSTEL, Alemanha

Oliver Lerch, Susanne Rose
Gerstel GmbH & Co. KG, Eberhard-Gerstel-Platz 1, D-45473 Mühlheim an der Ruhr, Alemanha

Lars Radünz, Hans-Werner Schütz, Jasna Neumann, Gertrud Rochholz
Centro Médico Universitário de Schleswig Holstein, Departamento de Medicina Forense, Arnold-Heller-Straße 3, 24105 Kiel, Alemanha