

Determinação de carboxi-THC em cabelo usando Captiva EMR-Lipid com LC/MS/MS

Autores

Mariá Del Bianco Luppi
JM BioAnalises
Botucatu, SP, Brasil

Simone Nascimento
e Leonardo Valentin
Agilent Technologies, Inc.
Barueri, SP, Brasil

Resumo

Esta nota de aplicação compara dois modelos de LC/MS/MS, o espectrômetro de massas com cromatografia líquida triplo quadrupolo Agilent 6470A e o espectrômetro de massas com cromatografia líquida triplo quadrupolo Agilent 6495C. O estudo resume as técnicas de preparo de amostras adequadas para a complexa matriz do cabelo. Também é apresentado o método final escolhido para verificação ao trabalhar com o Agilent Captiva EMR—Lipid na etapa de limpeza, para atender ao valor de corte de 0,2 ng/g de carboxi-THC no cabelo.

Parte experimental

Materiais e reagentes

Os seguintes materiais foram utilizados:

- Cartuchos Agilent Captiva EMR–Lipid, 3 mL, 300 mg (p/n 5190-1003) para processamento de 40 mg de cabelo, e 1 mL, 40 mg (p/n 5190-1002) ou well plate de 96 poços (p/n 5190-1000) para processamento de 25 mg de cabelo.
- Manifold Vac Elut 20 com rack de coleta para tubos de teste de 16 × 100 mm (p/n 12234103).
- Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 3,0 × 150 mm, 1,9 μm (p/n 693675-312), Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 3 × 5 mm, 1,9 μm, UHPLC guard (p/n 823750-943).
- Filtro em linha Agilent 1290 Infinity II, 0,3 μm (p/n 5067-6189).

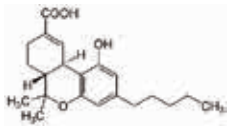
Os seguintes produtos químicos foram utilizados:

- Padrões de carboxi-THC e carboxi-THC-d₃ da Cerilliant e LGC, respectivamente.
- *n*-hexano e acetato de etila (EtOAc) grau GC e metanol (MeOH) grau LC/MS da J.T. Baker.
- Hidróxido de sódio (NaOH) grau ACS e ácido acético da Merck/Sigma.
- Água Milli-Q ultrapura.

Padrões e soluções

- **Hidróxido de sódio 1 M (solução para digestão do cabelo):** NaOH (4 g) foi pesado em um béquer. Após dissolução com 50 mL de água, a solução foi transferida para um frasco volumétrico de 100 mL. O béquer foi lavado com uma pequena quantidade de água

Tabela 1. Analito alvo, log P, fórmula molecular e estrutura química.

Nome	Log P	Fórmula molecular	Estrutura
Carboxi-THC	6,21	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	

por duas a três vezes. A solução foi sonicada por um minuto e calibrada com água até o menisco do frasco volumétrico. A solução foi armazenada em um frasco com tampa de plástico.

Cuidado: há liberação de calor quando água é adicionada ao hidróxido de sódio.

- ***n*-Hexano e EtOAc (9:1 v/v) (solvente da extração do cabelo):** Noventa mililitros de hexano e 10 mL de acetato de etila foram misturados e homogeneizados.
- **MeOH/água (80:20 v/v) (Solvente para o Captiva EMR–Lipid):** Oitenta mililitros de metanol e 20 mL de água ultrapura foram misturados e homogeneizados.
- **Padrão interno (IS) – carboxi-THC-d₃:** A solução de padrão interno contendo 8 ng/mL de carboxi-THC-d₃ foi preparada em MeOH, correspondendo a 8 ng/g nas matrizes.
- **Padrões da curva de calibração– carboxi-THC (CCS):** Seis padrões de calibração foram preparados em MeOH nos níveis de 0,15, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 ng/mL.
- **Solução de controle de qualidade (QC) (carboxi-THC):** Uma solução a 0,2 ng/mL foi usada para controle de qualidade dos lotes. Uma solução a 0,04 ng/mL foi injetada no LC/MS/MS para avaliar a adequação do sistema antes do início da análise.

Método de preparo de amostras

As amostras de cabelo foram lavadas com água, acetona e diclorometano (DCM) em sequência por um minuto no vórtex. O cabelo foi seco e cortado em pequenos pedaços. Posteriormente, o método de preparo de amostra englobou quatro etapas: 1) digestão e pré-limpeza do cabelo, 2) extração líquido-líquido (LLE), 3) Limpeza com o Captiva EMR–Lipid e 4) injeção no LC/MS/MS.

1. Digestão do cabelo

Quarenta miligramas de cabelo negativo foram pesados em um vial do headspace. Recomenda-se o uso de um vial salinizado para evitar que o cabelo grude na parede do vial devido a efeitos eletrostáticos. As amostras de cabelo em branco passaram pelas seguintes adições:

- a) Branco – adicionado 40 μL de padrão interno.
- b) Branco duplo (sem padrão interno).
- c) Os padrões 1 a 6 foram preparados com 40 μL das soluções padrão da curva de calibração, respectivamente, e 40 μL de solução de padrão interno, resultando em concentrações finais de 0,15, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 ng/g de carboxi-THC no cabelo.
- d) No QC houve adições de 40 μL da solução de QC e 40 μL da solução de padrão interno, resultando em uma concentração final de 0,2 ng/g de carboxi-THC no cabelo.
- e) Quarenta microlitros da solução de padrão interno foram adicionados ao restante das amostras que serão testadas no lote.

As amostras de cabelo com adições foram equilibradas por três minutos. Uma alíquota de 2 mL da solução de NaOH 1 M foi adicionada. Os vials foram tampados e incubados a 100°C por 30 minutos e, em seguida, resfriados à temperatura ambiente.

Uma alíquota de 5 mL de *n*-hexano/EtOAc (9:1 v/v) foi adicionada. As amostras foram agitadas em vórtex por um minuto e centrifugadas a 4.000 rpm por cinco minutos para separação clara de fases quando necessário. A camada orgânica superior foi descartada. Uma alíquota de 2 mL de ácido acético foi adicionada e a amostra foi misturada.

Um procedimento alternativo usando 25 mg de cabelo e um cartucho Captiva EMR–Lipid de 1 mL pode ser usado ajustando o volume adequadamente. As Figuras 2 e 3 mostram os fluxos de trabalho do método usando tamanhos de amostra de 40 e 25 mg.

2. Extração líquido-líquido (LLE)

Uma alíquota de 5 mL de *n*-hexano/EtOAc (9:1, v/v) foi adicionada. A amostra foi agitada em vórtex por um minuto e centrifugada conforme necessário. A camada superior foi transferida para outro tubo. Este procedimento de LLE foi repetido mais duas vezes com a camada orgânica superior sendo transferida e combinada. O extrato orgânico combinado foi seco com um fluxo de N₂ a 50°C. A amostra seca foi então reconstituída com 1,5 mL de MeOH/água (8:2 v/v), seguido por 1,5 minuto de sonicação e 30 segundos no vórtex.

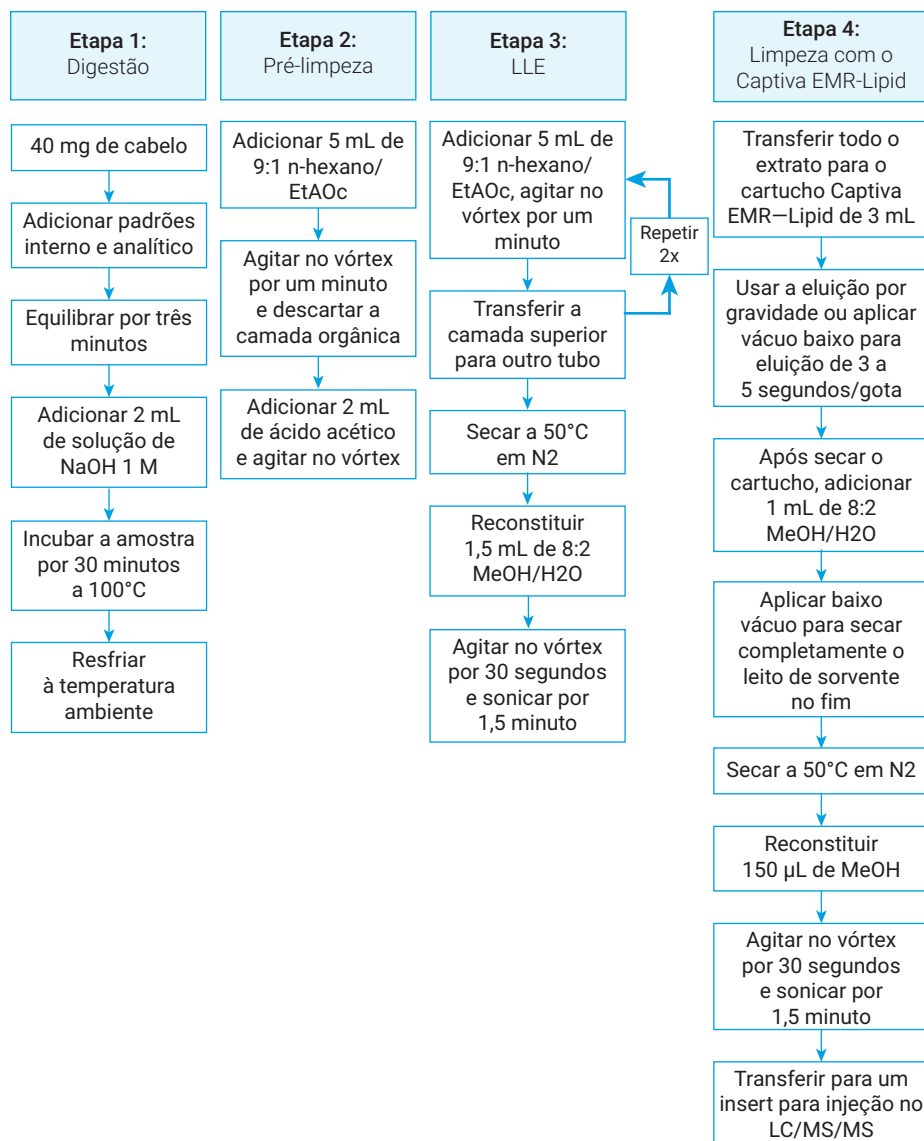


Figura 2. Fluxo de trabalho do preparo de amostra para 40 mg de cabelo usando cartuchos Agilent Captiva EMR–Lipid de 3 mL.

3. Limpeza com o Captiva EMR-Lipid

O volume de 1,5 mL de amostra reconstituída foi transferido para um cartucho Captiva EMR – Lipid de 3 mL. A amostra foi eluída por gravidade com uma vazão de três a cinco segundos por gota. Baixo vácuo foi aplicado conforme necessário. Quando não for possível observar nenhum líquido remanescente no cartucho, uma alíquota de 1 mL de MeOH/água (8:2 v/v) foi adicionada para eluição adicional. Vácuo foi aplicado conforme necessário. O eluente foi seco com um fluxo de N₂ a 50°C. A amostra seca foi reconstituída com 150 µL de MeOH, agitada em vórtex por 30 segundos e sonicada por 1,5 minuto. A amostra foi transferida para um vial de 2 mL com insert para injeção no LC/MS/MS.

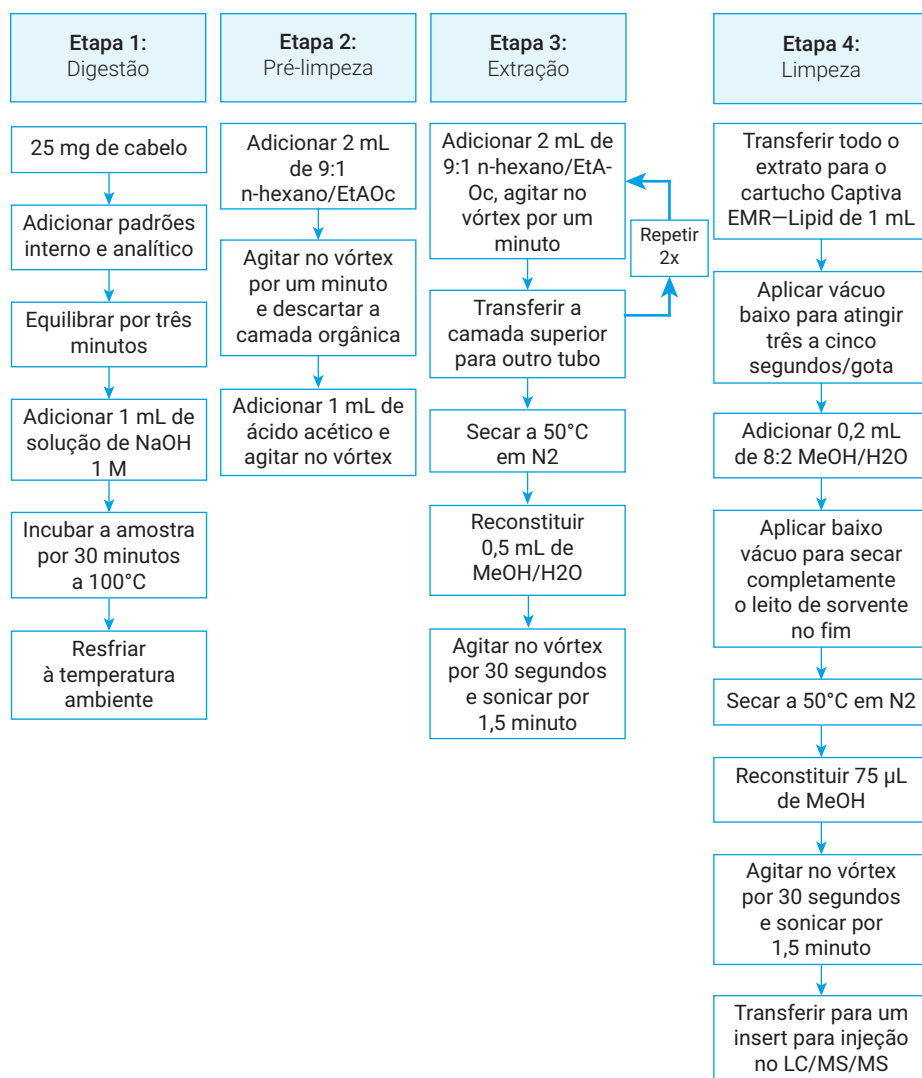


Figura 3. Fluxo de trabalho do preparo de amostra para 25 mg de cabelo usando cartuchos Agilent Captiva EMR-Lipid de 1 mL.

Método do instrumento

As amostras foram analisadas em um LC Agilent 1290 Infinity II acoplado a um espectrômetro de massas com cromatografia líquida triplo quadrupolo Agilent 6495C equipado com uma fonte de ionização eletrospray Agilent Jet Stream iFunnel. As Tabelas 2 e 3 mostram o método do instrumento em detalhes.

Antes da análise diária da amostra, um teste de adequação do sistema foi executado com a injeção de uma solução padrão de 0,04 ng/mL em MeOH.

Tabela 2. Condições do LC/MS/MS.

Parâmetro	Valor																														
Coluna analítica	Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl Hexyl (3,0 × 150 mm; 1,9 µm) e coluna de guarda. Filtro em linha no amostrador automático.																														
Temperatura da coluna	50°C																														
Volume de injeção	5 µL																														
Fases móveis	A) H ₂ O com ácido acético a 0,01% B) MeOH com ácido acético a 0,01%																														
Vazão	0,5 mL/min																														
Gradiente	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tempo (min)</th> <th>%A</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0,00</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr><td>0,50</td><td>55</td><td>45</td></tr> <tr><td>2,00</td><td>25</td><td>75</td></tr> <tr><td>5,00</td><td>25</td><td>75</td></tr> <tr><td>8,00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>9,00</td><td>20</td><td>80</td></tr> <tr><td>9,01</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>12,00</td><td>0</td><td>100</td></tr> <tr><td>12,01</td><td>55</td><td>45</td></tr> </tbody> </table>	Tempo (min)	%A	%B	0,00	55	45	0,50	55	45	2,00	25	75	5,00	25	75	8,00	20	80	9,00	20	80	9,01	0	100	12,00	0	100	12,01	55	45
Tempo (min)	%A	%B																													
0,00	55	45																													
0,50	55	45																													
2,00	25	75																													
5,00	25	75																													
8,00	20	80																													
9,00	20	80																													
9,01	0	100																													
12,00	0	100																													
12,01	55	45																													
Tempo de corrida final	12,02																														
Tempo posterior	3 minutos																														
Tempo de corrida total	15 minutos																														

Tabela 3. Parâmetros de aquisição de dados.

Condições do MS Agilent 6495C	
Modo	MRM
Temperatura do gás de secagem	300°C
Temperatura do vaporizador	450°C
Fluxo do gás de secagem	13 L/min
Pressão do nebulizador	50 psi
Voltagem do capilar	4.500 V
Fluxo do gás de impulsão	12 L/min
Temperatura do gás de focalização	385°C
Voltagem do nozzle	2.000 V
RF de alta pressão (+)	0
RF de alta pressão (-)	130
RF de baixa pressão (+)	0
RF de baixa pressão (-)	140
Delta EMV (-)	800

Nome do composto	Íon precursor	Íon produto	CE	CAV	Polaridade
Carboxi-THC	343,2	245,1	32	4	Negativa
	343,2	191,1	33	3	Negativa
Carboxi-THC d ₃	346,2	302,2	20	3	Negativa
	346,2	194,1	20	3	Negativa

Resultados e discussão

Muitos tipos de preparo de amostras para extrair carboxi-THC do cabelo foram publicados. Esses métodos geralmente incluem três etapas de pré-tratamento: 1) Lavagem da amostra de cabelo, 2) Corte ou pulverização e 3) Pesagem de 10 a 50 mg de cabelo para análise da amostra. Depois disso ocorre a incubação do cabelo em uma solução ácida ou básica, seguida de um solvente orgânico para a extração.

A digestão básica com NaOH foi escolhida para este estudo. A mistura de digestão do cabelo foi então extraída usando LLE e seguida pela limpeza com um cartucho Captiva EMR–Lipid. O método todo fornece recuperações mais altas e supressão mais baixa de íons, resultando na remoção eficiente de sais, proteínas e lipídios. A Tabela 4 mostra a comparação de técnicas típicas de preparo de amostras usadas para extração e limpeza do cabelo.

A curva de calibração apresentou linearidade com $R^2 > 0,99$ dentro da faixa de calibração de 0,15 a 3,2 ng/g em cabelo, com injeções em duplicata e quadruplicata, conforme apresentado na Figura 4. As recuperações permaneceram em média 110%, com 8,8% de RSD para sete replicatas de 0,2 ng/g em cabelo e 101% com 7,8% de RSD para sete replicatas de 0,8 ng/g em cabelo. A Figura 5 mostra que o LC/MS triplo quadrupolo 6495C forneceu uma resposta três vezes maior que a do sistema LC/MS triplo quadrupolo 6470A para o cabelo com adição de carboxi-THC a 0,2 ng/g. A Figura 6 mostra a matriz em branco do cabelo e cinco replicatas no valor de corte para ambos os MRMs.

Tabela 4. Comparação do preparo de amostra para limites de quantificação baixos (0,0002 ng/mg) de carboxi-THC na matriz do cabelo.

Método de preparo de amostras	Vantagens	Desvantagens
LLE	<ul style="list-style-type: none"> Sais e proteínas são removidos da etapa de digestão Fácil de aplicar Ampla variedade de extração de compostos 	<ul style="list-style-type: none"> Os lipídios co-extraídos com os analitos alvo causam problemas analíticos no instrumento Falta de robustez do método com alta supressão de íons
Troca aniônica-SPE com e sem LLE	<ul style="list-style-type: none"> Sais e proteínas são removidos da etapa de digestão O extrato final para injeção é mais limpo do que com LLE Maior recuperação de analitos 	<ul style="list-style-type: none"> Apesar da extração ser mais limpa do que a LLE, ainda apresentou alta supressão de íons Mais etapas no protocolo de extração e limpeza
Troca catiônica-SPE com e sem LLE	<ul style="list-style-type: none"> Sais e proteínas são removidos da etapa de digestão O extrato final para injeção é mais limpo do que com LLE Menor supressão de íons 	<ul style="list-style-type: none"> Extração mais limpa em comparação com a LLE e de troca aniônica, mas menores recuperações de analito Mais etapas no protocolo de extração e limpeza
LLE com Agilent Captiva EMR–Lipid	<ul style="list-style-type: none"> Sais, proteínas e lipídios são removidos da etapa de digestão O extrato final para injeção é mais limpo do que com LLE Menor supressão de íons 	<ul style="list-style-type: none"> Mais etapas no protocolo de extração e limpeza

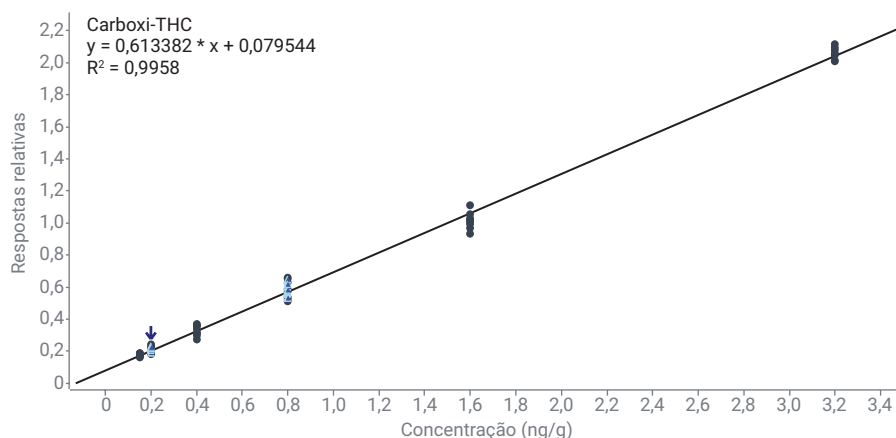
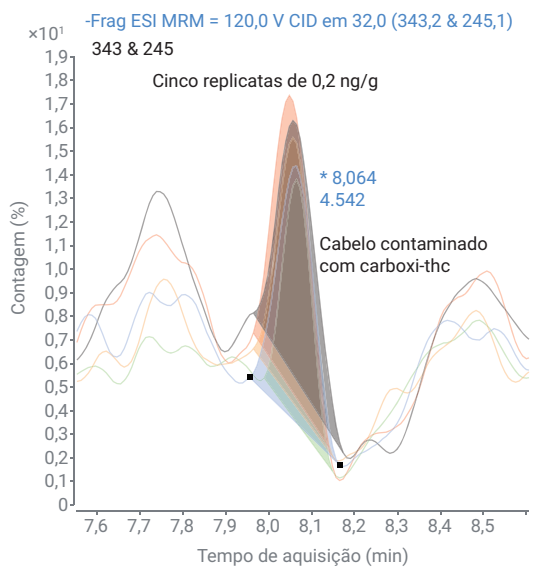
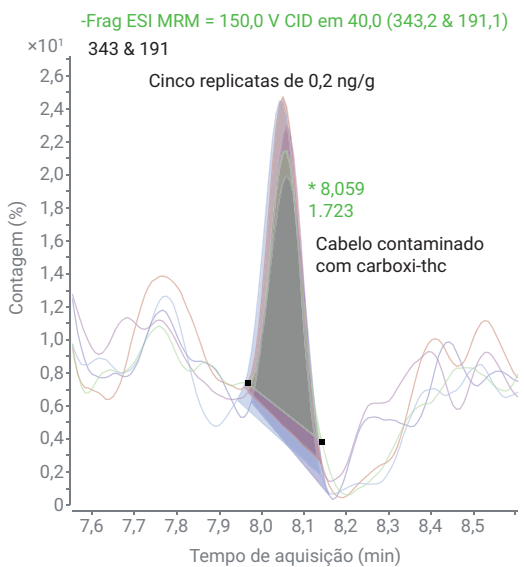


Figura 4. Curva de calibração de 0,15 a 3,2 ng/g de carboxi-THC em cabelo. Os triângulos azuis representam as sete extrações em replicata nos valores de corte de 0,2 e 0,8 ng/g para as amostras QC de cabelo.

Agilent 6470A



Agilent 6495C

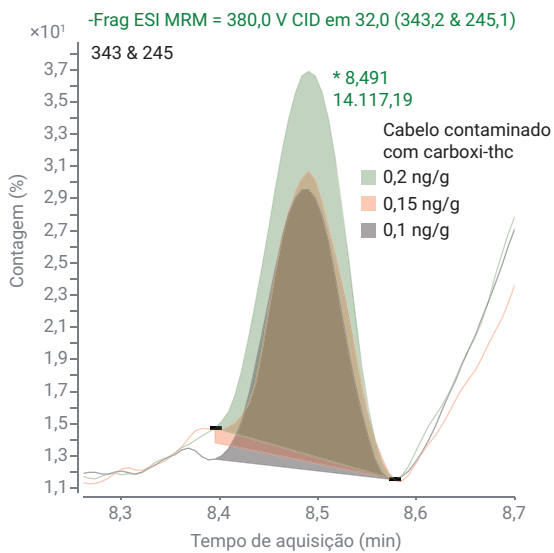
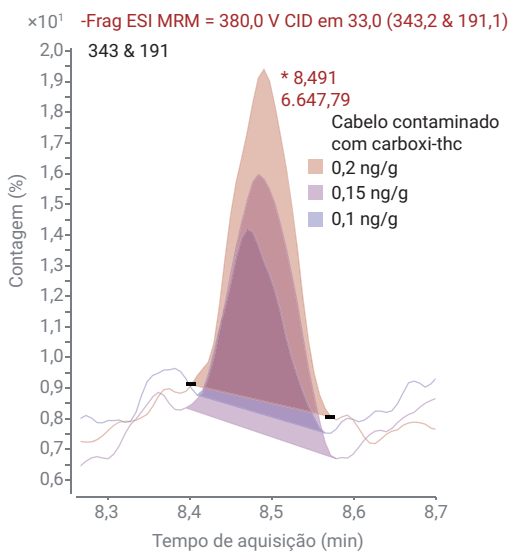


Figura 5. Resultados do carboxi-THC no cabelo a 0,2 ng/g usando o LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6470A e 6495C, respectivamente.

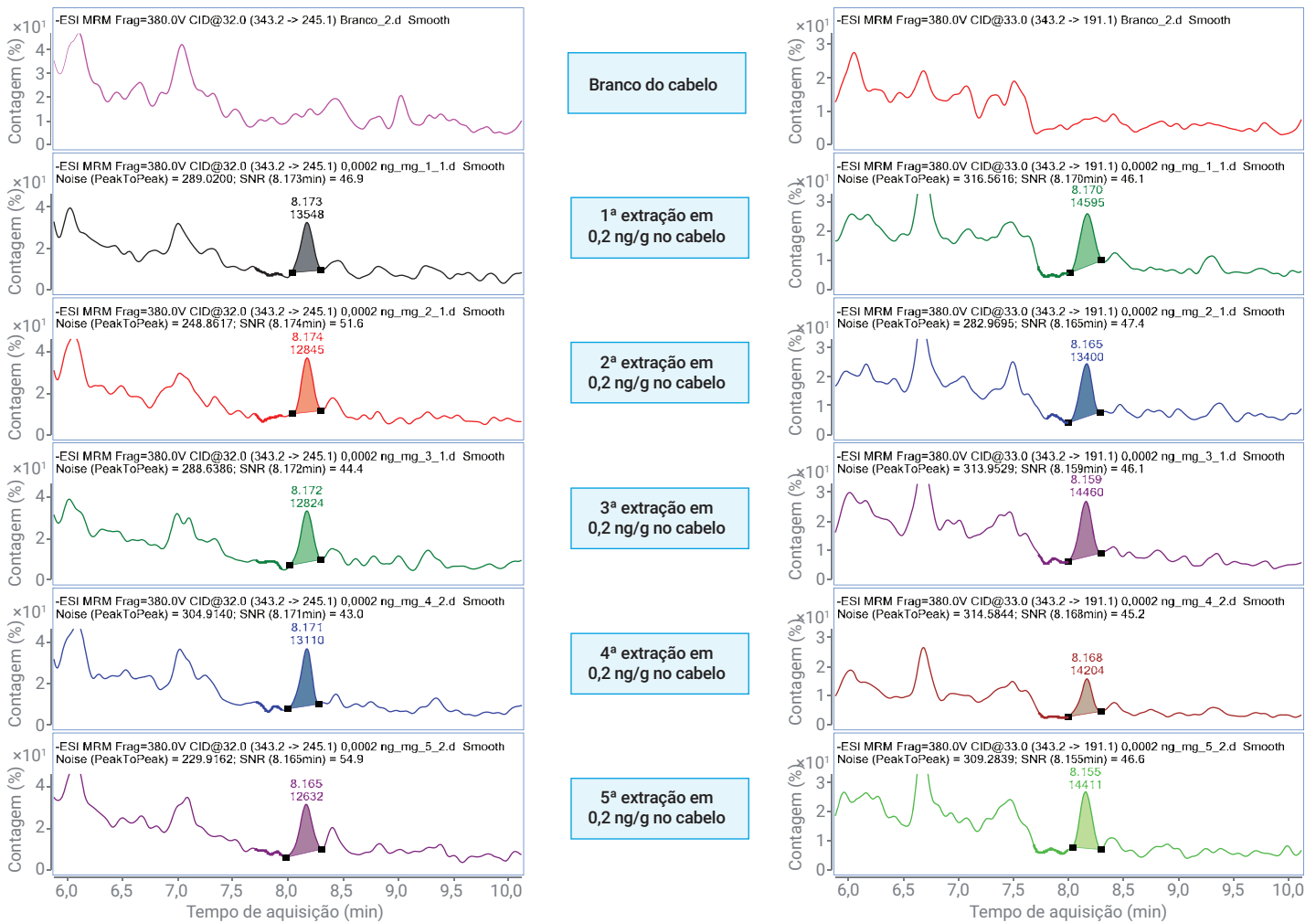


Figura 6. Uma amostra em branco de cabelo e cinco amostras com pré-adição em 0,2 ng/g, com MRM 343,2 → 245,1 e 343,2 → 191,1.

Conclusão

Um método robusto de preparo de amostra usando LLE seguido de limpeza com o Agilent Captiva EMR—Lipid foi desenvolvido e verificado para a análise de carboxi-THC em cabelo usando LC/MS/MS. As amostras de matriz de cabelo também foram analisadas nos sistemas LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6495C e 6470A para comparação de sensibilidade, sendo que o primeiro forneceu melhor sensibilidade. O método foi verificado com robustez e sensibilidade aprimorados. Centenas de amostras já foram avaliadas para análises de rotina usando o método desenvolvido.

Referências

1. Bjoern, M.; Nadine, R.; Auwarter, A. Finding Cannabinoids in Hair Does Not Prove Cannabis Consumption. *Sci. Rep.* **2015**, 14906.
2. SoHT (Society of Hair Testing) official website: <https://www.soht.org/statements/9-nicht-kategorisiert/85-statement-2011>.
3. Baumgartner, W. A.; Hill, V. A.; Bland, W. H. Hair Analysis for Drugs of Abuse. *J. Forensic Sci.* **1989**, 34(6), 1433-1453.
4. Cirimele, V.; Kintz, P.; Mangin, P. Testing Human Hair for Cannabis. *Forensic Sci. Int.* **1995**, 70(1-3), 175-182.
5. Wilkins, D. et al. Quantitative Analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in Human Hair by Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **1995**, 19(6), 483-491.
6. Moore, C.; Guzaldo, F.; Donahue, T. The Determination of 11-Nor-Delta(9)-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid (THC-COOH) in Hair Using Negative Ion Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Volume Injection. *J. Anal. Toxicol.* **2001**, 25(7), 555-558.
7. Baptista, M. J.; et al. Hair Analysis for Delta(9)-THC, Delta(9)-THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI. Comparison with GC/MS-NCI for Delta(9)-THC-COOH. *Forensic Sci. Int.* **2002**, 128(1-2), 66-78.
8. Mieczkowski, T. Assessing the Potential of a "Color Effect" for Hair Analysis of 11-Nor-9-carboxydelta(9)-tetrahydrocannabinol: Analysis of a Large Sample of Hair Specimens. *Life Sci.* **2003**, 74(4), 463-469.
9. Uhl, M.; Sachs, H. Cannabinoids in Hair: Strategy to Prove Marijuana/Hashish Consumption. *Forensic Sci. Int.* **2004**, 145(2-3), 143-147.
10. Engelhart, D. et al. Rapid, Robust, and Sensitive Detection of 11-Nor-Delta(9)-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid in Hair. *Nota de aplicação Agilent Technologies*, número de publicação 5990-7535EN, **2014**.
11. Stevens, J.; Zhao, L. Efficient Quantitative Analysis of THC and Metabolites in Human Plasma using Agilent Captiva EMR—Lipid and LC/MS/MS. *Nota de aplicação Agilent Technologies*, número de publicação 5991-8636EN, **2017**.

www.agilent.com/chem

Para uso forense.

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.