



## **DETECÇÃO DE BENZOILECGONINA EM URINA POR SPE E GC-MS**

- Extração em fase sólida;
- Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa – GC/MS.

### **1. Material:**

#### **1.1 Amostra:**

- urina – material biológico

#### **1.1.1 Amostra referência negativa:**

- urina - livre de benzoilecgonina

#### **1.2 Reagentes:**

- ácido clorídrico 0,1M;
- hidróxido de sódio NaOH 0,1M;
- solução padrão de benzoilecgonina 10µg/mL da da Radian®;
- solução padrão de benzoilecgonina-d3 10µg/mL (padrão interno) da Radian® ;
- tampão fosfato 0,1% pH 6,0;
- solução de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (12:3:0,3);
- reagente BSTFA (Freezer 1.9 ; sala 1) ;
- metanol;
- água bi-destilada (mili-Q);

#### **1.3 Vidrarias/Equipamentos/Acessórios:**

- tubos de centrífuga de 15mL com tampa de vidro esmerilhado;
- pipetas graduadas de vidro;
- frascos de derivação 3mL;
- micropipetas;

- vórtex (1.20; sala 1);
- cuba a vácuo;
- compressor;
- bloco de aquecimento com evaporador (1.12; sala 1);
- pipeta *Pasteur*;
- Cartuchos para extração em fase sólida SPE BOND ELUT CERTIFY 130mg (VARIAN);
- GC/MS ;
- Fitas de pH.

## 2. Operação/Procedimento:

### 2.1 Identificação dos tubos:

Para cada análise, além dos tubos de ensaio com as amostras de urina, é feito um branco que contém urina referência negativa e um adicionado que contém a urina referência negativa e o padrão de benzoilecgonina. Além disso, em todos os tubos (branco, adicionado e amostras) é adicionado o padrão interno benzoilecgonina-d3.

### 2.2 Preparo do adicionado, branco e amostras:

Soluções/ Tubos	Adicionado	Branco	Amostra
Urina Referência negativa	2,5 mL	2,5 mL	-
Urina Amostra	-	-	2,5 mL
Benzoilecgonina 10µg/mL Radian®	37,5 µL	-	-
Benzoilecgonina isopropil éster 10µg/mL Radian®	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL
Água destilada	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL

#### Procedimento comum a todos os tubos:

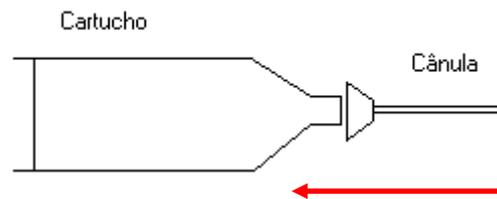
- Ajustar o pH das amostras para que fiquem entre 6,0 e 7,0. Caso esteja abaixo de 6,0, ajustar com NaOH 0,1M; se acima de 7,0, ajustar com HCl 0,1M;
- Adicionar 2,0mL de tampão fosfato 0,1% pH 6,0 ;
- Fechar os tubos e vedá-los com parafilme;
- Agitar os tubos no vórtex;
- Distribuir os tubos numa estante e abrir cada um deles;
- Colocar uma pipeta Pasteur em cada tubo e aspirar a solução, verificando se a borracha não está bem acoplada à pipeta. Caso estiver mal acoplada, trocar a pipeta ou a borracha;

- Levar a estante com os tubos e as pipetas para a capela da sala 3, onde está localizada a cuba para extração em fase sólida;
- Na capela devem estar presentes as seguintes soluções: ácido clorídrico 0,1M, água mili-Q (recentemente trocada), tampão fosfato 0,1% pH 6,0 e metanol;
- Proceder a extração em fase sólida.

### 3.1 Extração em fase sólida:

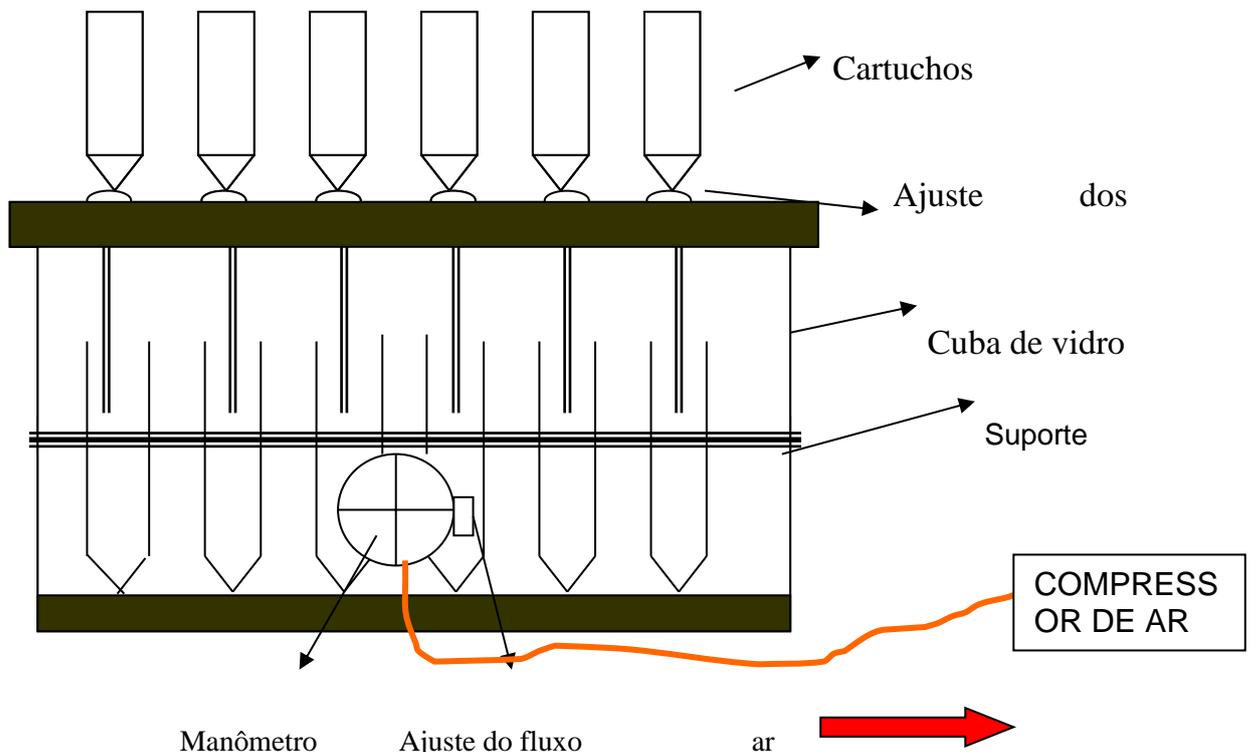
#### 3.1.1 Montagem dos cartuchos no sistema de vácuo

- Encaixar a cânula ao cartucho de SPE (fig. 1)



**Fig. 1.** Encaixe da cânula no cartucho

- Dispor a cuba de vácuo na bancada dentro da capela
- Conectar a mangueira do compressor à saída de ar da cuba (fig. 2)
- Encaixar os tubos na cuba (fig. 2)
- Encaixar os cartuchos, previamente conectados às cânulas, na tampa da cuba (fig. 2)
- **Fig. 2.** Cuba de vácuo



**Fig. 2** Aparelhagem usada na extração em fase sólida

### 3.1.2 Condicionamento dos cartuchos:

- Adicionar 2mL de metanol (fluxo até 5 in Hg) e esperar que passe todo o volume pelo cartucho;
- Desligar o compressor e adicionar 2mL de tampão fosfato 0,1% pH 6,0;
- Ligar o compressor até uma pressão de 2 in Hg ou aproximadamente 1 gota por segundo;
- **Atenção:** *NÃO DEIXAR SECAR O CARTUCHO. DESLIGAR O COMPRESSOR ASSIM QUE O TAMPÃO ATINGIR  $\pm 3\text{mm}$  DO TOPO DA FASE SÓLIDA.*

### 3.1.3 Passagem de amostra:

- Com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, imediatamente adicionar a amostra de urina (cada uma no respectivo cartucho), sendo que o fluxo não deve passar de 1 gota por segundo;
- Desprezar o volume do tubo, presente dentro da cuba de vácuo no descarte apropriado;

### 3.1.4 Lavagem:

- Passar 2 vezes 3mL de água deionizada (Milli-Q);
- Passar 3mL de HCl 0,1M (fluxo até 5 in Hg);
- Após passar todo o HCl pelo cartucho, permanecer com o compressor ligado por 7 minutos com fluxo de 15 in Hg;
- Desprezar o volume do tubo;
- Passar 3 vezes 3mL de metanol;

### 3.1.5 Eluição:

- Trocar os tubos de ensaio por frascos de derivação de 3mL;
- Passar 2mL de solução de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (12:3:0,3), recém preparado (fluxo até 2-3 in Hg);

## 4. Derivação:

- Evaporar a 40°C no bloco de aquecimento com evaporador (1.12 sala 1);
- Adicionar 50 $\mu\text{L}$  de BSTFA (Freezeer 1.9; sala 1);
- Incubar a 70°C durante 20 minutos (para a derivação);
- Injetar 2 $\mu\text{L}$  no GC/MS (2.12/2.11 ou 2.6/2.7; sala 2).

## 5. Injeção no GC/MS:

- Injetar 2.0  $\mu\text{L}$  do adicionado, do branco, do extrato e cada uma das amostras em GC/MS, sendo que para cada amostra o tempo de análise é de aproximadamente 20 minutos.

## 6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

<b>Analito</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b><i>m/z</i></b>
BE*	10,70	<b>182-240-361</b>
BE*-d3	10,65	<b>185-243-364</b>

Os íons marcados em negrito são utilizados para quantificação e também são o pico-base para identificação.

BE\* = como derivado trimetilsili de benzoilecgonina

### Bibliografia

YONAMINE, M.; SILVA, O. A. Confirmation of cocaine exposure by gas chromatography mass spectrometry of urine extracts after methylation of benzoylecgonine. Journal of Chromatography. B., v. 773, p. 83-87, 2002.