

EVALUATION OF THE METHOD OF COCAINE AND BENZOYLECGONINE ISOLATION FROM *POST-MORTEM* MATERIAL. PART I: LIQUID-LIQUID EXTRACTION

Marianna KISZKA, Roman MAJRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: The effectiveness of cocaine (C) and benzoylecgonine (BE) isolation using LLE: one- and three-step extractions and in a continuous system was studied. The highest C recovery from aqueous solutions was achieved in the pH range 7–11 while for BE no clear optimum pH was observed. In the one-step extraction, recovery of C was high while that of BE low. BE recovery increased, however, with an increase in the amount of solvent and with addition of alcohol, and also after salting out the samples, but this resulted in higher levels of impurities in the extracts. The mixture dichloromethane-isopropanol (3:1) was found to be the optimum one for the three-step LLE of urine samples. With the sample/solvent ratio ranging from 1/5 to 1/8, C recovery was 57–69% and BE recovery – 39–50%. Moreover, the extracts were of high purity (suitable for HPLC analysis). The extraction in a continuous system was characterised by high recovery (68–75% of C and 72–80% of BE from deproteinised homogenates of the kidney); however, it depended on the quality of solvents and was limited to the pH range 7–8, and, furthermore, prior to their analysis (HPLC method), the extracts required purification (TLC method).

KEY WORDS: Cocaine; Benzoylecgonine; Liquid-liquid extraction; Autopsy material.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLVIII, 2001, 7–30
Received 6 September 2001; accepted 9 November 2001

INTRODUCTION

Differences in the structure of the molecule of cocaine (C) and that of its metabolite benzoylecgonine (BE) cause them to have a different polarity – and their behaviour in the course of the process of isolation is to a large extent dependent on this difference. Thus, recognition of the effectiveness of various isolation methods is very important for proper diagnostic procedure.

The effectiveness of xenobiotics isolation depends on the extraction method, the kind of solvent used and many other factors. In the case of C, the pH of the environment is of crucial importance due to its low stability in an alkaline environment [6, 17]. Thus, in the first stage of the presented study,

the following were evaluated: the influence of pH on the isolation of C and BE, and in further stages the effectiveness of C and BE isolation using one- and three-step liquid-liquid extraction as well as extraction in a continuous system.

MATERIAL, METHODS AND RESULTS

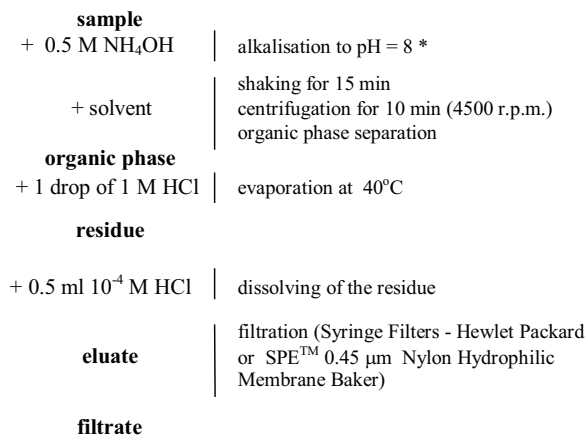
C and BE were extracted from aqueous solutions and also homogenates of kidneys and urine samples, in which the presence of alcohol and pharmaceuticals had been excluded.

Quantitative analysis of the samples was performed using a Gibson liquid chromatograph with a spectrometric detector with regulation of wavelength. The following measurement conditions were applied: Hypersil ODS column (250 × 4.0 mm, 5 μm), moving phase: an 80:20 mixture of phosphate buffer (0.025 M, pH = 3 with addition of 0.5% triethylamine) and acetonitrile in a two-pump system, flow velocity – 1 ml/min, volume of the injected sample – 10 μl and detection at 233 nm. The signal from the detector was electronically transformed using a Gibson 715 HPLC System Controller Software. The quantities of extracted C and BE were determined with the method of an external standard using calibration curves that were obtained directly from C and BE solutions, i.e. omitting the extraction stage. The percentage of C and BE recovery was calculated according to the following formula: $A/B \cdot 100\%$ (where: A – the quantity of C or BE in μg, determined with the HPLC method; B – the quantity of C or BE in μg included in samples before extraction).

A number of experiments were performed in order to evaluate the effectiveness of C and BE isolation:

1. One-step extraction method, including the influence of the following factors:
 - 1.1. pH in the range of 1–14;
 - 1.2. the kind of solvent;
 - 1.3. the volume of solvent;
 - 1.4. salting out of the samples before extraction.

Figure 1 gives an outline of the performed one-step extraction. The scheme and results of the study on the influence of pH and the kind of solvent used are presented in Figure 2. Tables I–IV contain the structure and results of experiments carried out in order to evaluate the influence of the kind and volume of the solvent as well as the salting out of the samples being extracted.



* Only while examining the pH effects on the extraction recovery, the reaction was regulated with phosphate buffer in the pH range 1-14.

Fig. 1. A diagram of one-step extraction.

TABLE I. THE EFFECTS OF THE SOLVENT TYPE AND VOLUME ON THE C AND BE EXTRACTION RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS AT THE XENOBIOTIC CONCENTRATION OF 1 µg/ml

Solvent	Mean recovery (<i>n</i> = 5) and standard deviation (±) in [%]			
	BE		C	
	Sample/solvent ratio		Sample/solvent ratio	
	1/1	1/2	1/1	1/2
Chloroform	8.7 ± 2.89	18.9 ± 4.19	78.7 ± 5.42	89.6 ± 4.04
Ether	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	86.0 ± 5.20	85.5 ± 4.43
Dichloromethane	10.4 ± 2.48	21.2 ± 3.61	87.4 ± 4.89	92.7 ± 5.88
Dichloromethane/isopropanol (9:1)	14.2 ± 3.81	30.2 ± 4.50	93.2 ± 6.86	95.1 ± 6.13
Dichloromethane/isopropanol (4:1)	16.7 ± 5.20	34.4 ± 3.19	95.2 ± 6.73	97.0 ± 4.24
Dichloromethane/isopropanol (3:1)	19.8 ± 4.66	40.5 ± 3.37	96.1 ± 5.03	96.2 ± 4.69
Dichloromethane /isopropanol (2:1)	22.6 ± 2.44	43.7 ± 6.11	98.7 ± 5.64	97.9 ± 4.45
Dichloromethane /isopropanol (1:1)	32.4 ± 4.19	58.8 ± 6.02	97.6 ± 2.74	96.8 ± 7.29
Chloroform/isopropanol (3:1)	19.4 ± 2.39	38.5 ± 4.53	98.2 ± 2.35	96.4 ± 4.52
Chloroform/ethanol (3:1)	13.8 ± 4.48	28.8 ± 3.42	95.9 ± 6.20	98.1 ± 3.80

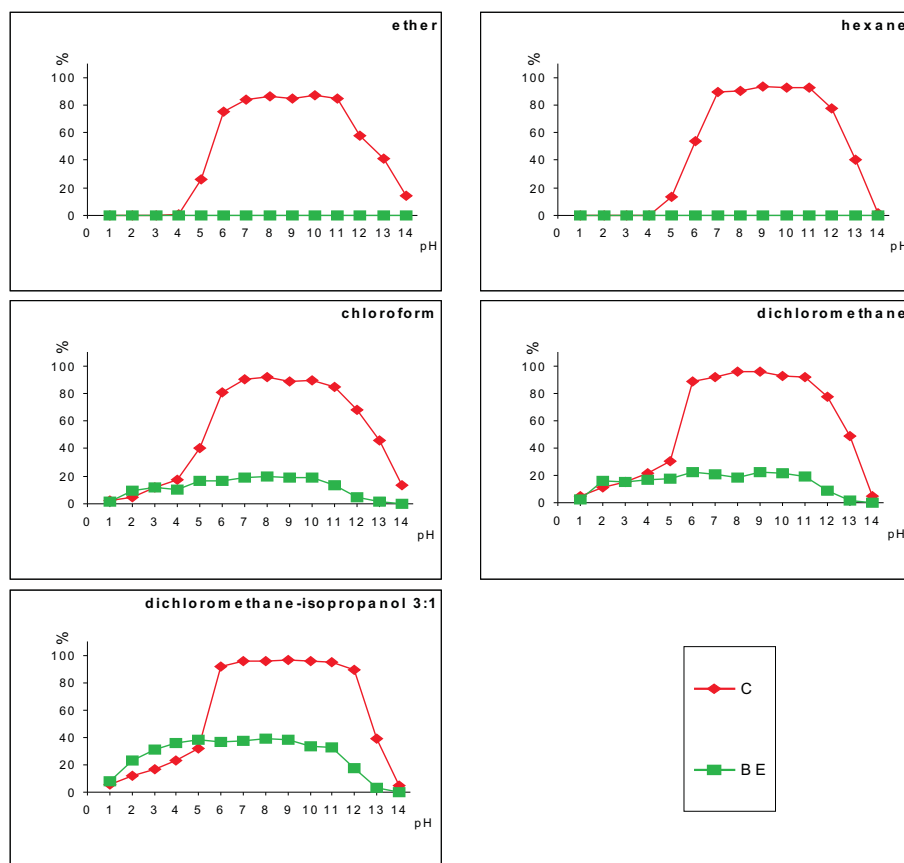


Fig. 2. The C and BE extraction yield (mean percentage of recovery calculated on the basis of 3 determinations) from standard water solutions (xenobiotic concentration – 2.5 µg/ml) in relation to pH and type of the solvent (sample/solvent ratio =1/2).

TABLE II. THE EFFECTS OF SOLVENT VOLUME (DICHLOROMETHANE-ISOPROPANOL 3:1) ON THE C AND BE EXTRACTION RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS AT THE XENOBIOTIC CONCENTRATION OF 2.5 µg/ml

Sample/solvent ratio	Mean recovery ($n = 6$) and standard deviation (\pm) in [%]	
	BE	C
1:1	20.1 \pm 3.82	93.1 \pm 2.67
1:2	38.0 \pm 5.53	95.6 \pm 4.23
1:5	71.8 \pm 3.27	96.8 \pm 3.18
1:8	80.9 \pm 2.73	94.8 \pm 6.19

TABLE III. THE EFFECTS OF SOLVENT VOLUME (DICHLOROMETHANE-ISOPROPANOL 3:1) ON THE C AND BE EXTRACTION RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS AT THE XENOBIOTIC CONCENTRATION OF 2.5 $\mu\text{g/ml}$ AFTER THEIR SALTING OUT WITH 0.1 g NaHCO_3/ml

Sample/solvent ratio	Mean recovery ($n = 4$) and standard deviation (\pm) in [%]	
	BE	C
1:1	34.1 \pm 3.24	95.3 \pm 2.40
1:2	52.4 \pm 3.49	96.7 \pm 4.43
1:5	86.5 \pm 5.72	94.1 \pm 5.03
1:8	88.7 \pm 5.35	93.4 \pm 7.52

TABLE IV. THE EFFECTS OF SOLVENT VOLUME (DICHLOROMETHANE-ISOPROPANOL 3:1) ON THE C AND BE EXTRACTION RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS AT THE XENOBIOTIC CONCENTRATION OF 2.5 $\mu\text{g/ml}$ AFTER THEIR SALTING OUT WITH 0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{ml}$

Sample/solvent ratio	Mean recovery ($n = 4$) and standard deviation (\pm) in [%]	
	BE	C
1:1	55.4 \pm 5.49	91.8 \pm 4.05
1:2	78.6 \pm 4.51	92.4 \pm 6.26
1:5	92.9 \pm 8.25	95.7 \pm 4.25
1:8	93.2 \pm 3.75	94.5 \pm 6.63

2. Three-step extraction method taking into account the influence of the following factors:
 - 2.1. the volume of 0.1 M HCl (on the recovery of C and BE in the second stage of the extraction);
 - 2.2. the proportion of the components of the extraction mixture;
 - 2.3. the relationship between the volume of the sample and the volume of the solvent;
 - 2.4. the effectiveness of the particular stages of the three-step extraction.

Procedures for the particular steps of the three-step extraction are presented in Figure 3. The structure and results of particular experiments are included in Tables V–VIII and Figure 4.

sample*		
STAGE I	+ 0.5 M NH ₄ OH	alkalisation to pH = 8
	+ solvent**	shaking for 15 min centrifugation for 10 min (4500 r.p.m.) organic phase separation
organic phase		
STAGE II	+ 0.1 M HCl***	shaking for 15 min centrifugation for 10 min (4500 r.p.m.) acid phase separation
water acid phase		
STAGE III	+ 2.5 M NH ₄ OH	alkalisation to pH = 8
	alkaline phase + solvent**	shaking for 15 min centrifugation for 10 min (4500 r.p.m.) organic phase separation
organic phase		
	+ 1 drop of 1 M HCl	evaporation at 40°C
residue		
	+ 0.5 ml 10 ⁻⁴ M HCl	dissolving of the residue
eluate		
		filtration (Syringe Filters - Hewlett Packard)
filtrate		

* The sample contained 1 ml of standard solution or 1 ml of urine.

** The optimal C and BE recovery was achieved using the mixture of dichloromethane-isopropanol 3:1 and sample/solvent ratio = 1:8.

*** The optimal C and BE recovery was achieved using 2 ml.

Fig. 3. A diagram of the three-step reaction

TABLE V. RECOVERY OF THE II STAGE OF THREE-STEP EXTRACTION (REEXTRACTION) OF C AND BE FROM THE ORGANIC PHASE (DICHLOROMETHANE/ISOPROPRANOL 3:1) IN RELATION TO THE VOLUME OF HCL

C and BE content in 5 ml of the solvent	Volume of 0.1 M HCl [ml]	Mean recovery ($n = 4$) and standard deviation (\pm) in [%]	
		BE	C
1.0 μ g	2.0	90.2 \pm 3.61	76.8 \pm 5.51
	1.0	66.2 \pm 4.19	43.5 \pm 4.16
	0.5	49.0 \pm 5.62	35.3 \pm 3.05
	0.2	33.5 \pm 7.06	26.6 \pm 4.26
2.5 μ g	2.0	94.8 \pm 2.80	80.1 \pm 3.38
	1.0	71.6 \pm 5.18	54.4 \pm 4.61
	0.5	55.6 \pm 3.54	39.8 \pm 5.97
	0.2	32.4 \pm 5.31	27.9 \pm 7.52

3. The extraction method in a continuous system:

- 3.1. from aqueous standard solution (containing: 25, 50 and 125 μg of C and BE in 100 ml of water) that underwent 6-hour-extraction with ether in an acidic environment $\text{pH} = 2$ and then with chloroform in an alkaline environment of pH in the range 7–8 (using Quikfit apparatuses). Ether extracts were rejected, whereas one drop of 1 M HCl was added and evaporated to chloroform extracts. The obtained residue was dissolved in 2.5 ml of 10^{-4} M HCl and then diluted (with the same solution, appropriately to the concentration of xenobiotics in the analysed sample) directly before carrying out determinations by means of the HPLC method;

TABLE VI. RECOVERY OF THE WHOLE THREE-STEP EXTRACTION OF C AND BE FROM URINE (AT THE XENOBIOTIC CONCENTRATION OF 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) IN RELATION TO THE COMPOSITION OF THE DICHLOROMETHANE (X) : ISOPROPANOL (Y) SOLVENT AT THE CONSTANT SAMPLE/SOLVENT RATIO = 1:5

X:Y	Mean recovery ($n = 5$) and standard deviation (\pm) in [%]	
	BE	C
9:1	16.9 \pm 1.88	65.2 \pm 8.16
4:1	28.1 \pm 4.12	64.8 \pm 3.32
3:1	37.5 \pm 4.40	66.9 \pm 3.80
2:1	44.9 \pm 6.46	64.5 \pm 3.52
1:1	75.3 \pm 10.66	51.6 \pm 8.10

TABLE VII. RECOVERY OF THE WHOLE THREE-STEP EXTRACTION OF C AND BE FROM WATER SOLUTIONS (XENOBIOTIC CONCENTRATIONS – 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) USING THE MIXTURE OF DICHLOROMETHANE: ISOPROPANOL 3:1 IN RELATION TO THE SAMPLE/SOLVENT RATIO.

Sample/solvent ratio	Mean recovery ($n = 8$) and standard deviation (\pm) in [%]	
	BE	C
1:1	10.2 \pm 2.82	70.7 \pm 3.92
1:2	17.7 \pm 3.22	76.5 \pm 5.28
1:5	39.2 \pm 2.58	69.4 \pm 3.20
1:8	50.3 \pm 5.23	57.2 \pm 5.67

TABLE VIII. RECOVERY OF INDIVIDUAL STAGES (I, II, III) AND COMPLETE THREE-STEP EXTRACTION* OF C AND BE AT VARIOUS XENOBIOTIC CONCENTRATIONS (A, B, C, D) THE EXIT MATERIAL, I.E. IN AQUEOUS SOLUTIONS (I STAGE AND COMPLETE EXTRACTION), IN THE ORGANIC (II STAGE) AND ACID PHASE (III STAGE)

Xenobiotic concentration in [mg/ml]		Mean recovery ($n = 5$) and standard deviation (\pm) in [%]			
		I stage	II stage	III stage	Complete three-step extraction
BE	a 0.5	80.2 \pm 4.80	88.3 \pm 2.86	75.2 \pm 5.72	49.7 \pm 4.84
	b 1.0	82.6 \pm 6.71	87.0 \pm 4.30	71.6 \pm 2.83	47.2 \pm 6.84
	c 2.5	85.0 \pm 4.53	89.9 \pm 7.26	73.9 \pm 3.24	46.1 \pm 4.07
	d 5.0	82.3 \pm 8.96	87.3 \pm 2.50	74.8 \pm 2.14	51.4 \pm 5.68
	average	82.5 \pm 6.20	88.1 \pm 4.40	73.9 \pm 3.70	48.6 \pm 5.44
C	a 0.5	90.5 \pm 3.99	69.8 \pm 6.17	94.6 \pm 2.91	61.5 \pm 6.63
	b 1.0	93.8 \pm 4.87	73.2 \pm 4.55	92.5 \pm 3.47	57.3 \pm 5.91
	c 2.5	94.5 \pm 7.23	73.9 \pm 4.72	93.9 \pm 2.57	56.0 \pm 3.19
	d 5.0	95.1 \pm 5.16	68.8 \pm 3.90	89.8 \pm 3.23	62.1 \pm 7.37
	average	93.5 \pm 5.32	71.5 \pm 5.03	92.7 \pm 3.38	59.2 \pm 6.12

* According to the instructions presented in Fig. 3 using the optimal solvent and sample/solvent ratio and 2 ml 0.1 M HCl.

3.2. from kidney homogenates (obtained by mechanical crumbling of 25 g fragments of this organ with addition of 50 ml of water), to which 25, 50 and 125 μ g of C and BE were added (which corresponded to 1.2 and 5 μ g of xenobiotics per gram of the tissue). Samples that had been prepared in this manner were then deproteinised with the sulphate – ammonium method according to Borkowski [2] and extracted as in point 3.1; at the same time extraction was carried out in the same manner for each homogenate, except without addition of xenobiotics. Evaporated extracts were dissolved in 0.5 ml of methanol, purified with TLC¹ and analysed by HPLC in order to determine the concentration of C and BE (prior to that eluates of the samples of xenobiotics of concentrations 1 and 2 μ g/g were condensed to a volume of 0.5 ml) using calibration curves obtained from standard solutions which were also “purified” with TLC. Results of the evaluation of the extraction method in a continuous system are included in Tables IX and X.

¹ Determinations of C and BE in extracts of biological material obtained with the method of continuous extraction was possible only after their purification by means of TLC method. For this aim on a chromatographic plate portions of 40 μ l of extract (related to 2g of tissue) were introduced and developed in ethyl acetate – methanol – ammonium (60:30:6) system and a part of the plate was developed with Dragendorff reagent with addition of 20% H₂SO₄, and then colourless areas of the chromatogram (located at the level of xenobiotic spots) were eluted with 2.5 ml of ethanol.

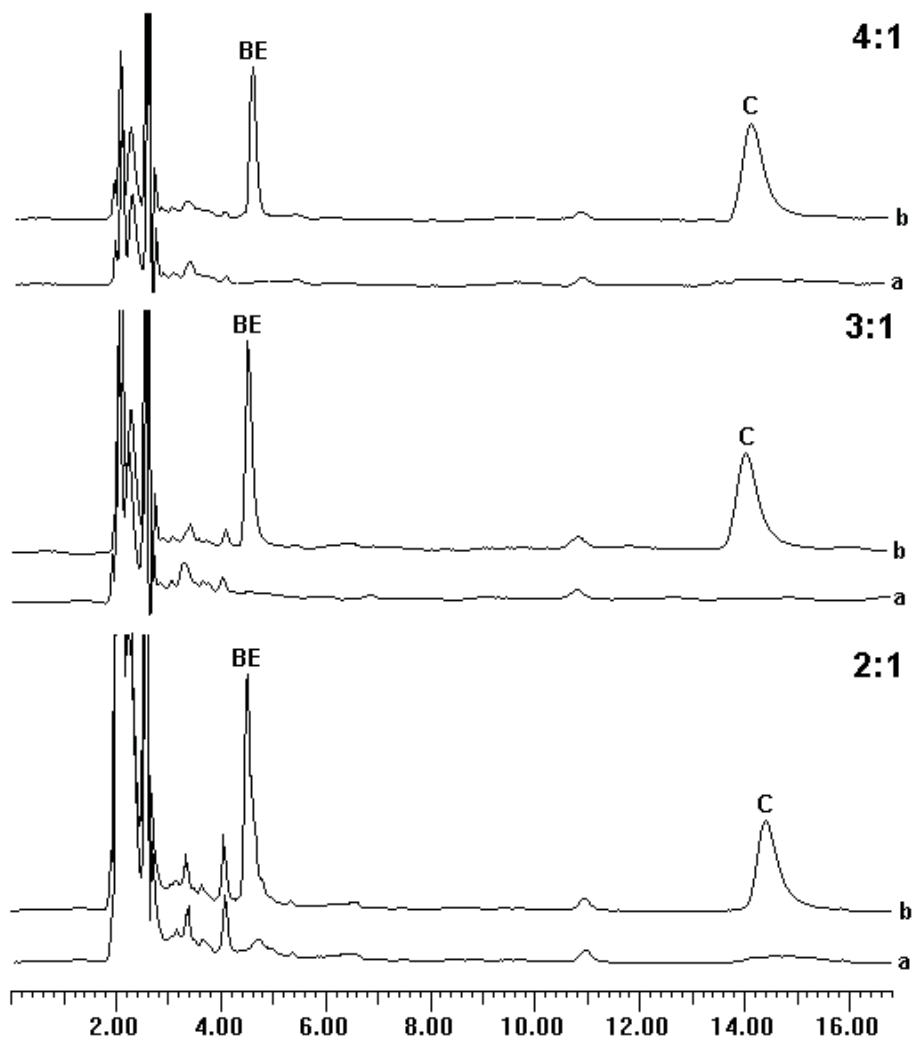


Fig. 4. The HPLC chromatograms of urine samples after extraction with the mixture of dichloromethane-isopropanol in the ratio 4:1, 3:1 i 2:1 (a – the extract of the urine “background”, b – the urine extract with xenobiotics).

DESCRIPTION OF THE RESULTS AND DISCUSSION

Ad 1.1. Results presented in Figure 2 prove that in the case of 5 used eluents a high (above 80%) recovery of C with one-step liquid-liquid extraction method ensures maintenance of pH in the range 7–11, due to the fact that in a strongly alkaline environment its hydrolysis takes place.

TABLE IX. RECOVERY OF THE EXTRACTION IN CONTINUOUS SYSTEM OF C AND BE (USING CHLOROFORM) FROM WATER SOLUTIONS

The C and BE content in the sample	Number of samples (<i>n</i>)	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
25 μg	3	91.3 \pm 8.11	96.2 \pm 6.14
50 μg	3	93.0 \pm 7.41	93.6 \pm 9.48
125 μg	3	86.4 \pm 9.29	95.1 \pm 5.97

TABLE X. RECOVERY OF THE EXTRACTION IN CONTINUOUS SYSTEM OF C AND BE (USING CHLOROFORM) FROM DEPROTEINISED* HOMOGENATES OF KIDNEY; ESTIMATED AFTER PURIFICATION OF THE EXTRACTS BY MEANS TLC METHOD**

The C and BE concentration in the homogenate of 1 g the tissue	Number of samples (<i>n</i>)	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
1 $\mu\text{g/g}$	3	69.5 \pm 15.57	72.0 \pm 17.65
2 $\mu\text{g/g}$	3	67.8 \pm 14.73	77.8 \pm 13.28
5 $\mu\text{g/g}$	3	75.7 \pm 12.06	80.3 \pm 9.09

* The sulphate-ammonium method according to Borkowski.

** In the way described in the paper.

“Zero” elution of C from an aqueous solution in the case of using both ether and hexane at pH lower than 4 leads to the conclusion that the frequently used “purifying” acidic extraction should be performed with application of these solvents. For, after using chloroform and dichloromethane, C transfers into the solvent phase even in a strongly acidic environment (at pH = 4 there is already about 20%), which means losses of the xenobiotic at the stage of purifying. Moreover, 0% recovery of BE from aqueous solutions after using ether or hexane in the entire range of pH, allows utilisation of these solvents to separate C from BE during the extraction process. However, with the use of chloroform, dichloromethane and a mixture of dichloromethane and isopropanol 3:1 it is possible (in a wide range of pH) to extract both C and BE from aqueous solutions. In a strongly alkaline environment (pH of 11–12), however, a decrease in extraction efficiency of both xenobiotics took place.

Javaid et al. [10] published similar results. They did not observe that the change in pH in the range 6.5–9.5 influenced recovery of C from urine and plasma when using cyclohexane, but they found that at pH > 10 the efficiency of C isolation decreased. A high recovery of C after extraction with use of ether (close to 100%) at pH in the range of 7–11 was also found by Bouis et al. [3]. Thus, taking into account these observations as well as the results of our study presented earlier, one should be wary of planning an extraction of C and BE from highly alkaline environment (pH = 12.1 and \approx 13) that is suggested by Gerlits [7] and Dvorchik et al. [4].

Ad 1.2. Studies on the influence of various solvents on the recovery of C and BE from their aqueous solutions (Table I) entirely confirmed the high (57–100%) efficiency of C isolation with the use of simple organic solvents, as well as (organic solvent) mixtures with alcohols, as has been described [1, 3, 5, 10, 12, 13, 16, 19, 20, 21, 22, 24].

Unlike C, BE did not transfer to chloroform. Only a very small amount of BE transferred to chloroform and dichloromethane, and a little more to a mixture of dichloromethane and isopropanol. In the last case the effectiveness of the extraction increased with an increasing contribution by isopropanol in the eluting mixture² and was significantly greater when the sample was extracted with a double volume of the solvent. Results of the examinations presented in Table I show that the output of BE extraction with chloroform mixed with alcohols (ethanol and isopropanol) also increases markedly. Moreover, from the performed experiment one can conclude that an identical recovery of BE to that gained in the case of the chloroform-isopropanol (3:1) mixture can be obtained using the same proportion of isopropanol in a mixture with dichloromethane, which is of great significance to the analysis. Dichloromethane has a lower boiling temperature than chloroform, and so its application has more benefits because of the shorter time of evaporation of extracts.

Comparison of the experimentally obtained data for the recovery of BE in relation to type and volume of solvent (Table I) with numerous data contained in the literature [5, 7, 13, 14, 16, 18, 19, 22, 24] turned out to be impossible due to the fact that the authors of these publications used different volumes of solvents, which (it turns out) influences BE extraction output to a significant extent.

Ad 1.3. Results presented in Table II are a confirmation of the lack of any relationship between C recovery and the volume of solvent and at the same time of the great influence of this parameter on BE recovery. Percentage of BE recovery increased from about 20%, at equal volumes of the sample and

² The contribution of isopropanol in the extraction mixture was however limited to proportion 3:1 due to the increase of pollution (compare Fig. 4) and lengthening of the time of evaporation of extracts being caused by alcohols.

optimal mixture of solvents (dichloromethane-isopropanol 3:1, Table I) to about 38% at volume proportion of sample/solvent 1:2, and to about 72% and even to about 81% when it was 1:5 and 1:8 respectively.

This kind of relationship between the volume ratio of sample/solvent and the output of the extraction of C and BE was observed by Refali et al. [21], who compared a single and double extraction with 3:1 chloroform-isopropanol mixture and observed that BE recovery increased by about 20% after double extraction, while extraction of C remained at the same level. Results of extraction using other solvents also show that an increase in their volumes significantly improves BE recovery without any significant influence on C recovery. Application of a mixture of chloroform-isopropanol 3:2 at the sample/solvent ratio 1:4 and 1:7 allowed BE recovery of 53% [16] and 82% [5] respectively, with a similar C recovery (94.5 and 100% respectively). Using a mixture of chloroform-isopropanol 9:1 for urine extraction at a sample/solvent volume ratio of 1:4 and 1:5 gave lower BE recovery – 38% [16] and 60% [18] respectively. However, the recovery of BE from plasma (15–23%) which was obtained by Tagliano et al. [24] deviates unfavourably from the above mentioned findings. They used an even larger volume (sample/solvent ratio of about 1:14) of identical solvent (i.e. a chloroform-isopropanol mixture 9:1). Perhaps their results could be explained by the loss of xenobiotic during evaporation of a great volume of the extract or the effect of the highly alkaline pH of the extraction.

Ad 1.4. Data presented in Tables III and IV prove that BE recovery could be increased by salting out of the sample before extraction; the highest increase of recovery, in comparison to the results of extraction of non-salted-out samples was observed when the sample/solvent ratios were 1:1 and 1:2 respectively. The output of BE extraction increased especially when samples were salted out with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Then the recovery was 2.8 and 2.1 times larger, which should be linked to the greater solubility of this salt in water in comparison to NaHCO_3 – after application of which, the increase in recovery was smaller (1.7 and 1.4-times respectively).

Results of research on the influence of salting out obtained by the authors are in agreement with results presented by Jatlow et al. [9], who salted out (with a mixture of Na_2CO_3 and NaHCO_3) samples of urine before their extraction with chloroform – ethanol 4:1 mixture at a sample/solvent volume ratio 1:2, and they obtained a BE recovery as high as 80%. A comparison of Jatlow's results with the 87% BE recovery from plasma obtained by Lau et al. [13] without the salting out step (also using a chloroform – ethanol 82.5:17.5 mixture) leads to the conclusion that such an increase in BE extraction as obtained by salting out can only be achieved by increasing the volume of solvent by more than three times.

The advantage of salting out in the case of biological material is, however, limited by the related increase in impurities in the extract. Salting out causes a transfer into the solvent of the majority of the components of the biological matrix, which also have a polar character as confirmed by Wallace et al. [25].

Ad 2.1. After establishing the conditions of the one-step extraction, the basic problem was to determine the optimal volume of 0.1 M HCl used at the second stage of the three-stage extraction (Figure 3)³. Thus, an experiment was carried out which showed that (Table V) good recovery of both xenobiotics (77–80% of C and 90–95% of BE) could be obtained with 2 ml of acid – independently of whether 5 ml of the solvent contained 1 microgram or 2.5 microgram C or BE, and so this volume of HCl was used, as BE recovery at the next stage (III) is highly dependent on the sample/solvent volume ratio (see Table II). Thus, further increasing of the amount of HCl and the corresponding increase of the volume of alkaline phase would make it necessary to use too high amounts of solvents.

Ad 2.2. The three-step extraction of the diluted urine⁴ showed (Table VI), similarly to the case of the one-step extraction, that an increase in the amount of isopropanol in the solvent caused an increase of BE recovery (to max. 75% at a ratio of 1:1). However, in the range from 9:1 to 2:1 no influence of the composition of the solvent on the continually high recovery of C (about 65–67%) was observed. Extracts obtained with a mixture of dichloromethane and isopropanol 1:1 (and also 2:1) were much more polluted than those obtained using a solvent of smaller concentration of isopropanol (see Figure 4). Application of these mixtures to the analysis of urine, especially concentrated urine, is connected to a risk of obtaining extracts that are polluted to the extent of making them useless for the quantitative determination of xenobiotics (especially BE) by the HPLC method.

Ad 2.3. On the basis of the results presented in Table VI, a mixture of dichloromethane and isopropanol 3:1 was chosen as the optimal solvent for the three-step extraction. It was used in the first and third step of extraction in the experiment performed in order to determine the relationship between the sample and the solvent that would ensure maximum C and BE recovery

³ The possibilities provided by the three-step extraction were evaluated due to the fact that extracts of the biological material (especially urine), obtained using the one-step extraction with dichloromethane and chloroform with alcohols (even at small level of alcohol concentration), cannot be used directly for analysis by means of the HPLC method (in conditions described in this paper) due to their high impurity.

⁴ In which there were taken into account the presented above results of the research on the influence of the volume of HCl on the C and BE recovery in the three-step extraction (i.e. each time 2 ml of 0.1 M HCl was added in the second step) and results of the research on C and BE recovery in the one-step extraction (from which it was found that a mixture of dichloromethane and isopropanol was the most useful solvent).

(in both above mentioned steps). It turned out (Table VII) that BE recovery increased as the amount of solvent increased in relation to the volume of the extracted sample, and it had the highest value (about 50%) when the sample/solvent ratio was 1:8 and so it was established to be optimal, especially since it ensured a similarly high (57%) C recovery. Results of this experiment were thus similar to those obtained during the examination of the influence of the sample/solvent ratio on the effects of the one-step extraction (see Table II).

Ad 2.4. The previously established optimal conditions for the three-step extraction of C and BE (see Tables V, VI and VII) were taken into account in the final step of the evaluation of its usefulness for analysis of samples containing xenobiotics, in which not only the efficiency of the whole process, but also of its particular steps were evaluated (Table VIII). In this manner it was revealed that using the three-step extraction (in accordance with the procedure presented in Figure 3) could guarantee a high recovery of BE (46–51%, average 49%) and of C (56–62%, average 59%) in a broad range of concentrations of both xenobiotics (0.5–5.0 μml).

The presented results of the research on the optimisation of the three-step extraction of BE and C could not be compared with those obtained by other authors, for in the accessible literature there were only data on the recovery of C at a level of 80% [8], 82% [15] and 65–80% [10], obtained by means of the three-step extraction, but utilising other systems (than those applied by the authors): butyl chloride – 0.1 M HCl – butyl chloride [8], ether – 0.1 M acetic acid – hexane [15]; cyclohexane – 0.1 M H_2SO_4 – cyclohexane [10]. Zhang and Foltz [28], who extracted C and its metabolites (BE among them) from urine by this method, did not present any numerical data. Meanwhile, simultaneous recovering of BE and C using the same isolation-purifying process is of a great importance, because of the fact that evaluation of the extent and stage of poisoning by C could be difficult or even impossible if this metabolite and product of *post-mortem* changes was omitted [11].

Ad 3.1., 3.2. Results presented in Table IX prove that using the extraction in the continuous system with chloroform as the solvent can provide a very high recovery of C (86–93%) and BE (94–96%) for aqueous solutions independently of the concentration of xenobiotics (25–125 μg) in the sample. The recovery of both xenobiotics for deproteinized homogenates of kidney (Table X) was comparable and also high (68–77% for C and 72–80% for BE) and independent of the concentration (in the range 1.0–5.0 $\mu\text{g/g}$).

The results mentioned above indicate the high practical value of C and BE isolation from biological material by means of the continuous extraction method with chloroform. It allows not only a very high C and BE recovery (much higher than that obtained using the three-step extraction), but also

permits omitting of time- and work-consuming actions such as shaking and centrifuging.

The isolation of BE and C from biological material by means of continuous extraction, however, has very important limitations. One of them is related to the risk of excessive heating of the alkaline aqueous phase and of causing disintegration of C and BE, which can be partially prevented (as shown in the experiment performed by the authors) by appropriate control of the heating process and by reduction of the level of alkalisation of the extracted material to the indispensable minimum, i.e. 7–8 (Figure 2). The second limitation results from the high correlation between BE and C recovery and the quality of the solvents used for extraction, which was pointed out by Sukbuntherng et al. [23], who separated C from its polar metabolites using ethyl acetate. This necessitates performing a control extraction parallel to the extraction of the analysed sample and of a careful choice of solvents, which, in the case presented by the authors was associated with the elimination of two compounds made by POCh Gliwice, i.e. chloroform p.p.a. (which caused almost entire disintegration of C) and ethyl acetate (as a decrease in C was also observed when ethyl acetate was used in the TLC developing systems).

CONCLUSIONS

1. Extraction in a continuous system is especially useful for analysis of samples of large volume (e.g. deproteinised homogenates of tissues) as it ensures very high C and BE recovery from biological material (on condition that suitable pH and temperature of extraction are adhered to and appropriate quality of chloroform is ensured). The extracts obtained in this manner would be suitable for further analysis by the HPLC method only after their purification from the biological matrix by means of the TLC method.
2. Significantly lower C and BE recovery can be obtained with use of the three-step extraction method (according to the method described in this work) which is much more time- and work-consuming, but reduces the biological matrix to the extent that it is possible to analyse the extracts by the HPLC method.
3. Results of the C and BE extraction are dependent on the following factors: pH of the analysed sample (excessively alkaline can cause disintegration of both xenobiotics), the type of simple solvent (that could be utilised in selective extraction of C only), the contents of the complex solvent (BE recovery increases with concentration of alcohol), the volume relationship between the sample and the solvent (BE recovery in-

creases with increase in the volume of the solvent, at a constant and high C recovery) and also on prior salting out of the extracted sample (significantly improving BE recovery).

References:

1. Ambre J. J., Ruo T. I., Smith G. L. [et al.], Ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine, [in:] Cocaine: determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the Journal of Analytical Toxicology, Baselt R. C., Espe E. [ed.], Preston Publications, Niles 1988.
2. Borkowski T., Metoda wyosobniania trucizn organicznych z materiału biologicznego, *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii* 1968, t. XVIII, s. 95–100.
3. Bouis P., Taccard G, Boelsterli U. A., Determination of cocaine and norcocaine in plasma and cell cultures using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1990, vol. 526, pp. 447–459.
4. Dvorchik B. H., Gas chromatographic determination of cocaine in whole blood and plasma using a nitrogen-sensitive flame ionization detector, *Journal of Chromatography* 1977, vol. 135, pp. 141–148.
5. Evans M. A., Morarity T., Analysis of cocaine and cocaine metabolites by high pressure liquid chromatography, [in:] Cocaine: determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the Journal of Analytical Toxicology, Baselt R. C., Espe E. [ed.], Preston Publications, Niles 1988.
6. Fletcher S. M., Hancock V. S., Potential errors in benzoylecgonine i cocaine analysis, *Journal of Chromatography* 1981, vol. 206, pp. 193–195.
7. Gerlits J., GC/MS quantitation of benzoylecgonine following liquid-liquid extraction of urine, *Journal of Forensic Sciences* 1993, vol. 38, pp. 1210–1214.
8. Hime G. W., Hearn W. L., Rose S. [et al.], Analysis of cocaine and cocaethylene in blood and tissues by GC-NPD and GC- ion trap mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 241–245.
9. Jatlow P., van Dyke C., Barash P. [et al.], Measurement of benzoylecgonine and cocaine in urine, separation of various cocaine metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1978, vol. 152, pp. 115–121.
10. Javaid J. I., Dekirmenijan H., Davis J. M. [et al.], Determination of cocaine in human urine, plasma and red blood cell by gas-liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1978, vol. 152, pp. 105–113.
11. Kiszka M., Buszewicz G., Mądro R., Stability of cocaine in phosphate buffer and in urine, *Z Zagadnień Nauk Sądowych* 2000, z. XLIV, s. 7–23.
12. Lau C. E., Determination of cocaethylene, cocaine and their metabolites in rat serum microsamples by high-performance liquid chromatography, and its application to pharmacokinetic studies in rodents, *Journal of Chromatography* 1992, vol. 582, pp. 167–172.
13. Lau C. E., Ma F., Falk J. L., Simultaneous determination of cocaine and its metabolites with caffeine in rat serum microsamples by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1990, vol. 532, pp. 95–103.

14. Lillsunde P., Michelson L., Forsstrom T. [et al.], Comprehensive drug screening in blood for detecting abused drugs or drugs potentially hazardous for traffic safety, *Forensic Science International* 1996, vol. 77, pp. 191–210.
15. Masoud A. N., Krupski D. M., High-performance liquid chromatographic analysis of cocaine in human plasma, [in:] Cocaine: determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the Journal of Analytical Toxicology, Baselt R. C., Espe E. [ed.], Preston Publications, Niles 1988.
16. Matsubara K., Maseda C., Fukui Y., Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after extrelut extraction, *Forensic Science International* 1984, vol. 26, pp. 181–192.
17. Madro R., Kiszka M., Buszewicz G., Śmiertelne zatrucie kokainą, IV Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Zatrucia, urazy, alkoholizm i narkomania w praktyce sądowo-lekarskiej", Bielsko-Biała, 27–28 kwietnia 1995 r.
18. Nakashima K., Okamoto M., Yoshida K. [et al.], Preparation of a fluorescent derivative of benzoylecgonine, and preliminary studies of its application to the analysis of urine, *Journal of Chromatography* 1992, vol. 584, pp. 275–279.
19. Peyton J. E., Baker A. E., Reese T. J. [et al.], Determination of benzoylecgonine and cocaine in biologic fluids by automated gas chromatography, *Journal of Chromatography* 1987, vol. 417, pp. 277–286.
20. Puopolo P. R., Chamberlin P., Flood J., Detection and confirmation of cocaine and cocaethylene in serum emergency toxicology specimens, *Clinical Chemistry* 1992, vol. 38/39, pp. 1838–1842.
21. Rafla F. K., Epstein R. L., Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol, [in:] Cocaine: determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the Journal of Analytical Toxicology, Baselt R. C., Espe E. [ed.], Preston Publications, Niles 1988.
22. Sandberg J., Olsen G., Microassey for the simultaneous determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and benzoynorecgonine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1990, vol. 525, pp. 113–121.
23. Sukbuntherng J., Walters A., Chow H. H. [et al.], Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1995, vol. 84, pp. 799–804.
24. Tagliaro F., Antonioli C., de Battisti Z. [et al.], Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of cocaine in plasma and human hair with direct fluorimetric detection, *Journal of Chromatography* 1994, vol. 674, pp. 207–215.
25. Wallace J. E., Hamilton H. E., Schwetner H. [et al.], Thin-layer chromatographic analysis of cocaine and benzoylecgonine in urine, *Journal of Chromatography* 1975, vol. 114, pp. 433–441.
26. Zhang J. Y., Foltz R. L., Cocaine metabolites in man: identification of four previously unreported cocaine metabolites in human urine, *Journal of Analytical Toxicology* 1990, vol. 14, pp. 201–205.

OCENA METOD IZOLACJI KOKAINY I BENZOILOEKGONINY Z MATERIAŁU SEKCYJNEGO. CZĘŚĆ I. EKSTRAKCJA TYPU CIECZ-CIECZ (LLE)

Marianna KISZKA, Roman MADRO

WSTĘP

Różnice w strukturze cząsteczki C i jej metabolitu BE sprawiają, że mają one odmienną polarność, a od niej w dużym stopniu zależy zachowanie się tych związków w trakcie procesów izolacji. Poznanie efektywności różnych metod ich wyosobniania ma więc bardzo istotne znaczenie dla prawidłowego postępowania diagnostycznego.

Efektywność izolacji ksenobiotyków zależy od metody ekstrakcji, rodzaju użytego rozpuszczalnika i wielu innych czynników. W przypadku C, ze względu na niską stabilność tej substancji w środowisku zasadowym [6, 17], zasadnicze znaczenie ma pH środowiska ekstrakcyjnego. W pierwszym etapie badań oceniano więc wpływ pH na izolację C i BE, a w dalszych efektywność izolacji C i BE przy użyciu ekstrakcji typu ciecz-ciecz: jedno- i trójstopniowej oraz ekstrakcji w systemie ciągłym.

MATERIAŁ, METODY I WYNIKI

C i BE ekstrahowano z roztworów wodnych oraz homogenatów nerki i próbek moczu, w których wykluczono obecność alkoholu i środków farmakologicznych.

Oznaczenia ilościowe wykonywano przy użyciu chromatografu cieczowego firmy Gilson z detektorem spektrofotometrycznym o regulowanej długości fali. Zastosowano: kolumnę Hypersil ODS (250 × 4,0 mm, 5 μm), fazę ruchomą w postaci mieszaniny (80:20) buforu fosforanowego (0,025 M; pH = 3 z dodatkiem 0,5% trietylaminy) z acetonitrylem w systemie dwóch pomp, prędkość przepływu – 1 ml/min, objętość wstrzykiwanej próbki – 10 μl i detekcję przy 233 nm. Sygnał z detektora przetwarzany był elektronicznie z zastosowaniem oprogramowania Gilson 715 HPLC System Controller Software. Ilości wyekstrahowanej C i BE oznaczano metodą standardu zewnętrznego za pomocą krzywych kalibracji, które sporządzano bezpośrednio z wzorcowych roztworów C i BE, tj. z pominięciem etapu ekstrakcji. Procentowy odzysk C i BE obliczano ze wzoru: $A : B \times 100 \%$ (gdzie: A = ilość C lub BE w μg – oznaczona metodą HPLC, natomiast B = ilość C lub BE w μg – zawarta w próbkach przed ekstrakcją).

Przeprowadzono szereg eksperymentów, których celem była ocena wydajności izolacji C i BE:

1. Metodą ekstrakcji jednostopniowej z uwzględnieniem wpływu:
 - 1.1. pH w zakresie 1–14;
 - 1.2. rodzaju rozpuszczalnika;
 - 1.3. objętości solwentu;
 - 1.4. wysalania próbek przed ekstrakcją.

Schemat ekstrakcji jednostopniowej ilustruje rycina 1. Układ i rezultaty badań nad wpływem pH oraz rodzajem solwentu przedstawiono na rycinie 2. Tabele I, II, III i IV zawierają natomiast układ i wyniki doświadczeń, w trakcie których oceniano wpływ rodzaju i objętości solwentu oraz wysalania ekstrahowanych próbek.

2. Metodą ekstrakcji trójstopniowej z uwzględnieniem wpływu:
 - 2.1. objętości 0,1 M HCl (na odzysk C i BE w II etapie ekstrakcji);
 - 2.2. proporcji składników mieszaniny ekstrakcyjnej;
 - 2.3. relacji między objętością próbki a objętością solwentu;
 - 2.4. wydajności poszczególnych etapów izolacji trójstopniowej.

Procedury realizowane w poszczególnych etapach trójstopniowej ekstrakcji przedstawia rycina 3. Układ i rezultaty poszczególnych eksperymentów zawierają tabele V, VI, VII i VIII oraz rycina 4.

3. Metodą ekstrakcji w systemie ciągłym:
 - 3.1. z wodnych roztworów wzorcowych (o zawartości: 25, 50 i 125 μg C i BE w 100 ml wody), które poddawano 6-godzinnej ekstrakcji eterem w środowisku kwaśnym pH = 2, a później chloroformem ze środowiska zasadowego pH = 7–8 (przy użyciu aparatów firmy Quikfit). Wyciągi eterowe odrzucano, natomiast do ekstraktów chloroformowych dodawano 1 kroplę 1 M HCl i odparowywano je do sucha. Pozostałości rozpuszczano w 2,5 ml 10^{-4} M HCl, a następnie rozcieńczano (tym samym roztworem, stosownie do stężenia ksenobiotyków w oznaczanej próbce) bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń metodą HPLC;
 - 3.2. z homogenatów nerki (uzyskiwanych przez mechaniczne rozdrabnianie 25 gramowych fragmentów tego narządu z dodatkiem 50 ml wody), do których dodawano po 25, 50 lub 125 μg C i BE (co w przeliczeniu odpowiadało 1, 2 i 5 μg ksenobiotyku/g tkanki). Tak przygotowane próbki odbiałczano metodą siarczanowo-amonową według Borkowskiego [2] i poddawano ekstrakcji jak w p. 3.1, przy czym równolegle wykonywano w identyczny sposób ekstrakcję każdego homogenatu, ale bez dodatku ksenobiotyków. Odparowane ekstrakty rozpuszczano w 0,5 ml metanolu, oczyszczano metodą TLC¹ i oznaczano w nich C oraz BE metodą HPLC (po uprzednim zagęszczeniu eluatów z próbek o stężeniach ksenobiotyków 1 i 2 $\mu\text{g/g}$ do objętości 0,5 ml) przy pomocy krzywych kalibracji wykonanych z użyciem roztworów wzorcowych, które także „oczyszczano” metodą TLC.

Rezultaty oceny ekstrakcji w systemie ciągłym zawierają tabele IX i X.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Ad 1.1. Wyniki przedstawione na rycinie 2 dowodzą, że w przypadku 5 użytych eluentów wysoki (powyżej 80%) odzysk C metodą jednostopniowej ekstrakcji typu

¹ Oznaczanie C i BE w ekstraktach z materiału biologicznego uzyskanych metodą ekstrakcji ciągłej było bowiem możliwe dopiero po ich oczyszczeniu metodą TLC. W tym celu na płytkę chromatograficzną nanoszono po 40 μl ekstraktu (co odpowiadało 2 g tkanki), rozwijano w układzie octan etylu-metanol-amoniak (60:30:6) i część płytki wywoływano odczynnikiem Dragendorffa z 20% H_2SO_4 , po czym niewybarwione obszary chromatogramu (zlokalizowane na poziomie plam ksenobiotyków) eluowano przy użyciu 2,5 ml etanolu.

ciecz-ciecz zapewnia utrzymanie pH w zakresie 7–11 ze względu na to, iż w środowisku silnie alkalicznym dochodzi do jej hydrolizy.

„Zerowa” elucja C z roztworu wodnego w przypadku zastosowania zarówno eteru, jak i heksanu oraz pH mniejszego niż 4, prowadzi do wniosku, że często stosowaną „oczyszczającą” ekstrakcję kwaśną powinno się prowadzić przy użyciu właśnie tych rozpuszczalników. Po zastosowaniu chloroformu i dichlorometanu C przechodzi bowiem do solventu nawet w środowisku silnie kwaśnym (przy pH = 4 już ok. 20%), co oznacza straty ksenobiotyku na etapie oczyszczania. Ponadto 0% odzysku BE z roztworów wodnych po zastosowaniu eteru lub heksanu w całym zakresie pH pozwala na wykorzystanie tych rozpuszczalników do oddzielenia C od BE podczas procesu ekstrakcji. Natomiast za pomocą chloroformu, dichlorometanu i mieszaniny dichlorometan-izopropanol 3:1 można (w szerokim zakresie pH) ekstrahować z roztworów wodnych zarówno C, jak i BE. W środowisku silnie alkalicznym (pH = 11–12) dochodziło jednak do spadku wydajności ekstrakcji obu ksenobiotyków.

Zbliżone wyniki badań przedstawili Javaid i in. [10], którzy nie obserwowali, by zmiana pH w zakresie 6,5–9,5 wpływała na odzysk C z moczu i osocza przy użyciu cykloheksanu, ale stwierdzili, że pH > 10 powodowało spadek wydajności izolacji C. Wysoki odzysk C po ekstrakcji przy użyciu eteru (zbliżony do 100%) w przedziale pH = 7–11 wykazali również Bouis i in. [3]. W związku z tym, oraz z przedstawionymi wcześniej rezultatami badań własnych, należy więc przestrzec przed ekstrakcją C i BE ze środowiska silnie zasadowego (pH = 12,1 i ≈13), którego stosowanie sugerują Gerlits [7] oraz Dvorchik i in. [4].

Ad 1.2. Badania nad wpływem różnych solventów na odzysk C i BE z ich wodnych roztworów (tabela I) w pełni potwierdziły opisywaną [1, 3, 5, 10, 12, 13, 16, 19, 20, 21, 22, 24] wysoką (57–100%) wydajność izolacji C przy zastosowaniu zarówno prostych rozpuszczalników organicznych, jak też ich mieszanin z alkoholami.

BE nie przechodziła natomiast do eteru, bardzo słabo do chloroformu i dichlorometanu, a nieco lepiej do mieszaniny dichlorometanu z izopropanolem, przy czym wydajność ekstrakcji BE wzrastała wraz ze wzrostem udziału izopropanolu w mieszaninie eluującej² oraz była znacznie większa wówczas, gdy próbkę ekstrahowano dwukrotnie większą objętością rozpuszczalnika. Rezultaty badań przedstawione w tabeli I świadczą również o tym, że wydajność ekstrakcji BE przy pomocy chloroformu także zdecydowanie wzrasta po zmieszaniu go z alkoholami (etanołem lub izopropanolem). Ponadto z przeprowadzonego eksperymentu wynika, że identyczny odzysk BE jak w przypadku mieszaniny chloroform-izopropanol (3:1), można uzyskać po zastosowaniu takiego samego udziału izopropanolu w mieszaninie z dichlorometanem, co ma istotne znaczenie dla analizy. Dichlorometan ma bowiem niższą temperaturę wrzenia od chloroformu, zatem jego zastosowanie jest korzystniejsze ze względu na krótszy czas odparowywania ekstraktów.

Konfrontacja uzyskanych eksperymentalnie danych na temat odzysku BE w zależności od rodzaju i objętości solventu (tabela I) z licznymi danymi zawartymi w literaturze [5, 7, 13, 14, 16, 18, 19, 22, 24] okazała się niemożliwa ze względu na fakt, iż autorzy tych publikacji stosowali różne objętości rozpuszczalników, a to (jak się okazało) w znacznym stopniu wpływa na wydajność ekstrakcji BE.

² Udział izopropanolu w mieszaninie ekstrakcyjnej ograniczono jednak do proporcji 3:1 ze względu na powodowany przez alkohol wzrost zanieczyszczeń (por. rycina 4) oraz wydłużenie czasu odparowywania ekstraktów.

Ad 1.3. Potwierdzenie braku jakiegokolwiek zależności między odzyskiem C a objętością solwentu i jednocześnie bardzo dużego wpływu tego parametru na odzysk BE stanowią wyniki, które zawiera tabela II. Procent odzysku BE wzrastał bowiem od ok. 20% przy równych objętościach próbki i optymalnej mieszaniny rozpuszczalników (dichlorometan-izopropanol 3:1, por. tabela I) do ok. 38% przy proporcji objętości próbka/solwent 1:2 i do ok. 72%, a nawet ok. 81%, wówczas, gdy wynosiła ona odpowiednio 1:5 i 1:8.

O tego rodzaju zależności między relacją objętościową próbka/solwent a wydajnością ekstrakcji C i BE świadczą spostrzeżenia Rafla i in. [21], którzy porównywali jedno- oraz dwukrotną ekstrakcję mieszaniną chloroform-izopropanol 3:1 i zauważyli, że po ekstrakcji dwukrotnej odzysk BE wzrastało o ok. 20%, podczas gdy ekstrakcja C pozostawała na niezmiennym poziomie. Także rezultaty ekstrakcji przy użyciu innych solwentów świadczą o tym, że zwiększenie ich objętości poprawia istotnie odzysk BE bez znaczącego wpływu na odzysk C. Zastosowanie mieszaniny chloroform-izopropanol 3:2 w relacji próbka/solwent 1:4 i 1:7 pozwalało bowiem na odzyskanie odpowiednio 53% [16] i 82% [5] BE przy zbliżonym odzysku C (odpowiednio 94,5 i 100%). Natomiast zastosowanie mieszaniny chloroform-izopropanol 9:1 do ekstrakcji moczu w relacji próbka/solwent 1:4 i 1:5 dawało mniejszy odzysk BE – odpowiednio 38% [16] i 60% [18]. Od tej prawidłowości odbiega jednak niekorzystnie odzysk BE z osocza (15–23%), który uzyskali Tagliaro i in. [24] po zastosowaniu jeszcze większej objętości (relacja próbka/solwent w przybliżeniu 1:14) identycznego rozpuszczalnika (tj. mieszaniny chloroform-izopropanol 9:1), co można próbować wyjaśnić stratami ksenobiotyku podczas odparowywania dużej objętości ekstraktu lub oddziaływaniem silnie zasadowego pH ekstrakcji.

Ad 1.4. Dane zawarte w tabeli III i IV dowodzą, że odzysk BE można zwiększyć przez wysalanie próbki przed ekstrakcją, przy czym największy wzrost odzysku w porównaniu z wynikami ekstrakcji niewysalanych próbek zaobserwowano wtedy, gdy relacje objętościowe próbka/solwent wynosiły 1:1 i 1:2. Wydajność ekstrakcji BE wzrastała zwłaszcza wówczas, gdy próbki wysalano $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Odzysk był bowiem wtedy odpowiednio 2,8- i 2,1-krotnie większy, co należy wiązać z większą rozpuszczalnością tej soli w wodzie w porównaniu z NaHCO_3 , po zastosowaniu którego wzrost odzysku był mniejszy (odpowiednio 1,7- i 1,4-krotny).

Rezultaty badań autorów nad wpływem wysalania są zatem zbieżne z wynikami przedstawionymi przez Jatlowa i in. [9], którzy wysalali (mieszaniną Na_2CO_3 i NaHCO_3) próbki moczu przed ich ekstrakcją mieszaniną chloroform-etanol 4:1 w relacji objętości próbka/solwent 1:2 i otrzymali odzysk BE w wysokości 80%. Porównanie wyniku Jatlowa z 87% odzyskiem BE z surowicy uzyskanym przez Lau i in. [13] bez etapu wysalania (także przy użyciu mieszaniny chloroform-etanol 82,5:17,5) prowadzi do wniosku, że taki wzrost ekstrakcji BE, jaki zapewnia wysalanie, można osiągnąć dopiero przez ponad trzykrotne zwiększenie objętości solwentu.

Korzystny wpływ wysalania w przypadku materiału biologicznego jest jednak ograniczony wiążącym się z nim wzrostem zanieczyszczeń w ekstraktach. Wysolenie sprawia bowiem, że do rozpuszczalnika przechodzi większa ilość tych składników materiału biologicznego, które także mają charakter polarny, co potwierdzili Wallace i in. [25].

Ad 2.1. Po ustaleniu warunków ekstrakcji jednostopniowej podstawowym problemem było określenie optymalnej objętości 0,1 M HCl używanego w II etapie

ekstrakcji trójstopniowej (rycina 3)³. Przeprowadzono więc eksperyment, z którego wynika (tabela V), że dobry odzysk obu ksenobiotyków (77–80% C oraz 90–95% BE) otrzymano po użyciu 2 ml kwasu – niezależnie od tego, czy 5 ml solwentu zawierało 1,0 µg, czy też 2,5 µg C oraz BE i na tej objętości HCl porzeczano, gdyż odzysk BE w następnym etapie reekstrakcji (etap III) w znacznym stopniu zależy od relacji objętościowej próbka/solwent (por. tabela II). W związku z tym dalsze zwiększenie ilości HCl i odpowiedni do tego wzrost objętości fazy alkalicznej spowodowałyby konieczność stosowania zbyt dużych ilości rozpuszczalników.

Ad 2.2. Trójstopniowa ekstrakcja rozcieńczonego moczu⁴ wykazała (tabela VI), że podobnie, jak w przypadku ekstrakcji jedностopniowej, wzrost zawartości izopropanolu w solwencie zwiększał odzysk BE (do maksymalnie 75% przy jego udziale 1:1), ale w zakresie od 9:1 do 2:1 nie obserwowano wpływu składu solwentu na stale wysoki (ok. 65–67%) odzysk C. Ekstrakty uzyskane mieszaniną dichlorometan-izopropanol 1:1 (a także 2:1) były jednak znacznie bardziej zanieczyszczone niż te, które uzyskano przy użyciu solwentu o mniejszej zawartości izopropanolu (por. rycina 4). Zastosowanie tych mieszanin do analizy moczu, a zwłaszcza moczu zagęszczonego, wiąże się zatem z ryzykiem otrzymania ekstraktów zanieczyszczonych w stopniu czyniącym je nieprzydatnymi do ilościowego oznaczania ksenobiotyków (a szczególnie BE) metodą HPLC.

Ad 2.3. Ze względu na wyniki przedstawione w tabeli VI, za solwent optymalny dla ekstrakcji trójstopniowej uznano mieszaninę dichlorometan-izopropanol 3:1 i właśnie ją zastosowano w I i III etapie ekstrakcji eksperymentu przeprowadzonego w celu określenia takiej relacji między próbka a solwentem w obu wyżej wymienionych etapach, która zapewni maksymalny odzysk C i BE. Okazało się przy tym (tabela VII), że odzysk BE wzrastał w miarę zwiększania objętości solwentu w stosunku do objętości ekstrahowanej próbki, przy czym największy (ok. 50%) był wówczas, gdy relacja objętościowa próbka/solwent wynosiła 1:8, co sprawiło, że uznano ją za optymalną, zwłaszcza, że zapewniała ona podobnie wysoki (57%) odzysk C. Rezultaty tego eksperymentu były więc zbieżne z otrzymanymi w trakcie badania wpływu relacji próbka/solwent na efekty ekstrakcji jedностopniowej (por. tabela II).

Ad 2.4. Ustalone wcześniej (por. tabele V, VI, VII), a optymalne dla odzysku C i BE warunki ekstrakcji trójstopniowej, zostały uwzględnione w końcowym etapie oceny jej przydatności do analizy próbek zawierających ksenobiotyki, w którym określono nie tylko wydajność całego procesu, ale również jego poszczególnych etapów (tabela VIII). W ten sposób wykazano, że zastosowanie trójstopniowej ekstrakcji (zgodnie z procedurą podaną na rycinie 3) gwarantuje wysoki odzysk BE

³ Możliwości, jakie stwarza ekstrakcja trójstopniowa, oceniano ze względu na to, że ekstrakty materiału biologicznego (zwłaszcza moczu) otrzymane przy użyciu ekstrakcji jedностopniowej mieszaniną dichlorometanu lub chloroformu z alkoholami (nawet przy niskiej zawartości alkoholu) nie nadają się do bezpośredniej analizy metodą HPLC (w opisanych w tej pracy warunkach analitycznych) z powodu ich dużego zanieczyszczenia.

⁴ W której uwzględniono przedstawione wyżej rezultaty badań nad wpływem objętości HCl na odzysk C i BE metodą ekstrakcji trójstopniowej (tzn. każdorazowo w II etapie dodawano 2 ml 0,1 M HCl) oraz rezultaty badań nad odzyskiwaniem C i BE metodą ekstrakcji jedностopniowej (w świetle których najbardziej przydatnym solwentem była mieszanina dichlorometanu z izopropanolem).

(46–51, średnio 49%) i C (56–62, średnio 59%) w szerokim przedziale stężeń obu ksenobiotyków (0,5–5,0 µg/ml).

Przedstawionych wyżej wyników badań nad optymalizacją ekstrakcji trójstopniowej w odniesieniu do C i BE nie można skonfrontować z ustaleniami innych autorów. W dostępnym piśmiennictwie znaleziono bowiem tylko dane na temat odzysku C w wysokości 80% [8], 82% [15] i 65–80% [10], który uzyskano w rezultacie ekstrakcji trójstopniowej, ale po zastosowaniu innych (niż przyjęty przez autorów niniejszej pracy) systemów: chlorek butylu – 0,1 M HCl – chlorek butylu [8]; eter – 0,1 N kwas octowy – heksan [15]; cykloheksan – 0,1 M H₂SO₄ – cykloheksan [10]. Zhang i Foltz [26], którzy tą metodą ekstrahowali C i jej metabolity (w tym BE) z moczu, nie przedstawili natomiast żadnych danych liczbowych. Tymczasem równoległe odzyskiwanie BE wraz z C w tym samym procesie izolująco-oczyszczającym ma istotne znaczenie ze względu na to, że ocena stopnia i fazy zatrucia C jest znacznie utrudniona lub wręcz niemożliwa wówczas, gdy pominięty zostanie ten jej metabolit i produkt przemian pośmiertnych [11].

Ad 3.1, 3.2. Wyniki przedstawione w tabeli IX świadczą o tym, że przy użyciu ekstrakcji w systemie ciągłym z zastosowaniem chloroformu jako rozpuszczalnika można uzyskać bardzo wysoki odzysk C (86–93%) i BE (94–96%) z roztworów wodnych niezależnie od zawartości ksenobiotyków (25–125 µg) w próbce. Porównywalny i także wysoki (68–77% dla C i 72–80% dla BE) oraz niezależny od stężenia (w zakresie 1,0–5,0 µg/g) był również odzysk obu ksenobiotyków z odbiałczonych homogenatów nerki (tabela X).

Powyższe rezultaty świadczą o wysokich walorach praktycznych wyodrębniania C i BE z materiału biologicznego metodą ekstrakcji ciągłej z zastosowaniem chloroformu. Pozwala ona bowiem nie tylko na bardzo wysoki (znacznie wyższy od uzyskanego przy użyciu ekstrakcji trójstopniowej) odzysk C i BE, ale również na pominięcie takich czaso- i pracochłonnych czynności, jak wytrząsanie oraz wirowanie.

Izolacja C i BE z materiału biologicznego za pomocą ekstrakcji ciągłej ma jednak także bardzo istotne ograniczenia. Jedno z nich wiąże się z ryzykiem nadmiernego ogrzania alkalicznej fazy wodnej i spowodowaniem rozkładu C do BE, czemu można (jak to dowodzi przeprowadzony przez autorów eksperyment) częściowo zapobiegać, właściwie nadzorując proces ogrzewania oraz ograniczając stopień alkalizacji ekstrahowanego materiału do niezbędnego minimum, tj. pH = 7–8 (rycina 2). Drugie ograniczenie wynika natomiast z dużej zależności odzysku C i BE od jakości używanych w tej ekstrakcji rozpuszczalników, na co zwrócili także uwagę Sukbuntherng i in. [23], którzy rozdzielali C od jej polarnych metabolitów przy pomocy octanu etylu. Oznacza to konieczność prowadzenia kontrolnej ekstrakcji równoległe z ekstrakcją badanej próbki oraz potrzebę starannego doboru rozpuszczalników, co w opisywanym przez autorów przypadku wiązało się z wyeliminowaniem dwóch odczynników produkowanych przez POCH Gliwice, tj. chloroformu cz.d.a. (który powodował prawie całkowity rozkład C) i octanu etylu (bowiem po zastosowaniu go do układów rozwijających TLC również obserwowano ubytek C).

WNIOSKI

1. Ekstrakcja w systemie ciągłym jest szczególnie przydatna do analizy próbek o dużej objętości (np. odbiałczonych homogenatów tkanek), gdyż zapewnia bardzo wysoki odzysk C i BE z materiału biologicznego (pod warunkiem, że przestrzegane będą odpowiednie pH i temperatura ekstrakcji oraz zapewniona zostanie odpowiednia jakość chloroformu), ale uzyskane w ten sposób ekstrakty nadają się do dalszej analizy metodą HPLC dopiero po ich oczyszczeniu od tła biologicznego metodą TLC.
2. Znacznie mniejszy odzysk C i BE można uzyskać, stosując metodę ekstrakcji trójstopniowej (zgodnie z przepisem podanym w tej pracy), która jest wprawdzie bardziej czaso- i pracochłonna, ale usuwa tło biologiczne w stopniu umożliwiającym analizę ekstraktów metodą HPLC.
3. Rezultaty ekstrakcji C i BE zależą od: pH analizowanej próbki (nadmiernie alkaliczne może spowodować rozkład obu ksenobiotyków), rodzaju prostego solwentu (co można wykorzystać do selektywnej ekstrakcji wyłącznie C), składu solwentu złożonego (odzysk BE wzrasta wraz z zawartością alkoholu), relacji objętościowej próbka/solwent (przy stałym i wysokim odzysku C odzysk BE wzrasta w miarę zwiększania objętości solwentu), a także od uprzedniego wysalania ekstrahowanej próbki (co znacznie poprawia odzysk BE).