

EVALUATION OF THE METHOD OF COCAINE AND BENZOYLECGONINE ISOLATION FROM *POST-MORTEM* MATERIAL. PART II: SOLID PHASE EXTRACTION (SPE)

Marianna KISZKA, Roman MADRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: Cocaine (C) and benzoylecgonine (BE) were isolated from water solutions, blood, urine and homogenates of the liver, kidney and brain. The columns used were: C-18 (Baker), Cyano (CN) (Baker) and Bond Elut Certify (Varian). The eluent was a mixture of dichloromethane – isopropanol – ammonium hydroxide 80:20:2. The highest recovery of xenobiotic extraction from urine (BE about 80% and C over 90%) and from blood (about 67% of BE and 83% of C), and good recovery from tissues (44–58% of BE and 66–72% of C) was achieved using Bond Elut Certify columns. Such extracts from “fresh” autopsy material showed low “background” levels, which enabled their further analysis using the HPLC method. Additionally, the effects of various factors on the extraction yield using B. E. Certify columns were studied. No significant effects of pH and the amount of the solvent on the recovery of C and BE were observed. It was found that the recovery of both xenobiotics from the brain homogenates increased after diluting them with a higher amount of phosphate buffer and decreased when the samples were prepared using acetonitrile.

KEYWORDS: Cocaine; Benzoylecgonine; Solid phase extraction; Autopsy material.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIX, 2002, 14–37

Received 6 September 2001; accepted 17 September 2001

INTRODUCTION

The most popular methods of extraction of cocaine (C) and its metabolites from biological material are liquid-liquid extraction (LLE) and solid phase extraction (SPE). According to the first part of the work¹, the non-polar character of C makes it possible to isolate by means of LLE with the use of the majority of simple organic solvents. However, the hydrophilic character of benzoylecgonine (BE) requires addition of a polar component, e.g. alcohol. LLE is time- and work-consuming, due to the necessary centrifuging (in order to remove emulsions created during the extraction) and lengthy evaporation of extracts (due to the use of large quantities of solvents), which could be avoided through the application of solid phase extraction [17, 25]. Thus,

¹ Compare: *Problems of Forensic Science* 2001, vol. XLVIII, pp. 7–30.

in the second part of the work, three kinds of packing for the SPE column were tested in terms of their usefulness in the isolation of C and BE from autopsy material.

MATERIALS, METHODS AND RESULTS

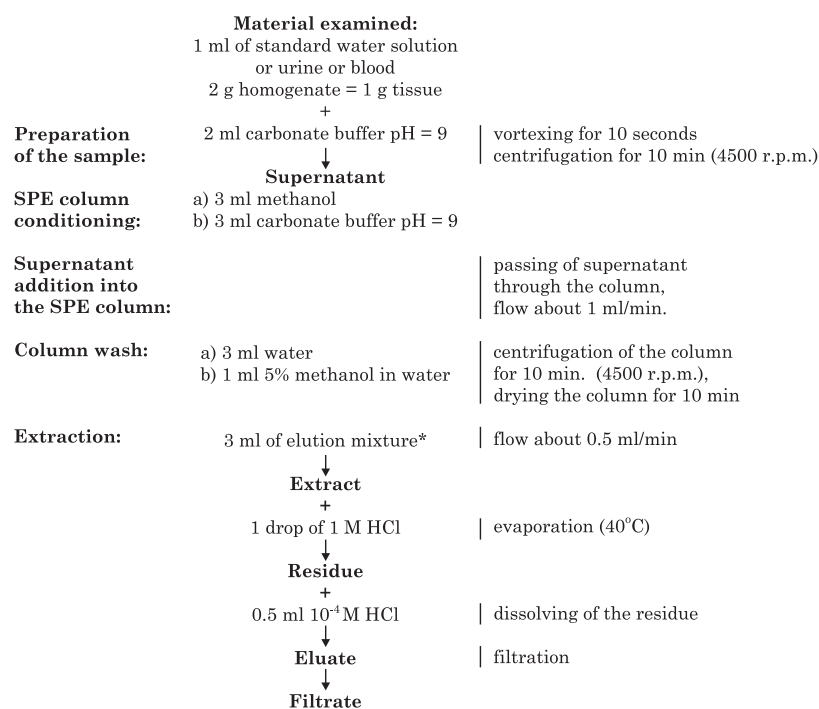
Samples of aqueous solutions, blood, urine, and homogenates of the liver, kidney and brain (prepared by chopping up fragments of these organs mechanically in water at a ratio of 1:1)² were analysed. Upon adding C and BE to this material, the following concentrations of both xenobiotics were obtained: 2.5 µg/ml in water, urine and blood and 1.25 µg per 1 g of the homogenate, respectively. For the extraction, 1 ml portions of aqueous solution (and also of blood and urine) were taken, and 2 g of the homogenate (being equivalent to 1 g of an organ). Consequently, samples containing 2.5 µg of C and 2.5 µg of BE were analysed every time.

Quantitative determinations of the isolated xenobiotics were performed using the high-pressure liquid chromatography (HPLC)³ method.

1. The usefulness of various kinds of solid phase (i.e. packing of SPE columns) for isolation of C and BE was evaluated on the basis of the recovery obtained as the result of elution with dichloromethane-isopropanol-ammonia (80:20:2) using:
 - a) Bakerbond SPE C-18 (200 mg, 6 ml) columns and a modified extraction method [2, 26], according to the scheme shown in Figure 1; the obtained results are listed in Table I;
 - b) Bakerbond SPE Cyano (CN) (500 mg, 6 ml) columns and a modified extraction procedure (a PH-004 application, materials by Baker – Bakerbond SPE Application Notes) for alkaline medicines [3], according to the scheme shown in Figure 2; the obtained results are listed in Table II;
 - c) Bond Elut Certify columns by Varian (300 mg, 3 ml) and the analytical procedure described in materials by Varian [4], as well as in the work of Abusada et al. [1], according to the scheme presented in Figure 3; the obtained results are listed in Table III.

² Similarly, as in the first part of this work, samples taken from the bodies of car accident victims were firstly examined for the presence of pharmacological means.

³ With the use of the analytical conditions described in the first part of this work.



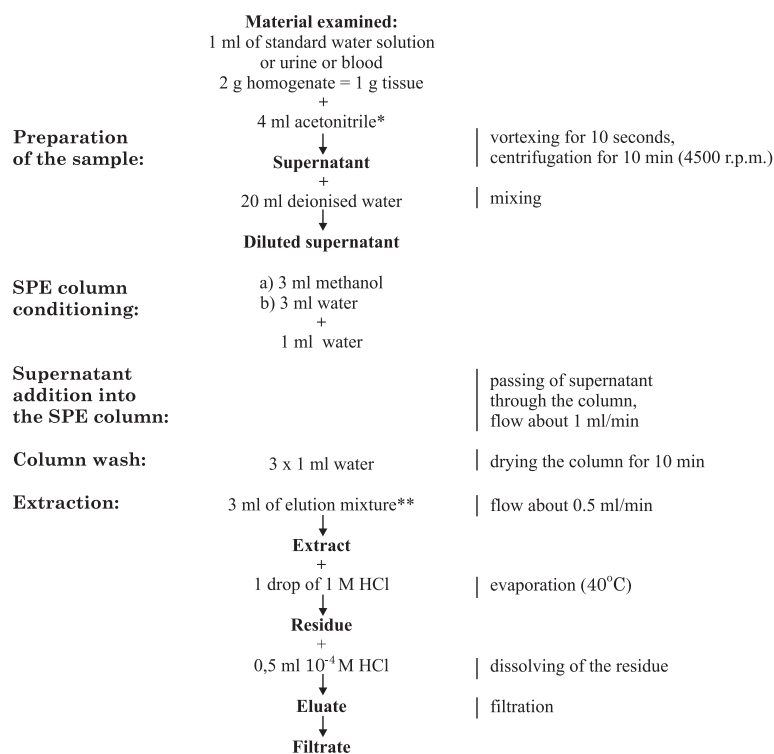
* Dichloromethane-isopropanol-ammonium hydroxide 80:20:2.

Fig. 1. A diagram of extraction using Bakerbond SPE C 18 columns.

TABLE I. C AND BE RECOVERY AFTER SPE USING BAKERBOND SPE C-18 COLUMNS ACCORDING TO THE PROCEDURE PRESENTED IN FIG. 1

Samples	Number of samples	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
Water	4	92.7 \pm 10.45	78.3 \pm 13.67
Urine	4	89.5 \pm 12.26	?*
Blood	4	78.1 \pm 12.11	59.2 \pm 14.10
Brain	4	39.3 \pm 17.02	31.2 \pm 17.81
Kidney	4	?*	?*
Liver	4	50.6 \pm 18.57	42.1 \pm 19.91

* Extracts unsuitable for HPLC determinations.



* in blood samples, 0,5 ml of methanol added first.

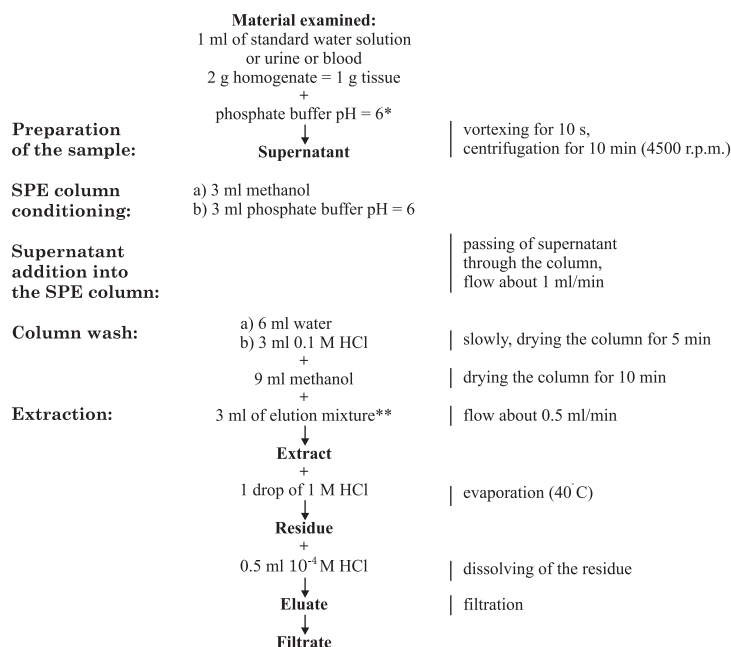
** dichloromethane-isopropanolammonium hydroxide 80:20:2.

Fig. 2. A diagram of extraction on Bakerbond SPE Cyano (CN) columns.

TABLE II. C AND BE RECOVERY AFTER SPE USING BAKERBOND SPE CYANO (CN) COLUMNS ACCORDING TO THE PROCEDURE PRESENTED IN FIG. 2

Samples	Number of samples	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
Water	4	87.7 \pm 11.64	0
	4	93.6 \pm 7.11	0
Urine	4	95.4 \pm 6.30	0
Blood	4	61.2 \pm 11.65	0
Brain	4	30.8 \pm 10.58	0
Liver	4	35.9 \pm 8.51	0
Kidney	4	33.6 \pm 5.47	0

Recovery after using a 100:2 methanol-ammonium hydroxide mixture.



* 2 ml for water solutions and urine samples, 8 ml for blood samples and tissue homogenates.

** dichloromethane-isopropanol-ammonium hydroxide 80:20:2

Fig. 3. A diagram of extraction on Bond Elut Certify columns (Varian).

TABLE III. C AND BE RECOVERY AFTER SPE USING BOND ELUT CERTIFY COLUMNS ACCORDING TO THE PROCEDURE PRESENTED IN FIG. 3

Samples	Number of samples	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
Water	3	94.7 \pm 8.00	80.4 \pm 4.37
Urine	4	96.3 \pm 6.46	78.9 \pm 6.73
Blood	5	82.9 \pm 6.19	67.2 \pm 5.87
Brain	6	71.3 \pm 9.24	44.7 \pm 7.31
Kidney	5	72.2 \pm 8.49	58.4 \pm 11.20
Liver	5	66.2 \pm 10.12	50.3 \pm 5.91

- Also evaluated was the efficiency of extraction of C and BE from their aqueous standard solutions⁴ using Varian Bond Elut Certify columns (300 mg, 3 ml), taking the influence of the following factors into account:

⁴ In agreement with the scheme shown in Fig. 3.

- a) the pH of the phosphate buffer used in the preparation of samples – in such a manner that 2 ml of the phosphate buffer of pH = 2 or pH = 6 was added to each sample, using 3 ml of the same buffers for conditioning of the column (the obtained results are shown in Table IV);
- b) the volume of the eluent – in such a way that the extraction was performed using 3, 6 or 10 ml of the eluent mixture (the obtained results are shown in Table V);
- c) acetonitrile – in such a manner that 2 ml each of acetonitrile and the pH = 6 phosphate buffer, or 4 ml of this buffer alone were used for the sample preparation (the obtained results are presented in Table VI);
- d) the quantity (4 or 8 ml) of pH = 6 phosphate buffer used for the dilution of aqueous standard solutions and brain homogenates (the obtained results are presented in Table VII).

TABLE IV. C AND BE RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS USING* BOND ELUT CERTIFY COLUMNS IN RELATION TO THE pH OF THE PHOSPHATE BUFFER USED TO PREPARE THE SAMPLES AND CONDITION THE COLUMNS

Buffer pH	Number of samples	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
2	3	96.4 \pm 10.61	83.1 \pm 9.85
6	3	91.5 \pm 6.84	85.8 \pm 8.57

*According to the diagram presented in Fig. 3.

TABLE V. C AND BE RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS USING* BOND ELUT CERTIFY COLUMNS IN RELATION TO THE ELUENT VOLUME

Eluent volume	Number of samples	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
3 ml	3	92.9 \pm 5.33	85.2 \pm 6.31
6 ml	3	92.3 \pm 6.67	81.6 \pm 11.46
10 ml	3	97.2 \pm 9.43	87.4 \pm 8.00

*According to the diagram presented in Fig. 3.

TABLE VI. C AND BE RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS USING* BOND ELUT CERTIFY COLUMNS WITH AND WITHOUT ACETONITRILE

Type of solutions	Number of samples	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
2 ml buffer	3	90.3 \pm 8.81	79.4 \pm 3.35
1 ml acetonitrile + 1 ml buffer	3	69.1 \pm 7.87	10.2 \pm 3.21

*According to the diagram presented in Fig. 3.

TABLE VII. C AND BE RECOVERY FROM WATER SOLUTIONS AND BRAIN HOMOGENATES USING* BOND ELUT CERTIFY COLUMNS IN RELATION TO THE AMOUNTS OF PHOSPHATE BUFFER USED TO PREPARE THE SAMPLES

Buffer Amount	Number of samples	Mean recovery and standard deviation (\pm) in [%]	
		C	BE
4 ml	3	91.4 \pm 3.42	82.3 \pm 8.17
4 ml	3	52.0 \pm 9.89	33.6 \pm 6.52
8 ml	3	95.3 \pm 7.09	84.5 \pm 4.46
8 ml	3	73.5 \pm 7.65	45.6 \pm 5.18

Water solution Brain homogenate

*According to the diagram presented in Fig. 3.

RESULTS AND DISSCUSION

- 1a. The extraction procedure using Bakerbond SPE C-18 columns in the manner depicted in Figure 1 resulted (Table I) in a high recovery of C and BE from the aqueous solutions (about 93% and 78%, respectively). C recovery from urine turned out to be comparatively high as well (about 89%), however the level of impurity in these extracts made it impossible to determine BE concentrations with the HPLC method. The efficiency of xenobiotics extraction from blood treated in the same way was also quite high – about 78% for C and 59% for BE.

Aderjan et al. [2, 26], however, were able to obtain a high xenobiotics recovery level from both urine (95% of C and 87% of BE) and blood (86% of C and 75% of BE), using a similar extraction procedure with Analytchem

International Bond Elute C-18 columns, and gas- chromatography combined with mass detection. A comparable level of efficiency in C and BE extraction from urine and blood was obtained by Tebbett and McCartney [27], who used columns with C-8 packing that was more polar, and treated blood samples ultrasonically (which significantly improved the flow through the column packing). Moreover, the purity of extracts was higher when a C-18 column was used. Thus, the results presented in the current work, as well as those obtained by the above-mentioned authors remain in agreement with the conclusions of Scheurer and Moore [25], who claim that non-polar phases are more versatile, but extracts obtained using them (especially extracts from urine) contain large amounts of impurities, which makes the determination of BE difficult.

The isolation of C and BE from tissues using Bakerbond SPE C-18 columns turned out to be unsatisfactory, since there were difficulties transferring all of the tissue filtrates through the column packing, despite the fact that more pressure was used (it came down to the column stacking). The mean recovery of C and BE from the liver was only 51% and 42%, respectively, and from the brain scarcely 39% and 31%, respectively. Moreover, the extracts were adulterated significantly. In the case of the kidney, the “background” was so large that the extracts were yellow in colour, so the quantitative analysis was resigned from due to the high risk of destroying the chromatographic column.

Brown, et al [6] observed clogging of the C-18 and C-8 columns as well. For the extraction of C and BE from enzymatically etched brain, they successfully used C-2 packing that was more polar. The authors of the presented work determined the usefulness of C-18 phase in the isolation of xenobiotics from tissues to be limited, this probably caused by an interaction of fat bodies present in the material with the non-polar packing of the column.

A significant disadvantage of the extraction performed in columns with octadecyle phase was also a transfer of water molecules to the extracts, which was only partially decreased by washing the columns with a 5% aqueous solution of methanol and centrifuging them before extraction. This should be given particular attention, since even an insignificant amount of water in the extract can cause decomposition of C and BE during evaporation because of the alkaline environment of the aqueous phase⁵ (caused by the extraction conditions). In the experiment, it was prevented by the addition of one drop of 1M HCl to the extract (before evaporation). Removal of the aqueous phase with a pi- pette carried the risk of additional, uncontrolled loss of the compounds being isolated.

⁵ As witness the results of study of the authors in the work on the stability of C and BE as a function of pH and temperature [16].

- 1b. The extraction with Bakerbond SPE Cyano (CN) columns (performed according to the manufacturer's instructions for isolation of alkaline compounds, i.e. according to the scheme presented in Figure 2) turned out to be useless for the extraction of BE (Table II). C recovery, on the other hand, was fully satisfactory. It was not increased (in cases of analysis of aqueous solutions) when using a 100:2 methanol-ammonia mixture as an eluent. The isolation of C from biological materials was then continued according to the instructions presented in Figure 2 and it was established that only the recovery of C from urine was quantitatively close to that from water (more than 90%). However, its recovery from blood samples was significantly worse (61%) and was very low (31-36%) from the brain, liver and kidneys. In the HPLC analysis, interference between C and the background of a biological material was not observed, which could also be a result of the deproteinating action of acetonitrile being added during the initial preparation of samples.
- 1c. Using columns with a mixed type of packing, i.e. Bond Elut Certify, a high level of efficiency in the extraction of C and BE (Table III) from aqueous solutions and from urine samples (above 90% and about 80%, respectively) was observed. The efficiency of extraction of C (83%) and BE (67%) from the autopsy blood was also high. The recoveries of the xenobiotics from the liver, kidneys and brain, however, were lower (in the ranges: 66–72% for C and 45–58% for BE). The obtained extracts were of such purity that it was possible to identify both of the xenobiotics in them using the HPLC method (Figure 4), a fact that can be attributed to the large volume of methanol used to wash the column, which can only be applied in the case of the type of packing found in Bond Elut Certify columns, i.e. of dual character (non-polar and ion-exchange). In the column filled by C-18 or propylcyane phase, the same quantity of methanol causes significant losses, especially of compounds that are polar in character (i.e. BE). Moreover, the use of methanol prevented the transfer of water to extracts and degradation of the recovered xenobiotics.

Comparing the efficiency of C and BE extraction using Bond Elut Certify columns with that obtained by other authors is difficult due to the use of various modifications to the analytical procedures, as well as various columns with mixed types of packing⁶. In this situation, the only fact one can admit is that the recovery of C and BE obtained (from

⁶ It is well-known that any change of pH of the buffer, the quantity of the solvent used or the composition of the extraction mixture as well as the manner of the preparation of a biological sample can influence the efficiency of extraction. Moreover, differences in recovery of xenobiotics may arise between different columns with the same type of packing and even between different batches of columns made by the same producer [25].

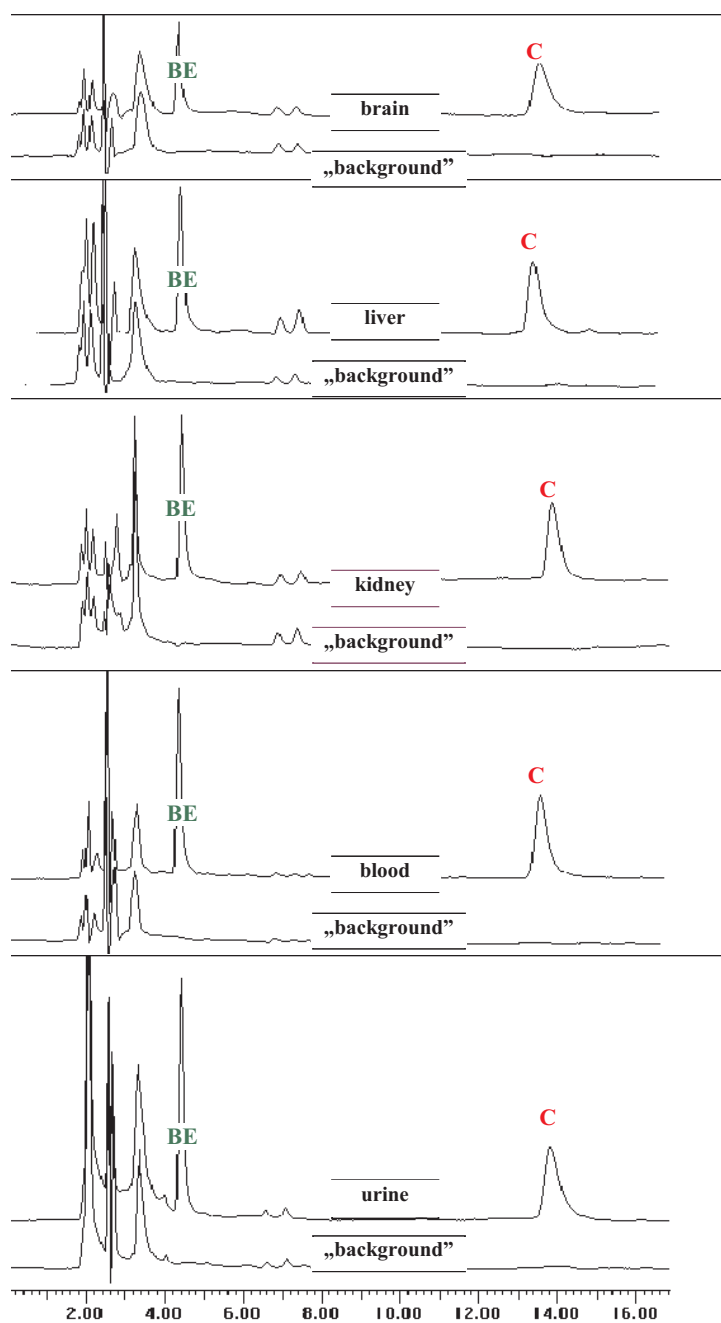


Fig. 4. The HPLC chromatograms of extracts from autopsy material prepared by means of the SPE - B. E. Certify method.

standard solutions, urine and blood) using a Bond Elut Certify column was comparable to the results obtained by other authors when extracting liquid samples, i.e. urine [8, 10, 11, 12, 13, 18, 23, 24], plasma [7, 8, 10, 11, 13], serum [1, 22] blood [1, 7, 10, 11] or amniotic fluid [19] using various columns with dual-character packing (B. E. Certify, Clean Screen, X-Track T). They always obtained a high recovery of C (87–100%), while BE recovery was considerably variegated (58–96%). Differences in the recovery of BE could be explained by the observations of Milles et al. [18] that, using resins of a copolymer structure (e.g. Clean Screen or X-Track T columns), the extraction efficiency of polar compounds, such as BE, was higher (of about 20–30%) as compared to the recovery that could be obtained using columns with a mixed, “combined” packing (e.g. B. E. Certify).

The extraction of C and BE from a biological material other than urine and blood was described in few publications [14, 20]. In the case of brain tissue, C recovery was 60 and 74%, respectively, and 54 and 34% for BE, bearing witness to the fact that recovery of xenobiotics from tissues was lower than that from liquids, similarly to the experiment described here. It should be explained that in the case of the analysis of blood or homogenates of fresh tissues, no difficulties were observed in the transfer of their filtrates through the packing of Bond Elut Certify columns, nor was there any clogging of the columns, these being the main problems with tissue extraction using the SPE method. Hernandez et al [14], too, observed that during SPE extraction using Clean Screen columns, all of the brain samples passed through them easily (regardless of whether or not they underwent the process of digestion with lipase) and achieved an average recovery of xenobiotics (60% for C and 54% for BE), similarly to ours. On the other hand, Moore et al. [20] obtained a higher recovery of C (74%), but lower of BE (34%) using X-Tract T columns (specially adapted to enable the rapid flow of highly viscous samples). They related this to the excessive speed of the samples' flow through the column.

Comparing of the recoveries of C and BE from the brain obtained in the experiments described here (using B. E. Certify columns), and those obtained by Moore et al. [20], with the results of the study by Huang et al⁷ [15] does not mean that additional analysis of the sediment could provide a chance to improve the recovery levels of these xenobiotics from homogenates of the organs, even assuming that sig-

⁷ After extraction of supernatants taken from above homogenates of the liver with SPE method these authors initially obtained a low recovery of alkaline medicines but significantly improved it by an enzymatic digestion of the sediment (at temperature of 60°C, pH = 10.5) and an additional isolation by means of SPE.

nificant amounts of C and BE are present in the centrifuge residue. In a strongly alkaline environment, and at a high temperature not only C, but its metabolites as well, undergo disintegration.

A comparison of extraction efficiency using three SPE-tested columns turned out to be most advantageous to the Bond Elut Certify column, as the recovery of C and BE (especially) from tissues was higher and more stable than in the case of Bakerbond SPE-C-18 columns. Bakerbond SPE Cyano (CN) columns are compromised by zero recovery of BE⁸. The high “purity” of the extracts, which made determination of C and BE by the HPLC method possible, decided on the advantage of extracting with Bond Elut Certify over a traditional LLE⁹ extraction.

Extraction using Bond Elut Certify columns reveals negative sides as well, such as high costs, variable column quality, and the possibility of some transfer of column packing components to the extracts. Obtaining repeatable results could pose some problems as well, due to the fact that xenobiotics recovery depends strongly on the speed of the solution’s flow through the packing of a column. Thus, in quantitative examinations it is necessary to use internal standards or automatic SPE extraction equipment [25].

- 2a. Changing the pH of the phosphate buffer can improve the efficiency of C and BE recovery. This was supported by the results of examinations of the meconium. It was found that dilution of its methanol eluents with a pH = 2 buffer [21] made a higher BE recovery level (by about 25%) possible than did dilution with a pH = 3 buffer [5].

It turned out, however, (Table IV) that changing the pH of the phosphate buffer within a range of 2–6 (used in preliminary sample preparation and conditioning of the column, see Figure 3) did not influence the recovery of xenobiotics from aqueous solutions.

Thus, the explanation of these doubts concerning the influence of the buffer’s pH on the efficiency of C and BE extraction should be sought in the fact that the extraction conditions were modified along with the change of pH in the buffer¹⁰. The unfounded conviction of Murphey et al [21] that the lower BE recovery (about 30%) obtained by Clark et al. [9] for the meconium could be related to the use of a pH = 6

⁸ The toxicological expert’s report could not be treated as complete without determination of BE, as it is one of the main metabolites of C and products of disintegration of this xenobiotic in biological material *in vitro* [16].

⁹ Conditions of extraction and recovery of C and BE with these methods were presented in the first part of this work.

¹⁰ All authors used phosphate buffer pH = 6 for Bond Elut Certify and X-Track T columns [1, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 18, 20, 23, 27] whereas in the case of Clean Screen columns the following buffers: pH = 2 [21], pH = 3 [5, 22], pH = 4 [10] or pH = 6 [11, 14].

phosphate buffer bears witness to how much depends on the details of SPE extraction. Murphey et al. observed very weak BE retention on columns conditioned by a pH = 6 buffer when the xenobiotic was solved in pure methanol. Nevertheless, Clark et al. evaporated methanol prior to the drift on the column and dissolved the residue in pH = 6 buffer before introducing it into the column, which should not lower BE recovery.

- 2b. It was confirmed in experiments that 3 ml of dichloromethane : isopropanol : ammonium mixture (80:20:2) is sufficient for obtaining a high recovery of C and BE from aqueous solutions, as it was shown that increasing the amount of solvent used for the elution did not significantly influence the efficiency of the extraction when using Bond Elut Certify columns (Table V).

The experiments of Moore et al [19] show that, in the case of some columns packed with co-polymers, the recovery of C and BE could depend on the amount of elution mixture. After using high flow X-Track T columns for extraction, they found that increasing the amount of eluent from 3 to 10 ml caused an increase in the recovery of xenobiotics from the amniotic fluid (C: 67 → 96%, and BE: 19 → 58%). However, these authors [5] obtained an even higher level of C (100%) and BE (64%) recovery from the meconium, using different columns (Clean Screen, also packed with dual-action resins) and only 3 ml of the same eluent in the experiment. One can conclude from their aforementioned research, and from the results of the experiment described here, that even a small amount of the eluent could assure a high level of efficiency in the extraction of both xenobiotics when suitable columns are selected. This is also borne out by the results of research performed by Hernandez et al [14], who used 3 ml of the same eluent and a Clean Screen column with a type of packing similar to that used in the current work with Bond Elut Certify columns, recovering most of the C and its metabolites from the brain. Repeated extraction with a new portion of eluent did not improve this result.

- 2c. An attempt to increase extraction efficiency in the experiment described here, using acetonitrile for preliminary sample preparation, failed. When acetonitrile was applied, the mean recovery of C was distinctly lower than that obtained from samples prepared using only phosphate buffer, and BE recovery was decreased by about 70% (Table VI).
- 2d. The use of a larger amount of buffer for sample preparation appeared to be beneficial in the case of extracting brain homogenates, because after using 8 ml of the buffer, BE recovery increased by about 10% (as compared to recovery after using 4 ml of the buffer) and C recovery by

as much as 20%, while recovery from aqueous solutions remained on a similar level (Table VII).

Similar conclusions can be drawn from a comparison of the efficiency of C and BE extraction from meconium, which was obtained by Clark et al [9] and Abusada et al [1], who used methanol for the preliminary treatment of samples (after which eluents were evaporated and dissolved in the buffer). Both obtained maximum recovery of C (99–100%), whereas BE recovery was only 30% when 5 ml of methanol was used [9]; using two times this amount of alcohol, however, it increased to 68–90% [1].

CONCLUSIONS

1. Using Varian Bond Elut Certify columns in accordance with the manufacturer's recommendations can assure high efficiency in the extraction of C and BE from aqueous solutions, urine, blood and tissue homogenates, and enables determination of xenobiotics, using the HPLC method, without any additional purification of extracts from biological material. Conversely, the use of Bakerbond SPE C-18 columns caused an increase of biological matrix in the extracts (this impedes direct determination of xenobiotics in urine and kidney extracts using HPLC method), while using Bakerbond SPE Cyano (CN) makes any recovery of BE impossible.
2. Increasing the amount of phosphate buffer for preliminary tissue homogenate preparation improves BE and C recovery. However, changes to the extraction conditions when using Bond Elut Certify columns, such as decreasing the pH of the phosphate buffer and increasing the amount of solvent, do not significantly improve the efficiency of the extraction.
3. The recovery of C and BE from aqueous solutions, urine and blood using Bond Elut Certify is comparable to that obtained in an optimised LLE extraction (which was described in the first part of this work); LLE extraction (in the continuous system), however, assures a higher recovery of both xenobiotics from tissue homogenates.
4. SPE extraction using Bond Elut Certify columns allows one to obtain much cleaner extracts from biological material, and requires much smaller amounts of solvent than LLE extraction.
5. The application of SPE extraction involves the risk of column overload (in the case of extracting samples that are too large or have very high concentrations of xenobiotics) as well as increasing costs of a toxicological analysis.

References:

1. Abusada G. M., Abukhalaf I. K., Alford D. D. [et al.], Solid-phase extraction and GC/MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood, and plasma, *Journal of Analytical Toxicology* 1993, vol. 17, pp. 353–358.
2. Aderjan R. E., Schmitt G., Wu M. [et al.], Determination of cocaine and benzoylecgonine by derivatization with iodomethane-D3 or PFPA/HFIP in human blood and urine using GC/MS (EI or PCI Mode), *Journal of Analytical Toxicology* 1993, vol. 17, pp. 51–55.
3. Baker J. T., Bakerbond SPE* application notes [materialy firmy Baker].
4. Bond Elut Certify™ instruction manual, Varian sample preparation products.
5. Browne S., Moore C., Negrusz A. [et al.], Detection of cocaine, norcocaine, and cocaethylene in the meconium of premature neonates, *Journal of Forensic Sciences* 1994, vol. 39, pp. 1515–1519.
6. Browne S. P., Moore C. M., Scheurer J. [et al.], A rapid method for determination of cocaine in brain tissue, *Journal of Forensic Sciences* 1991, vol. 36, pp. 1662–1665.
7. Chen X. H., Franke J. P., Wijsbeek J. [et al.], Determination of basic drugs extracted from biological matrices by means of solid-phase extraction and wide-bore capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 150–153.
8. Chen X. H., Wijsbeek J., Franke J. P. [et al.], A single-column procedure on Bond Elut Certify for systematic toxicological analysis of drugs in plasma and urine, *Journal of Forensic Sciences* 1992, vol. 37, pp. 61–71.
9. Clark G. D., Rosenzweig I. B., Raisys V. A. [et al.], The analysis of cocaine and benzoylecgonine in meconium, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, vol. 16, pp. 261–263.
10. Cone E. J., Hillsgrove M., Darwin W. D., Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites, and “crack” pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry, *Clinical Chemistry* 1994, vol. 40, pp. 1299–1305.
11. Crouch D. J., Alburges M. E., Spanbauer A. C. [et al.], Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid-phase extraction and positive ion chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, vol. 19, pp. 352–358.
12. Ellerbe P., Tai S. S. C., Christensen R. G. [et al.], The certification of cocaine and benzoylecgonine in a human urine standard reference material, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, vol. 16, pp. 158–162.
13. Fernandez P., Lafuente N., Bermejo A. M. [et al.], HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 224–228.
14. Hernandez A., Andollo W., Hearn W. L., Analysis of cocaine and metabolites in brain using solid-phase extraction and full-scanning gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *Forensic Science International* 1994, vol. 65, pp. 149–156.

15. Huang Z. P., Chen X. H., Wijsbeek J. [et al.], An enzymic digestion and solid-phase extraction procedure for screening for acidic, neutral, and basic drugs in liver, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, pp. 248–254.
16. Kiszka M., Buszewicz G., Mađro R., Stability of cocaine in phosphate buffer and in urine, *Problems of Forensic Sciences* 2000, vol. XLIV, pp. 7–23.
17. McDowall R. D., Sample preparation for biomedical analysis, *Journal of Chromatography* 1989, vol. 492, pp. 3–58.
18. Mills M. S., Thurman E. M., Pedersen M. J., Application of mixed-mode, solid-phase extraction in environmental and clinical chemistry. Combining hydrogen-bonding, cation-exchange and Van der Waals interactions, *Journal of Chromatography* 1993, vol. 629, pp. 11–21.
19. Moore C., Browne S., Tebbett I. [et al.], Determination of cocaine and benzoylecgonine in human amniotic fluid using high flow solid-phase extraction columns and HPLC, *Forensic Science International* 1992, vol. 56, pp. 177–181.
20. Moore C., Browne S., Tebbett I. [et al.], Determination of cocaine and its metabolites in brain tissue using high-flow solid-phase extraction columns and high-performance liquid chromatography, *Forensic Science International* 1992, vol. 53, pp. 215–219.
21. Murphey L. J., Olsen G. D., Konkol R. J., Quantitation of benzoylecgonine and other cocaine metabolites in meconium by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1993, vol. 613, pp. 330–335.
22. Muztar J., Chari G., Bhat R. [et al.], A high-performance liquid chromatographic procedure for the separation of cocaine and some of its metabolites from acepromazine, ketamine, and atropine from serum, *Journal of Liquid Chromatography* 1995, vol. 18, pp. 2635–2645.
23. Nishikawa M., Nakajima K., Tatsuno M. [et al.], The analysis of cocaine and its metabolites by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (LC/APCI-MS), *Forensic Science International* 1994, vol. 66, pp. 149–158.
24. Rakoczy I., Dragshold C., Wyodrębnianie kokainy i benzoilecgoniny z płynów biologicznych za pomocą ekstrakcji na fazie stałej mieszanego rodzaju. Streszczenia referatów. II Sympozjum Nauk Sądowych „Ślady kryminalistyczne”, Kraków, 20–23 września 1994.
25. Scheurer J., Moore C. M., Solid-phase extraction of drugs from biological tissues – A review, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, vol. 16, pp. 264–269.
26. Schmitt G., Aderjan R., Nachweis von Cocain und Benzoylecgonin – Pentafluoroisopropylester aus Blut und Urin, *Toxichem + Krimtech* 1991, Bd 58, S. 98–105.
27. Tebbett I. R., McCartney Q. W., A rapid method for the extraction of cocaine and benzoylecgonine from body fluids, *Forensic Science International* 1988, vol. 39, pp. 287–291.

OCENA METOD IZOLACJI KOKAINY I BENZOILOEKGONINY Z MATERIAŁU SEKCYJNEGO. CZĘŚĆ II. EKSTRAKCJA NA FAZIE STAŁEJ (SPE)

Marianna KISZKA, Roman MAĐRO

WSTĘP

Do izolacji C (kokainy) i jej metabolitów z materiału biologicznego najpowszechniej stosuje się ekstrakcję typu ciecz-ciecz (LLE – *liquid-liquid extraction*) oraz ekstrakcję z fazy stałej (SPE – *solid phase extraction*). Jak wynika z pierwszej części tej pracy,¹ niepolarny charakter C sprawia, że może ona być łatwo izolowana przy użyciu ekstrakcji LLE z zastosowaniem większości prostych rozpuszczalników organicznych. Natomiast hydrofilowy charakter BE (benzoiloekgoniny) wymaga dodania do niej składnika polarnego, tj. alkoholu. Ekstrakcja LLE jest jednak czasochłonna ze względu na konieczność wirowania (celem usuwania emulsji tworzących się podczas ekstrakcji) oraz długiego odparowywania ekstraktów (ze względu na stosowanie dość dużych ilości rozpuszczalników), czego można uniknąć, stosując ekstrakcję na fazie stałej [17, 25]. Z tego względu w drugiej części pracy prze-testowano trzy rodzaje wypełnień kolumn SPE pod kątem ich użyteczności do izolacji C i BE z materiału sekcyjnego.

MATERIAŁ, METODY I WYNIKI

Analizowano próbki roztworów wodnych, krwi i moczu oraz homogenatów wątroby, nerki i mózgu (które uzyskiwano przez mechaniczne rozdrobnienie fragmentów tych narządów w wodzie w proporcji 1:1)². Przez dodanie C i BE do tego materiału uzyskiwano stężenie obu ksenobiotyków w wysokości 2,5 µg/ml w wodzie, moczu i krwi oraz 1,25 µg/g homogenatu. Do ekstrakcji pobierano po 1 ml roztworu wodnego (a także moczu i krwi) oraz po 2 g homogenatu (co odpowiadało 1 g narządu). Analizowano zatem każdorazowo próbkę zawierającą 2,5 µg C i 2,5 µg BE.

Oznaczenia ilościowe wyizolowanych ksenobiotyków przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)³.

1. Przydatność różnych rodzajów fazy stałej (tj. wypełnień kolumn SPE) do izolacji C i BE oceniano na podstawie odzysku otrzymanego w rezultacie elucji mieszaniną dichlorometan-izopropanol-amoniak (80:20:2) przy użyciu:

¹ Por. *Z Zagadnień Nauk Sądowych* 2001, z. XLVIII, s. 7–30.

² Podobnie, jak w pierwszej części pracy, materiał pobierany ze zwłok ofiar wypadków drogowych sprawdzano przed tym pod względem obecności różnych środków farmakologicznych.

³ Z zastosowaniem warunków analitycznych podanych w pierwszej części tej pracy.

- a) kolumn Bakerbond SPE C-18 (200 mg, 6 ml) i zmodyfikowanej metody ekstrakcji [2, 26], zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 1, czego rezultaty zawiera tabela I;
 - b) kolumn Bakerbond SPE Cyano (CN) (500 mg, 6 ml) i zmodyfikowanej procedury ekstrakcyjnej (aplikacja PH-004, materiały firmy Baker – Bakerbond SPE Application Notes) przeznaczonej dla leków o charakterze zasadowym [3], zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 2, czego rezultaty zawiera tabela II;
 - c) kolumn Bond Elut Certify firmy Varian (300 mg, 3 ml) i postępowania analitycznego opisanego w materiałach firmy Varian [4] oraz w pracy Abusada i in. [1], zgodnie ze schematem przedstawionym na rycinie 3, czego rezultaty zawiera tabela III.
2. Oceniano także wydajność ekstrakcji C i BE z ich wodnych roztworów wzorcowych przy użyciu⁴ kolumn Bond Elut Certify firmy Varian (300 mg, 3 ml) z uwzględnieniem wpływu:
- a) pH buforu fosforanowego używanego do przygotowania próbek – w ten sposób, że dodawano do nich 2 ml buforu fosforanowego o pH = 2 lub pH = 6, stosując 3 ml takich samych buforów do kondycjonowania kolumny (wyniki zawiera tabela IV);
 - b) objętości eluentu – w ten sposób, że ekstrakcję przeprowadzano, stosując 3, 6 lub 10 ml mieszaniny eluującej (wyniki zawiera tabela V);
 - c) acetonitrylu – w ten sposób, że do przygotowania próbek używano albo 2 ml acetonitrylu i 2 ml buforu fosforanowego o pH = 6, albo tylko 4 ml tego buforu (wyniki zawiera tabela VI);
 - d) ilości (4 lub 8 ml) buforu fosforanowego o pH = 6 użytego do rozcieńczenia wodnych roztworów wzorcowych i homogenatów mózgu (wyniki zawiera tabela VII).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

- 1a. Procedura ekstrakcji z zastosowaniem kolumn Bakerbond SPE C-18 w sposób przedstawiony na rycinie 1 zapewniała (tabela I) wysoki odzysk C i BE z roztworów wodnych (odpowiednio ok. 93% i 78%). Porównywalnie wysoki okazał się również odzysk C z moczu (ok. 89%), ale stopień zanieczyszczenia tych ekstraktów uniemożliwił oznaczenie w nich stężenia BE metodą HPLC. Wydajność ekstrakcji ksenobiotyków z krwi potraktowanej w ten sposób była również dość wysoka – około 78% C i 59% BE.

Zastosowanie podobnej procedury ekstrakcji i kolumn Bond Elut C-18 firmy Analytichem International oraz metody chromatografii gazowej z detekcją masową pozwoliło jednak Aderjanowi i in. [2, 26] na wysoki odzysk obu ksenobiotyków z moczu (95% C, 87% BE) i z krwi (86% C, 75% BE). Podobną wydajność ekstrakcji C i BE z moczu oraz z krwi uzyskali Tebbett i McCartney [27], którzy używali kolumn z bardziej polarnym wypełnieniem C-8, a próbki krwi

⁴ Zgodnie ze schematem przedstawionym na ryc. 3.

poddawali działaniu ultradźwięków (co znacznie poprawiało przepływ przez wypełnienie kolumny), przy czym czystość ekstraktów była większa niż po zastosowaniu kolumn C-18. Wyniki badań autorów niniejszej pracy oraz rezultaty otrzymane przez cytowane wyżej osoby są zatem zgodne z wnioskami Scheurera i Moore'a [25], zdaniem których fazy niepolarne są wprawdzie bardziej uniwersalne, ale ekstrakty uzyskane przy ich użyciu (szczególnie ekstrakty z moczu) zawierają duże ilości zanieczyszczeń, co czyni trudnym oznaczenie w nich BE.

Izolacja C i BE z tkanek przy pomocy kolumn Bakerbond SPE C-18 okazała się niezadowolająca, gdyż wszystkie filtraty tkankowe źle przechodziły przez wypełnienie kolumny mimo stosowania większego podciśnienia (dochodziło nawet do czopowania kolumn). Średni odzysk C i BE z wątroby wynosił tylko 51% C i 42% BE, a z mózgu zaledwie 39% C i 31% BE. Ponadto uzyskano ekstrakty znacznie zanieczyszczone. W przypadku nerki „tło” było tak duże, że ekstrakty miały żółte zabarwienie, w związku z czym odstąpiono od oznaczeń ilościowych ze względu na wysokie ryzyko zniszczenia kolumny chromatograficznej.

Zatykanie się kolumn C-18 i C-8 stwierdzili również Browne i in. [6]. Do ekstrakcji C i BE z mózgu trawionego enzymatycznie z powodzeniem zastosowali natomiast bardziej polarne wypełnienie C-2. Autorzy niniejszej pracy potwierdzili zatem małą przydatność fazy C-18 do izolacji ksenobiotyków z tkanek, związaną prawdopodobnie z oddziaływaniem ciał tłuszczowych zawartych w tym materiale na niepolarne wypełnienie kolumny.

Poważną wadą ekstrakcji przeprowadzanej na kolumnach z fazą oktadecylołą było także przechodzenie wody do ekstraktów, które udało się tylko częściowo zmniejszyć przez mycie kolumn pięcioprocentowym wodnym roztworem metanolu oraz ich wirowanie przed ekstrakcją. Należy na to zwrócić szczególną uwagę, bowiem nawet niewielka ilość wody w ekstrakcie stanowi poważny problem, gdyż może powodować rozkład C do BE podczas odparowywania ekstraktów ze względu na (spowodowany warunkami ekstrakcji) alkaliczny odczyn fazy wodnej⁵. W eksperymencie zapobiegano więc temu przez dodawanie do ekstraktu (przed jego odparowaniem) jednej kropli 1 M kwasu solnego. Usuwanie warstwy wodnej pipetą wiązało się bowiem się z ryzykiem dodatkowych, niekontrolowanych strat izolowanych substancji.

- 1b. Ekstrakcja na kolumnach Bakerbond SPE Cyano (CN) (przeprowadzona zgodnie z zaleceniem producenta odnośnie do izolacji związków o charakterze zasadowym, tj. według schematu przedstawionego na rycinie 2), okazała się nieprzydatna do ekstrakcji BE (tabela II). W pełni zadowolający był natomiast odzysk C, którego (w przypadku analizy roztworów wodnych) nie podwyższało zastosowanie jako eluentu mieszaniny metanol-amoniak 100:2. Izolację C z materiału biologicznego kontynuowano więc zgodnie z przepisem przedstawionym na rycinie 2 i stwierdzono, że tylko odzysk C z próbek moczu był ilościowo zbliżony do odzysku z wody (ponad 90%). Znacznie gorszy był natomiast

⁵ O czym świadczą wyniki badań autorów tej pracy nad trwałością C i BE w zależności od pH i temperatury [16].

jej odzysk z próbek krwi (61%), a bardzo niski (31–36%) z mózgu, wątroby i nerki. Podczas analizy metodą HPLC nie obserwowano przy tym interferencji między C a tłem materiału biologicznego, co mogło również wynikać z odbiałczającego działania acetonitrylu, który dodawano w trakcie wstępnej obróbki próbek.

- 1c. Przy zastosowaniu kolumn o mieszanym typie wypełnienia, tj. Bond Elut Certify, stwierdzono wysoką wydajność ekstrakcji (tabela III) C i BE z roztworów wodnych i z próbek moczu (odpowiednio ponad 90 i ok. 80%). Wysoka była również wydajność ekstrakcji C (83%) i BE (67%) z krwi sekcyjnej. Odzysk ksenobiotyków z wątroby, nerki i mózgu był natomiast niższy (w granicach: 66–72% dla C i 45–58% dla BE). Otrzymane ekstrakty odznaczały się przy tym takim stopniem czystości, że możliwe było oznaczenie w nich obu ksenobiotyków metodą HPLC (rycina 4), co wiązać należy z dość dużą objętością metanolu używaną na etapie mycia kolumny, a możliwą do zastosowania tylko w przypadku takich wypełnień jak w kolumnach Bond Elut Certify, tj. o podwójnym charakterze (niepolarnym i jonowymiennym). W przypadku kolumn wypełnionych fazą C-18 lub propylocjanową taka ilość metanolu spowodowałaby bowiem znaczne straty zwłaszcza substancji o charakterze polarnym (tj. BE). Zastosowanie metanolu zapobiegało ponadto przedostawaniu się wody do ekstraktów i degradacji odzyskiwanych ksenobiotyków.

Porównanie – z obserwacjami innych autorów – efektywności ekstrakcji C i BE, którą uzyskano przy użyciu kolumn Bond Elut Certify, jest trudne ze względu na stosowanie różnych modyfikacji procedur analitycznych i różnych kolumn o mieszanym typie wypełnienia⁶. W tej sytuacji można jedynie zwrócić uwagę na fakt, że odzysk C i BE (z roztworów wzorcowych, moczu i krwi) dokonany przy zastosowaniu kolumny Bond Elut Certify, jest porównywalny z rezultatami otrzymanymi przez innych autorów poprzez ekstrakcję próbek płynnych, tj. moczu [8, 10, 11, 12, 13, 18, 23, 24], osocza [7, 8, 10, 11, 13], surowicy [1, 22], krwi [1, 7, 10, 11] lub płynu owodniowego [19] przy zastosowaniu różnych kolumn o podwójnym charakterze wypełnienia (B. E. Certify, Clean Screen, X-Track T). Osiągali oni bowiem zawsze wysoki odzysk C (87–100%) i znacznie zróżnicowany odzysk BE (58–96%). Różnice w odzysku BE można wytłumaczyć spostrzeżeniem Millsa i in. [18], że przy użyciu żywic o strukturze kopolimerów (np. kolumny Clean Screen lub X-Track T) wydajność ekstrakcji takich polarnych substancji, jak BE, jest większa (o około 20–30%) w porównaniu z odzyskiem, jaki można osiągnąć, stosując kolumny o mieszanym, „łączonym” typie wypełnienia (np. B. E. Certify).

Ekstrakcję C i BE z materiału biologicznego innego niż mocz i krew opisywano w niewielu publikacjach [14, 20]. W przypadku mózgu odzysk C wynosił odpowiednio 60 i 74%, a BE 54 i 34%, co świadczy o tym, że podobnie jak w opi-

⁶ Wiadomo bowiem, że zmiany pH buforu, ilości rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji lub składu mieszaniny ekstrakcyjnej, a także sposób przygotowania próbki biologicznej, mogą wpływać na wydajność ekstrakcji. Ponadto mogą wystąpić różnice w odzysku ksenobiotyków także przy użyciu kolumn o tym samym typie wypełnienia nawet między poszczególnymi partiami towaru tej samej firmy [25].

sanym tu eksperymencie, odzysk ksenobiotyków z tkanek był niższy od odzysku z płynów. Wyjaśnić więc należy, że w przypadku analizy krwi oraz świeżych homogenatów tkankowych nie obserwowano trudności w przeprowadzeniu ich filtratów przez wypełnienie kolumny Bond Elut Certify, jak również zatykania się tych kolumn, tj. głównych problemów związanych z ekstrakcją tkanek metodą SPE. Również Hernandez i in. [14] w trakcie ekstrakcji SPE dokonanej przy użyciu kolumn Clean Screen stwierdzili, że wszystkie próbki mózgu przechodziły przez nie łatwo (bez względu na to, czy były poddane procesowi trawienia lipazą, czy też nie) i otrzymali zbliżony do uzyskanego przez autorów tej pracy średni odzysk ksenobiotyków (60% dla C i 54% dla BE). Natomiast Moore i in. [20], stosując kolumny X-Track T (specjalnie przystosowane do szybkiego przepływu próbek o dużej lepkości), uzyskali wprawdzie wyższy odzysk C (74%), ale jednocześnie niższy odzysk BE (34%), co powiązali ze zbyt szybkim przepływem próbek przez kolumnę.

Zestawienie odzysku C i BE z mózgu otrzymanego w opisanym tu doświadczeniu (przy użyciu kolumn B. E. Certify) i przez Moora i in. [20] z rezultatami badań Huanga i in.⁷ [15] nie oznacza, że dodatkowa analiza osadu stwarza szansę poprawienia odzysku tych ksenobiotyków z homogenatów narządów, nawet gdyby założyć, że z pozostałością po odwirowaniu związana jest znacząca ilość C i BE. W silnie alkalicznych warunkach oraz w wysokiej temperaturze ulega bowiem rozkładowi nie tylko C, ale również jej metabolity.

Porównanie efektywności ekstrakcji przy użyciu trzech przetestowanych kolumn SPE wypadło zatem najkorzystniej dla kolumn Bond Elut Certify, gdyż odzysk C i BE (zwłaszcza z tkanek przy ich zastosowaniu) okazał się większy i bardziej stabilny, niż w przypadku kolumn Bakerbond SPE C-18. Kolumny Bakerbond SPE Cyano (CN) dyskredytuje bowiem zerowy odzysk BE⁸. Natomiast o przewadze ekstrakcji przy użyciu kolumn Bond Elut Certify nad tradycyjną ekstrakcją LLE⁹ decyduje przede wszystkim „czystość” ekstraktów, która umożliwia oznaczanie w nich C i BE metodą HPLC.

Ekstrakcja z zastosowaniem kolumn Bond Elut Certify ma jednak także ujemne strony, do których należą dość wysoki koszt, różna jakość kolumn i możliwość przechodzenia do ekstraktów składników wypełnienia tych kolumn. Ze względu na to, że odzysk ksenobiotyków zależy w dużym stopniu od prędkości przepływu roztworów przez wypełnienie kolumny, pewne problemy może stwarzać również uzyskanie powtarzalnych wyników. W badaniach ilościowych konieczne jest w związku z tym stosowanie standardów wewnętrznych lub sprzętu do automatycznej ekstrakcji SPE [25].

⁷ Którzy po ekstrakcji SPE supernatantów z homogenatów wątroby uzyskali początkowo niski odzysk leków o charakterze zasadowym, ale znacznie go poprawili przez enzymatyczne trawienie (w temperaturze 60°C przy pH = 10,5) osadu i dodatkową izolację SPE.

⁸ A bez oznaczania BE ekspertyzy toksykologicznej tego rodzaju nie można uznać za pełną, gdyż BE jest jednym z głównych metabolitów C oraz produktów rozkładu tego ksenobiotyku w materiale biologicznym *in vitro* [16].

⁹ Warunki ekstrakcji i odzysk C i BE tymi metodami przedstawiono w pierwszej części tej pracy.

- 2a. O tym, że zmiana pH buforu fosforanowego może poprawić efektywność ekstrakcji C i BE, świadczyły dane na temat rezultatów badania smółki, z których wynikało, że rozcieńczanie jej metanолоwych eluatów buforem o pH = 2 [21] umożliwia wyższy odzysk BE (o około 25%) niż rozcieńczanie buforem o pH = 3 [5]. Okazało się jednak (tabela IV), że zmiana odczynu buforu fosforanowego w zakresie pH = 2–6 (zastosowanego do wstępnego przygotowania próbek oraz kondycjonowania kolumny – por. rycina 3) nie wpływa na odzysk ksenobiotyków z wodnych roztworów.

W związku z tym wyjaśnienia wątpliwości odnośnie do wpływu pH buforu na efektywność ekstrakcji C i BE (jakie pozostają po lekturze licznych publikacji) należy szukać w fakcie, że wraz ze zmianą pH buforów¹⁰ modyfikowano także pozostałe warunki ekstrakcji.

Jak wiele zależy od szczegółów ekstrakcji SPE, świadczy nieuzasadnione przekonanie Murphey'a i in. [21], że niski odzysk BE (około 30%) uzyskany przez Clarka i in. [9] ze smółki należy wiązać z zastosowaniem buforu fosforanowego o pH = 6. Murphey i in. przy użyciu kolumn kondycjonowanych buforem pH = 6 obserwowali bowiem bardzo słabe zatrzymywanie BE przez ich wypełnienie wtedy, gdy ksenobiotyk był rozpuszczony w czystym metanolu. Jednak Clark i in. przed naniesieniem na kolumnę odparowywali metanol i rozpuszczali pozostałość w buforze o pH = 6, co w świetle rezultatów uzyskanych przez autorów niniejszej pracy, nie powinno wpłynąć na zmniejszenie odzysku BE.

- 2b. Potwierdzono eksperymentalnie, że 3 ml mieszaniny dichlorometan-izopropanol-amoniak (80:20:2) to ilość wystarczająca do otrzymania wysokiego odzysku C i BE z roztworów wodnych, gdyż wykazano, że wzrost objętości rozpuszczalnika używanego do elucji nie wpływa w sposób znaczący na wydajność ekstrakcji z zastosowaniem kolumn Bond Elut Certify (tabela V).

Doświadczenie Moore'a i in. [19] świadczy o tym, że w przypadku niektórych kolumn wypełnionych kopolimerami odzysk C i BE może zależeć od objętości mieszaniny eluującej. Po zastosowaniu do ekstrakcji wysokoprzepływowych kolumn X-track T stwierdzili oni bowiem, że wzrost objętości eluentu z 3 do 10 ml powodował wzrost odzysku ksenobiotyków z płynu owodniowego (C 67–96%, a BE 19–58%). W doświadczeniu z użyciem innych kolumn (Clean Screen, które wypełnione są także żywicami o podwójnym działaniu) i tego samego eluentu o objętości zaledwie 3 ml autorzy ci [5] uzyskali jednak ze smółki jeszcze większy odzysk C (100%) i BE (64%), co w połączeniu z ich wcześniej przytoczonymi badaniami oraz rezultatami opisanego tu doświadczenia świadczy o tym, że przy odpowiednio dobranych kolumnach nawet niewielka ilość eluentu może zapewnić wysoką wydajność ekstrakcji obu ksenobiotyków. Potwierdzają to również rezultaty badań przeprowadzonych przez Hernandeza i in. [14], którzy stosowali 3 ml identycznego jak autorzy tej pracy eluentu oraz kolumny Clean Screen o typie wypełnienia zbliżonym do użytych w niniej-

¹⁰ Dla kolumn Bond Elut Certify oraz X-Track T wszyscy autorzy stosowali bufor fosforanowy o pH = 6 [1, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 18, 20, 23, 27], natomiast w przypadku kolumn Clean Screen używano zarówno buforów o pH = 2 [21], jak i pH = 3 [5, 22], pH = 4 [10] lub pH = 6 [11, 14].

szych badaniach kolumn Bond Elut Certify i odzyskali większość C oraz jej metabolitów z mózgu, a powtórna ekstrakcja nową porcją eluentu nie poprawiła tego wyniku.

- 2c. Próba podniesienia wydajności ekstrakcji przez zastosowanie w opisywanym tu eksperymencie acetonitrylu do wstępnego przygotowania próbek zakończyła się niepowodzeniem. Po zastosowaniu acetonitrylu średni odzysk C był bowiem wyraźnie niższy od tego, który otrzymano z próbek przygotowanych z użyciem wyłącznie buforu fosforanowego, a odzysk BE zmniejszył się o prawie 70% (tabela VI).
- 2d. Użycie większej ilości buforu do przygotowania próbek okazało się korzystne w przypadku ekstrakcji homogenatów mózgu, gdyż po zastosowaniu 8 ml buforu odzysk BE wzrastał (w porównaniu z odzyskiem po zastosowaniu 4 ml buforu) o około 10%, a odzysk C nawet o około 20%, podczas gdy odzysk z roztworów wodnych kształtował się na podobnym poziomie (tabela VII).

Do podobnych wniosków prowadzi porównanie wydajności ekstrakcji C i BE ze smółki, jaką uzyskali Clark i in. [9] oraz Abusada i in. [1], którzy do wstępnej obróbki próbek używali metanolu (po czym eluaty odparowywali i rozpuszczali w buforze). Obaj uzyskali wprawdzie maksymalny odzysk C (99–100%), ale odzysk BE po 5 ml metanolu wynosił tylko 30% [9], natomiast po zastosowaniu prawie dwukrotnie większej objętości tego alkoholu wzrastał do 68–90% [1].

WNIOSKI

1. Użycie kolumn Bond Elut Certify firmy Varian zgodnie z zaleceniem producenta zapewnia wysoką wydajność ekstrakcji C i BE z roztworów wodnych, moczu i krwi oraz homogenatów tkanek, jak również umożliwia oznaczanie ksenobiotyków metodą HPLC bez potrzeby dodatkowego oczyszczania ekstraktów z materiału biologicznego. Natomiast zastosowanie kolumn Bakerbond SPE C-18 powoduje wzrost tła biologicznego w ekstraktach (co znacznie utrudnia oznaczanie ksenobiotyków metodą HPLC bezpośrednio w ekstraktach z moczu i nerki), a użycie kolumn Bakerbond SPE Cyano (CN) uniemożliwia odzyskanie BE.
2. Zwiększenie objętości buforu fosforanowego do wstępnego przygotowania homogenatów tkankowych poprawia odzysk BE i C, natomiast takie zmiany warunków ekstrakcji przy użyciu kolumn Bond Elut Certify, jak obniżenie pH buforu fosforanowego i zwiększenie objętości solventu, nie poprawiają znacząco wydajności ekstrakcji.
3. Odzysk C i BE z roztworów wodnych, moczu i krwi przy użyciu kolumn Bond Elut Certify jest porównywalny z otrzymanym w rezultacie zoptymalizowanej ekstrakcji LLE (którą omawiano w pierwszej części tej pracy), ale ekstrakcja LLE (systemem ciągłym) zapewnia większy odzysk obu ksenobiotyków z homogenatów tkankowych.
4. Ekstrakcja SPE przy użyciu kolumn Bond Elut Certify pozwala na uzyskanie bardziej czystych ekstraktów z materiału biologicznego i stosowanie znacznie mniejszych objętości rozpuszczalników niż ekstrakcja LLE.

5. Korzystanie z ekstrakcji SPE wiąże się z ryzykiem przeładowania kolumny (w przypadku ekstrahowania zbyt dużych próbek lub bardzo wysokich stężeń ksenobiotyków), a także ze wzrostem kosztów analizy toksykologicznej.