

THE USEFULNESS OF THE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY METHOD IN THE IDENTIFICATION OF COCAINE AND ITS METABOLITE BENZOYLECGONINE IN AUTOPSY MATERIAL

Marianna KISZKA, Roman MADRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: The usefulness of thin-layer chromatography (TLC) in the identification of cocaine (C) and benzoylecgonine (BE) in urine and tissues was evaluated. The possibility of separating C from BE as well as both of these compounds from the “biological background” and also the sensitivity of different staining systems were studied. To this end, 30 developing systems were examined, four of which (methanol-chloroform 4:1, ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6, chloroform-methanol-ammonia 100:20:1, chloroform-methanol-ammonia-water 70:30:1:0.5) were assessed as optimal for the analysis of extracts from the liver and the kidney due to good separation of the investigated xenobiotics from the “biological background”. For the analysis of urine extracts, the first three systems out of those mentioned above and the mixture chloroform-methanol 4:1 turned out to be the best. In the search for optimal developing systems, lidocaine (LD) was also considered, as good separation of it from C and BE was achieved, e.g. in the systems methanol-chloroform 4:1 and 1:4. However, separation of cocaethylene (CEt) from C was not entirely satisfactory – only after using a hexane-toluene-diethylamine system 65:20:5 a moderate differentiation of *R_f* was achieved, i.e. 0.48 and 0.42, respectively. It was also found that the best system for staining chromatograms (from among 20 examined ones) is a combination of Dragendorff's reagent with a solution of sulphuric acid (because it dyes about 1 µg of C or BE in a spot). However, the “background” of the autopsy material influenced the sensitivity of the detection.

KEY WORDS: Cocaine; Benzoylecgonine; Thin-layer chromatography; Determination; Autopsy material.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. LI, 2002, 7–28

Received 6 October 2002; accepted 30 December 2002

INTRODUCTION

The thin-layer chromatography method (TLC) is still applied to the identification of various stupefying substances, including cocaine (C). The effectiveness of the TLC method, however, depends on optimisation of the analytical procedure – especially on the use of an appropriate developing system:

one which makes possible good separation of C from its metabolites and also from the “biological background”. It is also important to select such a manner of staining of chromatograms that will ensure high detectability of xenobiotics. Moreover, it is also necessary to examine whether it is possible to separate lidocaine (LD) and cocaethylene (CEt) both from C and from benzoylecgonine (BE), which is one its main metabolites. Prior to using LD as the internal standard in liquid chromatography (HPLC), its presence in the examined biological material should be excluded, as C on offer from dealers is sometimes adulterated with this medicine [14, 15]. CEt may also be found in analysed samples, because consumption of C together with alcohol leads to its formation [3].

EXPERIMENTAL

DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 × 20 cm plates by Merck were used. Chromatograms were developed on a 16 cm segment by a technique utilising glass-cells saturated with vapours of solvents. The following four cycles of the study were executed (I–IV):

- I. 30 different developing systems (listed in Table I) were tested using methanol-based standard solutions of C, BE, LD and CEt and “standards” of the biological background in the form of chloroform-alkaline extracts of biological material¹. Standard solutions of xenobiotics (in quantities of 10 µg) and “standards” of the background (in quantities of 40 µg, which corresponded to 2 g of the extracted tissue) were introduced onto chromatographic plates and developed in each of the thirty systems. Dry chromatograms were observed in UV light and then were stained using Dragendorff’s reagent with 20% sulphuric acid, potassium iodoplatinate with 20% sulphuric acid and a combination of both above-mentioned reagents with addition of 5% iron chloride solution. Values of *R_f* of spots visible in UV and after staining were determined. The shape of the spots was also taken into account.
- II. The sensitivity of twenty developing systems was evaluated after introducing C and BE (in the form of alcoholic solutions) onto plates in quantities of 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 µg and using the mixture ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6, i.e. one of the four best developing systems (determined in the first stage of the experiment – compare Ta-

¹ The “standards” were obtained from 25 g samples of the kidney and the liver by means of mechanical homogenisation with addition of 50 ml of water, deproteinisation by the sulphate-ammonium method according to Borkowski [7], extraction with ether in desiccators by Quickfit, alkalisation of the aqueous phase (with 2 M ammonia up to pH = 7.5–8) and its chloroform extraction in the continuous system for 6 hours, evaporation of the alkaline extracts with addition of a drop of 1 M HCl and finally dissolving in 0.5 methanol.

- ble I). Attention was also paid to the order of appearance of spots, their size and shape, as well as the intensity of their colour.
- III. The usefulness of the TLC method in the identification of C and BE in biological material was investigated using extracts² of the liver and the kidney with addition of both xenobiotics at a concentration of 1, 2 and 5 g/g of the tissue. For this reason, standards of C and BE (in the form of alcoholic solutions) in quantities of 1, 2 and 5 g as well as extracts from the liver and kidney in quantities of 40 l (corresponding to 2 g of the tissue) with and without the addition of xenobiotics were introduced onto the chromatographic plates. The plates were then developed in each of the four optimal systems (defined in the first stage of the experiment – see Table I), i.e. in the following mixtures: methanol-chloroform 4:1, chloroform-methanol-ammonia 100:20:1, chloroform-methanol-ammonia-water 70:30:1:0.5 and ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6, after which they were stained using Dragendorff's reagent with 20% sulphuric acid, then iron chloride solution and then potassium iodoplatinate solution.
- IV. In the last stage the usefulness of the TLC method in the detection of C and BE in urine was evaluated. Samples of urine (10 ml) with the addition of C and BE (at concentrations of 1, 2 and 5 g/ml) were used. They were subjected to ether-acidic extraction and then basic extraction (pH = 8) with a mixture of dichloromethane-isopropanol 3:1 (proportion of sample to solvent 1:8). At the same time, extraction of identically prepared samples of urine together with salting out with NaHCO₃ (0.1 g/ml of urine) was performed. All extracts were dissolved in 100 l of methanol. C and BE standards (in the form of alcoholic solutions in quantities corresponding to 1, 2 and 5 g) and 25 l of each of the alkaline extracts (corresponding to 2.5 ml of the extracted urine) were introduced onto the chromatographic plates and developed in seven moving phases, four of which had earlier been evaluated as optimal ones (see Table I and the results of stage III). The three remaining systems (benzene-methanol-acetone-ammonia 50:50:40:5, methanol-ammonia 100:1.5 and chloroform-methanol 4:1) were studied, because they are often used in everyday work in toxicological laboratories. For staining chromatograms (similarly to stage III of the research), Dragendorff's reagent and solutions of sulphuric acid, iron chloride and potassium iodoplatinate were applied.

² Obtained in the manner presented in point I.

TABLE I. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF C (COCAINE), BE (BENZOYLECGONINE), CEt (COCAETHYLENE), LD (LIDOCAINE) AND "BACKGROUND" OF THE LIVER AND KIDNEY EXTRACTS IN VARIOUS DEVELOPING SYSTEMS

No	Developing system	<i>R_f</i> (100)					Evaluation
		BE	C	CEt	LD	"Background"	
1	Methanol	20	32**	28	64	50; 56 58; 66	++ !
2	Methanol-chloroform 9:1	19	34**	34	61	47; 55 57; 66	++ !
3	Methanol-chloroform 4:1	16	30	31	60	47; 54 56; 65	+++!
4	Methanol-acetone 3:1	20	37**	35	63	46; 58 59; 68	++!
5	Methanol-acetone-ammonia 60:2:0.2	22	46	48	74	49 62; 72	+
6	Methanol-ethyl acetate 1:1	7	32*	26	59	37; 53 50; 68	- !
7	Methanol-ethyl acetate 4:6	9	33*	33	73	45; 61 58; 73	- !
8	Methanol-ammonia 100:1.5	24	63	64	69	55; 57 54; 71	+
9	Chloroform-methanol 9:1	2	23**	24	55*	8; 18 12; 39; 49	- !
10	Chloroform-methanol 4:1	7	40	40	64	22; 36 31; 60	+
11	Chloroform-acetone 4:1	st	St*	st*	st*	St* 3; 7	-
12	Chloroform-isopropanol-ammonia 45:45:10	17	80	80	80	36 12; 21; 51	+
13	Chloroform-isopropanol-ammonia 45:45:5	6	73	73	73	27 9; 15; 43	-
14	Chloroform-isopropanol-ammonia- water 45:45:5:5	12	85	85	85	42 15; 25; 57	+
15	Chloroform-isopropanol-ammonia- water 45:45:2:1	5	83	83	83	33 20; 58; 70	-
16	Chloroform-methanol-ammonia 100:20:1	8	80	80	81	25; 39 29; 49; 60; 64 ^{uv}	+++
17	Chloroform-methanol-ammonia-water 70:30:1:0.5	18	85	86	89	41; 57 48; 62; 72; 74 ^{uv}	+++
18	Chloroform-ammonia 100:0.2	st	St	st	4	st ; st	-
19	Ethyl acetate-cyclohexane- methanol-ammonia 70:15:10:5	1	73	75	73	7; 28 4; 38	-
20	Ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6	12	81	84	83	34; 61 30; 45; 58	+++
21	Ethyl acetate-methanol-ammonia 85:10:5	1	74	74	65	10; 34 3; 34; 53	-

22	Ethyl acetate-methanol-ammonia-water 86:10:1:3	st	60	62	62	8; 31 <i>17; 30; 45</i>	–
23	Benzene-methanol-acetone-ammonia 50:50:40:5	20**	85	87	85	39; 63 <i>46; 66; 70^w</i>	++
24	Benzene-hexane-diethylamine 50:20:2	st	48	50	39	st 7	–
25	Benzene-ethyl acetate-methanol-ammonia-water 40:45:13.5:0.5:12	1	58	58	60	19 <i>8; 14; 25; 28</i>	–
26	Benzene-dioxane-ethanol-ammonia 50:40:5:5	st	74	75	68	16 <i>9; 18; 76</i>	–
27	Dioxane-benzene-ethanol-ammonia 50:40:5:5	st	61	64	64	8 <i>13; 27; 58</i>	–
28	Dioxane-chloroform-ethyl acetate-ammonia 60:25:10:5	st	66	68	69	11 <i>17; 30; 57</i>	–
29	Hexane-toluene-diethylamine 65:20:5	st	42	48	31	st ; st	– !!
30	Toluene-acetone-ethanol-ammonia 54.5:45.5:6.5:2.5	st	68	73	66	52 <i>19; 75</i>	–

Evaluation of the developing system:

 very good  good  unsuitable

Usefulness of the developing system in separating C, BE and “biological background”:

+++ very good; ++ good; + average; – unsuitable;

and for: ! LD identification; !! CEt identification;

* elongated spots (streaks); ** oval spots; w – additional spots in liver extracts visible in UV;

st – spots at the start.

The numbers in the second column denote the volume proportions of individual solvents in the given developing system, whilst those in the remaining columns – *R_f* values (*R_f* of spots visible only in UV are in italics).

RESULTS AND DISCUSSION

Results of the experimental evaluation of the usefulness of the TLC method in the identification of C and BE in autopsy material are presented in Tables I and II and in Figures 1 and 2.

- I. Very good and good results of separation of C from BE and from the “background” extracts (from the liver and the kidney) were obtained after applying eight developing systems, which are highlighted by two shades of grey in Table I. Four of them were evaluated as optimal (marked with three pluses in Table I) because of the very good separation of both xenobiotics from the “background”. When they were used, spots of the “background” stained using iodoplatinate and Dragendorff reagent, as well as spots of the “background” visible in UV, were situated outside the zone of spots of C and BE in the intermediate part of the chromatogram (phases no. 16, 17 and 20 – Table I) or in the upper

part of the chromatogram (phase no. 3 – Table I). These four systems appeared to be especially useful for the purifying of extracts (by the TLC method) before the quantitative analysis of C and BE. However, the four remaining developing systems (no. 1, 2, 4 and 23 – Table I) were marked only with two pluses, because after their use, the spots of xenobiotics were less closely grouped and had an oval shape, so these systems were evaluated as less useful for purifying extracts from biological material.

In spite of good separation of C from BE, too small differences between R_f of spots of these xenobiotics and spots of the “background” (visible in UV or stained) meant that the remaining developing systems (in Table I – marked by one plus) were evaluated as insufficiently useful for the identification of C and BE in tissue extracts.

For the identification of LD, the best systems turned out to be those denoted in Table I by numbers 1–7 and 9–10. However, optimal simultaneous separation of LD, C and BE from the “biological background” was ensured only by system no. 3, i.e. methanol-chloroform 4:1.

Separation of CEt from C was not achieved to an entirely satisfactory degree. Only the use of system no. 29 (hexane-toluene-diethylamine 65:20:5)³ allowed us to obtain different values of R_f ($C = 0.42$ and $CEt = 0.48$), but then identification of BE was not possible (spots at the starting point). It should be remembered that CEt may also be present in spots of C obtained after applying the above mentioned eight optimal developing systems (because of the similarity of R_f s). CEt, however, can be easily identified using the HPLC method.

- II. The results of the performed study on the detectability of C and BE on chromatography plates depending on the developing system used are presented in Table II. The results show that the combination of Dragendorff’s reagent with a solution of sulphuric acid turned out to be the optimal reagent for developing spots of C and BE. After applying Dragendorff’s reagent alone it was possible to identify spots containing 2 g of C and 5 g of BE, but the detectability increased more than twice for C and over five times for BE after additional sprinkling of the plate with sulphuric acid. The use of hydrochloric acid yielded somewhat worse effects (especially for C), because spots were then less visible and less durable.

Wallace et al. [27] found that the best combination for detection of xenobiotics in urine extracts was precisely this one (i.e. Dragendorff’s reagent with sulphuric acid) in combination with vapours of iodine. However, concentrations of compounds detected in this manner were situated near the limits of detectability achieved in this experiment – they were approximately 0.5 g of C and 0.8 g of BE. From the per-

³ Suggested by Bailey [3, 4] for the analysis of extracts from serum and urine.

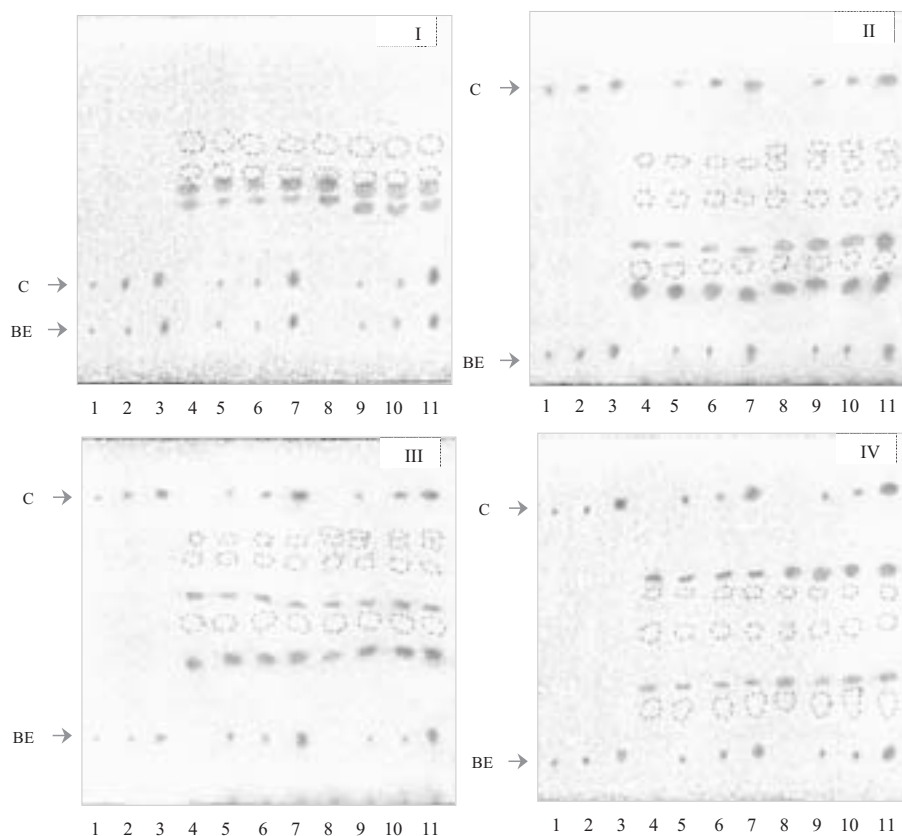


Fig. 1. Chromatograms of liver and kidney extracts in 4 optimal developing systems (compare Table I). I – methanol-chloroform 4:1; II – chloroform-methanol-ammonia 100:20:1; III – chloroform-methanol-ammonia-water 70:30:1:0.5; IV – ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6. 1 – C and BE standards: 1 g; 2 – C and BE standards: 2 g; 3. C and BE standards: 5 g; 4 – kidney extract (“background”) without xenobiotics; 5 – kidney extract with C and BE: 1 g/g; 6 – kidney extract with C and BE: 2 g/g; 7 – kidney extract with C and BE: 5 g/g; 8 – liver extract (“background”) without xenobiotics; 9 – liver extract with C and BE: 1 g/g; 10 – liver extract with C and BE: 2 g/g; 11 – liver extract with C and BE: 5 g/g; (○) – “background” spots visible only in UV.

formed experiment it turned out, however, that the only positive effect of the use of iodine vapours after Dragendorff's reagent with sulphuric acid was a small and short increase of the intensity of staining (clearly visible only for spots of higher concentrations). At the same time, the risk arose of “overdosing” of the reagent leading to darkening of the entire chromatogram, thus minimising the chances of detecting low concentrations of both C and BE. These observations are consistent with

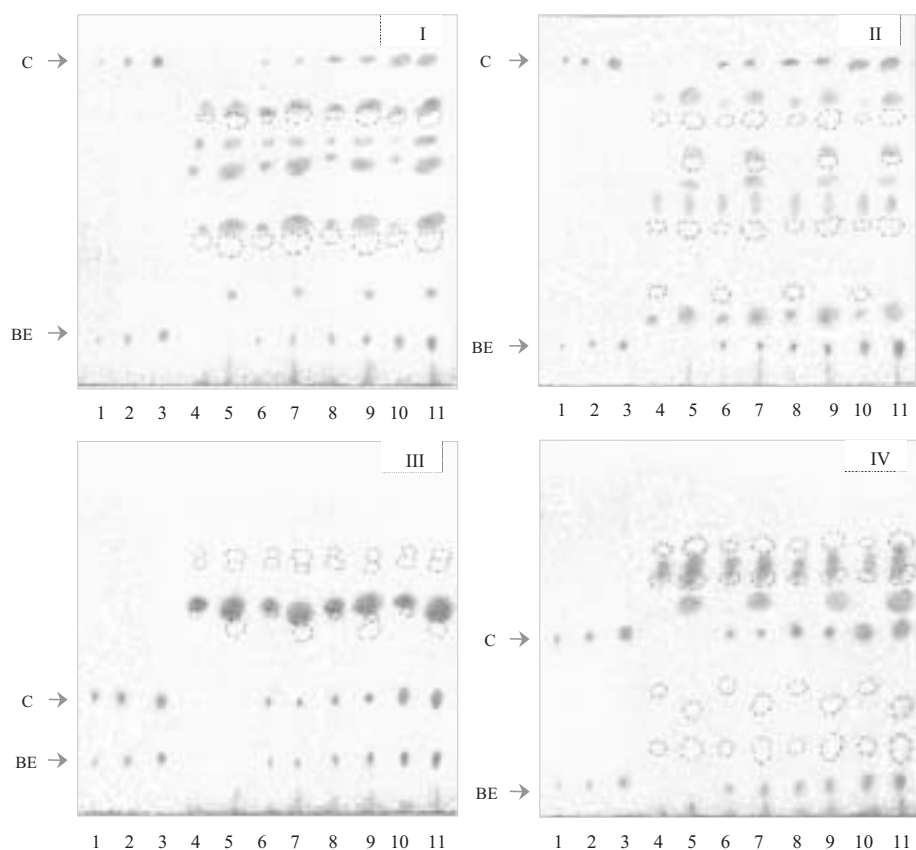


Fig. 2. Chromatograms of urine extracts in 4 optimal developing systems. I – ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6; II – chloroform-methanol-ammonia 100:20:1; III – methanol-chloroform 4:1; IV – methanol-chloroform 1:4. 1 – C and BE standards: 1 g; 2 – C and BE standards: 2 g; 3 – C and BE standards: 5 g; 4 – urine extract (“background”) without xenobiotics (extraction without salting out); 5 – urine extract (“background”) without xenobiotics (extraction with salting out); 6 – urine extract with C and BE: 1 g/g (extraction without salting out); 7 – urine extract with C and BE: 1 g/g (extraction with salting out); 8 – urine extract with C and BE: 2 g/g (extraction without salting out); 9 – urine extract with C and BE: 2 g/g (extraction with salting out); 10 – urine extract with C and BE: 5 g/g (extraction without salting out); 11 – urine extract with C and BE: 5 g/g (extraction with salting out); ○ – “background” spots visible only in UV.

findings by Kaistha and Tadrus [11], who also detected BE in extracts of urine using the combination of Dragendorff's reagent with a solution of iodine and potassium iodide, and also noticed a quick disappearance of spots of low concentration of BE, so they proposed, as an alternative system of staining, a combination of Dragendorff's reagent with sulphuric acid.

Wallace et al. [27] found that the best combination for detection of xenobiotics in urine extracts was precisely this one (i.e. Dragendorff's reagent with sulphuric acid) in combination with vapours of iodine. However, concentrations of compounds detected in this manner were situated near the limits of detectability achieved in this experiment – they were approximately 0.5 g of C and 0.8 g of BE. From the performed experiment it turned out, however, that the only positive effect of the use of iodine vapours after Dragendorff's reagent with sulphuric acid was a small and short increase of the intensity of staining (clearly visible only for spots of higher concentrations). At the same time, the risk arose of “overdosing” of the reagent leading to darkening of the entire chromatogram, thus minimising the chances of detecting low concentrations of both C and BE. These observations are consistent with findings by Kaistha and Tadrus [11], who also detected BE in extracts of urine using the combination of Dragendorff's reagent with a solution of iodine and potassium iodide, and also noticed a quick disappearance of spots of low concentration of BE, so they proposed, as an alternative system of staining, a combination of Dragendorff's reagent with sulphuric acid.

TABLE II. EVALUATION OF THE PRACTICAL USEFULNESS OF VARIOUS STAINING SYSTEMS IN DETECTING SPOTS OF COCAINE (C) AND BENZOYLECGONINE (BE) AFTER APPLYING THE ETHYL ACETATE-METHANOL-AMMONIA (60:30:6) DEVELOPING SYSTEM

No.	Location reagents	C [g in spot]						BE [g in spot]					
		0.5	1	2	5	10	20	0.5	1	2	5	10	20
1	Dragendorff	–	–	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+
2	Dragendorff + 20% H ₂ SO ₄	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
3	Dragendorff + 20% H ₂ SO ₄ + iodine vapour* ¹	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
4	Dragendorff + 20% H ₂ SO ₄ iodine vapour + iodoplatinate* ²	–	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+
5	Dragendorff + HCl* ³	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
6	Dragendorff + HCl + iodoplatinate	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+
7	Dragendorff + HCl + iodoplatinate + 5% FeCl ₃ * ⁴	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
8	Dragendorff + 20% H ₂ SO ₄ + iodoplatinate* ⁵	–	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
9	Dragendorff + 20% H ₂ SO ₄ + iodine vapour + 5% FeCl ₃ * ⁴	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+

10	Dragendorff + 20% H ₂ SO ₄ + 5% FeCl ₃ + iodoplatinate		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
11	Dragendorff + iodoplatinate		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
12	Iodoplatinate		-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
13	Iodoplatinate + HCl		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
14	Iodoplatinate + HCl+ Dragendorff		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
15	Iodoplatinate + HCl + Dragendorff + 5% FeCl ₃		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
16	Iodoplatinate + 20% H ₂ SO ₄		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
17	Iodoplatinate + 20% H ₂ SO ₄ + Dragendorff		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
18	Iodoplatinate + 20% H ₂ SO ₄ + Dragendorff + 5% FeCl ₃		-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
19	Iodoplatinate + Dragendorff		-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
20	Cobalt Thiocyanate	Fresh	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
		After 1 day (in refrigerator)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
		After 2 days (in refrigerator)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

The usefulness of the developing system:

very good good unsuitable

Explanatory notes to Table II:

*1 – very unstable spots, increase in sensitivity only in the case of higher amounts of the substance (5–10 g of C and BE in the spot), spots of lower C and BE concentration less visible after 5–10 minutes, risk of darkening of the chromatograms and decreasing the sensitivity in the case of overdose of iodine vapour.

*2 – the chromatogram background becomes darker, the spots less visible than after application of systems 2 and 3, better effects only with higher C and BE amounts (5–10 g).

*3 – spots less visible than after application of system 2 (particularly C spots), spots less stable (they fade after 5–10 minutes).

*4 – only a short-term increase in the intensity of C and BE spots.

*5 – spots more intense and stable for over 5 g of C and BE, for lower concentrations – less visible (particularly C spots) than after application of system 2.

Colours of spots: a) iodoplatinate – violet; b) Dragendorff – orange; c) a + b and their modifications – various shades of the above-mentioned colours; d) cobalt thiocyanate – blue.

The universally applied iodoplatinate turned out to be a reagent with low detectability of C and BE (5 g) – spots containing BE appeared only after additional spraying of plates with hydrochloric or sulphuric acid. Differences in reaction of C and BE on iodoplatinate in combination with acid may thus be an additional indicator differentiating these substances.

A similar level of detection of BE (to that in Table II) was obtained by Müller et al. [20] after a two-step separation of extracts (from about 7 ml of urine) with the TLC method and staining of the chromatogram with a solution of iodoplatinate mixed with 2 M HCl. Using iodoplatinate, a similarly poor detection of C was ascertained by Bailey [4]. However, from a comparison of the conditions of his experiment (in which an extract from 35 ml of urine was introduced onto the chromatographic plate) with the results of the research presented in this work one can observe that, using Dragendorff's reagent with sulphuric acid, detectability of C at the same level can be obtained from a five times smaller quantity of urine.

In the case of joint application of iodoplatinate and Dragendorff's reagent, it turned out that using first the Dragendorff reagent and then iodoplatinate was more beneficial than using them in the reverse order. However, this combination did not lower the detection limits below about 5 µg C in a spot, which was earlier also ascertained by Lillsunde and Korte [16]. To obtain good staining of spots of BE, however, additional sprinkling of the chromatogram by acid was necessary.

Cobalt rhodanate was considered because it is used in qualitative colour tests for the detection of cocaine [5, 17]. In the described experiment, however, this developer proved to be insufficiently sensitive to apply to the identification of C and BE, using the TLC method.

Although introducing various staining systems increased the intensity of spots containing small quantities of xenobiotics, it simultaneously caused a darkening of the background of chromatograms and decreased the durability of spots. Positive effects of such a procedure were observed only when not less than about 5 µg of C or BE were present in chromatographic spots. Results of the performed experiments lead to the conclusion that staining should be commenced by combining Dragendorff's Reagent and sulphuric acid, and then further reagents (iron chloride, iodoplatinate or others) should only be used after exact evaluation of the chromatogram obtained in this way.

- III. Analysis of chloroform-alkaline extracts of the liver and the kidney using the four moving phases selected earlier (which were denoted by +++ in Table I) gave very distinct differences between the *R_f* value of the spots of C and BE. Furthermore, spots of "the background" were situated outside the area of the separated zones of both xenobiotics. Location system no. 10 (see Table II) proved to be effective for making spots of both xenobiotics visible, in all extracts obtained from tissues containing C and BE at a concentration between 1–5 µg/g, but only if an appropriate sequence of staining was carried out (Dragendorff's re-

agent with 20% H₂SO₄, then 5% solution of iron chloride and then potassium iodoplatinate) each stage of the development of the chromatogram was observed (Figure 1).

Thus a limit of detection was achieved that made the TLC method useful for preliminary diagnosis of fatal poisoning with C. Very low levels of C were detected only in a few cases, e.g. 0.1–1.5 g/g of liver [8, 19] and 0.4 g/g of brain [19]. Considerably more often its concentrations were many times higher: 6.8–51.3 g/g of liver, 4–83 g/g of the brain and 10.2–58 g/g of kidney [2, 6, 8, 12, 18, 19, 22, 28]. The average levels of BE were also high in the liver – 21.3 g/g and in the brain – 2.9 g/g [26].

- IV. An overlapping of the stained spots of the urine “background” on zones of C and BE took place only after applying methanol-ammonia 100:1.5, especially when the studied samples were more impure. Using three systems (chloroform-methanol-ammonia-water 70:30:1:0.5; benzene-methanol-acetone-ammonia 50:50:40:5 and methanol-ammonia 100:1.5), spots of “the background” of some samples of urine (visible only in UV) were situated very close to BE spots, which may cause difficulties when purifying BE by the TLC method.

Good results for separation of urine extracts (obtained both with and without salting out) of various content of C and BE (1–5 g/ml) were achieved using the four remaining developing systems (see Figure 2), two of which (ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6 and chloroform-methanol-ammonia 100:20:1) were earlier positively rated by other authors [20, 27].

The use of the four selected developing systems (Figure 2) and the method of staining of chromatograms described earlier (see part III), as well as the established manner of extraction, allows detection of C and BE⁴ in 2.5 ml of urine containing these xenobiotics at a concentration of 1–2 g/ml. Thus the applied procedure allowed us to achieve a threshold of detectability which was considerably lower than the concentrations of C and BE – which were detected in urine of persons deceased due to poisoning with cocaine [2, 6, 8, 9, 12, 18, 19, 21, 22, 25].

However, the following fact should be taken into account: the limits of detection of xenobiotics by the TLC method depend not only on the

⁴ This is important, since BE remains unchanged in urine for longer than C and EME (ecgonine methyl ester), the second important metabolite of C [1, 10]. Moreover, BE occurs in urine in higher concentrations than C [10, 21] – also when this is a urine sample collected from a living person taking cocaine [10, 23, 24]. Another strong argument in favour of determining this metabolite is the fact that concentrations of BE excreted in urine within 0–8 hours (after taking C in the form of snuff in a quantity of 96 mg and injected in a quantity of 48 mg) or 6–12 hours (after taking per os in a quantity of 25 mg) were 45.0, 9.5 and 7.9 g/ml respectively, whereas the concentrations of C in urine were much lower (0.3–1.9 g/ml) [10].

method of extraction and the developing and staining systems, but also on the level of “background” biological material. An abundant “background” negatively influences the readability of the chromatogram (because it causes streaks or distortions of spots of xenobiotics) which means that spots of small content of C and BE may be undetected (masked). In the case of samples of urine with a low level of background, it may be possible to detect lower concentrations of C and BE (than those obtained in this cycle of research), but on the condition that a greater quantity of the extract is introduced onto the plate. This was shown by Kaistha and Tadrus [11], who detected BE from a volume of the extract corresponding to 5 ml of urine and achieved a sensitivity of the order of 0.5 g/ml, and also by Wallace et al. [27], who, using an identical quantity of urine and a similar staining system, obtained an even higher sensitivity (0.1 g/ml for C and 0.25 g/ml for BE).

- V. Moreover, during the research described above the following observations were made:
1. complex developing systems made possible better separation of C and BE from the “biological background” after longer (1–2 day) saturation of the chromatographic cell with a mixture of solvents;
 2. the use of solvents of low grade is linked to the risk of receiving falsely negative results (e.g. ethyl acetate by POCH-Gliwice caused a partial decay of C);
 3. salting out of the extracted samples of urine increases the efficiency of the isolation of BE [13], but at the same time causes an increase in the level of “background”.

CONCLUSIONS

1. Optimal separation of C from BE and from the “biological background” on plates by Merck (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 × 20 cm) can be gained with the use of the following developing systems:
 - a) ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6, chloroform-methanol-ammonia 100:20:1, methanol-chloroform 4:1 and chloroform-methanol 4:1 (in the case of analysis of extracts from urine);
 - b) methanol-chloroform 4:1, chloroform-methanol-ammonia 100:20:1, chloroform-methanol-ammonia-water 70:30:1:0.5 and ethyl acetate-methanol-ammonia 60:30:6 (in the case of analysis of extracts from tissues).
2. The optimal system of staining chromatograms is a combination of Dragendorff’s reagent with a solution of sulphuric acid (it stains about 1 g of C or BE).

3. The optimisation of conditions of separation and staining (in accordance with results of the research presented in this work) allows application of thin-layer chromatography to:
 - a) the identification of C and BE in urine and tissues at a concentration of 1–2 g/g;
 - b) purification of both xenobiotics before their determination by the use of another method (e.g. UV spectrophotometry or HPLC).

References:

1. Ambre J., The urinary excretion of cocaine and metabolites in humans: A kinetic analysis of published data, [in:] Cocaine: Determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the *Journal of Analytical Toxicology*, Baselt R. C., Espe E. [eds.], Preston Publications, Niles 1988.
2. Amon C. A., Tate L. G., Wright R. K. [et al.], Sudden death due to ingestion of cocaine, [in:] Cocaine: Determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the *Journal of Analytical Toxicology*, Baselt R. C., Espe E. [eds.], Preston Publications, Niles 1988.
3. Bailey D. N., Cocaethylene (ethylcocaine) detection during toxicological screening of a University Medical Centre patient population, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, vol. 19, pp. 247–250.
4. Bailey D. N., Thin-layer chromatographic detection of cocaethylene in human urine, *American Journal of Clinical Pathology* 1994, vol. 101, pp. 342–345.
5. Baker P. B., Gough T. A., The rapid determination of cocaine and other local anaesthetics using field tests and chromatography, *Journal of Forensic Sciences* 1979, vol. 24, pp. 847–855.
6. Bednarczyk L. R., Gressmann E. A., Wymer R. L., Two cocaine-induced fatalities, [in:] Cocaine: Determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the *Journal of Analytical Toxicology*, Baselt R. C., Espe E. [eds.], Preston Publications, Niles 1988.
7. Borkowski T., Metoda wyosobniania trucizn organicznych z materiału biologicznego, *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii* 1968, t. XVIII, s. 95–100.
8. Di Maio V. J. M., Garriott J. C., Four deaths due to intravenous injection of cocaine, *Forensic Science International* 1978, vol. 12, pp. 119–125.
9. 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.
10. Iten P. X., Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluss. Forensische Interpretation und Begutachtung, Institut für Rechtsmedizin Forensische Toxikologie Universität, Zurich 1994.
11. Kaistha K. K., Tadrus R., Single- and two step extraction and thin-layer detection procedures for benzoylecgonine (cocaine metabolite) alone or in combination with a wide variety of commonly abused drugs in urine screening programs, *Journal of Chromatography* 1977, vol. 135, pp. 385–393.

12. Kissler W., Über eine todliche Cocainvergiftung, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1985, Bd. 94, S. 155–158.
13. Kiszka M., Mađro R., Evaluation of the method of cocaine and benzoylecgonine isolation from post-mortem material. Part I: Liquid-liquid extraction, *Problems of Forensic Sciences* 2001, vol. 48, pp. 7–30.
14. Kubalski J., Tobolska-Rydz H., Środki uzależniające, PZWL, Warszawa 1984.
15. LeBelle M., Lauriault G., Callahan S. [et al.], The examination of illicit cocaine, *Journal of Forensic Sciences* 1988, vol. 33, pp. 662–675.
16. Lillsunde P., Korte T., Comprehensive drug screening in urine using solid-phase extraction and combined TLC and GC/MS identification, *Journal of Analytical Toxicology* 1991, vol. 15, pp. 71–81.
17. Logan B. K., Nichols H. S., Stafford D. T., A simple laboratory test for the determination of the chemical form of cocaine, *Journal of Forensic Sciences* 1989, vol. 34, pp. 678–681.
18. Lowry W. T., Lomonte J. N., Hatchett D. [et al.], Identification of two novel cocaine metabolites in bile by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry in a case of acute intravenous cocaine overdose, [in:] Cocaine: Determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the *Journal of Analytical Toxicology*, Baselt R. C., Espe E. [eds.], Preston Publications, Niles 1988.
19. Lundberg G. D., Garriott J. C., Reynolds P. C. [et al.], Cocaine-related death, *Journal of Forensic Sciences* 1977, vol. 22, pp. 402–408.
20. Mueller M. A., Adams S. M., Lewand D. L. [et al.], Detection of benzoylecgonine in human urine, *Journal of Chromatography* 1977, vol. 144, pp. 101–107.
21. Peterson K. L., Logan B. K., Christian G. D., Detection of cocaine and its polar transformation products and metabolites in human urine, *Forensic Science International* 1995, vol. 73, pp. 183–196.
22. Poklis A., Maggin D., Barr J., Tissue disposition of cocaine in man: a report of five fatal poisonings, *Forensic Science International* 1987, vol. 33, pp. 83–88.
23. Poklis A., Evaluation of TDx cocaine metabolite assay, [in:] Cocaine: Determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the *Journal of Analytical Toxicology*, Baselt R. C., Espe E. [eds.], Preston Publications, Niles 1988.
24. Ramcharitar V., Levine B., Smialek J. E., Benzoylecgonine and ecgonine methyl ester concentrations in urine specimens, *Journal of Forensic Sciences* 1995, vol. 40, pp. 99–101.
25. Sperry K., Suicide with, and because of cocaine (Letter), *Journal of American Medical Association* 1988, vol. 259, p. 2995.
26. Spiehler V., Reed D., Brain concentrations of cocaine and benzoylecgonine in fatal cases, *Journal of Forensic Sciences* 1985, vol. 30, pp. 1003–1011.

27. 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.
28. Winek C. L., Wahba W. W., Rozin L. [et al.], An unusually high blood cocaine concentration in fatal case, [in:] Cocaine: Determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the *Journal of Analytical Toxicology*, Baselt R. C., Espe E. [eds.], Preston Publications, Niles 1988.

PRZYDATNOŚĆ METODY CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ DO IDENTYFIKACJI KOKAINY I JEJ METABOLITU BENZOILOEKGONINY W MATERIALE SEKCYJNYM

Marianna KISZKA, Roman MAĐRO

WSTĘP

Metoda chromatografii cienkwarstwowej (TLC) nadal znajduje zastosowanie do identyfikacji różnych substancji odurzających, w tym także kokainy (C). Skuteczność metody TLC zależy jednak od optymalizacji procesu analitycznego, zwłaszcza od zastosowania odpowiedniego układu rozwijającego, tj. takiego, który umożliwi dobre rozdzielenie C od jej metabolitów, a także od „tła” biologicznego. Ważne jest również dobranie takiego sposobu wybarwiania chromatogramów, który zapewni wysoką wykrywalność ksenobiotyków. Konieczne jest ponadto uwzględnienie możliwości rozdzielenia lidokainy (LD) oraz kokaetylenu (CEt) zarówno od C, jak i od benzoiloekgoniny (BE), która jest jednym z jej głównych metabolitów. Przed zastosowaniem LD jako standardu wewnętrznego w chromatografii cieczowej (HPLC) należy bowiem wykluczyć jej obecność w badanym materiale biologicznym, gdyż C oferowana przez dealerów bywa niekiedy zafalszowana tym lekiem [14, 15]. CEt może natomiast znajdować się w analizowanych próbkach ze względu na to, że spożywanie C łącznie z alkoholem prowadzi do jego powstawania [3].

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Zastosowano płytki firmy Merck (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 × 20 cm). Chromatogramy rozwijano na odcinku 16 cm techniką wstępującą w komorach szklanych wysyconych parami rozpuszczalników. Wykonano cztery (I–IV) cykle badań:

- I. 30 różnych układów rozwijających (wyszczególnionych w tabeli I) przetestowano z zastosowaniem metanolowych roztworów wzorcowych C, BE, LD i CEt oraz „wzorców” tła biologicznego w postaci chloroformowo-alkalicznych ekstraktów z materiału biologicznego¹. Wzorce ksenobiotyków (w ilości 10 µg) oraz „wzorce” tła (w ilości 40 µg, co odpowiadało 2 g ekstrahowanej tkanki) nanoszono na płytki chromatograficzne i rozwijano w każdym z trzydziestu układów. Wysuszone chromatogramy oglądano w świetle UV, a następnie wybarwiano przy użyciu odczynnika Dragendorffa z 20% kwasem siarkowym,

¹ Uzyskiwano je z 25-gramowych próbek nerki i wątroby przez ich homogenizację mechaniczną z dodatkiem 50 ml wody, odbiałczanie tego materiału metodą siarczanowo-amoniową według Borkowskiego [7], ekstrakcję eterem w ekstraktorach firmy Quikfit, alkalizowanie fazy wodnej (2,5 M wodą amoniakalną do pH = 7,5–8) i jej ekstrakcję chloroformową systemem ciągłym przez 6 godzin, odparowanie ekstraktów alkalicznych z dodatkiem 1 kropli 1 M HCl, a następnie ich rozpuszczenie w 0,5 ml metanolu.

jodoplatynianu potasowego z 20% kwasem siarkowym i kombinacji obu wymienionych odczynników z 5% roztworem chlorku żelazowego. Określano R_f plam widocznych w świetle UV i po wybarwieniu. Uwzględniano także kształt plam.

- II. Czulość dwudziestu systemów wywołujących oceniano po naniesieniu na płytki C i BE (w postaci alkoholowych roztworów) w ilości 0,5, 1, 2, 5, 10 i 20 g i zastosowaniu mieszaniny octan etylu-metanol-amoniak 60:30:6, tj. jednego z czterech najlepszych układów rozwijających (określonych w pierwszym etapie eksperymentu – por. tabela I). Zwracano przy tym uwagę na kolejność pojawiania się plam, ich rozmiar i kształt oraz intensywność barwy.
- III. Przydatność metody TLC do identyfikacji C i BE w materiale biologicznym badano przy użyciu ekstraktów² z wątroby i nerki z dodatkiem obu ksenobiotyków w stężeniu 1, 2 i 5 g/g tkanki. W tym celu na płytki chromatograficzne nanoszono wzorce C i BE (w postaci alkoholowych roztworów) w ilości 1, 2 i 5 µg i po 40 l ekstraktów z wątroby i nerki (co odpowiadało 2 g tkanki) z dodatkiem i bez dodatku ksenobiotyków. Płytki te rozwijano następnie w każdym z czterech optymalnych układów (określonych w pierwszym etapie eksperymentu – por. tabela I), czyli w mieszaninach: metanol-chloroform 4:1, chloroform-metanol-amoniak 100:20:1, chloroform-metanol-amoniak-woda 70:30:1:0.5 i octan etylu-metanol-amoniak 60:30:6, po czym wybarwiano kolejno odczynnikami Dragendorffa z 20% kwasem siarkowym, roztworem chlorku żelazowego oraz roztworem jodoplatynianu potasowego.
- IV. W ostatnim etapie oceniano przydatność metody TLC do wykrywania C i BE w moczu. Użyto do tego próbek (10 ml) moczu z dodatkiem C i BE (w stężeniu 1, 2 i 5 g/ml), które poddawano ekstrakcji eterowo-kwaśnej, a następnie ekstrakcji zasadowej (pH = 8) mieszaniną dichlorometan-izopropanol 3:1 w proporcji próbka : solwent = 1:8. Równolegle przeprowadzono ekstrakcję identycznie przygotowanych próbek moczu połączoną z wysalaniem NaHCO₃ (0,1 g/ml moczu). Wszystkie ekstrakty rozpuszczano w 100 l metanolu. Na płytki chromatograficzne nanoszono wzorce C i BE (w postaci alkoholowych roztworów w ilości odpowiadającej 1, 2 i 5 g) oraz po 25 l każdego z zasadowych ekstraktów (co odpowiadało 2,5 ml ekstrahowanego moczu) i rozwijano w siedmiu fazach ruchomych, z których cztery uznano wcześniej za optymalne (por. tabela I i rezultaty etapu III), a trzy pozostałe (benzen-metanol-aceton-amoniak 50:50:40:5, metanol-amoniak 100:1,5 i chloroform-metanol 4:1) uwzględniono, ponieważ są często stosowane w codziennej pracy w laboratorium toksykologicznym. Do wybarwiania chromatogramów (podobnie jak w trzecim etapie badań) stosowano kolejno odczynnik Dragendorffa oraz roztwory kwasu siarkowego, chlorku żelazowego i jodoplatynianu potasowego.

WYNIKI BADAŃ, ICH OMÓWIENIE I DYSKUSJA

Wyniki eksperymentalnej oceny przydatności metody TLC do identyfikacji C i BE w materiale sekcyjnym przedstawiono w tabelach I i II oraz na rycinach 1 i 2.

² Uzyskanych w sposób podany w punkcie pierwszym.

- I. Bardzo dobre i dobre rezultaty rozdziału C od BE i od „tła” ekstraktów (z wątroby i nerki) uzyskano po zastosowaniu ośmiu układów rozwijających, które w tabeli I zaznaczono dwoma stopniami szarości tła. Cztery z nich uznano jednak za optymalne (w tabeli I oznaczono je trzema plusami) ze względu na bardzo dobrą separację obu ksenobiotyków od „tła”. W przypadku ich zastosowania plamy „tła”, wybarwione przy użyciu jodoplatynianu i odczynnika Dragendorffa, a także plamy „tła” widoczne w UV, były bowiem usytuowane poza strefą plam C i BE w środkowej (fazy nr 16, 17 i 20 – tabela I) lub górnej (faza nr 3 – tabela D) części chromatogramu. Te cztery układy okazały się zatem szczególnie użyteczne do oczyszczania ekstraktów (metodą TLC) przed ilościową analizą C i BE. Natomiast cztery pozostałe układy rozwijające (nr 1, 2, 4 i 23 – tabela I) oznaczono tylko dwoma plusami, gdyż po ich zastosowaniu plamy ksenobiotyków były mniej zwarte i miały owalny kształt, w związku z czym układy te uznano za mniej przydatne do oczyszczania ekstraktów z materiału biologicznego.

Mimo dobrego rozdziału C od BE zbyt małe różnice między R_f plam ksenobiotyków i plam „tła” (widocznych w UV lub wybarwionych) sprawiają, że pozostałe układy rozwijające (w tabeli I – oznaczone jednym plusem) uznano za mało użyteczne do identyfikacji C i BE w ekstraktach z tkanek.

Do identyfikacji LD najlepsze okazały się układy oznaczone w tabeli I numerami 1–7 i 9–10. Optymalny jednoczesny rozdział LD, C i BE od „tła biologicznego” zapewniał jednak wyłącznie układ nr 3, tj. metanol-chloroform 4:1.

W stopniu w pełni zadowalającym nie udało się natomiast rozdzielić CEt od C. Jedynie zastosowanie układu nr 29 (heksan-toluen-dietylamina 65:20:5)³ pozwoliło na uzyskanie różnych wartości R_f ($C = 0,42$ i $CEt = 0,48$), ale kosztem utraty możliwości zidentyfikowania BE (plamy pozostały w punkcie startu). Należy zatem pamiętać, że w plamach C uzyskanych po zastosowaniu wcześniej omówionych 8 optymalnych układów rozwijających może znajdować się również CEt (ze względu na podobieństwo R_f), który można jednak łatwo zidentyfikować przy użyciu metody HPLC.

- II. Wyniki badań nad wykrywalnością C i BE na płytkach chromatograficznych w zależności od zastosowanego systemu wywołującego zawiera tabela II, z której wynika, że kombinacja odczynnika Dragendorffa z roztworem kwasu siarkowego okazała się optymalnym odczynnikiem do wywoływania plam C i BE. Po zastosowaniu odczynnika Dragendorffa możliwe było bowiem zidentyfikowanie plam o zawartości 2 g C i 5 g BE, ale wykrywalność wzrastała przeszło dwukrotnie dla C i aż ponad pięciokrotnie dla BE po dodatkowym spryskaniu płytki kwasem siarkowym. Zastosowanie kwasu solnego dawało nieco gorsze efekty (zwłaszcza dla C), gdyż plamy były wtedy słabiej widoczne i mniej trwałe.

Wallace i in. [27] za najlepszą do wykrywania ksenobiotyków w ekstraktach z moczu uznali natomiast tę właśnie kombinację (tj. odczynnika Dragendorffa z kwasem siarkowym) w połączeniu z parami jodu, ale stężenia wykrywanych tym sposobem związków mieściły się blisko osiągniętej w tym doświadczeniu granicy wykrywalności, bowiem w przybliżeniu wynosiły 0,5 g C i 0,8 g BE. Z przeprowadzonego w związku z tym eksperymentu wynika

³ Polecanego przez Baileya [3, 4] do analizy ekstraktów z osocza i moczu.

jednak, że jedynym pozytywnym skutkiem zastosowania par jodu po odczynniku Dragendorffa z kwasem siarkowym był niewielki i krótkotrwały wzrost intensywności wybarwienia (wyraźnie widoczny tylko dla plam o wyższych stężeniach). Ujawniło się przy tym ryzyko „przedawkowania” odczynnika prowadzące do zaciemnienia całego chromatogramu, co zmniejszało szansę wykrycia niskich stężeń zarówno C, jak i BE. Obserwacje te są zgodne z doniesieniem Kaistha i Tadrus [11], którzy BE w ekstraktach z moczu wykrywali także przy użyciu kombinacji odczynnika Dragendorffa z roztworem jodu oraz jodku potasu i również zauważyli szybkie zanikanie plam o niskiej zawartości BE, w związku z czym jako alternatywny system wybarwienia zaproponowali połączenie odczynnika Dragendorffa z kwasem siarkowym.

Powszechnie stosowany jodoplatynian okazał się odczynnikiem o niskiej wykrywalności C i BE (5 g), przy czym plamy zawierające BE pojawiały się dopiero po dodatkowym spryskaniu płytek kwasem solnym lub siarkowym. Różnice w reagowaniu C i BE na jodoplatynian w połączeniu z kwasem mogą więc być dodatkową wskazówką różnicującą te substancje.

Zbliżony (do przedstawionego w tabeli II) poziom detekcji BE uzyskali Müller i in. [20] po dwustopniowym rozdzieleniu ekstraktów (z około 7 ml moczu) metodą TLC i wybarwieniu chromatogramu roztworem jodoplatynianu zmieszonym z 2 M HCl. Przy użyciu jodoplatynianu podobnie słabą detekcję C stwierdził też Bailey [4]. Z porównania warunków jego doświadczenia (w którym na płytkę chromatograficzną nanosił ekstrakt z 35 ml moczu) z rezultatami badań przedstawionymi w tej pracy wynika jednak, że po zastosowaniu odczynnika Dragendorffa z kwasem siarkowym wykrywalność C tego rzędu można uzyskać z pięciokrotnie mniejszej ilości moczu.

W przypadku łącznego stosowania jodoplatynianu i odczynnika Dragendorffa okazało się, że użycie najpierw odczynnika Dragendorffa, a następnie jodoplatynianu, jest bardziej korzystne niż zastosowanie ich w odwrotnej kolejności, ale taka kombinacja nie obniża granicy detekcji poniżej około 5 g C w plamie, co wcześniej stwierdzili również Lillsunde i Korte [16]. Dla uzyskania dobrego wybarwienia plam BE konieczne było jednak dodatkowe spryskanie chromatogramu kwasem.

Uwzględniony został także rodanek kobaltu, ponieważ używany jest w jakościowych testach barwnych służących do wykrywania kokainy [5, 17]. W omawianym eksperymencie okazał się on jednak zbyt mało czułym wywoływaczem, aby można go było wykorzystać do identyfikacji C i BE przy użyciu metody TLC.

Nakładanie różnych systemów wybarwiających zwiększało wprawdzie intensywność plam zawierających małe ilości ksenobiotyków, ale jednocześnie powodowało przyciemnienie tła chromatogramów i zmniejszało trwałość plam. Korzystne efekty takiego postępowania obserwowano tylko wówczas, gdy w plamach chromatograficznych znajdowało się nie mniej niż około 5 g C lub BE. Rezultaty przeprowadzonych eksperymentów prowadzą zatem do wniosku, że wybarwienie należy rozpoczynać od połączenia odczynnika Dragendorffa z kwasem siarkowym, a dalsze odczynniki (chlorek żelazowy, jodoplatynian lub inne) można stosować dopiero po dokładnej ocenie tak uzyskanego chromatogramu.

III. Analiza chloroformowo-alkalicznych ekstraktów z wątroby i nerki przy użyciu czterech wybranych wcześniej faz ruchomych (które w tabeli I wyróżniono znakiem +++) dawała bardzo wyraźne różnice między współczynnikiem R_f plam C i BE, a plamy „tła” były usytuowane poza obszarem rozdzielonych stref obu ksenobiotyków. Do uwidocznienia plam obu ksenobiotyków we wszystkich ekstraktach uzyskanych z tkanek zawierających C oraz BE w stężeniu 1–5 g/g skutecznym okazał się system wywołujący nr 10 (por. tabela II), ale pod warunkiem zachowania odpowiedniej kolejności wybarwiania (odczynnik Dragendorffa z 20% H_2SO_4 5% roztwór chlorku żelazowego jodoplatynian potasowy) oraz obserwacji każdego etapu wywoływania chromatogramu (rycina 1).

Uzyskano zatem limit detekcji, który czyni metodę TLC przydatną do wstępnej diagnostyki śmiertelnych zatruc C. Bardzo niskie poziomy C wykrywano bowiem tylko w nielicznych przypadkach, np. 0,1–1,5 g/g wątroby [8, 19] i 0,4 g/g mózgu [19]. Znacznie częściej jej stężenia były wielokrotnie wyższe: 6,8–51,3 g/g wątroby, 4–83 g/g mózgu i 10,2–58 g/g nerki [2, 6, 8, 12, 18, 19, 22, 28]. Wysokie były także średnie poziomy BE w wątrobie – 21,3 g/g i w mózgu – 2,9 g/g [26].

IV. Nakładanie się wybarwionych plam „tła” moczu na strefy C i BE miało miejsce tylko po zastosowaniu układu metanol-amoniak 100:1,5, zwłaszcza w przypadku badania próbek bardziej zanieczyszczonych. Przy użyciu trzech układów (chloroform-metanol-amoniak-woda 70:30:1:0,5; benzen-metanol-aceton-amoniak 50:50:40:5 i metanol-amoniak 100:1,5) plamy „tła” (widoczne tylko w UV) niektórych próbek moczu usytuowane były natomiast bardzo blisko plam BE, co może stwarzać trudności przy oczyszczaniu BE metodą TLC.

Dobre efekty rozdziału ekstraktów z moczu (otrzymanych zarówno z wysalaniem jak i bez wysalania) o różnej zawartości (1–5 g/ml) C i BE uzyskano natomiast przy pomocy czterech pozostałych układów rozwijających (por. rycina 2), z których dwa układy (octan etylu-metanol-amoniak 60:30:6 i chloroform-metanol-amoniak 100:20:1) zostały wcześniej pozytywnie ocenione przez innych autorów [20, 27].

Zastosowanie czterech wybranych systemów rozwijania (rycina 2) i opisanej wcześniej (por. część III) metody wybarwiania chromatogramów (jak również przyjętego sposobu ekstrakcji) pozwala na wykrywanie C oraz BE⁴ w 2,5 ml moczu zawierającego te ksenobiotyki w stężeniu 1–2 g/ml. Zastosowana procedura pozwoliła zatem na uzyskanie progu wykrywalności znacznie niższego od stężeń C i BE, które stwierdzano w moczu osób zmarłych w wyniku zatrucia kokainą [2, 6, 8, 9, 12, 18, 19, 21, 22, 25].

⁴ Jest to istotne, ponieważ BE utrzymuje się w moczu dłużej od C oraz dłużej od EME (estru metyloвого ekgoniny) – drugiego ważnego metabolitu C [1, 10]. Ponadto BE w moczu występuje w większych stężeniach niż C [10, 21], także wtedy, gdy mamy do czynienia z moczem pobranym od żywych osób używających kokainy [10, 23, 24]. Mocnym argumentem przemawiającym za koniecznością oznaczania tego metabolitu jest także to, że stężenia BE wydalanej z moczem w ciągu 0–8 godzin (po spożyciu C w postaci tabletki w ilości 96 mg oraz po jej wstrzyknięciu dożylnym w ilości 48 mg) lub 6–12 godzin (po przyjęciu doustnym w ilości 25 mg) wynosiły odpowiednio: 45,0; 9,5 lub 7,9 g/ml, podczas gdy stężenia C w moczu (0,3–1,9 g/ml) były o wiele niższe [10].

Należy jednak uwzględnić fakt, że poziom wykrywalności ksenobiotyków metodą TLC zależy nie tylko od metody ekstrakcji oraz systemów rozwijania i wybarwiania, ale także od poziomu „tła” materiału biologicznego. Obfite „tło” oddziałuje bowiem niekorzystnie na czytelność chromatogramu (gdyż powoduje smugi lub zniekształcenie plam ksenobiotyków), co sprawia, że plamy o małej zawartości C i BE mogą zostać niezauważone (zamaskowane). W przypadku próbek moczu o niskim poziomie tła możliwym wydaje się natomiast wykrywanie również niższych (od uzyskanych w tym cyklu badań) stężeń C i BE, ale pod warunkiem naniesienia na płytkę większej ilości ekstraktu. Wskazują na to bowiem badania Kaistha i Tadrus [11], którzy wykrywali BE z objętości ekstraktu odpowiadającej 5 ml moczu i osiągnęli czułość rzędu 0,5 g/ml, a także Wallace i in. [27], którzy, przy zastosowaniu identycznej ilości moczu i zbliżonego systemu wybarwiania, uzyskali jeszcze wyższą wykrywalność (0,1 g C i 0,25 g BE/ml).

- V. W trakcie wyżej omówionych badań ponadto zauważono, że:
1. złożone układy rozwijające umożliwiały lepsze rozdzielenie C i BE od „tła biologicznego” po dłuższym (1–2 dni) wysycaniu komory chromatograficznej mieszaniną solwentów;
 2. użycie rozpuszczalników niskiej jakości wiąże się z ryzykiem uzyskania fałszywie ujemnych wyników (np. octan etylu firmy POCH-Gliwice powodował częściowy rozkład C);
 3. wysalanie ekstrahowanych próbek moczu zwiększa wydajność izolacji BE [13], ale równocześnie powoduje wzrost poziomu „tła”.

WNIOSKI

1. Optymalną separację C i BE oraz „tła biologicznego” na płytkach firmy Merck (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, 20 × 20 cm) pozwalają uzyskać następujące układy rozwijające:
 - a) octan etylu-metanol-amoniak 60:30:6, chloroform-metanol-amoniak 100:20:1, metanol-chloroform 4:1 i chloroform-metanol 4:1 (w przypadku analizy ekstraktów z moczu);
 - b) metanol-chloroform 4:1, chloroform-metanol-amoniak 100:20:1, chloroform-metanol-amoniak-woda 70:30:1:0,5 i octan etylu-metanol-amoniak 60:30:6 (w przypadku analizy ekstraktów z tkanek).
2. Optymalnym systemem wybarwiającym chromatogramy jest kombinacja odczynnika Dragendorffa z roztworem kwasu siarkowego (wybarwia około 1 g C lub BE).
3. Optymalizacja warunków rozdziału i wybarwiania (zgodnie z rezultatami badań przedstawionych w tej pracy) pozwala na zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej do:
 - a) identyfikacji C i BE w moczu i tkankach w stężeniu 1–2 g/g;
 - b) oczyszczania obu ksenobiotyków przed ich oznaczaniem przy użyciu innej metody (np. spektrofotometrii UV lub HPLC).