

УДК 340.67:543.054:615.074

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ИЗ КРОВИ ДЛЯ ПАТРОНОВ СО СМЕШАННОЙ ФАЗОЙ НЕКОТОРЫХ БРЕНДОВ

С.С. Катаев¹, О.Н. Дворская²

¹Государственное казенное учреждение закрытого типа
«Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы»,
614077, Россия, г. Пермь, ул. Старцева, 61

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, 2
E-mail: dvoksnik@gmail.com

Твердофазная экстракция (ТФЭ) – один из современных методов выделения из биологического материала токсикологически значимых веществ, к которым относятся наркотические и лекарственные вещества, а также их метаболиты. В настоящее время на рынке присутствует большое количество предложений по патронам для ТФЭ различных производителей. Выбор подходящего патрона для ТФЭ как по качественным характеристикам, так и по ценовым параметрам является актуальным вопросом в ходе химико-токсикологического и судебно-химического анализа. **Цель исследования** – оценить и сравнить эффективность экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых брендов, предназначенных для твердофазной экстракции. **Материалы и методы.** Исследование по сравнению эффективности экстракции проводилось с использованием патронов для ТФЭ со смешанной фазой следующих производителей: Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel), Strata Screen-C (Phenomenex) EVIDEX SampliQ (Aqilent), HyperSep Verify-CX (Thermo), Starlab C8/SCX (Starlab Scientific Co., Ltd) с применением Agilent 7820 – газового хроматографа и Agilent 5975 – масс-селективного детектора (Agilent, США). **Результаты и обсуждение.** В статье приведены данные по сравнению эффективности экстракции патронов для ТФЭ со смешанной фазой 5 производителей (Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel), Strata Screen-C (Phenomenex) EVIDEX SampliQ (Aqilent) и HyperSep Verify-CX (Thermo)) для целей скрининга лекарственных и наркотических веществ из крови. Патроны Starlab C8/SCX исследованной партии имели признаки использования в производстве некачественного сорбента. **Заключение.** Даны рекомендации по использованию 5 типов патронов для процедуры скрининга наркотических и лекарственных веществ в крови в рутинной практике судебно-химических отделений и химико-токсикологических лабораторий. Исходя из относительной стоимости патронов для ТФЭ, экономически выгодными для применения в рутинной практике являются патроны брендов Strata Screen-C (Phenomenex) и EVIDEX SampliQ (Aqilent).

Ключевые слова: скрининг, лекарственные и наркотические вещества, кровь, твердофазная экстракция, газовая хроматография – масс-спектрометрия

Для цитирования:

Катаев С.С., Дворская О.Н.
СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТВЕРДОФАЗНОЙ
ЭКСТРАКЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И НАРКОТИЧЕ-
СКИХ ВЕЩЕСТВ ИЗ КРОВИ ДЛЯ ПАТРОНОВ СО
СМЕШАННОЙ ФАЗОЙ НЕКОТОРЫХ БРЕНДОВ.
Фармация и фармакология. 2017;5(6):543-555.
DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-6-543-555
© Катаев С.С., Дворская О.Н., 2017

For citation:

Kataev S.S., Dvorskaya O.N.
COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS
OF SOLID-PHASE EXTRACTION OF DRUGS
AND NARCOTIC SUBSTANCES FROM BLOOD FOR
MIXED-PHASE CARTRIDGES OF SOME BRANDS.
Pharmacy & Pharmacology. 2017;5(6):543-555. (In Russ.)
DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-6-543-555

COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF SOLID-PHASE EXTRACTION OF DRUGS AND NARCOTIC SUBSTANCES FROM BLOOD FOR MIXED-PHASE CARTRIDGES OF SOME BRANDS

S.S. Kataev¹, O.N. Dvorskaya²

¹State healthcare establishment of special type "Perm regional bureau of forensic-medical expertise", 61, Startsev Str., Perm, Russia, 614077

²Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Poleyaya St., Perm, Russia, 614990
E-mail: dvoksnik@gmail.com

Solid-phase extraction (SPE) is one of the modern methods for isolating toxicologically significant substances from biological materials, which include narcotic and medicinal substances, as well as their metabolites. Currently, the market has a large number of proposals for SPE cartridges from various manufacturers. The choice of a suitable cartridge for SPE both in terms of qualitative characteristics and price parameters is a topical issue in the course of chemical-toxicological and forensic chemical analysis. The aim of the research is to evaluate and compare the effectiveness of medicinal and narcotic substances's extraction from blood for widespread mixed-phase cartridges of some brands, which are intended for solid-phase extraction. **Materials and methods.** The research comparing the effectiveness of extraction was carried out with the use of mixed-phase cartridges for SPE of the following manufacturers: Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel), Strata Screen-C (Phenomenex) EVIDEX SampliQ (Aqilent), HyperSep Verify-CX (Thermo), Starlab C8/SCX (Starlab Scientific Co., Ltd) with the using of gas chromatograph Agilent 7820 equipped with mass selective detector Agilent 5975 (Agilent, USA). **Results and discussion.** This article presents the data on the comparison of the effectiveness of the extraction of mixed-phase cartridges for SPE from 5 manufacturers (Bond Elut Certify (Varian), Chromabond Drug (Macherey-Nagel), Strata Screen-C (Phenomenex) EVIDEX SampliQ (Aqilent) и HyperSep Verify-CX (Thermo)) for the purposes of screening drugs and narcotic substances from blood. The cartridges Starlab C8/SCX of the investigated batch had some signs of poor-quality sorbent in the production. **Conclusion.** Recommendations for using 5 types of cartridges for the procedure of screening narcotic and medicinal substances in blood during the routine practice of forensic chemical departments and chemical-toxicological laboratories are given. Considering the relative cost of cartridges for SPE, in routine practice it is economically viable to use cartridges from brands Strata Screen-C (Phenomenex) and EVIDEX SampliQ (Aqilent).

Keywords: screening, medicinal and narcotic substances, blood, solid-phase extraction, gas chromatography – mass spectrometry

Введение. Твердофазная экстракция (ТФЭ) – один из современных методов выделения из биологического материала токсикологически значимых веществ, к которым относятся наркотические и лекарственные вещества, а также их метаболиты.

Имеется ряд работ, рассматривающих ТФЭ на патронах со смешанной фазой *Bond Elut Certify*, *Clean Screen DAU*, *Isolute Confirm HCX* для пробоподготовки крови или её компонентов (сыворотки, плазмы) с целью анализа наркотических и лекарственных веществ [1-5]. Ранее нами было изучено применение патронов *SampliQ EVIDEX* со смешанной фазой (C8/катионит) для скрининга наркотических средств и лекарственных веществ в посмертной и цельной крови методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии [6-8].

На текущий момент времени на рынке присутствует большое количество предложений по патронам для ТФЭ различных производителей. Выбор подходящего патрона для ТФЭ как по качественным характеристикам, так и по ценовым параметрам является актуальным вопросом в ходе химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Существует мнение, что возможны существенные различия в выходах тех или иных веществ на

патронах для ТФЭ от партии к партии и от производителя к производителю [9].

Цель исследования – оценить и сравнить эффективность экстракции лекарственных и наркотических веществ из крови для распространенных патронов со смешанной фазой некоторых брендов, предназначенных для ТФЭ.

Материалы и методы. *Оборудование.*

Газовый хроматограф – *Agilent 7820* (капиллярная колонка *HP-5MS* с внутренним диаметром 0,25 мм, длиной 30 м, толщиной пленки 0,25 мкм (*Agilent*, США);

Масс-селективный детектор *Agilent 5975* (*Agilent*, США);

Система с вакуумной камерой (12 позиций) (*Supelco*);

Насос низкого вакуума *AIR CADET* (США);

Термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия);

Одноканальный испаритель ПЭ-2300 (ОАО «Экрос», Россия);

Микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия);

Полуавтоматические пипетки-дозаторы (для отбора объемов жидкостей: 4–40, 40–200 мкл и 0,2–1, 1–5 мл).

Патроны для ТФЭ на основе силикагеля со смешанной фазой (табл. 1), характеристики: площадь

поверхности 500 м²/г, размер пор 60–70 Å, размер частиц 40–60 мкм.

Таблица 1 – Сведения о патронах для твердофазной экстракции

Патрон (тип)	Бренд (модель)	Производитель	Масса, мг	Объем, мл	Относительная стоимость
EVIDEX	SampliQ	Agilent	200	3	1,0
Screen-C	Strata	Fenomenex	200	3	0,62
Certify	Bond Elut	Varian	200	3	1,82
Verify CX	HyperSep	Thermo Scientific	200	6	1,91
Drug	Chromabond	Macherey-Nagel	200	3	1,33
C8/SCX	Starlab	Starlab Scientific Co., Ltd	200	3	нет данных

Материалы. Салициловая кислота (ГФ XIII, ФС.2.1.0033.15), кокаина гидрохлорид (ГФ X, ФС 167), изониазида (ГФ X, ФС 357), морфина гидрохлорид (ФС 413, ГФ X), амфетамина сульфат (ГФ X, ФС 513), фенобарбитал (ГФ XIII, ФС.2.1.0041.15), реланиум (ампулы, 2 мл, 5 мг/мл диазепам, Polfa, Польша), метиндол (ампулы, 2 мл, 60 мг/мл индометацина, Polfa, Польша), субстанция кеторолака трометамин («Чемо Иберика С. А.», Испания), эналаприл (таблетки, 5 мг, Немофарм, Сербия), амитриптилин (ампулы, 2 мл, 10 мг/мл амитриптилина гидрохлорида, ЗЕНТИВА, Чешская Республика). Бензоилэксгонин, эксгонин готовили из кокаина гидрохлорида согласно публикации [10].

2,2,3,3,3-Пентафтор-1-пропанол (*Sigma-ALDRICH CHEMI*, Германия), йодистый метил (Вектон, Россия).

Буферный раствор: 1/15 М фосфатный буфер (рН 4,8).

Растворители: 95% этанол (х.ч.), 99,6% метанол (х.ч.), этилацетат (х.ч.), дихлорметан (х.ч.), гексан (х.ч.), пропанол-2 (х.ч.).

Другие реактивы: уксусная кислота ледяная (ГФ XII), аммиака раствор концентрированный 25% (ГФ XII), гелий (о.с.ч.), азот (о.с.ч.).

Спиртовые растворы стандартов (№ 1, № 2, № 3, № 4) содержали:

№1 – индометацин 0,1 мг/мл, кеторолак 0,02 мг/мл, салициловая кислота 0,1 мг/мл, фенобарбитал 0,2 мг/мл;

№2 – амитриптилин 0,02 мг/мл, амфетамин 0,02 мг/мл, диазепам 0,02 мг/мл, морфин 0,01 мг/мл, эналаприл 0,0008 мг/мл;

№3 – изониазид 0,06 мг/мл;

№4 – кокаина гидрохлорид 0,01 мг/мл, бензоилэксгонин 0,01 мг/мл, эксгонина гидрохлорид 0,005 мг/мл.

Интактную кровь до исследования хранили при температуре –18°C.

Скрининг наркотических средств и лекарственных веществ в крови с использованием методов твердофазной экстракции и газовой хроматографии- масс-спектрометрии

Для сравнительного исследования патронов различных производителей нами была применена опти-

мированная методика, опубликованная в работе [8].

Подготовка проб. 0,5 мл крови вносили во флакон и прибавляли по 50 мкл растворов стандартов (№ 1, № 2, № 3, № 4), 2 мл 1/15 М буфера фосфатного (рН 4,8). Флаконы укупоривали и на 5 минут помещали в ультразвуковую баню, затем в течение 15 минут при 3000 об/мин содержимое флаконов центрифугировали. Полученный центрифугат отделяли от осадка.

Процедура ТФЭ.

Кондиционирование сорбента. Через картридж последовательно пропускали 2 мл 95% этанола, 2 мл 1/15 М буфера фосфатного (рН 4,8).

Далее в патрон загружали образец и пропускали его со скоростью потока 1 мл/мин. Промывку патрона осуществляли со скоростью потока 2–3 мл/мин, последовательно внося 1 мл 1/15 М буфера фосфатного (рН 4,8) и 1 мл 10% этанола. Сушили патрон в течение 20 минут под вакуумом.

Получение I элюата. Через патрон дважды пропускали по 2 мл смеси н-гексан-этилацетат (2:1).

Получение II элюата. Через патрон пропускали дважды по 2 мл смеси дихлорметан-изо-пропанол-25% аммиак (2:1:0,1).

Для оценки эффективности экстракции к элюатам I и II прибавляли 50 мкл спиртового раствора 1 мг/мл динонилфталата (ДНФ). Далее элюаты I и II испаряли в токе азота при 40°C.

Дериватизация и исследование

Метилирование. К остатку I элюата после высушивания прибавляли 500 мкл ацетона безводного, 40 мкл йодистого метила, 20–25 мг калия карбоната безводного, флакон герметично закрывали, нагревали в термоблоке в течение 60 минут при 60°C. После охлаждения флакона отбирали жидкую фазу реакционной смеси, переносили ее в вials, испаряли при комнатной температуре в токе азота. Сухой остаток реконструировали в 100 мкл этилацетата безводного, 1 мкл вводили в инжектор ГХ/МС.

Ацетилирование и этерификация

Стадия I (ацетилирование). К остатку II элюата после высушивания прибавляли 40 мкл пиридина безводного, 60 мкл уксусного ангидрида (при этом замывая стенки флакона). Флакон герметично укупоривали, нагревали при 80°C в термоблоке 30 минут. После охлаждения флакон вскрывали, избыток реа-

гентов выпаривали в токе азота (при температуре не выше 40°C).

Стадия 2 (этерификация). К сухому остатку элюата II прибавляли 20 мкл 2,2,3,3,3-пентафтор-1-пропанола, 60 мкл уксусного ангидрида (замывая при этом стенки флакона). Флакон герметично закрывали и выдерживали в термоблоке при 60°C 30 минут. После охлаждения флакона его вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (при температуре не выше 40°C). Сухой остаток после высушивания реконструировали в 100 мкл этилацетата безводного, далее 1 мкл вводили в инжектор ГХ/МС.

Режим работы газового хроматографа с масс-селективным детектором. Скорость потока гелия (газ-носитель) через колонку составляла 1,5 мл/мин, режим работы – split/splitless (с делением потока 20:1, задержка включения после ввода пробы – 1 мин). Температурные данные испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавались в значениях 250 и 280°C. Начальная температура колонки была 70°C в течение 2 мин, затем имел место прогрев до 280°C со скоростью программирования 20 град/мин. Выдержка при конечной температуре – 12,5 мин.

Напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали равной величине автоматической настройки детектора. Регистрацию масс-спектров для метильных и ацетильных производных

проводили в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42–450 а.е.

С целью идентификации компонентов проб обработку хроматограмм проводили с использованием пакета программ *ChemStation G1701DA* и *AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST)*.

Результаты и обсуждение. Для исследования использовали 5 типов патронов известных брендов, а также, предлагаемые в качестве их аналогов, патроны *Starlab C8/SCX*. Все типы патронов содержат «зернистые» сорбенты на основе силикагеля со смешанным типом фазы: «обращенная» (октил-, C8) и фенилсульфокислота (катионит, SCX).

Патроны *Starlab C8/SCX* исследованной партии имели признаки использования в производстве некачественного сорбента. Данный вывод обусловлен «смывом» привитой фазы, а также химическим загрязнением вследствие технологического процесса производства сорбентов. Артефакты фазы C8 наблюдались в обоих элюатах (рис. 1–3), имидазол определялся в элюате II (рис. 3, 4). Исходя из вышесказанного, патроны *Starlab C8/SCX* в дальнейшем исследовании не использовали. Также следует отметить, что для остальных 5 типов патронов подобных проблем качества нами не наблюдалось.

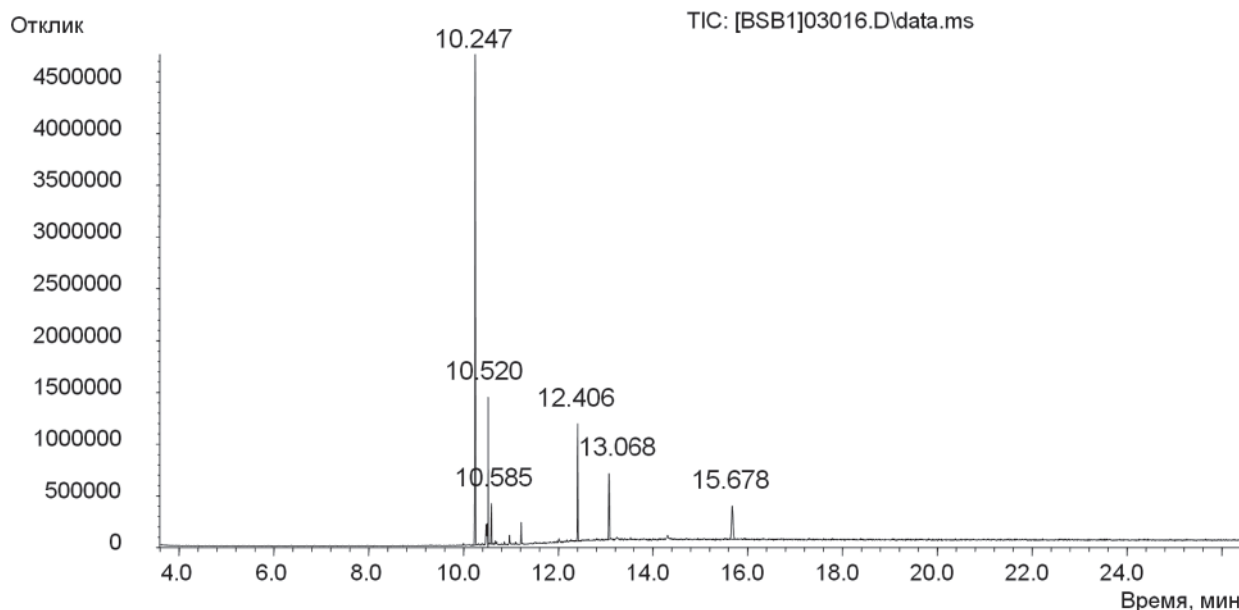


Рисунок 1 – Хроматограмма. Исследование элюата I, полученного на патроне *Starlab C8/SCX*

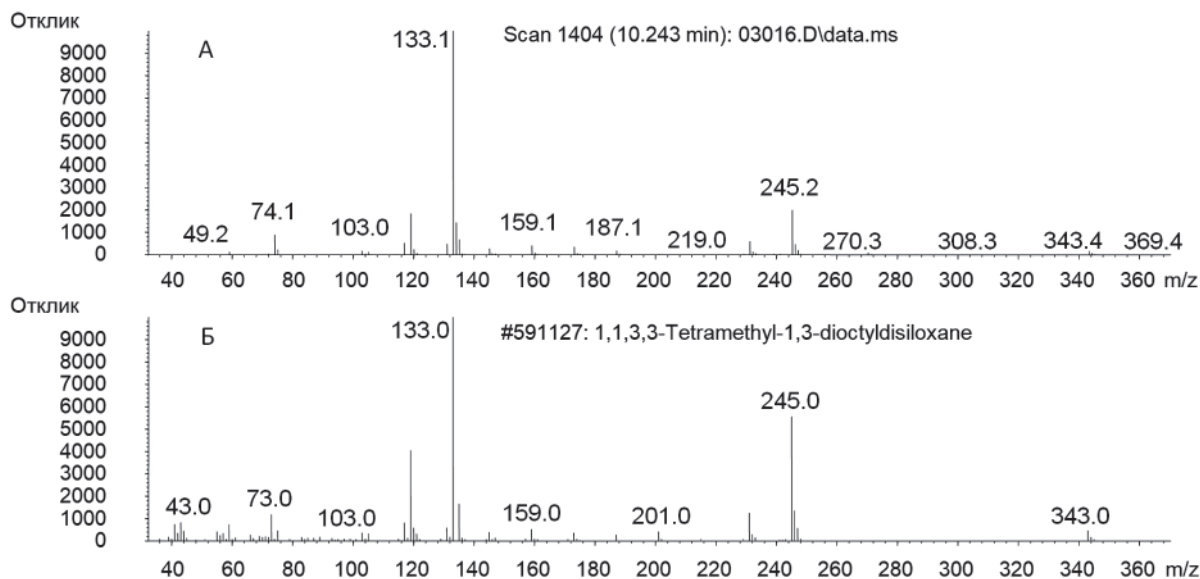


Рисунок 2 – Фрагмент экстракционной хроматограммы по ионам, характерным для масс-спектра 1,1,3,3-тетраметил-1,3-диоктилдисилоксана (А). Сравнение масс-спектра пика со временем удерживания 10,25 мин с библиотечным масс-спектром 1,1,3,3-тетраметил-1,3-диоктилдисилоксана (Б)

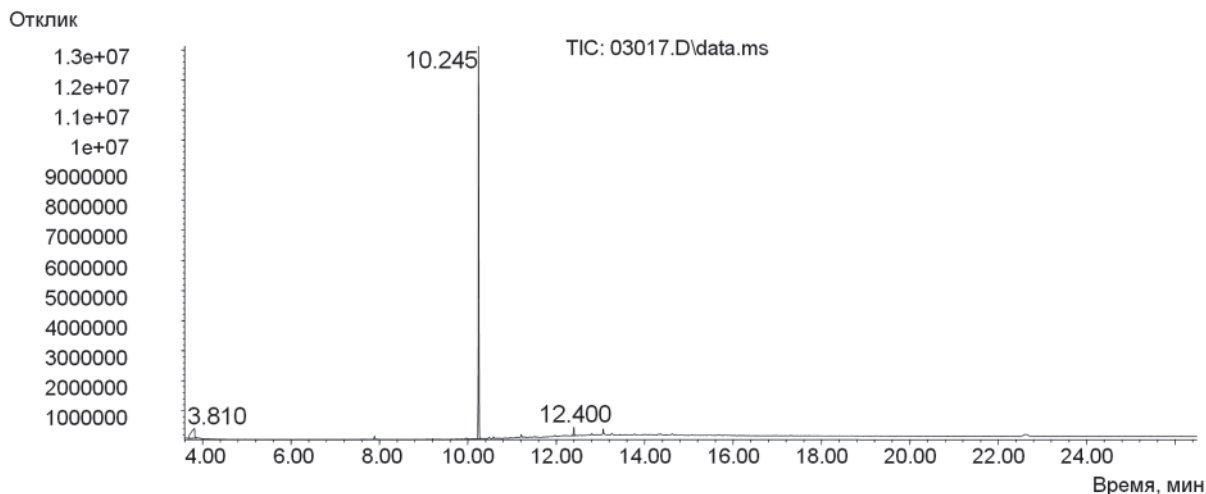


Рисунок 3 – Хроматограмма. Исследование элюата II, полученного на патроне Starlab C8/SCX

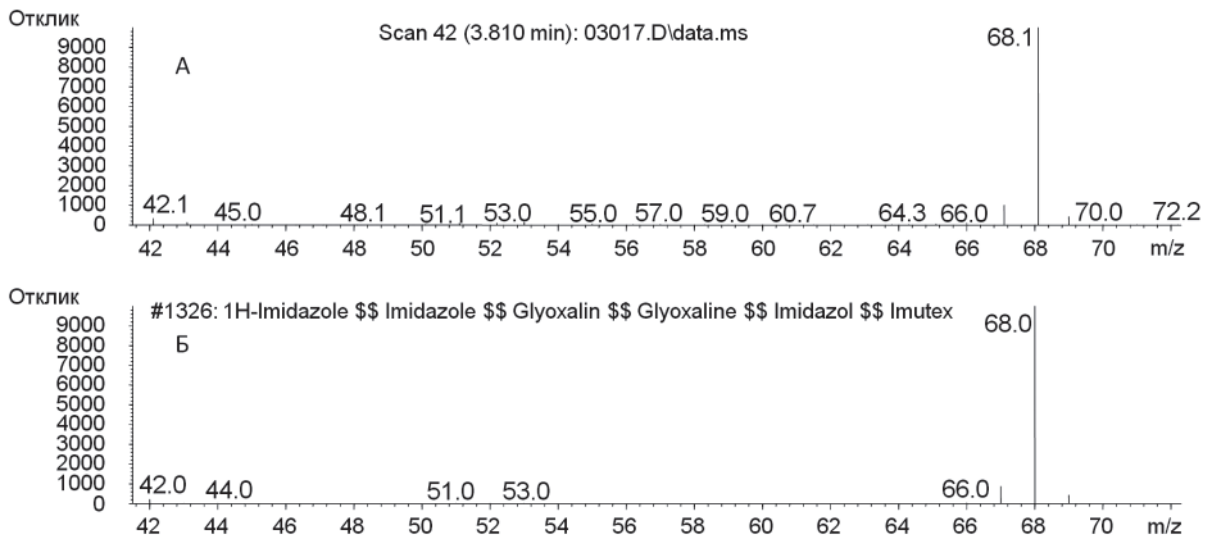


Рисунок 4 – Фрагмент экстракционной хроматограммы по ионам, характерным для масс-спектра имидазола (А). Сравнение масс-спектра пика со временем удерживания 3,81 мин с библиотечным масс-спектром имидазола (Б)

В таблице 2 приведены результаты оценки эффективности экстракции (ЭЭ) модельных соединений из крови.

Таблица 2 – Результаты оценки эффективности экстракции модельных соединений ($n=6$, $X \pm SD$, %)

Соединение	Evidex SampliQ (Aqilent)		Strata Screen-C (Phenomenex)		Bond Elut Certify (Varian)		HyperSep Verify-CX (Thermo)		Chromabond Drug (Macherey-Nagel)	
	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II	Элюат I	Элюат II
Салициловая кислота	0,82 (91)	н.о.	следы	н.о.	следы	н.о. / n.d.	0,02 (90)	н.о.	н.о.	н.о.
Фенобарбитал	88 (8,6)	н.о.	81 (4,6)	н.о.	81 (3,5)	н.о. / n.d.	79 (9,0)	н.о.	84 (2,6)	н.о.
Кеторолак	27 (13)	н.о.	30 (49)	н.о.	12 (90)	н.о. / n.d.	7,0 (53)	н.о.	14 (98)	н.о.
Диазепам	61 (9,9)	н.о.	60 (23)	н.о.	55 (4,2)	0,91 (99)	60 (6,4)	2,4 (58)	68 (2,5)	1,7 (56)
Индометацин	101 (5,2)	н.о.	106 (3,6)	н.о.	97 (1,6)	н.о. / n.d.	100 (4,0)	н.о.	105 (2,7)	н.о.
Эктонин	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о. / n.d.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Амфетамин	н.о.	93 (4,5)	н.о.	104 (20)	н.о.	98 (1,4)	н.о.	90 (12)	н.о.	97 (2,2)
Изониазид	н.о.	0,69 (33)	н.о.	1,1 (30)	н.о.	0,58 (36)	н.о.	0,79 (22)	н.о.	0,69 (23)
Бензоилэгонин	н.о.	48 (9,5)	н.о.	78 (3,3)	н.о.	68 (15)	н.о.	38 (10)	н.о.	58 (24)
Амитриптилин	н.о.	53 (14)	н.о.	71 (26)	н.о.	82 (6,6)	н.о.	69 (14)	н.о.	90 (5,8)
Кокаин	н.о.	79 (6,4)	н.о.	84 (5,6)	н.о.	85 (4,3)	н.о.	78 (15)	н.о.	102 (1,6)
Морфин	н.о.	24 (19)	н.о.	9,1 (55)	н.о.	10 (40)	н.о.	6,1 (33)	н.о.	8,0 (20)
Эналаприл	н.о.	78 (10)	н.о.	56 (14)	н.о.	74 (10)	н.о.	70 (11)	н.о.	85 (3,7)

н.о. – не обнаружено

Как видно из полученных данных, салициловая кислота не обнаружена в процедуре ТФЭ при использовании патронов *Chromabond Drug (Macherey-Nagel)*. Низкая ЭЭ кеторолака с высокими значениями девиации наблюдалась для патронов *Bond Elut Certify (Varian)*, *Verify-CX (Thermo)* и *Chromabond Drug (Macherey-Nagel)*. Для бензоилэгонина и амитриптилина самая низкая ЭЭ отмечалась при использовании патронов *EVIDEX SampliQ (Agilent)* и *Verify-CX (Thermo)*.

Патроны *Verify-CX (Thermo)* по геометрическим параметрам несколько отличались от прочих исследованных патронов (имели объем 6 мл, а не 3, как остальные), последнее, в некоторой степени, могло повлиять на полученные результаты.

Следует отметить также следующее: при проведении процедуры ТФЭ для ряда проб у некоторых патронов наблюдались проблемы с прохождением пробы через патрон, что, очевидно, связано с «блокированием» пор фритт. Такие проблемы наблюдались для патронов *Bond Elut Certify (Varian)*, *Chromabond Drug (Macherey-Nagel)* и *Strata Screen-C (Phenomenex)* и не наблюдались для патронов 2 марок: *EVIDEX SampliQ (Agilent)* и *HyperSep Verify-CX (Thermo)*. Таким образом, при применении патронов

Bond Elut Certify, *Chromabond Drug* и *Strata Screen-C* следует обращать внимание на тщательность отбора центрифугата, избегая попадания взвеси и осадка.

Заключение. Оценена эффективность экстракции патронов для ТФЭ со смешанной фазой разных производителей для целей скрининга лекарственных и наркотических веществ из крови. Учитывая вышеизложенное, можно утверждать, что все 5 типов патронов в равной степени могут использоваться для процедуры скрининга наркотических и лекарственных веществ в крови.

Исходя из относительной стоимости патронов для ТФЭ, экономически выгодными для применения в рутинной практике являются патроны брендов *Strata Screen-C (Phenomenex)* и *EVIDEX SampliQ (Agilent)*.

Учитывая сложившуюся систему закупок, которая не позволяет гарантированно приобретать конкретный вид патронов для ТФЭ, необходимо обращать внимание на качество сорбентов, использованных в их производстве. В противном случае, «смыв» фазы может привести к химическому загрязнению элюатов, отсутствию воспроизводимости анализа и, как следствие, получению необъективных результатов исследования.

Introduction. Solid-phase extraction (SPE) is one of the modern methods for isolating toxicologically significant substances from biological materials, which include narcotic and medicinal substances, as well as their metabolites.

There is a number of scientific works describing the SPE on the basis of mixed-phase cartridges from *Bond Elut Certify*, *Clean Screen DAU*, *Isolute Confirm HCX* for sample preparation of blood or its components (serum, plasma) for the purpose of the analysis of narcotic and medicinal substances [1–5]. Earlier, we studied the use of mixed-phase cartridges *SampliQ EVIDEX* (C8 and cation exchange) for screening drugs and narcotic substances in whole and post mortem blood using the method of gas chromatography and mass spectrometry [6–8].

Currently, the market has a large number of proposals for SPE cartridges from various manufacturers. The choice of a suitable cartridge for SPE both in terms of qualitative characteristics and price parameters is a topical issue in the course of chemical-toxicological and forensic chemical analysis.

There is an opinion that there may be significant differences in various substances on cartridges for SPE from batch to batch and from manufacturer to manufacturer [9].

The **aim** of the research is to evaluate and compare the effectiveness of medicinal and narcotic substances's extraction from blood for *widespread* mixed-phase cartridges of some brands, which are intended for solid-phase extraction.

Materials and methods. Equipment.

Gas chromatograph *Agilent 7820* (capillary column HP-5MS, inner diameter 0.25 mm, length 30 m, thickness of film 0.25 μm);

Mass-selective detector *Agilent 5975 (Agilent, USA)*;

12 Position vacuum manifold (*Supelco*);

Low vacuum pump (*AIR CADET, USA*);

Thermal block PE-4030 (*Ekros, Russia*);

Single-channel vaporizer PE-2300;

Microshaker PE-2 (*Ekros, Russia*);

Semi-automatic dispensers with 4–40, 40–200 μl and 0.2–1, 1–5 ml range;

Mixed-phase cartridges for SPE based on silica gel (Table 1). The characteristics are: the surface area is 500 m^2/g , the pore size is 60–70 \AA , the particle size is 40–60 μm .

Materials. Salicylic acid (GF XIII, PS.2.1.0033.15), cocaine hydrochloride (HP X, PS 167), isoniazid (GP X, PS 357), morphine hydrochloride (FS 413, GF X), amphetamine sulfate (GF X, PS 513), phenobarbital (GF XIII, PS.2.1.0041.15), Relanium (ampoules, 2 ml with diazepam 5 mg/ml, Polfa, Poland), methindole (ampoules, 2 ml with indomethacin 30 mg/ml, Polfa, Poland), ketorolac tromethamine (Chemo Iberika SA, Spain), enalapril (tablets, 5 mg, Hemofarm, Serbia), amitriptyline (ampoules, 2 ml with amitriptyline hydrochloride 10 mg/ml, ZENTIVA, Czech Republic). Benzoylcegonine and eegonin were prepared from cocaine hydrochloride according to the publication [10].

Table 1 – Information on cartridges for solid-phase extraction

Cartridge (type)	Brand (model)	Manufacturer	Weight, mg	Volume, ml	Relative price
EVIDEX	SampliQ	Agilent	200	3	1.0
Screen-C	Strata	Fenomenex	200	3	0.62
Certify	Bond Elut	Varian	200	3	1.82
Verify CX	Hyper Sep	Thermo Scientific	200	6	1.91
Drug	Chromabond	Macherey-Nagel	200	3	1.33
C8/SCX	Starlab	Starlab Scientific Co., Ltd	200	3	No data

2,2,3,3,3-Pentafluoro-1-propanol (*Sigma-ALDRICH CHEMI*, Germany), methyl iodide (Vecton, Russia).

Buffer solution: 1/15 M phosphate buffer (pH 4.8).

Organic solvents: 95% ethanol (hp), 99.6 % methanol (hp), ethyl acetate (h), dichloromethane (hp), hexane (hp), propanol-2 (hp).

Other reagents: acetic acid ice (GF XII), ammonia solution concentrated 25% (GF XII), helium (bhp), nitrogen (bhp).

Alcohol solutions of standards (№1, №2, №3, №4) contained:

№1 – indomethacin 0.1 mg/ml, ketorolac 0.02 mg/ml, salicylic acid 0.1 mg/ml, phenobarbital 0.2 mg/ml;

№2 – amitriptyline 0.02 mg/ml, amphetamine 0.02 mg/ml, diazepam 0.02 mg/ml, morphine 0.01 mg/ml, enalapril 0.0008 mg/ml;

№3 – isoniazid 0.06 mg/ml;

№4 – cocaine hydrochloride 0.01 mg/ml, benzoylecgonine 0.01 mg/ml, ecgonine hydrochloride 0.005 mg/ml.

Before the investigation intact blood was stored at -18°C .

Screening of drugs and narcotic substances in blood with the use of methods of solid-phase extraction and gas chromatography with mass-selective detection

For a comparative study of cartridges from different manufacturers, we used the optimized technique published in [8].

Sample preparation. 0.5 ml of blood was put into the vial. Then 50 μl of standard solutions (№1, №2, №3, №4), 2 μl of 1/15 M of phosphate (pH 4.8) buffer were added. Vials were sealed and placed in an ultrasonic bath for 5 minutes, then the contents of the vials were centrifuged for 15 minutes at 3000 rpm. The resulting centrifugate was separated from the precipitate.

The solid-phase extraction procedure

Conditioning of sorbent. 2 ml of 95% ethanol, 2 ml of 1/15 M phosphate buffer (pH 4.8) were sequentially passed through the cartridge.

After that the cartridge was loaded with the sample and passed at the speed of 1 ml/min. Flushing of cartridge was performed at a flow rate of 2–3 ml/min, sequentially adding 1 ml of 1/15 M phosphate buffer (pH 4.8) and 1 ml of 10% ethanol. Drying of cartridge was carried out in vacuum for 20 minutes.

Obtaining Eluate I. Eluate I is derived via double transfer of 2 ml of n-hexane – ethylacetate (2:1) concoction through the cartridge.

Obtaining Eluate II. Eluate II is derived via double transfer of 2 ml of dichloromethane – propan-2-ol – 25% ammonia (2:1:0.1) concoction.

To evaluate the extraction efficiency, 50 μl of a spirituous solution of 1 mg/ml of dinonyl phthalate (DNP) were added to eluates I and II.

Eluates I and II were vaporized in nitrogen flow at 40°C .

Derivatization and research

Methylation. 500 μl of anhydrous acetone, 40 μl of iodomethane and 20–25 mg of anhydrous potassium carbonate were added to dry residue of Eluate I, the vial was corked up and heated at 60°C for 60 minutes in the thermal block. The vial was then cooled down, the fluid fraction of the reactive concoction was separated and transferred into a clean vial, then vaporized in nitrogen flow at 20°C . The dry residue was dissolved in 100 μl of anhydrous ethylacetate and 1 μl of this solution was put into chromatomass-spectrometer's injector.

Acetylation and esterification

Step 1 (acetylation). 40 μl of anhydrous pyridine and 60 μl of acetic anhydride (washing the walls of the vial) were added to the dry residue of eluate II, the vial was sealed tightly and incubated at 80°C for 30 minutes. After cooling down the vial was opened and the surplus reagents were vaporized in nitrogen flow at $\leq 40^{\circ}\text{C}$.

Step 2 (esterification). 20 μl of 2,2,3,3,3-pentafluoro-1-propanol and 60 μl of acetic anhydride (washing the walls of the vial) were added to the dry residue, the vial was sealed tightly and incubated for 30 minutes at 60°C . After cooling, the vial was opened and redundant reagents were evaporated in a stream of nitrogen (up to 40°C). The dry residue was dissolved in 100 μl of anhydrous ethylacetate and 1 μl of this solution was put into chromatomass-spectrometer's injector.

The mode of operation of gas chromatograph with a mass-selective detector. The speed of flow of the carrier gas (helium) passing the column was 1.5 ml/min, the operation mode was split/splitless (the flow-splitting was 20:1, with the impulse delay of 1 minute after the sample injection). The temperatures of the injection port and the line connecting to the mass spectrometer were 250° and 280°C , respectively. The initial temperature of the column was 70°C for 2 minutes; then the column was heated up to 280°C at the rate of 20 degrees/min. and kept at the final temperature for 12.5 minutes.

The voltage of the multiplier of the mass-spectrometric detector was set at 200 V higher than that obtained in the automatic routine adjustment of the detector. The registration of the mass spectrum for acetyl and methyl derivatives in full ion scanning mode was in the mass range of 42–450 a.u.

Processing of chromatograms in order to identify the

components of the samples was done using ChemStation G1701DA и AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST) software.

Results and discussion. For the research, 5 types of cartridges from well-known brands, as well as Starlab C8 / SCX cartridges offered as their counterparts, were used. All types of cartridges contain “granular” sorbents based on silica gel with a mixed phase type: “reverse” (octyl-, C8) and phenylsulphonic acid (cationite, SCX).

The cartridges Starlab C8/SCX of the investigated

batches had signs of using poor-quality sorbent in the production. This conclusion conditioned by “flushing” of the vaccinated phase, as well as chemical pollution caused by the technological process of sorbent production. The artifacts of the C8 phase were observed in both eluates (Fig. 1–3), imidazole was determined in Eluate II (Fig. 3, 4). Based on the foregoing, Starlab C8 / SCX cartridges were not used in the future study. It should also be noted that we did not observe similar quality problems for the remaining 5 types of cartridges.

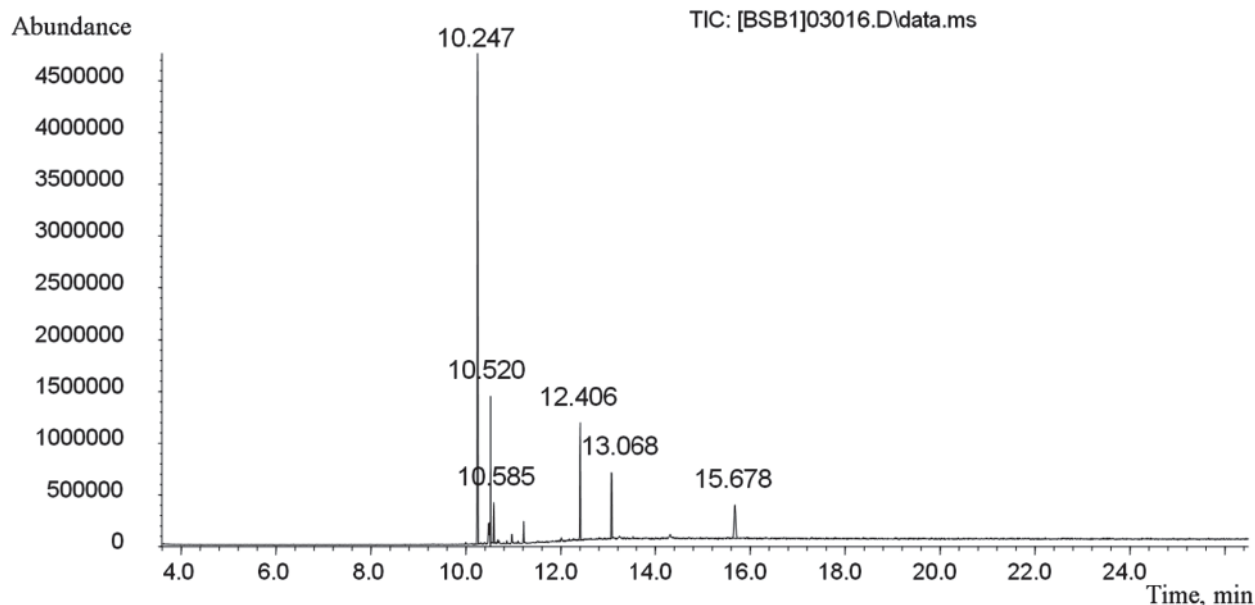


Figure 1 – Chromatogram. A study of the eluate I obtained on the Starlab C8 / SCX cartridge

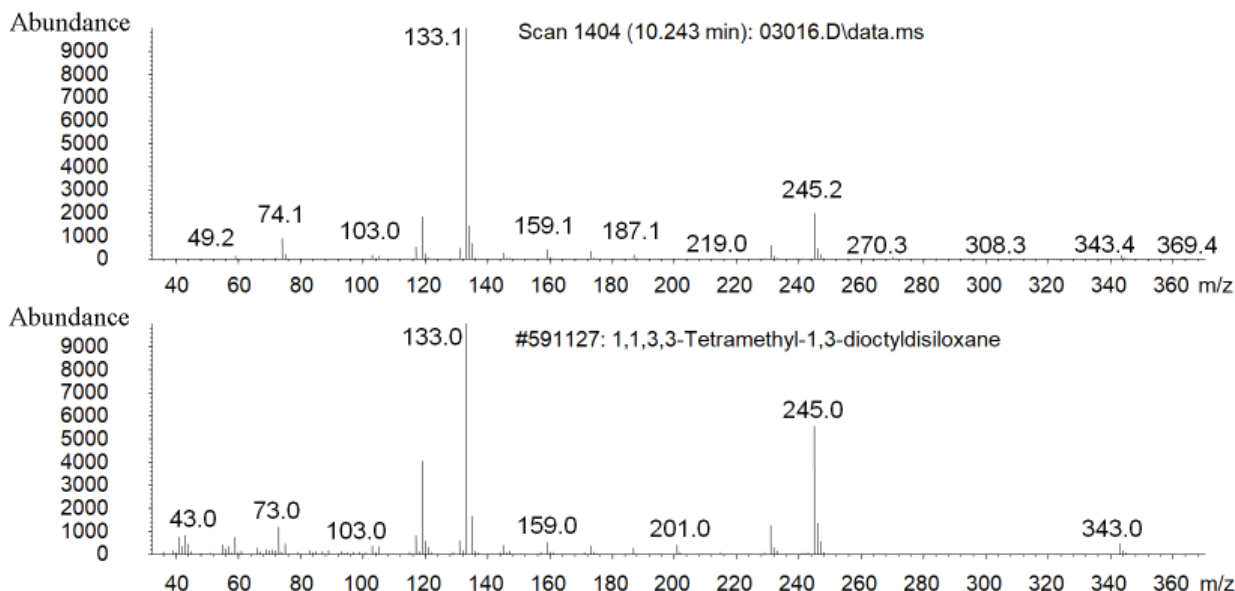


Figure 2 – Fragment of the extraction chromatogram according to the ions, characteristic for the mass spectrum of 1,1,3,3-tetramethyl-1,3-dioctyl disiloxane (A). Comparison of the mass spectrum of the peak with the retention time of 10.25 min with the library mass spectrum of the spectrum of 1,1,3,3-tetramethyl-1,3-dioctyl disiloxane (B)

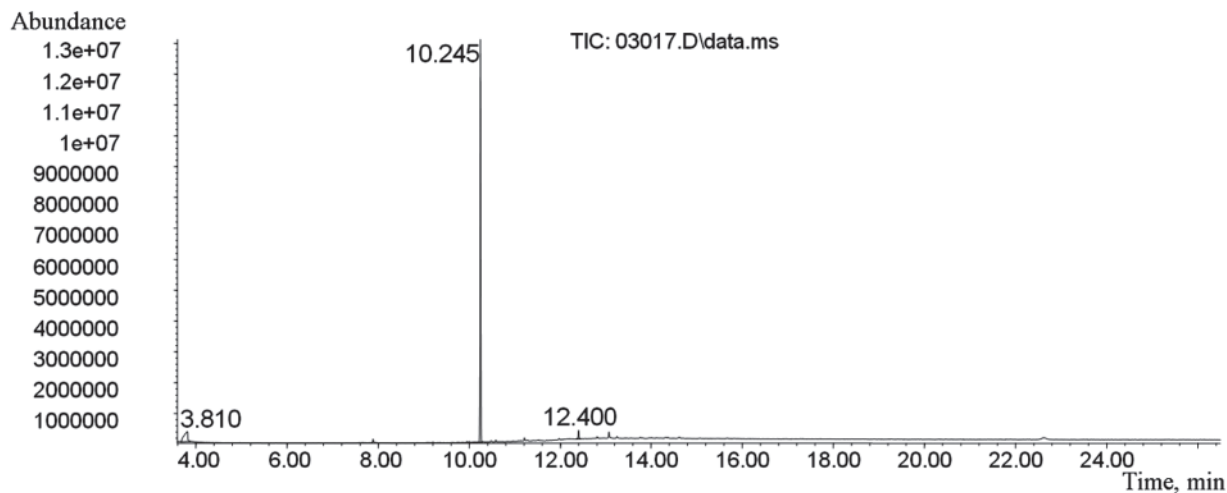


Figure 3 – Chromatogram. A study of eluate II obtained on the Starlab C8 / SCX cartridge

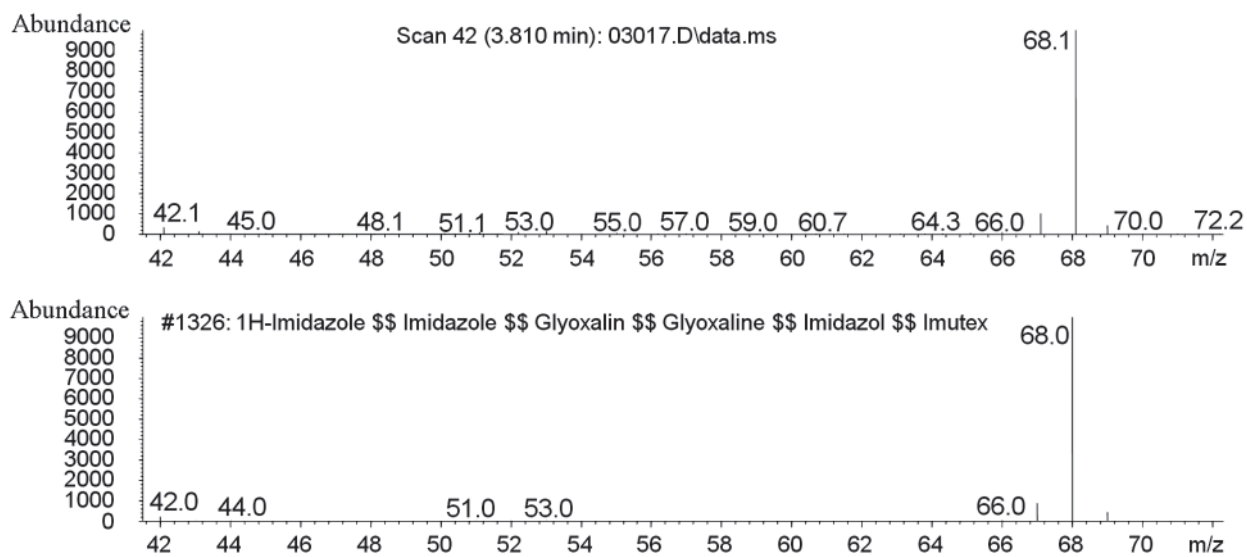


Figure 4 – Fragment of the extraction chromatogram according to the ions characteristic for the mass spectrum of imidazole (A). Comparison of the peak mass spectrum with the retention time 3.81 min with the library mass spectrum of the imidazole spectrum (B)

Table 2 shows the results of the extraction efficiency evaluation (EE) of model compounds from the blood.

Table 2 – Results of the evaluation of the extraction efficiency of model compounds ($n = 6$, mean values \pm S.D., %)

Compound	Evidex SampliQ (Aqilent)		Strata Screen-C (Phenomenex)		Bond Elut Certify (Varian)		HyperSep Verify-CX (Thermo)		Chromabond Drug (Macherey-Nagel)	
	Eluate I	Eluate II	Eluate I	Eluate II	Eluate I	Eluate II	Eluate I	Eluate II	Eluate I	Eluate II
Salicylic acid	0.82 (91)	n.d.	traces	n.d.	traces	n.d.	0.02 (90)	n.d.	n.d.	n.d.
Phenobarbital	88 (8.6)	n.d.	81 (4.6)	n.d.	81 (3.5)	n.d.	79 (9.0)	n.d.	84 (2.6)	n.d.
Ketorolac	27 (13)	n.d.	30 (49)	n.d.	12 (90)	n.d.	7.0 (53)	n.d.	14 (98)	n.d.
Diazepam	61 (9.9)	n.d.	60 (23)	n.d.	55 (4.2)	0.91 (99)	60 (6.4)	2.4 (58)	68 (2.5)	1.7 (56)
Indomethacin	101 (5.2)	n.d.	106 (3.6)	n.d.	97 (1.6)	n.d.	100 (4.0)	n.d.	105 (2.7)	n.d.
Ecgonine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Amphetamine	n.d.	93 (4.5)	n.d.	104 (20)	n.d.	98 (1.4)	n.d.	90 (12)	n.d.	97 (2.2)
Isoniazid	n.d.	0.69 (33)	n.d.	1.1 (30)	n.d.	0.58 (36)	n.d.	0.79 (22)	n.d.	0.69 (23)
Benzoyllecgonine	n.d.	48 (9.5)	n.d.	78 (3.3)	n.d.	68 (15)	n.d.	38 (10)	n.d.	58 (24)
Amitriptyline	n.d.	53 (14)	n.d.	71 (26)	n.d.	82 (6.6)	n.d.	69 (14)	n.d.	90 (5.8)
Cocaine	n.d.	79 (6.4)	n.d.	84 (5.6)	n.d.	85 (4.3)	n.d.	78 (15)	n.d.	102 (1.6)
Morphine	n.d.	24 (19)	n.d.	9.1 (55)	n.d.	10 (40)	n.d.	6.1 (33)	n.d.	8.0 (20)
Enalapril	n.d.	78 (10)	n.d.	56 (14)	n.d.	74 (10)	n.d.	70 (11)	n.d.	85 (3.7)

n.d. – not detected

As can be seen from the obtained data, salicylic acid is not found in the SPE procedure when using cartridges of *Chromabond Drug* (*Macherey-Nagel*). A low EE of ketorolac with high deviation values was observed for cartridges from *Bond Elut Certify* (*Varian*), *Verify-CX* (*Thermo*) and *Chromabond Drug* (*Macherey-Nagel*). For benzoylecgonine and amitriptyline, the lowest EE was observed with the use of cartridges from *EVIDEX SampliQ* (*Aqilent*) and *Verify-CX* (*Thermo*).

The *Verify-CX* (*Thermo*) cartridges were slightly different by geometric parameters from the other cartridges examined (they had a volume of 6 ml, and not 3 as the others), the last condition, to a certain degree, could affect the results obtained.

It is also necessary to note the following: during the TFE procedure for a number of samples, some cartridges had problems with passing the sample through the cartridge, which is obviously related to the “blocking” of the pores of the frits. Such problems were observed for cartridges from *Bond Elut Certify* (*Varian*), *Chromabond Drug* (*Macherey-Nagel*) and *Strata Screen-C* (*Phenomenex*), but were not observed for cartridges of 2 marks: *EVIDEX SampliQ* (*Aqilent*) and *HyperSep Verify-CX*

(*Thermo*). Thus, when using cartridges from *Bond Elut Certify*, *Chromabond Drug* and *Strata Screen-C*, attention should be paid to ensuring that the centrifuge is carefully selected, avoiding suspension and sediment.

Conclusion. The efficiency of the extraction of cartridges for SPE with a mixed phase from different manufacturers for the purposes of screening drugs and narcotic substances from blood was evaluated. Considering the foregoing, it can be affirmed that all the 5 types of cartridges can equally be used for the procedure of screening drugs and narcotic substances in blood.

Considering the relative cost of cartridges for SPE, in routine practice it is economically viable to use the cartridges from brands *Strata Screen-C* (*Phenomenex*) and *EVIDEX SampliQ* (*Aqilent*).

Considering the existing system of procurement, which makes a guaranteed purchase of a specific type of cartridges for SPE impossible, it is necessary to pay attention to the quality of the sorbents used in their production. Otherwise, “flushing” of the phase can lead to chemical contamination of the eluates, to the lack of reproducibility of the analysis and, as a result, to the receiving of biased results of the research.

Библиографический список

1. Chen X.H., Franke J.P., Wijsbeek J., de Zeeuw R.A. Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column // *J Anal Toxicol*. 1992. Vol. 16. Is. 6. P. 351–355. DOI:10.1093/jat/16.6.351
2. Chen X.H., Franke J.P., Wijsbeek J., de Zeeuw R.A. Study of lot-to-lot reproducibilities of Bond Elut Certify and Clean Screen DAU mixed-mode solid-phase extraction columns in the extraction of drugs from whole blood // *J Chromatogr*. 1993. Vol. 617. No. 1. P. 147–151. DOI:10.1016/0378-4347(93)80434-6
3. Lai C.K., Lee T., Au K.M., Chan A.Y. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection // *Clin Chem*. 1997. Vol. 43. No. 2. P. 312–325.
4. Rittner M., Pragst F., Bork W.R., Neumann J. Screening method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry // *J Anal Toxicol*. 2001. Vol. 25. No. 2. P. 115–124. DOI:10.1093/jat/25.2.115
5. Takeda A., Tanaka H., Shinohara T., Ohtake I. Systematic analysis of acid, neutral and basic drugs in horse plasma by combination of solid-phase extraction, non-aqueous partitioning and gas chromatography-mass spectrometry // *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001. Vol. 758. Is. 2. P. 235–248. DOI:10.1016/S0378-4347(01)00189-X
6. Катаев С.С., Дворская О.Н. Применение твердофазной экстракции в исследовании крови на наркотические и лекарственные вещества // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2012. Т. 55. №4. С. 38–42.
7. Дворская О.Н., Крохин И.П., Катаев С.С. Опыт применения твердофазной экстракции в скрининге лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // *Химико-фармацевтический журнал*. 2017. Т. 51. № 3. С. 36–40. DOI:10.1007/s11094-017-1585-4
8. Катаев С.С., Дворская О.Н., Крохин И.П. Оптимизация процедуры твердофазной экстракции для скрининга лекарственных и наркотических веществ в крови методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2017. Т. 60. №1. С. 29–35. DOI:10.1017/116/sudmed201760129-35
9. Bogusz M.J., Maier R.D., Schiwy-Bochat K.H., Kohls U. Applicability of various brands of mixed-phase extraction columns for opiate extraction from blood and serum // *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1996. Vol. 683. Is. 2. P. 177–188. DOI: 10.1016/0378-4347(96)00120-X
10. Casale J.F., Piñero E.L. Quantitation of Cocaine by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection Utilizing Isopropylcocaine as a Structurally Related Internal Standard // *Microgram Journal*. 2006. Vol. 4. No. 1–4. P. 47–53.

References

1. Chen XH, Franke JP, Wijsbeek J, de Zeeuw RA. Isolation of acidic, neutral, and basic drugs from whole blood using a single mixed-mode solid-phase extraction column. *J Anal Toxicol.* 1992 Nov-Dec; 16(6):351–5. DOI:10.1093/jat/16.6.351
2. Chen XH, Franke JP, Wijsbeek J, de Zeeuw RA. Study of lot-to-lot reproducibilities of Bond Elut Certify and Clean Screen DAU mixed-mode solid-phase extraction columns in the extraction of drugs from whole blood. *J Chromatogr.* 1993 Jul 23; 617(1):147–51. DOI:10.1016/0378-4347(93)80434-6
3. Lai CK, Lee T, Au KM, Chan AY. Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. *Clin Chem.* 1997 Feb;43(2):312–25.
4. Rittner M, Pragst F, Bork WR, Neumann J. Screening method for seventy psychoactive drugs or drug metabolites in serum based on high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2001 Mar; 25(2):115–24. DOI:10.1093/jat/25.2.115
5. Takeda A, Tanaka H, Shinohara T, Ohtake I. Systematic analysis of acid, neutral and basic drugs in horse plasma by combination of solid-phase extraction, non-aqueous partitioning and gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001 Jul 15;758(2):235–48. DOI:10.1016/S0378-4347(01)00189-X
6. Kataev S.S., Dvorskaya O.N. Primenenie tverdogaznoj ekstrakcii v issledovanii krovi na narkoticheskie i lekarstvennyye veshchestva [The application of the solid phase extraction technique to the analysis of blood for the presence of narcotic and pharmaceutical substances]. *Sudebno-medicinskaya ekspertiza.* 2012 Jul–Aug; 55(4):38–42. Russian.
7. Dvorskaya O.N., Krokhin I.P., Kataev S.S. Opyt primeneniya tverdogaznoj ekstrakcii v skrininge lekarstvennyh i narkoticheskikh veshchestv v krovi metodom gazovoj hromatografii s mass-spektrmetricheskim detektirovaniem [Experience in the use of solid-phase extraction in the screening of pharmaceuticals and narcotics in the blood by gas chromatography with mass spectrometric detection]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 2017; 51(3):216–21. DOI: 10.1007/s11094-017-1585-4. Russian.
8. Kataev SS, Dvorskaya ON, Krokhin IP. Optimizaciya procedury tverdogaznoj ekstrakcii dlya skrininga lekarstvennyh i narkoticheskikh veshchestv v krovi metodom gazovoj hromatografii s mass-spektrmetricheskim detektirovaniem [Optimization of the solid-phase extraction procedure for the screening of the medicinal and narcotic substances in the blood by gas chromatography with mass-spectrometric detection]. *Sudebno-medicinskaya ekspertiza.* 2017; 60(1):29–35. DOI: 10.17116/sudmed201760129-35. Russian.
9. Bogusz MJ, Maier RD, Schiwy-Bochat KH, Kohls U. Applicability of various brands of mixed-phase extraction columns for opiate extraction from blood and serum. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1996; 683(2):177–88. DOI: 10.1016/0378-4347(96)00120-X
10. Piñero EL, Casale JF. Quantitation of Cocaine by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection Utilizing Isopropylcocaine as a Structurally Related Internal Standard. *Microgram Journal.* 2006;4(1–4):47–53.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Катаев Сергей Сергеевич – кандидат химических наук, заведующий судебно-химическим отделением ПКБСМЭ, ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». Область научных интересов: исследования в области судебно-химического и химико-токсикологического анализа. E-mail: forenschemist@narod.ru

Дворская Оксана Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии, ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Область научных интересов: исследования в области судебно-химического и химико-токсикологического анализа, проблемы злоупотребления лекарственными препаратами. E-mail: dvoksnik@gmail.com

Kataev Sergei Sergeevich – PhD (Chemistry), Chief of the forensic-chemistry division, State healthcare establishment of special type “Perm regional bureau of forensic-medical expertise”. Research interests: forensic-chemical and chemical toxicological analysis of drugs and narcotic substances, screening of drugs and narcotic substances, their identification and quantification in biological material, processes of metabolism of designer drugs in the human body and identification of their markers in biological objects of human body. E-mail: forenschemist@narod.ru

Dvorskaya Oksana Nikolaevna – PhD (Pharmacy), Assistant professor of chair of toxicological chemistry, Perm State Pharmaceutical Academy. Research interests: forensic-chemical and chemical toxicological analysis of drugs and narcotic substances, screening of drugs and narcotic substances, their identification and quantification in biological material, the problem of drug abuse. E-mail: dvoksnik@gmail.com

Поступила в редакцию: 02.10.2017
Отправлена на доработку 11.11.2017
Принята к печати: 15.11.2017

Received: 02.10.2017
Sent back for revision: 11.11.2017
Accepted for publication: 15.11.2017