

## Anwendbarkeit der Festphasenextraktion mit abselut<sup>®</sup> NEXUS - Kartuschen für toxikologisches Screening

---

Maciej J. Bogusz, Rolf-Dieter Maier und Klaus-Dieter Krüger

---

*Institut für Rechtsmedizin der RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, D-52057 Aachen*

### Abstract

New kind of solid phase extraction (SPE) has been recently introduced by Varian Sample Preparation Products under the name abselut<sup>™</sup>. These cartridges, filled with a new sorbent NEXUS, were claimed to isolate acidic, neutral and basic drugs from biological fluids in one analytical run. Moreover, the activation (wetting) step was omitted.

The purpose of this study was to check the applicability of abselut<sup>™</sup> -NEXUS cartridges for the isolation of basic drugs in wide polarity range (amphetamine, MDMA, MDE, codeine, morphine, cocaine, benzoylecgonine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide, codeine-6-glucuronide) as well as of acidic drugs of low and middle polarity (tetrahydrocannabinol and THC-carboxylic acid). All drugs were extracted from serum with abselut<sup>™</sup> NEXUS cartridges and with routinely used SPE (Bond Elut C18 cartridges) as control procedures. All basic drugs were determined with LC-MS (atmospheric pressure chemical ionization), the cannabinoids with GC-MS.

The analytical recovery of basic drugs of low and middle polarity (amphetamine, MDMA, MDE, codeine, morphine, cocaine, benzoylecgonine) was similar for abselut<sup>™</sup> and Bond Elut cartridges. However, the polar opiate glucuronides were not extracted by abselut<sup>™</sup> cartridges at all, whilst were very well extracted by Bond Elut cartridges. Cannabinoids were extracted with abselut<sup>™</sup> cartridges to some extent (similar as with the SPE procedure used for basic drugs), but the recovery was too low for demanded sensitivity.

This study did not confirm the statement of the manufacturer concerning an universal application of abselut<sup>™</sup> - NEXUS SPE columns.

### Einleitung

Die simultane Isolierung saurer und basischer, toxikologisch relevanter Stoffe aus biologischem Material kann einen wichtiger Fortschritt bei der Probenvorbereitung bedeuten. Die praktischen Aspekte einer solchen Prozedur sind sofort zu erkennen, zumal die Ergänzung des § 24 StVG sowohl saure (THC) als auch basische (Morphin, Benzoylecgonin, Amphetamin, MDMA, MDE) Substanzen erwähnt [1]. In der letzten Zeit hat die Firma Varian Sample Preparation Products (Varian GmbH, Alsfelder Straße 6, 64289 Darmstadt) ein neues SPE-Sorbens entwickelt, das - laut den Unterlagen des Herstellers - eine solche Eigenschaft verspricht. Dieses Sorbens - unter dem Namen NEXUS (Nonconditioned **EX**traction - **U**niversal **S**orbent) ist in abselut<sup>™</sup> - Kartuschen (**a**cidic-**b**asic-**s**creen-**e**lut) kommerziell erhältlich.

Die abselut<sup>™</sup> - Kartuschen sollen saure, neutrale und basische Stoffe in einem breiten Polariitätsbereich quantitativ isolieren. Die Extraktionsprozedur wurde vereinfacht, da eine Aktivierung des Sorbens nicht mehr notwendig ist. Die Prozedur, NC-SPE genannt (Non-Conditioned Solid Phase **EX**traktion) weist nur drei Stufen auf: Probenapplikation, Spülung mit Wasser und Elution mit Methanol.

Ziel dieser Studie war die Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit der NC-SPE. Als Testsubstanzen wurden drei Gruppen toxikologisch relevanter Stoffe ausgewählt:

- basische Stoffe niedriger und mittlerer Polarität ( Amphetamin, MDMA, MDE, Codein, Morphin, Cocain und Benzoylcegonin)
- basische Stoffe von hoher Polarität (Morphin-3-Glucuronid = M3G, Morphin-6-Glucuronid = M6G, Codein-6-Glucuronid = C6G)
- saure Stoffe von niedrigen und mittleren Polarität (Tetrahydrocannabinol = THC) und THC-Carbonsäure = THC-COOH).

Die Ergebnisse der Bestimmungen nach der Isolierung mit abselut™ - Kartuschen wurden mit den Ergebnissen verglichen, die nach den von uns routinemäßig eingesetzten SPE-Prozeduren erhalten wurden.

## Material

### 1. Festphasenextraktionssäulen

NC-SPE: abselut™ - Kartuschen (30 mg/1 ml und 60 mg/3 ml, Varian GmbH)

SPE für basische und saure Stoffe: BondElut C18 - Kartuschen (200 mg/3ml, Varian GmbH)

### 2. Reagenzien

Amphetamin, MDMA, MDE, Codein, Morphin, Cocain, Benzoylcegonin (BE), THC und THC-COOH - Fa. Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen).

Amphetamin-d<sub>11</sub>, MDMA-d<sub>5</sub>, MDE-d<sub>7</sub>, Cocain-d<sub>8</sub>, BE-d<sub>8</sub> - Fa. High Standard Product Corporation (Inglewood, CA)

Codein-d<sub>6</sub>, Morphin-d<sub>3</sub>, THC-d<sub>6</sub> und THC-COOH-d<sub>10</sub> - Fa. Radian (Promochem GmbH, Weisel).

M3G, M6G, C6G, M3G-d<sub>3</sub>, M6G-d<sub>3</sub>, C6G-d<sub>3</sub> - Fa. Lipomed (Arlesheim, Schweiz).

### 3. Probenmaterial

Folgende Serumproben wurden untersucht:

- Kontrollserum BTMF2/98 (enthält nominell folgende Substanzkonzentrationen (ng/ml): Amphetamin 59.8, BE 138.9, Cocain 68.3, Codein 46.8, Morphin 27.4, MDE 103.0, MDMA 128.1, THC 9.2, THC-COOH 13.6)
- Serum gespiked mit Amphetamin, BE, Cocain, Codein, Morphin, MDE, MDMA (je 50 ng/ml)
- Serum gespiked mit M3G, M6G und C6G (je 250 ng/ml)

## Methoden

### 1. Festphasenextraktion

Die eingesetzten Extraktionsmethoden sind schematisch in der Tabelle 1 dargestellt. Die Einzelheiten und die Effizienz der SPE für basische Stoffe [2-6] sowie für saure Stoffe [7] wurden veröffentlicht. In der Pilotphase wurden abselut™ Kartuschen 30 mg (1ml) in einer manuellen Prozedur eingesetzt. Es wurde festgestellt, daß die Durchflußrate des Elutionsmittels bei den Kartuschen sehr unterschiedlich war. Dies äußerte sich in der großen Varianz der

Substanzausbeuten. Deshalb wurden alle Extraktionen für basische Stoffe automatisch durchgeführt, unter Verwendung des ASPEC-Extraktors (Gilson) und abselut™ Kartuschen 60 mg (3ml). Für die automatische Extraktion basischer Substanzen mit BondElut-Kartuschen wurde das bereits beschriebene Verfahren eingesetzt [8]. Alle Serumproben wurden vor der Extraktion mit einer Mischung von deuterierten Analoga als interne Standards versetzt.

**Tab. 1** Extraktionsprozeduren

	NC-SPE abselut <sup>®</sup>	SPE - basische Stoffe	SPE - saure Stoffe
<b>Konditionierung</b>	-	1 ml MeOH, 2 ml AMF	3 ml MeOH, 3 ml H <sub>2</sub> O
<b>Probenapplikation</b>	1 ml abzentrifugiertes Serum	2 ml Mischung: Serum 1 ml + AMF 2 ml	1 ml abzentrifugiertes Serum
<b>Spülung</b>	1 ml H <sub>2</sub> O, Vakuum	2 ml AMF, Vakuum	3 ml H <sub>2</sub> O, 3 ml 0.25M CH <sub>3</sub> COOH, 3 ml H <sub>2</sub> O
<b>Elution</b>	1 ml Methanol	1 ml Methanol/CH <sub>3</sub> COOH 0.5 M (9:1)	3 x 0.5 ml Aceton

Es wurden zwei Serien von Extraktionen durchgeführt. In beiden Serien wurden je drei Serumproben mit den obengenannten Extraktionsmethoden untersucht.

## 2. LC-APCI-MS

Für die basischen Stoffe niedriger und mittlerer Polarität (Amphetamin, MDMA, MDE, Codein, Morphin, Cocain und BE) erfolgte eine Gradientenelution in Acetonitril (ACN)-Ammoniumformiatpuffer (AMF) pH 3.0, 50 mM. Gradientenprofil: 2 min in 10% ACN, in 10 min bis 25% ACN, 7 min bei 25% ACN, Flußrate 0.6 ml/min, Säule Superspher RP18 3mmx125 mm. Die LC-MS-Analyse erfolgte unter Einsatz des SSQ 7000 Massenspektrometers (Finnigan MAT, San Jose, CA) im APCI modus (positive Ionen). Dazu wurde eine "time scheduled" SIM-Prozedur geschrieben, bei der die Molekülionen der Substanzen und deren deuterierter Analoga mit folgenden Ionen registriert wurden (zeitliche Reihenfolge): m/z 136, 147, 286, 289, 300, 306, 194, 199, 208, 215, 290, 298, 304, 312.

Die basischen Stoffe hoher Polarität (M3G, M6G, C6G) wurden isokratisch in ACN – AMF (10:90) mit einer Flußrate von 0.4 ml/min auf der gleichen Säule getrennt. Für die APCI-MS Analyse im SIM-Modus wurden folgende Ionen registriert: m/z 286, 289, 462, 465 (für Morphin-Glucuronide sowie deren Aglycone und deuterierter Analoga) und m/z 476, 479 (für Codein-6-Glucuronid und deuteriertes Analogon).

## 3. GC-MS

Die sauren Substanzen (THCCOOH, THC) wurden nach Derivatisierung (Methylierung nach Möller, Dörr [7]) gaschromatographisch/massenspektrometrisch quantifiziert. GC: Carlo Erba MFC500 - Säule: Optima 1 (Fa. Macherey-Nagel, 52313 Düren), 10m x 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm – Trägergas: Helium 1ml/min – Temperaturprogramm: 170°C – 270°C 10°/min.

Sektorfeldmassenspektrometer: Kratos MS25 im EI-Modus. Es wurden folgende Ionen im SIM-Modus detektiert: m/z 382, 372, 334, 328.

## Ergebnisse und Diskussion

### 1. *Basische Stoffe niedriger und mittlerer Polarität*

Die Peakflächen der Substanzen und deren interner Standards aus absolut-Extrakten waren mit denen aus Bond-Elut-Extrakten etwa gleich (Tab.2, Abb.1A und 1B). Somit kann gesagt werden, daß sich die SPE mit absolut™ -Kartuschen für die Isolierung basischer Stoffe niedriger und mittlerer Polarität gut eignet.

**Tab. 2** Vergleich der Peakflächen und Quotienten: Probe/IS für basische Stoffe

	Absolut /Bond-Elut %	Absolut St/IS	Bond-Elut St/IS
Amphetamin	92	0.76	0.78
MDMA	83	2.68	2.62
MDE	97	2.35	2.03
Morphin	129	1.45	1.59
Codein	141	3.57	3.56
BE	114	4.48	4.34
Cocain	98	2.21	2.14

**Abb. 1:** Chromatogramme der protonierten Molekülonen (m/z: 136 Amphetamin, 194 MDMA, 208 MDE, 286 Morphin, 290 BE, 300 Codein, 304 Cocain) nach Extraktion mit absolut™ (A) bzw. Bond-Elut (B)

### 1. *Basische Stoffe mit hoher Polarität*

Nach der SPE mit absolut™-Kartuschen wurden lediglich nicht meßbare Spuren von Opiat-Glucuroniden feststellbar (Abb.2A.) Diese Stoffe wurden dagegen mit Bond-Elut Säulchen sehr gut isoliert (Abb.2B). Es ist somit offensichtlich, daß eine Isolierung basischer Stoffe hoher Polarität - wie z.B. Opiatglucuronide - mit absolut™-Kartuschen nicht möglich ist.

**Abb. 2:** Chromatogramme der protonierten Molekülonen (m/z: 286 Morphin, 289 Morphin-d<sub>3</sub>, 462 M3G und M6G, 465 M3G-d<sub>3</sub> bzw. M6G-d<sub>3</sub>, 476 Codein-6-G, 479 Codein-6-G-d<sub>3</sub>) nach Extraktion mit absolut™ (A) bzw. Bond-Elut (B)

### 2. *Saure Stoffe niedriger und mittlerer Polarität*

Die Extraktion saurer Substanzen niedriger (THC) und mittlerer (THC-COOH) Polarität wurden mit drei unterschiedlichen Methoden überprüft:

- a) absolut™-Kartuschen
- b) Bond-Elut Kartuschen nach der Methode, die für die Extraktion basischer Substanzen eingesetzt wird

c) der gebräuchlichen Methode für die SPE von Cannabinoiden [7].

Die letzte Methode diente als Referenz. Es ergibt sich, daß sowohl die Extraktion mit absolut™-Kartuschen, als auch die SPE für basische Stoffe (c) vergleichbare Ausbeuten für THC und THC-COOH liefern. Die relative Ausbeute (im Vergleich zum Referenzverfahren) ergab für THC ca. 33%, für THC-COOH ca. 20%. Die Peakflächenquotienten Standard/IS waren für jede Methode sehr unterschiedlich (Tab.3, Abb.3).

Die Information des Herstellers einer universellen Anwendbarkeit der absolut™-Kartuschen hat sich nicht bestätigt. Die Ausbeuten mit den beschriebenen Verfahren war deutlich schlechter als bei der bisher üblichen Extraktionsmethode nach Möller/Dörr/Warth. Es zeigte sich, daß die für basische Stoffe angewandte Extraktionsvariante ähnliche Ergebnisse wie die absolut™-Extraktion lieferte.

**Tab. 3** Vergleich der Peakflächen der 3 überprüften Extraktionsvarianten

	Absolut /Referenz %	Absolut St/IS	Bond-Elut /Referenz %	Bond-Elut St/IS	Referenz St/IS
THC	33	0.20	32	0.25	0.91
THC-COOH	23	1.42	17	2.34	1.88

**Abb. 3:**

Chromatogramme der Molekülionen (Methylderivate) von THC und THC-COOH sowie der deuterierten Analoga nach Extraktion mit absolut™ (A), mit Bond-Elut nach der Methode für Extraktion basischer Substanzen (B) und Referenzmethode für Cannabinoid-Extraktion (C).

### Zusammenfassung

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß die Festphasenextraktion mit absolut™-Kartuschen sich für die Isolierung gängiger *basischer* Stoffe gut eignet. Eine befriedigende Isolierung von Cannabinoiden gelang nicht; polare Opiat-Glucuronide waren mit diesen Kartuschen praktisch nicht extrahierbar. Der in dem Namen "absolut" enthaltene Hinweis einer simultanen universellen Extraktion (**a**cidic-**b**asic-**s**creen-**e**lut) hat sich nicht bestätigt.

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei der Firma Varian Deutschland (Frau Elisabeth Korte) für die kostenlose Bereitstellung von absolut™-Kartuschen .

### Literatur

- [1] Änderung des § 24a des Straßenverkehrsgesetzes und Bericht der Grenzwertkommission. *Toxichem + Krimtech* 65 (1998) 71.
- [2] M.J.Bogusz, R.D.Maier, S.Driessen: Morphine, morphine-3-glucuronide, morphine-6-glucuronide and 6-monoacetylmorphine determined by means of atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry - liquid chromatography in body fluids of heroin victims. *J.Anal.Toxicol.* 21 (1997) 346.
- [3] M.J.Bogusz, R.D.Maier, M.Erkens, S.Driessen: Determination of morphine and its 3- and 6-glucuronides, codeine, codeine-6-glucuronide and 6-monoacetylmorphine in body fluids by liquid chromatographic atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Chromatogr.Biomed.Appl.* 703 (1997) 115.
- [4] M.J.Bogusz, R.D.Maier, K.D.Krüger, U.Kohls: Determination of common drugs of abuse in body fluids using one isolation procedure and liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J.Anal.Toxicol.* 22, (1998) 549.
- [5] M.J.Bogusz, R.D.Maier, K.D.Krüger, W.Früchtnicht: Determination of flunitrazepam and its metabolites in blood by means of liquid chromatograph-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J.Chromatogr.B* 713 (1998) 36.
- [6] M.J.Bogusz, K.D.Krüger, R.D.Maier: Analysis of underivatized amphetamines and related phenethylamines with high-performance liquid chromatography -atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J.Anal.Toxicol.* – im Druck 1999.
- [7] M.R.Möller, G. Dörr, S.Warth: Simultaneous quantitation of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in serum by GC/MS using deuterated internal standards and its application to a smoking study and forensic cases. *J.Forensic Sci.* 37 (1992) 969.
- [8] R.D.Maier, K.D.Krüger, M.J.Bogusz: ASPEC (Automated Sample Preparation by Extraction Cartridges) in der forensisch toxikologischen Analytik. *Toxichem + Krimtech* 65 (1998) 47.

## **Neue synthetische Drogen: Piperazin-, Propicyclidin- und $\alpha$ -Aminopropiophenonderivate**