

## STABILITY OF COCAINE IN PHOSPHATE BUFFER AND IN URINE\*

Marianna KISZKA, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

*Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin*

**ABSTRACT:** The stability of cocaine and benzoylecgonine standard solutions in phosphate buffer and cocaine solutions in three different samples of urine was evaluated. The research indicated that cocaine solution is significantly less stable than benzoylecgonine solution. Both xenobiotics were isolated from urine by means of three-step liquid-liquid extraction. Quantitative analysis was performed using the HPLC method. The effect of time (up to 90 days), temperature (+25°C, +4°C and -20°C), pH (in the range from 5 to 8) and, in the case of urine, sodium fluoride as well, was tested. It turned out that sodium fluoride did not have a noticeable influence on the degradation process of cocaine and benzoylecgonine. The stability of cocaine and benzoylecgonine increased with a decrease in samples storage temperature and a decrease in their pH. But only the freezing of samples, or their acidifying down to pH = 5 together with storage at +4°C assured the stability of the investigated cocaine and benzoylecgonine solutions for 90 days.

**KEY WORDS:** Cocaine; Benzoylecgonine; Stability; Autopsy material; Urine.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIV, 2000, 7–23*

*Received 9 July 2000; accepted 10 October 2000*

### INTRODUCTION

The mean life-time of cocaine in the body amounts to merely 20–90 minutes [8, 10, 12, 14, 19, 20]. Only 1 to 14% of this xenobiotic is excreted as the unchanged form with urine [8, 14]. The remaining part of cocaine is converted mainly to benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, which comprise over 80% of all cocaine metabolites [1, 2, 4, 5]. The above-mentioned transformations consist mainly in enzymatic (to ecgonine methyl ester) or chemical (to benzoylecgonine) hydrolysis of two ester bonds included in the cocaine molecule [8, 18].

---

\* This article is based on a presentation given at the 11th Meeting of the Polish Society of Forensic Medicine and Criminology, Łódź, 1998. The first author, dr Marianna Kiszka, received the Professors Jan Markiewicz and Tadeusz Borkowski of the Institute of Forensic Research Memorial Award.

The enzymatic and chemical processes that lead to degradation of cocaine in the body of living persons are continued after death and in biological material collected during autopsy and from living persons. The hydrolysis of cocaine to benzoylecgonine depends considerably on pH [9]. This is confirmed by our observations<sup>1</sup>, indicating that in aqueous medium at pH between 8.5 and 9 after 1–6 hours approximately 1/10 to over 1/3 of the initial amount of cocaine is excreted to benzoylecgonine. One should keep in mind the dependence of the cocaine degradation rate on pH, because gradual pH changes of biological material take place with time in corpses as well as *in vitro* [16].

There is no doubt that for diagnostic needs of fatal and other cocaine poisonings it is important to find out exactly the transformations which it undergoes *in vitro*. This knowledge is essential to appropriately protect biological or standard materials against degradation of cocaine and benzoylecgonine, to avoid xenobiotics loss during toxicological analysis and correctly interpret the results. Cocaine stability was tested in urine because its pH varies and also because in the case of living persons it is the only biological material which can be obtained non-invasively and in sufficient amounts for toxicological investigations.

#### MATERIALS AND METHODS

Standard solutions of cocaine and benzoylecgonine were prepared using three phosphate buffers with different pH (5.0, 7.4 and 8.0). Phosphate buffer was applied because it is used as a mobile phase in determination of these xenobiotics by means of the HPLC method. Three samples of urine were collected from three different corpses. Each sample was divided into 3 portions and their pH was adjusted to 5.0, 6.0 and 8.0 respectively, with the use of 0.1 M HCl solution and 0.1 M NaOH solution.

In the next step of urine preparation for analysis, each of the nine samples was divided into 2 parts and sodium fluoride NaF (in the amount required to reach a concentration of 5 mg/ml) was added to one of them.

Next, each buffer and each of the eighteen urine samples were divided into two parts. Cocaine was added to one part of each buffer solution and benzoylecgonine in the amount required to create a concentration of 5 µg/ml was added to the other one. In the case of urine, cocaine (in the amount re-

---

<sup>1</sup> Mądro R., Kiszka M., Buszewicz G., Fatal cocaine poisoning – a presentation at the 4th Polish Scientific Conference “Poisonings, injuries, alcoholism and drug addiction in forensic and medical practice”, Bielsko-Biała, 27–28 April, 1995.

quired to obtain a concentration of 5 µg/ml) was added to one half of the eighteen samples and the other one was left as the background control.

The initial concentration of cocaine and benzoylecgonine, which was assumed as 100%, was determined directly after preparation of their solutions in phosphate buffers and in urine. After determination of initial xenobiotics concentrations, their solutions were divided and put into tubes which were stored at different temperatures, +25°C, +4°C and –20°C respectively. The samples were collected for analysis after 1, 7, 14, 21, 30, 60 and 90 days in the case of cocaine and benzoylecgonine solutions in buffers and after 1, 7, 30, 60 and 90 days in the case of cocaine solutions in urine.

Xenobiotics were isolated from urine by means of three-step liquid-liquid extraction with the use of dichloromethane / isopropanol mixture (3:1), 0.1 N HCl and once again dichloromethane / isopropanol mixture (3:1)<sup>2</sup>.

Quantitative determinations were carried out by means of the HPLC method using a liquid chromatograph manufactured by Gilson equipped with a spectrophotometric detector with fluent adjustment of wavelength. Chromatographic separation was performed on a Hypersil ODS (250 x 4.0 mm, 5 µm) column. A mixture of 80% 0.025 M phosphate buffer, pH = 3 (with addition of 0.5% triethylamine) and 20% acetonitrile constituted the mobile phase, in a two-pump system. Before each use, the buffer and acetonitrile were filtered on Nylon 66 Membranes 0.45 µm x 47 mm purchased by Supelco and vented by constant helium flow. The flow rate of the eluent amounted to 1 ml per minute and the volume of the injected sample – 10 µl. The measurements were carried out at  $\lambda = 233$  nm. The detector signal was processed electronically using Gilson 715 HPLC System Controller Software. Concentrations of cocaine and benzoylecgonine were determined from the appropriate calibration curves using Gilson 715 HPLC System software. The internal standard method (with use of lignocaine) was applied in the case of urine investigations and the external standard method was used in the case of buffer solutions analysis<sup>3</sup>.

Diagrams of solution preparation and storage are shown in Figures 1 and 2.

132 samples of cocaine and benzoylecgonine solutions in phosphate buffers and 558 urine samples were analysed.

<sup>2</sup> The procedure was shown in detail at the presentation: Kiszka M., Buszewicz G, Mađro R., Determination of cocaine and benzoylecgonine in urine, 14th Szczecin Scientific Symposium, Szczecin, 24–26 September, 1997.

<sup>3</sup> The analytical procedures of cocaine and benzoylecgonine determination were presented in detail at the presentation: Kiszka M., Mađro R., Buszewicz G., Analytical problems connected with cocaine determination in tissues, 11th Meeting of the Polish Society of Forensic Medicine and Criminology, Łódź, 2–5 September, 1998.

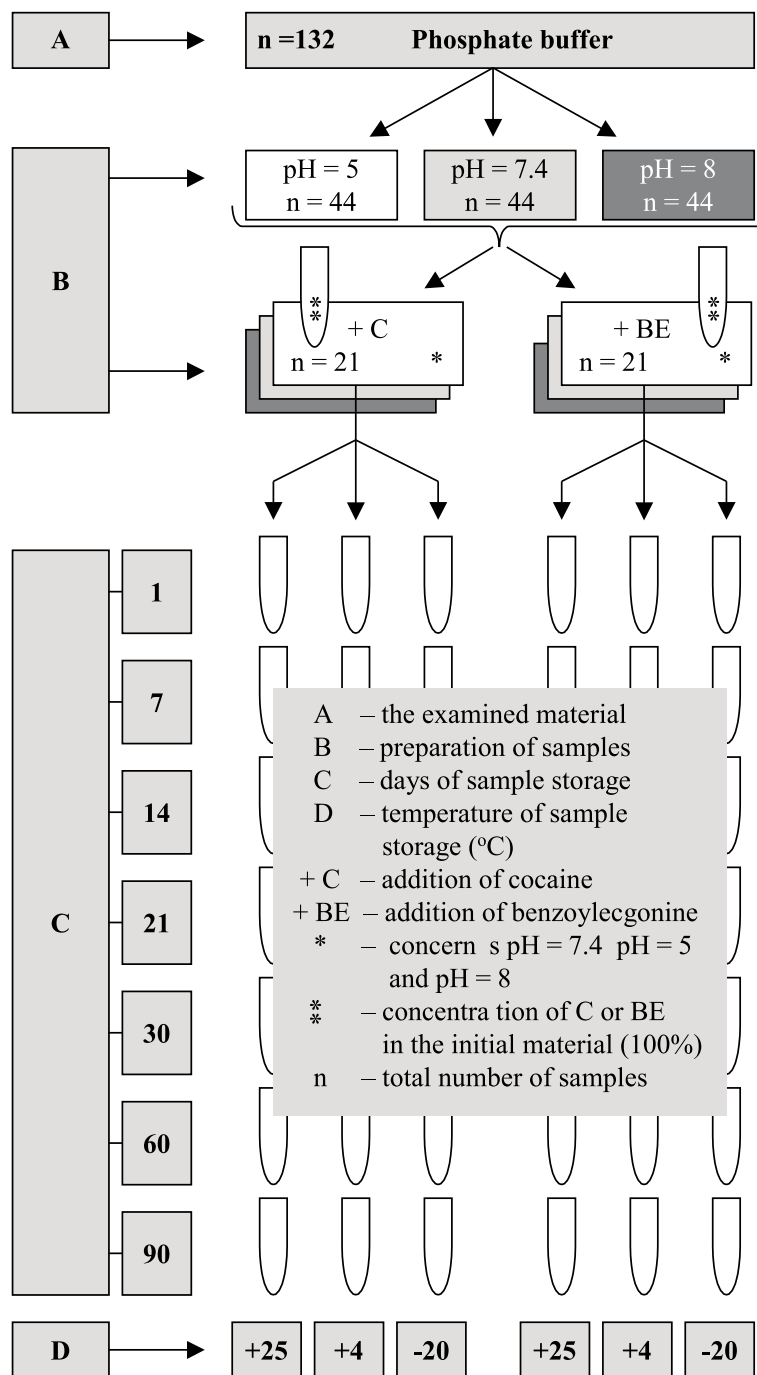


Figure 1. A diagram of preparation and storage of cocaine and benzoylecgonine in buffer solutions.

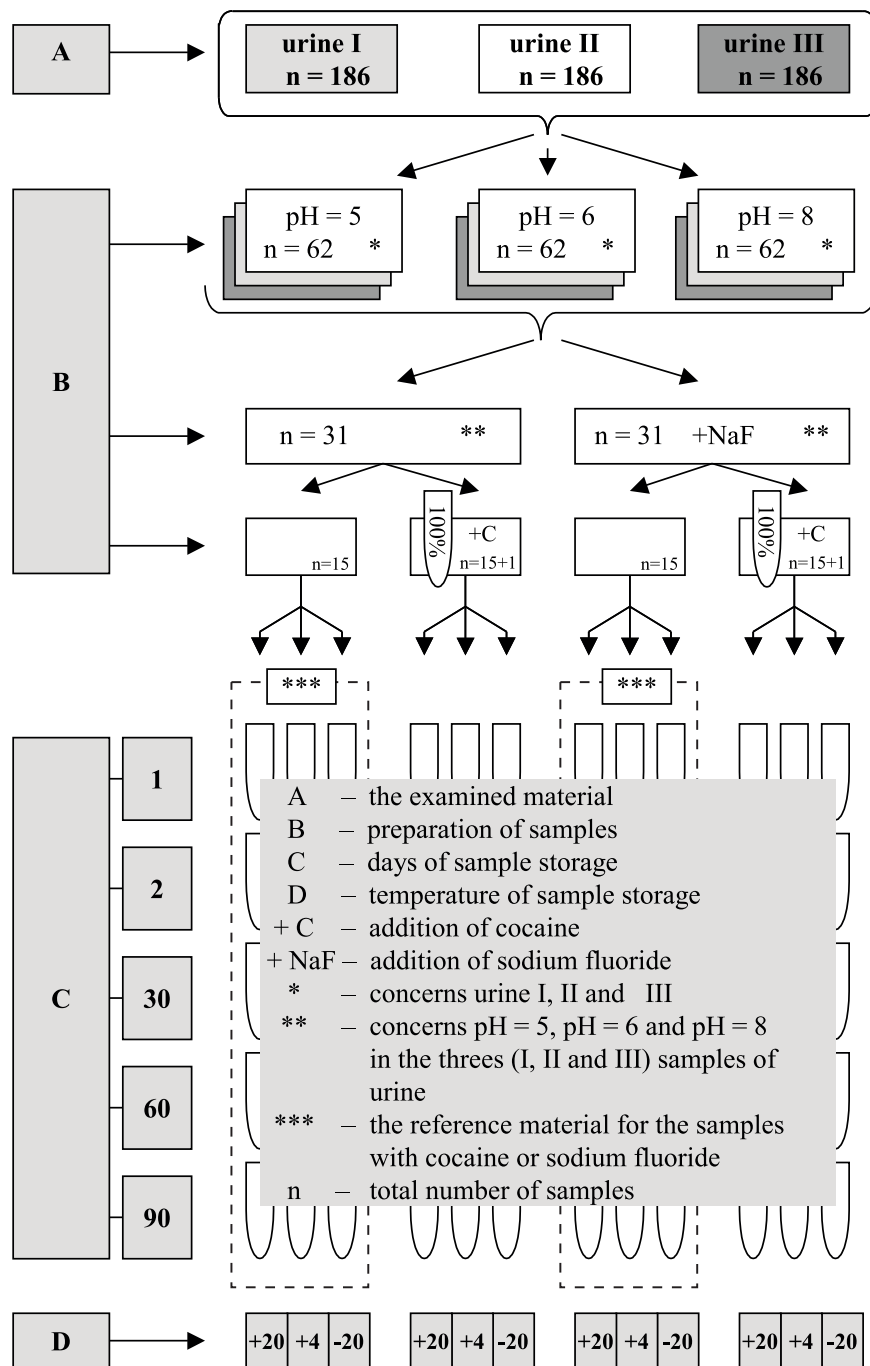


Figure 2. A diagram of preparation and storage of urine samples.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results of the study were displayed in the form of stability curves, i.e., graphs of the relationship between the concentration of cocaine or benzoylecgonine (expressed as percentages of initial concentration), and the storage time of samples at different pH and temperature. Figure 3 concerns cocaine and benzoylecgonine solutions in phosphate buffers and Figure 4 – cocaine in urine. Good and moderate stability periods of cocaine in buffer and in urine according to sample pH and storage temperature are shown in Table 1. Stability was assumed to be good when cocaine loss was smaller than 15% and moderate when it was between 15 and 30%.

TABLE 1. PERCENTAGES OF MEAN COCAINE LOSS (L) IN PHOSPHATE BUFFER AND URINE

Temperature		25°C					4°C				
Days		1	7	30	60	90	1	7	30	60	90
Buffer	pH = 5	2	4	5	7	14	0	1	2	3	8
	pH = 7.4	13	75	100	100	100	0	10	33	51	61
	pH = 8	45	86	100	100	100	5	34	53	70	86
Urine	pH = 5	2	3	9	23	76	0	0	3	2	11
	pH = 6	1	6	66	100	100	1	1	4	10	33
	pH = 8	49	84	100	100	100	12	37	63	84	100

Stable (L < 15%)
  Moderately stable (L < 30%)
  Unstable (L > 30%)

From the stability curves shown in Figure 3, it is clear that significant loss of both xenobiotics was not detected during storage of cocaine and benzoylecgonine acidic standard solutions (phosphate buffer pH = 5) for 90 days, even when the samples temperature was +25°C. The cocaine and benzoylecgonine solutions also turned out to be stable at –20°C (regardless of their pH). However, analysis of samples at pH = 7.4 and 8.0 stored at +4°C and +25°C indicated that an increase in storage temperature and in pH caused a loss of cocaine as well as benzoylecgonine. The decrease of cocaine concentration in standard solution was connected with adequate growth of metabolite (benzoylecgonine) concentration.

The influence of pH on stability of cocaine was particularly clear during storage of solutions at +4°C. At pH = 7.4 loss of cocaine was not observed over one day and it amounted to only 10% after one week. But a small increase of

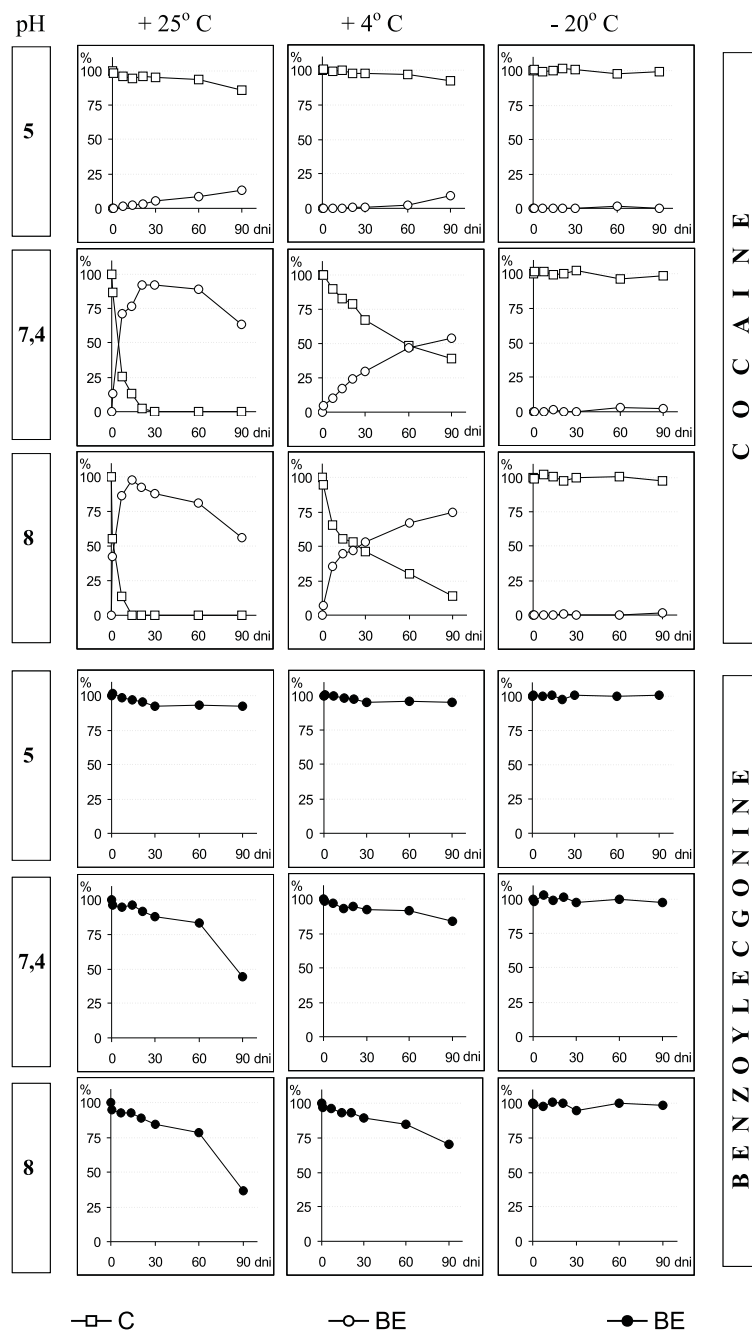


Figure 3. The stability of cocaine (C) and benzoylecgonine (BE) in standard solutions according to storage periods (days), temperature and pH of phosphate buffers.

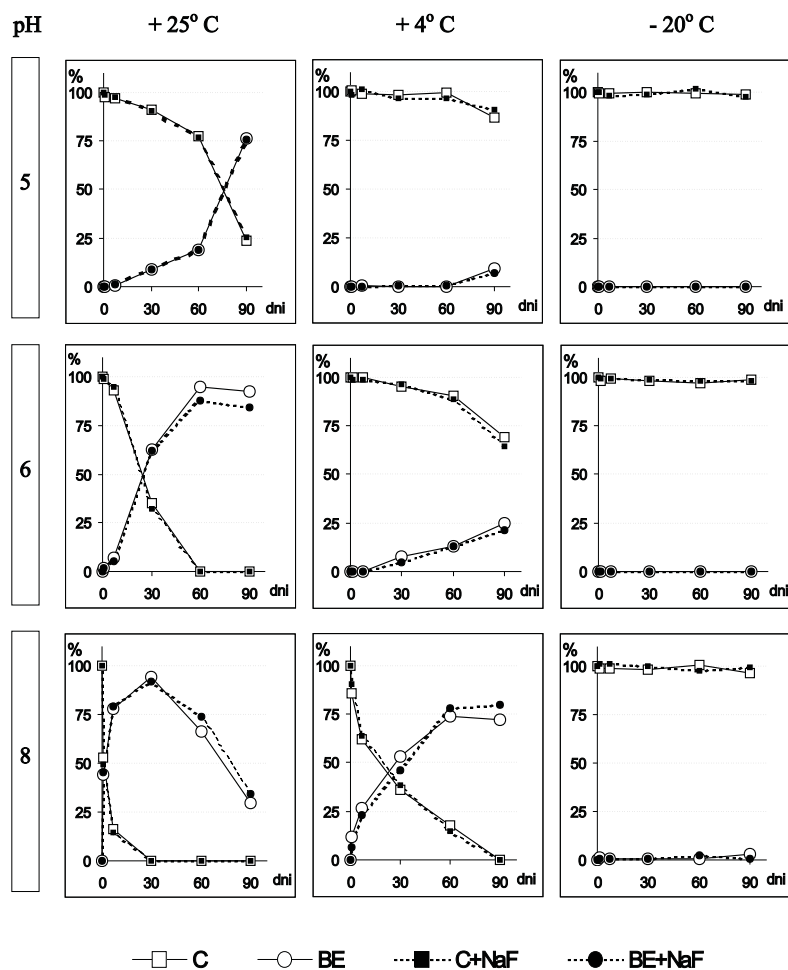


Figure 4. The stability of cocaine (C) in urine (expressed in per cents, calculated as the mean value of 3 urine samples) according to temperature and storage periods (days), pH of urine and NaF addition.

the buffer pH (up to 8) caused approximately 2 to 3 times greater loss of cocaine.

Cocaine stability in standard solutions decreased greatly at +25°C. At pH = 7.4, about 10% of the initial cocaine concentration had already decomposed within one day. The loss level averaged 75% after 7 days and cocaine was totally decomposed after 3 weeks.



On the other hand, the benzoylecgonine standard solutions were much more stable. After 2 months of their storage at +25°C only about 1/5 of the initial xenobiotic concentration had decomposed both at pH 7.4 and 8.

Other authors [9, 13] have observed a similar influence of temperature and pH on cocaine hydrolysis in aqueous solutions. There is a lack of data in the available literature concerning benzoylecgonine stability at different pH. However, in a study by Isenschmid [13], longer stability of benzoylecgonine (the hydrolysis product of cocaine) in alkaline buffers is seen (compared to cocaine). Similar trends were observed in (our) described experiment. Cocaine decomposed to benzoylecgonine and over a relatively long period of time (about 60 days), especially in the weakly alkaline solutions (pH = 7.4) the sum of the concentrations of both substances was comparable to the initial cocaine concentration. However, buffer alkalinity decreased benzoylecgonine stability – this was particularly clear in samples stored at +25°C.

The freezing of urine samples similar to standard solutions guaranteed the stability of cocaine over 90 days, regardless of pH. Dugan et al. [6] ascertained good stability of drugs in urine samples frozen to –20°C, but even in these conditions, the cocaine concentration decreased after one year by 37% on average and maximally 87%.

It turned out that the shapes of cocaine stability curves in urine and in buffers at identical or similar pH's were similar. But it has to be noted that in room temperature a change of the pH from 5 to 6, i.e. a small decrease of acidity caused a considerable decrease of cocaine stability. Thus the acidity of the urine did not stabilise cocaine as effectively as the acidity of the buffer. Satisfactory cocaine stability was ascertained only in urine samples at pH = 5 stored in a refrigerator at +4°C – under these conditions cocaine did not undergo significant degradation in the space of 90 days. In the case of urine samples stored at 25°C, acidity (pH = 5) ensured sufficient cocaine stability only for 60 days.

The alkalinity of urine was conducive to faster degradation of cocaine. In samples of pH = 8 stored at +4°C after just 1 day, cocaine loss averaged 12% and after 7 days – 37%. When samples were stored at +25°C it averaged 49% and 84% respectively. Moreover, an increase of benzoylecgonine concentration, (as was the case in acidic buffers and acidic urine), was observed simultaneously.

The experimentally demonstrated increased speed of cocaine degradation in urine with increase of pH from acidic to alkaline fully confirmed the results of Baselt's research [3]. He ascertained an approximately two-fold decline of cocaine concentration in urine at pH = 8 (after 3 weeks of storage at +4°C), and no significant changes in the cocaine level in urine at pH = 5 stored at this temperature. Our observations are also similar to the findings of Dugan et al. [7]. However, we found a definitely slower cocaine hydrolysis

at +25°C in acidic urine. The observed cocaine loss was only about 10% after 30 days, while Dugan ascertained as much as a 10-fold decline of cocaine concentration after 7 days of urine storage in the same conditions.

Because about 23% of cocaine was lost from urine at pH = 5 stored at +25°C after 60 days, and as much as about 76% after 90 days, the view of Hippenstiel and Gerson [11] should be rejected. These authors deliberate, on the basis of Isenschmid's investigation [13], the usefulness of refrigeration of urine at this acidity. It should be noted that Isenschmid performed determinations of cocaine in buffers, where it is more stable than in urine. Moreover, the research was finished after 4 weeks, while urine storage up to the beginning of analysis and during the time analysis is performed is very often much longer.

The findings of this experiment that cocaine degradation in urine at different pH was intensified with increase in temperature of sample storage are similar to the observations of Javaid et al. [15] and Matsubara et al. [17]. The statement that addition of NaF as a preservative in the amount of 5 mg/ml does not significantly affect cocaine stability in urine at pH = 5, 6 and 8 during storage from 1 to 90 days at +4°C and at +25°C, was in full agreement with the observations of other authors [3, 17].

## CONCLUSIONS

1. Cocaine is degraded to benzoylecgonine in standard solutions as well as in urine samples.
2. Because benzoylecgonine is much more stable in biological material, it should be determined in the case of suspicion of cocaine poisoning.
3. Immediate freezing prevents the degradation of cocaine contained in standard solutions and urine samples.
4. When the investigated material can be stored only at +4°C, satisfactory cocaine stability for 90 days is ensured by acidifying of urine samples to pH = 5.
5. Storage of urine at pH = 5 and at +25°C longer than 60 days creates a risk of significant degradation of cocaine present in the sample.

## References:

1. Ambre J., Fischman M., Ruo T. I., Urinary excretion of ecgonine methyl ester, a major metabolite of cocaine in humans, [in:] Cocaine: determination in human body fluids. Reprints of selected articles from the Journal of Analytical Toxicology, Baselt R. C., Espe E. [ed.], Preston Publications, Niles 1988, pp. 79–81.

2. 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. [ed.], Preston Publications, Niles 1988, pp. 99–103.
3. Baselt R. C., Stability of cocaine in biological fluids, *Journal of Chromatography* 1983, vol. 268, pp. 502–505.
4. Bogusz M., Schmidt G., Cocain-Missbrauch – Neue Bedrohung mit der alten Substanz, *Zeitschrift für Rechtsmedizin* 1991, Bd. 35, S. 783–793.
5. Clarke E. G. C., Isolation and identification of drugs in pharmaceutical, body fluids and post-mortem material, The Pharmaceutical Press, London 1986.
6. Dugan S., Bogema S., Schwartz R. W. [et al.], Stability of drugs of abuse in urine samples stored at –20°C, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 391–396.
7. Dugan S. H., Costantino A. G., Bogema S. C. [et al.], A study of the stability of cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, creatinine, and other chemistries in urine, *Journal of Analytical Toxicology* 1996, vol. 20, p. 74.
8. Fleming J. A., Byck R., Barash P. G., Pharmacology and therapeutic applications of cocaine, *Anesthesiology* 1990, vol. 73, pp. 518–531.
9. Fletcher S. M., Hancock V. S., Potential errors in benzoylecgonine and cocaine analysis, *Journal of Chromatography* 1981, vol. 206, pp. 193–195.
10. Gawin F. H., Ellinwood E. H., Cocaine and other stimulants. Actions, abuse, and treatment, *New England Journal of Medicine* 1988, vol. 318, pp. 1173–1182.
11. Hippenstiel M. J., Gerson B., Optimization of storage conditions for cocaine and benzoylecgonine in urine: a review, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 104–109.
12. Isenschmid D. S., Fischman M. W., Foltin L. W. [et al.], Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, vol. 16, pp. 311–314.
13. Isenschmid D. S., Levine B. S., Caplan Y. H., A comprehensive study of the stability of cocaine and metabolites, *Journal of Analytical Toxicology* 1989, vol. 13, pp. 250–256.
14. Iten P. X., Fahren unter Drogen- oder Medikamenteneinfluss. Forensische Interpretation und Begutachtung, Institut für Rechtsmedizin Forensische Toxikologie Universität, Zurich 1994.
15. Javaid J. I., Dekirmenijan H., Davis J. M. [et al.], Determination of cocaine in human urine, plasma and red blood cell by gas-liquid chromatography, *Journal of Chromatography* 1978, vol. 152, pp. 105–113.
16. Markiewicz J., Swoistość sądowych badań chemiczno-toksykologicznych, *Z zagadnień kryminalistyki* 1971, z. VI, s. 22–29.
17. Matsubara K., Maseda C., Fukui Y., Quantitation of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester by GC-CI-SIM after Extrelut extraction, *Forensic Science International* 1984, vol. 26, pp. 181–192.
18. Stewart D. J., Inaba T., Lucassen M. [et al.], Cocaine metabolism: cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1979, vol. 25, pp. 464–468.

19. Weiss R. D., Gawin H. F., Protracted elimination of cocaine metabolites in long-term, high-dose cocaine abusers, *American Journal of Medicine* 1988, vol. 85, pp. 879–880.
20. Wilkinson P., Van Dyke C., Jatlow P. [et al.], Intranasal and oral cocaine kinetics, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1980, vol. 27, pp. 386–394.

## TRWAŁOŚĆ KOKAINY W BUFORZE FOSFORANOWYM I W MOCZU\*

Marianna KISZKA, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MĄDRO

### WSTĘP

Średni czas półtrwania kokainy (C) w organizmie wynosi zaledwie 20–90 min [8, 10, 12, 14, 19, 20]. Tylko 1–14% tego ksenobiotyku wydalane jest w postaci niezmienionej z moczem [8, 14]. Pozostała część C przechodzi w benzoiliekgoninę (BE) i ester metylowy ekgoniny (EME), które stanowią ponad 80% wszystkich metabolitów C [1, 2, 4, 5]. Powyższe przemiany polegają głównie na hydrolizie enzymatycznej (do EME) lub chemicznej (do BE) dwu wiązań estrowych zawartych w cząsteczce C [8, 18].

Procesy enzymatyczne i chemiczne, które zażyciowo prowadzą do degradacji C, toczą się dalej w zwłokach oraz w materiale biologicznym pobieranym podczas sekcji i od osób żywych. Hydroliza C do BE zależy przy tym w znacznym stopniu od pH [9], co potwierdzają spostrzeżenia autorów<sup>1</sup>, z których wynika, że w wodnym środowisku o pH = 8,5–9 już po 1–6 godzinach rozkładowi do BE ulega w przybliżeniu od 1/10 do ponad 1/3 początkowej ilości C. Należy pamiętać o zależności tempa degradacji C od tego czynnika, bowiem wraz z upływem czasu następują stopniowe zmiany pH materiału biologicznego zarówno w zwłokach, jak i *in vitro* [16].

Nie ulega więc wątpliwości, że dla potrzeb diagnostyki śmiertelnych (i innych) zatruc C istotne znaczenie ma dokładne poznanie przemian, jakim podlega ona *in vitro*. Wiedza ta jest niezbędna po to, by odpowiednio zabezpieczyć materiał biologiczny (lub wzorcowy) przed degradacją C i BE oraz po to, by uniknąć strat ksenobiotyków podczas analizy toksykologicznej i prawidłowo zinterpretować jej wyniki. Natomiast rozpoczęcie testowania trwałości C w moczu było podyktowane tym, że jego pH waha się oraz tym, że w przypadku osób żywych jest to jedyny materiał biologiczny, który można uzyskać w sposób nieinwazyjny i w odpowiedniej ilości do badań toksykologicznych.

---

\* Niniejszy artykuł opracowany został na podstawie referatu pt. „Trwałość kokainy w materiale biologicznym”, który został uznany za najlepszą pracę przedstawioną podczas XI Krajowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii w Łodzi w 1998 roku, a jej pierwszy autor (dr Marianna Kiszka) otrzymała Nagrodę Imienia Profesorów Instytutu Ekspertyz Sądowych – Jana Markiewicza i Tadeusza Borkowskiego.

<sup>1</sup> Mądro R., Kiszka M., Buszewicz G., „Śmiertelne zatrucie kokainą” – referat wygłoszony na IV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Zatrucia, urazy, alkoholizm i narkomania w praktyce sądowo-lekarskiej”, Bielsko-Biała, 27–28 kwietnia 1995 r.

## MATERIAŁ I METODY

Roztwory wzorcowe C i BE wykonano z użyciem trzech buforów fosforanowych o różnym pH (5,0; 7,4; 8,0), co podyktowane było tym, że właśnie bufor fosforanowy jest stosowany (jako faza ruchoma) przy oznaczaniu tych ksenobiotyków metodą HPLC. Trzy próbki moczu pobrano z trzech różnych zwłok i każdą z nich podzielono na trzy porcje, których pH zmodyfikowano do 5,0; 6,0 i 8,0 dodając odpowiednie ilości 0,1 M roztworu HCl i 0,1 M roztworu NaOH.

W kolejnym etapie przygotowywania moczu do badań każdą z dziewięciu próbek podzielono na dwie części i do jednej dodano fluorek sodu NaF (w ilości potrzebnej do uzyskania stężenia 5 mg/ml). Następnie każdy bufor i każdą z osiemnastu próbek moczu podzielono na pół. Do jednej połowy każdego z buforów dodano C, a do drugiej BE w ilości odpowiedniej do uzyskania stężenia 5 µg/ml. Natomiast w przypadku moczu, do jednej połowy każdej z osiemnastu próbek dodano C (również w ilości odpowiedniej do uzyskania stężenia 5 µg/ml), a drugą połowę pozostawiono jako kontrolę „tła”.

Wyjściowe, przyjmowane następnie za 100%, stężenie C i BE oznaczano bezpośrednio po przygotowaniu ich roztworów w buforach fosforanowych i w moczu. Po oznaczeniu wyjściowych stężeń ksenobiotyków ich roztwory rozdzielono do probówek, które przechowywano w różnej temperaturze (+25°C, +4°C, -20°C) i pobierano do badań po 1, 7, 14, 21, 30, 60 i 90 dniach w przypadku roztworów C i BE w buforach oraz po 1, 7, 30, 60 i 90 dniach w przypadku roztworów C w moczu.

Ksenobiotyki z moczu wyosobniano metodą trój etapowej ekstrakcji typu ciec-z-ciecz przy użyciu mieszaniny dichlorometan / izopropanol (3:1), a następnie 0,1 NHCl i ponownie mieszaniną dichlorometan / izopropanol (3:1)<sup>2</sup>.

Analizę ilościową wykonywano metodą HPLC przy użyciu chromatografu cieczowego firmy Gilson z detektorem spektrofotometrycznym o płynnej regulacji długości fali. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Hypersil ODS (250 x 4,0 mm, 5 µm). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina: bufor fosforanowy 0,025 M, pH = 3 (z dodatkiem 0,5% trietylaminy) – acetonitryl w proporcjach 80:20 w systemie dwóch pomp. Przed każdym użyciem bufor oraz acetonitryl były filtrowane (Nylon 66 Membranes, 0,45 µm x 47 mm firmy Supelco), a następnie odpowietrzane przez ciągły przepływ helu. Prędkość przepływu eluentu wynosiła 1 ml/min., a objętość wstrzykiwanej próbki – 10 µl. Pomiar wykonywano przy długości fali  $\lambda = 233$  nm. Sygnał z detektora przetwarzany był elektronicznie z zastosowaniem oprogramowania Gilson 715 HPLC System Controller Software. Stężenia C i BE wyznaczano metodą standardu wewnętrznego (który w trakcie badania moczu stanowiła lidokaina) lub standardu zewnętrznego (w przypadku analizy roztworów buforowych) z odpowiednich krzywych kalibracji (oprogramowanie Gilson 715 HPLC System<sup>3</sup>). Schemat

<sup>2</sup> Metoda przedstawiona została szczegółowo na XIV Szczecińskim Sympozjum Naukowym, które odbyło się w dniach 24–26 września 1997 r., w referacie: Kiszka M., Buszewicz G, Mądro R., „Oznaczanie kokainy i benzoilokgoniny w moczu”.

<sup>3</sup> Procedury analityczne związane z oznaczaniem C i BE przedstawione zostały szczegółowo w trakcie XIX Krajowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii (Łódź, 2–5 września 1998 r.) w referacie: Kiszka M., Mądro R., Buszewicz G., „Problemy analityczne z oznaczeniem kokainy w tkankach”.

ty, zgodnie z którymi przygotowywano i przechowywano roztwory, przedstawiają ryciny 1 i 2.

Przebadano 132 próbki roztworów C i BE w buforach fosforanowych oraz 558 próbek moczu.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki badań przedstawiono w postaci krzywych trwałości (C i BE w buforach fosforanowych – rycina 3 oraz C w moczu – rycina 4), tj. wykresów zależności stężeń C lub BE (wyrażonych w procentach początkowego stężenia) od czasu przechowywania próbek o różnym pH w różnej temperaturze. Natomiast tabela I zawiera zestawienie okresów dobrej (ubytek C poniżej 15%) lub średniej (ubytek C w zakresie 15–30%) stabilności C w buforze i w moczu w zależności od pH próbek i temperatury, w jakiej były przechowywane.

Z krzywych trwałości, które przedstawia rycina 3, wynika jednoznacznie, że przez 90 dni przechowywania kwaśnych (bufor fosforanowy pH = 5) roztworów wzorcowych C i BE nie stwierdzono w nich znaczącego ubytku obu ksenobiotyków nawet wówczas, gdy temperatura próbek wynosiła +25°C. Roztwory C i BE okazały się trwałe (niezależnie od ich pH) również w temperaturze –20°C. Natomiast rezultaty analizy próbek o pH = 7,4 i 8 przechowywanych w temperaturze +4°C i +25°C wykazały, że wzrost temperatury oraz wzrost pH powodowały ubytek zarówno C, jak i BE. W roztworach wzorcowych kokainy jej ubytkowi towarzyszyło przy tym adekwatne narastanie stężenia produktu rozpadu, tj. BE.

Wpływ pH na stabilność C był szczególnie wyraźny w trakcie przechowywania roztworów w temperaturze +4°C. Przy pH = 7,4 po jednym dniu nie obserwowano bowiem strat C, a po jednym tygodniu wynosiły one zaledwie 10%, ale już niewielki wzrost pH buforu (do 8) powodował w przybliżeniu 2–3-krotnie większy ubytek C.

Stabilność C w roztworach wzorcowych obniżała się najbardziej w temperaturze +25°C. W roztworze o pH = 7,4 już po jednym dniu rozkładowi ulegało bowiem około 10% początkowego stężenia C, po siedmiu dniach poziom strat wynosił średnio 75%, a po trzech tygodniach dochodziło do całkowitego rozkładu C.

Natomiast roztwory wzorcowe BE były wielokrotnie bardziej stabilne, o czym świadczy fakt, że po 2 miesiącach ich przechowywania w temperaturze +25°C tylko około 1/5 początkowego stężenia ksenobiotyku ulegało degradacji zarówno przy pH = 7,4, jak i pH = 8.

Podobny wpływ temperatury i pH na hydrolizę C w jej wodnych roztworach był obserwowany przez innych autorów [9, 13]. W dostępnej literaturze brakuje natomiast danych na temat stabilności BE w roztworach o różnym pH. W pracy Isenschmida [13] widoczne jest jednak dłuższe (w porównaniu z C) utrzymywanie się BE będącej produktem hydrolizy substancji macierzystej w buforach alkalicznych. W opisanym eksperymencie obserwowano podobne tendencje. C rozkładała się bowiem do BE, przy czym przez dość długi czas (ok. 60 dni), zwłaszcza w roztworach słabo alkalicznych (pH = 7,4), suma stężeń obu substancji była zbliżona do wyjściowego stężenia C. Zasadowy odczyn buforu zmniejszał jednak trwałość BE, co było szczególnie wyraźne w próbkach przechowywanych w temperaturze +25°C.

Zamrożenie próbek moczu, podobnie jak zamrożenie próbek roztworów wzorcowych, gwarantowało trwałość C przez 90 dni niezależnie od pH. Z publikacji Dugana

i in. [6], którzy stwierdzali znaczną stabilność leków w próbkach moczu zamrożonych do  $-20^{\circ}\text{C}$ , wynika jednak, że nawet w tych warunkach po roku następowało obniżenie stężenia C średnio o 37%, a maksymalnie o 87%.

Okazało się, że krzywe trwałości C w moczu miały kształt dość zbliżony do krzywych trwałości C w buforach o identycznym lub zbliżonym pH. Zwraca jednak uwagę fakt, że w temperaturze pokojowej zmiana pH z 5 do 6 (tj. niewielkie obniżenie odczynu kwaśnego) powodowało znaczne zmniejszenie stabilności C. Zatem kwaśny odczyn nie stabilizował C w moczu tak skutecznie, jak kwaśny odczyn buforu. W pełni zadowalającą trwałość C stwierdzono bowiem tylko w próbkach moczu o pH = 5 przechowywanych w lodówce w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$ , gdyż wówczas nie ulegała ona znaczącemu rozkładowi przez 90 dni. Natomiast w przypadku próbek moczu przechowywanych w temperaturze  $+25^{\circ}\text{C}$  odczyn pH = 5 zapewniał wystarczającą stabilność C tylko przez 60 dni.

Zasadowy odczyn moczu sprzyjał szybkiej degradacji C. W próbkach o pH = 8 przechowywanych w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  już po 1 dniu straty C wynosiły średnio 12%, a po 7 dniach 37%, zaś w temperaturze  $+25^{\circ}\text{C}$  odpowiednio 49% i 84%. Obserwowano przy tym (podobnie jak w buforach i w moczu o odczynie kwaśnym) równoczesne narastanie stężenia BE.

Wykazane eksperymentalnie przyspieszenie degradacji C w moczu w miarę zmiany pH od kwaśnego do zasadowego w pełni potwierdza wyniki badań Baselta [3], który stwierdził około dwukrotne obniżenie się stężenia C w moczu o pH = 8 (po 3 tygodniach przechowywania w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$ ) i brak istotnych zmian poziomu C w przechowywanym w tej temperaturze moczu o pH = 5. Obserwacje autorów niniejszej publikacji są również zbieżne z ustaleniami Dugana i in. [7]. Autorzy wykazali jednak zdecydowanie wolniejszą hydrolizę C w temperaturze  $+25^{\circ}\text{C}$  w moczu o kwaśnym odczynie. Po 30 dniach zaobserwowane straty C wynosiły zaledwie około 10%, podczas gdy Dugan po 7 dniach przechowywania moczu w tych samych warunkach stwierdził aż dziesięciokrotny spadek stężenia C.

Ze względu na to, że w moczu o pH = 5, który przechowywano w temperaturze  $+25^{\circ}\text{C}$ , po 60 dniach degradacji ulegało około 23% C, a po 90 dniach nawet około 76%, odrzucić należy pogląd Hippenstiela i Gersona [11]. Autorzy ci na podstawie wyników badań Isenschmida [13] zastanawiają się bowiem nad celowością schładzania moczu o tym odczynie. Tymczasem Isenschmid oznaczał C w buforach, w których jest ona bardziej stabilna niż w moczu, a ponadto doświadczenie kończyło się po upływie czterech tygodni, podczas gdy przechowywanie moczu do chwili rozpoczęcia analizy i w trakcie jej wykonywania niejednokrotnie trwa znacznie dłużej.

Ustalenia niniejszego eksperymentu, z których wynika, że rozkład C w moczu o różnym pH nasilał się wraz ze wzrostem temperatury przechowywania próbek, są w przybliżeniu zgodne z obserwacjami Javaida i in. [15] oraz Matsubary i in. [17]. W pełni zgodne z obserwacjami innych autorów [3, 17] okazało się natomiast ustalenie, że dodatek substancji konserwującej pod postacią NaF w ilości 5 mg/ml nie wpływa w uchwytyn sposób na stabilność C w moczu o pH = 5, 6 i 8 podczas jego przechowywania przez okres od 1 do 90 dni zarówno w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$ , jak i  $+25^{\circ}\text{C}$ .



#### WNIOSKI

1. W roztworach wzorcowych i w próbkach moczu kokaina rozkłada się do benzoiloeckgoniny.
2. Zdecydowanie wyższa trwałość benzoiloeckgoniny w materiale biologicznym stanowi wskazanie do jej oznaczania w przypadku podejrzenia o zatrucie kokainą.
3. Natychmiastowe zamrożenie zapobiega rozkładowi kokainy zawartej w roztworach wzorcowych i w próbkach moczu.
4. W przypadku, gdy materiał do badań można przechowywać jedynie w temperaturze +4°C, zadowalającą stabilność kokainy zapewnia przez 90 dni zakwaszenie próbek moczu do pH = 5.
5. Przechowywanie moczu o pH = 5 w temperaturze +25°C dłużej niż 60 dni wiąże się z ryzykiem znacznej degradacji zawartej w nim kokainy.