

## STABILITY OF COCAINE IN BLOOD AND IN OTHER TISSUES\*

Marianna KISZKA, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

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

**ABSTRACT:** The stability of cocaine (C) in blood samples and in homogenised samples of liver, kidney and brain was tested. The influence of time (up to 90 days) and temperature (+25°C, +4°C, -20°C) were evaluated, and, in the case of blood, the influence of acetic acid and sodium fluoride as well. For isolation of C and benzoylecgonine the solid phase extraction (SPE) was performed. Quantitative analysis was carried out with the use of the HPLC method. It was shown that the stability of C increased with lowering the temperature of storage of the biological material. Freezing blood and other tissues down to -20°C made C stable up to 90 days. In blood samples stored at +4°C a similar stability of C was reached by addition of acetic acid (to pH = 5) and NaF.

**KEY WORDS:** Cocaine; Benzoylecgonine; Stability; Autopsy material; Blood; Liver; Kidney; Brain.

*Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLV, 2001, 16-35*

*Received 28 August 2000; accepted 11 October 2000*

### INTRODUCTION

Cocaine (C) undergoes many biochemical processes in an organism (hydrolysis, N-demethylation, N-oxidation, hydroxylation, alkylation, dehydrobenzoilation, esterification and other reactions) which lead to the creation of many derivative products [18, 19, 20]. The first step of transformation of C is the hydrolysis of one or two ester groups to pharmacologically inactive metabolites: benzoylecgonine (BE), methylesterecgonine (EME), and further to ecgonine (E).

---

\* This article is based upon 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 Memorial Award of Professors Jan Markiewicz and Tadeusz Borkowski of the Institute of Forensic Research, Cracow. The first part of this work ("Stability of cocaine in phosphate buffer and in urine") was published in *Problems of Forensic Sciences* 2000, vol. XLIV, pp. 7-23.

BE is formed on the path of hydrolysis of the methyl ester bond, especially if  $\text{pH} > 7$  [5, 9, 23, 32]. However, it is generally accepted that enzymes also take part in the process [2, 9, 21, 26]. The hydrolysis of the other ester bond in the C molecule, leading to the creation of EME, is, however, catalysed by the liver and plasma esterases [9, 13, 26, 32].

These processes do not only take place in living organisms. They also go on after death until the exhaustion of buffer systems capacity. Moreover, the action of bacterial enzymatic systems occurs very early after death [25]. Also, the great influence of pH on the stability of C should not be overlooked [10] in the interpretation of results of the study of tissue materials. Although initially after death a gradual acidifying of tissues is observed (with the maximum appearing about 24–48 hours after death), in the following phase (of proteolytic autolysis) pH eventually rises above 7 [25].

Knowledge of the dynamics of the decomposition of C in enzymatically active biological material is therefore of significant importance for toxicological expert appraisements, both at the stage of securing and storage of samples and at the stage of interpretation of the obtained analytical results.

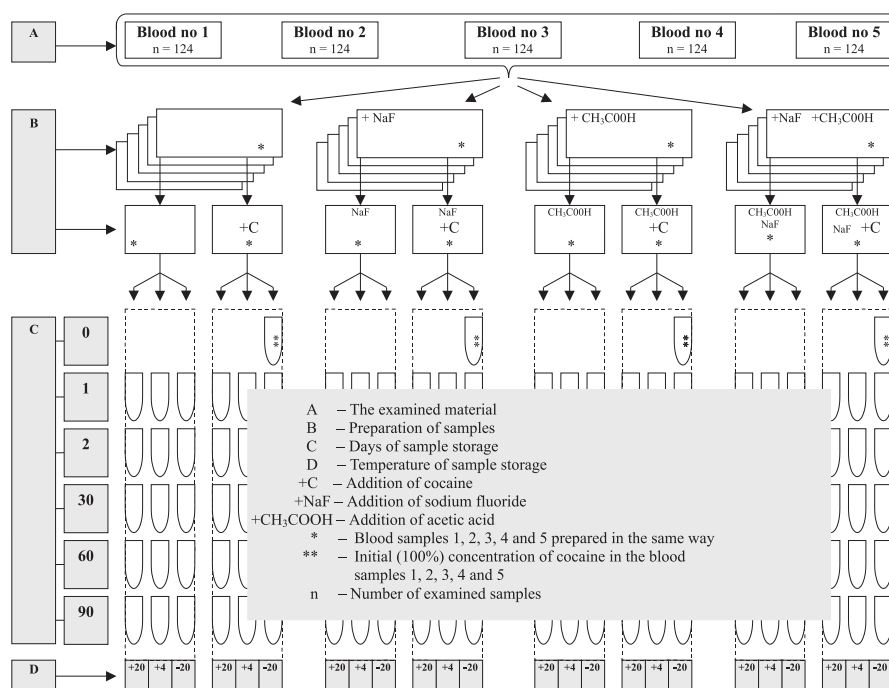


Fig. 1. A diagram of preparation and storage of blood samples.

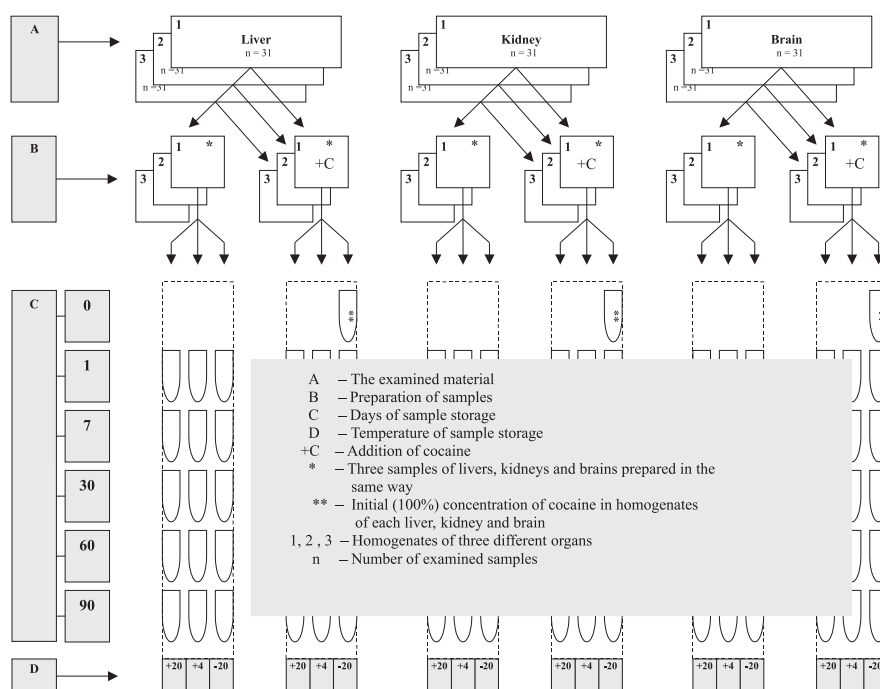


Fig. 2. A diagram of preparation and storage of liver, kidney and brain samples.

## MATERIALS AND METHODS

The material studied was blood samples collected from 5 corpses and fragments of the liver, kidney and brain secured during the autopsy of 3 corpses.

The method of preparation of blood samples is shown in part B of Figure 1. Each blood sample was divided into four portions. NaF in the quantity of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was added to the first portion,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  was added to the second portion until  $\text{pH} \approx 5$  was obtained, both compounds were added to the third, and none of the preservatives was added to the fourth. Then each portion (of each blood sample) was divided into two parts, and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of C was added to the first, whereas no C was added to the second<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> As a background control sample.

The internal organs (3 livers, 3 kidneys and 3 brain hemispheres) were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  directly after collecting. Then they were partially thawed, cut into small fragments, treated with liquid nitrogen<sup>2</sup> and powdered by grinding in a porcelain mortar. The powdered tissue was divided into two parts: to the first, C was added to obtain a concentration of  $5\ \mu\text{g/g}$  and the other was left without addition of C<sup>3</sup>.

Material prepared in this manner (both the blood and the organs) was placed into vials that were stored at three different temperatures ( $+25^{\circ}\text{C}$ ,  $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$ ) and was analysed (in order to determine the concentrations of C and BE) immediately after the preparation of samples and after 1, 7, 30, 60 and 90 days (in accordance with the scheme shown in parts C and D of Figures 1 and 2).

Xenobiotics were isolated with the method of the solid phase extraction (SPE), using Bond Elut Certify 300 mg/3 ml columns made by Varian [1, 6].

Quantitative analysis was carried out by means of the HPLC method (with a liquid chromatograph manufactured by Gilson; Hypersil ODS  $250 \times 4.0\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$  column; the mobile phase: 0.025 M phosphate buffer with addition of 0.5% triethylamine at  $\text{pH} = 3$  – acetonitrile 80–20 in a two pump system; the flow rate of the eluent was 1 ml/min; the volume of the injected sample was  $10\ \mu\text{l}$ ; detection at a wavelength of 233 nm). Concentrations of C and BE were determined with the method of the internal standard (lignocaine) using Gilson 715 HPLC software<sup>4</sup>.

Extracts from blood were characterised by a sufficient level of purity, whereas those from other tissues were significantly contaminated, yet the influence of 'biological background' was not observed at the C peak in any of the biological material. However, due to the interference of endogenic compounds with the peak of BE, visible in the first part of the HPLC chromatogram, BE determination was not carried out in the case of extracts from other (non-blood) tissues.

---

<sup>2</sup> In this way deactivation of enzymes (which occurs in the case of the use of the blade homogeniser) and a dilution of the biological material was avoided.

<sup>3</sup> See footnote no 1.

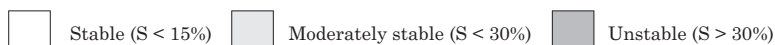
<sup>4</sup> The analytical procedure for cocaine and benzoylecgonine determination was presented in detail in the paper: Kiszka M., Mądro R., Buszewicz G., "Analytical problems connected with cocaine determination in tissues", at the 11th Meeting of the Polish Society of Forensic Medicine and Criminology, Łódź, 2–5 September 1998.

## RESULTS AND DISCUSSION

The concentrations of C and BE determined in 5 different samples of blood after 1, 7, 30, 60 and 90 days of storage at the following temperatures: +25°C, +4°C and –20°C with and without addition of preservatives (NaF, CH<sub>3</sub>COOH and NaF + CH<sub>3</sub>COOH) were used for calculating mean values, and, further, for calculating the decrease in C and the increase in BE<sup>5</sup>. The obtained results are graphically presented in Figure 3. Data concerning the mean decrease in concentration of C, which was observed in the homogenates of three different livers (and also kidneys and brains) stored without preservative at temperatures of +25, +4 and –20°C for 1, 7, 30, 60 and 90 days are graphically presented in Figure 4. The summary data concerning mean losses in the examined biological material as a function of temperature and time of storing (and in the case of blood the influence of preservatives as well) are listed in Table I.

TABLE I. MEAN COCAINE LOSS (S) IN TISSUES (EXPRESSED IN %).

Temperature		25°C					4°C				
Days		1	7	30	60	90	1	7	30	60	90
Blood	–	70	97	100	100	100	21	65	85	96	97
	NaF	9	56	91	100	100	2	3	11	42	49
	pH 5	5	55	87	98	100	1	4	14	39	51
	NaF + pH 5	2	2	4	14	40	1	0	3	6	5
Brain		10	23	55	95	0	0	13	19	26	39
Liver		22	69	78	90	28	28	48	62	59	68
Kidney		34	66	82	100	23	23	33	47	66	70



One can observe in Figure 3 that in the samples of blood frozen without addition of preservatives and stored for 90 days, a little decrease in the level of C down to 77–90% of the starting concentration occurred, whereas in the other blood samples, stored at –20°C, cocaine showed stability during the entire time of the experiment.

At higher temperatures in the non-preserved blood samples a very fast decrease in concentration of C was observed. At +4°C the loss of C after 1 day oscillated in the range of 6–37%, after 7 days in the range 28–90%, and at +25°C after only 1 day it reached about 56–84%. Thus the largest value of the mean decrease of C at room temperature occurred after 24 hours, and at

<sup>5</sup> Expressed in [%] of the starting C concentration.

+4°C after 1 week. Because at the same time no BE was detected in blood or it appeared only at very low concentrations, it should be assumed that the main product of the decomposition of C in non-preserved blood was probably EME, i.e. the metabolite that was not analysed in this experiment.

Investigations of other authors [5, 7, 16, 22, 27] also indicate that a decrease in temperature slows down the decomposition of C in blood, but does not protect against losses during long storage. Significant differences in the stability of C were present among results of examinations presented in some publications, which were probably caused by the use of different concentrations of C, examinations of blood taken from live persons or corpses and also by the individual properties of the studied blood samples. This has been fully confirmed in our experiment since we observed large differences between the velocity of the decomposition of C in autopsy blood taken from different corpses that could have resulted from differences of *post-mortem* changes of pH in blood as well as post-mortem enzymatic activity.

The value of pH of blood after death can decrease to 5.5–6 or even lower values [23, 29], so one should expect that in the experiment the chemical decomposition of C to BE would have been inhibited due to the *post-mortem* decrease of pH in blood. And, indeed, in some blood samples without preservatives, BE appeared only in insignificant concentrations in comparison to the losses of C. That would support the opinion that the main product of the decomposition of C in blood after death is methyloecgonine, which was not analysed in this experiment [14, 15, 23]. However, the results mentioned above are inconsistent with those obtained by Liu et al. [22], who showed in examinations of stability of C in blood (10 µg/ml) stored at +16°C that a decrease in C takes place and, simultaneously, an increase in concentration of BE which is proportional to the decomposition of C – the sum of the concentrations of both compounds remaining constant and being equal to the initial concentration of C. It seems that this type of decomposition is possible only in cases where C does not decompose to EME. This type of decomposition was observed only in blood samples with addition of NaF, which is an inhibitor of pseudocholine esterase responsible for the conversion of C to EME. This opinion is confirmed in the works of Isenschmid et al. [14, 15, 16], who consider EME to be the main product of the decomposition of C in autopsy blood.

According to Isenschmid et al. [16], the velocity of the enzymatic hydrolysis of C does not depend on its concentration in blood in the range 0.25–1.0 µg/ml, although they do not exclude such an influence at higher concentrations. Saady et al. [30] quote the opinion of Shuster that the velocity of conversion of C to EME by plasma esterases is strongly connected to the concentration of the substrate. Thus, in the case of larger concentrations of C (after exceeding the efficiency of the enzymatic systems), hydrolysis of C

to BE can also take place, which should explain the occurrence of small quantities of BE in the samples of blood without preservatives.

From a comparison of the velocity of the decomposition of C in blood with NaF and in blood without preservatives (Figure 3), one can observe a significant influence of sodium fluoride on the stability of C. The addition of NaF to blood stabilised C for 24 hours at +25°C, and for 1 month, if the sample was cooled down to +4°C. In these conditions (temperature +4°C), the maximum loss of C after 7 days was 9% and after 30 days – 23%. However, McCurdy et al. [27] established that under the same conditions in blood samples, C was stable only for a few days. Nevertheless, observations resulting from their experiment concerning the favourable influence of NaF were consistent with results contained in other publications [5, 7, 11, 16]. The decomposition of C which took place in spite of the addition of NaF can be explained e.g. by the incomplete blocking of enzyme by fluoride [3] or the temporary character of this inactivation [16]. The inhibiting influence (on enzymatic activity) of phosphoro-organic compounds is more effective than that of NaF, but the addition of these compounds is not advantageous because of their interference with the analysed xenobiotics [4, 16].

The decrease in the concentration of C in the blood samples of pH = 5 (Figure 3) was close to that found for samples with addition of NaF. In blood preserved with acetic acid the occurrence of BE was not observed, whereas in blood treated with fluoride BE concentration increased as the concentration of C decreased. Following Anderson et al. [29] it should be accepted that in blood after death (even in an acidic environment) C is metabolised to EME by pseudocholine esterase which is still active. So, just acidifying blood samples, especially if left at room temperature, did not sufficiently stabilise the C contained in them.

A significant increase in the durability of C in the acidified blood samples (in comparison to the samples left without any preservation) seems to confirm the suggestion by Isenschmid et al. [16] of the influence of pH on the process of enzymatic decomposition. The stabilising influence of acidity of blood (pH = 5.2) was mentioned by Moriya and Hashimoto [29], who observed no changes in the concentration of C over 24 hours in experimentally decomposed homogenates of human blood stored at +25°C and +37°C.

Figure 3 shows unequivocally that cocaine in blood was best stabilised by simultaneous preservation with sodium fluoride and acidifying to pH = 5. After the addition of NaF and acidifying of blood, cocaine was fairly stable for 60 days, and a decrease in temperature to +4°C offered good protection against decomposition for 90 days. Moreover, in the set of blood samples prepared in such a manner (collected from different corpses) the smallest differences in the velocity of decomposition of C were revealed. However, in the other sets (acidified either with addition of fluoride, or containing no preser-

vatives) individual differences were significant. A similar increase in the stability of C was obtained by Isenschmid et al. [16] and Baselt et al. [4], who also preserved blood samples by NaF and acetic acid or oxalic acid.

In the tissues stored at +4°C and +25°C (Figure 4 and Table I), the stability depended on the passage of time and the internal organ from which the sample was taken. Within the same organ some quite large individual differences occurred, which were especially pronounced in the case of livers and kidneys. These differences could indicate the participation of enzymatic processes in the post-mortem degradation of C in internal organs and could result from different, individually variable, activity of enzymes in particular tissues. In some samples of liver and kidney at a temperature of +25°C the loss of C after 1 day was significant (even 35–43%), although some samples showed high stability. On average, after 7 days about 70% of C underwent degradation. A somewhat slower velocity of decomposition was observed at a temperature of +4°C: after 1 day about 1/4 of the initial concentration of C was decomposed, after 7 days the mean loss of C in the liver and in the kidney was 48% and 33%, respectively, and during the first month of storage 62% and 47%. In the frozen samples of tissues: liver, kidney and brain (Figure 4) C revealed a high stability (similar to that in blood) for practically the whole time of the experiment. Only in some cases was a small decrease in the concentration of C observed, but only after 90 days, and the maximum was in the range of ten to twenty percent, independent of the kind of tissue.

In the performed experiment (Figure 4) the decomposition of C was a little slower than that noted by Price, who observed decomposition of more than 90% of C [17] in the liver of a person who died from cocaine poisoning, after two-month storage at +4°C.

A comparison of data on the velocity of the decomposition of C in blood (Figure 3) and in the liver (Figure 4), i.e. in tissues with high activity of enzymes, leads to the conclusion that at the same temperature the degradation of C in the liver proceeded slower. This can be explained by the higher decrease in the activity of enzymes in the liver. It is possible, as was suggested in relation to blood [16], that the differences are connected to the influence of pH on the activity of enzymes. Liver tissue contains more compounds, which can cause acidity, than blood.

The most stable biological environment was the brain. Even at a temperature of +25°C the decomposition of C in the brain after 1 day was insignificant (about 10%), after 7 days was moderate (about 1/4 of C), and after 1 month in the tissue there were still, on average, about 45% of xenobiotics present. A decrease in temperature down to +4°C ensured the stability of C for many days, since after 30 days the decrease in its concentration was on average about 19% and after 60–90 days about 26–39%.



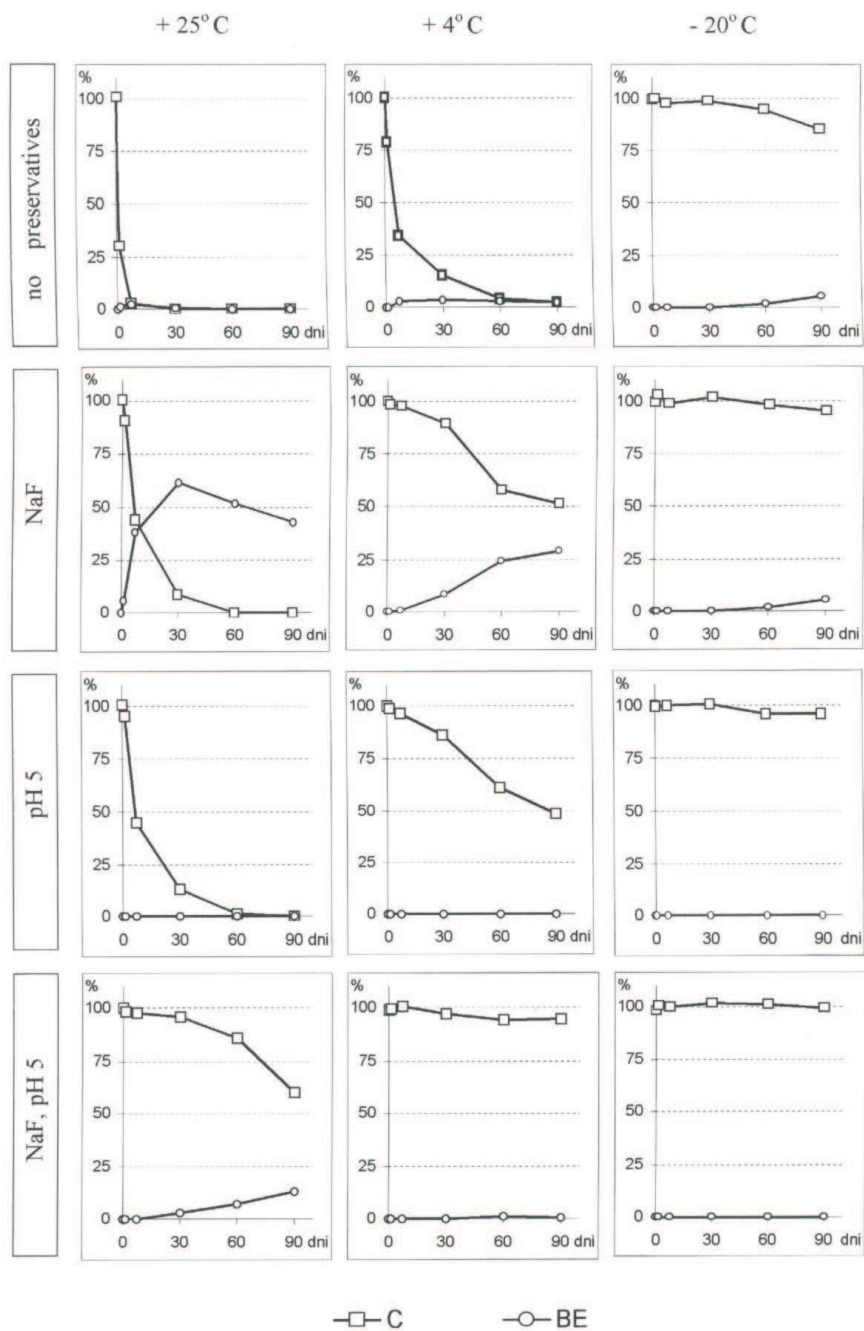


Fig. 3. Stability of cocaine (C) in blood (expressed in [%] as a mean value of 5 blood samples) in relation to temperature, storage periods (days) and preservatives: NaF and  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; BE – benzoyllecgonine.

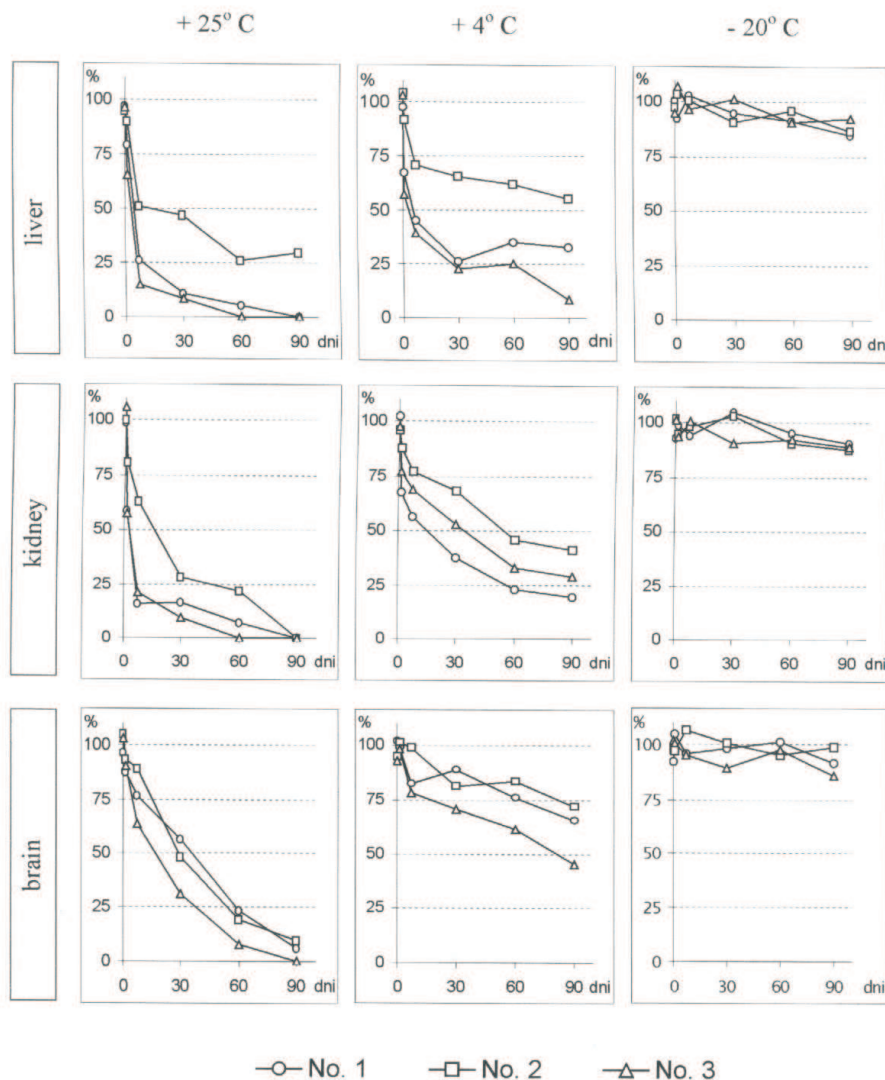


Fig. 4. Stability of cocaine in tissues in relation to temperature and storage periods.

During analysis of autopsy material, Hernandez et al. [12] observed much faster decomposition of C in brain samples stored at temperatures of  $-80^{\circ}\text{C}$  and  $+4^{\circ}\text{C}$ : the difference between the determined concentrations was about 48% after a month and about 90% after 2 months. The authors also showed that even after 144 days of storage of samples at  $+4^{\circ}\text{C}$ , C was detectable in the brain.

The results of our work are therefore closer to those in the study carried out by Spiehler and Reed [31], who did not reveal any significant changes in

C after one and three months in brain samples stored at a temperature of +8°C to +10°C and at -16°C.

In comparison with blood and other tissues the brain is a very good material for examination, not only because of the high stability of C *in vitro* observed in this work, but also because, as in the cases of poisoning with cocaine [8, 28], the concentrations of this xenobiotic in the brain were relatively high (on average 32.9 µg/g) and 4–8 times higher than its concentration in blood. This aspect of the usefulness of brain for toxicological examinations, when death from cocaine overdosing is suspected, was confirmed by Spiehler and Reed [31], according to whom the mean ratio of the concentration of C in the brain to that in blood was 9.60 on average, whereas it was only 0.36 in the case of BE. The absence of significant concentrations of BE in the brain confirms the high stability of C in this material *in vivo* as well [8, 28, 31]. This is also supported by the fact that the mean ratio of the concentrations C/BE in the brain was 14.70 whereas in blood and in the liver 0.64 and 0.50 [31] respectively. A comparison of the concentrations of C in the brain and in the liver reveals greater concentrations in the brain tissue.

Moriya and Hashimoto [29] did not observe a decrease in C during the first day at temperatures of 20–25°C and 37°C in the decomposed homogenates of liver, brain, muscles or blood – so their results differed from those presented within the current work. However, the homogenates used by Moriya and Hashimoto were significantly acidified (down to pH = 4.2–5.2). They therefore came to the conclusion that in tissues other than blood the decomposition of C can be disregarded, since the pH of samples taken after death decreases quickly to a value of less than 7. The *post-mortem* decomposition of C in the liver and in the brain is most probably mainly the result of the activity of enzymes, which was confirmed by the fact that in the liver (containing much more esterases) the metabolism of C is faster than in the brain. The decreased activity of the enzymes in the decomposing tissues inhibits the breakdown of C to EME – so the progressive processes of decomposition (changes of pH and the decrease of the enzymatic activity) can explain the clearly visible (Figure 4) slower degradation of C in tissues after the 30 day period of the experiment.

To summarise, one can state after Manhoff et al. [24] that relatively advantageous conditions for the stability of C arise in corpses, i.e. a decrease in temperature, the acidity of the environment and also a decrease in the efficiency of enzymatic processes. However, as was shown in the performed study, the conditions do not stabilise the concentration of C in the *post-mortem* material to a degree that would be sufficient from the point of view of forensic toxicology.

## CONCLUSIONS

1. The cold storage of blood samples at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ , or the addition of 1% NaF plus acidifying down to  $\text{pH} = 5$  plus storage at  $+4^{\circ}\text{C}$ , ensure the stability of C in blood for 90 days.
2. The freezing of tissue samples at  $-20^{\circ}\text{C}$  ensure the stability of C for 90 days.
3. The brain is the best material for *post-mortem* diagnosis of cocaine poisoning.
4. The quick decrease of C in non-preserved autopsy blood points to the necessity of determining its metabolites, and simultaneous analysis of other tissues.

## References:

1. Abusada G. M., Abukhalaf I. K., Alford D. D. [et al.], Solid-phase extraction and GC/MS quantitation of cocaine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, and cocaethylene from meconium, whole blood, and plasma, *Journal of Analytical Toxicology* 1993, vol. 17, pp. 353–358.
2. Bailey D. N., Studies of cocaethylene (ethylcocaine) formation by human tissues, *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 13–15.
3. Baselt R. C., Shaw R. F., McEvilly R., Effect of sodium fluoride on cholinesterase activity in postmortem blood, *Journal of Forensic Science* 1985, vol. 30, pp. 1206–1209.
4. Baselt R. C., Yoshikawa D., Chang J. [et al.], Improved long-term stability of blood cocaine in evacuated collection tubes, *Journal of Forensic Science* 1993, vol. 38, pp. 935–937.
5. Baselt R. C., Stability of cocaine in biological fluids, *Journal of Chromatography* 1983, vol. 268, pp. 502–505.
6. Bond Elut Certify™ Instruction Manual. Varian sample preparation products.
7. Brogan W. C., Kemp P. M., Bost R. O. [et al.], Collection and handling of clinical blood samples to assure the accurate measurement of cocaine concentration, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, vol. 16, pp. 152–154.
8. Browne S. P., Moore C. M., Scheurer J. [et al.], A rapid method for determination of cocaine in brain tissue, *Journal of Forensic Sciences* 1991, vol. 36, pp. 1662–1665.
9. Fleming J. A., Byck R., Barash P. G., Pharmacology and therapeutic applications of cocaine, *Anesthesiology* 1990, vol. 73, pp. 518–531.
10. Fletcher S. M., Hancock V. S., Potential errors in benzoylecgonine and cocaine analysis, *Journal of Chromatography* 1981, vol. 206, pp. 193–195.
11. Giorgi S. N., Meeker J. E., A 5-year stability study of common illicit drugs in blood, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, vol. 19, pp. 392–398.
12. Hernandez A., Andollo W., Hearn W. L., Analysis of cocaine and metabolites in brain using solid-phase extraction and full-scanning gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *Forensic Science International* 1994, vol. 65, pp. 149–156.

13. Inaba T., Stewart D. J., Kalow W., Metabolism of cocaine in man, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1978, vol. 23, pp. 547–552.
14. 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.
15. Isenschmid D. S., Levine B. S., Caplan I. H., The role of ecgonine methyl ester in the interpretation of cocaine concentrations in postmortem blood, *Journal of Analytical Toxicology* 1992, vol. 16, pp. 319–324.
16. 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.
17. 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.
18. Jenkins A. J., Goldberger B. A., Identification of unique cocaine metabolites and smoking by-products in postmortem blood and urine specimens, *Journal of Forensic Sciences* 1997, vol. 42, pp. 824–827.
19. Jindal S. P., Lutz T., Ion cluster techniques in drug metabolism: use of a mixture of labelled and unlabeled cocaine to facilitate metabolite identification, [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 1986.
20. Jindal S. P., Lutz T., Mass spectrometric studies of cocaine disposition in animals and humans using stable isotope-labeled analogues, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1989, vol. 78, pp. 1009–1014.
21. Kappus H., Ubersucht uber die Pharmakokinetik und den metabolismus von Morphin, Codein, Cocain und Tetrahydrocannabinol. Symposium Forensische Probleme des Drogenmissbrauchs, Mosbach 1985, S. 33–35.
22. Liu Y., Budd R. D., Griesemer E. C., Study of stability of cocaine and benzoylecgonine, its major metabolite, in blood samples, *Journal of Chromatography* 1982, vol. 248, pp. 318–320.
23. Logan B. K., Peterson K. L., The origin and significance of ecgonine methyl ester in blood samples (Letter), *Journal of Analytical Toxicology* 1994, vol. 18, pp. 124–125.
24. Manhoff D. T., Hood I., Caputo F. [et al.], Cocaine in decomposed human remains, *Journal of Forensic Sciences* 1991, vol. 36, pp. 1732–1735.
25. Markiewicz J., Swoistość sądowych badań chemiczno-toksykologicznych, *Z Zagadnień Kryminalistyki* 1971, z. VI, s. 22–29.
26. Matsubara K., Kagawa M., Fukui Y., In vivo and in vitro studies on cocaine metabolism: ecgonine methylester as a major metabolite of cocaine, *Forensic Science International* 1984, vol. 26, pp. 169–180.
27. McCurdy H. H., Callahan L. S., Williams R. D., Studies on the stability and detection of cocaine, benzoylecgonine, and 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in whole blood using Abuscreen® Radioimmunoassay, *Journal of Forensic Sciences* 1989, vol. 34, pp. 858–870.

28. Moore C., Browne S., Tebbett I. [et al.], Determination of cocaine and its metabolites in brain tissue using high-flow solid-phase extraction columns and high-performance liquid chromatography, *Forensic Science International* 1992, vol. 53, pp. 215–219.
29. Moriya F., Hashimoto Y., Postmortem stability of cocaine and cocaethylene in blood and tissues of humans and rabbits, *Journal of Forensic Sciences* 1996, vol. 41, pp. 612–616.
30. Saady J. J., Bowman E. R., Aceto M. D., Cocaine, ecgonine methyl ester, and benzoylecgonine plasma profiles in rhesus monkeys, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, vol. 19, pp. 571–575.
31. Spiehler V., Reed D., Brain concentrations of cocaine and benzoylecgonine in fatal cases, *Journal of Forensic Sciences* 1985, vol. 30, pp. 1003–1011.
32. 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.

## TRWAŁOŚĆ KOKAINY WE KRWI I INNYCH TKANKACH\*

Marianna KISZKA, Grzegorz BUSZEWICZ, Roman MAĐRO

### WSTĘP

Kokaina (C) w organizmie podlega wielu przemianom biochemicznym (hydroli-  
zie, N-demetylacji, N-utlenianiu, hydroksylacji, alkilacji, dehydrobenzoilacji, estry-  
fikacji i innym procesom), które prowadzą do powstania wielu produktów pochod-  
nych [18, 19, 20]. Pierwszym etapem przemiany C jest hydroliza jednej lub obu grup  
estrowych do nieaktywnych farmakologicznie metabolitów: benzoiloekgoniny (BE)  
i estru metylowego ekgoniny (EME), a następnie ekgoniny (E).

BE powstaje na drodze chemicznej hydrolizy metylowego wiązania estrowego,  
zwłaszcza przy pH > 7 [5, 9, 23, 32]. Przyjmuje się jednak, że w procesie tym biorą  
udział także enzymy [2, 9, 21, 26]. Hydroliza drugiego połączenia estrowego w struk-  
turze cząsteczki C z wytwarzaniem EME jest natomiast katalizowana przez estera-  
zy wątroby i osocza [9, 13, 26, 32].

Procesy te mają miejsce nie tylko w żywym organizmie. Do momentu wyczerpa-  
nia pojemności systemów buforujących zachodzą także po śmierci. Ponadto w ma-  
teriale pośmiertnym dość wcześnie występuje działanie bakteryjnych układów en-  
zymatycznych [25]. W interpretacji wyników badań materiału tkankowego nie moż-  
na również pominąć dużego wpływu pH na stabilność C [10]. Po zgonie obserwuje się  
wprawdzie początkowo stopniowe zakwaszanie tkanek, którego maksimum przy-  
pada w czasie ok. 24–48 godzin od śmierci, ale w kolejnej fazie (autolizy proteolitycz-  
nej) dochodzi ostatecznie do wzrostu pH powyżej 7 [25].

Poznanie dynamiki rozkładu C w aktywnym enzymatycznie materiale biologicz-  
nym ma więc istotne znaczenie dla ekspertyzy toksykologicznej zarówno na etapie  
zabezpieczania i przechowywania próbek przeznaczonych do analizy, jak i na etapie  
interpretacji otrzymanych wyników.

### MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki krwi pobrane z 5 zwłok oraz wycinki wątro-  
by, nerki i mózgu, które zabezpieczono w czasie 3 sekcji zwłok.

Sposób przygotowywania próbek krwi przedstawia część B ryciny 1. Każdą próbę  
krwi dzielono na cztery porcje. Do jednej z nich dodawano NaF w ilości 10 mg/ml, do

---

\* Niniejszy artykuł opracowany został na podstawie referatu pt. „Trwałość kokainy w materia-  
le biologicznym”, który uznano 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. Pierwszą część tego  
artykułu („Trwałość kokainy w buforze fosforanowym i w moczu”) opublikowano w czaso-  
piśmie *Z Zagadnień Sądowych* 2000, z XLIV, s. 7–23.

drugiej  $\text{CH}_3\text{COOH}$  do uzyskania  $\text{pH} \approx 5$ , do trzeciej obie substancje, a do czwartej nie dodawano żadnych środków konserwujących. Następnie każdą porcję (każdej z prób krwi) dzielono na dwie części i do jednej z nich dodano C w ilości  $5 \mu\text{g/ml}$ , natomiast drugą pozostawiono bez dodatku C<sup>1</sup>.

Narządy wewnętrzne (3 wątroby, 3 nerki i 3 półkule mózgowe) zamrażano w temperaturze  $-20^\circ\text{C}$  bezpośrednio po ich pobraniu. Następnie częściowo rozmrażano, krojono na drobne fragmenty i rozdrabniano do postaci proszku przez ucieranie w porcelanowym moździerzu po zalaniu ciekłym azotem<sup>2</sup>. Sproszkowaną tkankę dzielono na dwie części. Do jednej z nich dodawano C do uzyskania stężenia  $5 \mu\text{g/g}$ , a drugą pozostawiono bez dodatku C<sup>3</sup>.

Tak przygotowany materiał (zarówno krew, jak i narządy) rozdzielono do probówek, które przechowywano w trzech różnych temperaturach ( $+25^\circ\text{C}$ ,  $+4^\circ\text{C}$ ,  $-20^\circ\text{C}$ ) i poddawano analizie (w celu oznaczenia poziomu C i BE) tuż po sporządzeniu próbek oraz po 1, 7, 30, 60 i 90 dniach (zgodnie ze schematem przedstawionym w częściach C i D rycin 1 i 2).

Ksenobiotyki izolowano metodą ekstrakcji z fazy stałej (SPE) na kolumnach Bond Elut Certify 300 mg/3 ml firmy Varian [1, 6].

Analizę ilościową wykonywano metodą HPLC (chromatograf cieczowy firmy Gilson; kolumna Hypersil ODS  $250 \times 4,0 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ; faza ruchoma: bufor fosforanowy  $0,025 \text{ M}$  z dodatkiem  $0,5\%$  trietylaminy o  $\text{pH} 3$  – acetonitryl  $80-20$  w systemie dwóch pomp; przepływ eluentu  $1 \text{ ml/min}$ ; objętość wstrzykiwanej próbki –  $10 \mu\text{l}$ ; detekcja –  $233 \text{ nm}$ ). Stężenia C i BE oznaczano metodą standardu wewnętrznego (lidokainy) według oprogramowania Gilson 715 HPLC System<sup>4</sup>.

Ekstrakty z krwi charakteryzowały się wystarczającym stopniem czystości. Wyciągi z innych tkanek były natomiast znacznie zanieczyszczone. W miejscu występowania piku C nie obserwowano wprawdzie wpływu „tła biologicznego”, ale interferencja endogennej substancji z pikiem BE, widoczna w początkowej części chromatogramu HPLC sprawiła, że w przypadku ekstraktów z tkanek zrezygnowano z oznaczania BE.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Stężenia C i BE stwierdzone w 5 różnych próbkach krwi po 1, 7, 30, 60 i 90 dniach ich przechowywania w określonej temperaturze ( $+25$ ,  $+4$ ,  $-20^\circ\text{C}$ ) bez dodatku środków konserwujących oraz z ich użyciem ( $\text{NaF}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  i  $\text{NaF} + \text{CH}_3\text{COOH}$ ) posłużyły do obliczenia wartości średnich, a następnie ubytku C i narastania BE<sup>5</sup>,

<sup>1</sup> Jako kontrolną próbkę tła.

<sup>2</sup> Unikano w ten sposób dezaktywacji enzymów (jaka ma miejsce w przypadku użycia homogenizatora ostrzowego) oraz rozcieńczenia materiału biologicznego.

<sup>3</sup> Zob. przypis nr 1.

<sup>4</sup> Szczegóły procedur analitycznych związanych z oznaczaniem C i BE przedstawione zostały w trakcie XI Krajowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii (Łódź, 2–5 września 1998 roku) w referacie: Kiszka M., Mądro R., Buszewicz G., „Problemy analityczne związane z oznaczaniem kokainy w tkankach”.

<sup>5</sup> Wyrażonego w [%] w stosunku do wyjściowego stężenia C.



czego rezultaty przedstawiono graficznie na rycinie 3. Graficznie przedstawiono również (na rycinie 4) dane na temat średniego ubytku stężenia C, który obserwowano w homogenatach trzech różnych wątrób (a także nerek i mózgu) przechowywanych bez dodatku środków konserwujących w temperaturze +25, +4, -20°C przez 1, 7, 30, 60 i 90 dni. Zbiorcze zestawienie średniej wielkości strat wyjściowego stężenia C w przebadanym materiale biologicznym w zależności od temperatury i czasu jego przechowywania, a w przypadku krwi także wpływu środków konserwujących, zawiera tabela I.

Z ryciny 3 wynika, że w zamrożonych próbkach krwi bez dodatku środków konserwujących po 90 dniach widoczne było niewielkie obniżenie poziomu C do 77–90% jej początkowego stężenia, zaś w pozostałych próbkach krwi przechowywanej w temperaturze -20°C kokaina wykazywała stabilność przez cały czas trwania eksperymentu.

W wyższej temperaturze we krwi nie konserwowanej obserwowano bardzo szybkie zanikanie C. W temperaturze +4°C jej straty po 1 dniu wahały się w granicach 6–37% i 28–90% po 7 dniach, a w temperaturze +25°C już po 1 dniu sięgały aż 56–84%. Największy średni ubytek C w temperaturze pokojowej występował zatem w ciągu 24 godzin, a w temperaturze +4°C w ciągu 1 tygodnia. Ze względu na to, że w tym czasie nie stwierdzano we krwi BE lub występowała ona w bardzo niskich stężeniach, przyjąć należy, że głównym produktem rozkładu C we krwi nie konserwowanej był prawdopodobnie EME, czyli metabolit, którego nie oznaczano w tym eksperymencie.

Z badań innych autorów [5, 7, 16, 22, 27] wynika także, że obniżenie temperatury spowalnia rozkład C we krwi, ale nie zabezpiecza przed jej stratami podczas dłuższego przechowywania. Między wynikami badań przedstawionych w niektórych publikacjach widoczne były istotne różnice stabilności C we krwi, które prawdopodobnie wynikały ze stosowania różnych stężeń C, badania krwi pobranej od osób żywych lub ze zwłok, a także osobniczych właściwości badanych prób krwi. Znajduje to pełne potwierdzenie w przeprowadzonym przez autorów eksperymencie. Obserwowano bowiem duże różnice między tempem rozkładu C we krwi sekcyjnej pobranej z różnych zwłok, co mogło wynikać z różnic w pośmiertnych zmianach pH krwi i pośmiertnej aktywności enzymatycznej.

Odczyn krwi po zgonie może obniżyć się do pH = 5,5–6,0 lub nawet niższych wartości [23, 29] i w związku z tym w eksperymencie należało oczekiwać, że chemiczny rozkład C do BE zostanie zahamowany w wyniku pośmiertnego obniżania się pH krwi. I rzeczywiście, w niektórych próbkach krwi bez dodatku substancji konserwujących obserwowano pojawianie się BE tylko w znikomych stężeniach w porównaniu ze stratami C. Potwierdzałoby to pogląd, że głównym produktem rozkładu C we krwi po zgonie jest metyloekgonina, której nie oznaczano w tym eksperymencie [14, 15, 23]. Przyniesione wyżej wyniki pozostają jednak w sprzeczności z ustaleniami Liu i in. [22], którzy w badaniach stabilności C we krwi (10 µg/ml) przechowywanej w temperaturze +16°C wykazali spadek jej zawartości i równoczesny, proporcjonalny do rozkładu C, wzrost stężenia BE, przy czym suma stężeń obu składników była stała, równa początkowej ilości C. Wydaje się, że tego rodzaju rozkład jest możliwy tylko w przypadku, gdy C nie rozkłada się do EME. Taki rozkład obserwowano jedynie w próbkach krwi z dodatkiem NaF, który jest inhibitorem pseudocholinesterazy odpowiedzialnej za przemianę C do EME. Pogląd ten znajduje potwierdzenie w pracach

Isenschmida i in. [14, 15, 16], którzy za główny produkt rozkładu C we krwi sekcyjnej uważają właśnie EME.

Według Isenschmida i in. [16] szybkość enzymatycznej hydrolizy C nie zależy od jej stężenia we krwi w zakresie 0,25–1,0 µg/ml, chociaż nie wykluczają takiego wpływu przy wyższych stężeniach. Jednak Saady i in. [30] przytaczają opinię Shustera, że tempo rozkładu C do EME przez esterazy osocza jest mocno związane ze stężeniem substratu. W przypadku większych stężeń C (po przekroczeniu wydolności układów enzymatycznych) może zatem także występować hydroliza C do BE, czym należy tłumaczyć występowanie niewielkich ilości BE w próbkach krwi bez dodatku konserwantów.

Z porównania szybkości rozkładu C we krwi z dodatkiem NaF i krwi bez dodatku substancji konserwujących (rycina 3) wynika wyraźnie zaznaczony stabilizujący wpływ fluorku sodu. Dodatek NaF do krwi stabilizował zawartą w niej C przez 24 godziny w temperaturze +25°C i przez 1 miesiąc wówczas, gdy próbkę krwi schłodzono do +4°C. W tych warunkach (temperatura +4°C) maksymalny ubytek C po 7 dniach wynosił 9%, a po 30 dniach – 23%. Tymczasem McCurdy i in. [27] stwierdzili, że w tych samych warunkach w próbkach krwi C była stabilna zaledwie przez kilka dni. Wynikające z eksperymentu spostrzeżenia dotyczące pozytywnego działania NaF są natomiast zgodne z ustaleniami zawartymi w innych publikacjach [5, 7, 11, 16]. Rozkład C, który zachodził mimo dodatku NaF, można wytłumaczyć m.in. niepełnym zablokowaniem enzymu przez fluorek [3] lub przejściowym charakterem tej inaktywacji [16]. Hamujące (aktywność enzymatyczną) działanie związków fosforoorganicznych jest skuteczniejsze niż NaF, ale dodatek tych substancji nie jest korzystny ze względu na możliwość ich interferencji z oznaczanymi ksenobiotykami [4, 16].

Obniżenie stężenia C w próbkach krwi o pH = 5 (rycina 3) było zbliżone do wykazanego w próbkach z dodatkiem NaF. We krwi konserwowanej kwasem octowym nie obserwowano pojawiania się BE, której stężenie narastało w miarę spadku stężenia C we krwi fluorkowanej. Należy zatem przyjąć za Andersonem i in. [29], że C we krwi po śmierci (nawet w środowisku kwaśnym) jest metabolizowana do EME przez wciąż aktywną pseudocholinesterazę. Tak więc samo zakwaszenie próbek krwi, zwłaszcza pozostawionych w temperaturze pokojowej, nie stabilizowało dostatecznie zawartej w nich C.

Wyraźny wzrost trwałości C w zakwaszonych próbkach krwi (w porównaniu z próbkami bez jakiegokolwiek konserwacji) wydaje się potwierdzać sugerowany przez Isenschmida i in. [16] wpływ pH na enzymatyczny proces rozkładu. Na stabilizujący wpływ kwaśnego odczynu krwi (pH = 5,2) zwrócili również uwagę Moriya i Hashimoto [29], którzy stwierdzili brak zmian stężenia C przez 24 godziny w eksperymentalnie rozłożonych homogenatach ludzkiej krwi przechowywanych w temperaturze +25°C i +37°C.

Z ryciny 3 wynika jednoznacznie, że kokainę we krwi najlepiej stabilizowała równoczesna konserwacja fluorkiem sodu i zmiana odczynu do pH = 5. Po dodaniu NaF i zakwaszeniu krwi w temperaturze +25°C kokaina była bowiem dość stabilna przez 60 dni, a obniżenie temperatury do +4°C praktycznie zabezpieczało ją przed rozkładem przez 90 dni. W serii tak zabezpieczonych próbek krwi (z różnych zwłok) wykazano ponadto najmniejsze różnice w szybkości rozkładu C. Natomiast w pozostałych seriach (nie zawierających konserwantów, tylko zakwaszonych i wyłącznie fluorkowanych) indywidualne różnice były znaczne. Podobny wzrost stabilności C uzyskali

Isenschmid i in. [16] oraz Baselt i in. [4], którzy także konserwowali próbki krwi przy użyciu NaF i kwasu octowego lub kwasu szczawiowego.

W tkankach przechowywanych w temperaturach  $+4^{\circ}\text{C}$  i  $+25^{\circ}\text{C}$  (rycina 4 i tabela I) trwałość C zależała od upływu czasu oraz narządu, z którego pobrano materiał. W obrębie tego samego narządu występowały dość duże indywidualne różnice, co było widoczne zwłaszcza w przypadku wątroby i nerki. Różnice te mogły wskazywać na udział procesów enzymatycznych w pośmiertnej degradacji C w narządach wewnętrznych i wynikać z różnej, zmiennej osobniczo, aktywności enzymów w poszczególnych tkankach. W niektórych próbkach wątroby i nerki w temperaturze  $+25^{\circ}\text{C}$  ubytek C już po 1 dniu był znaczący (nawet o 35–43%), chociaż zdarzały się próbki o dużej stabilności, a po 7 dniach degradacji ulegało średnio ok. 70% C. Nieco wolniejsze tempo rozkładu obserwowano w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$ , gdyż w ciągu 1 doby rozkładała się w przybliżeniu 1/4 wyjściowego stężenia C, po 7 dniach średnie straty C w wątrobie i w nerce wynosiły odpowiednio 48% i 33%, a w ciągu pierwszego miesiąca przechowywania próbek 62% i 47%. Natomiast w zamrożonych próbkach tkanek: wątroby, nerki i mózgu (rycina 4) C wykazywała wysoką stabilność (podobnie jak w przypadku krwi) praktycznie przez cały czas doświadczenia. Tylko w niektórych próbkach obserwowano niewielkie obniżenie stężenia dopiero po 90 dniach, maksymalnie do kilkunastu procent, niezależnie od rodzaju tkanki.

W przeprowadzonym doświadczeniu (rycina 4) rozkład C był nieco wolniejszy niż wynikało to z obserwacji Price'a, który w wątrobie osoby zmarłej w wyniku zatrucia kokainą po 2 miesiącach jej przechowywania w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  obserwował rozkład ponad 90% C [17].

Porównanie danych na temat szybkości rozkładu C we krwi (rycina 3) i w wątrobie (rycina 4), tj. tkankach o dużej aktywności enzymów, prowadzi do wniosku, że w tej samej temperaturze degradacja C w wątrobie przebiegała wolniej. Można to tłumaczyć szybszym spadkiem aktywności enzymów w wątrobie. Być może, jak to sugerowano w odniesieniu do krwi [16], różnice te wiążą się z wpływem pH na aktywność enzymów. Tkanka wątroby zawiera bowiem więcej niż krew substancji, które mogą powodować zakwaszenie.

Najbardziej stabilnym środowiskiem biologicznym okazał się mózg. Nawet w temperaturze  $+25^{\circ}\text{C}$  rozkład C w mózgu po 1 dniu był bowiem nieznaczny (ok. 10%), po 7 dniach umiarkowany (ok. 1/4 C), a po 1 miesiącu w tkance tej pozostało nadal średnio 45% ksenobiotyku. Natomiast obniżenie temperatury do  $+4^{\circ}\text{C}$  zapewniało stabilność C przez wiele dni, gdyż po 30 dniach dochodziło do spadku jej stężenia średnio o 19%, a po 60–90 dniach średnio o 26–39%.

W trakcie analizy materiału sekcyjnego Hernandez i in. [12] wykazali o wiele szybszy rozkład C w próbkach mózgu przechowywanych w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  i  $+4^{\circ}\text{C}$ , gdyż po miesiącu różnica między wykazanymi w nich stężeniami wynosiła około 48% i ponad 90% po 2 miesiącach. Autorzy ci wykazali jednak, że nawet po 144 dniach przechowywania próbek w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  można było jeszcze wykryć C w mózgu. Wyniki przeprowadzonego przez autorów niniejszej pracy eksperymentu są zatem bliższe badaniom Spiehlera i Reeda [31], którzy nie wykazali znaczących zmian stężeń C po upływie jednego oraz trzech miesięcy w próbkach mózgu przechowywanych w temperaturze od  $+8^{\circ}\text{C}$  do  $+10^{\circ}\text{C}$  i w temperaturze  $-16^{\circ}\text{C}$ .

W porównaniu z krwią oraz innymi tkankami mózg jest więc bardzo dobrym materiałem badawczym, nie tylko ze względu na obserwowaną w tej pracy dużą stabil-

ność C *in vitro*, ale także ze względu na to, że w przypadkach zatruc kokainą [8, 28] stężenia tego ksenobiotyku w mózgu były stosunkowo wysokie (średnio 32,9 µg/g) i 4–8-krotnie wyższe od stężenia C we krwi. Ten aspekt przydatności mózgu do badań toksykologicznych, gdy podejrzewa się śmierć w wyniku przedawkowania kokainy, potwierdzają Spiehler i Reed [31], według których stosunek stężenia C w mózgu do stężenia we krwi wynosił średnio 9,60, a dla BE tylko 0,36. Brak znaczących stężeń BE w mózgu potwierdza dużą trwałość C w tym materiale także w warunkach *in vivo* [8, 28, 31]. Świadczy o tym również średni stosunek stężeń C/BE, który w mózgu wynosił 14,70, a we krwi i w wątrobie odpowiednio 0,64 oraz 0,50 [31]. Porównanie poziomów stężeń C w mózgu i w wątrobie wypada przy tym korzystnie dla tkanki mózgowej [31].

Moriya i Hashimoto [29] nie stwierdzili zanikania C w ciągu 1 doby w temperaturze 20–25°C i 37°C w rozłożonych homogenatach wątroby, mózgu, mięśni oraz krwi, czym rezultaty ich badań różnią się od przedstawionych w tej pracy. Homogenaty te były jednak w znacznym stopniu zakwaszone (do pH = 4,2–5,2), dlatego wspomniani autorzy doszli do wniosku, że w innych niż krew tkankach, chemiczny rozkład C może być pominięty, ponieważ odczyn próbek pobranych po zgonie obniża się szybko do wartości pH mniejszej niż 7. Pośmiertny rozkład C w wątrobie i mózgu jest prawdopodobnie głównie wynikiem działania enzymów, co potwierdza fakt, że w wątrobie (zawierającej dużo większą ilość esteraz) metabolizm C jest szybszy niż w mózgu. Obniżona aktywność enzymów w gnilnie rozłożonych tkankach zwalnia rozkład C do EME, a zatem postępującymi procesami rozkładowymi (zmiany pH i spadek aktywności enzymatycznej) można wytłumaczyć wyraźnie widoczną (rycina 4) wolniejszą degradację C w tkankach po 30 dniach trwania eksperymentu.

W podsumowaniu można powtórzyć za Manhoffem i in. [24], że w zwłokach występują stosunkowo korzystne warunki dla trwałości C, tj. obniżenie temperatury, kwaśne środowisko, a także spadek wydolności procesów enzymatycznych. Jednak, jak wykazano w przeprowadzonych badaniach, warunki te nie stabilizują stężeń C w materiale pośmiertnym w stopniu zadowalającym z punktu widzenia toksykologii sądowej.

#### WNIOSKI

1. Zamrożenie próbek krwi w temperaturze –20°C, a także dodanie 1% NaF i równoczesne ich zakwaszenie do pH = 5 połączone z przechowywaniem w temperaturze +4°C zapewniają osiągnięcie trwałości C we krwi do 90 dni.
2. Skutecznym sposobem zapewnienia stabilności C w tkankach przez 90 dni jest ich zamrożenie w temperaturze –20°C.
3. Mózg jest najlepszym materiałem do pośmiertnej diagnostyki zatruc kokainą.
4. Szybkie zanikanie C w nie konserwowanej krwi sekcyjnej wskazuje na konieczność oznaczania jej metabolitów i równoległą analizę innych tkanek.