

Andrea Klingmann  
Dr. sc. hum.

## **In vitro Untersuchungen zur Stabilität von Morphin, Cocain und Abbauprodukten in Vollblut und Plasma**

Geboren am 19. 04. 1969 in Waibstadt

Reifeprüfung am 03. 05. 1988 in Mosbach (Baden)

Studiengang der Fachrichtung Lebensmittelchemie vom WS 1991/1992 bis WS 1996/1997

Zwischenprüfung am 10. 10. 1994 an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

1. Staatsexamen am 19. 11. 1996 an der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster

Promotionsfach: Rechtsmedizin

Betreuerin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. G. Skopp

Die Stabilität von Messgrößen in biologischem Untersuchungsmaterial stellt ein Kernproblem der präanalytischen Phase dar. Sie ist für Analyte in forensischen Blutproben von entscheidender Bedeutung, da aus den Ergebnissen Aussagen über das Ausmaß einer Beeinträchtigung abgeleitet werden, die erhebliche Rechtsfolgen für den Betreffenden nach sich ziehen können. Blutproben für forensische Untersuchungen sind einmalige Proben, die überwiegend ohne konservierende oder stabilisierende Zusätze gewonnen werden, häufig einer kurzfristigen Aufbewahrung bei höheren Temperaturen und längeren Transportwegen unterliegen. Nach dem Eintreffen im Labor werden die Proben regelmäßig nicht sofort analysiert. In der Regel werden die Proben 2 Jahre aufbewahrt, um im Laufe des Ermittlungsverfahrens auftretende Fragen gegebenenfalls nachprüfen zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die wesentlichen Einflussfaktoren Zeit, Temperatur und natürliches Licht auf Messgrößen in frischen Blut- und Plasma- sowie in Leichenblutproben systematisch zu untersuchen. Als Analyte wurden Morphin und seine Glucuronide als Hauptabbauprodukte des Heroins sowie Cocain gewählt. Weiterhin wurde im Hinblick auf den überwiegend oxidativen Abbau von Morphin und der vorrangig hydrolytischen Zersetzung von Cocain die Effektivität verschiedener spezifischer Zusätze zu frischem Blut geprüft.

Zu diesem Zweck wurden zwei Analysenmethoden mit hochdruckflüssigkeitschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion aufgebaut und validiert. Die ursprünglich geplante fluorimetrische Detektion von Morphin und seinen Glucuroniden wurde aufgrund von Matrixproblemen durch die massenspektrometrische Detektion ersetzt. Die gaschromatographische Bestimmung von Cocain und Hydrolyseprodukten stellte sich als unzureichend heraus, da Ecgonin als wesentliches Abbauprodukt nicht erfasst wurde.

Morphin und seine Glucuronide erwiesen sich in frischen Blut- und Plasmaproben unter Lichtausschluss als äußerst stabile Analyten, auch bei kurzfristiger thermischer Belastung der Proben bis 40°C. Maßnahmen, die einer oxidativen Zersetzung der Analyte entgegenwirken, erscheinen bei Proben, die Morphin enthalten, nicht zwingend erforderlich. Allerdings sollte bei einer Aufbewahrung bei Temperaturen über 4°C eine Analyse innerhalb von Tagen erfolgen, da die beiden pharmakologisch wirksamen Heroinmetaboliten Morphin und M6G nach der experimentell ableitbaren Reaktionskinetik erster Ordnung anfänglich sehr schnell abgebaut werden. Wesentliche Einflussfaktoren stellten eine Lichtexposition und ein bakterieller Befall des Untersuchungsmaterials dar. Letzterer spielt vor allem bei der Bewertung der Ergebnisse an Leichenblut eine Rolle, das nicht steril entnommen werden kann bzw. häufig

bereits bakteriell besiedelt ist. In Leichenblutproben ergaben sich individuell unterschiedliche Konzentrations-Zeitverläufe mit raschem Abbau von M3G und unterschiedlichem Anstieg der Morphinkonzentrationen. Leichenblutproben sollten daher bis zur Analyse tiefgefroren aufbewahrt werden. Bilanzierungen der Analytkonzentrationen ergaben, dass bisher nicht identifizierte Abbauprodukte entstehen, die in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden sollten.

Cocain erwies sich als äußerst instabiler Analyt mit stark temperaturabhängigem Zerstellungsprofil, das zusätzlich durch individuelle Esteraseaktivitäten im Blut beeinflusst wurde. Durch einen Zusatz von Fluorid oder Phenylmethylsulfonylfluorid konnte die Hydrolyse des Cocains nicht vollständig gestoppt, aber aufgehalten werden, so dass die pharmakologisch aktive Substanz über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden konnte. Diese Maßnahmen wirkten sich auch bei der Probenaufarbeitung günstig aus. Bei einer Hemmung der Esteraseaktivität in den Proben wurde die Bildung von EME unterdrückt, und es entstand mehr BE als in unbehandelten Proben. Die LC/MS/MS Analyse ließ nicht nur eine schonendere Analyse von Cocain zu, sie erwies sich auch als eine sogenannte *stability indicating method*. Der Zerfall von BE und EME, der erstmalig näher untersucht wurde, wurde ebenfalls stark durch die Temperatur beeinflusst. Ihr gemeinsames Hydrolyseprodukt ECG war unter allen experimentellen Bedingungen der stabilste Analyt und könnte daher auch in Proben, die über längere Zeit und bei erhöhten Temperaturen gelagert wurden, als qualitativer Beleg für einen Konsum der Droge herangezogen werden. Aufgrund des äußerst dynamischen in vitro Zerfallsmuster und einer bei forensischen Proben im Blutentnahmezeitpunkt unbekanntem pharmakokinetischen Phase erscheinen auch bei sorgfältig gelagerten Proben Rückschlüsse aus der Analytenprofil äußerst unsicher.

Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl für Morphin als auch für Cocain und ihre Abbauprodukte Vollblut die stabilere Matrix im Vergleich zu Plasma war. Stabilitätsdaten, die an Blutproben lebender Personen erhoben wurden, können, wie für Morphin und seine Glucuronide gezeigt, auf Leichenblutproben nicht übertragen werden. Eine Charakterisierung des Probenmaterials, insbesondere bei Leichenblut, erscheint sinnvoll. Der Zusatz stabilisierender Stoffe bei der Blutentnahme ist auf jeden Fall zu empfehlen, ebenso wie eine rasche Einsendung an das Untersuchungslabor. Für Cocain erscheint dann eine Kurzzeitverwahrung von 1 bis 2 Tagen im Kühlschrank ausreichend, bei längerer Aufbewahrungsdauer bis zur Analyse sollte die Blutprobe nach dem Abseren tiefgefroren werden.