

Vergleichende Morphinbestimmung an Gehirnteilen mittels kombinierter GC/MS

Eine Möglichkeit zur Eingrenzung der Überlebenszeit*

W. Vycudilik

Institut für gerichtliche Medizin der Universität Wien,
Sensengasse 2, A-1090 Wien, Österreich

Comparative Morphine Determination in Brain Segments by GC/MS

A Means of Determining the Survival Time

Summary. Comparison of the morphine concentrations in the medulla oblongata and the cerebellum provides information on the interval between morphine administration and death. If this period is short, the ratio of $C_{Med} : C_{Cereb}$ is below 1. The ratio is above 1 if a number of hours have passed at least. The balance of the morphine concentrations is achieved within a few hours. Results have been achieved by gas chromatography/mass spectrometry analysis in about 100 autopsy cases.

Key words: Morphine determination in brain segments, GC/MS – Time of survival after application of morphine alkaloids

Zusammenfassung. Die vergleichende Morphinbestimmung in der Medulla oblongata und im Cerebellum erlaubt einen Hinweis auf die Zeitspanne zwischen Morphinaufnahme und Todeszeitpunkt. Das Konzentrationsverhältnis $C_{Med} : C_{Cereb}$ ist kleiner als 1, wenn diese Zeitdifferenz kurz ist; liegen zwischen Aufnahme und Tod zumindest viele Stunden, ist der Quotient größer als 1. Eine Gleichverteilung der Morphinkonzentration entsteht im Verlauf von wenigen Stunden. Die Ergebnisse basieren auf der Untersuchung von etwa 100 Obduktionsfällen; die Morphinkonzentrationen wurden mittels GC/MS bestimmt.

Schlüsselwörter: Morphinbestimmung in Gehirnteilen, GC/MS – Überlebenszeit nach Zufuhr von Morphinalkaloiden

* Auszugweise vorgetragen auf der 65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in St. Gallen, 9.–13.9.1986

Einleitung

Der qualitative und quantitative Nachweis von Morphin führt zur Frage nach dem Zeitpunkt der Alkaloidzufuhr und deren toxikologischer Wirkung. Die kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) erweist sich wegen der hohen Nachweisempfindlichkeit und Spezifität für forensische Untersuchungen als besonders geeignet (Baselt 1978; Drost et al. 1984; Maurer et al. 1984; Paul et al. 1985).

Wenn niedrige Morphinkonzentrationen oder konkurrierende Todesursachen vorliegen, ist die Interpretation der Analysenwerte besonders schwierig. Die vergleichende Morphinbestimmung in verschiedenen Kompartimenten und die Konzentrationsverhältnisse zwischen Morphin und seinen Metaboliten können einen Hinweis auf die Verweildauer im Organismus geben. Von Meyer (1982) hat die Konzentrationsverhältnisse zwischen Lunge und Blut, bzw. Lunge und Leber bestimmt und auf die Möglichkeit verwiesen, den akuten Rauschgifttod vom Tod nach langer Überlebenszeit zu unterscheiden. 1986 präsentierten Spiehler und Brown am TIAFT-Kongress in Gent Ergebnisse, die belegen, daß eine Korrelation zwischen der Überlebenszeit und dem Verhältnis der Morphin- und Morphin-3-glucoronidkonzentration im Blut besteht. In Obduktionsfällen, deren Vorgeschichte auf die mögliche Morphineinnahme hinweist, untersuchen wir seit 1981 nicht nur Blut, Harn, Gallenflüssigkeit und Lebergewebe, sondern auf die leicht darstellbaren Gehirnteile Medulla oblongata und Cerebellum.

Zu prüfen war, ob ein Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsverhältnis des Morphins in beiden Gehirnteilen und der Überlebenszeit besteht. Außerdem erschien uns wichtig, den Morphinspiegel in den verschiedenen Gehirnteilen mit den Konzentrationen in anderen Organen und Körperflüssigkeiten zu vergleichen.

Material und Methoden

Zu Beginn dieser Untersuchungen war die quantitative Bestimmung auch mittels EMIT^R-dau (E. Merck) durchgeführt worden; sowohl wegen der Möglichkeit nicht vorhersehbarer Kreuz- und Störreaktionen, als auch der – im Vergleich zu massenspektrometrischen Werten – großen Differenzen der Resultate, war EMIT für diese Aufgabe nicht geeignet. Daher wurde ausschließlich die kombinierte GC/MS angewendet.

Im Zuge der quantitativen Bestimmung von Morphin im biologischen Untersuchungsgut wurde auch ein für den Spurenbereich nicht unbeträchtlicher Morphingehalt in handelsüblichen pharmazeutischen Nalorphinzubereitungen festgestellt: 1 µg Nalorphin enthielt ca. 1 bis 0,5 ng Morphin (1000–500 ppm). Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses ist daher eine Reinigung des Handelsprodukts unerlässlich.

Um Komplikationen beim Vorliegen von Nalorphin im Untersuchungsgut zu vermeiden, wurde 3-O-n-Pentylmorphin auf seine Tauglichkeit als innerer Standard für die quantitative Analyse mittels GC/MS geprüft. Die Isolierung dieses Derivats erfolgt mit einfachen Hilfsmitteln, wie Dünnschicht- oder Säulenchromatographie, bis zur notwendigen Reinheit.

Probenvorbereitung

Ausgangsmaterial für die Analyse stellen Kleinhirn und Medulla oblongata dar. Die Medulla wird zur Gänze verarbeitet, vom Kleinhirn gelangt ein aliquoter Teil der Hemisphären zur

Untersuchung. Das Gewebe (ca. 10 g auf 100 ml Puffer) wird in Phosphatpuffer pH 7,4 mit einem Ultraturrax homogenisiert, zentrifugiert (10^4 g) und die Lösung durch ein Sieb mit der Maschenweite 1 mm von den groben und aufschwimmenden Zellresten abgetrennt. Aus dieser wässrig kolloidalen Lösung werden nach Zugabe des internen Standards ($10 \mu\text{l}$ einer Lösung von 2,5 mg Pentylmorphin pro Milliliter Chloroform) die niedermolekularen organischen Substanzen durch Adsorption an gereinigtem¹ Amberlite XAD-4-Harz (ca. 5 g) isoliert. 50 ml Ethylacetat Isopropanol (9:1 v/v) eluieren die adsorbierten organischen Substanzen vom Harz.

Das Eluat wird – zusammen mit 0,5 ml 10%iger wässriger Weinsäure – im Rotavapor vom Lösungsmittel befreit, und der wässrige Rückstand sauer und basisch getrennt. Die basische Fraktion (bzw. ein aliquoter Teil) wird mit $50 \mu\text{l}$ N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) bei 80°C 20 min derivatisiert. Davon werden jeweils $0,8 \mu\text{l}$ „splitless“ in die Kapillarsäule injiziert.

Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Die gaschromatographische Trennung erfolgt auf einer 25 m langen, mit Methylpolysiloxan (HP Ultraphase) belegten Quarzkapillare, deren innerer Durchmesser 0,31 mm beträgt. Sie ist über eine Quarzkapillare mit innerem Durchmesser von 0,1 mm mit einem doppelfokussierenden Massenspektrometer MAT 112 (70eV, positives EI-Spektrum) direkt gekoppelt. Die gaschromatographisch/massenspektrometrischen Daten werden von einem Integrator 3390A von Hewlett Packard bzw. von einem LABCOM.1 Computer (MSS-G.B.) ausgewertet. Das Molekülion von Morphin-bis-trimethylsilylether der Masse M/e 429 wird mit einer Genauigkeit der Massenbestimmung von ± 10 ppm bei einer Auflösung von 1500 detektiert. Die Ofentemperatur des Gaschromatographen wird von 200°C auf 280°C mit einer Aufheizrate von $20^\circ\text{C}/\text{min}$. programmiert. Die Temperaturen von Einspritzteil und Transferleitung sind auf 280°C eingestellt. Die Strömungsgeschwindigkeit des Trägergases Helium beträgt $1,5 \text{ ml}/\text{min}$. Zur quantitativen Auswertung werden die Peakflächen von Standards entsprechender Konzentration mit den Flächen der zu untersuchenden Proben verglichen (Abb. 1).

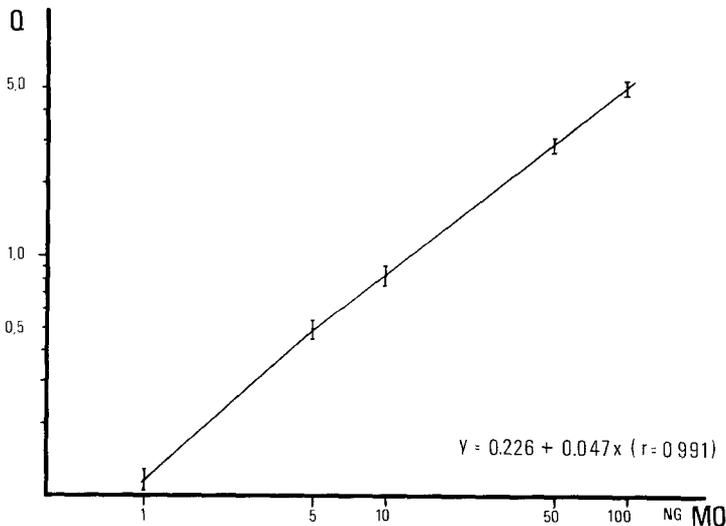


Abb. 1. Eichkurve zur Bestimmung von Morphin mittels Einzelionenregistrierung der Masse m/e 429 (Q = Verhältnis der Peakfläche von Morphin und 3-n-Pentylmorphin)

¹ Die Reinigung dieses käuflichen Produkts umfasst die Extraktion am Soxhlet Extraktor mit Aceton, sowie die Entfernung dieses Lösungsmittels vom Harz durch kontrollierte Destillation aus einer wässrigen Suspension

Synthese des 3-O-n-Pentylmorphin (7,8-Didehydro-4,5-epoxy-3-n-pentoxy-17-methylmorphinan-6-ol; Vycudilik 1977; Dabre 1978)

200 Mikromol Morphin (56 mg) werden in einem Gemisch aus 4 ml N,N-Dimethylacetamid, 1 ml Methanol und 80 µl einer 24%igen, methanolischen Tetramethylammoniumhydroxidlösung (w/v) gelöst. Nach Zugabe von 400 mg n-Pentyljodid wird das Reaktionsgemisch 10 min lang am Vortexrührer gemischt, danach die Reaktion durch Eingießen in kaltes Wasser gestoppt und das Reaktionsprodukt mit 20 ml Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wird mit wenig Natriumsulfat (wasserfrei) getrocknet, das Lösungsmittel am Rotavapor abdestilliert und der Rückstand auf einer Kieselgelsäule (3 cm × 20 cm; Kieselgel 60, 0,2–0,5 mm) mit Chloroform/Ethanol 80:20 (v/v) gereinigt. Der Rf-Wert von 3-O-n-Pentylmorphin beträgt 0,42; der Wert von Morphin, dem Ausgangsmaterial, 0,12.

Ergebnisse

Die gaschromatographische Trennung auf einer 25 m langen Quarzkapillare ergibt bei 260°C folgende Retentionsindices (Tabelle 1):

Das EI-Massenspektrum von 3-O-n-Pentylmorphintrimethylsilylether (Abb. 2) zeigt intensive Bruchstücke der Massen 429 (M + 2), 399 (M – 28) und 371 (M – 56), die auch jeweils in den Spektren der Trimethylsilylether von Morphin, 6-Acetylmorphin und Codein dominieren (Tabelle 2).

Meßergebnisse von den Gehirnteilen

Seit 1981 sind nach diesem Verfahren an die hundert Gehirne untersucht worden. 62 Beobachtungen sind hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes hinreichend dokumentiert. Eine Auswahl dieser anamnestisch gut belegten Fälle findet sich in den Tabellen 3–5. Von den verbleibenden 40% des Untersuchungsgutes ist der Zeitpunkt der Alkaloidzufuhr unbekannt.

Die massenspektrometrisch gemessenen Konzentrationen von unkonjugiertem Morphin in Medulla und Cerebellum liegen in der Mehrzahl der Fälle unter 0,1 ppm². Im selben Bereich finden sich die Morphinkonzentrationen im Blut

Tabelle 1. Retention der TMSi-Derivate (SE-30, 260°C)

Von:	Se- kunden	RR	RI
Dihydrocodein	236	0,48	2438
Codein	270	0,55	2505
Oxycodon	299	0,60	2553
Morphin	305	0,62	2563
6-Acetylmorphin	334	0,67	2606
Hydromorphon	345	0,70	2621
Nalorphin	393	0,79	2679
3-O-n-pentylmorphin	495	1,00	2781

² Einzelwerte (gerundet) reichen bis in den mittleren ppm-Bereich. ppm: *part per million* (z. B. 1 µg/g). ppb: 10⁻³ ppm

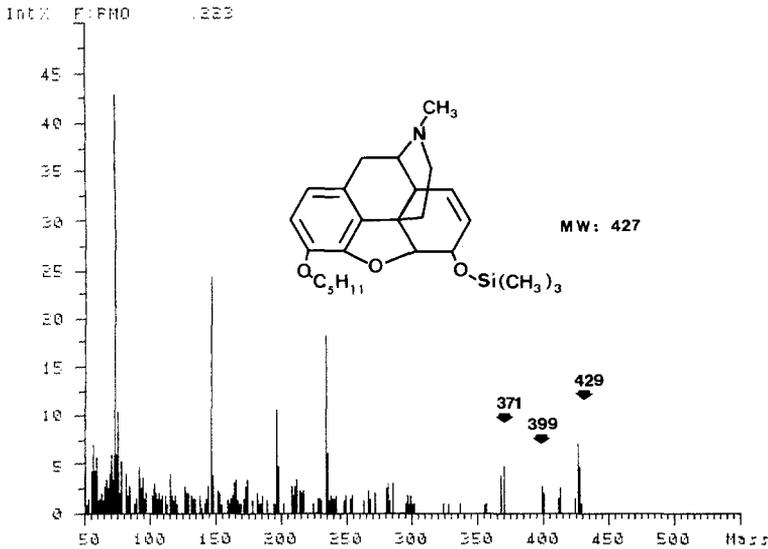


Abb. 2. EI-Massenspektrum (70 eV) des 3-O-n-Pentyl-6-O-trimethylsilyl-morphins

Tabelle 2. EI-Fragmente der TMSi-Derivate

Von:	Nominelle Masse				
	429	399	371	285	235
Dihydrocodein				+	
Codein			+		+
Oxycodon	+		+		+
Morphin	+		+		+
6-Acetylmorphin		+		+	
Hydromorphon	+				
Nalorphin			+		+
3-O-n-pentylmorphin	+	+	+	+	+

Tabelle 3. Beispiele für Fälle mit einem Quotienten $C_{Med.}/C_{Cereb.} < 1$

Fall	Morphinkonzentration in ppb			Quotient	Überlebenszeit (h)
	Medulla	Cerebellum	Blut		
Ch 491/82	50	500	500	0,1	0,5
Ch 1464/83	110	260	300	0,4	0,5
Ch 26/86	10	15	14	0,7	0,5
Ch 412/86	350	460	1700	0,7	<1

Tabelle 4. Beispiele für Fälle mit einem Quotienten $C_{Med.}/C_{Cereb.} > 1$

Fall	Morphinkonzentration in ppb			Quotient	Überlebenszeit (h)
	Medulla	Cerebellum	Blut		
Ch 1349/81	20	10	10	2	> 48
Ch 901/82	60	10	70	6	> 24
Ch 1208/82	7	2	n.n.	3	> 6
Ch 104/84	20	2	20	10	> 20
W.I.	20	3	–	6	100
H.H.	120	30	–	4	20

n.n., nicht nachweisbar

Tabelle 5. Beispiele für Fälle mit einem Quotienten $C_{Med.}/C_{Cereb.}$ näherungsweise ~ 1

Fall	Morphinkonzentration in ppb			Quotient	Überlebenszeit (h)
	Medulla	Cerebellum	Blut		
Ch 227/84	60	40	7	1,5	1,5
Ch 932/84	250	260	–	1	1,5
Ch 1119/85	50	30	60	1,6	1–5
P.J.	100	125	–	0,8	< 2
E.N.	440	430	–	1	1

(Abb. 3). Erwartungsgemäß werden die Konzentrationen bei länger zurückliegender Morphinapplikation niedriger und können auch unter die Erfassungsgrenze von $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ sinken.

Die statistische Auswertung der toxikologischen Befunde wird nach Einbeziehung weiterer Beobachtungen Gegenstand künftiger Arbeiten sein.

Diskussion

Die absoluten Konzentrationswerte in den untersuchten Gehirnteilen – wie auch im Blut – sind sehr variabel und im Hinblick auf eine Eingrenzung der Überlebenszeit nicht genügend aussagekräftig.

Nach Quotientenbildung der Morphinkonzentrationen in Medulla und Kleinhirn lassen sich drei Gruppen unterscheiden:

$$C_{Med.}/C_{Cereb.} < 1$$

$$C_{Med.}/C_{Cereb.} \sim 1$$

$$C_{Med.}/C_{Cereb.} > 1$$

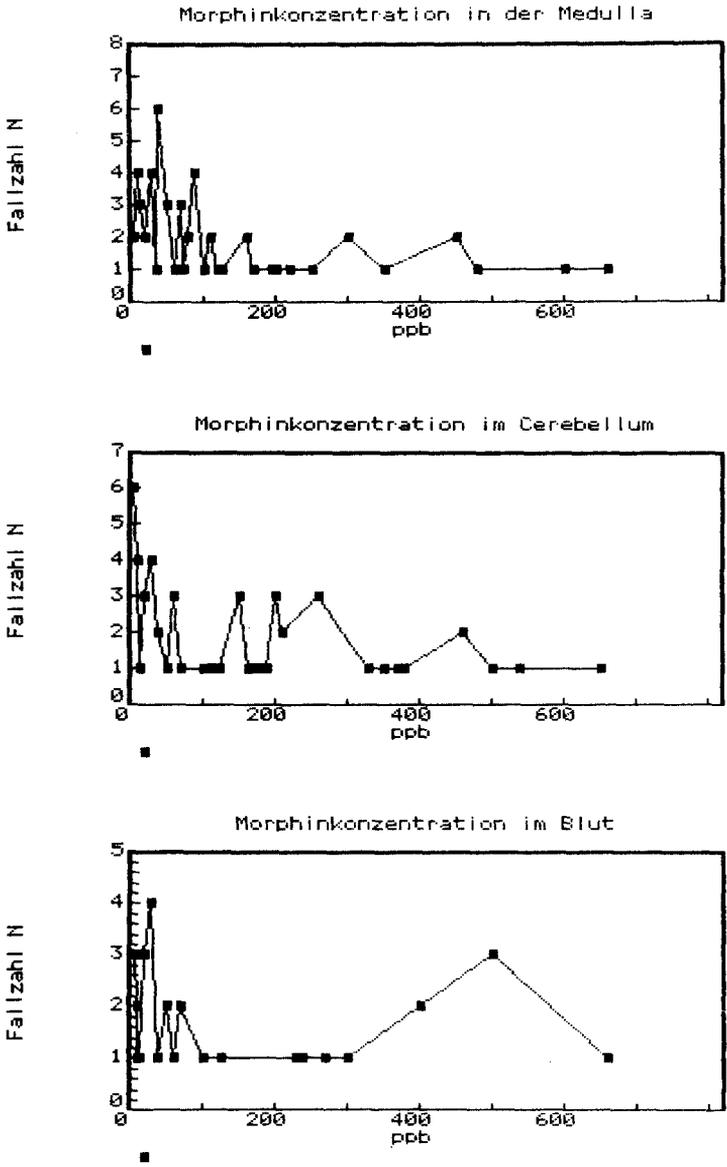


Abb. 3. Häufigkeitsverteilung der absoluten Morphinkonzentration in Medulla obl., Cerebellum und Blut (100 ppb = 100 ng/g)

Das Verhältnis $C_{Med.}/C_{Cereb.}$ liegt *unter 1*, wenn die Zeitspanne zwischen der Morphinaufnahme und dem Todeszeitpunkt *kurz* ist, d.h. entsprechend der Vorgeschichte bzw. den Zeugenaussagen weniger als eine Stunde betragen hat. Aus dem untersuchten Kollektiv ist etwa ein Viertel der Fälle dieser Gruppe mit perakutem Verlauf zuzuordnen. In Tabelle 3 sind vier Fälle zusammengefaßt, deren Vorgeschichte durch Zeugenaussagen hinreichend dokumentiert ist.

Beträgt die Zeitspanne zwischen Morphinaufnahme und Todeseintritt *zumindest viele Stunden*, liegt das Verhältnis der Morphinkonzentrationen *über 1*. Repräsentative und ausführlich belegte Fälle sind in Tabelle 4 dargelegt. Bei ihnen fehlt zumeist ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Morphinaufnahme und Tod.

Einer Gleichverteilung der Morphinkonzentrationen in Medulla und Kleinhirn entspricht das Verhältnis um 1 und stellt sich im Verlauf von wenigen Stunden ein. In Tabelle 5 sind einige Fälle zusammengestellt, deren Zeitverlauf durch Zeugenaussagen oder Krankengeschichten zu belegen war.

Die Ergebnisse lassen sich mit Hilfe pharmakologischer Rezeptormodelle interpretieren: Simon und Mitarbeiter stellten schon 1973 eine unterschiedliche Verteilungsdichte von Morphinrezeptoren in den beiden Gehirnteilen fest (Hiller et al. 1973). Später wurden die regionale Verteilung im Gewebe und die unterschiedlichen Eigenschaften der Rezeptoren untersucht (Simon 1984). Im Cerebellum ist die Zahl der spezifischen Morphinrezeptoren sehr niedrig, doch lassen sich dort auch andere Rezeptoren ähnlicher Art in großer Zahl nachweisen (Maurer et al. 1983).

Spiehler et al. konnten 1978 mittels RIA keinen Zusammenhang zwischen den absoluten Morphinkonzentrationen in bestimmten Gehirnteilen und der Überlebenszeit finden. Sie versuchten eine Korrelation mit interindividuellen Durchschnittswerten, ohne die Verteilung innerhalb des individuellen Gehirns zu berücksichtigen. Mullis et al. haben 1979 die zeitliche Konzentrationsänderung von Morphin im Rattengehirn nach subcutaner Injektion ermittelt und einen biphasischen Verlauf festgestellt. Pare et al. (1984) vermuteten eine Abhängigkeit von der Morphinkonzentration im Gehirn und der Überlebenszeit.

Abbildung 4 zeigt eine einfache schematische Darstellung, die auf der Annahme von mindestens zwei Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität beruht: in

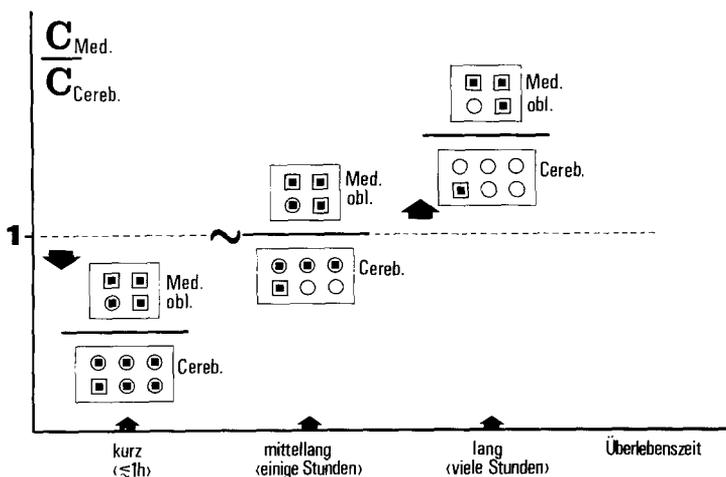


Abb. 4. Schematische Morphinverteilung auf die Kompartimente Medulla obl. und Cerebellum in Abhängigkeit von der Überlebenszeit. □ Stereospezifische Morphinrezeptoren, ○ unspezifischer Rezeptor, ■ Morphin (alkaloid)

Tabelle 6. Morphin- und 6-Acetylmorphinverteilung in Medulla und Cerebellum in Fällen von Heroinzufuhr

Fall	Konzentrationsverhältnisse		Kommentar
	Q _{Mo}	Q _{AcMo}	
Ch 587/85	1,4	1,0	Heroinapplikation einige Stunden Überlebenszeit
Ch 891/85	0,5	20	Morphinapplikation nach Heroininjektion
Ch 946/85	0,6	0,6	Heroininjektion kurze Zeitspanne
Ch 1119/85	1,6	1,7	Heroinapplikation einige Stunden Überlebenszeit
Ch 26/86	0,7	1,5	Morphinapplikation nach Heroininjektion

Q_{Mo}: Verhältnis der Morphinkonzentration in Medulla und Cerebellum

Q_{AcMo}: Verhältnis der 6-Acetylmorphinkonzentration in Medulla und Cerebellum

der Medulla sind *stereospezifisch bindende* Morphinrezeptoren in relativ hoher Verteilungsdichte nachgewiesen; das Kleinhirn enthält eine große Zahl anderer Rezeptoren, die Morphinalkaloide *unspezifisch binden*. Im Stadium der Anflutung und kurz danach ist die Konzentration im Cerebellum höher als in der Medulla. Nach dem Ausgleich der Konzentration in einem weiter gespannten Zeitrahmen entsteht neuerlich eine ungleiche Verteilung; die Morphinkonzentration ist dann in der Medulla größer als im Kleinhirn. Eine zeitabhängige, ungleiche Konzentrationsverteilung ist auch bei 6-Acetylmorphin, einem Metaboliten von Heroin, zu beobachten. Bei unterschiedlichen Verhältnissen läßt sich so eine zu verschiedenen Zeiten erfolgte Morphin- und Heroinapplikation unterscheiden (Tabelle 6).

Darüber hinaus ermöglicht die chemische Untersuchung der Medulla auch dann noch den Nachweis einer Morphinaufnahme, wenn die Konzentration im Blut bereits unter die Nachweisgrenze abgesunken ist. Der Morphin-Rezeptor-Komplex im Gehirn stellt ein Kompartiment höherer Konzentration dar.

Zur toxikologischen Interpretation sollten unseres Erachtens nicht nur die Absolutwerte, sondern auch das Verhältnis der Konzentrationen in den beiden Gehirnteilen herangezogen werden. Auf diese Weise ist die individuell unterschiedliche Rezeptordichte berücksichtigt.

Literatur

Baselt RC (1978) Disposition of toxic drugs and chemicals in man. In: Vol. 1: Centrally acting drugs. Biomedical Publications, Canton, Connecticut, pp 10–13

- Darbre A (1978) Esterification. In: Blau K, King GS (eds) Handbook of derivatives for chromatography. Heyden, p 76
- Drost RH, van Ooijen RD, Ionescu T, Maes RAA (1984) Determination of morphine in serum and cerebrospinal fluid by gas chromatography and selected ion monitoring after reversed-phase column extraction. *J Chromatogr* 310:193-198
- Hiller JM, Pearson J, Simon EJ (1973) Distribution of stereospecific binding of the potent narcotic analgesic etorphine in the human brain: predominance in the limbic system. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 6:1052-1062
- Maurer H, Pflieger K (1984) Screening procedure for the detection of opioids, other potent analgesics and metabolites in urine using a computerized gas chromatographic mass spectrometric technique. *Fresenius Z Anal Chem* 317:42-52
- Maurer R, Cortes T, Probst A, Palacios JM (1983) Multiple opiate receptor in human brain: an autoradiographic investigation. *Life Sci* 33:231-234
- v. Meyer L (1982) Die Arzneistoffkonzentration im Lungengewebe – ihre Bedeutung für die forensische Toxikologie. 12. Kongress der internationalen Akademie für gerichtliche und soziale Medizin, Wien
- Mullis KB, Perry DC, Finn AM (1979) Morphine persistence in rat brain and serum after single doses. *J Pharmacol Exp Ther* 208:228-231
- Pare EM, Monforte JR, Thibert RJ (1984) Morphine concentrations in brain tissue from heroin-associated deaths. *J Anal Toxicol* 8:213-216
- Paul BD, Mell LD Jr, Mitchell JM, Irving J, Novak AJ (1985) Simultaneous identification and quantitation of codeine and morphine in urine by capillary gas chromatography and mass spectroscopy. *J Anal Toxicol* 9:222-226
- Simon JE (1984) Opiate receptors. In: Lajtha A (ed) Handbook of Neurochemistry, 2. Ed. Plenum Press, New York London, pp 331-352
- Spiehler VR, Cravey RH, Richards RG, Elliott HW (1978) The distribution of morphine in the brain in fatal cases due to the intravenous administration of heroin. *J Anal toxicol* 2:62-67
- Spiehler VR, Brown R (1986) Unconjugated morphine in blood by radioimmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. 23. Kongress der TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists), Gent 1986. *J Forensic Sci* (in press)
- Vycudilik W (1977) Der Nachweis von Barbituraten im biologischen Material. *Beitr Gerichtl Med* 35:213-220

Received July 13, 1987