

Zum Nachweis von Morphin und Codein in Blutproben mit GC/MS (NCI und PCI) und zur Unterscheidung einer Codeinaufnahme von Heroin- oder Morphinkonsum

G. Schmitt, M. Bogusz, R. Aderjan und C. Meyer

Institut für Rechtsmedizin, Universität Heidelberg, Vosstrasse 2, D-6900 Heidelberg,
Bundesrepublik Deutschland

Eingegangen 7. Dezember 1989

Differentiation of morphine abuse from codeine abuse by means of GC/MS examination of blood

Summary. Morphine and codeine were isolated from blood with C18 Bond Elut columns and derivatised with pentafluoropropionic anhydride (PFPA). The PFPA-derivatives were examined by means of gas chromatography/mass spectrometry using electron impact and chemical ionisation (positive and negative mode). The negative chemical ionisation, as most sensitive, was applied for the quantitation of both examined substances in forensic blood samples.

Key words: Morphine, examination in blood samples – Codeine, examination in blood samples – Differentiation of morphine from codeine abuse

Zusammenfassung. Morphin und Codein wurde mittels C18-Säulenextraktion isoliert und mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA) derivatisiert. Die PFPA-Derivate wurden gaschromatographisch und massenspektrometrisch untersucht und hinsichtlich ihrer optimalen Nachweismöglichkeit verglichen. Aufgrund unserer Untersuchungsergebnisse ist die C18-Säulenextraktion in Kombination mit der negativ-chemischen-Ionisation (NCI) besonders zum Nachweis von derivatisiertem Codein und Morphin geeignet. Die Bestimmungsgrenze liegt derzeit bei etwa 2 bis 5 µg Morphin oder Codein pro Liter Blut.

Schlüsselwörter: Morphin, Nachweis in Blutproben – Codein, Nachweis in Blutproben – Heroinkonsum, Unterscheidung von Codeinaufnahme

1. Einleitung

Die Körperflüssigkeit, die am ehesten den Nachweis einer vorausgegangenen Aufnahme von Heroin zuläßt, ist der Urin, sofern er in ausreichender Menge abgegeben wurde. Bekannte Probleme bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse sind die Differenzierung zwischen der Aufnahme von Heroin und/oder Codein aus Tabletten als Ersatzdroge. Auch bei reiner Codeinaufnahme liegt in der Endphase der Elimination die Morphin- über der Codeinkonzentration [1]. Fehn und Megges sowie andere Autoren wiesen auf die Möglichkeit hin, über Monoacetylmorphin einen Heroinkonsum nachzuweisen [2–6]. Sticht, Käferstein und Staak gelang es, Monoacetylmorphin neben freiem und gebundenen Morphin und Codein in Urinproben nachzuweisen und über das Konzentrationsverhältnis von freier Codein- zu Morphinbase auf die Verbringungsform rückzuschließen. Ist das Konzentrationsverhältnis unter 0,5, so kann mit 98%iger Wahrscheinlichkeit von einem Heroin- oder Morphinkonsum ausgegangen werden [7].

Zunehmend häufiger verweigern jedoch die Betroffenen die freiwillige Abgabe einer Urinprobe, und die Ermittlungsbehörden sind gezwungen, entsprechend der Alkoholuntersuchung die Blutprobe als Untersuchungsmaterial heranzuziehen. Aus der wesentlich geringeren Probenmenge und der gegenüber Urin um 2 bis 3 Zehnerpotenzen niedrigeren Konzentration stellt sich zunächst das Problem einer zufriedenstellenden Aufarbeitung, das durch geringe Wiederfindung bei der Extraktion von Morphin und Codein gekennzeichnet ist. Zum anderen sollte der Nachweis aus Blut die akute Beeinflussung durch Morphin/Heroin oder Codein anhand meßbarer Konzentrationen bewertbar machen. Konzentrationen von Morphin oder Codein in Blut unter $100\ \mu\text{g/l}$ können mit massenspektrometrischer Einzelionendetektion unter Verwendung von EI-, besonders aber PCI- oder NCI-Technik nachgewiesen werden.

Die immunochemischen Untersuchungen für Blut und Urin sind Vortests, erfassen alle Opiate entsprechender Struktur und lassen die Unterscheidung zwischen Morphin und Codein nicht zu. Ein weiterer Nachteil der üblichen immunochemischen Untersuchungen ist, daß weniger die freien, sondern vor allem die als Glucuronid gebundenen Anteile erfaßt werden, obwohl sie pharmakologisch inaktiv sind und das Morphin-Glucuronid die Blut/Gehirn-Schranke nicht passieren kann. Die immunochemische Bestimmung des freien Morphins ist mit speziellen Tests möglich [8].

Heroin wird im Blut schnell über 6-Monoacetylmorphin zu Morphin hydrolysiert. Die Plasmahalbwertszeit von Heroin beträgt etwa 3, die von 6-Monoacetylmorphin etwa 38 Min. [9, 10]. 6-Monoacetylmorphin wird auch *in vitro* durch eine im Blut vorhandene Esterase weiter zu Morphin abgebaut [10]. Morphin und Codein besitzen im Gegensatz dazu eine Plasmahalbwertszeit von etwa 2 bis 4 Std. und sind daher auch noch Stunden nach ihrer Einnahme nachweisbar. Die Halbwertszeiten können sich durch Induktion des mikrosomalen Enzymsystems (Gewöhnung und Abhängigkeit) verkürzen. Nach einer Codeineinnahme wird auch Morphin als aktiver Metabolit gebildet. Es ist daher wie bei der Urinanalyse sinnvoll, die Konzentration von Morphin und Codein im Blut zu bestimmen und über das Konzentrationsverhältnis zu versuchen, eine Aussage über die Verbringungsform zu treffen, falls nicht Monoacetylmorphin direkt nachweisbar ist. Aus Gründen der Spezifität und der breiten Anwendungsmöglichkeit für andere Betäubungsmittel wählten wir die Derivatisierung mit PFPA (Abb. 1). Die

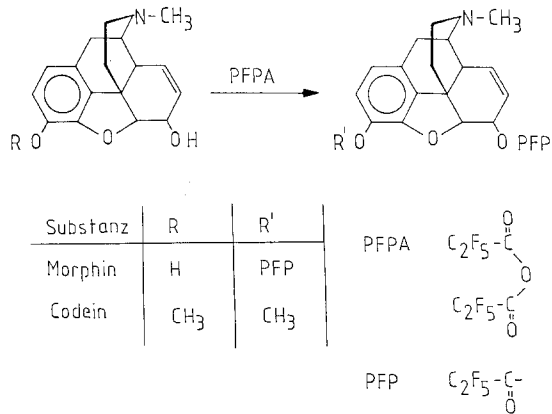


Abb. 1. Derivatisierung von Morphin und Codein mit PFPFA

EI-Spektren der PFPFA-Derivate von Morphin und Codein wurden bereits 1988 von J. Fehn beschrieben [3].

Ziel dieser Arbeit war es, die PFPFA-Derivate von Codein und Morphin gaschromatographisch und massenspektrometrisch mit verschiedenen Ionisationstechniken zu untersuchen und die dabei gewonnenen Erkenntnisse bei der Untersuchung von Blutproben im angesprochenen Sinne anzuwenden.

2. Experimentelles

2.1. Probenmaterial. Zur Verfügung standen 13 Blutproben, die von polizeilichen Kontrollmaßnahmen im Straßenverkehr oder hauseigenen Sektionen stammten. Die Proben sind mit dem Präfix S für Sektion, Ba für Blutalkohol und Ch für chemisch-toxikologische Untersuchung ohne Blutalkohol versehen.

2.2. Standards. Es wurden methanolische Standards (je 1 mg/ml) von Morphin und Codein durch Einwiegen der Hydrochloride hergestellt. Die Standardlösungen sind im Gegensatz zu den PFPFA-Derivaten monatelang unzersetzt haltbar. Für Zusätze bis etwa 1 mg Codein oder Morphin pro Liter Blut als externen Standard ergab sich eine lineare Beziehung zwischen Konzentration und Peakfläche.

2.3. Extraktionsmethode. Die Extraktionsmethode basiert auf einer Vorschrift von Schubert und Schubert [11] und geht von 1 ml Blut aus (Abb. 2). 1 ml Blut wird mit 0,5 ml Ethanol versetzt und für 10 Min. im Kühlschrank bei ca. 5°C aufbewahrt. Danach werden 6,5 ml einer eiskalten 0,1 M Sodapufferlösung (pH 9) zugegeben. Nach dem Zentrifugieren wird der gesamte Überstand durch eine mit 3 ml Methanol und 3 ml Wasser vorkonditionierte C-18 Säule (Analytischem 3 ml) gesaugt. Die Säule wird mit 3 ml Wasser gespült und 10 Min. unter Wasserstrahlvakuum belassen. Die Elution erfolgt mit 1,5 ml einer Mischung aus Dichlormethan/Aceton (1:1). Die Lösung wird mit Stickstoff zur Trockne eingengt und mit 50 µl Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPFA) für 1 Std. im geschlossenen GC-Gläschen auf 60°C erwärmt. Danach werden das überschüssige PFPFA mit Stickstoff abgeblasen und die Extraktionsrückstände in 30 µl Essigsäureethylester aufgenommen. Die Extrakte sind auch bei der Verwendung von Sektionsblut farblos. Die Wiederfindung beträgt für Codein 93% und für Morphin 71% und bestätigt die von Schubert und Schubert angegebenen Werte (Codein 93% und Morphin 68%).

2.4. Gaschromatographie und Massenspektrometrie. Zur Messung der GC/MS-Spektren wurde ein HP 5988 Massenspektrometer in Kombination mit einem HP 5890 Gaschromatographen

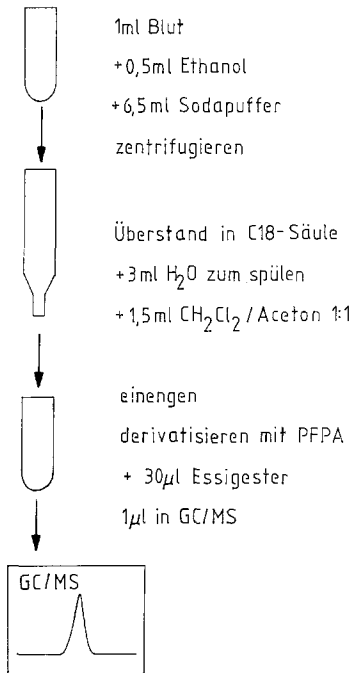


Abb. 2. Probenvorbereitung und Derivatisierung (Schubert 1989)

(Hewlett Packard GmbH, Waldbronn) verwendet. Die Auswertung erfolgte mit einer HP 59970 Workstation.

Als Trennsäule diente eine Kapillare CP-SIL 5 (12 m, 0,24 mm ID, Filmdicke 0,1 μm). Der Splitless-Injector und das Interface wurden auf 250°C geheizt. Die Trennung wurde nach 1 Min isotherm bei 200°C temperaturprogrammiert mit 20°C/Min bis 300°C durchgeführt. Diese Endtemperatur wurde dann für 1 Min gehalten.

2.5. Immunochemischer Vortest. Zur Untersuchung der Blutproben mit der Fluoreszenzpolariation (FPIA, TDx-Meßsystem Abbott GmbH, Wiesbaden) wurde 1 ml einer Blutprobe mit 3 ml Aceton versetzt und zum Überstand nach Einengung im Stickstoffstrom 0,5 ml Wasser gegeben. Die derartig aufkonzentrierte Probe kann direkt vermessen werden. Der „cut-off“ dieser Methode liegt bei ca. 100 μg Opiate/l Blut [12] relativ hoch. Die Messung mit RIA erfolgte ohne weitere Probenvorbereitung direkt aus Blut. Der „cut-off“ für RIA liegt bei ca. 20 μg Opiate/l Blut. Bei den von uns verwendeten immunochemischen Methoden werden sowohl gebundene als auch freie Opiate erfaßt. Eine Differenzierung zwischen Codein und/oder Morphin ist mit diesen immunochemischen Methoden nicht möglich.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Derivatewahl

Gängige Derivatisierungsmethoden für Morphin und Codein für die Gaschromatographie sind mit Acetanhydrid, Trifluoracetanhydrid, Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA), Heptafluorbuttersäureanhydrid, *N*-Methyl-bis-Trifluoracetamid (MBTFA) und *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) bekannt [13–16]. Die Derivatisierung mit PFPA ist auch für andere Betäubungsmittel anwendbar [17].

Tabelle 1. Retentionsindex (RI) nach Kovats (Säule: CP-SIL 5) und m/z-Werte für verschiedenen Ionisationsarten (EI, PCI, NCI) in Klammer die Intensität in Prozent

PFFPA-Derivat von	RI	EI	PCI	NCI
Morphin	2140	577 (15)	578 (100)	557 (38)
		414 (100)	577 (71)	538 (24)
			558 (55)	537 (100)
			415 (96)	517 (11)
			414 (22)	513 (29)
				429 (11)
				412 (19)
				411 (86)
				391 (12)
		Codein	2150	446 (18)
445 (100)	474 (46)			425 (100)
	447 (17)			
	446 (78)			
	445 (61)			
	426 (14)			
	283 (21)			
	282 (100)			
Dihydrocodein	2160	448 (23)	448 (100)	427 (100)
		447 (100)	284 (32)	383 (36)
		284 (43)		407 (24)
		300 (15)		
6-Monoacetylmorphin	2260	474 (13)	474 (15)	537 (28)
		473 (56)	473 (12)	414 (23)
		415 (22)	415 (22)	413 (100)
		414 (100)	414 (100)	412 (16)
		361 (13)		411 (54)
				385 (52)
		325 (18)		

3.2. GC/MS Parameter

In Tabelle 1 werden die Ergebnisse unserer GC/MS Untersuchungen für den Massenbereich von 280 bis 600 zusammengefaßt. Es werden die wichtigsten m/z-Werte (über 10%) für fünf ausgewählte Opiate angegeben. Von den PFFPA-Derivaten von Morphin und Codein erhielten wir EI-Spektren, die mit denen von J. Fehn [3] vergleichbar sind. Durch die Messung mit positiv- und negativchemischer Ionisation (PCI und NCI) lassen sich die bisher bekannten massenspektrometrischen Daten sinnvoll ergänzen. In den PCI-Spektren (230 eV) von derivatisiertem Morphin und Codein treten, wie erwartet, die M+1 Peaks bei 578 und 446 auf. Im PCI-Spektrum des Codein-Derivates ist auch ein M+29 Peak kräftig ausgebildet. Bei den NCI-Spektren (230 eV) konnte weder für das Morphin noch für das Codein-Derivat ein Molpeak erhalten werden. Die Peaks mit dem größten m/z-Verhältnis entsprechen bei Morphin einem M-40 und bei Codein einem M-20 Peak.

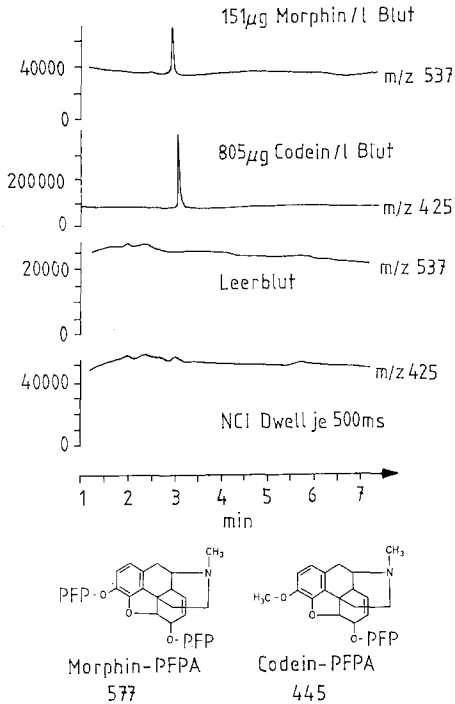


Abb. 3. Massenchromatogramme für die Massen 425 und 537 in Leerblut und für Zusätze von Morphin und Codein

In Abb. 3 sind die Massenchromatogramme für ein Leerblut und zwei Zusätze abgebildet. Obwohl der Retentionsindex (nach Kovats) des Morphin-PFPA Derivates 2140 und der des Codein-PFPA Derivates 2150 beträgt, ist eine Quantifizierung mittels GC/MS leicht möglich, da die gesuchten Massen spezifisch für das Morphin oder Codein-Derivat sind.

Die Signalstärke für NCI:PCI:EI betragen für die PFPA-Derivate von Morphin und Codein etwa 2000:100:1. Dabei wurden unter EI-Bedingung (70 eV) die Ionen 414 für Morphin und 445 für Codein beobachtet. Unter PCI-Bedingung (230 eV) wurden die Ionen 578 für Morphin und 446 für Codein und unter NCI-Bedingung (230 eV) die Ionen 537 für Morphin und 425 für Codein verwendet. Die Verweilzeit betrug für jedes Ion 500 ms. Sowohl NCI als auch PCI sind unter den von uns gewählten Bedingungen um ein Vielfaches (mindestens Faktor 100) empfindlicher als EI.

Die absolute Bestimmungsgrenze liegt unter NCI-Bedingung bei etwa 5 pg für Morphin (Ion 537), Codein (Ion 425) und Dihydrocodein (Ion 427) und bei etwa 15 pg für 6-Monoacetylmorphin (Ion 537, Verweilzeit je 500 ms pro Ion).

3.2.1. Quantifizierung von Morphin und Codein. Zur Quantifizierung erwies es sich als sinnvoll, die Ionen 537 für Morphin und 425 für Codein zu verwenden (Verweilzeit pro Ion je 500 ms). Diese Ionen weisen die größte Intensität aller Ionen mit einem m/z-Verhältnis über 300 auf. Die gesuchten Ionen entsprechen nicht den Molekülionen der gesuchten PFPA-Derivate, sondern entstehen durch die Abspaltung von Fluorwasserstoff aus den entsprechenden PFPA-Derivaten. Das Ion 537 kann auch zum Nachweis von 6-Monoacetylmorphin verwendet werden. Die unterschiedliche Retentionszeit der PFPA-Derivate von Morphin

Tabelle 2. Immunochemische und GC/MS Befunde

Blutprobe	Immunochemisch		GC/MS			BAK (%)
	TDx (mg/l)	RIA (mg/l)	Morphin (mg/l)	Codein (mg/l)	Codein/Morphin	
S 403/88	–	2,1	0,378	2,673	7,0	0
S 38/89	0,078	0,16	0,404	0	0	0
S 79/89	> 0,2	> 1,0	0,794	0,262	0,3	0
S 225/89	–	0,39	0,290	0,140	0,48	2,45
S 245/89	–	0,69	0,360	0	0	0
S 247/89	> 0,4	0,66	0,181	0,107	0,5	0,72
S 306/89	> 0,2	1,2	0,110	+	+	0,36
Ba 1726/89	–	0,74	0,025	0,132	5,2	0
Ba 2032/89	> 0,2	–	0,022	0	0	1,18
Ba 2075/89	> 0,4	–	0,009	0,012	1,3	0,74
Ba 2111/89	0,2	–	0,009	0,251	27,8	2,42
Ba 2399/89	> 0,2	–	0,007	0	0	0
Ch 477/89	> 0,2	0,43	0,022	0,029	1,3	–

und 6-Monoacetylmorphin erlaubt es, beide Substanzen über das Ion 537 zu detektieren. Für routinemäßige Bestimmungen verwenden wir eine externe Einsprink-Kalibration. Zur Kalibration werden 0,2 µg Morphin-Hydrochlorid (entspricht 151 ng Morphinbase) und 1 µg Codein-Hydrochlorid (entspricht 805 ng Codeinbase) zu 1 ml Leerblut zugesetzt. Die Zusätze wurden so gewählt, daß sie für sich allein betrachtet im toxischen Konzentrationsbereich liegen.

3.3. Untersuchung von Blutproben

Bei der von uns gewählten Extraktionsmethode wurde bewußt auf eine saure Glucuronidspaltung im Blut verzichtet und nur die freien Anteile von Morphin und Codein bestimmt. In keiner der 13 untersuchten Blutproben wurde 6-Monoacetylmorphin gefunden. Um 6-Monoacetylmorphin im Blut zu finden, müßten die Blutproben sofort mit esteraseshemmenden Stoffen (z. B. Natriumfluorid) versetzt werden. Die Untersuchung einer Blutprobe mit GC/MS erfolgt bei uns nach positiven Befund mit einer immunochemischen Methode (RIA und/oder FPIA). In Tabelle 2 werden ausgewählte Beispiele unserer Untersuchungen vorgestellt.

Bei der immunochemischen Bestimmung werden freie und gebundene Opiate erfaßt. Die Konzentrationsangaben sind daher nur qualitativ mit den GC/MS Befunden vergleichbar. Bei den von uns mit RIA oder/und FPIA voruntersuchten Fällen traten keine falsch positiven Befunde auf. Alle konnten mit GC/MS bestätigt werden. Die Untersuchung auf falsch negative Ergebnisse der Immuntests dauert zur Zeit noch an.

Die Untersuchung von post mortem gewonnenem Blut erschwert allerdings die Untersuchung mit GC/MS. In einem Sektionsfall konnte zwar Morphin sicher, aber Codein nur qualitativ mit GC/MS bestätigt werden. Die Basislinie war aufgrund von Matrixeinflüssen so verzerrt, daß eine quantitative Berechnung unmöglich wurde. Die Untersuchung des Urines ergab nach saurer Hydro-

lyse und anschließender Aufarbeitung, wie bei Blut, eine Codeinkonzentration von 0,47 und eine Morphinkonzentration von 0,74 mg/l Urin. Die Gesamtopiatkonzentration über RIA ergab etwa 3,5 mg/l. Bei 7 Fällen mit relativ hohen Morphinkonzentrationen (über 0,1 mg/l) waren nur 4 Fälle alkoholfrei. Obwohl die von uns gemessene Probenanzahl noch zu klein ist, um gesicherte Aussagen zu machen, scheint es so zu sein, daß ein Verhältnis von freiem Codein zu freiem Morphin ab 4 mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Codeineinnahme hinweist. Liegt das Codein zu Morphinverhältnis unter 1 und ist die Morphinkonzentration über 0,1 mg/l kann, aufgrund unserer bisherigen Erfahrung, von einer Morphin- bzw. Heroineinnahme ausgegangen werden.

Schlußfolgerungen

Wir können die von J. Schubert vorgeschlagene Extraktions- und Nachweismethode als bisher beste bestätigen und durch Verwendung der negativ-chemischen-Ionisation (NCI) ergänzen. Mit der NCI-Technik ist es möglich, die pharmakologisch aktiven Morphin- und Codeinkonzentrationen zu bestimmen. In 7 von 13 immunochemisch positiven Blutproben lag die Morphin-Konzentration über 0,1 mg/l. In 4 Proben konnten wir Morphin, aber kein Codein nachweisen. Zur Differenzierung zwischen einer Morphin- und/oder Codeineinnahme kann das Konzentrationsverhältnis von Codein zu Morphin herangezogen werden. Aufgrund unserer bisherigen Ergebnisse liegt bei einem Codein- zu Morphinverhältnis von über 4 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Codeineinnahme vor. Bei Konzentrationsverhältnissen weit unter 1 und Morphinkonzentrationen über 0,1 mg/l dürfte im allgemeinen eine Morphin- oder Heroineinnahme vorliegen.

Literatur

1. Moosmayer A, Besserer K (1981) Renale Codein- und Morphin-Ausscheidung nach Codeineinnahme. *Beitr Gerichtl Med* 39:109–112
2. Fehn J, Megges G (1985) Detection of O^6 -monoacetylmorphine in urine samples by GC/MS as evidence for heroin use. *J Anal Toxicol* 9:134–139
3. Fehn J (1988) Differentialdiagnose des Opiatnachweises. In: Arnold W, Poser WE, Möller MR (Hrsg) Suchtkrankheiten. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 60–73
4. Mule SJ, Casella GA (1988) Rendering of "poppy-seed defence" defenseless: identification of 6-monoacetylmorphine in urine by gas chromatography/mass spectroscopy. *Clin Chem* 34:1427–1430
5. Paul BD, Mitchell JM, Mell LD (1989) Gas chromatography/electron impact mass fragmentometric determination of urinary 6-acetylmorphine, a metabolite of heroin. *J Anal Toxicol* 13:2–7
6. Romberg RW, Brown VE (1990) Extraction of 6-monoacetylmorphine from urine. *J Anal Toxicol* 14:58–59
7. Sticht G, Käferstein H, Staak M (1986) Zum sicheren Nachweis eines Heroinkonsums durch Bestimmung von 6-Acetylmorphin im Harn. *Beitr Gerichtl Med* 44:287–293
8. Spiehler V, Brown R (1987) Unconjugated morphine in blood by radioimmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *J Forensic Sci* 32:906–916
9. Moffat AC (ed) (1986) Clarke's isolation and identification of drugs. The Pharmaceutical Press, London, S 490–491, 524–525, 790–791
10. Schubert J, Schubert J (1989) Determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine in blood and urine from heroin abusers. 26th International Meeting of the TIAFT (The International Association of Forensic Toxicologists), Glasgow 1989

11. Schubert J, Schubert J (1989) Gas chromatograph-mass spectrometric determination of morphine, codeine and 6-monoacetylmorphine in blood extracted by solid phase. *J Chromatogr* 490:444–449
12. Bogusz M, Aderjan R, Schmitt G, Nadler E, Neureither B (1990) Determination of drugs in whole blood by means of FPIA and EMIT-dau procedures. *J Forensic Sci* (im Druck)
13. Paul B, Mell L, Mitchell J, Irving J, Novak A (1985) Simultaneous identification and quantitation of codeine and morphine in urine by capillary gas chromatography and mass spectroscopy. *J Anal Toxicol* 9:222–226
14. Vycudilik W (1988) Vergleichende Morphinbestimmung an Gehirnteilen mittels kombinierter GC/MS. *Z Rechtsmed* 99:263–272
15. Wu Chen N, Schaffer M, Lin R, Stein R (1982) Simultaneous quantification of morphine and codeine in biological samples by electron impact mass fragmentography. *J Anal Toxicol* 6:231–234
16. Saady J, Narasimhachari N, Blanke R (1982) Rapid simultaneous quantification of morphine, codeine, and hydromorphone by GC/MS. *J Anal Toxicol* 6:235–237
17. Schmitt G, Aderjan R, Bogusz M (1989) Nachweis einer Cannabisbeeinflussung durch Analyse von Blutproben mit GC/MS. In: Daldrup T (Hrsg) *GTFCh-Symposium Arzneistoffmißbrauch*. Verlag D. Helm, Heppenheim, S 118–130