

Analyse von Remifentanil in einem Fall einer letalen Intoxikation

Gertrud Rochholz, Lars Radünz, Katharina Bormann

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Institut für Rechtsmedizin, Arnold-Heller-Straße 12, D-24105 Kiel, Germany

Abstract

Aim: Remifentanil (4-methoxycarbonyl-4-[(1-oxopropyl)phenylamino]-1-piperidinepropionic acid methyl ester) is an extremely short acting opioid which is used especially in anaesthesia. Because decomposition occurs mainly by esterases no dose reduction is necessary in cases of liver or kidney dysfunction, and the short elimination half-life does not lead to cumulation in fatty tissue. Therefore, anaesthesia with remifentanil is well controllable. The increase in popularity also entails cases of misuse. A case of lethal intoxication involving remifentanil is presented. It was difficult to identify remifentanil; therefore, it was our aim to verify the incorporation of this drug.

Methods: Heart blood, peripheral blood, vitreous humour, cerebrospinal fluid, and also contents of syringes were analysed by gaschromatography-mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography with diode array (HPLC-DAD) or electrospray ionisation mass detection (LC-ESI-MS). Moreover, an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for fentanyl was checked for its applicability as a preliminary test.

Results and Discussion: Remifentanil could not be detected in blood neither with GC-MS nor with HPLC-DAD or LC-ESI-MS. Also, the ELISA used for preliminary testing of fentanyl gave no indication that the drug or one of its decomposition products were present. The investigation of one used and nearly empty syringe suggested a possibility to look for remifentanil acid (4-methoxycarbonyl-4-[(1-oxopropyl)phenylamino]-1-piperidinepropionic acid) as a typical decomposition product which was later on detected in all samples. Unchanged remifentanil could only be detected in one syringe which was found in a shelf.

Conclusion: Even in cases of lethal intoxication it can be difficult to identify remifentanil itself. Therefore, remifentanil acid has to be included in the screening procedure or multi target analysis to be able to verify the presence of this highly potent opioid.

1. Einleitung

Bei Remifentanil (4-Methoxycarbonyl-4-[(1-oxopropyl)phenylamino]-1-piperidinpropan-säuremethylester) handelt es sich um ein extrem kurzwirksames Opioid, das unter dem Handelsnamen Ultiva® vorwiegend in der Anästhesie eingesetzt wird und therapeutische Konzentrationen im Blut von 3 bis 50 ng/mL aufweist. Wie alle Opiode besitzt es analgetische, euphorische und pupillenverengende sowie ausgeprägte sedierende und atemdepressive Eigenschaften. Da Remifentanil vorwiegend durch im Gewebe befindliche Esterasen abgebaut wird, ist bei eingeschränkter Leber- oder Nierenfunktion keine Dosisreduzierung erforderlich. Durch die extrem kurze Eliminationshalbwertszeit von 3 bis 10 min kommt es unter der Anwendung von Remifentanil nicht zu einer Kumulation im Fettgewebe, wodurch die Anästhesie gut steuerbar ist und sich zunehmender Beliebtheit erfreut. In Deutschland ist Remifentanil ein verkehrsfähiges und verschreibungsfähiges Betäubungsmittel. Missbräuchlich wird es im Rennsport zum Doping von Pferden genutzt [1-3]. Der vorliegende Fall zeigt, dass auch beim Menschen mit missbräuchlicher Anwendung gerechnet werden muss, die zum letalen Verlauf führen kann.

2. Kasuistik

Ein 31-jähriger Honorar-Anästhesist wurde mit einem Stauschlauch am Arm tot im Schwesternwohnheim aufgefunden. Unter dem Leichnam fand sich eine entleerte Spritze mit Blutanhaftungen, in einem Regal eine weitere Spritze mit 14 mL einer farblosen Flüssigkeit. Weiterhin wurden im Zimmer einige leere Flaschen Wodka, eine unbrauchbar gemachte Kalaschnikov und zahlreiche Medikamente aufgefunden, darunter jedoch keine Betäubungsmittel.

Bei der Obduktion wurden als wesentliche Befunde eine Einstichstelle im Bereich der linken Ellenbeuge mit Punktionsmal in der darunterliegenden Vene und Umgebungsblutung sowie eine massiv ausgeprägte akute Blutstauung aller inneren Organe einschließlich des Gehirns, ein geringes Lungenödem und ein Hirnödem festgestellt. Weiterhin fand sich ein fruchtig-aromatischer Geruch der Körperhöhlen.

Bei der routinemäßig durchgeführten chemisch-toxikologischen Untersuchung fand sich eine Alkoholkonzentration im Blut von 0,57‰; weitere Analysen von Urin mittels GC-MS und von Blut mittels GC-MS und HPLC-DAD verliefen negativ. In der Flüssigkeit aus der gefüllten Spritze ließ sich mittels GC-MS unter Zuhilfenahme zweier verschiedener Datenbanken [4-5] nach Extraktion Remifentanil nachweisen, in der mit einem Lösungsmittelgemisch ausgespülten Spritze mit den Blutanhaftungen fand sich die Substanz mittels GC-MS nicht.

Um eine Remifentanilaufnahme zu belegen oder auszuschließen, wurden beide Spritzen zusätzlich mittels HPLC-DAD untersucht sowie Blut, Urin, Liquor und Glaskörperflüssigkeit sowie die Spritze mit den Blutanhaftungen gezielt mittels LC-ESI-MS auf die Anwesenheit von Remifentanil oder eines eventuell vorhandenen Abbauproduktes überprüft. Weiterhin wurde getestet, ob ein ELISA für Fentanyl Hinweise auf die Anwesenheit von Remifentanil oder seiner Abbauprodukte liefern kann.

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchung der Spritzen mittels HPLC-DAD

Die farblose Flüssigkeit aus der gefüllten Spritze wurde mit dem zur HPLC-Trennung verwendeten Laufmittel (Gemisch aus 562,6 mL Acetonitril und 1000 mL 0,02 molarem Phosphatpuffer pH 2) verdünnt und auf eine LiChrospher 60 RP-select B-Säule (5 µm, LiChroCART 125-4, Firma Merck, Darmstadt) aufgegeben. Die Trennung erfolgte isokratisch bei 30°C mit einem Fluss von 1 mL/min, die Detektion mittels eines DAD (Agilent 1100 HPLC-System, Agilent Technologies, Waldbronn). Die Spritze mit den Blutanhaftungen wurde mit einem Gemisch aus Dichlormethan, 1,2-Dichlorethan, 2-Propanol, n-Heptan (8:13:12:17, v/v/v/v) ausgespült. Ein Aliquot dieses Lösungsmittelgemisches wurde eingedampft und ebenfalls in dem zur HPLC-Trennung verwendeten Laufmittel mittels HPLC-DAD untersucht.

3.2. Untersuchung der Körperflüssigkeiten auf Remifentanil bzw. dessen Abbauprodukt Remifentanilsäure mittels LC-ESI-MS

Zur Aufarbeitung von Blut bzw. Serum wurden 100 µL nach Zugabe von 1 ng Fentanyl-d₅ (LGC Standards, Wesel) als internem Standard mit der doppelten Menge an Acetonitril versetzt (1:3-Verdünnung). Nach Zentrifugieren wurde der Überstand mit der fünffachen Menge

des zur Trennung verwendeten Laufmittels A verdünnt und diese 1:6 verdünnte Lösung nach Zentrifugieren auf die LC-MS aufgegeben.

Für die Aufarbeitung von Urin, Liquor oder Glaskörperflüssigkeit wurden 100 µL nach Zugabe von 1 ng Fentanyl-d₅ als internem Standard 1:20 mit dem zur Trennung verwendeten Laufmittel A verdünnt. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand auf die LC-MS aufgegeben.

Ein Aliquot des zum Ausspülen der Spritze mit den Blutanhaftungen benutzten Lösungsmittelgemisches wurde eingedampft, in Laufmittel A aufgenommen und ebenfalls der LC-MS-Analyse zugeführt.

Die LC-MS-Bestimmung erfolgte auf einem Waters Acquity UPLC-System gekoppelt mit dem Xevo-TQD (Waters, Eschborn) mit ESI im positiven Modus. Es wurden jeweils 10 µL in das System injiziert. Das Laufmittel A bestand aus 2% Methanol, 0,1% Ameisensäure und 0,05% Ammoniumformiat in Wasser (pH 3), das Laufmittel B aus 0,1% Ameisensäure in Methanol. Die Trennung erfolgte auf einer Chromsystems MASS Tox™ TDM Serie A-Säule von 8 cm Länge (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, Gräfelfing) bei 35°C mit einem Fluss von 0,6 mL/min in 2,5 min mit folgendem Lösungsmittelgradienten: initial bis 0,2 min 90% Laufmittel A und 10% Laufmittel B, von 0,2 min bis 1,5 min linearer Wechsel zu 30% Laufmittel A und 70% Laufmittel B, Halten dieses Gemisches von 1,5 min bis 1,8 min, dann von 1,8 min bis 2,0 min lineare Wiedereinstellung der initialen Bedingungen, die von 2,0 bis 2,5 min gehalten wurden. Es wurden folgende MS-Parameter verwendet: Kapillarspannung 3,53 kV, Quelltemperatur 150°C, Gastemperatur 500°C, Trocknungsgasfluss (N₂) 850 L/h, Konusgasfluss (N₂) 30 L/h, Stoßgasfluss (Ar) 0,15 mL/min. Zur Identifizierung wurden folgende Massenübergänge gemessen: für Fentanyl-d₅ m/z 342,29 → 105,08 und 342,29 → 188,18, für Remifentanil m/z 377,16 → 113,07 und 377,16 → 317,21 sowie für das Remifentanil-Abbauprodukt Remifentanilsäure m/z 363,16 → 113,07 und 363,16 → 146,12.

3.3. Untersuchung der Körperflüssigkeiten mittels eines ELISA-Tests auf Fentanyl

Herzblut, Urin sowie mit Wasser 1:5 verdünnter Urin wurden gemäß der Anweisung des Herstellers (Immunalysis Corporation, Pomona, USA; Vertrieb durch Mahsan Diagnostika Vertriebsgesellschaft mbH, Reinbek) mit dem ELISA-Testkit auf Fentanyl untersucht. Positiv- und Negativkontrollen wurden mitgeführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

In der farblosen Flüssigkeit aus der gefüllten Spritze ließ sich auch mittels HPLC-DAD Remifentanil nachweisen (Abb. 1.). Als Vergleichsspektrum wurde ein selbst aufgenommenes DAD-Spektrum einer frisch aus dem Lyophilisat des Handelspräparates Ultiva® hergestellten Lösung verwendet.

In der mit einem Lösungsmittelgemisch ausgespülten Spritze mit den Blutanhaftungen ließ sich auch mittels HPLC-DAD kein Remifentanil nachweisen (Abb. 2.).

Mittels LC-ESI-MS ließ sich Remifentanil in einer Konzentration von 1 ng/mL in der aus dem Handelspräparat Ultiva® frisch hergestellten Standardlösung bei einer Retentionszeit von 1,64 min problemlos nachweisen (Abb. 3.). In allen Körperflüssigkeiten und in der mit einem Lösungsmittelgemisch ausgespülten Spritze mit den Blutanhaftungen fand sich hingegen kein Remifentanil.

Aufgrund dieser Befunde und des Wissens um mögliche Abbauege von Remifentanil (Abb. 4.) wurden die von den beiden Spritzen erhaltenen HPLC-Chromatogramme näher betrachtet.

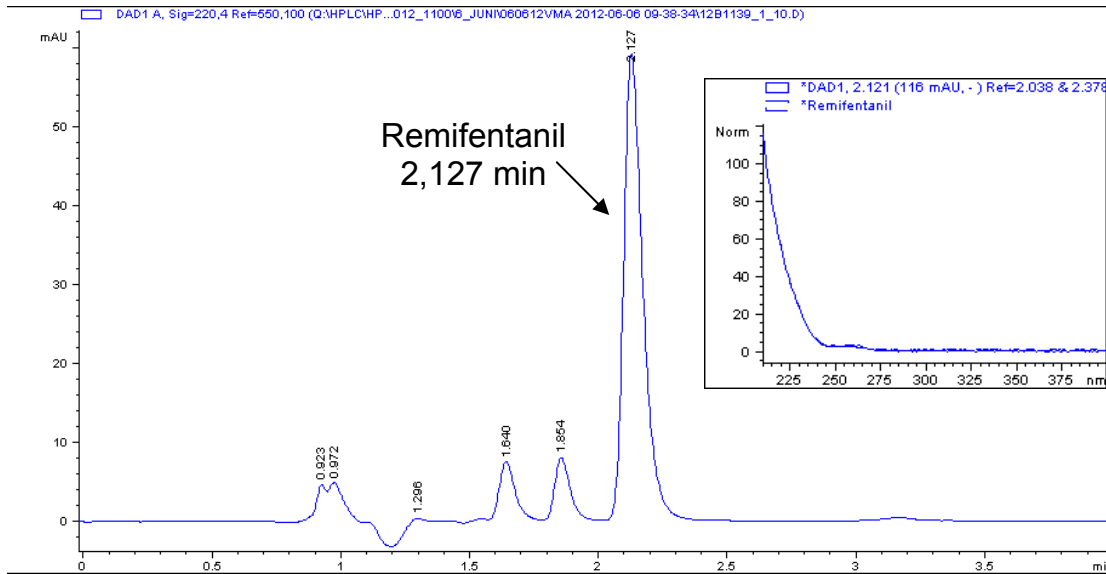


Abb. 1. HPLC-Chromatogramm der farblosen Flüssigkeit aus der gefüllten Spritze und DAD-Spektrum des Peaks bei 2,12 min.

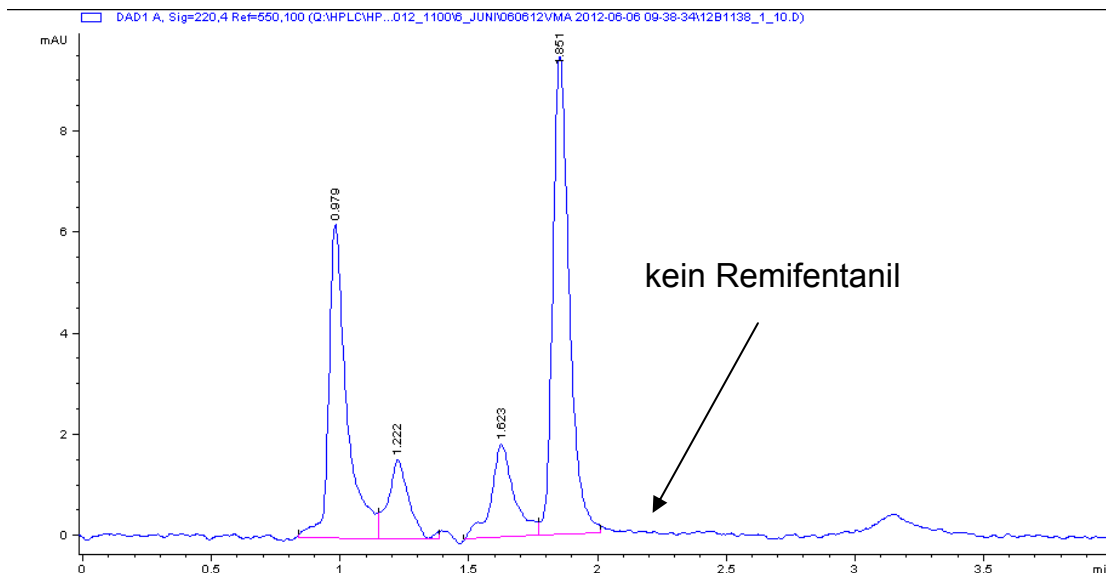


Abb. 2. HPLC-Chromatogramm der mit einem Lösungsmittelgemisch ausgespülten Spritze mit den Blutanhaftungen.

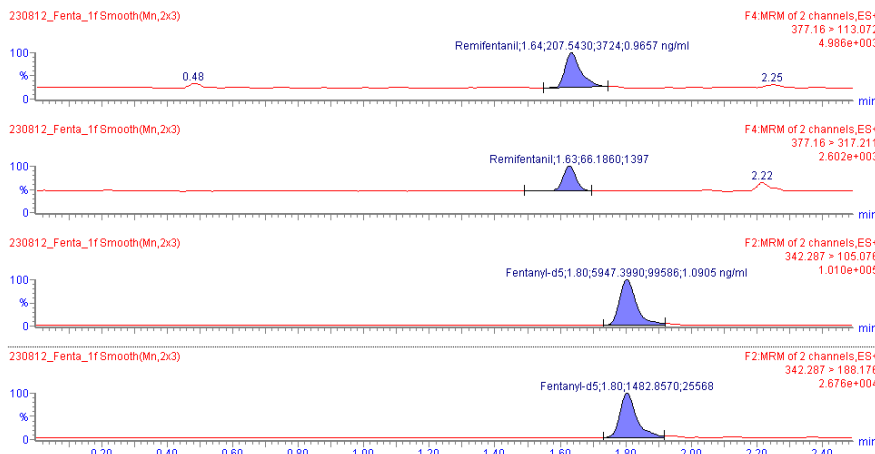


Abb. 3. LC-ESI-MS-Chromatogramm einer aus Ultiva® hergestellten Remifentanyl-Standardlösung mit Fentanyl-d₅ als internem Standard (Konzentration jeweils 1 ng/mL), Retentionszeit für Remifentanyl 1,64 min, für Fentanyl-d₅ 1,80 min.

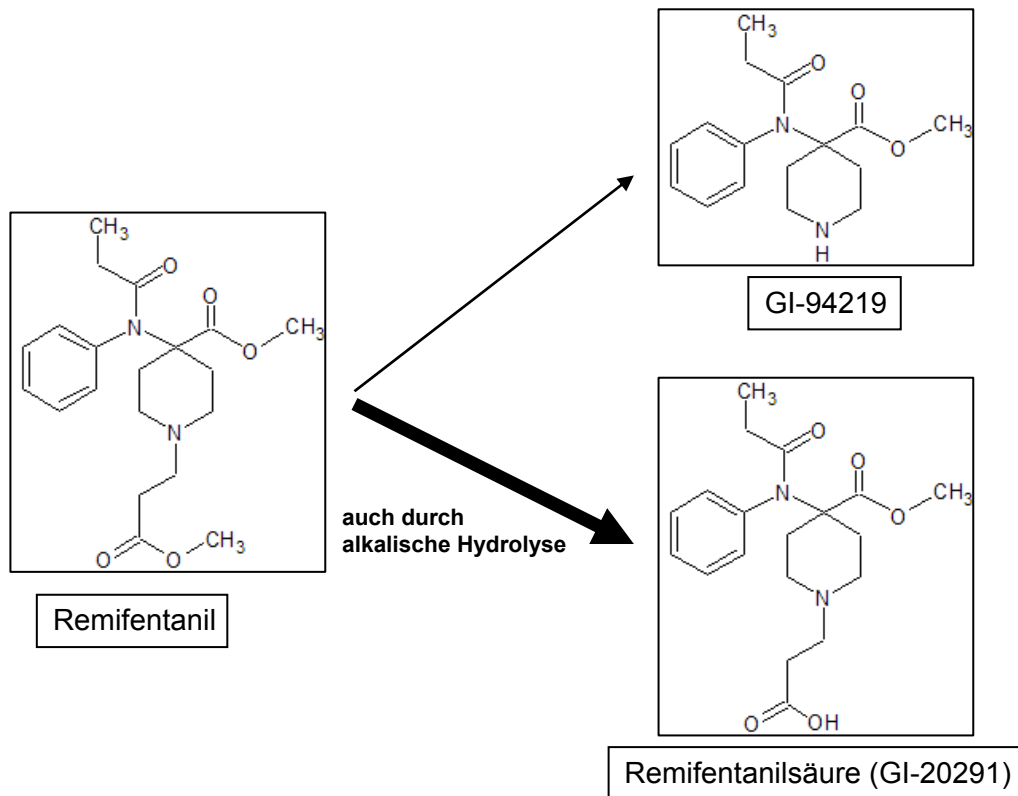


Abb. 4. Metabolismus von Remifentanyl, modifiziert nach [1].

Im HPLC-Chromatogramm der mit einem Lösungsmittelgemisch ausgespülten Spritze mit den Blutanhaftungen fand sich bei 1,62 min ein Peak, der auch in der Flüssigkeit aus der gefüllten Spritze bei 1,64 min nachzuweisen war und dessen DAD-Spektrum dem des Remifentanils sehr stark ähnelte (Abb. 5).

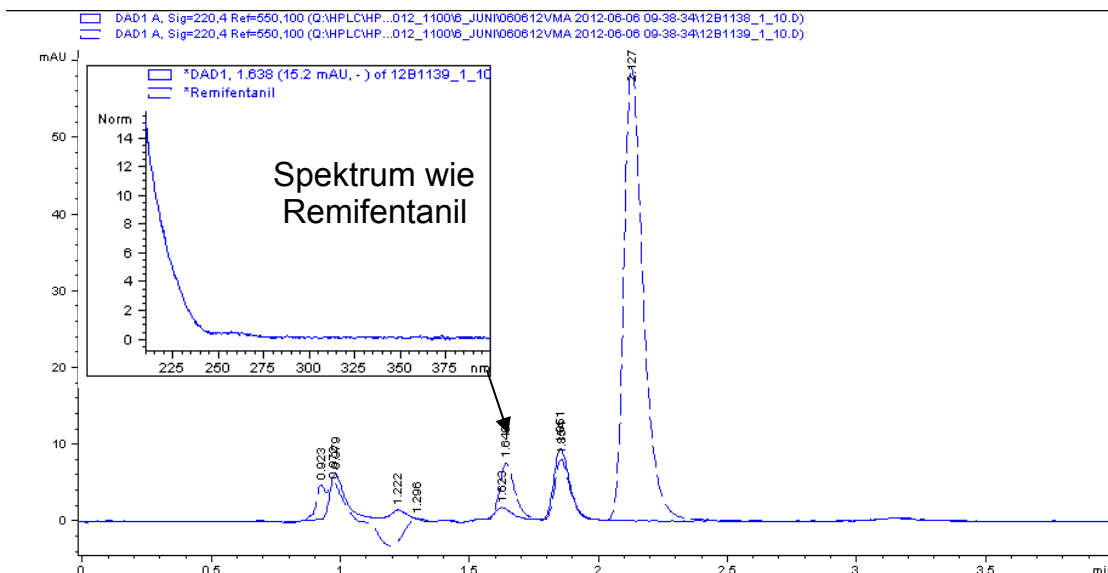


Abb. 5. HPLC-Chromatogramme der farblosen Flüssigkeit aus der gefüllten Spritze (gestrichelte Linie) und der mit einem Lösungsmittelgemisch ausgespülten Spritze mit den Blutanhaftungen (durchgezogene Linie) sowie DAD-Spektrum des Peaks bei 1,63 min, das eine sehr gute Übereinstimmung mit dem DAD-Spektrum von Remifentanyl aufweist.

Auch in den aus dem Handelspräparat Ultiva® hergestellten Standardlösungen ließ sich nach längerem Stehenlassen dieser Peak nachweisen, der der Remifentanilsäure (GI-20291) zugeordnet werden konnte, die als Hauptmetabolit im Urin – auch beim Pferdedoping – zu finden ist [1-3]. Mit dem aus den Standardlösungen bei längerem Stehenlassen erhältlichen Abbauprodukt als Referenz wurden die vorhandenen Körperflüssigkeiten Venenblut, Herzblut, Urin, Liquor und Glaskörperflüssigkeit sowie die ausgespülte Spritze mit den Blutanhafungen mittels LC-ESI-MS untersucht. Dabei ließ sich in allen Asservaten dieses Remifentanil-Abbauprodukt nachweisen. Das Chromatogramm des Venenblutes zeigt Abb. 6.

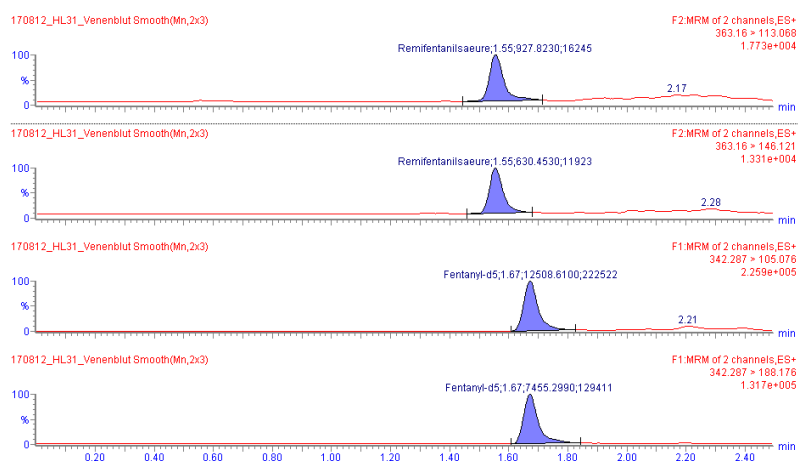


Abb. 6. LC-ESI-MS-Chromatogramm des Venenblutes mit dem der Remifentanilsäure zugeordneten Peak bei 1,55 min und Fentanyl-d₅ bei 1,67 min.

Auch in drei weiteren Obduktionsfällen, in denen Remifentanil offensichtlich kurz vor dem Tod appliziert wurde, konnte dieses Abbauprodukt in allen untersuchten Asservaten mittels LC-ESI-MS nachgewiesen werden, Remifentanil selbst fand sich eindeutig nur im Urin eines einzigen Falles. Auch hier lieferte der ELISA keine Hinweise auf die Anwesenheit von Remifentanil oder seiner Abbauprodukte.

Fazit: Aufgrund der Auffindesituation und beim Fehlen konkurrierender Todesursachen ist im vorliegenden Fall von einer tödlichen Intoxikation durch Remifentanil auszugehen. Wahrscheinlich handelt es sich um einen Unfall nach missbräuchlicher Aufnahme dieses hochwirksamen Opioids. Wegen der Instabilität von Remifentanil in Lösung und des Abbaus durch Esterasen im Gewebe ist in postmortal erhaltenen Proben immer auch nach dem Abbauprodukt Remifentanilsäure zu suchen. Der Nachweis von Remifentanil selbst kann noch am ehesten im Urin gelingen. Ein qualitativer Standard von Remifentanilsäure ist leicht erhältlich durch Stehenlassen oder alkalische Hydrolyse einer Remifentanil-Lösung. Ein kommerziell erhältlicher ELISA auf Fentanyl ist nicht geeignet, um potentiell positive Proben herauszufiltern.

5. Literatur

- [1] Baselt RC. Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man. 9th Edition, Biomedical Publications, Foster City, California, 2011, S. 1492-1493.
- [2] Fachinformation Ultiva®, GlaxoSmithKline, Stand März 2012.
- [3] Lehner AF, Almeida P, Jacobs J, Harkins JD, Karpiesiuk W et al. Remifentanil in the Horse: Identification and Detection of its Major Urinary Metabolite. J Anal Tox 2000;24:309-315.
- [4] Rösner P. Mass Spectra of Designer Drugs 2012 Upgrade. Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- [5] Maurer HH, Pflieger K, Weber AA. Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites. 4th Edition, Wiley-VCH, Weinheim, 2011.