

## **Einige Erfahrungen mit dem enzymatischen Aufschluß von Lebergewebe durch Subtilisin Carlsberg**

E. Klug

Institut für Rechtsmedizin der Freien Universität Berlin, Hittorfstr. 18, D-1000 Berlin 33

### **Some Experience with the Enzymatic Digestion of Liver Tissue by Means of Subtilisin Carlsberg**

**Summary.** According to the literature, the use of Subtilisin Carlsberg for the enzymatic digestion of tissue is supposed to yield significantly higher findings of barbiturates, alkaline substances, and benzodiazepins than traditional methods. In the case of 11 liver specimens, however, a comparison with a modified acetone method (extraction by ultrasonics) did not lead to an improvement in the results, nor did it facilitate preparation of the specimens.

**Key words:** Enzymatic digestion, liver tissue – Ultrasonic extraction

**Zusammenfassung.** Die Anwendung von Subtilisin Carlsberg zum enzymatischen Gewebeaufschluß soll nach Literaturangaben signifikant erhöhte Ausbeuten an Barbituraten, basischen Substanzen und Benzodiazepinen gegenüber herkömmlichen Verfahren liefern. Ein Vergleich mit einem modifizierten Acetonverfahren (Extraktion mittels Ultraschall) ergab jedoch bei elf Leberproben keine Verbesserung der Ergebnisse und keine Erleichterung bei der Aufarbeitung der Proben.

**Schlüsselwörter:** Enzymatischer Aufschluß, Lebergewebe – Ultraschallextraktion

Die Ausmittelung organischer, schwer flüchtiger Arzneistoffe erfordert in der Regel die Abtrennung und eine Anreicherung der Substanzen vor der qualitativen und quantitativen Bestimmung. Die Analyse der Extrakte bereitet meist keine größeren Schwierigkeiten, da vor allem die modernen chromatographischen Analyseverfahren gut reproduzierbare Ergebnisse liefern und Fehlbestimmungen bei der Anwendung zweier unabhängiger Methoden — wie forensisch erforderlich — schnell erkannt werden.

Trotz der vielfältigen technischen Möglichkeiten und sorgfältigster Arbeit des Analytikers können nun die Einzelwerte einer Giftanalyse in manchen Fällen um

50–100% schwanken, Differenzen, die vor allem auf unkontrollierbare Ausbeuteverluste bei der Extraktion und der Reinigung zurückzuführen sind [9]. Auch weitere Mängel der üblichen Aufschlußverfahren wie Verluste ganzer Substanzklassen, stark verunreinigte Extrakte, unverhältnismäßig großer Aufwand usw. haben seit den Tagen von Stas (1854) und Otto (1856) zu immer neuen Methoden und Varianten geführt. Vor kurzem wurde nun von englischen Autoren ein enzymatisches Verfahren veröffentlicht, das Ausbeutesteigerungen über 1000% gegenüber herkömmlichen Verfahren ermöglichen soll. Das schnell und einfach durchzuführende, universell einsetzbare Verfahren wurde zur Ausmittlung von basischen Arzneimitteln, Benzodiazepinen, Barbituraten, Salizylsäure und Selex<sup>1</sup> überprüft, wobei die Konzentrationen nicht nur der säurelabilen Benzodiazepine und des Dextropropoxyphen, sondern auch die der übrigen Substanzen um ein Vielfaches höher gefunden wurden [6, 7, 8].

Ähnliche Methoden wurden bereits 1952 von Mayer und Dropmann sowie 1953 von Katte und Specht publiziert, hatten jedoch keine weitere Verbreitung gefunden [5, 3].

Die von Osselton et al. (1978) angeführten Resultate ließen nun Zweifel an der Effizienz der bisher eingesetzten Verfahren und an den mit ihnen ermittelten Werten aufkommen, so daß es erforderlich erschien, einen Methodenvergleich mit unseren Routineverfahren durchzuführen.

Zur Untersuchung standen frische Leberproben von Vergiftungsfällen zur Verfügung.

## Methodik

### 1. Enzymatische Aufarbeitung von Lebergewebe nach Osselton [6, 7, 8]

10 g Leber wurden mit 40 ml einer 12%igen Lösung von Tris(hydroxymethyl)aminomethan homogenisiert, mit 10 mg Subtilisin Carlsberg<sup>2</sup> versetzt und 60 min bei 60° unter leichtem Rühren auf dem Wasserbad erwärmt. Die Probe ist dann in der Regel bis auf sehr geringe Rückstände gelöst.

a) Saure Substanzen: Die Lösung wird mit 3 ml einer 25%igen Wolframatlösung und mit 25%iger Schwefelsäure bis zur sauren Reaktion versetzt, geschüttelt und 10 min in einem siedenden Wasserbad erwärmt. Filtrieren. Zweimalige Extraktion mit Diethylether.

b) Basische Substanzen: Extraktion des durch Glaswolle filtrierten Aufschlusses mit je 100 ml Ether (2×). Reextraktion mit 10 ml M-Schwefelsäure (3×) und erneute Etherextraktion nach Einstellen auf pH 9. Eindunsten des Ethers.

c) Benzodiazepine und Neutralsubstanzen: Extraktion mit Ether wie unter b) beschrieben. Einengen. Der ölige Rückstand wird in angesäuertem Wasser aufgenommen, erwärmt, filtriert, auf pH 7–8 eingestellt und mit Ether extrahiert. Einengen.

### 2. Extraktion von Lebergewebe mit angesäuertem Aceton und Ultraschallbehandlung [4]

Je 10 g Leber werden in 70 ml Aceton und 5 ml 10%iger Weinsäure homogenisiert und 5 min mit 200 Watt beschallt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages wird mit 5 ml gesättigter Ammoniumschloridlösung versetzt und im Vakuum eingengt. Nach kurzem Erwärmen auf dem Wasserbad wird filtriert, das Filtrat wie üblich sauer mit Ether und bei pH 9 mit Chloroform

1 Herbizid, Gemisch aus 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxypropionsäure

2 Subtilisin A wurde uns freundlicherweise von der Firma Novo-Industrie, Mainz, zur Verfügung gestellt

**Tabelle 1.** Barbituratgehalte in Lebergewebe (alle Werte in mg/100 g)

|          |               | Subtilisin<br>Carlsberg | Ultraschall-<br>Aceton-Verfahren |                    |
|----------|---------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------|
| L 243/80 | Pentobarbital | 2,0                     | 1,8                              | zusätzlich Morphin |
| L 245/80 | Pentobarbital | 2,9                     | 3,1                              | Suicid             |
| L 253/80 | Phenobarbital | 4,5                     | 5,4                              | zusätzlich Morphin |
| L 331/80 | Allobarbital  | 1,5                     | 1,4                              | Tötung             |

**Tabelle 2.** Basische Arzneistoffe in Lebergewebe (alle Werte in mg/100 g)

|          |                              | Subtilisin<br>Carlsberg | Ultraschall-<br>Aceton-Verfahren |                     |
|----------|------------------------------|-------------------------|----------------------------------|---------------------|
| L 68/79  | Propoxyphen                  | 2,1                     | 1,1                              | 12 Stunden überlebt |
|          | Abbauprodukt                 | 1,8                     | 1,6                              |                     |
| L 113/79 | Propoxyphen                  | 1,2                     | 1,6                              | Suizid              |
|          | Abbauprodukt                 | 1,8                     | 1,5                              |                     |
| L 565/79 | Prothipendyl                 | 1,5                     | 1,3                              | Ertrinken           |
| L 284/79 | Perazin und<br>Abbauprodukte | 23                      | 24                               | Suizid              |

extrahiert. Der Chloroformextrakt wird schonend unter Zusatz einiger Tropfen alkoholischer Salzsäure eingedunstet.

Die Bestimmungen und quantitativen Messungen erfolgten durch GC, UV sowie halbquantitativ durch DC.

## Ergebnisse und Diskussion

Mittels der angegebenen Verfahren wurden untersucht:

1. Lebergewebe mit a) Phenobarbital, b) Allobarbital und c) Pentobarbital.
2. Lebergewebe mit Dextropropoxyphen.
3. Lebergewebe mit Perazin.
4. Lebergewebe mit Prothipendyl.
5. Lebergewebe mit Methaqualon.
6. Lebergewebe mit Diazepam.

Die Anzahl der durchgeführten Analysen erscheint auf den ersten Blick zu gering, um aussagekräftige Schlüsse aus den Ergebnissen zu ziehen. Die Uniformität der Resultate berechtigt trotzdem schon zu einigen Rückschlüssen auf die Anwendbarkeit des Verfahrens.

### Barbituratanalysen

Die direkte Ausschüttelung der angesäuerten Aufschlußlösungen ergibt, wie auch von Osselson (1978) beschrieben, sehr verunreinigte Extrakte, so daß zunächst eine

Wolframatfällung erforderlich ist. Auch danach erhielten wir stets bei der Etherextraktion wägbare Rückstände, die die Dünnschichtchromatographie sehr erschwerten. Bei der papierchromatographischen Auftrennung im System nach Seifert [11] bleiben allerdings die Verunreinigungen dicht am Startpunkt zurück, so daß eine Bestimmung angeschlossen werden kann. Dabei fanden sich in den untersuchten Fällen gute Übereinstimmungen der Werte, jedoch keine besondere Erhöhung der mit dem Enzymverfahren erhaltenen Konzentrationen (Tabelle 1).

Da nach einer Wolframatfällung in der Regel die Ausbeuten an basischen Substanzen sehr gering sind, wird durch diese Reinigungsmaßnahme ein gesonderter Aufschluß für basische und neutrale Substanzen notwendig (z. B. 10).

### *Basische Arzneimittel*

Die von Osselton (1977) angegebene Reinigung durch Reextraktion des Ethers mit Schwefelsäure und erneute Extraktion nach Alkalisieren liefert sehr reine Rückstände. Während bei den stärker basischen Substanzen nur mit geringen Ausbeuteverlusten zu rechnen ist, können jedoch bei den schwächer basischen Arzneimitteln größere Verluste eintreten. Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, liefert das Verfahren annähernd gleiche Werte wie das „Ultraschallverfahren“. Die größere Differenz bei L 68/79 konnte aus Mangel an Material nicht näher geklärt werden. Die Leber L 284/80 wurde weiterhin nach dem bei Phenothiazinvergiftungen von Curry (1976) empfohlenen Salzsäureaufschluß analysiert. Dabei ergab sich der gleiche Wert von 23 mg/100 g Perazin [1].

Die Anwendung des Verfahrens zur Benzodiazepinanalyse und zu der Untersuchung auf schwach basische Substanzen und Neutralstoffe bereitet größere Schwierigkeiten. Beim empfohlenen Einengen der etherischen Extrakte erhält man stets eine mehr oder weniger große Menge eines gelben, langsam erstarrenden Öles, das eine Analyse mittels chromatographischer Verfahren (GC, DC) unmöglich macht. Aus 10 g Lebergewebe eines Säuglings wurden z. B. 340 mg, aus einer mäßigen Fettleber jedoch schon 1,4 g Rückstand gewonnen. Die von Osselton (1978) empfohlene Reinigung über Schwefelsäure ergab bei den Zusatzversuchen mit Methaqualon und Diazepam Verluste bis zu 60%. Ähnliche und höhere Verluste dürften bei allen Neutralstoffen eintreten. Um die Analyse des Öls überhaupt zu ermöglichen, wurde es mit angesäuertem Wasser versetzt und bei 80° erwärmt. Nach Filtrieren und Nachwaschen wurde neutralisiert und erneut mit Ether extrahiert. Die nach dem Abdunsten erhaltenen Rückstände konnten nun wie üblich aufgearbeitet werden.

Nach dieser Modifikation wurde eine methaqualonhaltige und zwei diazepamhaltige Leberproben untersucht. Die Ergebnisse zeigen wiederum, daß die Konzentrationen nach beiden Verfahren in der gleichen Größenordnung liegen, wobei eine bessere Übereinstimmung angesichts der sehr kleinen Mengen nicht zu erwarten ist (Tabelle 3).

Die angeführten Beispiele aus den verschiedenen Gruppen organischer, forensisch wichtiger Arzneistoffe zeigen, daß das enzymatische Aufschlußverfahren universell zur Ausmittelung solcher Stoffe einsetzbar erscheint. Die gefundenen Konzentrationen entsprechen etwa denen, die mit dem „Ultraschall-Aceton-Verfahren“ erhalten wurden, lagen aber in keinem Falle signifikant höher.

**Tabelle 3.** Diazepam- und Methaqualongehalte in Lebergeweben (alle Werte in mg/100 g)

|          |             | Subtilisin<br>Carlsberg | Ultraschall-<br>Aceton-Verfahren |           |
|----------|-------------|-------------------------|----------------------------------|-----------|
| L 38/80  | Diazepam    | 0,6                     | 0,7                              | Ertrinken |
| L 198/80 | Diazepam    | 0,2                     | 0,1                              | Erfrieren |
| L 315/80 | Methaqualon | 2,3                     | 2,1                              | Suizid    |

Von Nachteil ist, daß zur Ausmittlung saurer und basischer Substanzen gesonderte Aufschlüsse durchgeführt werden müssen und daß zur Bestimmung der schwach basischen Arzneistoffe eine zusätzliche Reinigung, zumindest bei dem Einsatz der DC oder GC, erforderlich ist.

Einen Hinweis auf eine Fehlerquelle gaben kürzlich Dunnett und Mitarbeiter (1979), die bei der Überprüfung des enzymatischen Verfahrens schlechte Ausbeuten an neutralen und sauren Substanzen erhielten. Als möglichen Grund dafür nannten sie die Hydrolyse einiger dieser Verbindungen in dem alkalischen Medium [2].

Insgesamt haben sich aus den bisherigen Untersuchungen keinerlei arbeitstechnische Vorteile bzw. exaktere Ergebnisse durch den enzymatischen Aufschluß gegenüber dem „Ultraschall-Aceton-Verfahren“ ergeben, so daß uns die Einführung der Methode aufgrund dieser Erfahrungen für die Routineanalytik nicht erforderlich erscheint.

## Literatur

- 1 Curry A (1976) Poison detection in human organs. C. C. Thomas, Springfield
- 2 Dunnett N, Ashton PG (1979) Experience with enzymic deproteination in general toxicological case work. TIAFT 15:Nr 1
- 3 Katte W, Specht W (1953) Ultraschallextraktion giftverdächtiger Leichenteile. Dtsch Apotheker 96:490-494
- 4 Klug E (1971) Ultraschallextraktion biologischer Proben. Beitr Ger Med 28:333-339
- 5 Mayer A, Dropmann P (1952) Die Anwendbarkeit der Pepsinverdauung als Aufschlußverfahren für den Nachweis organischer Gifte. Dtsch Apotheker Z; Süddtsch Apotheker Z 92:836-837
- 6 Osselton MD (1977) The release of basic drugs by the enzymic digestion of tissues in cases of poisoning. J Forensic Sci Soc 17:189-194
- 7 Osselton MD, Hammond MD, Twitchett PJ (1977) The extraction and analysis of benzodiazepines in tissues by enzymatic digestion and high-performance liquid chromatography. J Pharm Pharmacol 29:460-462
- 8 Osselton MD, Shaw IC, Stevens HM (1978) Enzymic digestion of liver tissue to release barbiturates, salicylic acid and other acidic compounds in cases of human poisoning. Analyst 103:1160-1164
- 9 Schmidt G (1969) Der forensische Beweiswert toxikologischer Untersuchungsmethoden. Beitr Ger Med 25:122-127
- 10 Stevens HM, Owen P, Benuker VW (1977) The release of alkaloids from body tissues by protein precipitating reagents. J Forensic Sci Soc 17:169-176
- 11 Vidic E, Goebel K (1961) Nachweis der renalen Ausscheidungsprodukte von Schlafmitteln. Arch Toxikol 19:85-111

Eingegangen am 24. Juli 1980