

**Zusammenfassung der Dissertation als Dank an die GTFCh für die Gewährung eines Stipendiums zur Präsentation eines wissenschaftlichen Vortrages oder Posters beim SOFT-TIAFT Meeting in San Francisco (CA) 2011 und beim TIAFT Meeting in Hamamatsu (Japan) 2012**

## **Nachweis und Bestimmung halluzinogener Wirkstoffe und ihrer Metaboliten in Körperflüssigkeiten und Haaren**

**Rafaela Martin**

Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Universitätsklinikum Münster, Röntgenstraße 23, 48149 Münster

---

### **1. Einleitung**

Halluzinogene Wirkstoffe stellen eine bedeutende Gruppe an Betäubungsmitteln dar. Sie verändern die visuelle, auditive, taktile und olfaktorische Wahrnehmung. Auch Raum und Zeit werden anders erlebt. Wichtige Halluzinogene sind das Lysergsäurediethylamid (LSD) und Psilocin (Abb. 1), die beide laut Betäubungsmittelgesetz (BtMG) zu den nicht verkehrsfähigen Betäubungsmitteln zählen. LSD wird halbsynthetisch aus Alkaloiden des Mutterkorns hergestellt, während Psilocin der Wirkstoff von halluzinogenen Pilzen, den sogenannten „Magic Mushrooms“, ist. Bufotenin, ein Positionsisomer von Psilocin, kommt im Sekret einiger Kröten- und Pilzarten vor, wird aber auch endogen im Körper gebildet. Es untersteht jedoch nicht dem BtMG.

Die Bestimmung dieser Analyten in Körperflüssigkeiten ist sehr anspruchsvoll, da Psilocin einerseits licht- und sauerstoffempfindlich ist und andererseits schnell verstoffwechselt wird [1-4]. LSD ist ebenfalls lichtempfindlich und wird zudem in sehr niedrigen Dosen konsumiert [5-7]. Darüber hinaus wird es ebenfalls schnell metabolisiert [8]. Dementsprechend niedrig sind die in Körperflüssigkeiten zu erwartenden Konzentrationen. Um das Nachweisfenster zu verlängern, bietet es sich an, auch die wichtigsten Metaboliten von LSD, das *nor*-LSD und das 2-Oxo-3-hydroxy-LSD (O-H-LSD) sowie *iso*-LSD, das bei der Herstellung von LSD entsteht, mit zu erfassen (Abb. 1). Zur Analytik von Psilocin und Bufotenin in Haaren sind bisher noch keine Methoden veröffentlicht. Daher ist auch nicht bekannt, ob diese Substanzen überhaupt in Haare eingelagert werden. Positive LSD-Befunde in Kopfhair wurden bisher nur in drei Fällen veröffentlicht [9,10].

Ziel der Dissertation war, Methoden zu entwickeln mit denen die in Abbildung 1 aufgeführten Substanzen in Körperflüssigkeiten und Haaren bestimmt werden können. Zudem sollten umfassende Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt werden.

### **2. Methoden**

#### **2.1 Bestimmung von Halluzinogenen in Serum, Plasma und Urin**

Nach dem Verdünnen mit Phosphatpuffer (pH 6) wird das Probenmaterial mit Ascorbinsäure versetzt, um Psilocin während der Extraktion zu schützen. Die Festphasenextraktion (SPE) mit mixed-mode Kationenaustauschersäulen wird lichtgeschützt durchgeführt. Zwischen Waschschritten mit Phosphatpuffer, Wasser, Methanol und Ethylacetat werden die Säulen mit Stickstoff getrocknet. Vor der Elution mit ammoniakalischem Dichlormethan/Isopropanol wird Ascorbinsäure in die HPLC-Vials gegeben. Das Eluat wird eingedampft und im HPLC-Fließmittel zur LC-ESI-MS/MS-Messung im MRM-Modus aufgenommen.

Die Validierung der Methode wurde gemäß der Richtlinien der GTFCh durchgeführt. Details sind in [11] aufgeführt.

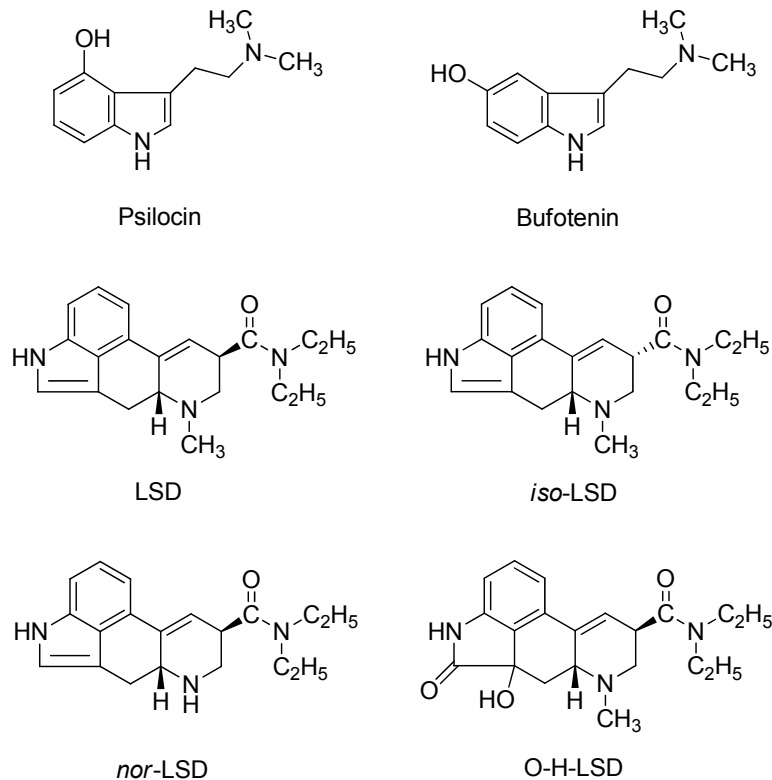


Abb. 1. Strukturformeln wichtiger Halluzinogene und einiger Metabolite.

## 2.2 Bestimmung von Halluzinogenen in Haaren

Haarproben werden in einem 1:1-Gemisch aus Methanol und Salzsäure lichtgeschützt 6 h im Ultraschallbad extrahiert. Die Aufreinigung der Haarextrakte erfolgt mit der leicht modifizierten SPE-Methode für Körperflüssigkeiten [12]. Die Extrakte werden mit LC-ESI-MS/MS vermessen.

## 2.3 Synthese von Psilocinglucuronid

Die genauen Synthesebedingungen für Psilocinglucuronid (PCG) sind in [13] beschrieben.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Bestimmung von Halluzinogenen in Serum, Plasma und Urin

Es sollte eine Methode entwickelt werden, mit der neben Psilocin auch LSD und einige seiner Metaboliten erfasst werden können. Um ein breites Spektrum an Untersuchungsmatrices abzudecken, sollte die Methode auf Serum, Plasma und Urin angewendet werden. Es stellte sich heraus, dass es sinnvoll ist, auch Bufotenin, ein Positionsisomer von Psilocin, mit einzubeziehen. Bufotenin kann endogen in Urinproben vorkommen. Es ist jedoch nicht möglich, es massenspektrometrisch von Psilocin zu differenzieren. Um falsch positiven Psilocin-Befunden vorzubeugen, ist es notwendig, Bufotenin zuverlässig von Psilocin unterscheiden zu können.

Als Messtechnik wurde aufgrund ihrer hohen Selektivität und Sensitivität die Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandemmassenspektrometrie mit positiver Elektrospray-Ionisation im Multiple Reaction Monitoring-Modus gewählt. Die flüssigchromatographische Trennung erfolgte an einer C18-Säule. Hierbei musste die Trennung der Isomerenpaare Bufotenin/Psilocin, LSD/*iso*-LSD und *nor*-LSD/*nor-iso*-LSD (Metabolit von *iso*-LSD) gewährleistet werden, wozu ein Gradient mit Ammoniumacetatpuffer und Acetonitril (jeweils mit Ameisensäure) verwendet wurde.

Die SPE mit einem polymerbasierten mixed-mode-Material (apolare Wechselwirkungen und starker Kationenaustauscher) erwies sich als die geeignetste Methode, um die Analyten aus verschiedenen Matrices zu extrahieren. Die Extraktionssäulen konnten zur Entfernung von Matrixbestandteilen intensiv wässrig und mit organischen Lösungsmitteln gewaschen werden. Die gesamte Extraktion wurde wegen der Lichtempfindlichkeit von Psilocin und LSD lichtgeschützt durchgeführt. Aufgrund der Sauerstoffempfindlichkeit war es notwendig, die Säulen mit Stickstoff zu trocknen, anstatt wie sonst üblich mit Luft durch Anlegen von Vakuum. Während der Elution mussten Polypropylenspitzen eingesetzt werden, da die normalerweise verwendeten Metallspitzen zur teilweisen Zersetzung der Analyten führten. Zudem war es notwendig, die Proben vor der SPE zum Schutz vor Oxidation mit Ascorbinsäure zu versetzen und vor der Elution Ascorbinsäure in die Vials vorzulegen, um Psilocin auch während des Eindampfens der Extrakte zu schützen und eine ausreichende Autosamplerstabilität zu gewährleisten. Die Methode wurde erfolgreich gemäß der Richtlinien der „Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie“ (GTFCh) validiert. Einzelheiten hierzu in [11].

### 3.2 Bestimmung von Halluzinogenen in Haaren

Um die Extraktion der Analyten aus der Haarmatrix simulieren zu können, wurde Leerhaar mit den Substanzen angereichert, indem es eine Woche in eine hochkonzentrierte Lösung der Analyten eingelegt wurde. Dabei wurden alle Analyten in die Haare eingelagert.

Die angereicherten Haare wurden mit verschiedenen Extraktionsmitteln untersucht. Die Extraktion mit Salzsäure ergab bessere Ergebnisse für die polareren Verbindungen Psilocin, Bufotenin und O-H-LSD, während die unpolaren Analyten besser mit Methanol extrahiert wurden. Ein Gemisch aus Salzsäure und Methanol erwies sich schließlich als am besten für alle Analyten. Haarextrakte müssen aufgrund starker Matrixbelastung meist noch aufgereinigt werden. Hierfür wurde die SPE-Methode für Halluzinogene aus Körperflüssigkeiten angepasst. Die Methode wurde erfolgreich validiert und eignet sich zur quantitativen Bestimmung aller Analyten aus Haaren mit Ausnahme von O-H-LSD, welches nur qualitativ erfasst werden kann [12].

### 3.3 Synthese von Psilocinglucuronid

Psilocinglucuronid ist der kommerziell bisher nicht erhältliche Hauptmetabolit von Psilocin. Bisher wurde nur eine Synthese für PCG auf enzymatischem Weg mit Rattenlebermikrosomen veröffentlicht [14]. Während der Dissertation wurde PCG in Anlehnung an die Herstellung von Paracetamolglucuronid [15] und Morphindiglucuronid [16] auf chemischem Weg synthetisiert (Abb. 2).

Psilocin (**1**) wurde dabei mit Methyl-2,3,4-tri-*O*-isobutyryl-1-*O*-trichloracetimidoyl- $\alpha$ -D-glucopyranuronat (**2**) in Anwesenheit von Bortrifluorid-Etherat umgesetzt. Nach der Abspaltung der Schutzgruppen mit Natronlauge wurden 12 mg PCG (**4**, 18 %) erhalten. Dies ist das erste Mal, das eine erfolgreiche chemische Synthese von PCG beschrieben wurde [13].

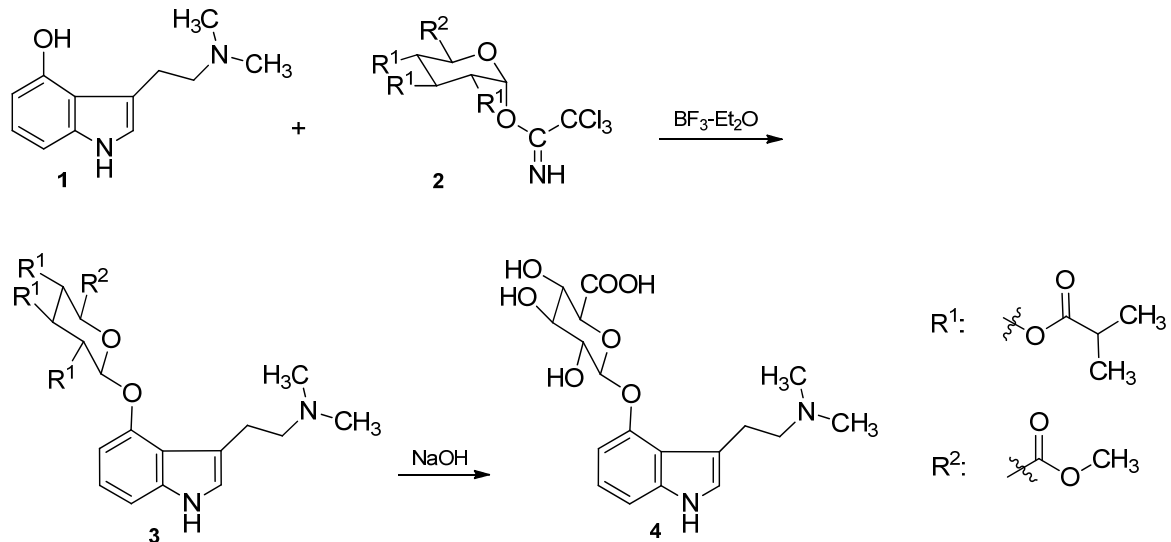


Abb. 2. Synthese von Psilocinglucuronid (4).

### 3.4 Stabilitätsuntersuchungen

Es wurden außerdem umfassende Untersuchungen zur Stabilität der Analyten in verschiedenen Matrices durchgeführt, da bisher nur unvollständige Daten in der Literatur vorliegen. Die Stabilität von PCG konnte mit dem synthetisierten Referenzstandard erstmals untersucht werden.

Die Kurzzeitstabilität der Analyten in Vollblut (mit Natriumfluorid-Zusatz) wurde bei verschiedenen Temperaturen über den Zeitraum von einer Woche evaluiert. Die meisten Analyten wiesen in tiefgefrorenen Blutproben große, nicht reproduzierbare Verluste auf. LSD und *iso*-LSD waren über eine Woche bei Raumtemperatur stabil, die anderen Analyten zeigten eine zeitliche Abnahme, die bei Psilocin besonders groß war. PCG war dabei deutlich stabiler als Psilocin. In gekühlten Proben waren alle Analyten am stabilsten. Blutproben, die auf Halluzinogene untersucht werden sollen, dürfen demnach nicht tiefgefroren werden. Sie sollten bis zum Eintreffen in der forensischen Untersuchungsstelle, in der sie zentrifugiert und abesert werden, gekühlt aufbewahrt werden [13,17].

Darüber hinaus wurden die Einfrier-/Auftaustabilität und Langzeitstabilität der Analyten in Serum und Urin bestimmt. Alle Analyten waren nach drei Einfrier-/Auftauzyklen sowie nach sechs Wochen Lagerung unter Tiefkühlung noch stabil. LSD, *iso*-LSD und *nor*-LSD wiesen nach sechs Monaten in Urin leichte Verluste auf. Psilocin war in Serum und Urin nach sechs Monaten ebenfalls nicht mehr stabil, PCG dagegen schon. Abschließend kann gesagt werden, dass PCG stabiler als Psilocin ist [11,13].

### 4. Zusammenfassung

Es wurden empfindliche und schnelle Extraktions- und Detektionsmethoden mit sauberen Extrakten zur simultanen Bestimmung von Psilocin, Bufotenin, LSD und seinen Metaboliten in Serum, Plasma, Urin und Haaren entwickelt, bei denen die instabilen Analyten optimal geschützt werden. Zudem gelang erstmals die erfolgreiche chemische Synthese von Psilocinglucuronid, dem Hauptmetaboliten von Psilocin. Es wurden außerdem umfangreiche Untersuchungen zur Kurz- und Langzeitstabilität der Analyten durchgeführt, wobei sich Psilocinglucuronid als stabiler erwies als Psilocin.

## 5. Danksagung

Ich danke der GTFCh für die großzügigen Reisestipendien, die es mir ermöglichten, meine Ergebnisse bei den Jahrestreffen der TIAFT 2011 in San Francisco und 2012 in Hamamatsu vorzustellen.

## 6. Literatur

- [1] Hasler, F.; Bourquin, D.; Brenneisen, R.; Bär, T.; Vollenweider, F. X. Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man. *Pharm. Acta Helv.* 1997, 72, 175-184.
- [2] Holzmann, P. Bestimmung von Psilocybin-Metaboliten im Humanplasma und -urin. Dissertation. Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1995.
- [3] Anastos, N.; Barnett, N. W.; Pfeffer, F. M.; Lewis, S. W. Investigation into the temporal stability of aqueous standard solutions of psilocin and psilocybin using high performance liquid chromatography. *Science & Justice* 2006, 46, 91-96.
- [4] Lindenblatt, H.; Krämer, E.; Holzmann-Erens, P.; Gouzoulis-Mayfrank, E.; Kovar, K. Quantitation of psilocin in human plasma by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection: comparison of liquid-liquid extraction with automated on-line solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 1998, 709, 255-263.
- [5] Musshoff, F.; Daldrup, T. Gas chromatographic/mass spectrometric determination of lysergic acid diethylamide (LSD) in serum samples. *Forensic Sci. Int.* 1997, 88, 133-140.
- [6] Skopp, G.; Pötsch, L.; Mattern, R.; Aderjan, R. Short-term stability of lysergic acid diethylamide (LSD), *N*-desmethyl-LSD, and 2-oxo-3-hydroxy-LSD in urine, assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2002, 48, 1615-1618.
- [7] Geschwinde, T. *Rauschdrogen, Marktformen und Wirkungsweisen*, 5. Auflage, Springer-Verlag: Berlin, 2003.
- [8] Papac, D. I.; Foltz, R. L. Measurement of lysergic acid diethylamide (LSD) in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* 1990, 14, 189-190.
- [9] Nakahara, Y. Detection of LSD and metabolite in rat hair and human hair. *J. Anal. Toxicol.* 1996, 20, 323.
- [10] Röhrich, J.; Zörntlein, S.; Becker, J. Analysis of LSD in human body fluids and hair samples applying ImmunoElute columns. *Forensic Sci. Int.* 2000, 107, 181-190.
- [11] Martin, R.; Schürenkamp, J.; Gasse, A.; Pfeiffer, H.; Köhler, H. Determination of psilocin, bufotenine, LSD and its metabolites in serum, plasma and urine by SPE-LC-MS/MS. *Int. J. Legal Med.* 2013, 127, 593-601.
- [12] Martin, R.; Schürenkamp, J.; Gasse, A.; Pfeiffer, H.; Köhler, H. Analysis of Psilocin, Bufotenine and LSD in Hair. *J. Anal. Toxicol.* 2014, 1-4 (doi:10.1093/jat/bku141)
- [13] Martin, R.; Schürenkamp, J.; Pfeiffer, H.; Lehr, M.; Köhler, H. Synthesis, hydrolysis and stability of psilocin glucuronide. *Forensic Sci. Int.* 2014, 237, 1-6.
- [14] Shoda, T.; Fukuhara, K.; Goda, Y.; Okuda, H. Enzyme-assisted synthesis of the glucuronide conjugate of psilocin, an hallucinogenic component of magic mushrooms. *Drug Test. Anal.* 2011, 3, 594-596.
- [15] Brown, R. T.; Mayalarp, S. P.; McGown, A. T.; Hadfield, J. A. An efficient synthesis of paracetamol glucuronide from paracetamol. *J. Chem. Research* 1993, 12, 496-497.
- [16] Brown, R. T.; Carter, N. E.; Mayalarp, S. P.; Scheinmann, F. A simple synthesis of morphine-3,6-di- $\beta$ -d-glucuronide. *Tetrahedron* 2000, 56, 7591-7594.
- [17] Martin, R.; Schürenkamp, J.; Pfeiffer, H.; Köhler, H. A validated method for quantitation of psilocin in plasma by LC-MS/MS and study of stability. *Int. J. Legal Med.* 2012, 126, 845-849.