

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

## **Neue Psychoaktive Substanzen – Entwicklung analytischer Methoden und Untersuchung ihres Metabolismus**

**Lars Ambach**

Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie und Chemie, Universität Bern,  
Bühlstrasse 20, CH-3006 Bern, Schweiz; Lars.Ambach@ugent.be

---

### **1. Einleitung**

Neue psychoaktive Substanzen (NPS) spielen seit ca. 2008 eine immer größere Rolle in der forensischen und klinischen Toxikologie. NPS können allgemein als Substanzen definiert werden, die weder dem UN-Einheitsabkommen über die Betäubungsmittel (1961) noch der UN-Konvention über psychotrope Substanzen (1971) unterstehen. Dies umfasst verschiedene Substanzklassen wie z.B. synthetische Cannabinoidrezeptoragonisten, Phenethylamine, Cathinone, Piperazine, Tryptamine etc. [1, 2] Diese Substanzen werden als kommerzielle Produkte verkauft mit der Absicht, bestehende Betäubungsmittelgesetze zu umgehen und legale Alternativen zu üblichen Missbrauchssubstanzen wie Cannabisprodukten oder Stimulanzien wie Amphetamin anzubieten. Landesabhängig wurden bereits verschiedene gesetzliche Maßnahmen ergriffen um diesem Problem zu begegnen.

### **2. Ergebnisse und Diskussion**

#### **2.1. Entwicklung von Nachweismethoden mittels LC-MS/MS**

Die Durchsetzung solcher gesetzlichen Maßnahmen erfordert jedoch passende analytische Methoden um einen Substanzgebrauch zu erkennen. Der erste Teil meiner Dissertation beschäftigt sich daher mit Methodenentwicklung. Zuerst wurde eine Methode zur Quantifizierung von 56 NPS in Vollblut und Urin mittels HPLC-MS/MS entwickelt und gemäß den Richtlinien der GTFCh validiert. Vollblutproben wurden mittels Festphasenextraktion, Urinproben mittels Flüssig-flüssig-Extraktion aufgearbeitet. Um bei der relativ großen Anzahl erfasster Substanzen noch eine Zykluszeit des Massenspektrometers  $< 1$  s zu erreichen, wurde im scheduled-MRM-Modus gemessen, bei dem MRM-Übergänge nur in einem relevanten Retentionszeit-Bereich erfasst werden [3]. Die Bestimmungsgrenzen lagen zwischen 1 und 10 ng/mL bei einer Probenlaufzeit von 20 min.

Um den mit der Analyse verbundenen Arbeitsaufwand weiter zu optimieren, wurde ein schnelleres qualitatives Screening-Verfahren für 64 NPS mit Hilfe von getrockneten Blutproben (Dried Blood Spots, DBS) als schnelle und einfache Probenvorbereitung für Vollblutproben entwickelt. Nachweisgrenzen lagen zwischen 1 und 10 ng/mL bei einem eingesetzten Probenvolumen von 10  $\mu$ L [4]. Die Probenlaufzeit betrug 10 min.

Im Laufe des Projekts stieg die Anzahl bekannter NPS deutlich an. Eine fortwährende Methodenerweiterung stellte sich in der Praxis als herausfordernd dar, da nach jeder Anpassung der bestehenden MRM-basierten Methoden eine umfassende Revalidierung notwendig wäre.

Einen möglichen Lösungsansatz für dieses Problem stellen „untargeted methods“ dar, d.h. Verfahren, bei denen die eigentliche Messmethode und das erfasste Substanzspektrum weitestgehend voneinander unabhängig sind. Dies lässt sich z.B. durch bibliotheksbasierte Methoden bewerkstelligen. Da im Falle einer Methodenerweiterung nur die Bibliothek nicht aber die eigentliche Messmethode verändert wird, ist eine umfangreiche Revalidierung nicht nötig. Entsprechend wurde eine Massenspektren-Bibliothek für NPS entwickelt, die konzeptionell auf den Arbeiten von Dresen et al. basiert [5-8]. Dafür wurden die Substanzen dem Massenspektrometer über eine kurze chromatographische Säule zugeführt. Dies erlaubt die Abtrennung etwaiger Verunreinigungen/Begleitstoffe in der Probe sowie eine Bereinigung der spektralen Daten durch Entfernung von Untergrundsignalen. Produktionenspektren wurden bei drei verschiedenen Kollisionsenergien (20, 35 u 50 eV) sowie mit „collision energy spread“ ( $35 \pm 15$  eV) aufgenommen, um die Substanzidentifizierung auf eine möglichst breite Datenbasis zu stellen. Aktuell enthält die Spektrenbibliothek 1564 Produktionenspektren für 388 Substanzen. Die Massenspektren stehen unter [www.legal-highs.ch](http://www.legal-highs.ch) im pdf-Format frei zur Verfügung. Für forensische und klinische Einrichtungen ist die Bibliothek auf Anfrage ([wolfgang.weinmann@irm.unibe.ch](mailto:wolfgang.weinmann@irm.unibe.ch)) auch im mdb-Format zum Gebrauch mit der Analyst-Software der Firma Sciex erhältlich.

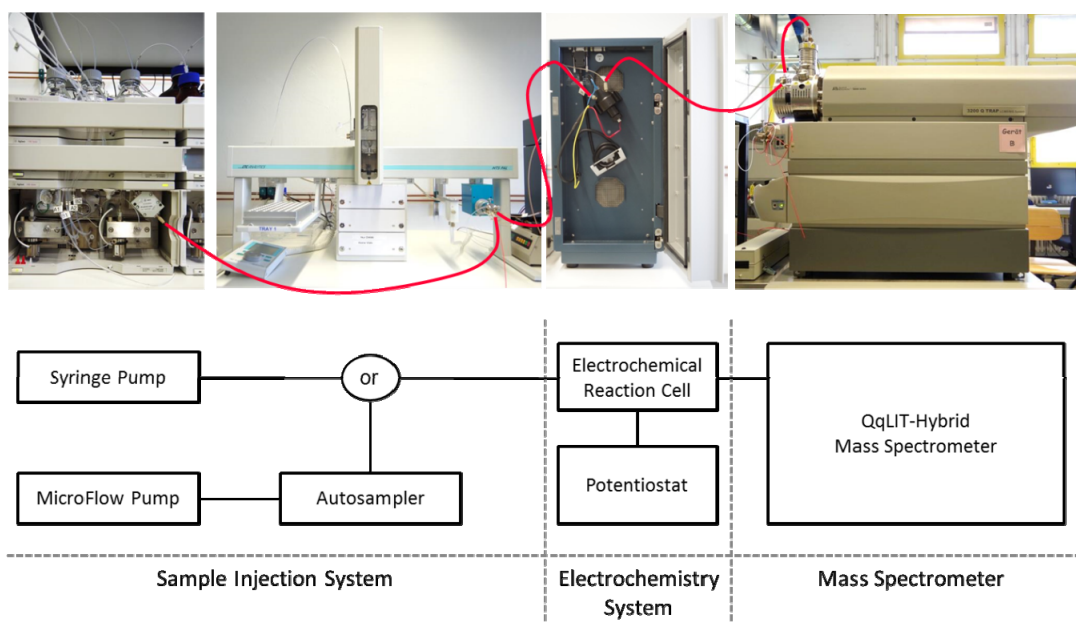


Abb. 1. Aufbau des automatisierten EC-MS-Systems.

## 2.2. Metabolisierung von NPS

Um die Metabolisierungswege verschiedener NPS aufzuklären wurden zwei verschiedene *in-vitro*-Methoden untersucht: Elektrochemie gekoppelt mit Massenspektrometrie (EC-MS) und humane Lebermikrosomen (HLM). Es konnte im Vorfeld bereits von anderen Gruppen gezeigt werden, dass EC bestimmte oxidative Reaktionen, wie sie von Cytochrom-P450-Enzymen *in vivo* katalysiert werden, nachstellen kann [9-12]. Erste Experimente wurden mit Benzylpiperazin als Modellsubstanz durchgeführt. Anschließend konnte das EC-MS-System durch Einbindung eines Autosamplers und einer Mikroflussspumpe weitgehend automatisiert werden (Abb. 1). Mit Hilfe dieses automatisierten Systems wurde die elektrochemische Konversion von 18 NPS (Amphetamine, Cathinone, Tryptamine und synthetische Cannabinoide) und drei Kontrollsubstanzen systematisch mit Kombinationen drei verschiedener mobiler Phasen (pH 2,9, 6,1 und 10,9) und vier Elektrodenmaterialien (Bor-dotierter Diamant, Glaskohlenstoff,

Gold und Platin) untersucht. In diesen 252 Messungen wurden für jede Substanz die optimalen Konversionsparameter ermittelt. Für ausgewählte Substanzen wurden die bei diesen Parametern generierten Produkte gesammelt und per HPLC-ToF-MS genauer charakterisiert. [13]. Es zeigte sich, dass mehrere bekannte *in-vivo*-Metabolite sowie weitere Oxidationsprodukte (potentielle Metabolite) generiert werden konnten. Dies erforderte jedoch für jede untersuchte Substanz mehrere Experimente unter verschiedenen Reaktionsbedingungen bzgl. mobiler Phase und Elektrodenmaterial. Eine universell einsetzbare Kombination aus mobiler Phase und Elektrodenmaterial wurde in diesen Versuchen nicht gefunden. Zusätzlich zu diesem Arbeitsaufwand wurde eine deutliche Tendenz zur Artefaktbildung beobachtet.

Als Alternative für die Generierung von NPS-Metaboliten wurde die Verwendung von HLM untersucht. Hierfür wurden das hochpotente, halluzinogene Phenethylamin-Derivat 25D-NBOMe sowie die synthetischen Cannabinoide AB-FUBINACA und EAM-2201 mit kommerziell erhältlichen HLM, hergestellt aus einem Pool von 120 Spendern, umgesetzt. Nach einer einfachen Proteinfällung mit Acetonitril zur Probenvorbereitung wurden die Proben mittels HPLC-ToF-MS analysiert.

Für 25D-NBOMe konnte ein umfassender Metabolismus aufgeklärt werden, der *O*-Demethylierungsreaktionen und Hydroxylierungen an verschiedenen Positionen, *N*-Dealkylierung sowie Kombinationen dieser Reaktionen umfasst (Abb. 2). Für AB-FUBINACA wurden ebenso umfangreiche Stoffwechselreaktionen ermittelt, während für EAM-2201 zwei Metabolite identifiziert wurden.

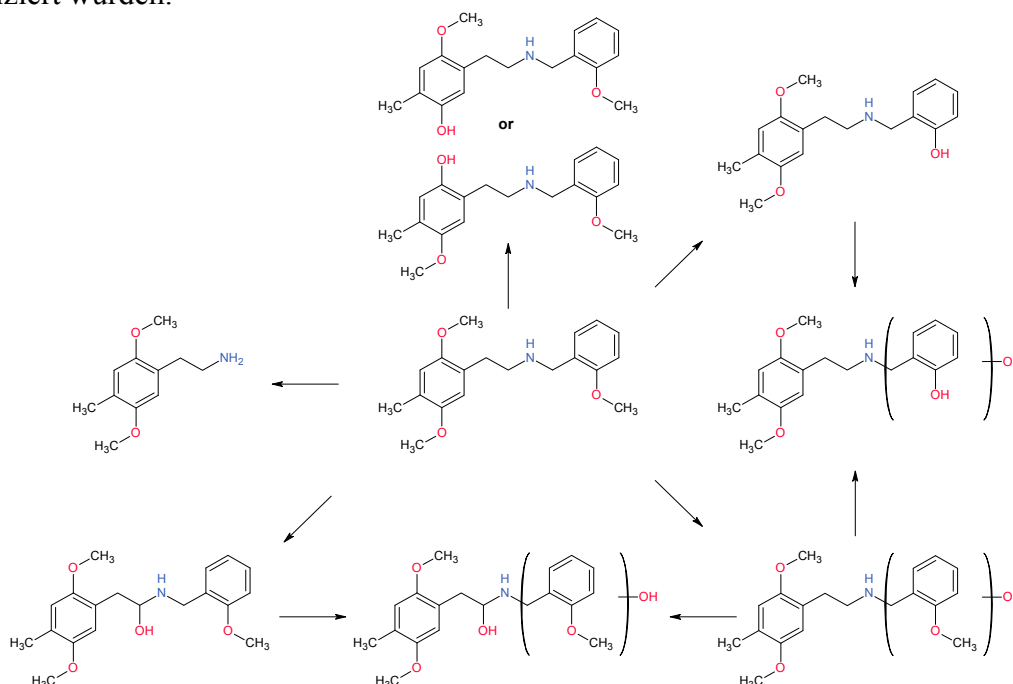


Abb. 2. Mit humanen Lebermikrosomen (HLM) ermittelte Metabolite von 25D-NBOMe.

Im Vergleich erwiesen sich HLM als geeigneter um die Metabolisierungswege neuer Substanzen zu untersuchen als EC-MS. HLM erfordern nur eine einzelne Inkubation für eine neue Substanz, während EC-MS mindestens zwölf Experimente pro neuer Verbindung erfordert. Das mit HLM erhaltene Spektrum an Reaktionsprodukten ist in der Regel auch besser mit *in vivo* ermittelten Metaboliten vergleichbar, was auch in einer parallel zu diesem Projekt durchgeführten Master-Arbeit am IRM Bern gezeigt werden konnte [14]. Ein möglicher Einsatzbereich der EC wäre jedoch z. B. die gezielte Synthese einzelner Oxidationsprodukte mit Hilfe spezieller Elektroden.

### 3. Ausblick

Aufgrund der bisherigen Erfahrungen ist davon auszugehen, dass das exponentielle Wachstum auf dem Gebiet der NPS weiter anhält und stetig neue Verbindungen auf den Markt gebracht werden. Dies macht fortwährende Anstrengungen auf dem Gebiet der Methodenentwicklung nötig. Dementsprechend wird auch die im Rahmen dieses Projektes entwickelte Massenspektrenbibliothek erweitert und aktualisiert werden. Aufgrund der zunehmende Substanzvielfalt bleibt auch das Gebiet der Metabolismus-Studien weiterhin hoch relevant.

### 4. Danksagung

Ich danke der GTFCh für die großzügige finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte, meine Forschungsergebnisse auf den Jahrestreffen der TIAFT 2011 in San Francisco und 2012 in Hamamatsu einem internationalen Publikum vorzustellen.

Des Weiteren bedanke ich mich beim Schweizer Bundesamt für Gesundheit, das meine Forschung im Rahmen zweier Projekte finanziell unterstützt hat. Dies erlaubte mir auch, weitere Ergebnisse auf den TIAFT-Jahrestreffen 2013 und 2014 zu präsentieren.

### 5. Literatur

- [1] UNODC. 2014 Global Synthetic Drugs Assessment. 2014. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Vienna. [http://www.unodc.org/documents/scientific/2014\\_Global\\_Synthetic\\_Drugs\\_Assessment\\_web.pdf](http://www.unodc.org/documents/scientific/2014_Global_Synthetic_Drugs_Assessment_web.pdf).
- [2] EMCDDA. European Drug Report 2014 - Trends and Developments. 2014. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Luxembourg. <http://www.emcdda.europa.eu/edr2014>.
- [3] Ambach L, Hernández Redondo A, König S, Angerer V, Schürch S, Weinmann W. Detection and quantification of 56 new psychoactive substances in whole blood and urine by LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 2015. 7(9): p. 1119-1136.
- [4] Ambach L, Hernández Redondo A, König S, and Weinmann W. Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Testing and Analysis*, 2014. 6(4): p. 367-375.
- [5] Dresen S, Kempf J, and Weinmann W. Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification. *Forensic Science International*, 2006. 161(2-3): p. 86-91.
- [6] Dresen S, Gergov M, Politi L, Halter C, and Weinmann W. ESI-MS/MS library of 1,253 compounds for application in forensic and clinical toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009. 395(8): p. 2521-2526.
- [7] Dresen S, Ferreirós N, Gnann H, Zimmermann R, and Weinmann W. Detection and identification of 700 drugs by multi-target screening with a 3200 Q TRAP LC-MS/MS system and library searching. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010. 396(7): p. 2425-2434.
- [8] Dresen S. PhD Thesis: Entwicklung neuer LC-MS/MS Methoden und deren Anwendung in der Forensischen Toxikologie. 2011. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock, Rostock.
- [9] Baumann A and Karst U. Online electrochemistry/mass spectrometry in drug metabolism studies: principles and applications. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2010. 6(6): p. 715-731.
- [10] Johansson T, Weidolf L, and Jurva U. Mimicry of phase I drug metabolism--novel methods for metabolite characterization and synthesis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. 21(14): p. 2323-2331.
- [11] Jurva U, Wikström HV, and Bruins AP. In vitro mimicry of metabolic oxidation reactions by electrochemistry/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000. 14(6): p. 529-533.
- [12] Jurva U, Wikström HV, Weidolf L, and Bruins AP. Comparison between electrochemistry/mass spectrometry and cytochrome P450 catalyzed oxidation reactions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003. 17(8): p. 800-810.
- [13] Pedersen AJ, Ambach L, König S, and Weinmann W. Electrochemical simulation of phase I metabolism for 21 drugs using four different working electrodes in an automated screening setup with MS detection. *Bioanalysis*, 2014. 6(19): p. 2607-2621.
- [14] Bregy L. MSc Thesis: Comparison of different in vitro techniques for the synthesis and determination of designer drug metabolites: electrochemistry-mass spectrometry, human liver microsomes and fungi. 2013. Department of Chemistry / Institute of Forensic Medicine Bern, ETH Zürich / University of Bern, Zürich / Bern.