

LC-QTOF-MS Peak-Muster-Analyse als Hinweis auf übermäßigen Konsum von Muskatnuss

Torsten Dame¹, Helena Fels¹, Hans Sachs¹, Patricia Anielski², Detlef Thieme²,
Frank Musshoff¹

¹Forensisch Toxikologisches Centrum (FTC) München, Bayerstraße 53, D-80335 München

²Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie (IDAS), Dresdner Str. 12, D-01731 Kreischa

Aims: Liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) screening has become a versatile tool for the detection of many drugs of abuse in urine. Screening procedures for the detection of synthetic cannabinoids enable to detect “unknown” substances. Using different data extraction tools can lead to unexpected (or: hitherto unknown) results. **Methods:** For this work, urine samples which were extracted for the determination of synthetic cannabinoids, were examined with special extracted ion chromatogram (XIC) tables to look for nutmeg ingredients. Analysis was performed by using liquid-liquid-extraction applying buffered extraction agents and an LC-Triple TOF 5600 system (AB Sciex, equipped with a Kinetex C18 column, Phenomenex). Results were compared to those obtained by GC-MS. Urine samples following controlled oral intake of nutmeg powder as well as supernatants from human liver microsomes after incubation were used to verify the results. **Results and Discussion:** Several case and blank samples (obtained from origin from drug rehabilitation centres) were used to illustrate the strategy. All these samples were processed with a target list of nutmeg contents (myristicin, safrole and elemicin) and their known metabolites. Additionally, the peak pattern was compared to some incidental findings during evaluation of urine samples for “spice”. We found various peaks of parent compounds (e.g. myristicin 192 Da), metabolites (e.g. hydroxy-myristicin 208 Da) and some “unknown” compounds (e.g. 416 Da). The peak pattern of positive case samples were comparable to those from controlled oral intake samples but different and unique to those from blank samples. **Conclusion:** While screening for synthetic cannabinoids we found some very characteristic peak patterns which could be explained by excessive (or: abnormal) consumption of nutmeg. In large doses, nutmeg misuse leads to psychoactive effect; however, in routine drug testing procedures nutmeg ingredients were not analysed.

1. Einleitung

Die Muskatnuss (*Myristica fragrans* Houtt.) wird seit der Antike sowohl als Gewürzmittel als auch als berauschendes Mittel verwendet. Die wichtigsten aromatischen Inhaltsstoffe im ätherischen Öl, denen eine berauschende Wirkung zugeschrieben wird, sind Myristicin, Elemicin und Safrol [1]. Um halluzinogene Effekte zu erzielen, müssen ca. 5 g Muskatnusspulver konsumiert werden [2]. Der Nachweis dieser Phenylpropanoide erfolgt vorzugsweise mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Forensisch-psychiatrische Entzugskliniken fragen im Rahmen der Abstinenzkontrolle häufiger nach einer Untersuchung auf synthetische Cannabinoide an. Diese wird im FTC mittels LC-QTOF-MS durchgeführt. Hierbei konnten einige auffällige Peaks bzw. Marker detektiert werden, die nicht den üblichen „Spice“-Komponenten, sondern einem vermeintlichen, übermäßigen Konsum von Muskatnuss zugeordnet werden konnten.

Mit dieser Arbeit soll die Vielseitigkeit der LC-QTOF-MS-Methodik unter Berücksichtigung verschiedener Software-Tools gezeigt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Urinproben aus einem Abstinenzkontrollprogramm, Überstand eines Inkubationsansatzes von humanen Lebermikrosomen (HLM) mit Muskatnusspulver, Urinproben nach Selbstingestion (orale Aufnahme von 0,2 g Muskatnusspulver, Studiendauer: 2 Tage), Muskatnusspulver (Ostermann Gewürze GmbH), Myristicin Standard (Sigma-Aldrich)

2.2. Methoden

LC-QTOF-MS: 1000 µL der Urinproben wurden nach Zugabe eines internen Standard-Mixes mit β -Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* (Merck) hydrolysiert, flüssig/flüssig extrahiert, und der eingeeengte Rückstand in 150 µL LC-Fließmittel konstituiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines LC-Systems (Agilent), gekoppelt mit einem AB Sciex TripleTOF 5600 nach Elektrospray-Ionisation im positiven Ionenmodus.

GC-MS: 2000 µL der Urinproben wurden nach Extraktion mit De-Tox Tubes A und B, anschließender Acetylierung und Rekonstitution des Rückstandes in Ethylacetat mittels GC-MS analysiert.

2.3. Datenauswertung

Die auffälligen Proben wurden in mehreren Schritten mittels PeakView- und MultiQuant-Software ausgewertet. Bei der Spice-Auswertung wurde der Marker M-01 (m/z 417) detektiert. Danach wurde ein „Non Targeted Peak Finding“ durchgeführt, wobei die Marker M-02 und M-03 detektiert wurden. Anschließend wurde für diese drei Marker sowie weitere neun Marker (M-04-12), welche sich aus den Summenformeln von Myristicin, Elemicin, Safrol und deren Hydroxy- und Demethylierungsmetaboliten zusammensetzen, ein Suspects Screening anhand einer XIC-Liste durchgeführt (Abb. 1). Dabei konnten auffällige Peakmuster mit teilweise sehr hohen Signalintensitäten verifiziert werden. Eine eindeutige Zuordnung zu einer einzelnen Verbindung war aber aufgrund der Vielzahl der Einzelpeaks und der intensiven Fragmentierungen bisher nicht möglich.

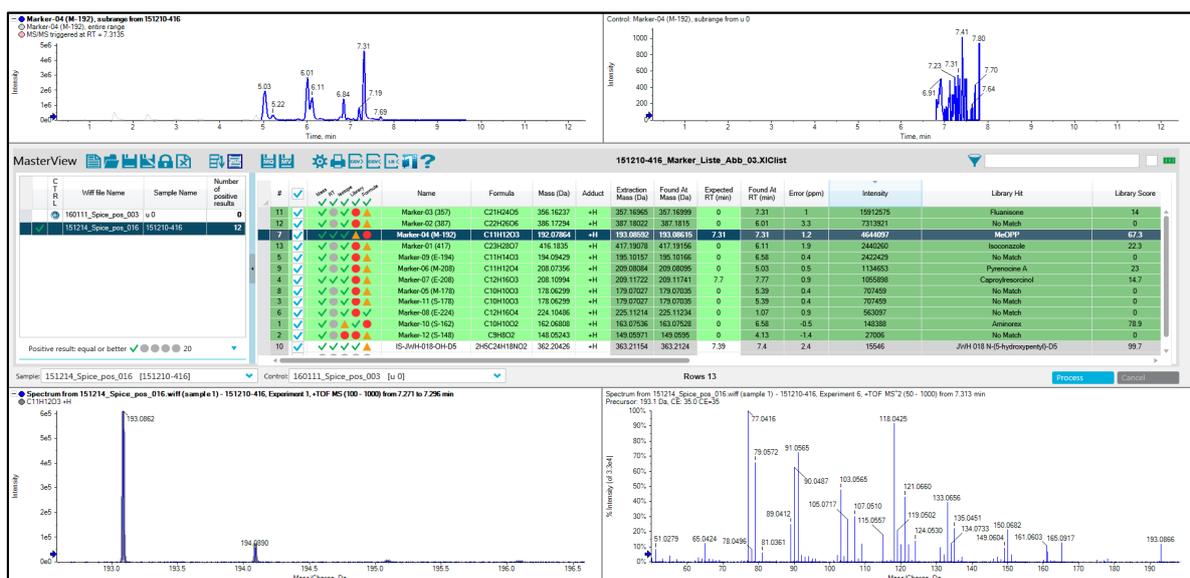


Abb. 1. LC-QTOF-MS-Auswertung mit angepasster XIC-Liste, Marker M-01-12.

Die GC-MS-Untersuchung ergab mehrere Treffer für Metaboliten von Myristicin, Elemicin und Safrol. Die Auswertung der Urinproben (Selbstversuch, negativ, positiv, Abstinenz) und der Inkubationsüberstände ist in Abbildung 2 zusammengefasst.

3. Ergebnisse und Diskussion

Von Dezember 2015 bis März 2017 wurde bei 11 Fällen mit dieser Marker-Analyse ein positives Ergebnis erzielt. Die auffälligen Klinikproben wurden mittels GC-MS bestätigt. Als Kriterium für die Bestätigung der LC-QTOF-MS-Befunde wurde festgelegt, dass die Summe der Marker M-01-03 eine Peakfläche von $1e7$ überschreiten muss. Die Untersuchung mehrerer Urinproben des Selbstversuchs über die Dauer von zwei Tagen ergab sehr ähnliche Peak-Muster, allerdings mit deutlich geringerer Intensität im Vergleich zu den Proben aus der Abstinenzkontrolle. Eine weitere Überprüfung wurde *in vitro* nach Inkubation von humanen Lebermikrosomen mit Muskatnuss durchgeführt. Auch hier zeigten sich sehr ähnliche Peak-Muster (Abb. 2).

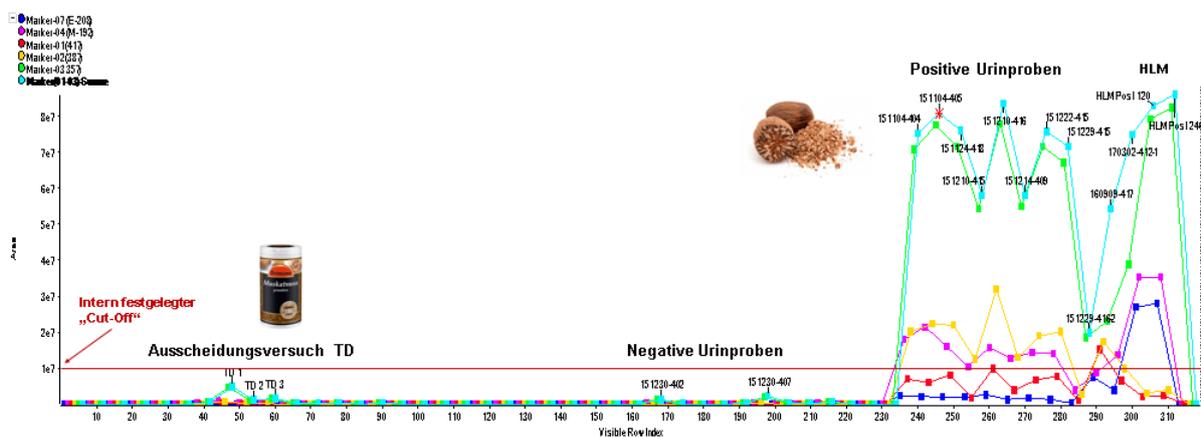


Abb. 2. Intensitätsverlauf der Marker M-01-03, M-04, M-07 – Ausscheidungsversuch, negative und positive Urinproben, HLM-Inkubationsüberstände.

4. Schlussfolgerung

LC-QTOF-MS bietet die Möglichkeit durch Anpassung der Auswertungsparameter auch andere analytische Fragestellungen in Form von hinweisgebenden Informationen zu bearbeiten. Als Nebenprodukt der Spice-Analytik ist auf diese Weise die Untersuchung auf Muskatnuss-Inhaltsstoffe entwickelt worden. Auch wenn eine eindeutige Substanzidentifizierung derzeit noch nicht möglich war, ist eine hinweisgebende Auswertung über die ausgewählten Marker und ihr Verhältnis zueinander möglich.

5. Literatur

- [1] Beyer J. Dissertation: Development of Procedures for Screening for, Identification and/or Validated Quantification of Herbal Drugs in Blood or Urine Using GC-MS, LC-MS or LC-MS/MS. 2006. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- [2] Rahman NAA, Fazilah A, Effarizah ME. Toxicity of Nutmeg (Myristicin): A Review. IJASEIT 2015; 5:212-215.