

Weder Zauberpilz noch Krötenschleim - Zur Differenzierung von Bufotenin und Psilocin mit dem Toxyper

Karsten Stemmerich^{1*}, Katharina Schulz^{2*},
Andreas Peschel², Michael Böttcher², Torsten Arndt¹

¹Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH, 55218 Ingelheim

²Medizinisches Versorgungszentrum MVZ Labor Dessau GmbH, 06847 Dessau;

karsten.stemmerich@bioscientia.de, katharina.schulz@laborpraxis-dessau.de

1. Einleitung

Bei der Untersuchung von Urinproben mittels Toxyper stießen wir kürzlich mehrfach auf die Fragestellung der Differenzierung von Psilocin und Bufotenin. Folgende Überlegungen erwiesen sich als wichtig für die toxikologische Übersichtsanalyse mit diesem kommerziellen LC-MSⁿ-Ion Trap-System der Firma Bruker:

1. Bufotenin und Psilocin sind Stellungsisomere (Abb. 1)
2. Psilocin unterliegt in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz (Anlage I) [1], Bufotenin hingegen nicht
3. Bufotenin kann endogen in Urinproben vorkommen (siehe hierzu Abschnitt 3)
4. die vom Hersteller mitgelieferten Datenbanken des Toxyper enthalten derzeit nur Informationen über Psilocin, nicht aber zu Bufotenin
5. da beide Verbindungen ein identisches Fragmentierungsmuster aufweisen, resultiert daraus eine Verwechslungsgefahr von Psilocin und Bufotenin im Toxyper, mit der Folge einer potentiellen Fehlinterpretation

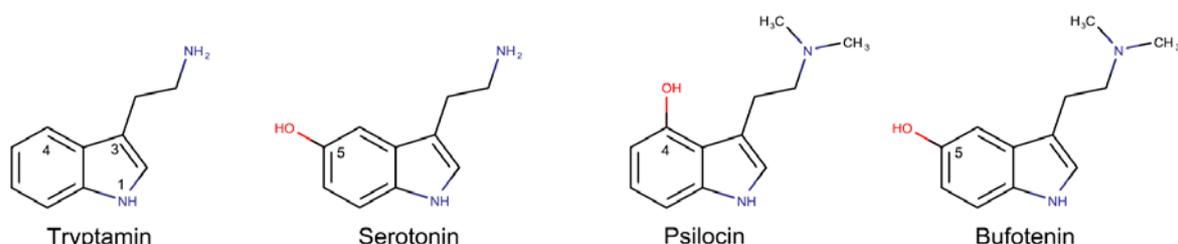


Abb. 1. Strukturformeln von Tryptamin, Serotonin (5-Hydroxytryptamin), Psilocin (4-Hydroxy-N,N-dimethyltryptamin, 4-OH-DMT) und Bufotenin (5-Hydroxy-N,N-dimethyltryptamin, 5-OH-DMT bzw. N,N-dimethylserotonin).

Psilocin (4-OH-DMT) und Bufotenin (5-OH-DMT) sind Stellungsisomere und leiten sich wie beispielsweise auch Serotonin vom Tryptamin ab (Abb. 1). Zwei weitere Isomere (6- bzw. 7-OH-DMT, nicht abgebildet) kommen weder in der Natur vor, noch sind sie als Missbrauchsdrogen bekannt [2].

2. Psilocin

Viele Pilzspezies produzieren Alkaloide mit halluzinogenen Eigenschaften (sog. „magic mushrooms“ oder „shrooms“). Wichtige psychoaktive Inhaltsstoffe dieser Pilze sind Psilocybin und das daraus im Metabolismus enzymatisch gebildete, eigentlich halluzinogene Psilocin [3].

Zu diesen Spezies gehören Pilze der nahezu weltweit vorkommenden Gattungen *Conocybe*, *Copelandia*, *Panaeolus*, *Psilocybe*, *Stropharia* [3] sowie *Galerina*, *Gymnopilus*, *Inocybe* und *Pluteus* [4]. Psilocin und dessen Phosphatester Psilocybin sind die Hauptwirkstoffe von z. B. Teonanacatl, dem mexikanischen Zauberpilz (*Psilocybe mexicana* und verwandte Arten) [4].



Diese Pilze werden vorwiegend von den Ureinwohnern Mexikos und Südamerikas für religiöse Zeremonien verwendet. Psilocin verursacht Halluzinationen und Veränderungen in der Stimmungslage [5]. Für weiterführende Informationen und ethnopharmakologische Hintergründe wird auf die entsprechende Literatur verwiesen, wie z. B. [6]. Die nebenstehende Abbildung 2 zeigt einen inzwischen auch in Deutschland häufig vorkommenden neobiotischen Vertreter der Gattung *Psilocybe*.

Abb. 2. Blauer Kahlkopf (*Psilocybe cyanescens* Wakef.) aus [7] mit freundlicher Genehmigung von Dr. Alexander Gießler, Dresden.

Psilocin und Psilocybin werden auch verwendet, um Schizophrenie in Tier- und Humanmodellen zu untersuchen [2]. Der beim gesunden Menschen durch diese psychoaktiven Substanzen („Psychotomimetika“) vorübergehend ausgelöste Zustand ähnelt in Bild und Symptomen einer Schizophrenie, wobei die psychischen Veränderungen durch Neuroleptika aufgehoben werden können [8]. Aufgrund solcher Beobachtungen wurde vermutet, dass Patienten mit Schizophrenie möglicherweise ähnliche Substanzen endogen erzeugen, sog. „Schizotoxine“. Bisher fehlt jedoch der Nachweis zwischen dem Vorkommen entsprechender Substanzen in Blut oder Urin und einer psychiatrischen Diagnose [9].

Psilocybin (mit dem aktivem Wirkprinzip Psilocin) gilt nicht nur als Modell für Psychosen. Es werden auch therapeutische Anwendungen diskutiert: Einsatz als Anxiolytikum und Antidepressivum, Behandlung von Alkoholabhängigkeit, Raucherentwöhnung, sowie Einsatz gegen Cluster-Kopfschmerzen [10]. Die Erforschung von Psilocybin zur Behandlung therapieresistenter Depressionen wird seit 2018 von der FDA unterstützt. Sie hat dem Wirkstoff im Rahmen einer Studie den Status eines beschleunigten Zulassungsverfahrens, der sogenannten „Breakthrough Therapy“, verliehen. Im Jahr 2020 wurde Psilocybin auch zur Behandlung schwerer Depressionen dieser Status von der FDA zugewiesen [11].

Nach oraler Aufnahme wird Psilocybin rasch durch Magensäure oder alkalische Phosphatasen (oder andere unspezifische Esterasen) im Darm zu Psilocin hydrolysiert. Es gibt Hinweise auf eine komplette Umwandlung von Psilocybin zu Psilocin vor der Aufnahme aus dem Verdauungstrakt in die Blutbahn. Psilocybin kann als Prodrug von Psilocin betrachtet werden. Alle *in vivo* Effekte von Psilocybin werden durch Psilocin verursacht, das die Blut-Hirn-Schranke leicht überqueren kann [12]. Die Hemmung alkalischer Phosphatasen (z. B. mit Natrium- β -glycerophosphat) kann die psychischen Symptome nach einer Psilocybin-Gabe verhindern [13].

Nach Dinis-Oliveira [12] werden etwa 65% der aufgenommenen Menge Psilocin innerhalb von 8 Stunden renal ausgeschieden, 15-20% biliär. Im Urin erscheinen etwa 80% als Psilocin-O-Glucuronid [10, 12]. Die Psilocin-Eliminationshalbwertszeit beträgt ca. 50 Minuten [5, 12].

Auf einem metabolischen Nebenweg wird Psilocin durch Demethylierung und oxidative Deaminierung über die Enzyme Monoamino-Oxidase (MAO) und Aldehyd-Dehydrogenase zu 4-Hydroxyindolacetaldehyd, 4-Hydroxyindolessigsäure und 4-Hydroxytryptophol abgebaut [12]. Nach Tyls et al. [10] werden etwa 4% über diesen Weg metabolisiert. Zur Intensivierung eines halluzinogenen Effekts von Psilocin werden daher von Drogenkonsumenten teilweise MAO-

Hemmer beikonsumiert [12]. Ein dritter Abbaueg ist die Oxidation von Psilocin durch Hydroxyindoloxidasen zu einem Produkt mit *o*-Chinon- oder Iminochinonstruktur [10, 12].

Die Toxizität von Psilocybin gilt als niedrig ($LD_{50}^{\#} = 280-285$ mg/kg KG bei Ratten bzw. Mäusen [12] und 12,5 mg/kg KG in Kaninchen [10]). Psilocin zeigt eine höhere Toxizität ($LD_{50}^{\#} = 75$ mg/kg KG in Ratten und Mäusen bzw. 7 mg/kg KG bei Kaninchen) [10]. Es gibt kein spezifisches Antidot [12]. [#]Applikationsweg nicht eindeutig benannt, wahrscheinlich oral.

Die Analytik von Psilocybin und Psilocin wird als schwierig beschrieben, nicht nur aufgrund der schnellen Metabolisierung *in vivo*, sondern auch wegen der Instabilität *in vitro* - insbesondere von Lösungen - unter Licht und Luft. Blutproben verlieren bei Raumtemperatur 90% des Gehalts innerhalb einer Woche. Abhilfe schaffen Kühlung und der Zusatz von Fluorid [5, 12]. Gefrorene Blutproben zeigen unkontrollierbare Verluste an Psilocin, vermutlich aufgrund der durch die Hämolyse beim Einfrieren freigesetzten Enzyme [5].

3. Bufotenin

Bereits 2000 v. Chr. hatten *Bufo*-Kröten bei den Azteken, Maya und Olmeken eine wichtige rituelle Bedeutung. In China werden Krötengifte seit Jahrtausenden von Heilern verwendet. Auch in Afrika, Deutschland, Griechenland, Indien, Nepal, Tibet, Sibirien und bei den Wikinger gab oder gibt es Mythen, Rituale oder Anwendungen im Zusammenhang mit Kröten. So wurden im mittelalterlichen Europa immer wieder Verbindungen zwischen Kröten und Hexen hergestellt [14]. Eine literarische Verewigung findet sich nach [14] bei Shakespeare in Macbeth. Dort beginnt der 4. Akt mit dem Schmoren von Kröten für das Hexengebräu.



Zitat aus Macbeth [15]:

„Um den Kessel dreht euch rund,
Werft das Gift in seinen Schlund:
Kröte, die im kalten Stein
Tag' und Nächte, dreimal neun,
Zähen Schleim im Schlaf gegoren,
Sollst zuerst im Kessel schmoren!“

Abb. 3. Erdkröte (*Bufo bufo*) aus [16]. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dietrich Mebs, Frankfurt am Main.

Das Wissen über die Toxizität von Krötensekret geht mindestens bis auf das Altertum zurück. So beschreibt beispielsweise der römische Dichter Juvenal (60-128 n. Chr.) die Verwendung von Kröten als Gift bei den Römern [17]. Zu ethnopharmakologischen Details s. z. B. [6, 14].

Bufotenin ist ein Positionsisomer von Psilocin (Abb. 1). Es wird aus Serotonin gebildet und kommt in Sekreten verschiedener Krötenarten der Gattung *Bufo* sowie Pflanzen der Gattungen *Anadenanthera* und *Bromisium* vor [18]. Bufotenin ist auch ein Metabolit von 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamin (5-MeO-DMT) [18], welches selber als potentes endogenes Halluzinogen gilt [19] und in Deutschland dem BtMG [1] unterliegt. 5-MeO-DMT kommt nicht nur in der Rinde tropischer Gewächse vor, sondern ebenfalls im Sekret von Kröten [19].

Weltweit gibt es über 200 Spezies der Gattung *Bufo*. Bei allen kommt Bufotenin als Bestandteil eines komplexen Sekrets vor, das als Verteidigungsmittel gegen Fressfeinde gilt. Gleichzeitig hat das Krötensekret antibakterielle und antivirale Eigenschaften [14].

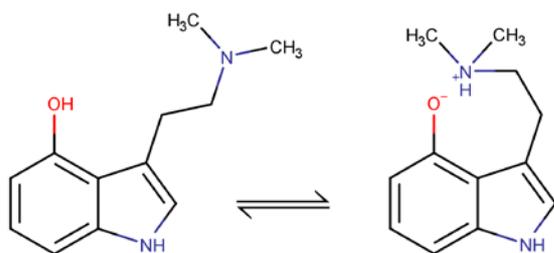
Bufotenin wurde 1893 von den französischen Wissenschaftlern Césaire Phisalix und Gabriel Bertrand identifiziert, welche auch den Namen vorschlugen [17]. Im Jahr 1920 beschrieb der österreichische Chemiker Hans Handovsky eine Isolierung der Substanz aus Krötengift [17, 20]. Er übernahm die von Phisalix und Bertrand vorgeschlagene Bezeichnung Bufotenin und vermutete, ein Pyrrolalkaloid isoliert zu haben. Tatsächlich handelte es sich aber um eine Indol-Grundstruktur [17]. Diese wurde 1934 in Heinrich Wielands Labor in München bestätigt [17, 21] und ein Strukturvorschlag gemacht, welcher von Toshiro Hoshino zwei Jahre später durch eine erfolgreiche Synthese bewiesen wurde [17].

Kulturelle Bedeutung als psychoaktive Substanz hat isoliertes Bufotenin nie erlangt, sondern nur im Zusammenspiel mit anderen toxisch oder halluzinogen wirksamen Substanzen in Form von Krötensekret oder Krötengift [6].

Seit den 1960er Jahren wurde über das Rauchen von Bufokrötensekret und seit den 1980er Jahren vom Krötenlecken berichtet [5]. Die mögliche halluzinogene Wirkung von Bufotenin wird in der von uns gesichteten Literatur kontrovers diskutiert. Beispiele für psychoaktive Effekte finden sich u. a. bei [4, 18, 22-24], Beispiele dagegen geben z. B. [5, 14, 17, 25, 26]. Das Fehlen halluzinogener Wirkungen von Bufotenin führen [25-27] darauf zurück, dass die Verbindung die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann.

Bufotenin weist nicht nur eine strukturelle Ähnlichkeit zu Psilocin auf, sondern auch z. B. zu Halluzinogenen wie LSD. Es zeigt Wirkung an Serotoninrezeptoren und hat somit halluzinogenes Potential. Allerdings ist der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von Bufotenin mit 0,06 [25] deutlich geringer als z. B. von Psilocin (3,3) [25]. Um eine halluzinogene Wirkung *in vivo* zu erhalten, gilt ein Verteilungskoeffizient von mindestens 1,4 als nötig [28]. Mit der geringeren Lipophilie kann Bufotenin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden [25].

Im Unterschied zu Bufotenin kann Psilocin einen Pseudo-Ring bilden (Abb. 4), der zu einer Erhöhung der Lipophilie führen sollte. Dies könnte den deutlich abweichenden Verteilungskoeffizienten und die bessere orale Verfügbarkeit von Psilocin erklären.



Pseudo-Ring-Struktur von Psilocin

Die Pseudo-Ringbildung von Psilocin hemmt einen schnellen enzymatischen Abbau durch die MAO. Daher ist Psilocin im Gegensatz zu seinem Stellungsisomeren Bufotenin bei oraler Aufnahme wirksam [25].

Abb. 4. Pseudo-Ring-Struktur von Psilocin, die u. a. den Verteilungskoeffizienten und damit die orale Verfügbarkeit und halluzinogene Wirkung der Substanz beeinflussen kann (nach [25]).

Bufotenin wurde zum Beispiel in Urinen von psychiatrischen Patienten, aber auch von gesunden Probanden nachgewiesen [29]. Man fand Bufotenin auch in Urinen, welche als Leerproben zur Validierung einer Messmethode für u. a. Psilocin und Bufotenin verwendet werden sollten [5]. Dies deutet darauf hin, dass Bufotenin ein physiologischer Urinbestandteil sein kann [30].

Insbesondere das Vorkommen von Bufotenin im Urin von Patienten mit Schizophrenie oder Autismus fand Beachtung. In diesen Urinen konnten unphysiologisch hohe Konzentrationen an Indolkomponenten (wie Tryptamin, Serotonin etc.) gemessen werden. Gewöhnlich werden diese Substanzen über die MAO abgebaut. Bei Schizophrenie ist aber die MAO-Aktivität vermindert, was zu einer reduzierten oxidativen Deaminierung führt und den Metabolismus von Indolen zu einem alternativen Abbauweg verschiebt [31].

Eine metabolische Alternative zur oxidativen Deaminierung ist die Transmethylierung, insbesondere wenn die MAO inhibiert oder gehemmt ist. Folglich begünstigt die bei Schizophrenie reduzierte MAO-Aktivität eine Transmethylierung von Tryptophan-Metaboliten wie Serotonin (5-Hydroxytryptamin) in die korrespondierenden dimethylierten Substanzen, wie z. B. Bufotenin (5-Hydroxy-N,N-dimethyltryptamin bzw. N,N-dimethylserotonin). Unter normalen Umständen werden diese N,N-Dimethylmetabolite über die MAO abgebaut und schnell metabolisiert. Unter pathologischen Bedingungen mit MAO-Hemmung kann es zu einer Akkumulation dieser (zumindest teilweise psychoaktiven) Substanzen im Gehirn von Patienten mit Schizophrenie kommen [31]. Dieses kann auch erhöhte Bufotenin-Werte im Urin nach Einnahme von MAO-Hemmern erklären [30, 32].

Bufotenin scheint gegen Tollwut (Rabies) wirksam zu sein. Dieses Potential wird derzeit mit Blick auf die Entwicklung eines Tollwut-Medikamentes evaluiert [33].

Bufotenin wird unter physiologischen Bedingungen zu 90% innerhalb von 12 Stunden renal eliminiert. Davon werden etwa 68-74% als 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) [34] und 1-6% unverändert als freies Bufotenin in den Urin ausgeschieden [35]. Der glucuronidierte Anteil des Bufotenins im Urin wird mit 50% [9] bis zu 69% [24, 36] angegeben. Die Toxizität von Bufotenin gilt als gering, LD₅₀ (i. p.) = 290 mg/kg KG (Maus) [4]. Sie liegt damit im Bereich von Psilocybin (s. o.). Bufotenin zeigt oral appliziert keine Wirkung [14].

Barker et al. [9] haben 69 Studien aus den Jahren 1955 bis 2010 über das Vorkommen endogener N,N-Dimethyltryptamine in Menschen ausgewertet. Danach stammt die erste Veröffentlichung über einen Nachweis von Bufotenin in Urin, basierend auf Papierchromatographie, aus dem Jahr 1955. Die frühen Studien zeigten im Vergleich zu späteren Veröffentlichungen tendenziell höhere Messwerte, was sich vermutlich durch die weniger selektiven Analysetechniken erklären lässt. Zu Bufotenin und dessen Bestimmung in Urin lagen 51 Berichte mit zusammen 1912 Individuen vor (davon 1249 Patienten vorwiegend mit der Diagnose Schizophrenie und 663 Kontrollen). Insgesamt wurden 65% aller Individuen positiv auf Bufotenin getestet (71% der Patienten und 55% der Kontrollgruppe). Zusammenschauend ergaben sich aus diesen Studien keine Hinweise auf eine Abhängigkeit oder Verfälschung der Testergebnisse von der bzw. durch die Ernährung. In den Studien wird über Bufotenin-Urinkonzentrationen von 0,48 bis 218 ng/mL berichtet [9].

4. Analytische Bearbeitung unseres Falls

Da Psilocin-Spektren in den vom Toxyper-Hersteller mitgelieferten Datenbanken (Toxyper 2.0 und Maurer-Weber-Wissenbach 2014 und 2019) enthalten sind, kann diese Substanz auch in der Standardausstattung prinzipiell mit dem Toxyper identifiziert werden. Spektren und Daten zu dessen Stellungsisomer Bufotenin sind hingegen in diesen Datenbanken nicht vorhanden. Daraus ergibt sich das Risiko einer Fehlidentifikation.

In dem hier berichteten Fall wurde uns eine Urinprobe eines 29-jährigen Patienten zur Durchführung einer ungerichteten toxikologischen Suchanalyse zugesandt. Die vom behandelnden Arzt übermittelte Diagnose lautete „Psychische und Verhaltensstörungen durch multiplen Substanzgebrauch und Konsum anderer psychotroper Substanzen: Psychotische Störung“ (ICD-10 Diagnoseschlüssel F19.5).

In dieser Urinprobe wurde mittels Toxyper Psilocin nachgewiesen (und Quetiapin, was aber für die Fallbeschreibung nicht weiter wichtig ist). Die Identifikationskriterien des Toxyper-Systems waren in zwei voneinander unabhängigen Messungen und Auswertung mittels unterschiedlicher Datenbanken voll erfüllt. Eine Identifikation von Psilocin erfolgte über die MS-Spektren bis zu einschliesslich MS³ mit sehr guter Übereinstimmung zu den Datenbanken.

Die Retentionszeit lag am Rand des vorgegebenen - jedoch sehr breiten - Retentionszeitfensters. In der Sequenz mitgeführte Kontrollen und Leerläufe waren in Ordnung bzw. unauffällig. Zusätzlich ergab das chromatographische Bild einen deutlichen Peak von hoher Intensität.

Aufgrund des für unser Labor ungewöhnlichen Befundes wurde der behandelnde Arzt konsultiert. Wir erfuhren, dass der Patient bisher mit Risperidon und Chlorprothixen behandelt, aber auf Quetiapin umgestellt wurde. Die Anamnese beschreibt Alkoholabusus und Cannabiskonsum seit dem 18. Lebensjahr, Amphetamine ab dem 25. Lebensjahr, aber keine Drogen wie Opiate oder Cocain. Eine Beeinträchtigung der Leber- oder Nierenfunktion lag nicht vor. Der Arzt konfrontierte den Patienten mit der Identifikation von Psilocin in der Urinprobe. Dieser stritt jedoch einen entsprechenden Konsum energisch ab.

Zur Überprüfung des Befundes wurde dieser Urin mit den bei uns vorhandenen Informationen an das Labor Dessau geschickt. Dort konnten die Toxytper-Ergebnisse aus Ingelheim zunächst reproduziert werden. Da die Spektren bis zur Stufe MS³ auch in Dessau mit den Datenbanken sehr gut übereinstimmen (Abb. 5) und auch das Retentionszeitfenster eingehalten wird, wäre die Identifizierung auf dem Toxytper-System als positiv anzusehen.

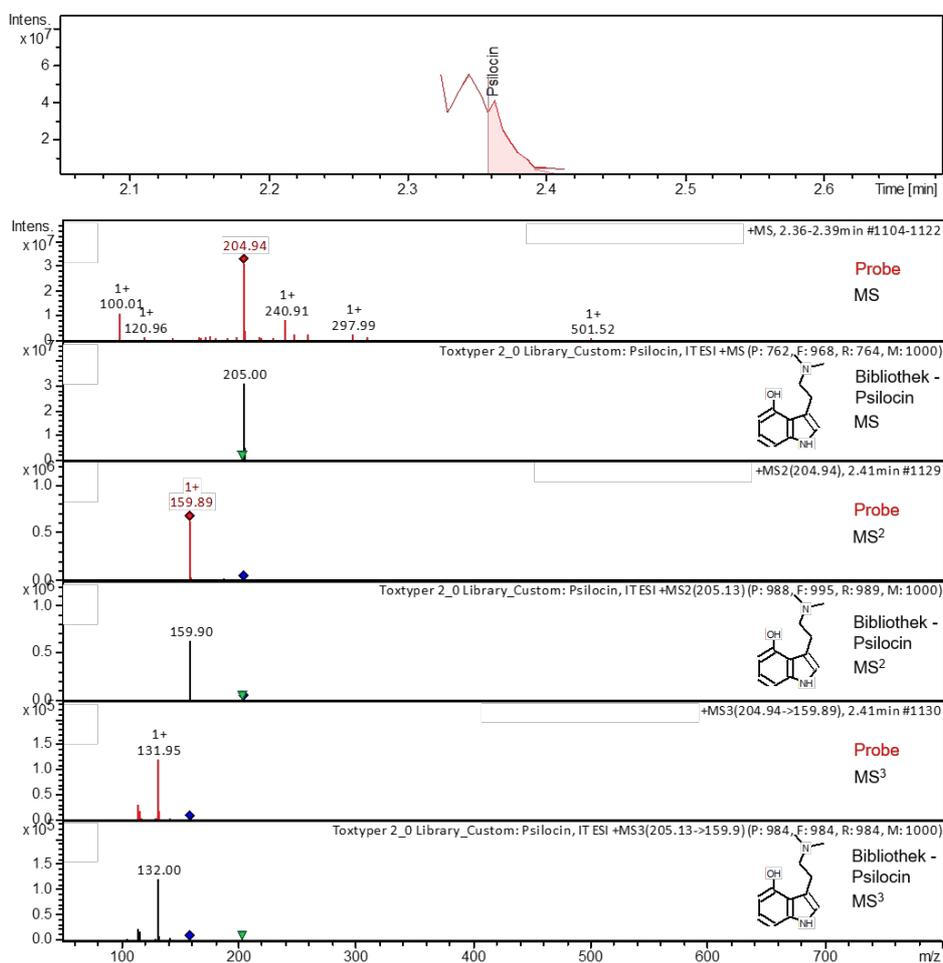


Abb. 5. Bestätigungsanalyse der vermeintlich Psilocin-positiven Urinprobe mittels Toxytper-System. Extrahiertes Ionenchromatogramm von Psilocin sowie MS, MS² und MS³-Spektren inklusive Bibliotheksabgleich.

Der sog. Purity-Wert, d. h. das Maß für die Übereinstimmung der Analysendaten (Spektren und Retention) mit den Datenbanken ist mit über 980 sehr hoch. Der Maximalwert bei völliger Übereinstimmung hat den Wert 1000. Auch deshalb erschien die Zuordnung des Messsignals zu Psilocin zunächst sicher zu sein.

Mit der in Dessau erstellten GC-MS/MS-Analyse wurde kein Psilocin gefunden, dafür jedoch eine unbekannte Substanz mit identischer Fragmentierung aber abweichender Retentionszeit.

Aufgrund der spezifischen Fragestellung nach einer Psilocin-Bestätigung wurde die Toxyper-Analytik im Labor Dessau unter Zusatz von deuteriertem Psilocin als Interner Standard wiederholt. Dabei fiel eine ungewöhnliche Retentionszeitverschiebung auf. In der Messung mittels Toxyper-Datenbank ergab sich eine relative Retentionszeit (Psilocin zu Psilocin-D10) von 0,881. Aufgrund des anderen Gradienten der mobilen Phase beträgt die relative Retention bei Verwendung der Methode zur Maurer-Weber-Wissenbach-Datenbank (MWW) 0,807. Psilocin eluierte in beiden Methoden also deutlich vor seinem deuterierten Analogon Psilocin-D10. Auf einer Umkehrphase ist dieses Verhalten nicht plausibel, üblicherweise haben die durch Deuterierung etwas polaren Internen Standards eine geringere Retention.

Man muss dabei beachten, dass die Retentionszeitverschiebung zwischen Psilocin und Psilocin-D10 bis hier hin nicht erkannt wurde und nicht erkannt werden konnte, da es in der Toxyper-Analytik nicht üblich ist, einen Internen Standard für jeden Analyten mitzuführen. Das wäre aufgrund der Vielzahl der in den Datenbanken vorhandenen Substanzen auch nicht möglich.

Die Suche nach isobaren Verbindungen mit identischen Fragmentierungsmustern konzentrierte sich schnell auf das Stellungsisomer Bufotenin, zu welchem weder in der Toxyper- noch in der MWW-Bibliothek Daten enthalten waren. Daher wurde Bufotenin als Standardsubstanz bestellt und in weitere Versuche einbezogen. Bei der Analyse mittels GC-MS/MS stimmten Retention und Fragmentierung der unbekanntes Substanz in der Urinprobe mit dem Referenzstandard von Bufotenin überein.

Zur Prüfung einer möglichen Störung der Analytik von Psilocin durch sein Stellungsisomer Bufotenin wurde die Urinprobe zusätzlich mit LC-HRMS² (Orbitrap) analysiert. Auch unter Hochauflösung zeigten Psilocin und Bufotenin identische Fragmentierungsmuster, allerdings ebenfalls unterschiedliche Retentionszeiten (Abb. 6). Bufotenin eluiert unter den verwendeten Bedingungen deutlich vor Psilocin-D10 und Psilocin.

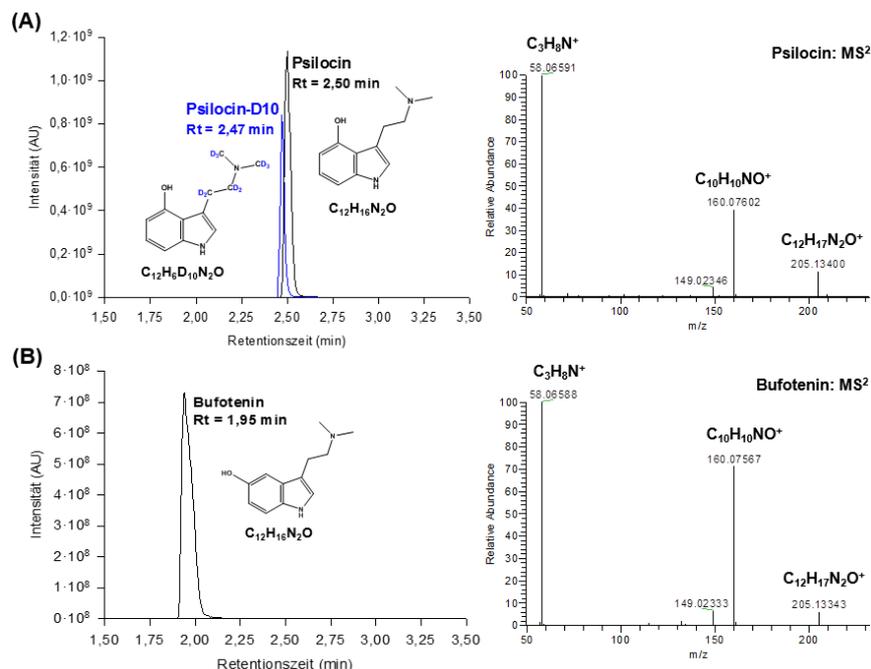


Abb. 6. Analyse von Psilocin und Bufotenin mit datenabhängiger LC-HRMS². Extrahierte Ionenchromatogramme (Massengenauigkeit: 5 ppm) von (A) Psilocin (schwarz), Psilocin-D10 (blau) und (B) Bufotenin sowie MS²-Spektren von Psilocin und Bufotenin. Messung mit matrixfreien Standard-Referenzmaterialien.

Die Analyse der vermeintlich Psilocin-positiven Urinprobe ergab somit eine eindeutige Identifizierung von Bufotenin, während Psilocin nicht nachweisbar war (Abb. 7).

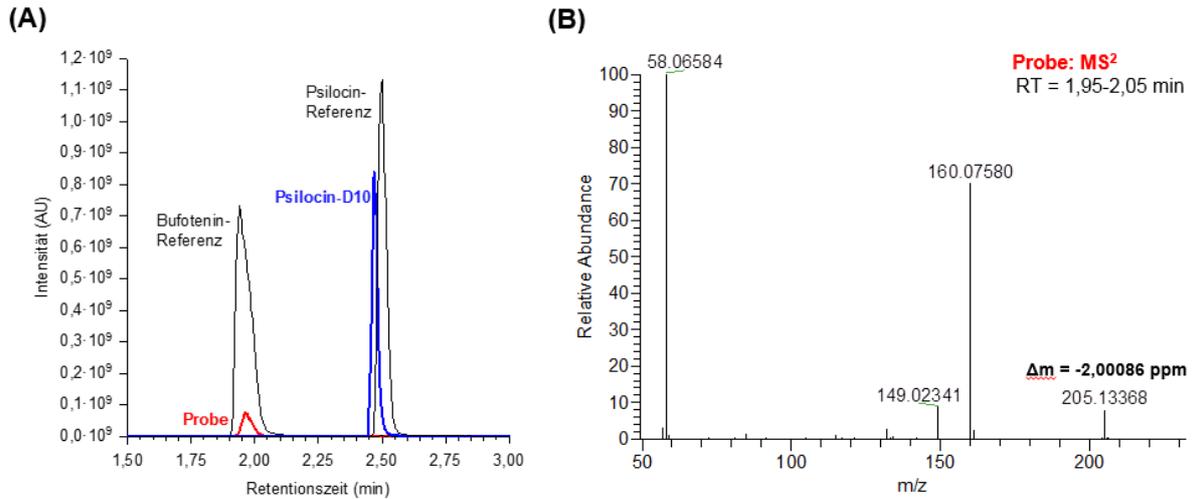


Abb. 7. Qualitative Analyse der vermeintlich Psilocin-positiven Urinprobe mit LC-HRMS². (A) Überlagerte, extrahierte Ionenchromatogramme (Massengenauigkeit = 5 ppm) der Bufotenin- und Psilocin-Referenzen (schwarz) und der Urinprobe (rot) versetzt mit Psilocin-D10 (blau). (B) MS²-Spektrum (m/z 205,13354 ± 5 ppm) der Urinprobe bei einer Retentionszeit von 1,95-2,05 min.

Abschließend wurde eine Quantifizierung durchgeführt, welche für den konkreten Fall jedoch ohne weitere diagnostische bzw. therapeutische Bedeutung war. Hierzu wurde eine 3-Punkt-Standardaddition jeweils mit Psilocin und Bufotenin unter Verwendung von Psilocin-D10 als Internem Standard durchgeführt. Dabei wurde in der untersuchten Urinprobe ein Bufotenin-Gehalt von 79 ng/mL per LC-HRMS gemessen (Abb. 8). Das Vorhandensein von Psilocin konnte auch aufgrund dieser Standardadditionsversuche ausgeschlossen werden.

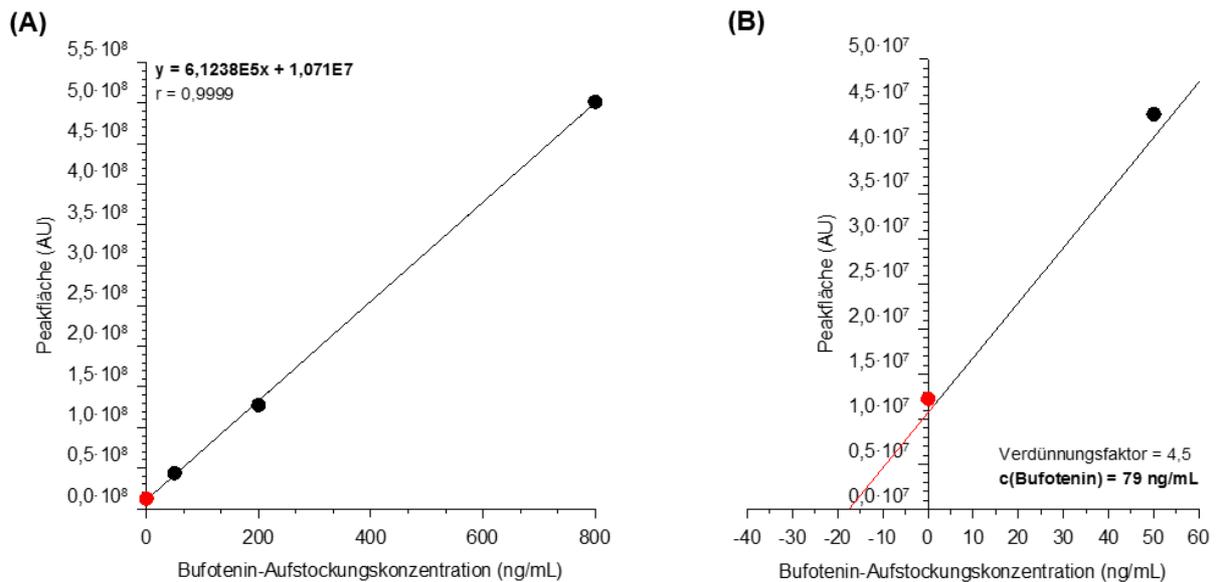


Abb. 8. Quantitative Analyse der vermeintlich Psilocin-positiven Urinprobe per Standardadditionsverfahren mit LC-HRMS. (A) Kalibrationsgerade über den gesamten Konzentrationsbereich (0 ng/mL bis 800 ng/mL) und (B) Zoom-in auf den Ursprung der Kalibrationsgerade (-40 ng/mL bis 60 ng/mL).

Die Unvollständigkeit der originalen Toxytyper-Datenbanken führte in unserem Fall also zunächst zu einem falsch-positiven Ergebnis bezüglich eines Psilocin-Nachweises. Die Toxytyper-Datenbank wurde deshalb um die mit Hilfe der Referenzsubstanz gewonnenen Spektren und Retentionszeit von Bufotenin erweitert. Bei einer Reanalyse der Urinprobe mittels Toxytyper wurde nun in beiden Laboren übereinstimmend Bufotenin eindeutig identifiziert. Zwar sind die Spektren von Psilocin und Bufotenin bis zu MS³ weiterhin qualitativ identisch, anhand der Abweichungen in der Retentionszeit ist eine Unterscheidung jedoch auch bei automatisierter Auswertung nun eindeutig möglich (Abb. 9).

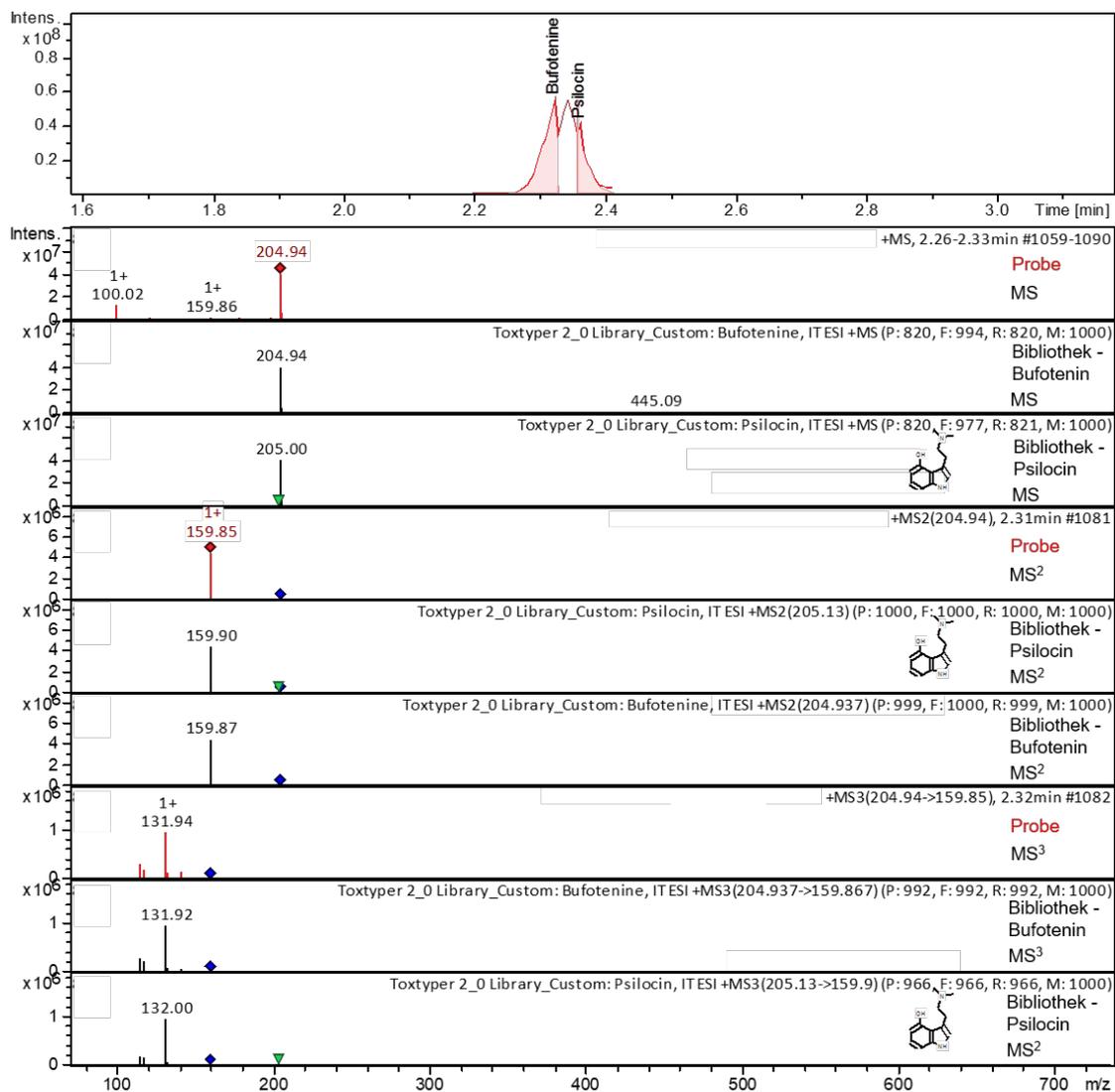


Abb. 9. Reanalyse der vermeintlich Psilocin-positiven Urinprobe mittels Toxytyper-System nach Erweiterung der Bibliotheken mit Daten zu Bufotenin. Extrahiertes Ionenchromatogramm des m/z-Verhältnisses 205 von Psilocin und Bufotenin sowie die jeweiligen MS, MS² und MS³-Spektren inklusive Bibliotheksabgleich.

Das Toxytyper-System liefert nach Erweiterung der Bibliotheken nun zwei Vorschläge zur Identifikation des unbekannten Peaks (Bufotenin und Psilocin). Zur besseren Erkennbarkeit wird das weniger gut übereinstimmende Isomer (in unserem Fall Psilocin) in der Ergebnistabelle des Toxytyper-Reports nach rechts eingerückt dargestellt (hier nicht gezeigt). Anhand der Retentionszeit ist eine Zuordnung nun eindeutig möglich.

Einzelheiten zu den verwendeten Aufarbeitungen und Messmethoden (Toxytyper, GC-MS/MS nach Silylierung, LC-HRMS und LC-HRMS²) können bei den Autoren erfragt werden.

5. Fazit

Retention ist die Grundlage der Chromatographie, einer Technik welche bis in die 1930er Jahre kaum Beachtung fand. Flüssig-flüssig-Verteilung, Kristallisation und Destillation galten bis dahin als Trennmethode der Wahl [37], wie ein Zitat von Heinrich Otto Wieland (1872-1957, Nobelpreis für Chemie 1927), aus dessen Labor die Struktur von Bufotenin vorgeschlagen wurde, über die aufkommende Chromatographie verdeutlicht [37]: „Mit viel Mühe haben wir gelernt, wie man destilliert, kristallisiert und rekristallisiert, und nun kommen sie daher und gießen das Zeug einfach durch ein kleines Rohr“.

Systeme wie der Toxyper, welche auf einem Abgleich mit Datenbanken basieren, sind neben dem Umfang der Bibliotheken stark von den verwendeten Identifikationskriterien abhängig. Der Toxyper berücksichtigt nicht nur die Übereinstimmung mit den Bibliotheksspektren bis MS³. Es werden auch Abweichungen in der Retention und der Massenzahl des Vorläuferions (m/z) in die Berechnung des Übereinstimmungswertes „Reinheit“ (Purity) einbezogen.

Beispielsweise wird in der Toxyper-Methode zur Aufzeichnung einer Substanz ein chromatographisches Zeitfenster von $\pm 0,4$ Minuten verwendet. Zur Identifikation hingegen wird eine Retentionszeitabweichung von bis zu $\pm 0,3$ Minuten akzeptiert, bis $\pm 0,5$ Minuten (und damit sogar über das chromatographische Fenster hinaus) gibt es einen Abzug auf den Reinheitswert, und Substanzvorschläge mit einer Abweichung von über 0,5 Minuten werden direkt abgelehnt.

Das vorliegende Beispiel zeigt, dass Retentionszeitabweichungen zumindest für die Identifikation von Strukturisomeren möglicherweise nicht stark genug gewichtet bzw. die zulässigen Retentionszeitfenster für eine sichere Identifikation im Einzelfall zu weit gesetzt sind.

Die Toleranzen der absoluten Retentionszeit für eine Identifikation sind in Richtlinien beispielsweise der GTFCh [38] (mit $\pm 5\%$) oder der WADA [39] ($\pm 1\%$ oder 0,1 Minute, je nachdem, was davon größer ist) deutlich enger gefasst. Bei Verwendung von Internen Standards gelten engere Grenzen, insbesondere wenn diese isotopenmarkiert sind. Deren Einsatz und damit die Verwendung von relativen Retentionszeiten ist beim Toxyper und vergleichbaren Systemen aufgrund der Fülle an Substanzen in den Datenbanken jedoch nur begrenzt möglich.

Die Toxyper-Auswertekriterien, insbesondere das Erkennungsfenster für die Retentionszeit, könnten enger gesetzt werden. Dass dieses möglich sein sollte, zeigt die chromatographische Stabilität des Toxyper-Systems anhand der arbeitstäglichen mitgeführten Qualitätskontrollen.

Hochauflösende Massenspektrometrie oder MS³ können eine chromatographische Retention im Fall von zu unterscheidenden Isomeren nicht ersetzen. Ein wichtiger Vorteil des offenen Toxyper-Systems ist die Möglichkeit, Datenbanken selbstständig auf einfache Art erweitern zu können. Dazu muss jedoch die Reinsubstanz verfügbar sein, mit der die Retentionszeit bestimmt und Spektren aufgezeichnet werden können. Mit Hilfe der Referenzsubstanz ist außerdem eine Quantifizierung per Standardaddition durchführbar oder die Identifikation trotz gestörter Chromatographie.

Bereits 2013 haben Martin et al. [5] über eine Verwechslungsgefahr der Isomere Psilocin und Bufotenin, sowie die Möglichkeit des nativen Vorkommens von Bufotenin in Urin berichtet. Die dort getroffene Schlussfolgerung hat nach unserer Einschätzung immer noch Gültigkeit [5]:

(...) it is quite common that urine samples contain bufotenine though it was not consumed as a drug. Therefore, it is important to be able to distinguish between bufotenine and psilocin to prevent false-positive psilocin results.

***Anmerkung:** Diese beiden Autoren teilen sich die Erstautorenschaft zu gleichen Teilen.

6. Literatur

- [1] https://www.gesetze-im-internet.de/btmg_1981/anlage_i.html, (abgerufen am 13.10.2020).
- [2] Mishraki-Berkowitz T, Kochelski E, Kavanagh P, O'Brien J, Dunne C, Talbot B, Ennis P und Udi W. The Psilocin (4-hydroxy-N,N-dimethyltryptamine) and Bufotenine (5-hydroxy-N,N-dimethyltryptamine) Case: Ensuring the Correct Isomer has Been Identified. *Journal of Forensic Sciences* 2020;65(5):1450-1457.
- [3] Meyer JS und Quenzer LF. *Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior*. 2nd Edition, Sunderland, Massachusetts, 2013.
- [4] Wink M, van Wyk BE und Wink C. *Handbuch der giftigen und psychoaktiven Pflanzen*. Stuttgart, 2008.
- [5] Martin R, Schürenkamp J, Gasse A, Pfeiffer H und 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.
- [6] Rätsch C. *The Encyclopedia of Psychoactive Plants – Ethnopharmacology and its Applications*. Park Street Press, Rochester, Vermont 2005.
- [7] Gießler A. *Psilocybe cyanescens in Germany - Ecology and Taxonomy of an Invasive Neomycete*. Dissertation, Faculty of Forest Sciences and Forest Ecology. Georg-August-University Göttingen, 2016, <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-002E-E322-0>, (abgerufen am 19.11.2020)
- [8] Schunack W, Mayer K und Haake M. *Arzneistoffe: Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*. 2., überarbeitete Auflage, Braunschweig 1983.
- [9] Barker SA, McIlhenny EH und Strassman R. A critical review of reports of endogenous psychedelic N,N-dimethyltryptamines in humans: 1955-2010. *Drug Testing and Analysis* 2012;4(7-8):617-635.
- [10] Tylš F, Páleníček T und Horáček J. Psilocybin – summary of knowledge and new perspectives. *European Neuropsychopharmacology* 2014;24(3):342-356.
- [11] <https://www.gelbe-liste.de/neurologie/psilocybin-durchbruchstherapie-fda> (abgerufen am 13.10.2020).
- [12] Dinis-Oliveira RJ. Metabolism of psilocybin and psilocin: clinical and forensic toxicological relevance. *Drug Metabolism Reviews* 2017;49(1):84-91.
- [13] Horita A. Some Biochemical Studies on Psilocybin and Psilocin. *J. Neuropsychiatry* 1963;4:270-273.
- [14] Lyttle T, Goldstein D und Gartz J. Bufo Toads and Bufotenine: Facts and Fiction Surrounding an Alleged Psychedelic. *Journal of Psychoactive Drugs* 1996;28(3):267-290.
- [15] Shakespeare W. *Shakespeare's Dramatische Werke*, übersetzt von A. W. v. Schlegel und L. Tieck. 8. Band, 4. Auflage, Berlin 1905.
- [16] Mebs D. *Gifftiere - ein Handbuch für Biologen, Toxikologen, Ärzte und Apotheker*. 3. Aufl., Stuttgart 2010.
- [17] Chilton WS, Bigwood J und Jensen RE. Psilocin, Bufotenin and Serotonin: Historical and Biosynthetic Observations. *Journal of Psychedelic Drugs* 1979;11(1-2):61-69.
- [18] Baselt RC. *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man*. 12th Edition, Seal Beach, California, 2020.
- [19] Shen HW, Jiang XL, Winter JC und Yu AM. Psychedelic 5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine: Metabolism, Pharmacokinetics, Drug Interactions, and Pharmacological Actions. *Curr Drug Metab*. 2010;11(8): 659-666.
- [20] Handovsky H. Ein Alkaloid im Gifte von *Bufo vulgaris*. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1920;86:138-158.
- [21] Wieland H, Konz W und Mittasch H. Die Konstitution von Bufotenin und Bufotenidin. Über Kröten-Giftstoffe. VII. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 1934;513:1-25.
- [22] Tittarelli R, Mannocchi G, Pantano F und Romolo FS. Recreational Use, Analysis and Toxicity of Tryptamines. *Current Neuropharmacology* 2015;13:26-46.
- [23] Emanuele E, Colombo R, Martinelli V, Brondino N, Marini M, Bosco M, Barale F und Politi P. Elevated urine levels of bufotenine in patients with autistic spectrum disorders and schizophrenia. *Neuroendocrinology Letters* 2010;31(1):101-1105.
- [24] Forsström T, Tuominen J und Kärkkäinen J. Determination of potentially hallucinogenic N-dimethylated indoleamines in human urine by HPLC/ESI-MS-MS. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61:547-556.
- [25] McBride MC. Bufotenine: Towards an Understanding of Possible Psychoactive Mechanisms. *Journal of Psychoactive Drugs* 2000;32(2):321-331.
- [26] Narasimhachari N und Himwich HE. The Determination of Bufotenin in Urine of Schizophrenic Patients and Normal Controls. *J. psychiat. Res.* 1972;9:113-121.
- [27] Gillin JC, Kaplan J, Stillman R und Wyatt RJ. The Psychedelic Model of Schizophrenia: The Case of N,N-Dimethyltryptamine. *Am J Psychiatry* 1976;133(2):203-208.
- [28] Barfknecht CF und Nichols DE. Correlation of Psychotomimetic Acitivity of Phenylamines and Amphetamines with 1-Octanol-Water Partition Coefficients. *Journal of Medicinal Chemistry* 1975;18(2):208-210.

- [29] Kärkkäinen J, Räisänen M, Naukkarinen H, Spoo J und Ranan R. Urinary Excretion of Free Bufotenin by Psychiatric Patients. *Biol Psychiatry* 1988;24:441-446.
- [30] Kärkkäinen J, Forsström T, Tornaues J, Wähälä K, Kiuru P, Honkanen A, Stenman UH, Turpeinen U und Hesso A. Potentially hallucinogenic 5-hydroxytryptamine receptor ligands bufotenine and dimethyltryptamine in blood and tissues. *Scand J Clin Lab Invest* 2005;65:189-199.
- [31] Gilka L. The Biochemistry of Schizophrenias. *Orthomolecular Psychiatry* 1978;7(1):6-16.
- [32] Kärkkäinen J und Räisänen M. Nialamide, an MAO Inhibitor, Increases Urinary Excretion of Endogenously Produced Bufotenin in Man. *Biol Psychiatry* 1992;32:1042-1048.
- [33] Vigerelli H, Sciani JM, Pereira PMC, Lavezo AA, Silva ACR, Collaco RCO, Rocha T, Buenos TC und Pimenta DC. Bufotenine, a tryptophan-derived alkaloid, suppresses the symptoms and increases the survival rate of rabies-infected mice: the development of a pharmacological approach for rabies treatment. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* 2020;26: e20190050.
- [34] Sanders-Bush E, Oates JA und Bush MT. Metabolism of Bufotenine-2'-14C in Human Volunteers. *Life Sciences* 1976;19:1407-1412.
- [35] Räisänen M und Kärkkäinen J. Mass fragmentographic quantification of urinary N,N-dimethyltryptamine and bufotenine. *Journal of Chromatography* 1979;162:579-584.
- [36] Räisänen J. The Presence of Free and Conjugated Bufotenin in Normal Human Urine. *Life Sciences* 1984;34:2041-2045.
- [37] Schwack W, Anastassiades M und Scherbaum E. Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln. *Chemie in unserer Zeit* 2003;37:324-335.
- [38] Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, https://www.gtfch.org/cms/images/stories/files/GTFCh_Richtlinie_For-Tox_Version-2.pdf, (abgerufen am 12.11.2020).
- [39] WADA Technical Document – TD2010IDCR https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2015idcr_-_eng.pdf, (abgerufen am 11.11.2020).