

## Experimentelle und klinische Toxikologie

# Neuen Drogen auf der Spur mittels Chromatographie und MS

LEA WAGMANN, SASCHA K. MANIER, MARKUS R. MEYER  
 INSTITUT FÜR EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE PHARMAKOLOGIE UND  
 TOXIKOLOGIE, PRÄKLINISCHES ZENTRUM FÜR MOLEKULARE SIGNALVERARBEITUNG  
 (PZMS), UNIVERSITÄT DES SAARLANDES, HOMBURG

**New psychoactive substances (NPS) are an emerging topic in analytical toxicology. They can lead to severe and even fatal intoxications whether intentionally or unintentionally consumed. To detect them in human biosamples, hyphenated mass spectrometry (MS) is currently the gold standard. We will highlight in this article the role of chromatography coupled MS in the field of NPS analysis and discuss prerequisites and recent developments.**

DOI: 10.1007/s12268-019-0214-z  
 © Springer-Verlag 2019

Die „neuen psychoaktiven Substanzen“ (NPS), früher auch unter den Namen *Legal Highs* oder *Research Chemicals* gehandelt, sind vorwiegend zentralnervös wirkende Substanzen. NPS sind chemisch und pharmakologisch betrachtet eine sehr heterogene Gruppe und werden als Ersatzstoffe für die dem Betäubungsmittelgesetz unterstehenden, klassischen Drogen vertrieben und konsumiert. Daher gibt es verschiedene NPS-Gruppen (**Abb. 1**), wie z. B. synthetische Cannabinoide als *Cannabis*-Ersatz, synthetische Cathinone als Amphetamin/Kokain-Ersatz oder Tryptamine als LSD-Ersatz. Ihre chemischen Strukturen sind typischerweise denen der Ursprungsdrogen angelehnt und unter-

scheiden sich oft nur durch kleinere Modifikationen. Die Wirkungen können ähnlich denen der Ursprungsdrogen sein, aber es können auch deutlich verstärkte Wirkungen bis hin zu schweren Intoxikationen auftreten. So sind die 2Cs und NBOMes (sehr) potente Serotoninrezeptor-Agonisten, die vor allem am Subtyp 5-HT<sub>2A</sub> wirken und so eine bewusstseinsverändernde und -verändernde Wirkung haben. Ein Missbrauch von NBOMes, 2Cs aber auch von LSD-Derivaten wurde im Zusammenhang mit schweren bzw. tödlichen Vergiftungen dokumentiert. Studien zu Toxikodynamik bzw. -kinetik sind für NPS zumeist nur in unzureichendem Maße vorhanden, da neue Drogen in der Regel keine

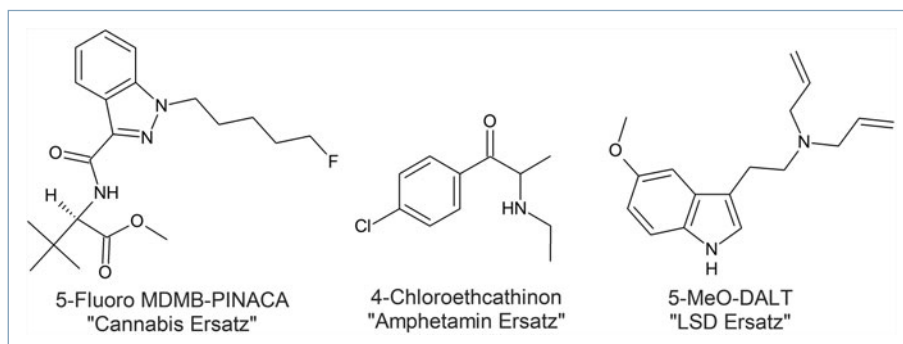
präklinischen bzw. klinischen Studien durchlaufen. Daher wurde, um die Flut an NPS einzudämmen, am 26. November 2016 das Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetz (NpSG) im Bundesgesetzblatt veröffentlicht. Das NpSG sieht ein weitreichendes Verbot des Erwerbs, Besitzes und Handels mit NPS vor.

### Nachweis mittels Chromatographiegekoppelter Massenspektrometrie

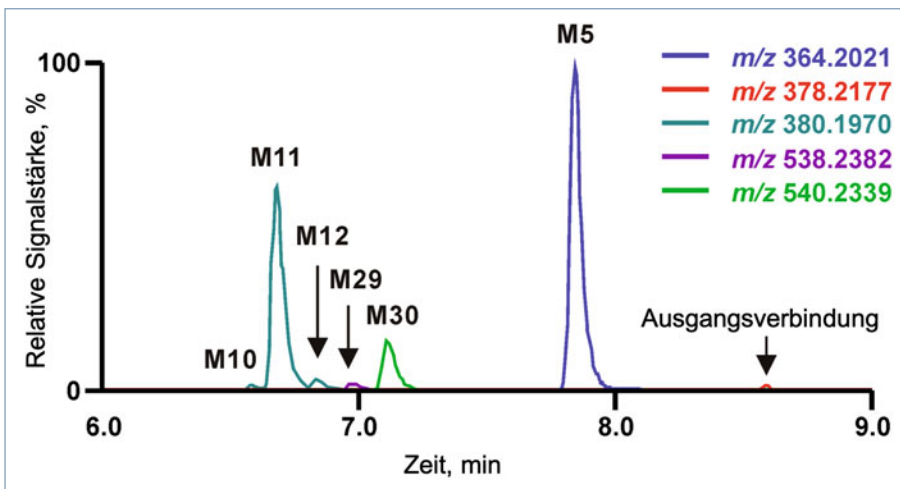
Um eine Einnahme von NPS, aber auch von anderen Substanzen, z. B. im Falle von Vergiftungen oder chronischem Missbrauch in beispielsweise Blut oder Urin nachzuweisen, bedient sich die klinisch-toxikologische bzw. forensisch-toxikologische Analytik vorwiegend der gekoppelten Massenspektrometrie. Typischerweise werden Gas- und Flüssigchromatographie im Zusammenspiel mit nieder- und hochauflösender Massenspektrometrie eingesetzt [1, 2]. Bauweisen dieser Massenanalytoren reichen hierbei von einfachen Quadrupolen (oft in Kombination mit Gaschromatographie) bis hin zu Ionenfallen, Triple-Quadrupolen sowie Quadrupolgekoppelten Flugzeit- oder Orbitrap-Massenspektrometern. Entscheidend für den Einsatz dieser Techniken ist die Möglichkeit, mit ihnen den Konsum oben genannter Substanzen nahezu zweifelsfrei unter Zuhilfenahme analytischer Kenngrößen wie Retentionszeit und Massenspektrum nachzuweisen. Oft ist es jedoch zwingend erforderlich, den Metabolismus der Substanzen zu eruieren, wenn z. B. der Nachweis aus Urin erfolgen soll und die Ausgangssubstanz lediglich in Form ihrer Stoffwechselprodukte im Urin ankommt. In **Abbildung 2** ist exemplarisch die Analyse eines Humanurins nach Einnahme des synthetischen Cannabinoids 7'-N-5F-ADB dargestellt. Aus diesem Grund sind Untersuchungen unter anderem zur Toxikokinetik von NPS unerlässlich [3].

### Metabolismus-Studien als Hilfe

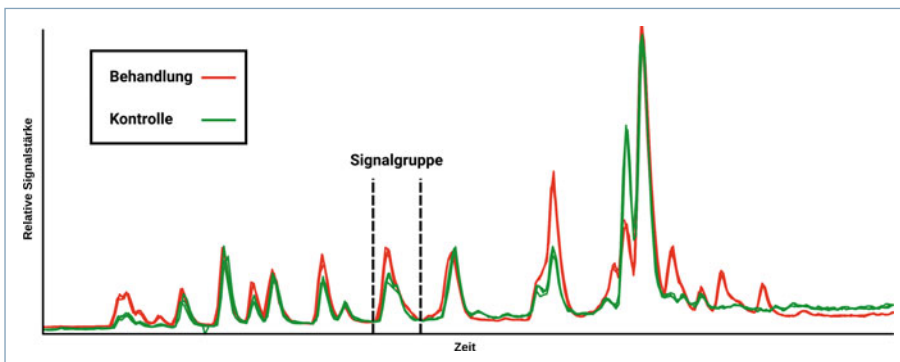
Bevor die Metaboliten von NPS in Analyseverfahren implementiert werden können, müssen diese zuerst identifiziert werden. Aus



**▲ Abb. 1:** Beispiele für Vertreter der neuen psychoaktiven Substanzen (NPS) und ihre jeweilige Gruppenzugehörigkeit.



▲ **Abb. 2:** Rekonstruiertes Ionenchromatogramm der  $m/z$  364.2021, 378.2177, 380.1970, 538.2382 und 540.2339 nach Flüssigchromatographie und hochauflösender Massenspektrometrie eines Humanurins. Das Muster der Metaboliten (M5, M10–M12, M29 und M30) bestätigte die Einnahme des synthetischen Cannabinoids 7'-N-5F-ADB. Die Ausgangssubstanz selbst (*parent compound*) war nur in Spuren zu detektieren (aus [16]).



▲ **Abb. 3:** Schematische Darstellung einer computergesteuerten Signalerkennung. Signale mit gleicher Masse und Retentionszeit werden zur statistischen Untersuchung als Signalgruppe zusammengefasst. Eine behandelte Gruppe kann beispielsweise neuen psychoaktiven Substanzen (NPS) ausgesetzt worden sein.

ethischer Sicht sind jedoch kontrollierte Humanstudien mit neuen Drogen nicht vertretbar. Gelegentlich ist dennoch Humanmaterial aus Vergiftungsfällen verfügbar, das nach geeigneter Probenvorbereitung mittels massenspektrometrischer Verfahren auf Metaboliten untersucht werden kann. Ist dies nicht der Fall, steht eine ganze Reihe von *in vivo*- und *in vitro*-Modellen zur Verfügung, die bereits erfolgreich zum Studium des Metabolismus benutzt wurden [2–4]. Ein neueres *in vivo*-Modell, das zu diesem Zweck etabliert wurde, ist die Larve des Zebrafisches [5]. Allerdings gilt es, Speziesunterschiede zum Menschen zu berücksichtigen. *In vitro*-Experimente können mit Zellen (primäre Hepatocyten oder Leberzelllinien wie HepaRG) oder Zellfraktionen (Leberzellmikrosomen oder -cytosol) durchgeführt werden. Letztgenann-

te bieten den Vorteil, sehr schnell Ergebnisse zu liefern, ohne teures Zellkulturequipment zu erfordern. Nichtsdestotrotz haben all diese *in vitro*-Modelle Limitationen durch mangelnde Verteilungs- und Eliminationsvorgänge. In Vergleichsstudien konnte aber gezeigt werden, dass auch *in vitro*-Modelle in der Lage sind, die Hauptausscheidungsprodukte der NPS im menschlichen Urin vorzusagen [3, 5].

### Einfluss der Toxikokinetik

Unter dem Begriff Pharmako- bzw. Toxikokinetik werden alle Prozesse zusammengefasst, die zur Aufnahme von Fremdstoffen in den Körper, deren Biotransformation, Gewebeerzeugung und Elimination beitragen. Im Falle von Nicht-Arzneimitteln, etwa den NPS, gibt es dazu in der Regel keine Daten, da kein

Zulassungsprozess und keine klinischen Studien durchlaufen werden. Die größte Bedeutung im Metabolismus von Xenobiotika kommt dabei den Cytochrom-P450-(CYP)-Monoxygenasen zu, deren Anteil am Stoffwechsel durch *in vitro*-Studien eruiert werden kann [3, 4]. Eine verminderte Enzymaktivität kann zu einer geringeren Biotransformationsrate, folglich zu einem erhöhten Plasmaspiegel und letztendlich möglicherweise zu toxischen Effekten führen. LSD-Derivate, wie z. B. 1P-LSD, werden fast ausschließlich durch CYP3A4 verstoffwechselt [6]. Ähnliche Untersuchungen können auch für UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) durchgeführt werden, wobei z. B. gezeigt wurde, dass hauptsächlich UGT1A4 an der Glucuronidierung von Designer-Benzodiazepinen wie Flubromazolam beteiligt ist [7]. Auch die Inhibition von Proteinaktivitäten kann sich nachteilig auswirken. NPS und klassische Drogen mit einer Methylendioxy-Partialstruktur wurden beispielsweise als potente CYP2D6-Hemmstoffe identifiziert, was zu einer erhöhten Plasmakonzentration von CYP2D6-Substraten wie Dextromethorphan oder Drogen wie  $\alpha$ -PBP führen kann [3]. NPS vom  $\alpha$ -Methyltryptamin-Typ sind starke Inhibitoren der Monoaminoxidase A, die am Abbau von Neurotransmittern wie Serotonin beteiligt ist [3]. Die Folge können serotonerge Effekte wie Hyperthermie, Krämpfe, Erbrechen und Halluzinationen sein. Das synthetische Cannabinoid WIN 55-212-2 wurde z. B. als Inhibitor der beiden humanen Transportproteine BCRP (*breast cancer resistance protein*) und P-Glykoprotein identifiziert, die maßgeblich an der Elimination von Xenobiotika beteiligt sind [4, 8].

### Omics als neues Werkzeug

Der Begriff *Omics* bezeichnet eine Reihe verschiedener Techniken, die alle eine Gemeinsamkeit besitzen: das Gesamtbild einer Messung zu erfassen und durch den Vergleich mit anderen Messungen Unterschiede zu erkennen. Für die Detektion von NPS bzw. deren Metaboliten eignet sich *Metabolomics* dabei besonders [9]. Hier wird der Fokus vor allem auf Stoffwechselprodukte gelegt. Blut, Urin oder eine andere Biomatrix wird dabei analysiert, alle Signale werden computergesteuert erkannt, und anschließend wird die Retentionszeit innerhalb erkannter Signalgruppen aneinander angeglichen [10–12]. Vergleicht man nun die Signalfächen mit und ohne Behandlung innerhalb solcher Gruppen, kann auf eine signifikante Zu- oder Abnahme eines

Analyten geschlossen werden (**Abb. 3**). Dazu werden in der Regel multivariate statistische Methoden wie Hauptkomponentenanalyse oder PLS-DA (*partial least squares discriminant analysis*) verwendet [13]. Dieses Verfahren ermöglicht es, nicht nur Metaboliten von NPS zu erfassen, sondern auch deren Einfluss auf andere Stoffwechselwege, wie den von Katecholaminen oder Fettsäuren, zu untersuchen.

Gerade bei der Signalerkennung, bei der der Computer das Signal gegen verschiedene Formen einer Standardkurve abgleicht, um die Fläche zu ermitteln, spielt die Signalform eine entscheidende Rolle [12]. Eine konstante Signalform hat aber auch Einfluss auf die statistische Auswertung, da es hier oft auf das Verhältnis von Variabilität innerhalb einer Analysengruppe zur Variabilität zwischen den Analysengruppen ankommt [13]. Der Einsatz von Gaschromatographie bietet hier viele Vorteile, da zum einen die Trennleistung einer Kapillarsäule enorm hoch und gut reproduzierbar ist und es bei der Detektion mittels Massenspektrometer zu keinen Matrixeffekten kommen kann. Allerdings sind Analyten oftmals thermolabil oder schwer verdampfbar, weshalb die Flüssigchromatographie das bevorzugte Verfahren darstellt. Aber auch mittels Flüssigchromatographie können nicht alle Analyten bedingungslos detektiert werden, da das Säulenmaterial ihren physikochemischen Eigenschaften Rechnung tragen muss. Aus diesem Grund kommen in der Regel verschiedene Säulen zum Einsatz [12]. Für lipophile Substanzen, wie Fette und Steroidhormone, wird üblicherweise eine Umkehrphasenchromatographie unter Verwendung von  $C_4$ - $C_{18}$ -Säulen eingesetzt, während für hydrophile Stoffe, wie Aminosäuren, oft eine Normalphasenchromatographie eingesetzt wird. Eine Kombination beider Techniken erlaubt es, für jede Analytengruppe die passenden Voraussetzungen zu schaffen, damit sie gleichförmige Signale bilden und die benötigte Trennleistung erreicht wird. Es hat sich gezeigt, dass ein Wechsel von Säulenchargen zwischen Analysenläufen zu Variabilitäten beitragen und somit das Ergebnis verzerren kann [14]. Ein wichtiges Kriterium der Qualitätssicherung von *Metabolomics* in Hinblick auf die Chromatographie sind die Druck- und Temperaturkurven der Analysen [15]. Diese sollten im Vergleich minimal voneinander abweichen, können aber auch bei der Auswertung der Daten zur Kor-

rektur von Retentionszeiten eingesetzt werden. Sollten bei der Korrektur der Retentionszeiten innerhalb von Signalgruppen Variabilitäten auffallen, die unregelmäßig über das Chromatogramm verteilt sind, sollten diese Aufzeichnungen zurate gezogen werden.

### Zusammenfassung

Die Flut an NPS in den letzten Jahren hat zu einer großen Anzahl von Publikationen zu diesem Thema geführt, insbesondere jedoch zu deren Nachweis mittels Chromatographie, gekoppelt an nieder- oder hochaufgelöste Massenspektrometrie. Verlässliche und hochsensitive Analyseverfahren für NPS sind unabdingbar für eine Vielzahl von Fragestellungen im Bereich der klinischen und forensischen Toxikologie, aber auch der Dopinganalytik.

### Danksagung

Die Autoren bedanken sich bei Prof. Dr. Hans H. Maurer für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. ■

### Literatur

- [1] Meyer MR, Maurer HH (2016) Review: LC coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for new psychoactive substance screening in biological matrices – where do we stand today? *Anal Chim Acta* 927:13–20
- [2] Wagmann L, Maurer HH (2018) Bioanalytical methods for new psychoactive substances. *Handb Exp Pharmacol* 252:413–439
- [3] Meyer MR (2018) Toxicokinetics of NPS: update 2017. *Handb Exp Pharmacol* 252:441–459
- [4] Meyer MR (2016) New psychoactive substances: an overview on recent publications on their toxicodynamics and toxicokinetics. *Arch Toxicol* 90:2421–2444
- [5] Richter LHJ, Herrmann J, Andreas A et al. (2019) Tools for studying the metabolism of new psychoactive substances for toxicological screening purposes – a comparative study using pooled human liver S9, HepaRG cells, and zebrafish larvae. *Toxicol Lett* 305:73–80
- [6] Wagmann L, Richter LHJ, Kehl T et al. (2019) *In vitro* metabolic fate of nine LSD-based new psychoactive substances and their analytical detectability in different urinary screening procedures. *Anal Bioanal Chem* 411:4751–4763
- [7] Pettersson Bergstrand M, Richter LHJ, Maurer HH et al. (2019) *In vitro* glucuronidation of designer benzodiazepines by human UDP-glucuronyltransferases. *Drug Test Anal* 11:45–50
- [8] Wagmann L, Maurer HH, Meyer MR (2018) Inhibition and stimulation of the human breast cancer resistance protein as *in vitro* predictor of drug-drug interactions of drugs of abuse. *Arch Toxicol* 92:2875–2884
- [9] Manier SK, Keller A, Schaper J et al. (2019) Untargeted metabolomics by high resolution mass spectrometry coupled to normal and reversed phase liquid chromatography as a tool to study the *in vitro* biotransformation of new psychoactive substances. *Sci Rep* 9:2741
- [10] Smith CA, Want EJ, O'Maille G et al. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem* 78:779–787
- [11] Barnes S, Benton HP, Casazza K et al. (2016) Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future. *J Mass Spectrom* 51:535–548
- [12] Barnes S, Benton HP, Casazza K et al. (2016) Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collect-

- ing and extracting samples and generating metabolomics data. *J Mass Spectrom* 51:ii–iii
- [13] Worley B, Powers R (2013) Multivariate analysis in metabolomics. *Curr Metabolomics* 1:92–107
  - [14] Zelena E, Dunn WB, Broadhurst D et al. (2009) Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum. *Anal Chem* 81:1357–1364
  - [15] Dudzik D, Barbas-Bernardos C, Garcia A et al. (2018) Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. *J Pharm Biomed Anal* 147:149–173
  - [16] Richter LHJ, Maurer HH, Meyer MR (2019) Metabolic fate of the new synthetic cannabinoid 7'-N-5F-ADB in rat, human, and pooled human S9 studied by means of hyphenated high-resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal* 11:305–317

### Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Markus R. Meyer  
Abteilung für Experimentelle und Klinische Toxikologie  
Universität des Saarlandes  
Gebäude 46  
Kirrberger Straße 100  
D-66421 Homburg  
Tel.: 06841-16-26438  
markus.meyer@uks.eu

### AUTOREN



Markus R. Meyer, Lea Wagmann und Sascha K. Manier (v. l. n. r.)

#### Lea Wagmann

2009–2014 Pharmaziestudium (Diplom) an der Universität des Saarlandes (UdS). 2015–2018 Promotion bei Prof. Dr. h. c. H. Maurer an der UdS und seit 2019 Postdoc bei Prof. Dr. M. R. Meyer in der Abteilung für Experimentelle und Klinische Toxikologie, Universität des Saarlandes.

#### Sascha K. Manier

2011–2015 Pharmaziestudium (Diplom) an der Universität des Saarlandes. Seit 2016 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. R. Meyer in der Abteilung für Experimentelle und Klinische Toxikologie, Universität des Saarlandes.

#### Markus R. Meyer

2000–2005 Pharmaziestudium (Diplom) an der Universität des Saarlandes. 2009 Promotion. 2014 Habilitation sowie Venia Legendi für Pharmakologie und Toxikologie. 2014–2016 Associate Professor und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinischen Pharmazie des Karolinska Institutet Stockholm, Schweden bzw. des Universitätsklinikums Heidelberg. Seit 2016 W3-Professor für Experimentelle und Klinische Toxikologie und Pharmakologie, Universität des Saarlandes.