

Zur Unterscheidung von (il)legalen Methylnmethcathinon-Isomeren mittels LC-MS/MS

Karsten Stemmerich, Stefanie Schröfel, Torsten Arndt

Bioscientia Zentrum für Toxikologie und Forensik, 55218 Ingelheim

Das Cathinon-Derivat Mephedron (4-Methylnmethcathinon, 4-MMC) unterliegt gemäß der 24. Betäubungsmittelrechts-Änderungsverordnung (BtMÄndV) [1] als Substanz der Anlage I (nicht verkehrsfähige Betäubungsmittel) dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG) [2]. Isobare und strukturähnliche Verbindungen wie beispielsweise die (Regio-)Isomere 2-Methylnmethcathinon (2-MMC) und 3-Methylnmethcathinon (3-MMC) werden derzeit nicht durch das BtMG erfasst, wenngleich die Aufnahme von 3-MMC in der 40. Sitzung des Sachverständigenausschusses für Betäubungsmittel vom Mai 2013 beschlossen wurde [3].

Wir berichten über Auffälligkeiten bei der LC-MS/MS-basierten Identifizierung von Methylnmethcathinon-Isomeren im Urin zweier stationär behandelter Suchtkranker nach deren gemeinsamen Wochenendausgang.

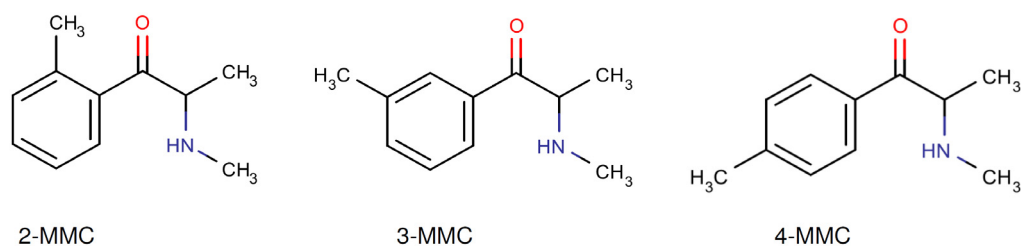


Abb. 1. Stellungsisomere von Methylnmethcathinon, 2-Methylnmethcathinon (2-MMC), 3-Methylnmethcathinon (3-MMC) und 4-Methylnmethcathinon (4-MMC, Mephedron). Bis dato wurde nur 4-MMC dem deutschen Betäubungsmittelgesetz (BtMG) unterstellt.

Ein Screening auf Designer-Amphetamine und verwandte Drogen per LC-MS/MS auf einer kurzen Säule mit einer Chromatographiezeit von 5 min zeigte in beiden Urinproben ausgeprägte, über die Linearitätsgrenze des massenspektrometrischen Detektors reichende Signale im Retentionszeitfenster von 4-Methylnmethcathinon. Um die absoluten Retentionszeiten der unbekannt Signale und deren relative Retentionszeiten in Bezug zu den internen Standards sowie die Verhältnisse der MRM-Übergänge exakt ermitteln zu können, wurden die Urinproben nach entsprechender Verdünnung erneut analysiert. Danach ergab sich für beide Proben ein deutlicher Hinweis auf Mephedron. In Bezug auf die absolute Retention von 4-Methylnmethcathinon in einer dotierten Leermatrix und auf die Verhältnisse der MRM-Übergänge lagen die Ergebnisse für beide Urinproben im zulässigen Toleranzbereich (Tab. 1).

Tab. 1. Analytische Kenndaten zur Identifikation des unbekannt Signals bezogen auf 4-MMC nach GTFCh-Kriterien [4].

	Δ absolute Retentionszeit	Δ relative Retentionszeit	Δ MRM-Verhältnis (relativ)
Probe 1	- 3,1%	- 3,1%	+ 11,8%
Probe 2	- 3,1%	- 2,4%	+ 7,4%
GTFCh-Kriterien	\pm 5%	\pm 2,5%	\pm 20% relativ

Bezogen auf die relative Retention (interner Standard MDMA-D5) erfüllte Probe 2 die vorgegebenen Anforderungen einer Identifikation nach den Kriterien in [4] vollständig, Probe 1 dagegen nicht (Tab. 1).

Daraufhin wurde eine Standardaddition mit 4-Methylmethcathinon (Mephedron) durchgeführt (Abb. 2). Sie zeigte eindeutig, dass es sich bei dem untersuchten Signal in den beiden Urinproben *nicht* um 4-Methylmethcathinon handelt. Stattdessen lag offenbar eine Substanz mit dem 4-MMC ähnlichen Retentionseigenschaften, gleichen Massenfragmenten (MRM) und vergleichbaren MRM-Intensitätsverhältnissen in den Patientenproben vor.

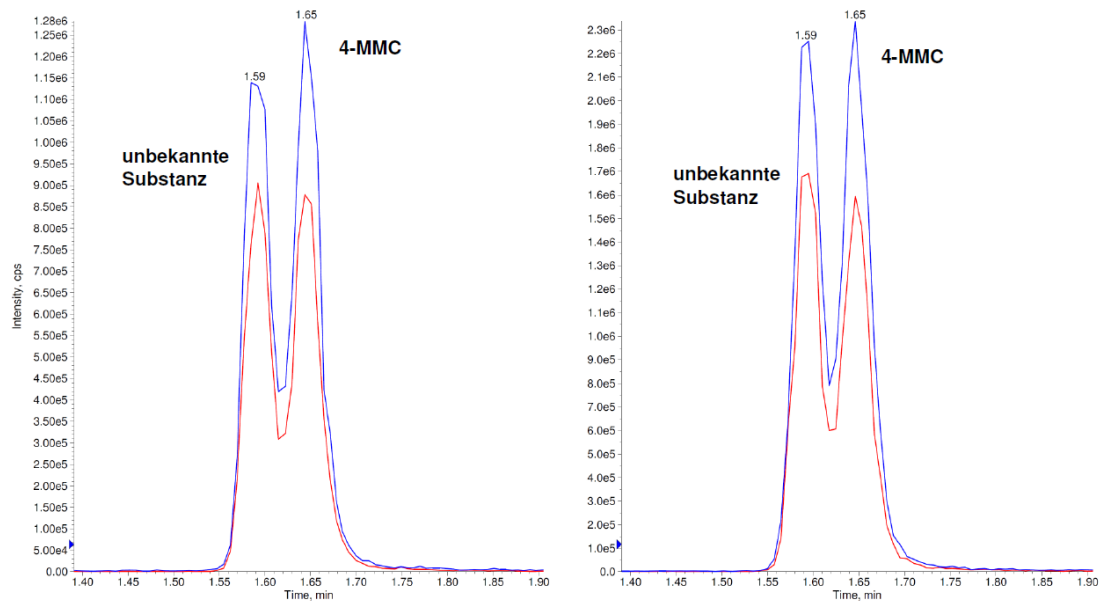


Abb. 2. MRM-Spuren einer Mephedron (4-MMC)-Addition zu Patientenprobe 1 (links) bzw. Patientenprobe 2 (rechts).

Enhanced product ion (EPI)-Spektren der unbekanntes Substanz stimmten in beiden Fällen mit dem Spektrum von Mephedron gut überein. Die EPI-Spektren führten damit auch nicht zur Identifikation der unbekanntes Substanz. Im Gegenteil, eine Auswertung der Chromatogramme über einen Spektrenvergleich (z. B. per Datenbanksuche) hätte den Verdacht auf das Vorliegen von Mephedron (4-MMC) eher erhärtet.

Zur Überprüfung, ob Stellungsisomere von 4-Methylmethcathinon, z. B. 2-MMC oder 3-MMC, für unsere Befunde ursächlich sind, wurden diese beiden, bis dato im Labor nicht vorhandenen, Substanzen beschafft. Die LC-MS/MS-Analytik von mit diesen Substanzen dotierten Leermatrizes und Aliquoten der beiden Patientenproben ergab schließlich eine Übereinstimmung der absoluten und relativen Retentionszeiten mit jenen von 3-MMC und damit die sichere Identifikation von 3-Methylmethcathinon in den beiden Patientenproben¹.

Unser Beispiel zeigt, dass auch bei Anwendung und vollständiger Erfüllung der Identifikationskriterien nach den GTFCh-Leitlinien [4] Fehlidentifizierungen für Stellungsisomere mit isobaren MRM möglich sind.

¹Aliquote der Patientenproben wurden an das Institut für Rechtsmedizin der Universität Freiburg weitergeleitet. Dort konnte die Substanz 3-MMC bestätigt werden, zusätzlich wurde ein Methylbuphedronisomer in den Proben identifiziert. Die Autoren danken der Arbeitsgruppe um Professor Volker Auwärter für die Analysen.

Eine genaue Identifizierung des Isomers kann aber von hoher Relevanz sein: So ist das in unserer Kasuistik zunächst vermutete 4-Methylmethcathinon als Betäubungsmittel eingestuft [2], das letztendlich nachgewiesene 3-Methylmethcathinon soll dagegen erst dem Betäubungsmittelgesetz unterstellt werden [3], ist also momentan legal, während das Stellungsisomer 2-Methylmethcathinon offenbar derzeit noch gar nicht zur Aufnahme in das BtMG vorgesehen ist².

Möglicherweise muss, in Reaktion auf die neuen Drogentrends, über eine Verschärfung der Identifikationskriterien diskutiert werden. Dabei könnte durchaus auf bereits etablierte Systeme zurück gegriffen [5] oder eine Standardaddition eingefordert werden [6]. Die WADA [5] beispielsweise verlangt zur Identifikation bezogen auf die absolute Retentionszeit eine maximale Abweichung von $\pm 2\%$ oder $\pm 0,1$ min (die kleinere der beiden Abweichungen gilt). Hinsichtlich der relativen Retentionszeit wird eine Abweichung von $\pm 1\%$ toleriert, bei Verwendung eines isotopenmarkierten Standards der Zielsubstanz sogar nur $\pm 0,1\%$. Diese Kriterien würden im Vergleich zu jenen aus [4] (Tab. 1) eine deutliche Verschärfung der analytischen Anforderungen bedeuten. Dies könnte sich in Anbetracht der bereits vorhandenen und noch zu erwartenden Fülle von Designerdrogen und deren Isomere jedoch als sinnvoll und notwendig erweisen.

Bei Anwendung der WADA-Kriterien [5] wäre zum Beispiel in unseren beiden Fällen 4-Methylmethcathinon als Kandidat sofort ausgeschieden (Tab. 2).

Tab. 2. Analytische Kenndaten zur Identifikation des unbekanntes Signals bezogen auf 4-MMC nach WADA-Kriterien [5].

	Δ absolute Retentionszeit	Δ relative Retentionszeit	MRM-Verhältnis absolut
Probe 1	- 3,1%	- 3,1%	76%
Probe 2	- 3,1%	- 2,4%	73%
Vergleich 4-MMC	$\pm 0\%$	$\pm 0\%$	68%
WADA-Kriterien	$\pm 2\%$	$\pm 1\%$	$\pm 10\%$ absolut

Gleichzeitig erreichen wir auch unter diesen verschärften Kriterien in beiden Fällen eine sichere Identifikation von 3-Methylmethcathinon (Tab. 3).

Tab. 3. Analytische Kenndaten zur Identifikation des unbekanntes Signals bezogen auf 3-MMC nach WADA-Kriterien [5].

	Δ absolute Retentionszeit	Δ relative Retentionszeit	MRM-Verhältnis absolut
Probe 1	- 0,6%	$\pm 0\%$	76%
Probe 2	- 0,6%	0,7%	73%
Vergleich 3-MMC	$\pm 0\%$	$\pm 0\%$	75%
WADA-Kriterien	$\pm 2\%$	$\pm 1\%$	$\pm 10\%$ absolut

²In diesem Zusammenhang ist interessant zu wissen, dass sich - nach Aussage des einen Patienten gegenüber dem behandelnden Psychiater - der Drogendealer auf den Internetseiten der rechtsmedizinischen Institute über deren Nachweismöglichkeiten von Designer-Amphetaminen informierte und absichtlich entsprechende, dort nicht gelistete, Substanzen anbot, in dem Glauben, diese könnten derzeit analytisch nicht erfasst werden.

Westphal und Junge beschreiben eine erfolgreiche Differenzierung von LSD-Isobaren über die entsprechenden Immoniumion-Produktionenspektren [7]. Dieser Weg wird im Fall der von uns untersuchten Mephedron-Stellungisomere 2-MMC, 3-MMC und 4-MMC allerdings nicht zum Ziel führen, da sich diese Verbindungen lediglich in der Position des Ringsubstituenten (Abb. 1) und nicht durch die Alkylketten am Stickstoff unterscheiden und somit identische Immoniumionen und deren Produktionenspektren zu erwarten sind.

Westphal zeigt Möglichkeiten einer Unterscheidung von Substitutionsmustern am aromatischen Ring auf [8]. Diese sind allerdings abgänglich von der Substanz nur teilweise umsetzbar oder können sich z. B. auf eine Abtrennung von ortho-substituierten von meta- und para-substituierten Verbindungen beschränken. Ob die in unseren Fällen erforderliche meta-/para-Trennung von 3-MMC und 4-MMC über diese Protokolle realisierbar ist, bleibt zu klären.

Schließlich bleibt zu prüfen, ob durch die Einbeziehung von physiologischen Metaboliten der in Frage kommenden isobaren Verbindungen ein Verdacht erhärtet oder eine sichere Identifikation herbei geführt werden kann. So zeigte sich in unseren beiden Urinproben zusätzlich zum hier diskutierten, letztlich als 3-Methylmethcathinon identifiziertem, Signal ein zweites Signal unbekannter Herkunft. Seine Massenübergänge und MRM-Intensitätsverhältnisse entsprachen jenen von Methcathinon, nicht aber die Retentionszeit. Diese differierte in beiden Fällen deutlich zu jener von Methcathinon. Es könnte sich hierbei um einen Metaboliten des 3-Methylmethcathinons handeln. Nach [9,10] ist Desmethyl-MMC ein Metabolit von MMC und zeigt die gleichen Massenübergänge wie Methcathinon. MRM-IDA-EPI-Scans der beiden Urinproben unter Anwendung theoretischer MRM für Desmethyl-MMC ergaben tatsächlich Hinweise auf MMC-Metabolite. Deren sicherer Nachweis würde dann zusätzlich einen Methylmethcathinon-Konsum bestätigen. Da für den Beweis dieser Vermutung die Vergleichssubstanzen fehlten, sollen diese Befunde für eine spätere, ausführliche Kasuistik zurück gestellt werden.

Zusammenfassung: Die Anwendung schärferer Identifikationskriterien und insbesondere die Standardaddition erwiesen sich in unseren Fällen zur Differenzierung (il)legaler Methylmethcathinon-Isomere als erfolgreich. Ob dieses Vorgehen auf vergleichbare (Grenz-)Fälle unter anderen analytischen Bedingungen übertragen werden kann und ob eine allgemeine Anwendung dieser Kriterien sinnvoll und praktikabel ist, muss sich zukünftig erweisen.

Literatur

- [1] 24. BtMÄndV vom 18.12.2009 (BGBl. I S. 3944), gültig ab dem 22. Januar 2010.
- [2] BtMG in der Fassung vom 01.03.1994 (BGBl. I S. 358), zuletzt geändert am 07.08.2013 (BGBl. I S. 3154).
- [3] www.bfarm.de/DE/Bundesopiumstelle/Betaeubungsmittel/Sachverst/Sitzungen/Ergebnisse_40.html
- [4] Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen (Version vom 01.06.2009, gültig ab 01.04.2011, veröffentlicht in Toxichem Krimtech 2009;76:142-176.
- [5] WADA Technical Document – TD2010IDCR unter <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2010-idcr>
- [6] Peters F. Hase und Igel in der forensischen Toxikologie. Trillium Diagnostik 2014;12(2):86.
- [7] Westphal F, Junge T. Massenspektrometrische Unterscheidung von LSD, LAMPA und anderen LSD-Isobaren. Toxichem Krimtech 2014;81:129-135.
- [8] Westphal F. Identifizierung von Designerdrogen. Möglichkeiten und Grenzen in der Routine. Handout zum Vortrag auf der Fort- und Weiterbildungsveranstaltung der GTFCh, Kirkel, 12. April 2014.
- [9] Pedersen AJ, Reitzel LA, Johansen SS, Linnert K. In vitro metabolism studies on mephedrone and analysis of forensic cases. Drug Test Anal. 2013;5:430–438.
- [10] Khreit OIG, Grant MH, Zhang T, Henderson C, Watson DG, Sutcliffe OB. Elucidation of the Phase I and Phase II metabolic pathways of (±)-4'-methylmethcathinone (4-MMC) and (±)-4'-(trifluoromethyl)methcathinone (4-TFMMC) in rat liver hepatocytes using LC-MS and LC-MS2. J Pharm Biomed Anal. 2013;72:177–185.