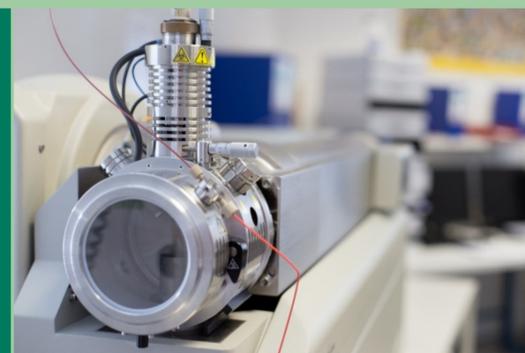


Entwicklung und Validierung einer effizienten LC-MS/MS-Methode auf Basis der MassTox Series A-Analytik zur Bestimmung von Amphetaminen im Urin

Alexander Garthof, Milos Horcicka und Christoph Geffert*

Labor Staber | Abteilung Toxikologie

www.labor-staber.de | *Telefon +49 35204 63 50; Email: c.geffert@staber-kollegen.de



1 Einleitung

Amphetamin und die davon abgeleiteten Derivate Metamphetamin, MDA, MDMA und MDEA werden unter dem Begriff der Phenylethylamine subsumiert^[1]. In der Medizin wird das Amphetamin aktuell nur noch zur Therapie der Narkolepsie und des Aufmerksamkeitsdefizitsyndroms (ADHS) eingesetzt, allerdings im Fall von ADHS nur dann, wenn das Methylphenidat (ebenfalls ein Amphetamin-Derivat) oder etwa Atomoxetin zuvor eine unzureichende Wirkung aufwies^[2]. Die psychotropen Wirkungen und das große Missbrauchspotential der Amphetamine sind bestens bekannt. Hierbei werden die beiden klassischen Psychostimulanzien Amphetamin und Methamphetamin („Crystal Meth“) von den halluzinogenen Dimethoxyamphetaminen („Ecstasy“-Designerdrogen) MDA, MDMA und MDEA aufgrund ihrer Wirkausprägung unterschieden^[3]. Im sogenannten Drogen-Screening wird üblicherweise zunächst immunologisch die Anwesenheit der Grundstruktur der Amphetamine nachgewiesen, bevor mittels chromatographischen und / oder massenspektrometrischen Verfahren die spezifische Substanz analytisch bestätigt und quantifiziert wird.

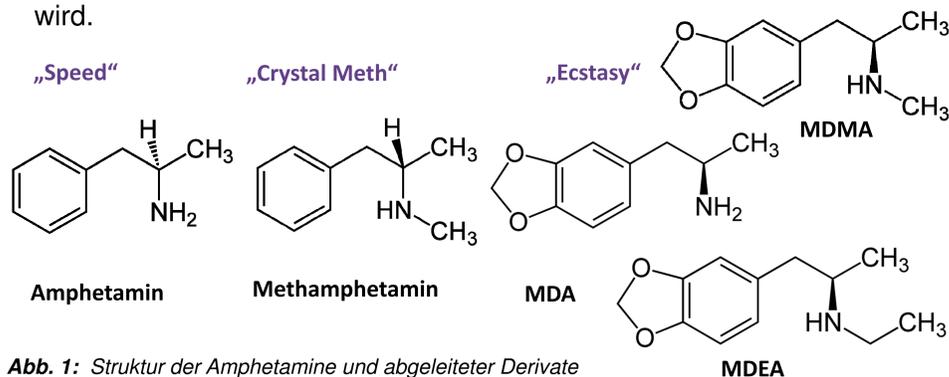
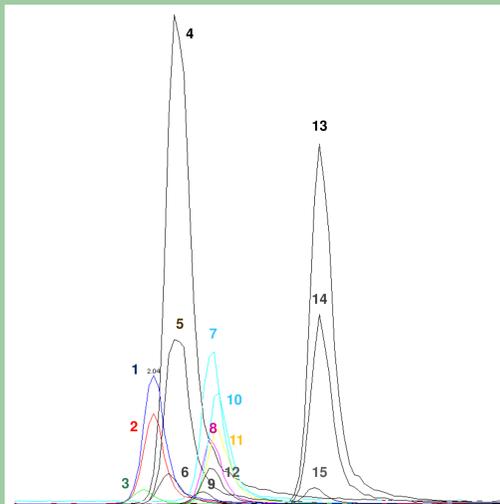


Abb. 1: Struktur der Amphetamine und abgeleiteter Derivate



1. Amphetamin 1
2. Amphetamin 2
3. Amphetamin-D₅ (ISTD)
4. Methamphetamin 1
5. Methamphetamin 2
6. Methamphetamin-D₅ (ISTD)
7. MDA 1
8. MDA 2
9. MDA-D₅ (ISTD)
10. MDMA 1
11. MDMA 2
12. MDMA-D₅ (ISTD)
13. MDEA 1
14. MDEA 2
15. MDEA-D₅ (ISTD)

Abb. 2: Chromatogramm eines Amphetamin-Kalibrators

Tabelle 3: LLOD und LLOQ

Ermittlung anhand von Kalibrationsreihen mit aufgestockten Matrixproben

Substanz	LLOD (µg/l)	LLOQ (µg/l)
Amphetamin	1.5	3.0
Methamphetamin	0.7	1.5
MDA	2.1	3.8
MDEA	0.9	1.8
MDMA	1.1	2.3

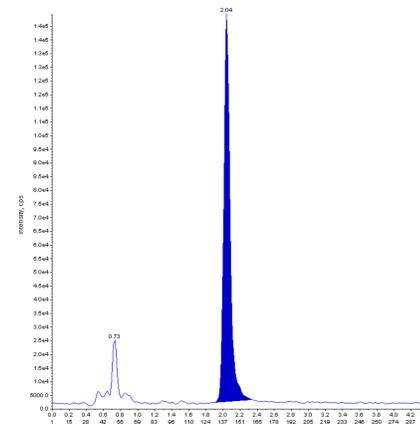


Abb. 3: Amphetamin (aufgestockte Matrixprobe), c = 50 µg/l, 136.0/119.0 Da

Tabelle 4: Matrixeffekte

Fünf Reinsubstanzlösungen (Kontrollproben) wurden mit zwei Konzentrationsleveln der Analyten aufgearbeitet (n = 5). Analog wurden 20 aufgestockte Matrixproben mit zwei Analyt-Konzentrationen bestimmt. Die Angabe des Matrixeffektes erfolgte als Verhältnis der Peakflächen der aufgestockten Matrixproben zu denen der Kontrollproben

Substanz	Matrixeffekt in % (Konzentration in µg/l)	
	MRM 1	MRM 2
Amphetamin	99.4 ± 12.1 (50)	99.7 ± 12.1 (150)
Methamphetamin	101 ± 12.7 (50)	101 ± 9.9 (150)
MDA	100 ± 12.5 (50)	100 ± 11.5 (150)
MDEA	101 ± 15.4 (50)	101 ± 8.1 (150)
MDMA	106 ± 17.5 (50)	106 ± 11.6 (150)

Tabelle 5: Linearität und Varianzhomogenität im relevanten Bereich

Linearität (Mandel-F-Test) und Varianzhomogenität (Cochran-Test) wurden für jeden Analyten anhand von Kalibrationsreihen (20, 30, 60, 120, 200, 400, 700 und 1000 µg/l) geprüft. Die Proben jedes Konzentrationslevels wurden mehrfach aufgearbeitet (n = 6)

Substanz	Linearität und Varianzhomogenität	
	MRM 1	MRM 2
Amphetamin	20 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
Methamphetamin	30 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
MDA	20 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
MDEA	30 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l
MDMA	20 – 1000 µg/l	20 – 1000 µg/l

2 Patienten/Methoden

Es wurde die MassTox-Series A Diagnostik inklusive der dazugehörigen analytischen Säule und dem Laufmittelsystem der Chromsystems GmbH, Gräfelfing verwendet (siehe Arbeitsvorschrift). Bei der modifizierten Aufarbeitung wurden 20 µl Interner Standard-Mix zu je 20 µl Probe gegeben (Tab. 1), 1:20 mit einem Gemisch der Verdünnungspuffer 1 und 2 (1:1 v/v) der MassTox Serie A verdünnt und direkt in das Chromatographie-System injiziert.

Tabelle 1: Für die Diagnostik verwendete Massenübergänge, AB Sciex API 5500 Triple Quad™, ESI-Positivmodus

Substanz	MRM 1	MRM 2	IS (D ₅ -Derivat)
Amphetamin	136 → 119	136 → 90.9	141.1 → 93
Methamphetamin	150 → 91	150 → 119	155 → 92
MDA	180.1 → 163	180.1 → 105	185.2 → 168.1
MDEA	208 → 163	208 → 105	213.2 → 77.1
MDMA	194 → 105	194 → 133	199.2 → 165.1

Tabelle 2: Systemeinstellungen für die HPLC, Agilent 1260 Infinity

Zeit (min)	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Flussrate	0,6 ml/min
	(%)	(%)		
0,00	90	10	Injektionsvolumen	10 µl
3,00	50	50	Säulenofen	25 °C
3,16	90	10	Methodenlänge	5 min
5,0	90	10		

3 Ergebnisse

Die Bestimmungen der Wiederholgenauigkeiten in Serie (Vk < 5%) und an verschiedenen Tagen (Vk < 10%) ergaben akzeptable Werte. Die Methode wurde im Fall von Amphetamin und Metamphetamin für jeweils 15 Urinproben mit einer etablierten GC-MS Methode verglichen. Es wurde eine Korrelation von r² = 0,97 (Amphetamin) und r² = 0,94 (Metamphetamin) erzielt. Die hohe Leistungsfähigkeit konnte inzwischen bei Messungen von Ringversuchsproben bestätigt werden.

4 Schlussfolgerung

Die vorgestellte, schnelle und robuste LC-MS/MS-Methode erweitert die MassTox Series A-Diagnostik der Chromsystems GmbH um die Bestimmung von Amphetaminen im Urin und kann aufgrund der Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse mit der Referenzmethode als Bestätigungsanalyse zum Nachweis der genannten psychotropen Substanzen eingesetzt werden. Eine weitere Ergänzung der Methodik um die Wirkstoffklasse der Benzodiazepine ist geplant.

5 Literatur

- [1] A. M. Gressner, T. Arndt, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, **2007**, 68-69 [2] (a) Eric Taylor et. al., *Eur Child Adolesc Psychiatry*, **2004**, 13 (1), 17-30; (b) D. J. Heal, *J Psychopharmacol.*, **2013**; 27(6), 479-496 [3] (a) F. R. Smith, *Handbook of Forensic Drug Analysis*, Elsevier Academic Press, **2005**, 358 – 360; (b) W. R. Külpmann (Hrsg.), *Klinische-toxikologische Analytik*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, 402-410

Danksagung

Herzlichen Dank an Herrn Priv.-Doz. Dr. Richard Lukačín, Chromsystems GmbH, für die tatkräftige, fachliche Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt dem gesamten Team der Toxikologie für den unentwegten Einsatz.