

Tochterionenspektroskopie zur Gewinnung struktureller Zusatzinformation im Rahmen forensisch toxikologischer Untersuchungen

Peter Rösner und Thomas Junge

Die hohe Strukturvielfalt der heutigen Drogen und Medikamentenwirkstoffe bedingt, daß die übliche Elektronenstoßmassenspektroskopie nicht mehr in der Lage ist, in jedem Fall verlässliche Information zur Identifikation der oftmals isomeren Drogenvarianten zu liefern. So sind etwa Designerdrogen des Amphetamintyps hinsichtlich ihrer Identifikation besonders problematisch. Ihre Elektronenstoßmassenspektren bestehen in der Regel aus nur einem Basispeak im unteren Massenbereich und wenigen Fragmenten geringer Intensität im oberen Massenbereich. So weisen etwa die isomeren Methylenedioxyamphetaminderivate MDE (N-Ethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin), das MBDB (N-Methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamin) und das MDDA (N,N-Dimethyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-propanamin) außerordentlich ähnliche Elektronenstoßmassenspektren auf.

Der Basispeak in den Massenspektren dieser Verbindungen entsteht durch eine schnelle α -Spaltung, wobei sich unter Abspaltung von Methylenedioxybenzylradikalen isomere Immoniumionen mit dem m/z -Wert 72 bilden (Abb.1). Die bei der α -Spaltung gebildeten Immoniumionen sind von hoher Stabilität und erleiden keine schnellen Umlagerungen. Sie enthalten daher die originäre strukturelle Information am Stickstoffatom und am benachbarten α -C-Atom des ursprünglichen Amphetaminderivates. Kennt man also die Struktur der Immoniumionen, dann ist auch die entsprechende Partialstruktur des ursprünglichen Amphetaminderivates bekannt. Diese günstigen Voraussetzungen waren Anlaß, systematisch zu untersuchen, ob die Tochterionenspektren von Immoniumionen geeignet sein könnten, eindeutige strukturelle Information zu gewinnen.

Tochterionenspektren können mit Hilfe von MS/MS-Systemen aufgenommen werden [1]. Bei den Ionenstrahl-MS/MS-Systemen koppelt man zwei Massenspektrometer MS_1 und MS_2 über eine Kollisionszelle (Abb. 2). Nach der Erzeugung von Ionen durch die übliche Elektronenstoßkollision bewirkt das erste Massenspektrometer MS_1 die Selektion eines Mutterions ABC^+ . Zwischen

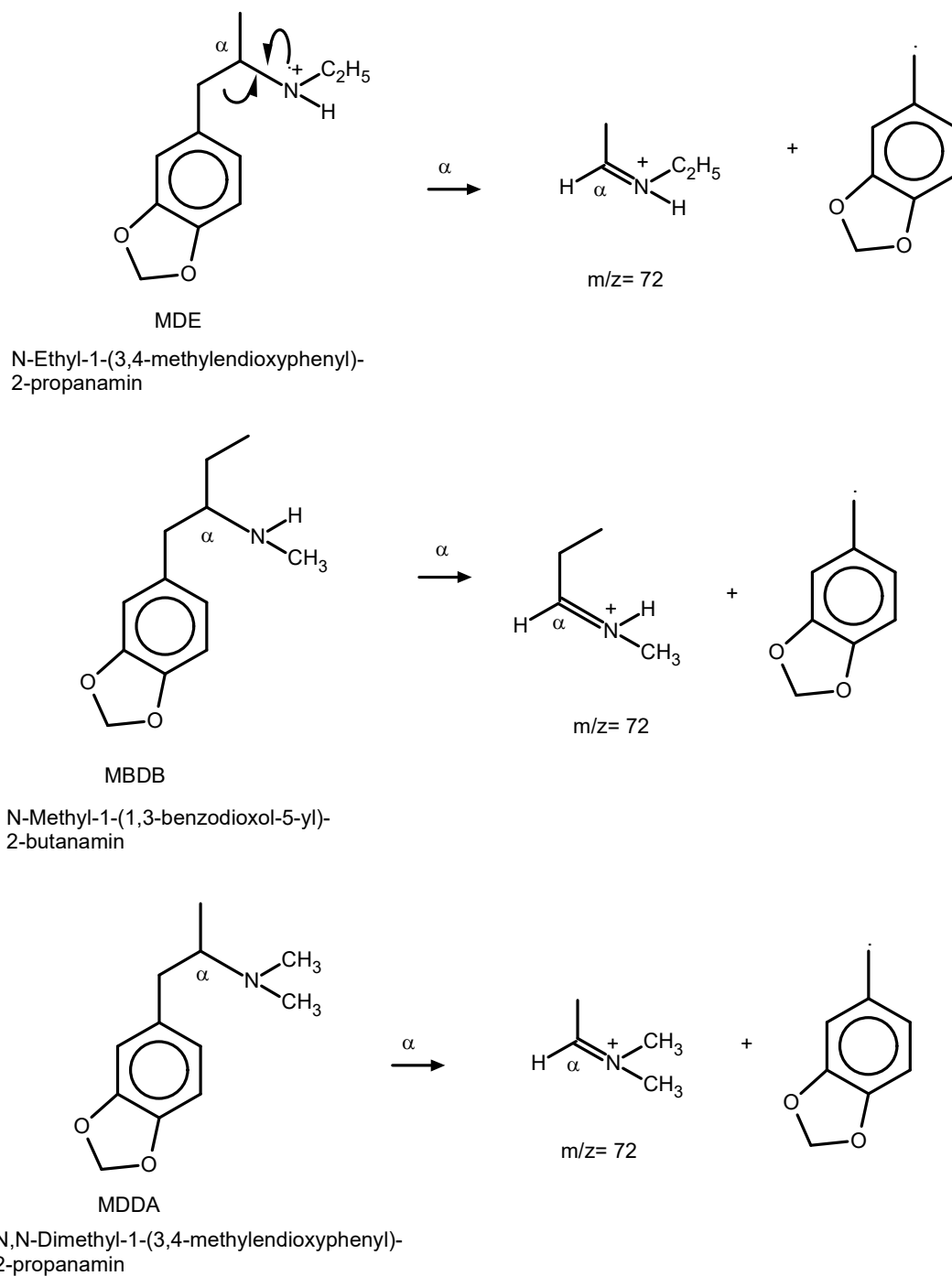


Abb. 1: Die α -Spaltung bei den Methylenedioxyamphetamin-derivaten MDE, MBDB und MDDA

dem ersten Massenspektrometer MS_1 und der Kollisionszelle liegt bei Quadrupol-MS/MS-Systemen eine Beschleunigungsspannung von etwa 20 V, so daß das

Mutterion ABC^+ beim Eintritt in die Kollisionszelle eine definierte kinetische Energie von 20 eV besitzt. Hier kollidiert das Mutterion mit Edelgasatomen wie Helium oder Argon, und es kommt infolge eines inelastischen Stoßes zu einer Konvertierung von kinetischer Energie in innere Energie und damit zu einer Fragmentierung des Mutterions ABC^+ .

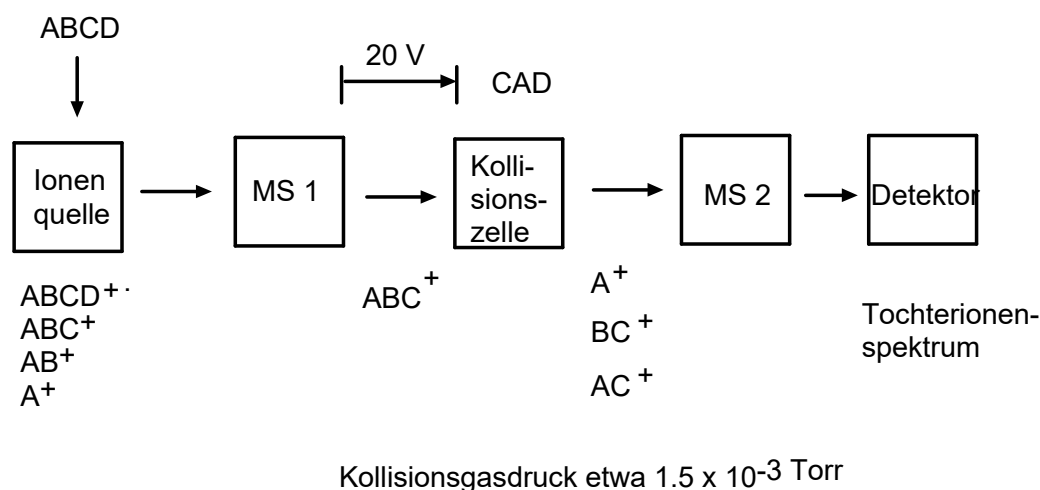


Abb. 2: Funktionsweise eines Ionenstrahl MS/MS-Systems

Dieser sekundäre Fragmentierungsprozeß wird kollisionsaktivierte oder kollisionsinduzierte Fragmentierung genannt und mit CAD oder CID abgekürzt. Die aus dem Mutterion ABC^+ entstehenden Tochterfragmente A^+ , BC^+ und AB^+ werden schließlich über das zweite Massenspektrometer MS_2 differenziert und über den Detektor registriert. Man erhält bei dieser Vorgehensweise somit das Massenspektrum des über MS_1 selektierten Mutterions, ein sogenanntes Tochterionenspektrum.

In Abb. 3 sind die Tochterionenspektren der Immoniumionen mit den m/z -Werten 72 des MDE, des MBDB und des MDDA dargestellt, die auf dem GC/MS/MS-System TSQ 70 der Firma Finnigan gemessen wurden. Die Tochterionenspektren belegen, daß strukturell unterschiedliche Immoniumionen durch ihre unterschiedlichen Tochterionenspektren differenzierbar werden. Die Interpretation von Tochterionenspektren ist im Vergleich zu Elektronenstoßmassenspektren relativ einfach. Ein Alkylsubstituent am Stickstoffatom kann etwa durch das entsprechende Alkylkation und das Produkt seiner Abspaltung im Tochterionenspektrum erkannt werden.

Das Immoniumion des MDE weist einen Ethylsubstituenten am Stickstoffatom auf. Das Tochterionenspektrum spiegelt diese Struktur wider durch die Existenz eines intensiven Ethylkations bei dem m/z -Wert 29 und eines Ions mit

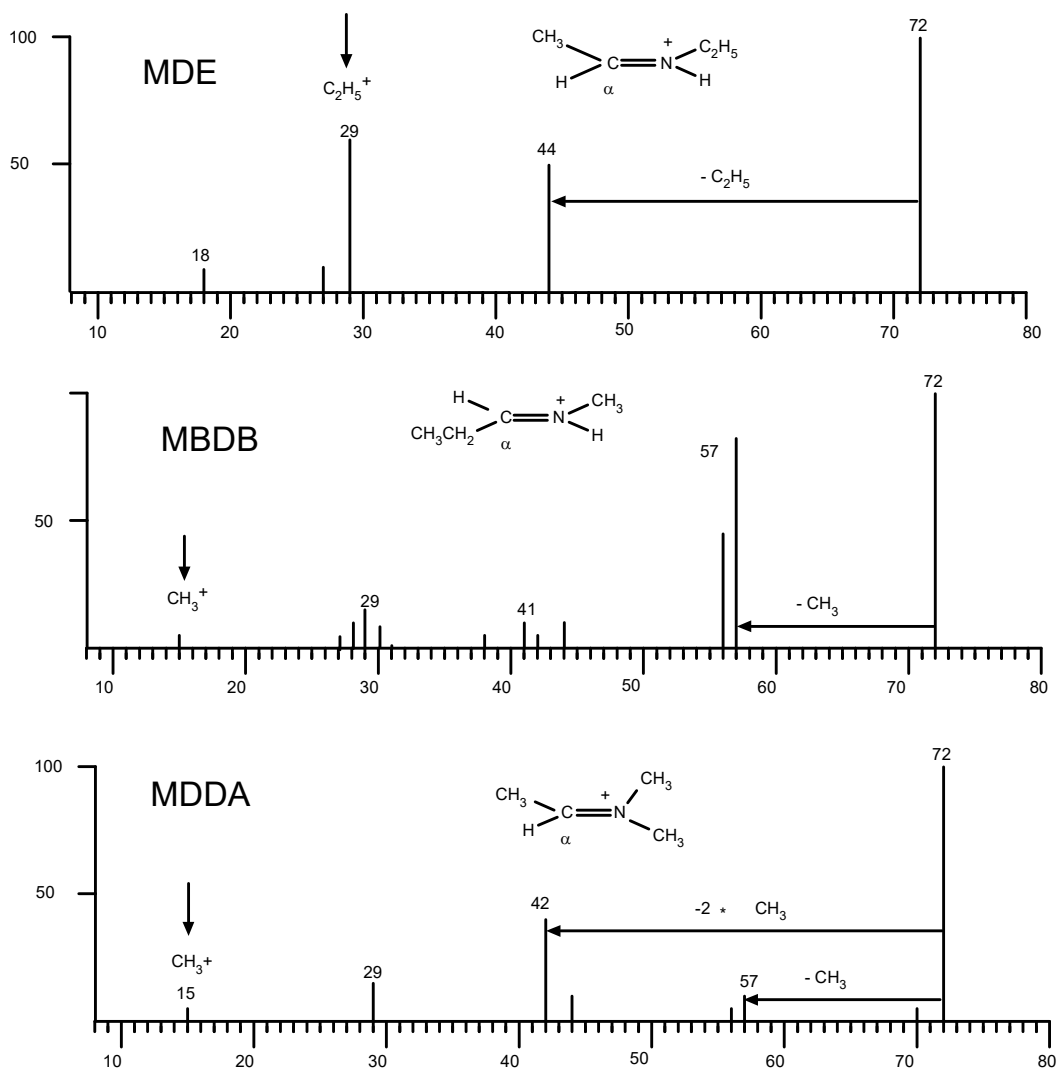


Abb. 3: Tochterionenspektren des MDE, MBDB und MDDA

dem m/z-Wert 44, das durch Ethylenabspaltung entsteht. Das MBDB weist am Stickstoffatom dagegen einen Methylsubstituenten auf. Folgerichtig zeigt das Tochterionenspektrum ein Methylkation bei dem m/z-Wert 15 und bei dem m/z-Wert 57 ein Ion, das durch Abspaltung von Methyl entstanden ist.

Das Immoniumion des MDDA besitzt eine N,N-Dimethylpartialstruktur. Das Tochterionenspektrum weist folgerichtig ein Methylkation bei dem m/z-Wert 15 und die Ionen einer sukzessiven zweifachen Methylabspaltung mit den m/z-Werten 57 und 42 auf. Die Ursache für die leichtere Interpretierbarkeit der Tochterionenspektren von Ionen mit einer geradzahigen Anzahl von Elektronen liegt in der Tatsache begründet, daß im Gegensatz zur üblichen Elektronenstoßmassenspektroskopie ganze Fragmentierungskaskaden und Umlagerungsreak-

tionen entfallen, die durch das radikalische Elektron des Moleküls bedingt sind.

In der Abbildung 4 sind die Tochterionenspektren aller Immoniumionen der allgemeinen Formel $C_4H_{10}N^+$ mit dem m/z -Wert 72 dargestellt [2]. Die Darstellung belegt, daß alle isomeren Immoniumionen mit dem m/z -Wert 72 signifikant unterschiedliche Tochterionenspektren aufweisen. Es ist bemerkenswert, daß ein ein-

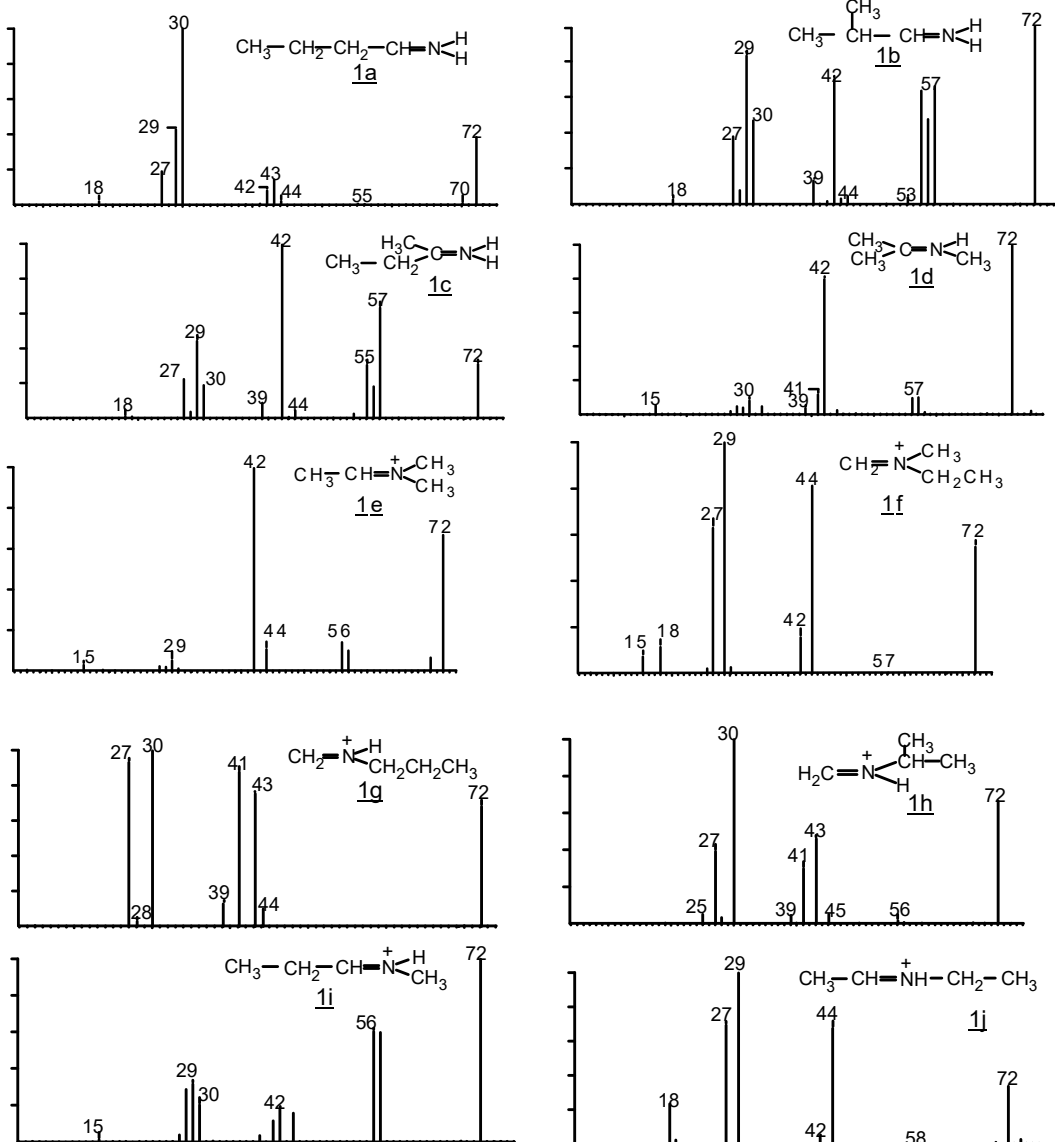


Abb. 4: Die Tochterionenspektren von Immoniumionen der allgemeinen Formel $C_4H_{10}N^+$ zelles Ion eines Elektronenstoßmassenspektrums eine derartige Fülle massenspektroskopischer Information enthalten kann, daß eine strukturelle Differenzierung aller seiner isomeren Strukturen möglich wird.

Zwischenzeitlich wurde durch systematisches Vermessen aller strukturell denkbaren Alkylimmoniumionen bis zu einer Masse von 72 dalton festgestellt, daß sie alle definitiv unterschiedliche Tochterionenspektren aufweisen. Die Tochterionenspektroskopie ermöglicht somit zur Zeit eine eindeutige Strukturaufklärung der Alkylsubstituenten R_1 , R_2 am Stickstoffatom und der Substituenten R_3 , R_4 am α -C-Atom von Amphetaminderivaten bzw. von Aminen, sofern die in der Abbildung 5 schraffiert dargestellte Partialstruktur keine größere Masse als 72 dalton aufweist. Bei höheren Massen der gekennzeichneten Partialstruktur ist zur Zeit nicht bekannt, ob alle Immoniumionen ebenfalls defi-

(Masse \leq 72 dalton)

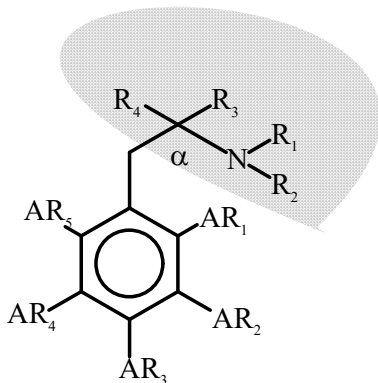


Abb. 5:
Partialstruktur von Amphetaminderivaten oder Aminen, die zur Zeit über Tochterionenspektroskopie aufgeklärt werden kann

nitiv unterschiedliche Tochterionenspektren aufweisen, da unsere Tochterionenspektrenbibliothek in diesem Massenbereich fragmentarischer Natur ist. Bisher ist jedoch beim Vermessen von Partialstrukturen oberhalb einer Masse von 72 dalton noch kein Fall aufgetreten, bei dem das Tochterionenspektrum nicht eindeutig von allen anderen im Datenbestand befindlichen Tochterionenspektren differenziert werden konnte. Zur Zeit wird im Rahmen einer Doktorarbeit am Institut für Pharmazie der Christian Albrechts Universität untersucht, ob die Tochterionenspektroskopie auch in der Lage ist, die arylische, in der Abbildung 5 nicht gekennzeichnete Partialstruktur der Amphetaminderivate strukturell aufzuklären.

Bei der Elektronenstoßmassenspektroskopie bewirkt das radikalische Elektron des Molekülions eine α -Spaltung unter Bildung eines Immoniumions, das zur Strukturermittlung am Stickstoffatom und am α -C-Atom des Amphetaminderivates dienen kann (Abb. 6). Hierbei wird der aromatische Teil in Form eines ladungsneutralen Benzylradikals vom Restmolekül getrennt, das sich damit einer Strukturaufklärung durch Tochterionenspektroskopie entzieht. Setzt man dagegen

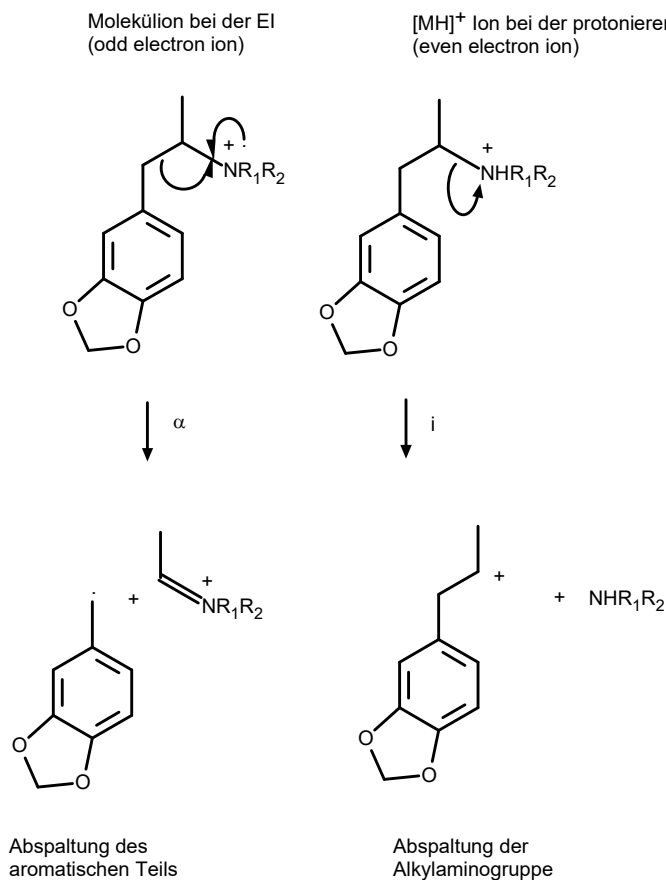


Abb. 6:
Die reziproken Fragmentierung bei der EI (α -Spaltung) und CI (i- Spaltung).

die protonierende chemische Ionisation ein, so läßt sich ein Ion mit der aromatischen Partialstruktur gewinnen. Bei dieser Ionisationsart bildet sich im ersten Schritt ein Ammoniumion. Das Ammoniumion weist kein radikalisches Elektron mehr auf, so daß lediglich ein durch die Ladung initiiertes induktives Bindungsbruch eintreten kann. Bei dieser Fragmentierung kommt es unter Ladungstransfer zur Bildung eines Homobenzykations, das die aromatische Partialstruktur des Moleküls aufweist. Dieses Ion ist daher potentiell zur Strukturaufklärung des aromatischen Molekülteils geeignet. Aufgrund der unterschiedlichen primär gebildeten ionischen Spezies weisen die Elektronenstoßionisation und die chemische Ionisation wie in diesem Fall oftmals reziproke Eigenschaften auf.

Die im Rahmen forensisch toxikologischer Untersuchungen bisher eher selten eingesetzte Tochterionenspektroskopie [3-5] ist jedoch keinesfalls lediglich eine Methode zur Strukturaufklärung isomerer Ionen, sondern sie stellt auch bei der täglichen analytischen Arbeit eine große Hilfe dar. Im oberen Teil der Abbildung 7 ist das Totalionenchromatogramm einer Urinprobe dargestellt, bei der die Frage nach einem eventuellen Heroinkonsum geklärt werden sollte. Eine Auswertung der für Monoacetylmorphin charakteristischen Ionenspur ergab, daß

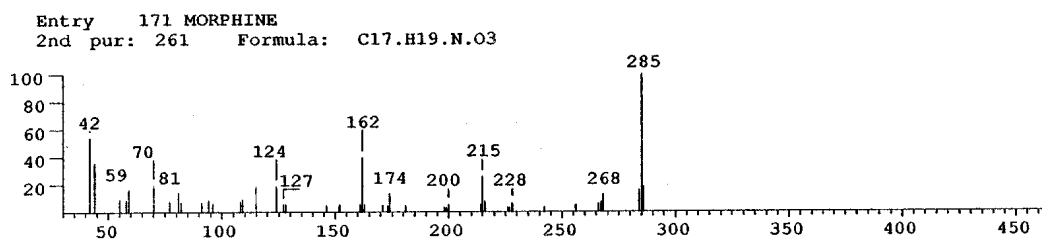
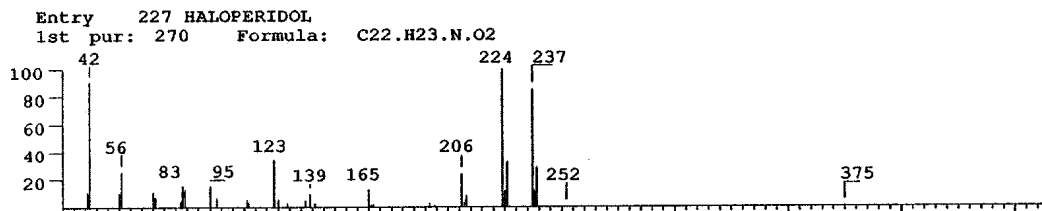
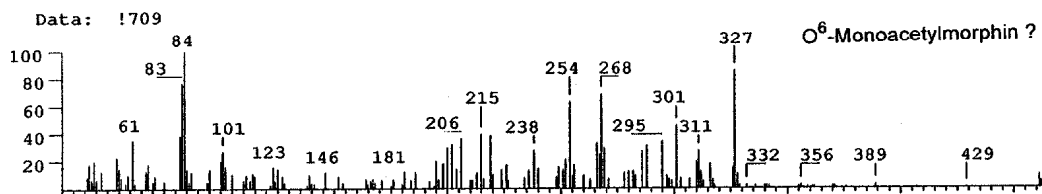
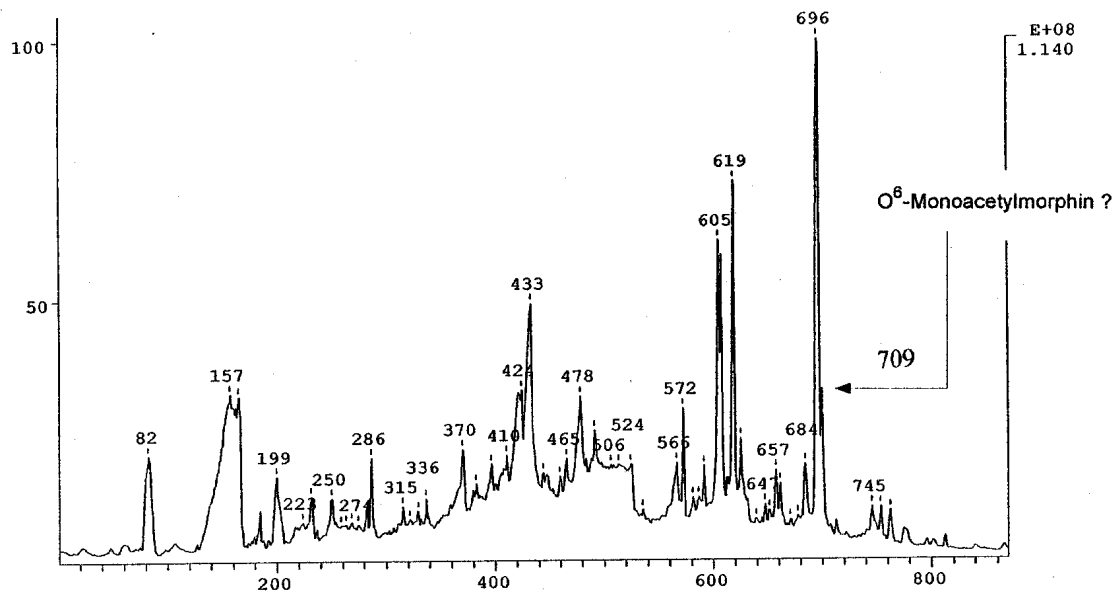


Abb. 7: Totalionen chromatogramm und Suchergebnis eines GC/EI-Laufes einer auf Heroinkonsum zu überprüfenden Urinprobe

der bei der Scannummer 709 liegende Peak möglicherweise vom Monoacetylmorphin stammen könnte.

Das von diesem Scan erhaltene Massenspektrum war jedoch sehr verunreinigt, da der Peak in der Flanke des weit intensiveren Peaks eines Steroides lag. Eine Bibliothekssuche mit dem Spektrum dieses Scans erbrachte daher auch nach Subtraktion des Untergrundes keinen sinnvollen Vorschlag.

Die stark matrixbelastete Probe wurde daher nochmals im Tochterionenmodus für das protonierte Monoacetylmorphin mit dem m/z-Wert 328 unter Anwendung der chemischen Ionisation mittels Methan vermessen.

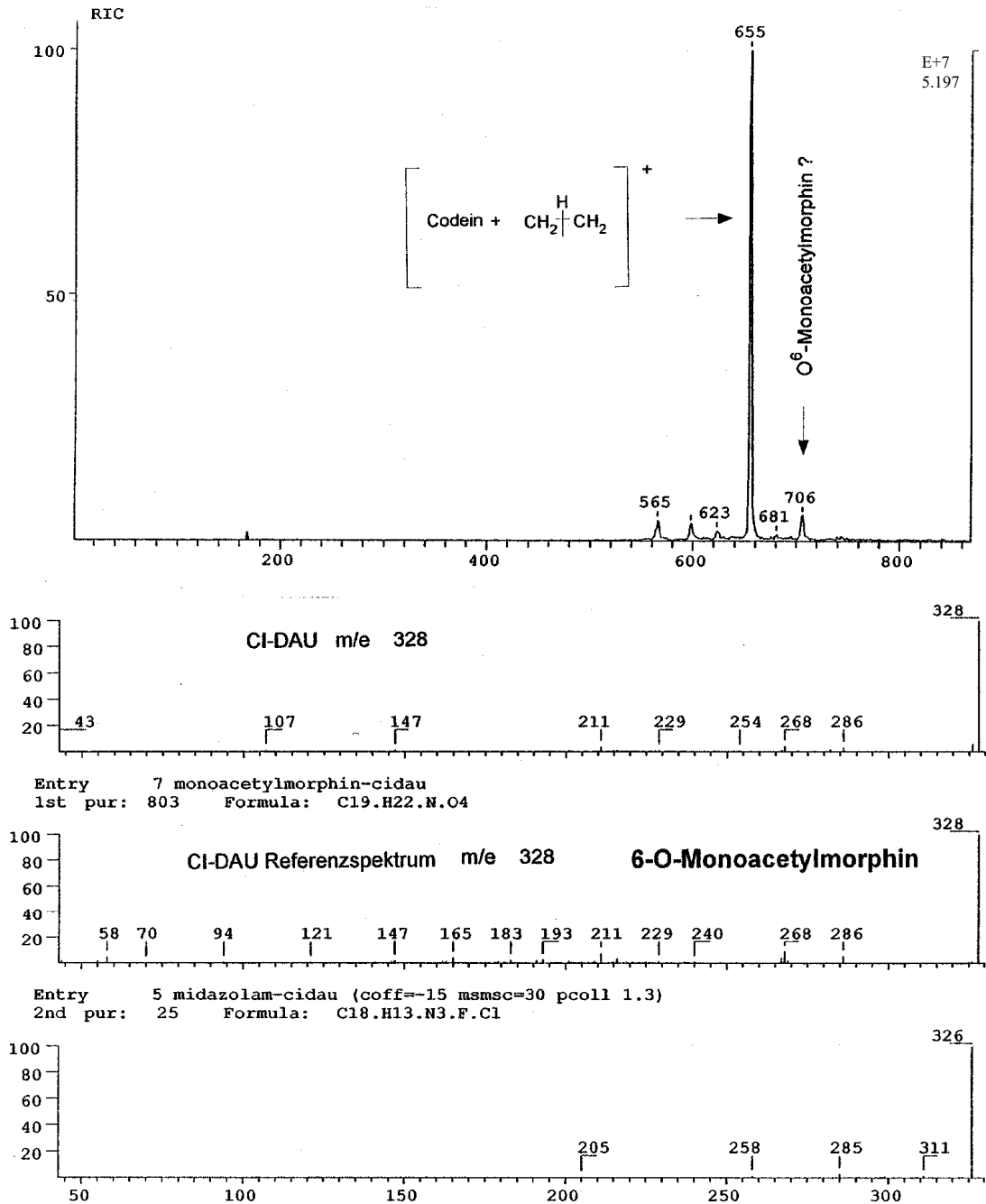


Abb. 8: Totalionenchromatogramm und Suchergebnis eines GC/CI-DAU Laufes einer auf Heroinkonsum zu überprüfenden Urinprobe.

Im oberen Teil der Abbildung 8 ist das Totalionenchromatogramm dieser sogenannten CI-DAU Messung dargestellt. CI kennzeichnet die chemische Ionisation, DAU steht für den daughter ion mode, kennzeichnet also den MS/MS-Modus der Tochterionenspektroskopie. Da bei diesem Verfahren nur noch Verbindungen detektiert werden, die chemisch ionisiert werden können und die darüberhinaus ein protoniertes Molekülion mit dem m/z -Wert 328 bilden, ist die beim üblichen GC/MS-Lauf störende Matrix weitgehend eliminiert. Bei der Scannummer 706 liegt ein Peak, der der Retentionszeit des Monoacetylmorphins entspricht. Das Tochterionenspektrum dieses Peaks und die Vorschläge einer Bibliothekssuche sind im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Mit einem Purity-Wert von 803 findet man eine gute mathematische Übereinstimmung zwischen dem Tochterionenspektrum der zu identifizierenden Verbindung und dem Referenzspektrum des 6-O-Monoacetylmorphins. Damit war über die Tochterionenspektroskopie ein Heroinkonsum in dieser stark matrixbelasteten Urinprobe gelungen, ohne langwierige Optimierungsmethoden anwenden zu müssen.

Eine gute Übereinstimmungen zwischen dem Tochterionenspektrum der zu identifizierenden Verbindung und dem entsprechenden Referenzspektrum ist jedoch nur zu erwarten, wenn die Stoßbedingungen in der Kollisionzelle von MS/MS-Systemen reproduzierbar eingestellt werden [6].

Das folgende Beispiel zeigt, daß die Tochterionenspektroskopie in Verbindung mit der chemischen Ionisation auch hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit deutliche Vorteile bieten kann. Im oberen Bereich der Abbildung 9 ist das Totalionenchromatogramm eines üblichen Elektronenstoß-GC/MS-Laufes eines Urinextraktes dargestellt, bei dem ein Cocainkonsum belegt oder ausgeschlossen werden sollte.

Die Ionenspuren der Molekülionen des Methylecgonins mit dem m/z -Wert 199 und des Cocains mit dem m/z -Wert 303 zeigen bei den entsprechenden Retentionszeiten Peaks, die mit 10^4 bzw. 10^3 counts eine nur geringe Intensität aufwiesen. Eine Bibliothekssuche erbrachte daher auch nur unakzeptable Resultate. Bei der intensiven Matrix erschien eine erneute Aufarbeitung und Aufkonzentrierung der Probe wenig aussichtsreich. Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit wurde die Probe daher erneut mittels chemischer Ionisation (Methan) im Tochterionenmodus vermessen.

Das Ergebnis dieser Messung ist in der Abbildung 10 dargestellt. Bis zu einer Scananzahl von 260 wurde das erste Quadrupol auf den m/z -Wert 200 eingestellt, um das protonierte Methylecgonin zu erfassen. Anschließend wurde während des Laufes auf den m/z -Wert 304 umgestellt, um im gleichen Lauf auch das protonierte Cocain zu detektieren. Das Resultat der Messung ist ein weitgehend matrixfreies Totalionenchromatogramm, in dem die Intensität des Methylecgoninpeaks und des Cocainpeaks um eine Zehnerpotenz gesteigert sind. Hier macht sich im Sinne einer erhöhten Nachweisempfindlichkeit vorteilhaft bemerkbar, daß bei der chemischen Ionisation ganz überwiegend ein einzelnes Ion

mit hoher Intensität gebildet wird. Im unteren Teil der Darstellung ist das Ergebnis einer Suche in einer Tochterionenspektrenbibliothek zu sehen. Eine gute optische und mathematische Übereinstimmung mit einem Purity-Wert von 821 läßt keinen Zweifel an der Identität der Verbindung. Die Tochterionenspektroskopie

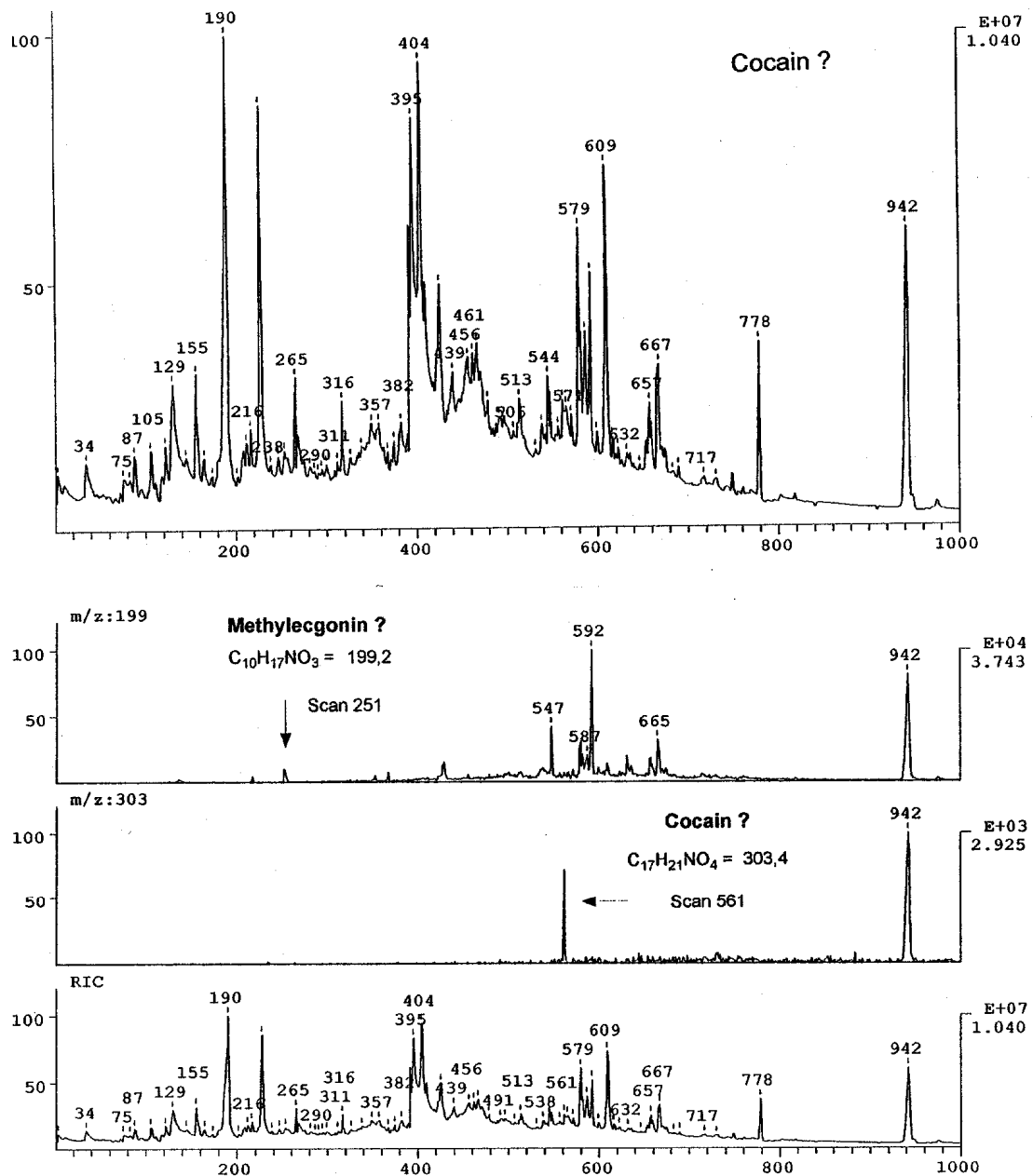
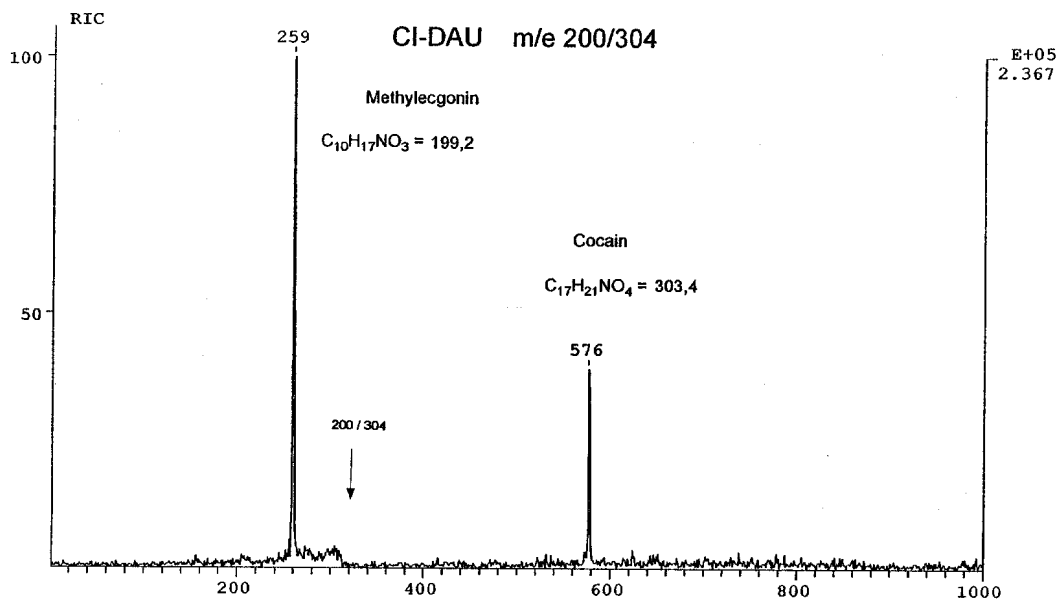
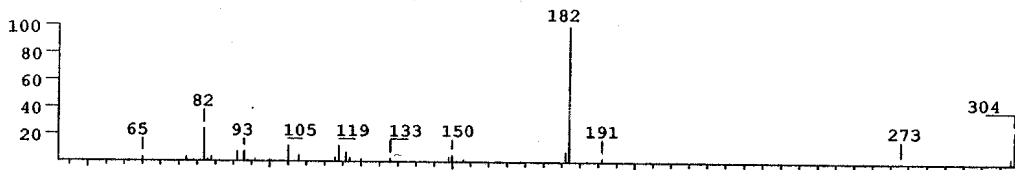


Abb. 9: Totalionenchromatogramm und Ionenspuren eines GC/EI-Laufes einer auf Cocainkonsum zu überprüfenden Urinprobe.

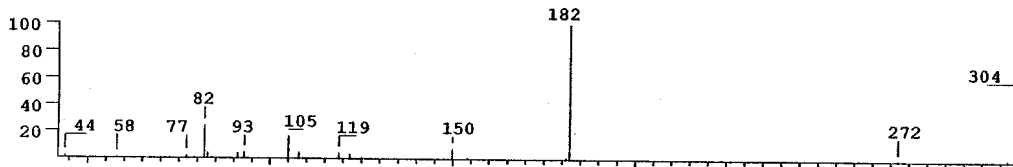


Library: cidau

SCAN 576 of p60dau (Reduced)



Entry 8 kokain-cidau
 1st pur: 821 Formula: $C_{17}H_{22}N.O_4$



Entry 9 scopolamin-cidau
 2nd pur: 84 Formula:

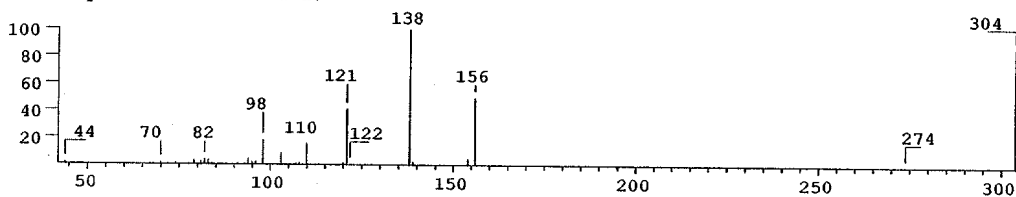


Abb. 10: Totalionen chromatogramm eines GC/CI-DAU Laufes und das Ergebnis einer Tochterionenspektrenbibliothekssuche

verbindet eine hohe Nachweisempfindlichkeit bis in den Picogramm-Bereich mit einer hoher Identifikationssicherheit aufgrund der Zusatzinformation des Tochterionenspektrums. Wie wichtig massenspektroskopische Zusatzinformation im Rahmen forensisch toxikologischen Untersuchungen werden kann, zeigt das von

Röhrich, Kauert und Schmidt [7] veröffentlichte Beispiel der Verwechslung des Wirkstoffes des Insekten Repellents Autan mit N-Propionyl-amphetamin. Die Autoren berichten, daß die relativen Retentionszeiten der isomeren Verbindungen N,N-Diethyl-m-toluamid und N-Propionyl-amphetamin sehr gut übereinstimmen und daß die CI-Spektren nahezu völlige Übereinstimmung zeigen. Es besteht daher keine Möglichkeit, die beiden Verbindungen im Rahmen eines einfachen GC/CI-

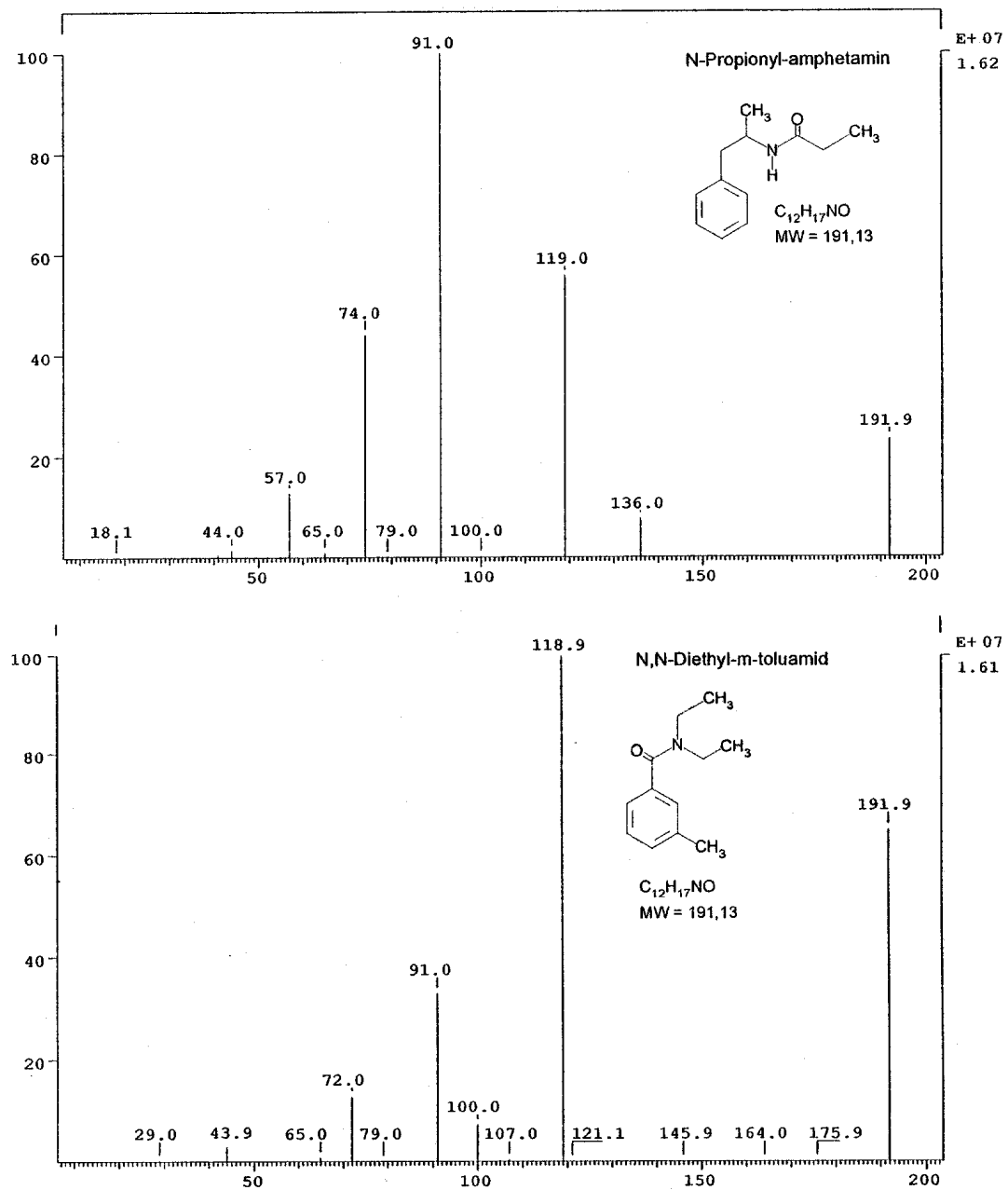


Abb. 11: CI-DAU Tochterionenspektren des Propionylamphetamins und des N,N-Diethyl-m-toluamids

Laufes zu differenzieren. Dieses Beispiel wurde zum Anlaß genommen um zu überprüfen, ob die Tochterionenspektroskopie eine eindeutige Differenzierung dieser beiden isomeren Verbindungen ermöglicht. Man sieht auf den ersten Blick, daß die in der Abbildung 11 dargestellten Tochterionenspektren deutliche Unterschiede aufweisen. So ist die Intensität des Tropyliumkations bei dem m/z-Wert 91 im N-Propionylamphetamin Basispeak und wesentlich intensiver als im N,N-Diethyl-m-toluamid. Das McLafferty-Produkt bei dem m/z-Wert 74 im Tochterionenspektrum des N-Propionyl-amphetamins ist im N,N-Diethyl-m-toluamid überhaupt nicht enthalten. Die Differenzierung von N-Propionyl-amphetamin und N,N-Diethyl-m-toluamid ist somit bei Anwendung der chemischen Ionisation in Verbindung mit der Tochterionenspektroskopie unproblematisch.

Ich hoffe, anhand der dargestellten Beispiele wurde deutlich, daß der Einsatz der Tochterionenspektroskopie zu einem Gewinn wertvoller massenspektroskopischer Information führt. Die damit verbundene erhöhte Sicherheit bei der Interpretation der Untersuchungsergebnisse ist gerade im Rahmen forensisch toxikologischer Untersuchungen naturgemäß von besonderem Gewicht.

Literaturverzeichnis

- [1] K. L. Busch, G. L. Glish and S. A. McLuckey: Mass Spectrometry/Mass Spectrometry, Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry, VCH Publishers, Inc. 230 East 23rd Street, Suite 909, New York 10010 (1988).
- [2] P. Rösner and Th. Junge: Investigation of the Alkylamino Group of Aliphatic or Arylaliphatic Amines by Collision-induced Dissociation Mass Spectra of $C_4H_{10}N^+$ Immonium Ions. J. Mass Spec. 31 (1996) 1047-1053.
- [3] M. T. Cheng, G. H. Krupp and F. W. Mc Lafferty: Structural Information from Tandem Mass Spectrometry for China White and related Fentanyl Derivatives. Anal Chem. 54 (1982) 2204-2207.
- [4] R. J. Perchalski, R. A. Yost, and B. Wilder: Structural Elucidation of Drug Metabolites by Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. Anal. Chem. 54 (1982) 1466-1471.
- [5a] P. Rösner and Th. Junge: N-Methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butamin, ein Vertreter einer neuen Klasse von Designerdrogen. Toxichem + Krimtech 61/2 (1994) 32-38.
- [5b] P. Rösner and Th. Junge: N-methyl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-butamine, a Representative of a New Class of Street Drugs, Microgram, 27/ 12 (1994) 411-418.
- [6] P. H. Dawson and Sun Wing-Fun: A round Robin on the Reproducibility of standard operating Conditions for the Acquisition of Library MS/MS Spectra

using Triple Quadrupoles. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 55 (1984) 155-170.

- [7] G. Kauert, K. Schmidt und J. Röhrich: Unerwarteter Nachweis eines Insekten-Repellents in Haaren. *Toxichem+Krimtech*, 63/2 (1996) 25-31.

P. Rösner und Th. Junge
Landeskriminalamt Schleswig-Holstein
Sachgebiet Toxikologie/Betäubungsmittel
Mühlenweg 166
D-24116 Kiel