

Identifizierung geringer Mengen Methamphetamins nach Körperpassage durch Kopplung von Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie

IV. Mitteilung zum Problem des Doping*

H. ALFES und D. CLASING

Anatomisches Institut (II. ordentlicher Lehrstuhl: Prof. Dr. H. KNOCHE)
und Institut für Sportmedizin (Direktor: Prof. Dr. E. J. KLAUS)
der Universität Münster

Eingegangen am 11. August 1968

Bei Routine-Untersuchungen zum Nachweis von Dopingmitteln in Körperflüssigkeiten wird heute vornehmlich die Dünnschicht- (STAHL, 1967) oder Gaschromatographie (ALFES u. Mitarb., 1968) angewendet. Zur näheren Charakterisierung der abgetrennten Substanz wird von verschiedenen Autoren die IR-Spektroskopie vorgeschlagen. Da bekanntlich einerseits die R_f -Werte von äußeren Faktoren abhängen und andererseits die IR-Spektren ähnlicher Substanzen — wie z. B. die der Phenyläthylamin-Abkömmlinge — sich nur unwesentlich unterscheiden, erscheint es sicherer, die Substanzen durch andere spektroskopische Verfahren zu identifizieren. Besonders bewährt hat sich eine Kombination von Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie (HEYNS u. GRÜTZMACHER, 1962). Die Methode ist nur etwas aufwendig, sie liefert aber in Zweifelsfällen die besten Ergebnisse. Als Anwendungsbeispiel soll dieses Verfahren am Nachweis von d-Methamphetaminhydrochlorid (Pervitin®) gezeigt werden, das häufig als Dopingmittel Anwendung findet.

Wie von verschiedenen Autoren (SEILER u. WIECHMANN, 1967; MÖLLMANN u. Mitarb., 1967; CREVELING u. DALY, 1967) gezeigt worden ist, lassen sich physiologisch aktive Amine besonders gut dann chromatographieren, wenn sie vorher mit einem entsprechenden Reagenz in analytisch leichter handhabbare Verbindungen überführt worden sind, wie z. B. mit 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-chlorid (Kurzbezeichnung: DANS-Cl oder Dansylchlorid).

* III. Mitteilung: Sportarzt (Köln) **19**, 492 (1968).

Experimenteller Teil

1 mMol d-Methamphetaminhydrochlorid in 3 ml Wasser wurde mit 1 mMol 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-chlorid in 6 ml Aceton versetzt. Die Lösung wurde mit Natriumhydrogencarbonat gesättigt und über Nacht stehen gelassen. Nach Abdampfen des Acetons wurde das Dansylderivat des d-Methamphetamins mit 3 ml Äthylacetat extrahiert und durch Dickschichtchromatographie an Kieselgel G Merck [Fließmittel: Cyclohexan/Äthylacetat = 2/1 (v/v)] gereinigt. Die Zone mit dem R_f -Wert von 0,55 wurde ausgekratzt, mit absolutem Äther eluiert und das Dansylderivat mit ätherischer Salzsäure als Hydrochlorid gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und mehrfach mit absolutem Äther gewaschen.

Schmp. 85—86° $C_{22}H_{28}Cl_2N_2O_2S$ (455,4)

Ber. C 58,07 H 6,20 Cl 15,59 N 6,16 S 7,05

Gef. C 58,37 H 6,43 Cl 15,40 N 6,13 S 6,79.

Zur Identifizierung des Methamphetamins nach Körperpassage wurden den Versuchspersonen 15 mg/70 kg Körpergewicht d-Methamphetaminhydrochlorid per os in einer Steckkapsel verabreicht, die nach 4—5 min Verweildauer im Magen zerfällt (ECKERT, 1967). Die Urinproben wurden mit Natriumhydrogencarbonat versetzt und mit 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde durch 10minütiges Zentrifugieren bei 5000 U/min abgetrennt. Nach Zusatz von 0,2 ml 0,1 n Salzsäure wurde das Lösungsmittel abgedampft, der Rückstand mit 0,2%iger acetonischer Dansylchlorid-Lösung behandelt und — wie vorne beschrieben — weiter verarbeitet. Die mit absolutem Äther oder Äthylacetat eluierte Zone wurde bis auf ein kleines Volumen eingengt und dieses tropfenweise im Probierrohrchen für die Massenspektrometrie eingedampft.

Die Dünnschichtchromatographie wurde daneben auch zweidimensional durchgeführt (2. Fließmittel: Benzol/Triäthylamin = 5/1, v/v). Der dem Methamphetamin-DANS entsprechende Fleck wurde mit dem Kieselgel massenspektrometrisch untersucht. Die Qualität des Spektrums war dabei vermindert.

Zur Aufnahme der Massenspektren stand ein Hitachi Perkin-Elmer RMU-6D zur Verfügung. Das Kernresonanzspektrum wurde mit einem Varian A 60 und das IR-Spektrum mit einem Perkin-Elmer Modell 21 gemessen.

Methoden und Ergebnisse

Abb. 1 zeigt das Massenspektrum des Dansylderivats vom Methamphetamin¹. Die Charakterisierung erfolgte durch das Molekül-Ion m/e 382 (5% des 100%-Peaks) und durch den Fragmentierungsmechanismus (Abb. 2).

Der 100%-Peak m/e 170 entsteht aus der Spaltung der Bindung zwischen der SO_2 -Gruppe und dem Naphthalinringsystem. Dieses Signal ist für die Charakterisierung der Substanz wertlos. Das gleiche gilt für die Fragment-Ionen m/e 234, 186, 154, 127 und 115, die aus dem Dansylrest entstehen (REISCH u. Mitarb., 1968 b). Typisch sind dagegen die beiden durch β -Spaltung (zwischen dem zum Kern α - und β -ständigen C-Atom der Seitenkette) entstandenen Bruchstücke m/e 91 (18%) und

¹ Herrn Dr. N. JANTOS (Oberkustos am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Münster) danken wir für die Aufnahme des Massenspektrums.

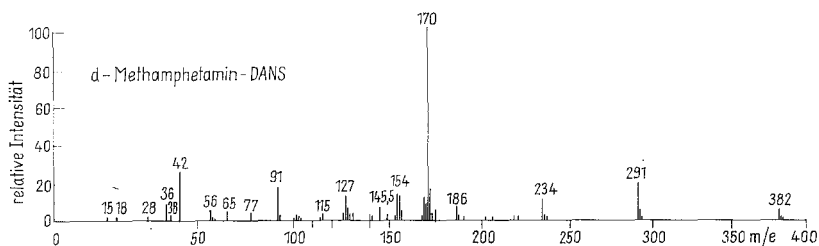


Abb. 1. Massenspektrum des d-Methamphetamine-DANS. (Arbeitstemperatur: 260°; 70 eV; direkt geheiztes Einlaßsystem)

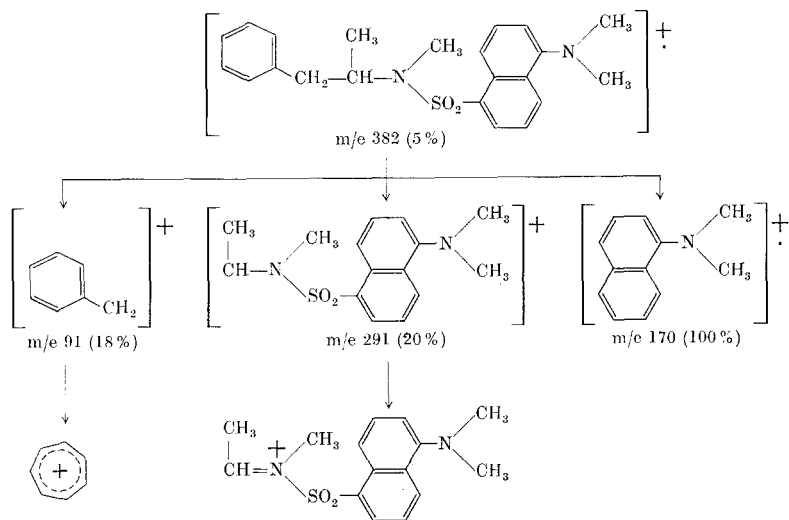


Abb. 2. Hauptfragmentierungsmechanismus des d-Methamphetamine-DANS im Massenspektrometer

m/e 291 (20%). Durch das Molekül-Ion und die durch β -Spaltung entstandenen Bruchstücke ist eine Identifizierung der Substanz eindeutig gewährleistet.

Durch Verwendung spezieller Meßröhrchen (Mikrozelle) und durch Einsatz eines Speichergerätes ("Time Averaging Computer") kann neben der Massenspektrometrie auch die Kernresonanzspektroskopie (LUNDIN u. Mitarb., 1966) zur Identifizierung der Substanz herangezogen werden. Die Identität des DANS-Methamphetamins ergibt sich aus den folgenden Kopplungskonstanten (J in cps) und chemischen Verschiebungen (δ in ppm, Tetramethylsilan = 0): Die endständige Methylgruppe der Seitenkette gibt ein Doublett bei 1,30 ppm ($J = 7$ cps), die dem Benzolkern benachbarte diastereotop Methylengruppe ein

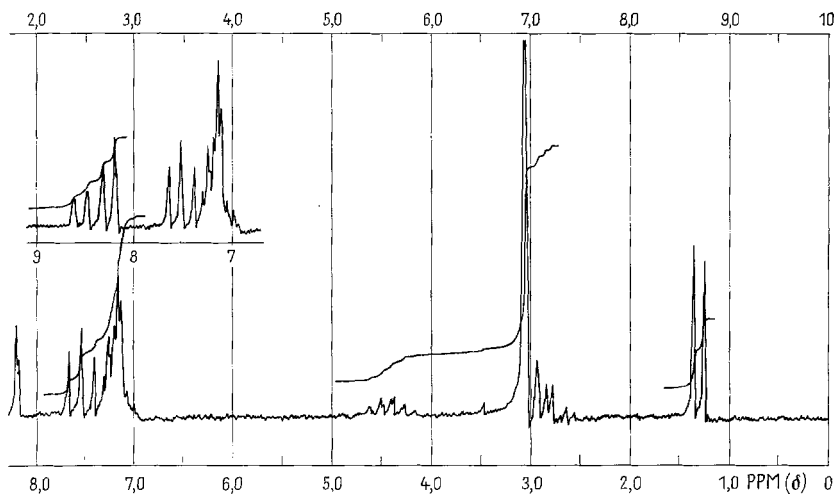


Abb. 3. Kernmagnetisches Resonanzspektrum des d-Methamphetamin-DANS (60 MHz; TMS = 0; Deuteriochloroform)

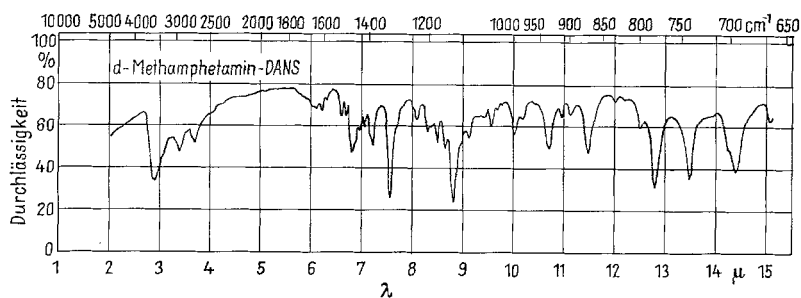


Abb. 4. Infrarotspektrum des d-Methamphetamin-DANS. (Als salzsaures Salz in KBr)

Multiplett bei 2,85 ppm (VAN GORKOM u. HALL, 1968) und der zum Benzolring β -ständige Methinwasserstoffe ein breites bei ca. 4,4 ppm zentriertes Multiplett mit einer schwer definierbaren Anzahl von Spitzen. Die an den Stickstoff-Atomen gebundenen Methylgruppen treten als ein 9 H-Singulett bei 3,06 ppm und die Protonen des Phenylkerns als ein Singulett bei 7,16 ppm auf (REISCH u. Mitarb., 1968a). Die Protonen des Naphthalinringsystems bilden zwei ABX-Systeme bei 7,40 und 8,42 ppm (WELLS, 1963).

Abb. 4 zeigt das IR-Spektrum vom salzsauren Salz des d-Methamphetamin-DANS. Die eingesetzte Substanzmenge betrug 1 mg. Sie läßt sich durch geeignete Techniken (LIPPINCOTT, WELSH u. WEIR,

1961; NICHOLLS, 1961; WEHRBERGER u. SCHUBERT, 1961; HANNAH, 1963; TAMURA u. Mitarb., 1963; u. a.) erheblich reduzieren.

Die praktische Anwendbarkeit des Verfahrens wurde am in vivo-Beispiel demonstriert. Wie früher mitgeteilt wurde (CLASING u. Mitarb., 1967), läßt sich das d-Methamphetamin über die Dansyl-Methode innerhalb einer Zeitspanne von 1—48 Std gut nachweisen. In Zweifelsfällen kann der Nachweis dadurch abgesichert werden, daß der nach zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie dem DANS-Methamphetamin entsprechende Fleck nach Elution oder direkt mit dem Kieselgel massenspektrometrisch identifiziert wird.

Zusammenfassung

Um Fehlerquellen beim chromatographischen Nachweis auszuschließen, wird vorgeschlagen, die Substanz nach der Dünnschichtchromatographie massenspektrometrisch näher zu identifizieren. Zum exakten Nachweis von d-Methamphetamin in Urinproben wurde eine Kombination der Dünnschichtchromatographie mit der Massenspektrometrie durchgeführt, nachdem das d-Methamphetamin mit 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-chlorid umgesetzt worden war.

Summary

For the exclusion of errors, which may occur in chromatographic determination, it is proposed that the substance be identified by mass spectrometry following separation by thin-layer chromatography. The exact identification of d-methamphetamine in urine samples was obtained by a combination of thin-layer chromatography and mass spectrometry, after reacting the substance with 1-dimethylamino-naphthalene-5-sulfonyl chloride.

Literatur

- ALFES, H., J. REISCH, D. CLASING u. H. MÖLLMANN: Der Nachweis von zentral-stimulierenden Arzneimitteln (Dopingmittel) durch die Gaschromatographie. *Sportarzt* **19**, 492 (1968).
- CLASING, D., H. ALFES, H. MÖLLMANN, H. G. TOSCHKE u. J. REISCH: Ein Beitrag zum DC-Nachweis von d-Methamphetamin (Pervitin®) nach Körperpassage. *Sportarzt* **18**, 361 (1967).
- CREVELING, C. R., and J. W. DALY: Identification of 3,4-dimethoxyphenethylamine from schizophrenic urine by mass spectrometry. *Nature (Lond.)* **216**, 190 (1967).
- ECKERT, TH.: Die pH-Endoradiosonde: Eine Methode zur Untersuchung des Zerfalls oral applizierter Arzneiformen in vivo. *Arzneimittel-Forsch.* **17**, 645 (1967).
- GORKOM, M. VAN, and G. E. HALL: Equivalence of nuclei in high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Quart. Rev.* **22**, 14 (1968).
- HANNAH, R. W.: Optical accessory for obtaining the infrared spectra of very thin films. *Appl. Spectroscopy* **17**, 23 (1963).

- HEYNS, K., and H. F. GRÜTZMACHER: Combination of thin-layer chromatography and mass spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1**, 400 (1962).
- LIPPINCOTT, E. R., F. E. WELSH, and C. E. WEIR: Microtechnique for the infrared study of solids. *Anal. Chem.* **33**, 137 (1961).
- LUNDIN, R. E., R. H. ELSKEN, R. A. FLATH, N. HENDERSON, R. T. MON, and R. TERANISHI: Time-averaged proton magnetic resonance analysis of micro-samples from open-tube gas chromatographs. *Anal. Chem.* **38**, 291 (1966).
- MÖSLMANN, H., H. ALFES u. J. REISCH: Beitrag zur DC-Trennung einiger synthetischer Abkömmlinge der Catecholamine. *Med. Welt* **20** (N. F.), 1268 (1967).
- NICHOLLS, S. F.: The preparation of small rock salt plates for micro-sampling in infrared spectrophotometry. *Analyst* **86**, 664 (1961).
- REISCH, J., H. ALFES, N. JANTOS, and H. MÖLLMANN: Mass spectra of 1-dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl derivatives of biogenic amines. *Acta pharm. Suecica* **5**, 393 (1968b).
- — u. H. MÖLLMANN: Identifizierung von Phenyläthylamin-Abkömmlingen durch Kernresonanzspektroskopie. *Z. anal. Chem.* **238**, 29 (1968a).
- SEILER, N., u. M. WIECHMANN: Zur Chromatographie einiger 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonyl-derivate auf Kieselgel G-Schichten. *J. Chromatog.* **28**, 351 (1967) und dort zitierte Arbeiten.
- STAHL, E.: *Dünnschicht-Chromatographie*, 2. Aufl. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967.
- TAMURA, Z., M. NINOMIYA, F. SUZUKI, and M. CHIKU: Preparation of micro-tablets for infra-red spectrophotometry. *Japan Analyst* **12**, 372 (1963).
- WEHRBERGER, K., u. K. SCHUBERT: Fortschritte in der Mikrotechnik der Ultrarotspektroskopie. *Pharmazie* **16**, 249 (1961).
- WELLS, P. R.: Proton magnetic resonance spectra of dinitronaphthalenes. *J. chem. Soc.* **1963**, 1967.

Dr. med. D. CLASING
 Institut für Sportmedizin der Universität Münster
 44 Münster i. Westf., Horstmarer Landweg 39