

Zum Nachweis von Pentazocin (Fortral) im menschlichen Harn: Gaschromatographisch/massenspektrometrische Untersuchungen

W. Gielsdorf¹, E. Klug² und M. Tümmers³

¹ LAB-MS, Gesellschaft für pharmakologische Untersuchungen mbH., Brühlweg 23,
D-7910 Neu-Ulm 4, Bundesrepublik Deutschland

² Institut für Rechtsmedizin der FU Berlin, Hittorfstr. 18, D-1000 Berlin 33

³ VG Instruments GmbH, Gustav-Stresemann-Ring 12–16, D-6200 Wiesbaden,
Bundesrepublik Deutschland

Pentazocine (Fortral)—Detection in Human Urine: Gas Chromatographic/Mass-Spectrometric Investigations

Summary. After oral application of pentacozine (Fortral) besides the unchanged drug some further excretion products were detected by glc/ms in human urine. For their identification e.i.- and c.i.-mass-spectrometry as well as the just recently available FAB-technique were employed. All analyses were performed on a VG-Micromass 7035; the samples were introduced in the ion source via a fused silica, bonded phase capillary column (30 metres; DB-1 J + W, Inc.). The analytical profiles of the pure substance and some metabolites are reported as well as the behaviour of the pure substance on acidic hydrolyzation.

Key words: Pentacozine, detection in human urine – Fortral – Toxicology, Pentacozine

Zusammenfassung. Nach oraler Gabe von Pentazocin (Fortral) konnten im menschlichen Harn neben der unveränderten Ausgangsverbindung noch mehrere Ausscheidungsprodukte mit Hilfe der GC/MS nachgewiesen werden. Zu deren Identifizierung gelangte, neben der EI- und CI-Massenspektrometrie, die seit kurzem kommerziell erhältliche FAB-MS zur Anwendung. Die Untersuchungen wurden mit einem VG-Micromass 7035 durchgeführt, wobei die Proben über eine fused-silica, bonded-phase-Kapillare (30 m; DB-1; J + W, Inc.) in die Ionenquelle eingeführt wurden. Das analytische Verhalten von Reinsubstanz und einigen Metaboliten wird ebenso diskutiert wie das Verhalten der Reinsubstanz unter den Bedingungen der salzsauren Hydrolyse.

Sonderdruckanfragen an: Dr. W. Gielsdorf (Adresse siehe oben)

Schlüsselwörter: Pentazocin, Nachweis im Urin – Fortral – Toxikologie, Pentazocin-Nachweis

Einleitung

In ständig zunehmendem Maße wird zum Nachweis von Arzneistoffen (und deren Metaboliten), Rauschgiften und anderen Xenobiotica im biologischen Material die Massenspektrometrie in Kombination mit der Gaschromatographie und einem Datensystem eingesetzt; dies gilt insbesondere seit der Einführung neuer Meßmethoden („negative ions“; DCI; FAB) und CI-Reaktandgase wie Ammoniak [1–9].

Dadurch wurde es möglich, der Aufgabenstellung der toxikologischen Analytik, in kürzester Zeit aus einer komplexen Matrix mit einem hohen Überschuß an Stör-, Begleit- und Ballaststoffen Spuren einer unbekannten Verbindung nachzuweisen, gerecht zu werden, und dies auch bei Substanzen, die bisher einer massenspektrometrischen Untersuchung nicht zugänglich waren (→ FAB) [3].

In der vorliegenden Arbeit soll über unsere Erfahrungen beim gaschromatographisch-massenspektrometrischen Nachweis des zentralen Analgeticums Pentazocin (Fortral=I) im menschlichen Harn berichtet werden.

In der Literatur sind zwar einige Nachweismethoden [10–13] und Biotransformationsprodukte [1, 14–16] von I beschrieben, jedoch fehlen oft die zu deren Charakterisierung notwendigen analytischen Kenndaten; dies gilt insbesondere für die GC/MS. Daher werden die massenspektrometrischen Kenndaten von I und seinen Metaboliten zusammenfassend referiert.

Material und Methoden

Unser Datenmaterial wurde bei der Untersuchung von vier akuten Intoxikationen gewonnen; als Untersuchungsmaterial stand der Harn zur Verfügung.

Extraktion des Harns

Der Harn wurde nach dem in der toxikologischen Praxis üblichen Verfahren jeweils vor und nach salzsaurer Hydrolyse bei pH 2–3 und pH 10–12 mit Chloroform im Scheidetrichter extrahiert. Zur sauren Hydrolyse wurden drei Teile Urin mit einem Teil konzentrierter Salzsäure (v/v) versetzt und 1 h unter Rückfluß gekocht. Zur enzymatischen Spaltung der Konjugate wurden die Harnproben (ca. 30–50 ml) mit Acetatpuffer auf pH 5,5 eingestellt, mit 2 ml β -Glucuronidase/Arylsulfatase (Merck, Darmstadt) versetzt und über Nacht bei ca. 37°C gehalten.

Die organischen Phasen wurden dann über Natriumsulfat getrocknet, abfiltriert und am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur abgezogen; den basischen Extrakten wurde vorher ein Tropfen konzentrierte Salzsäure zugesetzt.

Hydrolyseversuche mit der Reinsubstanz

Einhundertdreißig Milligramm Pentazocin-Hydrochlorid, 20 ml Wasser und 20 ml konzentrierte Salzsäure (ca. 37%) wurden 6 min über der Bunsenflamme (Asbestnetz) gekocht.

Nach dem Abkühlen wurde — wie oben beschrieben — bei pH 2–3 und pH 10–12 mit Chloroform extrahiert; die Rückstände wurden in 50 μ l Methanol aufgenommen, ca. 2 μ l wurden direkt in den Gaschromatographen injiziert.

Bedingungen für die GC/MS-Kombination

MS. Gerät: hochauflösendes, doppelfokussierendes VG-Micromass 7035; Ionenquellentemperatur: 200°C; Ionisierungsenergie: 70 eV; Scan: m/e 35–600 (1 s/dec); Emissionsstrom: 250 µA; SEV: 2.5 KV; Reaktandgase f. d. CI: Methan, Isobutan, Ammoniak.

GC. Säule: 30 m fused silica-Kapillare, DB-1 bonded phase, 0,25 mm i.D., 0.25 µm Film (J+ W);

Temperaturen: Injector 250°C

Ofen 100°C 1 min, auf 290°C mit 10°C/min

Interface 230°C;

Split: 10:1;

Trärgas: Helium 30 cm/s.

Bedingungen für die FAB-Meßtechnik

Die Probenzuführung erfolgte mittels einer serienmäßigen FD-Schubstange.

Bombardinggas: Argon;

Druck in der Ionenquelle: 3×10^{-6} m bar

Energie der Ar-Atome: 8 KeV;

Scan: 10 s/dec;

Lösungsmittel: Glycerin;

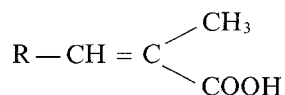
Massenauflösung: 5000 (10% Tal).

Ergebnisse und Diskussion

Nach Einnahme von Pentazocin sind im menschlichen Harn neben der unveränderten Ausgangsverbindung (ca. die Hälfte des Totalionenstroms (TIC)) eine Anzahl von Biotransformations-Produkten nachweisbar, deren massenspektrometrische Kenndaten in Tabelle 1 zusammenfassend referiert werden.

Im sauren Extrakt vor Hydrolyse konnte außerdem die in Tabelle 1 unter IV genannte Verbindung nachgewiesen werden, für die die angegebene Struktur vorgeschlagen wird.

Die Verbindungen III und IV blieben nur in Spuren nachweisbar und stellen somit sicherlich nur einen Nebenweg der Biotransformation dar. Das in der Literatur häufig beschriebene „Säure-Derivat“



konnte in keinem der untersuchten Extrakte nachgewiesen werden.

Nach salzsaurer Hydrolyse des Urins konnte eine weitere, unbekannte Verbindung (V) nachgewiesen werden, auf deren GC-peak im Chromatogramm allein über 90% des Totalionenstromes entfielen! Das unter den Bedingungen der Elektronenstoß-Ionisation (EI) aufgenommene Massenspektrum zeigt Abb. 1. Den base-peak liefert das α -Spaltprodukt bei m/e 230 (5.9-Dimethyl-N-methyl-2'-hydroxibenzomorphan-Kation), ein Ion, welches sich in den Spektren der hier untersuchten Verbindungen deutlich zu erkennen gibt.

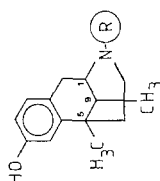


Tabelle 1. Die massenspektrometrischen Kenndaten (EI/CI) der nachgewiesenen Verbindungen

Verbindung	R	EI	CI	Mol.-Gewicht	Literatur
		starke Ionen (m/e; % rel. Int.; Reaktandgase)			
I	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H} - \text{C} = \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}_2- \end{array}$	285 (42); 270 (34); 256 (3); 242 (8); 230 (18); 217 (100); 202 (44); 188 (8); 174-172 (25); 159 (34); 146 (26); 131 (16); 110 (52); 86 (17); 69/70 (72); 57 (12); 45 (84); 41 (87)	CH ₄ : 286 (100); 270 (18); 230 u. 217 (46) Isob.: 286 (100); 230 (8); 217 (12) NH ₃ : 286 (100); 272, 218, 202 (5)	285	1, 11-13
II	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{H} - \text{C} = \text{C} - \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ -\text{CH}_2- \end{array}$	301 (4); 300 (6); 283 (3) 268 (18); 230 (10); 217 (100); 202 (52); 174-172 (22); 159 (24); 145 (14); 110 (48); 94 u. 57/55 (11); 86 (18); 70 (34); 45 (62)	CH ₄ : 302 (100); 282 (12) 266 u. 244 (3) NH ₃ : 302 (100); 282 (4); 217 (6)	301	1, 14, 15
III	-H	217 (100); 202 (74); 172 (27); 70 (82); 45 (28)	NH ₃ : 217 (100); 202 (14); 173 u. 159 (3)	217	16
IV	-CH ₃	231 (100); 216 (92); 202 (6); 174 (16); 159 (22); 145 (15); 124 (52); 115 u. 77 (18) 84 (82); 59 (28); 42 (49)	CH ₄ : 232 (100); 214, 173 (18); 109 (24)	231	

Im oberen Massenbereich ist neben dem wenig intensiven Molekülion bei m/e 303 nur das durch Abspaltung einer Methylgruppe entstehende Fragmention bei m/e 288, welches anschließend unter Verlust von Wasser das Ion bei m/e 270 liefert, von diagnostischer Bedeutung.

Durch hochauflösende Massenspektrometrie wurden die Elementarzusammensetzungen dieser Ionen bestimmt: m/e 303.2207 (C₁₉H₂₉NO₂), m/e 288.1958 (C₁₈H₂₆NO₂), m/e 230.1547 (C₁₅H₂₀NO) und das die Ethanamin-Brücke anzeigende Ion bei m/e 70.0659 (C₄H₈N).

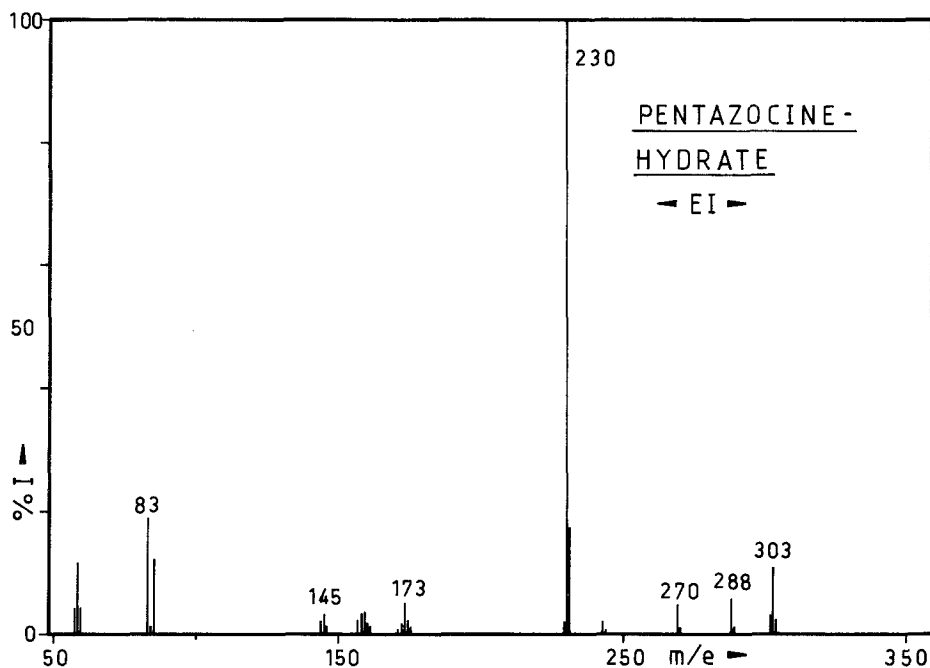


Abb. 1. EI-Massenspektrum des Pentazocine-Hydrats

Tabelle 2. Die mit verschiedenen Reaktandgasen erhaltenen CI-Massenspektren des Pentazocine-Hydrats

Reaktandgas	Starke Ionen (m/e; % rel. Int.)
CH ₄ :	332 (12); <u>304 (100)</u> ; 288 (14); 230 (86); 218 (48)
Isobutan:	346 (8); <u>304 (100)</u> ; 230 (32); 218 (46)
NH ₃ :	<u>304 (100)</u> ; 288 (3); 230 (12)

Zur Absicherung einer eindeutigen Molekulargewichtszuordnung gelangte nun die chemische Ionisation (CI) zur Anwendung; als Reaktandgase dienten Methan, Isobutan und Ammoniak (Tabelle 2).

Tabelle 2 sowie Abb. 2 zeigen augenfällig die Überlegenheit von Ammoniak als selektivem (!) Reaktandgas¹, eine schon bei ähnlichen Problemstellungen gemachte Erfahrung [2, 3, 9]. Neben der Erhöhung der Selektivität führt die Verwendung von Ammoniak auch zu einer beträchtlichen Steigerung der Nachweisempfindlichkeit.

Zur weiteren Bestätigung des Molekulargewichts wurde nun die erst seit kurzem kommerziell erhältliche FAB (= Fast Atom Bombardment)-Methode herangezogen: dabei erfolgte die Ionisation der Probe äußerst schonend, und

¹ Wenn das MH⁺-Ion (m/e 304) massenspezifisch detektiert wird, entfallen bei der CI mit Methan auf dieses Ion ca. 24% des Ionenstroms, mit Ammoniak als Reaktandgas dagegen 86%

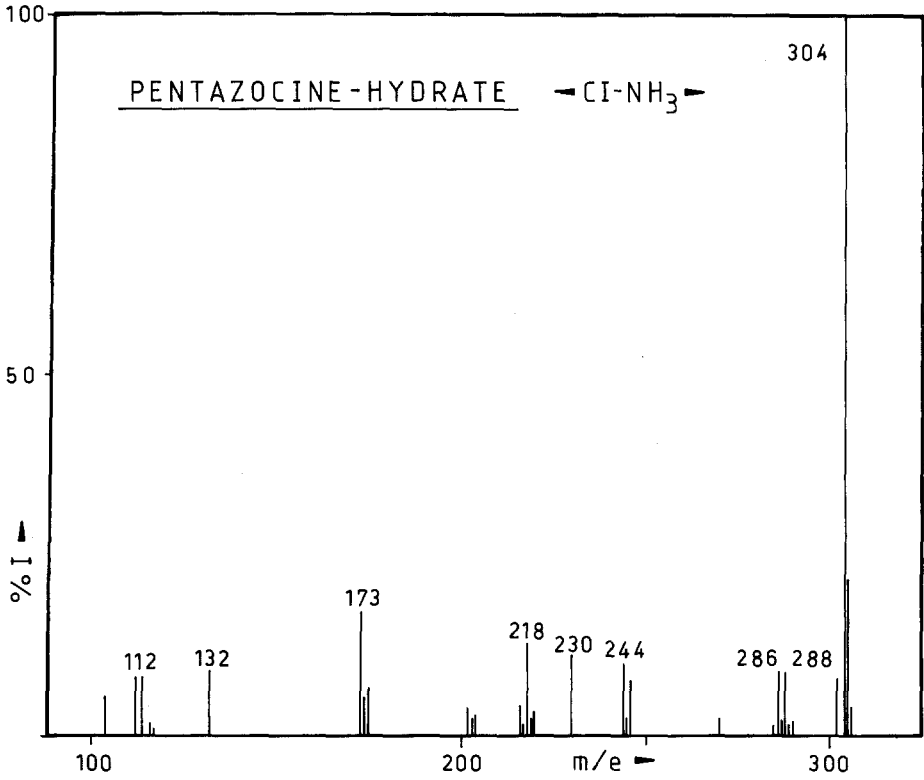


Abb. 2. CI-NH_3 -Massenspektrum des Pentazocine-Hydrats

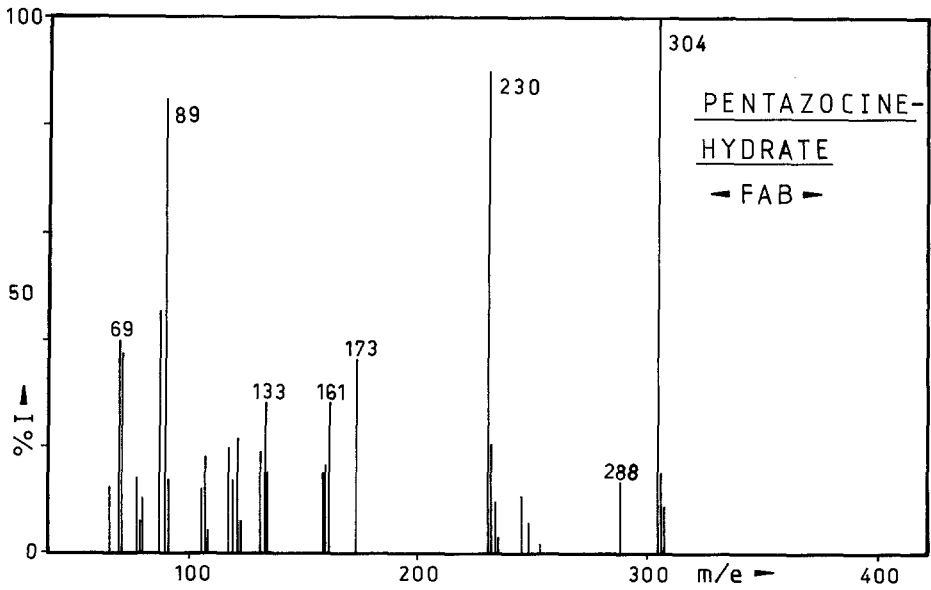


Abb. 3. FAB-Spektrum des Pentazocine-Hydrats

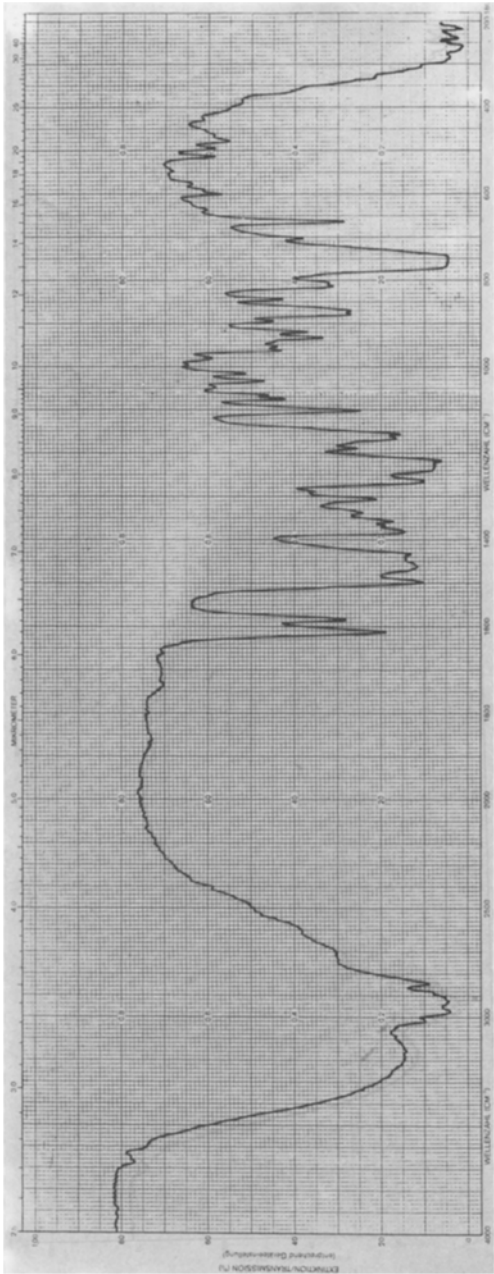


Abb. 4. IR-Spektrum des Pentazocine-Hydrats

thermische Belastungen (GC-Einspritzblock) des Probenmaterials werden vermieden [3].

Das FAB-Spektrum (Abb. 3) zeigt als Ion mit der höchsten Masse und relativen Intensität das Pseudomolekülion $(M + 1)^+$ bei m/e 304; weitere intensive Ionen finden sich bei m/e 230 und das nach Umlagerung entstehende Seitenkettenbruchstück bei m/e 89.

Dieser Verbindung kommt somit die Struktur eines 2'-Hydroxy-2-(3-methyl-3-hydroxybutyl)-5.9-dimethyl-6.7-benzomorphans zu (Pentazocine-hydrat):

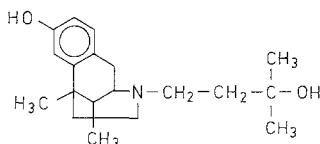


Abbildung 4 zeigt das IR-Spektrum (KBr-Preßtechnik 1 mg Substanz + 300 mg KBr; Gerät: PE 283) der Verbindung.

Das Hydrolyseverhalten der Reinsubstanz

In der Literatur sind zur Spaltung der Konjugate mit Mineralsäuren Dutzende von Methoden beschrieben, die jedoch beträchtliche Unterschiede in bezug auf Säurekonzentration und Hydrolysedauer zeigen [17, 18].

Da bei Untersuchungen zur Biotransformation von Arzneistoffen auch immer dessen Verhalten gegenüber Säuren geprüft werden muß (um Artefaktbildungen zu erkennen), wurde Pentazocin-Hydrochlorid nach der angegebenen Methode hydrolysiert.

Im sauren Extrakt konnte mit Hilfe der GC/MS noch ca. 55% Pentazocin nachgewiesen werden; die entsprechenden Ausbeuten im alkalischen Extrakt liegen bei <1% für I, III und IV. Dagegen werden 98% als Pentazocin-Hydrat wiedergefunden, d. h., unter den Bedingungen der salzsaurer Hydrolyse findet die (fast) quantitative Umwandlung des Pentazocins in das entsprechend Hydrat statt.

Das in den Harnextrakten nach Hydrolyse nachgewiesene I-Hydrat stellt somit ein Artefakt dar, welches sich allerdings als geeignet für eine quantitative Bestimmungsmethode erweisen könnte, zumal die Bioverfügbarkeit des Pentazocins selbst, bedingt durch den hohen first-pass-Effekt, bei nur ca. 20% liegt [19, 20].

Abschließend möchten wir noch darauf hinweisen, daß die Verbindung in offensichtlich größerem Umfange mißbräuchlich verwendet wird und ein nicht zu unterschätzendes Suchtpotential besitzt [21, 22].

Über unsere weiteren Untersuchungen werden wir in einer gesonderten Publikation berichten.

Literatur

1. Foltz RL, Clarke RA, Knowlton DA, Hoyland JR (1974) The rapid identification of drugs from mass spectra. Battelle Columbus Laboratories, Columbus. OH. USA

2. Foltz RL (1978) Quantitative analysis of abused drugs in physiological fluids by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. In: Leenheer AP de, Roncucci RR, van Peteghem C (eds) Quantitative mass spectrometry in life science, vol II. Elsevier, Amsterdam, pp 39–82
3. Gielsdorf W (1982) Fortschritte in der massenspektrometrischen Analysentechnik: FAB, CI, NICI, SIR. Internationales Symposium „Entwicklung und Fortschritte der forensischen Chemie“, Hamburg, 19.–20. 3. 1982
4. Budzikiewicz H (1981) Massenspektrometrie negativer Ionen. Angew Chem 93:635–649
5. Brandenberger H (1980) Negative ion mass spectrometry by low-pressure chemical ionization. In: Frigerio A, McCamish M (eds) Recent developments in mass spectrometry in biochemistry and medicine, vol 6. Elsevier, Amsterdam, pp 391–404
6. Dillard JG (1980) Negative ions. In: Waller GR, Dermer OC (eds) Biomedical applications of mass spectrometry, first suppl vol. Wiley & Sons, New York, pp 927–950
7. Richter WJ, Schwarz H (1978) Chemische Ionisation — ein stark Bedeutung gewinnendes massenspektrometrisches Analysenverfahren. Angew Chem 90:440–469
8. Horning EC, Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN, Thenot JP (1978) Detection, identification, and quantitation of organic compounds with bioanalytical systems based on mass spectrometry. J AOAC 61:1232–1246
9. Gielsdorf W (1981) Beitrag zu Biotransformation und Analytik des Psychopharmakons Mefexamid. Z Rechtsmed 87:117–127
10. Swezey SE, Blaschke TF, Meffin PJ (1978) Gas chromatographic analysis of pentazocine. J Chromatogr 154:256–260
11. Mackell MA, Poklis A (1982) Determination of pentazocine and tripelenamine in blood of T's and blues addicts by gas-liquid chromatography with a nitrogen detector. J Chromatogr 235:445–452
12. Agurell S, Boréus LO, Gordon E, Lindgren JE, Ehrnebo M, Lönnroth U (1974) Plasma and cerebrospinal fluid concentrations of pentazocine in patients: assay by mass fragmentography. J Pharm Pharmacol 26:1–8
13. Reid RW, Gerbeck CM (1981) Detection of pentazocine and tripelenamine in urine. Clin Chem 27:10–13
14. Pfeifer S, Borchert HH (1980) Pharmakokinetik und Biotransformation. Verlag „Volk und Gesundheit“, Berlin (Ost)
15. Pfeifer S (1978) Biotransformation von Arzneimitteln, Bd 2. Verlag Chemie, Weinheim
16. Gielsdorf W (1980) Massenspektrometrische Befunde im Urin nach Einnahme von Dihydrocodein (Paracodin) und Pentazocin (Fortral). Fresenius Z Anal Chem 301:434–435
17. Goenechea S, Goebel KJ (1978) Verhalten von Morphin-3-Glucuronid bei der Hydrolyse mit Salzsäure. Beitr Gerichtl Med 36:503–507
18. Goenechea S, Kobbe K, Goebel KJ (1978) Verhalten von Codein und Codein-6-Glucuronid bei der Hydrolyse mit Salzsäure. Arzneimittel-Forsch 28:1070–1071
19. Ehrnebo M, Boréus LO, Lönnroth U (1977) Bioavailability and first-pass metabolism of pentazocine in man. Clin Pharmacol Ther 22:888–892
20. Brogden RN, Speight TM, Avery GS (1973) Pentazocine: A review of its pharmacological properties, therapeutic efficacy and dependence liability. Drugs 5:6–91
21. Jasinski DR, Martin WR, Hoeldtke RD (1969) Effect of short- and long-term administration of pentazocine in man. Clin Pharmacol 11:385–402
22. Caldwell J, Sever PS (1974) The biochemical pharmacology of abused drugs. III. Cannabis, opiates, and synthetic narcotics. Clin Pharmacol Ther 16:989–1009

Eingegangen am 13. April 1982