Toxichem Krimtech 2026;93(1):72

GTFCh-Workshop – 30. / 31. Januar 2025 – Institut für Rechtsmedizin Bern (Schweiz)

QToF Screening mit Library Search, HighResNPS Database und Retentionszeitvorhersage

Silvana Petzel-Witt[1] und Bernhard Wüst[2]

[1]Institut für Rechtsmedizin, 60596 Frankfurt; *witt@med.uni-frankfurt.de*
[2]Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn; *bernhard_wuest@agilent.com*

1. Hintergrund

Die Dynamik der Drogenmärkte und das Auftauchen und die Verbreitung neuer psychoaktiver Substanzen sowie chemischer Varianten bekannter Betäubungsmittel und Arzneistoffe hat in den letzten zwei Jahrzehnten erheblich zugenommen und stellt nicht nur das Rechtssystem, sondern auch die forensischen Labore vor enorme und anhaltende Herausforderungen [1]. Mit dem Inkrafttreten des Neuen-psychoaktiven-Stoffe-Gesetzes (NpSG) im November 2016 hat der Gesetzgeber auf diese Entwicklungen reagiert und ganze Stoffgruppen dem NpSG unterstellt [2]. Dadurch unterliegen nun auch Substanzen dem Gesetz, die bisher vom Betäubungsmittelgesetz (BtMG) nicht erfasst wurden. Für die forensischen Labore bedeutet dies, dass sie zunehmend in der Lage sein müssen, derartige Substanzen auch in der Routine zu erfassen. Die hohe Dynamik auf den Drogenmärkten macht es in der Praxis allerdings schwierig, auf aktuelle Entwicklungen zeitnah zu reagieren, die jeweilige Laborroutine entsprechend anzupassen, Datenbanken zu erweitern und (soweit verfügbar) Reinsubstanzen zu erwerben. Insbesondere deren Nichtverfügbarkeit kann diese Prozesse erheblich verzögern. Hier kann ein datenbasiertes Suspect-Screening mittels hochauflösender Massenspektrometrie sich als nützlich erweisen [3].

Aus diesem Grund hat sich bereits vor Jahren eine Gruppe nordischer Wissenschaftler zusammengefunden und die HighResNPS-Datenbank ins Leben gerufen. Ziel war es, HR-MS-Bibliotheken für neue psychoaktive Substanzen zu erstellen, Daten zu teilen und diese Bibliotheken stets auf dem neuesten Stand zu halten. Durch schnell steigende Nutzerzahlen wurde es erforderlich, daraus eine Online-Datenbank zu entwickeln, aus der Nutzer nicht nur Informationen zu Spektren entnehmen können, sondern auch selbst Daten in diese einspeisen können. Inzwischen ist daraus ein internationales Projekt geworden, welches jetzt von der Internationalen Vereinigung der Forensischen Toxikologen (TIAFT) verwaltet wird [4].

Daten aus der HighResNPS-Datenbank können so auch bei Nichtverfügbarkeit benötigter Reinsubstanzen für ein Suspect-Screening mittels hochauflösender Massenspektrometrie genutzt werden. Aufgrund unbekannter Retentionszeiten kommt es aber typischerweise zu einer großen Zahl positiver Treffer, was die Auswertung mitunter schwierig machen kann und zudem mit einem sehr hohen Zeitaufwand verbunden ist. Daher wurde zur Datenreduktion von der Firma Agilent, in Zusammenarbeit mit Daniel Pasin, ein Retentionszeitvorhersagemodell, basierend auf dem Verhältnis von Analytstruktur und Retentionszeit entwickelt. Es integriert verschiedene LC-Systeme mit unterschiedlichen Elutionsbedingungen und verwendet Retentionszeiten aus der Online-Datenbank HighResNPS [5].

Mit diesem Model wichen die vorhergesagten Retentionszeiten für die meisten Analyte lediglich um etwa 1 Minute von der tatsächlichen Retentionszeit ab (Abb. 1). Das Modell wurde anschließend in der Forensischen Toxikologie in Frankfurt am Main getestet und in Zusammenarbeit mit Bernhard Wüst und Stefan Schäbler (beide Agilent) weiter verbessert und erweitert. Dabei wurden zusätzliche Deskriptoren für die Modellerstellung eingefügt und die Substanz-

klassifizierung verfeinert. Die Qualität der Retentionzeitvorhersage konnte dadurch verbessert werden. Dies zeigt sich in einer besseren Identifizierung von Substanzen und einer kürzeren Berechnungszeit.

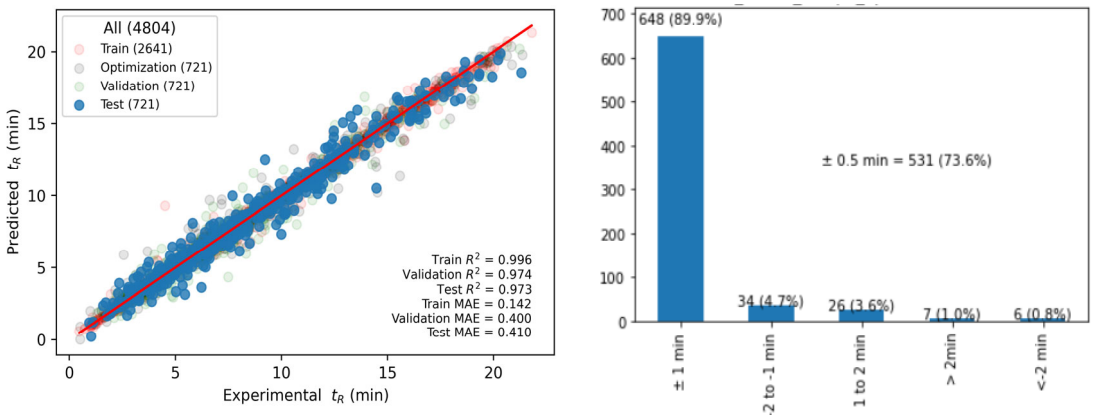

Abb. 1. Retentionszeitvorhersage im HighResNPS-Projekt. Mit Hilfe von Additionsdeskriptoren aus ChemAxon (Chemicalize), > 700 vermessenen Substanzen und mit Unterstützung von Daniel Pasin wurde die Retentionszeitvorhersage verbessert.

2. Material und Methoden

Für die Erprobung der Methode in der Praxis wurden die Analysen auf baugleichen Gerätemodellen, mit den gleichen Trennsäulen und unter denselben Elutions- und Messbedingungen sowohl im Labor von Agilent, als auch im Labor in Frankfurt durchgeführt.

Für die Messungen wurden ein Agilent Infinity II UHPLC 1290 II gekoppelt mit einem Agilent Revident QTOF Massenspektrometer verwendet. Bei der Trennsäule handelte es sich um eine Poroshell 120 EC C18 (3 x 100 mm, 2,7 µm), es erfolgte eine Gradientenelution (Mobile Phase A: Wasser, 5 mM NH_4-Formiat, 0,1 % (v/v) Ameisensäure; Mobile Phase B: Acetonitril und 0,1 % (v/v) Ameisensäure) mit einer Flussrate von 0,4 mL/min und einer Laufzeit von 29 Minuten. Als Messmethode wurde eine sog. AllIons oder data-independent MS/MS-Methode im positiven Modus mit einem Massenbereich von 40 bis 1000 m/z genutzt, bei der eine ungerichtete Datenerfassung von Vorläufer- und Fragment-Ionen erfolgt. Es wurden 4 verschiedene Kollisionsenergien verwendet (0, 10, 20, 40 eV).

Die AllIons MS/MS-Analyse ermöglichte eine zuverlässige, hochempfindliche qualitative und auch quantitative Analyse auf einem einzigen Gerät und in einem einzigen Analyselauf. Dadurch können der Probendurchsatz erhöht und die Kosten für Analysen minimiert werden. Dieser Arbeitsablauf ist damit deutlich schneller, als die Einrichtung eines Screenings mit Triple-Quadrupol-LC/MS-Instrumenten. Diese benötigen mitunter viele Stunden für die Eingabe von Substanzinformationen und für die Auswahl von geeigneten Qualifizierungsionen.

Zusätzlich wurde eine Personal Compound Database and Library (PCDL; Agilent) zur Identifizierung der Analyte verwendet. Die PCDLs sind sehr umfangreich. Sie enthalten genaue Masseinformationen für Tausende von Verbindungen. Zur Verwaltung und Erstellung der für die Auswertung verwendeten PCDLs wurde ChemVista als Bibliotheksverwaltungssoftware genutzt. In dieser sind gegenwärtig etwa 12000 Substanzen mit Retentionszeiten und Massenspektren aus verschiedenen Quellen erfasst. Die Agilent ChemVista Bibliotheksverwaltungssoftware verwaltet Verbindungen, Retentionszeiten und Massenspektren aus verschiedenen Quellen an einem Ort und rationalisiert so die Arbeitsabläufe zur Identifizierung unbekannter

Substanzen in der MassHunter-Datenanalyse. Sie enthält umfangreiche LC/Q-TOF-Bibliotheken und Datenbanken für die Bereiche Lebensmittelsicherheit und -qualität, Umwelt, extrahierbare und auslaugbare Stoffe sowie forensische Toxikologie. Ein effizientes Bibliotheksmanagement wird durch Listenorganisation und intuitive Such- und Filteroptionen erreicht. Der Import von Daten aus verschiedenen Dateiformaten, wie MassBank, MoNA (MassBank of North America) und CompTox Chemicals Dashboard, ermöglicht es dem Benutzer, eine große Anzahl von Spektren zu durchsuchen und so die Geschwindigkeit und Qualität der Identifizierung von Verbindungen zu verbessern [6].

Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Integration der AllIons MS/MS-Daten in der MassHunter Software von Agilent, mit der qualitativ, aber insbesondere auch quantitativ ausgewertet werden kann. Die MassHunter Software ermöglicht mittels des LC-Screener Tools eine schnelle Einordnung der positiven Treffer durch das implementierte und gut übersichtliche Farbschema (Ampelschema). Die Einordnung der Substanzen in Grün, Orange oder Rot erfolgt hierbei auf Basis der Retentionszeitdifferenz, der Anzahl verifizierter Ionen, der akkuraten Masse und dem Mass Match Score. Die die Kriterien können individuell eingestellt werden.

3. Fallbeispiele

Die Erprobung der Messmethode erfolgte in Frankfurt mit extrahierten biologischen Proben (Blut, Urin, Haare etc.) in Fällen mit dem Verdacht auf die Aufnahme neuer psychoaktiver Substanzen. Bei positiven Befunden erfolgte eine Quantifizierung in der Forensischen Toxikologie in Freiburg, wo all unsere positiven „Vorbefunde“ bestätigt wurden. So konnten mit der Methode beispielsweise Designer-Stimulanzien (α-PiHP, ca. 26 ng/mL), synthetische Cannabinoide (ADB-BINACA/BUTINACA > 10 ng/mL), Designer-Benzodiazepine (Bromazolam ca. 66 ng/mL, Pyrazolam ca. 95 ng/mL, Desalkylgidazepam ca. 3,7 ng/mL, Deschloroetizolam < 5 ng/mL) als neue psychoaktive Substanzen sowie viele weitere Substanzen und insbesondere auch Arzneistoffe nachgewiesen werden (Abb. 2).

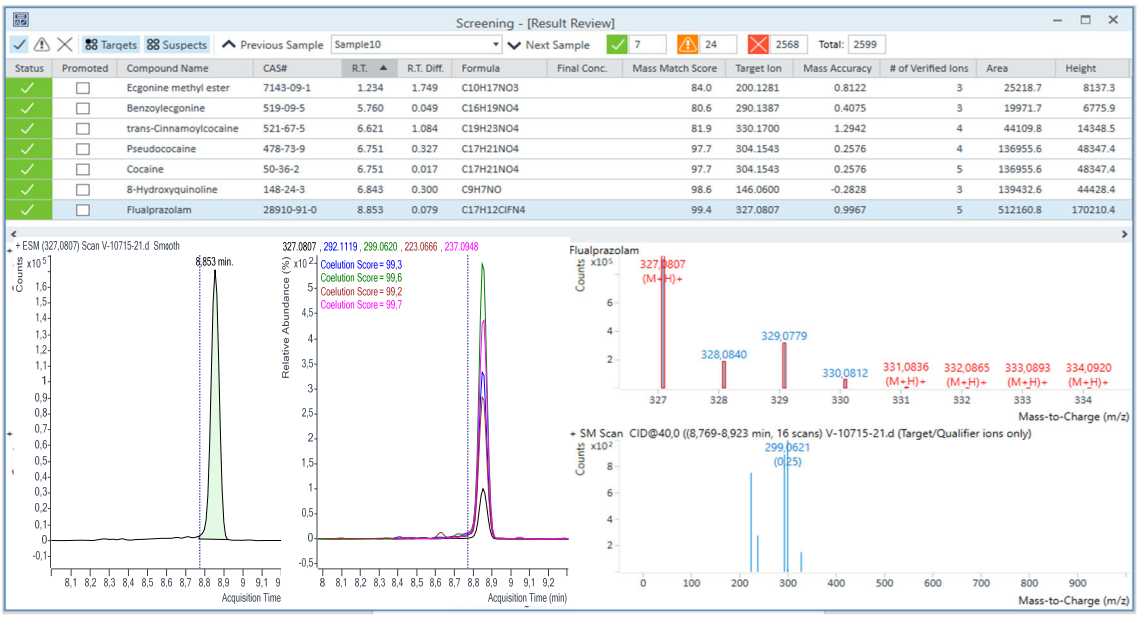

Abb. 2. Positiver Treffer für Flualprazolam in der Blutprobe eines Probanden. Vorläufer- und 4 Fragment-Ionen mit einem coelution score > 99 %, Retentions¬zeitdifferenz: 0,079 min, Massengenauigkeit: > 0,99. Quantifizierung: Flualpra-zolam 30 ng/ml.

4. Ausblick

Bisher hat sich die Integration eines hochauflösenden LC-QTof MS-Systems in der Routine für das Screening von Tausenden von Substanzen bewährt und wird von uns beständig erweitert und verbessert. Aktuell befinden sich circa 3000 Substanzen im Screening und es werden beständig neue Substanzen hinzugefügt. Ziel ist es, mittels dieser Analysenmethode zeitnah auf aktuelle Entwicklungen des Drogenmarktes reagieren zu können - durch eine permanente Erweiterung der Datenbank, insbesondere durch die Aufnahme von Substanzmetaboliten. Daneben soll durch eine fortgesetzte Verbesserung der Methode die Zahl falsch positiver Treffer weiter reduziert werden. Derzeit wird an einer Validierung der Methode gearbeitet. Ein Problem kann möglicherweise die analytische Sensitivität des Verfahrens bei sehr niedrigen Konzentrationen des Analyten in der Probe darstellen, beispielsweise bei synthetischen Cannabinoiden. Mglw. muss dem durch eine weitere Optimierung der Extraktionseffizienz in der Probenvorbereitung sowie durch entsprechende Anpassungen in der Messmethodik entsprochen werden.

5. Literatur

[1] New psychoactive substances-the current situation in Europa (European Drug report 2025), EUDA 05. Juni 2025 https://www.euda.europa.eu/publications/european-drug-report/2025/new-psychoactive-substances_en

[2] Anlage NpSG, BGBl. 2024 I Nr. 210, S. 3 – 16

[3] Hasan M, Ali Sarker S. New psychoactive substances: a potential threat to developing countries. Addict Health. 2023, 3, 136-143

[4] Mardal M, Findal Andreasen M, Mollerup CB, Stockham P, Telving R, Thomaidis NS, Diamanti KS, Linnet, K, Dalsgaar PW. Corrigendum to HighResNPS.com: An online crowd-sourced HR-MS Database for suspect and non-targeted screening of new psychoactive substances. J. Anal. Tox. 2019, 1-8

[5] Pasin D, Mollerup CB, Rasmussen BS, Linnet K, Dalsgaard PW. Development of a single retention time prediction model integrating multiple liquid chromatography systems: application to new psychoactive substances. Anal. Chim. Acta 2021, 1184, 339035

[6] https://www.agilent.com/cs/library/brochures/br-chemvista-software-5994-5965en-agilent.pdf https://www.agilent.com/en/product/software-informatics/mass-spectrometry-software/library-management/chemvista-with-lc-q-tof-spectral-libraries-databases