

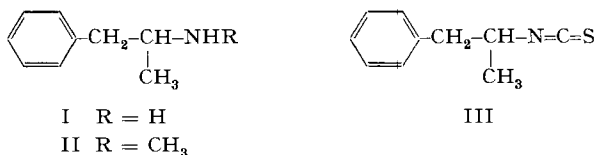
## 92. Über die gas-chromatographische Bestimmung von Amphetamin als (1-Phenyl-isopropyl)-isothiocyanat

von H. Brandenberger und Esther Hellbach

(23. II. 67)

Primäre und die entsprechenden durch N-Methylierung entstandenen sekundären Amine verhalten sich gas-chromatographisch oft sehr ähnlich. So lassen sich z. B. die beiden Weckamine Amphetamin (I) und N-Methylamphetamin (II) kaum auf Grund ihrer Retentionszeiten an Trennkolumnen wie SE-30 oder XE-60 auf Chromosorb unterscheiden. Zudem ist die Flüchtigkeit beider Amine gross, so dass sie, in zu verdünnter Lösung auf die Trennkolonne gegeben, beim Austritt leicht vom grossen Lösungsmittelpik überdeckt werden können. Diese Gefahr lässt sich bekanntlich beseitigen, wenn man als Lösungsmittel Schwefelkohlenstoff verwendet, der vom Flammenionisations-Detektor nicht angezeigt wird.

Bei einem solchen Vorgehen haben wir nun festgestellt, dass bei Auftrennungen in Schwefelkohlenstoff-Lösung die Retentionszeiten wohl für II dieselben bleiben wie bei ätherischer oder methanolischer Lösung, nicht aber für I. Je nach Alter der Lösung von I in Schwefelkohlenstoff reduziert sich dessen normaler Pik stark oder er verschwindet sogar. An seine Stelle tritt ein neuer Pik mit bedeutend längerer Verweilzeit auf (s. Tabelle), der einer neuen Verbindung zuzuordnen ist.



Für diese Verbindung, die sich bei ihrem Austritt aus der Trennkolonne auffangen liess, konnten wir UV-, IR.- sowie Massen-spektrometrisch die Struktur III nachweisen:

Im UV. ist ein aromatischer Kern durch eine Bande bei 247 nm angezeigt.

Im IR. (Fig. 1) sind die dominierende Bande um 2100 cm<sup>-1</sup> und die Bande bei 1090 cm<sup>-1</sup> einer -N=C=S Gruppierung zuzuordnen. Die Banden bei 745 und 700 cm<sup>-1</sup> bestätigen die Anwesenheit eines monosubstituierten Benzolringes, und auch die Existenz aliphatischer C-H-Bindungen ist durch Banden bei 1455, 1380 und um 2900 cm<sup>-1</sup> gesichert.

Das Massenspektrum (Fig. 2) zeigt eine Verbindung mit Mol.-Gew. 177 an, die, da der *m/e* 179 Pik (*M*+2) 5,4% des Molekular-Ionenpiks erreicht, 1 Atom Schwefel enthalten muss. Das Fragmentierungsschema, insbesondere das Auftreten der dominierenden Ionen mit *m/e* 86 und 91 (durch Spaltung der sowohl dem N als auch dem aromatischen Rest benachbart liegenden C-C Bindung) bestätigt das Vorliegen

des Senföls (1-Phenyl-isopropyl)-isothiocyanat, eine unseres Wissens bisher nicht beschriebene Verbindung<sup>1)</sup>.

Primäre Amine lassen sich bekanntlich mit Schwefelkohlenstoff zu Alkyl-dithiocarbaminsäuren (bzw. deren Salze) umsetzen, die beim Kochen mit Schwermetall-Ionen in Senföle und Schwefelkohlenstoff zerfallen:

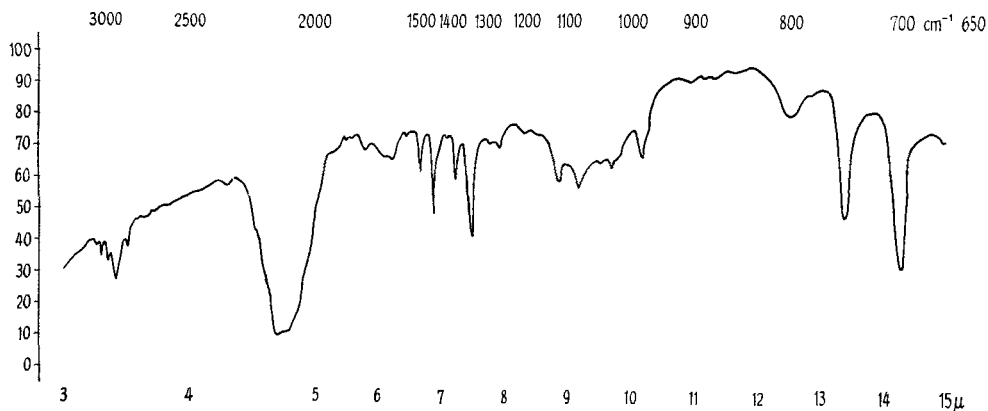
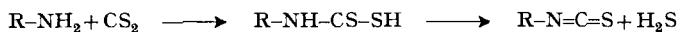


Fig. 1

IR.-Spektrum des gas-chromatographisch isolierten Reaktionsprodukts von Amphetamin mit  $\text{CS}_2$  Kondensat in 20 mg KBr, 2 mm Mikropille, BECKMAN IR-8 mit Strahlenbündler

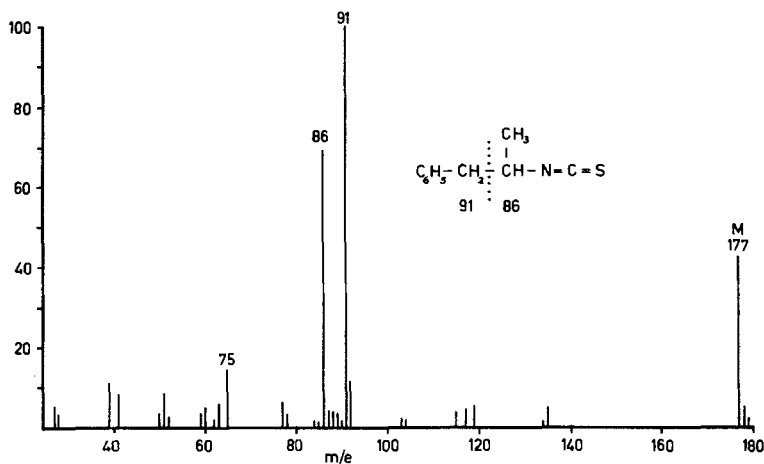


Fig. 2

Massenspektrum von gas-chromatographisch isoliertem Reaktionsprodukt von Aphetamin mit  $\text{CS}_2$  HITACHI-PERKIN ELMER RMU-6D

<sup>1)</sup> Während der Drucklegung sind wir auf das Kurzreferat einer Mitteilung von HALL, CORDOVA, RIEDERS gestossen, die ebenfalls die Derivierung mit Schwefelkohlenstoff zum gas-chromatographischen Amphetamin-Nachweis herangezogen haben [4].

Es fragte sich nun, ob die Umwandlung von I in III spontan sei oder ob ein Beispiel von Reaktions-Gaschromatographie vorliege. Eine Katalyse durch die heisse Metallwandung der Trennkolonne war auszuschliessen, da wir mit einer Glaskolonne die gleichen Resultate erzielten. Durch IR.-Analyse eingedampfter und getrockneter Proben von I in Schwefelkohlenstoff liess sich zeigen, dass sich das Senföl III bereits beim Zusatz von Schwefelkohlenstoff zu I fast quantitativ bildet. Ein analoger spontaner Umsatz konnte mit anderen primären Aminien, darunter Apophedrin (=  $\beta$ -Hydroxyamphetamin) bisher nicht reproduziert werden. Wir hoffen, auf die Gründe für dieses abnormale reaktive Verhalten des Amphetamins später zurückkommen zu können.

Der spontane Umsatz von I zu III lässt sich nun zum Nachweis von Amphetamin (Benzedrin, Dexedrin, Elastonon) in pharmazeutischen Präparaten, Getränken, Körperflüssigkeiten oder Organen heranziehen. Er erleichtert sowohl die Identifikation wie auch die quantitative Erfassung von I und ist besonders wertvoll als Unterscheidungsmerkmal von I und II (Doping-Kontrolle, ist doch I heute das beliebteste Stimulans in Sportkreisen!).

Zum Nachweis von *Amphetamin (I)* und *N-Methylamphetamin (II)* werden die wasserdampf-flüchtigen Basen aus dem durch Carbonat alkalisierten Untersuchungsmaterial, z. B. Urin, durch Wasserdampf-Destillation abgetrennt und aus dem Destillat nach Carbonat-Zusatz mit Äther extrahiert. Bei nicht biologischem Material genügt meist eine direkte Extraktion der alkalisch gemachten wässrigen Lösung ohne Destillation. Für den Nachweis von Spuren wird der organische Extrakt bei Raumtemperatur vorsichtig auf ein kleineres Volumen eingedunstet. Das erste Gas-Chromatogramm erfolgt aus der ätherischen Lösung. Anschliessend wird weiter eingedunstet (Äther nie ganz entfernen, da sonst Verdampfungsverluste auftreten) und durch Zusatz von Schwefelkohlenstoff wieder das gleiche Volumen eingestellt (eine sich eventuell bildende Trübung wird durch Zusatz von einigen Tropfen Methanol entfernt). Diese Lösung wird wie die erste gas-chromatographiert. Ein durch I verursachter Pik im ersten Chromatogramm ist im zweiten verschwunden oder zumindest stark reduziert. Dafür tritt ein durch III verursachter neuer Pik mit bedeutend längerer Verweilzeit auf (s. Tabelle). Auf diese Weise wird ein eventueller Amphetamin-Befund doppelt gesichert. Ein durch II verursachter Pik bleibt erhalten. Bei der Beurteilung ist in Betracht zu ziehen, dass nach Einnahme von II im

*Gas-chromatographische Retentionsdaten, in Min.*

Kolonne (Temperatur)	A (90°)	B (110°)	C (110°)
Amphetamin	4,8	3,0	7,8
Methylamphetamin	4,8	3,1	7,2
(1-Phenyl-isopropyl)-isothiocyanat	23	33	—

Kolonnc A 5% SE-30 auf silanisiertem Chromosorb W, 60–80 mesh, 165 cm, Metall

Kolonnc B 8% XE-60 auf silanisiertem Chromosorb W, 60–80 mesh, 170 cm, Glas

Kolonnc C 10% Carbowax 20 auf mit 5% KOH beschichtetem silanisiertem Chromosorb W, 60–80 mesh, 185 cm, Glas

Kolonncndurchmesser überall 1/8 inch

Trägergas N<sub>2</sub>, 25 ml/Min.

Urin neben II immer auch I als dessen Metabolit zu treffen ist, so dass eine Einnahme von II durch den gas-chromatographischen Nachweis von II neben I und auch III bewiesen wird.

Eine zusätzliche Verfeinerung der Methodik ergibt der Einsatz eines Elektroneneinfang-Detektors (EED) neben dem Flammenionisations-Detektor (FID). Für die Erfassung des Senföles wiederholt man dann das Chromatogramm nach Auswechseln des Detektors oder, besser noch, man arbeitet mit einem Zweikanalsystem [1], in welchem der Gasstrom nach Austritt aus der Trennkolonne gespalten und parallel den beiden Detektoren zugeführt wird. Die schwefelhaltige und daher Elektronen einfangende Verbindung III wird vom EED ebenfalls registriert und lässt sich so, abgesehen von ihrer Retentionszeit, auch durch den Quotienten (EED/FID) der beiden Detektor-Signale, die wir<sup>2)</sup> relative Elektroneneinfangs-Ausbeute (REA) nennen, charakterisieren. Mit der von uns benutzten Anordnung liegt die REA für III bei 0,15 [2]. Ein solcher Wert liegt für eine gesättigte Verbindung mit 1 Schwefelatom auf ein Molekulargewicht von 177 im Rahmen der Erwartungen [3].

Auch ohne die Verwendung zweier verschiedener gas-chromatographischer Detektoren erlaubt das zuerst beschriebene Vorgehen einen sicheren Nachweis von Amphetamin. Als bedeutend schwächer polare Verbindung lässt sich III an den meisten Trennkolonnen besser chromatographieren als das basische I, es liefert symmetrischere Pike, die sich quantitativ leichter auswerten lassen. Dazu steigt die Nachweisempfindlichkeit des FID für die zu erfassende Substanz leicht infolge Erhöhung des Molekulargewichtes beim chemischen Umsatz.

Bisher haben wir nur mit drei Trennkolonnen gearbeitet (s. Tabelle). Für den gas-chromatographischen Nachweis von Basen wie I und II eignen sich die Trennkolonnen A und B nur schlecht. Die Basen zeigen starke Schwanzbildung und es kommt im verwendeten Temperaturbereich auch zu irreversibler Adsorption. Auf der Trennkolonne C hingegen geben sowohl I wie II fast symmetrische Pike ohne störende Adsorptionseffekte. Das Senföl III lässt sich auf den Kolonnen A und B ohne Adsorption, auf Kolonne C aber nicht chromatographieren. Aus diesem Grund ist bei der Umwandlung von I in III ein Kolonnenwechsel angezeigt, wenn man schon die Trennung der Amine quantitativ auswerten will.

Mit der beschriebenen Technik können wir in 25-ml-Urinproben I und II bis hinunter zu 10 µg-% mit Sicherheit erfassen. Auch nach einmaliger Einnahme von nur 5 mg Wirkstoff (entsprechend einer Tablette eines handelsüblichen Präparates) wird sich dieser somit noch nach mehreren Std. im Urin nachweisen lassen.

**Experimentelles.** – Die *gas-chromatographischen Trennungen* (technische und experimentelle Daten s. Tabelle) erfolgten erst mit einem AEROGRAPH Model 600, später mit einem AEROGRAPH Model 1200, beide mit FID und SARGENT-1-mV-Schreiber, Model SR mit Disk-Integrator. Die Zweikanal-Gas-Chromatogramme<sup>3)</sup> wurden mit einem AEROGRAPH Model 204 mit 1:1-Stromteiler, führend auf parallel geschaltete FID und EED, durchgeführt. Der Vergleich der Detektor-ausschläge erfolgte durch Ausschneiden und Wägen der von zwei LEEDS & NORTHRUP-Speedomax-1-mV-Schreibern registrierten Kurvenflächen.

Für die *Isolierung von III* wurde das Ende der Trennkolonne auf einen im Kolonnenofen des AEROGRAPH 600 montierten Stromteiler geführt. Dieser leitete 10% des Gasstromes auf den FID und 90% in ein Glaskondensationsrohr von 175 mm Länge und 2 mm innerem Durchmesser. Die

<sup>2)</sup> Nach Vorschlag von Herrn Prof. Dr. E. SCHUMACHER.

<sup>3)</sup> Wir danken Frau C. WOLFENBERGER-WARR für die Durchführung dieser Chromatogramme.

Kondensation von III erfolgte ohne zusätzliche Kühlung ca. 2 cm über dem Austritt des Glasrohres aus dem Kolonnenofen. Die Kondensationszone ist mit einer Lupe erkennbar. Für jede Identifikation erfolgte eine gesonderte Kondensation. Für die Aufnahme des *UV.-Spektrums* (BECKMAN DB) wurde das Kondensat aus dem Glasrohr mit Alkohol direkt in die Quarz-Küvette gespült. Für die Aufnahme des *IR.-Spektrums* (BECKMAN IR-8 mit Strahlenbündler; Mikro-KBr-Pastille) wurde das Kondensat mit Chloroform aus dem Rohr ausgewaschen, wobei wir die Lösung direkt auf ca. 20 mg KBr auftropfen liessen. Nach Vermengen wurde mit Hilfe der Bleiring-Methodik eine Mikropille von 2 mm Durchmesser hergestellt. Für die Aufnahme des *Massenspektrums*<sup>4)</sup> wurde das Teilstück des Kondensationsröhrchens mit der Kondensationszone direkt in den Feststoff-Einlass eines doppelfokussierenden HITACHI-PERKIN-ELMER-RMU-6 D-Massenspektrometers eingeführt.

Für den *Nachweis der Wechamine im Urin* destillieren wir meist 25 ml Carbonat-alkalisiertes Material mit Wasserdampf. Die ersten 5 ml Destillat werden wiederum mit Carbonat versetzt und dreimal mit total 10 ml Äther ausgezogen. Der Ätherextrakt wird auf kleines Volumen eingeeengt und wie oben beschrieben gas-chromatographisch vor und nach Behandlung mit Schwefelkohlenstoff analysiert.

#### SUMMARY

Amphetamine (I) reacts spontaneously at room temperature with carbon disulfide to form (1-phenyl-isopropyl)-isothiocyanate, which was identified by UV-, IR- and mass spectrometry. This reaction is used for the analytical determination of I by gas chromatography. The characteristic peak shift which occurs after addition of carbon disulfide differentiates I from N-methylamphetamine (II). The method is applied to urine analysis of I and II (which partially metabolizes to I) and might be useful in doping control.

Chemische Abteilung am  
Gerichtlich-medizinischen Institut  
der Universität Zürich

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. F. LOVELOCK, *Analyt. Chemistry* **35**, 474 (1963); J. W. AMY & K. P. DIMICK, Pittsburgh Conference, March 1963; H. HARTMANN, D. M. OAKS & K. P. DIMICK, *Amer. chem. Soc. Meeting*, September 1963, und *Analyt. Chemistry* **36**, 1560 (1964).
- [2] H. BRANDENBERGER & S. MÜLLER, *Mitteil. Gebiet Lebensm.-Unters. Hygiene* **56**, 281 (1965).
- [3] D. M. OAKS, H. HARTMANN & K. P. DIMICK, *Second International Symposium on Gas Chromatography*, Houston, Texas, March 1964.
- [4] C. R. HALL, V. CORDOVA, F. RIEDERS, *Pharmacologist* **7**, 148 (1965), Abstrakt 71.

<sup>4)</sup> Wir danken Herrn PD Dr. J. SEIBL vom Laboratorium für Organische Chemie der ETH Zürich für Aufnahme und Interpretation des Spektrums.