

Routine-Nachweis des THC-Metaboliten 11-Nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carbonsäure in der forensischen Praxis

M. Hanke und G. Megges

Bayerisches Landeskriminalamt, Maillinger Str. 15, D-8000 München 19,
Bundesrepublik Deutschland

Routine Detection of the THC Metabolite 11-Nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic Acid in Forensic Practice

Summary. A method for the detection of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, one of the predominant metabolites of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human urine, is presented. As screening method a homogeneous enzyme immunoassay is used (Emit dau). Positive results are confirmed by GLC/MS as alternative method. After glucuronide hydrolysis the metabolite is isolated using a C_{18} reversed phase column and methylated in the 1-hydroxy and 9-carboxy position. The methylated metabolite is detected by gas chromatography/mass fragmentography. This pretty rapid method seems to be useful in forensic routine analysis.

Key words: Enzyme immunoassay, cannabinoids – Tetrahydrocannabinol metabolite, detection in urine – Mass spectrometry, THC metabolite

Zusammenfassung. Es wird eine Methode zum Nachweis von 11-Nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carbonsäure, einem Hauptmetaboliten von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, im Urin beschrieben. Als Screening dient der Enzymimmunoassay (EMIT dau). Bei positivem Befund wird der Metabolit nach Glucuronidspaltung mit Hilfe einer C_{18} -reversed phase-Säule isoliert und methyliert. Der Nachweis erfolgt mittels Massenfragmentographie. Das Verfahren ist für die forensisch-toxikologische Routineanalytik brauchbar.

Schlüsselwörter: Enzymimmunoassay, Cannabinoide – Tetrahydrocannabinol Metabolit, Nachweis im Urin – Massenspektrometrie, THC-Metabolit

Einleitung

An Methoden zum Nachweis des Cannabismißbrauchs durch Untersuchung von Körperflüssigkeiten wird seit dem Beginn der sog. Rauschgiftwelle während

Sonderdruckanfragen an: M. Hanke (Adresse siehe oben)

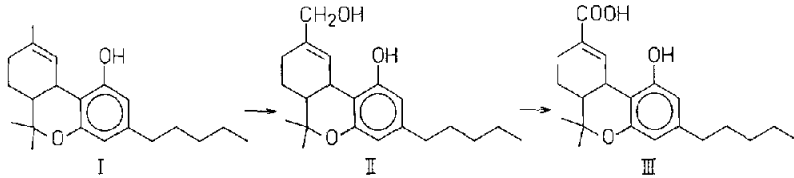


Abb. 1. I: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC); II: 11-Hydroxy- Δ^9 -THC; III: 11-Nor- Δ^9 -THC-9-carbonsäure

der sechziger Jahre gearbeitet. Erste Versuche, die intakten Cannabinoide Δ^9 -THC, CBN und CBD nachzuweisen, wiesen allerdings nicht die für den forensisch-toxikologischen Bereich erforderliche Reproduzierbarkeit auf [1-3] oder waren an die Aufnahme außergewöhnlich großer Cannabismengen gebunden [4]. Dies ist vor allem auf die rasche und weitgehende metabolische Umwandlung der Cannabinoide in hydrophile Verbindungen zurückzuführen. So fällt die Plasmakonzentration des Δ^9 -THC nach inhalativer Aufnahme von 10 mg Δ^9 -THC schon innerhalb von 2 Std auf etwa 5 ng/ml ab [5].

Der komplexe Metabolismus des Δ^9 -THC ist heute weitgehend untersucht [6, 7]. Wichtige metabolische Schritte sind die Hydroxylierung in verschiedenen Positionen des Moleküls, die Oxidation zur Carbonsäure in 11-Stellung sowie die Konjugation der Metaboliten.

Zum Nachweis dieser stark hydrophilen Stoffwechselprodukte des Δ^9 -THC und anderer Cannabinoide bieten sich als Screening die in den letzten Jahren entwickelten radioimmunochemischen (RIA) und enzymimmunochemischen (EMIT) Verfahren an. Da sie in homogener Phase durchführbar sind, kann auf einen Extraktionsschritt zur Isolierung der Metaboliten verzichtet werden. Diese Verfahren sind aber bekanntlich nicht streng substanzspezifisch, so daß insbesondere auch falsch-positive Ergebnisse im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden können [8]. Ein solcher methodischer Mangel ist im forensisch-toxikologischen Bereich aufgrund der möglichen rechtlichen Konsequenzen für den Betroffenen nicht tolerierbar. Ein positiver immunologischer Cannabis-Befund bedarf deshalb in diesen Fällen der Bestätigung durch eine unabhängige Alternativmethode [9, 10].

So wird von Moffat u. Mitarb. die Kombination RIA/Hochdruckflüssigkeitschromatographie eingesetzt [11, 12]. Auch die apparativ nicht aufwendige Dünnschichtchromatographie erscheint zur Bestätigung der immunologischen Befunde geeignet [13], erreicht aber bisher nicht deren Empfindlichkeit [14]. Dabei wird in beiden Fällen der Metabolit 11-Nor- Δ^9 -THC-9-carbonsäure (III) nachgewiesen, welcher aus Δ^9 -THC (I) über die Zwischenstufe des 11-Hydroxy- Δ^9 -THC (II) entsteht (Abb. 1).

Nachfolgend wird ein Verfahren zum Nachweis von (III) mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie beschrieben. Nach hydrolytischer Konjugat-spaltung wird der Metabolit in Anlehnung an Whiting u. Manders [15] methyliert, um ihn der Gaschromatographie zugänglich zu machen. Die von diesen Autoren entwickelten zeitaufwendigen Extraktions- und Reextraktionsschritte zur Isolierung und Reinigung des methylierten Metaboliten werden durch Adsorption an einer reversed-phase-Säule umgangen. Durch den so erreichten, vertretbaren Zeitaufwand kann das Verfahren zur Routineanalytik von Polizei-

urinen herangezogen werden. Die Detektion erfolgt mittels Massenfragmentographie.

Geräte

Emit Lab System II, Fa. Syva-Merck.

GC: Varian Aerograph 1400, gepackte Glassäule, 6' lang, ID 1,6 mm.

Säulenmaterial: 3% OV-101 auf Chromosorb, W AW DMCS, 80/100 mesh.

MS: Varian MAT 44.

Methodik

Screening mittels Enzymimmunoassay

Die Arbeitsweise entspricht der von der Fa. Syva-Merck entwickelten Vorschrift zum EMIT-dau-System.

Nachweis von (III) mittels GC/MS

Reagenzien zur Derivatisierung. Fünfundzwanzigprozentige Tetramethylammoniumhydroxidlg. (TMAH) : Dimethylsulfoxid (DMSO) 1 : 20 (10 g TMAH 5 H₂O + 10 g H₂O), Phosphat-Puffer pH = 2,5 (21 ml konz. H₃PO₄ + 250 ml H₂O + ca. 50 KOH-Plätzchen auf 300 ml mit H₂O auffüllen), 0,1N HCl, 10N KOH, Methanol, iso-Octan, Methyljodid.

Ausführung. Zehn Milliliter Urin + 2 ml 10N KOH + 8 ml Methanol werden im 50 ml Schliffertenmeyerkolben 15 min auf 50°C erwärmt. Nach dem Abkühlen werden 2 ml Phosphat-Puffer zugesetzt, mit konz. HCl wird die Lösung auf pH = 2-2.5 eingestellt (ca. 1,5 ml konz. HCl) und mit destilliertem Wasser auf 50 ml verdünnt. Die Probe wird nun durch eine mit Methanol und Wasser konditionierte Octadecyl-Einmaltrennsäule gesaugt (C₁₈, 500 mg, 6 ml; „Baker-10“-Extraktionssystem oder „Bond Elut“ von „Jct“). Nach dem Trocknen der Säule am Wasserstrahlvakuum wird portionsweise mit 1,5 ml Aceton eluiert und das Eluat am Rotationsverdampfer bei 50°C zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird mit Dichlormethan gelöst und die Lösung in einer „Conic-Ampulle“ (Mikro-Reaktionsgefäß mit konisch-zylindrischem Innenraum und Schraubverschlußkappe) zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 3 Tropfen TMAH/DMSO 1 : 20 gelöst. Nach 2 min werden 5 µl Methyljodid zugegeben, nach weiteren 5 min 0,2 ml 0,1 N HCl und 1 ml iso-Octan. Die beiden Phasen werden 1 min gut durchgeschüttelt, anschließend werden von der oberen Phase (iso-Octan) mit einer Pipette 80% vorsichtig abgehoben und in eine zweite „Conic-Ampulle“ überführt. Die Lösung (iso-Octan-Methyljodid) ist vorsichtig vollständig einzudampfen (Heizplatte + Fön). Der Rückstand wird in einem Tropfen iso-Octan aufgenommen.

GC/MS: GC isotherm 250°C; 75 eV, 220°C; injiziertes Volumen = 1 µl. Multiionenselektion mit m/e = 313 (100%), 357 (57%), 372 (25%); die Retentionszeit beträgt etwa 4 min.

Danksagung. Den Herren G. Roeder und R. Winkler danken wir für ihre wertvolle experimentelle Mitarbeit.

Literatur

1. Christiansen J, Rafaelson OJ (1969) *Psychopharmacologia* 15: 60
2. Repetto MJ, Menendez M (1972) Identification de produits cannebiques au niveau de doigts et dans le sang des fumeurs. *J Europ Tox* 1972: 502-504
3. Just WW, Werner G, Wicchmann M (1972) Nachweis und quantitative Bestimmung von TIIC bei Haschischrauchern. *Diagnostik* 5: 426
4. Machata G, Krypsin-Exner K (1970) Nachweis von Haschisch im Harn nach experimenteller Einnahme. *Wien Klin Wochenschr* 82: 849-852
5. Agurell S, Gustafsson B, Holmstedt B, Leander K, Lindgren J-E, Nilson I, Landberg F, Asberg M (1973) Quantitation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in plasma from cannabis smokers. *J Pharm Pharmacol* 25: 554
6. Basalt RC (1978) Disposition of toxic drugs and chemicals in man. *Biomedical Publications*, Canton, Conn
7. Arnold W (1979) Cannabis. In: Graf E, Preuß FR (Hrsg) *Gadamer's Lehrbuch der Chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte*, Bd I/2. Vandenhoeck & Rupprecht, Göttingen, S 205-254
8. Law B, Pocock K, Moffat AC (1980) An evaluation of a homogenous enzyme immunoassay (Emit) for cannabinoid detection in biological fluids. Home office central research establishment (HOCRF), Report No. 365. Aldermaston
9. O'Connor JE, Rejent TA (1981) Emit cannabinoid assay: Confirmation by RIA and GC/MS. *J Anal Tox* 5: 168-173
10. Rießelmann B (1981) Nachweis von Cannabis-Inhaltsstoffen im Urin. *Dtsch Apotheker Ztg* 121: 2078-2081
11. Williams PL, Moffat AC, King LJ (1979) Combined high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay method for the analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolites in human urine. *J Chromatogr* 186: 595-603
12. Law B, Pocock K, Moffat AC (1981) The routine detection of cannabinoids in blood by radioimmunoassay and combined high-performance liquid chromatography/radioimmunoassay. *HOCRE Report* Nr. 388. Aldermaston
13. Kanter SL, Hollister LE, Zamora JU (1982) Marijuana metabolites in man. XI. Detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid by TLC. *J Chromatogr* 235: 507-512
14. Meyer L v, Kauert G, Drasch G (1982) Zum enzymatisch-immunochemischen Nachweis des Haschischkonsums. Vortrag bei der 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Würzburg
15. Whiting JD, Manders WW (1982) Confirmation of a tetrahydrocannabinol metabolite in urine by GC/MS. *J Anal Tox* 6: 49-52

Eingegangen am 20. Oktober 1982