

*Journal of Chromatography*, 278 (1983) 63–70

*Biomedical Applications*

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1833

## NACHWEIS EINER EINNAHME VON HASCHISCH IN BIOLOGISCHEM MATERIAL\*

KLAUS HARZER\* und M. KÄCHELE

*Chemisches Untersuchungsamt der Landeshauptstadt Stuttgart, Staffenbergstrasse 81, 7000 Stuttgart 1 (B.R.D.)*

(Eingegangen am 18. November 1982; geänderte Fassung eingegangen am 20. Juni 1983)

---

### SUMMARY

#### *Detection of hashish intake in biological material*

In order to detect hashish intake, urine, blood and serum were analysed for the main components of hashish, i.e., tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol, cannabinol and the decomposition product of THC, THC-carboxylic acid. After extraction and silylation, the samples were analysed by gas chromatography—mass spectrometry with multiple ion detection. The Emit-st-system<sup>®</sup> is used as a pretest for urine.

---

### EINLEITUNG

Wegen ihrer psychotropen Wirkung fallen Zubereitungen von Haschisch (z.B. Marihuana, gepresster Haschisch oder Haschöl) unter das Betäubungsmittelgesetz (BtMG). Die Hauptinhaltsstoffe sind Cannabinol (CBN), Cannabidiol (CBD) und Tetrahydrocannabinol (THC), wobei dem letzteren die eigentliche Haschischwirkung zugeschrieben wird [1]. Im forensischen Bereich ist es nötig, die Einnahme von Haschisch im Blut oder Urin nachzuweisen, z.B. wegen eines Vergehens gegen das BtMG oder z.B. wegen eines Verkehrsdeliktes. Obwohl nach Einnahme von Haschisch eine Vielzahl von Abbauprodukten im Urin auftreten [2,3], beschränkt sich der Nachweis im Routinebetrieb auf die drei Hauptinhaltsstoffe CBN, CBD und THC, sowie auf

---

\*Auszugsweise vorgetragen auf der 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Würzburg, 21–25 September 1982.

das Hauptabbauprodukt von THC, 11-nor- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol-9-carbonsäure (THC-COOH). Es gibt hierfür radioimmunologische Verfahren (RIA) [4, 5] und enzymimmunologische Verfahren (Emit<sup>®</sup>) [6, 7], wobei die letzteren speziell auf THC-COOH eingestellt sind. Da diese immunologischen Methoden nur als Vortest verwendet werden können, weil damit keine eindeutige Aussagen möglich sind [8], müssen die Befunde mit einer zweiten Methode abgesichert werden. In der Literatur sind hierfür Verfahren für THC und THC-COOH beschrieben und zwar mit Gaschromatographie (GC) [9] und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) [10, 11]. Um eine grössere Sicherheit zu bekommen, werden zur Identifizierung Trennverfahren gekoppelt mit einem Massenspektrometer eingesetzt. Off-line wurde eingesetzt Flüssigkeitschromatographie—Massenspektrometrie (LC—MS) [12, 13] und am häufigsten on-line GC—MS [14—16]. Auch HPLC kombiniert mit Radioimmunoassay wurde eingesetzt [17].

Unser Problem war, den Haschischnachweis so zu führen, dass er schnell durchgeführt und in die Laborroutine eingebaut werden konnte. Ausserdem sollten alle drei Hauptinhaltsstoffe sowie die THC-COOH gleichzeitig und sicher nachgewiesen werden. Wir haben uns entschieden, als Vortest das Emit-st-System<sup>®</sup> einzusetzen. Zur Absicherung und zur quantitativen THC-Bestimmung verwenden wir eine GC—MS-Kopplung und Multiple-Ion-Detektion (MID). Mit dem beschriebenen Verfahren können schnell eindeutig abgesicherte Befunde erhalten werden, ohne dass eine spezielle Aufarbeitung notwendig ist.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### *Geräte und Gerätebedingungen*

(a) Emit-st-Photometer und Emit-st Reagenzien Cannabinoide (Syva-Merck, Darmstadt, B.R.D.).

(b) GC-MS-System 5985 (Hewlett-Packard). Quarzkapillarsäule 25 m OV-1 (Hewlett-Packard); 0.3 mm I.D. Ofen: Temperaturprogramm 150°C 1 min, dann 20°C pro min bis 280°C. Einspritzblock: 250°C. Splitlose Injection. Trägergas: Helium, Vordruck 0.7 bar, Ionenquellentemperatur 200°C; GC—MS-Interface-Temperatur: 280°C; SEV-Spannung: altersabhängig 1600—3000 V.

Zeitprogramm für MID: CBD 4.4—4.8 min, Massen: 390.2, 351.2, 337.2 und 301.2; THC 4.8—5.0 min, Massen: 386.2, 371.3, 315.2 und 303.2; CBN 5.0—5.3 min, Massen: 382.3 und 367.3; THC-COOH 6.3—6.6 min, Massen: 488.4, 473.4, 398.3 und 371.3. Material: Blut- bzw. Serumproben und Urinproben von Personen, bei denen der Verdacht bestand, dass Haschisch eingenommen wurde.

### *Aufarbeitung*

*Emit-st.* Für die immunologische Bestimmung wird der Urin nach pH-Kontrolle (pH 5—7) direkt eingesetzt.

*GC—MS Urin.* Für die qualitative Analyse von THC, CBN, CBD und THC-COOH im Urin werden je nach vorhandener Menge 5—20 ml Urin soweit nötig mit dest. Wasser auf 20 ml aufgefüllt und dann mit 1.5 ml konz.  $\text{NH}_3$  alkalisiert. Diese Lösung wird auf eine Extraktionssäule Extrelut<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, B.R.D.) gegeben. Zur Glucuronidspaltung werden 5—18 ml Urin

soweit nötig mit dest. Wasser auf 18 ml aufgefüllt und mit 2 ml konz. HCl 20 min am Rückfluss gekocht. Anschliessend wird mit 3 ml konz.  $\text{NH}_3$  alkalisiert und diese Lösung auf eine Extraktionssäule Extrelut gegeben.

Beide Säulen werden mit 40 ml Dichlormethan–Isopropanol (85:15) eluiert und die organischen Phasen eingedampft [18]. Die Rückstände werden dann getrennt analysiert.

*GC–MS Blut bzw. Serum.* Zu 1–3 ml Blut oder Serum werden 2 ml ges. Ammoniumsulfatlösung gegeben. Diese Mischung wird in einem Kunststoffzentrifugenröhrchen mit 2 ml Hexan geschüttelt. Nach Zentrifugation wird die Hexanphase abpipettiert, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und eingedampft.

### *Silylierung*

Zur GC–MS-Untersuchung werden die eingedampften Rückstände in Eppendorf-Reaktionsgefässen silyliert mit 50  $\mu\text{l}$  Silylierungsmittel [15% N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid (MSTFA, Macherey-Nagel) in Pyridin, dem noch einige Tropfen Chlorsilan zugesetzt sind]. Die Lösung wird im geschlossenen Gefäss 10 min bei 60°C gehalten. Aus dieser Lösung werden 3  $\mu\text{l}$  eingespritzt.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### *Emit-Verfahren*

Bei Verdacht einer Einnahme von Haschisch werden die Urinproben zunächst mit dem Emit-st-System geprüft. Negative Proben werden ausgeschieden, positive Proben werden mit GC–MS abgesichert. Mit dem Emit-st-System können nur Einzelproben untersucht werden und eine Automatisierung ist nicht möglich. Der Zeitaufwand pro Probe beträgt 3–5 min. Der Vorteil des Systems liegt darin, dass die Reagenzien gefriergetrocknet und deshalb bis zu einem Jahr haltbar sind.

Als Erfassungsgrenze für den Emit-st-Test sind 200 ng THC-COOH pro ml Urin angegeben. Welche Menge THC eingenommen werden muss, um diesen Spiegel zu erreichen, ist uns nicht bekannt. Nach unseren Erfahrungen reicht die Erfassungsgrenze aus bei missbräuchlicher Einnahme und bei solchen Fällen, wo nach Einnahme von Haschisch Ausfallserscheinungen festgestellt werden, z.B. Verkehrsdelikten. Zur Erfassung geringerer Konzentrationen müsste der Extraktionsrückstand untersucht werden.

Das Verfahren ist eingestellt auf THIC-COOH, es werden jedoch über Kreuzreaktionen auch andere Metaboliten und die Hauptinhaltsstoffe von Haschisch erfasst.

Nach Angaben von Syva-Merck beträgt die Empfindlichkeit für CBN und für die hydroxilierten Metaboliten von THC etwa die Hälfte, für THC und CBD etwa ein Viertel gegenüber THC-COOH.

### *GC–MS*

In der angegebenen Literatur wird der Nachweis von CBN, CBD und THC direkt oder nach Trimethylsilylierung, der Nachweis von THC-COOH nach Silylierung, nach Methylierung und anschliessender Trimethylsilylierung oder nach Umsetzung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) durchgeführt. Wir haben uns für die Trimethylsilylierung entschieden, weil damit alle vier

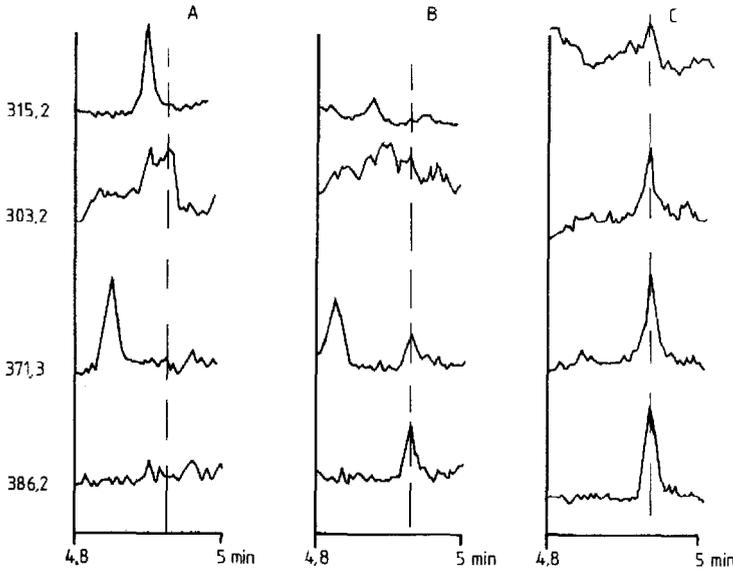


Fig. 1. Massenspektren von silyliertem THC. A, Negative Serumprobe; B, 8 ng/ml im Serum; C, Reinsubstanz THC 10 ng/ml.

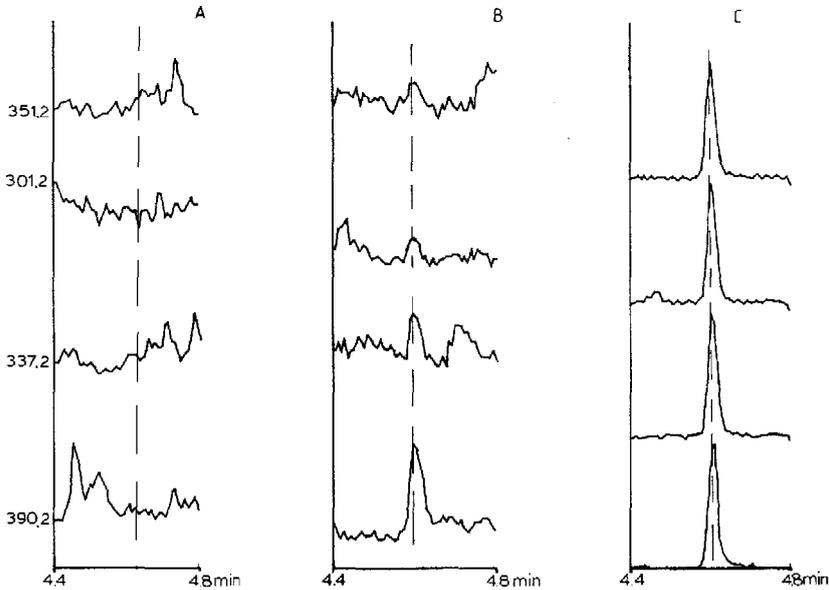


Fig. 2. Massenspektren von silyliertem CBD in Urin. A, Negative Probe; B, schwacher Befund; C, starker Befund. Die Bestimmungen wurden nur qualitativ durchgeführt.

Substanzen gleichzeitig und empfindlich erfasst werden. Die Umsetzung mit HFBA haben wir ebenfalls durchgeführt. Dieses Verfahren liefert zwar höhere Massen, das überschüssige HFBA verringert jedoch innerhalb kurzer Zeit die Trenneigenschaften der Säule. Zur Schonung der Säule musste deshalb ein zusätzlicher Aufarbeitungsschritt durchgeführt werden, was das Verfahren

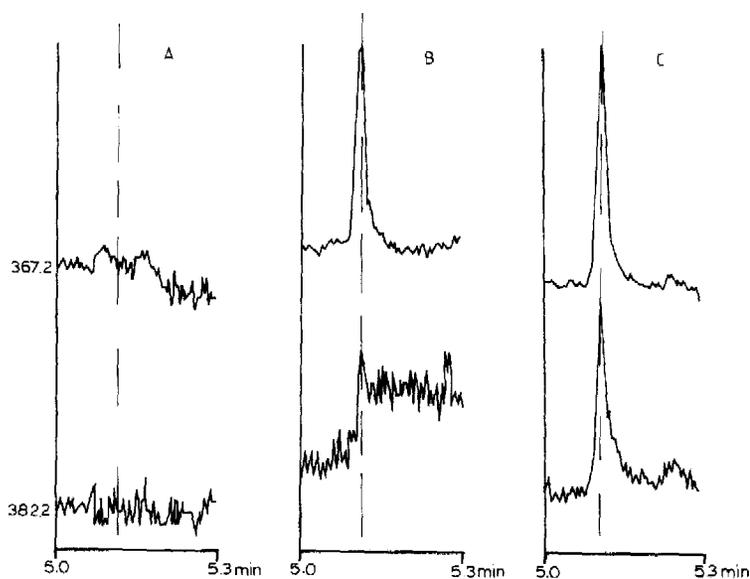


Fig. 3. Massenspektren von silyliertem CBN im Urin. A, Negative Probe; B, schwacher Befund; C, starker Befund. Die Bestimmungen wurden nur qualitativ durchgeführt.

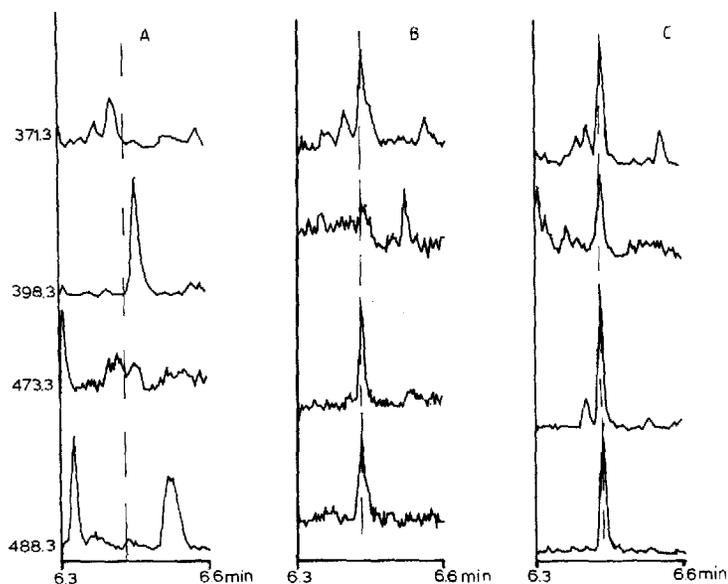


Fig. 4. Massenspektren von silyliertem THC-COOH im Urin. A, Negative Probe; B, schwacher Befund; C, starker Befund. Die Bestimmungen wurden nur qualitativ durchgeführt.

wieder aufwendiger machte. Es war deshalb für unsere Routineuntersuchungen nicht geeignet.

Die spezifischen Massen für die Trimethylsilylverbindung und die relativen Intensitäten sind in Lit. 19 angegeben; für CBN, das in dieser Liste fehlt, lauten sie 367 (100) und 382 (12). Fig. 1–4 zeigen die Massenspektren der Trimethylsilylverbindungen.

Um abgesicherte Befunde zu erhalten, die auch für forensische Zwecke Verwendung finden können, ist es notwendig, auf mehrere Massen einer Verbindung zu prüfen. Neben der Retentionszeit und der spezifischen Masse kann dann für die Identifizierung zusätzlich noch das Verhältnis der Massen zueinander verwendet werden.

In Tabelle I sind die Kovats-Indices der silylierten Substanzen angegeben, da die zur Bestimmung der Retentionszeit nötigen Reinsubstanzen nicht immer zur Verfügung stehen.

TABELLE I

## KOVATS-INDICES DER SILYLIERTEN VERBINDUNGEN IM TEMPERATUR-PROGRAMM

Verbindung	Kovats-Index
CBD	2272
THC	2361
CBN	2445
THC-COOH	2762

Bei der Untersuchung der Urinproben auf THC-COOH konnten wir bisher ca. 90% der positiven Emit-st-Befunde bestätigen. Wir führen die Untersuchung durch sowohl von direkt extrahiertem Urin als auch von Urin nach Hydrolyse. Nach unseren Erfahrungen findet man manchmal die Hauptmenge von THC-COOH im direkten Extrakt, manchmal im Extrakt nach Hydrolyse, vermutlich abhängig von zeitlichen Abstand zwischen Einnahme und Probeentnahme. Da bei der direkten Extraktion wesentlich weniger Störpeaks auftreten als nach Hydrolyse, machen wir beide Untersuchungen parallel. Ausserdem kann in diesen Extrakten dann noch auf weitere Suchtmittel geprüft werden, z.B. auf Cocain oder Tilidin im direkten Extrakt und auf Morphin im hydrolysierten Extrakt [20]. Aus diesen Gründen extrahieren wir auch nicht im Sauren. Die Ausbeute von THC-COOH bei der alkalischen Extraktion ist ohne weiteres ausreichend und so auch in der Literatur beschrieben [2]. Stellvertretend für die verschiedenen Substanzen wurde die Wiederfindungsrate für THC-COOH im Urin bestimmt, da es sich dabei auch um das Hauptausscheidungsprodukt handelt. Sowohl im direkten Extrakt als auch nach Hydrolyse betrug die Wiederfindung 70–75%, so dass durch die Hydrolyse keine Verluste auftraten. Die Erfassungsgrenze betrug für alle Substanzen 5–10 ng/ml.

Bei den für Urin positiven Emit-Befunden, die wir mit GC-MS absichern konnten, fanden wir zusätzlich in ca. 50% aller Fälle CBN, zu einem geringeren Prozentsatz CBD und vereinzelt THC.

Im Blut oder Serum untersuchen wir quantitativ auf THC. Die Bestimmung erfolgt durch externe Standardisierung über Zusatzversuche. Die Erfassungsgrenze beträgt ca. 5 ng/ml, die Wiederfindungsrate ca. 40%. Es ist somit möglich, die Einnahme von Haschisch im Blut trotz der schnell abfallenden Spiegel mehrere Stunden lang nachzuweisen [4,5,12]. Die Ergebnisse einiger Fälle sind in Tabelle II aufgeführt. Bei Fall A und B handelt es sich um einen

TABELLE II  
QUANTITATIVE THC-BESTIMMUNGEN IN BLUT/SERUM

	A Blut	B Blut	C Serum	D Serum
THC (ng/ml)	21	4	5	1. 103 2. 4

Mordfall, wobei A der Täter und B das Opfer waren. In der Wohnung waren Haschutensilien gefunden worden. Bei Fall C handelt es sich um einen Verkehrsdelikt, wo aufgrund des positiven Urinbefundes die Spiegelbestimmung durchgeführt worden war. Weitere Einzelheiten zu diesen Fällen waren nicht bekannt. Besonders interessant ist Fall D. Hier hat ein junger Mann beim Eintreffen der Polizei angeblich ca. 15 g gepressten Haschisch verschluckt. Er musste wegen entsprechender Symptome im Krankenhaus behandelt werden. Die erste Blutprobe wurde ca. 4 h nach Einnahme, die zweite ca. 16 h nach Einnahme entnommen. Der erste Wert von 103 ng/ml ist stark erhöht gegenüber dem Maximalspiegel von ca. 40 ng/ml, der nach dem Rauchen einer Marihuana-Zigarette 5–10 min nach Rauchbeginn erreicht wird [4]. Dass grössere Mengen von Haschisch eingenommen worden sein müssen, zeigt auch Fig. 5, wo im Serum neben THC noch CBD, CBN und THC-COOH deutlich nachweisbar waren. Die Abbildung zeigt die Summe der Einzelionen für jede Verbindung, die mit einem systemeigenen Rechnerprogramm aufsummiert wurden. Ob es sich bei den zusätzlichen Peaks um weitere Haschischabbau-

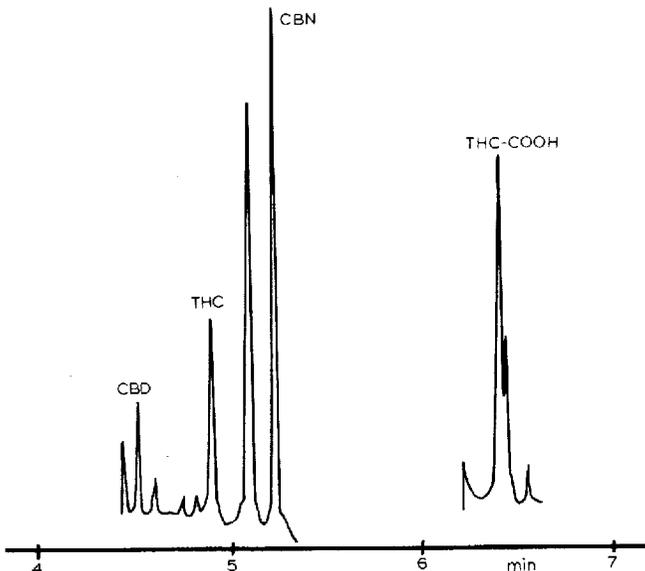


Fig. 5. Nachweis von silyliertem THC, CBN, CBD und THC-COOH im Serum nach Haschischvergiftung (Fall D). Die Darstellung erfolgt als Summe der Einzelionen.

produkte oder um sonstige Störsubstanzen gehandelt hat, konnte nicht geklärt werden. Eine Zuordnung über die spezifischen Massen anderer Haschischabbau-  
produkte, die in Lit. 19 angegeben sind, war nicht möglich.

## ZUSAMMENFASSUNG

Zum Nachweis einer Einnahme von Haschisch wird in Urin und Blut bzw. Serum auf die Hauptinhaltsstoffe Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol und Cannabinol sowie auf das Abbauprodukt von THC, die THC-Carbonsäure, geprüft. Als Vortest wird für den Urin das Emit-st-System verwendet, die Absicherung im Urin und die quantitative THC-Bestimmung im Blut/Serum erfolgt nach Extraktion und Silylierung mit GC-MS mit Einzelionen-  
detektion.

## LITERATUR

- 1 W. Forth, D. Henschler und W. Rummel (Herausgeber), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Bibliographisches Institut Mannheim, Wien, Zürich, 1975.
- 2 M.M. Halldin, S. Carlsson, S.L. Kanter, M. Widmann und S. Augurell, *Arzneim.-Forsch.*, 32 (1982) 764-768.
- 3 M.N. Halldin, L.K.R. Anderson, M. Widmann und L.E. Hollister, *Arzneim.-Forsch.*, 32 (1982) 1135-1138.
- 4 S.M. Owens, A.J. McBay, H.M. Reisner und M. Perez-Reyes, *Clin. Chem.*, 27 (1981) 619-624.
- 5 S.J. Gross und J.R. Soares, *J. Anal. Toxicol.*, 2 (1978) 98-100.
- 6 H.W. Peel und B.J. Perrigo, *J. Anal. Toxicol.*, 5 (1981) 165-167.
- 7 B. Riesselmann, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 121 (1981) 2078-2082.
- 8 DFG, Senatskommission für klinisch-toxikologische Analytik, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 20 (1982) 695-696.
- 9 N.K. McCallum und S.M. Shaw, *J. Anal. Toxicol.*, 5 (1981) 148-149.
- 10 H.K. Borys und R. Karler, *J. Chromatogr.*, 205 (1981) 303-323.
- 11 J.A. Winson, D.D. Patel und A.H. Patel, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 163-165.
- 12 J.L. Valentine, P.J. Bryant, P.L. Gutshal, O.H.M. Gan, P.D. Lovegreen, E.D. Thompson und H.C. Niu, *J. Pharm. Sci.*, 66 (1977) 1263-1266.
- 13 T. Daldrup, U. Matthiesen und T. Krätzschar, in W. Arnold und K. Püschel (Herausgeber), Symposiumsband Entwicklung und Fortschritte der Forensischen Chemie, Hamburg, 19.-20. März 1982, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, 1982, S. 246-253.
- 14 J.D. Whiting und W.M. Manders, *J. Anal. Toxicol.*, 6 (1982) 49-52.
- 15 E.W. Bachmann, A.E. Hofmann und P.G. Waser, *J. Chromatogr.*, 178 (1979) 320-323.
- 16 D. Rosenthal und D. Brine, *J. Forensic Sci.*, 24 (1979) 282-290.
- 17 P.L. Williams, A.C. Moffat und L.J. King, *J. Chromatogr.*, 186 (1979) 595-603.
- 18 J. Breiter, R. Helger und H. Lang, *J. Forensic Sci.*, 7 (1976) 131-135.
- 19 W. Arnold, in E. Graf und F.R. Preuss (Herausgeber), *Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxikologie, Band I/2*, Verlag Vandenhoeck und Ruprecht, Göttingen, 1979, S. 205-254.
- 20 K. Harzer und M. Kächele, *Beitr. Gerichtl. Med.*, 37 (1979) 357-361.