

Trapping ‘Spice’: a comprehensive, automated LC-ion trap-MS screening approach for the detection of currently 38 synthetic cannabinoids in serum

Laura M. Huppertz, Stefan Kneisel, Volker Auwärter, Jürgen Kempf

Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Albertstraße 9, 79104 Freiburg

Abstract

Aims: Considering the huge variety of synthetic cannabinoids and herbal mixtures on the market and the resultant increase of incidents related to their consumption, especially for clinical and forensic toxicology, there is a need for comprehensive up-to-date screening methods. This work aimed at developing and implementing an automated screening procedure for the detection of synthetic cannabinoids in serum using a liquid chromatography-ion trap-MS system and a spectra library-based approach.

Methods: D7-JWH-015 was added as internal standard to 1 mL of serum prior to liquid-liquid extraction. 2 µL were injected into an HPLC-system connected to an amaZon speed ion trap MS. Chromatographic separation was performed using a 12-minute gradient, formic acid/acetonitrile and a Kinetex 2.6u C18 100 x 2.10 mm column. The MS was operated in the autoMSⁿ mode generating data dependent MS² and MS³ spectra according to a predefined scheduled precursor list (SPL). The identification is based on our in-house generated library, currently containing spectra of 38 synthetic cannabinoids. A fully automated spectra library search and reporting tool manages data evaluation.

Results and Discussion: All compounds - including those in the library which are listed in annex II of the German narcotics law (BtMG) - could be automatically identified with an LOD of 0.5 ng/mL or less. The used search algorithm matched retention times, MS and MS²/MS³ spectra, respectively, in order to calculate a purity score. The use of parent compounds as analytical targets offers the possibility of instantly adding new emerging compounds to the library after extraction from herbal mixtures and immediately applying the updated method to serum samples.

Conclusions: The presented method offers a fast, easy-to-use screening solution for the detection of synthetic cannabinoids in serum. The combination of MS²/MS³ spectra and retention time meets common criteria for identification according to forensic guidelines. This approach can also be applied to other matrices and herbal mixtures.

1. Einleitung

Seit dem Erstdnachweis synthetischer Cannabinoide als Wirkstoffe in „Spice“ im Jahr 2008 wird weltweit eine wachsende Anzahl an Kräutermischungen vermarktet. Die zumeist als Räuchermischungen über das Internet vertriebenen Produkte enthalten die unterschiedlichsten synthetischen Cannabinoide in zum Teil wechselnden Zusammensetzungen und Konzentrationen. „Spice“ und seine Nachfolgeprodukte werden mit dem Hintergrund, die gültigen betäubungsmittelrechtlichen Bestimmungen sowie den Konsumnachweis durch die standardmäßigen Drogentests im Urin zu umgehen, als „legale“ Alternative zu Cannabis vertrieben.

Meldungen über Vergiftungen mit synthetischen Cannabinoiden, die nicht selten eine notfallmedizinische Behandlung des Konsumenten erfordern, nehmen zu [1,2]. Erst kürzlich sind erste Fälle tödlicher Vergiftungen mit synthetischen Cannabinoiden veröffentlicht worden [3,

4]. Es hat sich gezeigt, dass bereits kurz nach Änderung gesetzlicher Bestimmungen, teilweise sogar als Reaktion auf eine geplante Aufnahme einzelner synthetischer Cannabinoide in Anlage II des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG), diese vom Markt verschwanden und durch neue, chemisch leicht veränderte Substanzen ersetzt wurden. Aktuell sind 19 synthetische Cannabinoide dem BtMG unterstellt. Auf Grund dieser Problematik sind in der klinischen und forensischen Analytik umfassende Analysenmethoden zum Nachweis synthetischer Cannabinoide erforderlich. Insbesondere bei forensischen Fragestellungen ist eine eindeutige Identifizierung der aufgenommenen Wirkstoffe unumgänglich.

Chromatographisch-massenspektrometrische Methoden sind die Analysenverfahren der Wahl, wenn es um den Nachweis synthetischer Cannabinoide in biologischen Proben geht. In dieser Arbeit wird die erste auf einer Spektrenbibliothek basierende Screening-Methode zum Nachweis synthetischer Cannabinoide in Serum unter Verwendung einer Ionenfalle in Kombination mit einer ionBoosterTM (IB) Ionenquelle vorgestellt.

2. Material und Methoden

Zur Identifizierung der Substanzen wurde eine Spektrenbibliothek mit MS-, MS²- und MS³-Spektren von derzeit 38 synthetischen Cannabinoiden und 9 deuterierten Analoga erstellt. Hierzu wurden - wenn möglich - zertifizierte Referenzlösungen sowie Festsubstanzen („Research Chemicals“) und Extrakte aus Kräutermischungen verwendet. Die Identität und Reinheit aller nicht kommerziell erhältlichen und zertifizierten Materialien wurde mittels NMR-Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie und Gaschromatographie-Massenspektrometrie überprüft. Die Chromatographie wurde so modifiziert, dass eine ausreichende Trennung isobarer Analyten in möglichst kurzer Laufzeit möglich war. Die Retentionszeiten und Meta-Daten der einzelnen Analyten wurden nachträglich in die Spektrenbibliothek aufgenommen und daraus eine sogenannte Scheduled-Precursor-Liste (SPL) erstellt, um die Aufnahme von MS²/MS³-Spektren selektiv auszulösen.

Um herauszufinden ob und wenn ja wie sich die Signalintensitäten der synthetischen Cannabinoide verändern, wenn zur Ionisierung eine IB-Quelle verwendet wird, wurden Mischungen der verschiedenen synthetischen Cannabinoide in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 ng/ml in Laufmittel nacheinander mit der konventionellen ESI- und der IB-Quelle analysiert.

Zur Bestimmung der Grenzwerte für die automatische Identifikation wurden gepoolte humane Seren mit synthetischen Cannabinoiden in verschiedenen Konzentrationen dotiert, extrahiert und analysiert. Die Konzentrationen von 0,1, 0,25 bzw. 0,5 ng/ml wurden in Anlehnung an Bestimmungsgrenzen (LOQs) einer etablierten sMRM-Methode gewählt [5]. Verschiedene Leerseren und nur internen Standard enthaltende Seren wurden analog analysiert.

Die Probenaufarbeitung erfolgte mit basischer Flüssig-Flüssig-Extraktion. Hierzu wurde 1 ml Serum mit 1 ng D7-JWH-015 als internem Standard versetzt, der pH-Wert mit 0,5 ml Carbonat-Puffer (pH 10) eingestellt und mit 1,5 ml Hexan/Ethylacetat (100:1, v/v) extrahiert. Nach 5 min Durchmischen im Überkopfschüttler und 10 min Zentrifugation bei 3400 x g wurde der organische Überstand in ein LC-Vial überführt und bei 40°C unter Stickstoff zur Trockene eingedunstet. Die Rekonstitution des Rückstandes erfolgte in 25 µl mobiler Phase (A:B, 50:50, V/V).

Das verwendete LC-MS-System bestand aus einer Dionex UltiMate 3000 HPLC-Anlage gekoppelt an eine amaZon speed Ionenfalle (Bruker Daltonik). Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer KinetexTM C18 Säule (2,6 µm 100 x 2,10 mm, Phenomenex) mittels 12-minütiger Gradientenelution. Als mobile Phase wurden 0,1 %ige Ameisensäure (A) und Acetonitril (B), jeweils mit 2 mmol Ammoniumformiat, verwendet.

Massenspektren wurden mit positiver Ionisation (ESI und IB) im ultraScan Mode (32.000 Da/s) im Massenbereich von 70 bis 600 Da aufgenommen. Für den ionBooster wurden folgende Parameter gewählt: Vaporizer Temperatur: 300 °C, Dry Gas Temperatur: 200 °C und Sheath Gas Fluss: 150 L/h. Die Auswahl der Precursor-Ionen für die datenabhängige Aufnahme von MS²- und MS³-Spektren erfolgte anhand der Bibliothekseinträge über die erstellte SPL. Die Datenauswertung und Report-Erstellung erfolgte automatisiert in Analogie zum Toxtyper-Workflow [6].

3. Ergebnisse und Diskussion

Der Vergleich der klassischen ESI-Quelle mit der IB-Quelle ergab signifikant höhere Intensitäten für die letztere. Bei allen in diesem Projekt untersuchten Verbindungen waren die erhaltenen Signalintensitäten im direkten Vergleich mindestens verdoppelt. Die Verwendung einer IB-Quelle ermöglicht auch die Identifizierung von Substanzen, welche bei Ionisation mit der konventionellen ESI-Quelle nicht gefunden wurden. Details hierzu können Tabelle 1 entnommen werden. Dieser Gewinn an Sensitivität ermöglicht den Nachweis und die zuverlässige Identifikation synthetischer Cannabinoide in Konzentrationen, welche bei publizierten MRM-Methoden unter Verwendung von Triple-Quadrupole-MS als Bestimmungsgrenzen angegeben wurden.

Tab. 1. Vergleich der Nachweisgrenzen synthetischer Cannabinoide (dotiert in Laufmittel) mit ESI und IB-Quelle (*kursiv: Substanz ist bereits dem BtMG unterstellt*).

Substanz	LOD ng/ml		Substanz	LOD ng/ml	
	ESI	IB		ESI	IB
<i>AB-001</i>	1,0	0,1	<i>JWH-200</i>	0,1	0,1
AM-1220	0,1	0,1	<i>JWH-203</i>	1,0	0,25
AM-1220 Azepanderivat	1,0	0,1	<i>JWH-210</i>	1,0	0,1
AM-1248	0,25	0,1	<i>JWH-250</i>	1,0	0,1
AM-2201	0,25	0,1	<i>JWH-251</i>	0,25	0,1
AM-2232	0,1	0,1	JWH-307	> 1,0	0,1
AM-2233	0,1	0,1	JWH-370	> 1,0	0,1
<i>AM-694</i>	0,25	0,1	JWH-387	> 1,0	1,0
Cannabipiperi- diethanon	0,25	0,1	JWH-398	1,0	0,1
CRA-13	> 1,0	0,25	JWH-412	1,0	0,1
<i>JWH-007</i>	1,0	0,1	MAM-2201	0,25	0,25
<i>JWH-015</i>	0,1	0,1	Methanandamid	> 1,0	0,25
<i>JWH-018</i>	0,25	0,1	<i>RCS-4</i>	0,1	0,1
<i>JWH-019</i>	1,0	0,1	RCS-4 Butyl- derivat	0,25	0,1
<i>JWH-020</i>	1,0	0,1	RCS-4 ortho-Isomer	0,1	0,1
<i>JWH-073</i>	0,1	0,1	RCS-8	> 1,0	0,1
<i>JWH-081</i>	0,5	0,1	UR-144	> 1,0	0,25
<i>JWH-122</i>	0,5	0,25	WIN 48,098	0,1	0,1
JWH-182	1,0	0,1	WIN 55,212-2	0,25	0,1

Auf diesen Daten basierend erfolgte die Anwendung der Methode auf mit synthetischen Cannabinoiden dotierte humane Serumproben. Im Vergleich zu dotierten Lösungsmittel-Proben ergaben sich in matrixhaltigen Proben abweichende Nachweisgrenzen. Diese können Tabelle 2 entnommen werden.

Tab. 2. Nachweisgrenzen der 38 synthetischen Cannabinoide in Serum (*kursiv: Substanz ist bereits dem BtMG unterstellt*)

Substanz	0,1 ng/ml	0,25 ng/ml	0,5 ng/ml	Substanz	0,1 ng/ml	0,25 ng/ml	0,5 ng/ml
<i>AB-001</i>	Y	Y	Y	<i>JWH-200</i>	Y	Y	Y
AM-1220	Y	Y	Y	<i>JWH-203</i>	-	-	Y
AM-1220 Azepanderivat	-	-	-	<i>JWH-210</i>	Y	Y	Y
AM-1248	Y	Y	Y	<i>JWH-250</i>	-	Y	Y
AM-2201	Y	Y	Y	<i>JWH-251</i>	Y	Y	Y
AM-2232	-	-	Y	JWH-307	-	Y	Y
AM-2233	Y	Y	Y	JWH-370	-	Y	Y
<i>AM-694</i>	Y	Y	Y	JWH-387	-	-	Y
Cannabipiperi- diethanon	Y	Y	Y	JWH-398	Y	Y	Y
CRA-13	-	-	-	JWH-412	Y	Y	Y
<i>JWH-007</i>	Y	Y	Y	MAM-2201	-	-	Y
<i>JWH-015</i>	Y	Y	Y	Methanandamid	-	-	-
<i>JWH-018</i>	Y	Y	Y	<i>RCS-4</i>	Y	Y	Y
<i>JWH-019</i>	-	Y	Y	RCS-4 Butyl- derivat	-	Y	Y
JWH-020	Y	Y	Y	RCS-4 ortho- Isomer	Y	Y	Y
<i>JWH-073</i>	Y	Y	Y	RCS-8	-	Y	Y
<i>JWH-081</i>	-	Y	Y	UR-144	Y	Y	Y
<i>JWH-122</i>	Y	Y	Y	WIN 48,098	-	Y	Y
JWH-182	Y	Y	Y	WIN 55,212-2	-	Y	Y

Die Auswertung der Leerseren und nur internen Standard enthaltenden Seren ergab keine nennenswerten Störsignale zu den Retentionszeiten der hier untersuchten synthetischen Cannabinoide.

Die Bibliothekssuche sowie die Berichterstellung erfolgen vollständig automatisiert. Der verwendete Suchalgorithmus gleicht die Spektreninformationen der gemessenen MS-, MS²/MS³-Spektren und die erhaltene Retentionszeit mit den in Frage kommenden

Bibliothekseinträgen ab und errechnet einen ‚Purity-Score‘. Scorewerte oberhalb von 700 werden als mögliche Identifikation bewertet und im Analysenreport angegeben. Die angegebenen Nachweisgrenzen beziehen sich nur auf automatische Identifikationen. Generell ist eine manuelle Kontrolle der erstellten Berichte, besonders in forensischen Laboratorien, nie ganz vermeidbar.

Von den zurzeit 38 in der Bibliothek enthaltenen synthetischen Cannabinoiden lassen sich 35 in einer Konzentration von 0,5 ng/ml in Serum nachweisen, zehn davon auch in einer Konzentration von 0,1 ng/ml (Tabelle 2). AM-1220-Azepanderivat, Methanandamid und CRA-13 konnten in den dotierten und untersuchten Konzentrationen im Serum nicht nachgewiesen werden. Diese Verbindungen zeigen generell ein schlechtes Ionisationsverhalten unter ESI-Bedingungen. Zusätzlich könnten supprimierende Effekte der Probenmatrix verantwortlich sein. Methanandamid wurde bisher nicht in Kräutermischungen gefunden. CRA-13 und AM-1220-Azepanderivat wurden zwar in Mischungen, nicht aber in Serumproben nachgewiesen.

Die vorgestellte Methode wurde bereits erfolgreich zur Analyse forensischer Proben eingesetzt. Quantitative sMRM-Ergebnisse von Proben, die synthetische Cannabinoide in Konzentrationen oberhalb der hier angegebenen Nachweisgrenzen enthalten, konnten mit der hier vorgestellten Methode bestätigt werden.

4. Schlussfolgerungen

Die hier gezeigte LC-MSⁿ-Methode ist eine schnelle, robuste und einfach anzuwendende Methode zum Nachweis und zur Identifizierung synthetischer Cannabinoide in Serum. Auf Grund des hohen Automatisierungsgrades der Datenauswertung eignet sich die Methode auch für klinische Labore sowie zur Untersuchung großer Probenzahlen.

Die Kombination von MS²/MS³-Spektren und Retentionszeiten erfüllt die Kriterien forensischer Richtlinien für die sichere und eindeutige Identifikation von Analyten. Da es zurzeit keine verlässlichen Immunoassay-Verfahren für synthetische Cannabinoide gibt, stellt die hier beschriebene Methode eine schnelle und preiswerte Screening-Alternative dar. Positive Befunde können bzw. müssen, jedenfalls im forensischen Zusammenhang, mit komplementären, quantitativen Methoden bestätigt werden [5].

Die Verwendung der Muttersubstanz als analytisches Target ermöglicht eine einfache Erweiterung der Methode um neue synthetische Cannabinoide. Es entfällt die zeitaufwendige Identifikation von Metaboliten. Durch das kontinuierliche Hinzufügen neu auftretender Substanzen kann die Methode immer auf dem aktuellen Stand gehalten werden. Zusätzlich lassen sich die gemessenen Daten auch retrospektiv auswerten, da das vorgestellte Verfahren Fullscan-Daten erzeugt und so zumindest MS¹-Informationen neuer, zum Zeitpunkt der Messung noch unbekannter Verbindungen enthalten sind.

Die hier vorgestellte Methode eignet sich zudem zur Untersuchung von Kräutermischungen und „Research Chemicals“ und kann – nach entsprechender Evaluierung der Nachweisgrenzen – grundsätzlich zur Analyse anderer biologischer Matrices wie Speichel und Haare eingesetzt werden.

5. Literatur

- [1] Hermanns-Clausen et al. Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings. *Addiction* 2013;108:534-544.

- [2] Hermanns-Clausen et al. Acute intoxication by synthetic cannabinoids – Four case reports. *Drug Test. Anal.* 2013, 10.1002/dta.1483.
- [3] Remane et al. Fatal poisoning involving the synthetic cannabinoids JWH-122 and JWH-210. Oral Presentation, 91. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 2012.
- [4] Saito et al. A fatal case of MAM-2201 poisoning. *Forensic Toxicol* 10.1007/s11419-013-0190-9
- [5] Kneisel et al. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *J Mass Spectrom* 2012;47:825-835.
- [6] Huppertz et al. An automated MSⁿ-based screening procedure for clinical and forensic toxicology. Posterpräsentation, XVIII. GTFCh-Symposium, 18.-20.04.2013, Mosbach (Baden).