

Zusammenfassung der Dissertation als Dank an die GTFCh für die Gewährung eines Stipendiums zur Präsentation eines wissenschaftlichen Vortrags oder Posters beim TIAFT-SOFT Kongress in San Francisco 2011

Synthetische Cannabinoide in der forensischen Analytik: Von der Substanzidentifizierung in Räuchermischungen bis zum Nachweis in forensisch relevanten Matrices

Stefan Kneisel

Institut für Rechtsmedizin, Abteilung Forensische Toxikologie, Universitätsklinikum Freiburg, Albertstraße 9, 79104 Freiburg

1. Einleitung

Im Dezember des Jahres 2008 wurden in der Räuchermischung „Spice“ mit dem C8-Homologen von CP-47,497 sowie JWH-018 erstmals synthetische Cannabinoide entdeckt [1-3], die als Agonisten am CB₁-Rezeptor wirken [4-6]. In Internetforen wurde zuvor mehrfach von cannabisähnlichen Effekten nach inhalativem Konsum dieser und vergleichbarer Mischungen berichtet. Ursprünglich von der Pharmaindustrie als potentielle Alternativen zu Analgetika und nichtsteroidalen Antirheumatika entwickelt [7-13], werden synthetische Cannabinoide heutzutage auf getrocknetes Pflanzenmaterial aufgebracht und dieses in Form von Räuchermischungen als Cannabisersatz verkauft [14, 15]. Der Missbrauch dieser Mischungen als Rauschmittel führt vermehrt zu klinischen Notfällen [16] und stellt insbesondere die Arbeitsgebiete der Forensik vor immense Herausforderungen [17, 18].

2. Ergebnisse und Diskussion

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung von neuen synthetischen Cannabinoiden in Räuchermischungen. Hierfür wurden in einem Zeitraum von Januar 2010 bis Dezember 2012 fast 400 solcher Produkte qualitativ mittels GC/MS untersucht. Es zeigte sich, dass allein in diesem Zeitabschnitt mehr als 25 neuartige synthetische Cannabinoide in Räuchermischungen nachgewiesen werden konnten [19-23]. Umfangreiche Verschiebungen hinsichtlich des Substanzspektrums ergaben sich innerhalb des Untersuchungszeitraumes vor allem nachdem der Gesetzgeber die Unterstellung einzelner synthetischer Cannabinoide unter das BtMG ankündigte oder letztlich umsetzte. Es wurde deutlich, dass die Produzenten solcher Substanzen durch Kombination der für eine cannabisähnliche Wirkung wichtigsten Pharmakophore in der Lage sind, unzählige neuartige synthetische Cannabinoide zu kreieren. Auf Grund dieser strukturellen Vielfalt ist es ihnen somit möglich, dem Gesetzgeber sowie sämtlichen Instanzen der Strafverfolgung stets einen Schritt voraus zu sein. Einzelne Fallbeispiele zeigten eindeutig, dass auf Grund der umfangreichen Substanzvielfalt zunehmend analytische Herausforderungen bei der Identifizierung neuartiger synthetischer Cannabinoide auftreten. Problematisch sind vor allem nebeneinander vorliegende isobare Verbindungen, die sich physikochemisch nur minimal unterscheiden und bei nicht ausreichender chromatographischer Trennung zu Mischspektren führen [23]. Folglich bedarf es zur sicheren Identifizierung neuartiger synthetischer Cannabinoide häufig der Kombination mehrerer aufwändiger analytischer Verfahren. Über die hierfür erforderliche instrumentell-analytische Ausstattung verfügen nur wenige Institutionen. Anhand der enormen Substanzdynamik, die im Rahmen des Beobachtungszeitraumes vermerkt wurde, ist ferner ersichtlich, dass eine stufenweise

Einzelunterstellung von synthetischen Drogenwirkstoffen unter das BtMG das Auftauchen neuer Ersatzstoffe auf dem Drogenmarkt vielmehr verstärkt anstatt zu unterbinden.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Entwicklung einer LC/ESI-MS/MS-Methode für den Nachweis von synthetischen Cannabinoiden in humanen Blutserumproben sowie deren Anwendung im Rahmen der forensisch-toxikologischen Fallarbeit. Die Methode wurde schrittweise an die sich regelmäßig ändernde Marktsituation angepasst und nach forensischen Richtlinien validiert. Die Validierung ergab, dass mit der Methode ein empfindlicher Nachweis der Substanzen im unteren ng/mL Bereich möglich ist [24, 25]. Im Laufe der praktischen Arbeiten wurde die Methode zur Analyse von über 3000 authentischen Serumproben verwendet. Es zeigte sich, dass während des dreijährigen Untersuchungszeitraumes insgesamt 27 verschiedene synthetische Cannabinoide innerhalb des Untersuchungsgutes nachgewiesen werden konnten. Die hierbei festgestellten medianen Serumkonzentrationen von $\leq 1,1$ ng/mL machen deutlich, dass für den Nachweis synthetischer Cannabinoide in Blutproben hochempfindliche Analysenverfahren erforderlich sind. Die enorme Substanzfluktuation beweist, dass Nachweisverfahren jederzeit die aktuelle Lage des Drogenmarktes abbilden müssen, um eine Aufnahme von synthetischen Cannabinoiden mit hoher Sicherheit ausschließen zu können. Hiermit sind jedoch sowohl hohe Anforderungen an analytische Methoden als auch ein erheblicher personeller Aufwand verbunden. Demnach ist auf Grund der enormen Anzahl bereits in Räuchermischungen identifizierter Substanzen mittlerweile häufig ein Kompromiss zwischen Leistungsfähigkeit und Kosteneffizienz einer Nachweismethode erforderlich.

Die toxikologische Evaluierung von 29 klinischen Notfällen zeigte eindrucklich, dass der Konsum synthetischer Cannabinoide zu lebensbedrohlichen Zuständen führen kann und mit diesem - verglichen mit dem Konsum von Cannabis - eine deutlich höhere Gesundheitsgefahr einhergeht [26, 27]. Zwar ähnelte der Großteil der beobachteten Symptome weitgehend einer Cannabisintoxikation. Doch erscheinen die in der betrachteten Fallserie besonders häufig aufgetretenen Symptome wie Erbrechen, (generalisierte) Krampfanfälle, starke Unruhe sowie Hypokaliämie eher spezifisch für eine Intoxikation mit synthetischen Cannabinoiden zu sein. Die Analyse von Blutproben im Rahmen von Straßenverkehrtsdelikten belegte, dass der Konsum von synthetischen Cannabinoiden zu Ausfallerscheinungen führen kann, die mit dem sicheren Führen eines Kraftfahrzeugs nicht vereinbar sind. Demnach sollte ein Konsum dieser Substanzen bei der forensisch-toxikologischen Analyse von Straßenverkehrsproben stets in Betracht gezogen und, falls erforderlich, entsprechend analytisch überprüft werden [28].

Untersuchungen zur Langzeitnachweisbarkeit synthetischer Cannabinoide in Serumproben ergaben, dass lipophile Vertreter wie beispielsweise AM-2201 oder JWH-210 bei Verwendung empfindlicher Nachweisverfahren bereits nach einmaliger Aufnahme über mehrere Tage im Serum nachgewiesen werden können. Nach dauerhaftem und/oder exzessivem Konsum wurden Nachweisfenster von bis zu mehreren Wochen beobachtet [29]. Ursächlich für die lange Nachweisbarkeit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Umverteilung dieser Substanzen in tiefe, fettreiche Kompartimente. Die sich aus der langen Nachweisbarkeit für die Interpretation positiver Befunde ergebenden Konsequenzen sind weitreichend. So müssen niedrige Serumkonzentrationen, die im Zusammenhang mit Straßenverkehrtsdelikten auftreten, nicht zwingend mit einer akuten und für den Tathergang relevanten Wirkung assoziiert sein. Im Rahmen einer Abstinenzüberwachung bedarf es zur Beurteilung, ob ein Patient wiederholt synthetische Cannabinoide konsumiert hat, einer sorgfältigen Interpretation der Analyseergebnisse. Solange in aufeinanderfolgenden Proben eines Patienten weder neue Substanzen noch stark ansteigende Substanzkonzentrationen nachgewiesen werden können, sollten niedrige Serumkonzentrationen in positiven Folgeproben als Konsequenz einer langen terminalen Eliminationshalbwertszeit angesehen werden. In solchen Fällen darf im Zweifelsfall nicht automatisch von einem wiederholten Konsum ausgegangen werden. Idealerweise sollte die

Analyse von Serum in regelmäßigen Abständen erfolgen, um Konzentrationsverläufe genau verfolgen zu können. Inwieweit diese Beobachtungen auf alle bisher in Räuchermischungen vorgefundenen synthetischen Cannabinoide zutreffen, gilt es zukünftig zu untersuchen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit dem Nachweis synthetischer Cannabinoide in humanen OF-Proben. Hierfür wurde zunächst eine Methode zur Extraktion dieser Substanzen aus der Probenmatrix OF entwickelt. Für den massenspektrometrischen Nachweis konnte auf die bereits entwickelte LC/ESI-MS/MS-Methode zurückgegriffen werden. Zur Abnahme authentischer OF-Proben wurde der DCD 5000 Probensammler der Firma Dräger verwendet. Das Nachweisverfahren wurde zunächst forensisch validiert, wobei sich zeigte, dass die erfassten Analyten ebenfalls hochempfindlich in OF nachgewiesen werden können. Die Analyse von 26 authentischen Fällen, bei denen neben einer OF-zeitgleich eine Serumprobe abgenommen wurde, ergab eine hervorragende Übereinstimmung der qualitativen Analyseergebnisse beider Matrices [30]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Analytik von OF in Fällen, in denen eine Blutabnahme nicht realisierbar oder nicht erwünscht ist, als geeignete Alternative zur Blutanalytik anbietet.

Die Ergebnisse anschließender Studien zur allgemeinen Nachweisdauer synthetischer Cannabinoide in nOF weisen darauf hin, dass positive OF-Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit vorwiegend auf der Detektion von jenen Substanzmengen basieren, die während des Rauchens in die Mundhöhle des Konsumenten eingetragen werden. Nach rapidem Abfall der vergleichsweise hohen Anfangskonzentrationen konnten die untersuchten synthetischen Cannabinoide über mehrere Stunden bis hin zu wenigen Tagen in nOF nachgewiesen werden [31]. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass OF geeignet ist, einen kurzzeitig zurückliegenden Konsum synthetischer Cannabinoide anzuzeigen. Bei OF handelt es sich somit um eine vielversprechende Alternative zur Analyse von Serumproben im Rahmen der Abstinenzkontrolle in klinischen oder forensischen Einrichtungen.

Untersuchungen zur Stabilität ausgewählter synthetischer Cannabinoide in authentischen nOF-Proben in Abhängigkeit des Probengefäßes zeigten, welcher Stellenwert einer sachgemäßen Lagerung von nOF-Proben zukommt, in denen ggf. synthetische Cannabinoide präsent sind. So konnte demonstriert werden, dass lipophile synthetische Cannabinoide bei ungekühlter Lagerung der nOF-Probe in erheblichem Umfang an die Oberfläche von Polypropylengefäßen adsorbieren und einer Analytik somit entzogen werden. Bei ebenfalls untersuchten Glasmaterialien wurde dies nicht beobachtet [32]. Es ist somit erforderlich, die Eignung der zur Lagerung entsprechender nOF-Proben beabsichtigten Polypropylengefäße vor ihrer ersten Anwendung zu überprüfen, um falsch-negative Analyseergebnissen vorzubeugen.

3. Danksagung

Vielen Dank an die GTFCh für die großzügige finanzielle Unterstützung der Reise zur 49. Jahrestagung der TIAFT in San Francisco 2011 und der damit verbundenen Möglichkeit, eigene Forschungsergebnisse vor einem internationalen Publikum vorstellen zu können.

4. Referenzen

- [1] V. Auwärter, S. Dresen, W. Weinmann, M. Müller, M. Pütz, N. Ferreirós. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *J. Mass. Spectrom.* 2009, 44, 832-837.
- [2] N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, N. Kawahara, Y. Goda. Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product. *Forensic Toxicol.* 2009, 27, 61-66.

- [3] N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, N. Kawahara, Y. Haishima, Y. Goda. Identification of a Cannabinoid Analog as a New Type of Designer Drug in a Herbal Product. *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 57, 439-441.
- [4] B.K. Atwood, D. Lee, A. Straiker, T.S. Widlanski, K. Mackie. CP47,497-C8 and JWH073, commonly found in 'Spice' herbal blends, are potent and efficacious CB1 cannabinoid receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 659, 139-145.
- [5] B.K. Atwood, J. Huffman, A. Straiker, K. Mackie. JWH018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB1 receptor agonist. *Br. J. Pharmacol.* 2010, 160, 585-593.
- [6] L.K. Brents, E.E. Reichard, S.M. Zimmerman, J.H. Moran, W.E. Fantegrossi, P.L. Prather. Phase I Hydroxylated Metabolites of the K2 Synthetic Cannabinoid JWH-018 Retain In Vitro and In Vivo Cannabinoid 1 Receptor Affinity and Activity. *PLoS ONE* 2011, 6, e21917.
- [7] A. Weissman, G.M. Milne, L.S. Melvin. Cannabimimetic activity from CP-47,497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1982, 223, 516-523.
- [8] M.R. Johnson, L.S. Melvin, G.M. Milne. Prototype cannabinoid analgetics, prostaglandins and opiates - A search for points of mechanistic interaction. *Life Sci.* 1982, 31, 1703-1706.
- [9] L.S. Melvin, M.R. Johnson, C.A. Harbert, G.M. Milne, A. Weissman. A cannabinoid derived prototypical analgesic. *J. Med. Chem.* 1984, 27, 67-71.
- [10] M.R. Bell, T.E. D'Ambra, V. Kumar, M.A. Eissenstat, J.L. Herrmann et al. Antinociceptive (Aminoalkyl)indoles. *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1099-1110.
- [11] T.E. D'Ambra, K.G. Estep, M.R. Bell, M.A. Eissenstat et al. Conformationally restrained analogues of pravadoline: nanomolar potent, enantioselective, (aminoalkyl)indole agonists of the cannabinoid receptor. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 124-135.
- [12] J.E. Kuster, J.I. Stevenson, S.J. Ward, T.E. D'Ambra, D.A. Haycock. Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993, 264, 1352-1363.
- [13] M.A. Eissenstat, M.R. Bell, T.E. D'Ambra, E.J. Alexander, S.J. Daum et al. Aminoalkylindoles: Structure-Activity Relationships of Novel Cannabinoid Mimetics. *J. Med. Chem.* 1995, 38, 3094-3105.
- [14] P. Griffiths, R. Sedefov, A. Gallegos, D. Lopez. How globalization and market innovation challenge how we think about and respond to drug use: 'Spice' a case study. *Addiction* 2010, 105, 951-953.
- [15] C. Piggee. Investigating a not-so-natural high. *Anal. Chem.* 2009, 81, 3205-3207.
- [16] U.S. Zimmermann, P.R. Winkelmann, M. Pilhatsch, J.A. Nees, R. Spanagel, K. Schulz. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of "spice gold". *Dtsch. Arztebl. Int.* 2009, 106, 464-467.
- [17] R. Lindigkeit, A. Boehme, I. Eiserloh, M. Luebbecke, M. Wiggermann, L. Ernst, T. Beuerle. Spice: A never ending story? *Forensic Sci. Int.* 2009, 191, 58-63.
- [18] F. Westphal, T. Junge, F. Sönnichsen, P. Rösner, J. Schäper. Ein neuer Wirkstoff in SPICE-artigen Kräutermischungen: Charakterisierung von JWH-250, seinen Methyl- und Trimethylsilylderivaten. *Toxicchem Krimtech* 2010, 77 (1), 8-22.
- [19] S. Kneisel, F. Westphal, P. Rösner, V. Brecht, A. Ewald et al. Cannabinoidmimetika: Massenspektren und IR-ATR-Spektren neuer Verbindungen aus den Jahren 2009/2010. *Toxicchem Krimtech* 2011, 78, 23-35.

- [20] S. Kneisel, F. Westphal, B. Moosmann, V. Brecht, P. Bisel et al. Trends auf dem Gebiet der synthetischen Cannabinoidmimetika: Massenspektren und ATR-IR-Spektren neuer Verbindungen aus dem Zeitraum Ende 2010 bis Ende 2011. *Toxichem Krimtech* 2011, 78 (3), 468-479.
- [21] S. Kneisel, F. Westphal, P. Bisel, V. Brecht, S. Broecker, V. Auwärter. Identification and structural characterization of the synthetic cannabinoid 3-(1-adamantoyl)-1-pentylindole as an additive in 'herbal incense'. *J. Mass. Spectrom.* 2012, 47, 195-200.
- [22] B. Moosmann, S. Kneisel, U. Girreser, V. Brecht, F. Westphal, V. Auwärter. Separation and structural characterization of the synthetic cannabinoids JWH-412 and 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3yl]-(4-methylnaphthalen-1-yl)methanone using GC-MS, NMR analysis and a flash chromatography system. *Forensic Sci. Int.* 2012, 220, e17-e22.
- [23] S. Kneisel, P. Bisel, V. Brecht, S. Broecker, M. Müller, V. Auwärter. Identification of the cannabimimetic AM-1220 and its azepane isomer (N-methylazepan-3-yl)-3-(1-naphthoyl)indole in a research chemical and several herbal mixtures. *Forensic Toxicol.* 2012, 30, 126-134.
- [24] S. Dresen, S. Kneisel, W. Weinmann, R. Zimmermann, V. Auwärter. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples. *J. Mass. Spectrom.* 2011, 46, 163-171.
- [25] S. Kneisel, V. Auwärter. 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.
- [26] M. Hermanns-Clausen, S. Kneisel, B. Szabo, V. Auwärter. Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: Clinical and laboratory findings. *Addiction* 2012, 108, 534-544.
- [27] M. Hermanns-Clausen, S. Kneisel, M. Hutter, B. Szabo, V. Auwärter. Acute intoxication by synthetic cannabinoids – Four case reports. *Drug Test. Anal.* 2013, 5, 790-794.
- [28] F. Musshoff, B. Madea, G. Kernbach-Wightton, W. Bicker, S. Kneisel et al. Driving under the influence of synthetic cannabinoids ("Spice"): a case series, *Int. J. Legal Med.* 2013, 10.1007/s00414-013-0864-1.
- [29] S. Kneisel, J. Teske, V. Auwärter. Analysis of synthetic cannabinoids in abstinence control: long drug detection windows in serum and implications for practitioners. *Drug Test. Anal.* 2012, 10.1002/dta.1445.
- [30] S. Kneisel, V. Auwärter, J. Kempf. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Drug Test. Anal.* 2012, 10.1002/dta.1429.
- [31] S. Kneisel, M. Speck, B. Moosmann, T.M. Corneillie, N.G. Butlin, V. Auwärter. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 4691-4706.
- [32] S. Kneisel, M. Speck, B. Moosmann, V. Auwärter. Stability of 11 prevalent synthetic cannabinoids in authentic neat oral fluid samples: glass versus polypropylene containers at different temperatures. *Drug Test. Anal.* 2013, 5, 602-606.