

Summary of the PhD thesis to say “thank you” for the GTFCh travel fund for presenting at the 2011 SOFT-TIAFT Meeting in San Francisco and the 2012 TIAFT Meeting in Hamamatsu

Δ 9-Tetrahydrocannabinolsäure A – Studien und Untersuchungen zur Anwendung als Cannabis-Konsummarker in der forensischen Toxikologie

Nadine Roth

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

1. Einleitung

Cannabis ist laut der Europäischen Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA) die am weitesten verbreitete illegale Droge in Europa (siehe Jahresbericht 2012 zum Stand der Drogenproblematik in Europa). Bei Konsum dieser Droge wird nicht nur der gewünschte „high“-Effekt erzielt, sondern es kann je nach Dosierung auch zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Angstzuständen, Panikgefühl, Halluzinationen, Aufmerksamkeitsstörungen, Herzrasen, Übelkeit und Schwindel kommen [1,2]. Bei der Teilnahme am Straßenverkehr nach Cannabiskonsum kann es zu einer strafrechtlich relevanten wirkungsbedingten Beeinträchtigung der Fahrsicherheit kommen.

Die Durchführung von quantitativen Analysen auf Cannabinoide stellt daher eine wichtige Aufgabe in der forensischen Toxikologie dar. Dabei werden in der Routineanalytik Serum- und Urinproben auf Δ 9-Tetrahydrocannabinol (THC) sowie dessen Metaboliten 11-Hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) und 11-Nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) untersucht [3-5]. Da aufgrund unterschiedlicher genetischer Enzymausstattung, Toleranzbildung und unterschiedlicher Konsumarten (oral oder inhalativ) große interindividuelle Schwankungen in den nach einem Konsum erreichten Konzentrationen auftreten können, ist eine Einschätzung der Cannabiswirkung allein anhand der festgestellten Wirkstoffkonzentrationen nicht ohne Weiteres möglich [6,7]. Eine genaue Angabe der nach dem letzten Cannabiskonsum verstrichenen Zeit sowie die Unterscheidung zwischen regelmäßigem und seltenem Konsum ist ebenfalls nur schwer vorzunehmen und beruht bisher auf der Anwendung verschiedener theoretischer Modelle, die im Wesentlichen auf Erfahrungswerten aufbauen [8,9] und häufig bei Konsummuster mit regelmäßigem Konsum versagen.

Δ 9-Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA-A), die biogenetische Vorläufersubstanz des psychoaktiv wirksamen THC, ist selbst nicht psychoaktiv wirksam und ist der Hauptbestandteil der Cannabinoidfraktion in frischem Cannabis-Pflanzenmaterial. Da THCA-A bei hohen Temperaturen und Lichteinwirkung entgegen früherer Annahmen nur teilweise zu THC decarboxyliert [10] und somit bei inhalativem oder oralem Konsum ein gewisser Anteil bioverfügbar bleibt, könnten THCA-A beziehungsweise deren Metaboliten als Markersubstanzen zur Lösung der oben genannten forensisch-toxikologischen Probleme beitragen.

2. Zielsetzung

Ein Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines geeigneten internen Standards für die quantitative Analytik von THCA-A in diversen Matrices. Zum Einsatz kam dieser interne

Standard (THCA-A-D₃) zum ersten Mal bei der Entwicklung und Validierung einer LC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von THCA-A in Serum. Eine daran anknüpfende pharmakokinetische Analyse der bei einem Selbstversuch mit täglicher, hochdosierter oraler Einnahme von THCA-A gewonnenen Serumproben sollte neben der Akkumulationsrate weitere pharmakokinetische Parameter liefern.

Neben der Serumanalytik sollten auch Probleme der Haaranalytik auf Cannabinoide näher beleuchtet werden. Die Frage nach der Herkunft hoher THCA-A-Konzentrationen im Haar von Cannabis-Konsumenten sollte in einem Selbstversuch zur externen Kontamination von Haaren durch den Seitenstromrauch von Cannabis-Zigaretten geklärt werden. Dieser Studie ging die Entwicklung und Validierung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von THCA-A, THC, Cannabinol (CBN) und Cannabidiol (CBD) in Haaren voraus.

3. LC-MS/MS-Analytik

Die Probenaufarbeitung von Serumproben erfolgte mittels fraktionierter Proteinfällung mit Acetonitril auf Eis. Für die LC-MS/MS-Methode wurde eine C₁₈-Umkehr-Phase und eine Gradientenelution mit wässriger 0,1 %iger Ameisensäure und Acetonitril verwendet. Die Detektion erfolgte nach negativer Ionisierung im MRM-Modus. Die Methode wurde nach den Richtlinien der GTFCh validiert und für die Analyse von Studienproben und forensischen Proben eingesetzt.

Die Probenaufarbeitung für Haarproben wurde nach Prüfung der Extraktionseffizienz verschiedener Extraktionsmittel über eine vierstündige Extraktion in Methanol unter ständigem Schütteln durchgeführt. Die LC-MS/MS-Methode wurde auf Basis der Serumanalytik aufgebaut, wobei bedingt durch die gleichzeitige Detektion von THC, CBN und CBD in einem zweiten MRM-Experiment (positive Ionisierung) und die veränderte Matrix kleinere Änderungen vorgenommen werden mussten. Die Autosampler-Temperatur wurde von 4 auf 30 °C erhöht um das Ausbilden eines Fettfilms zu verhindern. Bei der Probenaufarbeitung wurde zur Rekonstitution der eingedampften Haarextrakte 0,25% Lecithin als Lösungsvermittler zugegeben. Die Methode wurde ebenfalls nach den Richtlinien der GTFCh validiert.

4. Studiendesign

In einer 2011 durchgeführten Probandenstudie (intravenöse Applikation von 5 mg THCA-A) wurden Hinweise darauf erhalten, dass THCA-A im menschlichen Körper ähnlich wie THC akkumulieren und nach Konsumende nur langsam wieder in das Blut rückverteilt werden könnte [11]. Im Zuge dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob es tatsächlich auch bei THCA-A zu einer solchen Akkumulation kommt. Dazu wurde ein Selbstversuch mit einem Probanden durchgeführt. Dieser nahm über einen Zeitraum von 30 Tagen täglich eine Kapsel mit 50 mg THCA-A ein. In einem zweiten Selbstversuch nahm derselbe Proband lediglich eine Kapsel mit 50 mg THCA-A ein. Die erhaltenen Datensätze wurden mit Hilfe der Pharmakokinetik-Software Kinetica unter Verwendung der Nicht-Kompartimentalanalyse und der Kompartimentalanalyse ausgewertet.

Informationen zur Herkunft hoher THCA-A-Haarkonzentrationen bei Cannabiskonsumenten sollte eine Studie zur externen Kontamination von Haaren durch den Seitenstromrauch eines Joints liefern. An der Studie nahmen drei Freiwillige teil, die sich täglich (insgesamt an 14 Tagen) dem Seitenstromrauch eines Joints aussetzten, ohne dabei den Rauch zu inhalieren. Während der dreiwöchigen Expositionsphase wurden jeweils am Ende jeder Woche sowie

vier Wochen nach Expositionsende Haarproben abgenommen. Ein Proband ließ sich sieben Wochen nach Expositionsende das komplette Kopfhhaar abnehmen.

5. Resultate

Die Umsetzung von 10 mg THC-D₃ mit einem 10-molaren Überschuss einer 2-M-Methyl-Magnesiumcarbonat-Lösung in Dimethylformamid unter dreistündigem Erhitzen (120 °C) führte nach Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure bei Raumtemperatur, Extraktion in *tert*-Butylmethylether und Aufreinigung über präparative HPLC zu einer Mischung aus THCA-A-D₃ > 90 %, THC-D₃ ~ 9 % und THCA-A < 1 %. Abbildung 1 zeigt das postulierte Syntheschema in Anlehnung an eine Publikation von Mechoulam et al. aus dem Jahre 1969 zur Synthese verschiedener Cannabinoidsäuren [12].

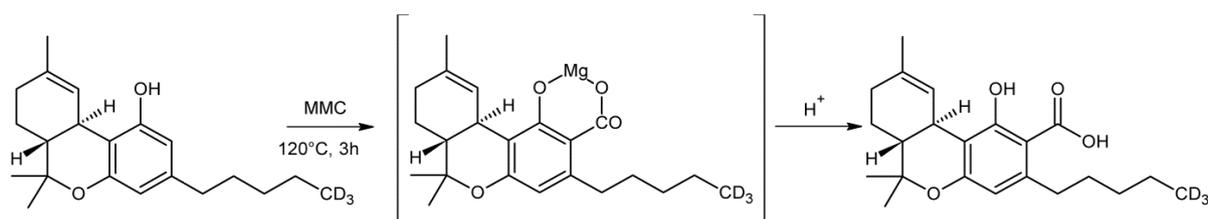


Abb. 1. Postuliertes Syntheschema zur Darstellung von THCA-A-D₃ in Anlehnung an Mechoulam et al. [12].

Die Identifikation und Charakterisierung erfolgte mittels GC-MS, ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie und LC-MS/MS. Die synthetisierte Lösung erfüllt alle Voraussetzungen zur Verwendung als interner Standard für die Quantifizierung von THCA-A in der massenspektrometrischen Analytik.

Bei Vergleich der Konzentrations-Zeit-Profile nach Einmal- und Mehrfachgabe wurden keine Hinweise auf eine Rückverteilung von THCA-A in das Blut erhalten (Abb. 2).

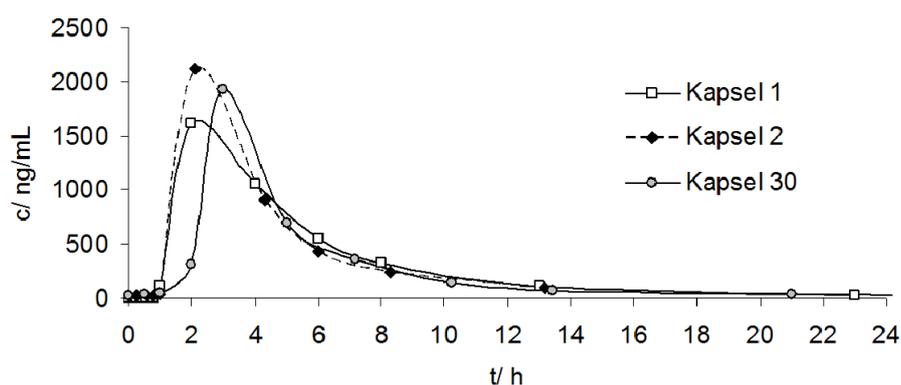


Abb. 2. Konzentrations-Zeit-Profil von THCA-A nach Einnahme der ersten Kapsel (Kapsel 1), der zweiten Kapsel (Kapsel 2) und der dreißigsten Kapsel (Kapsel 30) von insgesamt 30 Kapseln über einen Zeitraum von 30 Tagen (Dosierintervall $\tau = 24$ h).

Auch die ermittelten pharmakokinetischen Parameter (mittlere Verweilzeit (MRT) ~4 h, terminale Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) ~8 h) deuten nicht auf eine ausgeprägte Akkumulation von THCA-A im menschlichen Körper hin. Für den Konzentrations-Zeit-Verlauf nach

Einmalgabe zeigte sich bei der Kompartimentanalyse die beste Übereinstimmung unter Annahme eines gewichteten Zweikompartiment-Modells. Daher erscheint es plausibel, dass THCA-A eher in ein zweites, „flaches“ Kompartiment umverteilt wird und nicht wie zuvor angenommen in einem dritten, „tiefen“ Kompartiment akkumuliert. Nichtsdestotrotz scheidet THCA-A als Markersubstanz in Serum für einen erst kurz zurückliegenden Cannabiskonsum aus. Als Hauptgrund hierfür kann das lange Nachweisenfenster von ca. 98 h angesehen werden.

Die im Jahre 2009 begonnenen Untersuchungen zu THCA-A in Haaren [13] wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter ausgebaut und methodisch verbessert. Unter Einbeziehung des synthetisierten internen Standards (THCA-A-D₃) wurde eine quantitative Methode zur Bestimmung von THCA-A sowie drei weiteren Cannabinoiden (THC, CBN und CBD) in Haaren entwickelt. Die Methode wurde ebenfalls nach den Richtlinien der GTFCh validiert und konnte für die Messung von Studienproben und forensischen Proben eingesetzt werden (siehe Abb. 3). Zum ersten Mal angewendet wurde die Methode zur Klärung der Herkunft von in der Praxis häufig auftretenden hohen THCA-A-Konzentrationen (> 1000 pg/mg) in den Haaren von Cannabis-Konsumenten. Hierzu wurden zunächst Haarproben des Probanden untersucht, der über einen Zeitraum von 30 Tagen täglich je eine Kapsel mit 50 mg THCA-A eingenommen hatte. Dabei wurde keine THCA-A im Kopfhhaar des Probanden nachgewiesen.

Eine relevante Einlagerung dieser Substanz über den Blutkreislauf konnte somit ausgeschlossen werden. Weitere Informationen zur Herkunft hoher THCA-A-Konzentrationen in Konsumentenhaar lieferte eine Studie zur externen Kontamination von Haaren durch den Seitenstromrauch eines Joints. Die nach Ende der dreiwöchigen Kontaminationsphase untersuchten Haarproben waren bei allen Probanden in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich positiv auf THCA-A (bei vergleichsweise hohen THC-Konzentrationen). Die gemessenen THCA-A-Konzentrationen lagen weit unter den Konzentrationen, die üblicherweise in Konsumentenhaar nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt kann am besten über den Vergleich der Verhältnisse von THCA-A zu THC in Studienhaar und in Konsumentenhaar verdeutlicht werden.

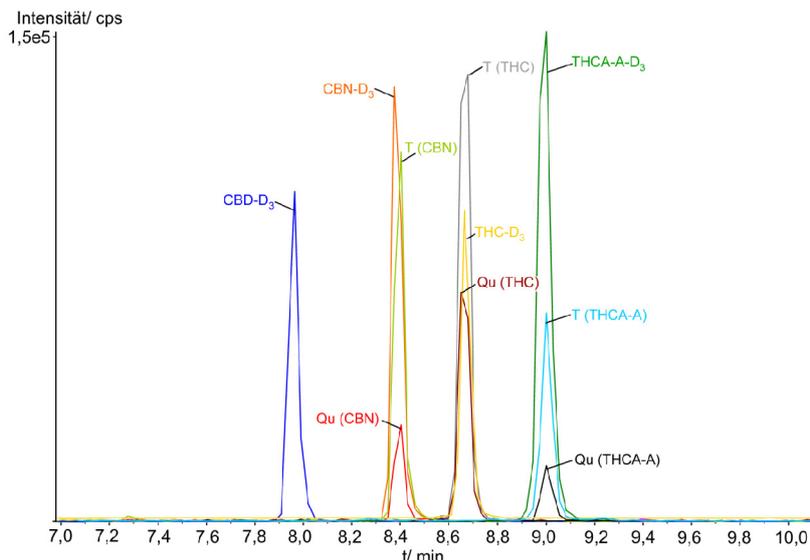


Abb. 3. Überlagerte Ionenchromatogramme einer Studienprobe im Retentionsbereich von 7 bis 10 min (THCA-A = 35 pg/mg, THC = 950 pg/mg, CBN = 330 pg/mg und CBD = nicht nachgewiesen), T: Target und Qu: Qualifier.

Das Verhältnis von THCA-A zu THC im Studienhaar lag weit auf der Seite von THC (1:520 bis 1:7). In Konsumentenhaar hingegen zeigte sich ein deutlich abweichendes Verhältnis mit einer mehr als doppelt so hohen THCA-A Konzentration (THCA-A zu THC ~ 2:1 oder größer). Somit scheidet auch eine Kontamination durch Seitenstromrauch als Hauptquelle für die Herkunft größerer Mengen an THCA-A in Haaren aus. Eine weitere Möglichkeit, wie

THCA-A in die Haare gelangen kann, wäre die Berührung des Haares mit kontaminierten Fingern (z. B. nach dem Rollen eines Joints). Erste Hinweise in diese Richtung lieferten die Extraktionsversuche während der Validierung der Methode. Aufgrund des Fehlens eines positiven Haarpoools wurde THCA-A-positives Haar durch Berührung der Haare mit kontaminierten Fingern selbst hergestellt. Die Extraktion der kontaminierten Haare ergab auch nach der üblichen Waschprozedur THCA-A-Konzentrationen im Bereich der in Konsumentenhaar festgestellten Konzentrationen und auch das Verhältnis von THCA-A zu THC lag, wie bei Konsumentenhaar, weit auf der Seite von THCA-A. Diese ersten Ergebnisse sollen in einer Probandenstudie mit 10 Teilnehmern bestätigt werden.

Weitere Erkenntnisse aus der Studie betreffen den psychoaktiven Wirkstoff THC selbst. THC wird bei der Untersuchung von Haarproben zum Beispiel im Rahmen der medizinisch-psychologischen Begutachtung zur Fahreignungsprüfung als Hauptanalyt erfasst. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass zwei von drei Probanden selbst vier Wochen nach Expositionsende noch THC-Konzentrationen über dem in den Beurteilungskriterien genannten Cut-off für die Fahreignungsbegutachtung aufwiesen (Cut-off = 20 pg/mg, Werte lagen bei 50 pg/mg oder darüber). Dies zeigt, dass eine Beurteilung von Haarbefunden allein aufgrund des Nachweises von THC problematisch sein kann.

Des Weiteren wurde die Verteilung der Kontamination über verschiedenen Kopfbereiche untersucht. Dazu ließ sich ein Proband 7 Wochen nach Expositionsende das komplette Kopfhaar abnehmen. Es zeigte sich, dass der Hinterkopfbereich und die Seitenbereiche hinter den Ohren am stärksten von der Kontamination betroffen waren. Gerade der Hinterkopfbereich ist aber der bevorzugte Ort der Probennahme für Haaruntersuchungen in der forensischen Praxis, da hier ein relativ gleichmäßiges Haarwachstum angenommen werden kann.

6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei der Interpretation von Haarbefunden bei Verdacht auf Cannabiskonsum große Vorsicht geboten ist. Bei der Beurteilung positiver Haarbefunde sollte stets auf die Möglichkeit einer externen Kontamination hingewiesen werden und für eine differenzierte Analyse sollten möglichst viele Analyte einbezogen werden, wobei vor allem THCA-A wertvolle Hinweise liefern kann.

Bei Betrachtung der Ergebnisse aus den pharmakokinetischen Untersuchungen der Serumproben nach oraler Mehrfachgabe scheidet THCA-A als Markersubstanz im Serum für einen kurz zurückliegenden Cannabiskonsum aus. Die Substanz zeigte im Selbstversuch zwar keine Tendenz in einem tiefen Kompartiment zu akkumulieren, bei einer Nachweiszeit von ca. 98 h kann aber nicht mehr von einem Kurzzeitmarker gesprochen werden.

7. Danksagung

Ich danke der GTFCh für die finanzielle Unterstützung in Form von Stipendien und die damit verbundene Möglichkeit, meine Ergebnisse auf den TIAFT-Konferenzen 2011 in San Francisco und 2012 in Hamamatsu präsentieren zu können.

8. Literatur

- [1] Ben Amar M. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* 2006; 105(1-2):1-25.

- [2] Grotenhermen F, Müller-Vahl K. The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109(29-30):495-501.
- [3] Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M, Stadelmann AM, Roser P, Scheffter T, Pragst F. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *J Anal Toxicol* 2005; 29(8):782-789.
- [4] Weller JP, Wolf M, Szidat S. Enhanced selectivity in the determination of delta9-tetrahydrocannabinol and two major metabolites in serum using ion-trap GC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 2000; 24(5):359-364.
- [5] Maralíkova B, Weinmann W. Simultaneous determination of Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Delta9-tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2004; 39(5):526-531.
- [6] Huestis MA, ElSohly MA, Nebro W, Barnes A, Gustafson RA, Smith ML. Estimating time of last oral ingestion of cannabis from plasma THC and THCCOOH concentrations. *Ther Drug Monit* 2006; 28(4):540-544.
- [7] Karschner EL, Schwöpe DM, Schwilke EW, Goodwin RS, Kelly DL, Gorelick DA, Huestis MA. Predictive model accuracy in estimating last delta9-tetrahydrocannabinol (THC) intake from plasma and whole blood cannabinoid concentrations in chronic, daily cannabis smokers administered subchronic oral THC. *Drug Alcohol Depend* 2012; 125(3):313-319.
- [8] Daldrup T, Käferstein H, Köhler H, Maier RD, Musshoff F. Entscheidung zwischen einmaligem/gelegentlichem und regelmäßigem Cannabiskonsum. *Blualkohol* 2000; 37:39-47.
- [9] Huestis MA, Barnes A, Smith ML. Estimating the time of last cannabis use from plasma delta9-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol concentrations. *Clin Chem* 2005; 51(12):2289-2295.
- [10] Dussy FE, Hamberg C, Luginbühl M, Schwerzmann T, Briellmann TA. Isolation of delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of delta9-THC in cannabis products. *Forensic Sci Int* 2005; 149(1):3-10.
- [11] Wohlfarth A. Pharmakokinetik und Metabolismus von Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A im Menschen. Dissertation, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2012.
- [12] Mechoulam R, Ben-Zvi Z. Carboxylation of resorcinols with methylmagnesium carboxylate. Synthesis of cannabinoid acids. *Chem Commun* 1969; 343-344.
- [13] Auwärter V, Wohlfarth A, Traber J, Thieme D, Weinmann W. Hair analysis for delta9-tetrahydrocannabinolic acid A - New insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair. *Forensic Sci Int* 2010; 196(1-3):10-13.