

Summary of the PhD Thesis as a ‘Thank You’ for the GTFCh Travel Fund for Presenting at the 2011 SOFT-TIAFT Meeting in San Francisco (CA)

Synthetische Cannabinoide in der forensischen Toxikologie: Metabolismus und Nachweis in unterschiedlichen Matrices

Melanie Hutter

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

1. Einleitung

Kräutermischungen, die vor allem unter dem Namen „Spice“ bekannt wurden, enthalten als Wirkstoffe in der Regel synthetische Cannabinoide und werden als Cannabisersatz konsumiert. Für die psychotropen Effekte verantwortlich sind synthetisch hergestellte Cannabimimetika, die ursprünglich im Zuge der Forschung am Endocannabinoidsystem entwickelt wurden. Während die synthetischen Cannabinoide der ersten Generation sich zunächst chemisch-strukturell stark am Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) orientierten (z. B. CP-47, 497 [1] und HU-210 [2]), wurden nach Entdeckung und Klonung der Cannabinoid-Rezeptoren später auch völlig neue Strukturtypen wie zum Beispiel die Aminoalkylindole als potente Bindungspartner dieser Rezeptoren erkannt [3]. Seitdem ist das wissenschaftliche Interesse an diesen Verbindungen kontinuierlich gestiegen und führte zu der Synthese hunderter Substanzen mit hoher oder mittlerer Bindungsaffinität zu einem oder beiden der bisher bekannten Cannabinoidrezeptoren (CB₁ und CB₂). Wie Lysergsäurediethylamid (LSD) und 3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin (MDMA, Ecstasy) der Sprung aus dem Feld der pharmazeutischen Forschung in die Welt der Missbrauchsdrogen gelang, ist nunmehr auch der Missbrauch synthetischer Cannabinoide als Rauschmittel häufig zu beobachten [4].

Hierzu werden die Chemikalien in chemischen Laboratorien hergestellt, auf getrocknetes Pflanzenmaterial aufgebracht und in bunt bedruckten Folienpäckchen unter einer Vielzahl an Namen wie „Spice“, „Maya“ oder „Jamaican Gold“ vermarktet (Abb. 1). In Deutschland begann um 2004 der Vertrieb synthetischer Cannabinoide in Kräutermischungen über das Internet, wobei der Markt seither eine hohe Dynamik aufweist.



Abb. 1. Kräutermischungen in ihrer besonders für Jugendliche attraktiven Aufmachung.

Großflächig bekannt wurde „Spice“ im Jahr 2008, und die Popularität und Verbreitung ähnlicher Produkte ist seither nicht abgebrochen. Vor allem für Personen, die sich regelmäßigen Drogentests unterziehen müssen, stellen diese Produkte eine Alternative zu Cannabis dar, da die verwendeten synthetischen Cannabinoide mit den üblichen Drogenschnelltests nicht nachweisbar sind. Für andere Konsumenten spielt die legale Erhältlichkeit eine große Rolle.

Der Nachweis des Konsums synthetischer Cannabinoide war auch nach Aufklärung der enthaltenen Wirkstoffe zunächst nur in Blut- oder Serumproben in sehr aufwendigen Unter-

suchungen möglich. Auf Urin basierende Schnelltests, wie sie vor allem in Abstinenzkontrollprogrammen eingesetzt werden, waren nicht verfügbar und eine Urinanalytik aufgrund der umfangreichen Metabolisierung der Substanzen zunächst nicht praktikabel. Daher stieg die Popularität dieser Produkte vor allem in Personenkreisen stark an, die sich aus verschiedenen Gründen einer regelmäßigen Abstinenzkontrolle durch Untersuchung von Urinproben unterziehen müssen.

2. Ziele der Arbeit

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der Hauptmetaboliten aller marktrelevanten synthetischen Cannabinoide in Humanurin und die Entwicklung einer darauf basierenden Methode für den sensitiven und spezifischen Nachweis synthetischer Cannabinoide in Urinproben.

Neben Blut-, Serum- oder Urinproben werden in der Praxis auch Haarproben als Matrix zur Überprüfung einer Abstinenz herangezogen. Allgemein lässt sich durch Haaranalytik retrospektiv ein längerer Zeitraum überwachen. Im Vergleich mit den üblichen Untersuchungsmatrices sind Haare besonders stark äußeren Einflüssen ausgesetzt und somit anfällig für externe Kontaminationen, was bei der Interpretation der Befunde einer Haaranalyse zu berücksichtigen ist. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung einer Nachweismethode für synthetische Cannabinoide in Haaren sowie die Untersuchung der Beeinflussung der Analyseergebnisse durch externe Kontamination.

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Der erste Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung der Phase-I-Hauptmetaboliten von 16 forensisch relevanten synthetischen Cannabinoiden in Humanurin. Basierend auf einer ständigen Marktüberwachung der Kräutermischungen vom „Spice“-Typ wurden die Metaboliten der synthetischen Cannabinoide, welche häufiger auftreten, zeitnah identifiziert. Für alle untersuchten synthetischen Cannabinoide wurden Mono- und Dihydroxylierungen sowie Oxidationen zur entsprechenden Carbonsäure als Hauptreaktionen des Phase-I-Metabolismus beobachtet. Die unverstoffwechselten Muttersubstanzen wurden in den untersuchten Urinproben nicht detektiert. Die Struktursicherung der postulierten Metaboliten erfolgte durch Bestimmung der Feinmassen, sowie –falls erhältlich – durch Abgleich mit den entsprechenden Referenzsubstanzen.

Neben den oben genannten Hauptmetabolisierungsreaktionen wurden im Metabolismus einiger synthetischer Cannabinoide Besonderheiten festgestellt. Dabei handelt es sich zum einen um die *in vivo* beobachtete Decarboxylierung der Säuremetaboliten. Diese Reaktion führt über einen noch ungeklärten Mechanismus zu einer Verkürzung der Alkylkette. In einigen Fällen können dabei Metaboliten entstehen, die üblicherweise aus dem Konsum eines anderen synthetischen Cannabinoides resultieren. Beispielsweise werden nach Konsum des synthetischen Cannabinoides JWH-019 sowohl Metaboliten des Pentylanalogons JWH-018 als auch des Butylanalogons JWH-073 und des Propylanalogons JWH-072 in den Urinproben der Konsumenten detektiert.

Eine weitere Besonderheit liegt im Metabolismus der synthetischen Cannabinoide, die eine 5-Fluorpentylgruppe am Indolstickstoff tragen. Neben den üblichen Monohydroxylierungen der Verbindungen kommt es bei diesen Substanzen auch zu einer metabolischen Substitution des Fluoratoms durch eine Hydroxygruppe. Dadurch werden Metaboliten gebildet, welche typisch für das nicht-fluorierte Analogon sind. Dies kann zu Problemen führen, wenn die

nicht-fluorierten Analoga auch in Kräutermischungen auftreten, da in diesen Fällen nicht ohne Weiteres auf die konsumierte Substanz geschlossen werden kann. So werden nach dem Konsum des synthetischen Cannabinoids AM-2201, neben den typischen AM-2201-Metaboliten zusätzlich Metaboliten des JWH-018 sowie die durch weitere Decarboxylierung gebildeten Metaboliten des JWH-073 im Urin nachgewiesen. Eine Aufklärung kann im Falle des Konsums von AM-2201 durch die Betrachtung der spezifischen Metaboliten des JWH-018 gelingen, da im Rahmen dieser Arbeit der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit als eindeutiger Konsummarker für JWH-018 identifiziert wurde. Entsprechende Analogieschlüsse sind nach ersten Beobachtungen in Patientenproben wahrscheinlich auch für strukturell analog aufgebaute synthetische Cannabinoide (wie EAM-2201, MAM-2201 und XLR-11) zulässig. Aus forensischer Sicht kann die sichere Identifizierung der konsumierten Substanz von besonderem Interesse sein, da die fluorierten Verbindungen im Vergleich zu ihren nicht-fluorierten Analoga oft erst zeitlich verzögert dem BtMG unterstellt wurden und in manchen Fällen die Zuordnung zu einem bestimmten Produkt von Interesse für die Strafverfolgung sein kann (z. B. unerlaubte Abgabe von Betäubungsmitteln an Minderjährige).

Auch pyrolytische Prozesse, die während des Rauchens auftreten, können das Metabolitenprofil stark erweitern (Abb. 2).

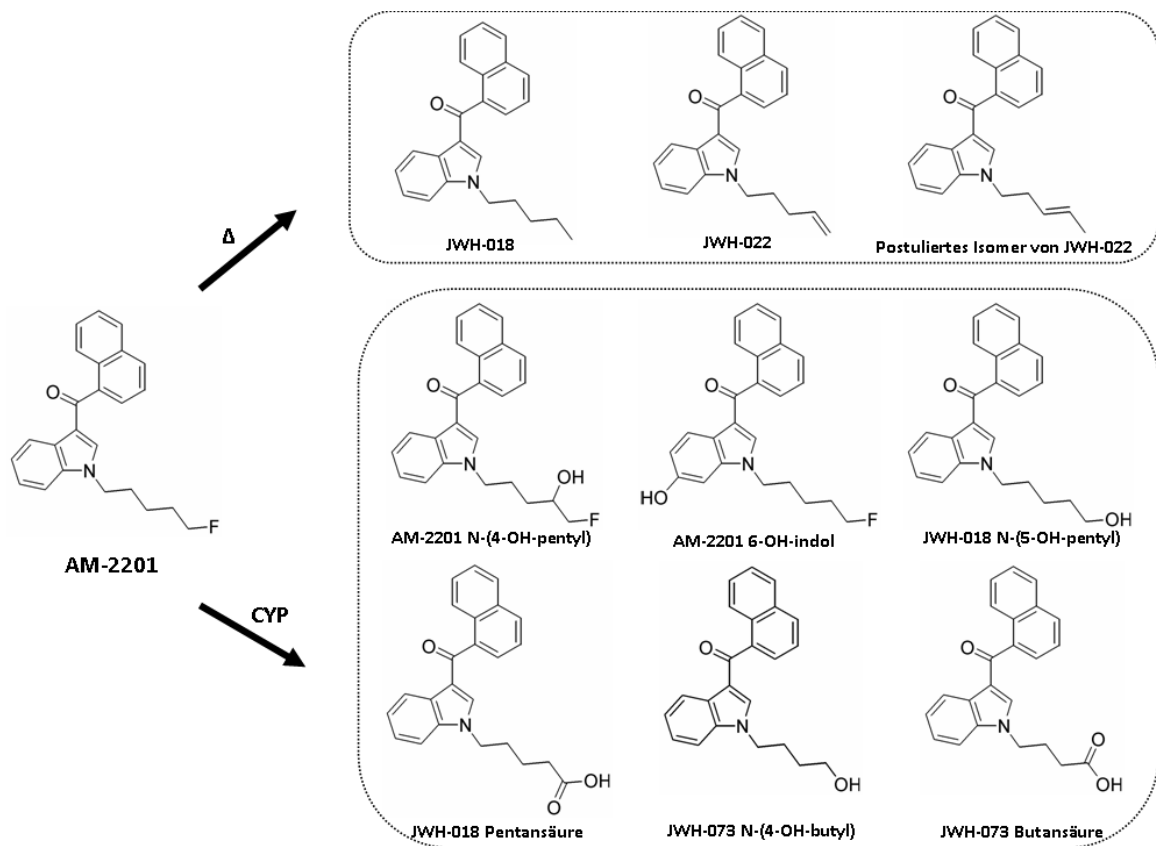


Abb. 2. Folgeprodukte des AM-2201, die durch Hitzeeinwirkung oder metabolisch gebildet werden können.

Zusätzlich wurde für einige ausgewählte synthetische Cannabinoide der Metabolismus *in vitro* durch Inkubationen mit humanen Lebermikrosomen und isolierten CYP-Enzymen untersucht und so erste Daten zur Enzymkinetik gewonnen. Nach den vorliegenden Ergebnissen werden die Hauptmetabolisierungsreaktionen durch mehrere CYP-Isoformen katalysiert. Individuelle genetische Varianten sollten daher beim Metabolismus synthetischer Cannabinoide nur eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Im Fokus der Arbeit stand die Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode zum Nachweis des Konsums synthetischer Cannabinoide in Urinproben. Diese wurde auf Grundlage der identifizierten humanen Hauptmetaboliten entwickelt und nach forensischen Richtlinien validiert. Sie fand Anwendung in der klinischen und forensisch-toxikologischen Fallarbeit zur Aufklärung von Vergiftungen und zur Abstinenzkontrolle. In Untersuchungen zur Nachweisbarkeitsdauer synthetischer Cannabinoide in Urinproben zeigte sich, dass die Metaboliten der Substanzen mittels hochempfindlicher Nachweisverfahren nach einem einmaligen Konsum bis zu mehreren Tagen und nach chronischem Konsum bis zu mehreren Wochen oder gar Monaten nachweisbar sind. Die Evaluierung eines Antikörper-basierten Schnelltests zum Nachweis der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urinproben durch Vergleich mit der entwickelten LC-MS/MS-Analytik ergab, dass dieser Schnelltest nicht mit ausreichender Sensitivität und Spezifität für einen Nachweis herangezogen werden kann.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung und Evaluierung einer LC-MS/MS-Methode zum Nachweis synthetischer Cannabinoide in Haarproben. Im Zuge einer Studie zur Rauchkontamination von Haarproben wurde gezeigt, dass die externe Einlagerung synthetischer Cannabinoide in die Haarstruktur zu enorm hohen Wirkstoffkonzentrationen führen kann, die auch nach mehrmaligen Haarwäschen nicht vollständig entfernt werden, und bei der Interpretation von Ergebnissen der Haaranalytik berücksichtigt werden muss.

Die retrospektive Analyse von Urin- und Haarproben aus der Fahreignungsdiagnostik zeigte zudem, dass die Substitution von Cannabis durch synthetische Cannabinoide in dieser spezifischen Gruppe potentieller Konsumenten eine bedeutende Rolle spielt (über 6 % der Probanden einer zufällig erhobenen Stichprobe mit $n > 500$ hatten ihren ursprünglichen Cannabiskonsum auf synthetische Cannabinoide umgestellt).

4. Danksagung

Vielen Dank an die GTFCh für die finanzielle Unterstützung zur Ermöglichung der Teilnahme am 49. Jahrestreffen der TIAFT in San Francisco. Die Projekte "*Spice and synthetic cannabinoids*" und "*Spice II Plus*" wurden von der EU-Kommission (JUST/2009/DPIP/AG/0948 und JUST/2011/DPIP/AG/3597), dem Bundesgesundheitsministerium und der Stadt Frankfurt/Main finanziell unterstützt.

5. Literatur

- [1] Weissman A, Milne GM, Melvin L. Cannabimimetic activity from CP-47,497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1982;223:516-523.
- [2] Howlett A, Champion T, Wilken G, Mechoulam R. Stereochemical effects of 11-OH- Δ^8 -tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology* 1990;29:161-165.
- [3] Huffman JW, Dai D, Martin BR, Compton DR. Design, synthesis and pharmacology of cannabimimetic indoles. *Bioorg Med Chem Lett* 1994;4:563-566.
- [4] Auwärter V, Dresen S, Weinmann W, Müller M, Pütz M, Ferreiros N. "Spice" and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *J Mass Spectrom* 2009;44:832-837.