

Analytik der THC-Carbonsäure

Spezifische Detektion und hochsensitive Quantifizierung im Harn durch **NCI-GC/MS**



Dr. Hans-Ulrich Melchert*), Dr. Hans-Joachim Hübschmann**) und Ellen Pabel***)

Die bisherigen Methoden zur Quantifizierung von Tetrahydrocannabinol-Carbonsäure in Urin arbeiten in der Regel nur bei relativ hohen Konzentrationen genau. Für Analysen im unteren Picogramm- oder gar Femtogrammbereich sind sie daher in der Regel ungeeignet. Wir stellen hier eine Methode vor, die durch hohe Wiederfindungsraten und eine hochsensitive Detektion charakterisiert ist und sich zur sicheren Identifizierung und Quantifizierung der THC-Carbonsäure in Harnproben auch von Probanden mit geringer und unregelmäßiger Cannabis-Exposition eignet,



Für den sicheren Beweis des Gebrauchs von Cannabis-Produkten wird in der forensischen Analytik schon seit längerem der Nachweis von THC-Carbonsäure in Harnproben empfohlen. Als ein wesentliches Stoffwechselprodukt des aufgenommenen Wirkstoffs Tetrahydrocannabinol (THC) ist diese Substanz nach adäquater Probenvorbereitung sowohl qualitativ als auch quantitativ durch GC/MS- oder HPLC/MS-Messungen zuverlässig zu bestimmen [1-4] und so ein THC-Konsum eindeutig belegbar. Die bisher publizierten Analyseverfahren verwenden in der Regel die deuterierte THC-Carbonsäure als internen Standard und meist eine Festphasenextraktion mit unterschiedlichen SPE-Produkten zur Probenvorbereitung. Zur chromatographischen Trennung werden vorwiegend Trimethylsilylderivate eingesetzt. Zu den erreichten Wiederfindungsraten werden bisher jedoch nur unzureichende Angaben publiziert. Daher eignen sich die bisherigen Methoden meist nur für die sichere Identifizierung/Quantifizierung von THC-Carbonsäure in Harnproben sogenannter ‚heavy-user‘ mit einem eher regelmäßigen Gebrauch von Cannabis-Produkten. Für Analysen im unteren Picogramm-

oder gar Femtogrammbereich sind die bisherigen Methoden in der Regel ungeeignet. Das gilt insbesondere dann, wenn hohe Matrixbelastungen durch Störkomponenten (z.B. durch Arzneimittel und deren Stoffwechselprodukte) vorliegen, die Cannabisexposition eher gering ist und nur gelegentlich erfolgt.

Die nachfolgend vorgestellte Methode zeichnet sich durch hohe Wiederfindungsraten und eine hochsensitive Detektion durch Einsatz der negativen chemischen Ionisation (NCI) aus und eignet sich daher besonders für die sichere Identifizierung und Quantifizierung der THC-Carbonsäure in Harnproben bei epidemiologischen Studien mit Studienteilnehmern bei nur geringer und unregelmäßiger Cannabis-Exposition, wie es u.a. auch bei Kindern und Jugendlichen zutreffen kann. In der physiologischen Forschung und bei forensischen Fragestellungen [5] im Low-level-Expositionsbereich gegenüber Cannabis-Produkten sind ebenfalls hohe Wiederfindungsraten und eine hochsensitive Detektion wesentliche Voraussetzungen für zuverlässige analytische Aussagen.

Für die Detektion im NCI-Modus wird eine Derivatisierung der THC-Carbonsäure zum Te-

*) Analytical & Epidemiological Services, Berlin.

**) Thermo Fisher Scientific, Bremen.

***) Robert Koch-Institut, Berlin.

trahydrocannabinolcarbonsäure-HFBA-PFPOH-Derivat durchgeführt. Angesichts der hohen Spezifität der massenspektrometrischen Messungen ist diese Methode besonders geeignet, die Ergebnisse von enzymimmunologischen Screeningverfahren zu bestätigen oder zu verwerfen.

Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Geräte

Chemikalien

THC-Carbonsäure (THC-COOH), Cerilliant, Round Rock, TX, USA.
Deuterierte THC-Carbonsäure (THC-COOH-d9), Cerilliant, Round Rock, TX, USA.
2,2,3,3,3-Pentafluoro-1-propanol (PFPOH), Fluka/Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA), Macherey-Nagel, Düren, Deutschland.
KOH, p.a., Roth, Karlsruhe, Deutschland.
Isooctan, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland.
Toluol, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland.
Methanol, LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Deutschland.
Eisessig, Merck, Darmstadt, Deutschland.

Verbrauchsmaterialien

Extrelut NT 1 Extraktionssäulen, Merck, Darmstadt, Deutschland.
Auslauf-Kanülen Sterican 0,60 x 30 mm 23G x 1 1/4", Merck,

Darmstadt, Deutschland.

Geräte

Spitzgläschen für 10 ml mit 14,5 Normschliff, Glasbläseranfertigung.
Certaflaschen, Promochem, Wesel, Deutschland.
Probengläser, N 11-1 HP/Vials Agilent-Technologies, Waldbronn, Deutschland.
Gewinde-Mikroflaschen, konisch ND 8, 1,1 ml, Theodor Geyer, Berlin, Deutschland.
Evaporator: Vortex-Evaporator, Buchler Instruments, Labconco, Kansas City, MO, USA.
GC/MS-System: DSQ II mit CTC-PAL Probengeber, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland (Bild 2).

GC-Trennsäule: Rtx-5Sil MS 30 m x 0,25 µm mit 10 m Integraguard, Restek GmbH, Bad Homburg, Deutschland.
Reaktandgas für die NCI-Messungen: Methan 4.5, Messer Griesheim GmbH, Krefeld.

Kontrollmaterial

Medidrug Drug U-Confirmation Cut-off - 25 % und Medidrug BTM U-Screen, Medichem, Steinbronnen, Deutschland.

Probenvorbereitung

Hydrolyse: Da die THC-Carbonsäure in Form ihrer Konjugate im Harn vorliegt, ist vor der Extraktion eine Hydrolyse erforderlich. 1 ml der Harnprobe wird in einem Probenglas mit 20 µl der Lösung des internen Standards (entsprechend 100 ng deuterierte THC-Carbonsäure in Methanol; Aufbewahrung der Stammlösung erfolgt bei Kühlschranktemperatur in Certaflaschen) versetzt und nach Zusatz von 100 µl 12N KOH mit einer Aluminiumbördelkappe und Septum verschlossen. Zur Hydrolyse wird die Mischung für 20 min auf 60 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden 350 µl Eisessig zugesetzt. Der pH-Wert sollte vor der Extraktion <4 sein.



Bild 1: Verwendete Glasgefäße (von links nach rechts: Certaflasche, Spitzglas mit 14,5 Normschliff, Probenglas mit Aluminiumbördelkappe und Septum, Mikroflasche mit Schraubverschluss und Septum).

Extraktion: Die hydrolysierte Harnprobe wird vollständig auf eine Extrelut NT1-Extraktionssäule aufgebracht. Nach einer Wartezeit von 5 Minuten wird die Extraktion mit 1 x 4 ml und nachfolgend mit 1 x 2 ml Isooctan vorgenommen. Die vereinigten Extrakte werden im Spitzgläschen (siehe Bild 1) gesammelt und im Vortex-Evaporator zur Trockene abgedampft.

Derivatisierung: Zur Derivatisierung werden nach vollständiger Überführung des Extraktionsrückstands 50 µl Pentafluorpropanol und 80 µl Heptafluorbuttersäureanhydrid



Bild 2: GC/MS-System DSQ II mit CTC PAL-Probengeber.

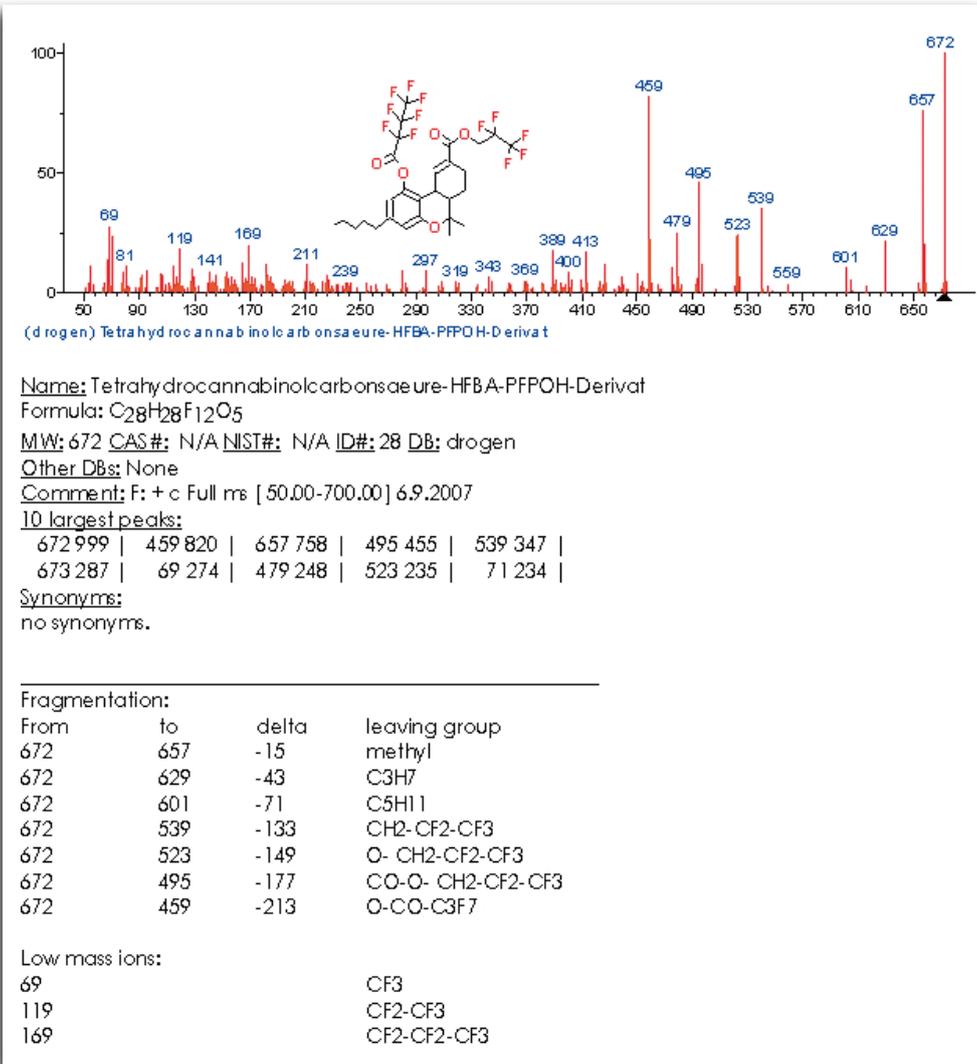


Bild 3: EI-Massenspektrum der derivatisierten THC-Carbonsäure.

zugesetzt. Die Derivatisierung erfolgt bei 65 °C für 20 min in einem mit Aluminiumbördelkappe und Septum verschlos-

senen HP-Probenglas. Nach der Derivatisierung werden die Derivatisierungsmittelrückstände im Vortex-Evaporator restlos ab-

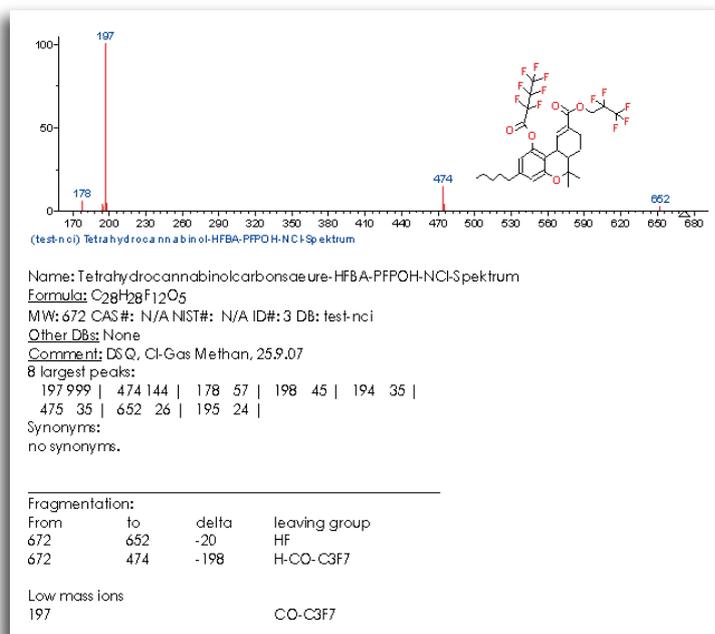


Bild 4: NCI-Massenspektrum der derivatisierten THC-Carbonsäure.

gedampft und der verbleibende Rückstand in 200 µl Toluol in einer Gewinde-Mikroflasche für die Injektion ins GC/MS-System aufgenommen.

GC/MS-Bedingungen: GC-Arbeitsbedingungen: Trägergas Helium 5.0, constant-flow-mode. PTV-Injektor im Splitless-Modus, Injektionstemperatur: 90 °C, Transfer-Rate: 10 °C/s, Transfer-Temp.: 200 °C. Ofenraum: 70 °C für 1 min, mit 40 °C/min auf 200 °C, weiter mit 20 °C/min auf 265 °C, Halten der Endtemperatur für 3,5 min.

Transfer-Leitung: 285 °C.

Probengeber: CTC PAL mit 10 µl Hamiltonspritze, 1 µl Injektionsvolumen.

MS-Arbeitsbedingungen: Ionisierungsmodi: EI und NCI im SIM-Modus (registrierte Massen m/z 197, 474 und 483). Reaktandgas: Methan 4.5. Reaktandgasfluss: 1,2 ml/min. Quellentemperatur: 230 °C. Ionisierungsenergie: 70 eV.

Ergebnisse

Massenspektren und GC-Trennung: Die Bilder 3 und 4 zeigen das EI- bzw. NCI-Massenspektrum der derivatisierten THC-Carbonsäure mit einigen Erläuterungen zu den registrierten Fragmenten. Einen Ausschnitt eines im NCI-Modus registrierten Chromatogramms einer aufgearbeiteten Harnprobe mit 50 pg THC-Carbonsäure und 500 pg deuterierte THC-Carbonsäure pro µl injizierter Probenlösung zeigt das Bild 5 mit den Darstellungen der Spuren für den Totalionenstrom bzw. den spezifischen MS-Spuren für die deuterierte (m/z 483) und die native (m/z 474) derivatisierte THC-Carbonsäure. Eine für den Bereich von 25 bis 500 pg im NCI-Modus erstellte Kalibrationsgerade zeigt das Bild 6.

Qualitätskriterien: Für Messungen im NCI-Modus kann eine sichere Quantifizierung der THC-Carbonsäurederivate in aufgearbeiteten Harnproben mit einem Quantifizierungsgrenzwert (limit of quantitation, LOQ) von 1 pg z.B. bei Wahl der m/z-Fragmente 483 und 474 (S/N >10) gewährleistet werden. Der qualitative sichere Nachweis (limit of detection, LOD, S/N > 3

für die spezifischen Fragmente) ist bis in den mittleren Femtogrammbereich möglich. Für aufgearbeitete Harnproben, denen zwischen 15 und 65 ng THC-Carbonsäure/ml zugesetzt waren, wurden Wiederfindungsraten von 85 bis 95 % ermittelt. Die Präzision in der Serie lag bei THC-COOH-Konzentrationen von 100 pg/µl injizierter Lösung bei < 1,5 %. In einem Zeitraum der praktischen Nutzung der Methode von mehr als sechs Monaten mit über 1000 Injektionen für die zu messenden Substanzen lag die Reproduzierbarkeit der Retentionszeit für die THC-Carbonsäurederivate bei $\pm 0,5$ % innerhalb eines Tages und bei ± 3 % über einen Zeitraum von sechs Monaten. Voraussetzung für die Messungen im unteren Picogramm- bzw. mittleren Femtogrammbereich sind eine saubere Ionenquelle und saubere EI- bzw. NCI-Ion-Volumes, was durch den regelmäßigen Austausch des Ionsierungsgehäuses erreicht wird sowie regelmäßige Wartung des Injektionssystems durch Tausch der Insertliner. Der Tausch der Ion-Volumes ist durch das Werkzeug des DSQ II-Systems ohne Brechen des Hochvakuums in wenigen Minuten möglich und wurde innerhalb von sechs Monaten zweimal vorgenommen. Ein Wechsel des Insertliners war innerhalb von sechs Monaten nicht erforderlich.

Diskussion

Durch die hohen Wiederfindungsraten bei der Probenvorbereitung sowie die hochspezifische und hochsensitive GC/MS-Messung der fluorierten Derivate der THC-Carbonsäure im NCI-Modus sind im Gegensatz zu anderen bisher beschriebenen Verfahren zuverlässige Quantifizierungen bis in den unteren Picogrammbereich möglich. Eine sichere Identifizierung wird auch noch im Femtogrammbereich erreicht.

Die Massenspektren der fluorierten Derivate der THC-Carbonsäure und deuterierten THC-Carbonsäure wurden der massenspektrometrischen Arbeitsgruppe des National Institute of Standards and Technology

(NIST) übergeben und werden voraussichtlich in der nächsten Ausgabe der NIST-Library verfügbar sein.

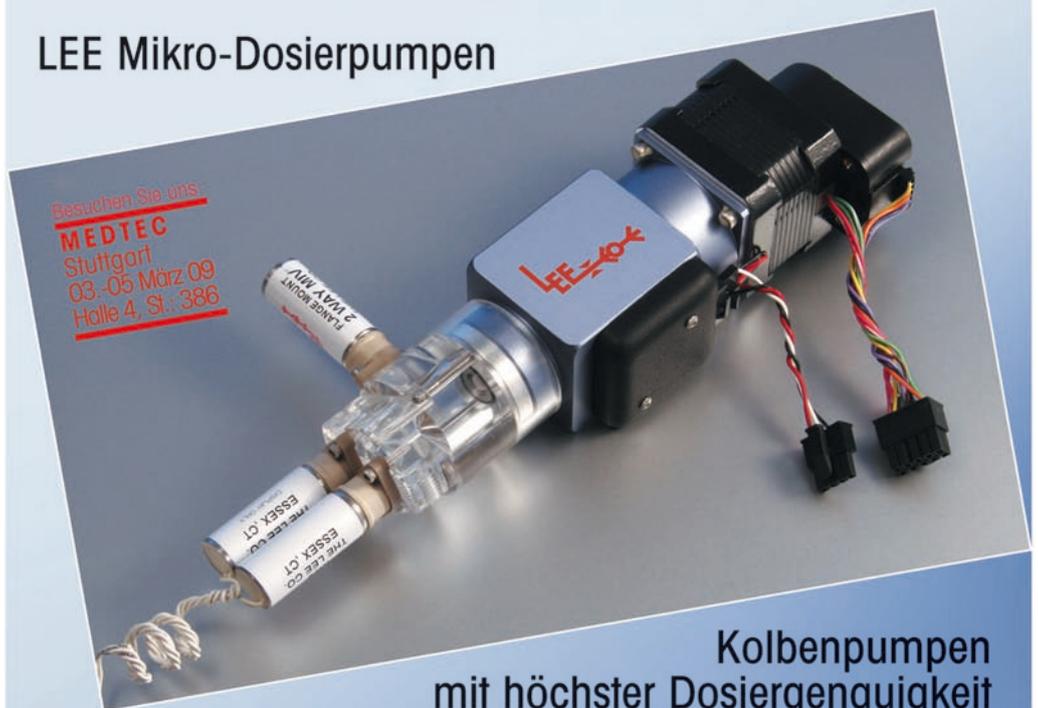
Da bereits länger bekannt ist, dass die häufig zu Screeningzwecken eingesetzten enzymimmunologischen Verfahren wie z.B. die EMIT-, Abuscreen- oder CEDIA-Tests zu klärungsbedürftigen Ergebnissen führen und insbesondere der CEDIA-Test im Low-level-Expositionsbereich häufig zu falsch negativen Ana-

lysenenergebnissen führen kann [6], stellt das hier beschriebene Analysenverfahren eine forensisch wichtige Ergänzung zu früheren Verfahren dar, um fehlerhafte Aussagen zu vermeiden.

Die Häufigkeit der Fragestellungen im Bereich der forensischen bzw. kriminologischen Analytik der Anwendung von Cannabis-Produkten wird in der Zukunft sicher eher zunehmen, da nach Mitteilungen auf

DIE NEUE GENERATION

LEE Mikro-Dosierpumpen



Kolbenpumpen mit höchster Dosiergenauigkeit

LPVA Präzisions-Kolbenpumpen mit integriertem Schrittmotor
 Dosierbereich: 0 - 50 / 250 / 750 / 1.250 / 3.000 µl
 Ein Vollhub aufgeteilt in 500 Schritte
 Separate Anschlüsse für Saug- und Druckseite

- Zur feineren Auflösung der Dosiergenauigkeit ist Mikrostepping möglich
- Unterschiedliche Werkstoffe für Pumpenkopf und Kolben sind verfügbar.
- Variationskoeffizient (Cv): 0,04% (mit Kompensation Spindelspiel). Genauigkeit 99,5 %.

Kleinste Bauform und geringstes Gewicht ermöglichen Installation nahe an der Abgabestelle.

Schlauchlängen und Totvolumen werden minimiert, Montage und Wartung vereinfacht.

LEE Hydraulische Miniaturkomponenten GmbH
 Postfach 1180 · 65796 Bad Soden
 Tel. 06196/7 73 69-0 · Fax 06196/7 73 69-69
 E-Mail info@lee.de · www.lee.de



Innovation in Miniatur

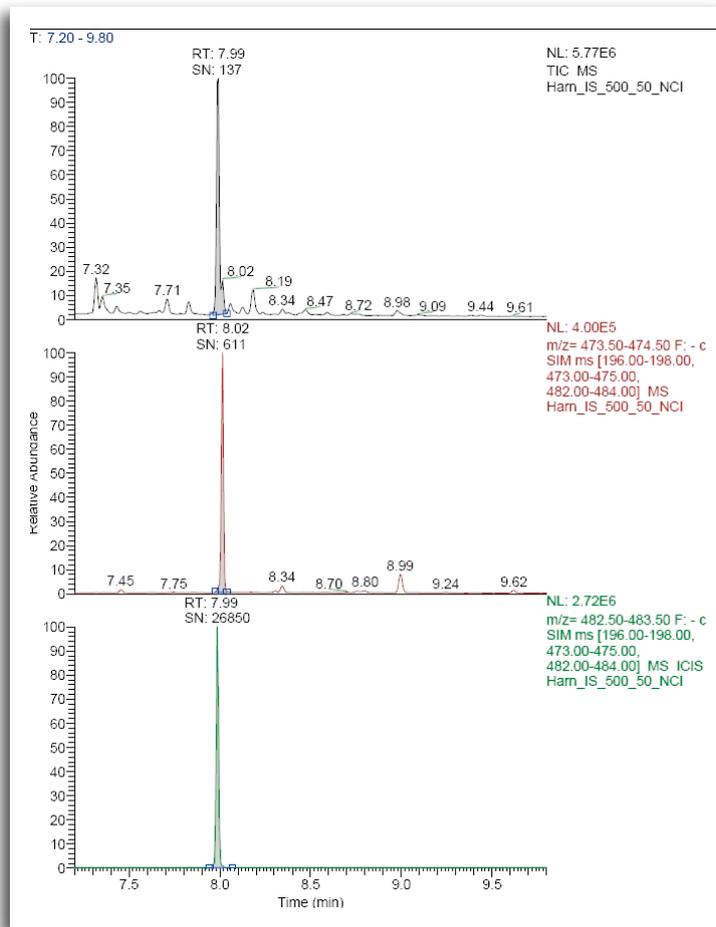


Bild 5: Massenfragmentogramm einer aufgearbeiteten Harnprobe mit ausgewählten Peaks für die deuterierte (m/z 483) und undeuterierte (m/z 474) THC-Carbonsäure und der Spur des Totalionenstroms (TIC).

einer Pressekonferenz des Bundeskriminalamts vom August 2008 sowohl der illegale ‚In-door‘- als auch der ‚Outdoor‘-Anbau von Hanfpflanzen in der Bundesrepublik Deutschland stark zugenommen hat [7]. Der

Drogenbericht 2008 der Drogenbeauftragten der Bundesrepublik Deutschland Sabine Bätzing [8] weist aus, dass der Gebrauch von Cannabisprodukten wohl nach wie vor ein Schwerpunkt der Drogenpolitik sein wird und

zu einem weiteren Ansteigen von THC-Carbonsäure-Analysen in dieser Qualität führen wird.

Literatur

- [1] Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M, Stadelmann AM, Roser P, Schefter T, Prags 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 Nov-Dec;29(8):782-9.
- [2] Teske J, Putzbach K, Engewald W, Müller RK. Determination of cannabinoids by gas chromatography-mass spectrometry and large-volume programmed-temperature vaporiser injection using 25 microl of biological fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002 Jun 5;772(2):299-306.
- [3] Huq S, Dixon A, Kelly K, Kallury KM. Novel solid-phase extraction protocol for 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol from urine samples employing a polymeric mixed-mode cation-exchange resin, Strata-X-C, suitable for gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A*. 2005 May 6;1073(1-2):355-61.
- [4] Maralikova 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 May;39(5):526-31.
- [5] Stout PR, Horn CK, Klette KL. Solid-phase extraction and GC-MS analysis of THC-COOH method optimized for a high-throughput forensic drug-testing laboratory. *J Anal Toxicol*. 2001 Oct;25(7):550-4.
- [6] Gustafson RA, Levine B, Stout PR, Klette KL, George MP, Moolchan ET, Huestis MA. Urinary cannabinoid detection times after controlled oral administration of delta9-tetrahydrocannabinol to humans. *Clin Chem*. 2003 Jul;49(7):1114-24.
- [7] <http://www.bka.de/pressemitteilungen/2008/pm080827.html>
- [8] http://www.bmg.bund.de/cln_110/nn_1196876/SharedDocs/Publikationen/DE/Drogen-und-Sucht/DrogenSucht-Bericht2008.html?__nnn=true

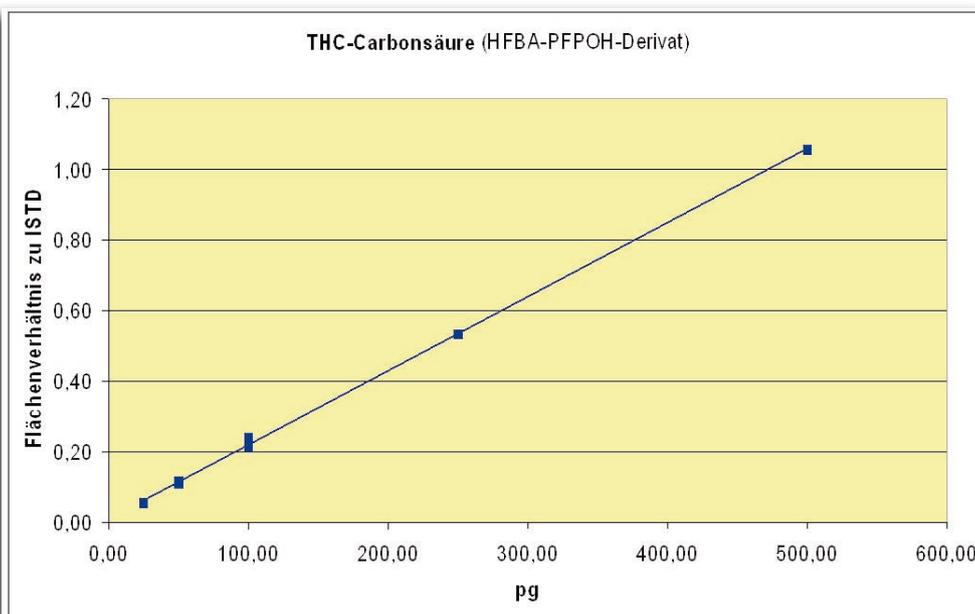


Bild 6: Kalibrationsgerade für die derivatisierte THC-Carbonsäure von 25...500 pg.

