

# Nichtwässrige derivative Headspace-Festphasenmikroextraktion in Verbindung mit GC-MS in der Haaranalyse – eine sensitive Methode zur Bestimmung von Cannabis- und Alkoholmissbrauch.

Johannes Schröder, Thomas Nadulski, Sandy Lehmann und Fritz Pragst

## Abstract

*Objective:* In general, headspace solid phase microextraction (HS-SPME) as a method of sample preparation of hair for drugs is performed from aqueous hair hydrolysates or hair extracts. Therefore, the method is limited to an extraction temperature below the boiling point of the aqueous phase (100-120 °C, depending on the salt content) and cannot be combined with in-sample derivatization by hydrolysable reagents. In order to overcome these limitations, new non-aqueous methods were developed using HS-SPME from dry hair extracts in combination with in-sample derivatization by for instance trimethylsulfonium hydroxide (TMSH), bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) or other reagents and were applied to analysis for THC, CBD, CBN, THC-COOH and ethyl glucuronide (EtG).

*Methods:* For analysis of the cannabinoids THC, CBD and CBN, the drugs were extracted from the alkaline hair hydrolysate with i-octane, the solvent evaporated and 10 µl BSTFA were added to the residue before analysis. In case of THC-COOH, the metabolite was first separated from the alkaline hair hydrolysate by SPE and the residue after evaporation was derivatized by a mixture of pentafluoropropionic anhydride (PFPA) and hexafluoro-i-propanol (HFIP). Ethylglucuronide was separated from the aqueous hair extract by SPE with an anion exchange column and the residue after evaporation of the eluate derivatized with HFBA. The analysis was performed by GC-MS with EI or NCI, or by GC-MS-MS with NCI in combination with HS-SPME, always using deuterated standards.

*Results:* After optimisation with respect to the amount of the derivatization reagent and the time and temperature of HS-SPME, the drugs or metabolites were determined from hair with detection limits of 0.01 ng/mg (THC, CBD and CBN), 0.1 pg/mg (THC-COOH) and 5 pg/mg (EtG). The advantages of the methods as compared to the direct extraction of the derivatized extracts were a clean-up effect of the HS-SPME step (exclusion of disturbing matrix constituents) and that a higher portion of the analytes can be brought into the GC-MS system.

*Conclusion:* The application of HS-SPME in hair analysis can be widely extended by performance from the dry hair extract. By combination with almost any derivatization reaction, non-evaporable substances such as EtG can be made accessible for headspace clean-up and enrichment on the fibre. In this way, increased sensitivity and less disturbances from the matrix can be achieved.

## 1. Einleitung

Alkohol und Cannabis sind die in Deutschland am häufigsten verwendeten Rauschdrogen. Ihre sichere und eindeutige Bestimmung ist daher wichtig für:

- Verkehrsrechtliche Fragestellungen, z.B. Fahren unter Alkohol oder Drogeneinfluß, § 24a StVG
- Arbeitsplatzüberwachung, „Workplace Testing“
- Forensische Fragestellungen
- Aufklärung von Abhängigkeiten

Von den Cannabinoiden sind für die Haaranalytik das psychoaktive  $\Delta^9$ -THC sowie das isomere Cannabidiol und das Oxidationsprodukt von  $\Delta^9$ -THC Cannabinol von besonderer Bedeutung. Im Fall von Cannabis kann eine stattgefundene aktive Drogenaufnahme nur durch den Nachweis des Metaboliten THC-Carbonsäure (THC-COOH) bewiesen werden, da die THC-COOH kein natürlicher vorkommender Bestandteil der Cannabis-Pflanze ist (Formeln s. Abb. 1).

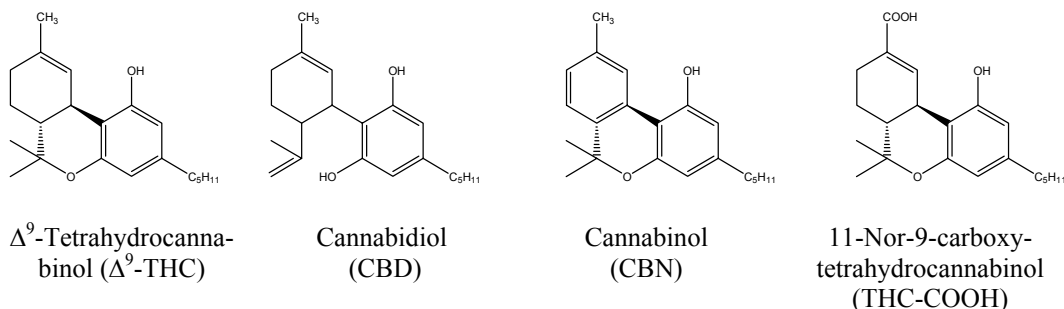


Abb. 1. Struktur einiger Cannabinoide

Im Fall des Alkoholkonsums sind ebenfalls Marker im Haar gefragt, die einen stärkeren Konsum eindeutig beweisen. Dazu gehören in erster Linie die Fettsäureethylester (FSEE, berechnet als Summe aus Ethylmyristat, Ethylpalmitat, Ethyloleat und Ethylstearat, die über das Sebum ins Haar eingelagert werden) und Ethylglucuronid (EtG).

EtG (Struktur s. Abb. 2) ist ein sehr hydrophiler Phase II-Metabolit des Ethanols und wird nur zu ca. 0,2-0,5% über die Uridindiphosphat-Glucuronyltransferase aus EtOH gebildet. Nach akutem Alkoholkonsum kann Ethylglucuronid bis zu 80 Stunden später noch im Urin nachgewiesen werden und ermöglicht den Nachweis in einem größeren Zeitfenster als die direkte Blutalkoholbestimmung. Erste Methoden zum Nachweis in Haaren wurden vor ca. 10 Jahren von Skopp entwickelt (1). Nach der Untersuchung einer größeren Anzahl an Haarproben wurde als vorläufige Unterscheidungsgrenze zwischen Alkoholabhängigen und Normaltrinkern ein Wert von 25 pg/mg Haar angenommen. Abstinenzler weisen typischerweise Werte unter 7 pg/mg Haar auf. Diese Angaben sind allerdings sehr kritisch zu betrachten, da auch Alkoholiker sehr geringe

Ethylglucuronid-Befunde aufweisen können (vgl. unten stehende Tabelle). Im Gegensatz dazu ist die Kategorisierung Abstinenzler – Normaltrinker – Alkoholiker für die Fettsäureethylester gelungen (2).

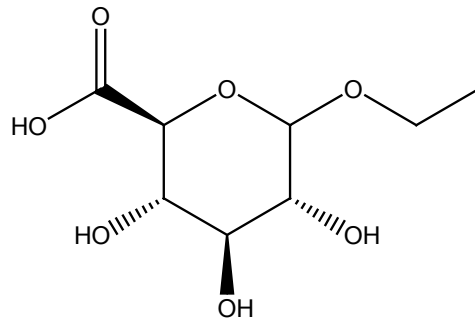


Abb. 2. Struktur von Ethylglucuronid (EtG)

## 2. Solid Phase Microextraction (SPME)

Für die o.g. Cannabinoide sowie für THC-COOH und Ethylglucuronid wurde eine – in Teilen neue - Methode zum Nachweis in Haaren entwickelt und in der vorliegenden Arbeit vorgestellt. Die Methode beruht auf dem Extraktionsprinzip der Festphasenmikroextraktion (SPME). Die SPME ist ein Extraktions-, Anreicherungs- und Injektionsverfahren, das 1989 von Pawliszyn entwickelt wurde. Ausführliche Applikationsübersichten siehe [1-3].

Üblicherweise wird in ein Headspace-Vial eine wässrige Lösung vorgelegt, die die zu bestimmenden Analyten enthält. In dieses Vial, das temperiert und geschüttelt werden kann, wird eine Faser eingeführt, die aufgrund ihrer Oberflächenbeschichtung durch Verteilungs- und Adsorptionseffekte die Analyten extrahieren und anreichern kann. Je nach Polarität, Größe und Lipophilie der Analyten werden unterschiedliche Polymere als Fasermaterial angewendet. Die in dieser Arbeit eingesetzten Fasern sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Darstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fasermaterialien

Fasermaterial	Abkürzung	Schichtdicke	Farbcode	Analyt
Polydimethylsiloxan	PDMS	100 µm	Rot	Cannabinoide
Carboxen/Polydimethylsiloxan	CAR/PDMS	75 µm	Schwarz	Ethylglucuronid
Polydimethylsiloxan/Divinylbenzol	PDMS/DVB	65 µm	Blau	THC-COOH

Neben der Extraktion aus dem wässrigen Medium hat sich besonders die Extraktion aus dem über dieser Lösung stehenden Kopfraum bewährt (Headspace Solid Phase Microextraction, HS-SPME). In der vorliegenden Arbeit wird eine HS-SPME-Methode vorgestellt, in der die Analyten nicht wie üblich in wässriger Lösung vorliegen, sondern sich als wasserfreier Rückstand einer vorangegangenen Flüssig-flüssig-Extraktion oder einer Säulenextraktion im festen oder öligen Zustand befinden. Gegenüber der Extraktion aus Wasser wird dadurch das Anwendungsspektrum deutlich erweitert.

Die Vorteile bestehen zunächst darin, dass eine einfache Kombination mit der Derivatisierung möglich ist. THC-Carbonsäure und Ethylglucuronid sind Analyte, die aufgrund ihrer Polarität und ihres geringen Dampfdruckes derivatisiert werden müssen.  $\Delta^9$ -THC, CBD und CBN sind auch ohne Derivatisierung detektierbar, allerdings verbessert die Derivatisierung die Sensitivität. Die Derivatisierung kann aber in der Regel nur in wasserfreiem, organischen Milieu erfolgen, da die Derivate und das Derivatisierungsreagenz im Wässrigen aufgrund von Hydrolyse nicht stabil sind. Die Extraktion aus dem Nichtwässrigen bietet weiterhin den Vorteil, dass die Temperatur über den Siedepunkt des Wassers hinaus erhöht werden kann. Auf diese Weise werden auch höhersiedende Analyte oder Derivate der HS-SPME zugänglich und die Anreicherung an die Faser kann weiter optimiert werden.

### 3. Derivatisierung

Wie oben dargelegt, müssen polare, hydrophile Substanzen mit geringem Dampfdruck für die Gaschromatographie derivatisiert werden, um detektierbar zu sein. Für alle anderen Stoffe, die funktionelle Gruppen mit einem aciden H-Atom tragen und im GC detektierbar sind, bietet die Derivatisierung folgende Vorteile:

- Erhöhung der thermischen Stabilität und des Dampfdruckes
- Erhöhung der Lipophilie
- Verbesserung der chromatographischen Eigenschaften (Peakform, Halbwertsbreite)
- Erhöhung der Molmasse zur besseren massenspektrometrischen Detektion
- Erhöhung der Elektronegativität bei chemischer Ionisierung in der GC-MS

Die in dieser Arbeit verwendeten Derivatisierungsreaktionen sind in Abb. 3 dargestellt. Die gebildeten Derivate erfordern aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur verschiedene Extraktions- und Detektionsprozeduren. Im folgenden sind die Vorschriften schematisch dargestellt.

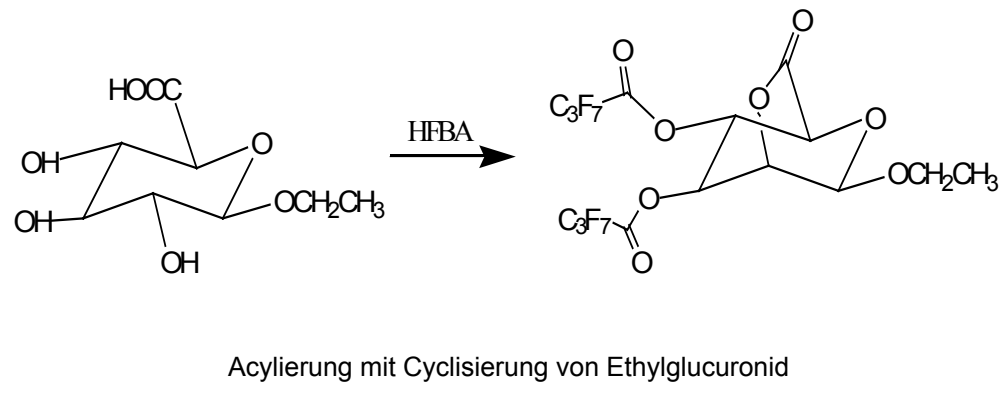
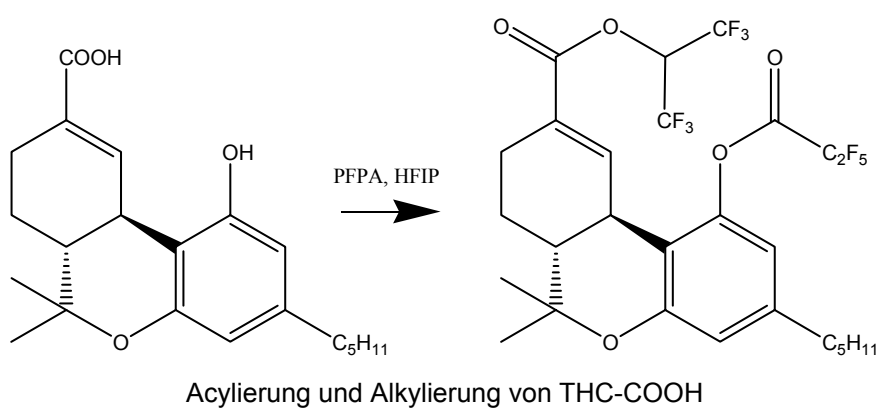
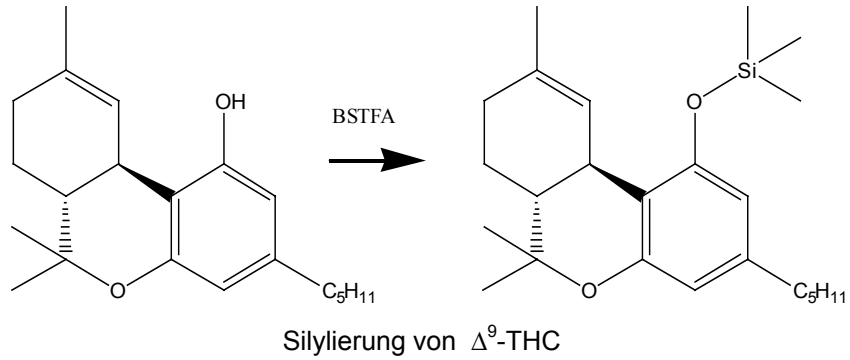


Abb. 3. Derivatisierungsreaktionen für Cannabinoide in Kombination mit HS-SPME. BSTFA = bis-N,O-trimethylsilyl trifluoroacetamide, HFBA = heptafluorobutyric anhydride, HFIP = hexafluoroisopropanol, PFPA = pentafluoropropionic anhydride.

#### 4. Bestimmung von $\Delta^9$ -THC , CBD und CBN aus Haarproben

Die Bestimmung der drei Cannabinoide kann nach folgender Vorschrift durchgeführt werden [4]:

- 15-30 mg Haar einwiegen
- Zusatz von 10 ng  $D_3$ - $\Delta^9$ -THC als interner Standard und 1 mL 1 N NaOH
- Hydrolyse bei 80°C für 20 min.
- Flüssig/flüssig-Extraktion mit 2 mal 2 mL iso-Octan
- Abblasen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom
- Zugabe von 10  $\mu$ L BSTFA
- Inkubation bei 125° C für 5 min.
- HS-Festphasenmikroextraktion bei 125°C für 20 min
- GC/EI-MS im SIM-Betrieb

Die Teilschritte sind auch in Abb. 4 veranschaulicht. Weitere experimentelle Details können [4] entnommen werden.

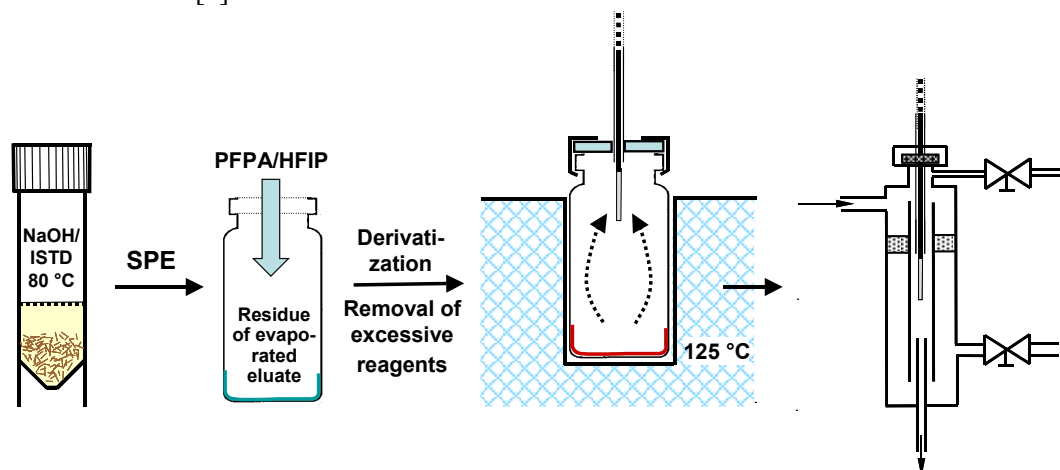


Abbildung 1: Probenvorbereitung zur Bestimmung von  $\Delta^9$ -THC , CBD und CBN

Die Anwendung der nicht-wässrigen derivativen Festphasenmikroextraktion ermöglicht den Nachweis von 10 pg  $\Delta^9$ -THC pro mg Haar, wie aus der Abbildung hervorgeht. Dargestellt ist das Target-Ion 371 sowie die Qualifier 386 und 303 für  $\Delta^9$ -THC resp. 374,389 und 306 für  $D_3$ - $\Delta^9$ -THC

#### 5. Bestimmung von THC-COOH aus Haarproben

Die Besonderheit bei diesem THC-Metaboliten besteht darin, dass er in extrem niedriger Konzentrationen ins Haar eingelagert wird. Entsprechend sind

Nachweisgrenzen von 0,1 pg/mg zu erreichen. Folgende Vorschrift wurde erarbeitet:

- 30-50 mg Haar einwägen
- Zusatz von 100 pg D<sub>3</sub>-THC-COOH als Interner Standard,
- alkalische Hydrolyse mit 10 N KOH/Methanol bei 80°C für 30 min.
- Einstellen auf pH 4 mit CH<sub>3</sub>COOH
- Aufreinigung mit SPE an Discovery DSC-18®-Kartuschen, Überführung in HS-Vials
- Abblasen des Lösungsmittels, Zugabe von 30 µL PFPA und 30 µL HFIP
- Derivatisierung bei 80°C für 30 min., Abblasen des Lösungsmittels
- HS-Festphasenmikroextraktion bei 125°C für 20 min.
- GC/NCI-MS

Die Arbeitsschritte der Vorschrift sind schematisch in Abb. 5 dargestellt.

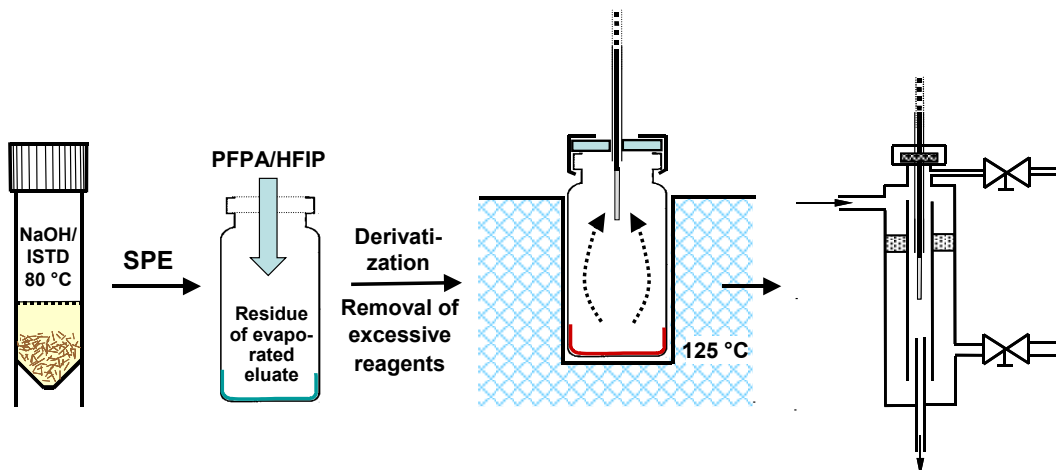
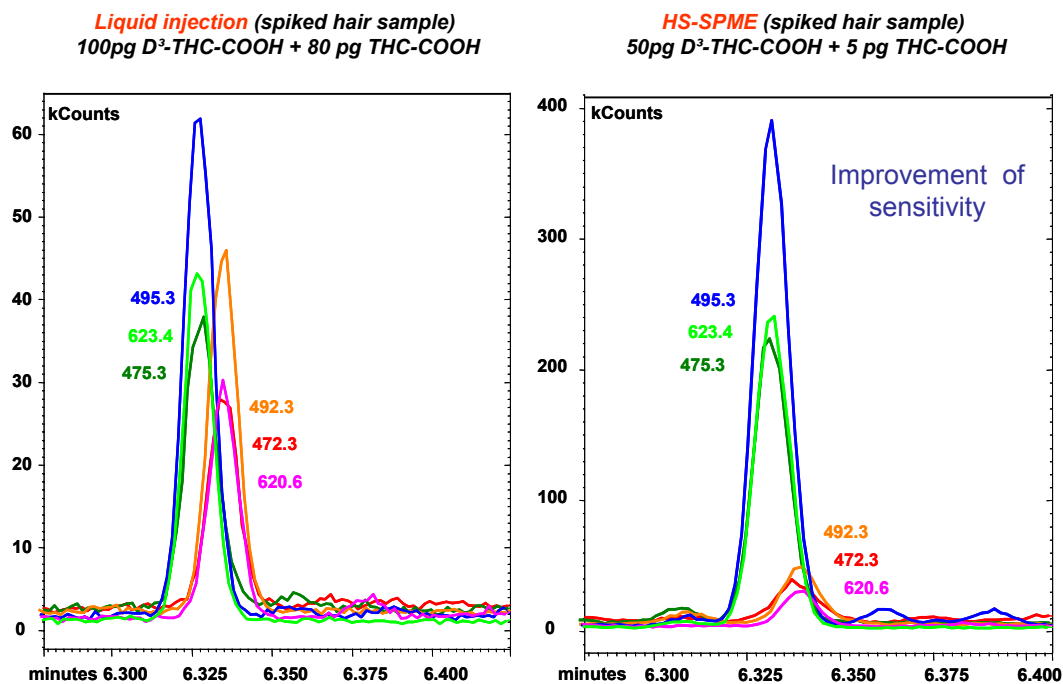


Abb. 5 : Bestimmung von THC-COOH durch derivative HS-SPME und GC-NCI-MS

Wie aus Abb. 6 ersichtlich ist, zeigt sich im Vergleich zur Flüssiginjektion die Verbesserung der Empfindlichkeit durch Erhöhung der absolut auf die GC-Säule gelangten Analytmenge und durch verringerte Matrixeffekte. Dargestellt sind das Target-Ion 492 sowie die Qualifier 472 und 620 für die derivatisierte THC-Carbonsäure resp. 495, 475 und 623 für die derivatisierte D<sub>3</sub>-THC-Carbonsäure.

## 6. Bestimmung von Ethylglucuronid aus Haarproben

Da bereits die Fettsäureethylester als Alkoholmarker mittels HS-SPME und GC-MS bestimmt werden, schien es sinnvoll, das gleiche Prinzip auch für Ethylglucuronid einzusetzen. Eine umfassende Darstellung der Möglichkeiten zur Bestimmung dieses Alkoholmarkers ist in [5] gegeben. Die einzelnen praktischen Stufen ergeben sich wie folgt



:

Abb. 6. Vergleich der Bestimmung von THC-COOH im Haar bei Flüssiginjektion und Headspace-SPME nach Derivatisierung mittels PFPA/HFIP

- 30-50 mg Haar
- Zusatz von 300 pg D<sub>5</sub>-Ethylglucuronid als Interner Standard und 2 mL Wasser
- Extraktion bei 60°C für 120 min im Ultraschall-Bad
- Aufreinigung mit SPE an Mixed-Mode-Anionenaustauscher-Kartuschen Oasis Max®
- Überführung in 10 mL-HS-Vial, Abblasen des Lösungsmittels
- Derivatisierung mit 100 µL HFBA bei 80°C für 20 min., Abblasen des Lösungsmittels
- HS-Festphasenmikroextraktion bei 105°C für 22 min.
- GC/NCI-MS

Die einzelnen methodischen Schritte sind schematisch in Abb. 7 dargestellt. Die Nachweisgrenze liegt bei diesem Verfahren bei 5 pg Ethylglucuronid pro mg Haar. Anhand der Tabellenwerte wird einerseits der große Wertebereich deutlich, andererseits wird aber auch ersichtlich, dass eine Korrelation mit den FSEE-Ergebnissen nicht besteht. Die beiden Parameter ergänzen sich jedoch gut und können als ein sicherer, retrospektiver Nachweis eines exzessiven Alkoholkonsums betrachtet werden. Tabelle 2 gibt die Ergebnisse des Vergleichs für sieben Haarproben von Fällen mit bekanntem exzessivem Alkoholkonsum wieder.



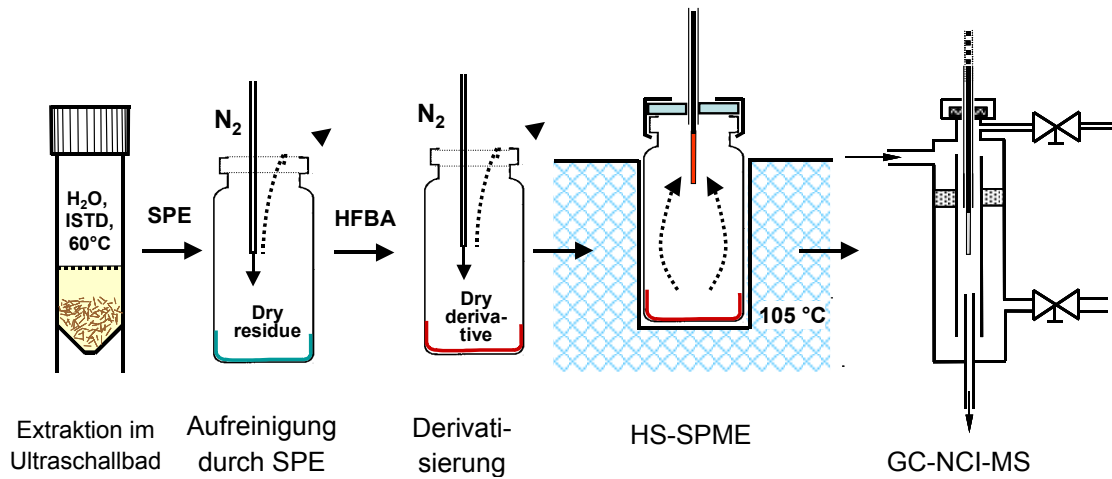


Abb. 7. Bestimmung von Ethylglucuronid im Haar durch Kombination von Ultraschallbad-Extraktion, Aufreinigung durch Festphasenextraktion, kombinierter Derivatisierung und SPME sowie GC-NCI-MS.

Tabelle 2: Haarproben von Freiwilligen mit bekanntem exzessivem Alkoholgenuß. Zum Vergleich wurden die Fettsäureethylester mit bestimmt

Labor-Nr.	EtG [pg/mg]	FSEE [ng/mg]
601-06	113,8	1,75
607-06	1413,7	9,17
608-06	135,5	9,43
618-06	274,1	2,52
621-06	160,8	9,25
625-06	657,6	6,45
632-06	7,8	1,48

## 7. Schlussfolgerungen

In den hier vorgestellten Methoden wird die Headspace-Festphasenmikroextraktion als ein Verfahren zur kombinierten Aufreinigung von Extrakten, Derivatisierung und Injektion in das GC-MS-System eingesetzt. Es ergeben sich folgende Vorteile:

- Die Headspace-Festphasenmikroextraktion aus einem trockenen Haar-Extrakt erschließt einen erweiterten Anwendungsbereich bei zeitsparender Probenvor-

bereitung. Hauptvorteil gegenüber der Flüssiginjektion ist dabei der Empfindlichkeitsgewinn durch Ausschluss schwerflüchtiger Matrixbestandteile und die hohe und selektive Anreicherung der Analyte an der Faser.

- Das wasserfreie Medium ermöglicht die Kombination der HS-SPME mit sehr vielen, auch hydrolyseempfindlichen Derivatisierungsreagenzien. Dadurch werden selbst nicht-flüchtige Substanzen wie EtG und THC-COOH für die Headspace- Aufreinigung und -Anreicherung an der Faser zugänglich gemacht. Neutrale Derivatisierungsreagenzien stören nicht bei der Injektion und können im HS-Vial verbleiben.
- Die höchsten Empfindlichkeiten werden durch die Kombination von stark elektronegativen Derivatisierungsreagenzien wie HFBA oder PFPA und GC/NCI-MS erhalten. Die Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht eine weitere Verbesserung.

## Literatur

- [1] Pawliszyn, J. Applications of Solid Phase Microextraction. Cambridge : RSC Chromatography, 1999.
- [2] Pawliszyn, J.. Solid Phase Microextraction - Theorie and Practice. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, : Wiley VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1997.
- [3] Pragst, F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. Anal Bioanal Chem. 388, 2007, Bd. 7, S. 1393-1414.
- [4] Nadulski T, Pragst F. Simple and sensitive determination of delta(9)-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B 846 (2007) 78-85.
- [5] Pragst F, Yegles M. Determination of Fatty Acid Ethyl Esters (FAEE) and Ethyl Glucuronide (EtG) in Hair – a Promising Way for Retrospective Detection of Alcohol Abuse During Pregnancy? Ther. Drug Monit., accepted for publication.

Oberfeldapotheker Johannes Schröder  
Sandy Lehmann  
Zentrales Institut des Sanitätsdienstes  
der Bundeswehr  
Scharnhorststr. 74  
D-10115 Berlin

Dr. rer. nat. Thomas Nadulski,  
Prof. Dr. Fritz Pragst  
Institut für Rechtsmedizin  
Charité - Universitätsmedizin Berlin  
Hittorfstr. 18  
D14195 Berlin