

Untersuchung zur Existenz von THC-Carbonsäureethylester THC-COOEt in Blut- und Haarproben als Marker für kombinierten Alkohol- und Cannabismissbrauch.

T. Nadulski, J. Schröder, S. Bleeck, W.-R. Bork und Fritz Pragst

Zusammenfassung

In Analogie zum bereits intensiv untersuchten Cocaethylen, als Marker für gleichzeitigen Missbrauch von Cocain und Alkohol, wurde untersucht, ob sich nach gleichzeitigem Konsum von Cannabis und Alkohol ein gemischter Drogenmarker, der THC-Carbonsäureethylester THC-COOEt, in Blut- und Haarproben nachweisen lässt. Nach der Synthese von THC-COOEt und seinem deuterierten Analogon aus den jeweiligen freien THC-Carbonsäuren, wurden zwei analytische Verfahren unter Anwendung von Festphasenextraktion SPE bzw. Festphasenmikroextraktion SPME und Gaschromatographie-Massenspektrometrie GC-MS entwickelt, um den kombinierten Drogenmarker in Blut- bzw. Haarproben mit empfindlichen Nachweisgrenzen bestimmen zu können. Des Weiteren wurden Inkubationsversuche mit humanem Vollblut durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich der THC-COOEt in-vitro aus freiem Ethanol und der THC-Carbonsäure bildet bzw. ob ein enzymatischer Abbau des THC-COOEt stattfindet. Die Untersuchung zahlreicher Blut- bzw. Haarproben von Probanden, welchen im Rahmen einer Strassenverkehrskontrolle durch den Nachweis von THC und Alkohol im Blut ein aktueller Alkohol- und Cannabismissbrauch bereits nachgewiesen wurde bzw. von Probanden, bei denen durch den Nachweis von Fettsäureethylestern FSEE und THC im Haar ein chronischer Alkohol- und Cannabisabusus belegt wurde, ergab keinen Hinweis auf die Bildung oder die Existenz des gemischten Markers für Alkohol- und Cannabismissbrauch THC-COOEt innerhalb der erzielten Nachweisgrenzen.

1. Einleitung

Von zahlreichen Carbonsäuren, z.B. Fettsäuren, ist bekannt, dass sie als Nebenstoffwechselweg des Ethanolabbaus Ethylester bilden können. Diese Nebenmetabolite, z.B. Fettsäureethylester FSEE [1-4] oder Ethylglucuronid EtG [5-8], werden bereits als Marker für chronisch exzessiven Alkoholabusus in Blut-, Urin- und Haarproben nachgewiesen. Als Besonderheit ist das Cocaethylen [9-12] anzusehen, welches aus Cocain bei zeitgleichem Genuss von Alkohol durch Umesterung gebildet wird und einen kombinierten Drogenmarker für Cocain und Alkohol darstellt.

THC wird metabolisch über das 11-OH-THC zu THC-COOH abgebaut [13-15], eine Carbonsäure, die ebenfalls für eine Veresterung in Frage kommt. In Analogie zum Cocaethylen bzw. den FSEE sollte daher untersucht werden, ob nach gleichzeitigem Konsum von Cannabis und Alkohol ein Ethylester der THC-COOH, der THC-Carbonsäureethylester THC-COOEt, im menschlichen Organismus gebildet wird und ob dieser in Blut- oder Haarproben nachweisbar ist.

Da THCCOOH nach Cannabiskonsum hohe Plasmakonzentrationen erreicht (~200ng/mL) und dieser Metabolit eine lange Halbwertszeit (~48h) im menschlichen Organismus besitzt, ist bei gleichzeitigem Alkoholkonsum eine Bildung des Ethylesters durch Carboxylasen oder Esterasen nicht unwahrscheinlich. Da dieser gemischte Drogenmarker im Gegensatz zur THC-COOH eine höhere Lipophilie besitzt und unter physiologischen Bedingungen als neutrales Molekül vorliegt, sollte eine Einlagerung in die Haarmatrix ähnlich gut erfolgen wie bei THC, sodass dieser THC-COOEt in höheren Konzentrationen im Haar nachweisbar wäre, als die THC-Carbonsäure selbst.

Da THC-COOEt bislang nicht untersucht wurde und auch nicht kommerziell verfügbar war, musste zunächst eine Synthese dieser Substanz erfolgen. Danach wurden Nachweismethoden für THC-COOEt in Blut- und Haarproben entwickelt und die Nachweisgrenzen ermittelt. Nach in-vitro Inkubationsversuchen wurden vitale Blut- und Haarproben von Probanden untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Synthese von THC-COOEt und D3-THC-COOEt

Um Methoden zum empfindlichen Nachweis des THC-COOEt in Blut- und Haarproben entwickeln zu können, bedurfte es zunächst der Synthese der Zielverbindung und eines deuterierten Analogons als internen Standard. Durch die Umsetzung von THC-Carbonsäure bzw. D3-THC-Carbonsäure mit Diazoethan in etherischer Lösung konnten die beiden Verbindungen nahezu quantitativ und ohne störende Verunreinigungen erhalten werden. Das Diazoethan wurde in situ durch Umsetzung von N-Ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin mit Kaliumhydroxid gebildet [16-18].

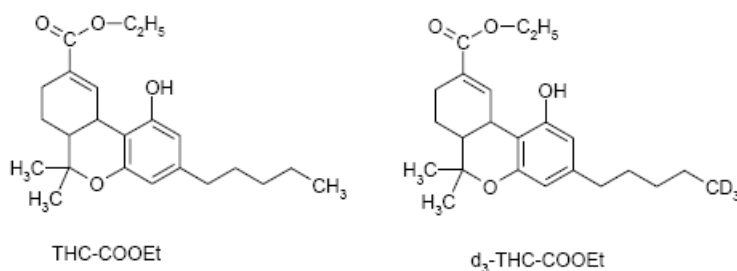


Abb.1. Struktur von THC-COOEt und D3-THC-COOEt

Die Analyse der beiden Substanzen mittels EI-GC-MS zeigte zum einen die Reinheit der Produkte und lieferte zum anderen typische EI-Massenspektren der bislang unbekanntenen Verbindungen (Abb. 2).

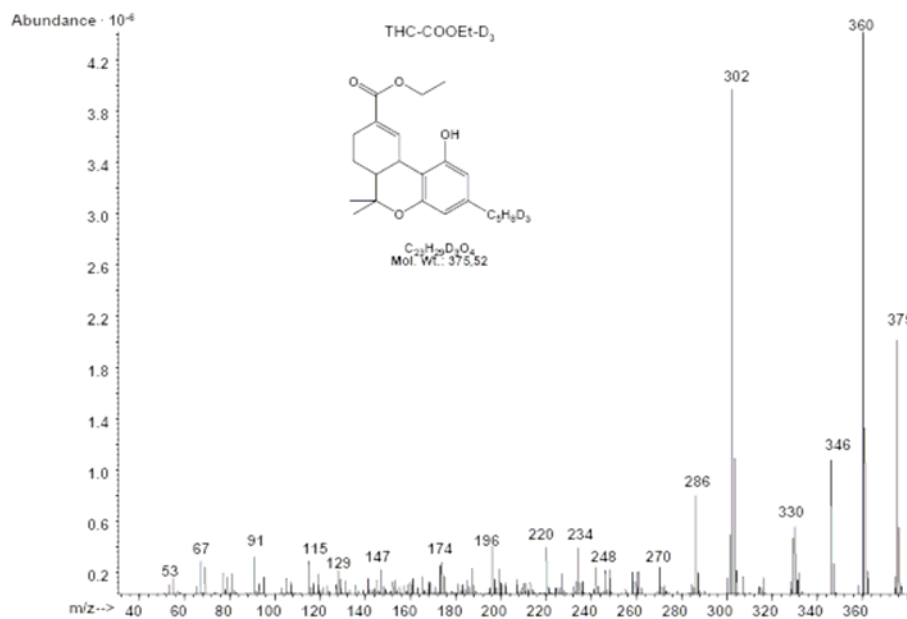
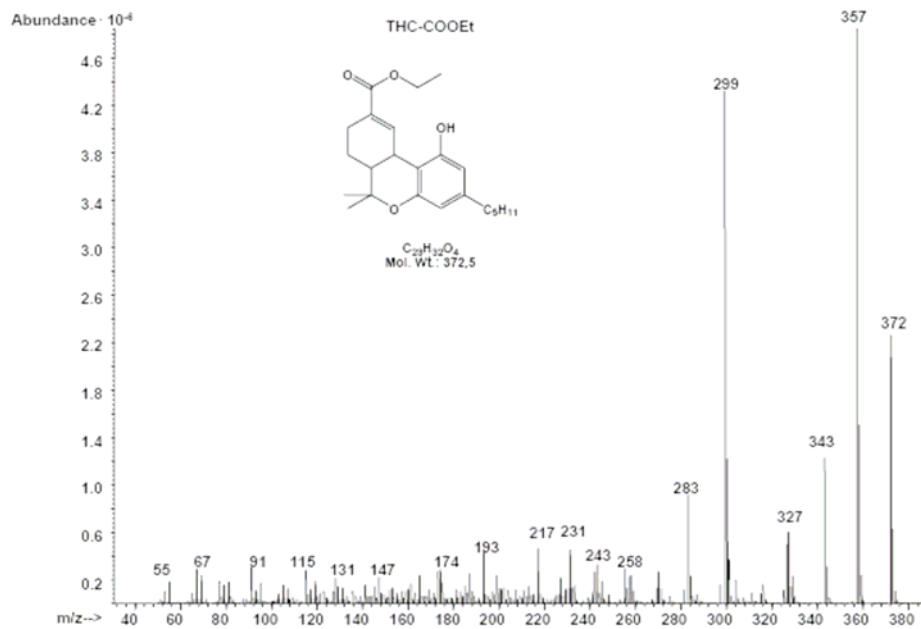


Abb. 2. EI-Massenspektren des THC-Carbonsäureethylesters THC-COOEt und des deuterierten THC-Carbonsäureethylesters D₃-THC-COOEt.

2.2 Inkubationsversuche/in-vitro-Experimente

Mittels in vitro Versuchen sollte anschließend untersucht werden, ob sich der Carbonsäureethylester THC-COOEt aus THC-COOH und Ethanol bildet und

wie stabil dieser Ester in Vollblutproben ist, da eine enzymatische Esterspaltung nach Blutentnahme, wie sie von Cocain bekannt ist, nicht auszuschließen war. Für die *in vitro* Versuche zur Bildung von THC-COOEt aus THC-COOH und Ethanol wurde frisch entnommenes Vollblut mit Ethanol und einer Lösung von THC-COOH versetzt, sodass die Konzentration 160ng/mL THC-COOH und 3mg/mL Ethanol betrug. Diese Blutprobe wurde fest verschlossen bei 38°C im Trockenschrank inkubiert. Nach 2,5, 5 und 10 Stunden wurde je ein Aliquot entnommen und es wurden die Konzentrationen an THC-COOH, EtOH und THC-COOEt ermittelt. In allen untersuchten Blutproben wurden Blutalkoholkonzentrationen von 3.1-3.3mg/mL und THC-COOH-Konzentrationen zwischen 160-174ng/mL nachgewiesen. Die leicht gegenüber den Sollwerten erhöhten Konzentrationen sind mit der Viskositäts-erhöhung des Vollblutes während der Inkubationsphase zu erklären. THC-COOEt wurde innerhalb der unter 2.3 ermittelten Nachweisgrenze nicht detektiert.

Für Cocaethylen ist bekannt, dass es sich unter den genannten Versuchsbedingungen aus Ethanol und Cocain in frisch entnommenem Vollblut bildet [9-12]. In einem weiteren Experiment wurde untersucht, wie stabil der THC-COOEt in einer Blutprobe ist. Dazu wurde frisch entnommenes Vollblut mit einer Lösung von THC-COOEt versetzt, sodass die Konzentration 20ng/mL betrug. Diese Vollblutprobe wurde dann bei 38°C im Trockenschrank inkubiert. Nach 0, 2,5, 5, 24 und 48 Stunden wurden Aliquots entnommen und mittels GC-MS auf THC-COOH und THC-COOEt untersucht. In allen untersuchten Blutproben wurden Konzentrationen an THC-COOEt zwischen 18.5-19.2ng/mL gemessen. Ein Ansteigen oder Abfallen der THC-COOEt Konzentration wurde nicht festgestellt. THCCOOH konnte auch nach 48h in keiner der untersuchten Blutproben nachgewiesen werden. Der THC-COOEt wurde in Vollblutproben nicht zu nachweisbaren Mengen an THC-COOH umgewandelt. Im Falle seiner Bildung sollte er daher in entnommenen Blutproben längere Zeit stabil sein.

2.3 Nachweis von THC-COOEt in Blutproben

Bei der Detektion von THC-COOEt in Blutplasmaproben sollten gleichzeitig auch THC, CBD, CBN sowie die THC-Metabolite 11-OH-THC und THC-COOH detektiert und quantifiziert werden. Als Ausgangspunkt wurde daher die bereits für pharmakokinetischen Untersuchungen entwickelte Methode zum Nachweis von THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD und CBN in Blutplasma [19] unter Anwendung von SPE als Extraktionsverfahren und anschließender Messung mittels GC-MS nach Derivatisierung mit BSTFA verwendet. Nach der Gewinnung der Blutplasmaproben erfolgte die Vorbereitung des Vollblutes für die Festphasenextraktion SPE. Die Derivatisierung wurde mit BSTFA durchgeführt. Bei der Detektion der Trimethylsilylderivate mittels GC-MS zeigte sich jedoch eine schlechte chromatographische Trennung der Derivate von THC-COOEt und THC-COOH. Deshalb wurden die Derivatisierungsreagenzien TMSH (Methylierung) und MBDSFTA (TBDMS-Derivate) getestet. Die beste chroma-

tographische Auftrennung der sechs Analyte erfolgte unter Verwendung von MBDSTFA.

Da die Messungen der ersten Blutproben von Probanden nach kombiniertem Alkohol- und Cannabiskonsum kein positives Ergebnis für THC-COOEt ergab, sollte die schon sehr empfindliche Methode nur für THC-COOEt allein noch weiter sensitiviert werden. Dazu wurde nach der SPE an C₁₈-Phasen eine Derivatisierung mit PFFA durchgeführt und das Pentafluorpropionylderivat mittels GC/NCI-MS detektiert. Das Massenspuren-Chromatogramm nach negativ-chemischer Ionisierung ist in Abb. 3 dargestellt

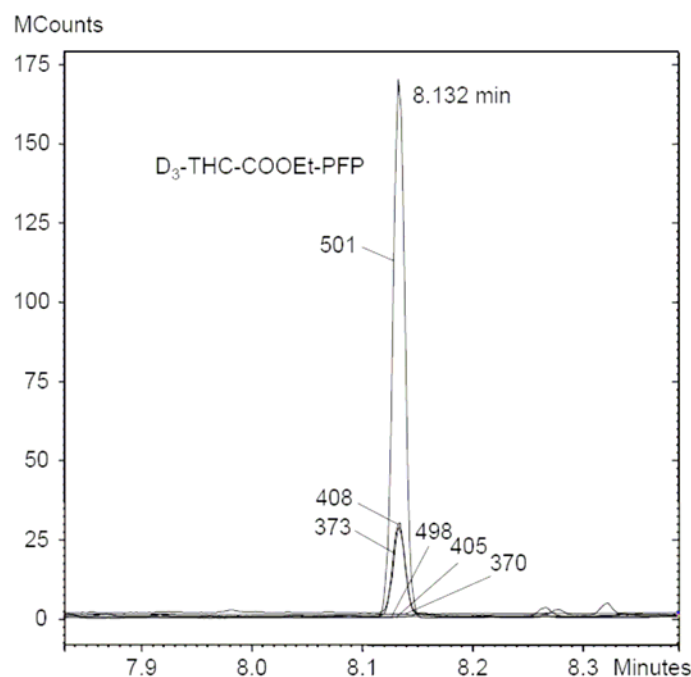


Abb. 3: Massenspuren-Chromatogramm von D₃-THC-COOEt und THC-COOEt nach NCI.

Für die entwickelten Methoden zur Analyse der Blutprobenextrakte auf THC-COOEt wurden für den Messbereich von 1-10ng/mL Nachweisgrenzen von 0.75ng/mL (EI) bzw. 0.30ng/mL (NCI) errechnet.

Mit der so entwickelten Nachweismethode für THC-COOEt in Blutproben wurden anschließend Proben von Probanden untersucht, bei denen bereits ein akuter Mischkonsum von Cannabis und Alkohol nachgewiesen wurde. Für die Untersuchung wurden einerseits vom Landeskriminalamt (LKA Berlin) Vollblutproben zur Verfügung gestellt, die Autofahrern im Rahmen einer Straßenverkehrskontrolle entnommen wurden und positiv auf Ethanol und Cannabinoide getestet wurden. Zum anderen wurden vier freiwilligen Probanden, welche regelmäßig Cannabis und Alkohol gleichzeitig konsumieren, Blutproben entnommen, nachdem diese innerhalb von vier Stunden Cannabis geraucht und alkoholische

Getränke zu sich genommen hatten. Alle Blutproben wurden wie oben beschrieben auf Cannabinoide, Alkohol und THC-COOEt untersucht. Die ermittelten Konzentrationen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Auf THC-COOEt untersuchte Blutproben.

Probe Nr.	Alkohol [mg/g]	THC [ng/ml]	11-OH-THC [ng/ml]	THC-COOH [ng/ml]
1	2.07	8.8	3.2	57.7
2	2.12	5.5	3.4	29.1
3	1.05	4.7	3.0	102.1
4	1.57	5.7	4.0	73.9
5	1.80	8.3	6.8	101.3
6	1.14	4.6	2.7	78.6
7	1.05	15.6	8.3	90.9
8	1.08	13.00	8.60	94.4
9	2.16	6.20	6.40	97.6
10	1.15	10.60	5.60	112.3

In keiner der mittels GC/NCI-MS untersuchten Blutproben konnte innerhalb der Nachweisgrenze von 0,30ng/mL der THC-COOEt nachgewiesen werden. Sollte diese Verbindung tatsächlich im menschlichen Körper gebildet werden, so liegt die Konzentration von THC-COOEt unterhalb der mit der entwickelten Methode erzielten Nachweisgrenze.

2.4 Nachweis von THC-COOEt in Haarproben

In Anlehnung an die bereits zum Nachweis von THC, CBD und CBN in Haarproben entwickelte HS-SPME Methode [20] wurde diese Methode weiterentwickelt bzw. abgewandelt, um auch THC-COOEt in Haarproben nachweisen zu können. Statt des alkalischen Aufschlusses der Haarmatrix mit NaOH wurde eine Ultraschall-Extraktion mit Puffer pH 7.6 und iso-Octan für 15 Stunden durchgeführt, um eine Esterspaltung unter alkalischen Bedingungen zu verhindern. Versuche der Ultraschallextraktion mit organischen Lösungsmitteln allein (n-Heptan, iso-Octan) oder kombinierte Lösungsmittlextraktion mit Dimethylsulfoxid als Quellmittel brachten schlechtere Ergebnisse der Extraktionsausbeute.

Auch die Verwendung von schwach saurem (pH 4.0) oder schwach alkalischem (pH 9.0) Puffer brachte schlechtere Extraktionsausbeuten. Das beste Ergebnis erhielt man mit Puffer pH 7.6 als Quellmittel und iso-Octan als Extraktionslösungsmittel.

Die Derivatisierung des so gewonnenen Haarextraktes erfolgte in Analogie zu den Blutproben mittels MBDSTFA. Für die SPME wurde dazu der Extrakt im Headspace-Gefäß eingedampft und das Derivatisierungsreagenz zugesetzt. Es wurden verschiedene SPME-Fasern getestet, um hohe Signalintensitäten und damit eine hohe Empfindlichkeit zu erreichen. Die besten SPME-Ergebnisse erhielt man bei Verwendung der 100µm PDMS-Faser (rot) bei einer Extraktion von 15Min. bei 95°C.

Da in den ersten mit dieser Methode untersuchten Haarproben kein THC-COOEt nachweisbar war, wurde in einer abgewandelten Methode der THC-COOEt allein mit PFPA derivatisiert und dieses Pentafluorpropionylderivat mit HS-SPME und GC/NCI-MS analysiert. Das NCI-Massenspektrum des THC-COOEt-PFP-Derivates ist in Abb. 4 dargestellt. Die überlagerten MS-MS-Übergänge von vier mit jeweils 10, 25, 50 und 100pg THC-COOEt dotierten Haarproben nach Extraktion, SPME und GC/NCI-MS-MS zeigt Abb. 5.

Die Nachweisgrenze, welche mit Hilfe der Valistat-Software im Konzentrationsbereich von 0.1-4pg/mg ermittelt wurde, betrug und 0.01pg/mg. Für die Untersuchung von Haarproben auf THC-COOEt wurden zum einen den vier freiwilligen Probanden, welche regelmäßig Cannabis und Alkohol zusammen konsumierten, Haarproben entnommen, zum anderen wurden asservierte Sektionshaarproben von

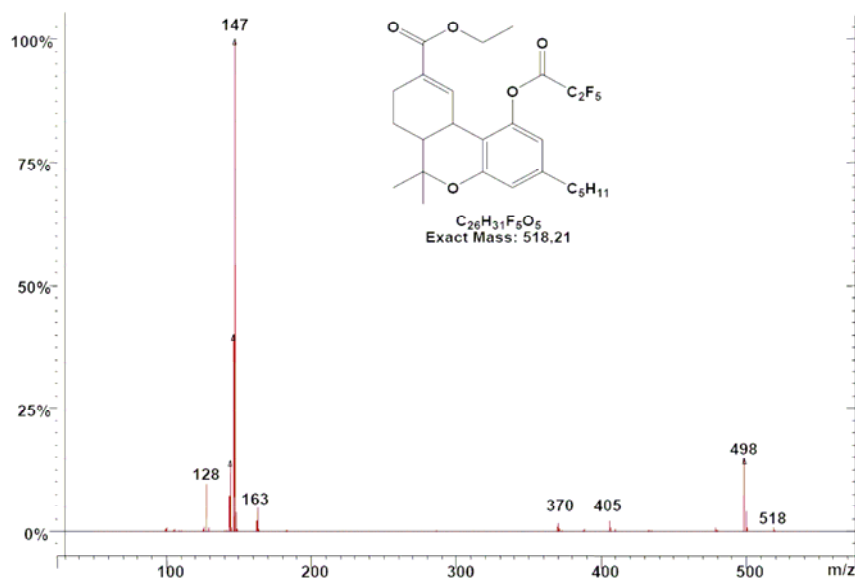


Abb. 4: NCI-Massenspektrum des THC-COOEt PFP-Derivates.

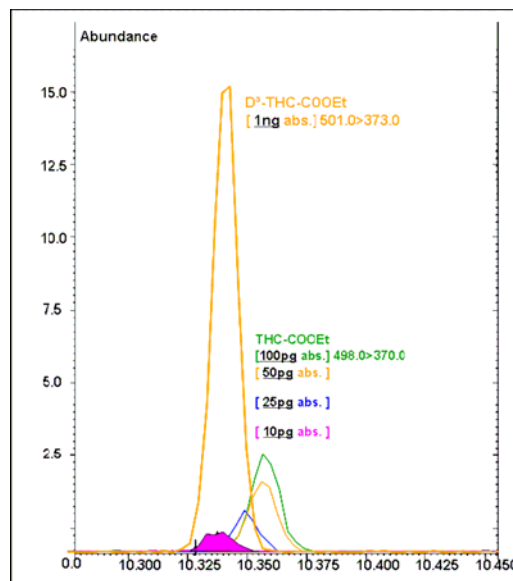


Abb. 5. NCI-MS-MS-Massenspuren von vier mit THC-COOEt dotierten Haarproben.

Todesfällen verwendet, welche bereits im Rahmen der forensischen Untersuchungen der Abteilung positiv auf THC und FSEE getestet wurden. Alle so gewonnenen Haarproben wurden wie oben beschrieben auf die Cannabinoide THC, CBD und CBN und auf Fettsäureethylester als Marker für chronisch exzessiven Alkoholabusus untersucht. Haarproben mit hohen Befunden an Cannabinoiden und FSEE wurden anschließend zusätzlich mittels HS-SPME und GC/NCI-MS auf THC-COOEt untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Haaranalysen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 2: Auf THC-COOEt untersuchte Haarproben.

Probe Nr.	CBD [ng/mg]	THC [ng/mg]	CBN [ng/mg]	C _{FSEE} [ng/mg]
1	1.92	0.48	0.38	0.80
2	5.19	0.51	0.80	6.30
3	2.02	1.52	0.36	0.90
4	0.04	0.18	0.09	0.49
5	3.62	1.63	0.46	0.34
6	1.92	0.73	0.37	0.80
7	0.09	0.24	0.28	6.30
8	0.19	0.32	0.80	0.90
9	2.01	1.04	0.36	0.31
10	0.09	0.24	0.09	0.49

Für die Untersuchung von Haarproben auf THC-COOEt wurden zum einen den vier freiwilligen Probanden, welche regelmäßig Cannabis und Alkohol zusammen konsumierten, Haarproben entnommen, zum anderen wurden asservierte Sektionshaarproben von Todesfällen verwendet, welche bereits im Rahmen der forensischen Untersuchungen der Abteilung positiv auf THC und FSEE getestet wurden. Alle so gewonnenen Haarproben wurden wie oben beschriebenen auf die Cannabinoide THC, CBD und CBN und auf Fettsäureethylester als Marker für chronisch exzessiven Alkoholabusus untersucht. Haarproben mit hohen Befunden an Cannabinoiden und FSEE wurden anschließend zusätzlich mittels HS-SPME und GC/NCI-MS auf THC-COOEt untersucht. Die Ergebnisse der durchgeführten Haaranalysen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

In keiner der untersuchten THC- und FSEE positiven Haarproben konnte der THC-COOEt innerhalb der ermittelten Nachweisgrenze von 0.01pg/mg nachgewiesen werden. Ein Beweis für die Existenz dieses gemischten Cannabis- und Alkoholmarkers konnte somit nicht erbracht werden.

3. Diskussion der Ergebnisse

Insgesamt konnte somit weder für die untersuchten Blutproben noch für die Haarproben der Beweis erbracht werden, dass der THC-COOEt nach kombiniertem Konsum von Alkohol und Cannabis im menschlichen Organismus metabolisch gebildet wird. Dieser Unterschied zum Cocaethylen lässt sich vor allem damit erklären, dass es sich bei der Bildung von Cocaethylen aus Cocain um eine Umesterungsreaktion handelt, während sich der THCCOOEt aus der unter physiologischen Bedingungen deprotonierten THC-Carbonsäure mit bedeutend geringerer Carbonyl-Aktivität bilden müsste. Schritte der metabolischen Aktivierung der THC-Carbonsäure, wie dies z.B. bei der Bildung von FSEE aus den Fettsäuren über Acyl-Coenzym A stattfindet, laufen offensichtlich nicht ab.

4. Literatur

- [1] Lange L.G., Bergmann S.R., Sobel B.E., *J. Biol. Chem.*, 256, 12968-12973, 1981.
- [2] Doyle K.M., Cluette-Brown J.E., Dube D.M., Bernhardt T.G., Morse C.R., Lapasota M., *JAMA*, 276, 1152-1156, 1996.
- [3] Moore C.J., Jones D., Lewis K., Buchi, *Clin. Chem.*, 49,133-136, 2003.
- [4] Auwarter V., Sporkert F., Hartwig S., Pragst F., Vater H., Diefenbacher A., *Clin. Chem.*, 47, 2003.
- [5] Skopp G., Schmitt G., Potsch L., Dronner P., Aderjan R., Mattern R., *Alcohol Alcohol*, 35, 3, 283, 2000.
- [6] Sachs H., *Research in Legal Medicine*, 16, 1, 119, 1997.
- [7] Janda I., Weinmann W., Kuehnle T., Lahode M., Alt A., *Forensic Sci Int*, 128, 1-2, 59, 2002.
- [8] Jurado C., Soriano T., Gimenez M. P., Menendez M., *Forensic Sci Int*, 145, 2-3, 161, 2004.
- [9] Dean R.A., Harper E.T., Dumauil N., Stoeckel D.A., Bosron W.F., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 117, 1-8, 1992.

- [10] Harris D.S., Everhart E.T., Mendelson J., Jones R.T., *Drug Alcohol Depend.*, 72, 169-182, 2003.
- [11] Wu A.H., Onigbinde T.A., Johnson K.G., Wimbish G.H., *J. Anal. Toxicol.*, 16, 132-136, 1992.
- [12] Bourland J.A., Hayes E.F., Kelly R.C., Sweeney S.A., Hatab M.M., *J. Anal. Toxicol.*, 24, 489-495, 2000.
- [13] Manno J.E., Manno B.R., Kemp P.M., Alford D.D., Abukhalaf I.K., McWilliams M.E., Hagaman F.N., Fitzgerald M.J., *J Anal Toxicol.*, 25(7), 538-49, 2001.
- [14] Lin D.L., Lin R.L. , *J Anal Toxicol.*, 29(1), 58-61, 2005.
- [15] Kelly P., Jones R.T., *J Anal Toxicol.*, 16(4), 228-35, 1992.
- [16] Schlenk, H., Gellerman, J.L., *Anal. Chem.*, 32 1412-14, 1960.
- [17] Joh, Y., Makino, K., Watanabe, A., *Jikeikai Medical Journal*, 10(3), 121-3, 1963.
- [18] McKay, A.F., *J Am Chem Soc*, 71, 1968-70, 1949.
- [19] Nadulski T., Sporkert F., Schnelle M., Stadelmann A.M., Roser P., Schefter T., Pragst F., *J Anal Toxicol.*, 29(8), 782-9, 2005.
- [20] Nadulski T., Pragst F., *J. Chromatogr. B*, 846 (1-2), 78-85, 2006.

Dr. rer. nat. Nadulski
 Simona Bleeck
 Prof. Dr. Fritz Pragst
 Institut für Rechtsmedizin
 Charité – Universitätsmedizin Berlin
 Hittorfstraße 18
 D-14195 Berlin
 E-Mail: fritz.pragst@charite.de

Dr. rer. nat. Wolf-Rainer Bork
 Landeskriminalamt Berlin
 Abteilung Kriminaltechnik
 Tempelhofer Damm 12
 12101 Berlin

Johannes Schröder
 Zentralinstitut des Sanitätsdienstes
 der Bundeswehr Kiel
 Außenstelle Berlin
 Scharnhorststr. 14
 10115 Berlin