

## Determination of 'Spice' Cannabinoids in Serum and Hair by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Merja A. Neukamm<sup>1+2</sup>, Hans Sachs<sup>3</sup>, Thomas E. Mürdter<sup>4</sup>, Susanna Fehn<sup>5</sup>, Thomas Pöhlmann-Moore<sup>6</sup>, Heinz-Dieter Wehner<sup>1</sup>, Cornelius Knabbe<sup>1</sup>, Dieter Ratge<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Robert-Bosch-Krankenhaus, Zentrum für Diagnostische Medizin, Auerbachstr. 110, D-70376 Stuttgart

<sup>2</sup> Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, D-79104 Freiburg

<sup>3</sup> Forensisch Toxikologisches Centrum, Bayerstr. 53, D-80335 München

<sup>4</sup> Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie und Universität Tübingen, Auerbachstr. 112, D-70376 Stuttgart

<sup>5</sup> Bayerisches Landeskriminalamt, Mailingstr. 15, D-80636 München

<sup>6</sup> Isar-Amper-Klinikum, Vockestr. 72, D-85540 Haar

---

### Abstract

**Aim:** 'Spice' and similar products are declared as herbal mixtures with intended use as incense or as plant growth modulator. However, consumers that smoked the herbal mixtures got intoxicated. Herbal mixtures e.g. Flower-Power, Blaze, Bonzai Winter-Boost, New Jamaican gold, LAVA red contain synthetic cannabinoids. The purpose of our work was to develop a fast and easily performed method for the routine screening of serum and hair for the synthetic cannabinoid ingredients of 'Spice' mixtures and for the quantification of JWH-018 in serum and hair.

**Methods:** The synthetic cannabinoids were extracted from 50 mg hair by ultrasonification in methanol. For the detection of the synthetic cannabinoids in serum, a fully automated solid phase extraction was applied after addition of the internal standard d7-JWH-018. The serum and hair extracts were analysed on a Waters Alliance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry system with Micromass Quattro micro API Triple-quadrupol. Two transitions in 'multiple reaction monitoring' mode and the retention time were used to provide unambiguous identification of a substance.

**Results:** The synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH-250 and CP 47,497-C8-derivative can be determined in blood and hair by the reported method. 37 blood samples of alleged 'Spice' consumers were tested positive for one or more of these synthetic cannabinoids and also 14 hair samples were positive. The highest concentration of JWH-018 was ca 68 ng/ml in serum and ca 119 pg/mg in hair. The limit of detection and lower limit of quantification (DIN 32645) for serum were 0.2 ng/ml and 0.6 ng/ml respectively. The limit of detection and lower limit of quantitation for hair were 0.09 pg/mg and 0.17 pg/mg.

**Discussion and Conclusion:** The synthetic cannabinoids of 'Spice' and similar products have been successfully determined in serum and hair by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in forensic cases. This determination of psycho-active Spice ingredients presents the basis for the evaluation of the influence of a drug or for the assessment of abstinence from drugs.

## 1. Einleitung

Kräutermischungen vom Typ Spice wie z.B. Spice Arctic Synergy, Spice Silver, Spice Gold, Sence, Space Rubin, Genie, Silent Black, Blaze, Flower Power, Bonzai, New Jamaican Gold oder LAVA red werden in kleinen Plastiktütchen zu 1 – 3 Gramm verkauft. Laut Angabe auf der Verpackung sollen die Kräuter z.B. als Wachstumsregulator für Pflanzen (Bonzai Winter Boost: Plant Growth Regulator) angewandt werden, oder sollte zur Raumluftverbesserung dienen (Blaze oder Jamaican Gold: A Potent Pot Pourri). Beim Rauchen der Kräuter entfaltet sich jedoch eine typische cannabinoide Wirkung. Als Wirkstoffe von „Spice“-Kräutermischungen wurden synthetische Cannabinoide identifiziert wie z.B. JWH-018 und CP 47,497-homologe [1].

Das deutsche Betäubungsmittelgesetz (BtmG) beinhaltet in Anlage II folgende synthetischen „Spice“-Cannabinoide: JWH-018, JWH-019, JWH-073 und CP 47,497-homologe (Stand: April 2011). Der Sachverständigenausschuss für Betäubungsmittel hat im Dezember 2010 vorgeschlagen auch die synthetischen Cannabinoide JWH-015, JWH-081, JWH-122 ins BtmG aufzunehmen. Bei den synthetischen Cannabinoiden aus „Spice“-Kräutermischungen handelt es sich somit um berauschende Mittel im Sinne des § 315c, 316 StGB.

Wer also eine „Spice“-Kräutermischung, welche synthetische Cannabinoide beinhaltet, raucht, dürfte zumindest kurzfristig nach dem Konsum nicht in der Lage sein, ein Kraftfahrzeug im Straßenverkehr sicher zu führen. Gleichzeitig gefährdet der Konsum von synthetischen Cannabinoiden den Therapieerfolg im Maßregelvollzug bei Unterbringung in einer Entziehungsanstalt nach § 64 StGB. Auch im Bereich der Forensik des § 63 StGB ("Unterbringung in einem Psychiatrischen Krankenhaus") sowie in der Allgemeinpsychiatrie führt der Konsum von synthetischen Cannabinoiden zu Problemen, da es sich dort häufig um labile Patienten mit schizophrenen Psychosen handelt, und bekannt ist, dass Cannabinoide derartige Erkrankungen verschlechtern bzw. sogar auslösen können. In diesen Fällen wird der Nachweis von längerfristigen oder viele Tage zurückliegenden Konsum notwendig und dafür eine Haaranalyse durchgeführt. Eine Methode für das Routinescreening von Serum und Haaren auf synthetische Cannabinoide aus „Spice“-Kräutermischungen wird im Folgenden vorgestellt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Analyse von „Spice“-Kräutermischungen

Methanolische Extrakte der Kräutermischungen Flower Power, Blaze, Bonzai, New Jamaican Gold oder LAVA red wurde per Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit der Routine-methode [2] bzw. im bayrischen Landeskriminalamt untersucht.

Kurzer Überblick über die Routinemethode: Der Extrakt wurde zusammen mit internem Standard (Mepivacain) zur Trockene eingeengt und in Ethylacetat aufgenommen. Die Analyse erfolgte auf einem Agilent GC-MSD-System mit einer Agilent HP-5MS Kapillarsäule (5 % Phenylmethylsiloxan).

### 2.2. Probenaufarbeitung für Serum

Verkehrsmedizinische Blutproben wurden aus dem Umkreis von Stuttgart eingesandt, Proben aus der forensischen Psychiatrie stammten aus dem Isar-Amper-Klinikum Haar bzw. wurden über das Forensisch Toxikologische Centrum, München eingesandt. Für den Nachweis von synthetischen Cannabinoiden in Serum wurden die Proben mittels Festphasenextraktion mit

einem Hamilton Star Pipettierroboter vollautomatisch im 96-well-Format aufgearbeitet. Die Aufarbeitung verlief simultan zur Bestimmung von Tetrahydrocannabinol (THC) und Metaboliten. Serum wurde mit d7-JWH018 als internem Standard versetzt (Synthese von d7-JWH-018 siehe [2]), mit 0,1 M Essigsäure verdünnt und auf Varian Versaplate BondEluteC18-Kartuschen, konditioniert mit Methanol und 0,1 M Essigsäure aufgetragen. Nach Waschen mit 0,1 M Essigsäure und 40 % Acetonitril wurde mit Acetonitril eluiert. Die Eluate wurden im Stickstoffstrom bei 40°C zur Trockene eingengt, der Rückstand wurde in 70 % Methanol in 1 % Essigsäure aufgenommen. Es wurde mit 5 äquidistanten Serumstandards im Bereich 1,0 ng/ml bis 5,0 ng/ml kalibriert.

### 2.3. Probenaufarbeitung für Haare

Haarproben wurden z.B. von der Forensischen Psychiatrie des Isar-Amper-Klinikums Haar eingesandt. 50 mg Haare wurden zerkleinert und die synthetischen Cannabinoide mit 3 ml Methanol im Ultraschallbad extrahiert. Zu 1 ml Extrakt wurde der interne Standard d7-JWH-018 hinzugefügt und zur Trockene eingengt, der Rückstand wurde in 70 % Methanol in 1 % Essigsäure aufgenommen. Es wurde mit 5 äquidistanten methanolischen Standards im Bereich 5 bis 25 picogramm pro Injektion kalibriert. Die Standards wurden analog zu den Extrakten aufgearbeitet.

### 2.4. LC-MS/MS-Parameter

Die LC-MS/MS-Analyse der Serum- und Haarextrakte wurde mit der Routinemethode auf einem Waters Alliance Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie System mit Micromass Quattro micro API Triple-quadrupol im ESI Modus durchgeführt [2]. In Kürze: Die Trennung erfolgte auf einer Luna Phenyl-Hexyl Säule mit einem Gradienten von Methanol und 1%iger Essigsäure. Folgende Retentionszeiten und Massenübergänge wurden zur Identifizierung im „Multiple Reaction Monitoring“ Modus (MRM) gemessen und ausgewertet: d7-JWH-018: 6,4 min; m/z 349,2 > 128,9; 349,2 > 156,9. JWH-018: 6,4 min; m/z 342,2 > 154,9; 342,2 > 126,9. JWH-073: 5,8 min; m/z 328,2 > 154,9; 328,2 > 126,9. JWH-081: 7,0 min; m/z 372,6 > 185; 372,6 > 214,2. JWH-122: 7,3 min; m/z 356,5 > 169; 356,5 > 115. JWH-250: 5,2 min; m/z 336,6 > 121,1; 336,6 > 91.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1. Inhaltsstoffe von „Spice“-Kräutermischungen

In den „Spice“-Kräutermischungen neueren Datums sind folgende synthetischen Cannabinoide enthalten: JWH-081 in Flower Power, JWH-081 zusammen mit JWH-250 in Blaze, Bonzai und New Jamaican Gold sowie JWH-122 in der Kräutermischung LAVA red.

Folgende Inhaltsstoffe von weiteren „Spice“-Kräutermischungen wurden von Neukamm et al. berichtet: [3] JWH-018 und CP 47,497-C8-Homolog in Kombination oder einzeln in Arctic Synergy, Spice Silver, Spice Gold, Sence, Genie. In den „Spice“-Kräutermischungen Space Rubin und Silent Black wurden keine synthetischen Cannabinoide gefunden.

In einer „Spice“-Kräutermischung können also ein oder mehrere synthetische Cannabinoide enthalten sein - oder gar keine. In einer Serum- oder Haarprobe können also in Abhängigkeit der konsumierten Mischungen auch mehrere synthetische Cannabinoide zu finden sein.

### 3.2. Serum

Die Bestimmung der Grenzwerte nach DIN32645 ergab für JWH-018 in Serum eine Nachweisgrenze von 0,2 ng/ml und eine Bestimmungsgrenze von 0,6 ng/ml.

37 positive „Spice“-Fälle waren unter den eingesandten Proben von März 2009 bis Dezember 2010. JWH-018 war in 11 Fällen enthalten. Die höchste gemessene JWH-018-Konzentration in einer Serumprobe betrug 68 ng/ml. Im Schnitt bewegten sich die Konzentrationen im Bereich 1 bis 2 ng/ml oder darunter. JWH-073 war in sechs Fällen vorhanden. In 16 Fällen wurde JWH-081 nachgewiesen, zwei Fälle gab es mit JWH-122 und einen Fall mit JWH-250.

Nur in drei Fällen wurde in einer Serumprobe eine Kombination von zwei synthetischen Cannabinoiden festgestellt (JWH-018 + JWH-073, JWH-018 + JWH-081, JWH-081 + JWH-250). Da die meisten dieser Proben aus Polizeikontrollen im Straßenverkehr stammten, ist anzunehmen, dass ein Verdacht auf Beeinflussung des Fahrers durch berauschende Mittel vorgelegen hat.

### 3.3. Haare

Beim Screening auf synthetische Cannabinoide wurde in den meisten Haarproben nicht nur ein Wirkstoff sondern vier oder mehr verschiedene synthetische Cannabinoide gefunden. In Probe 1 (s. Tabelle 1) sind zum Beispiel JWH-018 zusammen mit JWH-081, JWH-122 und JWH-250 enthalten. In diesen Fällen hat wohl ein Kontakt mit mehreren „Spice“-Kräutermischungen stattgefunden.

Tab. 1. Ergebnisse des Screenings auf Synthetische Cannabinoide in Haaren.

Probe	JWH-018	JWH-073	JWH-081	JWH-122	JWH-250
1	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
2	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
3	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
4	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
5	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
6	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
7	positiv	positiv	positiv	positiv	positiv
8	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
9	positiv	negativ	positiv	positiv	positiv
10	positiv	positiv	negativ	negativ	negativ
11	positiv	negativ	negativ	negativ	negativ
12	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv
13	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv
14	negativ	negativ	negativ	negativ	positiv

Die Bestimmung der Grenzwerte nach DIN32645 ergab für JWH-018 in Haaren eine Nachweisgrenze von 0,09 pg/mg und eine Bestimmungsgrenze von 0,17 pg/mg. Die höchste gemessene JWH-018-Konzentration in einer Haarprobe betrug ca 119 pg/mg, meist bewegten sich die Konzentrationen von JWH-018 im Bereich 5 bis 30 pg/mg Haar oder darunter.

#### 4. Schlussfolgerung

Eine schnelle und einfach durchzuführende Methode für das Screening von synthetischen Cannabinoiden aus „Spice“-Kräutermischungen und für die Quantifizierung von JWH-018 in Serum und Haaren wurde entwickelt. Die Methode wurde erfolgreich in die Routine implementiert und auf forensische Serumproben aus dem Straßenverkehr und der forensischen Psychiatrie angewendet, hierbei fanden sich Konzentrationen von JWH-018 bis zu 68 ng/ml. Auch JWH-073, JWH-081, JWH-122 und JWH-250 wurden in Serumproben nachgewiesen. In forensischen Haarproben aus einer psychiatrischen Entziehungsanstalt bzw. forensischen Psychiatrie waren in vielen Fällen bis zu fünf verschiedene synthetische Cannabinoide (JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122 und JWH-250) in einer einzigen Haarprobe nachweisbar. Der mehrmalige Kontakt mit „Spice“-Kräutermischungen der betreffenden Person wird dadurch nachgewiesen.

Die qualitative und quantitative Bestimmung von synthetischen Cannabinoiden in Serum und Haaren mit der beschriebenen Multimethode dient somit im Falle des Konsums von „Spice“-Kräutermischungen sowohl als Basis für die Beurteilung des Fahrens unter Einfluss von berauschenden Mitteln als auch für die Abstinenzkontrolle, z.B. zur Überprüfung des Therapieerfolgs bei Unterbringung in einer Entziehungsanstalt.

#### 5. Literatur

- [1] Auwärter V, Dresen S, Weinmann W, Ferreirós N. „SPICE“ sowie weitere Räucher-mischungen enthalten Designer-Cannabinoid. Toxichem Krimtech 2008; 75: 127-129
- [2] Neukamm M, Mürdter T E, Wehner H-D, Wehner F, Ratge D, Knabbe C. „Quantitative Determination of the Active ‚Spice‘ Ingredient JWH-018 in Blood by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. Beiträge zum XVI. GTFCh-Symposium 2009; 115-122
- [3] Neukamm M, Mürdter T E, Knabbe C, Wehner H-D, Wehner F. „Quantitativer Nachweis des „Spice“-Wirkstoffes JWH-018 im Serum mittels Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie. Blutalkohol 2009; 46: 373-379