

Nachweis von Betäubungsmitteln

Analytik von Cannabinoiden in biologischen Matrices – eine Übersicht

KERSTIN THUROW¹, STEFFEN THIELE²

¹ CENTER FOR LIFE SCIENCE AUTOMATION, UNIVERSITÄT ROSTOCK

² MEDIZINISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄT ROSTOCK

Cannabis is probably the best-known drug worldwide. Δ^9 -THC and 11-OH- Δ^9 -THC are the essential components that are responsible for the intoxicating and psychoactive effects. A general approval for pain therapy has been discussed for years. The analytical determination of low concentrations of Δ^9 -THC and its metabolites is therefore increasingly important. Quantitative tests in saliva, blood or urine require extensive analytical procedures including suitable sample preparation.

DOI: 10.1007/s12268-021-1513-9
© Die Autoren 2021

■ Cannabis, eine Pflanze aus der Familie der Hanfgewächse, ist die weltweit wohl bekannteste Droge. Grund für den betäubenden und berauschenden Effekt ist eine Gruppe von Stoffen, welche gemeinhin als Cannabinoide bekannt sind. Während Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) eine berauschende Wirkung zeigt, ist für den psychoaktiven Effekt vor allem der erste Metabolit des THC, 11-OH- Δ^9 -THC, verantwortlich, da dieser schneller und in größerer Menge als THC ins ZNS gelangen kann [1]. *Cannabis sativa* hat aber auch als

Heilmittel eine lange Tradition. So wird THC als Dronabinol zur Linderung von Zytostatika-induziertem Erbrechen und zur Behandlung von Anorexie mit Gewichtsverlust bei AIDS-Patienten eingesetzt [2]. Nabiximols ist in zahlreichen Staaten für die Linderung spastischer Anfälle bei multipler Sklerose zugelassen [2]. Im Unterschied zu Opioiden führen Cannabinoide auch bei Überdosierung nicht zu lebensgefährlichen Atemdepressionen oder einer Unterdrückung der wichtigen Abwehrfunktion gegen infektiöse Keime. Eine generelle Freigabe

für die Schmerztherapie wird seit Jahren diskutiert.

Die analytische Bestimmung von Δ^9 -THC und seinen Metaboliten ist zunehmend von Bedeutung, da vermehrt cannabishaltige Produkte auf den Markt kommen. Für einen schnellen Nachweis von Cannabiskonsum stehen Schnelltests zur Verfügung, die einen Nachweis, aber keine quantitative Bestimmung in Speichel oder Urin ermöglichen. Genauere Untersuchungen in Speichel, Blut, Urin oder der Atemluft erfordern umfangreiche analytische Verfahren. Üblicherweise erfolgt eine Bestimmung der Verbindungen gemäß **Tabelle 1**. Als messtechnische Verfahren finden die LC/MS/MS [3] oder die GC/MS [4] Anwendung.

Biologische Matrices für die Bestimmung von Cannabinoiden

Die Auswahl eines geeigneten analytischen Verfahrens zur Bestimmung von Cannabinoiden erfolgt u. a. in Abhängigkeit von der jeweiligen Matrix (**Abb. 1**).

Speichel ist für Tests auf die Konsumierung von Cannabis eine der am häufigsten verwendeten Matrices. Die Konzentration von Δ^9 -THC im Speichel korreliert mit der Konzentration des im Blutplasma ungebunden

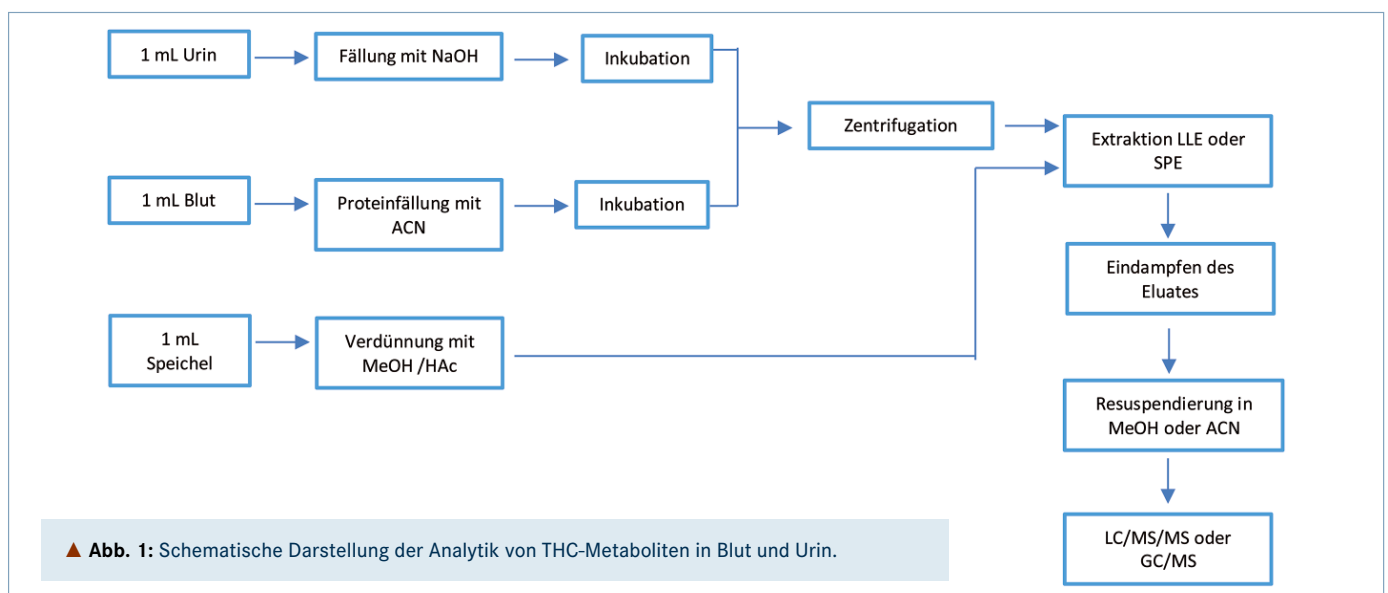


Tabelle 1: Δ^9 -THC und verschiedene wichtige Metabolite

Name	Strukturformel
D9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)	
Cannabinol (CBN)	
Cannabidiol (CBD)	
THC-COOH	
11-OH- Δ^9 -THC	

und nicht ionisiert vorliegenden Δ^9 -THCs. Die Probennahme von Speichel ist nicht invasiv und einfach durchführbar. Darüber hinaus gibt es im Speichel nur wenige interferierende Substanzen, welche bei der späteren Analyse das Ergebnis verfälschen können [5]. In der Regel reicht hier als Probenvorbereitung eine Verdünnung der Probe mit Methanol/Ameisensäure [4].

Weiterhin sind auch Urinproben für den quantitativen Nachweis von Cannabinoiden geeignet. Da im Urin nur glucuronidiertes THC-COOH zu finden ist, muss dieses vor der Analyse zur Entfernung von Glucuronsäure mit Glucosidase behandelt werden [7].

Eine besondere Herausforderung ist die Untersuchung von Blutproben. Hier ist zunächst eine Präzipitation der Proteine im Plasma erforderlich, die üblicherweise durch Zugabe von Acetonitril oder Methanol und anschließende Zentrifugation erfolgt [3, 8]. Alternativ kommen Proteinfällungsplatten zum Einsatz, die eine Proteinfällung ohne nachfolgende Zentrifugation ermöglichen

und so Arbeitsschritte und Fehlerquellen reduzieren [9].

Klassische Extraktionsverfahren zur Bestimmung von Cannabinoiden

Für die Extraktion der Cannabinoide findet die Flüssig-Flüssig-Extraktion (*liquid liquid extraction*, LLE) Anwendung. Sie ist zeitlich und materiell sehr aufwändig und aufgrund der großen Mengen an benötigten organischen Lösungsmitteln (z. B. 5 ml Hexan/Ethylacetat (5:1) auf 1 ml Blut) nicht umweltfreundlich. Für die Bestimmung von Δ^9 -THC, CBN, 11-OH-THC sowie CBD und THC-COOH aus Blut wurden Nachweisgrenzen von jeweils 0,25 ng/ml bzw. 0,5 ng/ml berichtet [8].

Die Flüssigphasenmikroextraktion (*liquid phase micro extraction*, LPME) ist eine miniaturisierte Version der LLE, bei der der Analyt aus der Probenlösung unter Verwendung von nur wenigen Mikroliter Lösungsmittel gewonnen wird. Dadurch findet neben der Abtrennung der Zielsubstanzen auch eine

Anreicherung statt. Die Technik wurde für die analytische Bestimmung von Cannabinoiden nur vereinzelt berichtet. Da die Probe für eine LPME zwingend flüssig sein muss, eignen sich Urinproben besonders [5]. Der Einsatz permeabler, hydrophober Filtermembranen ermöglicht eine kombinierte Extraktion und Derivatisierung von THC-COOH im Urin. R. Jain *et al.* beschrieben hierfür Nachweisgrenzen von 1 ng/ml [5].

Eine weitere in der Analytik verschiedener Drogen eingesetzte Extraktionsmethode ist die disperse Flüssig-Flüssig-Mikroextraktion (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME). Durch eine schnelle Zugabe einer geringen Menge Lösungsmittel in die Probenlösung erfolgt eine sofortige Vermischung der beiden Phasen durch die Entstehung von Mikrotropfen in der Probenlösung. Dadurch erfolgt aufgrund der vergrößerten Gesamtoberfläche eine sehr viel schnellere Trennung des Analyten von der Probenlösung. Moradi *et al.* berichteten die Bestimmung von THC-COOH aus Urin mit Nachweisgrenzen von 0,1–0,5 ng/ml [10].

Absorptionsbasierte Extraktionsverfahren zur Bestimmung von Cannabinoiden

Bei absorptionsbasierten Verfahren werden die zu analysierenden Stoffe zunächst auf einem geeigneten Sorbensbett adsorbiert und anschließend mit einem auf den jeweiligen Analyten abgestimmten Lösungsmittel eluiert. Damit gelingen sowohl eine Abtrennung und Aufreinigung des Zielanalyten als auch dessen Aufkonzentrierung. Absorptionsbasierte Verfahren zeichnen sich häufig durch kürzere Prozesszeiten sowie bessere Wiederfindungsraten im Vergleich zu den klassischen Flüssig-Extraktionsverfahren aus. Der erheblich reduzierte Lösungsmittelverbrauch hat darüber hinaus sowohl ökonomische als auch positive umweltrelevante Auswirkungen.

Für die Bestimmung von Cannabinoiden wurden unterschiedliche adsorptionsbasierte Verfahren berichtet (**Tab. 2**). Aufgrund der unpolaren Eigenschaften von D9-THC und seinen Metaboliten kommt in der klassischen Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) die *reverse phase*-SPE mit unterschiedlichen Endgruppen zum Einsatz (z. B. Octadecyl-Gruppen, OMIX C18 Tips (Agilent Technologies) [8]; Octyl-Gruppen, Clear Screen THC Extraction column [3]). Die Elution der Zielsubstanzen von den Säulen erfolgt dabei i. d. R. mit unpolaren Lösungs-

Tabelle 2: Absorptionsbasierte Analysenverfahren zur Bestimmung von Cannabinoiden (Auswahl). NWG: Nachweisgrenze; BG: Bestimmungsgrenze.

Verfahren	Matrix	Zielsubstanz	NWG / BG
Reverse Phase SPE (LC/MS/MS)	Speichel	Δ^9 -THC,	2,0 ng/ml [3]
	Urin	THC-COOH	0,5 ng/ml [3]
	Blut		0,5 ng/ml [3]
Ionenaustausch-SPE (GC/MS)	Urin	THC-COOH	0,875 ng/ml [11]
DI-SPME (GC/MS)	Speichel	Δ^9 -THC	3,0 ng/ml [4]
HS-SPME	Speichel	Δ^9 -THC; CBN, CBD	20 ng/ml [6]
PMME (GC/MS)	Speichel	Δ^9 -THC	0,68 ng/ml [13]
MEPS (LC/MS/MS)	Speichel	Δ^9 -THC; CBN; CBD; THC-OH; THC COOH	0,25 ng/ml; 0,3 ng/ml; 0,3 ng/ml; 0,4 ng/ml; 0,02 ng/ml [13]

mitteln wie Methanol [7] oder Hexan/Ethylacetat (80:20) [3].

Auch die Ionenaustausch-SPE kann für die Bestimmung von Cannabinoiden eingesetzt werden, die Extraktion kann durch Nutzung spezieller CEREX-POLYROM-Säulen zur Extraktion von Δ^9 -THC erfolgen [11].

Eine Weiterentwicklung der SPE ist die SPME (*solid phase micro extraction*), bei der im Vergleich zur klassischen SPE mehrere Schritte zusammengefasst werden (Probenahme, Extraktion, Konzentration und die Einführung des Analyten in die Analyse-methode). Die Methode nutzt modifizierte Silikafasern, welche mit entsprechenden stationären Phasen bedeckt sind und sich in einer Spitzennadel befinden. Bei der Probennahme werden diese Fasern mithilfe der Nadel durch ein Septum mit der isolierten Probe in Kontakt gebracht. Dabei können die Fasern entweder nur mit der Luftphase über der Probe (*headspace* SPME, HS-SPME) oder direkt mit ihr (*direct immersion* SPME, DI-SPME) in Kontakt gebracht werden. Für die Bestimmung von Cannabinoiden kommen je nach vorheriger Behandlung und Art der betroffenen Matrices beide Varianten zum Einsatz.

Eine Isolierung und Konzentrierung von Analyten aus gasförmigen und flüssigen Matrices ist auch mittels *solid phase dynamic extraction* (SPDE) möglich. Allerdings ist dieses Verfahren auf die Extraktion von Stoffen aus der Gasphase beschränkt, sodass bei der Analyse flüssiger oder fester Proben eine headspace-Extraktion vorgelagert wird.

Die PMME (*polymer monolith microextraction*) ist eine miniaturisierte Extraktionsmethode auf Basis der SPE. Der Vorteil einer PMME gegenüber einer SPME liegt in der größeren Oberfläche der Kapillare und der damit verbundenen erhöhten Extraktionseffizienz. Die *micro extraction by packed sor-*

bed (MEPS) ist eine 2004 entwickelte miniaturisierte Form der SPE, die verschiedene Schritte der Probenvorbereitung in einem Schritt zusammenfasst. MEPS wurde u. a. für die analytische Bestimmung von Cannabinoiden aus flüssigen Matrices wie Blutplasma oder Speichel eingesetzt. Der Vorteil von MEPS bei der Anreicherung der Cannabinoide liegt vor allem darin, dass die Methode nur eine geringe Probenmenge benötigt. So reichen bereits 125 μ l Speichel aus, um eine verlässliche Präkonzentration von Cannabinoiden für eine Analyse mithilfe von LC/MS/MS zu erreichen [12].

Literatur

- [1] Grotenhermen F (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* 42:327–360
- [2] Whiting P, Wolff R, Deshpande S (2015) Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 313:2456–2473
- [3] Teixeira H, Verstraete A, Proença P et al. (2007) Validated method for the simultaneous determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Sci Int* 170:148–155
- [4] Yonamine M, Tawil N, de Moraes Moreau RL, Silva OA (2003) Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-

mass spectrometry and headspace-gas chromatography of tetrahydrocannabinol, amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J Chromatogr B* 789:73–78

- [5] Jain R, Singh R (2016) Microextraction techniques for analysis of cannabinoids. *Trends Analyt Chem* 80:156–166
- [6] Fucci N, De Giovanni N, Chiarot N (2003) Simultaneous detection of some drugs of abuse in saliva samples by SPME technique. *Forensic Sci Int* 134:40–45
- [7] Montesano C, Sergi M, Odoardi S et al. (2014) A μ -SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 91:169–175
- [8] Andrews R, Paterson S (2012) A validated method for the analysis of cannabinoids in post-mortem blood using liquid-liquid extraction and two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 222:111–117
- [9] Snow L (2018) Clean-up and analysis of 12 cannabinoids in whole blood by LC-MS/MS using three phospholipid removal products and a luna omega polar C18 LC column. Application Note TN-0130, Phenomenex, https://www.phenomenex.com/ViewDocument/?id=clean-up+and+analysis+of+12+cannabinoids+from+whole+blood+using+lc-ms_ms
- [10] Moradi M, Yamini Y, Baheri T (2011) Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. *J Sep Sci* 34:1722–1729
- [11] Stout PR, Horn CK, Klettle KL (2001) Solid-phase extraction and GC-MS analysis of THC-COOH method optimized for a high-throughput forensic drug-testing laboratory. *J Anal Toxicol* 25:550–554
- [12] Sergia M, Montesano C, Odoardi S et al. (2013) Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids. *J Chromatogr A* 1301:139–146
- [13] Luo D, Chen F, Xiao K, Feng Y (2009) Rapid determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in saliva by polymer monolith microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 77:1702–1706

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/ die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

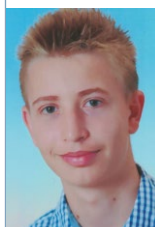
Prof. Dr.-Ing. habil. Kerstin Thurow
 celisca, Universität Rostock
 F.-Barnewitz-Straße 8
 D-18119 Rostock
 Kerstin.thurow@celisca.de
 www.celisca.de

AUTOREN



Kerstin Thurow

1995 Promotion in der Fachrichtung Organometallchemie an der LMU München. 1999 Habilitation und *venia legendi* sie auf dem Gebiet der Mess- und Regelungstechnik. 1999 Professur „Laborautomation“, Ingenieurwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock. Seit 2004 Lehrstuhlinhaberin „Automatisierungstechnik / Life Science Automation“, Universität Rostock und Leitung des Center for Life Science Automation, Universität Rostock.



Steffen Thiele

Seit 2018 Studium Medizinische Biotechnologie, Universität Rostock.