Z Rechtsmed (1985) 94:219–225

Zeitschrift für
Rechtsmedizin
© Springer-Verlag 1985

Zum enzymatisch-immunochemischen Nachweis des Haschischkonsums und seiner dünnschichtchromatographischen Absicherung

L. von Meyer

Institut für Rechtsmedizin, Frauenlobstr. 7a, D-8000 München 2, Bundesrepublik Deutschland

Detection of Cannabinoids in Blood and Urine by EMIT Confirmation by TLC

Summary. The EMIT cannabinoid assay was used for screening blood and urine after smoking tetrahydrocannabinol (THC; 10 mg) or ingestion of THC (30 mg). Cannabinoid levels in urine remain detectable up to 1 week. Confirmation was done by adsorption of the THC carboxylic acid onto a C_{18} extraction column and elution with acetone and TLC. The method is simple and sensitive and is applicable with common laboratory equipment. The detection limit is 10 ng/ml, using 10 ml urine.

Key words: Cannabinoids, enzyme immunoassay – THC-metabolite, detection in urine and blood

Zusammenfassung. Mit Hilfe des Enzymimmunoassay (EMIT-dau-Syva) lassen sich Cannabinoide in Blut und Urin nach inhalativer (10 mg THC) oder oraler (30 mg THC) Aufnahme nachweisen. Die Kurvenverläufe werden mitgeteilt. Im Urin waren erhöhte Spiegel bis zu einer Woche nachweisbar. Eine Absicherung der EMIT-Befunde ist mittels Dünnschichtchromatographie nach absorptiver Anreicherung an einer C_{18}-Extraktionssäule möglich. Nachweisgrenze ist 10 ng THC-Carbonsäure/ml bei Einsatz von 10 ml Urin.

Schlüsselwörter: Cannabinoide, Enzymimmunoassay – THC-Metabolit, Nachweis in Urin und Blut

Neben Heroin zählt das Harz des indischen Hanfes zu den am häufigsten gebrauchten Suchtstoffen. Obwohl die psychotrope Wirkung der Droge seit Jahrhunderten bekannt ist, gelang es erst vor 20 Jahren, das dafür verantwortliche Tetrahydrocannabinol zu isolieren [1, 2]. Seitdem hat es nicht an Versuchen gefehlt, den Stoffwechsel des THC aufzuklären und die Aufnahme von Cannabis im Urin nachzuweisen. Diese Arbeiten wurden derartig intensiv

durchgeführt, daß diese Droge sicherlich zur Zeit zu den mit am besten untersuchten Stoffen zählt. Entsprechend den Ansprüchen für die Identifizierung unbekannter Verbindungen wurden diese Untersuchungen in der Regel mit radioaktiv markierten Verbindungen und mit Hilfe der Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie durchgeführt [3–6]. Gaschromatographische und hochleistungsflüssigkeitschromatographische Verfahren sind in der Regel für sich allein weniger spezifisch [7, 8]. Diese Untersuchungsverfahren lassen sich für den Nachweis der Suchtstoffaufnahme wegen der hohen Kosten und des erforderlichen Aufwandes entweder nicht oder nur in ausgewählten Fällen einsetzen. Eine routinemäßige Untersuchung auf die Aufnahme von Cannabis-Zubereitungen wurde erst möglich, als radioimmunochemische [9] und später auch enzymatisch-immunochemische Teste erhältlich waren. Tetrahydrocannabinol selbst wird im Urin praktisch nicht unverändert ausgeschieden. Es wird als hochlipophiler Stoff im Fettgewebe gespeichert und über mehrere Tage hinweg in den Urin in Form des Metaboliten THC-Carbonsäure, überwiegend mit Glucuronsäure konjugiert, wieder abgegeben [10]. Der beim Enzym-Immuno-Assay der Firma Syva verwendete Antikörper reagiert am empfindlichsten auf die 11 Nor-Δ9-THC-Carbonsäure.

Wir haben Untersuchungen mit dem EMIT-Verfahren [11] nach Aufnahme von 10 mg THC durch Rauchen und von 30 mg THC peroral durchgeführt. Hierbei werden schon kurze Zeit nach Aufnahme hohe Extinktionsdifferenzen erreicht, die nach bis zu einer Woche den Nullwert wieder erreichen.

Die Markierung für den Low-Wert entspricht 20 ng/ml, der Medium-Wert 75 ng/ml. Neben dem Nachweis im Urin ist im Hinblick auf eine Beeinflussung der Einsichts- und Steuerungsfähigkeit der Nachweis im Blut von Bedeutung, da ein positiver Befund im Urin lediglich bedeutet, daß im Zeitraum von einigen Tagen vor der Entnahme Cannabisgenuß erfolgte. In der Literatur sind

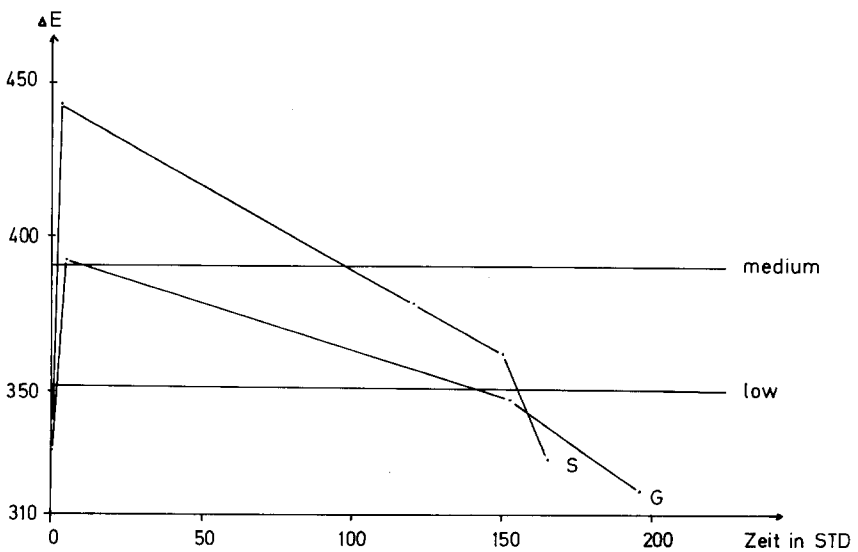

Abb. 1. Cannabinoid-Bestimmung im Urin (10 mg THC geraucht)

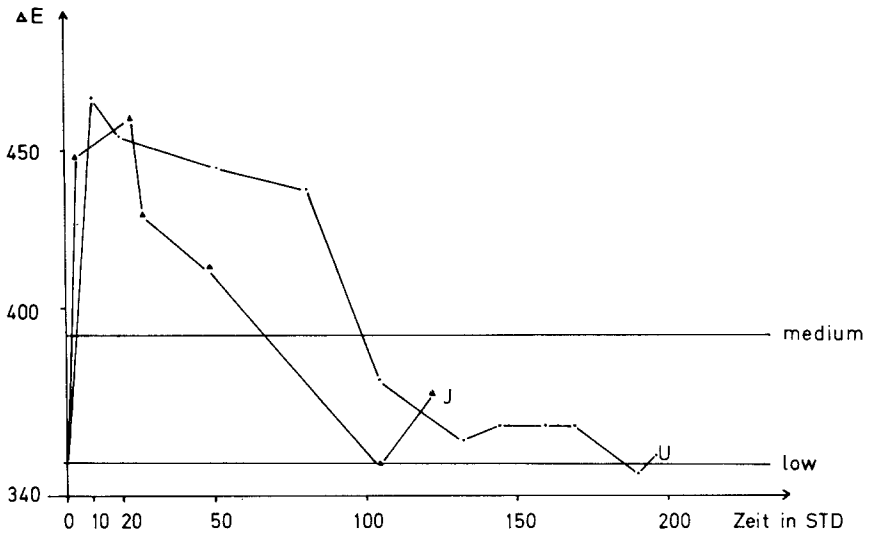

Abb. 2. Cannabinoid-Bestimmung im Urin (30 mg THC oral)

gaschromatographische und massenspektrometrische Verfahren zur quantitativen Bestimmung von THC im Blut beschrieben worden [12, 13]. Es ist sinnvoll, dieses aufwendige Verfahren nur auf die Fälle zu beschränken, in denen positive Befunde erwartet werden können. Es hat auch hier Versuche gegeben, das EMIT-Verfahren einzusetzen. Eine einfache Extraktion von Blut, wie sie von Slightom [14] 1976 angegeben wurde, ist nach den Erfahrungen von uns und anderen Autoren nicht anwendbar, da die ng-Mengen THC zum Teil an die Wand absorbiert und störende Begleitstoffe mitextrahiert werden. Wir führen die Schwierigkeiten insbesondere darauf zurück, daß es nicht gelingt, nach Extraktion von THC mit einem organischen Lösungsmittel und Einengen zur Trockne den hochlipophilen Stoff mit Wasser wieder in Lösung zu bringen. Wir haben daher unsere Versuche mit einer von Peel [15] angegebenen Methode durchgeführt, bei der das Eiweiß mit Methanol gefällt wird und die methanolische Lösung zur EMIT-Bestimmung eingesetzt wird.

Methodik zur Untersuchung von Blut

Zwei ml Methanol werden vorsichtig zu 1 ml Blut entlang der Gefäßwände hinzugegeben. Die Mischung wird 5 min mechanisch geschüttelt und dann weitere 5 min zentrifugiert. Ungefähr 1,5 ml der Flüssigkeitsschicht werden abgehoben und über Nacht bei −20°C im Gefrierschrank ausgefroren. Die resultierende partikelfreie Flüssigkeit wird entsprechend dem Urin in der üblichen Vorschrift eingesetzt. Wir haben hiermit folgende Resultate erzielt.

Man sieht, daß ca. $^1/_2$ Std nach Rauchbeginn es zum Ansteigen der Extinktionsdifferenzen kommt, die nach 2 Std bereits wieder abgefallen sind. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Befunden der Literatur [16]. Nach oraler Gabe kommt es zu einer verzögerten Resorption und aufgrund der höheren Dosis auch zu deutlich höheren Werten. Die Meßsignale für drogenfreie Blute lagen im gleichen Bereich, wie für Leerurin. Von Peel und Perrigo wird angegeben, daß 20 ng/ml ohne weiteres nachweisbar seien. Diese Konzentrationen entsprechen den psychoaktiv wirksamen Spiegeln. Damit ist das Verfahren geeignet, einen

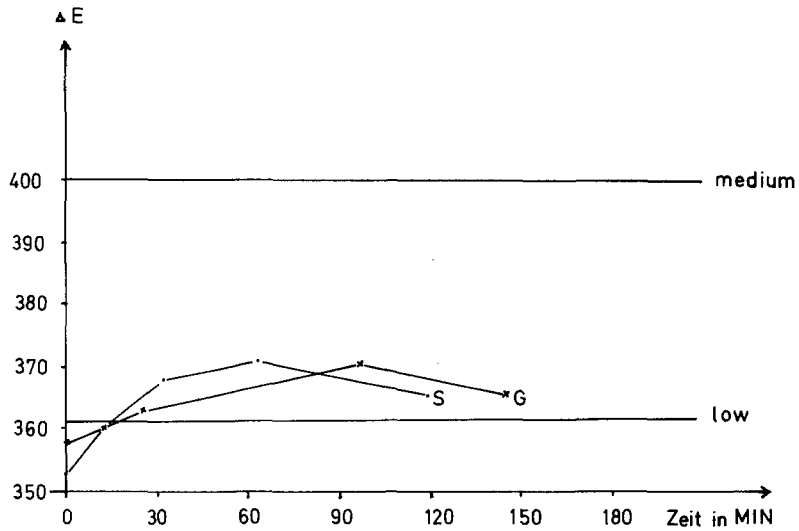

Abb. 3. Cannabinoid-Bestimmung im Blut (10 mg THC geraucht)

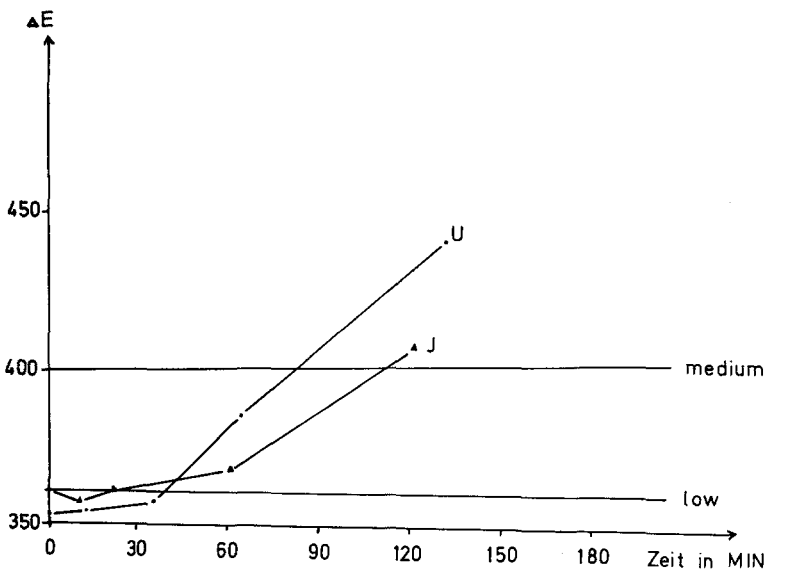

Abb. 4. Cannabinoid-Bestimmung im Blut (30 mg THC oral)

Hinweis auf die Cannabisaufnahme durch eine Blutentnahme während des Rausches oder kurz danach zu ermöglichen. Wir haben auch versucht, durch Konzentrieren der methanolischen Lösung die Nachweisempfindlichkeit zu erhöhen. Hierbei kam es zu nicht reproduzierbaren Absorptionsverlusten.

Die enzymatisch-immunochemische Methode ist nach unserer Überzeugung sehr wertvoll, um einen Hinweis auf eine Cannabisaufnahme zu erhalten. Ein Beweis im eigentlichen Sinne liegt bei positivem Ausfall jedoch nicht vor. Eine Absicherung mit einem zweiten Verfahren ist unerläßlich. Frühere dünnschichtchromatographische Versuche zum Nachweis einer Cannabisaufnahme sind weitgehend ergebnislos geblieben [17, 18], da in der Vergan-

genheit versucht wurde, das im Urin praktisch nicht vorkommende Tetrahydrocannabinol nachzuweisen. Aus jüngster Zeit gibt es Arbeiten, in denen der DC-Nachweis des Metaboliten beschrieben wird. Wir haben verschiedene Vorschriften [19, 20] überprüft und haben feststellen müssen, daß dabei vielfach eine Störung des Nachweises mit Echtblausalz durch mitextrahierte Begleitstoffe erfolgt.

Wir haben daher Extraktion und Reinigung so modifiziert [21], daß die Extraktion zum einen mit geringem Aufwand durchzuführen ist und praktisch nur noch die THC-Carbonsäure angefärbt wird.

Methodik zur Untersuchung von Urin

Baker-10 Extraktionssystem oder Vacelut (Analytichem ICT)
3 ml Octadecyl (C-18)-Extraktionssäulen
2 ml Probensammelgläser
6 ml Filtersäulen
Aceton zur Analyse
Ammoniaklösung 25% zur Analyse
Chloroform zur Analyse
Essigsäure 96% zur Analyse
Kaliumhydroxid, Plätzchen, zur Analyse (Lösung 10% in Methanol)
Methanol zur Analyse
Natriumhydrogencarbonat zur Analyse (5% Lösung)
Echtblausalz RR (Serva, Heidelberg)

Probenvorbereitung

Zehn ml Urin und 3 ml 10% KOH in Methanol 12 min bei 100°C erhitzen, abkühlen und dann 5 ml Essigsäure 96% zugeben (ca. pH 3,5).

Säulenvorbereitung

C-18-Säule auf den Deckel der BAKER-10 Vakuumeinheit und Filtersäule mit Hilfe des Adapters auf die Säule setzen. Vakuum einschalten. Mit zweimal 3 ml (Säulenvolumen) Methanol und anschließend mit zweimal 3 ml dest. Wasser Säulenfüllung spülen. Vakuum dann sofort abschalten. Säulenfüllung (Adsorbens) darf nicht trocken werden.

Probenaufgabe

Probe mit Hilfe von Vakuum durch Filter und Säule durchsaugen. Filteraufsatz entfernen.

Säulenwäsche

C-18-Säule nacheinander mit 1 ml dest. Waser, 1 ml 5%iger $NaHCO_3$-Lösung und erneut mit 1 ml dest. Wasser spülen. Jetzt Vakuum ausschalten. 50 µl Aceton aufgeben. Vakuum anstellen und Säulenfüllung trockensaugen. Vakuum abstellen.

Probenelution

Probensammler mit 2 ml Probensammelgläsern in Extraktionssystem einsetzen. Deckel mit C-18-Säule aufsetzen. Vakuum einschalten. Mit 2 × 200 µl Aceton eluieren. Eluat bis zur Trockne unter Vakuum einengen. Vakuum abschalten.

Analyse mittels Dünnschichtchromatographie

Rückstand mit 10 µl Methanol aufnehmen und auf Kieselgelplatte auftüpfeln; Vorgang wiederholen.

Fließmittel: Chloroform/Methanol/Ammoniaklösung 70:30:2

Detektion: Echtblausalz RR (Serva), 0,5% in Methanol/dest. Wasser 50:50 lösen.

THC-Carbonsäure: Färbung rosa bis kirschrot, HRf-Höhe-33. Zum Vergleich wird 1 ml der positiven Cannabinoid-Kontrolle (400 ng 11 Nor-Δ8 THC-Carbonsäure/ml Urin) aus dem EMIT ST-System (Syva) mit Leerurin auf 10 ml gebracht und wie beschrieben extrahiert.

Wiederfindung: 80%. Nachweisempfindlichkeit: 10 ng THC-Carbonsäure/ml Urin.

Diskussion

Dieses Vorgehen ist nach unserer Erfahrung geeignet, eine dünnschichtchromatographische Bestätigung des mit EMIT erhaltenen Hinweises zu bekommen. Noch nach einem halben Jahr Kühlschranklagerung ließ sich in den Urinen unseres Versuches die THC-Carbonsäure nachweisen. Beim Vergleich mit EMIT stellten wir fest, daß von etwa 50 ng/ml ab eine 100%ige Bestätigung des EMIT-Befundes durch DC möglich war. Für den darunterliegenden Bereich zwischen 20 und 50 ng/ml ließ sich die Carbonsäure nur in etwa jedem zweiten Fall nachweisen. Da auch andere THC-Metaboliten zum EMIT-Ergebnis beitragen, bedeutet dies natürlich nicht einen 50%igen Fehler des EMIT-Verfahrens für diesen Bereich. Irving et al. [22] fanden eine 98%ige Bestätigung von EMIT positiven Befunden mit einem empfindlichen GC-MS-Verfahren. Bei kurzen Zeiten zwischen Cannabisaufnahme und Urinentnahme kann die THC-Carbonsäure im Urin fehlen. Bereits eine Empfindlichkeit von 50 ng/ml im Urin ist als ausreichend zu betrachten, da, wie Hager und Magerl [23] berichteten, diese Konzentrationen noch nach 3 Tagen und länger vorliegen.

Durch Verwendung des EMIT-Verfahrens läßt sich ein einfacher und schneller Hinweis auf eine Aufnahme von Cannabisharz in Blut und Urin führen. Im Falle des Blutes ist GC-MS das Verfahren der Wahl für den Nachweis und die quantitative Bestimmung. Für die Absicherung des Nachweises im Urin steht mit der hier beschriebenen Methode ein einfaches und empfindliches dünnschichtchromatographisches Verfahren zur Verfügung, das in jedem Labor einsetzbar ist.

Literatur

1. Gaoni Y, Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. J Amer Chem Soc 86:1646–1647
2. Mechoulam R, Shani A, Edery H, Grunfeld Y (1970) The chemical basis of hashish activity. Science 169:611–612
3. Burstein S, Rosenfeld J, Wittstruck Th (1972) Isolation and characterization of two major urinary metabolites of Δ^1-tetrahydrocannabinol. Science 176:422–423
4. Hanke M, Megges G (1983) Routine-Nachweis des THC-Metaboliten. 11-Nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carbonsäure in der forensischen Praxis. Z Rechtsmed 90:105–108
5. Foltz RL, McGinnis KM, Chinn DM (1983) Quantitative measurement of Δ^9-tetrahydrocannabinol and two major metabolites in physiological specimens using capillary column gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry. Biomed Mass Spectrom 10:316–323

6. Whiting JD, Manders WU (1983) The confirmation of 9-carboxy-THC in urine by gas chromatography/mass spectrometry. Aviat Space Environ Med 54:1031–1033
7. El Sohly UA, Arafat ES, Jones AB (1984) Analysis of the major-metabolite of Δ^9-tetrahydrocannabinol in urine. III. A GC/ECD procedure. J Anal Toxicol 8:7–9
8. Peat UA, Deyman UE, Johnson JR (1984) High performance liquid chromatography-immunoassay of Δ^9 tetrahydrocannabinol and its metabolites in urine. J Forens Sci 29: 110–119
9. Teale JD, King LJ, Forman EJ, Marks V (1974) Radioimmunoassay of cannabinoids in blood and urine. Lancet 2:553–555
10. Law B, Mason PA, Moffat AC, Gleadle RI, King LJ (1984) Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral inquestion of cannabis resin. J Pharm Pharmacol 36:289–294
11. EMIT-dau Cannabinoid Urine Assay (1983) Syva Corporation, Palo Alto, Ca
12. Agurell S, Gustafsson B, Holmstedt B, Leander K, Lindgren J-E, Nilsson I, Sandberg F, Asberg M (1973) Quantitation of Δ^1-tetrahydrocannabinol in plasma from cannabis smokers. J Pharm Pharmacol 25:554–558
13. Bachmann EW, Hofmann AA, Waser PG (1979) Identification of Δ^9-tetrahydrocannabinol in human plasma by gaschromatography. J Chromatogr 178:320–323
14. Slightom EL (1978) The analysis of drugs in blood, bile and tissue with an indirect homogeneous enzyme imunoassay. J Forens Sci 23:292–303
15. Peel HW, Perrigo BJ (1981) Detection of cannabinoids in blood using EMIT. J Anal Tox 5:165–167
16. Ohlsson A, Lindgren J, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK (1980) Plasma concentrations of Δ^9-tetrahydrocannabinol and clinical effects following three routes of administration. Clin Pharmacol Ther 28:404–416
17. Salaschek M, Matte A, Seifert R (1973) Über die Problematik des Nachweises von Haschischgenuß durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen. J Chromatogr 78:393–400
18. Kisser W (1972) Zum Nachweis von Haschischinhaltstoffen im Harn. Arch Toxikol 29:331–334
19. Kaistha KK, Tadrus R (1982) Semi-quantitative thin-layer mass-screening detection of 11-nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human urine. J Chromatogr 237: 528–533
20. Kanter SL, Hollister LE, Musumeci M (1982) Marijuana metabolites in urine of man. X. Identification of Marijuana use by detection of Δ^9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid using thin-layer-chromatography. J Chromatogr 234:201–208
21. v Meyer L (1984) Schnelle Voranreicherung und Analyse von Tetrahydrocannabinol (carbonsäure) aus Urin mit dem Baker-10 Extraktionssystem und Baker SPE Trennsäulen. Baker Application Note 103
22. Irving J, Leeb B, Foltz RL, Cook CE, Bursey JT, Willette RE (1984) Evaluation of immunoassays for cannabinoids in urine. J Anal Toxicol 8:192–196
23. Hager W, Magerl JH (1981) Der Nachweis von Cannabinoiden mittels Enzymimmunoassay. Vortrag bei der 60. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Kiel

Eingegangen am 30. Juli 1984