

Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – a feasible approach for forensic applications?

Florian Franz^{1,2,*}, Georg Weinfurtner³, Bjoern Moosmann¹, Volker Auwärter¹

¹Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, D-79104 Freiburg

²Universität Freiburg, Hermann-Staudinger-Graduiertenschule, Hebelstraße 27, D-79104 Freiburg; *corresponding author: florian.franz@uniklinik-freiburg.de

³medbo[®] - Medizinische Einrichtungen des Bezirks Oberpfalz, Klinisch-Chemisches Labor, Regensburg

Aims: For economic reasons institutions of drug rehabilitation and forensic psychiatric hospitals started to use immunoassays to screen urine samples for abuse of synthetic cannabinoids. To check if the commonly available immunoassay kits are capable of detecting currently prevalent substances in authentic urine samples, a retrospective study was performed.

Methods: Urine samples were analysed for synthetic cannabinoids by commercially available immunoassays comprising a JWH-018 kit as well as an UR-144/XRL-11 kit. All samples were also analysed by an up-to-date LC-ESI-MS/MS screening method covering metabolites of 43 synthetic cannabinoids.

Results and Discussion: Urine samples of over 500 individuals from seven different forensic psychiatric hospitals located in the federal states of Bavaria and Baden-Württemberg were analysed. None of the patients was tested positive by the two immunoassays. The LC-MS/MS analysis results proved the intake of synthetic cannabinoids in 7.7 % of the patients. Detected substances were metabolites of AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, APICA, JWH-122 and 5F-PB-22. This result can be explained by missing cross reactivity of the available antibodies regarding the newer synthetic cannabinoids in combination with sensitivity issues due to low analyte concentrations. There were no marked differences regarding the positive rate across the two federal states or between hospitals applying immunoassay screening versus other means of abstinence control.

Conclusion: Due to the highly dynamic market, ongoing structural modifications and the high availability of new substances via the Internet, it is strongly recommended not to rely on immunoassay testing for synthetic cannabinoids in the forensic field. As the antibodies used for immunochemical assays of other providers show similar cross reactivities, similar results can be expected for other immunoassay products.

1. Einleitung

Als vermeintlich legale Cannabisalternative gewinnen synthetische Cannabinoide in der forensischen Praxis zunehmend an Bedeutung [1]. Besonders in Entwöhnungseinrichtungen, Maßregelvollzugsanstalten und forensischen Psychiatrien stellt der Konsum dieser Substanzen ein Problem dar, da sie von immunchemischen Drogentests nicht bzw. nicht zuverlässig erfasst werden. Unbemerkt bzw. nicht nachweisbarer Konsum von Drogen kann in solchen Einrichtungen das therapeutische Arbeiten empfindlich stören. Aufgrund der teilweise im Vergleich zu Cannabis extrem hohen Potenz einiger Wirkstoffe und der schwankenden Zusammensetzung und Wirkstoffgehalte der „Legal High“-Produkte kommt es darüber hinaus nicht selten zu schweren Intoxikationen, die teils stationäre Behandlungen erfordern [2,3]. Um den Konsum dieser problematischen Substanzen zu reduzieren und damit den Therapieerfolg zu unterstützen ist es sinnvoll, regelmäßig umfassende Drogen-Screenings durchzu-

führen. Zu diesem Zweck bieten einige Hersteller von Immunoassays automatisierbare Tests für kosteneffiziente Hochdurchsatz-Analytik an. Einige dieser Produkte wurden bereits wissenschaftlich evaluiert [4-8]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass diese Kits geeignet sind ein breites Spektrum an synthetischen Cannabinoiden (der ersten Generation) und deren Metaboliten nachzuweisen [5]. Obwohl in der Beurteilung der Immunoassays darauf hingewiesen wird, dass die Kreuzreaktivität der Antikörper mit neueren Substanzen kritisch betrachtet werden muss [5], kann bei oberflächlichem Lesen der Eindruck entstehen, dass diese Tests bei hohen Sensitivitäten ein zuverlässiges Abstinenzscreening ermöglichen würden. Tatsächlich werden aus wirtschaftlichen Überlegungen in klinisch-chemischen Laboratorien oft routinemäßig Immunoassays zum Screening auf synthetische Cannabinoide eingesetzt. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt um Daten zur Nachweisbarkeit aktuell prävalenter Substanzen mit zwei kommerziell verfügbaren immunchemischen Verfahren zu erheben.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Ameisensäure (Rotipuran® $\geq 98\%$, p.a.), Kaliumhydrogenphosphat ($\geq 99\%$, p.a.) und 2-Propanol (Rotisolv® $\geq 99,95\%$, LC-MS grade) wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Acetonitril (LC-MS grade), Ammoniumformiat 10 M (99,995 %) und Kaliumhydroxid (puriss. p.a. $\geq 86\%$ (T) Pellets) von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) erworben. Alle verwendeten Referenzstandards und deuterierten Standards wurden von Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, USA) gekauft. Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) produzierte die verwendete β -Gucuronidase (*E. coli* K 12). Die verwendeten Immunoassays „synthetic Cannabinoids-1“ und „synthetic Cannabinoids-2“ sowie alle hierfür benötigten Kalibrations-/Kontrolllösungen wurden von Immunalysis (Pomona, Kalifornien, USA) erworben. Deionisiertes Wasser wurde mittels eines Kartuschen-Entionisierers von Memtech (Moorenweis, Deutschland) aufbereitet. Leerurinproben wurde von einem Freiwilligen gespendet und vor der Studie auf die Abwesenheit synthetischer Cannabinoide getestet.

Für die Analyse mit LC-MS/MS wurden die Fließmittel A (0,2 % HCOOH, 2 mmol/L $\text{NH}_4^+\text{HCOO}^-$ in Wasser) und B (ACN) verwendet.

2.2. Authentische Urinproben

Es wurde je eine Urinprobe von 549 verschiedenen Patienten aus insgesamt sieben forensisch-psychiatrischen Stationen der Bundesländer Baden-Württemberg (BaWü) und Bayern untersucht. Alle Analysen wurden im Einverständnis mit den Einsendern im Rahmen des beauftragten Screenings auf synthetische Cannabinoide durchgeführt.

2.3. Studiendesign

Alle Patienten einer forensischen Klinik wurden ohne Vorankündigung an einem bestimmten Stichtag zu einer Urinabnahme gebeten. Die Urinabnahme fand unter Sichtkontrolle eines Stationsmitarbeiters statt und die erhaltenen Proben wurden noch in der jeweiligen Klinik in zwei Aliquote aufgeteilt. Ein Aliquot wurde für das immunchemische Screening an das klinisch-chemische Labor des Bezirksklinikums Regensburg und das andere an das Institut für Rechtsmedizin Freiburg zur LC-MS/MS-Analyse gesendet. Nach der Messung wurden die Ergebnisse beider Methoden gegenübergestellt.

2.4. Immunoassay-Screening

Alle Urinproben wurden nach Zentrifugation direkt mit einem Cobas Integra[®] 800 Analyssystem (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung der beiden gebrauchsfertigen Homogenen-Enzym-Immunoassays (HEIA[™]) „Synthetic Cannabinoids-1“ und „Synthetic Cannabinoids-2“ analysiert. Für die Messung mit dem Immunoassay „Synthetic Cannabinoids-1“ wurde eine Kalibration mit einer Negativkontrolle und einer Kalibrationslösung von JWH-018-N-Pentansäure (20 ng/ml) durchgeführt. Zudem wurden eine niedrige (10 ng/ml) und eine hohe (30 ng/ml) Kontrolllösung von JWH-018-N-Pentansäure mitgemessen. Es wurde der vom Hersteller empfohlene Cut-off von 20 ng/ml verwendet. Für den Immunoassay „Synthetic Cannabinoids-2“ wurde mit einer Negativkontrolle und einer Kalibrationslösung von UR-144-N-Pentansäure (10 ng/ml) kalibriert. Als Kontrolllösungen wurden UR-144-N-Pentansäure-Lösungen in den Konzentrationen 5 ng/ml und 15 ng/ml mitgemessen. Der vom Hersteller empfohlene Cut-off lag bei 10 ng/ml. Tabelle 1 enthält die vom Hersteller angegebenen Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper [9].

Tab. 1. Herstellerangaben zu den Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper zu synthetischen Cannabinoiden und deren Metaboliten bezogen auf den jeweiligen Kalibrator(*).

Immunoassay	Analyt	Kreuzreaktivität [%]	Cut-off [ng/ml]
Synthetic Cannabinoids-1 (HEIA [™])	JWH-018 N-Pentansäure*	100	20
	JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl)	143	14
	JWH-018 4-Hydroxyindol	40	50
	JWH-018 5-Hydroxyindol	44	45
	AM-2201 N-(4-Hydroxypentyl)	111	18
	AM-2201 6-Hydroxyindol	133	15
	JWH-073 N-(4-Hydroxybutyl)	111	18
	JWH-073 6-Hydroxyindol	111	18
	JWH-073 N-Butansäure	111	18
	JWH-018	67	30
	AM-2201	100	20
	JWH-073	100	20
	JWH-019	100	20
	JWH-022	111	18
	JWH-200	111	18
	JWH-007	67	30
	JWH-122	25	80
	JWH-015	67	30
	JWH-398	33	60
	3-(1-Naphthyl)-1 <i>H</i> -indol	67	30
Synthetic Cannabinoids-2 (HEIA [™])	UR-144 N-Pentansäure*	100	10
	UR-144	50	20
	UR-144 N-Heptyl	25	40
	UR-144 N-(5-Bromopentyl)	40	25
	UR-144 N-(5-Chloropentyl)	50	20
	UR-144 N-(5-Hydroxypentyl)	50	20
	UR-144 N-(5-Hydroxypentyl)- β -D-glucuronid	33	30
	A-796260	33	30
	A-834735	50	20
	AB-005	33	30
	AM-2233	0,1	10000
	JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl)	0,3	3000
	JWH-250 N-(5-Hydroxypentyl)	0,5	20000
RCS-4-2 Methoxyisomer	0,1	10000	

Tab. 1 (Fortsetzung). Herstellerangaben zu den Kreuzreaktivitäten der verwendeten Antikörper zu synthetischen Cannabinoiden und deren Metaboliten bezogen auf den jeweiligen Kalibrator(*).

Immunoassay	Analyt	Kreuzreaktivität [%]	Cut-off [ng/ml]
Synthetic Cannabinoids-2 (HEIA™)	XLR-11	50	20
	XLR-11 N-(4-Hydroxypentyl)	14	70
	XLR-11 N-(4-Pentanyl)	50	20
	Cannabipiperidiethanon	< 0,05	50000
	JWH-250 N-(4-Hydroxypentyl)	< 0,05	50000
	JWH-250 N-(5-Carboxypentyl)	< 0,05	50000

2.5. LC-MS/MS-Screening

Für die Probenaufarbeitung wurden 0,5 ml Urin verwendet. Zur Spaltung der Glucuronide wurden 0,5 ml Phosphatpuffer pH 6 und 30 µl β-Glucuronidase zugegeben und bei 45 °C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde je Probe 1,5 ml der in Acetonitril gelösten internen Standards (2 ng/ml) und 0,5 ml Ammoniumacetat-Lösung 10 M zupipettiert. Nach Schütteln und Zentrifugation wurde 1 ml der Acetonitril-Phase abgenommen und unter leichtem Stickstoffstrom zur Trockene eingedampft. Die Rekonstitution erfolgte unmittelbar vor der Analyse in 200 µl Fließmittelgemisch A/B (50/50, v/v). Die Negativkontrolle (0,5 ml Leerurin) und Positivkontrolle wurden analog aufgearbeitet. Als Positivkontrolle diente 0,5 ml Leerurin, der mit 5 µl Standardlösung (1 µg/ml) und 10 µl eines ethanolschen Extrakt-Gemisch verschiedener positiver Urine (AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, APICA (SDB-001), MDMB-CHMICA, STS-135, THJ-2201) aufgestockt wurde.

Das LC-MS/MS-System bestand aus einer UHPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) gekoppelt mit einem API 5000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit TurbolonSpray® (Sciex, Darmstadt, Deutschland). Auf einer Luna C18(2)-Säule (100 Å, 150×2 mm, 5 µm) mit entsprechender Vorsäule (4×2 mm) (beide von Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) erfolgte unter Gradientenelution mit den Fließmitteln A und B die chromatographische Trennung (Flussrate 0,25 ml/min) (Tab. 2).

Tab. 2. Fließmittelgradient der LC-Methode.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0,0	50	50
3,5	40	60
5,5	30	70
6,5	25	75
7,5	20	80
9,0	10	90
11,5	10	90
12,0	50	50
15,0	50	50

Zum qualitativen Nachweis wurde eine scheduled Multiple Reaction Monitoring™ (sMRM)-Methode nach positiver Ionisation mit mindestens zwei charakteristischen Massenübergängen von Metaboliten 43 verschiedener synthetischer Cannabinoide verwendet (Tab. 3). Als Identifizierungskriterium wurden entsprechend den Richtlinien der GTFCh die Retentionszeit sowie das Flächenverhältnis der Fragmentationensignale herangezogen, wobei ein Signal/Rausch-

Verhältnis von mindestens 3:1 vorausgesetzt wurde. Für Metaboliten mit kommerziell erhältlichen Referenzstandards lag die Bestimmungsgrenze (LLOQ) der Methode zwischen 0,05 ng/ml und 0,5 ng/ml. Die Bestimmungsgrenze der übrigen Metaboliten liegen aufgrund der chemisch-strukturellen Ähnlichkeiten mit hoher Wahrscheinlichkeit in einem ähnlichen Bereich. Die Nachweisgrenzen liegen typischerweise mindestens eine Zehnerpotenz tiefer als die LLOQ's.

Mittels der ausgewählten Analyten war ein selektiver und sensitiver Konsumnachweis aller im Zeitraum von Anfang 2012 bis Oktober 2014 relevanten synthetischen Cannabinoide gegeben (Tab. 4).

Zur Beurteilung der Relevanz wurden die Ergebnisse des kontinuierlichen Produkt-Monitorings und der Serumanalytik im Rahmen des EU-Projektes „Spice II Plus“ sowie der Recherche in Konsumenten-Foren, wissenschaftlicher Literatur und behördlichen Veröffentlichungen herangezogen.

Tab. 3. Massenübergänge und optimierte Parameter der detektierten Analyten.

Analyt	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
AB-CHMINACA OH-cyclohexyl	373	257	60	5	35	20
	373	145	60	5	53	19
AB-CHMINACA Hydrolyse	358	241	60	5	35	20
	358	145	60	5	53	19
AB-CHMINACA Hydrolyse + OH-cyclohexyl	374	257	60	5	35	20
	374	145	60	5	53	19
AB-FUBINACA Dihydrodiol-indazol	403	287	150	10	35	10
	403	190	150	10	50	10
AB-FUBINACA OH-indazol	385	269	150	10	35	10
	385	109	150	10	50	10
AB-FUBINACA Hydrolyse	370	253	150	10	35	10
	370	109	150	10	50	10
AB-PINACA Hydrolyse	332	286	60	5	20	13
	332	215	60	5	35	20
	332	145	60	5	50	13
APICA OH-adamantyl	381	214	150	9	35	8
	381	151	150	9	35	8
APICA OH-adamantyl + OH-pentyl	397	230	150	9	35	8
	397	186	150	9	35	8
APICA OH-adamantyl + Oxopentyl	395	228	150	9	35	8
	395	151	150	9	35	8
JWH-122 4-OH-pentyl	372	169	160	7	30	12
	372	141	160	7	57	16
JWH-122 6-OH-indol	372	169	40	5	38	10
	372	141	40	5	60	18
PB-22 5-OH-pentyl	375	230	110	6	45	15
	375	144	110	5	35	23
PB-22 Pentansäure	389	244	140	4	30	16
	389	144	80	4	48	16
PB-22-5F OH-indol	393	248	170	10	20	13
	393	160	170	10	50	13
PB-22-5F OH-chinolin	393	232	170	10	20	13
	393	144	170	10	50	13
PB-22-5F Hydrolyse	250	206	110	3	22	16
	250	118	110	3	26	13
AB-CHMINACA OH-cyclohexyl	373	257	60	5	35	20
	373	145	60	5	53	19

Tab. 4. In der LC-MS/MS-Methode erfasste synthetische Cannabinoide.

Muttersubstanz	Zielanalyt im Urin	Bestimmungsgrenze [ng/ml]
AB-001	OH-adamantyl	nicht bestimmbar
AB-CHMINACA	OH-adamantyl + OH-pentyl	nicht bestimmbar
	OH-cyclohexyl	nicht bestimmbar
AB-FUBINACA	Amidhydrolyse	nicht bestimmbar
	Amidhydrolyse + OH-Cyclohexyl	nicht bestimmbar
	OH-indazol	nicht bestimmbar
AB-PINACA	Dihydrodiol-indazol	nicht bestimmbar
	Amidhydrolyse	nicht bestimmbar
5F-AB-PINACA	OH-pentyl	nicht bestimmbar
	Amidhydrolyse	nicht bestimmbar
ADBICA	OH-valinamid	nicht bestimmbar
	Amidhydrolyse	nicht bestimmbar
ADB-PINACA	4-OH-pentyl	0,5
	5-OH-pentyl	0,5
	Pentansäure	0,5
AKB-48	4-OH-pentyl	0,5
	5-OH-pentyl	0,5
	Pentansäure	0,5
5F-AKB-48	4-OH-pentyl	0,5
	OH-adamantyl	nicht bestimmbar
	Hydrolytische Defluorierung	0,05
AM-2201	Pentansäure	0,05
	OH-pentyl	0,05
	Hydrolytische Defluorierung	0,05
AM-694	Pentansäure	0,05
	5-OH-pentyl	nicht bestimmbar
5F-AMB	Pentansäure	nicht bestimmbar
	Amidhydrolyse	nicht bestimmbar
AMB	Amidhydrolyse + OH-pentyl	nicht bestimmbar
	Amidhydrolyse	nicht bestimmbar
APICA	Amidhydrolyse + OH-pentyl	nicht bestimmbar
	OH-adamantyl	nicht bestimmbar
BB-22	OH-adamantyl + OH-pentyl	nicht bestimmbar
	OH-adamantyl + Oxopentyl	nicht bestimmbar
	OH-cyclohexyl	nicht bestimmbar
EAM-2201	DiOH-cyclohexyl	nicht bestimmbar
	Esterhydrolyse	0,5
	Hydrolytische Defluorierung	0,05
FUB-PB-22	Pentansäure	0,05
	OH-Chinolin	nicht bestimmbar
JWH-007	Esterhydrolyse	nicht bestimmbar
	OH-pentyl	nicht bestimmbar
JWH-018	Pentansäure	nicht bestimmbar
	4-OH-pentyl	0,05
	5-OH-pentyl	0,05
JWH-019	6-OH-indol	0,05
	Pentansäure	0,05
	5-OH-indol	0,05
JWH-072	6-OH-hexyl	0,05
	JWH-072 Propansäure	0,05
JWH-073	JWH-073 3-OH-butyl	0,05
	JWH-073 4-OH-butyl	0,05
	JWH-073 Butansäure	0,05

Tab. 4 (Fortsetzung). In der LC-MS/MS-Methode erfasste synthetische Cannabinoide.

Muttersubstanz	Zielanalyt im Urin	Bestimmungsgrenze [ng/ml]
JWH-081	4-OH-pentyl	0,05
	4-OH-naphthyl	0,05
	5-OH-pentyl	0,05
	Pentansäure	0,05
JWH-122	4-OH-pentyl	0,05
	5-OH-pentyl	0,05
	6-OH-indol	0,05
	Pentansäure	0,05
JWH-200	5-OH-indol	0,05
	6-OH-indol	0,05
JWH-203	4-OH-pentyl	0,1
	5-OH-pentyl	0,1
	Pentansäure	0,5
JWH-210	4-OH-pentyl	0,05
	5-OH-indol	0,05
	5-OH-pentyl	0,05
	Pentansäure	0,05
JWH-250	4-OH-pentyl	0,05
	5-OH-pentyl	0,05
JWH-307	OH-pentyl	nicht bestimmbar
	OH-pentyl + OH-naphthyl	nicht bestimmbar
JWH-398	5-OH-pentyl	0,1
	Pentansäure	0,1
MAM-2201	4-OH-pentyl	0,05
	Hydrolytische Defluorierung	0,05
	Pentansäure	0,05
MDMB-CHMICA	OH-cyclohexyl	nicht bestimmbar
	Amidhydrolyse	nicht bestimmbar
NNEI	OH-pentyl	nicht bestimmbar
	OH-naphthyl	nicht bestimmbar
PB-22	4-OH-pentyl	0,1
	5-OH-pentyl	0,1
	Pentansäure	0,05
	Esterhydrolyse	0,1
5F-PB-22	OH-indol	nicht bestimmbar
	OH-Chinolin	nicht bestimmbar
	Esterhydrolyse	0,1
RCS-4	OH-indol	nicht bestimmbar
	OH-pentyl	nicht bestimmbar
	OH-phenyl	nicht bestimmbar
SDB-006	OH-pentyl	nicht bestimmbar
STS-135	OH-adamantyl	nicht bestimmbar
	DiOH-adamantyl	nicht bestimmbar
THJ-018	OH-indol	nicht bestimmbar
	OH-pentyl	nicht bestimmbar
	Dihydrodiol-naphtyl	nicht bestimmbar
THJ-2201	OH-pentyl	nicht bestimmbar
	Dihydrodiol-naphtyl	nicht bestimmbar
UR-144	4-OH-pentyl	0,05
	5-OH-pentyl	0,05
	Pentansäure	0,05
UR-144 Isomer	OH-pentyl	nicht bestimmbar
	Pentansäure	0,05
XLR-11	4-OH-pentyl	0,05
	6-OH-indol	0,1
	Hydrolytische Defluorierung	0,05
	Pentansäure	0,05

Weitere Details zur LC-MS/MS-Methode wurden bereits veröffentlicht [10].

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der beiden verwendeten HEIATM-Assays fielen für alle 549 Proben negativ aus. Lediglich bei einer Urinprobe wurden Signale unterhalb des vom Vertreiber empfohlenen Cut-offs von 20 ng/ml (JWH-018-Kit) detektiert, die als Hinweis auf einen Konsum synthetischer Cannabinoide gewertet wurden. Dagegen wurden mittels LC-MS/MS-Analyse 42 (7,7 %) der Proben positiv getestet. Somit ergibt sich eine falsch-negativ-Rate von gerundet 8 % für die beiden Immunoassays (Tab. 5).

Bei den nachgewiesenen Analyten handelte es sich um Metaboliten von AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, APICA (SDB-001), JWH-122 und 5F-PB-22 (Abb. 1). Der Hinweis aus dem immunchemischen Verfahren (Messwert knapp unter Cut-off) konnte in der betreffenden Probe mit LC-MS/MS nicht bestätigt werden.

Tab. 5. Ergebnis der Vergleichsmessung.		LC-MS/MS Bestätigung	
		negativ	positiv
IA	negativ	92 %	8 %
	positiv	0 %	0 %

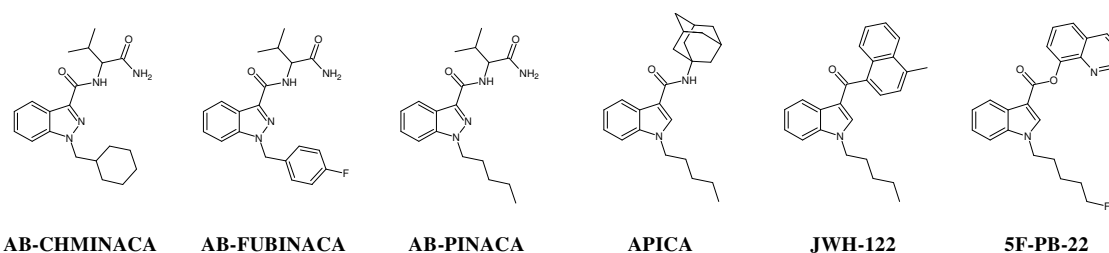
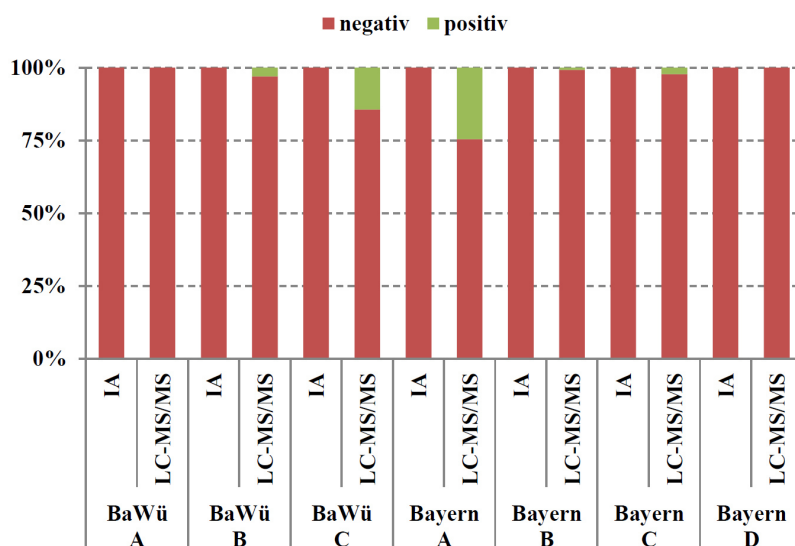


Abb. 1. Mittels LC-MS/MS-Analyse wurden Metaboliten der abgebildeten synthetischen Cannabinoide nachgewiesen. Die Immunoassays lieferten durchgehend negative Ergebnisse.



Insgesamt erscheint der Unterschied von 8 % aufgrund der hohen Negativrate im untersuchten Kollektiv zwar gering.

Betrachtet man allerdings die Ergebnisse innerhalb der einzelnen Kliniken im Detail, ergeben sich teilweise erhebliche falsch-negativ Raten von bis zu 25 % (Abb. 2).

Abb. 2. Analyseergebnisse der einzelnen Kliniken.

Weder zwischen den beiden Bundesländern noch zwischen den Kliniken mit routinemäßigem immunchemischen Screening und den Kliniken mit alternativen Kontrollmaßnahmen konnte bezüglich der Positivraten augenscheinliche Unterschiede festgestellt werden.

Berechnet man auf Grundlage dieser Ergebnisse die üblichen Leistungsparameter für die beiden Immunoassays, würde sich jeweils eine „Sensitivität“ von 0 %, eine „Spezifität“ von 100 % und eine „Richtigkeit“ von 92 % ergeben (Abb. 3).

$$\text{Sensitivität} = \left[\frac{\text{richtig Positive}}{\text{richtig Positive} + \text{falsch Negative}} \right] \times 100 = \left[\frac{0}{0 + 42} \right] \times 100\% = 0\%$$

$$\text{Spezifität} = \left[\frac{\text{richtig Negative}}{\text{richtig Negative} + \text{falsch Positive}} \right] \times 100 = \left[\frac{507}{507 + 0} \right] \times 100\% = 100\%$$

$$\text{Richtigkeit} = \left[\frac{\text{richtig Negative} + \text{richtig Positive}}{\text{Gesamtanzahl}} \right] \times 100 = \left[\frac{507 + 0}{549} \right] \times 100\% = 92\%$$

Abb. 3. Berechnung der Sensitivität, Spezifität und Richtigkeit der immunchemischen Analyse.

Das ausgewählte Kollektiv ist selbstverständlich nicht für die korrekte Bestimmung der Leistungsparameter der Immunoassays geeignet, dennoch zeigen die Zahlen anschaulich das Hauptproblem der Verwendung dieser Immunoassays für das Screening auf synthetische Cannabinoide auf. Dieses besteht in der fehlenden bzw. unzureichenden Kreuzreaktivität mit den aktuell vermarkteten Stoffen bzw. deren Stoffwechselprodukten. Dieses Problem war bezüglich der neueren Stoffe wie AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, APICA und 5F-PB-22 zu erwarten, da sich diese chemisch-strukturell deutlich von den synthetischen Cannabinoiden der früheren Generationen (insbesondere „JWH“-Substanzen und deren Fluor-Analoga) unterscheiden (Abb. 4).

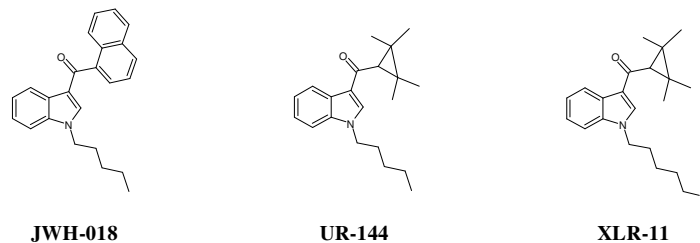


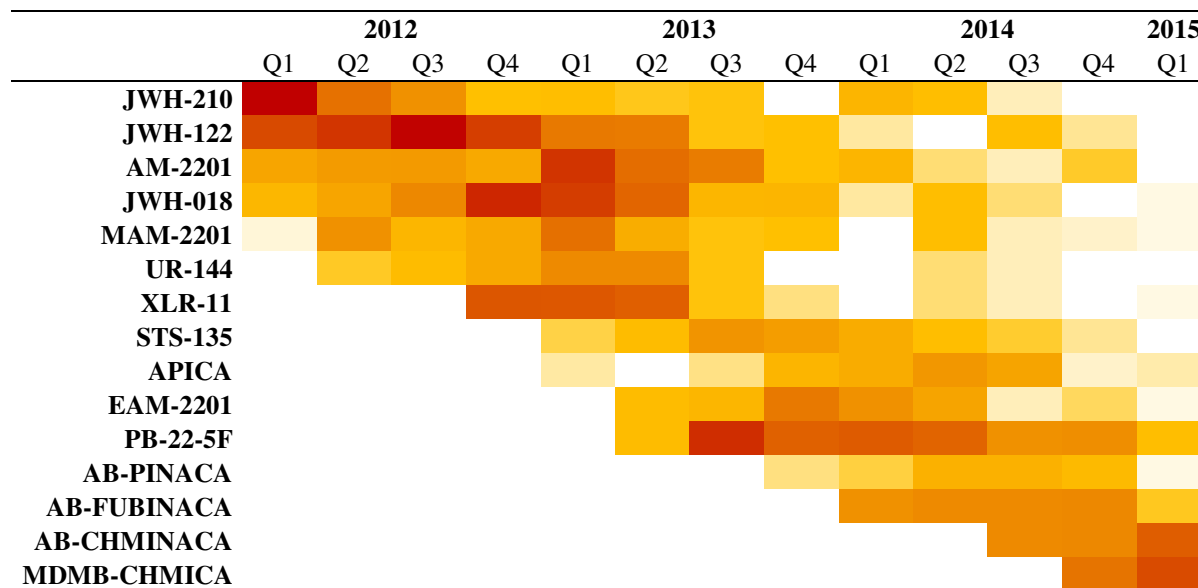
Abb. 4. Strukturen von JWH-018, UR-144 und XLR-11.

Aus der Analyse von über 3100 forensischen Proben (Serum) von Anfang 2012 bis Anfang 2015 (Positivrate 20 %) wird deutlich, wie stark sich das Spektrum der konsumierten synthetischen Cannabinoide innerhalb der letzten drei Jahre gewandelt hat (Analysen durchgeführt am Institut für Rechtsmedizin Freiburg) (Tab. 6). Die meisten Substanzen für welche eine nennenswerte Kreuzreaktivität der verwendeten Immunoassays ermittelt wurde wurden ab Mitte/Ende 2013 nur noch vereinzelt detektiert (vgl. Tab. 1).

Für JWH-122 und seine Metaboliten gibt der Hersteller dagegen eine Kreuzreaktivität von bis zu 25 % (bezogen auf die Muttersubstanz) an, was rechnerisch einem Cut-off von 80 ng/ml entspräche. Die Konzentrationen der in einer der Studienproben detektierten JWH-122-Metaboliten lag allerdings mit ca. 0,02 ng/ml 4-Hydroxypentyl-Metabolit und ca. 0,003 ng/ml 6-Hydroxyindol-Metabolit (Identifizierungskriterien erfüllt, Werte extrapoliert über den kleinsten Kalibrator) wesentlich niedriger. An diesem Beispiel ist erkennbar, dass neben mangelnder Kreuzreaktivität auch eine zu geringe Nachweisempfindlichkeit die Verwendung der Immunoassays für effektive Abstinenzkontrollen limitiert.

Noch deutlicher wird dies bei Betrachtung der durchschnittlichen in forensischen Urinproben gemessenen Konzentrationen von Metaboliten synthetischer Cannabinoide (Tab. 7).

Tab. 6. Authentische Serumproben, die positiv auf synthetische Cannabinoide getestet wurden im Verhältnis zu allen positiv gemessenen Serumproben je Quartal. Dargestellt als Heatmap zur Visualisierung der Prävalenz (0 % = weiß; 76 % = rot).



Tab. 7. Konzentrationsverteilung in positiven authentischen Urinproben aus den Jahren 2013 und 2014 für ausgewählte Analyten. „n“ = Anzahl der auf den jeweiligen Metaboliten positiv getesteten Metaboliten.

Analyt	< 0,05 ng/ml	0,05-10 ng/ml	> 10 ng/ml*	Proben (n)
JWH-018 4-Hydroxyindol	0%	0%	0%	0
JWH-018 5-Hydroxyindol	20%	80%	0%	10
JWH-018 N-(4-Hydroxypentyl)	18%	60%	21%	121
JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl)	16%	68%	15%	243
JWH-018 N-Pentansäure	13%	65%	22%	223
JWH-073 N-(3-Hydroxybutyl)	10%	90%	0%	10
JWH-073 N-(4-Hydroxybutyl)	38%	58%	4%	24
JWH-073 N-Butansäure	16%	71%	13%	55
JWH-122 5-Hydroxyindol	78%	22%	0%	9
JWH-122 N-(4-Hydroxypentyl)	18%	75%	8%	40
JWH-122 N-(5-Hydroxypentyl)	23%	70%	7%	97
JWH-122 N-Pentansäure	26%	68%	5%	38
JWH-210 5-Hydroxyindol	20%	50%	0%	2
JWH-210 N-(4-Hydroxypentyl)	100%	0%	0%	1
JWH-210 N-(5-Hydroxypentyl)	14%	86%	0%	28
JWH-210 N-Pentansäure	22%	78%	0%	9
UR-144 N-(4-Hydroxypentyl)	10%	76%	14%	21
UR-144 N-(5-Hydroxypentyl)	19%	76%	5%	42
UR-144 N-Pentansäure	6%	72%	23%	53
XLR-11 N-(4-Hydroxypentyl)	0%	86%	14%	7

*Werte lagen oberhalb des höchsten Kalibrators

Die Auswertung unserer Daten aus den Jahren 2013 und 2014 von über 5.700 forensischen Proben (Urin) zeigt, dass die gemessenen Analytkonzentrationen in 77-100 % der Fälle unter

10 ng/ml lagen (Analysen durchgeführt am Institut für Rechtsmedizin Freiburg). Bei Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Cut-offs wären demnach selbst für den Nachweis synthetischer Cannabinoiden der 1. Generation in der überwiegenden Anzahl der Fälle falsch negative Ergebnisse zu erwarten gewesen.

4. Schlussfolgerung

Aufgrund mangelnder Kreuzreaktivität bezüglich der aktuell relevanten Substanzen bzw. deren Metaboliten (vgl. Tab. 6) und zu hoher Cut-offs ist die Sensitivität der getesteten Immunoassays und damit ihr praktischer Nutzen stark in Frage zu stellen. Die häufig resultierenden falsch negativen Ergebnisse können dazu führen, dass der Konsum synthetischer Cannabinoide unerkannt bleibt und somit den Therapieerfolg gefährdet. Aus diesem Grund ist aus Sicht der Autoren der Einsatz der beiden getesteten Immunoassays weder für den forensischen noch für den klinischen Bereich zu empfehlen. Für Immunoassays anderer Anbieter mit vergleichbaren Kreuzreaktivitäten können ähnliche Ergebnisse erwartet werden.

5. Danksagung

Die Autoren möchten Ihren Dank aussprechen an alle involvierten Mitarbeiter der beteiligten Kliniken für die fruchtbare Kooperation. Des Weiteren danken die Autoren namentlich Frau Raija Hammer, Frau Kathrin Riedy und Herrn Manuel Sandmeyer für Ihr großes Engagement bei der organisatorischen und technischen Durchführung der vorliegenden Studie.

6. Referenzen

- [1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2015), New psychoactive substances in Europe. An update from the EU Early Warning System (March 2015), Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- [2] Hermanns-Clausen M, Kneisel S, Szabo B, Auwärter V Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings. *Addiction* 2013;108:534-544.
- [3] Moosmann B, Angerer V, Auwärter V Inhomogeneities in herbal mixtures: a serious risk for consumers. *Forensic Toxicol* 2015;33:54-60.
- [4] Schwöpe D, Milman G, Huestis M Validation of an Enzyme Immunoassay for Detection and Semiquantification of Cannabinoids in Oral Fluid. *Clinical Chemistry* 2010;56:1007-1014
- [5] Barnes A, Young S, Spinelli E, Martin T, Klette K, Huestis M Evaluation of a homogenous enzyme immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids in urine. *Forensic Science International* 2014;241:27-34
- [6] Castaneto M, Desrosiers N, Ellefsen K, Anizan S, Martin T, Klette K, Huestis M Method validation of the biochip array technology for synthetic cannabinoids detection in urine. *Bioanalysis* 2014;6.21:2919-2930
- [7] Schwöpe D, Milman G, Huestis M Validation of an ELISA Synthetic Cannabinoids Urine Assay. *Therapeutic Drug Monitoring* 2015; DOI: 10.1097/FTD.0000000000000201
- [8] Spinelli E, Barnes A, Young S, Castaneto M, Martin T, Klette K, Huestis M Performance characteristics of an ELISA screening assay for urinary synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis* 2014; DOI: 10.1002/dta.1702
- [9] Immunalysis. K2-II-Synthetic-Cannabinoids-HEIA-Info-Sheet-Ver.-A-Final; <http://immunalysis.com/wp-content/uploads/2013/03/MKT-1051-K2-II-Synthetic-Cannabinoids-HEIA-Info-Sheet-Ver.-A-Final.pdf>; 17.06.2015
- [10] Hutter M, Moosmann B, Kneisel S, Auwärter V Characteristics of the designer drug and synthetic cannabinoid receptor agonist AM-2201 regarding its chemistry and metabolism. *J Mass Spectrom* 2013;48:885-894