

Konsumnachweis synthetischer Cannabinoide in menschlichen Haar- und Urinproben

Möglichkeiten und Grenzen der Interpretation analytischer Befunde
in der forensisch-toxikologischen Fallarbeit



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Florian Franz
aus München

2018

Die praktischen Arbeiten zur Erstellung der vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Januar 2014 bis Dezember 2017 am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

Entsprechend des gemäß § 8 Absatz 3 der Promotionsordnung der Albert-Ludwigs-Universität für die Fakultät für Chemie und Pharmazie (vom 28.01.2016) gestellten Antrags vom 07.04.2017 (bewilligten durch den Promotionsausschuss am 27.04.2017) wurde die vorliegende Arbeit als kumulative Dissertation abgefasst. Die der Dissertation zugrunde liegenden Originalarbeiten wurden in begutachteten, international anerkannten Fachzeitschriften publiziert und sind unter einer gemeinsamen wissenschaftlichen Fragestellung entstanden (siehe Kapitel 2 „Ziele der Arbeit“). Die Publikationen sind in Kapitel 3 („Durchgeführte Studien“) aufgeführt, wobei zu jeder Veröffentlichung eine detaillierte Aufschlüsselung der individuellen Beiträge aller beteiligten Autoren als Fußnote angegeben ist. In Kapitel 4 („Abschließende Nachbetrachtung“) werden die wichtigsten Erkenntnisse aus den durchgeführten Studien in den Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Literatur der jeweiligen Forschungsbereiche kritisch eingeordnet. Eine vollständige Auflistung aller während der Promotionszeit entstandenen Veröffentlichungen findet sich am Ende der vorliegenden Arbeit (siehe „Publikationen“).

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Dekan:

Referent:

Korreferent:

Datum der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Stefan Weber

Prof. Dr. Manfred Jung

Prof. Dr. Manfred Jung

Prof. Dr. Volker Auwärter

23.07.2018

Meiner Familie gewidmet

Danksagung

Ich möchte nicht unerwähnt lassen, dass ich zu meinem großen Glück während meiner Promotionszeit auf die Unterstützung vieler lieber Menschen bauen konnte, was auf verschiedenste Weisen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Danke lieber Volker, dass du mich nach unserem erinnerungswürdigen ersten Treffen in deinen Arbeitskreis aufgenommen hast und mir dieses spannende und abwechslungsreiche Thema überlassen hast. Durch dein großes Vertrauen durfte ich selbstständig arbeiten und eigene Schwerpunkte setzen, was mir viel kreativen Spielraum eröffnet hat. Dabei haben mir unsere spätabendlichen, lehrreichen und freundschaftlichen Diskussionen immer geholfen den richtigen Weg zu finden. Besonders schätze ich auch, dass du es mir ermöglicht hast unsere Arbeiten auf zahlreichen Tagungen zu präsentieren und dabei viel von der Welt zu sehen.

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Drs. h.c. Pollak, Ihnen bin ich sowohl wegen der Erlaubnis diese Arbeit am Institut für Rechtsmedizin durchführen zu dürfen als auch wegen der finanziellen Unterstützung meiner Forschung und Dienstreisen zu großem Dank verpflichtet und wünsche Ihnen eine gute Zeit in Ihrem baldigen und wohlverdienten Ruhestand.

Weiterhin war die finanzielle Unterstützung der Europäischen Kommission (EU-Projekte „Spice“, „Spice II plus“, „Spice Profiling“), des Bundesministeriums für Gesundheit (EU-Projekt „Spice“), der Stadt Frankfurt (EU-Projekt „Spice“) sowie der Society of Hair Testing (SoHT Travel Grant 2016) eine grundlegende Voraussetzung für diese Arbeit und die zahlreichen Tagungsbeiträge.

Herrn Prof. Dr. Manfred Jung danke ich herzlich für die bereitwillige Aufnahme in seine „große Runde“, für die engagierte Betreuung der Doktorarbeit von Seiten der Fakultät für Chemie und Pharmazie und gleichwohl für die Möglichkeit zur begleitenden Weiterbildung zum „Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik“.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen/innen der „Tox Freiburg“ bin ich sehr dankbar für die herzliche Aufnahme und die tolle Zusammenarbeit. Ihr schafft es sogar in den herausforderndsten Situationen, eine großartige Arbeitsatmosphäre zu wahren! Mit einigen von euch habe ich in den letzten Jahren besonders eng zusammengearbeitet und mit eurer Hilfe viele Hürden gemeistert. Deshalb gilt mein besonderer Dank Kathrin, Katrin, Kristina, Lena, Nadine, Raija und Tobias – ohne euch wäre die „JWH-Urine“- und „JWH-Haare“-Dienstleistungsanalytik für mich kaum vorstellbar gewesen und wir würden heute vielleicht nicht über so viele wertvolle Daten verfügen. Trotz eurer hohen Auslastung wart ihr immer bereit, mich bei der Analyse zahlreicher Forschungsproben zu unterstützen. Ihr seid super! Laura, danke für die geduldige Einführung in die Welt der hochauflösenden Massenspektrometrie. Lieber Jürgen, vielen Dank für die kompetente Unterstützung in allen technischen und „hausmeisterlichen“ Belangen – habe stets ein Klebeband bei dir! Susanne, danke für deinen Rat bei einigen *post mortem*-Fällen und dafür, dass du mir selbst die ausgefallensten Forschungsutensilien besorgt hast. Danke Merja für die lohnende Zusammenarbeit in der „JWH-Haare“-Analytik und für das „behaarliche“ Vorantreiben der gemeinsamen Publikation.

Die vielen Stunden im Institut und so mancher Feierabend wären sehr einsam gewesen ohne meine tollen Promotionskollegen/innen: Björn, Chrissi, Kerstin, Lukas, Maurice, Melle, Michaela, Miriam, Sebastian, Verena – vielen, vielen Dank für den großartigen Zusammenhalt, den niemals endenden Süßigkeitsvorrat und einfach dafür, dass ich in eurem Kreis immer ich selbst sein durfte (was für euch vielleicht nicht immer leicht war). Ich wünsche euch weiterhin den größten Erfolg! Im Speziellen danke ich Melle für die geduldige Einarbeitung in die „JWH-Urin“-Thematik und Lukas für die herausragende Weiterführung der „unendlichen Geschichte“. Miriam, es war

schön mit dir gemeinsam neue Arbeitsplätze zu erobern und ich bin dir sehr dankbar für die telefonische Rückendeckung. Björn und Verena, ohne euch hätte ich vieles nicht erreicht – vielen Dank, dass ich so viel von euch lernen durfte und für das perfekte Teamwork in den vielen gemeinsamen Projekten! Maurice, danke für dein offenes Ohr in allen Angelegenheiten! „Buben“, ich werde euch nie vergessen, dass ihr mir gegen Ende so viele „Pinkler“ vom Hals gehalten habt!

Eine große Hilfe waren mir auch „meine“ engagierten Praktikanten/innen: Fabian, Hanna, Karina, Katharina und Nadja. Es hat Spaß gemacht mit euch zu arbeiten und ich wünsche euch viel Erfolg auf eurem Weg! Ganz besonders möchte ich dir danken, Hanna, für deine stete Zuverlässigkeit, die vielen Stunden Arbeit, die du mir über die Jahre abgenommen hast und deine ansteckende positive Art.

Neben den vielen genannten Kollegen haben noch mehr externe Kooperationspartner zum Gelingen der verschiedenen Projekte beigetragen – zu viele um an dieser Stelle alle namentlich aufzuführen zu können. Dennoch bin ich jedem Einzelnen dankbar für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Niemals wäre ich so weit gekommen ohne meine großartige Familie. Euer Glaube an mich und eure bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage sind für mich von unschätzbarem Wert. Danke für alles, was ihr mir mit auf meinen Weg gegeben habt. Außerdem danke ich euch und meinen Freunden in der Heimat auch für euer Verständnis dafür, dass ich in den letzten Jahren oft nicht da sein konnte.

Liebste Nina, es gibt so vieles wofür ich dir unendlich dankbar bin. Durch deine verständnisvolle, fürsorgliche und fröhliche Art hast du mir oft Kraft gegeben. Danke, dass du immer für mich da bist, mir hilfst an mich selbst zu glauben, immer die richtigen Worte findest, stetig meinen Horizont erweiterst, schier unerschöpfliche Geduld mit mir hast (die ich oft selbst nicht aufbringen kann) und mir eines Tages beibringen wirst, dass man nicht jeden Weg in 10 Minuten gehen kann. Ich blicke immer gerne auf unsere vielen kleinen und großen Momente zurück und freue mich sehr auf die, die noch kommen!

Florian

Freiburg, 26.06.2018

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit bestätige ich gemäß § 7 Absatz 1 Satz 3 Nr. 8 der Promotionsordnung der Albert-Ludwigs-Universität für die Fakultät für Chemie und Pharmazie (vom 28.01.2016), dass es sich bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema „Konsumnachweis synthetischer Cannabinoide in menschlichen Haar- und Urinproben – Möglichkeiten und Grenzen der Interpretation analytischer Befunde in der forensisch-toxikologischen Fallarbeit“ um meine eigenständig erbrachte Leistung handelt. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Freiburg, 26.06.2018

Ort, Datum



Unterschrift (Florian Franz)

Zusammenfassung

Synthetische Cannabinoide (SC) sind eine der bedeutendsten Klassen der „Designerdrogen“ und werden in erster Linie wegen ihrer cannabisähnlichen Wirkung konsumiert. Die Vielzahl der einzelnen Wirkstoffe, die hohe Dynamik des SC-Marktes und die meist niedrigen Konzentrationen der Drogen in humanen Haar- und Urinproben stellen für den Nachweis einer Substanzaufnahme in der forensisch-toxikologischen Fallarbeit eine große analytische Herausforderung dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung analytischer Methoden für einen sicheren Nachweis der in Deutschland relevanten SC beziehungsweise deren Hauptmetaboliten in humanen Haar- und Urinproben. Da SC vor der renalen Ausscheidung in der Regel einer extensiven Biotransformation unterliegen, war die Identifizierung der Hauptmetaboliten neuer Substanzen für deren Nachweis in Urinproben notwendig. Darüber hinaus sollten die Möglichkeiten und Grenzen der Befundinterpretation hinsichtlich eines Konsumbeweises untersucht werden.

Für die Analyse von Haar- und Urinproben wurde Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie eingesetzt (LC-MS/MS). Zur Identifizierung der Hauptmetaboliten neuer SC wurden Experimente mit humanen Lebermikrosomen (*in vitro*) und Analysen von Urinproben von SC-Konsumenten (*in vivo*) durchgeführt. Die Aussagekraft analytischer Befunde hinsichtlich eines Konsumbeweises wurde mittels Analyse authentischer Haar- und Urinproben, *in vitro*-Metabolismusstudien und verschiedener Stabilitätstests untersucht.

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien haben gezeigt, dass durch Haaranalysen das Ausmaß einer SC-Exposition abgeschätzt werden kann. Es wurde aber auch aufgezeigt, dass einige typische Phase-I-Metaboliten als Artefakte gebildet werden können. Dies bedeutet für die betroffenen Metaboliten eine erhebliche Einschränkung der Befundinterpretation und wirft die Frage auf, ob die allgemeine Akzeptanz von Metaboliten-Befunden in Haarproben als Beweis für eine systemische Substanzaufnahme berechtigt ist. Die durchgeführten Metabolismusstudien tragen durch die Beschreibung von Struktur-Metabolismus-Beziehungen zum besseren Verständnis der Phase-I-Biotransformation neuer SC bei. Durch die identifizierten Hauptmetaboliten wurde der sichere Nachweis einer systemischen SC-Aufnahme durch die Analyse menschlicher Urinproben ermöglicht. Die entwickelten Nachweisverfahren für SC bzw. deren Metaboliten in humanen Haar- und Urinproben entsprechen dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik hinsichtlich des erfassten Substanzspektrums und der erreichten Nachweisgrenzen. Beide Methoden können komplementär zur Beantwortung verschiedener klinischer und forensischer Fragestellungen eingesetzt werden, wobei der Einsatz schwerpunktmäßig auf der SC-Abstinenzkontrolle liegt.

Insgesamt tragen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wesentlich dazu bei, die Herausforderungen der SC-Bioanalytik zu bewältigen und analytische Befunde korrekt zu interpretieren.

Abstract

Synthetic cannabinoids (SCs) are one of the most important classes of 'designer drugs' and are commonly used for their cannabis-like psychoactive effects. The large number of substances, the high dynamic of the SC market as well as their generally low concentrations in hair and urine samples of drug users pose a great analytical challenge for the detection of an SC uptake in forensic-toxicological case work.

The aim of this thesis was the development of analytical methods for the reliable detection of all SCs (or their major metabolites) relevant on the German drug market in human hair and urine samples. As SCs are usually subject to extensive biotransformation prior to renal excretion, the major metabolites had to be identified for new compounds to enable their detection in urine samples. Moreover, it was important to evaluate the possibilities and limitations for the interpretation of analytical results regarding a proof of consumption.

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was applied for analysis of hair and urine samples. For the identification of the major metabolites of new SCs experiments with human liver microsomes (*in vitro*) and analysis of authentic urine samples of drug users (*in vivo*) were conducted. The value of a bioanalytical marker regarding a proof of consumption was assessed on the basis of results from analysis of authentic hair and urine samples, *in vitro* metabolism studies, and various stability tests.

The results of the presented work demonstrated hair analysis to be a useful tool to prove an SC exposure. However, it was also shown that several commonly detected phase I metabolites of SCs can be formed as artefacts in relevant amounts. This means a serious limitation for the interpretation of affected findings. In addition, this finding challenges the general acceptance of metabolite findings in hair taken as a proof of drug consumption. The conducted metabolism studies revealed distinct structure-metabolism relationships, which increase the understanding of phase I biotransformation of new SCs. Targeting the newly identified major metabolites in urine analysis enables the reliable proof of systemic SC uptake. The developed methods comply with the current state of science and technology concerning the covered analytes as well as the reached limits of detection. Both bioanalytical assays can be used complementarily to answer clinical and forensic questions in the context of an (alleged) SC exposure/uptake, although one of the main applications can be seen in abstinence testing.

In conclusion, the results of this thesis significantly contribute to overcome the challenges of SC bioanalysis and support the correct interpretation of analytical findings.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitende Vorbetrachtung	1
1.1	Forensische Toxikologie	2
1.2	Rauschdrogen	2
1.3	Synthetische Cannabinoide	3
1.3.1	Endocannabinoidsystem und Wirkmechanismus	3
1.3.2	Systematik der Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten	3
1.3.3	Synthetische Cannabinoide als Rauschdrogen	7
1.3.4	Rechtliche Situation in Deutschland	8
1.3.5	Bedeutung in der forensischen Toxikologie	9
1.4	Metabolismus	10
1.4.1	Allgemeine Grundlagen	10
1.4.2	Modelle für Metabolismusstudien	12
1.4.3	Synthetische Cannabinoide	12
1.5	Technologien zur Prüfung biologischen Probenmaterials	14
1.5.1	Massenspektrometrische Verfahren	14
1.5.2	Immunchemische Verfahren	26
1.6	Prüfung biologischen Probenmaterials	29
1.6.1	Urinanalytik	29
1.6.2	Haaranalytik	30
1.7	Referenzen	32
2	Ziele der Arbeit	37
3	Durchgeführte Studien	39
3.1	Metabolismus und Nachweis durch Urinanalysen	41
3.1.1	Struktur-Metabolismus-Beziehungen	43
3.1.2	AB-CHMFUPPYCA-Stellungsisomere	45
3.1.3	MDMB-CHMICA	47
3.1.4	5F-MDMB-PICA	49
3.1.5	5F-Cumyl-PINACA und Cumyl-PINACA	51
3.1.6	Synthetische Cannabinoide in Urinproben	53
3.2	Nachweis durch Haaranalysen	55
3.2.1	Synthetische Cannabinoide in Haarproben	57
3.2.2	Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Haarproben	59
4	Abschließende Nachbetrachtung	61
4.1	Trend des „Spice-Phänomens“	62
4.2	Chemisch-strukturelle Entwicklungen	62
4.3	Nachweis durch Urinanalysen	65
4.3.1	Biotransformation neuer synthetischer Cannabinoide	65
4.3.2	Humaner Lebermikrosomen-Assay	70
4.3.3	Testverfahren	71
4.3.4	Befundinterpretation	73
4.4	Nachweis durch Haaranalysen	74
4.4.1	Testverfahren	74
4.4.2	Befundinterpretation	74
4.5	Fazit	77
4.6	Referenzen	78

5	Anhang	87
5.1	Struktur-Metabolismus-Beziehungen	88
5.2	AB-CHMFUPPYCA-Stellungsisomere	88
5.3	MDMB-CHMICA	88
5.4	5F-MDMB-PICA.....	88
5.5	5F-Cumyl-PINACA und Cumyl-PINACA	89
5.6	Synthetische Cannabinoide in Urinproben	89
5.7	Synthetische Cannabinoide in Haarproben.....	89
	Publikationen	91
	Lebenslauf.....	97

Abkürzungsverzeichnis

Das folgende Verzeichnis enthält eine alphabetische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen. Die in den einzelnen Publikationen (Kapitel 3 „Durchgeführte Studien“) verwendeten Abkürzungen sind nicht Bestandteil dieses Verzeichnisses.

Abkürzung	Deutsch	Englisch
2-AG	2-Arachidonoylglycerol	2-Arachidonoylglycerol
AAI	Aminoalkylindole	Aminoalkylindoles
AMG	Arzneimittelgesetz	German act on medicinal products
AUC	Fläche unter der Kurve	Area under the curve
bbCID	Breitband-Stoßinduzierten Fragmentierung	Broadband Collision-Induced Dissociation
BtMG	Betäubungsmittelgesetz	German narcotics law
BtMGÄndV	Betäubungsmitteländerungs- verordnung	-
CB ₁	Cannabinoidrezeptor Typ-1	Cannabinoid receptor 1
CB ₂	Cannabinoidrezeptor Typ-2	Cannabinoid receptor 2
CES1	Carboxylesterase 1	Carboxylesterase 1
CID	Stoßinduzierte Fragmentierung	Collision-induced dissociation
CYP	Cytochrom-P450-Enzyme	Cytochrome P450 enzymes
EMCDDA	Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht	European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction
EPI	Verstärkter Produkt-Ionen-Scan	Enhanced product ion scan
ESI	Elektronenspray-Ionisation	Electrospray ionization
EtG	Ethylglucuronid	Ethyl glucuronide
EuGH	Europäischer Gerichtshof	European Court of Justice
FN	Falsch-Negatives Messergebnis	False negative result
FP	Falsch-Positives Messergebnis	False positive result
GC-MS	Gaschromatographie- Massenspektrometrie	Gas chromatography-mass spectrometry
GHB	γ-Hydroxybuttersäure	γ-Hydroxybutyric acid
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie	German-speaking society of toxicological and forensic chemistry
HEIA	Homogener Enzym-Immunoassay	Homogeneous enzyme immunoassay
HRMS	Hochauflösenden Massenspektrometrie	High resolution mass spectrometry
HU-210	11-Hydroxy-Δ ⁸ -THC-dimethylheptyl	11-Hydroxy-Δ ⁸ -THC-dimethylheptyl
IA	Immunchemisches Verfahren (Immunoassay)	Immunochemical assay (immunoassay)
ICH	-	International Council for Harmonisation

Abkürzung	Deutsch	Englisch
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie	Liquid chromatography-mass spectrometry
LLOQ	Unteren Bestimmungsgrenze	Lower limit of quantification
LOD	Nachweisgrenze	Limit of detection
LOQ	Bestimmungsgrenzen	Limits of quantification
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis	Mass-to-charge ratio
MPU	Medizinisch-psychologische Untersuchung	-
MRM	-	Multiple reaction monitoring scan
MS	Massenspektrometrie	Mass spectrometry
NPS	Neue psychoaktive Stoffe	New psychoactive substances
NpSG	Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetze	German law on new psychoactive substances
PIS	Produkt-Ionen-Scan	Product ion scan
Prec	Vorläufer-Ionen-Scan	Precursor ion scan
Q	Quadrupol	Quadrupole
QqQ	Triple-Quadrupol	Triple quadrupole
ROC	-	Receiver-Operating-Characteristic
RSD	Relative Standardabweichung	Relative standard deviation
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis	Signal-to-noise ratio
SC	Synthetisches Cannabinoid	Synthetic cannabinoid
sMRM	-	Scheduled multiple reaction monitoring scan
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TN	Richtig-Negatives Messergebnis	True negative result
ToF	Flugzeit	Time of flight
TP	Richtig-Positives Messergebnis	True positive result
ULOQ	Oberen Bestimmungsgrenze	Upper limit of quantification

1 Einleitende Vorbetrachtung

Im folgenden Kapitel wird die Ausgangssituation der vorliegenden Arbeit zu Beginn des Jahres 2014 skizziert. Dazu werden Informationen zum Hintergrund der Forschung vermittelt, der Stand der Wissenschaft zusammengefasst (bis Januar 2014) und einige relevante Begrifflichkeiten bezüglich der durchgeführten Studien eingeführt.

1.1 Forensische Toxikologie

Die forensische Toxikologie („gerichtliche Vergiftungslehre“) ist ein multidisziplinäres Fachgebiet, dessen Hauptaufgabe es ist, Fragestellungen zur Giftwirkung von Substanzen auf den menschlichen Organismus zu klären, die im Zusammenhang mit gerichtlichen Verfahren stehen. Zu diesem Zweck wird sowohl *ante mortem* als auch *post mortem* gewonnenes humanes Probenmaterial mit Hilfe biologischer, chemischer und physikalischer Testverfahren hinsichtlich der qualitativen und quantitativen Anwesenheit von Giftstoffen untersucht und die Analysebefunde im Kontext mit den Umständen des Falles bewertet. Häufig steht der Nachweis bzw. Ausschluss einer Substanzaufnahme zur Beurteilung von Fahrtüchtigkeit, Schuldfähigkeit oder Gesundheitszustandes einer Person bzw. die Ermittlung einer ungeklärten Vergiftungs-/Todesursache im Mittelpunkt einer forensisch-toxikologischen Untersuchung.^[1]

1.2 Rauschdrogen

Als Rauschdrogen werden gemeinhin psychoaktive Substanzen bezeichnet, die zur Erlangung von wahrnehmungs- oder bewusstseinsveränderten Zuständen eingenommen werden. Dabei ist die Abgrenzung zu Genussmitteln und Medikamenten häufig nur an Hand des Zieles der Einnahme dieser Substanzen möglich. Ein bekanntes Beispiel für ein Genussmittel mit hohem Missbrauchspotential sind ethanolhaltige Getränke ^[2]. Einige traditionelle, pflanzliche Heilmittel, welche zur Berauschung missbraucht werden können (z. B. psychoaktive Teile, Produkte oder Inhaltstoffe der Pflanzen Cannabis, Kokastrauch oder Schlafmohn), werden häufig als „illegale“ oder „klassische“ Rauschdrogen bezeichnet und unterliegen in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG).

Im Gegensatz zu diesen missbräuchlich verwendeten Substanzen wurden sogenannte „neue psychoaktive Stoffe“ (NPS) eigens zur Anwendung als Rauschdroge unter Umgehung rechtlicher Bestimmungen wie des BtMG entwickelt, weshalb man sie auch als „Designerdrogen“ bezeichnet. Unter dem Begriff NPS werden mehrere hundert Wirkstoffe zusammengefasst, die man nach ihrer Wirkung und chemischen Struktur weiter in Untergruppen einteilen kann. Als Leitstrukturen für die Entwicklung von NPS dienen meist klassische Rauschdrogen oder zugelassene Arzneimittel. Auch Wirkstoffe aus der pharmakologischen Forschung ohne Zulassung als Arzneimittel finden sich nicht selten – teils in abgewandelter Form – als Designerdrogen auf dem NPS-Markt wieder. Da das Inverkehrbringen und der Besitz dieser Substanzen in vielen Fällen zunächst keiner gesetzlichen Beschränkung unterliegt, hat sich auch die Bezeichnung „Legal Highs“ etabliert. Ein Beispiel hierfür sind die „synthetischen Cannabinoide“ (SC), die auf Grund ihrer cannabisartigen Wirkung („Cannabimimetika“) konsumiert werden.^[3] Diese Wirkstoffgruppe ist für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung und soll im Folgenden eingehend beschrieben werden.

1.3 Synthetische Cannabinoide

Im Zuge der Erforschung des Endocannabinoidsystems (siehe Kapitel 1.3.1) in den frühen 1990er Jahren wurden die Cannabinoidrezeptoren als vielversprechende pharmakologische Zielstrukturen für unterschiedliche Indikationen (z. B. Übelkeit, Tourette-Syndrom, Morbus Parkinson, Schmerz, Kachexie, Multiple Sklerose, Glaukom, Krebs, Diarrhöe oder Schlaganfall) identifiziert ^[4]. In den darauf folgenden Jahren wurden im Rahmen weiterführender pharmazeutischer Forschung eine Vielzahl von Cannabinoidrezeptoragonisten synthetisch entwickelt ^[5-32]. Für diese Wirkstoffklasse hat sich im allgemeinen Sprachgebrauch auch der kürzere Begriff „synthetische Cannabinoide“ etabliert.

1.3.1 Endocannabinoidsystem und Wirkmechanismus

Das Endocannabinoidsystem umfasst die Cannabinoidrezeptoren Typ-1 (CB₁) ^[33] und Typ-2 (CB₂) ^[34], deren endogene Agonisten sowie die Enzyme, welche an deren Biosynthese und Inaktivierung beteiligt sind. Beide Cannabinoidrezeptoren sind membranständige, G_{i/o}-Proteingekoppelte Rezeptoren. Die Einflüsse des Endocannabinoidsystems auf die physiologischen Prozesse des menschlichen Organismus sind äußerst komplex. So führt die Aktivierung von CB₁- und CB₂-Rezeptoren sowohl durch Inhibierung der Adenylatcyclase und der damit verbundenen Inaktivierung der Proteinkinase A als auch durch die Aktivierung der Mitogen-abhängigen Proteinkinase zur Expressionsregulierung verschiedener Gene. Die Aktivierung von CB₁-Rezeptoren im zentralen Nervensystem führt durch Inhibierung spannungsgesteuerter Ca²⁺-Kanäle und Öffnung einwärtsgerichteter K⁺-Kanäle zur Hemmung der Neurotransmitter-freisetzung bei verschiedenen exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen. CB₁-Rezeptoren sind überwiegend im zentralen Nervensystem exprimiert und unter anderem assoziiert mit der Regulation kognitiver und emotionaler Funktionen („psychoaktive Wirkung“), aber auch mit Auswirkungen auf das Schmerzempfinden sowie kardiovaskuläre, gastrointestinale und respiratorische Funktionen. CB₂-Rezeptoren sind dagegen hauptsächlich auf Blutzellen und in Geweben des Immunsystems lokalisiert. Eine Auswirkung auf Entzündungsprozesse und chronischen Schmerz wird diskutiert, der tatsächliche physiologische Zweck ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. ^[4]

1.3.2 Systematik der Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten

Diese umfangreiche Substanzklasse kann in verschiedene Untergruppen unterteilt werden, von denen im Folgenden nur einige der gängigsten genannt werden sollen. Als „natürliche Cannabinoide“ werden alle in der Natur vorkommenden Agonisten der Cannabinoidrezeptoren bezeichnet. Darunter fallen sowohl endogene wie pflanzliche Cannabinoide. Von den endogenen Agonisten („Endocannabinoide“) sind Anandamid ^[35] und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) ^[36] am besten untersucht. Biosynthetisch leiten sich diese Substanzen vor allem von der Arachidonsäure ab. Unter den pflanzlichen Cannabinoiden ist der Wirkstoff Δ⁹-Tetrahydrocannabinol (THC) aus der Hanfpflanze (*Cannabis*) der bekannteste Vertreter. THC agiert sowohl am CB₁- als auch am CB₂-Rezeptor als partieller Agonist. ^[4]

Die Pflanzcannabinoide werden auch zu den „klassischen Cannabinoiden“ gezählt, worunter ebenfalls synthetisch von THC abgeleitete Substanzen wie das 11-Hydroxy-Δ⁸-THC-dimethylheptyl (HU-210) fallen ^[37]. Abbildung 1-1 zeigt die chemischen Strukturen der genannten Vertreter natürlicher und klassischer Cannabinoide.

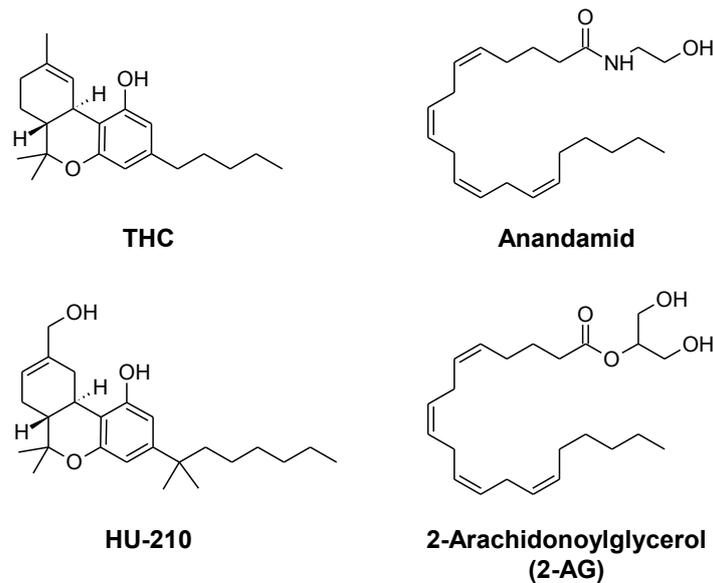


Abbildung 1-1. Chemische Strukturen der Endocannabinoide Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), des Pflanzcannabinoids THC sowie des synthetisch von THC abgeleiteten klassischen Cannabinoids HU-210.

Wie einleitend im Kapitel 1.3 bereits erwähnt, wurde eine Vielzahl synthetischer Cannabinoidrezeptoragonisten entwickelt, welche sich chemisch-strukturell deutlich von den natürlichen Cannabinoiden unterscheiden und wesentlich simplere Leitstrukturen aufweisen. Viele dieser Substanzen wirken als volle Agonisten an beiden Cannabinoidrezeptoren und weisen häufig um ein Vielfaches höhere Rezeptoraffinitäten und -aktivitäten auf.^[37] In der vorliegenden Arbeit werden diese SC entsprechend Ihrer gemeinsamen Teilstrukturen in Untergruppen eingeteilt. Die verwendeten Bezeichnungen der Teilstrukturen orientieren sich an der chemisch-strukturellen Stoffgruppendefinition für SC des deutschen „Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetzes“ (NpSG) (siehe Kapitel 1.3.4)^[38] und entsprechen der gängigen Praxis. Eine ähnliche Einteilung wird auch von der europäischen Überwachungsbehörde für Drogen und Drogensucht (engl.: *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*, EMCDDA) verwendet^[39]. Abbildung 1-2 zeigt den schematischen Aufbau SC bestehend aus „Kernstruktur“, „Brücke“, „Brückenrest“ und „Seitenkette“ am Beispiel der Substanz „AM-2201“ ([1-(5-Fluorpentyl)-1*H*-indol-3-yl](naphthalen-1-yl)methanon). Einige der zu Beginn dieser Arbeit besonders relevanten Teilstrukturen sind in Tabelle 1-1 aufgeführt.

Viele der SC, die in „Legal High“-Produkten identifiziert wurden, zeichnen sich durch eine ähnliche Struktur wie die des in Abbildung 1-2 dargestellten AM-2201 aus. In den meisten Fällen beinhaltet die Struktur einen Indolring als Kernstruktur, eine *N*-Alkyl-Seitenkette, eine Carbonyl-Gruppe als Brücke und ein aromatisches Ringsystem als Brückenrest (z. B. 1-Naphthyl). Substanzen mit Indol-Kern, Carbonyl-Brücke und 1-Naphthyl-Brückenrest werden häufig unter dem Namen „Naphthoylindole“ zusammengefasst. Der Begriff „Aminoalkylindole“ (AAI) wird für alle Substanzen mit Indol-Kern und *N*-Alkyl-Seitenkette verwendet.

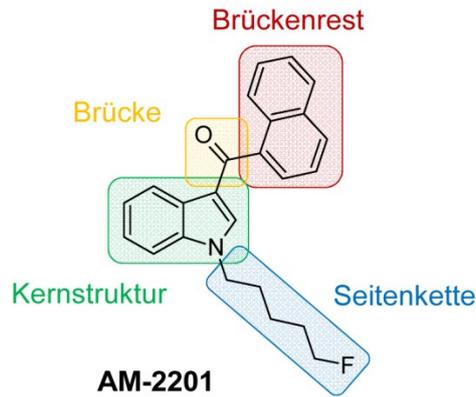


Abbildung 1-2. Schematischer Aufbau eines synthetischen Cannabinoids am Beispiel der Substanz AM-2201 in Anlehnung an die chemisch-strukturelle Stoffgruppendefinition des deutschen „Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetzes“ (NpSG) ^[38].

Mitte 2012 wurden erstmals SC in Kräutermischungen identifiziert, deren Grundstruktur durch einen Indazolring mit einer Carboxamido-Brücke, einem Valinamid-Brückenrest und einer variablen Seitenkette charakterisiert ist (Abbildung 1-3) ^[40]. Die Substanz „AB-FUBINACA“ (*N*-(1-Amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorbenzyl)-1*H*-indazol-3-carboxamid) wurde zuvor in einem Patent von Buchler *et al.* beschrieben ^[8]. Wegen des Valinamid-Brückenrestes weisen diese neuen Substanzen ein chirales Zentrum auf (siehe Abbildung 1-3), wohingegen die SC, welche zuvor in Drogenzubereitungen nachgewiesen wurden, meist achirale Substanzen waren. Zwar wurde die absolute Konfiguration von AB-FUBINACA und AB-PINACA von Uchiyama *et al.* nicht untersucht ^[40], jedoch legen das von Buchler *et al.* beschriebene Syntheseverfahren und die gute Verfügbarkeit des Synthesegrundstoffes L-Valinamid nahe, dass überwiegend die (*S*)-Enantiomere der Substanzen auf dem Markt verfügbar sind.

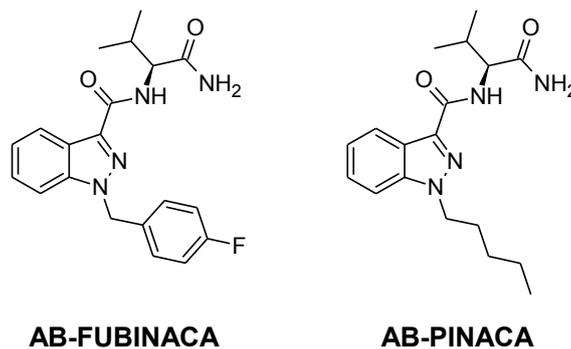
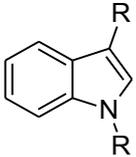
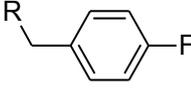
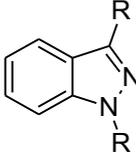
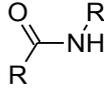
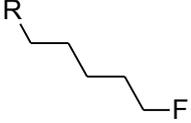
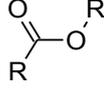
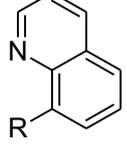
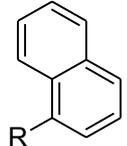
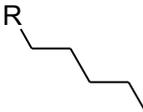
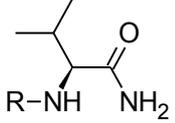


Abbildung 1-3. Chemische Struktur der (*S*)-Enantiomere der synthetischen Cannabinoide AB-FUBINACA und AB-PINACA.

Tabelle 1-1. Typische Strukturelemente synthetischer Cannabinoide bis zum Jahr 2014. Die verwendeten Bezeichnungen der Teilstrukturen orientieren sich an der chemisch-strukturellen Stoffgruppendefinition für synthetische Cannabinoide des deutschen „Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetzes“ (NpSG) ^[38].

Kernstruktur	Brücke	Brückenrest	Seitenkette
 Indol-1,3-diyl	 Carbonyl	 2,2,3,3-Tetramethyl- cyclopropyl	 4-Fluorobenzyl
 Indazol-1,3-diyl	 Carboxamido	 Adamantyl	 5-Fluoropentyl
	 Carboxyl	 Chinolin-8-yl	 Butyl
		 1-Naphthyl	 Pentyl
		 (L)-Valinamid	

1.3.3 Synthetische Cannabinoide als Rauschdrogen

Im Jahr 2004 wurden vermutlich zum ersten Mal Produkte unter der Markenbezeichnung „Spice“ als vermeintlich natürliche und legale Alternative zu Marihuana auf dem europäischen Markt angeboten. Formell wurden die „Kräutermischungen“ (engl.: *herbal mixtures*) häufig als „Räuchermischungen“ (engl.: *incense blends*) verkauft (siehe Abbildung 1-4).^[41] Ende 2008 gelang erstmals die Identifizierung mehrerer SC als psychoaktive Zusätze in dem getrockneten Pflanzenmaterial.^[42-44]



Abbildung 1-4. Typische „Spice“-Kräutermischung.

Nach Angaben der EMCDDA stieg die Anzahl der auf dem europäischen Drogenmarkt identifizierten Wirkstoffe seit 2008 kontinuierlich an. Ende 2013 waren die SC mit 103 verschiedenen Einzelsubstanzen die größte von der EMCDDA überwachte Wirkstoffklasse.^[45] Obwohl inzwischen eine unüberschaubare Anzahl weiterer Produkte mit wechselnden Inhaltsstoffen und Produktnamen vermarktet wurden, hat sich die Bezeichnung „Spice“ als Szenename für SC-haltige Kräutermischungen bis heute gehalten. Das Rauchen von gebrauchsfertigen Kräutermischungen ist die gängigste Konsumform, allerdings werden SC unter anderem auch als „Reinsubstanzen“ in Pulverform (sog. „Research Chemicals“) angeboten (siehe Abbildung 1-5).



Abbildung 1-5. Typisches „Research Chemical“.

Verglichen mit Cannabis ist die Prävalenz des SC-Konsums in der Gesamtbevölkerung niedrig. Beispielsweise ergab eine jährliche Befragung von Schülern (15-18 Jahre) in Frankfurt am Main im Jahr 2013 eine Lebenszeitprävalenz von 42 % für Cannabiskonsum und 5 % für einen Konsum von SC ^[46]. In einem Übersichtsartikel fassen die Autoren Fattore und Fratta die Cannabis-ähnliche Wirkung, vermeintliche Legalität, leichte Verfügbarkeit über das Internet zu einem relativ niedrigen Preis, ansprechende Aufmachung, Wahrnehmung als sicheres Rauschmittel und erschwerte Nachweisbarkeit in biologischem Probenmaterial mit herkömmlichen Drogentests als Hauptmotive für einen SC-Konsum zusammen ^[47]. Es ist daher zu erwarten, dass die Prävalenz in entsprechenden Teilpopulationen deutlich höher liegt. Beispielsweise könnten Personen, die regelmäßig auf den Konsum klassischer Drogen getestet werden (z. B. Drogenabstinenzprogramme, „Workplace-Drug-Testing“) oder einen erschwerten Zugang zu klassischen Drogen haben (Insassen von Justizvollzugsanstalten, Patienten in forensisch-psychiatrischen Kliniken), eine höhere Motivation für einen SC-Konsum haben.

1.3.4 Rechtliche Situation in Deutschland

Entsprechend § 1 Abs. 2 BtMG können die in „Legal High“-Produkten enthaltenen SC auf Empfehlung des Sachverständigenausschusses für Betäubungsmittel bei einem nachweislichen Gesundheitsrisikos in die Anlagen I-III des BtMG aufgenommen werden. Seit 2009 wurden mehrere SC in Anlage II („verkehrsfähige, nicht verschreibungsfähige Betäubungsmittel“) gelistet. Für den legalen Erwerb und die Abgabe dieser Substanzen ist dementsprechend eine Betäubungsmittelerlaubnis nach § 3 BtMG erforderlich. Für die Aufnahme neuer SC in die Anlagen des BtMG ist der Erlass einer Änderungsverordnung nach § 1 Abs. 2 BtMG (BtMGÄndV) notwendig, wodurch Einzelsubstanzen nur mit erheblicher zeitlicher Verzögerungen gesetzlich erfasst werden können. ^[48]

Bis 2014 wurde der Handel mit SC, welche keine deklarierten Betäubungsmittel waren, in Deutschland behelfsweise über das Arzneimittelrecht (AMG) gesetzlich eingeschränkt. Da SC-haltige Produkte pharmakologisch aktiv sind, entsprachen sie formal der Definition eines „Funktionsarzneimittels“ nach § 2 Abs. 1 AMG und wurden juristisch als nicht zugelassene, bedenkliche Arzneimittel angesehen. Das Inverkehrbringen SC-haltiger Produkte konnte auf diese Weise strafrechtlich verfolgt werden. ^[49]

Am 10.07.2014 entschied der Europäische Gerichtshof (EuGH) für ein vom Bundesgerichtshof vorgelegtes Verfahren jedoch, dass für Substanzen, *„deren Wirkungen sich auf eine schlichte Beeinflussung der physiologischen Funktionen beschränken, ohne dass sie geeignet wären, der menschlichen Gesundheit unmittelbar oder mittelbar zuträglich zu sein, die nur konsumiert werden, um einen Rauschzustand hervorzurufen, und die dabei gesundheitsschädlich sind“*, die Arzneimitteldefinition nicht greifen kann ^[50]. Dadurch verlor Deutschland – ebenso wie viele andere europäische Länder – ein wichtiges juristisches Mittel für die Kontrolle des NPS-Marktes.

Erst am 26.11.2016 konnte diese Lücke durch das Inkrafttreten des „Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetzes“ (NpSG) wieder größtenteils geschlossen werden. Im Gegensatz zur relativ langwierigen Unterstellung von Einzelsubstanzen unter das BtMG wurde in Anlage 2 des NpSG eine chemisch-strukturell definierte Stoffgruppe für SC eingeführt. Durch die Beschreibung von „Kernstrukturen“ mit bestimmten Substitutionsmustern in Kombination mit bestimmten „Brücken“, „Brückenresten“ und „Seitenketten“ fällt der größte Teil der auf dem Markt befindlichen SC unter das neue Gesetz. Gleichzeitig sind präventiv synthetische Derivate bekannter SC eingeschlossen, wodurch die Umgehung des Gesetzes durch geringfügige chemisch-strukturelle Modifikationen erschwert wurde. ^[38]

1.3.5 Bedeutung in der forensischen Toxikologie

Trotz der vergleichsweise geringen Prävalenz in der Gesamtbevölkerung ist mit steigender Popularität der SC auch deren Relevanz in der klinischen und forensischen Toxikologie gestiegen. Im Zusammenhang mit der Aufnahme von SC wurden der EMCDDA über die letzten Jahre eine Vielzahl schwerwiegender Intoxikationen berichtet ^[51]. Da die meisten intoxikierten Notfallpatienten sich unter symptomatischer Behandlung innerhalb von 24 Stunden erholen ^[52], ist eine analytische Abklärung der Ursache zwar nicht unbedingt notwendig, aber zusammen mit der Erhebung klinischer Daten äußerst wertvoll für das Verständnis der Wirkungsweise und spezifischer Risiken der Substanzen. Dagegen ist eine chemisch-toxikologische Untersuchung im Zusammenhang mit juristischen Fragestellungen oftmals unerlässlich. Dabei kann es sich beispielsweise um die Beurteilung der Zurechnungsfähigkeit und Straffähigkeit bei Ordnungswidrigkeiten oder Straftaten, den Verdacht auf eine ungewollte Beibringung oder eine unklare Todesursache handeln. Auch bei Drogenabstinenzkontrollprogrammen auf Grund gerichtlicher Auflagen oder im suchttherapeutischen Kontext muss immer häufiger auf einen SC-Konsum getestet werden. Für die beweissichere Beantwortung all dieser Fragestellungen ist ein analytischer Nachweis der Substanzen in biologischem Probenmaterial gefragt (siehe Kapitel 1.6). Dabei stellt die Vielzahl an Einzelsubstanzen, die hohe Dynamik des SC-Marktes und die niedrigen Konzentrationen der Substanzen (und deren Stoffwechselprodukte) in biologischen Proben hohe Anforderungen an die Testverfahren. Bei einem positiven Befund ergibt sich häufig die Frage nach dem zu Grunde liegenden Konsumverhalten und dem Zeitpunkt der letzten Drogenaufnahme. Jedoch ist die Interpretation der analytischen Befunde diesbezüglich häufig schwierig wegen des Mangels an pharmakologischen/toxikologischen Daten zu NPS. Die Frage, ob eine legale oder illegale Substanz konsumiert wurde, ist dabei zwar meist nachrangig, kann im Einzelfall aber von Interesse sein.

1.4 Metabolismus

1.4.1 Allgemeine Grundlagen

Um die Ausscheidung von körperfremden Stoffen wie Arzneistoffe oder Drogen zu fördern, bedient sich der menschliche Organismus verschiedener Enzymsysteme, welche über eine breite Substratspezifität verfügt. Überwiegend findet die Biotransformation dieser Xenobiotika in der Leber statt und führt zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit der Substanzen und damit zur schnelleren Elimination über den Urin. Die verschiedenen metabolischen Reaktionen können dabei grob in zwei Phasen eingeteilt werden.^[53]

1.4.1.1 Phase-I-Metabolismus

Die beteiligten Enzyme führen durch Oxidation, Reduktion, Hydrolyse oder Hydratisierung funktionelle Gruppen in das Molekül ein oder legen diese frei. Aus diesem Grund werden Phase-I-Reaktionen auch als „Funktionalisierungsreaktionen“ bezeichnet. Im oxidativen Phase-I-Metabolismus von Xenobiotika sind Cytochrom-P450-Enzyme (CYP) von zentraler Bedeutung, da sie durch die Einführung eines Sauerstoffatoms (Monooxidation) eine Vielzahl an Reaktionen katalysieren wie z. B. aliphatische und aromatische Hydroxylierung, Epoxidierung, N- und S-Oxidation, N- und O-Desalkylierung, Dehalogenierung.^[53] Einige dieser metabolischen Reaktionen sind in Abbildung 1-6 am Beispiel des SC AM-2201 veranschaulicht.

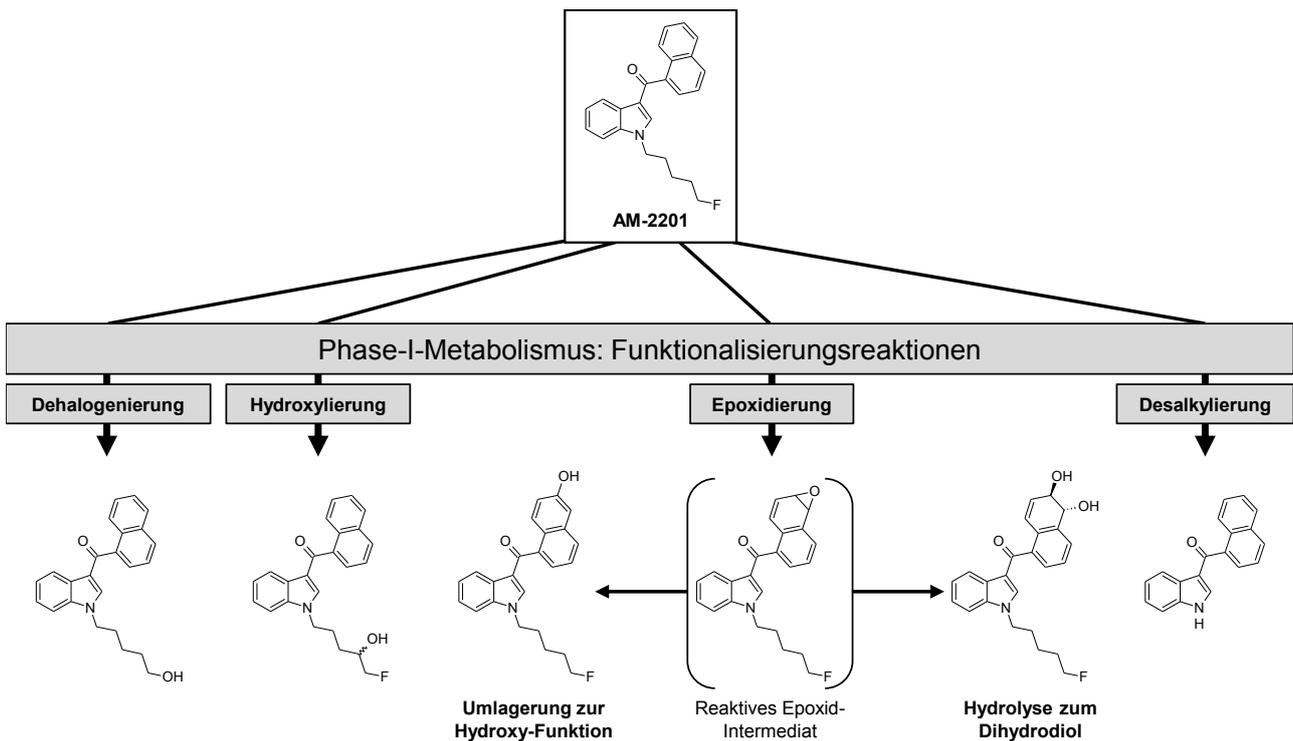


Abbildung 1-6. Typische Funktionalisierungsreaktionen im Phase-I-Metabolismus am Beispiel des synthetischen Cannabinoids AM-2201 (exemplarische Darstellung möglicher Phase-I-Metaboliten).

1.4.1.2 Phase-II-Metabolismus

Die Konjugation von polaren endogenen Stoffen (z. B. Aminosäuren, Glucuronsäure, Glutathion, Acetyl-Reste, Sulfat-Reste) mit den funktionellen Gruppen von Xenobiotika (z.B. Amino-, Carboxy-, Hydroxy-, SH-Gruppen) wird durch verschiedene Transferasen katalysiert und erleichtert dadurch erheblich deren renale Elimination. Phase-II-Reaktionen werden daher auch als Konjugationsreaktionen bezeichnet und erfordern gegebenenfalls eine vorangegangene Funktionalisierungsreaktion.^[53] Abbildung 1-7 zeigt am Beispiel des SC AM-2201 die Bildung von Glucuronid-Metaboliten durch die Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase (UGT)-katalysierte Bindung von Glucuronsäure an die zuvor durch Defluorierung und weitere Oxidation eingeführten Funktionen der Phase-I-Metaboliten.

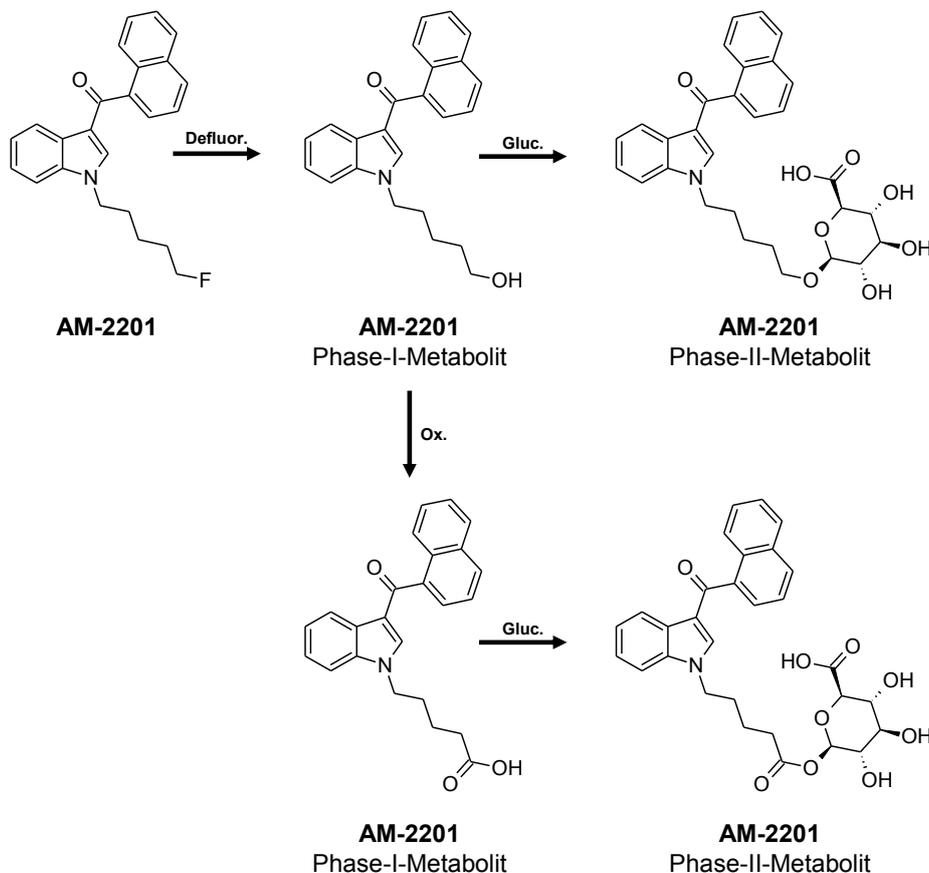


Abbildung 1-7. Bildung von Phase-II-Metaboliten durch Konjugation mit Glucuronsäure (Gluc.) am Beispiel des synthetischen Cannabinoids AM-2201 nach vorangegangener Funktionalisierung durch metabolische Defluorierung (Defluor.) und Oxidation (Ox.) (Phase-I-Metaboliten).

1.4.2 Modelle für Metabolismusstudien

Sowohl im Sinne einer Evaluierung der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften eines neuen (therapeutischen) Wirkstoffes als auch zur Identifizierung von Hauptmetaboliten als Zielanalyten für die Untersuchung biologischen Probenmaterials (siehe Kapitel 1.6.1) ist es von Interesse, die Biotransformation einer Substanz zu studieren. Während es für die fortgeschrittene Testung eines neuen Arzneimittels notwendig ist, entsprechende Daten im Rahmen klinischer Studien am Menschen zu erheben, muss für erste Studien mit neuen Wirkstoffen aus ethischen Gründen meist auf alternative Modelle zurückgegriffen werden. Hierzu stehen *in vivo*-Tiermodelle (z. B. Ratte) und verschiedene *in vitro*-Modelle zur Verfügung. Tiermodelle kommen zwar hinsichtlich der Komplexität des Organismus dem Menschen am nächsten, doch sind die Daten nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar. Außerdem ist sowohl die Etablierung als auch die Durchführung auf Grund tierschutzrechtlicher Bestimmungen mit hohen Kosten verbunden. Besonders für analytische Labore sind daher *in vitro*-Modelle meist zweckmäßiger. Die Verwendung humaner Hepatozyten, verschiedener Fraktionen aus der Ultrazentrifugation von Lebergewebe und rekombinant hergestellter Enzyme gehören zu den Standardassays. Von den genannten Optionen sind intakte Hepatozyten am besten geeignet, um den komplexen hepatischen Metabolismus abzubilden. Allerdings erfordert das Arbeiten mit dem Zellassay im Vergleich mit den übrigen genannten *in vitro*-Assays auch den höchsten apparativen und finanziellen Aufwand. Eine günstigere Alternative sind durch Ultrazentrifugation von Lebergewebe gewonnene Fraktionen. Die „S9-Fraktion“ wird nach Homogenisierung des Gewebes und Zentrifugation bei ca. $9.000 \times g$ als Überstand gewonnen. Diese enthält sowohl cytosolische als auch membrangebundene Enzyme des endoplasmatischen Retikulums. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei ca. $100.000 \times g$ trennt das Cytosol mit den darin gelösten Enzymen (Überstand) von den membranständigen Enzymen, welche in Membranvesikeln, den sogenannten Mikrosomen, im Sediment enthalten sind. Alle drei Fraktionen (S9, Cytosol, Mikrosomen) können für Metabolismusstudien eingesetzt werden, wobei Mikrosomen die meisten relevanten metabolischen Enzyme in der höchsten Konzentration enthalten. Wenn nur bestimmte metabolische Reaktionen untersucht werden sollen, wird in der Regel auf rekombinant hergestellte einzelne Enzyme zurückgegriffen. Das Ziel einer Studie und die vorhandenen Mittel sind daher ausschlaggebend für die Wahl des Modells.^[54]

1.4.3 Synthetische Cannabinoide

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits einige Metabolismusstudien zu verschiedenen SC in der wissenschaftlichen Literatur verfügbar. Die Untersuchungen wurden mit Hilfe rekombinanter Enzyme^[55-57], Ratten-Lebermikrosomen^[58-60], humaner Lebermikrosomen^[56, 57, 61-65], humaner Hepatocyten^[66, 67], Urinproben von Mäusen mit humanisierter Leber^[61], Urinproben von Ratten^[68, 69], humaner Urinproben^[57, 62, 68-80] und humaner Blutproben^[68, 69, 75] durchgeführt. Generell wurde gezeigt, dass alle untersuchten SC einer extensiven Biotransformation unterliegen. In menschlichen Urinproben waren die Muttersubstanzen in den meisten Fällen gar nicht oder im Vergleich zu deren Metaboliten nur in sehr geringen Intensitäten nachweisbar. Der beschriebene Phase-I-Metabolismus SC umfasste folgende metabolische Reaktionen: Hydroxylierung mit weiterführender Oxidierung zur entsprechenden Carbonyl- und Carbonsäure-Funktion, Bildung von Dihydrodiolen, *N*-Desalkylierung, oxidative Verkürzung der Alkylseitenkette, Dehalogenierung von 5-Fluorpentyl-Seitenketten, *O*-Desmethylierung phenolischer Methylether, Dehydrierung und verschiedene Kombinationen dieser Reaktionen (vergleiche Abbildung 1-6 und Abbildung 1-8). Die an rekombinanten Cytochrom-P450-Isoenzymen durchgeführten Studien haben gezeigt, dass in der Regel mehrere Isoenzyme an der oxidativen Bildung der Phase-I-Metaboliten beteiligt sind. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Biotransformation strukturähnlicher SC beispielsweise durch Defluorierung, Hydroxylierung und oxidativen Abbau der *N*-Alkylseitenkette zu gemeinsamen Metaboliten führen kann (Abbildung 1-8)^[75, 77]. Chimalakonda *et al.* beobachteten die

CYP-katalysierte Bildung des defluorierten Metaboliten von AM-2201 ^[56], welche formal einer Hydrolyse der Kohlenstoff-Fluor-Bindung entspricht. Einer CYP-katalysierten Bindungsspaltung liegt jedoch am wahrscheinlichsten eine Oxidation des Kohlenstoffatoms mit nachfolgender Abspaltung von Flusssäure (HF) und anschließender Reduktion des reaktiven Aldehyds zum primären Alkohol zugrunde. Nicht bekannt ist bisher, welche Enzyme bei dem metabolischen Abbau der Alkylseitenkette beteiligt sind. Einige der gebildeten Phase-I-Metaboliten mit Hydroxy- und Carbonsäure-Funktionen unterlagen einer extensiven enzymatischen Konjugation mit Glucuronsäure (vergleiche Abbildung 1-7) ^[57, 66, 67, 78-81]. Für die SC „JWH-018“ (Naphthalen-1-yl(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanon) und „JWH-073“ ((1-Butyl-1*H*-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanon) wurde beschrieben, dass verschiedene Isoformen der UGT sowohl in der Leber als auch im Intestinaltrakt zur Bildung der Glucuronide führen können ^[55]. Zudem zeigten einige Metaboliten von SC weiterhin eine Aktivität an den Cannabinoidrezeptoren und können somit zu einer Verlängerung der Wirkdauer beitragen ^[56, 82-84].

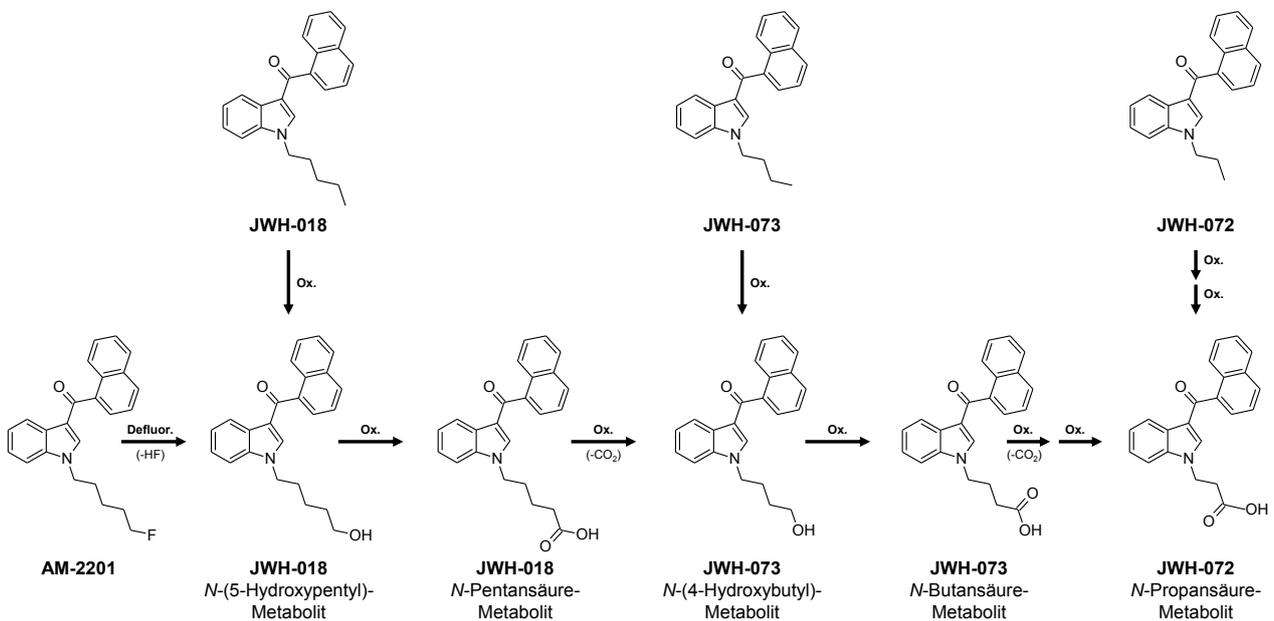


Abbildung 1-8. Gemeinsame Phase-I-Metaboliten der synthetischen Cannabinoide JWH-018, JWH-072 und JWH-073 gebildet durch metabolische Defluorierung (Defluor.) und Oxidation (Ox.) der Seitenkette.

1.5 Technologien zur Prüfung biologischen Probenmaterials

Verschiedenste biologische, chemische und physikalische Verfahren finden Anwendung bei der Untersuchung biologischer Proben. Für die vorliegende Arbeit waren jedoch die an Flüssigkeitschromatographie gekoppelte massenspektrometrische Detektion und immunchemische Verfahren von zentraler Bedeutung. Beide Methoden sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.5.1 Massenspektrometrische Verfahren

Mit der Realisierung der Kopplung von massenspektrometrischen Detektoren an chromatographische Verfahren fand die Massenspektrometrie (engl.: *mass spectrometry*; MS) zunehmend Anwendung bei der Analyse von biologischem Probenmaterial. Heutzutage sind die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (engl.: *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) wichtige Analysemethoden in der forensischen Toxikologie. Die chromatographische Auftrennung der komplexen Stoffgemische kombiniert mit selektiven Massendetektoren ermöglicht den Nachweis vieler Substanzen in biologischen Proben in sehr niedrigen Konzentrationen. Es wird in dieser Arbeit vorausgesetzt, dass dem Leser die grundsätzlichen Funktionsweisen der Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie vertraut sind. Aus diesem Grund werden im Folgenden lediglich die für diese Arbeit relevanten Funktionen in Kürze erläutert, wobei die theoretischen Grundlagen aus dem Lehrbuch „Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch“ des Autors Jürgen H. Gross zusammengefasst wurden ^[85].

1.5.1.1 Elektronenspray-Ionisation

Die Elektronenspray-Ionisation (engl.: *electrospray ionization*, ESI) gehört zur Gruppe der Atmosphärendruck-Ionisationsmethoden und ist ein „sanftes“ Ionisationsverfahren, mit dem Ionen aus der flüssigen Phase in die Gasphase überführt werden und die daher häufig zur Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie eingesetzt wird. Man kann sich die Ionenbildung bei der ESI als einen dreistufigen Prozess vorstellen: (1) Indem die in Lösung befindlichen Analyten durch die sogenannte Sprühkapillare geleitet werden, an deren Spitze eine Spannung von mehreren tausend Volt anliegt, wird ein elektrisch geladener Sprühnebel erzeugt; (2) das Verdampfen von Lösungsmittel aus den Tröpfchen des Sprühnebels führt zur Erhöhung der Ladungsdichte an deren Oberfläche mit der Folge, dass diese in noch kleinere Tröpfchen zerfallen; (3) letztendlich wird die elektrische Ladung durch einen nicht vollständig geklärten Mechanismus auf die Analyten übertragen, wodurch die Entstehung vollständig desolvatisierter Ionen in der Gasphase abgeschlossen wird. Bei kleinen Molekülen (ca. 100 - 1.500 Da) führt dies meist zu einfach geladenen Molekül-Ionen, welche anschließend im Massenspektrometer analysiert werden können. Die Polarität der angelegten Spannung entscheidet darüber, ob die Moleküle eine positive oder negative elektrische Ladung erhalten. Man spricht daher von einer Ionisation im „positiven Modus“ wenn die Molekül-Ionen eine positive Ladung in Form eines Protons ($[M+H]^+$) erhalten bzw. von einer Ionisation im „negativen Modus“ wenn die Moleküle durch Deprotonierung eine negative Ladung ($[M-H]^-$) erhalten.

1.5.1.2 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

Diese Geräte basieren auf klassischen Quadrupol-Massenanalysatoren (Q) (Abbildung 1-9). Die sich gegenüberliegenden Elektrodenpaare eines Quadrupols werden durch eine Gleichstrom- und eine Wechselstromkomponente auf dem gleichen Potential gehalten. Je nach Einstellung dieser Potentiale kann die Flugbahn eines Ions mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (engl.: *mass-to-charge ratio*, m/z) durch den Quadrupol stabilisiert werden, wobei Ionen mit anderer m/z „aussortiert“ werden. Der Quadrupol wirkt damit als ein Massenfilter.

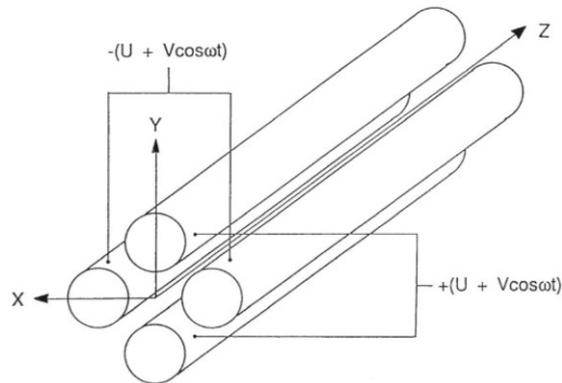


Abbildung 1-9. Schematischer Aufbau eines Quadrupol-Massenanalysators. Angepasst aus Literatur [85].

Durch die serielle Schaltung von drei Quadrupolen (Triple-Quadrupol, QqQ) können gezielt „Produkt-Ionen“ (engl.: *product ions*) von vorselektierten „Vorläufer-Ionen“ (engl.: *precursor ions*) untersucht werden (Abbildung 1-10). Dabei dient der erste Quadrupol (Q1) zur Selektion von Vorläufer-Ionen, der zweite Quadrupol (q2) der stoßinduzierten Fragmentierung (Dissoziation) des Vorläufer-Ions (engl.: *collision-induced dissociation* (CID) oder auch *collisionally activated dissociation* (CAD)) mit Hilfe eines inerten Stoßgases (z. B. Stickstoff) und der dritte Quadrupol (Q3) der Selektion der entstandenen Produkt-Ionen. Dies hat zwei Vorteile: (1) Es werden Strukturinformationen über das Vorläufer-Ion erhalten und damit eine hohe Spezifität; (2) der Einsatz zweier Massenanalysatoren erhöht die Selektivität des Verfahrens, wodurch niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden können. Wegen der Aneinanderreihung der Massenanalysatoren haben sich auch die Bezeichnungen „Tandem-Massenspektrometrie“ (engl.: *tandem mass spectrometry*, Tandem-MS) oder auch „Massenspektrometrie/Massenspektrometrie“ (engl.: *mass spectrometry/mass spectrometry*, MS/MS) etabliert. Einige Geräte besitzen an Stelle eines einfachen dritten Quadrupols eine lineare Ionenfalle, welche für eine zusätzliche Ionenakkumulation und damit zur Erhöhung der Signalintensität eingesetzt werden kann. Da die drei Quadrupole unabhängig voneinander gesteuert werden können, stehen dem Anwender unterschiedliche Messmodi zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Messmodi eingesetzt, die im Folgenden in Kürze erläutert werden. Eine Übersicht über die verwendeten Messmodi und deren Anwendung bei den durchgeführten Studien bietet Tabelle 1-2.

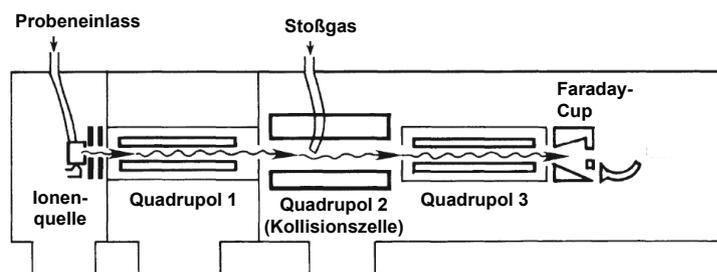


Abbildung 1-10. Schematischer Aufbau eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers. Angepasst aus Literatur [85].

„**Product Ion Scan**“ (**PIS**). Bei diesem Messmodus wird der erste Quadrupol (Q1) so eingestellt, dass dieser Vorläufer-Ionen mit der gewünschten m/z passieren lässt. Im zweiten Quadrupol (Kollisionszelle, q2) erfolgt die Fragmentierung der selektierten Vorläufer-Ionen. Der letzte Quadrupol (Q3) lässt nacheinander in Scanzyklen alle entstandenen Produkt-Ionen innerhalb eines festgelegten m/z -Bereiches passieren (Abbildung 1-11). Auf diese Weise kann das gesamte Produkt-Ionen-Spektrum eines selektierten Vorläufer-Ions untersucht werden und Rückschlüsse auf dessen Molekülstruktur gezogen werden. Bei Geräten, deren letzter Quadrupol aus einer linearen Ionenfalle besteht, können die Produkt-Ionen vor der Detektion angereichert werden, wodurch eine höhere Signalintensität erreicht werden kann (*enhanced product ion scan*, EPI). Dieser Scanmodus wurde zur Strukturcharakterisierung von SC und deren Metaboliten eingesetzt. Abbildung 1-12 zeigt ein Produkt-Ionen-Spektrum am Beispiel von AM-2201.

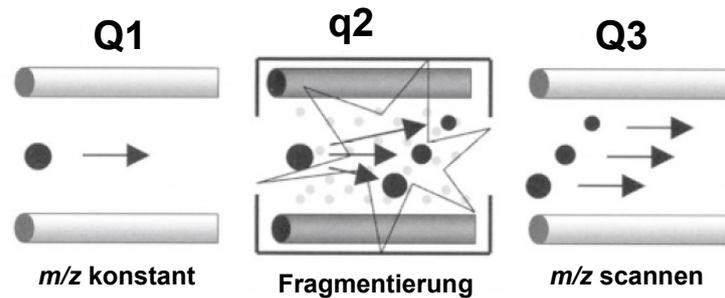


Abbildung 1-11. Schematische Darstellung der Funktion der drei Quadrupole (Q1, q2, Q3) während eines „Product Ion Scans“. Angepasst aus Literatur [85].

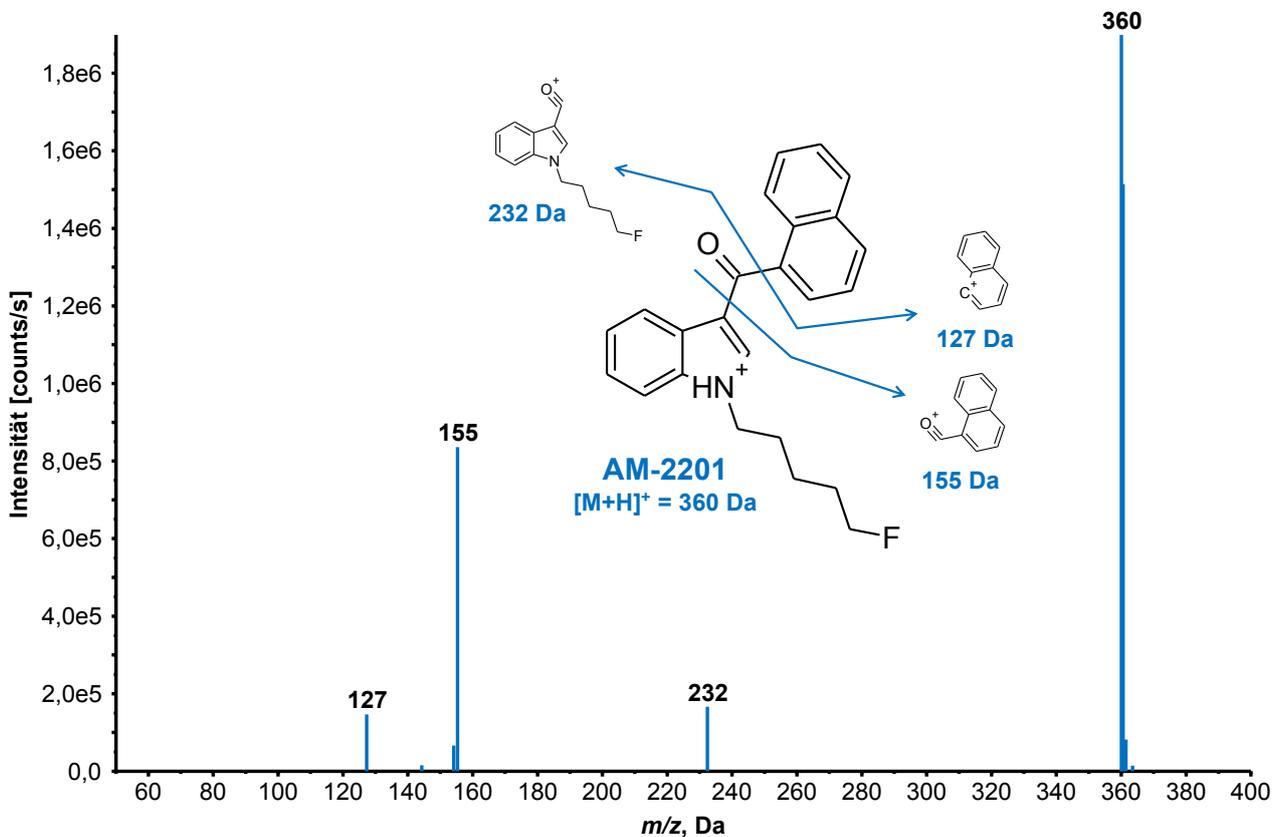


Abbildung 1-12. Das Produkt-Ionen-Spektrum von AM-2201 zeigt das unfragmentierte Molekül-Ion $[M+H]^+$ mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) von 360 Da und dessen durch alpha-Spaltung zur Carbonylfunktion bevorzugt gebildeten Produkt-Ionen (m/z 127, 155, 232 Da).

„**Multiple Reaction Monitoring Scan**“ (MRM). Bei diesem Scanmodus fungiert der erste Quadrupol als Massenselektor für das m/z eines gewünschten Vorläufer-Ions. Dieses wird im zweiten Quadrupol unter definierten Bedingungen fragmentiert. Im dritten Quadrupol wird das m/z eines gewünschten Produkt-Ions selektiert. Das MS/MS detektiert somit im MRM-Modus einen sogenannten „Ionenübergang“ eines bestimmten Analyten (Abbildung 1-13). Bei einem Multi-Target-Screening-Verfahren wird eine Liste von Ionenübergängen (MRM) zyklisch nacheinander gemessen. Um die Signalintensitäten bei langen MRM-Listen zu erhöhen, werden die Ionenübergänge eines bestimmten Analyten nur innerhalb eines definierten Zeitfensters um dessen Retentionszeit herum gemessen (*scheduled Multiple Reaction Monitoring*; sMRM). Bei der Analyse komplexer Matrices wie zum Beispiel biologische Proben werden im forensischen Kontext mindestens zwei Ionenübergänge je Substanz gemessen. Da eine Substanz unter definierten Fragmentierungsbedingungen immer ähnlich zerfällt, kann das Verhältnis seiner Produkt-Ionen-Signale zueinander („Ionen-Verhältnis“, engl.: *ion ratio*) als zusätzliches Identifizierungskriterium herangezogen werden. Abbildung 1-14 zeigt am Beispiel von AM-2201 in einem Chromatogramm die im MRM-Modus gemessenen Ionenübergänge vom Vorläufer-Ion ($[M+H]^+$ = 360 Da) auf dessen drei prominentesten Produkt-Ionen (m/z 127, 155, 232 Da) (vergleiche Abbildung 1-12). Dieser Scanmodus wurde sowohl für Multi-Analyt-Methoden (Identifizierung und Quantifizierung) als auch für Metabolismusuntersuchungen (Vergleich der Peakflächen von Metaboliten) eingesetzt.

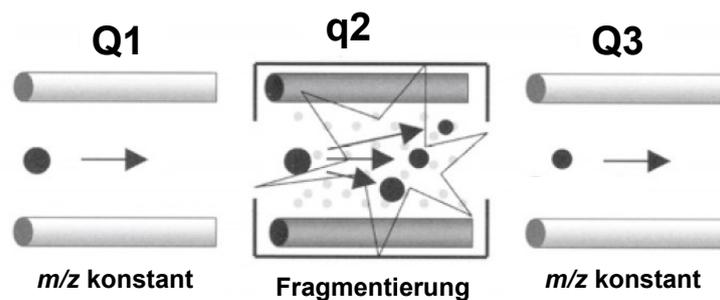


Abbildung 1-13. Schematische Darstellung der Funktion der drei Quadrupole (Q1, q2, Q3) während eines „Multiple Reaction Monitoring Scans“. Angepasst aus Literatur [85].

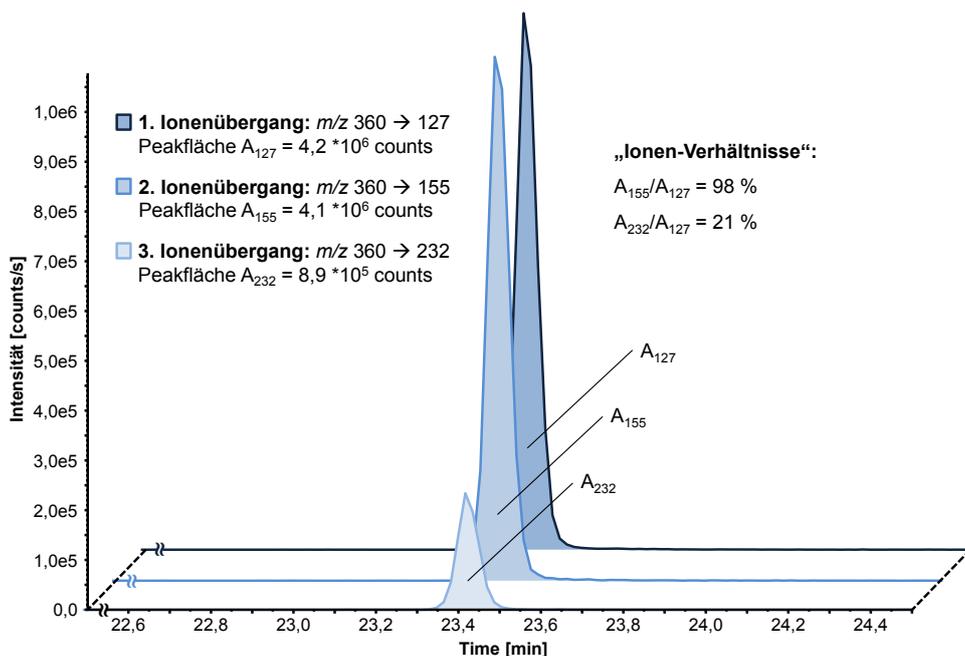


Abbildung 1-14. Extrahierte Chromatogramme eines MRM-Scans von drei Ionenübergängen für die Substanz AM-2201. Die Verhältnisse der Peakflächen zueinander können als substanzspezifisches Identifizierungskriterium herangezogen werden („Ionen-Verhältnisse“).

„**Precursor Ion Scan**“ (**Prec**). Bei diesem Scanmodus ist der erste Quadrupol so geschaltet, dass er in Scanzyklen nacheinander alle Vorläufer-Ionen eines festgelegten m/z -Bereichs passieren lässt. Diese werden in der Kollisionszelle unter definierten Bedingungen fragmentiert. Der letzte Quadrupol lässt darauf nur ein gewünschtes Produkt-Ion passieren. Auf diese Weise detektiert man alle Vorläufer-Ionen, die nach Fragmentierung ein bestimmtes Produkt-Ion abspalten (Abbildung 1-15). Dieser Scanmodus ist besonders geeignet, um unbekannte Moleküle mit ähnlichen Teilstrukturen zu identifizieren, beispielsweise Metaboliten eines neuen SC (Abbildung 1-16).

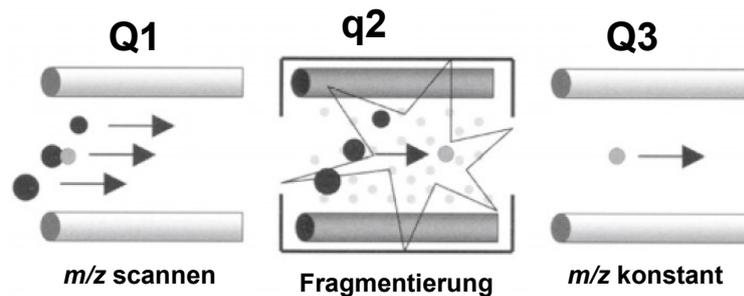


Abbildung 1-15. Schematische Darstellung der Funktion der drei Quadrupole (Q1, q2, Q3) während eines „Precursor Ion Scans“. Angepasst aus Literatur [85].

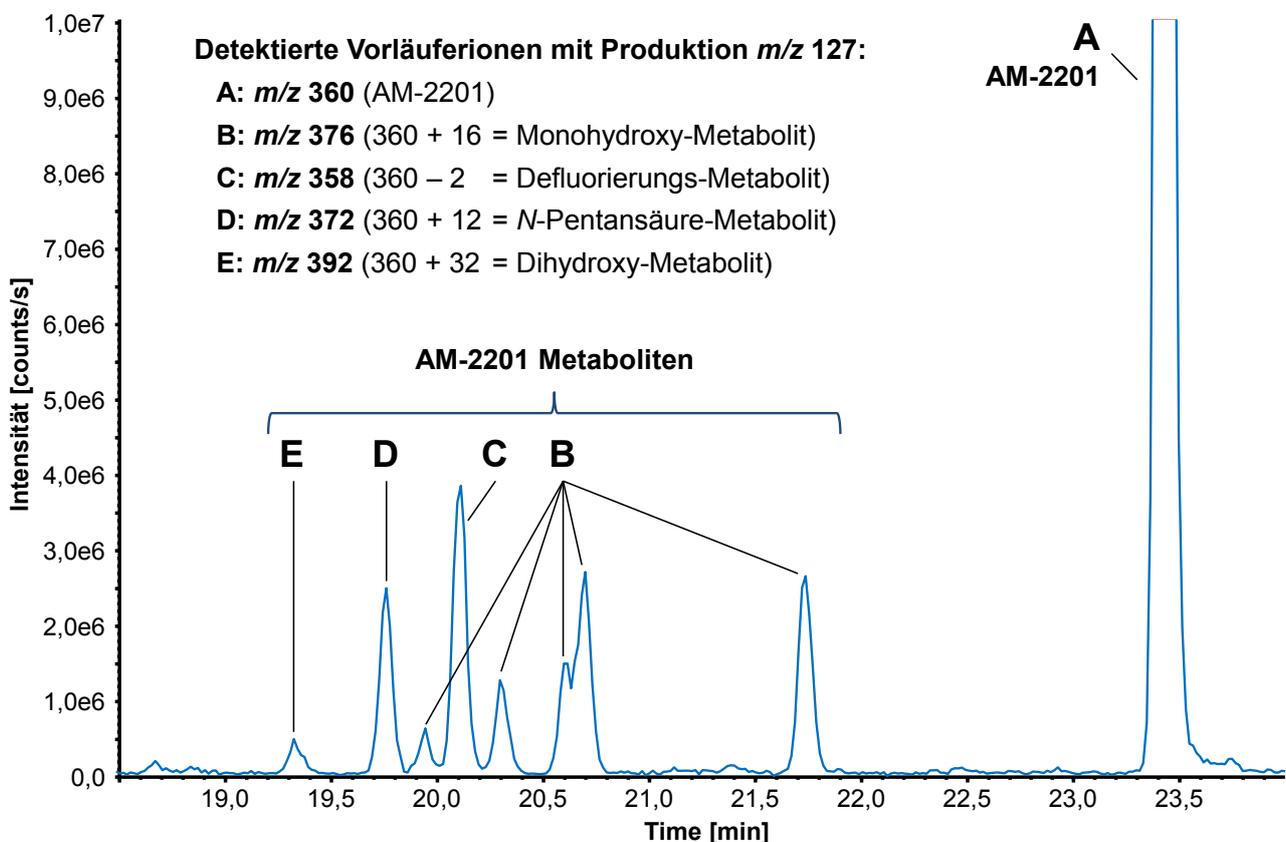


Abbildung 1-16. Nach Inkubation von AM-2201 mit humanen Lebermikrosomen wurden in der Probe durch einen „Precursor-Ion-Scan“ die Vorläufer-Ionen der Muttersubstanz (Peak A) und mehrerer ihrer Metaboliten (Peaks B-E) detektiert, die unter den gewählten Bedingungen das Produkt-Ion m/z 127 bildeten.

1.5.1.3 Time-of-Flight-Massenspektrometer

Das Prinzip dieses Massenanalysators besteht darin, dass Ionen mit unterschiedlicher Masse (m) nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld eine feldfreie Driftstrecke unterschiedlich schnell passieren (Abbildung 1-17). Dabei gilt, je höher das m/z , desto länger ist die benötigte Flugzeit (engl.: *time of flight*; ToF). Dies macht man sich zu Nutze, um über die gemessene Flugzeit auf das m/z eines detektierten Ions zurückzurechnen.

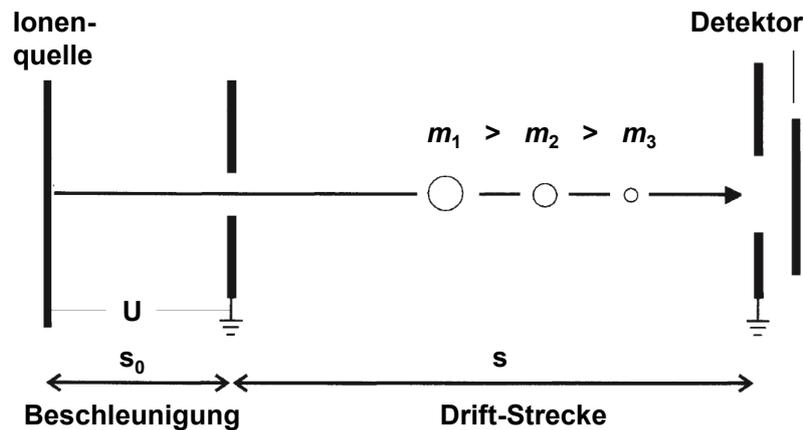


Abbildung 1-17. Schematischer Aufbau eines Time-of-Flight-Massenspektrometers. Angepasst aus Literatur [85].

Im Vergleich zu Triple-Quadrupol-Massenspektrometern messen moderne ToF-MS-Geräte mit wesentlich höherer Massenauflösung. Der Vorteil der hochauflösenden Massenspektrometrie (engl.: *high resolution mass spectrometry*; HRMS) besteht v. a. bei kleinen Molekülen darin, dass über die genaue Bestimmung der Masse eines Ions auf dessen elementare Zusammensetzung (molekulare Summenformel) geschlossen werden kann und damit mehr Strukturinformation gewonnen wird. Modernere ToF-MS verfügen oft zusätzlich über einen vorgeschalteten Quadrupol (qToF-MS) und bieten dem Anwender dadurch mehrere Messmodi. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Messmodi eingesetzt, die im Folgenden kurz erläutert werden. Eine Übersicht über die verwendeten Messmodi und deren Anwendung bei den durchgeführten Studien bietet Tabelle 1-2.

„**Full Scan**“. In diesem Messmodus wird die genaue m/z aller Vorläufer-Ionen detektiert, die zu einem bestimmten Zeitpunkt in das Massenspektrometer eintreten. Ein großer Vorteil dieser Messung liegt in der Vollständigkeit des Datensatzes. Da das gesamte Ionen-Spektrum detektiert wird, kann der Datensatz auch retrospektiv erneut nach bestimmten Analyten durchsucht werden. Dies ist bei den zuvor beschriebenen MS/MS-Messmethoden nur eingeschränkt möglich, da durch die Selektion in den Quadrupolen nur ein Teil des vorhandenen Ionen-Spektrums aufgezeichnet wird. Abbildung 1-18 zeigt ein „Full Scan“-Massenspektrum mit dem SC AM-2201. Dieser Scanmodus wurde für ein Screening nach Vorläufer-Ionen unbekannter Metaboliten und die Bestimmung deren Molekülformeln eingesetzt.

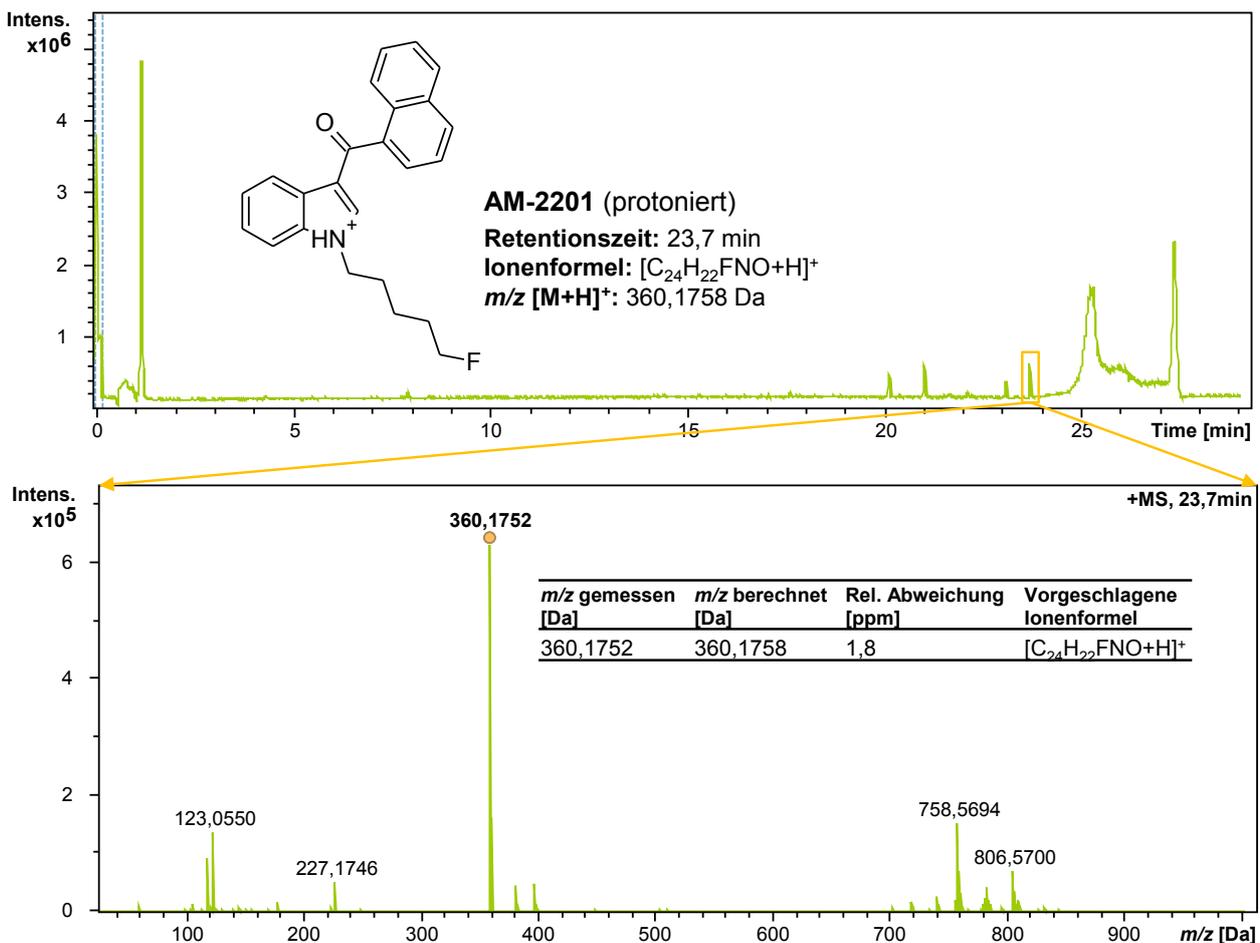


Abbildung 1-18. Messung einer Probe, welche die Substanz AM-2201 enthält, im „Full Scan“-Modus mit einem LC-qToF-MS. Im Gesamt-Ionen-Chromatogramm zeigt das synthetische Cannabinoid eine Retentionszeit von 23,7 min (oben). Das Massenspektrum (unten) zeigt die m/z aller Vorläufer-Ionen, die nach einer Elutionszeit von 23,7 min detektiert wurden. Das Vorläufer-Ion von AM-2201 ($[M+H]^+ = m/z 360$) wurde in der höchsten Intensität detektiert. Durch die hohe Auflösung der gemessenen Massen können die wahrscheinlichsten Summenformeln der Vorläufer-Ionen bestimmt werden. Die relative Abweichung der gemessenen Masse von der theoretisch berechneten Masse kann als Identifizierungskriterium herangezogen werden.

„Auto-MS/MS Scan“. Dieser Messmodus ist nur möglich, wenn das ToF-MS mit einem vorgeschalteten Massenselektor ausgestattet sind (z. B. qToF-MS). Für die automatische Aufnahme von Produkt-Ionen-Spektren (vergleiche Abbildung 1-11) wird ein auslösender Messwert (Trigger) gewählt. In dieser Arbeit wurde beispielsweise die Auto-MS/MS-Funktion mit dem Full-Scan kombiniert, so dass automatisch zu jedem Messpunkt des Full-Scans von den drei Vorläufer-Ionen mit den höchsten gemessenen Intensitäten ein Produkt-Ionen-Spektrum aufgenommen wurde. Abbildung 1-19 zeigt ein Auto-MS/MS-Spektrum der Substanz AM-2201. Dieser Scanmodus wurde alternativ zum Produkt-Ionen-Scan (PIS) mittels Tandem-Massenspektrometer für die Strukturcharakterisierung von SC und deren Metaboliten eingesetzt. Zusätzlich ermöglicht der Auto-MS/MS-Scan mit qToF-MS die Bestimmung der Molekülformeln der Produkt-Ionen.

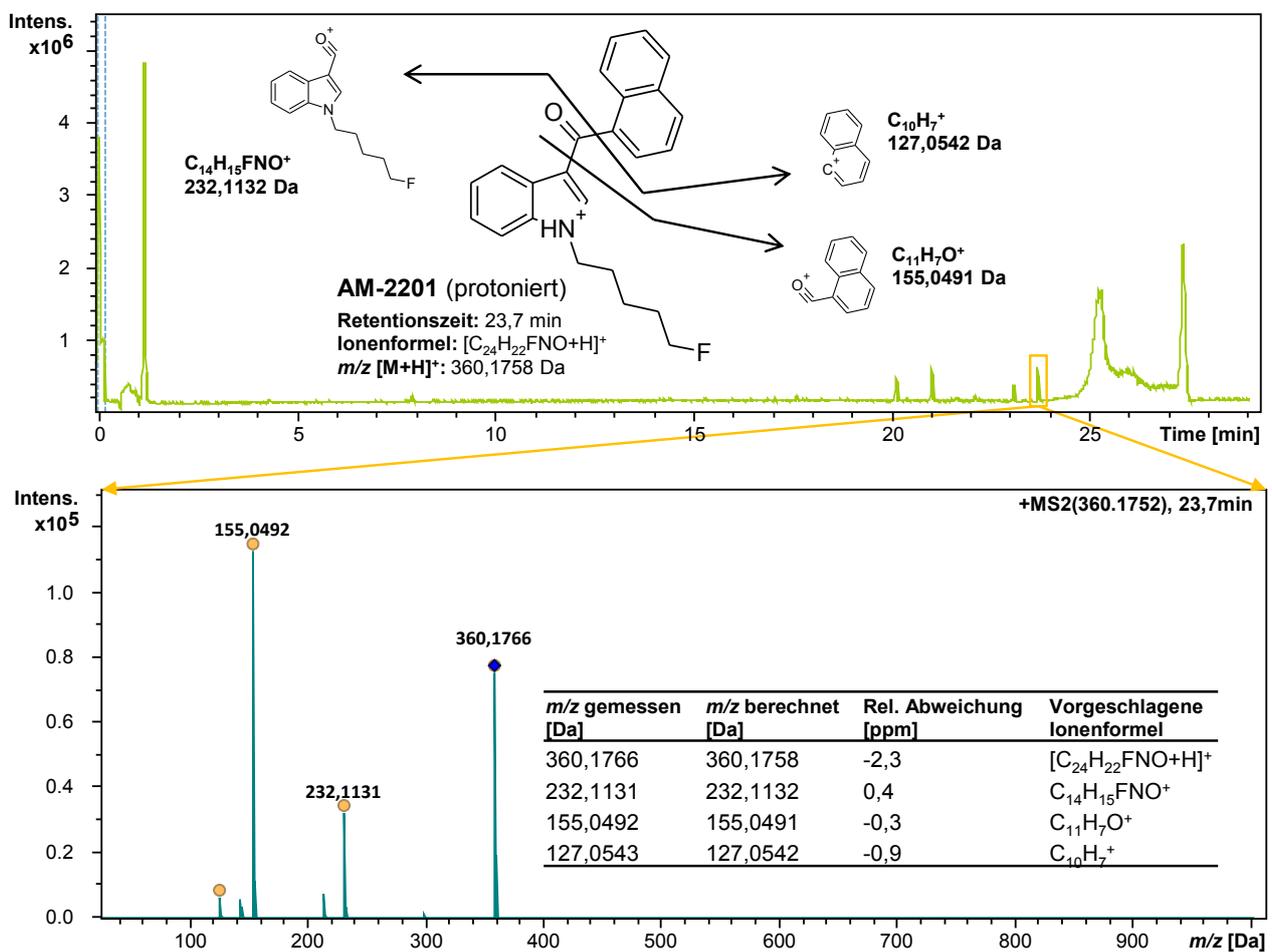


Abbildung 1-19. Messung einer Probe, welche die Substanz AM-2201 enthält, im „Auto-MS/MS Scan“-Modus mit einem LC-qToF-MS. Im Gesamt-Ionen-Chromatogramm zeigt das synthetische Cannabinoid eine Retentionszeit von 23,7 min (oben). Das Massenspektrum (unten) zeigt die m/z aller Produkt-Ionen des Vorläufer-Ions mit m/z 360,1752 (vergleiche Abbildung 1-18). Durch die hohe Auflösung der gemessenen Massen können die wahrscheinlichsten Summenformeln der Produkt-Ionen bestimmt werden. Die relative Abweichung der gemessenen Masse von der theoretisch berechneten Masse kann als Identifizierungskriterium herangezogen werden.

„**Broadband Collision-Induced Dissociation**“ (**bbCID**). Bei diesem Messmodus werden alle Vorläufer-Ionen, die in das Massenspektrometer eintreten, unter definierten Bedingungen fragmentiert. Anschließend wird die genaue m/z aller entstandenen Produkt-Ionen detektiert. Der Vorteil dieser Messung liegt im Vergleich zu Produkt-Ionen-Spektren von selektierten Vorläufer-Ionen in der größeren Vollständigkeit des Datensatzes. Der Nachteil ist, dass die detektierten Produkt-Ionen nicht zwangsläufig einem bestimmten Vorläufer-Ion zugeordnet werden können. Abbildung 1-20 zeigt ein bbCID-Spektrum mit der Substanz AM-2201. Dieser Scanmodus wurde für ein Screening nach Produkt-Ionen unbekannter Metaboliten und die Bestimmung derer Molekülformeln eingesetzt.

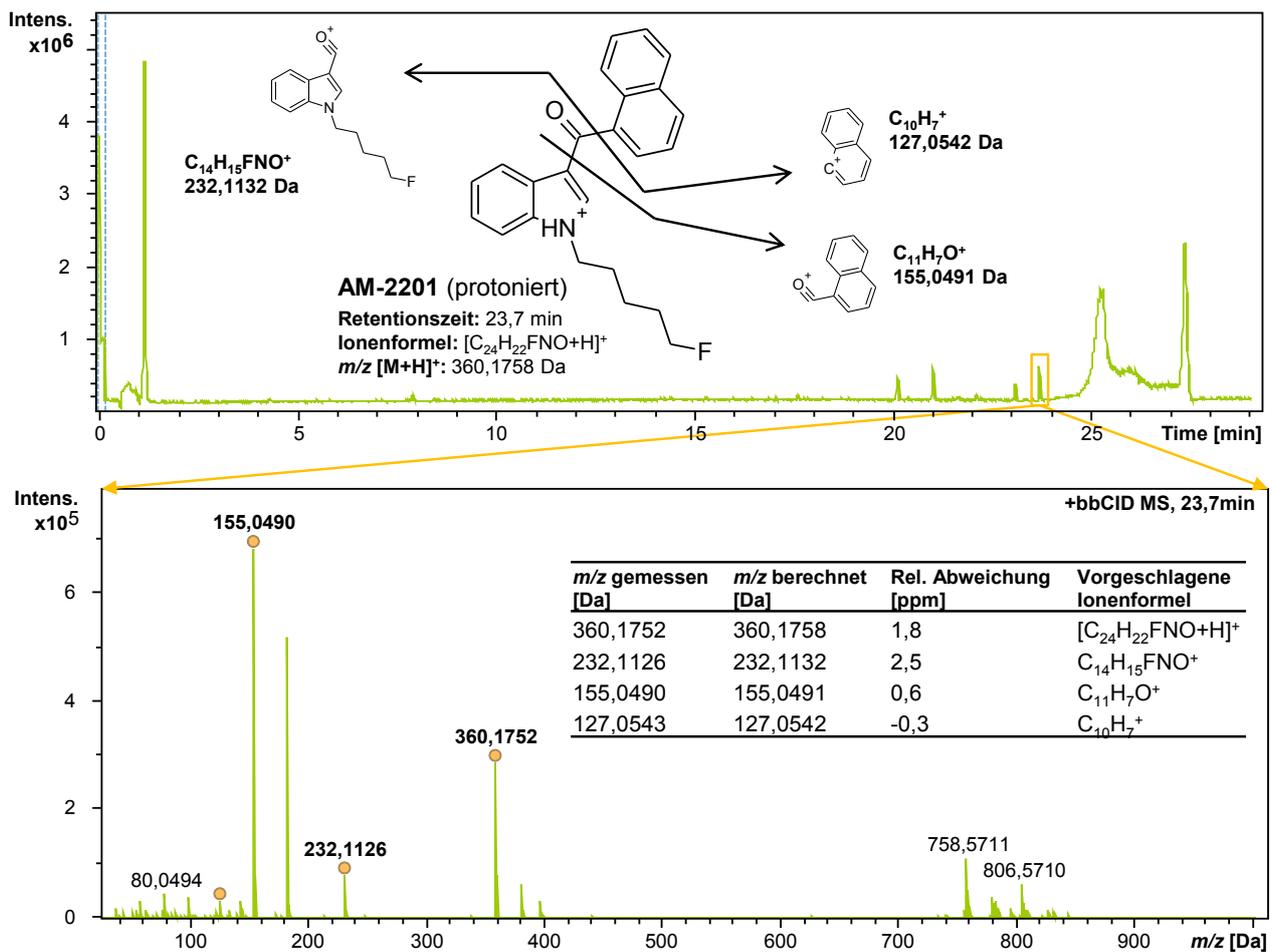


Abbildung 1-20. Messung einer Probe, welche die Substanz AM-2201 enthält, im „bbCID Scan“-Modus mit einem LC-qToF-MS. Im Gesamt-Ionen-Chromatogramm zeigt das synthetische Cannabinoid eine Retentionszeit von 23,7 min (oben). Das Massenspektrum (unten) zeigt die m/z aller Produkt-Ionen, die nach einer Elutionszeit von 23,7 min detektiert wurden. Auch das unfragmentierte Vorläufer-Ion von AM-2201 ($[M+H]^+ = m/z$ 360) und dessen charakteristische Produkt-Ionen (m/z 127, 155, 232) wurden detektiert.

Tabelle 1-2. Übersicht über die verwendeten massenspektrometrischen Messmodi und deren Anwendung in den durchgeführten Studien.

MS-Typ	Scan-Modus	Detektiertes Massenspektrum	Anwendung
MS/MS	PIS	Produkt-Ionen-Spektrum eines Vorläufer-Ions	Struktur-Charakterisierung von Substanzen/Metaboliten
	MRM	Ionenübergänge von Vorläufer-Ionen	Drogenscreening: Identifizierung und Quantifizierung, Metabolismusstudie: Abundanzvergleich von Metaboliten
	Prec	Vorläufer-Ionen eines Produkt-Ions	Screening nach unbekanntem Metaboliten
qToF-MS	Full Scan	Alle Vorläufer-Ionen	Screening nach unbekanntem Metaboliten, Bestätigung der Molekülformeln der Vorläufer-Ionen
	Auto-MS/MS	Produkt-Ionen-Spektrum eines Vorläufer-Ions	Struktur-Charakterisierung von Substanzen/Metaboliten (inklusive Bestimmung der Molekülformeln)
	bbCID	Alle Produkt-Ionen	Screening nach unbekanntem Metaboliten, Bestätigung der Molekülformeln von Produkt-Ionen

1.5.1.4 Validierung

Analytische Methoden müssen vor deren Einsatz zur Prüfung biologischen Probenmaterials validiert werden, um deren Eignung sicherzustellen. In Deutschland werden im akkreditierten forensisch-toxikologischen Bereich in der Regel die Validierungsrichtlinien der deutschsprachigen Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) angewendet ^[86]. Der Validierungsumfang muss dabei entsprechend dem analytischen Verfahren, dem zu analysierenden Probenmaterial und dem Zweck der Analytik rational angepasst werden. Im Folgenden sollen die wichtigsten Begrifflichkeiten in Bezug auf die Validierung quantitativer massenspektrometrischer Verfahren gemäß ihrer Definition in den GTFCh-Richtlinien kurz erläutert werden. In der Literatur finden sich weitere Definitionen dieser Begriffe, beispielsweise im „Compendium of Chemical Terminology“ der „International Union of Pure and Applied Chemistry“ (IUPAC) ^[87] oder im Leitfaden „Validation of Analytical Procedures“ des „International Council for Harmonisation“ (ICH) ^[88]. Dabei zeigen sich relevante Unterschiede in der Begriffsdefinition, den Vorgaben für die experimentelle Durchführung sowie den Akzeptanzkriterien, weshalb genaue Angaben zur Validierungsdurchführung unbedingt erforderlich sind.

Selektivität und Spezifität. Die Begriffe Selektivität (engl.: *selectivity*) und Spezifität (engl.: *specificity*) sind in der Literatur nicht einheitlich definiert und nicht eindeutig voneinander zu trennen. Im Anhang B der GTFCh-Richtlinie wird Selektivität als „*die Fähigkeit einer Methode, verschiedene nebeneinander zu bestimmende Analyten ohne gegenseitige Störungen oder Störungen durch andere endogene oder exogene Substanzen (Metaboliten, Verunreinigungen, Abbauprodukte, Matrix) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren*“ definiert ^[89]. Der Begriff der Spezifität wird in der Richtlinie nur auf einen Analyten bzw. eine Substanzklasse bezogen. Die Prüfung auf Selektivität/Spezifität erfolgt durch die Analyse verschiedener Leermatrixproben (engl.: *blank samples*), aufgestockter Leermatrixproben (z. B. mit internen Standards, relevanten Drogen bzw. Medikamenten) und authentischer Proben, welche potentiell interferierende Substanzen in hoher Konzentration enthalten. Leermatrixproben, die nur mit internen Standards aufgestockt wurden, werden als Nullproben (engl.: *zero sample*) bezeichnet. ^[89]

Kalibrationsbereich. Der Kalibrationsbereich (engl.: *calibration range* oder nur *range*) ist ein selbst definierter Konzentrationsbereich, in dem mit hinreichender Präzision und Richtigkeit (siehe unten) quantifiziert werden kann. Dieser sollte bei massenspektrometrischer Detektion im linearen Bereich der Kalibrationsfunktion liegen und durch die Konzentrationen der niedrigsten und höchsten gemessenen Kalibrationsprobe (engl.: *calibration sample*) begrenzt sein.

Linearität. Unter Linearität (engl.: *linearity*) wird der Teil des Kalibrationsbereichs verstanden, innerhalb dessen das gemessene Signal direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe ist.

Genauigkeit. Hinsichtlich der Genauigkeit (engl.: *accuracy*) einer analytischen Methode gilt es, zwischen der Richtigkeit (engl.: *trueness*) (siehe unten) als Maß für den systematischen Fehler und der Präzision (engl.: *precision*) (siehe unten) als Maß für den zufälligen Fehler zu unterscheiden. Auch hier muss beachtet werden, dass die Begriffe Genauigkeit, Präzision und Richtigkeit in der Literatur teilweise unterschiedlich verwendet werden. Die Überprüfung erfolgt üblicherweise durch mehrfache Analyse von Kontrollproben (engl.: *control samples*) im unteren, mittleren und oberen Konzentrationsbereich der Kalibration. Kontrollproben werden durch Aufstocken von Leermatrix-Proben hergestellt.

Richtigkeit. Die Richtigkeit ist ein Maß für den systematischen Fehler einer Methode, der sich aus dem Abstand der Messwerte vom Sollwert ergibt. Die Richtigkeit wird üblicherweise als „Bias“ (Quotient aus dem Mittelwert der Messwerte und dem Sollwert) in Prozent ausgedrückt.

Präzision. Die Präzision ist ein Maß für den zufälligen Fehler einer Methode, der sich aus der Streuung einzelner Messwerte um den Mittelwert ergibt. Die Präzision wird meist als relative Standardabweichung (engl.: *relative standard deviation*, RSD) in Prozent angegeben. Die Präzision kann unter verschiedenen Gesichtspunkten bestimmt werden. Meist wird die Wiederholpräzision (engl.: *repeatability, intra-day precision*) als Maß für die Reproduzierbarkeit von Messergebnissen am selben Messtag und die tagesverschiedene Laborpräzision (engl.: *inter-day precision*) als Maß für die Reproduzierbarkeit von Ergebnisse an verschiedenen Messtagen getestet.

Nachweisgrenze. Die Nachweisgrenze (engl.: *limit of detection*; LOD) gibt die Konzentration an, bei der ein bestimmter Analyt mit hinreichender Sicherheit identifiziert werden kann. Als Identifikationskriterien werden bei chromatographischen Verfahren mindestens die Retentionszeit und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (engl.: *signal-to-noise ratio*, S/N) herangezogen. Bei massenspektrometrischer Detektion wird darüber hinaus der Nachweis charakteristische Vorläufer-Ionen und Produkt-Ionen eines Analyten für die Identifizierung genutzt. Häufig wird eine niedrige Nachweisgrenze missverständlich als hohe Empfindlichkeit bezeichnet. Die Empfindlichkeit bzw. Sensitivität (engl.: *sensitivity*) einer Messmethode ergibt sich im eigentlichen Sinn jedoch aus der Steigung der Kalibrationsgeraden.

Bestimmungsgrenzen. Die Bestimmungsgrenzen (engl.: *limits of quantification*; LOQ) bezeichnen die Grenzkonzentrationen, zwischen denen eine Quantifizierung eines Analyten mit hinreichender Genauigkeit gewährleistet werden kann. Es wird zwischen der unteren Bestimmungsgrenze (engl.: *lower limit of quantification*; LLOQ), welche die niedrigste quantifizierbare Konzentration angibt, und der oberen Bestimmungsgrenze (engl.: *upper limit of quantification*; ULOQ), welche die höchste quantifizierbare Konzentration angibt, unterschieden.

Matrixeffekte. Jede Veränderung des Messsignals des Analyten durch Bestandteile der Probenmatrix wird als Matrixeffekt (engl.: *matrix effect*) bezeichnet. Dabei kann es sowohl zur Verstärkung (engl.: *enhancement*) als auch zur Unterdrückung (engl.: *suppression*) des Signals kommen. Bei massenspektrometrischen Verfahren können Matrixeffekte starke Auswirkungen haben, da bei der Ionisation die koeluiierenden Substanzen um die elektrischen Ladungen konkurrieren. Zur Ermittlung der Matrixeffekte wurde in der vorliegenden Arbeit das von Matuszewski *et al.* vorgeschlagene Vorgehen angewendet^[90].

1.5.2 Immunchemische Verfahren

Immunchemische Verfahren (engl.: *immunochemical assay*; IA) basieren auf der Bindung eines meist biotechnologisch hergestellten Antikörpers an den Zielanalyten nach dem klassischen Schlüssel-Schloss-Prinzip. Abhängig vom verwendeten Assay führt dies zu unterschiedlichen messbaren Signalen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei kompetitive homogene Enzym-Immunoassays (engl.: *competitive homogeneous enzyme immunoassay*, HEIA[®]) der Firma Immunalysis evaluiert. Das Funktionsprinzip dieser IA beruht auf der Verdrängung eines enzymgekoppelten Analyten – der dem Zielanalyten in der Probe chemisch-strukturell gleich oder ähnlich ist – von der Bindungsstelle des Antikörpers. Die Freisetzung des enzymgekoppelten Analyten führt zur Aktivierung des Enzyms und damit zu einer enzymkatalysierten Farbreaktion, welche photometrisch gemessen wird (Abbildung 1-21). Das Messsignal ist im Idealfall direkt proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe.

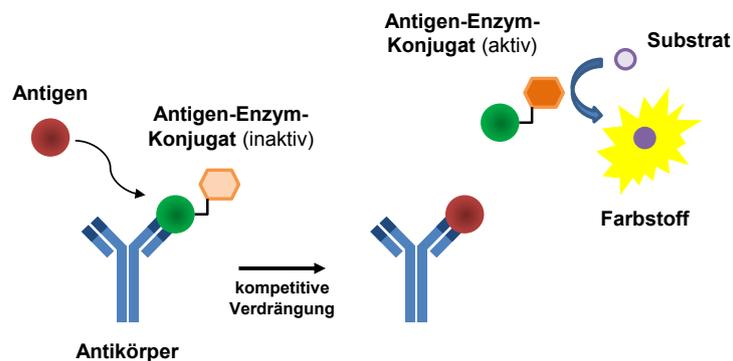


Abbildung 1-21. Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines kompetitiven Enzym-Immunoassays.

IA zeichnen sich durch kurze Messzeiten und einfache Handhabung aus. Da kommerzielle IA-Kits auf vollautomatisierten Geräten verwendet werden können, ermöglicht diese Technologie zudem eine kostengünstige Hochdurchsatzanalytik. Ein Nachteil der immunchemischen Verfahren besteht in unspezifischen Bindungen der Antikörper an Matrixbestandteile oder die Kreuzreaktivität (engl.: *cross-reactivity*) mit anderen Substanzen, wodurch falsch-positive Ergebnisse zustande kommen können.

In der forensischen Toxikologie werden IA als hinweisgebende Testverfahren eingesetzt. Positive Ergebnisse müssen jedoch stets mit einer beweissicheren Methode (i. d. R. GC-MS oder LC-MS) bestätigt werden um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen ^[86]. Teilweise wird die Kreuzreaktivität von Antikörpern ausgenutzt um nicht auf Einzelsubstanzen sondern auf ganze Stoffgruppen (z. B. Benzodiazepine) zu testen. Die entwickelten Antikörper binden dann charakteristische Teilstrukturen, in denen sich die Substanzen einer Stoffgruppe stark ähneln. Je größer die strukturelle Ähnlichkeit eines Stoffs mit dem „Antigen-Template“ ist, desto höher fällt in der Regel die Kreuzreaktivität aus. Wirkstoffe dieser Stoffgruppe mit größeren chemisch-strukturellen Abweichungen vom „Antigen-Template“ zeigen meist niedrige Kreuzreaktivität und werden dementsprechend nur in höheren Konzentrationen oder gar nicht durch den IA erkannt, was zu falsch-negativen Analyseergebnissen führen kann.

Die diagnostische Leistungsfähigkeit (engl.: *diagnostic efficiency*) eines IA kann durch die Analyse eines Probenkollektivs mit positiven und negativen Proben im Vergleich zu einer Referenzmethode ermittelt werden. Das Ergebnis der Vergleichsmessung wird üblicherweise in Form einer „Vierfeldertafel“ gegenübergestellt (Abbildung 1-22). Im Folgenden sollen die für diese Arbeit wichtigen Begrifflichkeiten für die Evaluierung von IA erläutert werden, wie sie auch in dem Übersichtsartikel von Fawcett beschrieben sind ^[91].

„**Richtig-Positive**“ (engl.: *true positives*, **TP**): Anzahl der positiven Proben, die vom IA korrekt als positiv klassifiziert wurden.

„**Falsch-Positive**“ (engl.: *false positives*, **FP**): Anzahl der negativen Proben, die vom IA fälschlich als positiv klassifiziert wurden.

„**Richtig-Negative**“ (engl.: *true negatives*, **TN**): Anzahl der negativen Proben, die vom IA korrekt als negativ klassifiziert wurden.

„**Falsch-Negative**“ (engl.: *false negatives*, **FN**): Anzahl der positiven Proben, die vom IA fälschlich als negativ klassifiziert wurden.

„**Sensitivität**“ (engl.: *sensitivity*): Wird berechnet als das Verhältnis der Anzahl richtig-positiver Proben zur Summe der richtig-positiven und falsch-negativen Proben (Gesamtanzahl tatsächlich positiver Proben). Die Sensitivität entspricht damit der „Richtig-Positiv-Rate“ (engl.: *true positive rate*).

„**Spezifität**“ (engl.: *specificity*): Wird berechnet als das Verhältnis der Anzahl richtig-negativer Proben zur Summe der richtig-negativen und falsch-positiven Proben (Gesamtanzahl tatsächlich negativer Proben). Die Spezifität entspricht damit der „Richtig-Negativ-Rate“ (engl.: *true negative rate*).

„**Genauigkeit**“ (engl.: *accuracy*): Wird berechnet als das Verhältnis der Summe der richtig-positiven und richtig negativen Proben zur Summe der Gesamtanzahl positiver und negativer Proben. Dieser Wert spiegelt wider, wieviel Prozent der Proben durch den IA korrekt klassifiziert wurden. Er ist ein Maß für die diagnostische Leistungsfähigkeit des Assays.

„**Toleranzgrenze**“ (engl.: *cut-off*): Als Cut-Off wird ein Messwert des IA definiert (Cut-Off-Wert), unterhalb dessen die gemessene Probe als negativ zu bewerten ist bzw. oberhalb dessen als positiv. Der Cut-Off-Wert sollte so gewählt werden, dass er im optimalen Arbeitsbereich des IA liegt, bei dem also die meisten Proben korrekt klassifiziert werden. Die detektierten Konzentrationen sollten dabei dem Zweck der Analyse entsprechen, so dass der Substanznachweis im praxisrelevanten Konzentrationsbereich (bzw. gesetzlich vorgeschriebene Grenzwert) gelingt.

„**Receiver-Operating-Characteristic**“ (**ROC**)-**Kurve**. Nach Berechnung der Richtig-Positiv-Raten (Sensitivität) und der Falsch-Negativ-Raten (= „100 % minus Spezifität“) bei der Anwendung verschiedener Cut-Off-Werte können die Ergebnisse graphisch gegeneinander aufgetragen werden. Die Fläche unter der resultierenden Kurve (engl.: *area under the curve*; AUC) kann zur Bewertung der Leistungsfähigkeit eines IA herangezogen werden. Dabei gilt, je größer die AUC desto spezifischer und selektiver arbeitet der IA unter den gewählten Bedingungen. Eine Fläche von 0,5 entspricht einer reinen Zufallsverteilung zwischen der Klassifizierung „positiv“ und „negativ“. Der Punkt auf der ROC-Kurve, der am weitesten von der Diagonalen entfernt liegt, entspricht der maximalen diagnostischen Leistungsfähigkeit des IA. Abbildung 1-23 zeigt die ROC-Kurve eines IA mit hoher Sensitivität und Spezifität sowie die ROC-Kurve einer reinen Zufallsverteilung.

		Ergebnis (Referenzmethode)	
		positiv	negativ
IA Ergebnis (Immunoassay)	positiv	Richtig-Positive	Falsch-Positive
	negativ	Falsch-Negative	Richtig-Negative

Abbildung 1-22. Einordnung der mittels Immunoassay ermittelten Analyseergebnisse (positiv oder negativ) im Vergleich zu der Verteilung positiver und negativer Proben, welche durch die Referenzmethode ermittelt wurde.

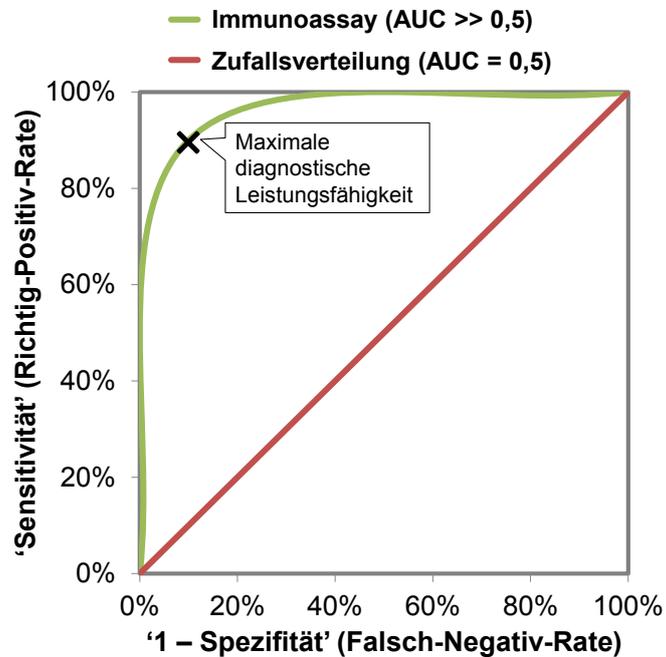


Abbildung 1-23. „Receiver-Operating-Characteristic“ (ROC)-Kurven eines Immunoassays (grüne Linie) und einer reinen Zufallsverteilung (rote Linie). Der Punkt auf der grünen ROC-Kurve, der am weitesten von der Diagonalen entfernt liegt, entspricht dem Cut-Off mit der maximalen diagnostischen Leistungsfähigkeit unter den gewählten Bedingungen.

1.6 Prüfung biologischen Probenmaterials

Wie eingangs erwähnt ist die qualitative und quantitative Analyse von Inhaltsstoffen komplexer biologischer Matrices wie beispielsweise Blut, Haar oder Urin in der forensischen Toxikologie von zentraler Bedeutung. Für diese Arbeit war insbesondere die Untersuchung menschlicher Haar- und Urinproben auf SC und deren Abbauprodukte zum Nachweis einer Drogenabstinenz bzw. -aufnahme von Interesse. Im Folgenden soll näher auf die Prüfung dieser beiden Matrices eingegangen werden.

1.6.1 Urinanalytik

Nach der renalen Filtration wird der Urin in der Harnblase bis zu ihrer Entleerung gespeichert. Dieser Prozess führt dazu, dass exogene Stoffe und/oder deren Metaboliten im Urin meist in höheren Konzentrationen enthalten sind als im Blut und häufig auch über einen längeren Zeitraum nachweisbar sind. Aus diesem Grund ist Urin in verschiedenen Bereichen – besonders für Abstinenzkontrolluntersuchungen – von Interesse (z. B. gerichtliche Auflagen zur Drogenabstinenz, „Work-Place-Drug-Testing“, Dopingkontrollen). Auch bei einem Verdacht auf den Konsum oder die Beibringung schnell eliminerter Substanzen (z. B. γ -Hydroxybuttersäure (GHB)) und bei der Untersuchung von *post mortem*-Fällen kann ein verlängertes Nachweisfenster wertvoll sein. Ein erheblicher Nachteil der Urinanalyse ist, dass die gemessene Konzentration im Urin nicht mit der Blutkonzentration korreliert. Dadurch ist eine klare Interpretation hinsichtlich Aufnahmezeitpunkt, Aufnahmemenge und möglicher Beeinträchtigung selbst bei der Erhebung quantitativer Werte meist nicht möglich. Wie bereits im Kapitel „Metabolismus“ beschrieben wird die renale Ausscheidung durch die Biotransformation der aufgenommenen Substanzen gefördert. Besonders lipophile Stoffe unterliegen häufig einem extensiven Metabolismus, so dass die entsprechenden Muttersubstanzen im Urin meist nicht detektierbar sind. Ein Nachweis extensiv verstoffwechselter Substanzen muss daher meist indirekt über deren Metabolite geführt werden, was wiederum Kenntnisse über die Pharmakokinetik dieser Stoffe voraussetzt.^[92]

In Kapitel 1.4.3 wurde aufgezeigt, dass auch SC in der Regel nur über ihre Biotransformationsprodukte in Urinproben nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund sind Metabolismusstudien eine unverzichtbare Grundlage für den Nachweis von SC in Urinproben. SC-Metaboliten, welche für einen Nachweis in Urinproben herangezogen werden, sollten dabei die folgenden Kriterien erfüllen: (1) Sie sollten in möglichst hoher Konzentration über den Urin ausgeschieden werden (im Vergleich zu den übrigen Metaboliten des SC); (2) die relative Konzentration sollte einer möglichst geringen Schwankung innerhalb eines größeren Probenkollektivs unterliegen (im Verhältnis zu den übrigen Metaboliten des SC); (3) eine hohe Spezifität für das nachzuweisende SC sollte gegeben sein (der Metabolit sollte nicht auch von anderen, strukturähnlichen SC gebildet werden). Die Ermittlung optimaler Zielanalyten wird idealerweise durch die Untersuchung des Metabolitenspektrums eines SC in einem größeren Kollektiv authentischer Urinproben von SC-Konsumenten durchgeführt. Da beim Auftreten einer neuen Substanz häufig keine Urinproben von Konsumenten zur Verfügung stehen, können erste Erkenntnisse aus *in vitro*-Metabolismusstudien sehr wertvoll für die Entwicklung analytischer Nachweismethoden sein. Wie bereits erwähnt werden viele SC-Metaboliten als Konjugate (v. a. mit Glucuronsäure) renal ausgeschieden. Eine Konjugatsspaltung (z. B. durch Inkubation mit β -Glucuronidase) führt zur Freisetzung der entsprechenden Phase-I-Metaboliten und kann bei der Probenaufbereitung eingesetzt werden, um deren Nachweis zu erleichtern. Bei der Interpretation analytischer Befunde muss berücksichtigt werden, dass manche strukturähnliche SC gemeinsame Metaboliten bilden können (siehe Kapitel 1.4.3). Gemeinsame Metaboliten können zwar als Zielanalyten zum Nachweis einer Gruppe strukturähnlicher SC genutzt werden^[77], je nach Fragestellung kann der Nachweis substanzspezifischer Metaboliten jedoch notwendig sein, um differenzieren zu können, welche Substanz aufgenommen wurde.

In der Literatur waren zu Beginn dieser Arbeit bereits einige Methoden zum qualitativen und quantitativen Nachweis von SC-Metaboliten in menschlichen Urinproben mittels LC-MS [70, 78, 93-100] und eine Methode zum Nachweis mittels IA [101] beschrieben. Ein gemeinsames Problem vieler dieser Methoden ist, dass kein Konzept für die Erweiterung des Analytenspektrums beschrieben wurde, obwohl sich das Spektrum der relevanten SC durch den dynamischen Drogenmarkt ständig verändert. Die Testverfahren sind daher in ihrer publizierten Form meist innerhalb kurzer Zeit nicht mehr geeignet, um alle praxisrelevanten Stoffe nachzuweisen. Darüber hinaus kann die Prävalenz verschiedener SC regional deutlich variieren. Besonders die verzögerte Verfügbarkeit analytischen Referenzmaterials für die Hauptmetaboliten neuer SC erschwert es, Urinanalysemethoden entsprechend anzupassen. Die Referenzmaterialien sind zudem notwendig um Leistungsparameter der LC-MS-Methoden (z. B. Nachweisgrenze) und IA (z. B. Kreuzreaktivität) zu evaluieren (siehe Kapitel 1.5.1.4 und 1.5.2).

1.6.2 Haaranalytik

Wegen der festen und dauerhaften Struktur der Haare können darin eingelagerte Substanzen häufig noch Monate bis Jahre nach deren Aufnahme nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu sind die meisten Xenobiotika nur wenige Tage in Körperflüssigkeiten wie Blut oder Urin detektierbar. Dieses verlängerte Nachweisfenster ist in der forensischen Toxikologie besonders im Hinblick auf eine Abstinenzkontrolle interessant. Beispielsweise für die Kontrolle einer Alkoholabstinenz im Rahmen der medizinisch-psychologischen Untersuchung (MPU) für die Wiedererlangung der Fahrerlaubnis ist die Haaranalytik auf den Ethanolmetaboliten Ethylglucuronid (EtG) zur Laborroutine geworden. Aber auch eine Vielzahl anderer Drogen und Arzneistoffe lassen sich – teilweise sogar nach einer einmaligen Aufnahme – in Haaren nachweisen. Für die Einlagerung exogener Stoffe in die Haarstruktur werden verschiedene Mechanismen diskutiert (Abbildung 1-24). Während man zu Beginn von einer exklusiven Einlagerung über den Blutkreislauf in die Haarwurzel ausging, haben Untersuchungen gezeigt, dass auch die passive Diffusion aus umliegenden Geweben, Talg (Sebum) und Schweiß eine Rolle spielen können. Da der größte Teil des Haarschafts der äußeren Umgebung ausgesetzt ist, können auch äußerliche Substanzantragungen („externe Kontamination“) von der Haaroberfläche bis tief in die Haarstruktur eindringen. Nach ihrer Einlagerung kann eine Substanz unterschiedlichen Einflüssen unterliegen, die zur Reduzierung ihrer Konzentration im Haar führen können („Auswascheffekte“). Dazu zählen verschiedene Zersetzungsprozesse (z. B. chemisch durch Bleichen, UV-Strahlung) und Extraktionsprozesse (z. B. durch Behandlung mit Shampoo und anderen Kosmetika). Der Umfang, in dem die beschriebenen Einlagerungs- und Abbau-/Extraktionsmechanismen zum Tragen kommen ist dabei von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise den chemisch-physikalischen Substanzeigenschaften oder der Art der Substanzaufnahme abhängig. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Kokain auf Grund seines basischen Charakters eine hohe Affinität zu den Haarpigmenten (Melanin) aufweist, wodurch die Einlagerung von Kokain in die Haarstruktur stark begünstigt wird. Dementsprechend kann die Interpretation der analytischen Befunde einer Haaruntersuchung schwierig sein. Das gilt insbesondere hinsichtlich der Unterscheidung zwischen einem aktiven Konsum, einer passiven Aufnahme oder einer externer Kontamination. Aber auch die Bewertung des Konsumverhaltens (gelegentlicher vs. chronischer Konsum) oder die Bestimmung des zeitlichen Verlaufs einer Substanzaufnahme durch die Analyse von unterschiedlichen Abschnitten einer Haarsträhne (segmentale Haaranalyse) werden durch die genannten Effekte erschwert. Der Nachweis von Stoffwechselprodukten einer Substanz in Haaren kann als indirekter Beweis für eine systemische Aufnahme dienen, sofern diese ausschließlich metabolisch gebildet werden. Da Metaboliten im Vergleich zu ihren Muttersubstanzen meist in wesentlich geringeren Umfang in der Haarstruktur vorhanden sind, stellt deren Nachweis oft hohe Anforderungen an die Nachweisgrenzen des Testverfahrens.^[102]

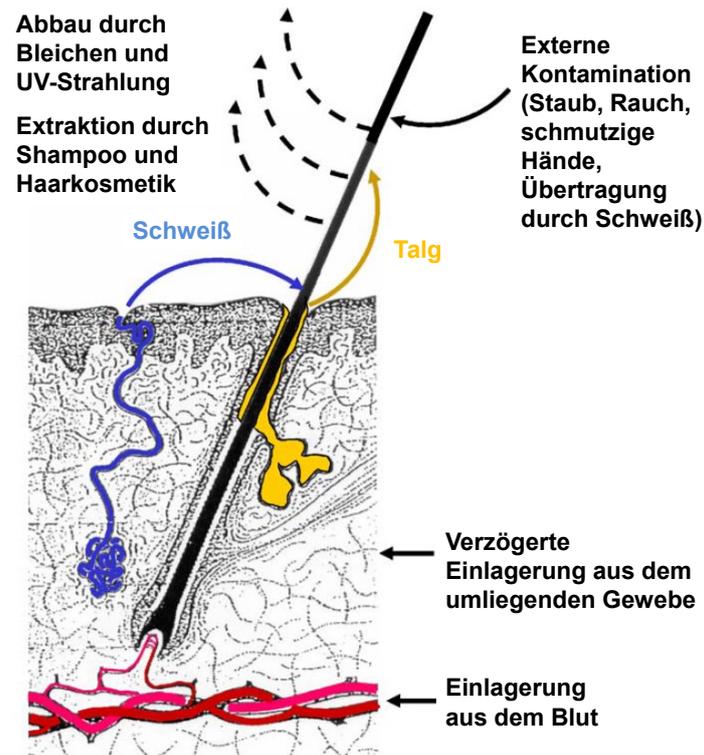


Abbildung 1-24. Schematische Darstellung der Einlagerungsmechanismen von Substanzen in die Haarstruktur sowie deren Abbau- und Extraktionsprozesse. Angepasst aus Literatur^[102].

Zu Beginn dieser Arbeit war nur wenig Literatur über den Nachweis von SC und einiger ihrer Metaboliten in Haarproben mittels LC-MS verfügbar^[103-106]. Zwar ist analytisches Referenzmaterial der Muttersubstanzen in den meisten Fällen schnell verfügbar, pragmatische Ansätze für die Erweiterung des Analytenspektrums der Testverfahren und der damit notwendigen Revalidierung sind allerdings bislang nicht vorgeschlagen worden. Hinsichtlich der Interpretation analytischer Befunde von SC und deren Metaboliten in Haarproben lagen zu Beginn dieser Arbeit sehr wenige Informationen vor. Kim *et al.* untersuchten die Einlagerung von JWH-073 und dessen Metaboliten in Abhängigkeit des Melaningehalts der Haare an Ratten, wobei keine Korrelation festgestellt wurde^[105]. Hutter *et al.* beobachteten bei der segmentalen Analyse authentischer Haarsträhnen, dass die Konzentrationen der SC in den Haarsegmenten in der Regel vom kopfnahen Ende (proximal) zur Haarspitze (distal) hin ansteigen^[104]. Es ergab sich keine zeitliche Korrelation der Befunde in den Segmenten mit den Angaben zum Konsumverhalten. Als mögliche Erklärung postulierten die Autoren eine überwiegende Einlagerung der Substanzen über eine externe Kontamination der Haare durch Nebenstromrauch.

1.7 Referenzen

- [1.] Daldrup, T. Forensische Toxikologie. *Chemie in unserer Zeit*, **1985**, 19(4), 125-136.
- [2.] WHO expert committee on problems related to alcohol consumption. World Health Organization (WHO), **2007**. Abgerufen von: http://www.who.int/substance_abuse/expert_committee_alcohol_tr944.pdf [am 27.05.2018].
- [3.] European drug report 2017: trends and developments. EMCDDA, **2017**. Abgerufen von: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001ENN.pdf_en [am 27.05.2018].
- [4.] Di Marzo, V.; Bifulco, M.; De Petrocellis, L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature reviews Drug discovery*, **2004**, 3(9), 771-784.
- [5.] Makriyannis, A.; Deng, H. Cannabimimetic indole derivatives. Patentnummer: US6900236B1, **2005**.
- [6.] Makriyannis, A.; Deng, H. Cannabimimetic indole derivatives. Patentnummer: US7241799B2, **2007**.
- [7.] Makriyannis, A.; Deng, H. Cannabimimetic indole derivatives. Patentnummer: US20080090871A1, **2008**.
- [8.] Buchler, I.P.; Hayes, M.J.; Hegde, S.G.; Hockerman, S.L.; Jones, D.E.; Kortum, S.W.; Rico, J.G.; Tenbrink, R.E.; Wu, K.K. Indazole derivatives. Patentnummer: WO2009106980A2, **2009**.
- [9.] Buchler, I.P.; Hayes, M.J.; Hegde, S.G.; Hockerman, S.L.; Jones, D.E.; Kortum, S.W.; Rico, J.G.; Tenbrink, R.E.; Wu, K.K. Indazole derivatives. Patentnummer: US2011/0028447A1, **2011**.
- [10.] Huffman, J.W.; Dai, D.; Martin, B.R.; Compton, D.R. Design, synthesis and pharmacology of cannabimimetic indoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1994**, 4(4), 563-566.
- [11.] Huffman, J.W.; Szklennik, P.V.; Almond, A.; Bushell, K.; Selley, D.E.; He, H.; Cassidy, M.P.; Wiley, J.L.; Martin, B.R. 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2005**, 15(18), 4110-4113.
- [12.] Gallant, M.; Gareau, Y.; Guay, D.; Labelle, M.; Prasit, P. Indole derivatives with affinity for the cannabinoid receptor. Patentnummer: US5532237A, **1996**.
- [13.] Aung, M.M.; Griffin, G.; Huffman, J.W.; Wu, M.-J.; Keel, C.; Yang, B.; Showalter, V.M.; Abood, M.E.; Martin, B.R. Influence of the *N*-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB₁ and CB₂ receptor binding. *Drug and Alcohol Dependence*, **2000**, 60(2), 133-140.
- [14.] Melvin, L.S.; Johnson, M.R.; Harbert, C.A.; Milne, G.M.; Weissman, A. A cannabinoid derived prototypical analgesic. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1984**, 27(1), 67-71.
- [15.] Compton, D.R.; Johnson, M.R.; Melvin, L.S.; Martin, B.R. Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: classification as cannabimimetic agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1992**, 260(1), 201-209.
- [16.] Melvin, L.S.; Milne, G.M.; Johnson, M.R.; Subramaniam, B.; Wilken, G.H.; Howlett, A. Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Molecular Pharmacology*, **1993**, 44(5), 1008-1015.
- [17.] Huffman, J.W.; Zengin, G.; Wu, M.-J.; Lu, J.; Hynd, G.; Bushell, K.; Thompson, A.L.; Bushell, S.; Tartal, C.; Hurst, D.P. Structure-activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl) indoles at the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB₂ receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2005**, 13(1), 89-112.
- [18.] Bowden, M.J.; Williamson, J.P.B. Cannabinoid compounds. Patentnummer: WO2014167530A1, **2014**.
- [19.] Compton, D.; Rice, K.C.; De Costa, B.R.; Razdan, R.; Melvin, L.S.; Johnson, M.R.; Martin, B.R. Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and *in vivo* activities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1993**, 265(1), 218-226.
- [20.] Compton, D.R.; Aceto, M.D.; Lowe, J.; Martin, B.R. *In vivo* characterization of a specific cannabinoid receptor antagonist (SR141716A): inhibition of delta 9-tetrahydrocannabinol-induced responses and apparent agonist activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1996**, 277(2), 586-594.
- [21.] Compton, D.R.; Gold, L.H.; Ward, S.J.; Balster, R.L.; Martin, B.R. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1992**, 263(3), 1118-1126.
- [22.] Dutta, A.; Ryan, W.; Thomas, B.; Singer, M.; Compton, D.; Martin, B.; Razdan, R. Synthesis, pharmacology, and molecular modeling of novel 4-alkoxy indole derivatives related to cannabimimetic aminoalkyl indoles (AAls). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1997**, 5(8), 1591-1600.
- [23.] Frost, J.M.; Dart, M.J.; Tietje, K.R.; Garrison, T.R.; Grayson, G.K.; Daza, A.V.; El-Kouhen, O.F.; Miller, L.N.; Li, L.; Yao, B.B. Indol-3-yl-tetramethylcyclopropyl ketones: effects of indole ring substitution on CB₂ cannabinoid receptor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 51(6), 1904-1912.

- [24.] Frost, J.M.; Dart, M.J.; Tietje, K.R.; Garrison, T.R.; Grayson, G.K.; Daza, A.V.; El-Kouhen, O.F.; Yao, B.B.; Hsieh, G.C.; Pai, M. Indol-3-ylcycloalkyl ketones: effects of *N*1 substituted indole side chain variations on CB₂ cannabinoid receptor activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 53(1), 295-315.
- [25.] Wiley, J.L.; Compton, D.R.; Dai, D.; Lainton, J.A.; Phillips, M.; Huffman, J.W.; Martin, B.R. Structure-activity relationships of indole- and pyrrole-derived cannabinoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1998**, 285(3), 995-1004.
- [26.] Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Héaulme, M.; Shire, D.; Calandra, B.; Congy, C.; Martinez, S.; Maruani, J.; Néliat, G.; Caput, D. SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Letters*, **1994**, 350(2-3), 240-244.
- [27.] Rinaldi-Carmona, M.; Barth, F.; Millan, J.; Derocq, J.-M.; Casellas, P.; Congy, C.; Oustric, D.; Sarran, M.; Bouaboula, M.; Calandra, B. SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB₂ cannabinoid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1998**, 284(2), 644-650.
- [28.] Lainton, J.A.; Huffman, J.W.; Martin, B.R.; Compton, D.R. 1-Alkyl-3-(1-naphthoyl) pyrroles: A new class of cannabinoid. *Tetrahedron Letters*, **1995**, 36(9), 1401-1404.
- [29.] Huffman, J.W.; Padgett, L.W.; Isherwood, M.L.; Wiley, J.L.; Martin, B.R. 1-Alkyl-2-aryl-4-(1-naphthoyl) pyrroles: new high affinity ligands for the cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, 16(20), 5432-5435.
- [30.] Huffman, J.W.; Mabon, R.; Wu, M.-J.; Lu, J.; Hart, R.; Hurst, D.P.; Reggio, P.H.; Wiley, J.L.; Martin, B.R. 3-Indolyl-1-naphthylmethanes: new cannabimimetic indoles provide evidence for aromatic stacking interactions with the CB₁ cannabinoid receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2003**, 11(4), 539-549.
- [31.] Huffman, J.; Padgett, L. Recent developments in the medicinal chemistry of cannabimimetic indoles, pyrroles and indenenes. *Current Medicinal Chemistry*, **2005**, 12(12), 1395-1411.
- [32.] Huffman, J. Cannabimimetic indoles, pyrroles and indenenes. *Current Medicinal Chemistry*, **1999**, 6, 705-720.
- [33.] Matsuda, L.A.; Lolait, S.J.; Brownstein, M.J.; Young, A.C.; Bonner, T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **1990**, 346(6284), 561.
- [34.] Munro, S.; Thomas, K.L.; Abu-Shaar, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **1993**, 365(6441), 61-65.
- [35.] Devane, W.A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R.G.; Stevenson, L.A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **1992**, 258(5090), 1946-1949.
- [36.] Sugiura, T.; Kondo, S.; Sukagawa, A.; Nakane, S.; Shinoda, A.; Itoh, K.; Yamashita, A.; Waku, K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **1995**, 215(1), 89-97.
- [37.] Howlett, A.; Barth, F.; Bonner, T.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W.; Felder, C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, **2002**, 54(2), 161-202.
- [38.] BMfG. Gesetz zur Bekämpfung der Verbreitung neuer psychoaktiver Stoffe. *Bundesgesetzblatt*, **2016**.
- [39.] Synthetic cannabinoids in Europe: chemistry and naming of the synthetic cannabinoids. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), **2018**. Abgerufen von: <http://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/synthetic-cannabinoids#panel2> [am 22.06.2018].
- [40.] Uchiyama, N.; Matsuda, S.; Wakana, D.; Kikura-Hanajiri, R.; Goda, Y. New cannabimimetic indazole derivatives, *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-pentyl-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-PINACA) and *N*-(1-amino-3-methyl-1-oxobutan-2-yl)-1-(4-fluorobenzyl)-1*H*-indazole-3-carboxamide (AB-FUBINACA) identified as designer drugs in illegal products. *Forensic Toxicology*, **2013**, 31(1), 93-100.
- [41.] Griffiths, P.; Sedefov, R.; Gallegos, A.; Lopez, D. How globalization and market innovation challenge how we think about and respond to drug use: 'Spice' a case study. *Addiction*, **2010**, 105(6), 951-953.
- [42.] Auwärter, V.; Dresen, S.; Weinmann, W.; Müller, M.; Pütz, M.; Ferreiros, N. 'Spice' and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *Journal of Mass Spectrometry*, **2009**, 44(5), 832-837.
- [43.] Uchiyama, N.; Kikura-Hanajiri, R.; Kawahara, N.; Haishima, Y.; Goda, Y. Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2009**, 57(4), 439-441.
- [44.] Untersuchung des Handelsproduktes "Spice". Christian Steup, **2008**. Abgerufen von: <http://usualredant.de/downloads/analyse-thc-pharm-spice-jwh-018.pdf> [am 22.06.2018].
- [45.] Perspectives on drugs: synthetic cannabinoids in Europe. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), **2017**. Abgerufen von: http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2753/att_212361_EN EMCDDA_POD_2013_Synthetic%20cannabinoids.pdf [am 22.06.2018].

- [46.] Werse, B.; Morgenstern, C.; Sarvari, L. MoSyD Jahresbericht 2013: Drogentrends in Frankfurt am Main. Centre For Drug Research, Goethe Universität Frankfurt am Main, **2014**.
- [47.] Fattore, L.; Fratta, W. Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **2011**, 5, 60.
- [48.] BMfG. Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln. *Bundesgesetzblatt*, **1994**.
- [49.] BrArM. Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln. *Bundesgesetzblatt*, **2005**.
- [50.] EuGH. Urteil des Gerichtshofes AZ C-358/13 u. C-181/14. **2014**.
- [51.] European Database on New Drugs (EDND). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Abgerufen von: <https://ednd.emcdda.europa.eu/html.cfm/index6555EN.html> [am 22.06.2018].
- [52.] Castaneto, M.S.; Gorelick, D.A.; Desrosiers, N.A.; Hartman, R.L.; Pirard, S.; Huestis, M.A. Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence*, **2014**, 144, 12-41.
- [53.] Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.B.; Starke, K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: *Urban & Fischer Verlag*; **2005**.
- [54.] Peters, F.T.; Meyer, M.R. *In vitro* approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds. *Drug Testing and Analysis*, **2011**, 3(7-8), 483-495.
- [55.] Chimalakonda, K.C.; Bratton, S.M.; Le, V.H.; Yiew, K.H.; Dineva, A.; Moran, C.L.; James, L.P.; Moran, J.H.; Radomska-Pandya, A. Conjugation of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition*, **2011**, 39(10), 1967-1976.
- [56.] Chimalakonda, K.C.; Seely, K.A.; Bratton, S.M.; Brents, L.K.; Moran, C.L.; Endres, G.W.; James, L.P.; Hollenberg, P.F.; Prather, P.L.; Radomska-Pandya, A.; Moran, J.H. Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metabolism and Disposition*, **2012**, 40(11), 2174-2184.
- [57.] Sobolevsky, T.; Prasolov, I.; Rodchenkov, G. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis*, **2012**, 4(10), 745-753.
- [58.] Zhang, Q.; Ma, P.; Iszard, M.; Cole, R.B.; Wang, W.Q.; Wang, G.D. *In vitro* metabolism of R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate, a cannabinoid receptor agonist. *Drug Metabolism and Disposition*, **2002**, 30(10), 1077-1086.
- [59.] Zhang, Q.; Ma, P.; Wang, W.Q.; Cole, R.B.; Wang, G.D. Characterization of rat liver microsomal metabolites of AM-630, a potent cannabinoid receptor antagonist, by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39(6), 672-681.
- [60.] Zhang, Q.; Ma, P.; Cole, R.B.; Wang, G.D. Identification of *in vitro* metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB₂) by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 386(5), 1345-1355.
- [61.] De Brabanter, N.; Esposito, S.; Tudela, E.; Lootens, L.; Meuleman, P.; Leroux-Roels, G.; Deventer, K.; Van Eenoo, P. *In vivo* and *in vitro* metabolism of the synthetic cannabinoid JWH-200. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2013**, 27(18), 2115-2126.
- [62.] ElSohly, M.A.; Gul, W.; Elsohly, K.M.; Murphy, T.P.; Madgula, V.L.; Khan, S.I. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine specimens for K2 (JWH-018) metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*, **2011**, 35(7), 487-495.
- [63.] Jin, M.J.; Lee, J.; In, M.K.; Yoo, H.H. Characterization of *in vitro* metabolites of CP-47,497, a synthetic cannabinoid, in human liver microsomes by LC-MS/MS. *Journal of Forensic Sciences*, **2013**, 58(1), 195-199.
- [64.] Wintermeyer, A.; Möller, I.; Thevis, M.; Jübner, M.; Beike, J.; Rothschild, M.A.; Bender, K. *In vitro* phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 398(5), 2141-2153.
- [65.] Kim, U.; Jin, M.J.; Lee, J.; Han, S.B.; In, M.K.; Yoo, H.H. Tentative identification of phase I metabolites of HU-210, a classical synthetic cannabinoid, by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2012**, 64-65, 26-34.
- [66.] Gandhi, A.S.; Zhu, M.S.; Pang, S.K.; Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.B.; Liu, H.F.; Huestis, M.A. First characterization of AKB-48 metabolism, a novel synthetic cannabinoid, using human hepatocytes and high-resolution mass spectrometry. *The AAPS Journal*, **2013**, 15(4), 1091-1098.
- [67.] Wohlfarth, A.; Pang, S.; Zhu, M.; Gandhi, A.S.; Scheidweiler, K.B.; Liu, H.F.; Huestis, M.A. First metabolic profile of XLR-11, a novel synthetic cannabinoid, obtained by using human hepatocytes and high-resolution mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, **2013**, 59(11), 1638-48.

- [68.] Grigoryev, A.; Savchuk, S.; Melnik, A.; Moskaleva, N.; Dzhurko, J.; Ershov, M.; Nosyrev, A.; Vedenin, A.; Izotov, B.; Zabirowa, I.; Rozhanets, V. Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2011**, 879(15-16), 1126-1136.
- [69.] Grigoryev, A.; Melnik, A.; Savchuk, S.; Simonov, A.; Rozhanets, V. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2011**, 879(25), 2519-2526.
- [70.] Adamowicz, P.; Zuba, D.; Sekula, K. Analysis of UR-144 and its pyrolysis product in blood and their metabolites in urine. *Forensic Science International*, **2013**, 233(1-3), 320-327.
- [71.] Grigoryev, A.; Kavanagh, P.; Melnik, A. The detection of the urinary metabolites of 3-[(adamantan-1-yl)carbonyl]-1-pentylindole (AB-001), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **2012**, 4(6), 519-524.
- [72.] Grigoryev, A.; Kavanagh, P.; Melnik, A.; Savchuk, S.; Simonov, A. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry detection of the urinary metabolites of UR-144 and its major pyrolysis product. *Journal of Analytical Toxicology*, **2013**, 37(5), 265-276.
- [73.] Grigoryev, A.; Kavanagh, P.; Melnik, A. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl]-2-iodophenylmethanone (AM-694), a high affinity cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **2013**, 5(2), 110-115.
- [74.] Hutter, M.; Broecker, S.; Kneisel, S.; Auwärter, V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques. *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, 47(1), 54-65.
- [75.] 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. *Journal of Mass Spectrometry*, **2013**, 48(7), 885-894.
- [76.] Kavanagh, P.; Grigoryev, A.; Melnik, A.; Simonov, A. The identification of the urinary metabolites of 3-(4-methoxybenzoyl)-1-pentylindole (RCS-4), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2012**, 36(5), 303-11.
- [77.] Lovett, D.P.; Yanes, E.G.; Herbelin, T.W.; Knoerzer, T.A.; Levisky, J.A. Structure elucidation and identification of a common metabolite for naphthoylindole-based synthetic cannabinoids using LC-TOF and comparison to a synthetic reference standard. *Forensic Science International*, **2013**, 226(1-3), 81-87.
- [78.] Möller, I.; Wintermeyer, A.; Bender, K.; Jübner, M.; Thomas, A.; Krug, O.; Schänzer, W.; Thevis, M. Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls. *Drug Testing and Analysis*, **2011**, 3(9), 609-620.
- [79.] Sobolevskii, T.; Prasolov, I.; Rodchenkov, G. Application of mass spectrometry to the structural identification of the metabolites of the synthetic cannabinoid JWH-018 and the determination of them in human urine. *Journal of Analytical Chemistry*, **2011**, 66(13), 1314-1323.
- [80.] Sobolevsky, T.; Prasolov, I.; Rodchenkov, G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Science International*, **2010**, 200(1-3), 141-147.
- [81.] Gandhi, A.S.; Zhu, M.S.; Pang, S.K.; Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. Metabolite profiling of RCS-4, a novel synthetic cannabinoid designer drug, using human hepatocyte metabolism and TOF-MS. *Bioanalysis*, **2014**, 6(11), 1471-1485.
- [82.] Brents, L.K.; Reichard, E.E.; Zimmerman, S.M.; Moran, J.H.; Fantegrossi, W.E.; Prather, P.L. Phase I hydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-018 retain *in vitro* and *in vivo* cannabinoid 1 receptor affinity and activity. *PLoS One*, **2011**, 6(7).
- [83.] Brents, L.K.; Gallus-Zawada, A.; Radomska-Pandya, A.; Vasiljevik, T.; Prinszano, T.E.; Fantegrossi, W.E.; Moran, J.H.; Prather, P.L. Monohydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-073 retain intermediate to high cannabinoid 1 receptor (CB1R) affinity and exhibit neutral antagonist to partial agonist activity. *Biochemical Pharmacology*, **2012**, 83(7), 952-961.
- [84.] Rajasekaran, M.; Brents, L.K.; Franks, L.N.; Moran, J.H.; Prather, P.L. Human metabolites of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 bind with high affinity and act as potent agonists at cannabinoid type-2 receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2013**, 269(2), 100-8.
- [85.] Gross, J.H. Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch. Heidelberg: Springer-Verlag; **2013**.
- [86.] Paul, L.; Musshoff, F.; Aebi, B.; Auwärter, V.; Krämer, T.; Peters, F.; Skopp, G.; Aderjan, R.; Herbold, M.; Schmitt, G. Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. *Toxichem Krimtech*, **2009**, 76(3), 142-176.
- [87.] Compendium of Chemical Terminology - the Gold Book. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Abgerufen von: <https://goldbook.iupac.org/> [am 22.06.2018].

- [88.] Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation (ICH), **2005**. Abgerufen von: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf [am 22.06.2018].
- [89.] Peters, F.T.; Hartung, M.; Herbold, M.; Schmitt, G.; Daldrup, T.; Mußhoff, F. Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. *Toxichem Krimtech*, **2009**, 76(3), 185-208.
- [90.] Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chavez-Eng, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75(13), 3019-3030.
- [91.] Fawcett, T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters*, **2006**, 27(8), 861-874.
- [92.] Moffat, A.C.; Osselton, M.D.; Widdop, B.; Watts, J. Clarke's analysis of drugs and poisons. London: *Pharmaceutical Press*; **2011**.
- [93.] de Jager, A.D.; Warner, J.V.; Henman, M.; Ferguson, W.; Hall, A. LC-MS/MS method for the quantitation of metabolites of eight commonly-used synthetic cannabinoids in human urine - an Australian perspective. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2012**, 897, 22-31.
- [94.] Dowling, G.; Regan, L. A method for CP-47,497 a synthetic non-traditional cannabinoid in human urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2011**, 879(3-4), 253-259.
- [95.] Moran, C.L.; Le, V.H.; Chimalakonda, K.C.; Smedley, A.L.; Lackey, F.D.; Owen, S.N.; Kennedy, P.D.; Endres, G.W.; Ciske, F.L.; Kramer, J.B.; Kornilov, A.M.; Bratton, L.D.; Dobrowolski, P.J.; Wessinger, W.D.; Fantegrossi, W.E.; Prather, P.L.; James, L.P.; Radomska-Pandya, A.; Moran, J.H. Quantitative measurement of JWH-018 and JWH-073 metabolites excreted in human urine. *Analytical Chemistry*, **2011**, 83(11), 4228-4236.
- [96.] Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.B.; Chen, X.H.; Liu, H.F.; Huestis, M.A. Qualitative confirmation of 9 synthetic cannabinoids and 20 metabolites in human urine using LC-MS/MS and library search. *Analytical Chemistry*, **2013**, 85(7), 3730-3738.
- [97.] Yanes, E.G.; Lovett, D.P. High-throughput bioanalytical method for analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine using salting-out sample preparation and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2012**, 909, 42-50.
- [98.] Chimalakonda, K.C.; Moran, C.L.; Kennedy, P.D.; Endres, G.W.; Uzieblo, A.; Dobrowolski, P.J.; Fifer, E.K.; Lapoint, J.; Nelson, L.S.; Hoffman, R.S.; James, L.P.; Radomska-Pandya, A.; Moran, J.H. Solid-phase extraction and quantitative measurement of omega and omega-1 metabolites of JWH-018 and JWH-073 in human urine. *Analytical Chemistry*, **2011**, 83(16), 6381-6388.
- [99.] 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(3), 534-544.
- [100.] Sundström, M.; Pelander, A.; Angerer, V.; Hutter, M.; Kneisel, S.; Ojanperä, I. A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405(26), 8463-8474.
- [101.] Arntson, A.; Ofsa, B.; Lancaster, D.; Simon, J.R.; McMullin, M.; Logan, B. Validation of a novel immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids and metabolites in urine specimens. *Journal of Analytical Toxicology*, **2013**, 37(5), 284-290.
- [102.] Pragst, F.; Balikova, M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*, **2006**, 370(1), 17-49.
- [103.] Goebel, A.; Boehm, M.; Kirchherr, H.; Kühn-Velten, W.N. Simultaneous identification and quantification of synthetic cannabinoids (cannabimimetics) in serum, hair, and urine by rapid and sensitive HPLC tandem mass spectrometry screenings: overview and experience from routine testing. *Laboratoriumsmedizin*, **2013**, 37(4), 167-180.
- [104.] Hutter, M.; Kneisel, S.; Auwärter, V.; Neukamm, M.A. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2012**, 903, 95-101.
- [105.] Kim, J.; In, S.; Park, Y.; Park, M.; Kim, E.; Lee, S. Deposition of JWH-018, JWH-073 and their metabolites in hair and effect of hair pigmentation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405(30), 9769-9778.
- [106.] Salomone, A.; Gerace, E.; D'Urso, F.; Di Corcia, D.; Vincenti, M. Simultaneous analysis of several synthetic cannabinoids, THC, CBD and CBN, in hair by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Method validation and application to real samples. *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, 47(5), 604-610.

2 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Entwicklung LC-MS/MS-basierter Methoden für einen beweissicheren Nachweis aller im Zeitraum von 2014 bis 2017 in Deutschland relevanten SC, beziehungsweise deren Hauptmetaboliten, in humanen Haar- und Urinproben. Auf Grund der hohen Marktdynamik dieser Stoffklasse sollten dabei für beide Verfahren Konzepte für die schnelle Anpassung des zu detektierenden Analytenspektrums und für die damit notwendige Revalidierung etabliert werden.

Da SC in der Regel extensiv verstoffwechselt werden, waren Metabolismusstudien zur Identifizierung der für den Nachweis in Urin geeigneten Hauptmetaboliten integraler Bestandteil der Entwicklung der Urinanalytik. Struktur-Metabolismus-Beziehungen sollten für SC des Valin- und *tert*-Leucin-Typs untersucht werden, um eine zuverlässigere Vorhersage und damit schnellere Identifizierung der geeigneten Hauptmetaboliten dieser bedeutenden neuen Stoffgruppe zu ermöglichen. Darüber hinaus sollten kommerziell verfügbare immunchemische Vortests auf deren Eignung zum Nachweis eines SC-Konsums in Urinproben evaluiert werden.

Neben der Entwicklung eines Verfahrens zur Haaranalytik auf SC sollten die Möglichkeiten und Grenzen der Befundinterpretation hinsichtlich eines Konsumbeweises im Detail untersucht werden.

3 Durchgeführte Studien

Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Veröffentlichungen vorgestellt, die in der vorliegenden Doktorarbeit zusammengefasst wurden (kumulative Dissertation). Die Originalarbeiten sind unter einer gemeinsamen wissenschaftlichen Fragestellung entstanden (siehe Kapitel 2 „Ziele der Arbeit“) und wurden in begutachteten, international anerkannten Fachzeitschriften publiziert. Zu jeder Publikation ist eine detaillierte Aufschlüsselung der individuellen Beiträge aller beteiligten Autoren als Fußnote angegeben.

3.1 Metabolismus und Nachweis durch Urinalysen

In den folgenden Kapiteln werden die durchgeführten Studien vorgestellt, welche sich mit dem *in vitro*- und *in vivo*-Metabolismus SC und dem Nachweis einer SC-Aufnahme in Urinproben beschäftigen. An erster Stelle werden Ergebnisse zu *in vitro*-Untersuchungen der Struktur-Metabolismus-Beziehungen (engl.: *structure-metabolism relationships*) innerhalb der Strukturklasse der Valin- und *tert*-Leucin-Derivate vorgestellt (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2). Anhand zweier ausgewählter Beispiele – „MDMB-CHMICA“ und „5F-MDMB-PICA“ – werden Ergebnisse zu umfassenden *in vitro*- und *in vivo*-Metabolismusstudien sowie der Evaluierung geeigneter Hauptmetaboliten für den Nachweis in Urinproben beschrieben (siehe Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). Darüber hinaus wurde die Biotransformation zweier Substanzen einer weiteren neuen Strukturklasse – den Cumyl-Derivaten – *in vitro* und *in vivo* untersucht (siehe Kapitel 3.1.5). Abschließend wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte LC-MS/MS-Screeningmethode zum Nachweis von SC-Metaboliten in Urinproben im Detail beschrieben und im Vergleich mit kommerziell verfügbaren immunchemischen Nachweisverfahren an einem Kollektiv authentischer Urinproben getestet (siehe Kapitel 3.1.6).

3.1.1 Struktur-Metabolismus-Beziehungen synthetischer Cannabinoide des Valin- und *tert*-Leucin-Typs

Veröffentlicht in:

Forensic Toxicology, 2019, vor dem Druck. (DOI: 10.1007/s11419-018-00462-x)

Autoren*:

Florian Franz, Hanna Jechle, Maurice Wilde, Verena Angerer, Laura M. Huppertz, Mitchell Longworth, Michael Kassiou, Manfred Jung und Volker Auwärter.

In der folgenden Studie wird mit Hilfe humaner Lebermikrosomen und hochauflösender Massenspektrometrie erstmals systematisch der Zusammenhang zwischen den chemisch-strukturellen Eigenschaften von SC des Valin- und *tert*-Leucin-Typs (n=32) und deren Phase-I-Biotransformation (Struktur-Metabolismus-Beziehungen) untersucht. Abbildung 3-1 zeigt die gemeinsame Grundstruktur der Substanzen mit den variablen Strukturelementen (X_1 , X_2 , X_3 , X_4). Durch den Vergleich verschiedener Strukturanaloga mit den Intensitäten ihrer Phase-I-Metaboliten wurden Struktur-Metabolismus-Beziehungen identifiziert. Die endständige funktionelle Gruppe der Brückenreste (X_1 = Amid vs. Methyl ester), die zusätzliche Methylgruppe der Brückenreste in Position X_2 (Valin vs. *tert*-Leucin), die Art der Kernstruktur (Indol vs. Indazol) (X_3 = C vs. N) sowie die Art der Seitenkette (X_4 = Cyclohexylmethyl vs. Pentyl vs. 5-Fluorpentyl vs. 4-Fluorbenzyl) zeigten verschiedene Einflüsse auf das Ausmaß der metabolischen Dehalogenierung, Dehydrierung, Bildung von Dihydrodiolen, Hydrolyse der Amidbrücke, Hydrolyse der endständigen funktionellen Gruppe, Hydroxylierung und *N*-Desalkylierung. Die Ergebnisse können zur Vorhersage relevanter Phase-I-Hauptmetaboliten weiterer Vertreter dieser neuen Strukturklasse herangezogen werden und

ermöglichen somit potentiell eine schnellere Anpassung von Screening-Methoden zum Nachweis von SC-Metaboliten in Urinproben. Darüber hinaus könnten die erhobenen Daten genutzt werden um beim Wirkstoffdesign gezielt die metabolische Stabilität zu beeinflussen. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Strukturklassen kann generell in Betracht gezogen werden, bedarf jedoch im Einzelnen weitergehender Untersuchungen. Ebenso konnte ein bislang wenig genutztes Potenzial des humanen Lebermikrosomen-Assays für systematische Struktur-Metabolismus-Studien aufgezeigt werden, das im Vergleich zur Verwendung mehrerer rekombinanter Enzyme finanzielle und zeitliche Einsparmöglichkeiten bietet.

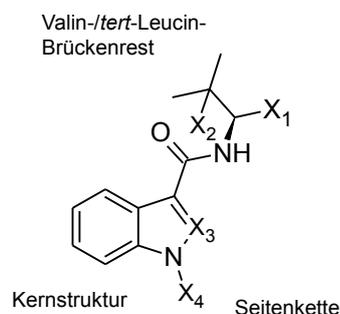


Abbildung 3-1. Grundstruktur der untersuchten Valin-/*tert*-Leucin-SC mit den variablen Strukturelementen (X_1 , X_2 , X_3 , X_4).

*Autorenbeiträge: [Florian Franz](#) erstellte das Studiendesign, unterstützte Hanna Jechle bei der Durchführung des HLM-Assays, entwickelte die LC-HRMS-Methode, wertete die LC-HRMS-Daten aus, interpretierte die LC-HRMS-Daten und erstellte das Manuskript. [Hanna Jechle](#) führte die Inkubation der Substanzen mit humanen Lebermikrosomen durch und unterstützte Florian Franz bei der Auswertung der LC-HRMS-Daten. [Maurice Wilde](#) und [Laura M. Huppertz](#) unterstützten Florian Franz bei der Entwicklung der HRMS-Methode und der computerbasierten Prozessierung der LC-HRMS-Daten. [Verena Angerer](#) erwarb die zu untersuchenden Substanzen und führte die analytische Charakterisierung nicht-zertifizierter Standards durch. [Mitchell Longworth](#) und [Michael Kassiou](#) synthetisierten die kommerziell nicht verfügbaren Substanzen und führten deren analytische Charakterisierung durch. [Manfred Jung](#) initiierte die Studie durch die Idee einer systematischen Studie zu Struktur-Metabolismus-Beziehungen. [Volker Auwärter](#) unterstützte Florian Franz bei der Ausarbeitung des Studiendesigns und der Interpretation der Daten. [Alle Autoren](#) unterstützten Florian Franz bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Franz, F.; Jechle, H.; Wilde, M.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Longworth, M.; Kassiou, M.; Jung, M.; Auwärter, V. Structure-metabolism relationships of valine and *tert*-leucine-derived synthetic cannabinoid receptor agonists: a systematic comparison of the *in vitro* phase I metabolism using pooled human liver microsomes and high-resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 2019, vor dem Druck. (DOI: 10.1007/s11419-018-00462-x)

Einzusehen unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11419-018-00462-x>

3.1.2 AB-CHMFUPPYCA-Stellungsisomere: *In vitro*-Phase-I-Biotransformation und thermische Stabilität

Veröffentlicht in:

Drug Testing and Analysis, 2017, 9(2), 311-316. (DOI: 10.1002/dta.1950)

Autoren*:

Florian Franz, Verena Angerer, Simon D. Brandt, Gavin McLaughlin, Pierce V. Kavanagh, Björn Moosmann und Volker Auwärter.

Die untersuchten SC (3,5-AB-CHMFUPPYCA und 5,3-AB-CHMFUPPYCA) (Abbildung 3-2) zählen chemisch-strukturell zu einer neuen Strukturklasse, zu der nur wenige Daten in der Literatur verfügbar sind. Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Kernstruktur ((4-Fluorphenyl)-pyrazol) fallen diese Substanzen bislang nicht unter das Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetz (NpSG) und könnten daher in Zukunft eine hohe Relevanz auf dem deutschen Drogenmarkt erlangen. Mit Hilfe humaner Lebermikrosomen und Tandem-Massenspektrometrie wurden in der folgenden Studie die Phase-I-Biotransformationen beider Isomere untersucht. Zusätzlich wurde durch Abrauchen von „Joints“ (präpariert mit beiden AB-CHMFUPPYCA-Isomeren) auf relevante Pyrolyseprodukte getestet. Im Phase-I-Metabolismus der beiden Isomere wurden keine bedeutenden Unterschiede festgestellt. Die Hauptmetaboliten wurden jeweils durch Hydroxylierung der Cyclohexylmethyl-Seitenkette gebildet und stellen vielversprechende Zielanalyten für einen Nachweis in Urinproben dar. Beide Substanzen zeigten im Abrauchversuch eine relevante Amidpyrolyse. Das jeweilige Pyrolyseprodukt wurde ebenfalls

metabolisch durch die Hydrolyse der endständigen Amidgruppe gebildet. Die erhobenen Metabolismus-Daten unterstützen forensische Toxikologen bei dem Nachweis einer Substanzaufnahme durch Urinanalysen. Die artefaktische Bildung der Hydrolyse-metaboliten unter Abrauchbedingungen kann für die Befundinterpretation von großer Bedeutung sein, da deren alleiniger Nachweis in biologischen Proben (z. B. Haar) nicht als Beweis für eine systemische Substanzaufnahme gewertet werden kann.

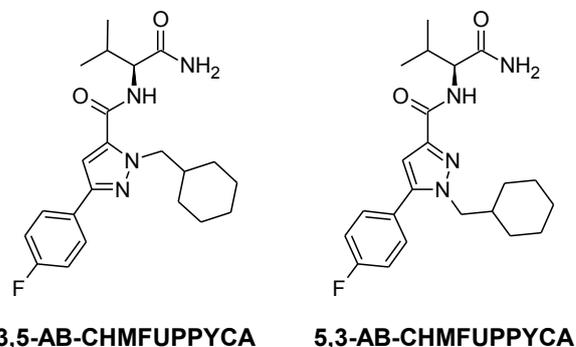


Abbildung 3-2. Chemische Strukturen der Stellungsisomere 3,5-AB-CHMFUPPYCA und 5,3-AB-CHMFUPPYCA.

*Autorenbeiträge: Florian Franz entwickelte die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis der Metaboliten, führte die experimentellen Arbeiten zur *in vitro*- und *in vivo*-Metabolismusstudie und thermischen Stabilität durch, interpretierte die LC-MS/MS-Daten und erstellte zusammen mit Björn Moosmann das Manuskript. Verena Angerer beschaffte das Damianakraut und unterstützte Florian Franz bei der GC-MS-Analytik. Simon D. Brandt, Gavin McLaughlin und Pierce V. Kavanagh synthetisierten die Referenzsubstanzen und führten deren analytische Charakterisierung durch. Björn Moosmann initiierte die Studie auf Vorschlag von Simon D. Brandt, erstellte das Studiendesign, unterstützte Florian Franz bei der Versuchsdurchführung zur thermischen Stabilität und erstellte zusammen mit Florian Franz das Manuskript. Volker Auwärter und die übrigen Autoren unterstützen Florian Franz und Björn Moosmann bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Franz, F.; Angerer, V.; Brandt, S.D.; McLaughlin, G.; Kavanagh, P.V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. *In vitro* metabolism of the synthetic cannabinoid 3,5-AB-CHMFUPPYCA and its 5,3-regioisomer and investigation of their thermal stability. *Drug Testing and Analysis*, 2017, 9(2), 311-316. (DOI: 10.1002/dta.1950)

Einzusehen unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dta.1950>

3.1.3 MDMB-CHMICA: *In vitro*- und *in vivo*-Phase-I-Biotransformation, thermische Stabilität und Nachweis durch Analyse authentischer Urinproben

Veröffentlicht in:

Drug Testing and Analysis, 2017, 9(5), 744-753. (DOI: 10.1002/dta.2049)

Autoren*:

Florian Franz, Verena Angerer, Björn Moosmann und Volker Auwärter.

MDMB-CHMICA (Abbildung 3-3) zählt zu der Gruppe der *tert*-Leucin-SC und ist vermutlich seit September 2014 sowohl in Deutschland als auch in anderen europäischen Ländern in vielen „Legal-High“-Produkten als Wirkstoff enthalten. Seitdem wurde eine Vielzahl von Vergiftungsfällen mit MDMB-CHMICA berichtet. In der folgenden Studie wird die Phase-I-Biotransformation des SC sowohl *in vitro* mit Hilfe humaner Lebermikrosomen als auch *in vivo* durch die Analyse humaner Urinproben untersucht. Insgesamt wurden 31 verschiedene Metaboliten in humanen Urinproben nachgewiesen, wobei alle auch *in vitro* gebildet wurden. Sowohl Hydrolyse der endständigen Methylestergruppe als auch Hydroxylierung der Cyclohexylmethyl-Seitenkette führte zu den Phase-I-Hauptmetaboliten. Mit Hilfe der identifizierten Marker konnte in Urinproben aus der forensisch-toxikologischen Fallarbeit (n = 5717) zwischen Oktober 2014 und November 2015 in 18 % der Fälle (n = 818) eine Aufnahme von MDMB-CHMICA nachgewiesen werden. Für die Interpretation analytischer Befunde ist bedeutend, dass durch die Hydrolyse der endständigen Methylestergruppe oder der Amidbrücke Metaboliten gebildet werden, die auch bei der Biotransformation einiger strukturähnlichen SC (z.B. ADB-CHMICA, BB-22) entstehen können.

Abbrauchversuche (analog zu Kapitel 3.1.2) zeigten eine relevante pyrolytische Spaltung der Amid- und Esterbindung. Die Bildung dieser Pyrolyseprodukte wurde auch durch metabolische Hydrolyse beobachtet. Entsprechend ist der alleinige Nachweis dieser Metaboliten nicht als Beweis für eine systemische MDMB-CHMICA-Aufnahme zu werten. Darüber hinaus wurde mit Hilfe eines cAMP-Assays für MDMB-CHMICA am humanen Cannabinoidrezeptor Typ 1 (CB₁) ein EC₅₀-Wert von 0,14 nM bestimmt, welcher erstmals die hohe Potenz dieser Substanz belegt (vergleiche JWH-018: EC₅₀ = 1,1 nM). Die Ergebnisse der Studie ermöglichen den Nachweis der Substanz in Urinproben mittels LC-MS und helfen bei der korrekten Interpretation analytischer Befunde.

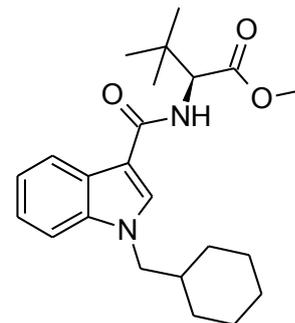


Abbildung 3-3. Chemische Struktur von MDMB-CHMICA ((S)-Konfiguration).

*Autorenbeiträge: Florian Franz initiierte die Studie nach dem ersten Nachweis der Substanz in Serumproben durch Verena Angerer, erstellte das Studiendesign, entwickelte die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis der Metaboliten, führte die experimentellen Arbeiten zur *in vitro*- und *in vivo*-Metabolismusstudie und der thermischen Stabilität durch, interpretierte die LC-MS/MS-Daten und erstellte das Manuskript. Verena Angerer erwarb die zu untersuchenden Substanzen, führte die analytische Charakterisierung nicht-zertifizierter Standards durch, entwickelte die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis in Serumproben und quantifizierte MDMB-CHMICA in authentischen Serumproben. Björn Moosmann bestätigte die molekularen Summenformeln der von Florian Franz identifizierten Metaboliten mittels LC-HRMS und koordinierte die Bestimmung der EC₅₀-Werte, welche von der Firma DiscoverX durchgeführt wurde. Volker Auwärter und die übrigen Autoren unterstützten Florian Franz bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Franz, F.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the highly potent synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, 2017, 9(5), 744-753. (DOI: 10.1002/dta.2049)

Einzusehen unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dta.2049>

3.1.4 5F-MDMB-PICA: *In vitro*- und *in vivo*-Phase-I-Biotransformation und Nachweis durch Analyse authentischer Urinproben

Veröffentlicht in:

Drug Testing and Analysis, 2018, 10(1), 196-205. (DOI: 10.1002/dta.2201)

Autoren*:

Lukas Mogler[#], Florian Franz[#], Daniel Rentsch, Verena Angerer, Georg Weinfurtnr, Mitchell Longworth, Samuel D. Banister, Michael Kassiou, Björn Moosmann und Volker Auwärter.

In der folgenden Studie wird die erstmalige Identifizierung des *tert*-Leucin-SC 5F-MDMB-PICA (Abbildung 3-4) in Kräutermischungen und humanen Proben im Jahr 2016 beschrieben. Es wurde die Phase-I-Biotransformation des SC sowohl *in vitro* mit Hilfe humaner Lebermikrosomen als auch *in vivo* durch die Analyse humaner Urinproben untersucht. Insgesamt wurden 12 verschiedene Metaboliten in humanen Urinproben nachgewiesen, wovon 11 auch *in vitro* gebildet wurden. Phase-I-Hauptmetaboliten wurden durch Hydrolyse der endständigen Methylestergruppe, Hydroxylierung am Indolring und verschiedene metabolische Modifikationen der 5-Fluorpentyl-Seitenkette (Defluorierung, Oxidation, Kettenabbau) gebildet. Zwei der Hauptmetaboliten wurden auch in glucuronidierter Form in Urinproben nachgewiesen. Für die Interpretation analytischer Befunde ist bedeutend, dass durch die Hydrolyse der endständigen Methylestergruppe oder Amidbrücke und durch hydrolytische Defluorierung Metaboliten

gebildet werden, die auch bei der Biotransformation anderer SC (z. B. 5F-ADBICA, 5F-PB-22) entstehen können. Eine Vergleichsmessung zeigte, dass gängige immunchemische Testverfahren 5F-MDMB-PICA-Metaboliten in relevanten Konzentrationen nicht detektieren und daher als hinweisgebende Verfahren nicht geeignet sind. Die Ergebnisse der Studie ermöglichen den massenspektrometrischen Nachweis der Substanz in Drogenzubereitungen und humanen Urinproben und helfen bei der korrekten Interpretation analytischer Befunde.

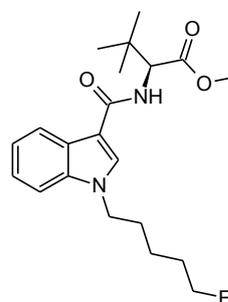


Abbildung 3-4. Chemische Struktur von 5F-MDMB-PICA ((S)-Konfiguration).

#Diese Autoren haben zu gleichen Teilen an der Publikation mitgewirkt (geteilte Erstautorenschaft).

*Autorenbeiträge: Lukas Mogler entwickelte die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis der Metaboliten, führte die experimentellen Arbeiten zum *in vitro*- und *in vivo*-Metabolismus durch, interpretierte die LC-MS/MS-Daten und erstellte zusammen mit Florian Franz das Manuskript. Florian Franz initiierte die Studie, nachdem er zum ersten Mal Metaboliten der Substanz in Urinproben nachgewiesen hatte, erstellte das Studiendesign, besorgte das Referenzmaterial, koordinierte die Immunoassay-Kreuzreaktivitäts-Messung, unterstützte Lukas Mogler bei den experimentellen Arbeiten und der Dateninterpretation und erstellte zusammen mit Lukas Mogler das Manuskript. Daniel Rentsch identifizierte die Substanz in mehreren Kräutermischungen am Institut für Rechtsmedizin in Rostock. Verena Angerer identifizierte die Substanz in Kräutermischungen am Institut für Rechtsmedizin in Freiburg und führte die analytische Charakterisierung nicht-zertifizierter Standards durch. Georg Weinfurtnr führte die Immunoassay-Kreuzreaktivitäts-Messungen im klinisch-chemischen Labor des Bezirkskrankenhauses in Regensburg durch. Mitchell Longworth, Samuel D. Banister und Michael Kassiou synthetisierten die die Substanz 5F-MDMB-PICA und führten deren analytische Charakterisierung durch. Björn Moosmann bestätigte die molekularen Summenformeln der identifizierten Metaboliten mittels LC-HRMS. Volker Auwärter und die übrigen Autoren unterstützen Lukas Mogler und Florian Franz bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Mogler, L.; Franz, F.; Rentsch, D.; Angerer, V.; Weinfurter, G.; Longworth, M.; Banister, S.D.; Kassiou, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 5F-MDMB-PICA in 'legal high' products and human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, 2018, 10(1), 196-205. (DOI: 10.1002/dta.2201)

Einzusehen unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dta.2201>

3.1.5 5F-Cumyl-PINACA und Cumyl-PINACA: *In vitro*- und *in vivo*-Phase-I-Biotransformation und Nachweis durch Analyse authentischer Urinproben

Veröffentlicht in:

Forensic Toxicology, 2019, 37(1), 186-196. (DOI: 10.1007/s11419-018-0451-8)

Autoren*:

Verena Angerer[#], Florian Franz[#], Björn Moosmann, Philippe Bisel und Volker Auwärter.

Im Mittelpunkt der folgenden Studie steht die Strukturaufklärung des neuen „Cumyl-Typ“-SC „5F-Cumyl-PINACA“ (Abbildung 3-5), das in einer neuen Konsumform („C-Liquids“ zum Gebrauch in elektronischen Zigaretten) auf dem europäischen Markt identifiziert wurde. Ferner wurden mittels cAMP-Assay erste Daten zur außergewöhnlich hohen Potenz ($EC_{50} = 0,06 \text{ nM}$) des unfluorierten Analogons „Cumyl-PINACA“ (Abbildung 3-5) am CB_1 -Rezeptor erhoben (vergleiche JWH-018: $EC_{50} = 1,1 \text{ nM}$). Des Weiteren wurden umfangreiche Daten zur *in vitro*- und *in vivo*-Phase-I-Biotransformation beider Stoffe sowie deren Nachweis in humanen Serum- und Urinproben erhoben. Die Hauptmetaboliten beider Substanzen wurden durch Hydroxylierung der *N*-Alkyl-Seitenketten gebildet. Hydrolytische Defluorierung von 5F-Cumyl-PINACA führte zu gemeinsamen Metaboliten mit Cumyl-PINACA. Die Unterscheidung zwischen einer Aufnahme von 5F-Cumyl-PINACA oder Cumyl-PINACA gelang jedoch über den Nachweis von 5F-Cumyl-PINACA-Metaboliten mit intakter 5-Fluoropentyl-Seitenkette, die in vergleichs-

weise hohen Intensitäten in den Urinproben detektiert wurden. In einem kontrollierten Selbstversuch konnte Cumyl-PINACA nach einmaliger oraler Aufnahme von 0,6 mg über 17 Stunden in Serumproben nachgewiesen werden. Cumyl-PINACA-Metaboliten wurden bis zu 8 Tagen nach der Aufnahme in Urinproben des Probanden detektiert. Die Ergebnisse der Studie ermöglichen den Nachweis der Substanzen in Drogenzubereitungen sowie in humanen Serum- und Urinproben und helfen bei der korrekten Interpretation analytischer Befunde.

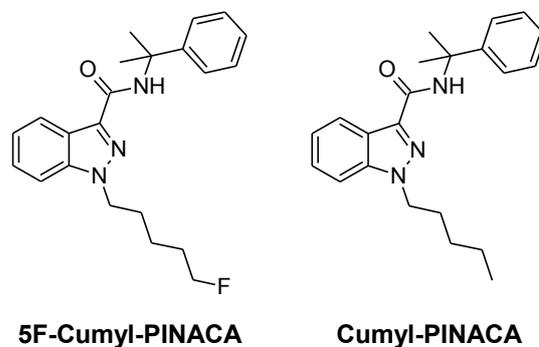


Abbildung 3-5. Chemische Strukturen von 5F-Cumyl-PINACA und Cumyl-PINACA.

[#]Diese Autoren haben zu gleichen Teilen an der Publikation mitgewirkt (geteilte Erstautorenschaft).

*Autorenbeiträge: Verena Angerer initiierte die Studie, nachdem sie die Substanz 5F-Cumyl-PINACA in einem „C-Liquid“ nachgewiesen hatte, erwarb die „C-Liquids“, beschaffte die Cumyl-PINACA-Referenzsubstanz, führte die analytische Charakterisierung mittels GC-MS durch, koordinierte die Identifizierung mittels NMR-Analyse, entwickelte die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis in Serumproben, quantifizierte Cumyl-PINACA in den Serumproben und erstellte zusammen mit Florian Franz das Manuskript. Florian Franz erstellte das Studiendesign für die Metabolismusstudie, entwickelte die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis der Metaboliten, führte die experimentellen Arbeiten zur *in vitro*- und *in vivo*-Metabolismusstudie durch, interpretierte die LC-MS/MS-Daten und erstellte zusammen mit Verena Angerer das Manuskript. Björn Moosmann unterstützte Verena Angerer bei der Identifizierung von 5F-Cumyl-PINACA und koordinierte die Bestimmung der EC_{50} -Werte, welche von der Firma DiscoverX durchgeführt wurde. Philippe Bisel führte die NMR-Analyse durch und interpretierte die NMR-Daten. Volker Auwärter und die übrigen Autoren unterstützen Verena Angerer und Florian Franz bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Angerer, V.; Franz, F.; Moosmann, B.; Bisel, P.; Auwärter, V. 5F-Cumyl-PINACA in 'e-liquids' for electronic cigarettes: comprehensive characterization of a new type of synthetic cannabinoid in a trendy product including investigations on the *in vitro* and *in vivo* phase I metabolism of 5F-Cumyl-PINACA and its non-fluorinated analog Cumyl-PINACA. *Forensic Toxicology*, 2019, 37(1), 186-196. (DOI: 10.1007/s11419-018-0451-8)

Einzusehen unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11419-018-0451-8>

3.1.6 Synthetische Cannabinoide in Urinproben: Nachweis mittels LC-MS/MS und immunchemischer Assays

Veröffentlicht in:

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2017, 55(9), 1375-1384.

(DOI: 10.1515/cclm-2016-0831)

Autoren*:

Florian Franz, Verena Angerer, Hanna Jechle, Melanie Pegoro, Harald Ertl, Georg Weinfurtner, David Janele, Christian Schlögl, Matthias Friedl, Stefan Gerl, Reinhard Mielke, Ralf Zehnle, Matthias Wagner, Björn Moosmann und Volker Auwärter.

In der folgenden Studie wird eine umfassende LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von Metaboliten von 45 SC in humanen Urinproben beschrieben (LOD < 1 ng/mL) und ein Konzept zur fortlaufenden Erweiterung des Analytenspektrums dieser Methode vorgeschlagen. Die Methode wurde angewendet um erstmalig Daten zur Prävalenz des SC-Abusus in forensisch-psychiatrischen Einrichtungen zu erheben und um die diagnostische Leistungsfähigkeit zweier kommerziell erhältlicher Immunoassays unter authentischen Bedingungen zu evaluieren. Bei der Analyse von Urinproben von 549 Patienten aus sieben verschiedenen forensisch-psychiatrischen Kliniken wurden mittels LC-MS/MS 8 % (n=42) der Patienten positiv getestet, wobei sich die Positivrate zwischen den einzelnen

Einrichtungen stark unterschied (0 % – 25 %). Durch die immunchemische Analyse wurde dagegen keine der Proben positiv getestet. In einer zweiten Studie ergab sich für die kombinierte Nutzung beider Immunoassays nach Analyse von 100 positiven und 100 negativen Proben eine diagnostische Leistungsfähigkeit von 51 %. Dieses Ergebnis kann durch eine mangelnde Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper zu neueren SC sowie durch zu hohe Cut-Off-Werte (10 bzw. 20 ng/mL) hinsichtlich der meist niedrigen Metabolitenkonzentrationen in authentischen Urinproben erklärt werden. Die Studie zeigt, dass häufig verwendete Immunoassays auf Grund hoher Falsch-Negativ-Raten nicht als hinweisgebende Verfahren für SC-Abstinenzkontrollen geeignet sind.

*Autorenbeiträge: Florian Franz entwickelte die LC-MS/MS-Screeningmethode zum Nachweis der SC-Metaboliten in Urinproben, erstellte zusammen mit Volker Auwärter und Harald Ertl das Studiendesign für die Vergleichsstudien, koordinierte die Analysen der Urinproben, wertete die LC-MS/MS-Daten aus und erstellte das Manuskript. Verena Angerer erwarb die Referenzstandards, führte die analytische Charakterisierung nicht-zertifizierter Standards durch und erhob die Daten zur SC-Prävalenz im Rahmen der Routineanalytik auf SC in Serumproben. Hanna Jechle führte einen Großteil der Urinanalysen mittels LC-MS/MS durch und unterstützte Florian Franz bei der Auswertung der LC-MS/MS-Daten. Melanie Pegoro leistete Vorarbeiten bei der Entwicklung der LC-MS/MS-Screeningmethode und erhob im Rahmen der Routineanalytik quantitative Daten zu SC-Metaboliten in Urinproben im Zeitraum vor 2014. Harald Ertl erstellte mit Florian Franz und Volker Auwärter das Studiendesign für die Ermittlung der diagnostischen Leistungsfähigkeit der Immunoassays und führte im Labor Lademannbogen in Hamburg die Immunoassay-Analysen durch. Georg Weinfurtner führte die Immunoassay-Analysen der Urinproben aus der Prävalenzstudie im klinisch-chemischen Labor des Bezirkskrankenhauses in Regensburg durch. David Janele, Christian Schlögl, Matthias Friedl, Stefan Gerl, Reinhard Mielke, Ralf Zehnle und Matthias Wagner koordinierten die kontrollierten Urinabgaben der Patienten an den teilnehmenden forensisch-psychiatrischen Kliniken. Björn Moosmann, und die übrigen Autoren unterstützen Florian Franz bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts. Volker Auwärter erstellte zusammen mit Florian Franz und Harald Ertl das Studiendesign und initiierte und koordinierte die Zusammenarbeit mit den forensisch-psychiatrischen Kliniken.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Franz, F.; Angerer, V.; Jechle, H.; Pegoro, M.; Ertl, H.; Weinfurtner, G.; Janele, D.; Schlögl, C.; Friedl, M.; Gerl, S.; Mielke, R.; Zehnle, R.; Wagner, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – an evaluation of the diagnostic efficiency. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2017, 55(9), 1375-1384. (DOI: 10.1515/cclm-2016-0831)

Einzusehen unter: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2017.55.issue-9/cclm-2016-0831/cclm-2016-0831.xml>

3.2 Nachweis durch Haaranalysen

In den folgenden Kapiteln werden die durchgeführten Studien vorgestellt, welche sich mit dem Nachweis SC und deren Metaboliten in Haarproben beschäftigen. Der erste Aufsatz stellt eine umfassende Methode zur semiquantitativen Analyse von Haarproben vor und diskutiert detailliert die Befunde aus der Untersuchung authentischer Proben über einen mehrjährigen Zeitraum (siehe Kapitel 0). In der zweiten Publikation wurde anhand eines Fallbeispiels untersucht, ob der Nachweis SC und deren Metaboliten einen Rückschluss auf das Konsumverhalten des Probanden zulässt, wobei erhebliche Einschränkungen bezüglich der Befundinterpretation aufgezeigt wurden (siehe Kapitel 3.2.2).

3.2.1 Synthetische Cannabinoide in Haarproben

Veröffentlicht in:

Analytica Chimica Acta, 2018, 1006, 61-73. (DOI: 10.1016/j.aca.2017.12.029)

Autoren*:

Florian Franz, Hanna Jechle, Verena Angerer, Melanie Pegoro, Volker Auwärter und Merja A. Neukamm

In der folgenden Studie wurde eine umfassende semiquantitative Methode zum Nachweis 72 relevanter SC in Haarproben validiert (LLOQ = 0,5 – 5,0 pg/mg). Für die fortlaufende Anpassung des Analytenspektrums wurde ein pragmatischer Ansatz hinsichtlich der erforderlichen Revalidierung vorgestellt und diskutiert. Dabei erwies sich die Teil-Revalidierung als angemessener Kompromiss zwischen Reduzierung des experimentellen Aufwands und ausreichender Kontrolle der Leistungsparameter der Methode. Die Analyse von 294 authentischen Haarproben ergab eine Positiv-Rate von 55 % (163 Fälle positiv auf SC) und stellt damit den bisher größten verfügbaren semiquantitativen Datensatz zu SC in Haaren dar. Insgesamt wurden 52 verschiedene SC in einem breiten Konzentrationsbereich (< 1,0 – ca. 5.700 pg/mg) in Haarproben nachgewiesen, wobei bis zu 17 verschiedene SC in einer Haarprobe

detektiert wurden. Der zeitliche Vergleich mit den in Serumproben nachgewiesenen SC deutet darauf hin, dass einige SC sehr lange in Haarproben nachweisbar sind. Im Kontext mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft wurde diskutiert, dass ein SC-Befund in Haaren nicht als Beweis für eine systemische Aufnahme der Substanzen herangezogen werden kann und es wurde auf weitere Einschränkungen bei der Befundinterpretation hingewiesen. Für eine grobe Einordnung der SC-Konzentrationen in dem vorgestellten Kollektiv wurden die Kategorien „passive bzw. länger zurückliegende Exposition“ (unteres 75 %-Perzentil), „Hinweis auf intensive Exposition“ (oberes 25 %-Perzentil) und „starke/kürzliche Exposition“ (Werte oberhalb des höchsten Kalibrators (150 pg/mg)) vorgeschlagen. Die erhobenen Daten können für die Analyse und Interpretation von SC-Befunden in Haarproben hilfreich sein.

*Autorenbeiträge: Florian Franz entwickelte die LC-MS/MS-Methode zum Nachweis SC in Haarproben, erstellte zusammen mit Hanna Jechle und Merja A. Neukamm den Validierungsplan, führte zusammen mit Hanna Jechle die Validierung durch, erstellte mit Volker Auwärter ein Konzept für die Revalidierung, führte mit Hanna Jechle die Revalidierung durch und erstellte das Manuskript. Hanna Jechle führte zusammen mit Florian Franz die Validierung und Revalidierung der analytischen Methode durch, wobei sie den überwiegenden Teil der Validierungsversuche und der Datenauswertung bewältigte. Verena Angerer erwarb die Referenzstandards, führte die analytische Charakterisierung nicht-zertifizierter Standards durch, war zuständig für die Wartung des LC-MS/MS-Gerätes sowie der Analysemethode und erhob die Daten zur SC-Prävalenz im Rahmen der Routineanalytik auf SC in Serumproben. Melanie Pegoro leistete Vorarbeiten bei der Entwicklung der LC-MS/MS-Methode und erhob im Rahmen der Routineurinanalytik quantitative Daten zu SC in Haarproben in den Jahren 2012 und 2013. Volker Auwärter erstellte zusammen mit Florian Franz das Konzept für die Revalidierung. Merja A. Neukamm initiierte die Studie im Rahmen der notwendigen Methodenvvalidierung, erstellte mit Florian Franz und Hanna Jechle den Validierungsplan und erhob im Rahmen der Routineanalytik quantitative Daten zu SC in Haarproben in den Jahren 2014-2016. Alle Autoren unterstützen Florian Franz bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Franz, F.; Jechle, H.; Angerer, V.; Pegoro, M.; Auwärter, V.; Neukamm, M.A. Synthetic cannabinoids in hair – pragmatic approach for method updates, compound prevalences and concentration ranges in authentic hair samples. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1006, 61-73. (DOI: 10.1016/j.aca.2017.12.029)

Einzusehen unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267017314526>

3.2.2 Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Haarproben

Veröffentlicht in:

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 408(13), 3445-3452.

(DOI: 10.1007/s00216-016-9422-2)

Autoren*: Florian Franz, Verena Angerer, Maren Hermanns-Clausen, Volker Auwärter und Björn Moosmann

Die folgende Pilotstudie beschäftigt sich mit der Frage, ob der Nachweis verschiedener Metaboliten SC in Haarproben als Beweis für eine systemische Substanzaufnahme herangezogen werden kann. In der Haarsträhne einer Entzugspatientin mit einer schweren SC-Abhängigkeit wurden unter anderem die SC AB-CHMINACA und 5F-PB-22 (Abbildung 3-6) sowie einige ihrer Hauptmetaboliten nachgewiesen. Alle Substanzen zeigten eine ähnliche Verteilung über die Haarsträhne und wurden auch in distalen Haarsegmenten nachgewiesen, die in einem Zeitraum gewachsen sein mussten, welcher deutlich vor der Verfügbarkeit dieser SC auf dem Drogenmarkt lag. Durch Abrauchexperimente (analog zu Kapitel 3.1.2) wurde bewiesen, dass die Amid- und Esterhydrolysemetaboliten auch als Artefakte in relevanten Mengen pyrolytisch gebildet werden können. Diese können potenziell mit dem Nebenstromrauch als Kontamination auf die Haaroberfläche gelangen. Zusätzlich wurde nach externer Kontamination von Haaren mit den Muttersubstanzen gezeigt, dass alle nachgewiesenen Metaboliten auch als Abbauprodukte in der Haarmatrix in relevanten Mengen gebildet werden. Für die Reaktionen wurde eine Zeit- und

Temperaturabhängigkeit festgestellt. Neben der Hydrolyse von relativ labilen Amid- und Esterbindungen trat auch die hydrolytisch Spaltung der Fluor-Kohlenstoff-Bindung bei 5F-PB-22 auf, für die eine Art katalytische Wechselwirkung mit bislang nicht identifizierten Bestandteilen der Haarmatrix (z. B. Melanin-Spezies) angenommen wird. Die Ergebnisse weisen auf eine potentielle, gegebenenfalls sehr praxisrelevante Einschränkung der generellen Aussagekraft von Metabolitenbefunden in Haaranalysen hin. Die Eignung eines Metaboliten für den Beweis einer systemischen Substanzaufnahme muss daher unter Berücksichtigung der verschiedenen Bildungs- und Einlagerungsmechanismen sorgfältigen geprüft werden.

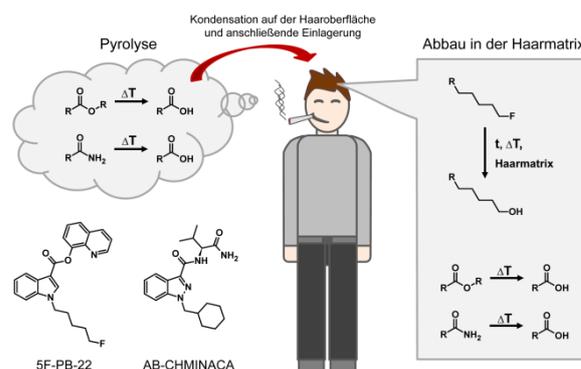


Abbildung 3-6. Graphische Zusammenfassung.

*Autorenbeiträge: Florian Franz erstellte zusammen mit Björn Moosmann das Studiendesign, führte die experimentellen Arbeiten zu den Stabilitätsversuchen durch, führte die Analyse der Proben aus den Stabilitätsversuchen und der authentischen Haarprobe durch, interpretierte die Analysendaten und erstellte zusammen mit Björn Moosmann das Manuskript. Verena Angerer initiierte die Studie, nachdem Sie die Probe und die Falldaten erhalten hatte, erwarb die Referenzstandards und führte die analytische Charakterisierung nicht-zertifizierter Standards durch. Maren Hermanns-Clausen stellte die authentische Haarprobe und die Falldaten zur Verfügung. Volker Auwärter und die übrigen Autoren unterstützen Florian Franz und Björn Moosmann bei der finalen Ausarbeitung des Manuskripts. Björn Moosmann erstellte mit Florian Franz das Studiendesign, stellte sich als Proband für den „Kontaminationsversuch“ zur Verfügung, unterstützte Florian Franz bei der Interpretation der Daten und erstellte mit Florian Franz das Manuskript.

Aufgrund urheberrechtlicher Bestimmungen ist die Originalveröffentlichung nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.

Originalveröffentlichung:

Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Auwärter, V.; Moosmann B. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair – proof of consumption or false friends for interpretation? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(13), 3445-3452. (DOI: 10.1007/s00216-016-9422-2)

Einzusehen unter: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-016-9422-2>

4 Abschließende Nachbetrachtung

Im folgenden Kapitel wird kritisch überprüft, inwiefern die definierten Ziele (siehe Kapitel 2) durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien (siehe Kapitel 3) erreicht werden konnten. Darüber hinaus wird der Stand der Wissenschaft zum Zeitpunkt der abgeschlossenen Arbeit zusammengefasst und im Kontext mit den präsentierten Ergebnissen diskutiert. Aus dieser Nachbetrachtung werden Ansatzpunkte für weitere Studien abgeleitet, wodurch ein Ausblick auf mögliche Weiterentwicklungen des Forschungsgebietes gegeben wird.

4.1 Trend des „Spice-Phänomens“

Seit 2014 wurden der EMCDDA 76 neue SC und zahlreiche Vergiftungs- und Todesfälle im Zusammenhang mit einem SC-Konsum gemeldet ^[1]. Hinsichtlich der Konsummotivation und Prävalenz eines SC-Konsums haben sich im Zeitraum dieser Arbeit kaum Änderungen abgezeichnet. Beispielsweise ergab eine Befragung unter 15-18 jährigen Schülern in Frankfurt am Main im Jahr 2016 eine ähnliche Lebenszeitprävalenz (6 %) ^[2] für einen SC-Konsum wie die vergleichbare Studie im Jahr 2013 (5 %) ^[3]. Zudem wurde in Kapitel 3.1.6 am Beispiel von forensisch-psychiatrischen Kliniken gezeigt, dass die Prävalenz in bestimmten Teilpopulationen deutlich höher liegen kann. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurde bei 8 % von 549 Patienten aus insgesamt sieben verschiedenen Einrichtungen eine SC-Aufnahme nachgewiesen. Dabei wurden in einer Klinik sogar 25 % der Patienten positiv getestet. Die Relevanz dieser Wirkstoffklasse für die klinische und forensische Toxikologie ist dementsprechend nach wie vor hoch und die hohen Anforderungen an die Analytik sind unverändert.

4.2 Chemisch-strukturelle Entwicklungen

Neben einigen exotischen Strukturen, die kaum Verbreitung auf dem NPS-Markt gefunden haben, finden sich bestimmte neue Strukturmerkmale häufiger unter den seit Anfang 2014 gemeldeten SC. So verfügen 31 (41 %) der neuen Substanzen über einen von Valin bzw. *tert*-Leucin abgeleiteten Brückenrest. Hinsichtlich der Stereochemie dieser Strukturklasse finden sich in der neueren Literatur weitere Hinweise, welche die Annahme stützen, dass überwiegend die (S)-Enantiomere der Substanzen auf dem Markt verfügbar sind ^[4-7]. Mit den neuen „Valin/*tert*-Leucin“-SC kamen ebenfalls zum ersten Mal Substanzen mit 4-Fluorbenzyl- und Cyclohexylmethyl-Seitenketten auf den Markt (z. B. „AB-FUBINACA“ und „MDMB-CHMICA“). Dies führte dazu, dass einige „ältere“ Substanzen als Derivate mit den neuen Seitenketten vermarktet wurden (Abbildung 4-1).

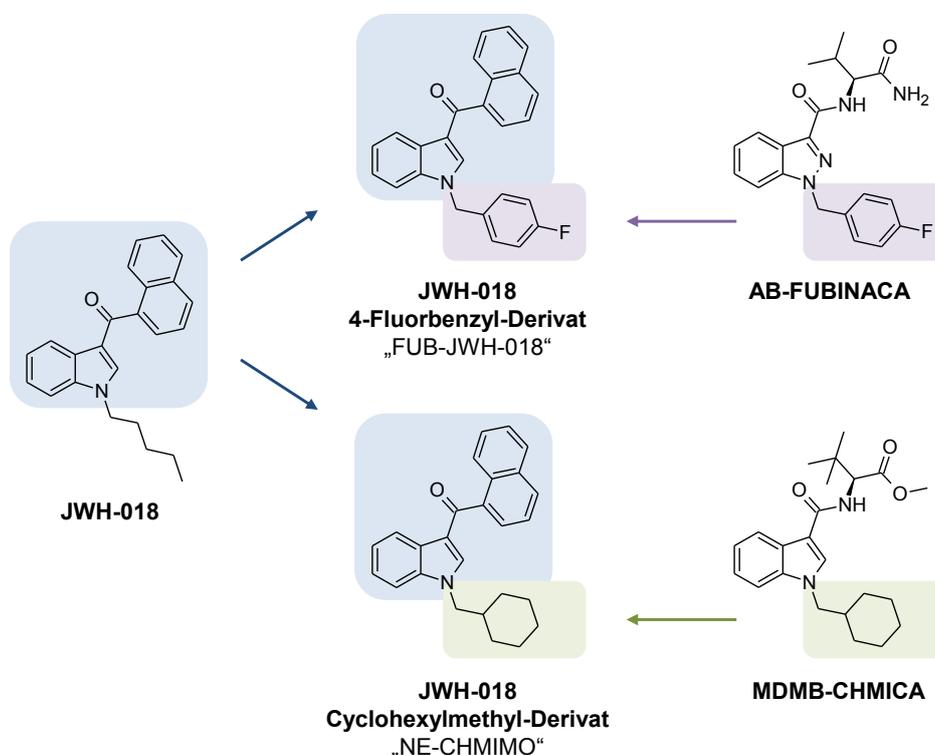
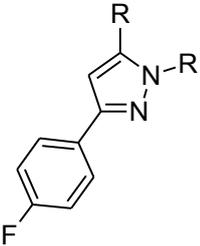
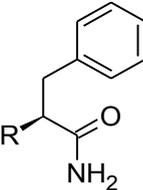
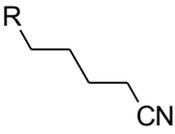
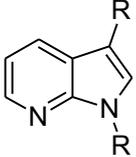
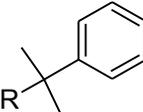
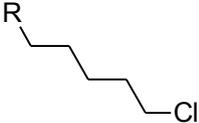
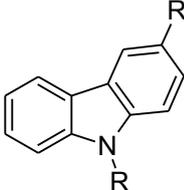
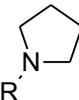
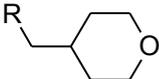
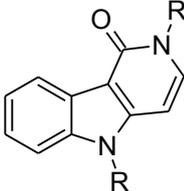
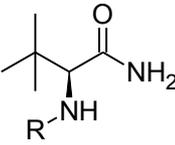
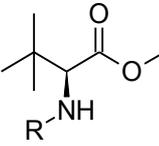
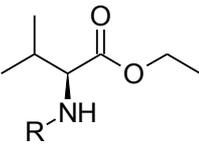
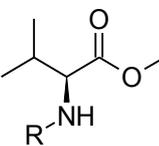


Abbildung 4-1. „Ältere“ synthetische Cannabinoide vom „Naphthoylindol-Typ“ (z. B. JWH-018) erschienen ab 2014 als Derivate mit 4-Fluorbenzyl- und Cyclohexylmethyl-Seitenketten auf dem NPS-Markt. Diese Seitenketten traten erstmals bei neuen synthetischen Cannabinoiden des „Valin/*tert*-Leucin-Typs“ auf (z. B. AB-FUBINACA und MDMB-CHMICA).

Drei (4 %) der neu gemeldeten Substanzen beinhalten eine 3-(4-Fluorphenyl)-pyrazol-1,5-diyl- bzw. 5-(4-Fluorphenyl)-pyrazol-1,3-diyl-Kernstruktur („Pyrazole“). Der neu eingeführte Cumyl-Brückenrest findet sich insgesamt bei 11 (14 %) der neu gemeldeten SC. Die Einführung von 4-Cyanbutyl- (n = 2, 3 %), 5-Chlorpentyl- (n = 4, 5 %) und Tetrahydropyran-4-ylmethyl-Seitenketten (n = 2, 3 %), 1-Amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl- (n = 4, 5 %), Pyrrolidin-1-yl- (n = 2, 3 %) und Valinethylester-Brückenresten (n = 2, 3 %) sowie von 7-Azaindol-1,3-yl- (n = 3, 4 %), Carbazol-3,9-diyl- (n = 4, 5 %) und γ -Carbolin-1-on-2,5-yl-Kernstrukturen (n = 2, 3 %) stellen weitere interessante strukturelle Weiterentwicklungen dar. Besonders die neuen Kernstrukturen haben große Relevanz für den deutschen Markt, da sie, wie die „Pyrazol“-Kernstrukturen, derzeit nicht von der Stoffgruppendefinition für SC des NpSG eingeschlossen sind und damit keiner gesetzlichen Kontrolle unterliegen. Tabelle 4-1 fasst die neuen Strukturelemente zusammen, die bei mindestens zwei der seit 2014 neu gemeldeten SC auftraten.

Tabelle 4-1. Neue Strukturelemente, die bei mindestens zwei der seit 2014 der EMDCCA neu gemeldeten synthetischen Cannabinoide auftraten ^[1].

Kernstruktur	Brücke	Brückenrest	Seitenkette
 <p>3-(4-Fluorphenyl)- pyrazol-1,5-diyl</p>	-	 <p>1-Amino-1-oxo-3- phenylpropan-2-yl</p>	 <p>4-Cyanbutyl</p>
 <p>7-Azaindol-1,3-yl</p>	-	 <p>Cumyl</p>	 <p>5-Chlorpentyl</p>
 <p>Carbazol-3,9-diyl</p>	-	 <p>Pyrrolidin-1-yl</p>	 <p>Tetrahydropyran- 4-ylmethyl</p>
 <p>γ-Carbolin-1-on-2,5-yl</p>	-	 <p>(L)-<i>tert</i>-Leucinamid</p>	-
-	-	 <p>(L)-<i>tert</i>-Leucinmethylester</p>	-
-	-	 <p>(L)-Valinethylester</p>	-
-	-	 <p>(L)-Valinmethylester</p>	-

4.3 Nachweis durch Urinalysen

Bereits zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass eine SC-Aufnahme durch Urinalysen nachgewiesen werden kann, aber dies auf Grund der extensiven Biotransformation der Substanzen meist nur indirekt durch den Nachweis der Metaboliten gelingt. Sowohl die Ergebnisse der hier beschriebenen Studien (Kapiteln 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5) als auch Studien anderer Autoren [8-32] haben bestätigt, dass alle bislang untersuchten SC nur über deren Stoffwechselprodukte zuverlässig in Urinproben nachgewiesen werden können. Die Identifizierung der Hauptmetaboliten, welche für einen Nachweis geeignet sind, ist daher nach wie vor die wichtigste Grundlage für den spezifischen Nachweis von SC in Urinproben.

4.3.1 Biotransformation neuer synthetischer Cannabinoide

Neben den hier präsentierten Studien wurde seit 2014 eine Vielzahl weiterer Metabolismusstudien zu SC veröffentlicht. Die überwiegende Anzahl der Untersuchungen wurden mit humanen Lebermikrosomen [8, 11, 12, 16, 18, 19, 23, 26, 27, 29-31, 33-54], humanen Urinproben [8, 9, 11-24, 26-30, 35, 52, 54-57], humanen Hepatozyten [11, 31, 33-35, 37, 40, 41, 47, 57-67] und rekombinanten Enzymen [12, 38, 39, 42-44, 48, 49, 51, 56, 68] durchgeführt. Es wurden aber auch Studien mit *Cunninghamella elegans* [69, 70], Ratten-Lebermikrosomen [40, 41, 71], Ratten-Hepatozyten [40, 41, 47, 65], Leberschnitten von Ratten [72], Blutproben von Ratten [40, 41], Urinproben von Ratten [17, 40, 41, 71, 73], biologischen Proben von Schweinen [49], humanen Lungenmikrosomen [51], humanem Lebercytosol [39], der humanen Hepatoma-Zelllinie HepaRG [20] und humanen Serumproben [24, 32, 74] sowie *in silico*-Berechnungen [57, 60, 65, 72] beschrieben.

4.3.1.1 Phase-I-Metabolismus

Im Folgenden soll der aktuelle Stand der Forschung zur Phase-I-Biotransformation von neuen SC mit Bezug auf die neuen chemischen Strukturelemente zusammengefasst und diskutiert werden.

Brückenreste. Ein Großteil der seit 2014 veröffentlichten Metabolismusstudien beschäftigt sich mit der Biotransformation verschiedener „Valin-*tert*-Leucin“-SC [12-14, 21, 30, 33, 34, 45, 50, 51, 55, 57-59, 65, 75-77], was die große Bedeutung dieser Strukturklasse unterstreicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass innerhalb dieser Strukturklasse – zusätzlich zu den bereits bekannten metabolischen Reaktionen (siehe Kapitel 1.4.3) – die Hydrolyse der endständigen Amid- bzw. Methylsterfunktion von großer Bedeutung ist (Kapitel 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4). Da durch die terminale Hydrolyse gemeinsame Metaboliten der Amid- und Esteranaloga gebildet werden (Abbildung 4-2), ist diese Reaktion für die Interpretation von analytischen Befunden in Urinproben von großem Interesse.

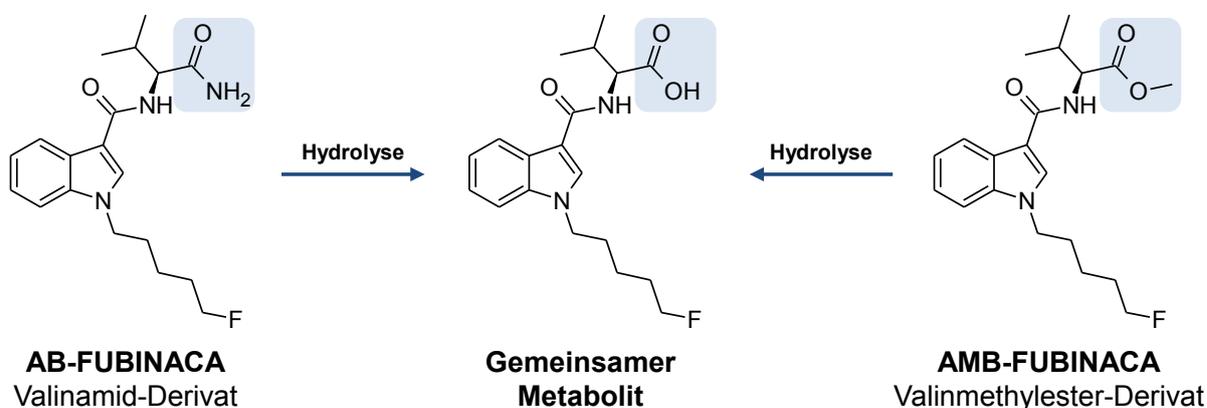


Abbildung 4-2. Bildung gemeinsamer Metaboliten durch enzymatische Hydrolyse der endständigen Amid- und Methylsterfunktion von synthetischen Cannabinoiden am Beispiel der Strukturanaloga AB-FUBINACA und AMB-FUBINACA.

Entsprechend der in Kapitel 3.1.1 identifizierten Struktur-Metabolismus-Beziehungen ist der Einfluss dieses Stoffwechselweges jedoch stark von der Kombination verschiedener Strukturmerkmale der einzelnen Substanzen abhängig. Von anderen Autoren wurde bislang nur der Metabolismus einzelner Vertreter dieser Strukturklasse untersucht. Die relativen Intensitäten, mit denen die jeweiligen Hydrolyseprodukte gebildet wurden, stehen jedoch (unabhängig von den verwendeten Modellen) im Einklang mit den eigenen Beobachtungen. Dies untermauert die Gültigkeit der identifizierten Struktur-Metabolismus-Beziehungen und deren Nutzen für die Vorhersage metabolischer Profile. Thomsen *et al.* haben am Beispiel der Substanzen „AB-FUBINACA“ und „AB-PINACA“ gezeigt, dass die Carboxylesterase 1 (CES1) bei der terminalen Amidhydrolyse eine wichtige Rolle spielt ^[61]. Es ist anzunehmen, dass auch die Hydrolyse der terminalen Methylester überwiegend durch die CES1 katalysiert wird. Der wissenschaftliche Beweis dafür wurde jedoch bisher nicht erbracht. Drei (10 %) der seit 2014 neu gemeldeten „Valin/*tert*-Leucin“-SC stellen homologe Derivate mit Ethylestern dar. Bislang liegen noch keine Metabolismusstudien zu diesen Wirkstoffen vor. Da bekannt ist, dass die Aktivität verschiedener Esterasen unter anderem von der Länge der veresterten Alkohole abhängig ist ^[78, 79], sollten die bisherigen Erkenntnisse für diesen Strukturtyp überprüft werden. Die terminale Hydrolyse könnte auch bezüglich der Inaktivierung dieser SC von großer Bedeutung sein. Buchler *et al.* haben für die Substanzen AB-CHMINACA (Patentbezeichnung: Compound 21) und ADB-CHMINACA (Patentbezeichnung: Compound 13) bzw. MDMA-CHMINACA (Patentbezeichnung: Compound 129) in einem GTPγS-Bindungsassay gezeigt, dass die CB₁-Rezeptoraffinitäten der Hydrolyseprodukte (Patentbezeichnungen: Compound 50 und Compound 206) drastisch reduziert sind ^[80]. Eine Studie von Longworth *et al.* zeigte eine signifikant reduzierte CB₁-Rezeptoraktivität des Hydrolyseproduktes von ADB-PINACA verglichen mit der Muttersubstanz im verwendeten FLIPR-Membranpotenzial-Assay ^[81]. Beide Studien deuten darauf hin, dass die terminale Hydrolyse eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung dieser Substanzen spielt. Allerdings steht eine Studie von Canaert *et al.* im Widerspruch zu diesen Ergebnissen, da in dem verwendeten Bioassay ähnliche CB₁-Rezeptoraktivitäten für die Hydrolyseprodukte von AB-CHMINACA und ADB-CHMINACA gemessen wurden im Vergleich zu den Muttersubstanzen ^[82]. Möglicherweise sind die widersprüchlichen Messergebnisse auf die Verwendung unterschiedlicher Messverfahren unter nicht vergleichbaren Bedingungen zurückzuführen. Eine systematische Untersuchung zu diesem Thema könnte nützliche Daten für die toxikologische Interpretation liefern. Obwohl es plausibel erscheint, dass überwiegend die (*S*)-Enantiomere der „Valin/*tert*-Leucin“-SC auf dem Markt verfügbar sind, muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen nicht notwendigerweise für die jeweiligen (*R*)-Enantiomere gültig sind. Es scheint daher allgemein sinnvoll die absolute Konfiguration chiraler SC in Drogenzubereitungen zu bestimmen und gegebenenfalls eine systematische Untersuchung der Unterschiede in der Biotransformation beider Konfigurationsformen durchzuführen.

Kapitel 3.1.5 zeigt, dass die Einführung von Cumyl-Brückenresten zwar die Potenz der Wirkstoffe erhöhen kann, aber für die Biotransformation dieser Stoffe keine neuen Stoffwechselwege zu berücksichtigen sind. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren, die sich mit der Biotransformation unterschiedlicher Substanzen dieses Strukturtyps beschäftigt haben ^[8, 23, 26, 40, 53]. Anders verhält es sich mit der Verstoffwechslung von Substanzen mit Pyrrolidin-1-yl-Brückenresten. Am Beispiel der Substanz „5F-PY-PICA“ ([1-(5-Fluorpentyl)-1*H*-indol-3-yl](pyrrolidin-1-yl)methanon) haben Mardal *et al.* gezeigt, dass der Pyrrolidin-Ring einer metabolischen Ringöffnung nach Oxidation in α -Position zum Stickstoff und anschließender *N*-Desalkylierung unterliegt (Abbildung 4-3) ^[47].

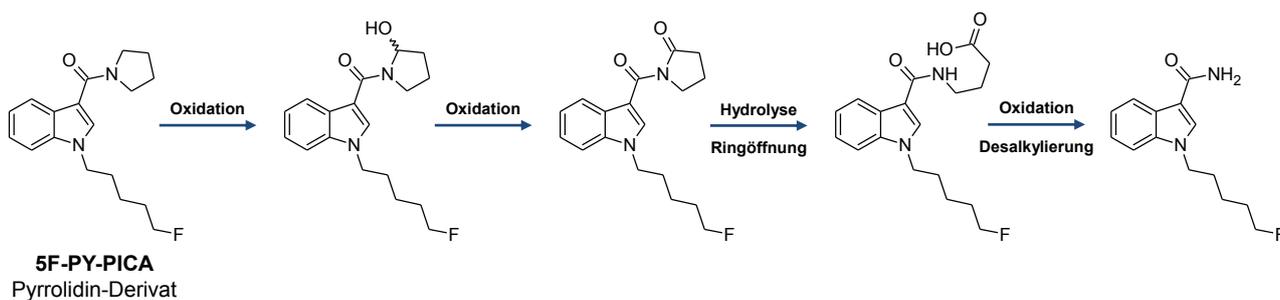


Abbildung 4-3. Im *in vitro*-Versuch mit Hepatozyten führte die mehrfache enzymatische Oxidation am Pyrrolidin-Brückenrest des synthetischen Cannabinoids 5F-PY-PICA zur Ringöffnung durch Hydrolyse und zur *N*-Desalkylierung [47].

Diese Studie zeigt, wie wichtig es ist, die möglichen Stoffwechselwege von Substanzen mit neuen Strukturmerkmalen detailliert zu untersuchen. Zu den neuen Substanzen mit 1-Amino-1-oxo-3-phenylpropan-2-yl-Brückenrest liegen aktuell noch keine Daten vor. Es bleibt zu hoffen, dass entsprechende Metabolismusstudien diese Lücke bald schließen werden.

Brücken. Im Wesentlichen sind unter den neu gemeldeten SC die bereits bekannten Carbonyl- ($n = 13$, 17 %), Carboxamido- ($n = 49$, 64 %) und Carboxylester-Brücken ($n = 11$, 14 %) vertreten (Tabelle 1-1, Seite 6). Während zu Beginn dieser Arbeit schon einige Metabolismusstudien zu verschiedenen Substanzen mit Carbonyl-Brücken vorlagen, die zeigten, dass diese weitestgehend stabil gegenüber metabolischen Reaktionen sind [83-104], gab es nur eine Untersuchung mit einer Amidbrücken-Substanz [105] und keine Untersuchungen zu Substanzen mit Esterbrücken. Wie in den vorgestellten Studien gezeigt wurde, unterliegen Substanzen mit Esterbrücken einer extensiven Hydrolyse (Kapitel 3.1.3, 3.1.4). Dagegen werden Amidbrücken meist nur in geringem Umfang metabolisch hydrolysiert (Kapitel 3.1.1, 3.1.3, 3.1.4) (Abbildung 4-4). Die Untersuchung zu Struktur-Metabolismus-Beziehungen deutet darauf hin, dass Substanzen mit Indazol-Kernstrukturen gegenüber Substanzen mit einer Indol-Grundstruktur einer stärkeren Spaltung der Brückenfunktion unterliegen könnten. Thomsen *et al.* hat auch für die Hydrolyse der Esterbrücken an drei SC („5F-PB-22“, „BB-22“ und „PB-22“) die CES1 als hauptverantwortliches Enzym identifiziert [51]. Welche Enzyme die Hydrolyse der Amidbrücke bei SC katalysiert, ist bislang unbekannt. Eine Studie von Canaert *et al.* hat gezeigt, dass die Hydrolyse der Esterbrücken bei 5F-PB-22 und PB-22 zu Metaboliten führt, die keine relevante CB₁-Rezeptoraktivität besitzen [106]. Dies deutet darauf hin, dass die extensive metabolische Hydrolyse von Substanzen mit Esterbrücken von großer Bedeutung für deren pharmakologische Inaktivierung sein könnte. Auch für die Interpretation von Metabolitenbefunden in Urinproben ist diese Reaktion von Relevanz, da verschiedene SC durch die Hydrolyse von Amid- und Esterbrücken dieselben Spaltprodukte bilden können (Abbildung 4-4).

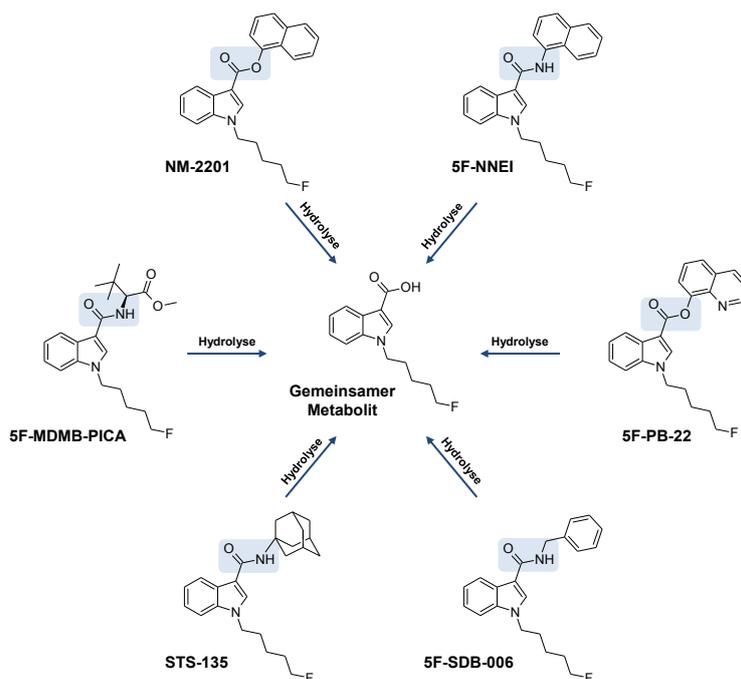


Abbildung 4-4. Durch enzymatische Hydrolyse der Amid- oder Esterbrücken können verschiedene synthetische Cannabinoide einen gemeinsamen Metaboliten bilden.

Kernstrukturen. Die in Kapitel 3.1.2 vorgestellte Studie zu den Stellungsisomeren des „Pyrazol“-SC „AB-CHMFUPPYCA“ ist bislang die einzige zu dieser Strukturklasse, wobei typische metabolische Reaktionen beobachtet wurden, wie sie auch von „Valin-*tert*-Leucin“-SC mit Indol- oder Indazol-Kernstrukturen bekannt sind. Lediglich die Bildung von Dihydrodiolen scheint bei den „Pyrazol“-SC kaum von Relevanz zu sein. Untersuchungen zur Biotransformation von Substanzen mit den „neuen“ Kernstrukturen („7-Azaindol“, „Carbazol“ und „ γ -Carbolin“) waren nicht Bestandteil dieser Arbeit und wurden bislang nur in wenigen Forschungsartikeln behandelt [23, 53, 54]. Da Substanzen mit diesen Strukturelementen derzeit in Deutschland noch keiner rechtlichen Kontrolle unterliegen, ist anzunehmen, dass weitere Vertreter dieser Strukturklassen den NPS-Markt erobern werden. Eine systematische Untersuchung zum tieferen Verständnis der Einflüsse dieser Kernstrukturen auf das metabolische Profil SC ist daher von großer Dringlichkeit.

Seitenketten. Die durchgeführte Studie zu Struktur-Metabolismus-Beziehungen (Kapitel 3.1.1) hat gezeigt, dass die Art der Seitenkette große Auswirkung auf das metabolische Profil eines SC haben kann. Während Alkyl-Seitenketten (5F-Pentyl-, Cyclohexylmethyl- und Pentyl-) einer extensiven Oxidation durch CYP-Enzyme unterliegen, sind 4-Fluorbenzyl-Seitenketten quasi inert gegen metabolische Modifikationen. Zudem wurde für alle Typen von Seitenketten CYP-katalysierte *N*-Desalkylierung beobachtet. Die in Kapitel 3.1.1 vorgestellte Studie hat gezeigt, dass das Ausmaß, mit dem die einzelnen SC einer *N*-Desalkylierung unterliegen, stark von bestimmten chemisch-strukturellen Eigenschaften der Substanzen mitbestimmt wird. Substanzen mit 4-Cyanbutyl-, 5-Chlorpentyl- und Tetrahydropyran-4-yl-methyl-Seitenketten waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Einige Arbeiten anderer Autoren haben den Metabolismus von Substanzen mit 4-Cyanbutyl- [65] und 5-Chlorpentyl- [8, 26, 53] Seitenketten untersucht. Analog zu der bekannten Defluorierung von Substanzen mit 5-Fluorpentyl-Seitenkette (Kapitel 1.4.3) wurde für diese Substanzen eine extensive Substitution der Nitrilgruppe bzw. des Chloratoms durch eine Hydroxygruppe beobachtet. Ebenfalls analog zu 5-Fluorpentyl-SC unterlagen die entsprechenden 4-Hydroxypentyl- bzw. 5-Hydroxypentyl-Seitenketten weiteren Oxidationsreaktionen inklusive oxidativer Verkürzung der Seitenkette (Abbildung 1-8). Chimalakonda *et al.* haben am Beispiel der

Substanz AM-2201 gezeigt, dass die Defluorierungsreaktion oxidativ durch verschiedene CYP-Isoformen katalysiert wird ^[107]. Darüberhinaus haben Holm *et al.* bei weiteren Metabolismusstudien an AM-2201 die Dehalogenierungsreaktion auch an bislang nicht weiter identifizierten NADPH-unabhängigen Enzymen beobachtet ^[39]. Zudem wurde in derselben Studie beschrieben, dass die anschließende Oxidation der endständigen Alkoholgruppe durch cytosolische Alkoholdehydrogenasen zum entsprechenden Aldehyd und schließlich durch Aldehyddehydrogenasen zur Carbonsäure katalysiert wird (Abbildung 1-8, Seite 13). Eine analoge Verstoffwechslung für SC mit 4-Cyanbutyl- und 5-Chlorpentyl-Seitenketten ist zwar nicht belegt, scheint aber wahrscheinlich. Nicht geklärt ist bislang, wie die metabolische Verkürzung der Alkylseitenketten abläuft. Möglicherweise bietet eine weitere Oxidation in α - bzw. β -Position zur gebildeten Carbonsäure mit nachfolgender Elimination – wie sie aus dem Fettsäurestoffwechsel bekannt sind ^[108, 109] – einen Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen. Die *N*-Desalkylierung, Hydrolyse bzw. Substitution von Halogen- oder Nitril-Gruppen und die oxidative Verkürzung der Alkylseitenketten sind von großer Relevanz für die Interpretation von Metaboliten-Befunden bei der Analyse von Urinproben, da die Reaktionen zu gemeinsamen Metaboliten verschiedener SC führen können (Abbildung 4-5 und Abbildung 1-8).

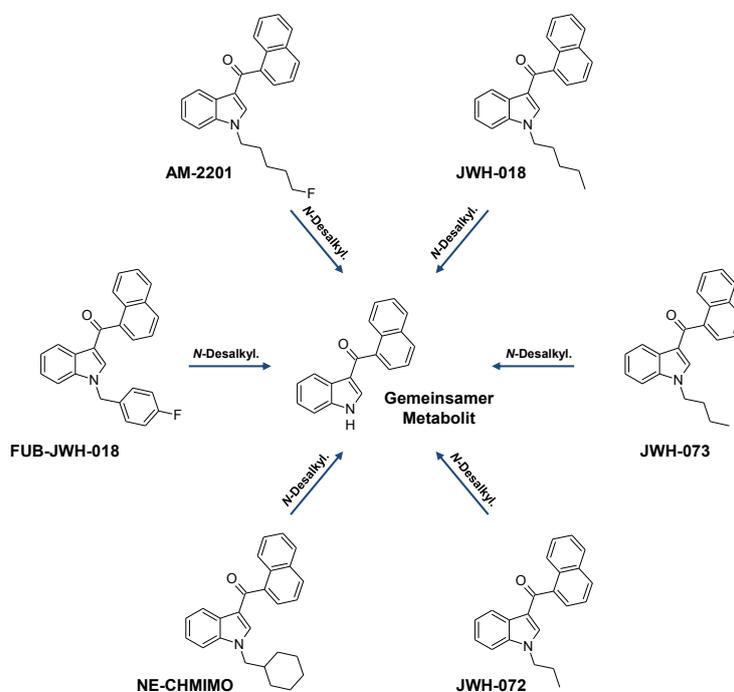


Abbildung 4-5. Durch enzymatische *N*-Desalkylierung (*N*-Desalkyl.) der Seitenkette können verschiedene synthetische Cannabinoide einen gemeinsamen Metaboliten bilden.

4.3.1.2 Phase-II-Metabolismus

Die entwickelte Urin-Screeningmethode beruht auf dem Nachweis von Phase-I-Metaboliten nach enzymatischer Konjugatspaltung mit β -Glucuronidase. Dementsprechend stand die Phase-II-Biotransformation von SC nicht im Fokus dieser Arbeit. Arbeiten anderer Forschungsgruppen haben jedoch bestätigt, dass auch viele Phase-I-Metaboliten der neuen SC Konjugationsreaktionen unterliegen. In den meisten Fällen wurden entsprechende Glucuronide nachgewiesen ^[8, 11-13, 19, 26, 33-35, 37, 40, 55, 58, 60-64, 66, 67, 71, 73]. Wenige Publikationen beschreiben auch den Nachweis von Sulfat- oder Cystein-Konjugaten ^[64, 67]. Dementsprechend ist es empfehlenswert, Urinproben vor der Analyse auf Phase-I-Metaboliten SC einer Konjugatspaltung zu unterziehen.

4.3.2 Humaner Lebermikrosomen-Assay

Im Rahmen dieser Arbeit wurde hervorgehoben, auf welche Weise der einfach durchzuführende und kostengünstige *in vitro*-Metabolimusassay mit humanen Lebermikrosomen erfolgreich eingesetzt werden kann, um die folgenden Herausforderungen bei der Urinanalytik auf SC zu bewältigen.

Nicht-Verfügbarkeit authentischer Urinproben von Konsumenten. Besonders wenn noch keine Urinproben von SC-Konsumenten verfügbar sind, ist man für die Identifizierung geeigneter Zielanalyten auf Kenntnisse aus *in vitro*-Untersuchungen angewiesen. Der Vergleich der Lebermikrosomeninkubationen mit der Analyse von authentischen Urinproben in den Studien 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5 hat gezeigt, dass unter den zwei mikrosomal gebildeten Metaboliten mit den höchsten Intensitäten mindestens einer ebenfalls unter den vier Phase-I-Metaboliten mit der höchsten Intensität in menschlichen Urinproben zu finden ist (nach Konjugatspaltung). Es wird daher empfohlen, mindestens zwei der mikrosomal gebildeten Hauptmetaboliten in eine Urinscreeningmethode aufzunehmen, bis diese Auswahl durch Daten aus Urinuntersuchungen optimiert werden kann.

Nicht-Verfügbarkeit analytischen Referenzmaterials. Der beweissichere Nachweis eines SC-Konsums durch die Analyse biologischer Proben erfordert üblicherweise den Abgleich mit einer Referenzsubstanz. Auch für die Validierung eines Testverfahrens ist Referenzmaterial notwendig, um die notwendigen Kontrollproben herzustellen. Entsprechende Standards für Metaboliten neuer SC sind jedoch meist gar nicht oder nur mit erheblicher zeitlicher Verzögerung kommerziell erhältlich. Wie in den Kapiteln 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben wurde, stellt die Inkubation der wesentlich leichter verfügbaren Muttersubstanzen mit Lebermikrosomen eine pragmatische Zwischenlösung für dieses Problem dar. Auf diese Weise können Signale aus biologischen Proben durch einen Abgleich mit *in vitro* generierten Phase-I-Metaboliten verifiziert werden. Lediglich die Quantifizierung von Metaboliten und die Bestimmung entsprechender Validierungsparameter einer quantitativen Methode bleiben damit weiterhin problematisch. Für eine ökonomisch sinnvolle Isolierung als Referenzmaterial werden die Metaboliten von Lebermikrosomen in zu geringen Mengen gebildet (eigene unveröffentlichte Daten). In den präsentierten Studien konnten insgesamt zwischen 92 und 100 % der in Urinproben detektierten Phase-I-Metaboliten *in vitro* generiert werden, wobei alle der empfohlenen Konsummarker abgedeckt wurden.

Gemeinsame Metaboliten strukturähnlicher Substanzen. Für die Interpretation von Metabolitenbefunden in Urinproben kann es relevant sein, ob der nachgewiesene Metabolit spezifisch für ein bestimmtes SC ist oder von mehreren strukturverwandten SC gebildet werden kann. Die Studien 3.1.3, 3.1.4 und 3.1.5 haben gezeigt, dass durch die Inkubation strukturähnlicher SC gemeinsame Stoffwechselprodukte identifiziert und deren Aussagekraft für die Interpretation von Urinbefunden bewertet werden kann. Zusätzlich zu den in Kapitel 1.4.3 beschriebenen Reaktionen wurde gezeigt, dass auch die metabolische Hydrolyse sowohl von Amid- und Esterbrücken als auch von endständigen Amid- und Esterfunktionen bei „Valin-/tert-Leucin“-Substanzen zu Phase-I-Metaboliten führen kann, die von mehreren SC gebildet werden können (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-4). Eine Arbeit von Thomsen *et al.* hat die Carboxylesterase 1 (CES1) als besonders aktives Enzym bei der Katalyse dieser Reaktionen identifiziert ^[51].

Untersuchung von Struktur-Metabolismus-Beziehungen. In Kapitel 3.1.1 wurden erstmals klare Beziehungen zwischen chemisch-strukturellen Merkmalen der neuen „Valin-/tert-Leucin“-SC und deren Phase-I-Biotransformation mit Hilfe humaner Lebermikrosomen beschrieben. Zusätzlich konnten durch HLM-Inkubationen Unterschiede in der Metabolisierung von AB-CHMFUPPYCA-Stellungsisomeren untersucht werden (Kapitel 3.1.2). Diese Struktur-Metabolismus-Beziehungen

ermöglichen es, gezielter nach vielversprechenden Zielanalyten zu suchen und Testverfahren mit reduziertem experimentellem Aufwand zu optimieren.

Obwohl der humane Lebermikrosomen-Assay gut etabliert ist und für die Urinanalyse auf SC-Metaboliten ein vielseitig einsetzbares Werkzeug darstellt, könnten andere Metabolismusmodelle weitere Verbesserungen bringen. Die durchgeführten Studien haben gezeigt, dass die relativen Intensitäten der mikrosomal gebildeten Metaboliten teilweise deutlich von den relativen Intensitäten der in Urinproben detektierten Phase-I-Hauptmetaboliten abweichen können (nach Konjugatspaltung). Besonders durch mehrfache Reaktionen gebildete Phase-I-Metaboliten können mikrosomal meist nur eingeschränkt generiert werden. Diesbezüglich könnte bei Verwendung der „S9-Fraktion“ oder mit humanen Hepatozyten eventuell ein noch ähnlicheres Metabolitenspektrum erzielt werden verlichen mit humanen Urinproben ^[110-112]. Eine rationale Kosten-Nutzen-Abwägung würde eine umfassende Vergleichsstudie hinsichtlich der vier genannten Gesichtspunkte erfordern. Eine weitere interessante Option wäre die Isolierung biologisch hergestellter Metaboliten neuer SC als Referenzmaterial im µg- bis mg-Maßstab. Einige Machbarkeitsstudien wurden beispielsweise mit Hilfe rekombinanter *Escherichia coli* ^[113], *Schizosaccharomyces pombe* ^[114] und *Cunninghamella elegans* ^[115] durchgeführt. Diese Vorarbeiten könnten genutzt werden, um eine entsprechend vereinfachte und robuste Realisierung für analytische Labore zu entwickeln. Zusätzlich wäre eine engere Zusammenarbeit zwischen den akademischen Forschungsgruppen und den kommerziellen Herstellern von Referenzmaterial wertvoll, um entsprechende Versorgungslücken in angemessenerer Zeit zu schließen.

4.3.3 Testverfahren

Im Zeitraum dieser Arbeit wurden verschiedene neue Testverfahren beschrieben, wobei der Nachweis mittels LC-MS-Methoden nach wie vor den „Goldstandard“ darstellt. Im Folgenden wird die am Institut für Rechtsmedizin Freiburg etablierte Screeningmethode anderen neuen LC-MS-basierten Methoden gegenübergestellt und es werden alternative Ansätze diskutiert.

4.3.3.1 Nachweis mittels LC-MS

Die in Kapitel 3.1.6 beschriebene Screeningmethode basiert auf einer Liste mit spezifischen Ionenübergängen für Phase-I-Hauptmetaboliten von SC, welche an einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im positiven Ionisationsmodus gemessen wird (+MRM Scan). Um zu gewährleisten, dass zu jeder Zeit die Metaboliten der aktuell relevanten SC erfasst werden, muss die MRM-Liste laufend angepasst werden. Die Entwicklungen des SC-Marktes wurden durch das regelmäßige Zusammentragen der vorhandenen Informationen aus der wissenschaftlichen Literatur, den Berichten an die EMCDDA und einschlägigen Internetforen, auf denen sich Drogenkonsumenten austauschen, überwacht (diese Daten wurden in kollegialer Zusammenarbeit erhoben und sind nicht Bestandteil dieser Arbeit). Die Relevanz neuer SC in Deutschland wurde im Rahmen der Promotionsarbeit von Verena Angerer durch die Analyse von „Legal-High“-Produkten und Serumproben überprüft ^[116]. Zur Identifizierung der optimalen analytischen Targets für die Urin-Screeningmethode wurden im Rahmen dieser Arbeit Metabolismusstudien *in vitro* (HLM-Assay) und *in vivo* (humane Urinproben) wie in Kapitel 3.1 beschrieben durchgeführt. Der zeitaufwendige Prozess für die Identifizierung der Phase-I-Hauptmetaboliten neuer SC konnte durch die in Kapitel 3.1.1 präsentierte Studie zu Struktur-Metabolismus-Beziehungen wesentlich beschleunigt werden. Für Analyten mit kommerziellen Referenzstandards wurden Nachweisgrenzen abgeschätzt, die zwischen 0,01 und 0,5 ng/mL lagen. Als Positivkontrolle für Analyten ohne Referenzstandards wurde eine Kombination aus authentischen Urinproben von Konsumenten und HLM-Proben etabliert. Die verhältnismäßig unspezifische Probenaufarbeitung durch Flüssig-flüssig-Extraktion mit Acetonitril und Ammoniumformiat erleichtert die Anpassung der Methode um neue Analyten.

Seit Anfang 2014 wurden einige LC-MS-basierte Screeningmethoden zum Nachweis SC und deren Metaboliten in Urinproben beschrieben. Verglichen mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode liegen die Nachweisgrenzen anderer LC-MS/MS-Methoden in einem ähnlichen Bereich (0,01 - 1,0 ng/mL) [22, 24, 25, 117-133]. Jedoch umfassen diese Methoden auf Grund fehlender Referenzstandards selten aktuelle SC (z. B. vom „Valin- bzw. *tert*-Leucin-Typ“), wodurch deren routinemäßige Anwendung in der publizierten Form für die klinische und forensische Fallarbeit fragwürdig erscheint. Auch beschreiben die Artikel kein Vorgehen zur Erweiterung des Analytenspektrums. Im Hinblick auf die Aktualität des Analytenspektrums ist die hier präsentierte Methode den bislang veröffentlichten Ansätzen deshalb überlegen. Andere Autoren beschreiben hochauflösende LC-qToF-MS-Screeningverfahren zum Nachweis von SC-Metaboliten in Urinproben [134-142]. Typischerweise liegen die Nachweisgrenzen dieser Verfahren mit ca. 1 - 10 ng/mL etwas höher als die LC-MS/MS-basierter Methoden. Da in Kapitel 3.1.6 gezeigt wurde, dass die Analytkonzentrationen in Urinproben aus Abstinenzkontrolluntersuchungen häufig unter 1 ng/mL liegen, sind die LC-qToF-MS-Verfahren nicht optimal für diesen Einsatz. Ein großer Vorteil dieser Methoden liegt allerdings darin, dass das Analytenspektrum nahezu beliebig erweitert werden kann, ohne Einbußen hinsichtlich der Signalintensitäten in Kauf nehmen zu müssen und bereits aufgezeichnete Daten auch retrospektiv nach neuen Analyten durchsucht werden können. Zudem bietet die Bestimmung der genauen Masse eine weitere Dimension für die Identifizierung der Analyten in biologischen Proben. Diese Vorteile machen die HRMS-Methoden aktuell interessant für klinische Anwendungen, bei denen höhere Analytkonzentrationen zu erwarten sind. Sobald durch technische Weiterentwicklungen niedrigere Nachweisgrenzen erreicht werden können, könnte der Einsatz in allen Anwendungsgebieten der SC-Analytik möglich werden.

4.3.3.2 Alternative Nachweisverfahren

Einige Testverfahren wurden seit Anfang 2014 entwickelt, die als hinweisgebende Analysen eingesetzt werden können. Besonders im Bereich der immunchemischen Methoden wurden viele neue kommerzielle Lösungen angeboten, von denen einige in wissenschaftlichen Studien evaluiert wurden [134, 141, 143-148]. In diesen Studien wurden die untersuchten IA meist als geeignet für den Nachweis eines bestimmten Analytenspektrums in Urinproben bewertet. Die in Kapitel 3.1.6 vorgestellte Vergleichsstudie hat jedoch an zwei Beispielen eindrücklich gezeigt, dass die IA für den Einsatz in Abstinenzkontrolluntersuchungen wegen hoher Falsch-Negativ-Raten nicht geeignet sind. Zum einen liegen die Nachweisgrenzen in der Regel zu hoch (> 1 ng/mL) und zum anderen besteht häufig keine oder nur eine unzureichende Kreuzreaktivität zu neueren SC (siehe auch Kapitel 3.1.4). Insbesondere die fehlende Kreuzreaktivität macht in Kombination mit der hohen Dynamik des SC-Marktes und der langen Entwicklungsdauer neuer IA deren Einsatz auch im klinischen Umfeld weitestgehend nutzlos. Bemerkenswert niedrige Nachweisgrenzen (0,2 - 0,45 pg/mL) wurden in einer Studie bei der Analyse von aufgestockten synthetischen Urinproben mittels eines Sensorsystems auf Basis molekular eingepprägter Polymere („molecularly imprinted polymers“) erreicht [149]. Auf Grund des „Schlüssel-Schloss-Bindungsprinzips“ ergibt sich allerdings für diese Technik das gleiche Kreuzreaktivitäts-Problem wie für die immunchemischen Assays. Neue „molecularly imprinted polymers“ könnten jedoch wesentlich schneller entwickelt werden. Unter der Voraussetzung, dass entsprechende Sonden schnell genug verfügbar sind, wäre deren Anwendung als hinweisgebendes Verfahren prinzipiell denkbar. Ein vielversprechender Ansatz wurde von Cannaert *et al.* beschrieben [82, 106]. Dieser beruht auf der vorhandenen Aktivität vieler SC-Metaboliten an den Cannabinoidrezeptoren 1 und 2, die durch den entwickelten Bioassay gemessen werden kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in Kooperation mit der belgischen Forschungsgruppe erste Machbarkeitsstudien durchgeführt, welche die Anwendbarkeit als hinweisgebendes Verfahren für ein Urinscreening belegen (die genannten Publikationen sind Bestandteil der Dissertation von Annelies Cannaert). Ob eine kommerzielle Umsetzung realisiert werden kann, müssen weitere Untersuchungen in der Zukunft zeigen.

4.3.4 Befundinterpretation

Der Nachweis von SC-Metaboliten in Urinproben beweist zweifelsfrei die systemische Aufnahme eines SC. Um auf die aufgenommene Muttersubstanz zurückschließen zu können, müssen substanzspezifische Metaboliten nachgewiesen werden. Durch Hydrolyse von Amid- und Estergruppen (Abbildung 4-2 und Abbildung 4-4), hydrolytische Dehalogenierung (Abbildung 1-8, Seite 13), Hydrolyse von Nitril-Gruppen, oxidativen Abbau von Alkylseitenketten (Abbildung 1-8) und oxidative *N*-Desalkylierung (Abbildung 4-5) können mehrere SC gemeinsame Metaboliten bilden, welche als unspezifische Konsummarker angesehen werden müssen.

Fragestellungen nach dem Aufnahmezeitpunkt, der Konsummenge oder der Konsumhäufigkeit können durch Urinalysen im Normalfall nicht beantwortet werden und erfordern die Analyse von Blutproben sowie Daten zur Pharmakokinetik/Toxikokinetik der jeweiligen Substanz.

4.4 Nachweis durch Haaranalysen

4.4.1 Testverfahren

Die von Hutter *et al.* beschriebene Methode ^[150] zum Nachweis SC in Haarproben wurde im Rahmen dieser Arbeit optimiert und das Analytenspektrum umfassend erweitert (siehe Kapitel 0). Auch diese Methode basiert auf einer Liste spezifischer Ionenübergänge, die auf einem LC-MS/MS-System gemessen wird und fortlaufend überarbeitet werden muss. Die Auswahl der relevanten Analyten wird wie in Kapitel 4.3.3.1 beschrieben getroffen. Im Gegensatz zur Urinanalytik können SC in Haaren direkt als Muttersubstanzen detektiert werden und entsprechende Referenzstandards sind meist mit geringer zeitlicher Verzögerung erhältlich. Dementsprechend ist eine quantitative Analyse zwar möglich, jedoch erfordert die häufige Anpassung der MRM-Liste eine aufwendige Revalidierung des Testverfahrens. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein pragmatischeres Konzept für die Revalidierung etabliert. Der Ansatz ist durch die Tatsache gerechtfertigt, dass für Fragestellungen, die eine Haaranalytik auf SC erfordern, in den meisten Fällen eine semiquantitative Einschätzung der Wirkstoffkonzentrationen ausreichend ist. Der Umfang der notwendigen Experimente konnte deutlich reduziert werden und ermöglicht es, die Revalidierung mit geringem Aufwand begleitend zur Routineanalytik durchzuführen. Die entwickelte Methode ermöglicht niedrige Bestimmungsgrenzen (0.5 - 10 pg/mg) aller relevanten SC in Haarproben und die semiquantitative Beurteilung einer SC-Exposition. Die Relevanz der verschiedenen SC wurde wie in Abschnitt 4.3.3.1 beschrieben bewertet. Für die uneingeschränkte Erweiterungsmöglichkeit des Analytenspektrums war die unspezifische methanolische Probenextraktion eine wichtige Grundlage. Durch die unspezifische Extraktion mussten allerdings teilweise hohe Matrixeffekte in Kauf genommen werden.

Seit Anfang 2014 wurden mehrere LC-MS-basierte Methoden zum Nachweis von SC in Haarproben beschrieben. Niedrigauflösende massenspektrometrische Methoden zeigten unterschiedliche Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im Bereich von 0,01 – 50 pg/mg ^[151-162]. Für hochauflösende Massenspektrometer wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ab 10 pg/mg berichtet ^[163, 164]. In Kapitel 0 wurde durch die Untersuchung mehrerer hundert authentischer Haarproben gezeigt, dass die in Haaren nachgewiesenen SC-Konzentrationen in fast 70 % der Fälle unter 10 pg/mg lagen. Neben den in Kapitel 4.3.3.1 bereits erwähnten Vorteilen hochauflösender Massenspektrometer wäre bei Verwendung dieser Geräte auch die erforderliche Revalidierung nach Erweiterung des Analytenspektrums deutlich weniger aufwendig. Da die Anzahl der zu erfassenden Analyten bei qToF-Geräten keinen Einfluss auf die Nachweisgrenzen des Verfahrens hat, müssten neben den obligatorischen Selektivitäts-/Spezifitäts-Tests lediglich Revalidierungsparameter für die neu hinzugefügten Analyten bestimmt werden. In den meisten Fällen werden Haarproben zur Kontrolle einer Drogenabstinenz untersucht, weshalb LC-MS/MS-Geräte aufgrund der meist niedrigeren Nachweisgrenzen aktuell zu bevorzugen sind. Dennoch stellen hochauflösende Massenspektrometer eine vielversprechende Alternative dar, sobald technische Weiterentwicklungen niedrigere Nachweisgrenzen ermöglichen.

4.4.2 Befundinterpretation

In Kapitel 0 wurden umfassende Daten zu SC und deren Konzentration in authentischen Haarproben präsentiert. Der zeitliche Vergleich mit den in Serumproben nachgewiesenen SC deutet darauf hin, dass einige SC sehr lange in Haarproben nachweisbar sind. Die Daten aus der Serumanalytik auf SC wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Verena Angerer erhoben ^[116]. Der Konzentrationsbereich von SC in Haarproben reichte von weniger als 1 pg/mg bis ca. 5.700 pg/mg. Unter Berücksichtigung des aktuellen Wissenstandes wurden für die Interpretation der Konzentrationen in diesem Kollektiv die Kategorien „passive bzw. länger zurückliegende Exposition“ (unteres 75 %-Perzentil), „Hinweis auf intensive Exposition“ (oberes 25 %-Perzentil)

und „starke/kürzliche Exposition“ (Werte oberhalb des höchsten Kalibrators (150 pg/mg)) vorgeschlagen. In Kapitel 3.2.2 wurde anhand eines authentischen Fallbeispiels gezeigt, dass die segmentale Analyse einer Haarsträhne auf SC keine zuverlässigen Rückschlüsse auf den Konsumverlauf zulässt. Dementsprechend scheint eine Einlagerung der SC über die Blutversorgung der Haarwurzel nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Einer der durchgeführten Versuche hat bestätigt, dass durch externe Kontamination der Haare mit Substanzpulver große Mengen der SC dauerhaft in die Haarstruktur eingelagert werden können. Überraschenderweise waren in den Haarsegmenten der authentischen Haarprobe zwar typische Phase-I-Hauptmetaboliten der detektierten SC nachweisbar, doch auch durch diese Befunde konnte der Konsumverlauf nicht plausibel rekonstruiert werden. Weitere Experimente haben schließlich gezeigt, dass die detektierten Metaboliten auch nach externer Kontamination temperatur- und zeitabhängig in der Haarstruktur als Abbauprodukte gebildet werden können (Abbildung 4-6). Während die Hydrolyse von Amid- und Esterbindungen in Haaren nachvollziehbar war, konnte für die beobachtete hydrolytische Defluorierung bislang keine plausible mechanistische Erklärung gefunden werden. Die Untersuchung einer katalytischen Interaktion mit Bestandteilen der Haarmatrix (z. B. Melanin) könnte weitere Erkenntnisse über diese relevante Abbaureaktion liefern. Die Amid- und Esterhydrolyseprodukte wurden ebenfalls unter Abrauchbedingungen pyrolytisch gebildet und könnten über den Nebenstromrauch auf die Haaroberfläche gelangen und von außen in die Haarstruktur eindringen (Abbildung 4-6). Die nachgewiesenen Phase-I-Metaboliten können folglich nicht als indirekter Beweis für eine systemische Aufnahme der SC gewertet werden. Es ist anzunehmen, dass diese Beobachtungen auch für andere SC und deren durch Hydrolyse von Amiden, Estern und Fluor-Kohlenstoff-Bindungen gebildeten Metaboliten zutreffen. Dies sollte jedoch in weiteren Studien genauer untersucht werden.

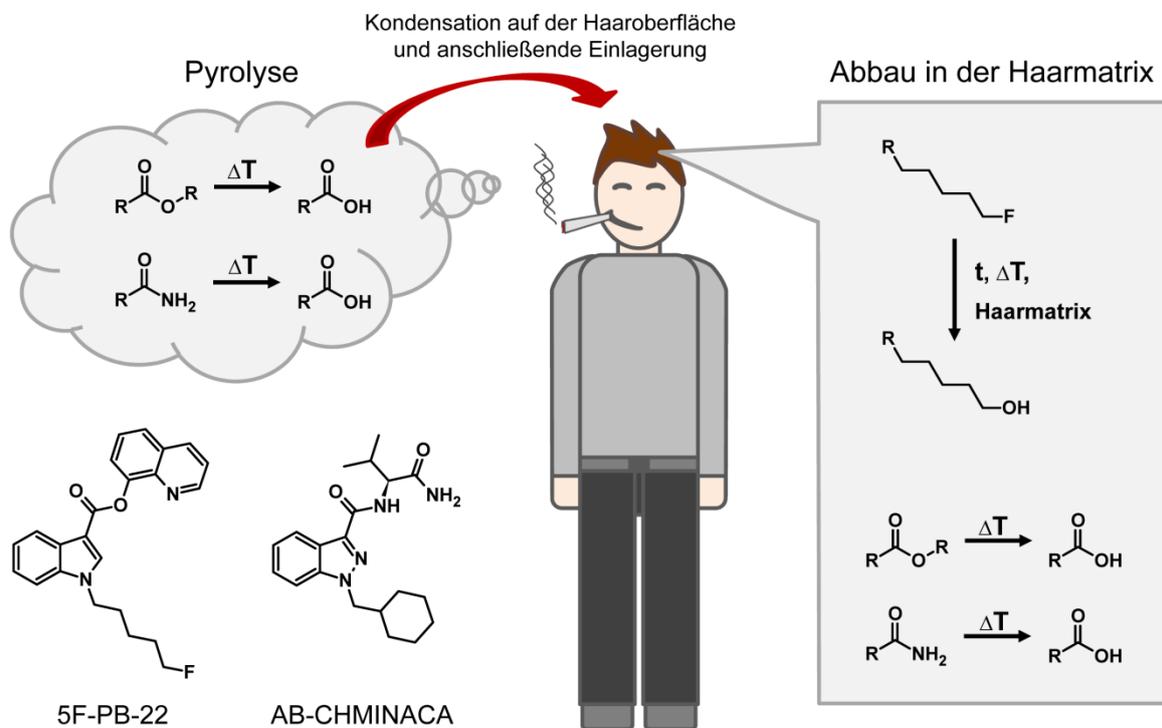


Abbildung 4-6. Artefaktische Bildung typischer Phase-I-Metaboliten synthetischer Cannabinoide (z. B. 5F-PB-22 und AB-CHMINACA) durch Pyrolyse beim Rauchen oder durch hydrolytischen Abbau in der Haarstruktur. Angepasst aus Literatur^[165].

Seit Anfang 2014 haben einige Arbeiten anderer Autoren ebenfalls neue Erkenntnisse mit Relevanz für die Interpretation von SC-Befunden in Haarproben geliefert. Eine neue Studie von Kim *et al.* hat für weitere SC bestätigt, dass die Haarpigmentierung keinen bedeutenden Einfluss auf die Einlagerung der Substanzen in die Haarstruktur hat ^[152]. Zudem wurde beobachtet, dass die Konzentrationen der detektierten SC und deren Metaboliten von proximalen zu distalen Haarsegmenten hin ansteigen. Ein Einfluss von Sebum und Schweiß auf die Verteilung der Analyten entlang des Haarschafts wurde postuliert. Hutter *et al.* haben in einer Studie den Nebenstromrauch und die bloße Handhabung von Drogenzubereitungen als bedeutende Quellen für die externe Kontamination der Haare mit SC identifiziert ^[166]. Durch die Exposition mit Nebenstromrauch wurden dabei höhere Konzentrationen in den Haaren erzielt als durch das Handling der Produkte. Durch mehrmaliges Waschen der Haarproben konnten die Kontaminationen nicht ausreichend entfernt werden. Selbst nach einigen Wochen wurden Probanden mit längeren Haaren noch positiv getestet. Die höchsten Konzentrationen wurden auch in dieser Studie in den distalen Haarsegmenten gemessen. Die Studie zeigt damit eindrücklich, dass SC zu einem relevanten Anteil nach externer Kontamination durch Diffusion von der Haaroberfläche in die Haarstruktur eingelagert werden können. Auch Moosmann *et al.* beschreiben die Einlagerung relevanter Mengen SC durch den bloßen Umgang mit Kräutermischungen ^[167]. Zudem wurden unbeteiligte Personen positiv getestet, deren Haare vermutlich nur durch den Kontakt zu primär belasteten Personen kontaminiert wurden. Diese Ergebnisse heben nochmals deutlich die Problematik bei der Interpretation von Haaranalyseergebnissen hinsichtlich eines Konsumbeweises hervor. Auch eine Arbeit von Saito *et al.* befasst sich mit der externen Kontamination von Haar ^[155]. Ähnlich wie in Kapitel 3.2.2 wurde von Sasaki *et al.* in einem Fallbeispiel beobachtet, dass die segmentale Haaranalyse keine plausiblen Daten zum Konsumverlauf lieferte ^[158]. Eine externe Kontamination durch Nebenstromrauch wurde als wahrscheinlichste Ursache postuliert. In guter Übereinstimmung zu den Ergebnissen der anderen Autoren wurde gezeigt, dass gezielte externe Kontamination nicht durch Waschprozeduren entfernt werden konnte. Dabei war die Absorption bei gefärbtem und gebleichtem Haar weniger stark ausgeprägt als bei naturschwarzem Haar. Zudem wurde Schweiß als potentielle Quelle für eine externe Kontamination der Haare identifiziert. Darüber hinaus konnten durch segmentale Haaranalysen keine Informationen hinsichtlich des Konsumverlaufes gewonnen werden. Ein Übersichtsartikel von Salomone *et al.* bietet ebenfalls einen detaillierten Überblick über die neuesten Entwicklungen ^[168].

Die Konsistenz der einzelnen Studien macht deutlich, dass ein SC-Nachweis in Haarproben keinen Beweis für die Aufnahme oder den Konsum von SC darstellt. Entsprechend stieg das Interesse an in Haaren nachweisbaren SC-Metaboliten als indirekter Beweis für eine systemische SC-Aufnahme. Einige Autoren gelang der Nachweis verschiedener SC-Metaboliten in authentischen Haarproben, welche als Konsummarker genutzt werden könnten ^[152-154, 169]. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studien jedoch unter Berücksichtigung der im Rahmen dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse (Kapitel 3.2.2), so muss festgestellt werden, dass bei der überwiegenden Anzahl der beschriebenen Fälle eine artefaktische Bildung der detektierten Metaboliten durch Pyrolyse beim Rauchen oder durch Abbau in der Haarstruktur nicht ausgeschlossen werden kann. Entsprechende Stabilitätsstudien sollten dringend durchgeführt werden, um die zweifelsfreie Eignung der detektierten Metaboliten zum Nachweis einer systemischen Aufnahme zu überprüfen.

4.5 Fazit

Die entwickelten LC-MS/MS-Methoden zum Nachweis SC bzw. deren Metaboliten in humanen Haar- bzw. Urinproben entsprechen dem aktuellen „Gold-Standard“ hinsichtlich Spezifität und Nachweisgrenzen. Ein Alleinstellungsmerkmal der Testverfahren liegt in der Aktualität des Analytenspektrums. Durch die semiquantitative Haaranalyse kann das Ausmaß einer SC-Exposition abgeschätzt werden. Eine systemische Aufnahme könnte durch den Nachweis von Metaboliten in Haarproben belegt werden, jedoch muss deren Eignung als Konsummarker kritisch geprüft werden. Die durchgeführten Untersuchungen haben verschiedene Wege aufgezeigt, durch die typische Phase-I-Metaboliten als Artefakte gebildet werden können und damit allgemein auf eine bislang stark unterschätzte Einschränkung der Aussagekraft nachgewiesener Metaboliten in Haarproben hingewiesen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Metabolismusstudien haben zum besseren Verständnis der Phase-I-Biotransformation neuer SC beigetragen und waren eine essentielle Grundlage für die Identifizierung der analytischen Targets für den Nachweis einer SC-Aufnahme durch Urinanalysen. Das darauf aufbauend entwickelte, qualitative Testverfahren zur Detektion der Phase-I-Hauptmetaboliten von SC in Urinproben ermöglicht den Beweis einer systemischen SC-Aufnahme. Beide Methoden können komplementär zur Beantwortung verschiedener klinischer und forensischer Fragestellungen eingesetzt werden, wobei der Einsatz schwerpunktmäßig auf dem Gebiet der Abstinenzkontrolle liegt. Auch zur Erhebung epidemiologischer Daten zur Verbreitung von SC kann die Analyse von Haar- und Urinproben wesentlich beitragen. Insgesamt haben die durchgeführten Studien einige Lücken in der Literatur geschlossen, wichtige Erkenntnisse für die korrekte Interpretation analytischer Befunde in Haar- und Urinproben geliefert und dazu beigetragen bioanalytisch mit den rasanten Entwicklungen auf dem Designerdrogenmarkt mithalten zu können. Spannende Weiterentwicklungen könnten sich zukünftig ergeben durch neue hochauflösende Massenspektrometer, die niedrigere Nachweisgrenzen erreichen, sowie durch alternative *in vitro*-Metabolismusmodelle, die eine genauere Vorhersage des *in vivo*-Metabolismus erlauben oder die Gewinnung von Hauptmetaboliten als Reinsubstanzen ermöglichen.

4.6 Referenzen

- [1.] European Database on New Drugs (EDND). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Abgerufen von: <https://ednd.emcdda.europa.eu/html.cfm/index6555EN.html> [am 22.06.2018].
- [2.] Werse, B.; Egger, D.; Sarvari, L.; Kamphausen, G.; Feilberg, N. MoSyD-Jahresbericht 2016: Drogentrends in Frankfurt am Main. Frankfurt am Main: Centre For Drug Research, Goethe Universität Frankfurt am Main, **2017**.
- [3.] Werse, B.; Morgenstern, C.; Sarvari, L. MoSyD Jahresbericht 2013: Drogentrends in Frankfurt am Main. Centre For Drug Research, Goethe Universität Frankfurt am Main, **2014**.
- [4.] Banister, S.D.; Moir, M.; Stuart, J.; Kevin, R.C.; Wood, K.E.; Longworth, M.; Wilkinson, S.M.; Beinat, C.; Buchanan, A.S.; Glass, M.; Connor, M.; McGregor, I.S.; Kassiou, M. Pharmacology of indole and indazole synthetic cannabinoid designer drugs AB-FUBINACA, ADB-FUBINACA, AB-PINACA, ADB-PINACA, 5F-AB-PINACA, 5F-ADB-PINACA, ADBICA, and 5F-ADBICA. *ACS Chemical Neuroscience*, **2015**, 6(9), 1546-1559.
- [5.] Banister, S.D.; Longworth, M.; Kevin, R.; Sachdev, S.; Santiago, M.; Stuart, J.; Mack, J.B.C.; Glass, M.; McGregor, I.S.; Connor, M.; Kassiou, M. Pharmacology of valinate and *tert*-leucinate synthetic cannabinoids 5F-AMBICA, 5F-AMB, 5F-ADB, AMB-FUBINACA, MDMB-FUBINACA, MDMB-CHMICA, and their analogues. *ACS Chemical Neuroscience*, **2016**, 7(9), 1241-1254.
- [6.] Longworth, M.; Banister, S.D.; Mack, J.B.C.; Glass, M.; Connor, M.; Kassiou, M. The 2-alkyl-2H-indazole regioisomers of synthetic cannabinoids AB-CHMINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, and 5F-AB-PINACA are possible manufacturing impurities with cannabimimetic activities. *Forensic Toxicology*, **2016**, 34(2), 286-303.
- [7.] Andernach, L.; Pusch, S.; Weber, C.; Schollmeyer, D.; Münster-Müller, S.; Pütz, M.; Opatz, T. Absolute configuration of the synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA with its chemical characteristics in illegal products. *Forensic Toxicology*, **2016**, 34(2), 344-352.
- [8.] Åstrand, A.; Vikingsson, S.; Lindstedt, D.; Thelander, G.; Green, H.; Kronstrand, R.; Wohlfarth, A. Metabolism study for CUMYL-4CN-BINACA in human hepatocytes and authentic urine specimens: free cyanide is formed during the main metabolic pathway. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, DOI 10.1002/dta.2373.
- [9.] Bertol, E.; Vaiano, F.; Di Milia, M.G.; Mari, F. *In vivo* detection of the new psychoactive substance AM-694 and its metabolites. *Forensic Science International*, **2015**, 256, 21-27.
- [10.] Diao, X.; Scheidweiler, K.B.; Wohlfarth, A.; Pang, S.; Kronstrand, R.; Huestis, M.A. *In vitro* and *in vivo* human metabolism of synthetic cannabinoids FDU-PB-22 and FUB-PB-22. *The AAPS Journal*, **2016**, 18(2), 455-464.
- [11.] Diao, X.; Carlier, J.; Zhu, M.; Pang, S.; Kronstrand, R.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. *In vitro* and *in vivo* human metabolism of a new synthetic cannabinoid NM-2201 (CBL-2201). *Forensic Toxicology*, **2017**, 35(1), 20-32.
- [12.] Erratico, C.; Negreira, N.; Norouzizadeh, H.; Covaci, A.; Neels, H.; Maudens, K.; van Nuijs, A.L.N. *In vitro* and *in vivo* human metabolism of the synthetic cannabinoid AB-CHMINACA. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(10), 866-876.
- [13.] Grigoryev, A.; Kavanagh, P.; Pechnikov, A. Human urinary metabolite pattern of a new synthetic cannabimimetic, methyl 2-(1-(cyclohexylmethyl)-1H-indole-3-carboxamido)-3, 3-dimethylbutanoate. *Forensic Toxicology*, **2016**, 34(2), 316-328.
- [14.] Hasegawa, K.; Minakata, K.; Gonmori, K.; Nozawa, H.; Yamagishi, I.; Watanabe, K.; Suzuki, O. Identification and quantification of predominant metabolites of synthetic cannabinoid MAB-CHMINACA in an authentic human urine specimen. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(2), 365-371.
- [15.] Hegstad, S.; Westin, A.A.; Spigset, O. Detection times of carboxylic acid metabolites of the synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 in human urine. *Journal of Analytical Toxicology*, **2015**, 39(4), 280-286.
- [16.] Holm, N.B.; Pedersen, A.J.; Dalsgaard, P.W.; Linnet, K. Metabolites of 5F-AKB-48, a synthetic cannabinoid receptor agonist, identified in human urine and liver microsomal preparations using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(3), 199-206.
- [17.] Jang, M.; Yang, W.; Shin, I.; Choi, H.; Chang, H.; Kim, E. Determination of AM-2201 metabolites in urine and comparison with JWH-018 abuse. *International Journal of Legal Medicine*, **2014**, 128(2), 285-294.
- [18.] Jang, M.; Shin, I.; Yang, W.; Chang, H.; Yoo, H.H.; Lee, J.; Kim, E. Determination of major metabolites of MAM-2201 and JWH-122 in *in vitro* and *in vivo* studies to distinguish their intake. *Forensic Science International*, **2014**, 244, 85-91.
- [19.] Jang, M.; Kim, I.S.; Park, Y.N.; Kim, J.; Han, I.; Baeck, S.; Yang, W.; Yoo, H.H. Determination of urinary metabolites of XLR-11 by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, 408(2), 503-516.
- [20.] Kanamori, T.; Kanda, K.; Yamamuro, T.; Kuwayama, K.; Tsujikawa, K.; Iwata, Y.T.; Inoue, H. Detection of main metabolites of XLR-11 and its thermal degradation product in human hepatoma HepaRG cells and human urine. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(4), 341-345.

- [21.] Kusano, M.; Zaitso, K.; Taki, K.; Hisatsune, K.; Nakajima, J.; Moriyasu, T.; Asano, T.; Hayashi, Y.; Tsuchihashi, H.; Ishii, A. Fatal intoxication by 5F-ADB and diphenidine: detection, quantification and investigation of their main metabolic pathways in humans by LC/MS/MS and LC/Q-TOFMS. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(2), 284-293.
- [22.] Minakata, K.; Hasegawa, K.; Yamagishi, I.; Nozawa, H.; Kikura-Hanajiri, R.; Suzuki, M.; Kitamoto, T.; Suzuki, O.; Watanabe, K. Sensitive quantification of 5F-PB-22 and its three metabolites 5F-PB-22 3-carboxyindole, B-22 N-5-hydroxypentyl and PB-22 N-pentanoic acid in authentic urine specimens obtained from four individuals by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, **2018**, 36(1), 151-159.
- [23.] Mogler, L.; Wilde, M.; Huppertz, L.M.; Weinfurter, G.; Franz, F.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the recently emerged synthetic cannabinoid CUMYL-PEGACLONE and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(5), 886-891.
- [24.] Ozturk, S.; Ozturk, Y.E.; Yeter, O.; Alpertunga, B. Application of a validated LC–MS/MS method for JWH-073 and its metabolites in blood and urine in real forensic cases. *Forensic Science International*, **2015**, 257, 165-171.
- [25.] Öztürk, Y.E.; Yeter, O.; Alpertunga, B. Validation of JWH-018 and its metabolites in blood and urine by UPLC–MS/MS: monitoring in forensic cases. *Forensic Science International*, **2015**, 248, 88-93.
- [26.] Öztürk, Y.E.; Yeter, O.; Öztürk, S.; Karakus, G.; Ates, I.; Buyuk, Y.; Yurdun, T. Detection of metabolites of the new synthetic cannabinoid CUMYL-4CN-BINACA in authentic urine samples and human liver microsomes using high-resolution mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(3), 449-459.
- [27.] Sobolevsky, T.; Prasolov, I.; Rodchenkov, G. Study on the phase I metabolism of novel synthetic cannabinoids, APICA and its fluorinated analogue. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(2), 131-142.
- [28.] Toennes, S.W.; Geraths, A.; Pogoda, W.; Paulke, A.; Wunder, C.; Theunissen, E.L.; Ramaekers, J.G. Excretion of metabolites of the synthetic cannabinoid JWH-018 in urine after controlled inhalation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2018**, 150, 162-168.
- [29.] Vikingsson, S.; Josefsson, M.; Green, H. Identification of AKB-48 and 5F-AKB-48 metabolites in authentic human urine samples using human liver microsomes and time of flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2015**, 39(6), 426-435.
- [30.] Vikingsson, S.; Gréen, H.; Brinkhagen, L.; Mukhtar, S.; Josefsson, M. Identification of AB-FUBINACA metabolites in authentic urine samples suitable as urinary markers of drug intake using liquid chromatography quadrupole tandem time of flight mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **2016**, 8(9), 950-956.
- [31.] Wohlfarth, A.; Castaneto, M.S.; Zhu, M.S.; Pang, S.K.; Scheidweiler, K.B.; Kronstrand, R.; Huestis, M.A. Pentyindole/pentyindazole synthetic cannabinoids and their 5-fluoro analogs produce different primary metabolites: metabolite profiling for AB-PINACA and 5F-AB-PINACA. *The AAPS Journal*, **2015**, 17(3), 660-677.
- [32.] Zaitso, K.; Nakayama, H.; Yamanaka, M.; Hisatsune, K.; Taki, K.; Asano, T.; Kamata, T.; Katagai, M.; Hayashi, Y.; Kusano, M. High-resolution mass spectrometric determination of the synthetic cannabinoids MAM-2201, AM-2201, AM-2232, and their metabolites in postmortem plasma and urine by LC/Q-TOFMS. *International Journal of Legal Medicine*, **2015**, 129(6), 1233-1245.
- [33.] Andersson, M.; Diao, X.; Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. Metabolic profiling of new synthetic cannabinoids AMB and 5F-AMB by human hepatocyte and liver microsome incubations and high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2016**, 30(8), 1067-1078.
- [34.] Carlier, J.; Diao, X.; Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.; Huestis, M.A. *In vitro* metabolite profiling of ADB-FUBINACA, a new synthetic cannabinoid. *Current Neuropharmacology*, **2017**, 15(5), 682-691.
- [35.] Diao, X.; Scheidweiler, K.B.; Wohlfarth, A.; Pang, S.K.; Kronstrand, R.; Huestis, M.A. *In vitro* and *in vivo* human metabolism of synthetic cannabinoids FDU-PB-22 and FUB-PB-22. *The AAPS Journal*, **2016**, 18(2), 455-464.
- [36.] Fietzke, M.; Thomas, A.; Beike, J.; Rothschild, M.A.; Thevis, M.; Mercer-Chalmers-Bender, K. *In vitro* elucidation of the metabolic profile of the synthetic cannabinoid receptor agonists JWH-175 and JWH-176. *Forensic Toxicology*, **2016**, 34(2), 353-362.
- [37.] Gandhi, A.S.; Wohlfarth, A.; Zhu, M.; Pang, S.; Castaneto, M.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. High-resolution mass spectrometric metabolite profiling of a novel synthetic designer drug, N-(adamantan-1-yl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indole-3-carboxamide (STS-135), using cryopreserved human hepatocytes and assessment of metabolic stability with human liver microsomes. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(3), 187-198.
- [38.] Holm, N.B.; Nielsen, L.M.; Linnet, K. CYP3A4 mediates oxidative metabolism of the synthetic cannabinoid AKB-48. *The AAPS journal*, **2015**, 17(5), 1237-1245.
- [39.] Holm, N.B.; Noble, C.; Linnet, K. JWH-018 ω -OH, a shared hydroxy metabolite of the two synthetic cannabinoids JWH-018 and AM-2201, undergoes oxidation by alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase enzymes *in vitro* forming the carboxylic acid metabolite. *Toxicology Letters*, **2016**, 259, 35-43.
- [40.] Kevin, R.C.; Lefever, T.W.; Snyder, R.W.; Patel, P.R.; Fennell, T.R.; Wiley, J.L.; McGregor, I.S.; Thomas, B.F. *In vitro* and *in vivo* pharmacokinetics and metabolism of synthetic cannabinoids CUMYL-PICA and 5F-CUMYL-PICA. *Forensic Toxicology*, **2017**, 35(2), 333-347.

- [41.] Kevin, R.C.; Lefever, T.W.; Snyder, R.W.; Patel, P.R.; Gamage, T.F.; Fennell, T.R.; Wiley, J.L.; McGregor, I.S.; Thomas, B.F. Kinetic and metabolic profiles of synthetic cannabinoids NNE1 and MN-18. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(1), 137-147.
- [42.] Kim, J.H.; Kim, H.S.; Kong, T.Y.; Lee, J.Y.; Kim, J.Y.; In, M.K.; Lee, H.S. *In vitro* metabolism of a novel synthetic cannabinoid, EAM-2201, in human liver microsomes and human recombinant cytochrome P450s. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2016**, 119, 50-58.
- [43.] Kong, T.Y.; Kim, J.-H.; Choi, W.G.; Lee, J.Y.; Kim, H.S.; Kim, J.Y.; In, M.K.; Lee, H.S. Metabolic characterization of (1-(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl)(4-methyl-1-naphthalenyl)-methanone (MAM-2201) using human liver microsomes and cDNA-overexpressed cytochrome P450 enzymes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2017**, 409(6), 1667-1680.
- [44.] Kong, T.Y.; Kwon, S.-S.; Cheong, J.C.; Kim, H.S.; Kim, J.Y.; Lee, H.S. *In vitro* inhibitory effects of synthetic cannabinoid EAM-2201 on cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase enzyme activities in human liver microsomes. *Molecules*, **2018**, 23(4), 920-933.
- [45.] Li, J.; Liu, C.; Li, T.; Hua, Z. UPLC-HR-MS/MS-based determination study on the metabolism of four synthetic cannabinoids, ADB-FUBICA, AB-FUBICA, AB-BICA and ADB-BICA by human liver microsomes. *Biomedical Chromatography*, **2018**, 32(3), e4126.
- [46.] Mardal, M.; Gracia-Lor, E.; Leibnitz, S.; Castiglioni, S.; Meyer, M.R. Toxicokinetics of new psychoactive substances: plasma protein binding, metabolic stability and human phase I metabolism of the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 studied using *in vitro* tools and LC-HR-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*, **2016**, 8(10), 1039-1048.
- [47.] Mardal, M.; Annaert, P.; Noble, C.; Oorts, M.; Linnet, K. Metabolism of the synthetic cannabinoid 5F-PY-PICA by human and rat hepatocytes and identification of biliary analytical targets by directional efflux in sandwich-cultured rat hepatocytes using UHPLC-HR-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2018**, 149, 296-307.
- [48.] Nielsen, L.M.; Holm, N.B.; Olsen, L.; Linnet, K. Cytochrome P450 mediated metabolism of the synthetic cannabinoids UR 144 and XLR 11. *Drug Testing and Analysis*, **2016**, 8(8), 792-800.
- [49.] Schaefer, N.; Helfer, A.G.; Kettner, M.; Laschke, M.W.; Schlote, J.; Ewald, A.H.; Meyer, M.R.; Menger, M.D.; Maurer, H.H.; Schmidt, P.H. Metabolic patterns of JWH 210, RCS 4 and THC in pig urine elucidated using LC HR MS/MS: do they reflect patterns in humans? *Drug Testing and Analysis*, **2017**, 9(4), 613-625.
- [50.] Takayama, T.; Suzuki, M.; Todoroki, K.; Inoue, K.; Min, J.Z.; Kikura-Hanajiri, R.; Goda, Y.; Toyo'oka, T. UPLC/ESI-MS/MS-based determination of metabolism of several new illicit drugs, ADB-FUBINACA, AB-FUBINACA, AB-PINACA, QUPIC, 5F-QUPIC and α -PVT, by human liver microsome. *Biomedical Chromatography*, **2014**, 28(6), 831-838.
- [51.] Thomsen, R.; Nielsen, L.M.; Holm, N.B.; Rasmussen, H.B.; Linnet, K.; Consortium, I. Synthetic cannabimimetic agents metabolized by carboxylesterases. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(7), 565-576.
- [52.] Wallgren, J.; Vikingsson, S.; Åstrand, A.; Josefsson, M.; Green, H.; Dahlén, J.; Wu, X.; Konradsson, P. Synthesis and identifications of potential metabolites as biomarkers of the synthetic cannabinoid AKB-48. *Tetrahedron*, **2018**.
- [53.] Staeheli, S.N.; Poetzsch, M.; Veloso, V.P.; Bovens, M.; Bissig, C.; Steuer, A.E.; Kraemer, T. *In vitro* metabolism of the synthetic cannabinoids CUMYL-PINACA, 5F-CUMYL-PINACA, CUMYL-4CN-BINACA, 5F-CUMYL-P7AICA and CUMYL-4CN-B7AICA. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(1), 148-157.
- [54.] Mogler, L.; Franz, F.; Wilde, M.; Huppertz, L.M.; Halter, S.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the carbazole derived synthetic cannabinoids EG-018, EG-2201 and MDMB-CHMCZCA and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, DOI 10.1002/dta.2398.
- [55.] Kavanagh, P.; Grigoryev, A.; Krupina, N. Detection of metabolites of two synthetic cannabimimetics, MDMB-FUBINACA and ADB-FUBINACA, in authentic human urine specimens by accurate mass LC-MS: a comparison of intersecting metabolic patterns. *Forensic Toxicology*, **2017**, 35(2), 284-300.
- [56.] Patton, A.L.; Seely, K.A.; Yarbrough, A.L.; Fantegrossi, W.; James, L.P.; McCain, K.R.; Fujiwara, R.; Prather, P.L.; Moran, J.H.; Radominska-Pandya, A. Altered metabolism of synthetic cannabinoid JWH-018 by human cytochrome P450 2C9 and variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2018**, 498(3), 597-602.
- [57.] Wohlfarth, A.; Castaneto, M.S.; Zhu, M.; Pang, S.; Scheidweiler, K.B.; Kronstrand, R.; Huestis, M.A. Pentylindole/pentylindazole synthetic cannabinoids and their 5-fluoro analogs produce different primary metabolites: metabolite profiling for AB-PINACA and 5F-AB-PINACA. *The AAPS Journal*, **2015**, 17(3), 660-677.
- [58.] Carlier, J.; Diao, X.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. Distinguishing intake of new synthetic cannabinoids ADB-PINACA and 5F-ADB-PINACA with human hepatocyte metabolites and high-resolution mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, **2017**, 63(5), 1008-1021.
- [59.] Carlier, J.; Diao, X.; Sempio, C.; Huestis, M.A. Identification of new synthetic cannabinoid ADB-CHMINACA (MAB-CHMINACA) metabolites in human hepatocytes. *The AAPS Journal*, **2017**, 19(2), 568-577.

- [60.] Diao, X.; Wohlfarth, A.; Pang, S.K.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. High-resolution mass spectrometry for characterizing the metabolism of synthetic cannabinoid THJ-018 and its 5-fluoro analog THJ-2201 after incubation in human hepatocytes. *Clinical Chemistry*, **2016**, 62(1), 157-169.
- [61.] Diao, X.; Scheidweiler, K.B.; Wohlfarth, A.; Zhu, M.; Pang, S.; Huestis, M.A. Strategies to distinguish new synthetic cannabinoid FUBIMINA (BIM-2201) intake from its isomer THJ-2201: metabolism of FUBIMINA in human hepatocytes. *Forensic Toxicology*, **2016**, 34(2), 256-267.
- [62.] Diao, X.; Carlier, J.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. *In vitro* metabolism of new synthetic cannabinoid SDB-006 in human hepatocytes by high-resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, **2017**, 35(2), 252-262.
- [63.] Diao, X.; Carlier, J.; Zhu, M.; Huestis, M.A. Human hepatocyte metabolism of novel synthetic cannabinoids MN-18 and its 5-fluoro analog 5F-MN-18. *Clinical Chemistry*, **2017**, 63(11), 1753-1763.
- [64.] Gandhi, A.S.; Zhu, M.S.; Pang, S.K.; Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. Metabolite profiling of RCS-4, a novel synthetic cannabinoid designer drug, using human hepatocyte metabolism and TOF-MS. *Bioanalysis*, **2014**, 6(11), 1471-1485.
- [65.] Mardal, M.; Dalsgaard, P.W.; Qi, B.; Mollerup, C.B.; Annaert, P.; Linnet, K. Metabolism of the synthetic cannabinoids AMB-CHMICA and 5C-AKB48 in pooled human hepatocytes and rat hepatocytes analyzed by UHPLC-(IMS)-HR-MSE. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2018**, 1083, 189-197.
- [66.] Wohlfarth, A.; Pang, S.K.; Zhu, M.S.; Gandhi, A.S.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. Metabolism of RCS-8, a synthetic cannabinoid with cyclohexyl structure, in human hepatocytes by high-resolution MS. *Bioanalysis*, **2014**, 6(9), 1187-1200.
- [67.] Wohlfarth, A.; Gandhi, A.S.; Pang, S.K.; Zhu, M.S.; Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. Metabolism of synthetic cannabinoids PB-22 and its 5-fluoro analog, 5F-PB-22, by human hepatocyte incubation and high-resolution mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406(6), 1763-1780.
- [68.] Allen, C.; Patton, A.; Seely, K.; Fantegrossi, W.; Radomska-Pandya, A.; Prather, P.; Ford, B.; James, L.; Moran, J. Functional consequences of synthetic cannabinoid metabolites and CYP2C9 polymorphisms. *The FASEB Journal*, **2014**, 28(1 Supplement), 838.4.
- [69.] Watanabe, S.; Kuzhiumparambil, U.; Winiarski, Z.; Fu, S. Biotransformation of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073 and AM-2201 by *Cunninghamella elegans*. *Forensic Science International*, **2016**, 261, 33-42.
- [70.] Watanabe, S.; Kuzhiumparambil, U.; Nguyen, M.A.; Cameron, J.; Fu, S. Metabolic profile of synthetic cannabinoids 5F-PB-22, PB-22, XLR-11 and UR-144 by *Cunninghamella elegans*. *The AAPS Journal*, **2017**, 19(4), 1148-1162.
- [71.] Hwang, J.; Hwang, J.; Ganganna, B.; Song, I.; Heo, M.Y.; Ahn, S.-H.; Lee, J. Metabolic and pharmacokinetic characterization of a new synthetic cannabinoid APINAC in rats. *Forensic Toxicology*, **2018**, 36(1), 88-101.
- [72.] Strano-Rossi, S.; Anzillotti, L.; Dragoni, S.; Pellegrino, R.M.; Goracci, L.; Pascali, V.L.; Cruciani, G. Metabolism of JWH-015, JWH-098, JWH-251, and JWH-307 *in silico* and *in vitro*: a pilot study for the detection of unknown synthetic cannabinoid metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406(15), 3621-3636.
- [73.] Savchuk, S.; Appolonova, S.; Pechnikov, A.; Rizvanova, L.; Shestakova, K.; Tagliaro, F. *In vivo* metabolism of the new synthetic cannabinoid APINAC in rats by GC-MS and LC-QTOF-MS. *Forensic Toxicology*, **2017**, 35(2), 359-368.
- [74.] Toennes, S.W.; Geraths, A.; Pogoda, W.; Paulke, A.; Wunder, C.; Theunissen, E.L.; Ramaekers, J.G. Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 and of its metabolites in serum after inhalation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2017**, 140, 215-222.
- [75.] Franz, F.; Angerer, V.; Brandt, S.D.; McLaughlin, G.; Kavanagh, P.V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. *In vitro* metabolism of the synthetic cannabinoid 3,5-AB-CHMFUPPYCA and its 5,3-regioisomer and investigation of their thermal stability. *Drug Testing and Analysis*, **2016**.
- [76.] Franz, F.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the highly potent synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, **2017**, 9(5), 744-753.
- [77.] Mogler, L.; Franz, F.; Rentsch, D.; Angerer, V.; Weinfurter, G.; Longworth, M.; Banister, S.D.; Kassiou, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 5F-MDMB-PICA in 'legal high' products and human urine samples. **2017**, DOI 10.1002/dta.2201.
- [78.] Imai, T.; Taketani, M.; Shii, M.; Hosokawa, M.; Chiba, K. Substrate specificity of carboxylesterase isozymes and their contribution to hydrolase activity in human liver and small intestine. *Drug Metabolism and Disposition*, **2006**, 34(10), 1734-1741.
- [79.] Takai, S.; Matsuda, A.; Usami, Y.; Adachi, T.; Sugiyama, T.; Katagiri, Y.; Tatematsu, M.; Hirano, K. Hydrolytic profile for ester- or amide-linkage by carboxylesterases pl 5.3 and 4.5 from human liver. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **1997**, 20(8), 869-873.
- [80.] Buchler, I.P.; Hayes, M.J.; Hegde, S.G.; Hockerman, S.L.; Jones, D.E.; Kortum, S.W.; Rico, J.G.; Tenbrink, R.E.; Wu, K.K. Indazole derivatives. Patentnummer: WO2009106980A2, **2009**.

- [81.] Longworth, M.; Connor, M.; Banister, S.D.; Kassiou, M. Synthesis and Pharmacological profiling of the metabolites of synthetic cannabinoid drugs APICA, STS-135, ADB-PINACA, and 5F-ADB-PINACA. *ACS Chemical Neuroscience*, **2017**, 8(8), 1673-1680.
- [82.] Cannaert, A.; Franz, F.; Auwärter, V.; Stove, C.P. Activity-based detection of consumption of synthetic cannabinoids in authentic urine samples using a stable cannabinoid reporter system. *Analytical Chemistry*, **2017**, 89(17), 9527-9536.
- [83.] Adamowicz, P.; Zuba, D.; Sekula, K. Analysis of UR-144 and its pyrolysis product in blood and their metabolites in urine. *Forensic Science International*, **2013**, 233(1-3), 320-327.
- [84.] De Brabanter, N.; Esposito, S.; Tudela, E.; Lootens, L.; Meuleman, P.; Leroux-Roels, G.; Deventer, K.; Van Eenoo, P. *In vivo* and *in vitro* metabolism of the synthetic cannabinoid JWH-200. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2013**, 27(18), 2115-2126.
- [85.] ElSohly, M.A.; Gul, W.; Elsohly, K.M.; Murphy, T.P.; Madgula, V.L.; Khan, S.I. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine specimens for K2 (JWH-018) metabolites. *Journal of Analytical Toxicology*, **2011**, 35(7), 487-495.
- [86.] Grigoryev, A.; Melnik, A.; Savchuk, S.; Simonov, A.; Rozhanets, V. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2011**, 879(25), 2519-2526.
- [87.] Grigoryev, A.; Savchuk, S.; Melnik, A.; Moskaleva, N.; Dzhurko, J.; Ershov, M.; Nosyrev, A.; Vedenin, A.; Izotov, B.; Zabirowa, I.; Rozhanets, V. Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2011**, 879(15-16), 1126-1136.
- [88.] Grigoryev, A.; Kavanagh, P.; Melnik, A. The detection of the urinary metabolites of 3-[(adamantan-1-yl)carbonyl]-1-pentylindole (AB-001), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **2012**, 4(6), 519-524.
- [89.] Kavanagh, P.; Grigoryev, A.; Melnik, A.; Simonov, A. The identification of the urinary metabolites of 3-(4-methoxybenzoyl)-1-pentylindole (RCS-4), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2012**, 36(5), 303-311.
- [90.] Kavanagh, P.; Grigoryev, A.; Melnik, A.; Savchuk, S.; Simonov, A.; Rozhanets, V. Detection and tentative identification of urinary phase I metabolites of phenylacetylindole cannabimimetics JWH-203 and JWH-251 by GC-MS and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2013**, 934, 102-108.
- [91.] Grigoryev, A.; Kavanagh, P.; Melnik, A.; Savchuk, S.; Simonov, A. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry detection of the urinary metabolites of UR-144 and its major pyrolysis product. *Journal of Analytical Toxicology*, **2013**, 37(5), 265-276.
- [92.] Grigoryev, A.; Kavanagh, P.; Melnik, A. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-2-iodophenylmethanone (AM-694), a high affinity cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, **2013**, 5(2), 110-115.
- [93.] Hutter, M.; Broecker, S.; Kneisel, S.; Auwärter, V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques. *Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, 47(1), 54-65.
- [94.] 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. *Journal of Mass Spectrometry*, **2013**, 48(7), 885-894.
- [95.] Lovett, D.P.; Yanes, E.G.; Herbelin, T.W.; Knoerzer, T.A.; Levisky, J.A. Structure elucidation and identification of a common metabolite for naphthoylindole-based synthetic cannabinoids using LC-TOF and comparison to a synthetic reference standard. *Forensic Science International*, **2013**, 226(1-3), 81-87.
- [96.] Wintermeyer, A.; Möller, I.; Thevis, M.; Jübner, M.; Beike, J.; Rothschild, M.A.; Bender, K. *In vitro* phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 398(5), 2141-2153.
- [97.] Möller, I.; Wintermeyer, A.; Bender, K.; Jübner, M.; Thomas, A.; Krug, O.; Schänzer, W.; Thevis, M. Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls. *Drug Testing and Analysis*, **2011**, 3(9), 609-620.
- [98.] Sobolevsky, T.; Prasolov, I.; Rodchenkov, G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Science International*, **2010**, 200(1-3), 141-147.
- [99.] Sobolevskii, T.; Prasolov, I.; Rodchenkov, G. Application of mass spectrometry to the structural identification of the metabolites of the synthetic cannabinoid JWH-018 and the determination of them in human urine. *Journal of Analytical Chemistry*, **2011**, 66(13), 1314-1323.

- [100.] Sobolevsky, T.; Prasolov, I.; Rodchenkov, G. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis*, **2012**, 4(10), 745-753.
- [101.] Wohlfarth, A.; Pang, S.K.; Zhu, M.S.; Gandhi, A.S.; Scheidweiler, K.B.; Liu, H.F.; Huestis, M.A. First metabolic profile of XLR-11, a novel synthetic cannabinoid, obtained by using human hepatocytes and high-resolution mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, **2013**, 59(11), 1638-1648.
- [102.] Zhang, Q.; Ma, P.; Iszard, M.; Cole, R.B.; Wang, W.Q.; Wang, G.D. *In vitro* metabolism of *R*(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate, a cannabinoid receptor agonist. *Drug Metabolism and Disposition*, **2002**, 30(10), 1077-1086.
- [103.] Zhang, Q.; Ma, P.; Wang, W.Q.; Cole, R.B.; Wang, G.D. Characterization of rat liver microsomal metabolites of AM-630, a potent cannabinoid receptor antagonist, by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39(6), 672-681.
- [104.] Zhang, Q.; Ma, P.; Cole, R.B.; Wang, G.D. Identification of *in vitro* metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB₂) by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 386(5), 1345-1355.
- [105.] Gandhi, A.S.; Zhu, M.S.; Pang, S.K.; Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.B.; Liu, H.F.; Huestis, M.A. First characterization of AKB-48 metabolism, a novel synthetic cannabinoid, using human hepatocytes and high-resolution mass spectrometry. *The AAPS Journal*, **2013**, 15(4), 1091-1098.
- [106.] Cannaert, A.; Storme, J.; Franz, F.; Auwärter, V.; Stove, C.P. Detection and activity profiling of synthetic cannabinoids and their metabolites with a newly developed bioassay. *Analytical Chemistry*, **2016**, 88(23), 11476-11485.
- [107.] Chimalakonda, K.C.; Seely, K.A.; Bratton, S.M.; Brents, L.K.; Moran, C.L.; Endres, G.W.; James, L.P.; Hollenberg, P.F.; Prather, P.L.; Radominska-Pandya, A.; Moran, J.H. Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metabolism and Disposition*, **2012**, 40(11), 2174-2184.
- [108.] Jansen, G.A.; Wanders, R.J. Alpha-oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, **2006**, 1763(12), 1403-1412.
- [109.] Schulz, H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, **1991**, 1081(2), 109-120.
- [110.] Peters, F.T.; Meyer, M.R. *In vitro* approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds. *Drug Testing and Analysis*, **2011**, 3(7-8), 483-495.
- [111.] Richter, L.H.; Maurer, H.H.; Meyer, M.R. New psychoactive substances: studies on the metabolism of XLR-11, AB-PINACA, FUB-PB-22, 4-methoxy- α -PVP, 25-I-NBOMe and meclonazepam using human liver preparations in comparison to primary human hepatocytes and human urine. *Toxicology Letters*, **2017**, 280, 142-150.
- [112.] Diao, X.; Huestis, M.A. Approaches, challenges and advances in metabolism of new synthetic cannabinoids and identification of optimal urinary marker metabolites. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **2017**, 101(2), 239-253.
- [113.] Vail, R.B.; Homann, M.J.; Hanna, I.; Zaks, A. Preparative synthesis of drug metabolites using human cytochrome P450s 3A4, 2C9 and 1A2 with NADPH-P450 reductase expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2005**, 32(2), 67-74.
- [114.] Drăgan, C.-A.; Zearo, S.; Hannemann, F.; Bernhardt, R.; Bureik, M. Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research*, **2005**, 5(6-7), 621-625.
- [115.] Watanabe, S.; Kuzhiumparambil, U.; Fu, S. Structural elucidation of metabolites of synthetic cannabinoid UR-144 by *Cunninghamella elegans* using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *The AAPS Journal*, **2018**, 20(2), 42.
- [116.] Angerer, V. Neue psychoaktive Substanzen in der forensischen Toxikologie: Synthetische Cannabinoide – eine unendliche Geschichte? Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, **2017**.
- [117.] Berg, T.; Kaur, L.; Risnes, A.; Havig, S.M.; Karinen, R. Determination of a selection of synthetic cannabinoids and metabolites in urine by UHPSFC-MS/MS and by UHPLC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*, **2016**, 8(7), 708-722.
- [118.] Blandino, V.; Wetzel, J.; Kim, J.; Haxhi, P.; Curtis, R.; Concheiro, M. Oral fluid vs. urine analysis to monitor synthetic cannabinoids and classic drugs recent exposure. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2017**, 18(10), 796-805.
- [119.] Borg, D.; Tverdovsky, A.; Stripp, R. A fast and comprehensive analysis of 32 synthetic cannabinoids using agilent triple quadrupole LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, **2017**, 41(1), 6-16.
- [120.] Castaneto, M.S.; Scheidweiler, K.B.; Gandhi, A.; Wohlfarth, A.; Klette, K.L.; Martin, T.M.; Huestis, M.A. Quantitative urine confirmatory testing for synthetic cannabinoids in randomly collected urine specimens. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(6), 483-493.

- [121.] Davies, B.B.; Bayard, C.; Larson, S.J.; Zarwell, L.W.; Mitchell, R.A. Retrospective analysis of synthetic cannabinoid metabolites in urine of individuals suspected of driving impaired. *Journal of Analytical Toxicology*, **2015**, 40(2), 89-96.
- [122.] Dong, X.; Li, L.; Ye, Y.; Zheng, L.; Jiang, Y. Simultaneous determination of major phytocannabinoids, their main metabolites, and common synthetic cannabinoids in urine samples by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2016**, 1033, 55-64.
- [123.] Ford, L.T.; Berg, J.D. 1-Adamantylamine a simple urine marker for screening for third generation adamantyl-type synthetic cannabinoids by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, **2016**, 53(6), 640-646.
- [124.] Jang, M.; Shin, I.; Kim, J.; Yang, W. Simultaneous quantification of 37 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, **2015**, 33(2), 221-234.
- [125.] Knittel, J.L.; Holler, J.M.; Chmiel, J.D.; Vorce, S.P.; Magluilo Jr, J.; Levine, B.; Ramos, G.; Bosy, T.Z. Analysis of parent synthetic cannabinoids in blood and urinary metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2016**, 40(3), 173-186.
- [126.] Minakata, K.; Yamagishi, I.; Nozawa, H.; Hasegawa, K.; Suzuki, M.; Gonmori, K.; Suzuki, O.; Watanabe, K. Sensitive identification and quantitation of parent forms of six synthetic cannabinoids in urine samples of human cadavers by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, **2017**, 35(2), 275-283.
- [127.] Neifeld, J.R.; Regester, L.E.; Holler, J.M.; Vorce, S.P.; Magluilo Jr, J.; Ramos, G.; Bosy, T.Z. Ultrafast screening of synthetic cannabinoids and synthetic cathinones in urine by rapidfire-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **2016**, 40(5), 379-387.
- [128.] Sánchez-González, J.; Odoardi, S.; Bermejo, A.M.; Bermejo-Barrera, P.; Romolo, F.S.; Moreda-Piñeiro, A.; Strano-Rossi, S. Development of a micro-solid-phase extraction molecularly imprinted polymer technique for synthetic cannabinoids assessment in urine followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2018**, 1550, 8-20.
- [129.] Scheidweiler, K.B.; Huestis, M.A. Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1327, 105-117.
- [130.] Simões, S.S.; Silva, I.; Ajenjo, A.C.; Dias, M.J. Validation and application of an UPLC-MS/MS method for the quantification of synthetic cannabinoids in urine samples and analysis of seized materials from the Portuguese market. *Forensic Science International*, **2014**, 243, 117-125.
- [131.] Wohlfarth, A.; Scheidweiler, K.B.; Castaneto, M.; Gandhi, A.S.; Desrosiers, N.A.; Klette, K.L.; Martin, T.M.; Huestis, M.A. Urinary prevalence, metabolite detection rates, temporal patterns and evaluation of suitable LC-MS/MS targets to document synthetic cannabinoid intake in US military urine specimens. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **2015**, 53(3), 423-434.
- [132.] Tang, M.H.; Ching, C.; Lee, C.Y.; Lam, Y.-H.; Mak, T.W. Simultaneous detection of 93 conventional and emerging drugs of abuse and their metabolites in urine by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2014**, 969, 272-284.
- [133.] Mazzarino, M.; de la Torre, X.; Botrè, F. A liquid chromatography-mass spectrometry method based on class characteristic fragmentation pathways to detect the class of indole-derivative synthetic cannabinoids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, **2014**, 837, 70-82.
- [134.] Kronstrand, R.; Brinkhagen, L.; Birath-Karlsson, C.; Roman, M.; Josefsson, M. LC-QTOF-MS as a superior strategy to immunoassay for the comprehensive analysis of synthetic cannabinoids in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2014**, 406(15), 3599-3609.
- [135.] Scheidweiler, K.B.; Jarvis, M.J.Y.; Huestis, M.A. Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2015**, 407(3), 883-897.
- [136.] Kinyua, J.; Negreira, N.; Ibáñez, M.; Bijlsma, L.; Hernández, F.; Covaci, A.; Van Nuijs, A.L. A data-independent acquisition workflow for qualitative screening of new psychoactive substances in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2015**, 407(29), 8773-8785.
- [137.] Kinyua, J.; Negreira, N.; Miserez, B.; Causanilles, A.; Emke, E.; Gremeaux, L.; de Voogt, P.; Ramsey, J.; Covaci, A.; van Nuijs, A.L. Qualitative screening of new psychoactive substances in pooled urine samples from Belgium and United Kingdom. *Science of the Total Environment*, **2016**, 573, 1527-1535.
- [138.] Archer, J.; Dargan, P.; Lee, H.; Hudson, S.; Wood, D. Trend analysis of anonymised pooled urine from portable street urinals in central London identifies variation in the use of novel psychoactive substances. *Clinical Toxicology*, **2014**, 52(3), 160-165.
- [139.] Archer, J.; Hudson, S.; Jackson, O.; Yamamoto, T.; Lovett, C.; Lee, H.; Rao, S.; Hunter, L.; Dargan, P.; Wood, D. Analysis of anonymized pooled urine in nine UK cities: variation in classical recreational drug, novel psychoactive substance and anabolic steroid use. *QJM: An International Journal of Medicine*, **2015**, 108(12), 929-933.

- [140.] Heikman, P.; Sundström, M.; Pelander, A.; Ojanperä, I. New psychoactive substances as part of polydrug abuse within opioid maintenance treatment revealed by comprehensive high-resolution mass spectrometric urine drug screening. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*, **2016**, 31(1), 44-52.
- [141.] Sundström, M.; Pelander, A.; Ojanperä, I. Comparison between drug screening by immunoassay and ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry in post-mortem urine. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(5), 420-427.
- [142.] Sundström, M.; Pelander, A.; Simojoki, K.; Ojanperä, I. Patterns of drug abuse among drug users with regular and irregular attendance for treatment as detected by comprehensive UHPLC-HR-TOF-MS. *Drug Testing and Analysis*, **2016**, 8(1), 39-45.
- [143.] Barnes, A.J.; Young, S.; Spinelli, E.; Martin, T.M.; Klette, K.L.; Huestis, M.A. Evaluation of a homogenous enzyme immunoassay for the detection of synthetic cannabinoids in urine. *Forensic Science International*, **2014**, 241, 27-34.
- [144.] Barnes, A.J.; Spinelli, E.; Young, S.; Martin, T.M.; Klette, K.L.; Huestis, M.A. Validation of an ELISA synthetic cannabinoids urine assay. *Therapeutic Drug Monitoring*, **2015**, 37(5), 661-669.
- [145.] Spinelli, E.; Barnes, A.J.; Young, S.; Castaneto, M.S.; Martin, T.M.; Klette, K.L.; Huestis, M.A. Performance characteristics of an ELISA screening assay for urinary synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(6), 467-474.
- [146.] Castaneto, M.S.; Desrosiers, N.A.; Ellefsen, K.; Anizan, S.; Martin, T.M.; Klette, K.L.; Huestis, M.A. Method validation of the biochip array technology for synthetic cannabinoids detection in urine. *Bioanalysis*, **2014**, 6(21), 2919-2930.
- [147.] De Giovanni, N.; Pascali, V.L.; Giacometti, S.; Fucci, N. Immunochemical screening for synthetic cannabinoids in workplace drug testing. *Journal of Drug Abuse*, **2016**, 2(4), 1-5.
- [148.] Mohr, A.L.A.; Ofsa, B.; Keil, A.M.; Simon, J.R.; McMullin, M.; Logan, B.K. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of use of the synthetic cannabinoid agonists UR-144 and XLR-11 in human urine. *Journal of Analytical Toxicology*, **2014**, 38(7), 427-431.
- [149.] Battal, D.; Akgönüllü, S.; Yalcin, M.S.; Yavuz, H.; Denizli, A. Molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor system for sensitive and label-free detection of synthetic cannabinoids in urine. *Biosensors and Bioelectronics*, **2018**, 111, 10-17.
- [150.] Hutter, M.; Kneisel, S.; Auwärter, V.; Neukamm, M.A. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **2012**, 903, 95-101.
- [151.] Fucci, N.; Pascali, V.L. Detection of JWH-073 and cannabis congeners in hair: application in pediatric patient. *Therapeutic Drug Monitoring*, **2016**, 38(1), 140-142.
- [152.] Kim, J.; Park, Y.; Park, M.; Kim, E.; Yang, W.; Baeck, S.; Lee, S.; Han, S. Simultaneous determination of five naphthoylindole-based synthetic cannabinoids and metabolites and their deposition in human and rat hair. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2015**, 102, 162-175.
- [153.] Sim, J.; Cho, H.S.; Lee, J.; In, S.; Kim, E. Determination of AB-CHMINACA and its metabolites in human hair and their deposition in hair of abusers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2017**, 140, 162-168.
- [154.] Park, M.; Yeon, S.; Lee, J.; In, S. Determination of XLR-11 and its metabolites in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2015**, 114, 184-189.
- [155.] Saito, T.; Sasaki, C.; Namera, A.; Kurihara, K.; Inokuchi, S. Experimental study on external contamination of hair by synthetic cannabinoids and effect of hair treatment. *Forensic Toxicology*, **2015**, 33(1), 155-158.
- [156.] Salomone, A.; Luciano, C.; Di Corcia, D.; Gerace, E.; Vincenti, M. Hair analysis as a tool to evaluate the prevalence of synthetic cannabinoids in different populations of drug consumers. *Drug Testing and Analysis*, **2014**, 6(1-2), 126-134.
- [157.] Salomone, A.; Palamar, J.J.; Gerace, E.; Di Corcia, D.; Vincenti, M. Hair testing for drugs of abuse and new psychoactive substances in a high-risk population. *Journal of Analytical Toxicology*, **2017**, 41, 376-381.
- [158.] Sasaki, C.; Saito, T.; Shinozuka, T.; Irie, W.; Murakami, C.; Maeda, K.; Nakamaru, N.; Oishi, M.; Nakamura, S.; Kurihara, K. A case of death caused by abuse of a synthetic cannabinoid *N*-1-naphthalenyl-1-pentyl-1*H*-indole-3-carboxamide. *Forensic Toxicology*, **2015**, 33(1), 165-169.
- [159.] Strano-Rossi, S.; Odoardi, S.; Fisichella, M.; Anzillotti, L.; Gottardo, R.; Tagliaro, F. Screening for new psychoactive substances in hair by ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2014**, 1372, 145-156.
- [160.] Wang, C.-F. Simultaneous determination of 32 new synthetic cannabinoids in human urine and hair by LC-MS/MS. *The Turkish Journal of Occupational / Environmental Medicine and Safety*, **2017**, 2, 86.

- [161.] Montenarh, D.; Hopf, M.; Warth, S.; Maurer, H.H.; Schmidt, P.; Ewald, A.H. A simple extraction and LC-MS/MS approach for the screening and identification of over 100 analytes in eight different matrices. *Drug Testing and Analysis*, **2015**, 7(3), 214-240.
- [162.] Boumba, V.A.; Di Rago, M.; Peka, M.; Drummer, O.H.; Gerostamoulos, D. The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. *Forensic Science International*, **2017**, 279, 192-202.
- [163.] Montesano, C.; Vannutelli, G.; Massa, M.; Simeoni, M.C.; Gregori, A.; Ripani, L.; Compagnone, D.; Curini, R.; Sergi, M. Multi-class analysis of new psychoactive substances and metabolites in hair by pressurized liquid extraction coupled to HPLC-HRMS. *Drug Testing and Analysis*, **2016**, 9, 798-807.
- [164.] Gottardo, R.; Sorio, D.; Musile, G.; Trapani, E.; Seri, C.; Serpelloni, G.; Tagliaro, F. Screening for synthetic cannabinoids in hair by using LC-QTOF MS: a new and powerful approach to study the penetration of these new psychoactive substances in the population. *Medicine, Science and the Law*, **2014**, 54(1), 22-27.
- [165.] Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Auwärter, V.; Moosmann, B. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair - proof of consumption or false friends for interpretation? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, 408(13), 3445-3452.
- [166.] Hutter, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V.; Neukamm, M.A. Hair analysis for JWH-018, JWH-122, and JWH-210 after passive in vivo exposure to synthetic cannabinoid smoke. *Forensic Toxicology*, **2015**, 33(1), 69-76.
- [167.] Moosmann, B.; Valcheva, T.; Neukamm, M.A.; Angerer, V.; Auwärter, V. Hair analysis of synthetic cannabinoids: does the handling of herbal mixtures affect the analyst's hair concentration? *Forensic Toxicology*, **2015**, 33(1), 37-44.
- [168.] Salomone, A.; Vincenti, M.; Gerace, E. Interpretation of NPS results in real hair samples. *Toxicologie Analytique et Clinique*, **2017**, 29(1), 4-10.
- [169.] Kim, J.; In, S.; Park, Y.; Park, M.; Kim, E.; Lee, S. Deposition of JWH-018, JWH-073 and their metabolites in hair and effect of hair pigmentation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405(30), 9769-9778.

5 Anhang

Der folgende Inhalt besteht aus Rohdaten und ergänzenden Daten, die zum Zweck der vollständigen Nachvollziehbarkeit mit den in Kapitel 3 vorgestellten Publikationen als unterstützendes Material veröffentlicht wurden.

5.1 Struktur-Metabolismus-Beziehungen synthetischer Cannabinoide des Valin- und *tert*-Leucin-Typs

Anhang zur Originalveröffentlichung („Supplementary Material“):

Franz, F.; Jechle, H.; Wilde, M.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Longworth, M.; Kassiou, M.; Jung, M.; Auwärter, V. Structure-metabolism relationships of valine- and *tert*-leucine-derived synthetic cannabinoid receptor agonists: a systematic comparison of the *in vitro* phase I metabolism using pooled human liver microsomes and high-resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, 2019, vor dem Druck. (DOI: 10.1007/s11419-018-00462-x)

Einzusehen unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11419-018-00462-x#SupplementaryMaterial>

5.2 AB-CHMFUPPYCA-Stellungsisomere: *In vitro*-Phase-I-Biotransformation und thermische Stabilität

Anhang zur Originalveröffentlichung („Supporting Information“):

Franz, F.; Angerer, V.; Brandt, S.D.; McLaughlin, G.; Kavanagh, P.V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. *In vitro* metabolism of the synthetic cannabinoid 3,5-AB-CHMFUPPYCA and its 5,3-regioisomer and investigation of their thermal stability. *Drug Testing and Analysis*, 2017, 9(2), 311-316. (DOI: 10.1002/dta.1950)

Einzusehen unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dta.1950>

5.3 MDMB-CHMICA: *In vitro*- und *in vivo*-Phase-I-Biotransformation, thermische Stabilität und Nachweis durch Analyse authentischer Urinproben

Anhang zur Originalveröffentlichung („Supporting Information“):

Franz, F.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the highly potent synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, 2017, 9(5), 744-753. (DOI: 10.1002/dta.2049)

Einzusehen unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dta.2049>

5.4 5F-MDMB-PICA: *In vitro*- und *in vivo*-Phase-I-Biotransformation und Nachweis durch Analyse authentischer Urinproben

Anhang zur Originalveröffentlichung („Supporting Information“):

Mogler, L.; Franz, F.; Rentsch, D.; Angerer, V.; Weinfurter, G.; Longworth, M.; Banister, S.D.; Kassiou, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 5F-MDMB-PICA in 'legal high' products and human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, 2018, 10(1), 196-205. (DOI: <https://doi.org/10.1002/dta.2201>)

Einzusehen unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/dta.2201>

5.5 5F-Cumyl-PINACA und Cumyl-PINACA: *In vitro-* und *in vivo-* Phase-I-Biotransformation und Nachweis durch Analyse authentischer Urinproben

Anhang zur Originalveröffentlichung („Supplementary Material“):

Angerer, V.; Franz, F.; Moosmann, B.; Bisel, P.; Auwärter, V. 5F-Cumyl-PINACA in 'e-liquids' for electronic cigarettes: comprehensive characterization of a new type of synthetic cannabinoid in a trendy product including investigations on the *in vitro* and *in vivo* phase I metabolism of 5F-Cumyl-PINACA and its non-fluorinated analog Cumyl-PINACA. *Forensic Toxicology*, 2019, 37(1), 186-196. (DOI: 10.1007/s11419-018-0451-8)

Einzusehen unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11419-018-0451-8#SupplementaryMaterial>

5.6 Synthetische Cannabinoide in Urinproben: Nachweis mittels LC-MS/MS und immunochemischer Assays

Anhang zur Originalveröffentlichung („Supplementary Material“):

Franz, F.; Angerer, V.; Jechle, H.; Pegoro, M.; Ertl, H.; Weinfurter, G.; Janele, D.; Schlögl, C.; Friedl, M.; Gerl, S.; Mielke, R.; Zehnle, R.; Wagner, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – an evaluation of the diagnostic efficiency. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2017, 55(9), 1375-1384. (DOI: 10.1515/cclm-2016-0831)

Einzusehen unter: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2017.55.issue-9/cclm-2016-0831/cclm-2016-0831.xml>

5.7 Synthetische Cannabinoide in Haarproben

Anhang zur Originalveröffentlichung („Supplementary Data“):

Franz, F.; Jechle, H.; Angerer, V.; Pegoro, M.; Auwärter, V.; Neukamm, M.A. Synthetic cannabinoids in hair – pragmatic approach for method updates, compound prevalences and concentration ranges in authentic hair samples. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1006, 61-73. (DOI: 10.1016/j.aca.2017.12.029)

Einzusehen unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267017314526>

Publikationen

Originalarbeiten mit Erstautorenschaften (Peer-Reviewed)

Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Auwärter, V.; Moosmann, B. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair – proof of consumption or false friends for interpretation? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, 408(13), 3445-3452.

Franz, F.; Angerer, V.; Brandt, S.D.; McLaughlin, G.; Kavanagh, P.V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. *In vitro* metabolism of the synthetic cannabinoid 3,5-AB-CHMFUPPYCA and its 5,3-regioisomer and investigation of their thermal stability. *Drug Testing and Analysis*, **2017**, 9(2), 311-316.

Franz, F.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the highly potent synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, **2017**, 9(5), 744-753.

Franz, F.; Angerer, V.; Jechle, H.; Pegoro, M.; Ertl, H.; Weinfurter, G.; Janele, D.; Schlögl, C.; Friedl, M.; Gerl, S.; Mielke, R.; Zehnle, R.; Wagner, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – an evaluation of the diagnostic efficiency. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **2017**, 55(9), 1375-1384.

Cannaert, A.,[#] Franz, F.,[#] Auwärter, V.; Stove, C.P. Activity-based detection of consumption of synthetic cannabinoids in authentic urine samples using a stable cannabinoid reporter system. *Analytical Chemistry*, **2017**, 89(17), 9527-9536.

Franz, F.; Jechle, H.; Angerer, V.; Auwärter, V.; Neukamm, M.A. Nachweis synthetischer Cannabinoide in Haarproben. *Blutalkohol*, **2017**, 54(5), 281-287.

Franz, F.; Jechle, H.; Angerer, V.; Pegoro, M.; Auwärter, V.; Neukamm, M.A. Synthetic cannabinoids in hair – pragmatic approach for method updates, compound prevalences and concentration ranges in authentic hair samples. *Analytica Chimica Acta*, **2018**, 1006, 61-73.

Mogler, L.,[#] Franz, F.,[#] Rentsch, D.; Angerer, V.; Weinfurter, G.; Longworth, M.; Banister, S.D.; Kassiou, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 5F-MDMB-PICA in 'legal high' products and human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(1), 196-205.

Angerer, V.,[#] Franz, F.,[#] Moosmann, B.; Bisel, P.; Auwärter, V. 5F-Cumyl-PINACA in 'e-liquids' for electronic cigarettes: comprehensive characterization of a new type of synthetic cannabinoid in a trendy product including investigations on the *in vitro* and *in vivo* phase I metabolism of 5F-Cumyl-PINACA and its non-fluorinated analog Cumyl-PINACA. *Forensic Toxicology*, **2019**, 37(1), 186-196.

Franz, F.; Jechle, H.; Wilde, M.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Longworth, M.; Kassiou, M.; Jung, M.; Auwärter, V. Structure-metabolism relationships of valine- and *tert*-leucine-derived synthetic cannabinoid receptor agonists: a systematic comparison of the *in vitro* phase I metabolism using pooled human liver microsomes and high-resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, **2019**, vor dem Druck. (DOI: 10.1007/s11419-018-00462-x)

Originalarbeiten mit Koautorenschaften (Peer-Reviewed)

Huppertz, L. M.; Bisel, P.; Westphal, F.; Franz, F.; Auwärter, V.; Moosmann, B. Characterization of the four designer benzodiazepines clonazolam, deschloroetizolam, flubromazolam, and meclonazepam, and identification of their *in vitro* metabolites. *Forensic Toxicology*, **2015**, 33(2), 388-395.

Angerer, V.; Franz, F.; Schwarze, B.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Reply to 'sudden cardiac death following use of the synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA'. *Journal of Analytical Toxicology*, **2016**, 40(3), 240-242.

Hermanns-Clausen, M.; Kithinji, J.; Spehl, M.; Angerer, V.; Franz, F.; Eyer, F.; Auwärter, V. Adverse effects after the use of JWH-210 – a case series from the EU 'Spice II plus' project. *Drug Testing and Analysis*, **2016**, 8(10), 1030-1038.

Moosmann, B.; Bisel, P.; Franz, F.; Huppertz, L.M.; Auwärter, V. Characterization and *in vitro* phase I microsomal metabolism of designer benzodiazepines – an update comprising adinazolam, cloniprazepam, fonazepam, 3-hydroxyphenazepam, metizolam and nitrazolam. *Journal of Mass Spectrometry*, **2016**, 51(11), 1080-1089.

Cannaert, A.; Storme, J.; Franz, F.; Auwärter, V.; Stove, C.P. Detection and activity profiling of synthetic cannabinoids and their metabolites with a newly developed bioassay. *Analytical chemistry*, **2016**, 88(23), 11476-11485.

Angerer, V.; Jacobi, S.; Franz, F.; Auwärter, V.; Pietsch, J. Three fatalities associated with the synthetic cannabinoids 5F-ADB, 5F-PB-22 and AB-CHMINACA. *Forensic Science International*, **2017**, 281, e9-e15.

Hermanns-Clausen, M.; Müller, D.; Kithinji, J.; Angerer, V.; Franz, F.; Eyer, F.; Neurath, H.; Liebetrau, G.; Auwärter, V. Acute side effects after consumption of the new synthetic cannabinoids AB-CHMINACA and MDMB-CHMICA. *Clinical Toxicology*, **2018**, 56(6), 404-411.

Mogler, L.; Wilde, M.; Huppertz, L.M.; Weinfurter, G.; Franz, F.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the recently emerged synthetic cannabinoid CUMYL-PEGACLONE and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(5), 886-891.

Mogler, L.; Franz, F.; Wilde, M.; Huppertz, L.M.; Halter, S.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. (2018). Phase I metabolism of the carbazole derived synthetic cannabinoids EG-018, EG-2201 and MDMB-CHMCZCA and detection in human urine samples. *Drug Testing and Analysis*, **2018**, 10(9), 1417-1429.

Hutter, M.; Broecker, S.; Kneisel, S.; Franz, F.; Brandt, S.D.; Auwärter, V. Metabolism of nine synthetic cannabinoid receptor agonists encountered in clinical casework: major *in vivo* phase I metabolites of AM-694, AM-2201, JWH-007, JWH-019, JWH-203, JWH-307, MAM-2201, UR-144 and XLR-11 in human urine using LC-MS/MS. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2018**, 19(2), 144-162.

Gaunitz F.; Thomas, A.; Fietzke, M.; Franz, F.; Auwärter, V.; Thevis, M.; Mercer-Chalmers-Bender, K. Phase I Metabolic profiling of the synthetic cannabinoids THJ-018 and THJ-2201 in human urine in comparison to human liver microsome and cytochrome P450 isoenzyme incubation and comparison to urinary metabolite profiles. *International Journal of Legal Medicine*, **2018**, vor dem Druck. (DOI: 10.1007/s00414-018-1964-8)

Originalarbeiten mit Erstautorenschaften (nicht Peer-Reviewed)

Franz, F.; Weinfurter, G.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – a feasible approach for forensic applications. *Toxichem Krimtech*, **2015**, 39(82), 140-150.

Franz, F.; Schwörer, N.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metabolism and urine analysis of the new synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA. *Toxichem Krimtech*, 39(82), **2015**, 192-198.

Franz, F. Proof of synthetic cannabinoid uptake – strategies for analysis of human hair and urine samples and pitfalls for result interpretation. *TIAFT Bulletin*, **2017**, 47(4), 31-36.

Konferenzbeiträge, Vorträge

Franz, F.; Henning, K.; Huppertz, L.M.; Angerer, V.; Auwärter, V. Analytik und *in-vitro/in vivo*-Metabolismus des neuen synthetischen Cannabinoids AB-FUBINACA. *93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*, **2014**, in Heringsdorf (Deutschland).

Franz, F.; Henning, K.; Lehmann, J.; Huppertz, L.M.; Angerer, V.; Auwärter, V. Analytics and *in vitro/in vivo* metabolism of AB-FUBINACA as a representative of a new generation of synthetic cannabinoids. *52. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2014**, in Buenos Aires (Argentinien).

Franz, F.; Schwörer, N.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metabolism of synthetic cannabinoids – similarities and differences between metabolic patterns of different structural subclasses. *19. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*, **2015**, in Mosbach (Deutschland).

Franz, F.; Schwörer, N.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metabolism of synthetic cannabinoids – similarities and differences between metabolic patterns of different structural subclasses. *53. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2015**, in Florenz (Italien).

Franz, F.; Angerer, V.; Kithinji, J.; Auwärter, V.; Hermanns-Clausen, M. Legal aber nicht harmlos – aktuelle Intoxikationsfälle mit synthetischen Cannabinoiden. *94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*, **2015**, in Leipzig (Deutschland).

Franz, F.; Jechle, H.; Angerer, V.; Neukamm, M.A.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Hair analysis for the synthetic cannabinoid 5F-PB-22: findings in authentic hair samples and stability issues. *54. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2016**, in Brisbane (Australien).

Franz, F.; Jechle, H.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Stability of synthetic cannabinoids in hair and consequences for interpreting forensic hair analysis results. *20. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*, **2017**, in Mosbach (Deutschland).

Franz, F. Hair analysis for synthetic cannabinoids and their metabolites – a lot of questions and some answers for result interpretation. *SOFT Young Forensic Toxicologists / TIAFT Young Scientists Symposium*, **2018**, in Boca Raton (FL, USA).

Konferenzbeiträge, Posterpräsentationen

Franz, F.; Weinfurter, G.; Schwörer, N.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – a feasible approach for forensic applications? *19. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*, **2015**, in Mosbach (Deutschland).

Franz, F.; Schwörer, N.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Auwärter, V. Metabolism and urine analysis of the new synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA. *19. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*, **2015**, in Mosbach (Deutschland).

Franz, F.; Weinfurter, G.; Schwörer, N.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Immunoassay screening in urine for synthetic cannabinoids – a feasible approach for forensic applications? *53. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2015**, in Florenz (Italien).

Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair – proof of consumption or false friends for interpretation? *53. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2015**, in Florenz (Italien).

Franz, F.; Schwörer, N.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Auwärter, V. Metabolism and urine analysis of the new synthetic cannabinoid MDMB-CHMICA. *7. European Academy of Forensic Science Conference*, **2015**, in Prag, (Tschechische Republik).

Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair – proof of consumption or false friends for interpretation? *7. European Academy of Forensic Science Conference*, **2015**, in Prag (Tschechische Republik).

Franz, F.; Ertl, H.; Auwärter, V. Screening for synthetic cannabinoids in urine by immunoassay versus LC-MS/MS – an evaluation of the diagnostic efficiency. *7. European Academy of Forensic Science Conference*, **2015**, in Prag (Tschechische Republik).

Franz, F.; Weinfurter, G.; Schwörer, N.; Auwärter, V. Immunoassays zum Urinscreening auf synthetische Cannabinoide – ein geeigneter Ansatz für die forensische Anwendung? *94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*, **2015**, in Leipzig (Deutschland).

Franz, F.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metabolismus und Urinanalytik des synthetischen Cannabinoids MDMB-CHMICA. *94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*, **2015**, in Leipzig (Deutschland).

Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metaboliten von synthetischen Cannabinoiden im Haar – Konsumbeweis oder Stolperfalle bei der Interpretation? *94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*, **2015**, in Leipzig (Deutschland).

Franz, F.; Müller, K.; Jechle, H.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Schwarze, B.; Auwärter, V. Prevalence of synthetic cannabinoid use among persons undergoing drug testing for cannabis. *54. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2016**, in Brisbane (Australien).

Franz, F.; Moosmann, B.; Angerer, V.; Dobos, A.; Kemenes, K.; Hidvégi, E.; Auwärter, V. Metabolism of the new synthetic cannabinoid MDMB-FUBICA and analysis of authentic forensic case samples. *54. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2016**, in Brisbane (Australien).

Franz, F.; Ertl, H.; Auwärter, V. Screening for synthetic cannabinoids in urine by immunoassay versus LC-MS/MS – an evaluation of the diagnostic efficiency. *54. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2016**, in Brisbane (Australien).

Franz, F.; Müller, K.; Jechle, H.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Schwarze, B.; Auwärter, V. Konsum synthetischer Cannabinoide in Cannabis-Abstinenzkontrollprogrammen. *12. Gemeinsames Symposium der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Verkehrspsychologie*, **2016**, in Rostock (Deutschland).

Franz, F.; Ertl, H.; Auwärter, V. Nachweis synthetischer Cannabinoide in Urinproben mittels Immunoassays versus LC-MS/MS – eine Überprüfung der diagnostischen Aussagekraft. *12. Gemeinsames Symposium der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Verkehrspsychologie*, **2016**, in Rostock (Deutschland).

Franz, F.; Mogler, L.; Angerer, V.; Huppertz, L.M.; Dobos, A.; Kemenes, K.; Hidvégi, E.; Auwärter, V. Phase I metabolism of the new synthetic cannabinoid Cumyl-4CN-BINACA and detection in human urine samples. *55. Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists*, **2018**, in Boca Raton (FL, USA).

Auszeichnungen

DGRM Posterpreis 2015: Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Moosmann, B.; Auwärter, V. Metaboliten von synthetischen Cannabinoiden im Haar – Konsumbeweis oder Stolperfalle bei der Interpretation?. *94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin*, **2015**, in Leipzig (Deutschland).

TIAFT Young Scientists Award 2016 ‘Best Publication’: Franz, F.; Angerer, V.; Hermanns-Clausen, M.; Auwärter, V.; Moosmann B. Metabolites of synthetic cannabinoids in hair – proof of consumption or false friends for interpretation? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, 408(13), 3445-3452.

DGVM/DGVP Posterpreis 2016: Franz, F.; Müller, K.; Jechle, H.; Angerer, V.; Moosmann, B.; Schwarze, B.; Auwärter, V. Konsum synthetischer Cannabinoide in Cannabis-Abstinenzkontrollprogrammen. *12. Gemeinsames Symposium der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Verkehrspsychologie*, **2016**, in Rostock (Deutschland).

Lebenslauf

Die Seite 97 (Lebenslauf) enthält persönliche Daten und ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung dieser Arbeit.