

Pharmakokinetik und Metabolismus von Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A im Menschen



INAUGURALDISSERTATION ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE DER
FAKULTÄT FÜR CHEMIE, PHARMAZIE UND GEOWISSENSCHAFTEN DER ALBERT-LUDWIGS-
UNIVERSITÄT FREIBURG IM BREISGAU

vorgelegt von
Ariane Wohlfarth
geboren in Dessau

2012

Die praktischen Arbeiten zur Erstellung dieser Dissertation wurden im Zeitraum von Oktober 2008 bis November 2011 am Institut für Rechtsmedizin des Klinikums der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

Dekan:

Prof. Dr. Harald Hillebrecht

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Prof. Dr. Thorsten Koslowski

Referent:

Prof. Dr. Rolf Schubert

Betreuer der Arbeit und Korreferent:

PD Dr. Volker Auwärter

Drittprüferin:

Prof. Dr. Regine Peschka-Süss

Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:

16. Februar 2012

Danke

Am 15. Januar 2008 betrat ich – am Tag zuvor aus dem Norden umgezogen – als Neuling das Institut für Rechtsmedizin der Uniklinik Freiburg. Von diesem Moment an tauchte ich ein in die Welt der Forensischen Toxikologie mit ihren immer wieder spannenden Fällen aus der Praxis, erlebte in fast vier Jahren Höhepunkte und Tiefschläge der Forschungsarbeit und durfte durch das auf- und anregende Kongressleben wandeln.

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer, Privatdozent Dr. Volker Auwärter, für seine Unterstützung bei der Bearbeitung des meiner Meinung nach interessantesten Promotionsthemas der Welt. Volker, ich danke Dir für Anregungen und Ideen in Diskussionen, Bremsmanöver bei zu perfektionistischen Unternehmungen und Deine enthusiastische und optimistische Art, die mich immer motiviert hat. Ich habe es sehr genossen, mit großer Freiheit und Deinem Vertrauen meine eigenen Wege durch all die Themen zu finden.

Herr Professor Pollak, Ihre ruhige, freundliche Art und Ihre Ausführungen im Wiener Dialekt, denen ich stundenlang zuhören könnte, werde ich immer in Erinnerung behalten. Ich danke Ihnen sehr für Ihre Bemühungen, die Randbedingungen für die Doktoranden so gut wie möglich zu gestalten, und dafür, dass Sie immer interessiert an dieser Arbeit waren. Auch die moralische und kulinarische Unterstützung während der natürlich nervenaufreibenden Humanstudie war sehr wohltuend.

Alles begann mit einem Bewerbungsgespräch im Oktober 2007. Ich war damals sofort überzeugt. Herr Professor Weinmann, herzlichen Dank für die Aufnahme in diesen Arbeitskreis, den Sie maßgeblich aufgebaut haben und der bis zum April 2010 von Ihrer Expertise und Erfahrung profitiert hat.

Herr Professor Schubert, ich danke Ihnen für die Aufnahme als externe Doktorandin in Ihren Arbeitskreis, Ihre Betreuung und die unkomplizierte Hilfe bei der Testung der Emulsionen für die Humanstudie.

Frau Professor Süss, vielen Dank, dass Sie sich kurzfristig und wie selbstverständlich dazu bereit erklärt haben, meine Drittprüferin zu sein.

Die Vorbereitungen kosten meistens die größte Kraft. So auch hier. Für die Mithilfe bei den Vorarbeiten für die Humanstudie möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken bei: Dr. Hellmut Mahler vom Landeskriminalamt Düsseldorf für die Bereitstellung des Cannabis-Rohmaterials, aus dem die THCA für die Humanstudie isoliert wurde. Tobias Huber und seinen Kollegen vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie für die Bereitstellung der Hochvakuumanlage und der Überwachung meines kostbaren und sensiblen Isolierungsprodukts. Dr. Markus Meyer vom Institut für Experimentelle Toxikologie in Homburg/Saar für die Inkubation der THCA mit verschiedenen CYP-Isoenzymen und humanen Lebermikro-

somen. Und Herrn Dr. Sutter, dem Leiter der Sterilabteilung der Klinikumsapotheke, für die Herstellung der Emulsionen zur intravenösen Applikation.

Ziel aller Vorbereitungsarbeiten und ohne Zweifel Höhepunkt der Promotion war die Humanstudie. Danke an alle Probanden und meine Hochachtung für soviel Schmerzresistenz! Für das gute Gelingen bei der Abnahme von gefühlten eine Million Blutproben vielen Dank an Rebecca Pircher und die Anästhesiepfleger Jörg Eschbach und Judith Spengler. Mein größter Dank an dieser Stelle gilt der liebenswürdigsten Studienärztin, die ich mir vorstellen kann, Frau Privatdozentin Dr. Annette Thierauf, für ihre immer hilfsbereite Art und aufopferungsvolle Unterstützung - selbst dann, wenn sie eigentlich krank ins Bett gehört hätte.

Vielen Dank an Dr. Björn Schelter vom Freiburg Center for Data Analysis and Modeling für die Hilfe bei der Nachbereitung, in diesem Fall der statistischen Analyse.

Eine gute Arbeitsatmosphäre ist fast alles! Vielen lieben Dank an meine jetzigen und ehemaligen Kollegen, insbesondere den „erlauchten“ Doktorandenkreis: Heike Gnann, Nadine Roth, Stefan Kneisel, Melanie Hutter, Björn Moosmann und Sebastian Dresen. Ich danke Euch für so viel gute Laune, Eure Späße, Geburtstagskuchen, die unterhaltsamen Mittagspausen mit Euch, diverse Freizeitaktivitäten außerhalb des Instituts, spannende Kongressreisen und Eure Unterstützung, ohne die sicher manches doppelt so lange gedauert hätte.

Hendrik, ich danke Dir dafür, dass Du mich die letzten vier Jahre so gefordert, motivierst und des Öfteren mit Analysen aus der Ferne „erleuchtet“ hast.

Meine liebe Familie, Ihr habt mich wesentlich beeinflusst auf meinem Weg dahin, wo ich jetzt bin. Danke für Eure Erfahrung, Euer Wissen, Euren Horizont und die moralische Rückendeckung von Anfang bis Ende.

Anne, Dirk, Eva, Marlies, Arne, Patrick, Nicole, Jutta und Jörg – wenn jemand Anteil daran hat, dass diese Arbeit nun fertig vor mir liegt, dann Ihr.

Ariane Wohlfarth
Januar 2012

Während der Promotionszeit veröffentlichte Publikationen

1. als Erstautor

Wohlfarth A, Weinmann W, Dresen S
LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum
Anal Bioanal Chem (2010); 396(7): 2403-14

Wohlfarth A, Weinmann W
Review: Bioanalysis of new designer drugs
Bioanalysis (2010); 2(5): 965-979

Wohlfarth A, Toepfner N, Hermanns-Clausen M, Auwärter V
Sensitive quantification of clozapine and its main metabolites norclozapine and clozapine-N-oxide in serum and urine using LC-MS/MS after simple liquid-liquid extraction work-up
Anal Bioanal Chem (2011); 400(3): 737-746

Wohlfarth A, Mahler H, Auwärter V
Rapid isolation procedure for $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA) from *Cannabis sativa* using two flash chromatography systems
J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci (2011); 879(28): 3059-64.

Wohlfarth A, Naue J, Lutz-Bonengel S, Dresen S, Auwärter V
Cocktail approach for *in vivo* phenotyping of 5 major CYP450 isoenzymes: Development of an effective sampling, extraction, and analytical procedure and pilot study with comparative genotyping
J Clin Pharmacol (2011), published online, doi: 10.1177/0091270011410570

Wohlfarth A, Roth N, Auwärter V
LC-MS/MS analysis of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA) in serum after protein precipitation using in-house synthesized deuterated internal standard
(eingereicht)

Wohlfarth A, Roth N, Auwärter V
Pharmacokinetics and metabolism of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA) in humans after intravenous and oral administration
(in Vorbereitung)

2. als Co-Autor

Thierauf A, Halter CC, Rana S, Auwärter V, Wohlfarth A, Wurst FM, et al.
Urine tested positive for ethyl glucuronide after trace amounts of ethanol
Addiction (2009); 104(12): 2007-2012

Auwärter V, Wohlfarth A, Traber J, Thieme D, Weinmann W
Hair analysis for $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinolic acid A - New insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair
Forensic Sci Int (2010); 196(1-3): 10-13

Thierauf A, Gnann H, Wohlfarth A, Auwärter V, Perdekamp MG, Buttler KJ, et al.

Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulphate after the consumption of "non-alcoholic" beer

Forensic Sci Int (2010); 202(1-3): 82-85

Thierauf A, Wohlfarth A, Auwärter V, Perdekamp MG, Wurst FM, Weinmann W.

Urine tested positive for ethyl glucuronide and ethyl sulfate after the consumption of yeast and sugar

Forensic Sci Int (2010); 202(1-3): e45-47

Thierauf A, Kempf J, Perdekamp MG, Auwärter V, Gnann H, Wohlfarth A, et al.

Ethyl sulphate and ethyl glucuronide in vitreous humor as postmortem evidence marker for ethanol consumption prior to death

Forensic Sci Int (2011); 210(1-3): 63-68

Roth N, Wohlfarth A, Auwärter V

Regioselective synthesis of THCA-A and THCA-B by reaction of Δ^9 -THC with magnesium methyl carbonate (MMC)

Toxichem Krimtech (2011); 79: 316-319

Roth N, Wohlfarth A, Auwärter V

Synthesis of isotopically labeled tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A-D₃) by reaction of delta-9-tetrahydrocannabinol-D₃ with magnesium methyl carbonate (in Vorbereitung)

Elling R, Haghiri S, Wohlfarth A, Hermanns-Clausen M

Prolonged hypoglycemia after a suicidal ingestion of repaglinide with unexpected slow plasma elimination

(in Vorbereitung)

Vorträge

Wohlfarth A, Thierauf A, Weinmann W, Halter C

Ethylglucuronidkonzentrationen nach hohen, mittleren und kleinen Trinkmengen

38. Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner, Mainz, April 2008

Wohlfarth A, Weinmann W

Anwendung von LC-MS/MS-Analytik in der Forensischen Toxikologie

Symposium der Arbeitsgruppe Klinische Chemie der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Kloster Banz, November 2009

Wohlfarth A, Dresen S, Auwärter V, Weinmann W

Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode für neue Designerdrogen

Arbeitskreissemnar Professor Schubert, Freiburg, Januar 2010

Wohlfarth A, Auwärter, Weinmann W

Intoxikation mit der neuen Designerdroge Mephedron

40. Treffen der Oberrheinischen Rechtsmediziner, Heidelberg, Februar 2010

Wohlfarth A, Dresen S, Weinmann W, Auwärter A

Cocktail approach for phenotyping of five major CYP450 isoenzymes: methodology and pilot test

48th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Bonn, August 2010

Wohlfarth A, Dresen S, Auwärter A

Phänotypisierung von fünf CYP450-Enzymen: Methodik und Auswertung einer Pilotstudie

89. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Berlin, September 2010

Wohlfarth A, Roth N, Auwärter V

Pharmacokinetic of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA) after intravenous administration

49th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), San Francisco, USA, September 2011

Wohlfarth A, Roth N, Auwärter V

Pharmacokinetics and metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA) after intravenous and oral administration

Arbeitskreiseminar Professor Schubert, November 2011

Posterpräsentationen

Wohlfarth A, Halter C, Gnann H, Wurst FM, Weinmann W

Ethylglucuronidkonzentrationen in Urin nach geringen Trinkmengen

1. Deutscher Suchtkongress, Mannheim, Juni 2008

Wohlfarth A, Halter C, Auwärter V, Gnann H, Wurst FM, Weinmann W

Direkte Alkoholkonsummarker in der Routineanwendung

87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM), Dresden, September 2008

Wohlfarth A, Dresen S, Weinmann W

LC-MS/MS Screening auf neue Designerdrogen

XVI. Mosbacher Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh), Mosbach, April 2009

Wohlfarth A, Dresen S, Weinmann W

LC-MS/MS Screening Method for new Designer Drugs

47th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Genf, Schweiz, August 2009

Wohlfarth A, Toepfner NM, Hermanns-Clausen M, Auwärter V

Clozapine intoxication of a 13-month-old girl: Quantification of clozapine and its main metabolites in serum and urine samples over 11 days

XVII. Mosbacher Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh), Mosbach, April 2011 und 49th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), San Francisco, USA, September 2011

Wohlfarth A, Mahler H, Auwärter V

Rapid Isolation of Tetrahydrocannabinolic Acid A From Cannabis Sativa Using Flash Chromatography

49th Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), San Francisco, USA, September 2011

Abkürzungsverzeichnis

11-OH-THC	11-Hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol
11-OH-THCA	11-Hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure A
4'-OH-THCA-COOH	11-Nor-9-carboxy-4'-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure A
5-OH-OMP	5-Hydroxy-Omeprazol
8-OH-THCA-COOH	11-Nor-9-carboxy-8-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure A
8 α ,11-Bis-OH-THCA	8 α ,11-Bis-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure A
8 α -OH-THCA	8 α -Hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure A
8 β ,11-Bis-OH-THCA	8 β ,11-Bis-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure A
8 β -OH-THCA	8 β -Hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure A
9,10-Bis-OH-HHCA	9,10-Bis-hydroxy-hexahydrocannabinolsäure A
Abs.	Absatz
AIC	Akaike criterion
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation
AUC	area under the curve
AUMC	area under the moment curve
BMI	Body-Mass-Index
BSTFA	N-Bis-(Trimethylsilyl)-fluoracetamid
BtMG	Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln
BV	Bioverfügbarkeit
C _{max}	Maximalkonzentration
C ₀	Konzentration zum Zeitpunkt Null
CAD	collision activated dissociation
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB ₁ , CB ₂	Cannabinoidrezeptoren vom Typ 1 bzw. Typ 2
CBC	Cannabichromen
CBCA	Cannabichromensäure (cannabichromic acid)
CBD	Cannabidiol
CBDA	Cannabidiolsäure (cannabidiolic acid)
CBG	Cannabigerol
CBGA	Cannabigerolsäure (cannabigerolic acid)
CBN	Cannabinol
CE	collision energy
CEP	cell entrance potential
CIF	Cannabis-Influence-Factor
CL	Clearance
COFF	Coffein
CUR	curtain gas
CXP	cell exit potential
CYP	Cytochrom P450
D ₃ -THC	Δ 9-Tetrahydrocannabinol, dreifach deuteriert
D ₃ -THC-COOH	11-Nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol, dreifach deuteriert

DAD	Dioden-Array-Detektion
DEX	Dextrorphan
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP	declustering potential
DXM	Dextromethorphan
EI	electron impact ionization
EP	entrance potential
EPI	enhanced product ion scan
ESI	electrospray ionization
FeV	Fahrerlaubnisverordnung
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GHB	gamma-Hydroxybuttersäure
Gluc	Glucuronid
GNU	im Rahmen des GNU-Projekts entwickeltes, freies Betriebssystem
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigchromatographie mit Dioden-Array-Detektion
IDA	information dependent acquisition
IS	Interner Standard
k	Geschwindigkeitskonstante
KAL	Kalibration
LADME	Liberation-Absorption-Distribution-Metabolisierung-Elimination
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
LS	least squares
m/z	Masse-Ladung-Verhältnis
MID	Midazolam
MRM	multiple reaction monitoring
MRT	mean residence time
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-Trifluoracetamid
MTBE	Methyl-tert-butylether
NADP ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduzierte Form
OMP	Omeprazol
p	Signifikanzwert
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PDI	Polydispersitätsindex
PFAA	Pentafluorpropionsäureanhydrid
PX	Paraxanthin
Q	Quadrupol
QC	Qualitätskontrolle

R	Statistiksoftware
r^2	Korrelationskoeffizient
RP	reversed phase
RSD	relative standard deviation
S/N	signal to noise ratio
SC	Schwartz criterion
SD	standard deviation
SIM	selected ion monitoring
SPE	solid phase extraction
ssp.	Subspecies
StGB	Strafgesetzbuch
stopp	Strafprozessordnung
StVG	Straßenverkehrsgesetz
$t_{1/2 \alpha}$	Eliminationshalbwertszeit in der alpha-Phase
$t_{1/2 \beta}$	Eliminationshalbwertszeit in der beta-Phase
$t_{1/2 \gamma}$	Eliminationshalbwertszeit in der gamma-Phase
t_{max}	Zeitpunkt der Maximalkonzentration
TFAA	Triflouracetanhydrid
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
THCA	Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A
THCA-8-on	Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure-A-8-on
THCA-B	Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure B
THCA-COOH	11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure A
THC-COOH	11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol
TIC	Totalionenchromatogramm
TMS	Trimethylsilan
TOLB	Tolbutamid
t_R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett
V_{ss}	Verteilungsvolumen im Steady State
V_{term}	terminale Eliminationshalbwertszeit
V_z	Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment
WT	Wildtyp
XIC	extrahiertes Ionenchromatogramm

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Motivation	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	1
1.3	Gliederung der Arbeit	2
2	Cannabis	3
2.1	Die Cannabispflanze – Herkunft, Taxonomie und Lebenszyklus	3
2.2	Cannabiskonsum in Deutschland und weltweit	5
2.3	Inhaltsstoffe von Cannabis	6
2.4	Pharmakodynamik von THC	10
2.5	Pharmakokinetik von THC	12
2.5.1	Resorption	12
2.5.2	Verteilung	13
2.5.3	Metabolismus	13
2.5.4	Elimination	14
2.6	Fahrverhalten unter Cannabis	17
2.7	Rechtliche Situation mit Fokus auf das Straßenverkehrsrecht	19
2.8	Interpretation gemessener Cannabinoidkonzentrationen	21
2.8.1	Korrelation von THC-Plasmakonzentration und akuter Wirkung	21
2.8.2	Unterscheidung von inhalativem und oralem Konsum	23
2.8.3	Unterscheidung von gelegentlichem und chronischem Konsum	23
2.8.4	Unterscheidung von kürzlich stattgefundenem und länger zurückliegendem Konsum	23
2.9	Bisherige Erkenntnisse zu THCA	26
3	Pharmakokinetische Berechnungen	31
3.1	Kompartimentanalyse	33
3.2	Nicht-Kompartimentanalyse	36
4	Präparative und analytische Techniken	39
4.1	Flash-Chromatographie mit UV-Detektion	39
4.2	Hochdruckflüssigchromatographie-Dioden-array-Detektion (HPLC-DAD)	40
4.3	Hochdruckflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)	40
4.4	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	41

5	Vorarbeiten zur Humanstudie	43
5.1	Phänotypisierung	43
5.1.1	Auswahl der Testsubstanzen	44
5.1.2	Auswahl der Phänotypisierungsindices	44
5.1.3	Entwicklung der Extraktions- und Analytikmethode	47
5.1.4	Validierung der Extraktions- und Analytikmethode	52
5.1.5	Genotypisierung	55
5.2	Isolierung der THCA aus Cannabisextrakt	56
5.2.1	Referenzmaterialien, Chemikalien und Geräte	56
5.2.2	Herkunft und Vorreinigung des Ausgangsmaterials	57
5.2.3	Flash-Chromatographie mit Normalphase	58
5.2.4	Flash-Chromatographie mit Umkehrphase	59
5.2.5	Reinheitsprüfungen und Ergebnisse	60
5.3	LC-MS/MS-Analytik von THCA, ihrer Metaboliten und THC	66
5.3.1	Entwicklung der Extraktions- und Analytikmethode	66
5.3.2	Validierung der Extraktions- und Analysenmethode	76
5.4	Metabolismusstudien <i>in vitro</i>	80
5.4.1	Durchführung der Inkubationsexperimente	80
5.4.2	LC-MS/MS-Analytik der Inkubate	80
5.4.3	Auswertung	81
5.5	Herstellung der Darreichungsformen für die Humanstudie	86
5.5.1	Herstellung der THCA-Kapseln	86
5.5.2	Herstellung und Prüfung der THCA-Emulsion zur Injektion	86
6	Die Humanstudie: Durchführung, Ergebnisse und Diskussion	91
6.1	Probanden	91
6.2	Studienprotokoll	93
6.3	THCA in Serum	95
6.3.1	Intravenöse Applikation	96
6.3.2	Orale Applikation	100
6.4	THCA-Metabolite in Serum	107
6.4.1	Intravenöse Applikation	107
6.4.2	Orale Applikation	112
6.5	THCA und ihre Metabolite in Urin	117

6.5.1	Intravenöse Applikation	117
6.5.2	Orale Applikation	120
6.6	Phänotypisierung und Genotypisierung.....	122
6.7	Pharmakokinetische Berechnungen: intravenöse Applikation.....	125
6.7.1	Nicht-Kompartimentanalyse	125
6.7.2	Kompartimentanalyse.....	126
6.8	Pharmakokinetische Berechnungen: orale Applikation	132
6.8.1	Nicht-Kompartimentanalyse	132
6.8.2	Kompartimentanalyse.....	133
6.9	Statistische Analyse	136
7	Schlussfolgerungen	141
7.1	THCA-Pharmakokinetik im Vergleich	141
7.2	THCA-Metabolismus: Analogien zu THC, Besonderheiten und Interpretationsmöglichkeiten..	142
7.3	THCA als Kurzzeitmarker für Cannabiskonsum?	143
7.4	Andere Einsatzgebiete in der Forensischen Toxikologie.....	145
7.4.1	Unterscheidung von Dronabinol- und Cannabiskonsum.....	145
7.4.2	Unterscheidung von oralem und inhalativem Konsum	145
7.5	Zukunftsvision	146
8	Zusammenfassung	149
9	Literaturverzeichnis.....	153
10	Lebenslauf.....	161

1 Einleitung

1.1 Motivation

Cannabis, ein jahrtausendealtes Rausch- und Heilmittel, stellt die forensische Toxikologie noch immer vor ein bis heute nicht zufriedenstellend gelöstes Problem - den sicheren Beweis eines akuten Rauscheffektes anhand von einzelnen Blut- oder Urinbefunden. In zahlreichen Situationen, insbesondere bei Straßenverkehrsdelikten, ist eine gerichtsfeste Aussage über eine Beeinflussung durch Cannabiskonsum jedoch von größtem Interesse. Und auch außerhalb der Forensik besteht Bedarf an eindeutiger Interpretation von analytischen Befunden, z. B. im Leistungssport, wo Cannabis als Dopingmittel während, nicht aber außerhalb des Wettkampfs untersagt ist. Der Cannabis-Hauptwirkstoff Tetrahydrocannabinol (THC) und seine zwei Hauptmetabolite sind zwar problemlos nachweisbar, doch führt die äußerst komplexe Pharmakokinetik von THC dazu, dass die gemessenen Konzentrationen nicht mit einem akuten Effekt korreliert werden können. Als Grund dafür wird vor allem die Akkumulation von THC und seinen Metaboliten in tieferen Kompartimenten angesehen.

Aus den Ergebnissen vorangegangener Forschungsprojekte ergab sich die Vermutung, dass Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA), die nicht psychoaktive Vorläufersubstanz von THC in der Cannabispflanze, bei der Lösung dieses Problems behilflich sein könnte. Über den Umweg, mit Hilfe von THCA den Zeitpunkt des Cannabiskonsums genauer zu ermitteln, ließe sich ein akuter Effekt besser abschätzen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass THCA eine andere Pharmakokinetik besitzt, die zu einem schnellen Abbau, einer kurzen Nachweisbarkeit und einem damit verkleinerten Zeitfenster für den zurückliegenden Cannabiskonsum führen würde. Um diese These zu überprüfen, sind umfangreiche Kenntnisse zu Pharmakokinetik und Metabolismus von THCA Voraussetzung.

Die Strukturformeln von THCA und THC sind in Abb. 1 dargestellt.

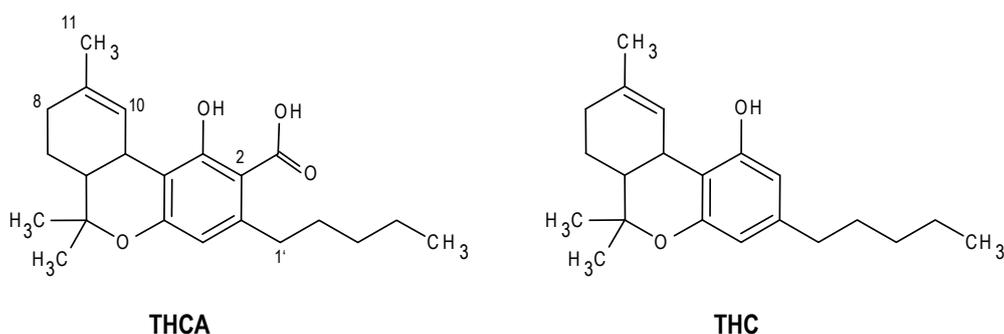


Abb. 1: Strukturformeln von Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA) und Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC)

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die pharmakokinetischen Eigenschaften und Stoffwechselwege von THCA im menschlichen Körper aufzuklären. Ihr Kernstück ist eine Humanstudie mit 16 Probanden, denen die Substanz intravenös und oral verabreicht wurde. Anhand der Vorbereitungsversuche und der gewonnenen Daten aus der Studie wurden die grundlegenden pharmakokinetischen Parameter errech-

net, ein theoretisches Kompartiment-Modell entwickelt, die am Metabolismus beteiligten Enzyme identifiziert und Haupt- und Nebenmetabolite in Serum und Urin ermittelt.

Abgesehen von der Frage, ob THCA das Potential hat, ein zukünftiger Marker für einen kurz zurückliegenden Cannabiskonsum zu werden, soll auch geklärt werden, ob THCA für die Klärung anderer forensisch interessanter Fragestellungen in Frage kommt. Dazu gehört z. B. die Unterscheidung von inhalativem und oralem sowie von illegalem Cannabis- und legalem Marinolikonsum. Die Daten können aber auch der medizinischen Forschung zugute kommen, die sich auf der Suche nach neuen Wirkstoffen zunehmend für andere Cannabisinhaltsstoffe als THC interessiert.

1.3 Gliederung der Arbeit

Die Arbeit gliedert sich in einen theoretischen (Kapitel 2 bis 4) und einen praktischen Teil (Kapitel 5 und 6) mit abschließenden Schlussfolgerungen und Zusammenfassung (Kapitel 7 und 8).

Kapitel 2 gibt einen theoretischen Überblick über Cannabis. Ein Schwerpunkt ist die Pharmakokinetik von THC und die bisherigen Bemühungen, gemessene Serum- und Urinkonzentrationen zu interpretieren. Es folgt in Kapitel 3 eine kurze Zusammenfassung der Formeln und der Prinzipien der pharmakokinetischen Analysen, die den späteren Berechnungen der pharmakokinetischen Parameter zugrunde liegen. Kapitel 4 erläutert die präparativen und analytischen Techniken, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

Alle Vorarbeiten, die der Vorbereitung der Humanstudie dienen, sind in Kapitel 5 beschrieben. Dazu gehören die Entwicklung einer Phänotypisierungsmethode für fünf CYP450-Isoenzyme, die Isolierung der benötigten THCA aus Cannabisrohmaterial, die Entwicklung und Validierung einer Analysenmethode für THCA und ihre Metabolite, ein *in vitro* Versuch zum Metabolismus sowie die Herstellung und Testung der „Studienmedikation“. Die Humanstudie – ihre Durchführung und ihre Resultate – ist Inhalt von Kapitel 6. THCA-Konzentrationsverläufe nach intravenöser und oraler Gabe, Metabolitenprofile in Serum und Urin, die Ergebnisse der Phänotypisierung und der Genotypisierung sowie die pharmakokinetischen Analysen finden sich dort und werden an dieser Stelle diskutiert. Schlussfolgerungen enthält Kapitel 7, wo auch die zu Beginn aufgeworfenen Fragen beantwortet werden. Eine Zusammenfassung findet sich in Kapitel 8.

2 Cannabis

2.1 Die Cannabispflanze – Herkunft, Taxonomie und Lebenszyklus

Cannabis ist eine der ältesten Kulturpflanzen der Menschheitsgeschichte, die seit der Neusteinzeit zur Gewinnung von Fasern, essbaren Samen und Öl sowie als Arzneipflanze und berauschende Droge verwendet wird [1]. Vermutlich stammt die Pflanze aus der Gegend des nordwestlichen Himalayas, möglicherweise reichte ihr ursprüngliches Verbreitungsgebiet auch über Südasien bis nach China. Älteste Zeugnisse der Anwendung von Cannabis finden sich in China, Indien und den antiken Hochkulturen Mesopotamiens. Von dort aus verbreitete sich Cannabis in die ganze Welt und wird heute auf der nördlichen Halbkugel vom Äquator bis zum 60. Breitengrad sowie in weiten Teilen der südlichen Hemisphäre kultiviert [1, 2].

Man vermutet zwei Diversitätszentren von Cannabis: Während sich die Kulturen in Europa und Ostasien auf Faserproduktion und Samengewinnung aus Cannabis fokussierten und die Pflanzen aus diesen Regionen einen THC-Gehalt von < 1 % Trockengewicht aufweisen, stand in Indien, Afrika, Südasien und dem Mittleren Osten die psychoaktive Wirkung im Vordergrund. Der überwiegende Teil der Pflanzen aus diesen Gebieten enthält daher deutlich mehr THC, meist zwischen 5 und 10 % [2]. Die Nutzung von Cannabis für unterschiedliche Zwecke, die mit Auswahl und Züchtung der gewünschten Eigenschaften einhergeht, und der Anbau unter verschiedenen klimatischen Bedingungen haben zu vielfältigen Wachstumsformen und einem großen Spektrum an Inhaltsstoffen geführt.

Dies erschwert auch die taxonomische Einordnung von Cannabis. Ausgehend von Carl von Linné, der *Cannabis sativa* L. als einzige Spezies der Gattung Cannabis einordnete, diskutierten Botaniker – darunter Lamarck und Vavilov – diverse Konzepte. Anhand von Untersuchungen der chemischen, physiologischen und morphologischen Eigenschaften unterteilten sie Cannabis entweder in mehrere Arten oder schlugen verschiedene Unterarten und Varietäten vor [3-8].

Genetische Untersuchungen von 157 Cannabispopulationen aus allen Regionen der Erde widerlegten die Annahme, dass die Gattung Cannabis nur eine Art enthält und bestätigten die These, dass sie stattdessen aus zwei fundamental von einander getrennten Genpools besteht: *Cannabis sativa* und *Cannabis indica* [1]. Zusätzlich wurden in denselben Proben die Konzentrationen der verschiedenen Cannabinoide und der genetische Hintergrund der biosynthetisch aktiven Enzyme untersucht [9]. Auch deren Verteilungsmuster bzw. Allelhäufigkeiten lassen auf zwei verschiedene Arten schließen. Nach heutigem Kenntnisstand beschreibt eine Synthese der Konzepte der Vergangenheit mit all ihren Unterarten und Varietäten die Taxonomie der Gattung *Cannabis* am besten. Die Taxonomie nach heutigen Erkenntnissen, die Einteilung in Untergruppen sowie deren Eigenschaften und Vorkommen zeigt Abb. 2.

In Bezug auf den Cannabinoidgehalt können Cannabispflanzen verschiedenen Chemotypen zugeordnet werden. Nach Fetterman et al. [10] bzw. Small und Beckstead [11] lassen sich über die Bestimmung des Verhältnisses von Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD) drei Chemotypen unterscheiden:

- Chemotyp I: THC/CBD-Verhältnis übersteigt 1 bei Weitem, THC-Gehalt > 0,3 %, CBD-Gehalt < 0,5 % - Verwendung als Drogenhanf
- Chemotyp II: THC/CBD-Verhältnis liegt bei etwa 1, THC-Gehalt > 0,3 %, CBD-Gehalt > 0,5 %
- Chemotyp III: THC/CBD-Verhältnis liegt weit unter 1 %, THC-Gehalt < 0,3 %, CBD-Gehalt > 0,5 % - Verwendung als Faserhanf

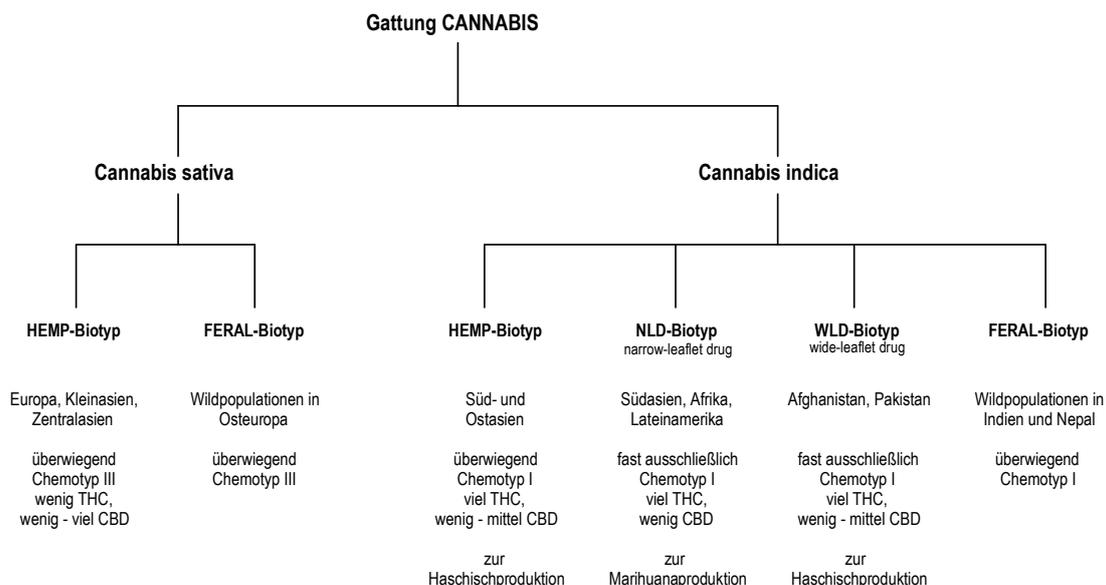


Abb. 2: Taxonomie der Gattung *Cannabis*

Bezeichnung der Biotypen nach Hillig [9], hemp - Hanf, feral - wild, narrow-leaflet drug - schmalblättriger Drogenhanf, wide-leaflet drug - breitblättriger Drogenhanf

Cannabis ist eine einjährige Pflanze mit einem Lebenszyklus von etwa vier bis sechs Monaten und in der Regel diözisch - mit männlichen und weiblichen Blüten auf getrennten Pflanzen. Sie gedeiht in soniger Umgebung auf nährstoff- und wasserreichen Böden und kann am Ende der Wachstumsperiode eine Höhe von bis zu fünf Metern erreichen. Nach Keimung der Samen wachsen die jungen Pflanzen heran und bilden Triebe und Blätter, bis eine Verkürzung der Tageslänge dazu führt, dass sich traubenförmige Blüten entwickeln. Ungefähr vier bis sechs Wochen nach Windbestäubung der weiblichen Pflanzen und noch vor der Samenreife sterben die männlichen Pflanzen ab. Die reifen Samen fallen schließlich zu Boden und können, wenn sie nicht von Menschen geerntet oder von Tieren gefressen werden, im darauf folgenden Jahr aufgehen [2].

Bei der Kultivierung von Cannabis zur Faser- und Samengewinnung folgen die Pflanzen diesem natürlichen Zyklus, nicht dagegen beim Anbau für die Drogenproduktion. Da hierfür nur die weiblichen Pflanzen von Interesse sind, die Pflanzen möglichst einheitlich und ertragreich sein sollen und Hanfsamen aufgrund von Verkaufsverboten in vielen Ländern schwer erhältlich sind, bevorzugen die Produzenten die vegetative Vermehrung der weiblichen Pflanzen. Ausgehend von Mutterpflanzen, die permanent in einem vegetativen Stadium gehalten werden, können über lange Zeit Stecklinge entnommen, eingepflanzt und unter den entsprechenden Bedingungen zur Blüte gebracht werden. Der Anbau der Pflanzen in Innenräumen und unter künstlichem Licht, der seit den neunziger Jahren verstärkt praktiziert wird, erleichtert die Steuerung der Wachstumsbedingungen. Im Idealfall können pro Quadratmeter und Jahr bis zu 1,2 Kilogramm getrocknete Blütenstände geerntet werden [12].

2.2 Cannabiskonsum in Deutschland und weltweit

Cannabis ist nach wie vor im Vergleich zu Opiaten, Cocain, Amphetamin und Ecstasy die Droge, die weltweit am meisten konsumiert wird. Eine 2008 vom United Nations Office on Drugs and Crime durchgeführte umfassende Untersuchung schätzte die Zahl der Personen zwischen 15 und 64 Jahren, die im vorangegangenen Jahr mindestens einmal Cannabis konsumiert hatten, auf 129 bis 191 Millionen. Für Europa wurde die Zahl der Konsumenten auf 29 Millionen beziffert [13]. Gemäß dem Drogen- und Suchtbericht 2011 der Bundesregierung lag 2010 in Deutschland die Prävalenz für Cannabiskonsum in den letzten 12 Monaten bei Jugendlichen zwischen 12 und 17 Jahren bei 5 %, bei Erwachsenen zwischen 18 und 25 Jahren bei 12,7 % [14].

Cannabis wird überwiegend geraucht, seltener oral konsumiert, und zwar in Form von:

- Marihuana, den getrockneten Blütenstände der weiblichen Pflanze, deren Harz Cannabinoide in hoher Konzentration enthält. Der Gesamt-THC-Gehalt ist variabel zwischen 1-20 % [12], wobei traditionell angebaute Pflanzen in der Regel unter 10 %, Sinsemilla-Produkte aus Indoor-Plantagen über 10 % THC liegen [15].
- Haschisch, dem getrockneten Harz, das durch Abreiben oder Absieben der harzenthaltenden Trichome und anschließendes Verpressen zu Platten gewonnen wird. Der Gesamt-THC-Gehalt liegt ebenfalls variabel zwischen 1-20 % [12].
- Haschischöl, dem durch Extraktion von Marihuana gewonnenen Öl, das als das potenteste aller Cannabisprodukte angesehen wird, in Europa aber nicht sehr verbreitet ist [16]. Der Gesamt-THC-Gehalt lag in umfangreichen Untersuchungen in beschlagnahmtem Material in den USA von 1993 bis 2008 bei durchschnittlich 17 % [15], kann aber auf einen Gehalt von bis zu 85 % ansteigen [17].

Die Suchtstoffkonvention der Vereinten Nationen verpflichtet jeden Unterzeichnerstaat, die Verwendung von Cannabis auf ausschließlich medizinische oder wissenschaftliche Zwecke zu beschränken sowie den Besitz, Kauf und Anbau für den persönlichen Verbrauch unter Strafe zu stellen [14]. In Deutschland sind daher Anbau, Herstellung, Handel, Einfuhr, Abgabe, Veräußerung, Erwerb und Besitz von Cannabispflanzen oder -pflanzenteilen nach dem Betäubungsmittelgesetz verboten und strafbar. Bisherige Ausnahmen dieses umfassenden Verbots sind:

- die Definition von Dronabinol als verkehrs- und verschreibungsfähiges Betäubungsmittel (Anlage III BtmG),
- die Importerlaubnis für die Fertigarzneimittel Marinol® aus dem Ausland und
- die Möglichkeit, in Einzelfällen eine Ausnahmegenehmigung zur Anwendung zu medizinischen oder wissenschaftlichen Zwecken zu erhalten

Eine Neuerung trat am 11. Mai 2011 in Kraft. Seitdem findet sich Cannabis im Betäubungsmittelgesetz in allen drei Anlagen wieder. In Anlage I ist Cannabis (Pflanzen, Pflanzenteile, Marihuana, Haschisch) wie bisher als nicht verkehrs- und nicht verschreibungsfähiges Betäubungsmittel aufgeführt, mit einigen Ausnahmeregelungen bezüglich Faserhanf. In der aktuellen Version findet sich nun auch in der Anlage II der Punkt „Cannabis, sofern es zur Herstellung von Zubereitungen zu medizinischen Zwecken bestimmt ist“ und in Anlage III „Cannabis nur in Zubereitungen, die als Fertigarzneimittel zugelassen sind“. Daraufhin kam im Juli 2011 das erste Fertigarzneimittel (Sativex®) in Deutschland auf den Markt, das THC und Cannabidiol enthält und bei Spastik bei Multipler Sklerose indiziert ist.

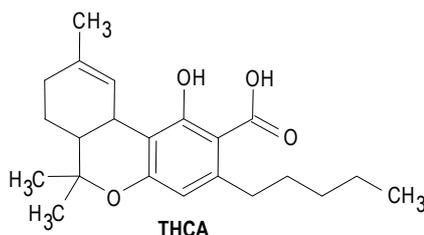
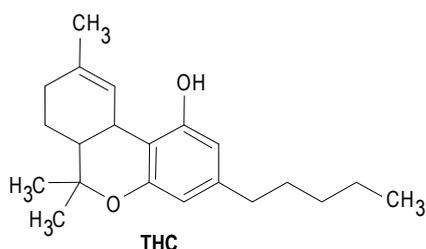
2.3 Inhaltsstoffe von Cannabis

In umfangreichen Studien zu den natürlichen Bestandteilen der Cannabispflanze ließen sich insgesamt 489 chemische Verbindungen strukturell genau definieren [18]. Diese gehören folgenden Klassen an:

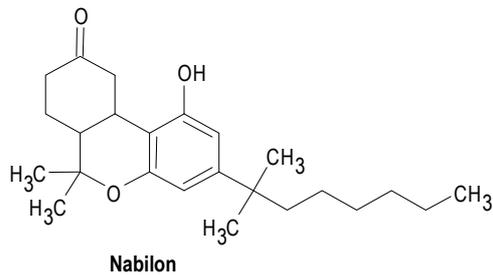
- Cannabinoide
u.a. Cannabinoide vom Cannabigerol-, Cannabichromen-, Cannabidiol-, Δ^9 -THC-, Cannabinol- und Cannabinodiol-Typ, Δ^8 -THC und andere Cannabinoide
- Stickstoffverbindungen
- Aminosäuren
- Proteine, Glykoproteine und Enzyme
- Zucker und verwandte Verbindungen
- Kohlenwasserstoffe
- einfache Alkohole, Aldehyde, Ketone und Säuren
- Fettsäuren
Cannabisöl ist bekannt für seinen Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Linolsäure (essentielle Fettsäure), Olein-, Stearin- und Palmitinsäure kommen am häufigsten vor
- einfache Ester und Laktone
- Steroide
- Terpene
verantwortlich für den cannabistypischen Geruch
- nichtcannabinoide Phenole
- Flavonoide
- Vitamine, Pigmente und Spurenelemente

Cannabis ist vor allem prominent aufgrund der Cannabinoide – eine Stoffklasse, die ausschließlich in dieser Pflanzengattung vorkommt. Insgesamt über 70 Cannabinoide konnten bisher in der Cannabispflanze identifiziert werden [19]. Sie sind prinzipiell in allen Pflanzenteilen enthalten, reichern sich aber vor allem im Harz der Blütenstände an, insbesondere jener der weiblichen Pflanzen. In der Vergangenheit definierte man „Cannabinoide“ über die Struktur und verstand darunter die in Cannabis enthaltenen typischen C_{21} -Körper und deren Abbauprodukte. Inzwischen ist man dazu übergegangen, die Definition weiterzufassen und auf der pharmakologischen Wirkung zu gründen. Danach steht der Begriff „Cannabinoide“ für alle Liganden, die an Cannabinoidrezeptoren binden, und verwandte Substanzen. Neben den sogenannten „klassischen“ Phytocannabinoiden zählen nun auch endogene Cannabinoidrezeptor-Liganden und synthetische Analoga dazu, die mit dem C_{21} -Grundkörper wenig oder nichts mehr gemeinsam haben [20].

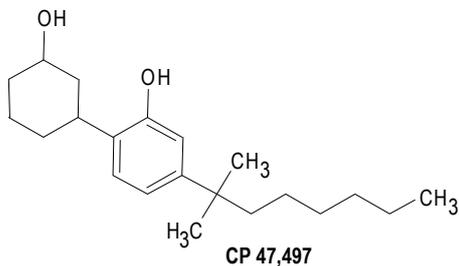
- klassisch, pflanzlichen Ursprungs



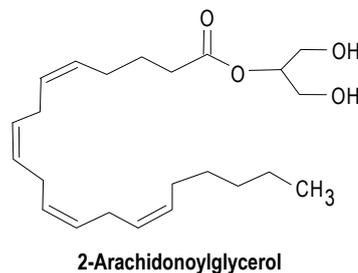
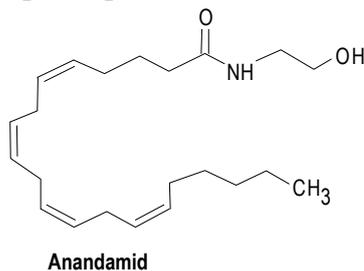
- klassisch, synthetisch



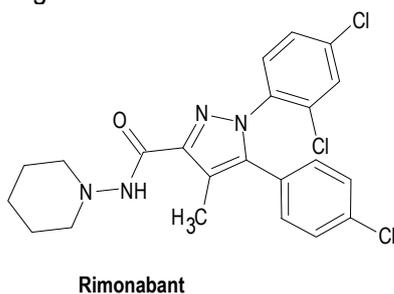
- nicht klassisch, synthetisch



- endogene Agonisten



- Antagonist



Die Biogenese der Cannabinoide wurde in den neunziger Jahren des 20. Jahrhunderts aufgeklärt. Der entscheidende Schritt gelang Taura et al. 1995 mit der Entdeckung der THCA-Synthase, mit der sie die Annahme widerlegten, dass THCA durch Ringschluss aus Cannabidiolsäure hervorgehe [21]. Nach heutigem Wissensstand verläuft die Biosynthese der Cannabinoide ausgehend von Geranylphosphat und Olivetolsäure. Die daraus gebildete Cannabigerolsäure (CBGA) nimmt eine Schlüsselstellung bei der weiteren Synthese verschiedener Cannabinoidtypen ein. Sie ist die Vorstufe für Cannabidiolsäure, Tetrahydrocannabinolsäure A und Cannabichromensäure, die jeweils durch Katalyse einer bestimmten

Oxidoreduktase entstehen: der CBDA-Synthase, der THCA-Synthase bzw. der CBCA-Synthase [22]. Von diesen drei Vorstufen lassen sich durch nicht-enzymatische Decarboxylierung, Isomerisierung, Reduzierung etc. alle weiteren Phytocannabinoide ableiten. Eine Übersicht des Biogeneseweges und weitere Reaktionen zeigt Abb. 3.

Die THCA-Synthase ist stereoselektiv, d. h. aus der Reaktion mit Cannabigerolsäure geht ausschließlich das *trans*-Isomer der THCA hervor. Substrat ist Cannabigerolsäure, deren Carboxylgruppe essentiell für die Reaktion ist. Versuche, das neutrale Cannabigerol mit Hilfe der THCA-Synthase zu THC umzusetzen, schlugen fehl. Interessanterweise wird die THCA-Synthase von den sekretorischen Zellen der Drüsenhaare in den Subkutikularraum abgegeben, wo auch die höchste Enzymaktivität messbar ist und demnach die THCA-Biosynthese abläuft. Eine Sekretion nach außen ist sinnvoll, um die Pflanze nicht zu schädigen, da bei der Reaktion neben THCA auch Wasserstoffperoxid entsteht. Hinzu kommt, dass THCA nicht nur für Insekten, sondern auch für die Cannabispflanze selbst zelltoxisch ist. Wie viele sekundäre Pflanzenstoffe dient THCA wahrscheinlich als effektiver chemischer Abwehrstoff gegen Fraßfeinde [22].

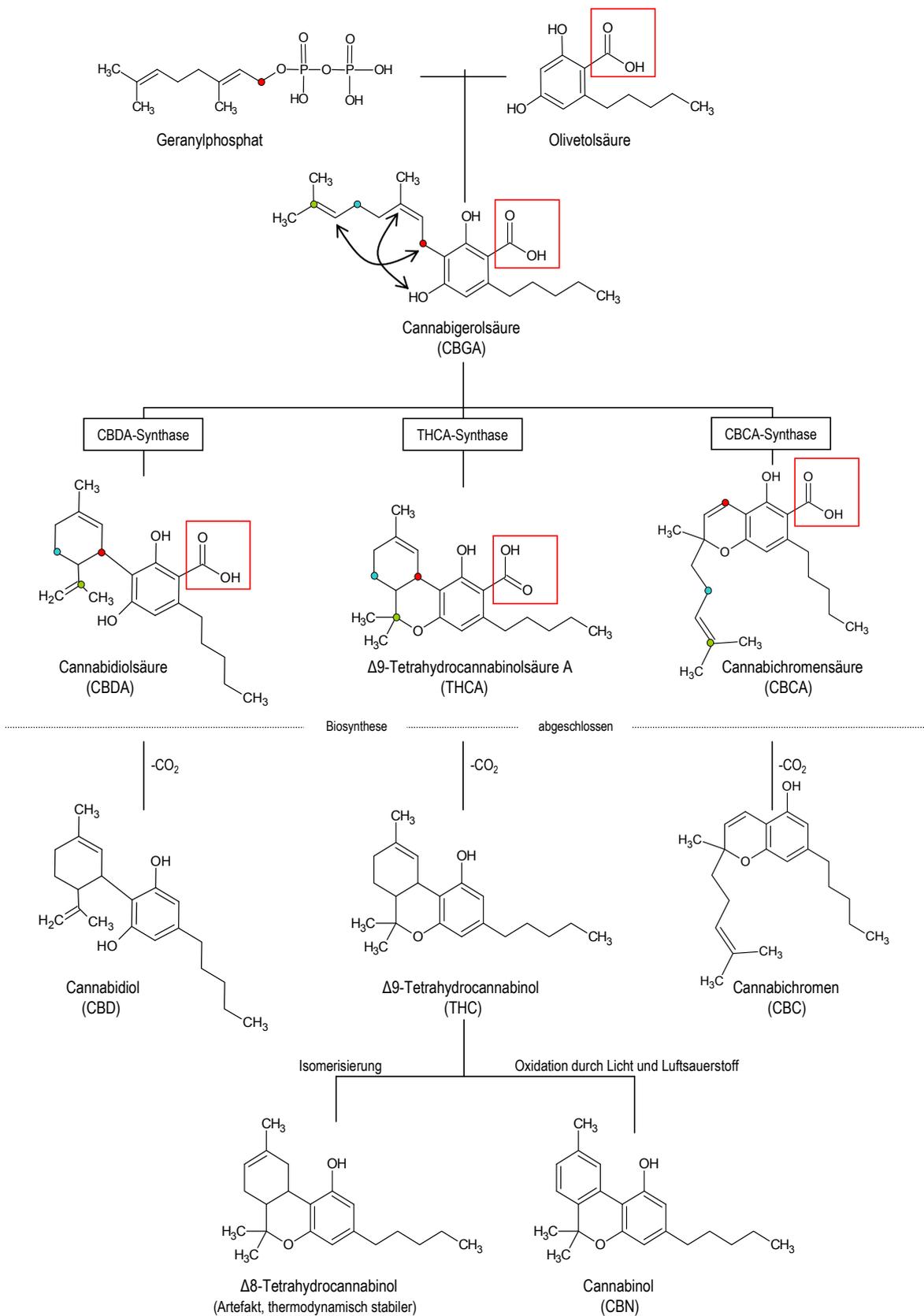


Abb. 3: Biogenese verschiedener Cannabinoidtypen ausgehend von Geranylphosphat und Olivetolsäure über die Zwischenstufe Cannabigerolsäure und sich anschließende Reaktionen (Decarboxylierung, Isomerisierung und Oxidation)

2.4 Pharmakodynamik von THC

THC wirkt über Cannabinoid-Rezeptoren, für die auch physiologische Liganden existieren. Die Erkenntnis, dass die Wirkungen von Cannabis über das sogenannte Endocannabinoidsystem vermittelt werden, ist das Ergebnis langer Forschung und stellte sich „schrittweise“ ein. Mit der Entdeckung des endogenen Opioidsystems Ende der 1970er Jahre hatte sich die generelle Vorstellung etabliert, dass psychoaktive Moleküle ihre Wirkung über analoge Rezeptoren vermitteln und für diese Rezeptoren körpereigene Liganden existieren können. Nach erfolglosen Versuchen, mittels radioaktiv markiertem THC die Bindungsstellen zu lokalisieren, konnten Martin et al. [23] Struktur-Wirkungs-Beziehungen herleiten, die die Vermutung nahe legten, dass ein strukturell definiertes Target (d. h. ein Rezeptor) existiert. Die ersten Experimente endeten erfolglos, weil THC nur eine geringe Bindungsaffinität zu den Rezeptoren hat. Die Vorstellung, dass THC aufgrund seiner Lipophilie über unspezifische Membraninteraktionen wirkt – wie damals diskutiert –, wurde damit immer unwahrscheinlicher. 1990 bestimmten Herkenham et al. [24] die Verteilung von Cannabinoid-Bindungsstellen im Körper mit Hilfe des extrem potenten Agonisten CP55,940. Es fanden sich hohe Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen. Schließlich gelang 1990 die Klonierung des CB₁-Rezeptors [25]. In den darauf folgenden Jahren wurden verschiedene Signaltransduktionswege aufgeklärt, der CB₂-Rezeptor kloniert und endogene Liganden entdeckt, darunter Anandamid 1995, 2-Arachidonoylglycerol 1995, Noladinether 2000. Alle drei sind Derivate der Arachidonsäure und fungieren als Agonisten an CB₁- und CB₂-Rezeptoren, zeigen aber chemisch keine strukturelle Verwandtschaft zu THC. Erst bei dreidimensionaler Betrachtung ergibt sich eine ähnliche räumliche Struktur [26].

Bei den beiden Cannabinoid-Rezeptoren, CB₁ und CB₂, handelt es sich um G_i-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Bei Aktivierung senkt ein G_i-Protein die intrazelluläre Konzentration des second messengers cAMP und führt so in der Regel zu einer Herabsetzung verschiedener Funktionen der betreffenden Zelle. Anhand der Verteilung der Cannabinoidrezeptoren in verschiedenen Gehirnarealen und in der Peripherie lassen sich typische Cannabiswirkungen sehr plausibel erklären. CB₁-Rezeptoren sind hauptsächlich im zentralen Nervensystem lokalisiert, dort aber sehr heterogen verteilt. Hohe Konzentrationen finden sich im Cortex, den Basalganglien, dem Cerebellum (Kleinhirn) sowie dem limbischen Vorderhirn, dort vor allem im Hypothalamus, im Hippocampus und im anterioren cingulären Cortex. Abb. 4 veranschaulicht die Verteilung der CB₁-Rezeptoren und ordnet die Wirkungen zu. Bemerkenswerterweise finden sich kaum Rezeptoren im Hirnstamm, dort wo Atem- und Kreislaufzentrum lokalisiert sind [24]. Dies erklärt auch, warum bei Cannabisintoxikationen im Gegensatz zu Opioiden höchst selten Atemdepressionen zu beobachten sind. Außerhalb des zentralen Nervensystems befinden sich CB₁-Rezeptoren auf sensorischen Neuronen und Neuronen des vegetativen Nervensystems. CB₂-Rezeptoren sind hauptsächlich in der Peripherie anzutreffen, vor allem auf Zellen des Immunsystems.

THC ist ein partieller Agonist und hat eine Affinität von 41 nM zu CB₁- bzw. 36 nM zu CB₂-Rezeptoren (bestimmt in Radioligand-Bindungsstudien mit CB₁/CB₂-exprimierenden Membranen). Im Vergleich dazu sind die Bindungsaffinitäten synthetischer Cannabinoide weit stärker: z. B. HU-210 0,7 bzw. 0,2 nM [27]. Die typischen Cannabiswirkungen beim Menschen sind gut dokumentiert und vielfach beschrieben [13, 27-30]. Sie werden überwiegend über CB₁-Rezeptoren vermittelt:

- Euphorie, Dysphorie oder Indifferenz
- gesteigerte Außen- und Innenwahrnehmung
- Sedation
- verändertes Zeitempfinden, Konzentrationsschwierigkeiten, verminderte Urteilsfähigkeit, sprunghaftes Denken, Gedächtnisverlust

- erst gesteigerte motorische Aktivität, gefolgt von Koordinationsschwierigkeiten und Ataxie
- Analgesie (Aktivierung von Rezeptoren auf verschiedenen Ebenen der aufsteigenden nozizeptiven Bahnen und Modulation der Schmerzverarbeitung [27])
- Appetitsteigerung
- Muskelrelaxierung

Es gibt inzwischen viele Hinweise darauf, dass das Endocannabinoidsystem auch die Fähigkeit hat, andere Neurotransmittersysteme zu beeinflussen. Man hat präsynaptisch lokalisierte CB₁-Rezeptoren auf GABAergen, glutamatergen, cholinergen und noradrenergen Neuronen im zentralen Nervensystem und in der Peripherie gefunden, die bei Aktivierung die Ausschüttung dieser inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmitter in den synaptischen Spalt unterdrücken können [27]. Wirkungen, die über die Interaktion mit anderen Neurotransmittern vermittelt werden, sind:

- über Acetylcholin: Tachykardie, periphere Vasodilatation, Hyposalivation
- über Serotonin: Antiemesis
- über GABA und Glutamat: Beeinflussung von Gedächtnis und Lernprozessen

Es wird vermutet, dass THC über CB₂-Rezeptoren immunsuppressive Effekte vermittelt [31].

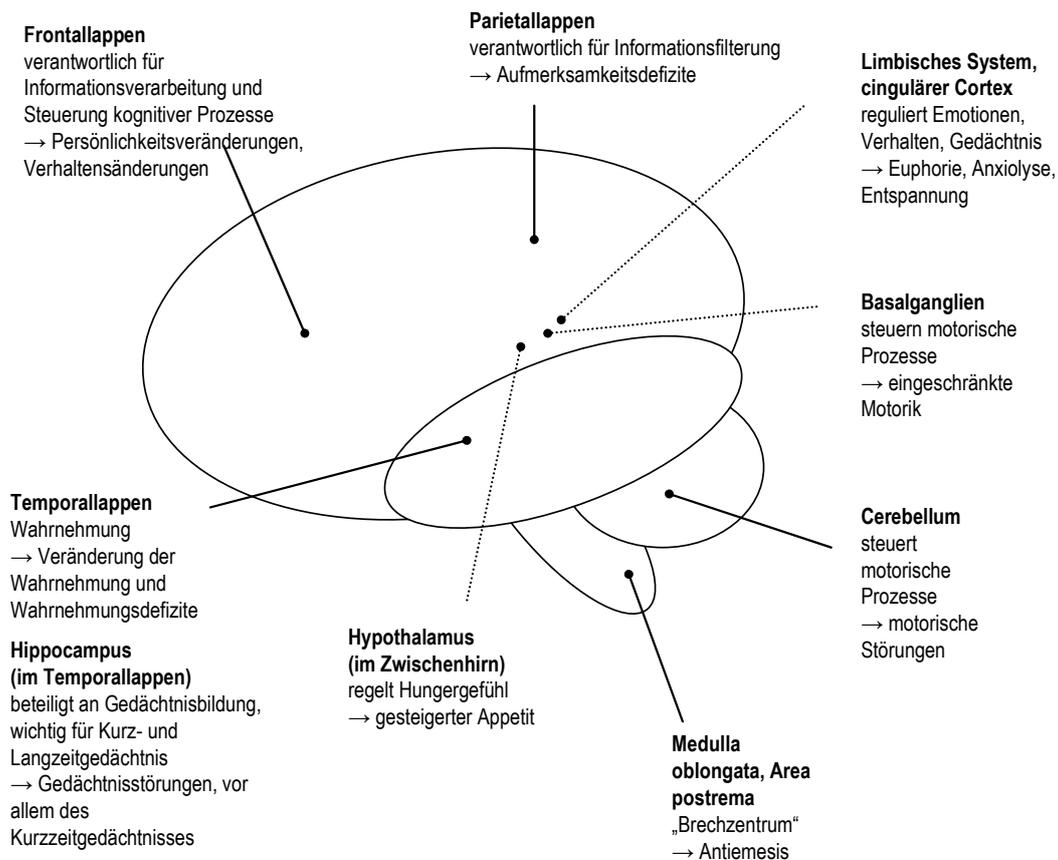


Abb. 4: CB₁-Rezeptor-reiche Gehirnareale und ihre Aufgaben, → Effekte, die bei Gabe von THC auftreten

2.5 Pharmakokinetik von THC

Die Aufklärung der pharmakokinetischen Parameter von THC erfordert die Messung sehr niedriger Analytkonzentrationen, da der Metabolismus schnell verläuft. Die physiko-chemischen Eigenschaften der relevanten Substanzen erschweren die Analytik zusätzlich. Mit modernen und immer empfindlicheren Analysemethoden lassen sich aber mittlerweile genaue Ergebnisse in sehr niedrigen Konzentrationsbereichen erzielen.

Anhand des (L)ADME-Modells, das die pharmakokinetischen Prozesse beschreibt, die eine Substanz mit dem Eintritt in den Körper durchläuft, sollen im Folgenden die grundlegenden Charakteristika der Pharmakokinetik von THC dargestellt werden. Im Vorfeld lässt sich prinzipiell sagen: Es gibt keine geschlechterspezifischen Unterschiede bei der THC-Pharmakokinetik. Es gibt jedoch große individuelle Unterschiede bei den Konzentrationszeitverläufen, selbst bei intravenöser und bei standardisierter inhalativer Applikation, und noch stärkere Variabilitäten nach oraler Gabe. Bei chronischem Konsum ändert sich die Pharmakokinetik kaum bis auf eine Erhöhung der totalen metabolischen Clearance von 605 auf 977 ml/min und des initialen apparenten Verteilungsvolumen von 2,6 auf 6,4 l/kg [32]. Die Toleranzentwicklung, die man mit der Zeit beobachtet, beruht daher wahrscheinlich nicht auf einer Änderung der Pharmakokinetik, sondern der Pharmakodynamik.

2.5.1 Resorption

- **Inhalative Applikation** gewährleistet eine schnelle THC-Resorption von der Lunge in das Blutgefäßsystem. Sie ist die bevorzugte Applikationsart von Cannabiskonsumern, da der Effekt schnell einsetzt und die Dosis unmittelbar titriert werden kann. Die Bioverfügbarkeit ist sehr variabel und wird laut Grotenhermen [20] mit 2 - 56 % angegeben. Diese großen Unterschiede sind begründet in unterschiedlichem Rauchverhalten (Anzahl, Dauer der Züge, Inhalationsvolumen) und treten selbst bei der Verwendung von standardisierten Rauchmaschinen im Rahmen von Studien auf. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass die THC-Spiegel in ähnlichen Größenordnungen liegen, wenn die Probanden von sich aus das Rauchen beenden [33]: Offensichtlich existiert eine „angestrebte, ideale THC-Konzentration“, bei der die gewünschten Effekte zu spüren sind, Nebenwirkungen aber noch nicht allzu heftig ausfallen. Bei den Probanden in einer Studie von Huestis et al. [33] lag diese Konzentration zwischen 33 - 187 ng/ml. Ein „Durchschnittsjoint“ enthält etwa 50 mg THC. Davon wird aber nur ein Anteil aufgenommen, der Rest wird pyrolysiert, verbleibt im Seitenstromrauch oder im Zigarettenstummel [34].
- **Orale Applikation** ist die übliche Applikationsart bei medizinischer Anwendung von synthetischem THC. Seltener wird sie auch als Applikationsart beim Drogenkonsum verwendet. Generell erfolgt die Resorption langsamer, ungleichmäßiger und führt zu weniger hohen THC-Konzentrationen als bei inhalativer Aufnahme. Dosis, Formulierung und physiologische Faktoren haben einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf und das Ausmaß der THC-Resorption. Es hat sich z. B. gezeigt, dass lipophile Begleitstoffe wie Glykocholeat und Sesamöl die Aufnahme erheblich verbessern [29]. Insgesamt liegt die Bioverfügbarkeit von THC nach oraler Einnahme nur bei etwa 6 %. Warum ist sie so niedrig? Diskutiert werden ein hoher First-Pass-Effekt in der Leber, außerdem unvollständige Resorption im Darm und eventuell auch ein Abbau von THC zu Cannabidiol im sauren Milieu des Magens.
- Die **intravenöse Applikation** spielt zwar beim Drogenkonsum keine Rolle, für die Grundlagenforschung ist diese Applikationsart jedoch von essentieller Bedeutung. Nur auf diesem Weg lassen sich bestimmte pharmakokinetische Parameter wie das Verteilungsvolumen und Bioverfügbarkeiten bestimmen.

- Für medizinische Anwendungen sind auch andere Applikationsarten getestet worden, um die niedrige und starken Schwankungen unterworfenen Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation zu umgehen. Dazu gehörten die oromukosale, sublinguale, topische und rektale Applikation sowie die Vernebelung zur Inhalation. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Ermittlung des Konsumzeitpunktes und der Applikationsart bei missbräuchlichem Cannabiskonsum liegt (der rauchend oder oral erfolgt), bleiben diese seltenen oder experimentellen Applikationsarten bei therapeutischem Einsatz an dieser Stelle außer Betracht.

2.5.2 Verteilung

THC ist sehr lipophil. Im Blut befinden sich 90 % des THCs im Plasma und sind dort zu 95 – 99 % an Plasmaproteine gebunden, die restlichen 10 % befinden sich in den Erythrozyten. Das initiale Verteilungsvolumen, das aus der extrapolierten Anfangskonzentration nach intravenöser Gabe berechnet wird, beträgt bei Gelegenheitskonsumenten $2,5 \pm 1,9$ l und bei chronischen Konsumenten $6,3 \pm 4,1$ l [20]. Für das Verteilungsvolumen im Steady State, das heißt nach abgeschlossener Verteilung in die peripheren Kompartimente bzw. an dem Punkt, an dem die THC-Konzentration in der Peripherie maximal ist, wurden in Studien Werte von 74 bis 307 l berechnet [20]. Der hier gemeinte Steady State ist nicht mit dem Steady State nach Mehrfachdosierung gleichzusetzen. Die berechneten Verteilungsvolumina spiegeln die starke Anreicherung von THC in peripheren Geweben wieder.

Interessanterweise ist zum Zeitpunkt des maximalen psychoaktiven Effekts weniger als 1 % der gesamten THC-Dosis im Gehirn angereichert, dem entscheidenden Wirkort [35]. In Studien mit Hausschweinen, deren Metabolismus und Eliminationsprozesse dem Menschen sehr ähnlich sind, zeigte sich, dass die THC-Konzentrationen im Gehirn langsamer sinken als im Blut [36], womit sich auch der verlängerte Effekt nach Absinken der THC-Plasmakonzentration erklärt. THC akkumuliert bevorzugt und intensiv im Fettgewebe. Bei chronischem Konsum kann das Verhältnis der THC-Konzentrationen von Hirn- zu Fettgewebe bis zu 1:64, von Plasma zu Fettgewebe 1:10.000 betragen [37].

Generell lässt sich die Pharmakokinetik von THC nach intravenöser und inhalativer Gabe mit einem Drei-Kompartimentmodell in guter Näherung beschreiben. Der Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurve kann dementsprechend in drei Phasen geteilt werden. Nach Injektion bzw. schneller Anflutung sinkt der Plasmaspiegel in der α -Phase rapide ab, da THC sehr schnell aus dem Blut in gut durchblutete Gewebe wie Lunge, Leber, Herz und Gehirn umverteilt wird. Diese Phase gilt nach einer Stunde als abgeschlossen. In der β -Phase (ca. 1 bis 8 Stunden nach Applikation) verlangsamt sich die Umverteilung. In dieser Phase diffundiert THC aus den gut durchbluteten Geweben vor allem in das Fettgewebe, wo es bevorzugt und langanhaltend gespeichert wird. Zum Ende dieser Phase hat sich ein Pseudoequilibrium zwischen Gewebe und Blutkreislauf eingestellt und die THC-Konzentration im Plasma liegt in der Regel unter 2 ng/ml. Die terminale Phase (γ -Phase), in der die THC-Plasmakonzentration extrem langsam abnimmt und deren Verlauf nur über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen genau verfolgt werden kann, ist charakterisiert durch eine Rückverteilung von THC aus tieferen Kompartimenten.

2.5.3 Metabolismus

THC wird hauptsächlich in der Leber metabolisiert, wobei dem Cytochrom P450-Enzymsystem eine entscheidende Rolle zukommt. Als Phase-1-Reaktionen finden u. a. allylische und aliphatische Hydroxylierungen, Oxidationen von Hydroxylgruppen zu Ketonen und Carbonsäuren, β -Oxidation und ein Abbau der aliphatischen Pentylkette statt [34]. Untersuchungen mit Lebermikrosomen ergaben, dass an den Oxidationen vor allem die Isoenzyme CYP450 2C9, 2C19 und 3A4 beteiligt sind [38]. Die wichtigste

Phase-2-Reaktion ist die Glucuronidierung von Hydroxylgruppen bzw. Carboxylgruppen. Insgesamt fast 100 THC-Metabolite sind bis zum heutigen Tag in verschiedenen Spezies identifiziert worden [39].

Hauptmetabolit von THC im menschlichen Körper, aber auch in vielen anderen Spezies, ist das ebenso psychoaktive 11-OH-THC, dessen Bildung durch das Isoenzym CYP450 2C9 katalysiert wird [40, 41]. Weitere Oxidierung der Hydroxylgruppe an Position 11 unter Katalyse der Alkoholdehydrogenase oder einer mikrosomalen Oxygenase führt zur inaktiven THC-Carbonsäure (THC-COOH), die im Anschluss glucuronidiert werden kann (THC-COOH-Glucuronid) [42]. Dieses nun hydrophilere Molekül ist das Hauptendprodukt der Biotransformation von THC im Menschen und der mit Abstand wichtigste Metabolit im Urin. Forensische Relevanz, z. B. bei der Unterscheidung von oralem und inhalativem Konsum oder der Interpretation von Konsummustern, erlangten bisher nur 11-OH-THC und THC-COOH.

Weitere Metaboliten werden in geringerem Ausmaß gebildet, z. B. die an einer der fünf Positionen der Seitenkette hydroxylierten Metaboliten, die in nachfolgender Oxidation zu den entsprechenden Carbonsäuren verstoffwechselt werden; zwei diastereomere 8-OH-Metaboliten, deren nachfolgende Oxidation THC-8-on ergibt; ein THC-epoxid an Position 9 und 10 sowie Kombinationen der beschriebenen Reaktionen mit anschließender Konjugierung [42].

Extrahepatischer Metabolismus trägt ebenfalls zum Abbau von THC bei. CYP 450-Enzyme finden sich außerhalb der Leber in Dünndarm, Blut, Knochenmark und Mastzellen und in weit geringeren Konzentrationen in vielen anderen Geweben. Für den THC-Metabolismus ist vor allem die Hydroxylierung an der Pentylseitenkette zum noch immer psychoaktiven 4'-OH-THC in der Lunge von Interesse – eine Reaktion, die auch in Mikrosomen im Gehirn verschiedener Spezies nachgewiesen werden konnte [43].

2.5.4 Elimination

Die Elimination einer Substanz aus dem Blutkreislauf kann sowohl durch Metabolisierung als auch durch Ausscheidung erfolgen. Die Plasmaclearance, die ein Parameter für die Eliminationsgeschwindigkeit darstellt, ist somit von beiden Prozessen abhängig. Werte für die Plasmaclearance von THC bewegen sich in den für die Zusammenstellung in Tab. 1 und Tab. 2 herangezogenen Studien zwischen 777 ± 690 ml/min und 980 ± 150 ml/min. Diese hohen Werte sprechen für eine ausgeprägte Metabolisierung, die auch den hohen First-Pass-Effekt bei oraler Gabe erklärt, und korrelieren mit dem hepatischen Blutfluss über die Pfortader, der mit ca. 1050 ml/min angegeben wird. Die Rate des hepatischen Blutflusses scheint damit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Elimination zu sein [20]. 65 % des ursprünglich vorhandenen THCs werden über den Stuhl ausgeschieden, nur 25 % über den Urin [44]. Das liegt sicher daran, dass die renale Clearance der polaren Metabolite THC-COOH und des THC-COOH-Glucuronids noch immer gering ist, da die hohe Bindung an Lipoproteine im Plasma eine Filtration in der Niere erschwert [45].

Neben der Clearance ist die Eliminationshalbwertszeit ein Parameter zur Charakterisierung. Ein Vergleich von Halbwertszeiten aus verschiedenen Studien ist allerdings nur sinnvoll, wenn die Beobachtungszeiträume und verschiedenen Verteilungsphasen berücksichtigt werden. Wie bereits oben erwähnt kann der Abfall der THC-Konzentration in (mindestens) drei Phasen unterteilt werden. Jeder dieser Phasen lässt sich dann eine eigene Halbwertszeit zuordnen ($t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ und $t_{1/2\gamma}$). Laut Toennes et al. [46] bewegt sich die Halbwertszeit der β -Phase in einer Größenordnung von 1,6 h, während sie in der γ -Phase auf ca. 18-36 h ansteigt. In vorangegangenen Studien zur Pharmakokinetik von THC ergaben auf den ersten Blick davon und untereinander abweichende Werte, die sich jedoch in Einklang bringen lassen, wenn die Phasen beachtet werden. Bei einem Beobachtungszeitraum von vier Wochen errech-

nete sich sogar eine Halbwertszeit von 12 Tagen, die einer vierten, terminalen Phase zugeordnet werden kann.

Detaillierte Ergebnisse von Studien zur Pharmakokinetik von THC sind getrennt für Gelegenheitskonsumenten und chronische Konsumenten in Tab. 1 und Tab. 2 aufgelistet. In diese Zusammenfassung flossen nur Ergebnisse von Studien mit GC-MS oder LC-MS-Analytik ein, da eine Quantifizierung mit Immunoassays zu unspezifisch und ungenau ist.

Tab. 1: Pharmakokinetische Parameter von THC nach intravenöser, inhalativer und oraler Applikation bei Gelegenheitskonsumenten, * Werte für totale Clearance wurden aus dem Mittelwert der angegebenen AUC und der verabreichten Dosis, die in den Publikationen angegeben sind, nachträglich berechnet

	Dosis mg THC	Probanden	c max ng/ml	t max	AUC $\mu\text{g} \cdot \text{min/l}$	Vd l	CL ml/min	$t_{1/2 \beta}$ h	Ref.
intra-venös	5	11	161 - 316		4330 ± 620	252	1154*		[47, 48]
	5	9	302 ± 95		$6040 \pm 2,2$	144	827*		[49]
	5	4			5460 ± 1180		950 ± 200		[50]
	5	4	386 ± 29		7094 ± 2248	74 ± 35	771 ± 287	$1,6 \pm 0,5$ h	[51]
	5	22	119 ± 166 (nach 10')						[52]
inhalativ	19	11	33 - 118		1960 ± 650				[47, 48]
	19	9	67 ± 38		1420 ± 740				[49]
	10	4			1420 ± 340				[50]
	16	6	50 - 129	9 min					[33]
	34	6	76 - 267	9 min					
	$18,2 \pm 2,8$	10	47 ± 35					$1,4 \pm 0,1$ h	[53]
	$36,5 \pm 5,6$	10	79 ± 42						
	0,5/kg KG	12	49 ± 24	5 min					[54]
22,5 – 47,5	12	11 - 86	5 min	2100 ± 840			$1,6 \pm 0,2$ h	[46]	
oral	20 (Cookie)	11	4,4 - 11	1 - 5 h					[48]
	10 (Marinol-Kapsel)	17	1,1 - 12,7	1 - 2 h					[37]
	10 - 15 (Marinol-Kapsel)	2	2,1 - 16,9	1 - 8 h					[55]
	10 (Marinol-Kapsel)	17	$4,7 \pm 3,0$				610 ± 310		[56]
	14,8 (Hanföl)	6	< 6,1						[57]

Tab. 2: Pharmakokinetische Parameter von THC nach intravenöser und inhalativer Applikation bei chronischen Konsumenten, * Werte für totale Clearance wurden aus dem Mittelwert der angegebenen AUC und der verabreichten Dosis berechnet, ** durch Subtraktion der residualen THC-Konzentrationen vor Applikation korrigierte Eliminationshalbwertszeit der β -Phase

	Dosis mg THC	Probanden	c max ng/ml	t max	AUC $\mu\text{g} \cdot \text{min/l}$	Vd l	CL ml/min	$t_{1/2 \beta}$ h	Ref.
intra- venös	5	9	288 ± 119		4300 ± 1670	307	1162*		[49]
	5	5			5180 ± 830		980 ± 150		[50]
	5	4	438 ± 36		9908 ± 3785	75 ± 16	777 ± 690	1,9 ± 0,3 h	[51]
inhalati- v	0,5/kg KG	12	120 ± 78	5 min					[54]
	22,5 – 47,5	12	7,9 - 244,8	5 min				(3,0 ± 1,5 h) 0,6 – 3,1 h**	[46]

Aufgrund der ausgeprägten Akkumulation im Fettgewebe lassen sich THC und seine Metabolite nach starkem Konsum noch über einen langen Zeitraum detektieren. Die Frage, wie lange ein Cannabiskonsum nachweisbar ist, spielt eine große Rolle in der forensischen Praxis, vor allem bei Abstinenzkontrollen im Rahmen von MPU-Untersuchungen und bei Bewährungsaufgaben. Die Zeitspannen der Nachweisbarkeit differieren je nach Analyt und besonders stark bei verschiedenen Konsummustern. Wie aus Tab. 3 ersichtlich wird, muss klar zwischen seltenen, gelegentlichen, häufigen und Dauerkonsumenten unterschieden werden.

Tab. 3: Zeitspannen der Nachweisbarkeit von THC und seiner wichtigsten Metabolite in Serum und Urin nach inhalativem und oralem Konsum

	Dosis mg THC	THC im Serum	11-OH-THC im Serum	THC-COOH im Serum	THC-COOH-Gluc im Urin
inhalativ	einmalig	16	3-12 h	4,5 h	2-7 Tage [58]
		34	6-27 h [33]	11 h [33]	4-7 Tage[33]
	gelegentlich				2-4 Tage [58]
	mehrmals wöchentlich				5-14 Tage [58]
Dauerkonsum		bis zu 13 Tage [59]			2-6 Wochen (in Einzelfällen 3 Monate) [58]
oral	5 Tage lang	ca. 7-15 mg	< 16	< 16 h [37]	bis zu 6 Tage [60]

Ergänzend zu den vielen pharmakokinetischen Untersuchungen zu THC führten Glazberg-Sand et al. 2005 eine klinische Studie durch, um die Pharmakokinetik von THC-COOH aufzuklären. Deren pharmakokinetische Parameter von THC-COOH waren davor immer indirekt nach THC-Gabe bestimmt worden. Da THC-COOH ein Strukturisomer von THCA ist, soll diese Studie hier nicht unerwähnt bleiben. Nach intravenöser Gabe von 5 mg THC-COOH erhielten die Autoren folgende Ergebnisse: $c_{\text{max}} = 336 \pm 61$ ng/ml, terminale Halbwertszeit $17,6 \pm 5,5$ h, totale Clearance 91 ± 24 ml/min (niedrig), AUC 56.460 ± 16.980 ng*min/ml (entsprechend 941 ± 283 ng*h/ml), initiales Verteilungsvolumen 139 ± 58 l, Verteilungsvolumen im Steady State 97 ± 30 l [61]. Diese Werte werden später noch interessant sein.

2.6 Fahrverhalten unter Cannabis

Die Beeinträchtigung der Fahrtüchtigkeit ist eine logische Konsequenz aus den oben beschriebenen Cannabiswirkungen. Konzentrationsstörungen, Veränderungen in der Wahrnehmung, verlängerte Reaktionszeiten und motorische Störungen sind mit dem sicheren Führen eines Kraftfahrzeugs jederzeit und besonders in unvorhergesehenen Gefahrensituationen schwer zu vereinbaren. Fahren ist ein sehr komplexer Prozess, der dem Fahrer eine Vielzahl reibungslos funktionierender und aufeinander abgestimmter kognitiver und motorischer Fähigkeiten abverlangt.

Ethanol ist das Standardbeispiel für eine Substanz, für die sich ein relativ klarer Zusammenhang zwischen erreichter Blutalkoholkonzentration und verminderter Fahrsicherheit herstellen lässt, was eine entsprechende Gesetzgebung nach sich zog. Die besondere Pharmakokinetik von Ethanol erleichterte außerdem die Etablierung von Grenzwerten. Ethanol wird nach einer Kinetik 0. Ordnung abgebaut, das heißt mit konstanter Rate und unabhängig von der Anfangskonzentration. Eine Rückrechnung der Konzentration für eine bestimmte Tatzeit ist daher relativ genau möglich. Dazu kommt, dass die Blutalkoholkonzentration gut mit der Alkoholkonzentration am Wirkort, dem Gehirn, korreliert, so dass innerhalb gewisser Grenzen von der Konzentration auf den Grad der Beeinträchtigung geschlossen werden kann. Alle diese sehr praktikablen Besonderheiten treffen auf Cannabis nicht zu. Dessen komplexe Pharmakokinetik, insbesondere die schnelle Umverteilung zu Beginn und die spätere Akkumulation, erschwert im Gegenteil eine Interpretation gemessener Werte.

Um die Fahrtüchtigkeit unter Cannabis zu untersuchen, bieten sich Tests an, die in der Vergangenheit für die Untersuchungen mit Alkohol entwickelt und validiert wurden. Fehler, die die Probanden in diesen einfachen Tests machen, lassen auf verminderte kognitive und psychomotorische Fähigkeiten schließen – unabhängig von der Ursache. Es zeigten sich dosisabhängige Beeinträchtigungen bei den kognitiven Prozessen und eine Verlängerung der Reaktionszeit, allerdings in geringerem Ausmaß als bei mittleren Alkoholkonzentrationen (0,8 ‰). Bemerkenswert war, dass die Probanden einfache Aufgaben relativ gut lösen konnten, die Fehlerquote jedoch rapide stieg, je mehr Aufgaben gleichzeitig zu bewältigen waren und je komplexer diese wurden. Auch in den weithin angewendeten „Feldtests“ (Nystagmus-Test, „Auf der Linie gehen“, Einbeinstand) schnitten die Probanden unter Cannabiseinfluss schlechter ab als unter Placebobedingungen [62]. Im Gegensatz zu Alkohol, der eher zu einer Enthemmung und erhöhten Risikobereitschaft führt, verhalten sich Cannabiskonsumenten jedoch generell vorsichtiger.

Ist Cannabis auch ursächlich an der Entstehung von Verkehrsunfällen beteiligt? Dazu wurden eine Reihe wissenschaftlicher epidemiologischer Studien durchgeführt. Die Schwierigkeit bei diesen Studien war, eine vorliegende Cannabiswirkung in Zusammenhang mit einem Unfallrisiko zu bringen. Die Wirkung ist retrospektiv kaum zu evaluieren und ein positiver toxikologischer Nachweis im Serum ein mittelmäßiges, in Urin ein unbrauchbares Indiz. In der Praxis gestaltet es sich zudem schwierig, Proben von nicht auffälligen, aber Cannabis konsumierenden Fahrern als Kontrollgruppe zu sammeln, um darin Cannabinoidkonzentrationen zu bestimmen. Die Studien verwenden daher in der Regel Verursacheranalysen, in denen Unfallfahrer, nachdem sie zu solchen wurden, untersucht werden. Nach einem festen Schema und „blind“ für eventuellen Drogenkonsum ermittelt man für jeden Fahrer einen Grad der Schuldhaftigkeit am Unfall. Nach Analyse der Proben werden die Fahrer schließlich in eine drogenfreie und eine drogenpositive Gruppe eingeteilt und die Verteilung der schuldhaften Fahrer verglichen [12].

Die Ergebnisse der meisten Studien, die in den neunziger Jahren durchgeführt wurden, ergaben keine eindeutigen Ergebnisse in Hinsicht auf Cannabis, sondern bewiesen meistens nur erneut die enorme Beeinträchtigung der Fahrer durch Alkohol. Aufgrund geringer Fallzahlen konnten Unterschiede zwi-

schen Unfallfahrern, die Cannabis konsumiert hatten, und drogenfreien Fahrern zwar in einigen Untersuchungen gezeigt, aber nicht statistisch abgesichert werden. Eine groß angelegte, multizentrische Studie von Drummer et al. aus dem Jahr 2004 mit insgesamt 3398 Unfallopfern lieferte zum ersten Mal eindeutige Ergebnisse [63]. Ein wichtiger Punkt in der Methodik war hier der Zeitpunkt der Probennahme. Nur Proben, die innerhalb von 4 Stunden nach dem Unfall entnommen wurden, waren zugelassen. Damit war gesichert, dass die gefundenen THC-Konzentrationen wirklich Aussagekraft über den Zustand des Fahrers zum Zeitpunkt des Unfalls hatten. Für drogenfreie Unfallfahrer ergab sich eine Verschuldensrate von 3,2. Für Fahrer mit positivem THC-Nachweis lag sie bei 10,2 und für Fahrer mit Alkohol im Blut bei 34,1. Bei Konsum beider Drogen erhöhte sich das Risiko um das Dreifache im Vergleich zu Fahrern mit Alkohol allein. Zudem folgerten die Autoren, dass die Wahrscheinlichkeit, einen Unfall zu verursachen, bei einem THC-Spiegel > 5 ng/ml in etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie bei einer Blutalkoholkonzentration von 1,5 ‰.

2.7 Rechtliche Situation mit Fokus auf das Straßenverkehrsrecht

Nach aktueller deutscher Gesetzgebung gilt folgendes: Drogenkonsum *per se* ist nicht strafbar. Dagegen sind Herstellung, Erwerb, Besitz und Verkauf illegaler Drogen, also auch von Cannabis, nach dem Betäubungsmittelgesetz strafbar. Der Besitz geringer Mengen führt in der Regel jedoch nicht zu einer Anklage, sondern gemäß §153a der Strafprozessordnung zur Einstellung des Verfahrens wegen geringfügigkeit gegen Auflagen.

Im Straßenverkehrsrecht kommen je nach Tatbestand verschiedene Gesetze zur Anwendung. Für das Führen eines Kraftfahrzeugs unter Wirkung von Cannabis gelten strafrechtlich dieselben gesetzlichen Tatbestände und Rechtsfolgen wie für das Fahren unter Alkoholeinfluss [30]. Ein Überblick findet sich in Tab. 4. Es gibt jedoch zwei entscheidende Unterschiede:

1. Bei einer Blutalkoholkonzentration $\geq 1,1 \text{ ‰}$ geht man von absoluter Fahruntüchtigkeit aus, deren Gegenteil rechtlich nicht bewiesen werden kann. Im Gegensatz zu Alkohol existiert kein solcher Grenzwert für THC. Um daher eine „rauschemittelbedingte Fahrunsicherheit“ zu bejahen, reicht der Nachweis eines Cannabiskonsums nicht aus. Anstelle des Kriteriums der absoluten Fahruntüchtigkeit tritt bei Fahren unter Cannabiseinfluss die relative Fahruntüchtigkeit. Zu deren Beweis müssen neben dem Nachweis der Droge Fahrfehler oder Ausfallserscheinungen hinzukommen.
2. Während es für Alkohol einen gesetzlich festgelegten Grenzwert gibt (0,5 ‰ Blutalkoholkonzentration), bei dessen Überschreiten mit einer Wirkung gerechnet werden muss, genügt laut Gesetzestext bei Betäubungsmitteln der Nachweis der Substanzen im Blut. Nach Empfehlungen der Grenzwertkommission vom 20. November 2002 [64] liegt der Grenzwert für THC bei 1,0 ng/ml, was in etwa der damals erreichbaren analytischen Bestimmungsgrenze entspricht.

Selbst wenn keiner der in Tab. 4 genannten Paragraphen greift – z. B. weil zwar THC-COOH nachgewiesen werden konnte, der THC-Wert jedoch unter 1,0 ng/ml lag – können sich für einen Cannabiskonsumenten rechtliche Konsequenzen ergeben. Besitzt der Konsument eine Fahrerlaubnis und wird die Fahrerlaubnisbehörde von dem Cannabiskonsum in Kenntnis gesetzt, muss sie die Fahreignung überprüfen. Dem Begriff der „Eignung“ kommt in der Fahrerlaubnisverordnung (FeV) eine zentrale Rolle zu, sie ist Voraussetzung zum Führen eines Kraftfahrzeugs. Erteilung und Fortbestand einer Fahrerlaubnis hängen davon ab.

§14 FeV befasst sich mit der „Klärung von Eignungszweifeln in Hinblick auf Betäubungsmittel und Arzneimittel“ und legt fest, „dass ein ärztliches Gutachten beizubringen ist, wenn Tatsachen die Annahme begründen, dass Einnahme von Betäubungsmitteln im Sinne des Betäubungsmittelgesetzes vorliegt“. Cannabis hat hier eine Sonderstellung, da unterschiedliche Konsummuster unterschiedliche rechtliche Konsequenzen nach sich ziehen. Bei einmaligem oder gelegentlichem Konsum geht man von Fahreignung aus, sofern Fahren und Konsum voneinander getrennt werden können. Erst wenn zu gelegentlichem Konsum weitere Auffälligkeiten hinzukommen, kann die Fahrerlaubnisbehörde eine medizinisch-psychologische Untersuchung anordnen. Liegt ein regelmäßiger Cannabiskonsum vor, spricht man dem Konsumenten die Fahreignung generell ab. Der Einschätzung des Konsumverhaltens kommt demnach bei der Fahreignungsbegutachtung ein hoher Stellenwert zu. Kriterien, Einordnung anhand gemessener THC-COOH-Konzentrationen und entsprechende Konsequenzen fasst Tab. 5 zusammen [65].

Tab. 4: Führen eines Kraftfahrzeugs unter dem Einfluss von Cannabis und seine rechtlichen Konsequenzen: Anwendung von §24a StVG, §316 StGB und §315 StGB

Paragraph	Gesetzestext	Tatbestand	Einstufung	Strafe
§ 24a StVG Abs. 2	„Ordnungswidrig handelt, wer unter der Wirkung eines in der Anlage zu dieser Vorschrift genannten berauschenden Mittels im Straßenverkehr ein Kraftfahrzeug führt. Eine solche Wirkung liegt vor, wenn eine in dieser Anlage genannte Substanz im Blut nachgewiesen wird.“	Führen eines Fahrzeugs + Nachweis von THC > 1 ng/ml im Plasma - Fahruntüchtigkeit muss nicht vorliegen	Ordnungswidrigkeit	Fahrverbot, Geldstrafe, Eintragung ins Verkehrsregister, Einschaltung der Führerscheinbehörde
§ 316 StGB	„Wer im Verkehr ein Fahrzeug führt, obwohl er infolge des Genusses alkoholischer Getränke oder anderer berauschender Mittel nicht in der Lage ist, das Fahrzeug sicher zu führen, wird mit Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder mit Geldstrafe bestraft [...]“	Führen eines Fahrzeugs + Fahruntüchtigkeit entweder absolut (Blutalkoholkonzentration $\geq 1,1$ ‰) oder relativ (z. B. Nachweis von Cannabinoiden PLUS Fahrfehler bzw. Ausfallerscheinungen) - keine Gefährdung oder Schädigung	Straftat (abstraktes Gefährdungsdelikt)	Freiheitsstrafe bis zu 1 Jahr, Entzug des Führerscheins
§ 315c StGB	„Wer im Straßenverkehr ein Fahrzeug führt, obwohl er infolge des Genusses alkoholischer Getränke oder anderer berauschender Mittel [...] nicht in der Lage ist, das Fahrzeug sicher zu führen, [...] und dadurch Leib oder Leben eines anderen Menschen oder fremde Sachen von bedeutendem Wert gefährdet, wird mit Freiheitsstrafe bis zu fünf Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.“	Führen eines Fahrzeugs + Fahruntüchtigkeit entweder absolut (Blutalkoholkonzentration $\geq 1,1$ ‰) oder relativ (z. B. Nachweis von Cannabinoiden PLUS Fahrfehler bzw. Ausfallerscheinungen) + Gefährdung oder Schädigung	Straftat (konkreter Gefährdungstatbestand)	Freiheitsstrafe bis zu 5 Jahren, Entzug des Führerscheins

Tab. 5: Kriterien für unterschiedliche Konsummuster, Einschätzung anhand analytischer Befunde und Konsequenzen für den Führerscheininhaber

Konsumgrad	Eignung?	Kriterien	analytische Grenzen	Konsequenz
einmalig	ja		THC-COOH < 5 ng/ml	keine
gelegentlich mehrmalige Aufnahme	ja	Wenn Konsum und Fahren getrennt werden, kein Konsum anderer Drogen dazu kommt und weder eine Persönlichkeitsstörung noch Kontrollverlust vorliegen.	THC-COOH: 5-75 ng/ml (Daldrup)	keine
	nein	Wenn die oben genannten Kriterien nicht erfüllt werden.		Anordnung einer medizinisch-psychologischen Untersuchung und eventuell Entzug des Führerscheins
regelmäßig täglich oder fast täglicher Konsum	nein		THC-COOH > 75 ng/ml in Proben nach Einbestellung bzw. > 150 ng/ml in Proben aus Straßenverkehrsdelikten nach kurzfristig zurückliegendem Konsum (Daldrup)	Entzug des Führerscheins
Abhängigkeit	nein			Entzug des Führerscheins

2.8 Interpretation gemessener Cannabinoidkonzentrationen

Es wurden viele Versuche unternommen, um anhand von gemessenen Cannabinoidkonzentrationen Rückschlüsse auf die akute Wirkung, das Konsummuster und den Konsumzeitpunkt zu ziehen. Es gibt einige Situationen, abgesehen von speziellen klinischen Fragestellungen, in denen solche Rückschlüsse sehr hilfreich wären, z. B. bei

- der Beurteilung einer Straftat, die unter Cannabiswirkung begangen wurde, z. B. einem Verkehrsunfall
- der Fahreignungsbegutachtung
- Bewährungsauflagen, z. B. nach einer Verurteilung wegen Verstoß gegen das Betäubungsmittelgesetz
- der Einschätzung, ob aufgrund einer akuten Intoxikation die Schuldfähigkeit vermindert (§21 StGB) oder aufgehoben war (§20 StGB)

2.8.1 Korrelation von THC-Plasmakonzentration und akuter Wirkung

Bestrebungen, einen Rauscheffekt durch Cannabis anhand von THC-Konzentrationen zu beweisen oder auszuschließen, waren in hohem Maße von Erfolglosigkeit gekrönt. Das größte Problem besteht in der komplexen Pharmakokinetik und der Akkumulation bei starkem Konsum. Die Frage, ob THC-Plasmakonzentrationen das Ausmaß der akuten Wirkung verlässlich widerspiegeln, beantworteten Hollister et al. schon 1981 mit Nein [47]. Im Gegensatz zu Ethanol, dessen Blutkonzentrationen gut mit dem tatsächlichen Grad an Beeinträchtigung zu jedem beliebigen Zeitpunkt korrelieren (wenn keine Toleranz vorliegt), zeigen THC-Plasmaspiegel und Cannabiswirkungen keinen solchen eindeutigen Zusammenhang. Auch lässt sich für THC kein relativ enger Konzentrationsbereich definieren, in dem sicher von einer (bzw. keiner) psychotropen Wirkung ausgegangen werden kann. Ein Grund dafür ist, dass die Plasmakonzentration nicht einfach mit der Konzentration an den CB₁-Rezeptoren im Gehirn und in der Folge mit der Wirkung korreliert werden kann. Auch eine Toleranzentwicklung aufgrund häufigen Konsums ist nicht einschätzbar.

Sehr anschaulich wird diese Diskrepanz in der Studie von Hollister et al. [47]. Abb. 5 zeigt typische Verläufe der THC-Konzentrationen nach intravenöser, inhalativer bzw. oraler Gabe von THC. Die Probanden, alle erfahrene Cannabiskonsumenten, waren aufgefordert, über einen Verlauf von 6 bzw. 8 Stunden ihr Rauschgefühl auf einer Skala von 1 – 10 anzugeben. Nach Rauchen und intravenöser Gabe traten maximale „High“-Wirkungen nach ca. 20 bis 30 Minuten auf, zu einem Zeitpunkt, als die maximale THC-Plasmakonzentration schon überschritten war. Periphere Effekte wie gesteigerte Herzfrequenz und die typische Rötung der Bindehäute setzten etwas früher ein. Nach drei Stunden verspürten die Probanden nur noch eine minimale Beeinflussung, die nach etwa vier Stunden verschwunden war. Die stärksten Rauschwirkungen (> 6) traten zwischen 45 und 60 Minuten auf.

Bei oraler Applikation zeigte sich ein anderes Bild. Da die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt zeitverzögert, unregelmäßig und mit einer geringen Bioverfügbarkeit stattfand, lagen die THC-Plasmakonzentrationen niedriger und ein leichter Rauscheffekt setzte erst nach ungefähr einer Stunde ein. Das maximale „High“ lag zwischen zwei und vier Stunden und sank nach sechs Stunden auf ein niedriges Niveau. Trotz erheblich niedrigerer THC-Plasmakonzentrationen als bei inhalativer und intravenöser Gabe wurde ein merklicher Effekt beobachtet. Sehr wahrscheinlich kompensiert der ebenso psychoaktive Metabolit 11-OH-THC den THC-Verlust.

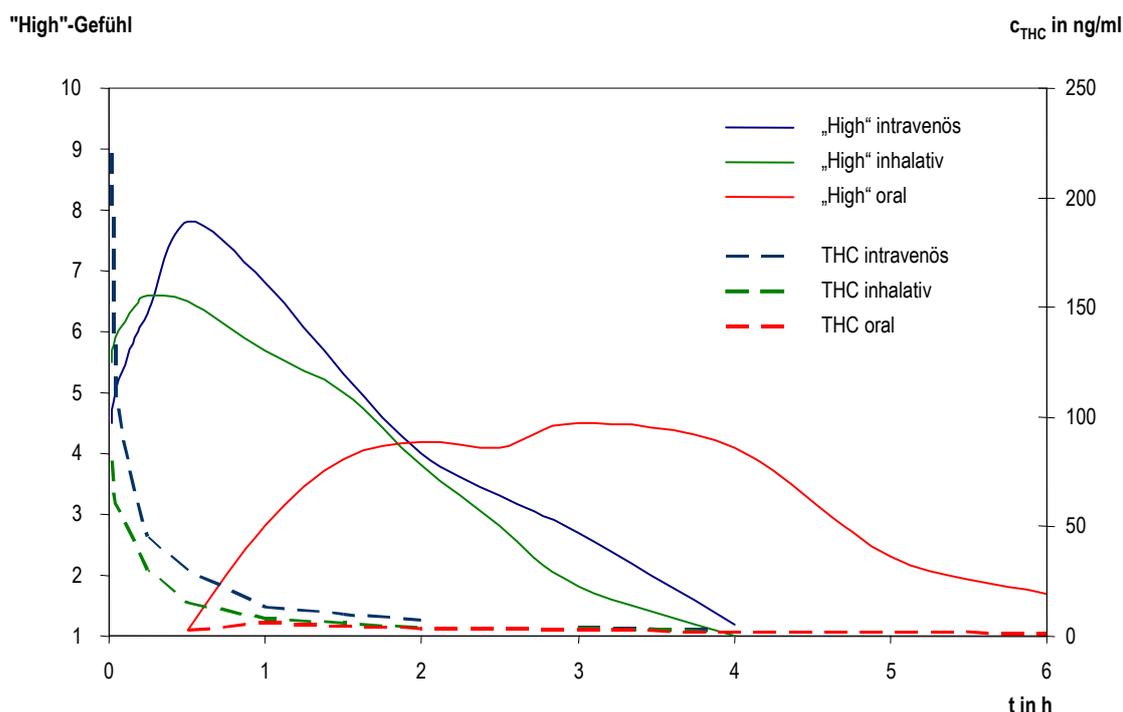


Abb. 5: Zeitverlauf des auf einer Skala von 1-10 von den Probanden selbst eingeschätzten "High"-Gefühls, wobei 10 dem maximal vorstellbaren Effekt entspricht. Intravenös: 5 mg THC, inhalativ: Joint mit ca. 19 mg THC, oral: 20 mg THC in einem Schokoladencookie. Daten aus Hollister et al. [47]

Einen Versuch, mit Hilfe von gemessenen Cannabinoidkonzentrationen auf eine akute Wirkung, konkret die Fahruntüchtigkeit, zu schlussfolgern, unternahm Daldrup mit dem Konzept des Cannabis Influence Factor (CIF). Anhand von 353 forensischen Fällen, zu denen jeweils ein vollständig ausgefüllter Polizeibericht mit detaillierten Ausfallerscheinungen sowie toxikologische Befunde vorlagen, errechnete er einen theoretischen Faktor und korrelierte ihn mit der Stärke der beobachteten Ausfallerscheinungen. Die Formel lautete wie folgt:

$$\text{CIF} = 100 \cdot \frac{\frac{[\text{THC}]}{314,5} + \frac{[\text{11-OH-THC}]}{330,5}}{\frac{[\text{THC-COOH}]}{344,5}}$$

Der Faktor ist ein Konstrukt, das einerseits die absolute Menge der aktiven Substanzen (THC und 11-OH-THC) berücksichtigen und andererseits durch die Verhältnisbildung mit dem inaktiven Metaboliten THC-COOH, der mit der Zeit vermehrt gebildet wird, die abgelaufene Zeit nach dem Konsum widerspiegeln soll. Chronische Konsumenten, die grundsätzlich hohe Konzentrationen an THC-COOH im Plasma aufweisen, werden sogar begünstigt. Es bleibt höchst zweifelhaft, ob damit den komplizierten Umverteilungsprozessen von THC und 11-OH-THC zwischen Blut und Wirkort im Gehirn sowie der Toleranzentwicklung, Akkumulation von Cannabinoiden, individuell verschiedener Metabolisierung und damit letztendlich der Wirkstärke Rechnung getragen werden kann. Ein weiterer Kritikpunkt ist die nicht-standardisierte Analytik für THC-COOH. Aufgrund verschiedener Aufbereitungs- und Analysemethoden,

bei denen mehr oder weniger freie THC-COOH artefaktisch aus THC-COOH-Glucuronid freigesetzt werden kann, kann die gemessene Konzentration stark schwanken [66]. Aus diesen Gründen hat der CIF-Wert bisher keinen verbindlichen Eingang in die deutsche Rechtsprechung gefunden.

2.8.2 Unterscheidung von inhalativem und oralem Konsum

Für die Unterscheidung zwischen inhalativem und oralem Konsum anhand von Messwerten gibt es einen Anhaltspunkt. Da THC bei oraler Aufnahme einem sehr ausgeprägten First-Pass-Effekt unterliegt, steigt die Konzentration des Metaboliten 11-OH-THC an und liegt in der gleichen Größenordnung wie THC, meistens sogar höher. Außerdem ist das Nachweisfenster länger. Gemäß Nadulski et al. [67] deutet ein Verhältnis von 11-OH-THC zu THC > 1 innerhalb von 2 Stunden nach Applikation und $> 1,5$ danach stark auf eine orale Applikation hin.

2.8.3 Unterscheidung von gelegentlichem und chronischem Konsum

Diese Unterscheidung spielt im deutschen Führerscheinrecht eine entscheidende Rolle. Bei Vorliegen eines chronischen (regelmäßigen) Cannabiskonsums wird kategorisch ausgeschlossen, dass eine Person zum Führen eines Fahrzeugs geeignet ist. Bei nur gelegentlichem Konsum wiederum muss nachgewiesen werden, dass der Fahrer das Führen eines Fahrzeugs und den Konsum nicht ausreichend voneinander trennen kann. Hohe THC-COOH-Konzentrationen dienen als Indikator für das Konsummuster.

In einem im Jahr 2000 veröffentlichten Artikel legten Daldrup et al. [68] anhand der Halbwertszeiten für THC-COOH verschiedene Konzentrationsbereiche fest, mit denen eine Einordnung des Konsummusters erleichtert werden soll. Nach dieser sogenannten „Daldrup-Tabelle“ gilt: Bei einer THC-COOH-Konzentration < 5 ng/ml ist von einmaligem Cannabiskonsum auszugehen, kommt ein positiver THC-Nachweis hinzu, von mindestens zweimaligem Konsum. Beträgt der Wert für THC-COOH zwischen 5 und 75 ng/ml, liegt gelegentlicher, und ab 75 ng/ml regelmäßiger Konsum vor. Diese Einstufung bezieht sich auf Blutproben, die mit ausreichendem zeitlichen Abstand zum Vorfall, in der Regel nach Einbestellung, abgenommen wurden. Bei zeitnahen Proben setzt man 150 ng/ml THC-COOH als Cut-off für regelmäßigen Konsum an. Toennes et al. merken an, dass hohe THC-COOH-Konzentrationen zwar auf chronischen Konsum hinweisen, der Umkehrschluss jedoch nicht möglich ist, da sich niedrige THC-COOH-Konzentrationen auch bei regelmäßigen starken Konsumenten fanden und daher keinen gelegentlichen Konsum beweisen [46].

2.8.4 Unterscheidung von kürzlich stattgefundenem und länger zurückliegendem Konsum

Wie in vielen Studien gezeigt wurde, variieren Plasmaspiegel-Wirkungs-Beziehungen bereits in einem Individuum sehr stark und in noch größerem Ausmaß bei verschiedenen Versuchspersonen. Eine erfolgversprechende Variante, um eine akute Beeinträchtigung zu bestätigen oder auszuschließen, ist die Ermittlung des letzten Konsumzeitpunktes.

Anhand der Daten aus einer klinischen Studie entwickelten Huestis et al. 1992 zwei mathematische Modelle zur Rückrechnung des Konsumzeitpunktes nach inhalativer Applikation aus nur einer Probe [33]. Unter Laborbedingungen rauchten sechs männliche Probanden mit Cannabiserfahrung jeweils einen Joint mit definiertem THC-Gehalt und gaben Blutproben bis zu 168 Stunden ab. Die THC- und THC-COOH-Konzentrationen wurden bestimmt und der dazugehörige Zeitabstand in einem doppelt logarithmischen Koordinatensystem gegen die THC-Konzentration (Modell I) bzw. das Verhältnis von

THC-COOH zu THC (Modell II) aufgetragen. Die Wertepaare zeigten eine gute Korrelation mit einer abfallenden Geraden. Deren Geradengleichungen lauteten:

$$\text{Modell I: } \lg t = -0,698 \cdot \lg c_{\text{THC}} + 0,687 \quad (r = 0,949)$$

$$\text{Modell II: } \lg t = 0,576 \cdot \lg \frac{c_{\text{THC-COOH}}}{c_{\text{THC}}} - 0,176 \quad (r = 0,919)$$

Mit der Streuung der Werte ermittelten die Autoren außerdem ein 95%-Konfidenzintervall. Deren Formeln lauteten:

$$\text{Modell I: } \lg \text{CI}_{95\%} = \lg t \pm 1,975 \cdot \sqrt{0,03 \cdot \left[1,006 + \frac{(\lg c_{\text{THC}} - 0,996)^2}{89,937} \right]}$$

$$\text{Modell II: } \lg \text{CI}_{95\%} = \lg t \pm 1,975 \cdot \sqrt{0,045 \cdot \left[1,006 + \frac{\left(\lg \frac{c_{\text{THC-COOH}}}{c_{\text{THC}}} - 0,283 \right)^2}{123,42} \right]}$$

2005 wurden zusätzliche Untersuchungen mit 38 Probanden, die eine Zweifachapplikation und auch Berechnungen mit vorher ausgeschlossenen THC-Werten < 2,0 ng/ml beinhalteten, veröffentlicht [69]. Bei Verwendung von Modell I lagen 91,2 % und von Modell II 95,5 % der zurückgerechneten Werte im 95%-Konfidenzintervall. Besonders kritisch wäre eine Unterschätzung des Zeitabstandes, da dann potentiell eine Person als beeinflusster eingeschätzt würde, als sie es in der Realität war. Modell I unterschätzte den Zeitabstand in 3 von 717 Proben, Modell II bei 21 von 704. Die Autoren kombinierten im Anschluss beide Modelle - d. h. sie fassen die Bereiche der 95%-Konfidenzintervalle zusammen, die damit größer werden -, woraufhin in keinem Fall mehr der Zeitabstand unterschätzt wird.

Die Modelle wurden mit Daten weiterer klinischer Studien anderer Autoren getestet und ergaben gute Ergebnisse. Einige Kritikpunkte bleiben jedoch bestehen:

- Es handelt sich um klinische Studien, in denen unter genau definierten Bedingungen Cannabis konsumiert wurde. Die Realität kann davon beträchtlich abweichen. Einige Konsumenten verteilen mehrere Portionen über mehrere Stunden, rauchen enorme Mengen und haben häufig noch Restkonzentrationen vergangener Applikationen im Blut. Eine Plausibilitätsüberprüfung von authentischen forensischen Fällen von Daldrup ergab in 15 % der Fälle ein negatives Ergebnis, d. h. zu kurze Zeitspannen [30]
- Die 95%-Konfidenzintervalle umfassen einen großen Bereich. Je größer der Zeitabstand, desto größer das Intervall. Während es bei 1 Stunde von nur 0,4 bis 2,6 Stunden reicht, vergrößert es sich bei 4 Stunden bereits auf eine beachtliche Spanne von 1,5 – 10,5 Stunden. Nach 1,5 Stunden kann man noch klar von einer akuten Wirkung ausgehen, im Gegensatz dazu besteht diese ab etwa 5 Stunden in der Regel nicht mehr. Dass die meisten berechneten Werte mit einer Genauigkeit von über 90 % innerhalb eines solchen Intervalls liegen, ist damit nicht verwunderlich.

- Das größte Problem stellen wie auch schon zuvor die chronischen, starken Konsumenten dar, die einen erheblichen Teil der üblicherweise im Untersuchungsgut repräsentierten Population ausmachen. Toennes et al. finden bei ihren Testpersonen selbst 24 Stunden nach dem letzten Joint noch THC-Konzentrationen über 1 ng/ml, bei einem Probanden sogar 11,7 ng/ml, und schlussfolgern, dass die Modelle zwar für gelegentliche Konsumenten geeignet sind, aber nicht für Rückrechnungen ausgehend von Werten in der terminalen Eliminationphase von starken Konsumenten [46]. Daldrup et al. [30] schränken weiterhin ein, dass „mit Modell II allenfalls die Mindestzeit, die seit Konsumende vergangen ist, abgeschätzt werden kann“.

Huestis et al. testeten die Modelle auch für Rückrechnungen nach oralem Cannabiskonsum. Die Ergebnisse wurden 2006 veröffentlicht, fallen aber naturgemäß schlechter aus, da die Resorption nach oraler Applikation variabler verläuft als beim Rauchen. Modell I sagte die Konsumzeitpunkte mit einer Genauigkeit von 74,4% richtig voraus, Modell II mit 90,0 %. Bei Mehrfachdosierungen sanken die Genauigkeiten weiter ab [70].

Eine weitere Strategie zur Bestimmung eines kurz zurückliegenden Konsums ist die Betrachtung von Metaboliten, die in einem solch geringen Ausmaß produziert werden, dass sie nur kurz nach dem Konsum nachweisbar sind. So wurde als ein Marker für kurz zurückliegenden Konsum der positive Nachweis von THC und 11-OH-THC in Urin nach β -Glucuronidasespaltung vorgeschlagen. Unter den gängigen Methoden führt nur die Spaltung mit der β -Glucuronidase aus *Escherichia coli*, die auch Etherglucuronide spalten kann, zum Nachweis relevanter Konzentrationen an THC und 11-OH-THC im Urin. Kemp et al. fanden vor allem kurz nach einem Konsumereignis relativ hohe Mengen [34, 71].

Seitdem THC-Glucuronid als Referenzstandard erhältlich ist, kann es auch ohne vorherige Glucuronidasespaltung direkt analysiert werden. Wenige Studien, deren Ergebnisse widersprüchlich sind, wurden bisher zur Evaluierung dieses Ansatzes durchgeführt. Einige lassen daran zweifeln, dass THC-Glucuronid als erfolgreicher Marker eingeführt werden kann, andere sind vielversprechend. Untersuchungen von Skopp et al. [72] ergaben, dass THC-Glucuronid bis zu einem Tag im Urin von chronischen Konsumenten nachweisbar ist, so dass bei der Urinanalytik für die chronischen Konsumenten falsch positive Ergebnisse erhalten werden können. In einer klinischen Studie von Mareck et al. fand sich nach Rauchen eines Joints mit 70 mg THC in keiner einzigen Blut- oder Urinprobe der Probanden ein positiver THC-Glucuronid-Nachweis [73]. Im Gegenzug zeigten Schwoppe et al. [74], dass THC-Glucuronid ein Einschlussfaktor, aber kein Ausschlussfaktor für kurz zurückliegenden Cannabiskonsum sein kann. In einer Rauchstudie konnten sie bei 80 % der Probanden kurz nach dem Rauchen THC-Glucuronid in sehr niedrigen Konzentrationen (Median c_{\max} 1,4 ng/ml, t_{\max} 0,5 h) im Serum nachweisen. Und das, obwohl der gerauchte Joint weniger THC (~ 54 mg) enthielt und die Bestimmungsgrenze mit 0,5 ng/ml höher lag als bei Mareck et al. Spätestens nach 2 Stunden war bei allen Probanden die Konzentration unter die Bestimmungsgrenze gefallen.

Ein weiterer Ansatz ist die Detektion von Cannabinoiden, die nur in geringen Mengen in Cannabismaterial enthalten sind. Dazu gehören Cannabinol und Cannabidiol, die beim Rauchen nur in kleinen Mengen aufgenommen werden und deren Konzentrationen im Blut deshalb schnell unter messbare Werte fallen. Diese beiden Substanzen zeigen ähnliche Detektionzeitfenster wie THC-Glucuronid (0,25 - 1 h). Nach 2 Stunden sind auch diese beiden Substanzen nicht mehr nachweisbar [74, 75].

2.9 Bisherige Erkenntnisse zu THCA

THCA ist bekannt als das Hauptcannabinoid in frischem Cannabismaterial und als nicht-psychoaktive Vorläufersubstanz von THC. Die Rauschwirkung bleibt bei Aufnahme dieser Substanz aus, da THCA nicht an Cannabinoid-Rezeptoren bindet. THCA ist instabil und wird im stark Sauren, im Alkalischen, bei Hitze und unter Einwirkung von UV-Licht decarboxyliert, so dass THC entsteht.

Die medizinische Forschung, die sich in der Vergangenheit vor allem mit THC beschäftigte, interessiert sich seit einigen Jahren zunehmend auch für andere Cannabinhaltsstoffe, unter anderem THCA. Verhoeckx et al. fanden potentielle immunmodulierende Effekte von THCA, die in Makrophagenkulturen den Tumornekrosefaktor- α , ein an Entzündungsreaktionen beteiligtes Zytokin, inhibierte [76].

THCA im Rauchkondensat und erste Versuche

Mit dem Nachweis von THCA im Rauchkondensat eines Joints und dem darauf folgenden Nachweis von THCA auch in Serum- und Urinproben von Cannabiskonsumern rückte THCA als möglicher Kurzzeitmarker für Cannabiskonsum ins Interesse. Jung et al. (2009) [77] untersuchten daraufhin den Metabolismus von THCA im Rattenmodell (zwei Wistar-Ratten, 15 mg THCA/kg Körpergewicht, orale Applikation), mit Rattenlebermikrosomen und an einem Probanden, der in einem Selbstversuch 50 mg THCA oral einnahm. Tab. 6 listet die identifizierten Metabolite, ihre MRM-Übergänge, MS-Parameter und Retentionszeiten in der damals verwendeten LC-MS/MS-Methode, so wie sie in der Doktorarbeit publiziert sind, auf. Interner Standard war damals D₃-THC-COOH, die chromatographische Säule eine Luna Phenylhexylsäule und das Fließmittelsystem bestand aus Ammoniumacetat und Acetonitril.

Auf Grundlage der gefundenen Metabolite wurde ein zu THC analoger Stoffwechselweg postuliert, der in Abb. 6 detailliert dargestellt ist. Die Positionen der Hydroxylgruppen und der Ketogruppe folgen dem typischen Metabolisierungsschema von THC, wurden aber nicht explizit bestimmt, da für eine sichere Strukturaufklärung eine NMR-Analyse nötig gewesen wäre. Die Positionsangaben werden für diese Arbeit wie oben angegeben beibehalten.

THCA in der Haaranalytik

Auwärter et al. [78] untersuchten außerdem, inwieweit THCA bei der Interpretation von Ergebnissen der Haaranalytik behilflich sein kann. Kontamination von außen und Inkorporation von Substanzen bzw. ihren Abbauprodukten sind bei der Haaranalytik ein viel diskutiertes Thema. Cannabiskonsum weist man in der Regel über den Metaboliten THC-Carbonsäure nach, der aber nur in sehr geringem Ausmaß – wenn überhaupt – in das Haar eingelagert wird. Oft findet man in den Haarproben unverhältnismäßig hohe THC-Konzentrationen, die schwer mit den geringen THC-Carbonsäure-Konzentrationen in Einklang zu bringen sind, zumal die Konzentrationsverhältnisse im Blut umgekehrt sind.

In einem Selbstversuch nahm einer der Autoren 10 mg THCA über 30 Tage ein. Haarproben wurden entnommen und sowohl mit alkalischer Hydrolyse als auch einem direkten Extraktionsverfahren mit Methanol aufbereitet. Es zeigte sich, dass THCA nach oraler Aufnahme zwar im Blut nachweisbar ist, aber nicht in relevanten Mengen in das Haar eingelagert wird.

Zum Vergleich wurden „THC-positive“ Haarproben aus einem Ringversuch und von einem starken Cannabiskonsumern analysiert. In diesen „THC-positiven“ Proben fand sich THCA, wobei ein signifikanter

Unterschied zwischen den beiden Aufbereitungsmethoden festzustellen war. Nach methanolischer Extraktion überstiegen die THCA-Konzentrationen in einigen Fällen die gefundenen THC-Konzentrationen bei weitem, während sich das Verhältnis nach alkalischer Hydrolyse umkehrte und z. T. keine THCA mehr detektiert werden konnte.

Da THCA nicht bzw. nur sehr geringfügig aus dem Körperinneren in die Haarmatrix eingelagert wird, kann man davon ausgehen, dass sie nahezu ausschließlich durch externe Kontamination ins Haar gelangt. Das bedeutet, dass ein positiver THCA-Nachweis eine externe Kontamination beweist. Nebenstromrauch hat eine geringere Temperatur als Hauptstromrauch, der inhaliert wird, so dass mehr THCA und weniger THC enthalten ist. Die im Vergleich zu THC-Carbonsäure hohen THC-Konzentrationen sind nach diesem Experiment sehr gut mit einer Decarboxylierung der THCA während des Probenaufbereitungsprozesses erklärbar.

Tab. 6: THCA-Metabolismus in der Ratte und im Menschen: in Urin bzw. Serum gefundene Metabolite, MRM-Übergänge und Retentionszeiten, so wie sie mit der damaligen LC-MS/MS-Methode beobachtet wurden, massenspektrometrische Parameter, die für alle Substanzen galten: DP -45 V, EP -10 V, CXP -3 V

Analyt	MRM-Übergänge		CE (V)	t _R (min)	Ratte (Urin)	Mensch (Urin)	Mensch (Serum)
THCA	357,2	313,2	-35	15,8	x	x	
	357,2	245,2	-50				
	357,2	191,1	-50				
THCA-Gluc	533,2	357,2	-35	12,4 und	x	x	x
	533,2	313,2	-50	14,7			
	533,2	245,2	-50				
11-OH-THCA	373,2	311,2	-35	13,5	x	x	x
	373,2	267,1	-50				
	373,2	173,1	-50				
THCA-COOH	387,2	299,2	-35	12,0	x	x	x
	387,2	245,2	-50				
	387,2	191,1	-50				
8 α -OH-THCA	373,2	311,2	-35	12,9		x	x
	373,2	267,1	-50				
	373,2	173,1	-50				
8 β -OH-THCA	373,2	311,2	-35	12,4		x	x
	373,2	267,1	-50				
	373,2	173,1	-50				
THCA-8-on	371,2	327,2	-35	13,8	x	x	x
	371,2	284,2	-35				
	371,2	189,1	-50				
8 α ,11-Bis-OH-THCA	389,2	327,2	-35	11,9	x	x	
	389,2	269,2	-35				
	389,2	309,2	-50				

Analyt	MRM-Übergänge		CE (V)	t _R (min)	Ratte (Urin)	Mensch (Urin)	Mensch (Serum)
8β,11-Bis-OH-THCA	389,2	327,2	-35	11,6	x	x	
	389,2	269,2	-35				
	389,2	309,2	-50				
8-OH-THCA-COOH	403,2	385,2	-20	10,2		x	
	403,2	297,2	-35				
4'-OH-THCA-COOH	403,2	315,2	-35	9,2		x	
	403,2	261,1	-50				
9,10-Bis-OH-HHCA	391,2	329,2	-35	12,1		x	x
	391,2	311,2	-50				
	391,2	191,2	-50				
11-OH-THCA-Gluc	549,2	373,2	-35	12,6	x	x	
	549,2	311,2	-50				
	549,2	268,2	-50				
THCA-COOH-Gluc	563,2	387,2	-35	10,8	x	x	x
	563,2	299,2	-50				
	563,2	245,2	-50				
8α-OH-THCA-Gluc	549,2	373,2	-35	12,0		x	
	549,2	311,2	-50				
	549,2	268,2	-50				
8β-OH-THCA-Gluc	549,2	373,2	-35	11,3		x	
	549,2	311,2	-50				
	549,2	268,2	-50				
THCA-8-on-Gluc	547,2	371,2	-35	12,8	x	x	
	547,2	327,2	-50				
	547,2	284,2	-50				
8α, 11-Bis-OH-THCA-Gluc	565,2	389,2	-35	11,0	x	x	
	565,2	327,2	-50				
	565,2	309,2	-50				
8β, 11-Bis-OH-THCA-Gluc	565,2	389,2	-35	10,6	x	x	
	565,2	327,2	-50				
	565,2	309,2	-50				
8-OH-THCA-COOH-Gluc	579,1	403,2	-35	9,4		x	
	579,1	385,2	-50				
	579,1	297,2	-50				
4'-OH-THCA-COOH-Gluc	579,1	403,2	-35	8,4		x	
	579,1	315,2	-50				
	579,1	261,1	-50				
9,10-Bis-OH-HHCA-Gluc	567,2	391,2	-35	11,4		x	
	567,2	329,2	-50				
	567,2	311,2	-50				

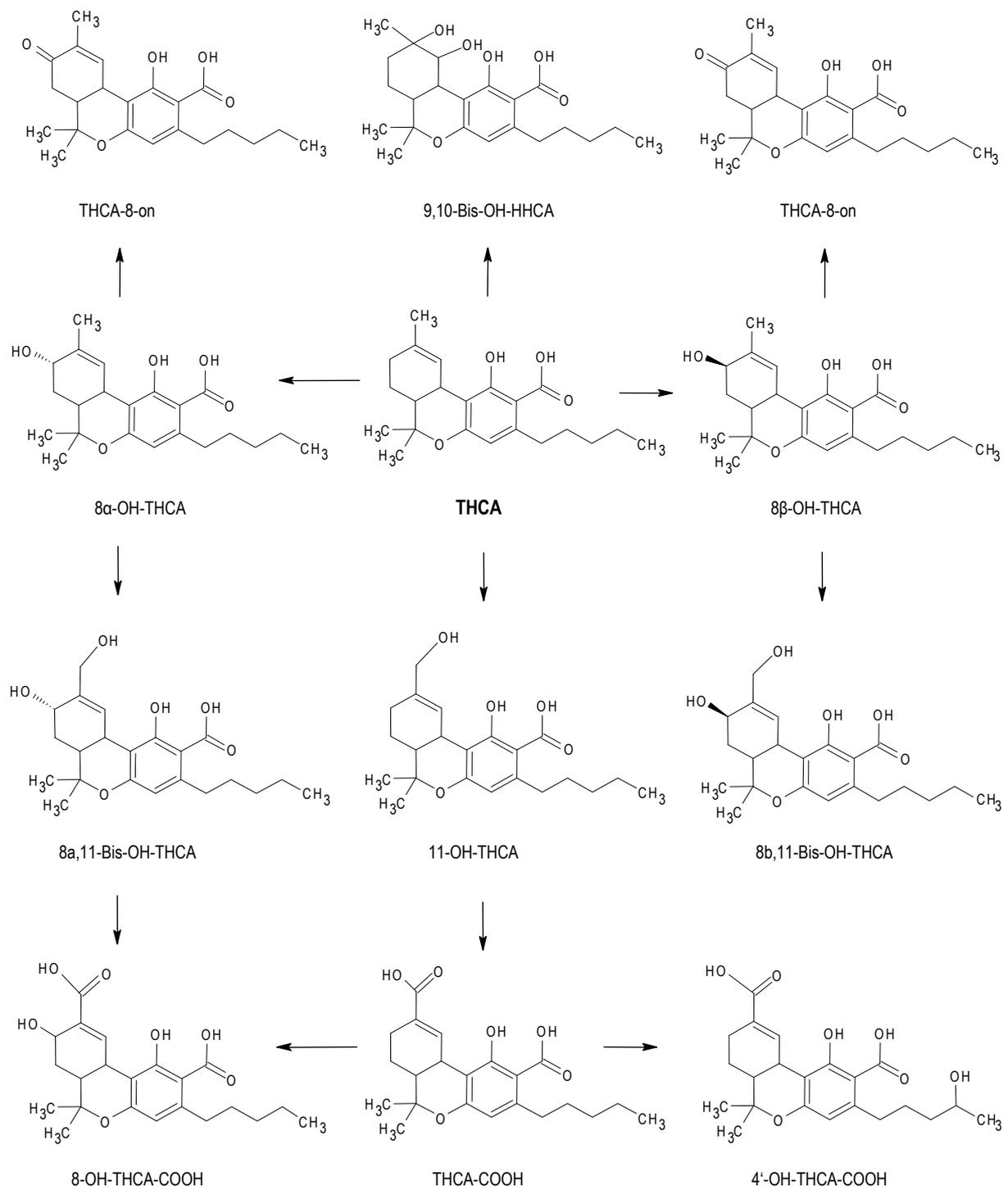


Abb. 6: Postulierte Phase-1-Reaktionen von THCA nach Jung et al. [77]

3 Pharmakokinetische Berechnungen

Pharmakokinetische Berechnungen basieren generell auf Konzentrations-Zeit-Kurven in Körperflüssigkeiten nach Applikation einer bestimmten Dosis der Testsubstanz. Ausgangspunkt in der pharmakokinetischen Grundlagenforschung ist in der Regel eine Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve nach intravenöser Gabe, anhand derer grundlegende Parameter ermittelt werden. Wichtige Parameter zur Charakterisierung einer Substanz sind u. a. die erreichte Maximalkonzentration c_{\max} , der Zeitpunkt der Maximalkonzentration t_{\max} , die Fläche unter der Kurve AUC, die Anfangskonzentration c_0 , die Clearance CL, verschiedene Verteilungsvolumina, die mittlere Verweilzeit MRT und Halbwertszeiten für Elimination und Verteilung.

Zwei Parameter sind direkt aus den Konzentrationzeitverläufen ablesbar:

- Maximalkonzentration c_{\max}
- der Zeitpunkt der Maximalkonzentration t_{\max}

Weitere sekundäre Parameter werden anhand des Kurvenverlaufs berechnet:

- AUC: Die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) ist einer der wichtigsten Parameter. Sie ist proportional zur absoluten Substanzmenge, die in den Blutkreislauf gelangt und berechnet sich folgendermaßen:

$$AUC = \int_0^{\infty} c(t) dt$$

Die Fläche unter der Kurve kann mit Hilfe der Trapezregel bestimmt werden. Bei der linearen Trapezregel wird zwischen den Messpunkten linear interpoliert und die Gesamtfläche durch Aufaddieren aller Teiltrapeze näherungsweise berechnet. Wird die Substanz nur noch aus dem Körper eliminiert, folgen die Werte in Normalfall einer Exponentialfunktion, so dass bei Anwendung der linearen Trapezregel die Flächen überschätzt würden. Daher bietet sich an, in diesem Bereich logarithmisch zu interpolieren (log-lineare Trapezregel). In Pharmakokinetik-Software wird oft eine Kombination beider Methoden verwendet, wobei bei ansteigenden oder gleich bleibenden Konzentrationen die lineare und bei abnehmenden die log-lineare Trapezregel zur Anwendung kommen.

- c_0 : Die Anfangskonzentration c_0 ist *per definitionem* = 0 bei extravasaler Applikation. Bei intravasaler Applikation berechnet man eine fiktive Anfangskonzentration. Diese entspricht dem Konzentrationswert, der sich bei sofortiger homogener Verteilung des Substanzbolus im Blutvolumen ohne Umverteilung in periphere Bereiche oder Metabolisierung ergeben hätte. Dazu wird der Kurvenabschnitt, den die ersten Messpunkte abbilden, bis zur Ordinate (Zeit = 0) extrapoliert.
- CL: Die Clearance CL ist ein Maß für die Elimination. Bildlich gesehen entspricht sie dem Blutvolumen, das in einer bestimmten Zeit von der Substanz befreit („gecleart“) wird. Die totale Plasmaclearance ergibt sich aus der applizierten Dosis und der AUC.

$$CL = \frac{\text{Dosis}}{AUC}$$

- MRT: Die mittlere Verweildauer MRT (mean residence time) entspricht der Zeit, die ein Substanzmolekül durchschnittlich im Körper verbringt. Sie ist das arithmetische Mittel aus den Verweilzeiten aller Moleküle und umfasst sämtliche pharmakokinetische Prozesse zusammen: Freisetzung, Resorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination. Vor allem bei einer komplexen Pharmakokinetik – und als solche kann man die Kinetik von THCA bereits ansehen – ist sie ein nützlicher Parameter.

Zur Berechnung der MRT benötigt man neben der AUC auch die erste Momentkurve, AUMC (area under the first moment curve) genannt.

$$\text{MRT} = \frac{\text{AUMC}}{\text{AUC}}$$

Die AUMC erhält man durch Multiplikation von Konzentration und Zeit und Auftragen gegen die Zeit.

$$\text{AUMC} = \int_0^{\infty} t \cdot c(t) dt$$

In Abb. 7 sind die AUC und die dazugehörige AUMC nach oraler Gabe von 10 mg THCA dargestellt. Die MRT repräsentiert den Zeitpunkt, zu dem 63,2 % aller Substanzmoleküle den Körper verlassen haben, und ist immer größer als $t_{1/2}$ [79].

- V : Das Verteilungsvolumen ist ein Proportionalitätsfaktor, der die Plasmakonzentration und die Dosis ins Verhältnis setzt. Es handelt sich um ein scheinbares Volumen, das keinem authentischen Raum entsprechen muss. Verteilt sich eine Substanz vorwiegend in peripheren Bereichen, kann das Verteilungsvolumen Werte annehmen, die weit über dem realen Körpervolumen liegen. Man unterscheidet das V_z , das Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments, das sich bei intravenöser Applikation aus dem Quotienten von Dosis und der fiktiven Anfangskonzentration ergibt

$$V_z = \frac{\text{Dosis}}{c_0}$$

und das V_{ss} , das scheinbare Verteilungsvolumen im Steady State, das sich kompartmentunabhängig berechnet, indem man die Clearance mit der MRT multipliziert. Ersetzt man diese beiden Parameter durch die oben genannten Gleichungen, ergibt sich eine Formel, die nur die Dosis sowie die AUC und die AUMC enthält.

$$V_{ss} = \text{CL} \cdot \text{MRT} \quad V_{ss} = \frac{\text{Dosis} \cdot \text{AUMC}}{\text{AUC}^2}$$

Der Steady State ist der Gleichgewichtszustand, an dem die Substanzkonzentration in der Peripherie maximal ist.

Für die terminale Phase lässt sich ein weiteres scheinbares Verteilungsvolumen, V_{term} , berechnen, wobei L_z die kleinste Verteilungskonstante ist.

$$V_{\text{term}} = \frac{\text{Dosis}}{\text{AUC} \cdot L_z}$$

- $t_{1/2}$: Im Gegensatz zur MRT ist die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ein Parameter, der jedem pharmakokinetischen Prozess zugeordnet werden kann. So gibt es für jede Resorptions-, Verteilungs- und Eliminationsphase eine eigene Geschwindigkeitskonstante und damit auch eine eigene Halbwertszeit. Die Halbwertszeit berechnet sich bei einer Kinetik 1. Ordnung aus der entsprechenden Geschwindigkeitskonstante k des betrachteten Prozesses.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

- BV: Die Bioverfügbarkeit ist definiert als der Anteil der ursprünglich verabreichten Substanzmenge, die im systemischen Kreislauf verfügbar ist. Bei intravenöser Gabe ist sie definitionsgemäß 100 %, da die gesamte Menge direkt injiziert wird. Die Bioverfügbarkeit nach extravasaler Gabe lässt sich nur nach einem solchen Referenzexperiment ermitteln. Nach Riviere [79] gilt:

$$\text{BV}_{\text{extravasal}} = \frac{\text{AUC}_{\text{ex}} \cdot \text{Dosis}_{\text{iv}} \cdot t_{1/2\text{iv}}}{\text{AUC}_{\text{iv}} \cdot \text{Dosis}_{\text{ex}} \cdot t_{1/2\text{ex}}}$$

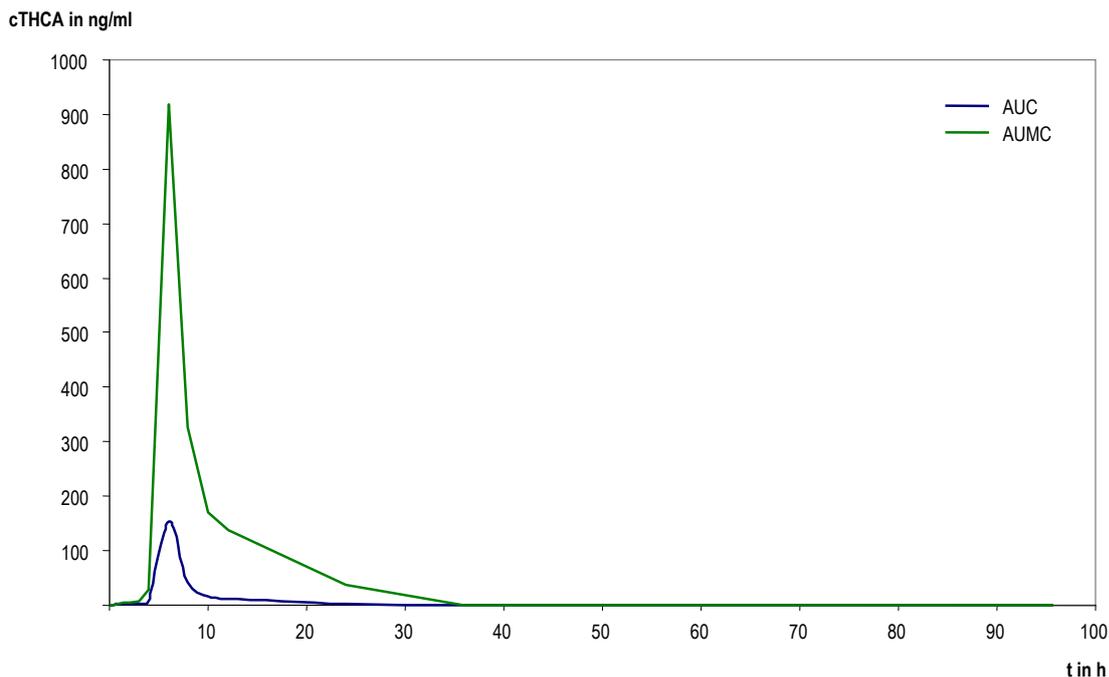


Abb. 7: Area under the curve (AUC) und area under the first moment curve (AUMC), berechnet aus Konzentrationzeitdaten nach Gabe von 10 mg THCA oral, Daten der Humanstudie von Proband C

Resorptions-, Verteilungs- und Eliminationsvorgänge folgen in der Regel der bereits eben erwähnten Kinetik 1. Ordnung, es sei denn, die verantwortlichen Transporter bzw. Enzyme sind aufgrund sehr hoher Dosen gesättigt. Die Kinetik 1. Ordnung wird in der pharmakokinetischen Literatur auch als „lineare Kinetik“ bezeichnet. Die gemessenen Konzentrationen im Organismus sind der applizierten Dosis proportional und die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Prozesse sind zwar abhängig vom Individuum und der Substanz, aber unabhängig von Dosis und Zeit. Bei halblogarithmischer Darstellung einer Konzentrations-Zeit-Kurve nach intravenöser Bolusgabe, die einer Kinetik 1. Ordnung folgt und der ein Ein-Kompartiment-Modell zugrunde liegt, ergibt sich eine Gerade.

Prinzipiell lassen sich bei der Analyse von Plasmakonzentrationskurven zwei Vorgehensweisen unterscheiden, die auch später bei der Auswertung der Humanstudie zur Anwendung kommen werden: die Kompartimentanalyse und die Nicht-Kompartimentanalyse.

3.1 Kompartimentanalyse

Dies ist die klassische Methodik, die bis heute am weitesten verbreitet ist. Bei der Kompartimentanalyse geht man davon aus, dass der Körper aus einer bestimmten Anzahl von Kompartimenten besteht. Ein Kompartiment ist definiert als ein pharmakokinetisch einheitlicher Raum, in dem eine bestimmte Wirkstoffkonzentration herrscht, der ein bestimmtes Volumen einnimmt und aus dem der Wirkstoff mit einer bestimmten Rate eliminiert wird. Dieser Raum muss keinen konkreten anatomischen oder physiologischen Räumen entsprechen, sondern kann heterogen sein. Da Blut eine leicht zugängliche Matrix ist, sind die meisten Modelle so gestaltet, dass das Plasmavolumen das zentrale Kompartiment darstellt, mit dem alle anderen Kompartimente und Prozesse verbunden sind. Grundvoraussetzung für die Annahme und Berechnung eines Kompartimentmodells ist die oben beschriebene lineare Kinetik.

Die Pharmakokinetik der wenigsten Substanzen lässt sich mit einem einzigen Kompartiment beschreiben. Oft muss man weitere Kompartimente mit einbeziehen, wenn deutlich wird, dass sie das pharmakokinetische Verhalten entscheidend beeinflussen. Es ist allerdings schwierig, mehr als drei Kompartimente zu identifizieren und auch mathematisch zu charakterisieren. Das offene Drei-Kompartiment-Modell ist daher in der Realität das komplexeste Modell, mit dem sinnvoll gearbeitet werden kann. Da dieses im weiteren Verlauf noch eine Rolle spielen wird, soll es hier in Grundzügen erläutert werden.

In Abb. 8 sind die Kompartimente, ihre Beziehungen zueinander und einige pharmakokinetische Parameter dargestellt. Ausgehend vom zentralen Kompartiment, dem Blutvolumen, in das der Substanzbolus gegeben wird, verteilt sich die Substanz in ein „flaches“ Kompartiment und ein „tiefes“ Kompartiment. Den Um- und Rückverteilungsvorgängen sowie der Elimination können Geschwindigkeitskonstanten zugeordnet werden: k_{12} und k_{13} für die Umverteilung aus dem zentralen Kompartiment in das flache bzw. tiefe Kompartiment, k_{21} und k_{31} für die jeweilige Rückverteilung und k_e für die Elimination aus dem zentralen Kompartiment. Das zentrale Kompartiment lässt sich gut definieren und charakterisieren. Ihm können eine Plasmakonzentration c_p , eine Anfangskonzentration c_0 und ein Volumen V_z zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu sind die anderen Kompartimente schwer fassbar und bleiben mitunter ohne klares physiologisches Korrelat.

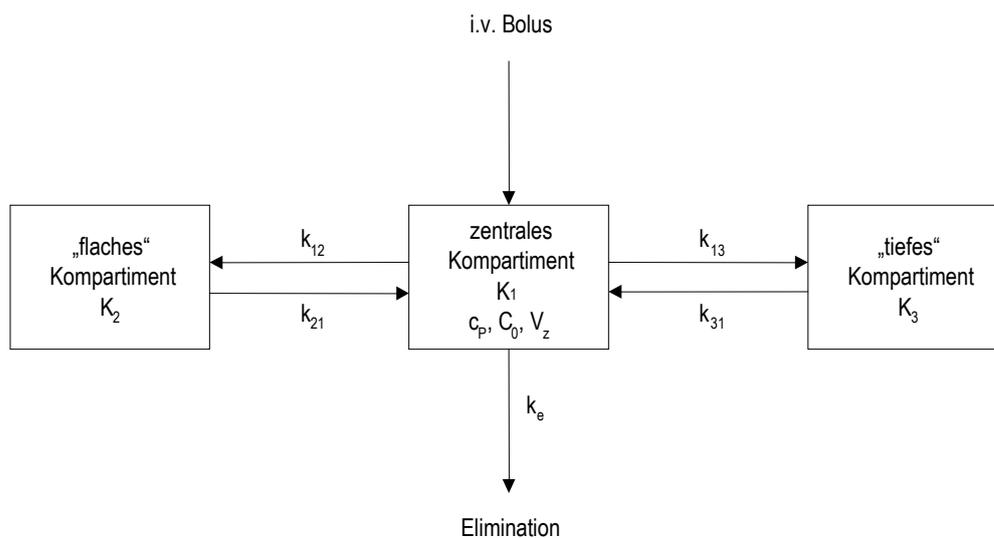


Abb. 8: Schematische Darstellung eines Drei-Kompartiment-Modells

Die allgemeine mathematische Formel eines Drei-Kompartiment-Modells lautet:

$$C_t = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} + C \cdot e^{-\gamma \cdot t}$$

Der erste Term entspricht der ersten Umverteilungsphase in das flache Kompartiment, der zweite der Umverteilung in das tiefe Kompartiment und der letzte der terminalen Eliminationsphase. Legt man diese drei Prozesse „übereinander“, ergibt sich der typische Kurvenverlauf, an dem man bereits bei halblogarithmischer Darstellung visuell die drei Phasen erkennen kann (Abb. 9). Die Werte für die präexponentiellen Faktoren A , B und C sowie die Dispositionskonstanten α , β und γ (die sogenannten Makrokonstanten) sind bei Mehrkompartimentmodellen aus dem Plasmaspiegelverlauf direkt zugänglich. Sie sind Hybridkonstanten, da sie sich aus der Überlagerung der verschiedenen Verteilungs- und

Eliminationsprozesse ergeben. Von den Makrokonstanten lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten k_e , k_{12} , k_{21} , k_{13} und k_{31} (die sogenannten Mikrokonstanten) ableiten.

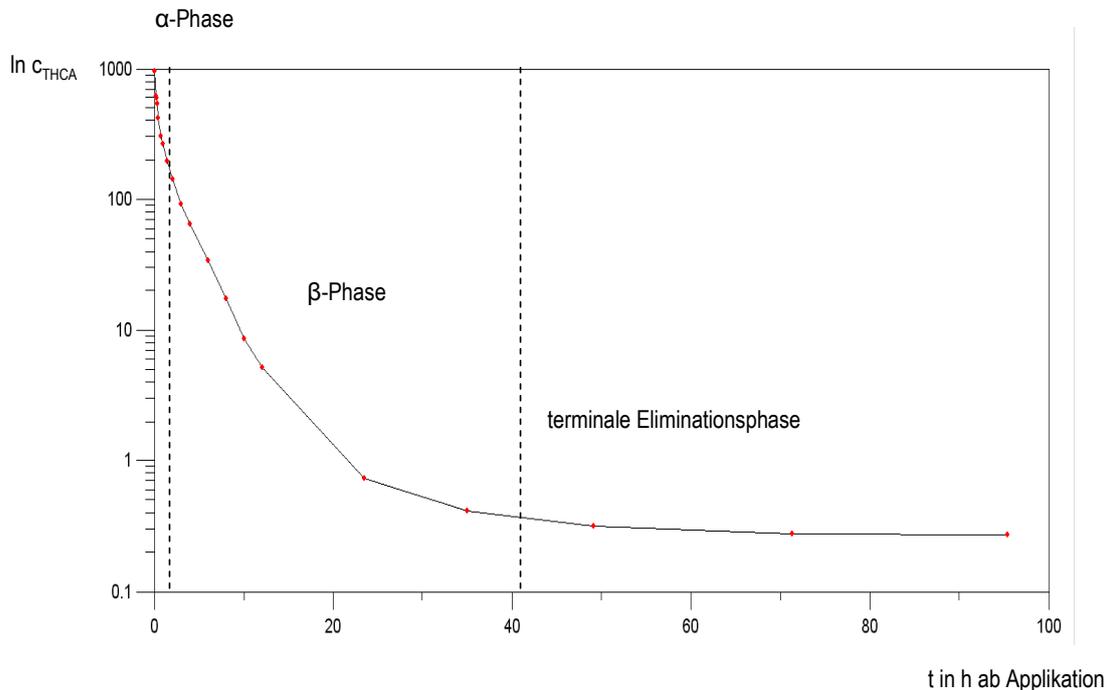


Abb. 9: Konzentrationszeitdiagramm in halblogarithmischer Darstellung, Daten aus der Humanstudie von Proband M, visuelle Abschätzung der α -, β - und terminalen Phase

Vorgehen bei der Datenanalyse

Das unten beschriebene Vorgehen folgt der von Borchert [80] vorgeschlagenen Methodik:

1. Am Anfang steht die Auswahl eines Modells und damit die Entscheidung, wie viele Kompartimente angenommen werden sollen. Zur Orientierung können die Plasmakonzentrations-Zeit-Wertepaare halblogarithmisch dargestellt und einzelne Phasen abgeschätzt werden. Daraus ergibt sich eine Grundgleichung für das mathematische Modell.
2. Es folgt die Ermittlung des mathematischen Modells mit Hilfe der Residuenabschälmmethode (Method of Residuals). Dabei werden die Plasmakonzentrationswerte logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen. Der terminale Eliminationsbereich stellt eine Gerade dar, deren Gleichung mittels linearer Regression ermittelt wird. Die Steigung ist $-k_e$. Nach Extrapolation der Gerade bis zur y-Achse berechnet man die Residuen, in dem die entlogarithmierten y-Werte der Gerade von den realen y-Werten abgezogen werden. Werden die berechneten Residualwerte wieder logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen, ergibt sich eine Residuengerade. Aus deren Steigung und dem y-Achsenabschnitt leiten sich der präexponentielle Faktor und die Dispositionskonstante ab [81]. Die Makro- und Mikrokonstanten einfacher Kompartiment-Modelle lassen sich noch leicht und ohne die Hilfe einer Software berechnen. Schon ab einem Zwei-Kompartiment-Modell, spätestens aber bei einem Drei-Kompartiment-Modell erleichtert ein Pharmakokinetik-Programm diese Berechnungen enorm.

- Die mit der Residuenabschälmethode gewonnenen Anfangsschätzwerte für die Makrokonstanten können von der Software weiter optimiert werden – die berechnete Kurve wird an die realen Daten angepasst („gefittet“). Eine gute Möglichkeit zu prüfen, ob ein Modell die beobachteten Konzentrations-Zeit-Verläufe gut beschreibt oder nicht, ist die Erstellung von „residual plots“. Dafür werden die Differenzen zwischen den realen und den nach dem Modell berechneten Werten ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Ergibt sich eine zufällige Verteilung der Residuen, kann man davon ausgehen, dass das Modell ausgewogen und nicht einseitig verschoben ist.
- Die optimierten Kurven werden über die Berechnung der Summe der Abweichquadrate (least squares = LS) evaluiert. Diese soll minimal sein.

$$LS = \sum (c_{\text{real}} - c_{\text{berechnet}})^2$$

Zusätzlich können verschiedene Wichtungsmodelle getestet werden, da die analytischen Fehler nicht für alle Konzentrationen gleich sind. Dabei werden alle Abweichquadrate mit einem Wichtungsfaktor multipliziert und danach aufsummiert (WLS = weighted least squares). Typische Wichtungsfaktoren sind $\frac{1}{c_{\text{real}}}$ oder $\frac{1}{(c_{\text{real}})^2}$.

- Nach der Analyse verschiedener Modelle kann mit Hilfe von sogenannten objektiven Informationskriterien festgestellt werden, welches Modell am besten geeignet ist. Das am häufigsten verwendete Kriterium ist das Akaike-Kriterium (AIC), benannt nach dem japanischen Statistiker Hirotugu Akaike. Dieser berücksichtigt in seiner Berechnungsformel sowohl die Güte der Anpassung (WLS) als auch die Anzahl der Parameter des Modells (k, bei einem Drei-Kompartiment-Modell gilt $k = 6$, und zwar A, B, C, α , β und γ). n steht für die Anzahl der Messwerte.

$$AIC = n \cdot \ln WLS + 2k$$

Damit ist gewährleistet, dass ein komplizierteres Modell nur dann als geeignet angesehen wird, wenn dadurch die Güte der Anpassung entscheidend verbessert wird („Prinzip der Sparsamkeit“). Weitere Kriterien sind das Schwarz-Kriterium und die „objective function“. Es gilt: Je kleiner der errechnete Wert, desto geeigneter das Modell. Bei der Berechnung von AIC oder SC-Werten ist die Differenz entscheidend. Differenzen < 2 sind grenzwertig, erst wenn sie > 5 sind, gelten sie als signifikant. Unmittelbare Vergleiche sind nur bei Modellen, die die gleiche Wichtung verwenden, sinnvoll [79].

- Zum Schluss können aus den Makrokonstanten die AUC und - von dieser abgeleitet - weitere pharmakokinetische Parameter wie V_z und CL berechnet werden. Die Geschwindigkeitskonstanten k_e , k_{12} , k_{21} , k_{13} und k_{31} , die Halbwertszeiten der einzelnen Phasen sowie die fiktive Anfangskonzentration c_0 ergeben sich ebenfalls aus den Makrokonstanten.

3.2 Nicht-Kompartimentanalyse

Ziel einer Nicht-Kompartimentanalyse (non-compartmental analysis) ist es, pharmakokinetische Parameter auf der Basis einer beschreibenden Datenanalyse zu ermitteln, ohne dabei von einem mathematischen Modell auszugehen. Es ist ohne Weiteres möglich, die Maximalkonzentration c_{max} , den Zeitpunkt der Maximalkonzentration t_{max} , verschiedene Werte für die Fläche unter der Kurve AUC, die fiktive Anfangskonzentration c_0 , die totale Plasmaclearance CL, die mittlere Verweilzeit MRT und die Verteilungsvolumina V_z und V_{ss} ohne eine an die Kurve „gefittete“ Exponentialfunktion n-ten Grades zu ermitteln. Genau darin liegt auch die Stärke dieser Herangehensweise.

Allein für die Berechnung der Halbwertszeit $t_{1/2}$, die bei der Nicht-Kompartimentanalyse der terminalen Eliminationshalbwertszeit entspricht, muss nach den Prinzipien der Kompartimentanalyse verfahren werden. Nach Logarithmierung wird eine Gerade in den Bereich des terminalen Eliminationsprozesses gelegt und über die ermittelte Steigung die Halbwertszeit berechnet.

4 Präparative und analytische Techniken

Dieses Kapitel beschreibt kurz die grundlegenden Aspekte der präparativen und analytischen Techniken, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

4.1 Flash-Chromatographie mit UV-Detektion

Die Flash-Chromatographie dient der Isolierung von Substanzen im präparativen Maßstab und kam für die Gewinnung von THCA aus vorextrahiertem Cannabisextrakt zum Einsatz. Sie folgt dem Prinzip der traditionellen Säulenchromatographie, arbeitet aber mit leicht erhöhtem Druck, was den Laufmittelfluss und damit die Trennung erheblich beschleunigt. Die Trennleistung wird dadurch sogar noch gesteigert, da die Moleküle weniger Zeit zur Diffusion haben.

Für die Trennung standen ein automatisiertes Flash-Chromatographie-System mit zwei Pumpen, integriertem UV-Detektor und Fraktionssammler sowie vorgepackte Säulen mit verschiedenen Trennmaterien zur Verfügung. Typische Partikelgrößen liegen zwischen 40 und 63 μm , was den besten Kompromiss zwischen Auflösung und Rückdruck darstellt. Das Drucklimit des Geräts liegt bei 200 psi, entsprechend ca. 14 bar.

Es können Substanzgemische im Milligramm- bis Grammbereich auf die Säule gegeben werden, wobei die Kapazität vom Säulenmaterial, dem Säulenvolumen und den zu trennenden Substanzen abhängig ist. Bei Säulen mit Normalphase (polar, z. B. Silicagel) liegt die obere Grenze bei 10 %, bei Säulen mit Umkehrphase (unpolar, z. B. durch C_{18} -Substituenten modifiziertes Silicagel) nur bei 1 % der Sorbensmasse. Ist die Trennung unproblematisch, weil die Retentionszeiten der zu trennenden Substanzen weit auseinander liegen, kann eine Beladungsmenge an der oberen Grenze gewählt werden. Ist dies nicht der Fall, empfiehlt sich eine geringere Menge.

Für die Beladung gibt es zwei verschiedene Techniken:

- Direkte Injektion: Das Substanzgemisch wird – wenn möglich – in Fließmittel, das so wie am Anfang des Konzentrationsgradienten zusammengesetzt ist, gelöst und mit Hilfe einer Spritze direkt auf die Trennsäule gegeben. Entscheidend ist, dass das zugegebene Lösungsmittel die Chromatographie nicht stört.
- "Dried solid load cartridge technique": Dazu wird das Substanzgemisch in einem organischen Lösungsmittel gelöst, auf ein Adsorbensmaterial, z. B. Silica 60 oder Celite®, aufgezogen und das trockene Pulver in eine leere Kartusche gefüllt, die der Trennsäule vorgeschaltet ist. Mit dieser Technik erreicht man generell eine bessere Auflösung, da das volle Volumen der Trennsäule ausgenutzt wird und kein zusätzliches Lösungsmittel ins Spiel kommt, das die Wechselwirkungen zwischen den Analyten und dem Sorbens beeinflussen kann.

Mussten bei der traditionellen Säulenchromatographie noch alle Fraktionen mittels Dünnschichtchromatographie getestet werden, erlaubt der integrierte UV-Detektor eine kontinuierliche Detektion und eine darauf abgestimmte automatische Fraktionierung. Zwei Wellenlängen, die man auf Grundlage der Absorptionsspektren der gesuchten Substanzen auswählt, können beim Combiflash-Gerät eingestellt werden. Je nach Signalintensität und sich ändernder Steigungen fängt der Fraktionssammler das Eluat dann auf oder verwirft es.

4.2 Hochdruckflüssigchromatographie-Dioden-array-Detektion (HPLC-DAD)

Die Hochdruckflüssigchromatographie gekoppelt mit Dioden-array-Detektion wurde für die Reinheitsbestimmung der isolierten THCA und zur Überprüfung der Stabilität der THCA-haltigen Injektionslösungen eingesetzt.

Bei in der HPLC verwendeten analytischen Säulen bewegen sich die Partikelgrößen zwischen 3 und 5 μm und Rückdrücke können bei mehreren hundert Bar liegen. Die Detektion mit einem Dioden-array-Detektor ermöglicht es, zu jedem Zeitpunkt ein komplettes UV-Spektrum zu vermessen. Eine Deuteriumlampe als Lichtquelle liefert dafür ein fast kontinuierliches Lichtspektrum im UV-Wellenlängenbereich. Anhand des erhaltenen UV-Spektrums und typischer Absorptionsmaxima und -minima können Substanzen im Vergleich mit Spektrenbibliotheken sowohl identifiziert als auch über die Messung der Absorption bei einer bestimmten Wellenlänge quantifiziert werden.

4.3 Hochdruckflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)

Die Hochdruckflüssigchromatographie-Massenspektrometrie ist mittlerweile die meist benutzte Technik in der Bioanalytik. Sie wurde für die Analytik bei der Phänotypisierungsmethode und zur Bestimmung der THCA-Konzentrationen und der Metabolitenprofile in den Proben der Humanstudie verwendet. Ein Meilenstein bei der Entwicklung dieser Technik war die Überführung des flüssigen Eluentenstroms in eine gasförmige Phase mit ionisierten Analyten und zwar unter Aufrechterhaltung des Hochvakuums, das im Inneren des Massenspektrometers herrschen muss. Die wichtigsten Ionisierungstechniken, die heute verwendet werden, sind die Elektrosprayionisation (ESI) und die chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur die ESI zum Einsatz kam, soll diese hier kurz erläutert werden.

Bei der Elektrosprayionisation wird die Flüssigkeit aus der HPLC über eine beheizte Metallkapillare, an der ein sehr hohes Potential (ca. 5000 V) anliegt, in das Interface gepumpt, wobei ein Nebel aus feinsten, hoch geladenen Tröpfchen entsteht. Auf dem Weg zum Massenspektrometer reduziert sich der Tröpfchendurchmesser immer weiter, bis sich schließlich nur noch einzelne meist einfach geladene Ionen in der Gasphase befinden, die schließlich in das Massenspektrometer geleitet werden. Es existieren zwei Theorien darüber, wie dieser Ionisationsprozess im Detail vonstatten geht, das „ion desorption model“ und das „charge residue model“.

Mitunter können verbliebene neutrale Lösemittelmoleküle an den Ionen angelagert sein (Cluster), was dazu führen würde, dass die Analyten bei den zu erwartenden m/z -Werten keine Signale hervorrufen. Diese Cluster können durch einen schwachen Stickstoffgegenstrom entfernt werden. Auch der Sprühvorgang und die Verkleinerung der Tröpfchen können durch den Einsatz von Hilfsgasen, z. B. Stickstoff, unterstützt werden – und zwar durch das sogenannte Ionspray, das durch die Kapillare geleitet wird, und das Turboionspray, das aus einem heißen Stickstoffstrom besteht.

Bei einem klassischen Tandemmassenspektrometer existieren drei Quadrupole, von denen der erste und der dritte als Massenanalytoren fungieren und der zweite die Kollisionszelle darstellt. Die Quadrupole dienen zur Fokussierung des Ionenstrahls und zur Selektion von Ionen definierter Masse-Ladungs-Verhältnisse. Wichtige Parameter, die man bei der Methodenentwicklung für jede Substanz optimiert, sind: das Declustering Potential (DP), das Collision Cell Entrance Potential (EP), die Kollisionsenergie (CE) und das Collision Cell Exit Potential (CXP). In der Kollisionszelle stoßen die Ionen mit

Stickstoffmolekülen zusammen und fragmentieren dabei. Die Fragmentierung ist umso stärker, je höher der Gasdruck in der Kollisionszelle ist (CAD). Weitere substanzunabhängige Einstellungen sind die Temperatur der Ionenquelle und das Curtain Gas.

Bei den verwendeten Tandemmassenspektrometern konnte der dritte Quadrupol als lineare Ionenfalle eingesetzt werden (QTrap-Funktion). Eine Ionenfalle kann Ionen definierter Masse-Ladungsverhältnisse durch verschiedene elektrische Felder festhalten und erst nach Ablauf eines zuvor bestimmten oder an den Ionenstrom angepassten Zeitraums freigeben und Richtung Detektor beschleunigen. Ergebnis ist eine höhere Empfindlichkeit und die Möglichkeit weiterer Experimente. Messtechniken, bei denen die Ionenfalle zum Einsatz kommt, werden als „enhanced“ bezeichnet.

4.4 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die Gaschromatographie-Massenspektrometrie ist prinzipiell zur Analytik von unzerstört verdampfenden Substanzen mit entsprechend kleinem Molekulargewicht geeignet. Die GC-MS wurde neben der HPLC-DAD und NMR für die Reinheitsprüfung der THCA verwendet. Als stationäre Phase dienen Kapillarsäulen, die in der Regel innen mit Polyorganosiloxanen definierter Filmdicke ausgekleidet sind. Die mobile Phase ist ein inertes Trägergas – Helium, Stickstoff oder Wasserstoff, das die im Injektor verdampften Analyten durch die Säule transportiert. Über einen Temperaturgradienten kann die Auftrennung komplexer Gemische mit sehr hoher Auflösung erreicht werden.

Zur Detektion im Massenspektrometer werden die Analyten entweder mit Elektronenstoßionisation oder chemischer Ionisation in Ionen überführt, wobei die Moleküle vor allem bei der Elektrostößionisation in zahlreiche typische Fragmente zerfallen. Nicht flüchtige, polare Substanzen können durch Derivatisierung oftmals in unpolare, flüchtigere Substanzen umgewandelt und so einer GC-MS-Analyse zugänglich gemacht werden. Derivatisierungsreagenzien sind z. B. MSTFA und BSTFA zur Silylierung sowie TFAA und PFAA zur Acetylierung.

5 Vorarbeiten zur Humanstudie

5.1 Phänotypisierung

Der Metabolismus der Testsubstanz THCA hängt entscheidend von der Aktivität der verstoffwechselnden Enzyme ab, die individuell sehr unterschiedlich sein kann. Daher sollten alle an der Studie teilnehmenden Probanden phänotypisiert werden, um später unterschiedliche pharmakokinetische Parameter besser bewerten zu können.

Ein Großteil der Phase-1-Reaktionen im Körper wird katalysiert durch die Cytochrom P450-Enzymfamilie, die hauptverantwortlich ist für die Oxidation von Xenobiotika und endogenen Substanzen. Mutationen in den DNA-Abschnitten, die für diese Enzyme codieren, können zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten führen und damit zu variierenden Plasmaclearances der Substrate. Tritt eine genetische Variation mit einer Prävalenz < 1 % in der Bevölkerung auf, spricht man von einem Polymorphismus. Doch nicht nur die genetische Disposition, sondern auch äußere Bedingungen wie bestimmte Nahrungsmittel, Medikamente, Rauchen und Alkohol können diese Enzyme induzieren oder inhibieren [82-84] und damit die Aktivität beeinflussen. Daher hat neben der Genotypisierung auch die Phänotypisierung eine große praktische Bedeutung.

Zur Bestimmung des Phänotyps, der die tatsächliche Enzymaktivität widerspiegelt und sowohl vom Genotyp als auch von allen anderen Einflussfaktoren beeinflusst wird, ist es üblich, eine enzymespezifische Testsubstanz zu verabreichen und zu ermitteln, in welchem Ausmaß sie metabolisiert wird [82]. Als „Goldstandard“, mit dem sich die Aktivität am besten abschätzen lässt, gilt bis auf wenige Ausnahmen die Plasmaclearance nach oraler Aufnahme [85]. Da deren Bestimmung extrem aufwändig ist, ist man dazu übergegangen, Ersatzparameter zu evaluieren – sogenannte Phänotypisierungsindices.

Diese Parameter aus wenigen Plasma- oder Urindaten sollen die orale Plasmaclearance so exakt wie möglich widerspiegeln [86]. Typische Indices sind z. B. die Plasmakonzentration der Testsubstanz oder das Verhältnis von Testsubstanz zu Metabolit(en) zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die wichtigsten Isoenzyme, die gemeinsam etwa 75 % aller Metabolisierungsreaktionen katalysieren, sind – aufgelistet nach abnehmender Bedeutung – CYP 3A4/5/7, CYP 2D6, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 1A2, CYP 2E1 und CYP 2A6 [87, 88]. Die meisten Forschungsarbeiten beschäftigen sich daher mit der Etablierung geeigneter Phänotypisierungsindices für diese CYP-Isoenzyme.

In der Anfangszeit der Phänotypisierung wurden die Testsubstanzen in der Regel einzeln und in mehreren Studienabschnitten hintereinander verabreicht. Um die Belastungen für die Probanden zu minimieren, ging man später dazu über, Cocktails aus mehreren Substanzen zu applizieren – immer vorausgesetzt, dass die Komponenten nicht interagieren.

Während sich die ersten Publikationen zu Cocktailmethoden [82, 89-93] vor allem mit der Frage beschäftigten, ob Interaktionen auftreten, konzentrieren sich neuere Arbeiten darauf, die Analytik und Praktikabilität der nun etablierten Cocktailzusammenstellungen zu verbessern [94, 95]. Dazu gehören die Verringerung der Probenanzahl, die Entwicklung unkomplizierter Extraktionsverfahren, mit denen möglichst alle relevanten Analyten in einem Schritt erfasst werden, und eine schnelle und empfindliche Analytik.

5.1.1 Auswahl der Testsubstanzen

Die erste wichtige Entscheidung ist die Auswahl der Testsubstanzen. Trotz langjähriger Forschung gibt es in dieser Frage bisher keinen Konsens, nur bei CYP 1A2, das in nahezu allen bisher publizierten Methoden mit Coffein getestet wird, besteht Einigkeit. Die Anforderungen an eine ideale Testsubstanz sind hoch und damit kaum in Gänze zu erfüllen: Essentiell ist eine hohe Spezifität für das zu charakterisierende Enzym, wünschenswert sind außerdem eine niedrige interindividuelle Variabilität, wenige oder nur leichte Nebenwirkungen, eine unkomplizierte Applikation und die kommerzielle Verfügbarkeit.

Verschiedene Organisationen oder Behörden wie das Committee for Proprietary Medicine, die US-amerikanische Food and Drug Administration gemeinsam mit der europäischen Federation for Pharmaceutical Sciences und der American Association of Pharmaceutical Scientists unternahmen erste Versuche, standardisierte Phänotypisierungsmethoden mit einheitlichen Dosierungs- und Probennahmeschemata zu etablieren [88]. Auf Grundlage dieser Empfehlungen, bereits validierten Cocktails und neueren Veröffentlichungen bezüglich Tolbutamid wurde der Cocktail für die Humanstudie konzipiert. Er besteht aus:

- 100 mg Coffein (COFF) für CYP 1A2
- 125 mg Tolbutamid (TOLB) für CYP 2C9
- 20 mg Omeprazol (OMP) für CYP 2C19
- 30 mg Dextromethorphan (DXM) für CYP 2D6
- 2 mg Midazolam (MID) für CYP 3A4

Alle Substanzen sind auf dem deutschen oder europäischen Markt zugelassen und käuflich zu erwerben. Der Cocktail wird oral appliziert. Zu beachten ist, dass Midazolam bei oraler Gabe nicht nur der Verstoffwechslung durch die hepatischen, sondern bereits durch die intestinalen CYP 3A4-Enzyme unterliegt. Dieser Umstand muss bei der Interpretation der Ergebnisse und vor allem beim späteren Vergleich mit den Studienergebnissen berücksichtigt werden.

5.1.2 Auswahl der Phänotypisierungsindices

Die Bestimmung eines Phänotypisierungsindex sollte einfach und für die Probanden minimal invasiv verlaufen. Das entscheidende Kriterium bei der Auswahl ist jedoch, dass der Index selbst die Plasmaclearance und damit die Enzymaktivität verlässlich und genau widerspiegelt. Der Korrelationskoeffizient sollte daher eine statistisch signifikante Korrelation zwischen beiden Größen zeigen und mindestens $> 0,8$ ($p > 0,05$) sein [84].

Generell ist es praktikabler, eine Blutprobe zu einem bestimmten Zeitpunkt abzunehmen als über mehrere Stunden Urin zu sammeln. Hinzu kommt, dass Plasmakonzentrationen im Vergleich zu Urin reproduzierbarere Ergebnisse liefern, da sie nur ein sehr enges Zeitfenster abbilden, unabhängiger von der Nierenfunktion sind und die Entleerung der Blase als weiterer Unsicherheitsfaktor entfällt. Urinkonzentrationen können außerdem stark vom pH-Wert des Urins abhängen.

Für die unter 5.1.1 genannten Substanzen existieren verschiedene validierte Phänotypisierungsindices. Im Hinblick auf eine möglichst geringe Probenanzahl wurden schließlich folgende ausgewählt:

- für Coffein: $PI_{\text{COFF}} = \frac{C_{\text{PX}}}{C_{\text{COFF}}}$ nach 4 Stunden, c_{Serum} in mol/l ($r = 0,95$, $p < 10^{-3}$ [96])
- für Tolbutamid: $PI_{\text{TOLB}} = \ln c_{\text{TOLB}}$ nach 24 Stunden, c_{Serum} in $\mu\text{g/ml}$ ($r^2 = 0,84$, $p < 10^{-7}$ [97])
- für Omeprazol: $PI_{\text{OMP}} = \frac{C_{5\text{-OH-OMP}}}{C_{\text{OMP}}}$ nach 4 Stunden, c_{Serum} in mol/l ($r^2 = 0,91$, $p < 10^{-3}$ [96])
- für Dextromethorphan: $PI_{\text{DXM}} = \frac{C_{\text{DXM}}}{C_{\text{DEX}}}$ nach 4 Stunden, c_{Serum} in mol/l ($r = 0,813$, $p < 2,3 \cdot 10^{-3}$ [98])
- für Midazolam: $PI_{\text{MID}} = c_{\text{MID}}$ nach 24 Stunden, c_{Serum} in ng/ml ($r^2 = 0,91$, $p < 10^{-3}$ [99])

Vor allem die Frage, welcher Phänotypisierungsindex für Midazolam in der Praxis am besten geeignet ist, wird kontrovers diskutiert. Penzak et al. [100] untersuchten in einer Studie, inwieweit auf Einzelmessungen basierende Indices überhaupt geeignet sind. Im Gegensatz zu anderen Autoren berechneten sie in ihrer Studie nicht nur Regressionskoeffizienten, sondern untersuchten auch, ob ein Einzelwert-Index eine Verringerung der Midazolam-AUC nach Gabe eines CYP 3A4-Inhibitors voraussagen konnte. Das war zwar möglich, die Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant. Trotz allem kommen Penzak et al. zu dem Schluss, dass „einzelne Midazolamkonzentrationen nach 3,5, 4 und 5 Stunden geeignet waren, um eine Vorhersage über die orale Midazolam-AUC zu treffen – sofern keine CYP-Modulation vorliegt“. Weiterhin empfehlen sie, dass „einzelne Midazolamkonzentrationen nur für solche Studien verwendet werden sollten, bei denen keine Schwankungen der CYP3A-Aktivität bestehen“, so wie das bei Interaktionsstudien der Fall sein kann. Für Studien dieser Art muss eine komplette AUC erstellt werden. Da es in der vorliegenden Arbeit um die Korrelation von Enzymaktivitäten zu pharmakokinetischen Parametern der Testsubstanz THCA und nicht um Interaktionen ging, stand einer einzelnen Midazolam-Konzentration als Index nichts entgegen.

Für die Berechnung der Phänotypisierungsindices waren damit zwei Blutabnahmen – nach 4 und 24 Stunden – und die Quantifizierung von insgesamt acht Analyten notwendig.

Diese sind chemisch sehr heterogen: Omeprazol, 5-OH-Omeprazol (5-OH-OMP), Tolbutamid (TOLB) und Midazolam sind schwache Säuren, Coffein verhält sich neutral und sein Metabolit Paraxanthin (PX) sowie Dextromethorphan und Dextrophan (DEX) basisch. Ihre Strukturformeln sind in Abb. 10 dargestellt.

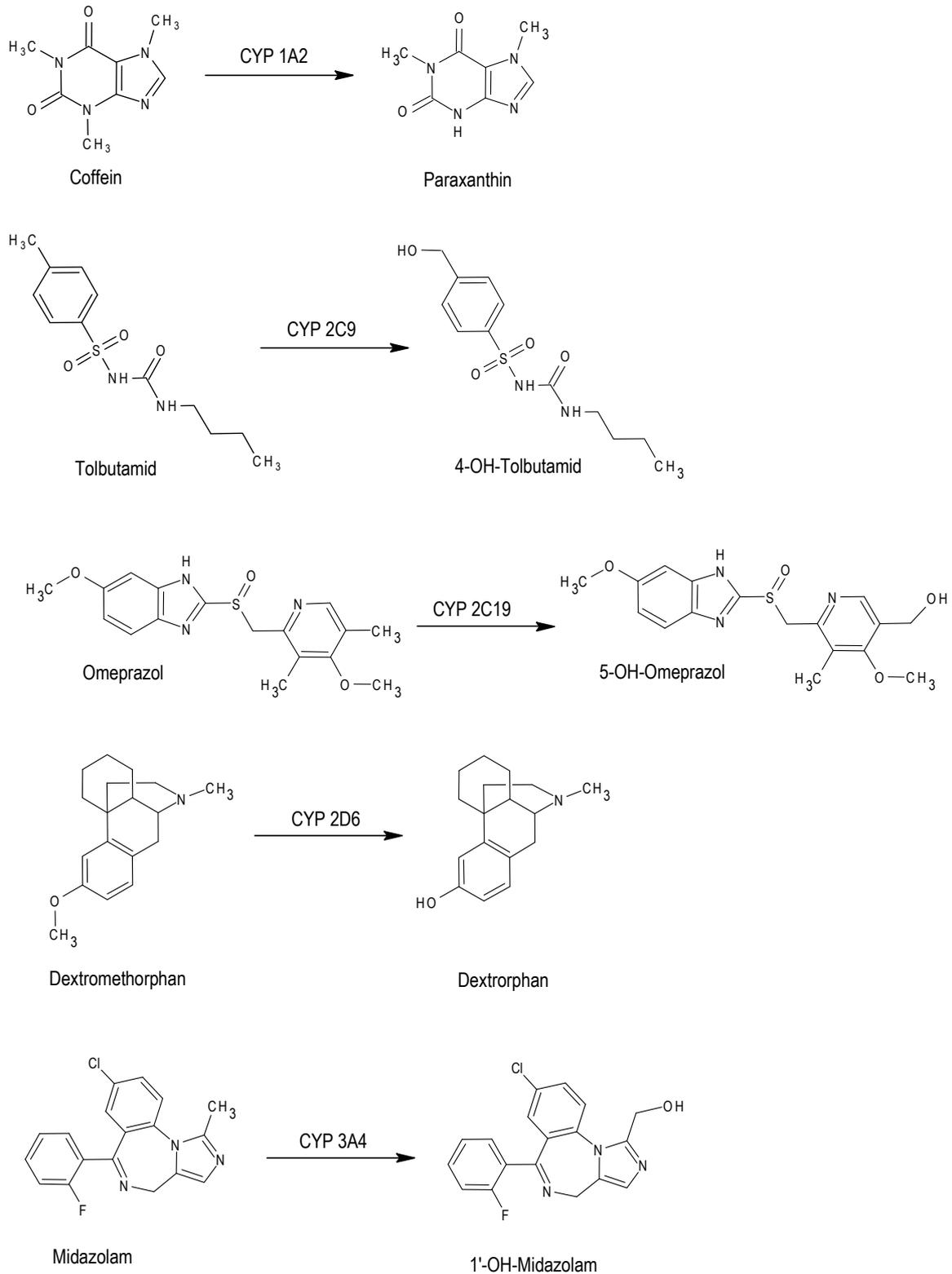


Abb. 10: Strukturformeln der fünf Cocktailsubstanzen und ihre durch CYP450-Isoenzyme katalysierten Metabolisierungsreaktionen

5.1.3 Entwicklung der Extraktions- und Analytikmethode

Ziel war es, für die chemisch sehr unterschiedlichen acht Analyten eine einzige Methode zur Extraktion aus Serum und eine chromatographische Methode zu entwickeln. Da Serum aus Blutbanken praktisch immer coffeinhaltig ist, wurde Leerblut von Freiwilligen gespendet, die mindestens drei Tage auf coffeinhaltige Nahrungsmittel (Schokolade) und Getränke (Kaffee, schwarzer Tee, Cola) verzichtet hatten, und vor seinem Einsatz auf Anwesenheit der Testsubstanzen bzw. ihrer Metabolite getestet. Als interne Standards waren für alle acht Analyten entsprechende deuterierte Analoga erhältlich. Diese und weitere Referenzstandards sowie Chemikalien und Geräte, die verwendet wurden, sind im Folgenden aufgelistet:

Referenzmaterialien		
Coffein	LGC Standards	Wesel, Deutschland
d3-Coffein	TLC PharmaChem	Vaughan, Kanada
Dextromethorphan	LGC Standards	Wesel, Deutschland
d3-Dextromethorphan	TLC PharmaChem	Vaughan, Kanada
Dextrorphan	LGC Standards	Wesel, Deutschland
d3-Dextrorphan	LGC Standards	Wesel, Deutschland
Omeprazol	LGC Standards	Wesel, Deutschland
d3-Omeprazol	TLC PharmaChem	Vaughan, Kanada
5-OH-Omeprazol	LGC Standards	Wesel, Deutschland
d3-5-OH-Omeprazol	TLC PharmaChem	Vaughan, Kanada
Paraxanthin	Toronto Research Chemicals	North York, Kanada
d3-Paraxanthin	Toronto Research Chemicals	North York, Kanada
Midazolam	Lipomed	Bad Säckingen, Deutschland
d4-Midazolam	LGC Standards	Wesel, Deutschland
Tolbutamid	LGC Standards	Wesel, Deutschland
d9-Tolbutamid	TLC PharmaChem	Vaughan, Kanada
Chemikalien		
Acetonitril	J.T. Baker	Deventer, Niederlande
Ammoniak (> 25 %)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Methanol	J.T. Baker	Deventer, Niederlande
Geräte und Zubehörmaterialien		
Festphasenextraktionsautomat	GX-274 ASPEC	Gilson, USA
	Kartuschen: Plexa PCX 60 mg; 3 ml	Varian Inc., Deutschland
LC-MS/MS	binäre Pumpe: G1312A	Agilent, Deutschland
	Autosampler: G1313A	
	Entgaser: G1379A	
	Säulenofen: G1316A	

LC-MS/MS (Fortsetzung)	Massenspektrometer: QTrap 2000 triple quadrupole linear ion trap	Applied Biosystems, USA
	Software: Analyst 1.4.1	
	Säule: Synergi Polar RP (150 mm x 2 mm, 4 µm) mit Vorsäule Polar RP (4 mm x 2 mm)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Probenaufbereitung mit Festphasenextraktion

Nach dem Abseren der Blutproben stand Serum für die Analytik zur Verfügung. Dieses wurde mittels Festphasenextraktion aufbereitet, wobei sich Plexa PCX-Kartuschen als am besten geeignet erwiesen, die verschiedenen Analyten an sich zu binden. Dieses Sorbensmaterial besteht aus einem mixed-mode Polymer, das die Extraktion verschiedener Substanzklassen ermöglicht. Saure und neutrale Analyten können mit dem hydrophoben Anteil Wechselwirkungen eingehen, bei saurem pH protonierte basische Substanzen binden an die Kationenaustauscherguppen. Diese Kartuschen lieferten im Vergleich mit Chromabond Drug (mixed-mode Silica) und Oasis HLB Kartuschen, die in anderen publizierten Methoden eingesetzt wurden, die besten Ergebnisse.

Aus praktischen Gründen wurde ein Mix aller internen Standards (IS-Mix) hergestellt, der die deuterierten Substanzen in einer Konzentration von 2,5 µg/ml enthielt. Davon wurden standardmäßig 20 µl in jede Serumprobe dotiert. Ein Mix aller Analyten, der auf verschiedene Konzentrationsstufen verdünnt wurde, diente zum Aufspiken von Kalibratoren und Qualitätskontrollen. Die Festphasenextraktion, für die entweder 1 ml oder 0,1 ml Serum eingesetzt werden, lief in Anlehnung an das Standardprotokoll für Plexa PCX Kartuschen nach folgendem Schema ab:

Verdünnung der Proben	2 bzw. 2,9 ml Phosphatpuffer pH 6	
Konditionierung der Säulen	1 ml Methanol	1 ml/min
	1 ml Phosphatpuffer pH 6	1 ml/min
Beladen der Säulen	3 ml Probenvolumen	1,5 ml/min
Waschen	1,5 ml Phosphatpuffer pH 6	2 ml/min
	1,5 ml Methanol 5 %	2 ml/min
Trocknen	Stickstoff	1 min
Eluieren	1,5 ml Methanol/Acetonitril/Ammoniak 25 % (47,5/47,5/5, v/v/v)	1 ml/min

Im Anschluss daran wurden die Eluate unter Stickstoff bei 40°C eingedampft und der Rückstand in 100 µl Fließmittelgemisch (Ammoniumacetat pH 7,5/MeOH, 80:20, v/v) aufgenommen.

Ein sehr kritischer Punkt der gesamten Extraktion und Analytik war die Stabilität von Omeprazol, welches bei saurem pH-Wert zu einem zyklischen Sulfonamid umgewandelt wird. Die Halbwertszeit von Omeprazol bei pH 4 (oder niedriger) beträgt 10 Minuten. Generell gilt, dass die Stabilität von Omeprazol mit steigendem pH-Wert zunimmt und bei neutralem pH-Wert die Halbwertszeit bereits 14 Stunden beträgt. Im Verlauf des Aufbereitungsprozesses und der nachfolgenden Messung gab es zwei Schritte, bei denen Omeprazol einem sauren pH-Wert ausgesetzt war: zuerst bei der Festphasenextraktion nach Verdünnung der Proben mit Phosphatpuffer pH 6 und unmittelbar vor der Messung, wenn der Rück-

stand in Fließmittelgemisch aufgenommen wird, das entsprechend der Fließmittelzusammensetzung zu Beginn eines Laufs aus 80 % Ammoniumacetat mit einem pH-Wert von 4 bestehen sollte.

Ein Stabilitätstest mit einer genau definierten Menge Referenzsubstanz in einem solchen Fließmittelgemisch zeigte, wie zu erwarten war, hohe Instabilität. Kurve A in Abb. 11 zeigte einen dramatischen Abfall. Eine Erhöhung des pH-Werts im Fließmittelgemisch auf 7,5 verbesserte die Stabilität erheblich und in ausreichendem Maß, wie an Kurve B erkennbar ist. Die Chromatographie wurde dadurch nicht negativ beeinflusst. Im Anschluss daran wurde ein weiterer Stabilitätstest für verdünnte Serumproben mit unterschiedlicher Wartezeit vor der Festphasenextraktion durchgeführt. Die Proben erwiesen sich für mindestens drei Stunden als stabil (Kurve C).

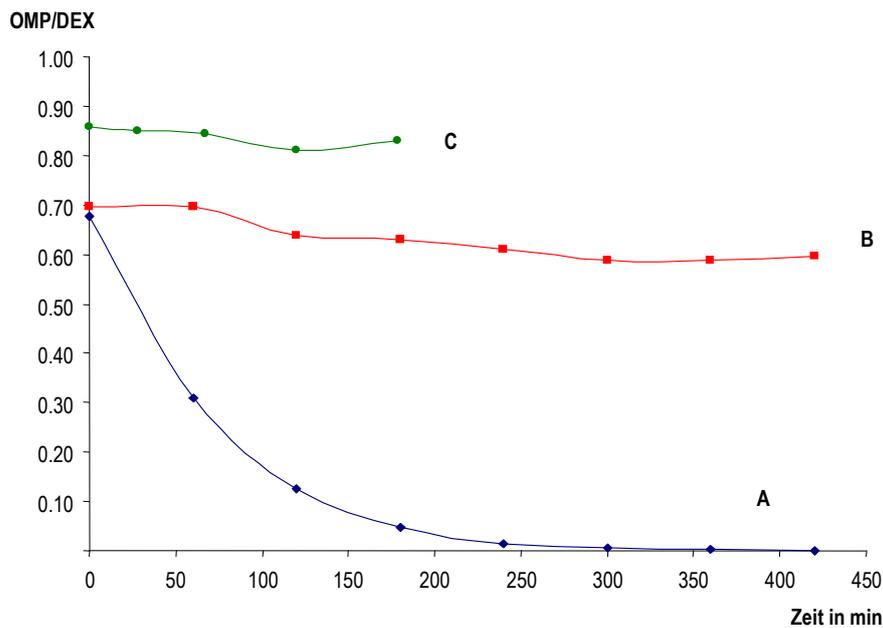


Abb. 11: Stabilitätstests für Omeprazol: Aufgetragen ist das Peakflächenverhältnis von Omeprazol (OMP) zu Dextrophan (DEX), das keine Instabilitäten zeigt und hier als Bezugsgröße dient
 Kurve A: Probe mit 100 ng jeder Substanz in Fließmittelgemisch pH 4,0
 Kurve B: Probe analog in Fließmittelgemisch pH 7,5
 Kurve C: mit 200 ng Substanz aufdotierte und mit Phosphatpuffer verdünnte Serumproben (1 ml), Festphasenextraktion zum Zeitpunkt 0, nach 30, 60, 120 und 180 Minuten

LC-MS/MS-Analytik

Die Analyten wurden auf einer Polar RP-Säule mit Gradientenelution und einer Flussrate von 0,25 ml/min innerhalb von 18 Minuten getrennt. Als optimale Fließmittel stellten sich 2 mM Ammoniumacetat pH 4 als wässriges Fließmittel A und Methanol als organisches Fließmittel B heraus. Der Gradient wurde folgendermaßen programmiert: Beginn mit 20 % B bis zu 1 min, Anstieg auf 95 % B in 8 min, 95 % B über 6 min, Abfall auf 20 % B innerhalb von 1,5 min und anschließende Reequilibration der Säule für 2,5 min.

Für die massenspektrometrische Detektion wurden alle Analyten mittels positiver Elektrosprayionisierung ionisiert. Obwohl Tolbutamid negativ ionisiert höhere Intensitäten lieferte, zeigt es auch im Positiv-

modus ein ausreichend großes Signal. Es bestand daher kein Grund, während des Laufs kontinuierlich die Polaritäten zu wechseln, was zwar möglich gewesen wäre, die Zykluszeit aber unnötig verlängert hätte. Für alle Analyten wurde deshalb nach Aufnahme von EPI-Spektren mit den intensivsten Fragmenten eine gemeinsame Multiple-reaction-monitoring-Methode (MRM) erstellt. Tab. 7 listet die Übergänge und alle optimierten substanzabhängigen massenspektrometrischen Parameter auf. Die Einstellungen für das ESI-Interface sind für alle Substanzen gleich: Curtaingas, Stickstoff, 20 psi; Kollisionsgas, Stickstoff, 5 psi; Spannung 2500 V; Quelltemperatur 400°C; Gas 1, Stickstoff, 40 psi; Gas 2, Stickstoff, 70 psi.

Tab. 7: MRM-Übergänge und optimierte Parameter der LC-MS/MS-Methode: T = Target, Q = erster Qualifier. * für die deuterierten Standards wurden keine relativen Ionenintensitäten ermittelt, da diese Substanz zu jeder Probe hinzugegeben werden und nicht explizit identifiziert werden müssen

		m/z im Q1	m/z im Q3	Messzeit	DP	EP	CEP	CE	CXP	rel. Ionenintensität
		amu	amu	ms	V	V	V	V	V	Q/T
PX	T	181	124,1	40	40	10	10	25	3	11%
	Q	181	66,9	40	40	10	10	45	3	
COFF	T	195	138,1	40	45	10	10	25	3	11%
	Q	195	123	40	45	10	10	40	2.5	
TOL	T	271	91,1	40	30	10	10	50	3	59%
	Q	271	155,1	40	30	10	10	20	3	
OMP	T	346	328,5	40	60	10	10	28	3	56%
	Q	346	203,4	40	60	10	10	40	3	
5-OH-OMP	T	362	149,5	40	30	5	10	15	3	48%
	Q	362	214,4	40	30	5	10	15	3	
DEX	T	258	157,2	40	65	10	10	52	3	38%
	Q	258	133,1	40	65	10	10	35	3	
DXM	T	272	171,2	40	60	10	10	50	3	77%
	Q	272	215,2	40	60	10	10	30	3	
MID	T	326	291,2	40	65	10	10	60	3.5	32%
	Q	326	249,2	40	65	10	10	60	3.5	
d₃-PX	T	184	124,1	40	40	10	10	25	3	*
	Q	184	66,9	40	40	10	10	50	3	
d₃-COFF	T	198	141,1	40	40	10	11	25	2.5	*
	Q	198	126,1	40	40	10	11	40	2.5	
d₉-TOL	T	280	91,0	40	30	10	10	50	2.5	*
	Q	280	155,1	40	30	10	10	20	2.5	
d₃-OMP	T	349	198,1	40	15	4	11	15	3	*
	Q	349	136	40	15	4	11	50	2.5	
d₃-5-OH-OMP	T	365	214,1	40	15	4	11	15	3	*
	Q	365	152,1	40	15	4	11	40	2.5	
d₃-DEX	T	261	157,2	40	70	10	10	50	3	*
	Q	261	133	40	70	10	10	42	3	

		m/z im Q1	m/z im Q3	Messzeit	DP	EP	CEP	CE	CXP	rel. Ionenintensität
		amu	amu	ms	V	V	V	V	V	Q/T
d₃-DXM	T	275	174,1	40	55	12	9	50	2.5	*
	Q	275	218,2	40	55	12	9	28	3	
d₄-MID	T	330	295,6	40	65	10	10	35	3	*
	Q	330	253,5	40	65	10	10	50	3	

Abb. 12 zeigt ein Totalionenchromatogramm (TIC) sowie die extrahierten Ionenchromatogramme (XIC) für den Lauf einer Qualitätskontrolle im niedrigen Konzentrationsbereich. Die Analyten eluierten in der folgenden Reihenfolge: D₃-Paraxanthin (6,67 min), Paraxanthin (6,73 min), D₃-Dextrophan (7,13 min), Dextrophan (7,14 min), D₃-Coffein (7,98 min), Coffein (8,02 min), D₃-Dextromethorphan (8,51 min), Dextromethorphan (8,52 min), D₃-5-OH-Omeprazol (8,57 min), 5-OH-Omeprazol (8,62 min), D₉-Tolbutamid (9,10 min), Tolbutamid (9,17 min), D₃-Omeprazol (9,40 min), Omeprazol (9,41 min), D₄-Midazolam (10,18 min) und Midazolam (10,19 min).

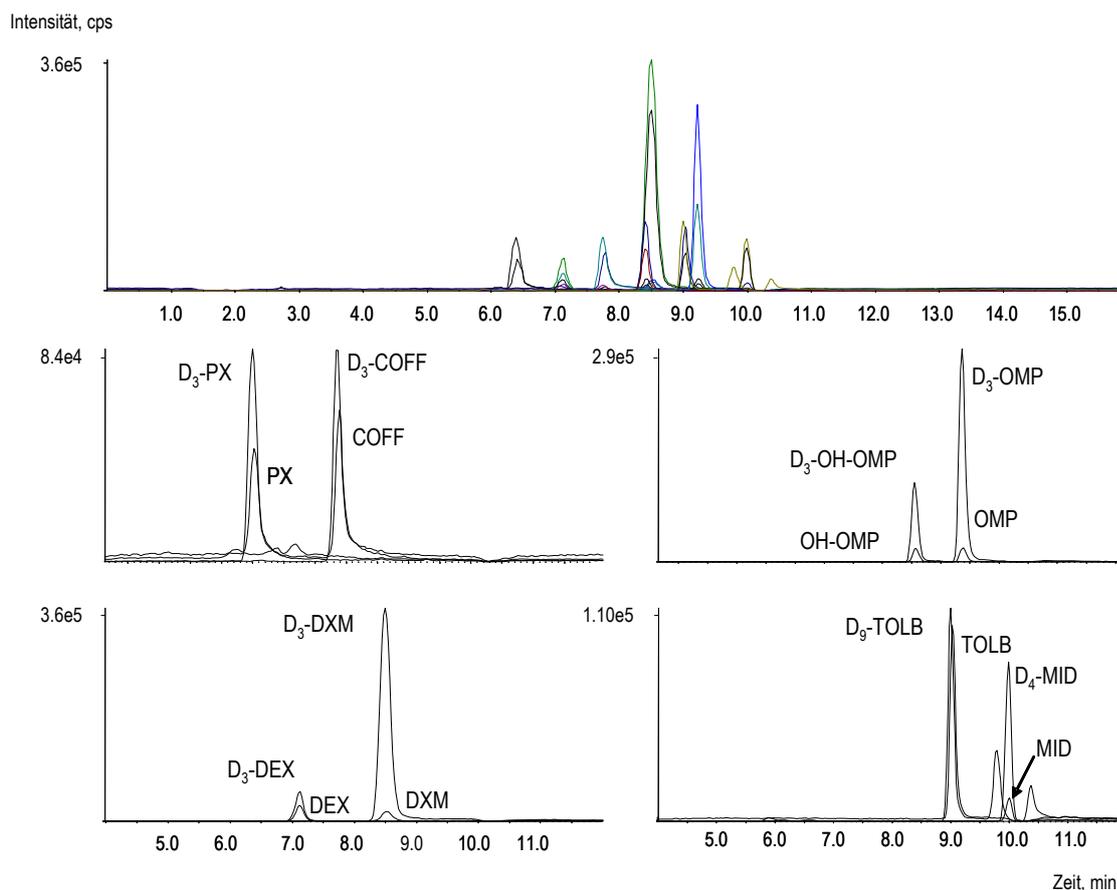


Abb. 12: TIC-Chromatogramm und XIC-Chromatogramme (smoothed) einer Qualitätskontrolle mit niedrigem Konzentrationslevel: Paraxanthin (PX), Coffein (COFF) und Tolbutamid (TOLB) 50 ng/ml, Omeprazol (OMP) und 5-OH-Omeprazol (OH-OMP) 5 ng/ml, Dextromethorphan (DXM), Dextrophan (DEX) und Midazolam (MID) 2 ng/ml, alle internen Standards mit einer Konzentration von 50 ng/ml

5.1.4 Validierung der Extraktions- und Analytikmethode

Selektivität

Acht verschiedene Serumproben wurden ohne weitere Zusätze nach der beschriebenen Methode extrahiert und vermessen. Es durften keine Interferenzen von Matrixbestandteilen oder Verunreinigungen zu den erwarteten Retentionszeiten der Analyten oder internen Standards in den entsprechenden MRM-Übergängen auftreten. Zwei der Serumproben wurden außerdem mit dem IS-Mix aufdotiert und auf undeuterte Anteile der deuterierten Standards geprüft.

Ergebnis: Es fanden sich keinerlei Interferenzen oder undeuterte Anteile.

Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ) wurde mit Hilfe von Signal-Rausch-Verhältnissen ermittelt. Dazu wurden Serumproben aus fünf verschiedenen Quellen mit 10, 20 bzw. 40 µl eines speziellen Mixes, der 25 ng/ml Dextrorphan, Dextromethorphan, Tolbutamid, Midazolam, Omeprazol und 5-OH-Omeprazol sowie 1000 ng/ml Coffein und Paraxanthin enthielt, aufdotiert. Die Signal-Rausch-Verhältnisse bei diesen drei verschiedenen – niedrigen – Konzentrationsstufen wurden berechnet. Bei der Bestimmungsgrenze muss das Signal-Rausch-Verhältnis des Quantifiers > 10 sein. Um die Identifizierungskriterien zu erfüllen, muss zusätzlich das Signal-Rausch-Verhältnis des Qualifiers > 3 sein.

Ergebnis: Die Bestimmungsgrenzen liegen bei 0,25 ng/ml für Omeprazol, 5-OH-Omeprazol, Dextrorphan und Dextromethorphan, bei 0,5 ng/ml für Midazolam, 1,0 ng/ml für Tolbutamid und 20 ng/ml für Coffein und Paraxanthin.

Linearität

In einem Pilotexperiment, in dem 14 Probanden den Cocktail einnahmen und Blutproben abgaben, stellte sich heraus, dass die realen Konzentrationen nach 4 bzw. 24 Stunden in sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereichen liegen. Während sich Midazolam- und Dextrorphankonzentrationen im unteren ng/ml-Bereich bewegten, stiegen die Paraxanthin-, Coffein- und Tolbutamidkonzentrationen auf einige µg/ml. Aus praktischen Gründen wurden daher zwei Kalibrationen mit entsprechenden Kalibrationsbereichen vom LOQ bis 1000 ng/ml gemessen – eine mit unverdünnten und eine mit 1:10 verdünntem Serum. Um diesen weiten Bereich über drei Zehnerpotenzen gut abzudecken, wurden zahlreiche Kalibratoren in engem Abstand vermessen: 0,25 – 0,5 – 1,0 – 2,0 – 3,0 – 4,0 – 5,0 – 7,5 – 10 – 20 – 30 – 40 – 50 – 75 – 100 – 250 – 500 – 750 und 1000 ng/ml für das unverdünnte Plasma, 100 – 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 – 800 – 900 und 1000 ng/ml für das verdünnte Plasma. Zusammengefasst erfasst man damit eine Konzentrationsspanne von 0,25 bis 10.000 ng/ml. Da es sich bei der Methode nicht um eine forensische Routinemethode handelt, genügt nach Peters et al. [101] die Analyse von Duplikaten aller Konzentrationslevel.

Eine Kalibration ist ausreichend linear, wenn der Regressionskoeffizient $> 0,98$ ist und alle mit der Kalibrationsgleichung zurückgerechneten Konzentrationen den Kalibratorsollwert um weniger als 15 % über- oder unterschreiten (20 % an der LOQ). Vor allem bei niedrigen Werten ergeben sich bei Rückrechnung oft enorme Abweichungen. Es ist daher sinnvoll, die Kalibration mit einem Faktor zu wichten oder die Kalibrationsbereiche einzuschränken, wobei eine Gerade durch mindestens fünf Punkte be-

stimmt sein sollte. Abhängig von der Analytkonzentration der realen Proben oder der Qualitätskontrollen verwendet man später den entsprechenden Bereich.

Ergebnis: Alle Regressionskoeffizienten – sowohl für den gesamten Kalibrationsbereich als auch die eingeschränkten – lagen zwischen 0,9952 und 0,9999.

Extraktionsausbeute und Matrixeffekte

Nach Matuszewski et al. [102] lassen sich Extraktionsausbeuten und Matrixeffekte durch Analyse drei verschiedener Probensets bestimmen: Set 1 besteht aus Referenzstandard in mobiler Phase. Set 3 besteht aus Proben, die wie typische Qualitätskontrollen durch Aufspiken von Serum und anschließende Extraktion hergestellt wurden. Bei den Proben für Set 2 wird die Matrix ohne Standards dem Extraktionsverfahren unterzogen und erst dann mit dem Referenzstandard versetzt. Mindestens fünf verschiedene Serumproben bei mindestens zwei Konzentrationsniveaus sollen untersucht werden, um Unterschiede durch verschiedene Matrices feststellen zu können. Für die Untersuchungen im niedrigen Konzentrationsbereich, der sich an den entsprechenden Bestimmungsgrenzen orientiert, wurde jede Serumprobe mit 40 ng Coffein und Paraxanthin sowie 5 ng der restlichen Analyten aufdotiert. Das hohe Konzentrationslevel entsprach generell 1000 ng/ml aller Analyten.

Ergebnis: Die Extraktionsausbeuten lagen zwischen 77 und 103% bei niedrigen und zwischen 79 und 97 % bei hohen Konzentrationen. Die Matrixeffekte waren trotz Anwendung der Festphasenextraktion relativ hoch und bewegten sich zwischen 23 und 95 % bei niedrigen und zwischen 44 und 82 % bei hohen Konzentrationen. Eine Referenzierung auf deuterierte interne Standards gleicht Einflüsse durch Matrixeffekte jedoch aus und ermöglicht eine verlässliche Quantifizierung.

Richtigkeit und Präzision

Um Richtigkeit und Präzision zu bestimmen, wurden Serumpools bei drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt, aliquotiert, bei -80°C zur Lagerung tiefgefroren und Duplikate an sechs verschiedenen Tagen gemessen. Je nachdem, in welchem Konzentrationsbereich sich die realen Werte bewegten, wurden die als „niedrig“, „mittel“ und „hoch“ definierten Level für jeden Analyten individuell festgelegt. Die genauen Konzentrationen für jede Substanz finden sich in Tab. 8. Da im Pilotexperiment die Midazolam- und Dextrophankonzentrationen 10 ng/ml nie überschritten, wurden für diese beiden Analyten nur die zwei unteren Level getestet.

Ergebnis: Die Richtigkeits- und Präzisionsdaten erfüllten alle vorgeschriebenen Kriterien. Relative Standardabweichungen und Bias lagen innerhalb des geforderten Intervalls von $\pm 15\%$ (bzw. 20 % an der LOQ) des Mittelwerts. Genaue Werte finden sich in Tab. 8.

Stabilität

Tests zur Langzeit- und Einfrier-Auftau-Stabilität wurden bereits in der Vergangenheit durchgeführt und mussten daher an dieser Stelle nicht wiederholt werden. Yin et al. [95] bzw. Ghassabian et al. [94] wiesen nach, dass alle Analyten bei -80°C und nach mehreren Einfrier-Auftau-Zyklen stabil sind.

Tab. 8: Übersicht aller Validierungsergebnisse: Angegeben sind LOQ, die Regressionskoeffizienten für die verschiedenen Kalibrationsbereiche (KAL) bei Verwendung von unverdünntem und verdünntem Serum, Präzisions- und Richtigkeitsdaten (PRÄ, RICHT) bei den getesteten Konzentrationsleveln sowie Extraktionsausbeute (EXTR) und Matrixeffekte (MATRIX)

	Serum, unverdünnt		Serum, 1:10									
	LOQ ng/ml	KAL	r ₁ r ₂	KAL	r ₁ r ₂	Level	C _{Analyt}	PRÄ	RICHT	C _{Analyt}	EXTR	MATRIX
			ng/mL		RSD, in %		bias, in %	ng/mL	mean ± SD in %	mean ± SD in %		
PX	20	20-1000	0,9995	100-1000	0,9959	niedrig	50	9,2	-8,4	40	95 ± 1,7	71 ± 10,9
			0,9998		0,9980	mittel	250	8,6	-4,1			
						hoch	1000	8,9	-3,2			
COFF	20	20-1000	0,9999	100-1000	0,9986	niedrig	50	7,0	-9,8	40	95 ± 10	95 ± 2,8
			0,9995		0,9990	mittel	250	8,0	-14,5			
						hoch	1000	7,7	-13,7			
TOL	1,0	0,25-1000	0,9998	100-1000	0,9989	niedrig	50	7,7	-4,7	5	77 ± 6,1	45 ± 11,6
			0,9984		0,9979	mittel	250	4,1	-10,4			
						hoch	1000	4,9	-11,4			
DEX	0,25	0,25-100	0,9995			niedrig	2	10,9	0,04	5	83 ± 4,6	23 ± 9,0
			0,9992			hoch	10	4,9	-14,4			
		0,25-10	0,9995			0,9995						
DXM	0,25	0,25-100	0,9987			niedrig	2	13,0	-1,5	5	82 ± 6,1	37 ± 15,5
			0,9998			mittel	10	8,2	-14,2			
		0,25-10	0,9990			0,9952	hoch	100	6,9	-12,2	1000	93 ± 2,8
OMP	0,25	0,25-1000	0,9990	100-1000	0,9986	niedrig	5	7,7	-18,1	5	93 ± 5,4	42 ± 11,3
			0,9998		0,9991	mittel	250	6,4	-13,7			
						hoch	1000	7,8	-10,9			
OH-OMP	0,25	0,25-1000	0,9990	100-1000	0,9990	niedrig	5	10,3	-9,0	5	84 ± 9,0	45 ± 7,9
			0,9999		0,9992	mittel	50	8,0	-9,0			
						hoch	1000	7,7	-10,0			
MID	0,5	0,5-100	0,9989	0,5-100	0,9989	niedrig	2	10,7	1,2	5	94 ± 4,3	30 ± 31,3
			0,9998		0,9998	hoch	10	5,6	-8,1			
		0,5-10	0,9997		0,5-10	0,9997						
		0,9986	0,9986									

Für einen ersten Test der neu entwickelten Methode stellten sich 14 Probanden für eine Pilotstudie zur Verfügung. Es ging darum, die Praxistauglichkeit zu erproben, ggf. Nebenwirkungen festzustellen und herauszufinden, in welchen Bereichen die Konzentrationen der Testsubstanzen und ihrer Metabolite liegen. Außerdem wollten wir einen Eindruck von den Phänotypisierungsindices bekommen und diese mit den Ergebnissen der Genotypisierung vergleichen.

5.1.5 Genotypisierung

Jana Naue aus der Forensischen Molekularbiologie des Instituts entwickelte eine Genotypisierungsmethode, um die fünf betrachteten CYP-Enzyme genetisch zu charakterisieren. Um den Genotyp zu bestimmen, wurden die die Enzyme codierenden Abschnitte auf Mutationen an einzelnen Nukleotidpositionen, die nach Stand der Forschung in Zusammenhang mit einem Polymorphismus stehen, untersucht.

Dazu finden sich in der Literatur einige Publikationen, die Mutationen beschreiben, welche eine verminderte oder erhöhte Enzymaktivität zur Folge haben. Wenn ein Allel keine dieser Mutationen aufweist, wird es als Wildtyp definiert, ansonsten erhält es die eingeführte Benennung. Es ist davon auszugehen, dass noch etliche weitere veränderte Nukleotidsequenzen existieren, die Einfluss auf die Enzymaktivität haben, aber noch nicht als Ursache für einen Polymorphismus identifiziert worden sind. Deren Allele werden dann als Wildtyp missinterpretiert, obwohl sie es nicht sind. Möglicherweise wird man später eine veränderte Enzymaktivität mit äußeren Faktoren zu erklären versuchen, auch wenn diese weniger relevant sind als sie scheinen. Die Genotypisierung dient daher nicht zur generellen Vorhersage, kann aber umgekehrt – vorausgesetzt es lässt sich eine bekannte Mutation finden – auffällige Beobachtungen erklären.

Der gesamte Prozess ist im Detail in [103] beschrieben. Kurz gefasst wird DNA aus EDTA-Blut der Probanden extrahiert, mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und schließlich nach dem Sanger-Verfahren sequenziert. Durch Vergleichen mit Referenzsequenzen kann man Unterschiede in den Nukleotidsequenzen, nicht aber heterozygote Deletionen (Fehlen von Genabschnitten bei nur einem Allel) oder Duplikationen (dauerhafte Verdopplung von DNA-Abschnitten) detektieren. Insgesamt wurden im Rahmen der Genotypisierung 21 Mutationen untersucht: eine für CYP 1A2 (*1F), vier für CYP 2C9 (*2, *11, *3 und *5), zwei für CYP 2C19 (*2, *3), vier für CYP 2D6 (*4, *2, *41 und *2) und zehn für CYP 3A4 (*8, *16, *17, *5, *2, *18, *11, *12, *13, *20).

5.2 Isolierung der THCA aus Cannabisextrakt

THCA ist zwar kommerziell als Referenzstandard erhältlich (übliche Konzentration 1 mg/ml), für die Humanstudie benötigten wir jedoch eine erheblich größere Menge von einigen hundert Milligramm. Es war daher preiswerter, die THCA selbst aus Cannabis zu isolieren.

Fünf Isolierungsverfahren für THCA sind bereits in der Literatur beschrieben. Alle diese Methoden sind aber entweder sehr aufwändig oder ineffizient, verwenden ungewöhnliche Geräte oder schädliche organische Lösungsmittel. Dies war Motivation, eine neue Methode zu entwickeln. Außerdem kam die Möglichkeit hinzu, mit einem automatisierten Flash-Chromatographie-Gerät die Isolierungsmethode erheblich zu beschleunigen und mit einem oder zwei Schritten einen sehr hohen Reinheitsgrad zu erreichen.

Die fünf bereits veröffentlichten Methoden sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden:

1. Die erste Methode wurde 1992 von Lehmann und Brenneisen veröffentlicht [104]. Sie extrahierten das Pflanzenmaterial zuerst mit angesäuertem Petrolether, der dann mit einer wässrigen basischen Lösung und Diethylether rückextrahiert wurde. Der Rückstand wurde danach zweimal auf einer Umkehrphase mit MPLC getrennt. Ergebnis: 50 mg THCA mit einer Reinheit von 99,6 % aus 50 g Extrakt.
2. Gemäß dem patentierten Verfahren von Flockhart et al. [105] reinigte man den zuerst mit Hexan gewonnenen Vorextrakt mit Hilfe einer Sephadex LH20-Säule auf (Fließmittel: Chloroform/Dichlormethan). Im Anschluss daran wurden die noch verbliebenen Verunreinigungen durch Auskristallisieren und Lösen in zwei verschiedenen Lösemitteln entfernt.
3. Hazekamp et al. [106] brachten den mit Hexan gewonnenen Vorextrakt auf ein Sandbett auf und eluierten die sauren Cannabinoide, darunter THCA, mit Natriumhydroxidlösung. Nach Fällung und Filtrieren werden die einzelnen Analyten mit zentrifugaler Verteilungschromatographie getrennt. Ergebnis: THCA mit einer Reinheit von 94 %.
4. Dussy et al. [107] wandelten die Methode von Lehmann und Brenneisen leicht ab. Anstatt Diethylether verwendeten sie Methyl-*tert*-butylether, der nicht explosiv ist, und ersetzten die MPLC durch traditionelle Säulenchromatographie (Fließmittel: Hexan/Toluol/Aceton und Essigsäure). Alle anderen Schritte blieben gleich. Ergebnis: THCA mit einer Reinheit von 96 %.
5. In der Dissertation von Julia Jung [77] ist ein weiteres Verfahren beschrieben: Der Vorextrakt wurde erst säulenchromatographisch gereinigt (Fließmittel Cyclohexan/Ethylacetat/Essigsäure) und danach mit semipräparativer HPLC von Verunreinigungen befreit. Ergebnis: THCA mit einer Reinheit von 99 %.

5.2.1 Referenzmaterialien, Chemikalien und Geräte

Für die Aufreinigung und nachfolgenden Reinheitsprüfungen wurden folgende Referenzstandards, Chemikalien und Geräte verwendet:

Referenzstandards		
THCA (1 mg)	Lipomed	Bad Säckingen, Deutschland
THC (1 mg/ml)	Lipomed	Bad Säckingen, Deutschland
11-OH-THC (100 µg/ml)	Cerilliant	Wesel, Deutschland

Chemikalien		
Aceton	VWR Prolabo	Briare, Frankreich
Ameisensäure	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cyclohexan	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethylacetat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol	J.T. Baker	Deventer, Niederlande
Methyl-tert-butylether	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Natriumsulfat, getrocknet	Merck	Darmstadt, Deutschland
Pyridin	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Rotisol	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Geräte und Zubehörmaterialien		
Flash-Chromatographie	Combiflash Rf (Version 1.5.14) mit Fraktionssammler (Version 00.00.49) Säulen: RediSep Rf Gold Silica (120 g) und RediSep Rf Gold C18-Säulen (150 g) Leerkartuschen zur Probenaufgabe	Teledyne Isco, Lincoln, USA
HPLC-DAD	Pumpen: LC-10 AD Injektor: SIL-10A Controller: CBM-10A communication bus module Detektor: SPD-M10A Dioden-array-detektor Software: Säule: Synergi Hydro RP (150 mm x 2 mm, 4 µm)	Shimadzu, Duisburg, Deutschland Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
NMR	Avance DRX-400	Bruker, Deutschland
GC-MS	GC: 7890A MS: 5975C Injektor: 7683B Säule: 19091 S-433 HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Software: MSD Chemstation (Version E.02.00.493) Controller: MAS C506	Agilent, Waldbronn, Deutschland Gerstel, Mülheim, Deutschland

5.2.2 Herkunft und Vorreinigung des Ausgangsmaterials

Das Rohmaterial stellte das Landeskriminalamt Düsseldorf für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung. Der Gesamt-THC-Gehalt (Summe aus THC- und THCA-Gehalt) belief sich laut GC-FID-Analyse auf 14,5 %.

Herr Dr. Hellmut Mahler vom LKA reinigte das Material vor: Dazu wurden 740 g Marihuana im gefrorenen Zustand pulverisiert und mit 3 l Rotisol unter gelegentlichem Schütteln bei 4°C über 96 Stunden extrahiert. Die festen Bestandteile wurden abfiltriert und die ethanolische Lösung mit 20 g Aktivkohle

über 72 Stunden bei 4°C behandelt. Nach Abfiltrieren der Aktivkohle wurde der Extrakt im Rotationsverdampfer bei 30°C eingedunstet. Übrig blieb ein brauner, charakteristisch riechender, zäh-klebriger Extrakt. Aus diesem wurde die THCA mittels Flash-Chromatographie extrahiert.

5.2.3 Flash-Chromatographie mit Normalphase

Das Ziel der Chromatographie bestand im Wesentlichen darin, THCA von THC abzutrennen. THC sollte auf keinen Fall in Zubereitungen für die Humanstudie enthalten sein. Da sich diese beiden Substanzen physikalisch und chemisch relativ ähnlich verhalten und THCA weder extrem saurem, noch alkalischem Milieu (Gefahr der Decarboxylierung) ausgesetzt werden darf, gestaltete sich die Methodenentwicklung schwierig.

Der einzige strukturelle Unterschied der zwei Substanzen besteht in der Carboxylgruppe an Position 2. Um diesen Polaritätsunterschied optimal auszunutzen, ist es günstig, wenn die THCA deprotoniert vorliegt und so intensiver mit polaren Sorbentien wechselwirken kann. Säulen mit verschiedenen stationären Phasen (Normalphase, Diolphase, saures Alumina und Aminphase) kamen während der Methodenentwicklung zum Einsatz und wurden mit unterschiedlichen Fließmittelsystemen (Cyclohexan/Ethylacetat, Cyclohexan/Toluol, Cyclohexan/Ether, Cyclohexan/Aceton) und den Modifiern Ameisensäure, Pyridin oder Ammoniak, kombiniert.

Eine erfolgreiche Trennung wurde mit einer Normalphase und Cyclohexan als Fließmittel A und Aceton als Fließmittel B, beide mit 0,1 % Pyridin versetzt, erreicht. THC eluierte von 8,9 bis 10,4 min, THCA von 10,6 bis 15 min. Die Substanzen waren damit basisliniengetrennt. Pyridin als organische Base ist in den Fließmitteln sehr gut löslich und besitzt einen geradezu idealen pK_s -Wert von 5,3. Es ist damit ausreichend basisch, um THCA (pK_s -Wert 3,3) zu deprotonieren, ohne wiederum zu einer Decarboxylierung der THCA zu führen.

Bei einer derart kritischen Trennung mit ohnehin breiten Substanzbanden empfiehlt es sich, die Probe nicht direkt, sondern mit der unter 4.1 beschriebenen „dried solid load technique“ auf die Säule zu geben. 1800 mg Rohextrakt wurden in Cyclohexan gelöst (500 mg/ml) und auf Silica-Pulver aufgezogen. Bezogen auf die 120-g-Säule entspricht das 1,5 % der Sorbensmasse. Nach Equilibrierung der Säule wurde die Probe aufgegeben und mittels Gradientenelution über 15 min mit einer Flussrate von 95 ml/min chromatographiert.

Technische Einschränkungen der Pumpen machten es nötig, Fließmittel B zu „strecken“, da die Pumpen nicht reproduzierbar arbeiten, wenn der Anteil eines Fließmittels unter 10 % liegt und sich während des Laufs nur minimal ändert. Daher wurde Fließmittel „B“ aus zwei Teilen Cyclohexan/0,1% Pyridin und einem Teil Aceton hergestellt. Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, startet der Gradient mit einer Anfangskonzentration von 5 % „B“ bis zwei Minuten und steigt dann über 13 Minuten kontinuierlich auf 15 % „B“.

Die UV-Spektren aus der Bibliothek von Pragst [108] zeigen für THC ein relevantes Maximum bei 209 nm, für THCA sind drei Maxima erkennbar - bei 220 nm, 270 nm und 305 nm. Da höchstens zwei Wellenlängen wählbar sind, wurden zur Detektion von THC 209 nm (in Abb. 13 rot dargestellt) und zur Detektion von THCA 270 nm (pink) eingestellt.

Nach der erfolgten Auftrennung wurden die THCA-haltigen Fraktionen vereinigt. Das für die Trennung erforderliche Pyridin war nun unerwünscht, da es toxisch ist, und wurde durch dreimaliges Ausschütteln

mit 0,5 M Salzsäure (5 ml pro 100 ml Eluat) quantitativ entfernt. Pyridiniumchlorid ist gut wasserlöslich (85 g/100 ml Wasser) und reichert sich in der wässrigen Phase an. Abgesehen davon hat die Ansäuerung einen weiteren positiven Effekt: THCA wird protoniert und damit in ihren stabileren Zustand überführt.

Die vom Pyridin befreitete organische Phase wurde schließlich im Rotationsverdampfer eingedampft und im Anschluss unter Hochvakuum getrocknet. Es wurde ein weißes, amorphes Pulver erhalten.

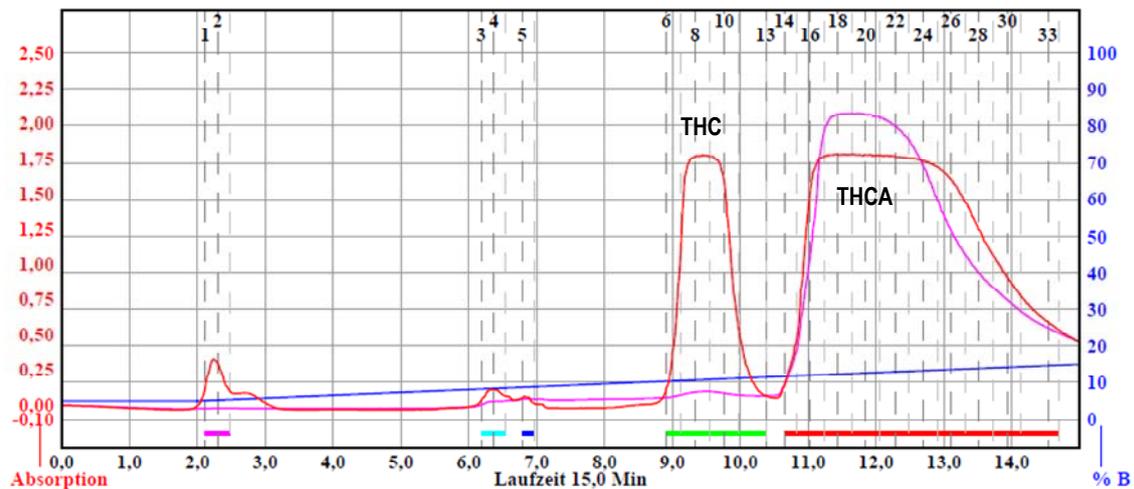


Abb. 13: Chromatogramm der Trennung mit Normalphase, Fließmittel A Cyclohexan/Pyridin und Fließmittel B Aceton/Cyclohexan mit Pyridin (1:2, v/v), Probenmenge 1800 mg Cannabisextrakt, blau eingezeichnet ist der Gradient, rot die Absorption bei 209 nm, pink die Absorption bei 270 nm

5.2.4 Flash-Chromatographie mit Umkehrphase

Der zweite erfolgreiche Versuch, THC von THCA abzutrennen, gelang mittels eines anderen Systems, das aus einer Säule mit Umkehrphase (C18) sowie Methanol und 0,55 %iger Ameisensäure als Fließmittel bestand. Die Fließmittelkomposition entsprach der Zusammensetzung bei der HPLC-DAD-Reinheitsprüfung, die im Vorfeld entwickelt wurde und unter 5.2.5 beschrieben wird. Bei dieser analytischen Methode sollte der pH-Wert bei 2,3 liegen, um ein reproduzierbares UV-Spektrum der Analyten, so wie es in der Spektren-Bibliothek nach Pragst et al. [108] abgebildet ist, zu erhalten. Auch wenn diese Anforderung bei der Isolierung keinerlei Rolle mehr spielte, gab es umgekehrt keinen Grund, das funktionierende System zu ändern. Bei der Auswahl des organischen Fließmittels waren zwei Kriterien zu beachten: Das Lösemittel musste erstens bei geringen Temperaturen verdampfbar sein, um die THCA keiner thermischen Belastung auszusetzen, und sollte sich zweitens nicht mit MTBE mischen, das im letzten Extraktionsschritt zur Anwendung kommen sollte.

Auch bei dieser Methode erwies sich die „dried solid phase technique“ als optimal. Die Probenmenge wurde der Säulenkapazität und den Trennergebnissen angepasst und auf 300 mg, entsprechend 0,2 % der Sorbensmasse, reduziert.

Der Gradient startete mit einer Anfangskonzentration von 85 % Methanol als Fließmittel A und 15 % Ameisensäure (0,55 %) als Fließmittel B über 2 Minuten. Über einen Zeitraum von 20 Minuten stieg die Methanolkonzentration dann langsam mit einer Flussrate von 80 ml/min auf 95 % an. Wie Abb. 14 zeigt, liegen die Retentionszeiten von THC und THCA bei dieser Trennung weiter auseinander als bei der Trennung mit Normalphase. THC eluierte zwischen 11,4 und 13,5 min, die THCA erst erheblich später bei 17 bis 20 min. Außerdem sind im Chromatogramm vier Verunreinigungen (A, B, C, D) gut zu erkennen. Die Detektionswellenlängen waren wie zuvor 209 und 270 nm.

Nach dem Lauf wurden die fraktionierten THCA-Eluate gepoolt und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Methanol dampfte ab, bis sich die im Kolben verbleibende Phase milchig trübte. Aus dieser vornehmlich wässrigen Phase konnte THCA mit MTBE extrahiert werden. Wie sich später bei der Reinheitsprüfung herausstellte, tendiert MTBE dazu, sich in die beim Abdampfen und Trocknen entstehenden THCA-Kristalle einzulagern. Es ließ sich dann auch durch langes Trocknen unter Hochvakuum nicht mehr entfernen. Wenn diese Einlagerung auftritt, kann das MTBE durch erneutes Auflösen mit Methanol, das mit MTBE ein Azeotrop bildet, entfernt werden. Am Ende des Isolierungsprozesses ergab sich wie zuvor ein weißes, amorphes Pulver.

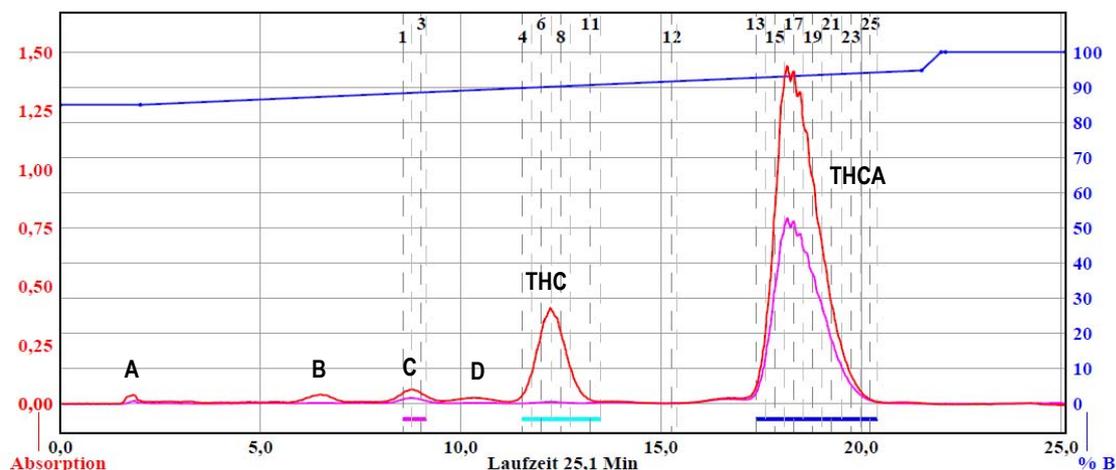


Abb. 14: Chromatogramm der Trennung mit Umkehrphase, Fließmittel A Methanol und Fließmittel B Ameisensäure, Probenmenge 300 mg Cannabisextrakt, blau eingezeichnet ist der Gradient, rot die Absorption bei 209 nm, pink die Absorption bei 270 nm

5.2.5 Reinheitsprüfungen und Ergebnisse

Da die THCA später zur oralen und intravenösen Applikation verwendet werden sollte, waren höchste Anforderungen an die Reinheit gestellt. Ein Reinheitsgrad von 99,5 % war die Minimalforderung. Gleichzeitig sollten so wenig wie möglich THC und keinerlei Spuren toxischer Substanzen, die während der Extraktion und Aufreinigung verwendet wurden (Pyridin, organische Lösemittel), enthalten sein. Drei Prüfungen des Endproduktes wurden durchgeführt: eine Reinheitsprüfung mit HPLC-DAD, eine Identitätsprüfung mit ¹H-NMR und ein zusätzliches Screening mit GC-MS.

Reinheitsprüfung mit HPLC-DAD

Mit HPLC-DAD-Analytik wurde der Reinheitsgrad der THCA bestimmt und der Gehalt an noch vorhandenem THC quantifiziert. 0,5 % THC waren als tolerierbarer Maximalwert definiert. Für die Trennung wurde eine Hydro Polar RP-Säule verwendet, die Elution erfolgte bei Raumtemperatur isokratisch mit einem Gemisch (85:15, v/v) aus Methanol und 0,55 %iger Ameisensäure (pH 2,3) bei einer Flussrate von 0,4 ml/min. Ein Lauf dauerte 20 Minuten. THC eluierte bei 6,1 min, THCA bei 13,8 min und 11-OH-THC, das als interner Standard verwendet wurde, bereits nach 2,9 min. In Abb. 15 sind die Chromatogramme zweier Läufe abgebildet, in denen jeweils eine Realprobe vermessen wurde. Wie in den Chromatogrammen deutlich zu erkennen ist, mussten aufgrund der enormen Konzentrationsunterschiede der zu bestimmenden Analyten THCA und THC in der Originalprobe zwei verschiedene Verdünnungen in Methanol verwendet werden:

- 100 µg/ml „THCA isoliert“ für die Quantifizierung der THCA
- 1 mg/ml „THCA isoliert“ für die Quantifizierung der Verunreinigung THC, deren Konzentration bei dem angenommenen Maximalwert von 0,5 % hier 5 µg/ml betragen hätte und damit noch gut über das UV-Spektrum zu erkennen gewesen wäre

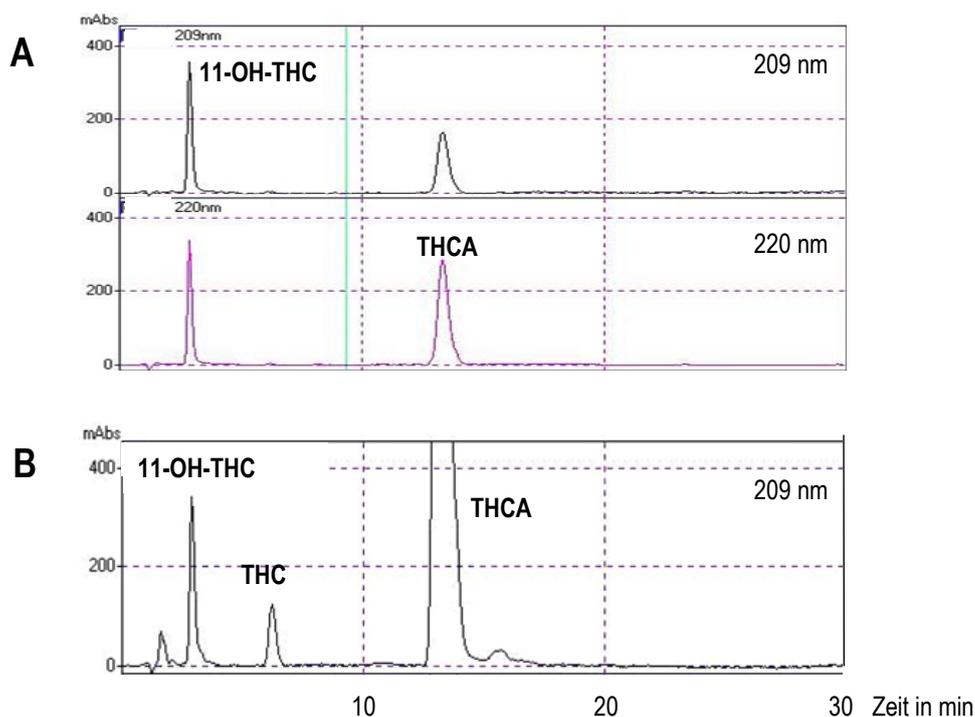


Abb. 15: Chromatogramme einer Realprobe für die Quantifizierung von THCA (oberer Teil A) und von THC (unterer Teil B)

Kalibratoren und Proben wurden gemäß dem Schema in Tab. 9 hergestellt. Nach Eindampfen der methanolischen Lösungen wurde der Rückstand in 100 µl Fließmittelgemisch rekonstituiert und davon – je nachdem, ob THCA oder THC quantifiziert werden sollte – 10 bzw. 20 µl injiziert. Auch die Menge des internen Standards wurde der zu erwartenden Peakfläche angepasst. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in der Tabelle zusätzlich die absoluten Mengen der Analyten, die auf die Säule gelangen, aufgeführt.

Für die Integration wurden die Signale bei 220 nm (THCA) und 209 nm (THC und 11-OH-THC) herangezogen, da bei diesen Wellenlängen die Absorption maximal ist. Die beiden oberen Chromatogramme (A) in Abb. 15 gehören zur THCA-Quantifizierung und zeigen die Peaks des internen Standards bei 209 nm sowie der THCA bei 220 nm. Das untere Chromatogramm (B) entstand bei Verwendung der 1 mg/ml-THCA-Lösung im Rahmen der THC-Quantifizierung. Gut zu erkennen ist der relativ kleine THC-Peak neben einem massiven THCA-Peak. Lineare Regression der Ausgleichsgeraden ergab r^2 0,9928 für die THCA-Kalibration und r^2 0,9976 für die THC-Kalibration.

Gemäß Analysenzertifikat hatte der kommerziell erworbene THCA-Referenzstandard der Firma Lipomed einen Reinheitsgrad von $98,751 \pm 0,064$ %. Die berechneten THCA-Konzentrationen mussten daher mit diesem Faktor korrigiert werden. Schließlich ergaben sich für die erhaltene THCA-Charge nach Normalphasenchromatographie eine Reinheit von 99,8 % und ein THC-Restgehalt von 0,09%. Dieses Produkt, das nach nur einem Flash-Chromatographie-Lauf isoliert wurde, kann damit als hochrein bezeichnet werden. Das Ergebnis der Trennung mit Umkehrphase war nur geringfügig schlechter und wies einen Reinheitsgrad von 98,8 % bei einem THC-Restgehalt von 0,67 % auf.

Tab. 9: Kalibrationsschema für die Reinheitsbestimmung von THCA und die Quantifizierung von THC

THCA-Kalibratoren						
$c_{\text{THCA-Ref}}$ µg/ml	$V_{\text{THCA-Ref. (c = 100 µg/ml)}}$ µl	$V_{\text{is (c = 100 µg/ml)}}$ µl	Injektionsvolumen µl	m_{THCA} ng	m_{is} ng	
105	105	50	10	1050	500	
100	100	50	10	1000	500	
95	95	50	10	950	500	
90	90	50	10	900	500	
85	85	50	10	850	500	
THC-Kalibratoren						
$c_{\text{THC-Referenz}}$ µg/ml	$V_{\text{THC-Ref. (c = 100 µg/ml)}}$ µl	$V_{\text{is (c = 100 µg/ml)}}$ µl	Injektionsvolumen µl	m_{THC} ng	m_{is} ng	
12,5	125	25	20	250	500	
10	100	25	20	200	500	
7,5	75	25	20	150	500	
5,0	50	25	20	100	500	
2,5	25	25	20	50	500	
Proben für THCA-Quantifizierung						
$c_{\text{THCA isoliert}}$ µg/ml	$V_{\text{THCA-Ref. (c = 100 µg/ml)}}$ µl	$V_{\text{is (c = 100 µg/ml)}}$ µl	Injektionsvolumen µl			
100	100	50	10			
Proben für THC-Quantifizierung						
$c_{\text{THCA isoliert}}$ µg/ml	$V_{\text{THC-Ref. (c = 100 µg/ml)}}$ µl	$V_{\text{is (c = 100 µg/ml)}}$ µl	Injektionsvolumen µl			
1000	100	25	20			

Identitätsprüfung mit NMR

Die Kernresonanzspektroskopie (NMR, nuclear magnetic resonance) dient in der organischen Chemie in erster Linie zur Strukturaufklärung und sicheren Identifizierung einer Substanz. Ist ausreichend Stoffmenge vorhanden, kann man durch zusätzliche Signale im Spektrum, die sich nicht mit der Struktur der gewünschten Substanz erklären lassen, auch auf eventuell vorhandene Verunreinigungen schließen.

Bei der ^1H -NMR werden Protonen einem starken Magnetfeld ausgesetzt und mit Strahlung einer bestimmten Frequenz zu Resonanz, d. h. dem Übergang von einem niedrigen Kernspinnenergieniveau auf ein höheres, angeregt. Abhängig von ihrer Umgebung im Molekül zeigen Protonen Resonanz bei minimal verschiedenen Frequenzen. Um diese minimalen Unterschiede auch geräteunabhängig angeben zu können, referenziert man auf Trimethylsilan (TMS), dessen Signal als 0 definiert wird. Die relative Abweichung eines Signals vom TMS-Signal heißt chemische Verschiebung. Anhand ihres Wertes lässt sich gut auf die unmittelbare Nachbarschaft des Protons schließen. Durch Kopplungen der Spins mit benachbarten Kernen kann es außerdem zur Aufspaltung eines Signals kommen. Letzten Endes ist es möglich, anhand der verschiedenen Signale, ihrer chemischen Verschiebung und Aufspaltungen auf die Struktur eines Moleküls zu schließen.

Für die NMR-Messung wurden 20 mg des weißen Pulvers in 650 μl CDCl_3 gelöst. Im ^1H -NMR-Spektrum (Abb. 16) fanden sich die in Tab. 10 aufgeführten Signale, die mit den von Dussy et al. [107] publizierten Daten übereinstimmen. Es traten keine zusätzlichen Signale auf.



Abb. 16: ^1H -NMR-Spektrum der isolierten THCA nach Normalphasenchromatographie: alle Signale sind entsprechend der oben aufgeführten Nummerierung gekennzeichnet

Tab. 10: Signale im ^1H -NMR-Spektrum nach Dussy et al. [107]: Angegeben sind die chemische Verschiebung δ , die Anzahl der Protonen, eventuelle Aufspaltungen durch Kopplung (s = Singulett, d = Duplett, m = Multipllett) und um welches Proton es sich handelt.

Nr.	δ	Protonenanzahl	Aufspaltung	Zuordnung H-Atome
1	0,90	3H	m	H _{5'}
2	1,11	3H	s	H ₁₂
3	1,34	4H	m	H _{3'} und H _{4'}
4	1,44	5H	m	H ₇ und H ₁₃
5	1,58	2H	m	H _{2'}
6	1,68	4H	m	H _{6a} und H ₁₁
7	1,92	1H	m	H ₇
8	2,17	2H	m	H ₈
9	2,78	1H	d, d, d	H _{1'}
10	2,95	1H	d, d, d	H _{1'}
11	3,23	1H	m	H _{10a}
12	6,26	1H	s	H ₄
13	6,39	1H	septett	H ₁₀
14	12,20	1H	s	OH

Reinheitsprüfung mit GC-MS

Zur letzten Absicherung – schließlich sollte die Substanz den Probanden auch intravenös verabreicht werden – wurde die THCA auch mittels einer GC-MS-Scan-Methode, die an die in der Routine verwendete Cannabinoid-Analytik angelehnt war, getestet. Im Spektrum hätten sich alle im Gaschromatographen nach Silylierung mit MSTFA verdampfbaren Verunreinigungen in einem Massenbereich von 50 bis 550 amu gezeigt. Damit wären Cannabinoide wie THC, aber auch Cannabidiol- und Cannabichromensäure, genauso gut zu erkennen gewesen wie andere typische Inhaltsstoffe der Cannabispflanze.

Die GC-Bedingungen waren wie folgt: Säule HP-5MS (innerer Durchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 μm , Länge 30 m, Agilent Technologies), splitlose Injektion, Injektionstemperatur 250 °C, Trägergas Helium, Flussrate 1,48 ml/min, Temperaturgradient 140 °C zu Beginn, 2 min halten, linearer Anstieg auf 200 °C innerhalb von 1 min, langsamerer linearer Anstieg auf 230 °C innerhalb von 12 min, Hochheizen mit 60 °C/min auf 310 °C, für 4,3 min halten. Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Full Scan von m/z 50-550, Ionisierung: electron impact, Ionisierungsenergie 70 eV, Quelltemperatur 230 °C.

Für die Messung wurden 5 μl methanolische THCA-Lösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eingedampft und mit 25 μl MSTFA und 25 μl Ethylacetat bei 90 °C über 45 min silyliert. 1 μl , entsprechend 10 ng THCA, wurde in das GC-MS injiziert. Im Chromatogramm zeigten sich ein massiver THCA-Peak und fünf weitere Peaks, die sich auch in der Kontrollprobe mit reinem Silylierungsreagenz fanden. Bei 14,6 min, der Retentionszeit von THC, war kein Peak zu erkennen. Ein Hinweis auf Verunreinigungen ergab sich demnach nicht.

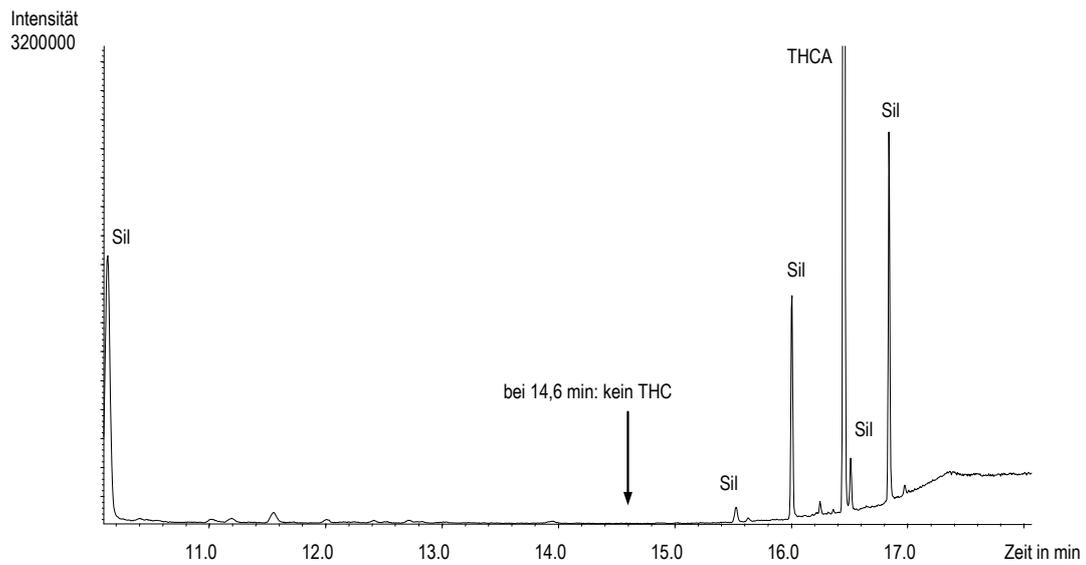


Abb. 17: Chromatogramm des GC-MS-Laufs: mit „Sil“ sind Peaks gekennzeichnet, die sich auch in der Kontrollprobe mit reinem Silylierungsreagenz fanden

Fazit: Mit den zwei entwickelten Flash-Methoden lässt sich in relativ kurzer Zeit und in einem chromatographischen Schritt ein hochreines Endprodukt isolieren. Die Trennung mit Normalphase ergab 623 mg THCA aus 1800 mg Rohextrakt und verbrauchte insgesamt 2,0 Liter Cyclohexan und 0,1 Liter Aceton. Bei der Trennung mit der Umkehrphase wurden aus 300 mg eingesetzter Probe 51 mg reine THCA erhalten und dafür 2,2 Liter Methanol, 0,3 Liter 0,1%ige Ameisensäure und 125 Milliliter Methyl-*tert*-butylether verbraucht.

5.3 LC-MS/MS-Analytik von THCA, ihrer Metaboliten und THC

Für die Messung der in der Humanstudie gewonnenen Proben ist eine empfindliche Analytikmethode Voraussetzung. Da sehr viele Proben anfallen, ist es weiterhin von Vorteil, eine zeitsparende Aufbereitungsmethode zu verwenden und die Messzeiten so gering wie möglich zu halten. Ziel war es, eine Gesamtmethode mit einer Maximaldauer von 20 Minuten zu entwickeln, mit der THCA quantitativ und bis zu einer Mindestuntergrenze von 1,0 ng/ml bestimmt werden kann, und daneben zusätzlich THC sowie alle 19 bereits bekannten THCA-Metaboliten zu erfassen.

5.3.1 Entwicklung der Extraktions- und Analytikmethode

Es existierte bereits eine LC-MS/MS-Methode von Julia Jung – eine Übertragung der in [109] beschriebenen Methode auf ein empfindlicheres Gerät (QTrap 2000), die neben den Übergängen für THCA bereits die Übergänge für die gefundenen Metaboliten enthielt. Für die Chromatographie wurde damals eine Luna Phenylhexylsäule und als Fließmittel Ammoniumacetat und Acetonitril eingesetzt. Die Methode dauerte insgesamt 30 Minuten und war anfällig für Verschleppung, so dass standardmäßig eine Leerprobe zwischen jeder Realprobe gemessen werden musste. Die Analyse einer Probe dauerte daher eine Stunde.

In Anbetracht von ca. 700 zu analysierenden Proben war dieser Zeitaufwand unverhältnismäßig hoch. Zudem ist Ammoniumacetat ein Reagenz, das schnell kontaminiert und öfter als andere Fließmittel ausgetauscht werden muss, so dass Alternativen – wenn möglich – vorzuziehen sind. Da inzwischen auch ein noch empfindlicheres Massenspektrometer (QTrap 4000) zur Verfügung stand, wurde die Methode neu aufgesetzt und bei dieser Gelegenheit grundlegend geändert.

Referenzstandards, Chemikalien und Geräte

Folgende Referenzstandards, Chemikalien und Geräte wurden verwendet:

Referenzmaterialien		
THCA	Lipomed	Bad Säckingen, Deutschland
THC	Lipomed	Bad Säckingen, Deutschland
d ₃ -THC	LGC Standards	Wesel, Deutschland
Chemikalien		
Acetonitril	J.T. Baker	Deventer, Niederlande
Ameisensäure	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker	Deventer, Niederlande
Wasser, deionisiert	gereinigt mit Deionisierungsanlage von Memtech	Moorweis, Deutschland
Geräte		
Zentrifuge	Hermle Z 233 MK-2	Wehingen, Deutschland
LC-MS/MS	Pumpen: LC-20 AD SP Autosampler: SIL-20 AC Entgaser: DGU-20 A Säulenofen: CTO-20A	Shimadzu, Deutschland

LC-MS/MS (Fortsetzung)	Controller: CBM-20A	
	Massenspektrometer: QTrap 4000 triple quadrupole linear ion trap mit Turboionspray ESI Interface	Applied Biosystems, USA
	Software: Analyst 1.5.1	
	Säule: Luna C18 (150 mm x 2 mm, 5 µm) mit Vorsäule C18 (4 mm x 2 mm)	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland

Synthese von D₃-THCA

Ein deuterierter interner Standard ist entscheidend für eine genaue Quantifizierung bei Verwendung einer LC-MS-Methode mit Elektrosprayionisierung. Denn bei dieser Ionisierungstechnik fallen Matrixeffekte besonders ins Gewicht und können, wenn Analyt und dazugehöriger interner Standard zu unterschiedlichen Zeiten eluieren, im schlimmsten Fall zu völlig falschen Ergebnissen führen. Dieses Problem wird bei der Verwendung eines deuterierten internen Standards auf ein Minimum reduziert. Da die Strukturen einer nicht-deuterierten Substanz und ihres deuterierten Analogons nahezu identisch sind und sich nur die Molekülmassen gering unterscheiden, eluieren beide zum annähernd gleichen Zeitpunkt und sind damit annähernd identischen Matrixeffekten ausgesetzt.

Nadine Roth synthetisierte für die Entwicklung der neuen LC-MS/MS-Methode dreifach deuterierte THCA [110]. Auf Grundlage einer Synthesvorschrift zur Carboxylierung von Resorcinol [111] wurde der Ausgangsstoff d₃-THC mit Magnesiummethylcarbonat in Dimethylformamid bei 120°C drei Stunden lang gekocht, nach Hydrolyse mit Salzsäure das Reaktionsgemisch mit Ether extrahiert und dieser Extrakt anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt. Bei dieser Reaktion wird eine Carboxylgruppe am aromatischen Ring eingeführt. Bestimmte Reaktionsbedingungen müssen eingehalten werden, um THCA-A und nicht das Konstitutionsisomer THCA-B zu erhalten [112]. Unter optimalen Voraussetzungen ergab sich eine Ausbeute von ca. 9 %. Die methanolische Lösung, die nach der Aufreinigung des Produkts vorlag, hatte eine Konzentration von ungefähr 0,15 mg/ml, wie sich beim Vergleich der absoluten Peakflächen mit THCA-Kalibratoren herausstellte. Die Isotopenreinheit war > 99 %. 10 % des Ausgangsstoffes D₃-THC waren noch in der Lösung vorhanden.

Entwicklung der LC-MS/MS-Methode

Cannabinoide lassen sich hervorragend auf Umkehrphasen trennen [113-119], so auch THCA und ihre Metaboliten. Ein Trennungssystem, bestehend aus einer Luna C18-Säule sowie 0,1%iger Ameisensäure und Acetonitril/0,1% Ameisensäure als Fließmittel A und B, erwies sich als prinzipiell geeignet. Der Fluss wurde so weit heraufgesetzt (Beginn mit bereits 0,6 ml/min, Anstieg auf 0,8 ml/min), dass die Methode auf 15 Minuten verkürzt werden konnte. Für eine ausreichende Verdampfung wurde eine Quelltemperatur von 600 °C eingestellt, die aber nicht zur Decarboxylierung von THCA führte, da sie nur für einen Bruchteil einer Sekunde wirkte und durch die Verdampfung des Lösungsmittels ein „Kühleffekt“ eintritt. In der Testphase zeigten sich keine Signale bei den mitgemessenen THC-Übergängen. Es war kein post-column-Zusatz eines organischen Lösungsmittels zur besseren Ionisierung nötig.

THCA und ihre Metaboliten lassen sich am besten negativ ionisieren. Bei der Optimierung zeigte sich, dass THC in jedem Fall positiv ionisiert werden muss, um bei den gegebenen Bedingungen ausreichende Intensitäten zu erhalten. Mit der Maßgabe, dass THCA, ihre Metaboliten und THC in einer Me-

thode analysiert werden sollen, führte dies zwangsläufig zu einem kontinuierlichen Hin- und Herschalten zwischen positiver und negativer Ladung. Das kostete enorm viel Zeit. Mit bereits herabgesetzten Messzeiten für alle Metaboliten und THC ergab sich noch immer eine inakzeptable Zykluszeit von über 3 s, die zu einer ungenügend exakten Abbildung der chromatographischen Peaks und damit schlechteren Ergebnissen bei der THCA-Quantifizierung führte.

Alle gewünschten Anforderungen ließen sich nicht vereinen, so dass die Methoden schließlich getrennt wurden – in eine Quantifizierungsmethode für THCA mit einer Zykluszeit von 0,8 s und einer zweiten Methode für die Identifizierung von THC und den THCA-Metaboliten. Da keine Verschleppungen auftraten, verkürzte sich die Messzeit für eine Probe auf die Hälfte verglichen mit der ursprünglichen Methode.

Die Analyten wurden bei beiden Methoden mittels Gradientenelution getrennt, wobei über die Zeit nicht nur die Fließmittelzusammensetzung, sondern auch die Flussrate variierte. Der Gradient war folgendermaßen programmiert: 0 bis 1 min 20 % B, Anstieg auf 95 % B innerhalb von sieben Minuten, Halten für 4 min, Abfall nach insgesamt 13 min auf wieder 20 % B und Equilibrieren für 2,5 min. Zu Anfang betrug die Flussrate 0,6 ml/min, stieg von 9,5 bis 9,75 min auf 0,8 ml/min, um von da an bis 13,0 min wieder auf 0,6 ml/min abzusinken. Die massenspektrometrischen Parameter wurden für THCA, d₃-THCA, THC und d₃-THC optimiert, für die anderen Analyten war dies mangels Referenzstandard nicht möglich.

Aus dem gleichen Grund mussten die Retentionszeiten für die Metaboliten anhand von Serum- und Urinproben aus der Humanstudie ermittelt werden. Dazu wurden die Proben wie im nächsten Abschnitt beschrieben aufbereitet und mit der MRM-Methode vermessen. Zur Identifikation und anschließenden Festlegung der Retentionszeit waren Peaks mit Signal-Rausch-Verhältnis > 3 in mindestens zwei Übergängen erforderlich. Bei isobaren Metaboliten mit gleichen Übergängen wurde die Reihenfolge mit der Reihenfolge auf der Luna Phenylhexylsäule verglichen und typische Metabolitenmuster von THC [120] zur Zuordnung herangezogen. Alle individuellen und substanzunabhängigen Parameter sind in Tab. 11 zusammengefasst.

- Monohydroxylierte Metabolite und ihre Glucuronide:
11-OH-THCA ist der mit Abstand häufigste monohydroxylierte Metabolit, gefolgt von 8 α -OH-THCA. 8 β -OH-THCA spielt nur eine untergeordnete Rolle. Auch die später in 5.4 beschriebenen Inkubationsversuche mit CYP-Isoenzymen bestätigen diese Analogie zu THC: Während CYP 2C9 die Umsetzung zu 11-OH-THCA und in geringerem Ausmaß zu 8 α -OH-THCA katalysiert, findet sich im Ansatz mit CYP 3A4 nur eine relativ kleine Menge an 8 β -OH-THCA. Abb. 18 zeigt ein Chromatogramm dieser drei monohydroxylierten Metabolite in einer authentischen Serumprobe (A) sowie ihrer Glucuronide in einer Urinprobe (B) nach intravenöser Applikation von THCA.
- Bishydroxylierte Metabolite und ihre Glucuronide:
Nach der Monohydroxylierung kann eine zweite Hydroxylierung an einer anderen Position erfolgen und es entstehen bishydroxylierte Metaboliten. Die Zuordnung der Retentionszeiten für diese Stereoisomere gestaltet sich schwierig, da keine eindeutig identifizierenden Fragmente vermessen werden können. Für die Übergänge existieren mindestens die zwei Stereoisomere 8 α ,11-Bis-OH-THCA und 8 β ,11-Bis-OH-THCA sowie an anderen Positionen, z. B. an der Seitenkette hydroxylierte Metabolite, so dass es wenig verwunderlich ist, dass im Chromatogramm in Abb. 19 klar mindestens vier Signale im ersten und zweiten Übergang zu erkennen sind.

Welcher Peak welchem Metaboliten entspricht, muss hier Spekulation bleiben. Unter der Annahme, dass die Hydroxylierungen an Position 11 und 8 α bevorzugt ablaufen, sollte das intensivste Signal bei 6,51 Minuten 8 α ,11-Bis-OH-THCA gehören. Betrachtet man die entsprechenden Glucuronide, zeigt vor allem die Substanz zur Retentionszeit 4,55 min eindeutige Signale in allen drei Übergängen. Diese wird später für die Erstellung der Metabolitenprofile unter dem Namen „8,11-Bis-OH-THCA-Glucuronid“ geführt.

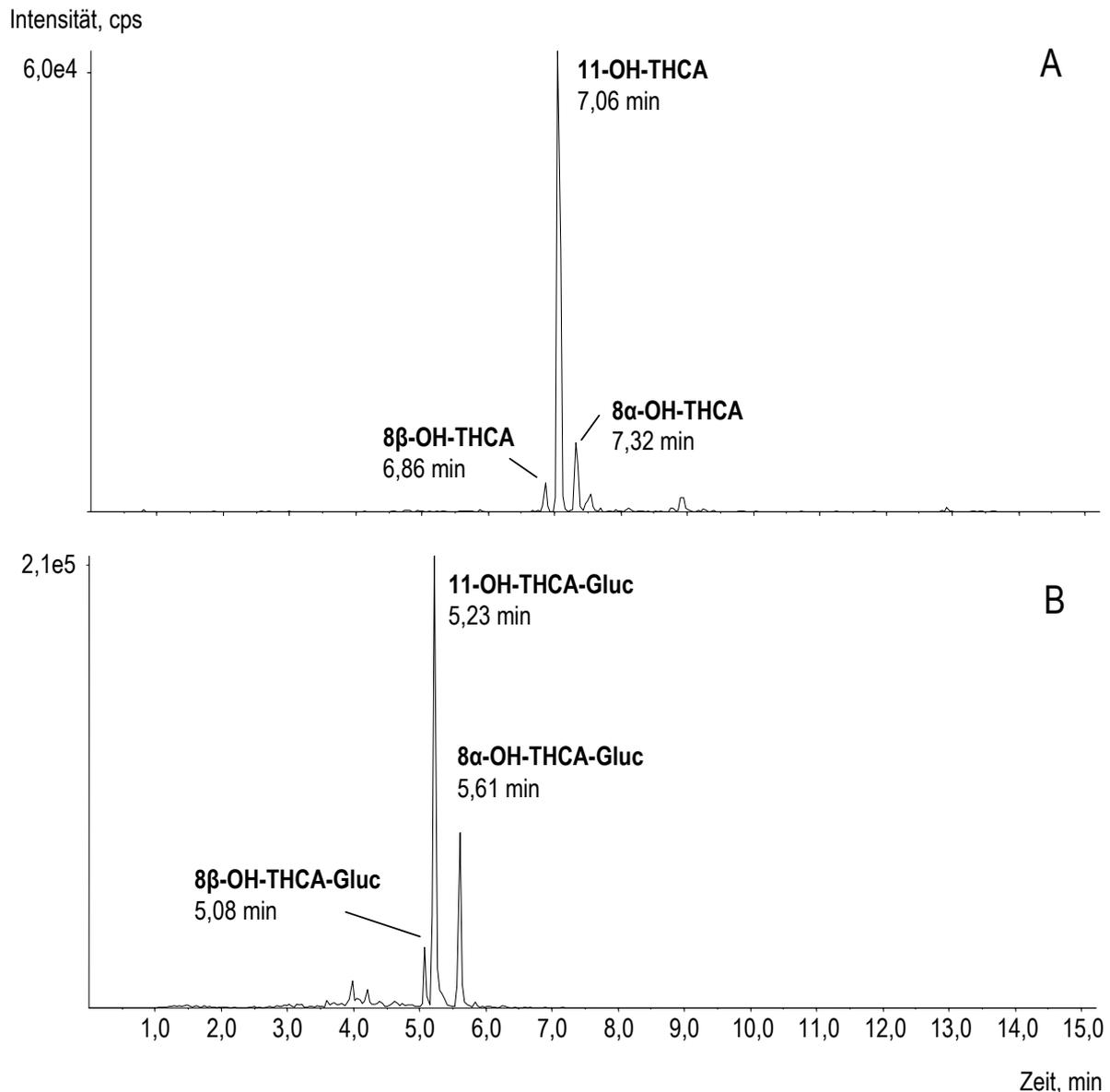


Abb. 18: Monohydroxylierte Metabolite und ihre Glucuronide:

A Extrahiertes Ionenchromatogramm des ersten Übergangs (373,2 – 311,2) für 8 β -, 11- und 8 α -OH-THCA in einer Serumprobe von Proband I nach 15 min nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA

B Extrahiertes Ionenchromatogramm des ersten Übergangs (549,2 – 373,2) für 8 β -, 11- und 8 α -OH-THCA-Glucuronid in einer Urinprobe von Proband D nach 2 h 40 min nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA

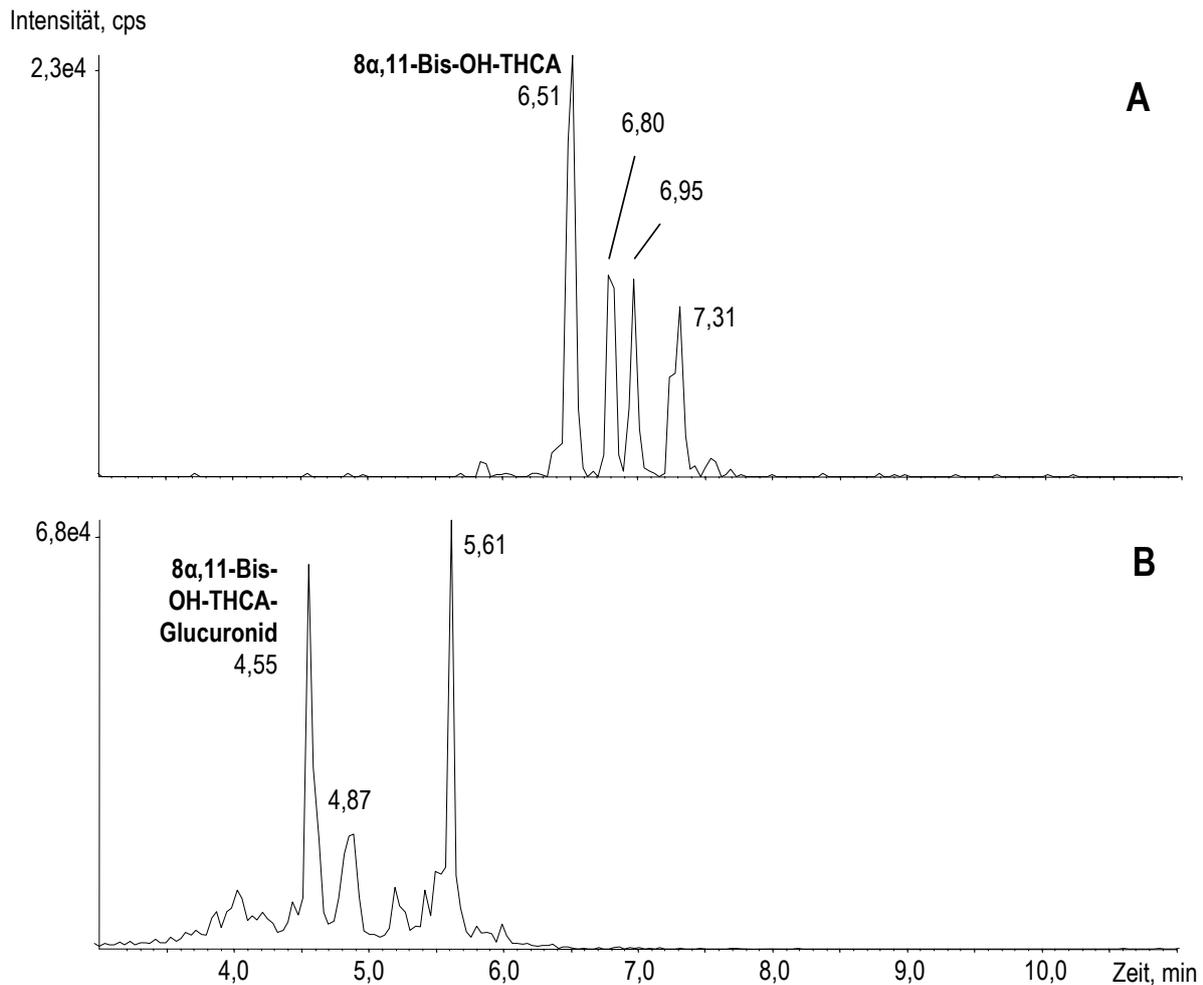


Abb. 19: Bishydroxylierte Metabolite und ihre Glucuronide

A Extrahiertes Ionenchromatogramm des ersten Übergangs (389,2 – 309,2), der den bishydroxylierten Metaboliten zugeordnet werden kann, Serumprobe von Proband L nach 10 min nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA

B Extrahiertes Ionenchromatogramm des ersten Übergangs (565,2 – 389,2) für die entsprechenden Glucuronide der bishydroxylierten Metabolite, Urinprobe von Proband F nach 1 h 35 min nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA; das Signal bei 5,61 min gehört wahrscheinlich zu einer Verunreinigung

- 9,10-Bis-OH-HHCA und sein Glucuronid

9,10-Bis-OH-HHCA entsteht nach Epoxidierung der Doppelbindung und nachfolgender Hydrolyse des instabilen Dreirings. In den Chromatogrammen der Serumproben nach intravenöser Applikation fanden sich zwei Signale im Retentionszeitabstand von 0,1 min, die Signale in allen drei Übergängen, jedoch mit unterschiedlichen relativen Ionenverhältnissen zeigten. Es handelt sich wahrscheinlich um die zwei Diastereomere, die bei der Hydrolyse des Epoxids entstehen können: das R,S- und das S,R-Isomer. Die Entstehung dieser Isomere und ihre Strukturformeln sind in Abb. 20 abgebildet. Beispielchromatogramme für die drei vermessenen Übergänge zeigt Abb. 21.

Der Metabolit 9,10-Bis-OH-HHCA-Gluc konnte weder in Serum oder Urin gefunden werden. Dementsprechend muss die Retentionszeit dieser Substanz offen bleiben.

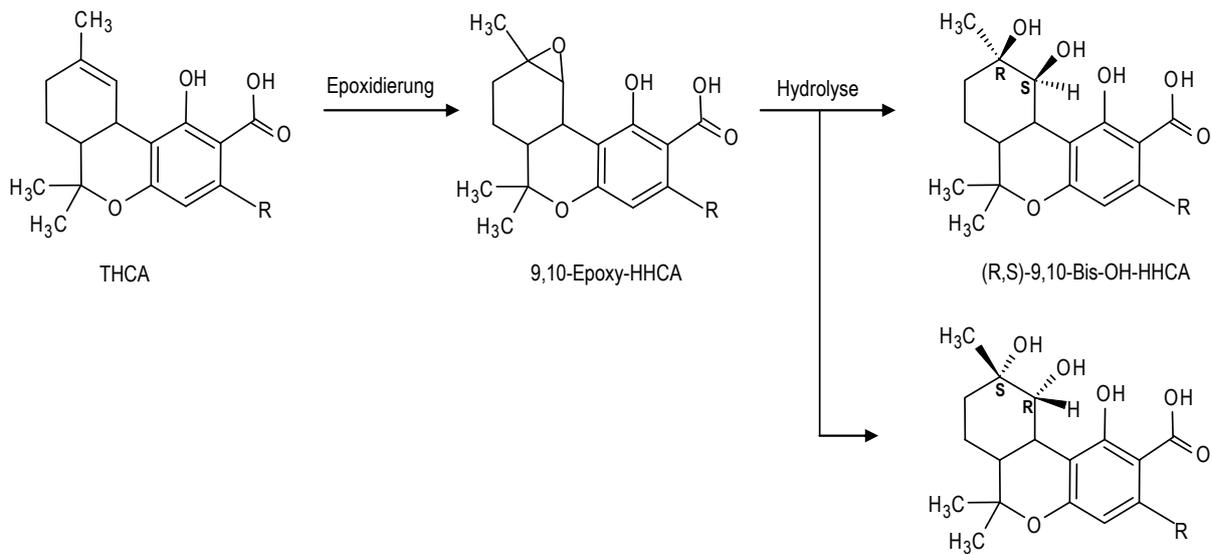


Abb. 20: Metabolisierungsreaktion von THCA über 9,10-Epoxy-HHCA zu 9,10-Bis-OH-HHCA: Gezeigt sind die zwei Stereoisomere von 9,10-Bis-OH-HHCA unter Angabe der absoluten Konfiguration der zwei Chiralitätszentren an Position 9 und 10, bestimmt nach Cahn-Ingold-Prelog

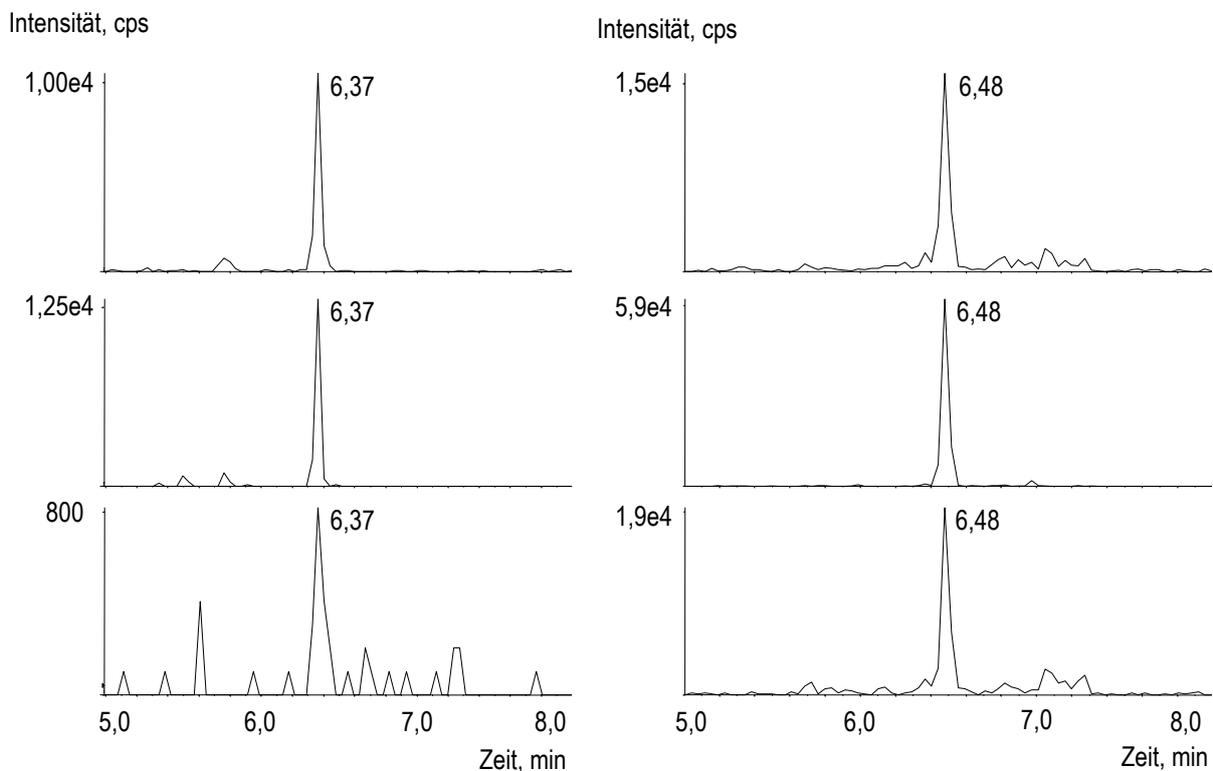


Abb. 21: Extrahierte Ionenchromatogramme für 9,10-Bis-OH-HHCA: Gezeigt sind die drei vermessenen MRM-Übergänge für eine Serumprobe von Proband B nach 36 Stunden (links) und von Proband C nach 6 Stunden (rechts) jeweils nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA. Klar zu erkennen sind die unterschiedlichen relativen Ionenintensitäten für die zwei Stereoisomere.

Tab. 11: Substanzunabhängige und substanzabhängige MS-Parameter der zwei verwendeten LC-MS/MS-Methoden: Quantifizierungsmethode für THCA bzw. die Identifizierungsmethode für THC und THCA-Metaboliten**Quantifizierung THCA**

MRM-Modus, negative Elektrosprayionisierung, Quelltemperatur 600°C, Spannung -4250 V, Curtain-Gas (CUR) Stickstoff (35 psi), Kollisionsgas (CAD) Stickstoff (6 psi), Ionenquellengas 1 und 2 Stickstoff (40 und 70 psi), Zykluszeit 0,88 s

Analyt	Q1	Q3	tR (min)	Messzeit (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
THCA	357,2	313,2	8,92	50	-95	-10	-34	-7
	357,2	245,2		20	-95	-10	-43	-5
	357,2	191,1		20	-95	-10	-43	-10
d3-THCA	360,3	316,4	8,91	50	-95	-10	-34	-7
	360,3	248,3		20	-95	-10	-43	-5

Identifizierung THCA-Metabolite und THCMRM-Modus, Quelltemperatur 600°C, Curtain-Gas (CUR) Stickstoff (35 psi), Kollisionsgas (CAD) Stickstoff (6 psi), Ionenquellengas 1 und 2 Stickstoff (40 und 70 psi); Gesamtzykluszeit: 2,30 s
Experiment 1: negative Elektrosprayionisierung, Spannung -4250 V

Analyt	Q1	Q3	tR (min)	Messzeit (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
THCA-Gluc	533,2	357,2	7,24	20	-45	-10	-35	-3
	533,2	313,2		10	-45	-10	-50	-3
	533,2	245,2		10	-45	-10	-50	-3
11-OH-THCA	373,2	311,2	7,06	20	-45	-10	-35	-3
	373,2	173,1		10	-45	-10	-50	-3
	373,2	267,1		10	-45	-10	-50	-3
THCA-COOH	387,2	299,2	7,29	20	-45	-10	-35	-3
	387,2	245,2		10	-45	-10	-50	-3
	387,2	191,1		10	-45	-10	-50	-3
8 α -OH-THCA	373,2	311,2	7,32	20	-45	-10	-35	-3
	373,2	267,1		10	-45	-10	-50	-3
	373,2	173,1		10	-45	-10	-50	-3
8 β -OH-THCA	373,2	311,2	6,86	20	-45	-10	-35	-3
	373,2	267,1		10	-45	-10	-50	-3
	373,2	173,1		10	-45	-10	-50	-3
THCA-8-on	371,2	327,2	7,66	20	-45	-10	-35	-3
	371,2	284,2		10	-45	-10	-50	-3
	371,2	189,1		10	-45	-10	-50	-3
8 α ,11-Bis-OH-THCA	389,2	309,2	6,51	20	-45	-10	-35	-3
	389,2	327,2		10	-45	-10	-35	-3
	389,2	269,2		10	-45	-10	-50	-3
8-OH-THCA-COOH	403,2	385,2	6,33	20	-45	-10	-20	-3
	403,2	297,2		10	-45	-10	-35	-3

Analyt	Q1	Q3	tR (min)	Messzeit (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
4'-OH-THCA-COOH	403,2	315,2	5,31	20	-45	-10	-35	-3
	403,2	261,1		10	-45	-10	-50	-3
9,10-Bis-OH-HHCA	391,2	329,2	6,36 und 6,48	20	-45	-10	-35	-3
	391,2	311,2		10	-45	-10	-50	-3
	391,2	191,2		10	-45	-10	-50	-3
11-OH-THCA-Gluc	549,2	373,2	5,23	20	-45	-10	-35	-3
	549,2	311,2		10	-45	-10	-50	-3
	549,2	268,2		10	-45	-10	-50	-3
THCA-COOH-Gluc	563,2	387,2	5,60	20	-45	-10	-35	-3
	563,2	299,2		10	-45	-10	-50	-3
	563,2	245,2		10	-45	-10	-50	-3
8α-OH-THCA-Gluc	549,2	373,2	5,61	20	-45	-10	-35	-3
	549,2	311,2		10	-45	-10	-50	-3
	549,2	268,2		10	-45	-10	-50	-3
8β-OH-THCA-Gluc	549,2	373,2	5,08	20	-45	-10	-35	-3
	549,2	311,2		10	-45	-10	-50	-3
	549,2	268,2		10	-45	-10	-50	-3
THCA-8-on-Gluc	547,2	371,2	5,70	20	-45	-10	-35	-3
	547,2	327,2		10	-45	-10	-50	-3
	547,2	284,2		10	-45	-10	-50	-3
8,11-Bis-OH-THCA-Gluc	565,2	389,2	4,55	20	-45	-10	-35	-3
	565,2	327,2		10	-45	-10	-50	-3
	565,2	309,2		10	-45	-10	-50	-3
8-OH-THCA-COOH-Gluc	579,1	403,2	4,74	20	-45	-10	-35	-3
	579,1	385,2		10	-45	-10	-50	-3
	579,1	297,2		10	-45	-10	-50	-3
4'-OH-THCA-COOH-Gluc	579,1	403,2	4,44	20	-45	-10	-35	-3
	579,1	315,2		10	-45	-10	-50	-3
	579,1	261,1		10	-45	-10	-50	-3
9,10-Bis-OH-HHCA-Gluc	567,2	391,2	?	20	-45	-10	-35	-3
	576,2	329,2		10	-45	-10	-50	-3
	567,2	311,2		10	-45	-10	-50	-3

Experiment 2: positive Elektrosprayionisierung, Spannung 5200 V

THC	315,2	193,2	8,60	20	60	10	34	3
	315,2	259,3		10	60	10	28	5
	315,2	233,3		10	60	10	27	4
d3-THC	318,2	196,2	8,59	20	60	10	34	3
	318,2	262,3		10	60	10	28	5

Entwicklung der Aufbereitungsmethode

Probenaufbereitung mit Proteinfällung oder Festphasenextraktion? Auf diese Frage konzentrierten sich alle Versuche, die im Rahmen der Methodenentwicklung durchgeführt wurden. Die Proteinfällung – bei der mit einem (kalten) organischen Lösungsmittel Serumproteine ausgefällt und abzentrifugiert werden und der verbleibende Überstand eingedampft, aufgenommen und vermessen wird – ist eine sehr schnelle Aufbereitungsart. Der Zeitfaktor ist ihr größter Vorteil. Da im Gegensatz zur Festphasenextraktion keinerlei Waschschriffe enthalten sind, geht keine Substanz verloren, bleiben die Überstände aber auch vergleichsweise matrixbelastet. Die Proteinfällung als Aufbereitungsmethode für eine spätere Quantifizierung konnte nur in Betracht gezogen werden, weil ein deuterierter interner Standard für THCA vorhanden war, ansonsten hätte sie von vornherein wegen der zu erwartenden Matrixeffekte ausgeschlossen werden müssen.

Die Festphasenextraktion liefert meistens Extrakte mit relativ geringer Matrixbelastung. Bei der Festphasenextraktionsmethode, die nach dem Vorbild der routinemäßig angewandten THC-Analytik für THCA erstellt worden war, trat aber ein erheblicher Analytverlust durch das Waschen auf. 1 ml Serum wurde auf C18-Kartuschen geladen, mit Essigsäure und 40 %igem Acetonitril gewaschen und mit 100 % Acetonitril eluiert. Bei der Analyse der gewonnenen Extrakte fanden sich geringere Peakintensitäten für THCA als bei Proteinfällung bei nur einem Zehntel der Probenmenge. Hinzu kam, dass einige Metabolite, die nach Proteinfällung noch detektiert werden konnten, nach der Festphasenextraktion gänzlich verschwunden waren. Änderungen des Acetonitril-Gehalts beim zweiten Waschschriffe brachten keine wesentliche Verbesserung.

Darauffin wurde die Proteinfällung im weiteren Verlauf optimiert. Um eine homogene und reproduzierbare Fällung zu erreichen, stellte es sich als unbedingt erforderlich heraus, dass

- das Serum vor der Fällung mit einer geringen Menge Methanol versetzt wird
- das Fällungsreagenz Acetonitril eiskalt ist (Lagerung bei -20°C)
- „fraktioniert“ gefällt und zwischendurch immer wieder gevortext wird,
- die Proben nach der Fällung 10 min bei -20 °C gelagert werden
- bei niedrigen Temperaturen zentrifugiert wird, d. h. die Zentrifuge muss eine Kühlung besitzen
- für die Herstellung von Kalibratoren immer mit dem gleichen Volumen methanolischer Referenzlösung aufdotiert wird, was zur Folge hat, dass für jedes Konzentrationslevel eine eigene Kalibratorlösung erforderlich ist

Mitunter lagen nach der Zentrifugation (10 min, 12500 U/min, 0 °C) zwei Phasen über dem festen, weißen Präzipitat vor. Eine eindeutige Ursache dafür ließ sich nicht ermitteln. Durch Aufschütteln und erneutes Zentrifugieren konnte das Problem aber leicht behoben werden. Zum Aufdotieren mit internem Standard wurde ein Mix aus D₃-THCA und D₃-THC hergestellt (IS-Mix), deren Konzentrationen ca. 75 ng/ml bzw. 50 ng/ml betragen. Aufdotiert wurde mit 20 µl, entsprechend 1,5 ng D₃-THCA und 1,0 ng D₃-THC in jeder Probe.

Alle Proben – Studienproben, Kalibratoren und Qualitätskontrollen – wurden schließlich nach folgendem Schema aufgearbeitet:

- 200 µl Serum
- + 20 µl IS-Mix
- + 20 µl Methanol **oder** 20 µl Kalibratorlösung
- + 100 µl kaltes Acetonitril, vortexen
- + 100 µl kaltes Acetonitril, vortexen
- + 300 µl kaltes Acetonitril, vortexen
- 10 min bei -20 °C kühlen
- 10 min bei 0 °C und 12500 U/min zentrifugieren
- 550 µl des Überstands abnehmen
- unter Stickstoff bei 40 °C eindampfen
- + 100 µl mobile Phase

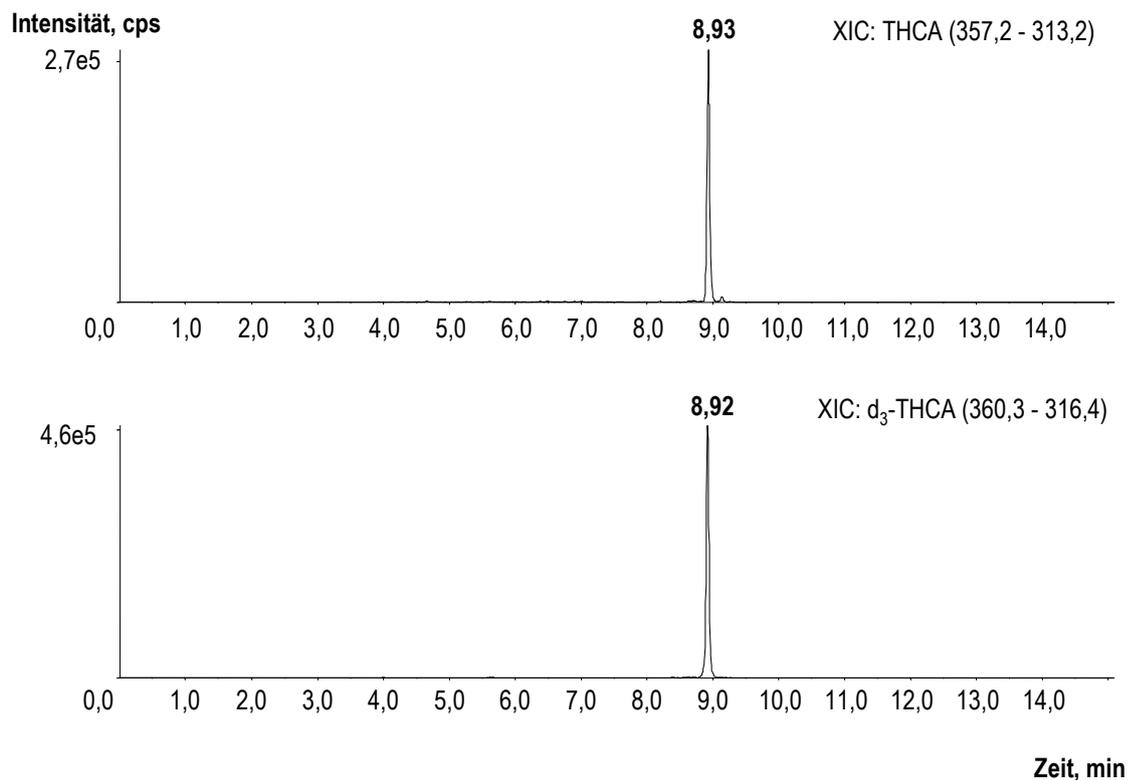


Abb. 22: Extrahiertes Ionenchromatogramm eines Serumkalibrators aufdotiert mit 10 ng/ml THCA, dargestellt sind der erste MRM-Übergang für THCA und den internen Standard D₃-THCA

5.3.2 Validierung der Extraktions- und Analysenmethode

Die Quantifizierungsmethode für THCA wurde nach GTFCh-Richtlinien [121] validiert. Nur für die Bestimmung der Matrixeffekte kam ein alternatives Verfahren nach Bonfiglio et al. [122] zum Einsatz.

Selektivität

16 verschiedene Serumproben wurden ohne weitere Zusätze mit Proteinfällung aufbereitet und vermessen. Es durften keine Interferenzen von Matrixbestandteilen oder Verunreinigungen mit THCA oder D₃-THCA in den entsprechenden MRM-Übergängen auftreten. Da Cannabiskonsumenten in den letzten Jahren immer häufiger auf synthetische Cannabinoide zurückgreifen, wurde zusätzlich eine Probe mit einem Mix aus 24 synthetischen Cannabinoiden aufdotiert und vermessen. Zwei der Serumproben wurden außerdem mit D₃-THCA aufdotiert und auf undeuterte Anteile des deuterierten Standards geprüft.

Ergebnis: Im ersten und zweiten Versuch fanden sich keinerlei Interferenzen durch Matrixbestandteile oder synthetische Cannabinoide. Der dritte Versuch ergab einen undeuterten Anteil in d₃-THCA von unter 1 %.

Analytische Grenzen

Die Nachweisgrenze wurde anhand von Signal-Rausch-Verhältnissen bestimmt, die an der Nachweisgrenze > 3 für den Quantifier und ersten Qualifier sein müssen. Zusätzliche Identifikationskriterien, die immer gelten, sind die richtige Retentionszeit und stimmige relative Ionenverhältnisse. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden Serumproben von sechs verschiedenen Probanden mit einer Konzentration von 0,1 ng/ml aufbereitet und analysiert.

Nach den Richtlinien der GTFCh ist die Bestimmungsgrenze die niedrigste Konzentration, für die sich nach fünfmaliger Messung nach separater Aufbereitung Werte mit einer ausreichenden Richtigkeit und Genauigkeit ermitteln lassen. Die relative Standardabweichung und der Bias dürfen einen Bereich von ± 20 % des Mittelwertes nicht überschreiten. Wiederum sechs verschiedene Seren wurden in einer Konzentration von 1,0 ng/ml hergestellt, mit der Proteinfällungsmethode aufbereitet und vermessen.

Ergebnis: Die Nachweisgrenze für THCA liegt bei 0,1 ng/ml, die Bestimmungsgrenze bei 1,0 ng/ml.

Linearität

Aus einem Pilotexperiment war bekannt, dass sich die Maximalkonzentrationen nach intravenöser Gabe von 5 mg THCA im Bereich von 1000 ng/ml bewegen und gegen Ende der Beobachtungsdauer von 96 Stunden auf annähernd Null absinken. Daher wurde zu Beginn ein Kalibrationsbereich von 0 bis 1000 ng/ml getestet, für den sich zwar im unteren Bereich eine Gerade, mit zunehmender Konzentration jedoch eine immer flacher verlaufende Kurve ergab (Überladung des Detektors). Daraufhin wurde ein kleinerer Kalibrationsbereich von 0 bis 100 ng/ml festgelegt und sechs Kalibrationsgeraden mit den Kalibratoren 1,0 – 5 – 10 – 50 und 100 ng/ml erstellt. Wie bereits unter 5.1.4 erwähnt, ist eine Kalibration ausreichend linear, wenn das Bestimmtheitsmaß $r^2 > 0,98$ (Regressionskoeffizient $r > 0,9899$) ist und alle mit der Kalibrationsgleichung zurückgerechneten Konzentrationen den Kalibratorsollwert um weniger als 15 % über- oder unterschreiten (20 % an der LOQ). Zusätzlich wurde das Kalibrationsmodell mit statistischen Tests auf seine Tauglichkeit überprüft (Grubbs-Test auf Ausreißer, F-Test und Cochran-Test zur Überprüfung der Varianzenhomogenität).

Ergebnis: Das Kalibrationsmodell muss gewichtet werden (Wichtungsfaktor $1/x$), um Varianzenhomogenität zu erreichen. Erst dann erhält man auch im niedrigen Bereich akzeptable Werte. Nach Wichtung erfüllten alle Rückrechnungen die oben genannten Kriterien und alle Regressionskoeffizienten waren $> 0,9996$. Im Grubbs-Test fanden sich keine Ausreißer (Signifikanzlevel 99 %) und der F-Test und der Cochran-Test zeigten Varianzenhomogenität (Signifikanzlevel 99 %).

Matrixeffekte

Die GTFCh-Richtlinien schlagen zur Bestimmung von Matrixeffekten und Extraktionsausbeuten die schon unter 5.1.4 beschriebene Methode nach Matuszewski et al. [102] vor. Dieses Verfahren ist auf Proben, die mit Proteinfällung aufbereitet werden, nicht adäquat übertragbar. Das liegt daran, dass die ausgefällte Serumproteinmenge und damit das Volumen des Überstands je nach Serum variabel sind, für die Herstellung der Set-2-Proben aber ein definiertes Volumen zum Aufdotieren benötigt wird. Anstatt dieses Volumen nun aufwändig zu bestimmen, bietet sich eine alternative Methode an, die von Bonfiglio et al. publiziert wurde [122]. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe, die während eines chromatographischen Laufs kontinuierlich THCA-Lösung über ein T-Stück hinter der Trennsäule („post-column“) infundiert, lassen sich in den Chromatogrammen von Nullseren ggf. Signaleinbrüche und -steigerungen sowie Schwankungen in den sensiblen Zeitabschnitten beobachten. Anhand dieser Signaländerungen lässt sich die Stärke des Matrixeffekts ablesen. Für dieses Experiment wurden sechs verschiedene Seren eingesetzt und die Signale zwischen 8,85 und 9,10 Minuten, dem relevanten Zeitraum, betrachtet. Die Verläufe mussten gleichmäßig sein und durften keine starken Schwankungen aufweisen.

Extraktionsausbeuten werden bei einer Proteinfällung nicht bestimmt, da es sich nicht um eine klassische Extraktion handelt und abgesehen von geringen Mengen des Analyten, die im Präzipitat eingeschlossen sind, nicht mit Verlusten zu rechnen ist.

Ergebnis: Wie in Abb. 23 erkennbar ist, sind die Signalverläufe bei allen Seren ähnlich und schwanken nur minimal. Es sind daher keine Beeinträchtigungen durch Matrixeffekte zu befürchten.

Richtigkeit und Präzision

Um Richtigkeit und Präzision zu bestimmen, wurden Serumpools bei drei verschiedenen Konzentrationen (2,5, 20 und 100 ng/ml) hergestellt. Diese wurden in Glasvials aliquotiert, zur Lagerung bei -20 °C tiefgefroren und Duplikate an acht verschiedenen Tagen gemessen. In der Realität traten auch Konzentrationen oberhalb des Kalibrationsbereichs auf. Um diese zu quantifizieren, wird die Originalprobe in der Regel verdünnt, mit Nullserum aufgefüllt, vermessen und der Wert hochgerechnet. Dass dieses Verfahren so anwendbar ist und korrekte Ergebnisse liefert, musste in der Validierung zusätzlich gezeigt werden. Dazu wurden jeweils Serumproben mit einer Konzentration von 1000 ng/ml hergestellt und davon 15 μl zur Analyse (entsprechend 75 ng/ml) eingesetzt. Wie für die anderen Qualitätskontrollen wurden Duplikate an acht Tagen gemessen.

Ergebnis: Die Richtigkeits- und Präzisionsdaten erfüllen alle vorgeschriebenen Kriterien. Relative Standardabweichungen und Bias liegen innerhalb des geforderten Intervalls von $\pm 15\%$ (bzw. 20 % an der LOQ) des Mittelwerts. Die genauen Ergebnisse waren wie folgt: für QC 2,5 ng/ml – RSD 6,5 und Bias 11,4; für QC 20 ng/ml – RSD 7,1 und Bias 2,4; für QC 100 ng/ml – RSD 8,4 und Bias 5,6, für QC 1000 ng/ml – RSD 7,7 und Bias 3,8.

Intensität, cps

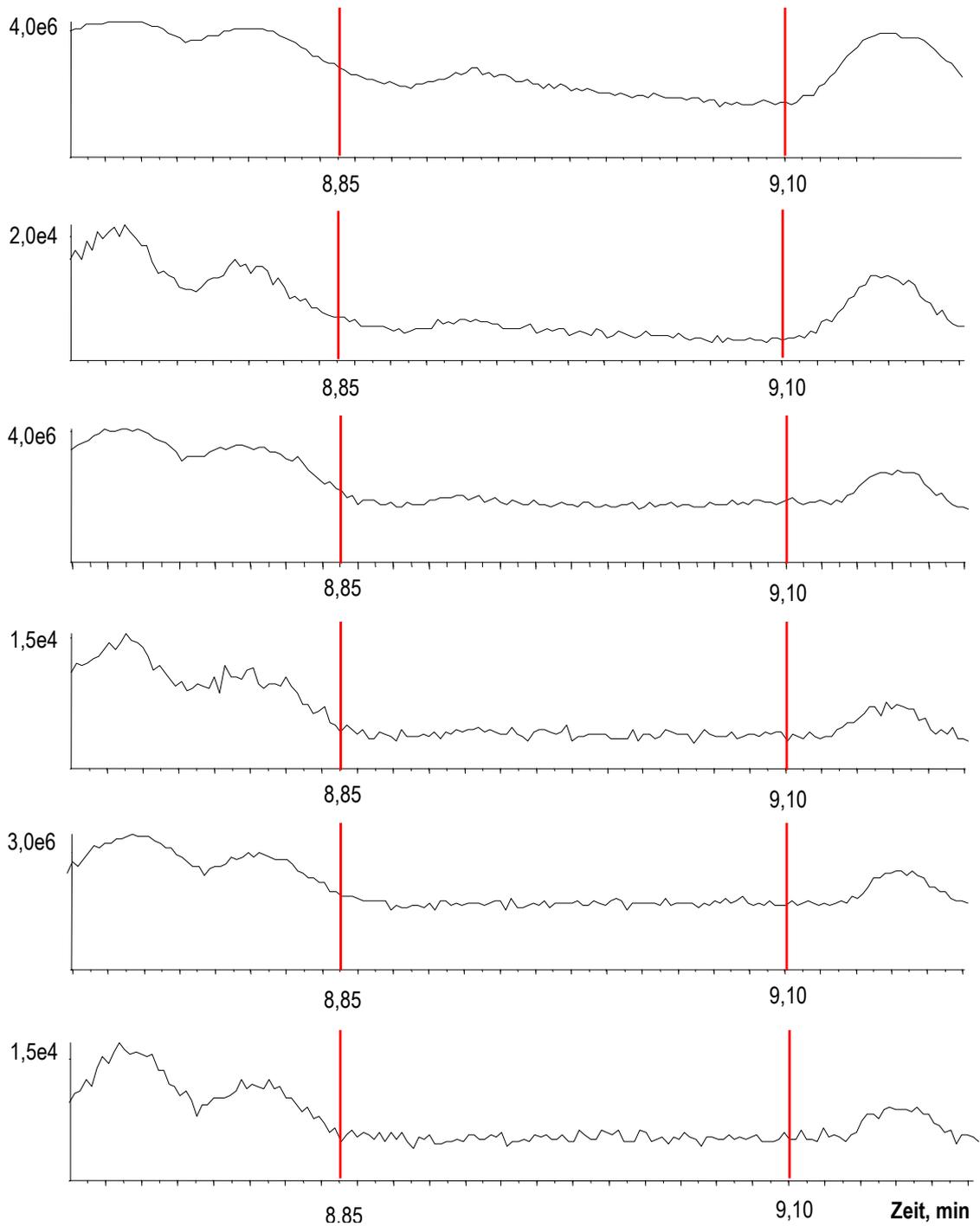


Abb. 23: Matrixeffekte in sechs verschiedenen Seren, bestimmt nach dem Prinzip von Bonfiglio et al. [122] ; die relevante Zeitspanne, in der D₃-THCA und THCA eluieren, reicht von 8,85 bis 9,10 Minuten. Es sind keine starken bzw. ungleichmäßigen Intensitätsschwankungen zu erkennen.

Stabilität

Die Autosamplerstabilität wurde bei zwei verschiedenen Konzentrationslevels getestet: 2,5 und 500 ng/ml. Je Level wurden sechs Proben aufbereitet, die fertigen Lösungen in mobiler Phase vereinigt, wieder aliquotiert und im Abstand von vier Stunden vermessen.

Langzeitstabilität und Einfrier-Auftau-Stabilität von THCA wurden bisher noch nicht getestet. Um die Einfrier-Auftau-Stabilität zu prüfen, wurden sechs verschiedene Seren in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 und 80 ng/ml) aufdotiert und drei Einfrier-Auftau-Zyklen unterworfen. Jeder Zyklus musste aus mindestens 20-stündigem Einfrieren und mindestens einstündigem Auftauen bestehen. Die Stabilitätsproben wurden schließlich gegen frisch aufdotierte Kontrollproben gemessen. Sie galten als stabil, wenn der Mittelwert der Stabilitätsproben innerhalb von $\pm 10\%$ und das 90 %-Konfidenzintervall der Stabilitätsproben innerhalb von 80 – 120 % des Mittelwerts der Kontrollen lag.

Für den Langzeitstabilitätstest wurden die Proben nach dem gleichen Schema hergestellt. Anstelle der drei Einfrier-Auftau-Zyklen trat eine Lagerung bei -20 °C für einen Monat. Danach wurden die Stabilitätsproben gegen frische Kontrollen verglichen. Es galten die gleichen Akzeptanzkriterien.

Ergebnis: Die aufbereiteten Proben sind mindestens 20 Stunden stabil, da sich keine negative Steigung der Regressionsgeraden nach Auftragen der Peakflächenverhältnisse gegen die Zeit zeigte. Tiefgefrorene Proben sind für mindestens einen Monat stabil, mehrmaliges Auftauen und Einfrieren haben keinen negativen Effekt.

5.4 Metabolismusstudien *in vitro*

Um zu untersuchen, welche CYP-Isoenzyme an den Hauptmetabolisierungsschritten der THCA beteiligt sind, wurden in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie Homburg/Saar *in vitro*-Experimente mit humanen Lebermikrosomen und einzelnen CYP-Isoenzymen durchgeführt. Die dazu verwendete THCA war eine Testcharge der Isolierung mittels Flash-Chromatographie (THC-Gehalt 0,2 %).

Mikrosomen sind Artefakte des endoplasmatischen Retikulums, die entstehen, wenn Zellen zerstört werden, und sich durch Zentrifugation leicht abtrennen und aufkonzentrieren lassen. Besonders die aus Leberzellen gewonnenen Mikrosomen enthalten eine große Menge an CYP 450-Isoenzymen und sind daher gut geeignet für den Einsatz zur Aufklärung des *in vitro*-Metabolismus einer Substanz. In der Forschung können damit Enzyminhibition, Clearance und Interaktionen abgeschätzt sowie Metabolite identifiziert werden. Humane Lebermikrosomen werden aus Spenderlebern gewonnen. Einzelne heterolog exprimierte CYP-Isoenzyme in Reinform sind ebenfalls kommerziell erhältlich.

5.4.1 Durchführung der Inkubationsexperimente

Dr. Markus Meyer (Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie Homburg/Saar) führte die Experimente durch und inkubierte 250 μM THCA mit gepoolten humanen Lebermikrosomen (50 mg Protein/ml) bzw. mit CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2B6, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1, CYP 3A4 oder CYP3A5 (75 pmol/ml) bei 37°C für 30 min. Neben den Enzymen und dem Substrat enthielt die Inkubationslösung 90 mM Phosphatpuffer pH 7,4, 5 mM, 5 mM Isocitrat, 1,2 mM NADP⁺, 0,5 U/ml Isocitratdehydrogenase und 200 U/ml Superoxiddismutase.

Der Phosphatpuffer dient zur Einstellung und Stabilisierung des pH-Wertes, die Superoxiddismutase fängt entstehende Radikale ab. Alle anderen Inhaltsstoffe der Lösung bilden ein NADPH-generierendes System. Unter Katalyse der Isocitratdehydrogenase mit Mg²⁺ im aktiven Zentrum entsteht aus Isocitrat α -Ketoglutarat und aus dem Cofaktor NADP⁺ bildet sich NADPH. Gemäß der Gebrauchsanweisung der Firma Gentest wurde bei der Inkubation mit CYP 2A6 und CYP 2C9 der Phosphatpuffer durch 45 mM bzw. 90 mM Tris-Puffer ersetzt. Ansonsten hätte die Phosphatkonzentration die Aktivität dieser beiden Enzyme zu stark inhibiert.

Die Metabolisierungsreaktionen starteten bei Zugabe der eiskalten Mikrosomen bzw. Enzyme und wurden durch Zugabe von 50 μl einer eiskalten Mischung aus Acetonitril und Ameisensäure (50/50, v/v) nach 30 min wieder gestoppt. Zum Schluss wurden die Proben bei 14000 g zentrifugiert und 50 μl des Überstandes (25 μl Inkubat und 25 μl Acetonitril) in Eppendorf-Cups nach Freiburg verschickt.

5.4.2 LC-MS/MS-Analytik der Inkubate

Für die Analyse wurden zu jeder Lösung 120 μl 0,1 %ige Ameisensäure hinzugefügt, um annähernd die Mischungsverhältnisse der mobilen Phase zu Beginn eines Laufs herzustellen (80 % A/20 % B). Die LC-MS/MS-Methode enthielt die MRM-Übergänge für THCA und alle bereits beschriebenen identifizierten Metabolite. Es kam der gleiche Gradient wie oben unter 5.3.1 beschrieben zum Einsatz, so dass die Retentionszeiten vergleichbar sind.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, neben dem MRM-Experiment auch Produktionenspektren (enhanced product ion spectrum: EPI) aufzunehmen – und zwar immer dann, wenn ein ausreichend hohes Signal auftritt. Ein sogenanntes IDA-Kriterium (IDA: information-dependent acquisition) legt die Schwelle fest, ab deren Überschreiten zusätzlich ein EPI gemessen wird. Für diesen Versuch wurde die zu überschreitende Peakintensität auf 5000 cps für zwei Übergänge festgelegt. Das ist eine vergleichsweise niedrige Schwelle für ein hochempfindliches Gerät wie das QTrap 4000, um sicherzustellen, dass auch von Substanzen in geringer Konzentration ein EPI aufgenommen wird.

Vermessen wurden:

- eine Leerprobe, die nur Leermikrosomen (d. h. Mikrosomen ohne CYP-Enzyme) und die Inkubationslösung enthielt
- die Inkubate von THCA mit zehn verschiedenen CYP-Isoenzymen
- ein Inkubat eines Ansatzes mit humanen Lebermikrosomen

5.4.3 Auswertung

Das erste Augenmerk richtete sich auf die Signale im Chromatogramm der Leerprobe. Insgesamt sechs relevante Signale traten auf, die demnach keinen THCA-Metaboliten entsprechen. Anhand der Retentionszeiten und der EPI-Spektren wurden diese Signale in den Chromatogrammen der echten Enzyminkubate identifiziert. Die verbleibenden Signale wurden mit den Produktionenspektren in der Dissertation von Julia Jung verglichen und so einem Metaboliten zugeordnet.

CYP-Enzyme katalysieren Phase-1-Reaktionen, insbesondere Hydroxylierungen. Mono- und dihydroxylierte Metaboliten waren deshalb in den Inkubaten zu erwarten, aber weder höher oxidierte Produkte wie THCA-8-on oder THCA-COOH noch Glucuronide, die erst durch Phase-2-Reaktionen entstehen. Diese Erwartungen wurden komplett erfüllt: Alle bereits identifizierten monohydroxylierten Metabolite fanden sich in mindestens zwei Ansätzen, ein bishydroxylierter Metabolit im CYP 3A4-Inkubat. Außerdem traten darin zwei weitere wahrscheinlich monohydroxylierte und bishydroxylierte Metabolite auf, die keiner genauen Struktur zugeordnet werden konnten.

Bei dem bishydroxylierten Metaboliten handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um an Position 8 und an der Pentylseitenkette hydroxylierte THCA, die im Weiteren mit „8,x-OH-THCA“ benannt wird, da die genaue Position der zweiten Hydroxylgruppe nicht bekannt ist. Die Hydroxylierung an Position 8 ist wahrscheinlich, da ein für 8 α - bzw. 8 β -OH-THCA typisches Fragment auftrat (m/z 173). Bezüglich der zweiten Hydroxylgruppe lässt sich nur sagen, dass Position 11 ausgeschlossen werden kann, da sich die Fragmente eindeutig von 8,11-Bis-OH-THCA unterscheiden.

Eine Auflistung der Ergebnisse nach CYP-Isoenzymen findet sich in Tab. 12. Wie dort erkennbar ist, zeigten insgesamt fünf von zehn Isoenzymen keine katalytische Aktivität.

Tab. 12: Gefundene Metabolite nach Inkubation von THCA mit zehn verschiedenen CYP-Isoenzymen bzw. humanen Lebermikrosomen

CYP 450-Isoenzym	identifizierte Metabolite mit Retentionszeiten
CYP 1A2	-
CYP 2A6	-
CYP 2B6	-
CYP 2C8	8 β -OH-THCA (6,85 min), 8 α -OH-THCA (7,31 min)
CYP 2C9	11-OH-THCA (7,06 min), 8 α -OH-THCA (7,31 min)
CYP 2C19	8 α -OH-THCA (7,31 min)
CYP 2D6	-
CYP 2E1	-
CYP 3A4	8,x-Bis-OH-THCA (4,95 min), 9,10-Bis-OH-HHCA (6,48 min), 8 β -OH-THCA (6,85 min), 11-OH-THCA (7,06 min), unbekannter Metabolit mit Molekülmasse 373 (8,09 min)
CYP 3A5	8 β -OH-THCA (6,85 min)
Humane Lebermikrosomen	8 β -OH-THCA (6,85 min), 8 α -OH-THCA (7,31 min), unbekannter Metabolit mit Molekülmasse 373 (8,09 min)

Im Folgenden sind die Totalionenchromatogramme der MRM-Experimente für die fünf CYP-Isoenzyme dargestellt (Abb. 24), in deren Ansätzen sich Metabolite fanden, und im Anschluss daran die Produktionenspektren der aufgetretenen Metabolite (Abb. 25). Die sechs Substanzen, die sich bereits in der Leerprobe fanden, sind in den Chromatogrammen mit A – F bezeichnet. Die sechs Metabolite, die identifiziert werden konnten, sind in den Abbildungen mit 1 – 6 beziffert. Einige von ihnen konnten in mehreren Ansätzen identifiziert werden. Für die Abbildung des Produktionenspektrums wurde jeweils der Ansatz gewählt, in dem sich die größte Menge des jeweiligen Metaboliten fand.

Die Inkubation von CYP-Isoenzymen mit einer Testsubstanz verfolgte zwar in erster Linie einen qualitativen Ansatz, doch ließen sich auch Tendenzen bezüglich des Ausmaßes der Metabolisierungsreaktionen erkennen. Anhand der Chromatogramme erkennt man deutlich, welche Isoenzyme extensiv und welche gering metabolisierten. In allen Ansätzen war ein Signal bei etwa 8,9 min zu sehen, das zu nicht umgesetzter THCA gehört. Dieses Signal konnte intensiv und erheblich größer als die Metabolitensignale (bei CYP 2C8, 2C19 und 3A5) oder im Vergleich zu diesen sehr viel kleiner sein (bei CYP 2C9 und 3A4).

Wie bereits im Vorfeld vermutet, sind die hauptsächlich am Metabolismus beteiligten Enzyme CYP 2C9 und CYP 3A4, während CYP 2C8, 2C19 und 3A5 nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die beiden erstgenannten Enzyme sind auch die Hauptakteure beim Phase-1-Metabolismus von THC (siehe Kapitel 2.5.3). CYP 2C9 katalysiert vor allem den Abbau zu 11-OH-THCA, die den größten Peak im Chromatogramm liefert und sich in dem Pilotversuch [77] mit 50 mg THCA als Hauptmetabolit im Serum herausstellte. Die Analogie zum THC-Metabolismus liegt auf der Hand, denn die Hydroxylierung an Position 11 zu 11-OH-THC, einem der oxidativen Hauptmetaboliten von THC, wird ebenfalls von CYP 2C9 katalysiert. Der zweite Metabolit, der in relevantem Ausmaß auftrat, war 8 β -OH-THCA.

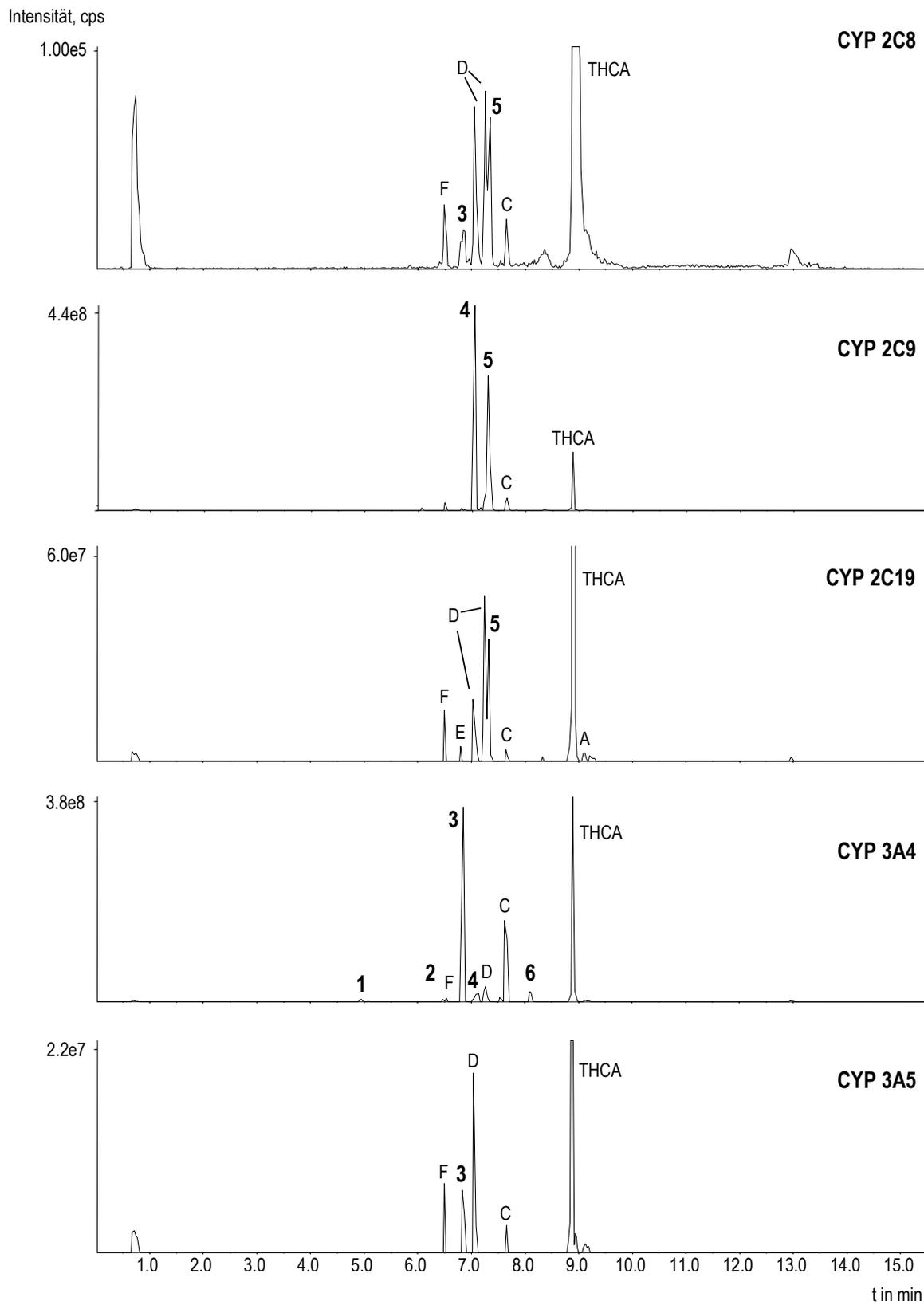


Abb. 24: Totalionenchromatogramme der Ansätze für die fünf CYP-Isoenzyme 2C8, 2C9, 2C19, 3A4 und 3A5: Mit A – F sind Substanzen bezeichnet, die schon in der Leerprobe detektiert wurden, die Bezifferungen 1 – 6 entsprechen den in Abb. 25 gezeigten Metaboliten.

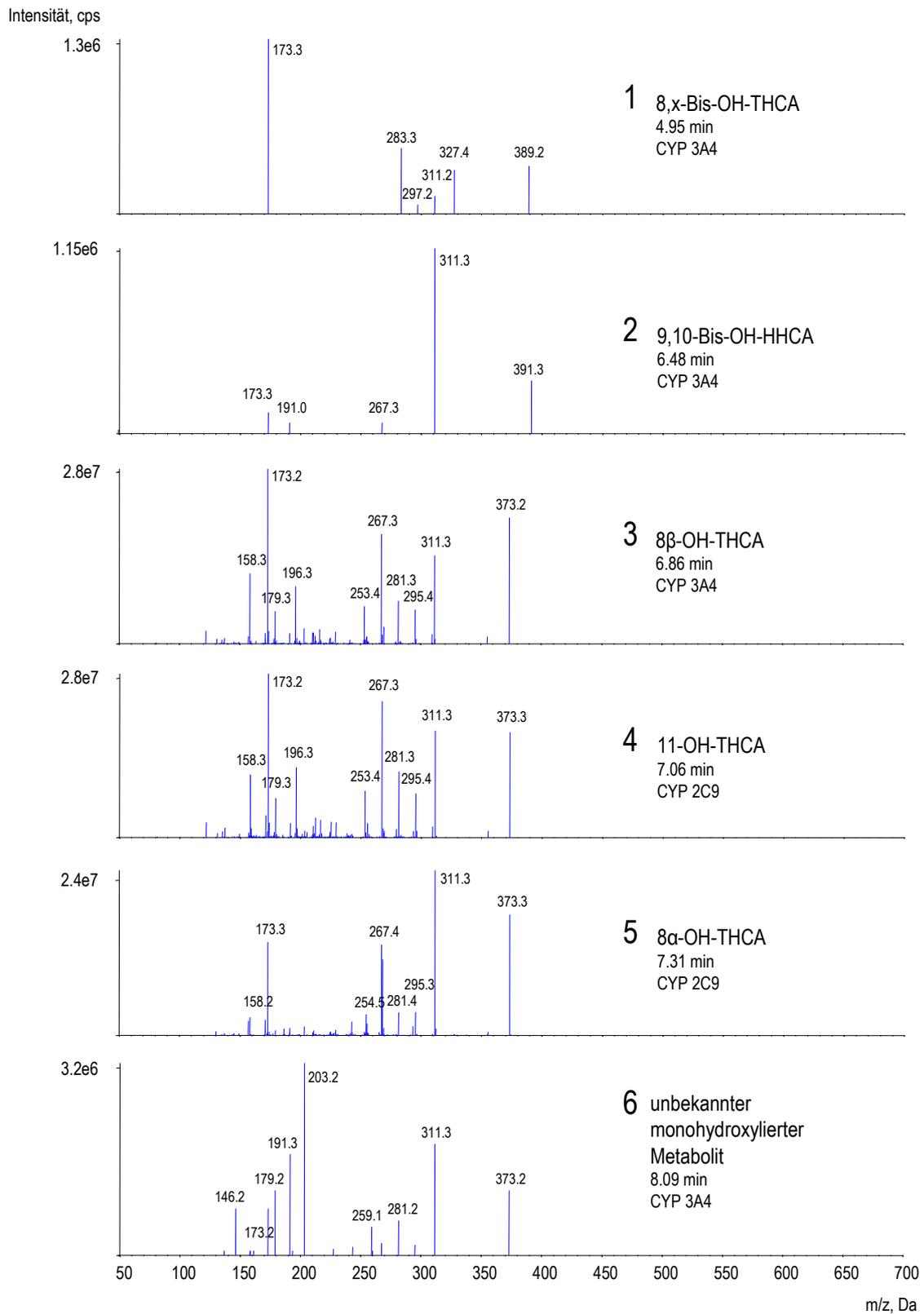


Abb. 25: Produktionenspektren (EPI) der in den Inkubationsversuchen gefundenen Metaboliten, geordnet nach Retentionszeiten und unter Angabe des CYP-Isoenzym-Ansatzes, der dafür vermessen wurde.

CYP3A4 sorgte schließlich für eine größere Bandbreite an Hydroxymetaboliten. Das mit Abstand intensivste Signal in diesem Ansatz wurde von 8α -OH-THCA hervorgerufen, gefolgt von 11-OH-THCA. In geringerem Ausmaß entstanden die zweifach hydroxylierten Metabolite 9,10-Bis-OH-HHCA und 8,x-Bis-OH-THCA. Im Ansatz mit CYP 3A4 tauchte außerdem eine weitere Substanz auf, die in der Leerprobe nicht vorkam und eine Molekülmasse von 373 amu besitzt (Nummer 6 in Abb. 25). Im Produktionspektrum fanden sich neben den typischen Fragmenten der anderen monohydroxylierten Metabolite, die die gleiche Molekülmasse haben, zwei weitere intensive Signale: eines bei 203,2 amu und eines bei 191,3 amu. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelte es sich um einen weiteren, an einer anderen Position einfach hydroxylierten Metaboliten, dessen Struktur im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden konnte. Eine exakte Struktur ließe sich z. B. über Magnetresonanzspektroskopie ermitteln, für die eine ausreichend große Substanzmenge isoliert werden müsste.

Interessant ist, dass sich im Ansatz der humanen Lebermikrosomen zwar 8α -OH-THCA und 8β -OH-THCA aber keine 11-OH-THCA fanden, obwohl diese sowohl von CYP 2C9 als auch von CYP 3A4 in den Einzelansätzen produziert wurde. Dies kann an der unterschiedlichen Enzymdichte der Medien liegen, die in den heterolog exprimierten Mikrosomen höher ist.

Interessant ist weiterhin, dass CYP 2D6 für die Metabolisierung von THCA offensichtlich überhaupt keine Rolle spielte. CYP 2D6 ist das Isoenzym, das unter allen CYP-Isoenzymen die ausgeprägteste Variabilität der Phänotypen zeigt. Vier grundsätzliche Phänotypen, die bei der mitteleuropäischen weißen Bevölkerung alle in relevanten Ausmaßen auftreten, werden unterschieden: der „poor metabolizer“ mit keiner oder sehr geringer, der „intermediate metabolizer“ mit eingeschränkter, der „extensive metabolizer“ mit normaler und der „ultra rapid metabolizer“ mit stark gesteigerter Enzymaktivität. Die Prävalenzen für die verschiedenen Typen liegen – in der oben genannten Reihenfolge - bei 7 %, 40 %, 50 % und 3 % [123, 124]. Da CYP 2D6 bei den in-vitro-Versuchen keine Metabolisierungsaktivität für THCA zeigte, waren extrem schwankende Clearances in Abhängigkeit vom Phänotyp in der Humanstudie kaum zu erwarten.

5.5 Herstellung der Darreichungsformen für die Humanstudie

Für die Humanstudie wurden sowohl Kapseln à 10 mg THCA als auch eine intravenös applizierbare Form à 5 mg THCA benötigt. Besonders für die Arzneiform zur Injektion galten hohe Anforderungskriterien. Ausgangsmaterial für beide Arzneiformen war die isolierte THCA, die mit der in 5.2.3 beschriebenen Methode mit Normalphase gewonnen wurde. Die Reinheitsprüfung des Endprodukts hatte eine Reinheit von 99,8 % und einen THC-Gehalt von 0,067 % ergeben.

5.5.1 Herstellung der THCA-Kapseln

Wie bereits in 2.5.1 erwähnt, verbessert ein lipophiles Vehikel wie Sesamöl die orale Bioverfügbarkeit von THC. Es ist davon auszugehen, dass Gleiches auch für THCA gilt, so dass als Grundlage und Lösungsmittel Sesamöl gewählt wurde. Die Sesamölmenge (Dichte 0,92 g/ml) orientierte sich am Abfüllvolumen für eine Hartgelatine kapsel der Größe 0 (Gesamtvolumen 500 µl) und sollte zwischen 300 und 400 µl liegen. Da die Dosierung über die Einwaage genauer ist, weil keine eventuell auftretenden Volumeneffekte berücksichtigt werden müssen, wurden alle Mengen abgewogen.

Die Mengen wurden für die Herstellung von 17 Kapseln berechnet.

Sollgehalt: 10 mg reine THCA

Einwaage pro Kapsel: 10,02 mg isolierte THCA (Reinheit 99,8 %)

Einwaage für 17 Kapseln: 170,34 mg isolierte THCA

Unter der Voraussetzung, dass später 300 mg Öl-THCA-Gemisch eingewogen werden sollten, wurden pro Kapsel 289,98 mg Sesamöl, entsprechend 4929,9 mg Sesamöl für 17 Kapseln, benötigt. THCA löste sich nach Rühren gut im Sesamöl. Als Leerkapseln wurden magensaftlösliche Hartgelatine kapseln (Capsulae Operculates Nr. 1, Pharmapol, Dägeling, Deutschland) verwendet. Die Kapseln wurden einen Tag vor Studienbeginn hergestellt und bis zur Applikation im Kühlschrank aufbewahrt.

5.5.2 Herstellung und Prüfung der THCA-Emulsion zur Injektion

Da sie direkt in den Körperkreislauf injiziert werden, müssen Zubereitungen zur intravenösen Injektion hohe Qualitätsstandards und nach Arzneibuch bestimmte Kriterien erfüllen. Sie müssen steril sein, pyrogenfrei, stabil während der Lagerung und sollen eine gute Verträglichkeit aufweisen. Voraussetzung für letzteres sind eine Isotonisierung (290 mOsmol), ein annähernd physiologischer pH-Wert (Isohydrie) und die Abwesenheit von partikulären Verunreinigungen [125].

THCA ist eine thermolabile Substanz und daher prinzipiell ungeeignet für eine Autoklavierung. Die einzige Möglichkeit, die isolierte THCA von Keimen zu befreien, war daher die Sterilfiltration. THCA ist außerdem sehr lipophil, im wässrigen Medium schwerlöslich und somit nicht in Form einer relativ einfach herzustellenden wässrigen Lösung applizierbar. Theoretisch möglich gewesen wäre die Injektion einer ethanolischen THCA-Lösung, die den Probanden aber nicht zugemutet werden sollte, da Irritationen an der Einstichstelle auftreten können. Eine geeignete Alternative war die Verwendung einer O/W-Fettemulsion als Basis, da sich in deren Fetttropfchen lipophile Substanzen wie THCA gut lösen können.

Die Wahl fiel auf ClinOleic® 20 %, eine industriell hergestellte Fettemulsion zur parenteralen Ernährung, als Grundlage für die spätere Zubereitung. Damit war gewährleistet, dass prinzipiell die Anforderungen

hinsichtlich Isotonie, Isohydrie und Sterilität erfüllt sind. ClinOleic enthält Olivenöl und Sojaöl im Mischungsverhältnis 80:20, den Emulgator Eilecithin und den Co-Emulgator Natriumoleat, Glycerol zur Isotonisierung, Natriumhydroxid zur pH-Wert-Einstellung und Wasser für Injektionszwecke als äußere Phase. Im Vorfeld stellten sich nun noch folgende Fragen: Gelangt die THCA durch einfache Mischung in die Fetttropfchen? Ist die Emulsion bei erfolgreicher Einlagerung weiterhin stabil und bleiben die Partikel klein?

Die Herstellungsvorschrift der schließlich für die Humanstudie verwendeten Emulsion wurde in Zusammenarbeit mit der Apotheke des Uniklinikums Freiburg erarbeitet. Herr Dr. Sutter, Leiter des Sterillabors des Uniklinikums Freiburg, stellte die Emulsionen nach folgendem Schema her:

- Lösen von 5 mg THCA in 750 µl sterilfiltriertem Ethanol (70%).
- erneute Sterilfiltration dieser Lösung durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße, um vorhandene Keime aus der isolierten THCA zu entfernen
- Mischen der sterilen ethanolischen THCA-Lösung mit 4,25 ml ClinOleic® (die fertige THCA-haltige Fettemulsion lässt sich durch den Sterilfilter nicht mehr filtrieren, da die Fetttropfchen bereits zu groß sind)
- Durchführung aller Herstellungsschritte mit sterilisierten Geräten unter Laminar Air Flow im Sterillabor

Tests

Die fertige Emulsion wurde am Tag der Herstellung und nach vier bzw. elf Tagen Lagerung im Kühlschrank folgenden drei Tests unterzogen:

1. Messung der Partikelgröße

Emulsionen sind thermodynamisch instabil. Abhängig von der Tröpfchengröße der inneren Phase kann eine Grenzfläche von mehreren Quadratmetern pro Milliliter entstehen, aus der eine sehr hohe Grenzflächenenergie resultiert. Um zu verhindern, dass die emulgierten Tröpfchen koagulieren, müssen grenzflächenaktive Stoffe (Emulgatoren) zugesetzt werden.

Bei intravenöser Applikation sollte die Partikelgröße der Emulsionströpfchen generell unter 1 µm Durchmesser liegen. Bei Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung liegt meist eine enge Teilchengrößenverteilung mit mittleren Partikelgrößen von 200 bis 500 nm vor. Mikropartikel, die die Größe der Erythrozyten (ca. 7,5 µm) überschreiten, werden für pulmonale Embolien verantwortlich gemacht und sind deshalb zu vermeiden. Fettartige, flexibel formbare Partikel, selbst wenn sie etwas größer sind als 7,5 µm, können die dünnen Kapillargefäße aber noch passieren. Einige wenige Partikel in dieser Größe sind deshalb zulässig.

Die Partikelgröße wurde mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) bestimmt. Bei der PCS werden Laserlichtstrahlen in eine Dispersion von Partikeln gesendet und das von den Partikeln erzeugte Streulicht mit einem Photomultiplier detektiert. Durch die ungeordnete Bewegung der Partikel (Brown'sche Molekularbewegung) schwanken die Streulichtintensitäten und zwar in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Aus den unterschiedlichen Schwankungen berechnet sich die Partikelgeschwindigkeit, daraus wiederum die Partikelgröße.

Voraussetzung für eine korrekte Messung ist, dass nur die Brown'sche Molekularbewegung für die ungeordnete Bewegung der Partikel sorgt und nicht etwa Konvektionsströmungen aufgrund mangelnder Temperaturkonstanz. Die verwendeten Messzellen müssen absolut staubfrei, die verwendeten Lösemittel mindestens einmal, besser mehrmals filtriert sein. Zusätzlich zur Partikelgröße wird noch ein sogenannter Polydispersitätsindex (PDI) ermittelt, der bei einer angestrebten engen Verteilung zwischen 0,100 und 0,200 liegen sollte. Für die Messung muss die Dispersion ausreichend verdünnt sein, damit ein Lichtstrahl nicht an mehreren Teilchen gestreut wird. 5 µl der THCA-Emulsionen wurden deshalb auf 1000 µl Wasser gegeben. Messgerät war ein Zetasizer Version 6.01 von Malvern Instruments (Malvern, UK).

Für die letzte Testcharge ergaben sich mittlere Partikelgrößen von 299 nm (PDI 0,118) am Tag der Herstellung und von 298 nm (PDI 0,102) nach elf Tagen. Die für die Humanstudie bestimmte Charge wurde am Tag vor der Gabe getestet und hatte eine mittlere Partikelgröße von 272 nm (PDI 0,123). Weder in der Test- noch der Humanstudiencharge fand sich eine zweite Partikelpopulation mit größeren Durchmessern.

2. Bestimmung des Zeta-Potentials

Das Zeta-Potential ist das Potential zwischen der Schergrenze und der Grenzfläche der dispergierten Phase. Dieses Potential ist entscheidend für die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln. Der Betrag des Zeta-Potentials gibt Auskunft darüber, wie gut die Emulsion elektrostatisch stabilisiert wird. Je größer das Zeta-Potential ist, desto eher stoßen sich diffundierende Teilchen gleicher Ladung, die sich aufeinander zu bewegen, wieder ab, so dass Koaleszenz vermieden wird.

Der Malvern Zetasizer 6.01 misst das Zeta-Potential mit Hilfe der Laser-Doppler-Elektrophorese: Dafür wird die zu messende Emulsion einem elektrischen Feld ausgesetzt und mit einem Laserstrahl bestimmter Frequenz bestrahlt. Alle Partikel in der Emulsion mit einem Zeta-Potential bewegen sich daraufhin zur gegensätzlich geladenen Elektrode und zwar mit einer Migrationsgeschwindigkeit, die proportional zum Zeta-Potential ist. Trifft der Laserstrahl auf ein sich bewegendes Teilchen, ändern sich seine Frequenz und sein Ausstrahlwinkel. Die Differenz der Eingangs- und Ausgangsfrequenz wird Doppler-Frequenz genannt. Aus ihr und dem Streuwinkel lassen sich die Partikelgeschwindigkeit und schließlich das Zeta-Potential errechnen [126].

Ab einem Zeta-Potential von ± 30 mV kann man von ausreichend starken Abstoßungskräften und einer stabilen Emulsion ausgehen. Für die letzte Testcharge ergab sich ein Zeta-Potential von -52,9 mV am Tag der Herstellung und von -53,4 mV nach elf Tagen. Die für die Humanstudie hergestellte Charge hatte am Tag vor der Applikation ein Zeta-Potential von -41,6 mV.

3. Stabilitätstest

Neben einer möglichen Instabilität der Emulsion wäre auch ein Abbau von THCA kritisch gewesen. Über einen Zeitraum von vier Tagen – länger sollte die fertige Emulsion nicht im Kühlschrank lagern – wurde deshalb der Gehalt von THCA und dem primär zu erwartenden Abbauprodukt THC bestimmt. Die HPLC-DAD-Methode für die Reinheitsprüfung der isolierten THCA, die in Kapitel 5.2.5 beschrieben ist, war dafür gut geeignet. Auch wenn die in der Emulsion vorhandenen Öle und die weiteren Hilfsstoffe keine UV-Absorption zeigen und die Analytflächen nicht beeinflussen sollten, war es günstiger, die chromatographische Säule nicht mit diesen Matrixbestandteilen zu belasten. Die Proben wurden deshalb mit dem Festphasenextraktionsverfahren für die Routine-THC-Analytik

aufbereitet.

Die Menge an eingesetzter Emulsion orientierte sich an den Beladungsmengen bei der Reinheitsprüfung. Im Fall des 100 µg/ml-Kalibrators gelangten dort bei einem Injektionsvolumen von 10 µl 1000 ng THCA und 500 ng 11-OH-THC als interner Standard auf die Säule. Um exakt die gleiche THCA-Menge zu erreichen, wären 20 µl der Emulsion (0,5 mg/ml) notwendig gewesen. Für die Aufbereitung wurden schließlich 25 µl Emulsion verwendet, da sich die Pipettiergenauigkeit mit steigendem Volumen verbessert. Dementsprechend wurden folgende Volumina zur Probenvorbereitung für die Festphasenextraktion verwendet:

25 µl THCA-Emulsion

+ 25 µl 0,1 M Essigsäure, um die Pipettenspitze zu spülen und Emulsionsreste in das Probenglas zu überführen

+ 50 µl 11-OH-THC (100 µg/ml)

+ 2,9 ml 0,1 M Essigsäure

Die Festphasenextraktion lief in Ahnlehnung an die Methode der THC-Routineanalytik mit C₁₈-Kartuschen (Chromabond C₁₈, 500 mg, Macherey-Nagel, Düren) nach folgendem Schema ab:

Konditionierung der Säulen	2 ml Methanol	2 ml/min
	2 ml 0,1 M Essigsäure	2 ml/min
Beladen der Säulen	3 ml Probenvolumen	1 ml/min
Waschen	1 ml 0,1 M Essigsäure	1 ml/min
	1 ml Acetonitril 40 %	1 ml/min
Trocknen	Stickstoff	1 min
Eluieren	1,5 ml Acetonitril	1 ml/min

Nach der Elution mit Acetonitril wurde das Eluat eingedampft und in 100 µl mobiler Phase für die HPLC-Analytik aufgenommen.

Die Ergebnisse der Vierfachbestimmung an vier aufeinander folgenden Tagen sind in Tab. 13 zusammengefasst. Zwei Werte mussten eliminiert werden, da die Gläschen zu lange auf dem Abdampfblock standen und dadurch erhebliche Verluste an THCA aufgetreten waren. Wie an den Mittelwerten der Peakflächenverhältnisse von THCA zum internen Standard ersichtlich ist, kam es nicht zu einem Abbau von THCA über die vier Tage Lagerungszeit. Weiterhin konnte keine Bildung von THC beobachtet werden.

Tab. 13: Gehaltsbestimmung von THCA in den Emulsionen zur intravenösen Applikation über vier Tage, * eliminierte Werte, interner Standard 11-OH-THC

Tag nach der Herstellung	Fläche 11-OH-THC bei 209 nm	Fläche THCA bei 220 nm	Area ratio THCA/11-OH-THC	Mittelwert
0	5022550	15337564	3.05	2,91
	5109280	14147611	2.77	
	4101864	(8588548)	*	
	4858944	14181323	2.92	
1	4674517	15443647	3.30	3,19
	4596240	12188229	2.65	
	3641289	(8288050)	*	
	3652391	13180436	3.61	
2	3618573	12552758	3.47	3,36
	3809572	12745606	3.35	
	3640995	11804099	3.24	
	3071870	10359075	3.37	
3	3416687	11747601	3.44	3,31
	3819767	11281348	2.95	
	4195909	14383724	3.43	
	3588433	12295916	3.43	

6 Die Humanstudie: Durchführung, Ergebnisse und Diskussion

Ziel der Humanstudie war die Aufklärung der Pharmakokinetik und des Metabolismus von THCA im Menschen. Ausgehend vom Pilotversuch mit einem Probanden sollte untersucht werden, wie variabel sich die Metabolisierung in einem größeren Probandenkollektiv darstellt. Die Eliminationskinetik und das Metabolitenspektrum im Serum sowie das Ausscheidungsprofil im Urin waren dabei von besonderem Interesse.

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki über die Durchführung wissenschaftlicher Versuche mit Menschen durchgeführt. Die Ethikkommission der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (Erstvotum vom 28.06.2007, Bewilligung der Änderungsanträge zur intravenösen Applikation und zur Genotypisierung am 03.11.2008 bzw. 20.01.2011) und das Regierungspräsidium Freiburg, Referat 25, stimmten der Studie zu. Die Probanden nahmen an der Studie freiwillig teil und konnten ihre Teilnahme jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile abbrechen. Vor Studienbeginn wurden sie schriftlich und mündlich über Inhalt und Tragweite, insbesondere über Risiken, aufgeklärt und erst nach Erklärung ihres Einverständnisses als Probanden zugelassen.

Die Studie fand vom 30. April bis 19. Mai 2011 am Institut für Rechtsmedizin unter der Leitung von Dr. Volker Auwärter und den verantwortlichen Studienärzten Prof. Stefan Pollak und Dr. Annette Thierauf statt. Aus Sicherheitsgründen erhielten die Probanden die THCA zuerst oral, da eine eventuell auftretende allergische Reaktion bei dieser Applikationsart weniger dramatische Folgen gehabt hätte als bei der intravenösen Gabe. Schließlich erhielten sie am zweiten Studienwochenende die THCA als intravenöse Injektion. Nach der oralen und vor der intravenösen Gabe wurden alle Probanden mit Hilfe der entwickelten Cocktailmethode phänotypisiert.

6.1 Probanden

Für die Teilnahme an der Studie mussten die Probanden gemäß Studienprotokoll folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Alter: 18 bis 60 Jahre
- Body-Mass-Index: 18 bis 30
- Cannabisabstinenz
- Alkoholabstinenz während der ersten zwei Tage nach oraler bzw. intravenöser Applikation
- Coffeinabstinenz in einem Zeitraum von mindestens 72 Stunden vor der Applikation von Coffein im Rahmen der Phänotypisierungsstudie

Wenn folgende Ausschlusskriterien zutrafen, durften die Probanden an der Studie nicht teilnehmen:

- Cannabiskonsum innerhalb der letzten drei Monate (Ausnahme, wenn keine Cannabinoide in den Nullproben mehr nachweisbar waren)
- bekannte Überempfindlichkeit gegen Cannabinoide, Coffein, Tolbutamid, Omeprazol, Dextromethorphan oder Midazolam
- Infektionskrankheiten
- Stoffwechselerkrankungen
- Autoimmunerkrankungen
- Atemwegserkrankungen

- HNO-Erkrankungen
- Herz-Kreislauf-Erkrankungen
- Magen-Darm-Erkrankungen
- Leber- oder Nierenfunktionsstörungen
- Psychiatrische oder neurologische Erkrankungen
- Krebserkrankungen
- Medikation an den Studientagen (Ausnahme: Hormonelle Kontrazeptiva)
- Schwangerschaft/Stillzeit

Kriterien, die zum Abbruch bei einzelnen Probanden bzw. der gesamten Studie geführt hätten, waren:

- Individuelle Unverträglichkeit von THCA
- Cannabiskonsum
- Alkoholkonsum
- Schwangerschaft
- Notwendigkeit einer medikamentösen oder nicht-medikamentösen Therapie
- unvorhergesehene schwere Nebenwirkungen

Sechzehn Probanden, zehn Frauen und sechs Männer, nahmen schließlich an der Studie teil und schlossen sie ab. Der Altersdurchschnitt betrug 28,1 Jahre, die mittlere Größe lag bei 1,70 m, das mittlere Gewicht bei 67,6 kg und der mittlere Body-Mass-Index bei 23,2. Die genauen biometrischen Daten aller Probanden sind in Tab. 14 aufgelistet.

Tab. 14: Übersicht über Geschlecht, Alter, Größe, Gewicht und BMI der 16 Probanden, MW = Mittelwert

Proband	Geschlecht	Alter (Jahre)	Größe (m)	Gewicht (kg)	BMI
A	W	19	1,72	75	25,4
B	M	28	1,84	90	26,6
C	W	29	1,68	62	22,0
D	W	25	1,56	52	21,4
E	W	25	1,77	68	21,7
F	M	29	1,72	72	24,3
G	W	27	1,68	55	19,5
H	W	30	1,56	56	23,0
I	W	27	1,70	65	22,5
J	W	28	1,78	76	24,0
K	M	20	1,75	63	20,7
L	W	21	1,60	63	24,6
M	M	27	1,77	87	27,8
N	W	28	1,66	53	19,2
O	M	41	1,72	72	24,3
P	M	46	1,74	73	24,1
MW		28,1	1,70	67,6	23,2

6.2 Studienprotokoll

Die Studie unterteilte sich in zwei Studienabschnitte, den oralen und den intravenösen Teil. Dazwischen fand die Phänotypisierung statt. Alle Probanden erhielten vor Studienbeginn einen genauen Terminplan mit den dazugehörigen Abstinenzregeln.

Humanstudie – 1. Teil – orale Applikation (30. April/1. Mai 2011)

Aus logistischen Gründen wurden die Probanden auf die zwei Wochenendtage aufgeteilt. Jeweils acht Probanden erhielten am Samstag die THCA-Kapsel, die anderen am Sonntag. So war für genug Helfer für die am Anfang häufigen Blutabnahmen und Puffer bei eventuell auftretenden Schwierigkeiten gesorgt.

Zu Beginn erhielten alle Probanden einen Venenverweilkatheter und gaben eine Nullblutprobe sowie eine Nullurinprobe ab. Beide Proben wurden später auf Anwesenheit von THC, seiner Abbauprodukte und THCA geprüft. Die Probanden mussten nüchtern erscheinen und sollten dies in Bezug auf Alkohol auch für die ersten zwei Tage nach Applikation bleiben, um die volle Kapazität der Leberenzyme zu gewährleisten. Nach oraler Einnahme der Kapsel mit 10 mg THCA durften sie nach 10 Minuten eine Butterbrezel und nach einer halben Stunde ein „Standardfrühstücksbrötchen“ essen. Auf diese Weise sollte ein annähernd vergleichbare Bedingungen für die Resorption und eine lipophile Resorptionsgrundlage geschaffen werden.

Blutproben wurden in Serummonovetten von Sarstedt ohne Gerinnungshemmer nach 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten sowie nach 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96 Stunden entnommen. Traten dabei Probleme auf, z. B. wegen eines verstopften Katheters, und verspätete sich deshalb die Abnahme, wurde die genaue Zeit auf dem Röhrchen notiert. Die Blutproben wurden noch am gleichen Tag abgesetzt und bei -20 °C tiefgefroren.

Urinproben wurden nicht nach einem festen Zeitschema abgegeben und nicht in Gänze gesammelt, da der Fokus der Urinanalytik auf der Identifizierung der möglichen Metabolite lag. Eine Quantifizierung und die Ermittlung pharmakokinetischer Daten war mangels Referenzstandards ohnehin nicht möglich.

Humanstudie – 2. Teil – intravenöse Applikation (14./15. Mai 2011)

Wie schon im ersten Studienabschnitt wurden die Probanden auf zwei Tage aufgeteilt, erhielten einen Venenverweilkatheter und gaben Nullblut- und Nullurinproben ab. Um den anfänglichen schnellen Abfall der THCA-Konzentration nach der Gabe gut zu erfassen, wurden in diesem Studienabschnitt drei weitere Blutproben abgenommen, und zwar zusätzlich nach 5, 10 und 20 Minuten. Für eventuelle Zwischenfälle nach der Injektion, z. B. aufgrund von Unverträglichkeiten oder Allergien, stand ein Notfallkoffer zur Verfügung.

Nach Abschluss der Vorbereitungen wurde den Probanden die THCA-Emulsion von der Studienärztin injiziert. Um Verfälschungen der Blutproben zu vermeiden, injizierte sie die Lösung nicht über den Katheter, sondern über einen venösen Zugang (Butterfly) am anderen Arm. Der kurze Schlauch wurde nach der Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um noch vorhandene Emulsionsreste komplett in den Körper zu transferieren. Die 16 Injektionsspritzen wurden ein bzw. zwei Tage vor der Applikation hergestellt. Nach Messung von Partikelgröße und Zeta-Potential, die den Anforderungen entsprechende Ergebnisse lieferten, lagerten die Spritzen bis zur Injektion bei 4 °C.

Blutproben wurden wie im ersten Studienabschnitt in Serummonovetten von Sarstedt ohne Gerinnungshemmer entnommen, dieses Mal nach 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 und 90 Minuten sowie nach 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96 Stunden. Alle Abläufe und Vorschriften bezüglich Blutprobenentnahme und Sammeln der Urinproben wurden analog zum ersten Teil durchgeführt.

Phänotypisierung und Genotypisierung (11./12. Mai 2011)

Zwischen den beiden Studienabschnitten wurde der Phänotypisierungsversuch durchgeführt. Dazu mussten die Probanden mindestens drei Tage vorher auf Coffein verzichten. Wie bereits in Kapitel 5.1 beschrieben, erhielten sie einen Substanzcocktail aus Coffein, Tolbutamid, Omeprazol, Dextromethorphan und Midazolam zur Phänotypisierung von CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6 und CYP 3A4. Die verwendeten Fertigarzneimittel sind nachfolgend aufgeführt. Zusätzlich zur regulären Nullblutprobe, die vor allem zur Überprüfung der Coffeinabstinenz diente, wurde auch ein 2-ml-EDTA-Röhrchen Blut für die Genotypisierung abgenommen. Auch an diesem Tag mussten die Probanden nüchtern erscheinen, da die Omeprazolkapsel auf nüchternen Magen genommen werden musste. Eine halbe Stunde nach Einnahme des Cocktails erhielten alle Probanden ein Standardfrühstück. Zwei weitere Blutproben, eine nach 4 und die zweite nach 24 Stunden, wurden für diesen Versuch abgenommen.

Verwendete Fertigarzneimittel zur Herstellung des Cocktails

Coffeinum N 0,2 g	200 mg Coffein/Tablette	Mylan dura, Darmstadt, Deutschland
Diabetol	500 mg Tolbutamid/Tablette	Polpharma, Starogard, Polen
Hustenstiller-ratiopharm	30 mg Dextromethorphan/Kapsel	ratiopharm, Ulm, Deutschland
Midazolam-ratiopharm	2 mg Midazolam/ml Lösung	ratiopharm, Ulm, Deutschland
Omeprazol 20 Heumann	20 mg Omeprazol/Kapsel	Heumann, Nürnberg, Deutschland

6.3 THCA in Serum

Bis auf zwei Probanden, die leichte Kreislaufprobleme nach der intravenösen Applikation hatten, vertrugen alle anderen Teilnehmer die Studienmedikation gut. Ob diese Probleme wirklich auf die THCA - Gabe zurückzuführen waren, ist zweifelhaft, da schon eine Blutabnahme allein im nüchternen Zustand mitunter zu Schwindel und Ohnmacht führen kann. Beide Probanden erholten sich nach dem Frühstück wieder schnell.

Insgesamt 624 Serumproben wurden mit der unter 5.3 beschriebenen LC-MS/MS-Methodik nach Proteinfällung gemessen. Jede Probe wurde zuerst mit der Quantifizierungsmethode für THCA und anschließend mit der Identifizierungsmethode für THCA-Metabolite und THC analysiert. Um Verschleppungen zu vermeiden, war eine Probe mit Fließmittelgemisch als Sicherheit zwischen den Studienproben höherer Konzentration eingebaut. Eine Kalibration von 1,0 bis 100 ng/ml zu Beginn und Qualitätskontrollen im niedrigen und hohen Konzentrationsbereich zum Schluss waren außerdem Bestandteil jeder Serie.

Vor allem gegen Ende der Beobachtungsdauer wurden die THCA-Konzentrationen sehr klein. Die Signale waren zwar noch identifizierbar, doch überschritten die errechneten Konzentrationen nicht mehr die Bestimmungsgrenze von 1,0 ng/ml. Da diese THCA-Mengen eindeutig von Null verschieden waren, sollen diese semiquantitativen Werte nicht vorenthalten werden, sondern sind in Klammern in den Ergebnistabellen aufgeführt.

Vorab bleibt festzuhalten, dass keine Probe nennenswerte THC-Mengen enthielt. Die unter thermischer Belastung stattfindende Decarboxylierungsreaktion von THCA zu THC findet demnach im Körper nicht statt. Die Reinheitsbestimmung hatte einen Restgehalt von 0,09 % THC in der isolierten THCA ergeben, so dass entsprechend einer Dosis von 5 mg THCA jedem Probanden 4,5 µg THC injiziert wurden. Die Peakflächenverhältnisse von THC zum internen Standard D₃-THC wurden berechnet und erreichten in der Probe von Proband N nach 5 Minuten den höchsten beobachteten Wert von 0,058.

Eine Kalibration zur genauen Quantifizierung wurde zwar nicht erstellt, vergleicht man jedoch die Peakflächen von THC zu D₃-THC, lassen sich die ungefähren Konzentrationen abschätzen. 20 µl IS-Mix enthalten absolut 1,15 ng D₃-THC, zusammengesetzt aus dem eingesetzter Referenzstandard und der zusätzliche Verunreinigung in der synthetisierten D₃-THCA mit 10 % D₃-THC. Dem höchsten gemessenen Peakflächenverhältnis von 0,058 entsprach daher einer THC-Menge von 0,068 ng in den verwendeten 200 µl Serum.

Da sich THC in Plasma und den festen Blutbestandteilen unterschiedlich verteilt, mussten die Umrechnungen auf Vollblut noch mit dem Faktor 1,6 [127] korrigiert werden. Bezogen auf ungefähr 5 Liter Blut, in denen sich der THCA-Bolus verteilt hat, ergab sich schließlich eine absolute THC-Menge von 2,67 µg. Dieser Wert lag noch unterhalb der theoretisch angenommenen Menge von 4,5 µg, so dass die detektierten THC-Spuren in den ersten Blutproben problemlos auf die geringe Verunreinigung in der verwendeten THCA zurückgeführt werden können. Diese These wird untermauert durch die Tatsache, dass bei allen Probanden der höchste Wert ausnahmslos in der ersten Blutprobe zu finden war, um dann kontinuierlich abzunehmen. Das spricht ebenfalls gegen eine metabolische Bildung von THC aus THCA. Spätestens nach 1,5 Stunden waren bei keinem Probanden mehr THC-Spuren nachweisbar.

6.3.1 Intravenöse Applikation

Die intravenöse Applikation kann als das Herzstück der pharmakokinetischen Grundlagenforschung betrachtet werden. Da die zu testende Substanz direkt in den Blutkreislauf gegeben wird, sind individuell verschiedene Auflösungs- und Resorptionsvorgänge von vornherein ausgeschlossen. Das erleichtert die Analyse erheblich und ermöglicht die Berechnung des initialen Verteilungsvolumens im zentralen Kompartiment und der Bioverfügbarkeiten nach extravasaler Gabe.

In Tab. 15 sind die gemessenen THCA-Konzentrationen aller Probanden mit den exakten Zeitspannen nach der intravenösen Applikation zusammengefasst. Abb. 26 und Abb. 27 zeigen die Konzentrations-Zeit-Verläufe für alle Probanden von 0 – 24 Stunden bzw. von 24 – 96 Stunden. Zwei Blutentnahmen, nach 15 min bei den Probanden B und D, mussten aufgrund eines kurzzeitig verstopften Katheters entfallen. Proband A nahm sich zusätzlich selbst eine Blutprobe nach 14 und nach 22 Stunden ab.

Der intravenös injizierte Bolus benötigt nur wenige Minuten, um sich im Blutplasma homogen zu verteilen. Laut Riviere [79] kann man selbst bei großen Lebewesen wie z. B. Pferden damit rechnen, dass nach fünf Minuten eine einheitliche Plasmakonzentration erreicht ist und die erste Probe abgenommen werden kann. Demzufolge sollte auch bei dem kleineren Organismus „Mensch“ nach fünf Minuten der THCA-Bolus gleichmäßig verteilt sein. Vor allem bei den ersten Blutabnahmen kommt es auf die genaue Abnahmezeit an, da kleine Abweichungen zu großen Fehlern führen können. Bezogen auf 10 min bewirkt eine Differenz von einer Minute schon einen Fehler von 10 %. Je länger die Zeitabstände werden, desto unproblematischer werden kleine Zeitdifferenzen.

Eine gleichmäßige Plasmaverteilung vorausgesetzt, können nach intravenöser Gabe die THCA-Plasmakonzentrationen naturgemäß nur noch fallen. Die höchste Konzentration wird daher immer in der ersten abgenommenen Blutprobe zu finden sein. Die Maximalkonzentrationen, die ausnahmslos in der 5-Minuten-Probe gemessen wurden, lagen bei den 16 Probanden zwischen 653 und 1060 ng/ml (Mittelwert 887 ± 107 ng/ml).

Verglichen mit THC-Kurven aus der Literatur fielen die THCA-Konzentrationen langsamer ab. Als erster Proband erreichte C nach 24 Stunden eine THCA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den Probanden A, B und G war nach 36 Stunden, bei L nach 72 Stunden keinerlei THCA mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu verliefen bei den anderen 11 Probanden spätestens ab 36 Stunden die Kurven sehr flach. Bis zur letzten Probe waren – wenn auch unter der Bestimmungsgrenze – messbare THCA-Mengen vorhanden.

Bei 12 von 16 Probanden lagen die THCA-Konzentrationen nach 24 Stunden unter der Bestimmungsgrenze von 1,0 ng/ml. Bei Proband C war das schon nach 12 Stunden, bei drei weiteren Probanden erst nach 36 Stunden der Fall.

	I		J		K		L		M		N		O		P	
	t	THCA														
ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml
5'	0,08	891	0,08	653	0,08	912	0,08	960	0,08	955	0,08	1010	0,08	799	0,08	1060
10'	0,17	694	0,17	582	0,17	767	0,17	675	0,18	613	0,17	877	0,17	622	0,17	841
15'	0,27	565	0,25	557	0,27	652	0,28	583	0,25	595	0,27	722	0,25	540	0,25	657
20'	0,33	541	0,33	488	0,35	600	0,35	525	0,35	533	0,35	635	0,33	486	0,33	610
30'	0,50	496	0,53	394	0,52	468	0,50	418	0,50	416	0,50	572	0,50	411	0,50	496
45'	0,75	246	0,75	336	0,77	387	0,75	347	0,75	303	0,75	459	0,73	347	0,75	383
60'	1,00	216	0,98	252	1,15	314	1,00	303	1,00	264	1,00	332	1,00	296	1,00	306
90'	1,50	152	1,50	190	1,65	257	1,50	225	1,50	196	1,50	276	1,50	217	1,50	223
2 h	2,00	91,2	2,00	149	2,07	199	2,00	183	2,02	143	2,05	182	2,00	177	2,00	186
3 h	3,00	68,5	3,00	97,3	2,98	148	3,08	131	3,02	92,7	3,13	98,6	3,00	118	3,00	103
4 h	4,00	33,2	4,00	62,6	3,98	91,2	3,98	90,8	3,97	64,5	4,00	68,2	4,00	73,6	4,00	62,5
6 h	6,00	11,4	6,20	34,8	5,97	54,8	6,00	45,2	6,00	33,4	6,00	30,6	6,02	37,0	6,00	26,1
8 h	8,00	7,98	8,00	18,8	7,97	24,6	8,02	11,8	7,98	17,1	8,00	15,6	8,03	17,9	8,00	12,5
10 h	10,00	2,45	10,00	11,1	9,97	11,9	10,00	24,8	10,00	8,47	10,00	8,55	9,97	8,60	10,00	5,47
12 h	12,00	1,58	12,00	6,54	11,65	8,46	12,10	7,12	12,00	5,12	11,90	4,81	12,00	4,67	12,00	3,44
24 h	24,00	(0,649)	23,37	1,33	23,37	(0,804)	24,20	(0,478)	23,52	(0,722)	24,00	(0,953)	23,67	1,15	24,00	(0,763)
36 h	36,00	(0,477)	34,82	(0,641)	35,67	(0,296)	35,48	(0,205)	35,02	(0,409)	35,40	(0,627)	36,07	(0,457)	35,72	(0,481)
48 h	47,85	(0,420)	47,27	(0,510)	47,42	(0,196)	47,65	(0,117)	49,08	(0,313)	48,27	(0,556)	48,13	(0,396)	49,28	(0,428)
72 h	71,72	(0,404)	71,18	(0,416)	71,33	(0,137)	71,60	n.n.	71,37	(0,274)	72,43	(0,459)	79,63	(0,365)	73,62	(0,364)
96 h	95,47	(0,389)	95,27	(0,377)	95,22	(0,129)	95,75	n.n.	95,45	(0,270)	96,52	(0,399)	96,15	(0,345)	96,00	(0,353)

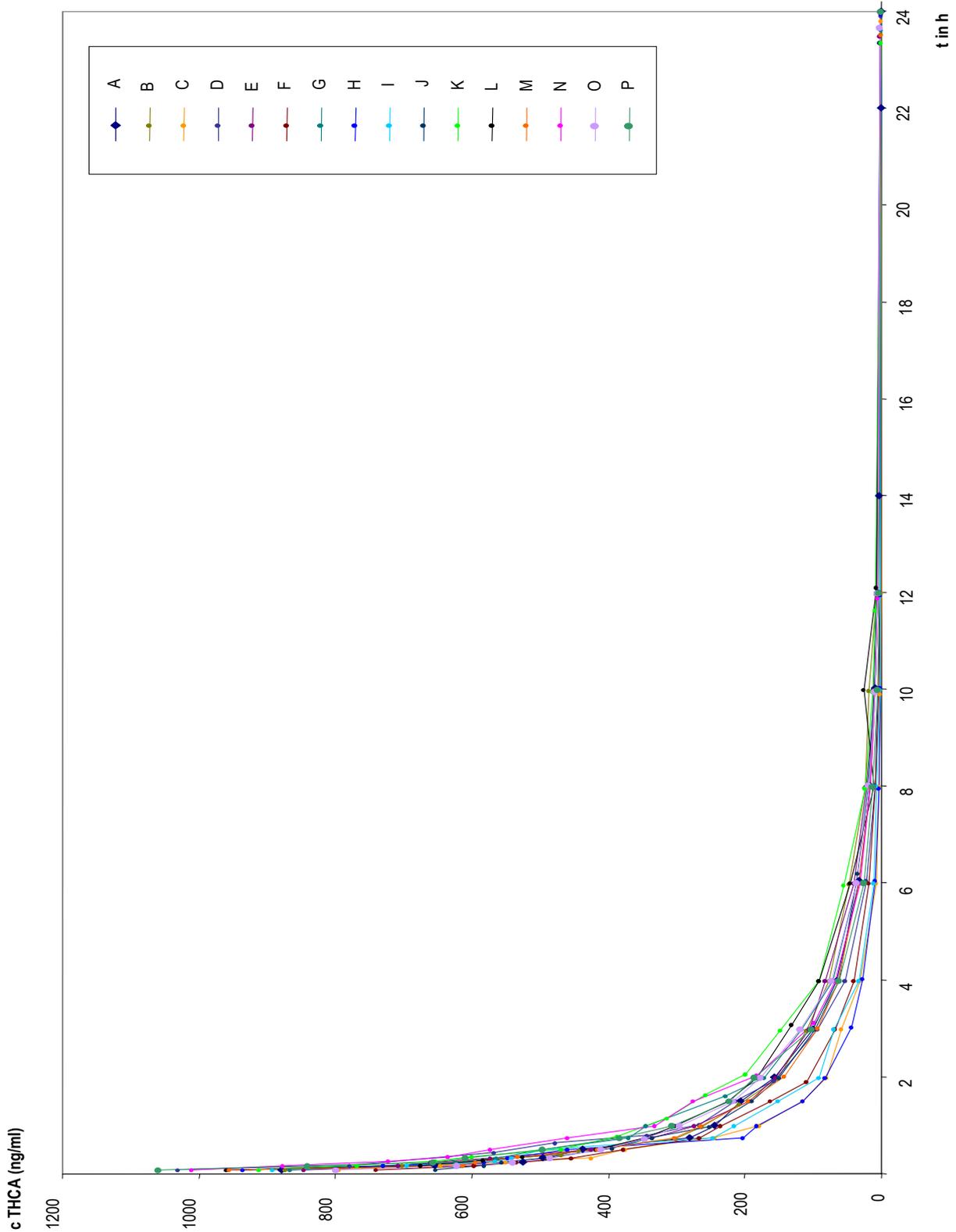


Abb. 26: THCA-Konzentrations-Zeit-Kurven aller sechszehn Probanden nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA: Für eine detaillierte Darstellung der anfänglichen Kurvenverläufe ist nur die Zeitspanne von 0 bis 24 Stunden nach Applikation abgebildet.

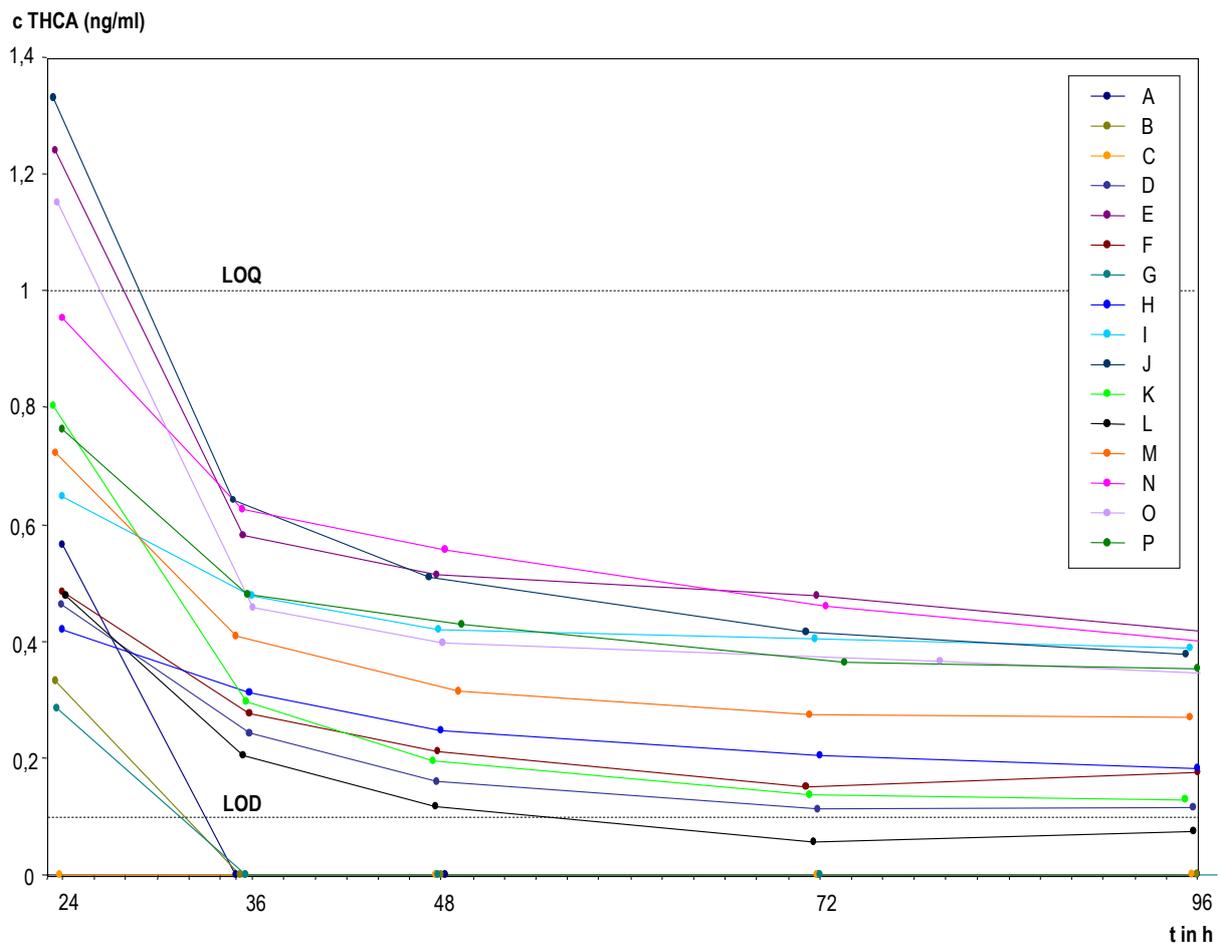


Abb. 27: THCA-Konzentrations-Zeit-Kurven aller sechszehn Probanden nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA: Für eine detaillierte Darstellung der Kurvenverläufe in der Endphase ist die Zeitspanne von 24 bis 96 Stunden nach Applikation abgebildet. LOQ = 1,0 ng/ml, LOD 0,1 ng/ml

6.3.2 Orale Applikation

Um die orale Bioverfügbarkeit von THCA zu bestimmen, wurden 10 mg THCA als Kapsel appliziert. Im Gegensatz zur intravenösen Applikation, spielt hier der Resorptionsschritt eine entscheidende Rolle und bestimmt die Konzentrations-Zeit-Kurven maßgeblich. Vergleichbar mit THC zeigten sich sehr unterschiedliche Profile. Tab. 16 listet die gemessenen THCA-Konzentrationen im Serum nach oraler Applikation auf, die in der nachfolgenden Abb. 28 grafisch dargestellt sind. In diesem Studienabschnitt musste keine Blutentnahme aufgrund eines verstopften Katheters oder anderer Probleme entfallen.

Tab. 16: THCA-Konzentrationen im Serum nach oraler Applikation von 10 mg THCA: semiquantitative Werte in Klammern; LOQ 1,0 ng/ml und LOD 0,1 ng/ml, n.n. = nicht nachweisbar (Fortsetzung nächste Seite)

	A		B		C		D		E		F		G		H	
	t	h	t	h	t	h	t	h	t	h	t	h	t	h	t	h
15'	0,25	0	0,25	0	0,25	0	0,23	101	0,25	0	0,25	0	0,25	0	0,23	0
30'	0,50	0	0,50	0	0,50	0	0,50	560	0,53	10,9	0,50	0	0,50	0	0,50	9,5
45'	0,75	0,63	0,75	0	0,75	2,3	0,75	557	0,75	20,0	0,75	0,63	0,75	0	0,77	23,4
60'	1,00	28,7	1,00	1,8	1,00	2,4	1,00	468	1,00	29,0	1,00	1,4	1,00	3,0	0,98	44,2
90'	1,50	67,5	1,53	7,4	1,50	2,4	1,50	304	1,47	24,0	1,50	5,8	1,50	8,9	1,50	61,5
2 h	2,00	51,5	2,07	9,1	2,00	1,9	1,97	206	2,00	23,0	2,00	42,0	2,00	34,0	2,00	45,6
3 h	3,00	45,1	3,03	7,8	3,00	2,7	3,00	106	2,98	44,0	3,00	29,0	3,00	17,0	3,00	20,5
4 h	4,00	118	4,03	7,5	4,00	6,8	4,00	89,2	3,97	59,0	4,00	28,0	4,00	16,0	4,00	13,6
6 h	6,03	149	6,00	11,6	6,00	153	6,00	58,7	5,97	107	5,98	239	6,00	235	6,02	169
8 h	8,00	52,2	8,03	36,4	8,00	40,8	8,03	24,2	8,00	63,0	8,03	61,0	8,00	74,0	8,02	38,60
10 h	10,00	27,4	10,03	47,5	10,00	16,9	10,05	12,6	10,00	48,0	10,03	22,0	10,00	47,0	10,00	13,50
12 h	12,00	16,0	12,03	31,3	12,00	11,4	12,05	8,3	12,00	29,0	12,00	11,4	12,00	17,0	12,00	9,6
24 h	23,30	16,3	23,20	34,4	24,00	1,5	24,17	2,6	24,05	23,0	23,98	3,9	23,42	7,8	23,97	1,9
36 h	36,02	(0,19)	35,92	2,5	35,83	n.n.	35,93	n.n.	35,25	2,7	35,83	(0,77)	35,45	1,3	35,85	(0,70)
48 h	47,33	n.n.	47,20	2,6	47,33	n.n.	48,03	n.n.	47,42	1,1	47,50	(0,63)	48,08	(0,16)	48,03	(0,30)
72 h	71,33	n.n.	71,17	(0,93)	71,72	n.n.	72,05	n.n.	71,92	n.n.	72,00	n.n.	71,88	n.n.	72,03	n.n.
96 h	95,28	n.n.	95,18	(0,20)	95,75	n.n.	96,05	n.n.	95,33	n.n.	96,58	n.n.	96,50	n.n.	96,05	n.n.

	I		J		K		L		M		N		O		P	
	t	THCA	t	THCA	t	THCA	t	THCA	t	THCA	t	THCA	t	THCA	t	THCA
ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml	h	ng/ml
15'	0,25	128	0,23	0	0,25	0	0,27	0	0,25	12,0	0,37	0	0,25	0	0,25	0
30'	0,50	605	0,52	0	0,52	0,50	0,50	0,14	0,52	179	0,63	2,7	0,50	0	0,48	50,6
45'	0,78	452	0,72	0	0,77	84,9	0,75	0,47	0,73	336	0,92	33,7	0,75	0,51	0,75	81,6
60'	1,03	283	0,98	0	1,02	135	1,00	0,78	1,00	302	1,00	50,2	1,00	7,4	0,98	77,2
90'	1,67	173	1,50	3,1	1,53	234	1,50	3,2	1,52	189	1,50	81,9	1,50	74,5	1,50	66,9
2 h	2,05	134	1,95	5,2	2,05	161	2,00	18,5	2,00	137	2,00	69,5	2,00	200	2,00	50,4
3 h	3,00	70,2	2,97	13,0	3,05	154	3,25	35,4	3,00	85,9	3,00	45,5	3,00	133	3,00	33,2
4 h	4,00	39,6	3,97	15,2	4,08	97,1	4,00	27,4	3,98	83,7	4,00	31,7	4,00	69,4	4,00	150
6 h	6,00	15,4	5,97	17,7	6,05	84,9	5,97	20,0	6,03	40,5	6,00	113	6,00	47,5	6,00	81,9
8 h	8,00	8,9	7,95	17,4	8,03	51,1	8,03	16,6	8,00	25,9	8,00	40,9	8,02	39,6	8,00	40,4
10 h	10,00	5,3	9,97	13,7	10,05	28,4	9,98	18,9	10,02	29,4	10,00	25,2	10,03	25,1	10,00	15,6
12 h	12,00	3,9	11,98	11,4	11,58	29,4	11,98	10,5	11,97	20,5	12,00	14,8	12,07	16,3	12,00	9,2
24 h	23,83	(0,67)	23,12	52,5	23,48	6,3	23,98	39,3	23,22	4,6	24,00	7,4	23,20	17,5	23,53	2,3
36 h	36,33	n.n.	35,17	5,4	35,23	(0,37)	35,40	3,1	35,30	(0,85)	36,08	2,3	35,92	(0,53)	36,28	(0,45)
48 h	47,92	n.n.	47,17	1,3	46,45	n.n.	46,95	(0,49)	48,73	n.n.	48,33	2,0	47,78	n.n.	46,70	n.n.
72 h	71,58	n.n.	71,12	n.n.	70,57	n.n.	71,67	n.n.	72,22	n.n.	71,95	(0,42)	71,52	n.n.	71,12	n.n.
96 h	95,92	n.n.	95,12	n.n.	94,52	n.n.	94,98	n.n.	95,22	n.n.	95,82	n.n.	99,05	n.n.	94,20	n.n.

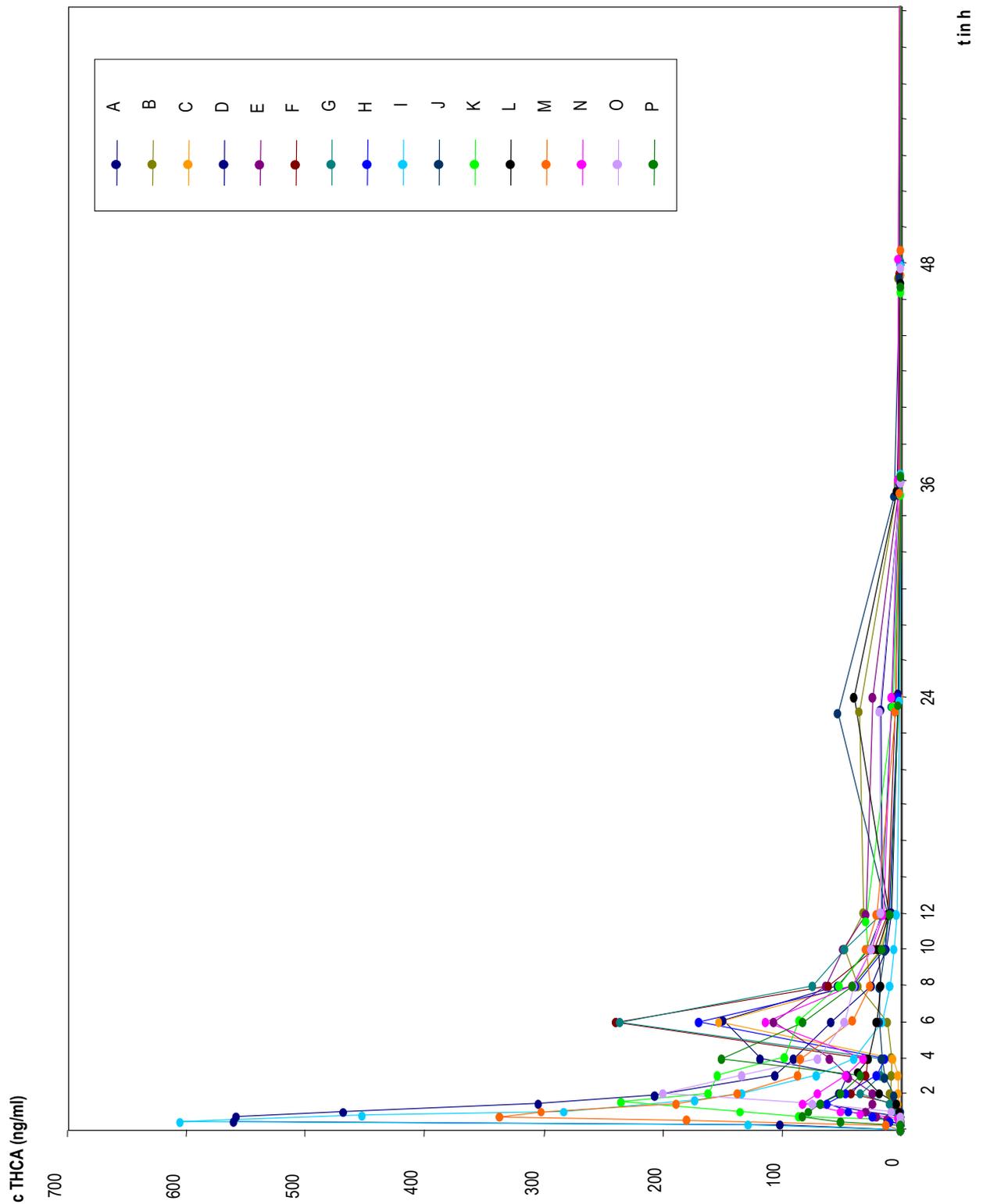


Abb. 28: THCA-Konzentrations-Zeit-Kurven aller 16 Probanden nach oraler Gabe von 10 mg THCA: Für eine detaillierte Darstellung der anfänglichen Kurvenverläufe ist nur die Zeitspanne von 0 bis 48 Stunden nach Applikation abgebildet.

Anhand der erhaltenen Kurven ist schon auf den ersten Blick zu erkennen, dass die Resorption bei den 16 Probanden sehr variabel verlief. Während bei Proband I schon in der Blutprobe nach 15 Minuten THCA in hoher Konzentration nachweisbar war (128 ng/ml) und sich die Konzentration bereits nach 30 Minuten auf ihrem Maximum (605 ng/ml) befand, bewegten sich bei Proband L die Konzentrationen in viel niedrigeren Bereichen und stiegen auf 39 ng/ml nach 24 Stunden. Prinzipiell kann man die Probanden nach den Kurvenverläufen in drei Gruppen einteilen:

- Gruppe 1: Dieser Gruppe gehörten die meisten Probanden an (n = 10). Maximalkonzentrationen zwischen 107 und 238 ng/ml erreichten sie zwischen 1,5 und 6 Stunden, der überwiegende Teil nach 6 Stunden. Ein Phänomen, das bei sieben der zehn Probanden dieser Gruppe auftrat, war ein zusätzlicher Konzentrationsanstieg vor dem eigentlichen Maximalpeak, so dass ein ein Doppelpeak im Konzentrationsprofil zu erkennen ist.
- Gruppe 2: Bei den drei Probanden dieser Gruppe fand offenbar eine sehr schnelle Resorption statt. Die Maximalkonzentrationen lagen zwischen 336 und 605 ng/ml und traten bereits nach 30 bzw. 45 Minuten auf.
- Gruppe 3: Bei den drei Probanden dieser Gruppe verzögerte sich die Resorption beträchtlich und führte zu sehr flachen Kurven, deren Maximalkonzentrationen zwischen 34 und 52 ng/ml lagen und sich erst nach 10 bzw. 24 Stunden einstellten.

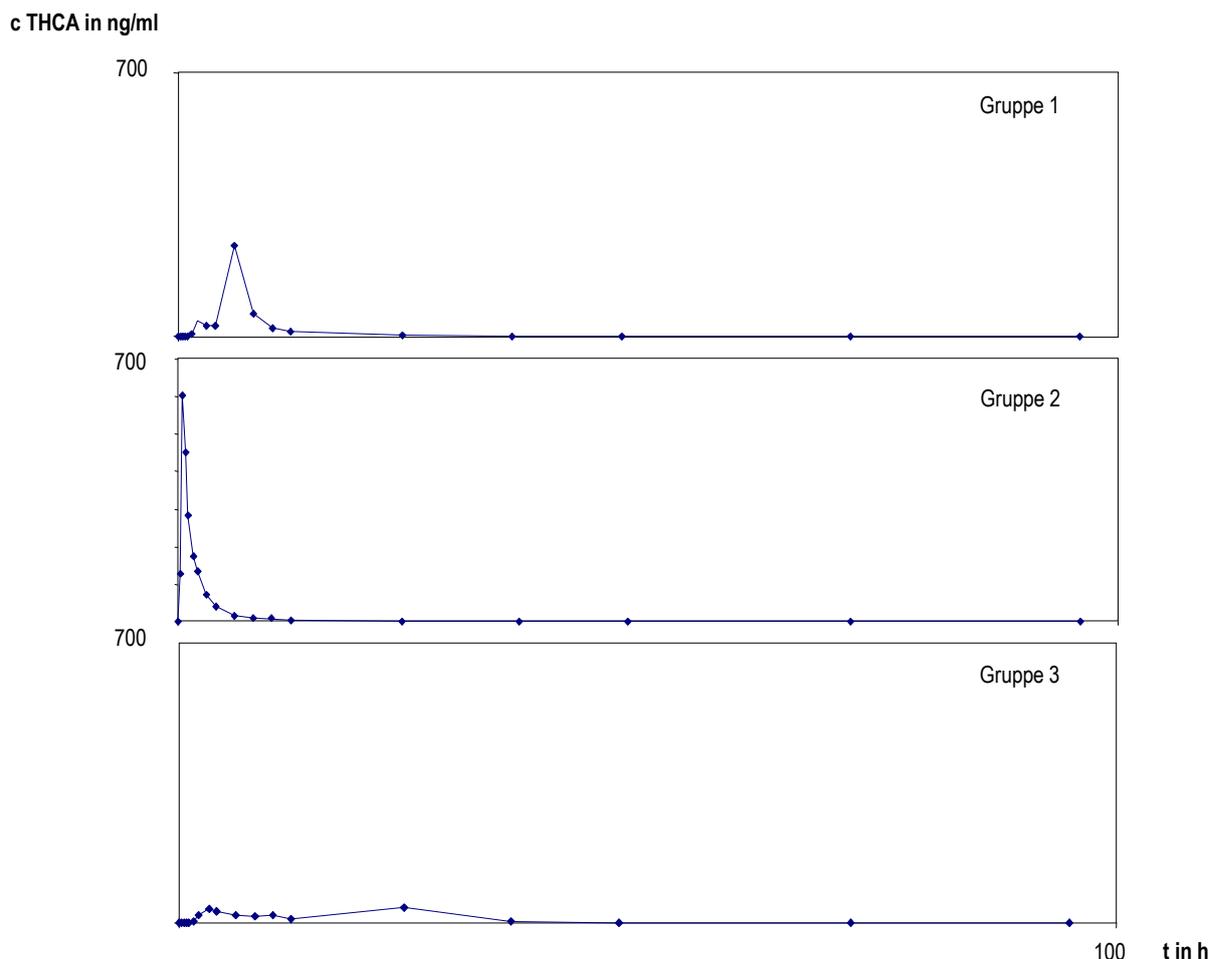


Abb. 29: Darstellung der schematischen Kurvenverläufe der drei Gruppen anhand der Konzentrations-Zeit-Kurven von Proband F (beispielhaft für Gruppe 1), Proband I (für Gruppe 2) und Proband L (für Gruppe 3)

Resorptionsprozesse fettlöslicher Substanzen wie THCA aus der Nahrung sind immer mit denen anderer Lipide verbunden. Die Lipophilie erleichtert zwar grundsätzlich den letzten Resorptionsschritt, die passive Diffusion durch die Zellmembran, doch müssen die Substanzen vorher bis zu den Dünndarmepithelzellen gelangen. Dies ist im wässrigen Milieu des Darminhalts nur durch Mizellierung möglich, wobei die Galle eine entscheidende Rolle spielt. Die Mizellen fungieren als Transportvehikel für die hydrophoben Substanzen und bestehen aus Gallensäuren, Cholesterin und aus bereits freigesetzten Monoacylglyceriden und Fettsäuren. Fein verteilt erreicht die THCA so den Bürstensaum des Dünndarms.

Sind die hydrophoben Substanzen einmal in die Enterozyten aufgenommen, werden sie in Chylomikronen verpackt, passieren die basolaterale Membran und gelangen in den Körperkreislauf. Dieser gesamte Prozess erklärt, warum lipophile Substanzen zwar auch ohne zusätzliches Nahrungsfett resorbiert werden können, sich die Resorption in Gegenwart von Fett aber erheblich steigert [79, 128]. Aus diesem Grund war im Versuchsaufbau vorgesehen, dass die Probanden nach der Einnahme der THCA-haltigen Kapsel eine Butterbrezel und später ein Brötchen essen.

Wie in Abb. 30 gut zu erkennen ist, verlief die Resorption der THCA individuell sehr unterschiedlich. Warum einige Probanden bereits nach einer halben Stunde, andere erst nach 24 Stunden das Konzentrationsmaximum erreichten, lässt sich allein mit individuell verschiedener gastrointestinaler Aktivität nicht erklären. Angenommen der eigentliche Resorptionsprozess im Dünndarm verlief bei allen Probanden mit annähernd gleicher Geschwindigkeit, kann nur die Freisetzung aus der Kapsel als Ursache für die großen Unterschiede in Frage kommen. Die Hartgelatine kapsel musste sich zunächst auflösen, damit die THCA freigesetzt wird, um daraufhin mizelliert und aufgenommen zu werden.

Gelatine ist ein Polypeptid tierischen Ursprungs und wird durch hydrolytische Spaltung aus Kollagen gewonnen. Nach dem sauren Verfahren entsteht Gelatine Typ A, die einen isoelektrischen Punkt zwischen 7,0 und 8,5 besitzt, und nach dem basischen Verfahren Typ B mit einem isoelektrischen Punkt zwischen 4,5 und 5,0 [125]. Die verwendeten Kapseln der Firma Pharmapol sind als „magensaftlöslich“ deklariert. Ein nachträgliches Experiment zum Auflösungsverhalten der Kapseln sollte Aufklärung bringen, ob eventuell die Kapseln gealtert waren und durch Quervernetzung schlechter lösbar oder ob der pH-Wert eine Rolle spielte. Dazu wurden Kapseln der verwendeten, zwei Jahre alten Charge und einer neuen bei drei verschiedenen pH-Werten untersucht – mit folgenden Ergebnissen:

- Es war kein Unterschied zwischen alten und neuen Kapseln zu beobachten.
- Bei pH 2 (0,01 M HCl) und unter gelegentlichem Umschwenken lösten sich die Kapseln innerhalb von 15 Minuten so weit, dass sie in der Mitte brachen.
- Bei pH 5,5 bzw. pH 7 und unter gelegentlichem Umschwenken deformierten sich die Kapseln zwar, blieben aber über 24 Stunden intakt. Sie waren zu Beginn in 0,01 M HCl gegeben worden, die dann durch Zugabe von Ammoniumacetat bzw. Natriumhydrogencarbonat auf den angegebenen pH-Wert gebracht wurde.

Die unterschiedlichen Konzentrations-Zeit-Verläufe sind mit diesen Beobachtungen gut in Einklang zu bringen. Offensichtlich wurde bei den drei Probanden der Gruppe 2 die THCA schnell und problemlos aus der Kapsel freigesetzt. Bei den 10 Probanden der Gruppe 1 löste sich die Kapsel zwar nicht sofort – eventuell aufgrund der kurzzeitigen pH-Wert-Erhöhung durch das Frühstück – wurde dann aber durch erneute Magensaftproduktion zur Verdauung innerhalb kurzer Zeit doch zerlegt. Eventuell hat auch die Magen- oder Darmperistaltik unterstützend zu einem Brechen der angelösten Kapseln beigetragen. Es ist gut möglich, dass bei den Probanden der Gruppe 3 die Kapseln zu schnell in das Doudenum und nachfolgend den Dünndarm gelangten. Bei den dort herrschenden pH-Werten konnten die Kapseln

dann lange Zeit intakt bleiben und setzten ihren Inhalt erst nach vielen Stunden frei. Im Nachhinein muss man feststellen, dass die Nahrungsaufnahme zu einem späteren Zeitpunkt wahrscheinlich zu geringeren Schwankungen bei der Resorption geführt hätte.

Da in der Praxis die THCA nicht eingeschlossen in einer Kapsel in den Körper gelangt, muss der unvollständige Auflösungsprozess unter Studienbedingungen und die daraus resultierende verzögerte Resorption bei den drei Probanden der Gruppe 3 als eher realitätsfern angesehen werden. Unter tatsächlichen Konsumbedingungen wird ein solcher Effekt wahrscheinlich nicht so ausgeprägt zu beobachten sein – es sei denn, der Konsument nimmt ganze Haschischstückchen zu sich.

6.4 THCA-Metabolite in Serum

6.4.1 Intravenöse Applikation

Alle Serumproben wurden unverdünnt mit der unter 5.1.3 beschriebenen Proteinfällung aufbereitet und mit der Analytikmethode für THCA-Metabolite, deren massenspektrometrische Parameter in Tab. 11 an zweiter Stelle aufgeführt sind, vermessen. Insgesamt enthält die Methode MRM-Übergänge für 18 Metaboliten. Da sehr hohe Konzentrationen nicht ausgeschlossen waren und Verschleppungen vermieden werden sollten, wurde zwischen jeder Realprobe eine Leerprobe analysiert. Die Auswertung konzentrierte sich in erster Linie auf die Identifizierung der vorhandenen Metabolite, da Referenzstandards bzw. deuterierte Standards für THCA-Metabolite nicht zur Verfügung standen und eine korrekte Quantifizierung deshalb nicht möglich war. Eine Substanz galt als nachgewiesen, wenn mindestens zwei MRM-Übergänge zur richtigen Retentionszeit Signale mit einem Signal-Rausch-Verhältnis > 3 zeigten.

Nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA waren im Serum von den in der MRM-Methode enthaltenen Metaboliten insgesamt elf nachweisbar:

- 11-OH-THCA
- 8 α -OH-THCA
- 8 β -OH-THCA
- THCA-8-on
- THCA-COOH
- 8,11-Bis-OH-THCA
- 9,10-Bis-OH-HHCA (nicht nachweisbar bei Proband N)
- THCA-Glucuronid
- THCA-COOH-Glucuronid
- 8-OH-THCA-Glucuronid (nicht nachweisbar bei Proband P)
- 4'-OH-THCA-Glucuronid

Nicht nachweisbar waren vier Metabolite:

- 8-OH-THCA-COOH
- 4'-OH-THCA-COOH
- THCA-8-on-Glucuronid
- 9,10-Bis-OH-THCA-Glucuronid

Unter der Annahme, dass sich die Metaboliten unter ESI-Bedingungen annähernd im gleichen Ausmaß ionisieren lassen, würden gleich große Peakflächen ungefähr gleich hohe Konzentrationen bedeuten. Dies ist wahrscheinlich, da alle Metaboliten an der Carboxylgruppe in Position 2 negativ ionisiert werden und die verschiedenen Substituenten auf diesen Vorgang nur geringen Einfluss haben sollten. Die Richtigkeit dieser Annahme vorausgesetzt, sind Konzentrationsunterschiede zwischen den Metaboliten deutlich in den Chromatogrammen zu erkennen. Einige Substanzen, die damit den Status eines Hauptmetaboliten erlangen, zeigen intensive Peaks in vielen Proben, während andere kaum die Identifikationskriterien erfüllen.

Um diese Unterschiede auch in Zahlen zu verdeutlichen und einen Eindruck von den Kurvenverläufen zu erhalten, wurde deshalb trotz aller Einschränkungen eine semiquantitative Analyse vorgenommen. Dazu wurden die absoluten Peakflächen aller gefundenen Metaboliten für jeden Probanden ermittelt und anhand dieser Werte für alle Metaboliten mit Hilfe der Pharmakokinetik-Software Kinetica (Thermo

Fischer Scientific) die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt. Genaue Werte finden sich in Tab. 17. Da bei 9,10-Bis-OH-HHCA der erste Übergang fast durchweg durch ein Störsignal beeinträchtigt war, diente der zweite, annähernd gleich intensive Übergang für die Berechnungen.

Bei der Interpretation dieser Werte ist zu beachten, dass die absoluten Peakflächen abhängig von Suppression oder Enhancement durch Matrixbestandteile stark schwanken können. Ein vorsichtiger Vergleich von Peakflächen ist daher höchstens zwischen den Seren desselben Probanden zulässig, zwischen verschiedenen Probanden aber wenig aussagekräftig. Da der interne Standard D₃-THCA aufgrund anderer physikalisch-chemischer Eigenschaften zu einer anderen Retentionszeit eluiert als alle Metaboliten und daher anderen Matrixeffekten ausgesetzt ist, hätte der Bezug auf diesen internen Standard die Schwankungen nicht ausgeglichen und wurde deshalb unterlassen.

Tab. 17: AUCs für die in den Serumproben gefundenen THCA-Metabolite nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA, für 9,10-Bis-OH-HHCA wurden die Signale des ersten Qualifiers zur Berechnung verwendet

	11-OH-THCA	8a-OH-THCA	8b-OH-THCA	THCA-8-on	THCA-COOH	8,11-Bis-OH-THCA	9,10-Bis-OH-HHCA	THCA-Gluc	THCA-COOH-Gluc	8-OH-THCA-COOH-Gluc	4'-OH-THCA-COOH-Gluc
A	959181	95955	12851	715891	473519	128117	658363	20459	284122	11960	45176
B	1270820	157710	34553	529229	672389	33363	2133730	3972	243087	8507	23262
C	264349	33109	3564	196727	498766	265692	1744730	19441	307033	10192	37356
D	495194	56534	12266	230031	104124	64602	768096	58197	228099	10615	26185
E	1510690	173710	12731	1101110	212406	17851	1349890	12130	102119	7182	8801
F	716255	62488	8007	199949	129148	23097	866235	4859	270873	10803	12087
G	1676500	169296	24658	1214100	1707850	45456	1805050	45134	514618	35875	36752
H	414527	42473	3831	163992	161192	111930	1091950	152399	365593	17724	36003
I	314965	30497	9367	187304	53758	95207	647720	10069	123834	6225	12205
J	562164	72310	10057	301078	92898	26341	381606	4939	140398	3274	13827
K	1852970	180949	28744	748750	81593	103110	3574	3059	194779	20100	22888
L	481024	47021	21243	255160	111661	111434	391438	33329	244201	10309	27747
M	489384	46653	761	175591	83679	36688	742990	12091	169304	4988	5548
N	309822	34606	7980	190035	141959	52633	n.n.	26145	407982	13869	51048
O	754585	126651	11365	400397	11785	73123	370542	1499	225397	7561	58174
P	421005	38604	48408	212143	389513	57888	283498	2912	149929	n.n.	8358

Um Aussagen über die Relevanz der einzelnen Metabolite treffen zu können, bietet sich bei Unvergleichbarkeit der Rohdaten die Zuordnung von Rängen an. Bei diesem Verfahren aus der Statistik werden mehrere vergleichbare Objekte (hier Peakflächen unterschiedlicher Metabolite bei einem Probanden) sortiert und durch Ränge in eine Ordinalskala gebracht. Der Vorteil ist, dass sich die absoluten Unterschiede zwischen den Peakflächen der Probanden nicht auf das Ergebnis auswirken und nur das Gesamtbild der Metaboliten eines jeden Probanden entscheidet. Die Ränge werden nach Größe der AUC vergeben. Sie sind in Tab. 18 aufgeführt und zeigen ein eindeutiges Bild: Die Hauptmetabolite des

Abbaus von THCA im menschlichen Körper nach intravenöser Applikation sind 11-OH-THCA, THCA-8-on, 9,10-Bis-OH-HHCA, THCA-COOH-Glucuronid und sein Aglykon THCA-COOH. 9,10-Bis-OH-HHCA führt diese Rangliste an, obwohl sie einen sehr flachen Kurvenverlauf zeigt, aber über den gesamten Zeitraum hinweg trotzdem oft die größte Fläche unter der Kurve ergibt.

Tab. 18: Rangzuordnung in Abhängigkeit von der Größe der AUC für alle im Serum gefundenen Metabolite nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA

	11-OH-THCA	8a-OH-THCA	8b-OH-THCA	THCA-8-on	THCA-COOH	8,11-Bis-OH-THCA	9,10-Bis-OH-HHCA	THCA-Gluc	THCA-COOH-Gluc	8-OH-THCA-COOH-Gluc	4'-OH-THCA-COOH-Gluc
A	1			2			3				
B	2				3		1				
C					2		1		3		
D	2			3			1				
E	1			3			2				
F	2						1		3		
G	3				2		1				
H	2						1		3		
I	2			3			1				
J	1			3			2				
K	1			2					3		
L	1			3			2				
M	2			3			1				
N	2			3					1		
O	1			2			3				
P	1				2		3				

Trägt man die absoluten Peakflächen der gefundenen Metabolite gegen die Zeit nach der Applikation auf, lassen sich Metabolitenprofile abbilden, die einen qualitativen Eindruck von den Verläufen vermitteln. Beispielfhaft sind in Abb. 30 die Profile für die Probanden A, G und O dargestellt.

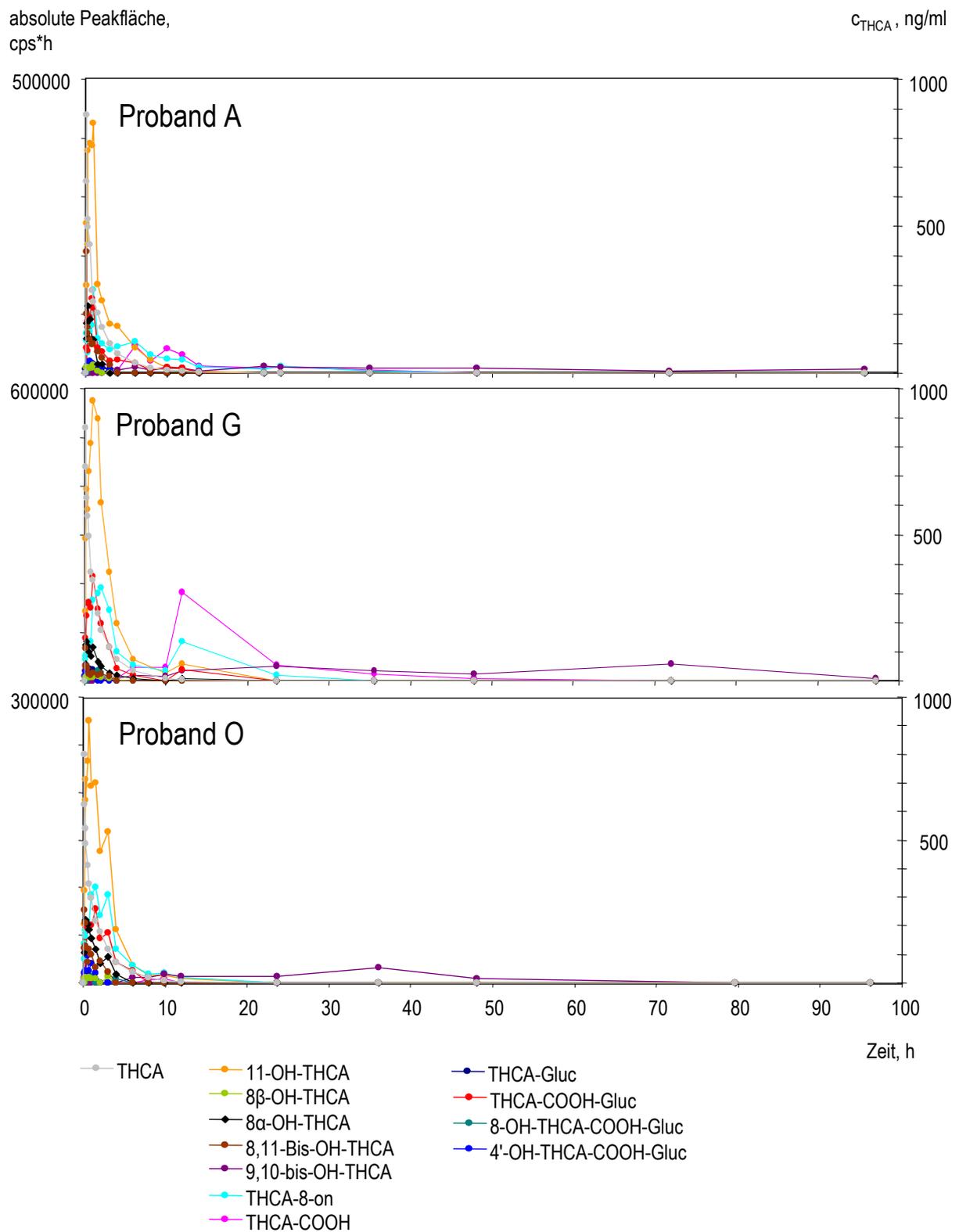


Abb. 30: Metabolitenprofile im Serum von Proband A, G und O nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA: Für die Metaboliten wurden die absoluten Peakflächen (linke Achse) gegen die Zeit, für THCA die Konzentration (rechte Achse) gegen die Zeit aufgetragen.

Außerdem wurden die Zeitpunkte der maximalen Peakfläche (t_{\max}) für jeden Metaboliten ermittelt und der Mittelwert für alle sechzehn Probanden berechnet. Die einzelnen t_{\max} sowie die jeweilige mittlere t_{\max} sind in Tab. 19 aufgeführt. In Einzelfällen traten Werte auf, die stark von den Werten der anderen Probanden abwichen. Möglicherweise spielten hier verschiedene Phänotypen der katalysierenden CYP-Isoenzyme eine Rolle. Diese „Ausreißer“ flossen nicht in die Mittelwerte ein.

Tab. 19: Zeitpunkte der größten absoluten Peakfläche (t_{\max}) für alle im Serum gefundenen THCA-Metabolite nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA, außerdem angegeben ist der Mittelwert (MW) aller t_{\max} der sechzehn Probanden für jeden Metaboliten mit der dazugehörigen Standardabweichung; **fett** markiert sind Werte, die stark von den anderen Werten abweichen und deshalb bei der Berechnung des Mittelwerts entfielen

	11-OH-THCA	8 α -OH-THCA	8 β -OH-THCA	THCA-8-on	THCA-COOH	8,11-Bis-OH-THCA	9,10-Bis-OH-HHCA	THCA-Gluc	THCA-COOH-Gluc	8-OH-THCA-COOH-Gluc	4'-OH-THCA-COOH-Gluc
A	60'	20'	60'	60'	6 h	2 h	22 h	20'	45'	60'	45'
B	20'	20'	45'	3 h	10 h	60'	12 h	60'	60'	30'	2 h
C	15'	15'	30'	45'	8 h	6 h	72 h	15'	45'	30'	30'
D	30'	30'	30'	30'	8 h	30'	12 h	30'	30'	30'	30'
E	30'	15'	60'	60'	12 h	5'	72 h	45'	30'	60'	60'
F	20'	10'	20'	45'	6 h	10'	12 h	10'	20'	20'	45'
G	60'	15'	1,5 h	2 h	12 h	5'	72 h	15'	60'	1,5 h	60'
H	20'	10'	15'	15'	10 h	5'	36 h	30'	30'	30'	30'
I	15'	15'	15'	60'	6 h	5'	6 h	15'	20'	20'	20'
J	30'	20'	20'	60'	6 h	5'	12 h	30'	30'	20'	45'
K	30'	10'	30'	3 h	6 h	10'	12 h	15'	30'	30'	60'
L	1,5 h	15'	5'	1,5 h	12 h	5'	12 h	45'	45'	15'	45'
M	20'	15'	5'	2 h	10 h	5'	12 h	20'	20'	45'	20'
N	30'	30'	30'	30'	8 h	5'	-	45'	45'	45'	45'
O	45'	20'	3 h	1,5 h	10 h	5'	36 h	60'	1,5 h	60'	1,5 h
P	60'	15'	30'	30'	10 h	5'	3 h	20'	30'	-	45'
MW	36'	17'	32'	76'	9 h	11'	30 h	30'	39'	39'	49'
SD	16'	6'	23'	51'	2 h	16'	25 h	17'	19'	21'	26'

Bei Betrachtung aller Profile lässt sich feststellen, dass fast ausnahmslos alle nur nachrangig gebildeten Metabolite wie 8 α -OH-THCA und 8 β -OH-THCA, 8,11-Bis-OH-THCA, THCA-Glucuronid, 8-OH-THCA-COOH-Glucuronid und 4'-OH-THCA-COOH-Glucuronid kurz nach der Injektion des THCA-Bolus ihre maximale Peakfläche erreichten und innerhalb von 4 bis 6 Stunden nicht mehr nachweisbar waren.

Bei den Hauptmetaboliten ergab sich ein differenzierteres Bild.

- Das erste Hydroxylierungsprodukt, 11-OH-THCA (—), zeigte bei allen Probanden ebenfalls ein ausgeprägtes, frühes Maximum (MW t_{max} : 36 Minuten). Die Kurve fiel dann steil ab und erreichte Null spätestens nach 24 Stunden bei 15 der 16 Probanden.
- THCA-8-on (—) entsteht nach Oxidierung der monohydroxylierten Metaboliten 8 α -OH-THCA (—) bzw. 8 β -OH-THCA (—) und stellt die Endstufe der Oxidation an dieser Position dar. Entsprechend sind auch die mittleren t_{max} plausibel. Die Edukte 8 α -OH-THCA und 8 β -OH-THCA erreichten ihre maximalen Peakflächen nach durchschnittlich 17 bzw. 32 Minuten, während THCA-8-on nachgeschaltet erst nach durchschnittlich 61 Minuten „gipfelte“.
- 9,10-Bis-OH-HHCA (—) ist das Produkt einer Epoxidierung an Position 9 und 10 und anschließender Hydrolyse und scheint bei den meisten, aber nicht bei allen Probanden ein Metabolit zu sein, der erst nach einem längeren Zeitraum in Erscheinung tritt. In den drei Beispielprofilen erkennt man, dass dieser Metabolit auch nach mehreren Tagen noch nachweisbar war und eine sehr flache, langgezogene Kurve zeigte. Bei 11 Probanden war auch noch in der letzten abgenommenen Probe nach 96 Stunden eine Spur 9,10-Bis-OH-HHCA zu finden, bei Proband N allerdings durchweg kein Signal und bei Proband K nur kleine Signale nach 30 min und 12 h.
- THCA-COOH (—) ist das Endprodukt der Oxidation an Position 11, die über 11-OH-THCA und die nicht nachweisbare Zwischenstufe THCA-11-aldehyd verläuft. Diese hintereinander stattfindenden Reaktionen erklären auch den Kurvenverlauf, der flach ist und ein mehr oder weniger deutliches Maximum nach einigen Stunden zeigt (MW t_{max} : 10 Stunden).
- Ein interessantes Phänomen zeigte sich bei THCA-COOH-Glucuronid (—), dessen maximale Peakflächen schon nach kurzer Zeit, bei durchschnittlich 39 Minuten, auftraten. Das leuchtet auf den ersten Blick nicht ein, da das Edukt THCA-COOH erst nach Stunden Maximalwerte zeigt. Es wäre zu erwarten, dass das Glucuronid ein dem THCA-COOH-Peak nachfolgendes Maximum hat. Mögliche Erklärungen dazu folgen im nächsten Kapitel.

Einige Ausreißer sind bei der Ermittlung der t_{max} zu erkennen, die stark von den anderen Werten abweichen.

6.4.2 Orale Applikation

Alle Serumproben nach oraler Gabe wurden analog zu der für die Proben nach intravenöser Gabe beschriebenen Methodik aufbereitet, gemessen und interpretiert. Nach oraler Applikation fanden sich im Serum prinzipiell die gleichen elf Metaboliten wie nach der intravenösen Applikation, wenn auch manche nicht bei allen Probanden:

- 11-OH-THCA
- 8 α -OH-THCA
- 8 β -OH-THCA
- THCA-8-on
- THCA-COOH
- 8,11-Bis-OH-THCA (nicht nachweisbar bei B, C, E, G, L und N)
- 9,10-Bis-OH-HHCA
- THCA-Glucuronid
- THCA-COOH-Glucuronid (nicht nachweisbar bei J)
- 8-OH-THCA-Glucuronid (nicht nachweisbar bei J und L)
- 4'-OH-THCA-Glucuronid (nicht nachweisbar bei J und L)

Generell nicht nachweisbar waren vier Metabolite:

- 8-OH-THCA-COOH
- 4'-OH-THCA-COOH (Spuren in zwei Proben von I)
- THCA-8-on-Glucuronid
- 9,10-Bis-OH-THCA-Glucuronid

Wie bereits unter 6.4.1 für die Metaboliten nach intravenöser Gabe beschrieben, wurden auch hier für die gefundenen Substanzen die absoluten Peakflächen ermittelt und damit AUCs berechnet, deren Ergebnisse in nachfolgender Tab. 20 aufgelistet sind. Anhand dieser Tabelle lassen sich deutlich die „Lücken“ bei den Metaboliten 8,11-Bis-OH-THCA, THCA-COOH-Glucuronid, 8-OH-THCA-COOH-Glucuronid und 4'-OH-THCA-COOH-Glucuronid erkennen. Abgesehen davon entspricht das Metabolitenmuster nach oraler Gabe den Ergebnissen nach intravenöser Gabe.

Tab. 20: AUCs für die in den Serumproben gefundenen THCA-Metabolite nach oraler Applikation von 10 mg THCA, für 9,10-Bis-OH-HHCA wurden die Signale des Quantifiers zur Berechnung verwendet, n.n. = nicht nachgewiesen

	11-OH-THCA	8a-OH-THCA	8b-OH-THCA	THCA-8-on	THCA-COOH	8,11-Bis-OH-THCA	9,10-Bis-OH-HHCA	THCA-Gluc	THCA-COOH-Gluc	8-OH-THCA-COOH-Gluc	4'-OH-THCA-COOH-Gluc
A	1036130	89011	151853	75806	489409	56185	1113827	164952	358129	33733	93374
B	781900	47962	75806	1238146	815920	n.n.	1542144	123715	194722	26844	27769
C	286732	32111	40503	550687	132428	n.n.	1704574	207003	276942	33346	59413
D	855635	248307	154161	1156315	353314	3605	1014146	649188	658484	52291	98959
E	1482410	115857	159743	2646968	512056	n.n.	2750711	50664	276385	1090	1090
F	765691	112547	42256	469502	154669	227	948706	261770	335210	46330	83625
G	578213	49869	16278	457822	1025720	n.n.	665794	144084	489200	36669	62422
H	390927	97419	43843	367718	255368	9264	277876	265805	567547	60649	96460
I	554378	64536	73951	367718	892891	45218	702124	293551	497779	41500	70076
J	667004	137478	163989	10812	944492	39094	193579	49187	n.n.	n.n.	n.n.
K	2204890	299939	202949	1253276	1024120	4925	485487	104469	514297	52369	55639
L	302724	162498	37860	1153829	905791	n.n.	1296636	82783	312009	n.n.	n.n.
M	943113	97247	106351	497004	525896	3658	1295543	119158	316751	32626	46082
N	189135	35798	9603	319548	75031	n.n.	10318	10603	349850	14022	48119
O	605654	101552	89350	1010121	358823	1812	826430	165710	554677	56370	267830
P	460009	98944	53321	507645	853628	2945	1080476	93122	383822	23744	23409

Vergibt man wieder Ränge nach Größe der AUC, um für jeden Probanden die Hauptmetabolite festzustellen, zeigt sich ein ähnliches Bild wie nach intravenöser Gabe (siehe Tab. 21). Auch nach oraler Gabe sind die relevanten Metabolite 11-OH-THCA, THCA-8-on, THCA-COOH und sein Glucuronid sowie 9,10-Bis-OH-HHCA.

Die Metabolitenverläufe nach oraler Gabe waren sehr unterschiedlich, was mit hoher Wahrscheinlichkeit daran lag, dass schon die Resorption der THCA selbst sehr variabel verlief. Abb. 31 zeigt Metaboli-

tenprofile für die Probanden H, I und B, die beispielhaft für die drei unter 6.3.2 vorgestellten Resorptionstypen stehen. Wie bereits unter 6.4.1 beschrieben, wurden die absoluten Peakflächen der gefundenen Metabolite verwendet und gegen die Zeit aufgetragen.

Die Kurvenverläufe der meisten Metaboliten folgten sehr genau dem Kurvenverlauf der THCA. Ein Maximum der Metaboliten, die sich bei der intravenösen Gabe als „Metaboliten der ersten Stunde“ herausstellten, fiel immer mit einem Maximum der THCA zusammen. Wie in der Abbildung gut zu erkennen ist, zeichneten die Kurvenverläufe der Metaboliten sogar die auffälligen Doppelpeaks nach. War die THCA einmal aufgenommen, vollzog sich das gleiche Metabolisierungsschema wie nach intravenöser Gabe: Die nur in kleinen Mengen gebildeten Metabolite waren nach wenigen Stunden nicht mehr detektierbar, THCA-COOH hatte ein nachgelagertes Maximum und auch hier fand sich das Phänomen des vorgelagerten Maximums des THCA-COOH-Glucuronids. Der am längsten nachweisbare Metabolit war wie schon zuvor 9,10-Bis-OH-HHCA.

Anhand des Metabolitenprofils von Proband I, der die THCA sehr schnell resorbierte und dessen THCA-Konzentrations-Zeit-Kurve nach oraler Gabe der Kurve nach intravenöser Bolusapplikation ähnelt, lässt sich besonders gut ablesen, dass sich die Verläufe der Metaboliten von denen nach intravenöser Gabe kaum unterschieden, sobald die Substanz aufgenommen war. Eine Abschätzung der t_{max} wie nach der THCA-Injektion ist nach oraler Gabe nicht sinnvoll, da es keinen festen Zeitpunkt gibt, den man als Zeitpunkt Null der vollständigen Resorption ansehen könnte.

Tab. 21: Rangzuordnung in Abhängigkeit von der Größe der AUC für alle im Serum gefundenen Metabolite nach oraler Applikation von 10 mg THCA

	11-OH-THCA	8a-OH-THCA	8b-OH-THCA	THCA-8-on	THCA-COOH	8,11-Bis-OH-THCA	9,10-Bis-OH-HHCA	THCA-Gluc	THCA-COOH-Gluc	8-OH-THCA-COOH-Gluc	4'-OH-THCA-COOH-Gluc
A	2				3		1				
B				2	3		1				
C	3			2			1				
D	3			1			2				
E	3			2			1				
F	2			3			1				
G	3				1		2				
H	2			3					1		
I	3				1		2				
J	2				1		3				
K	1			2	3						
L				2	3		1				
M	2				3		1				
N	3			2					1		
O	3			1			2				
P				3	2		1				

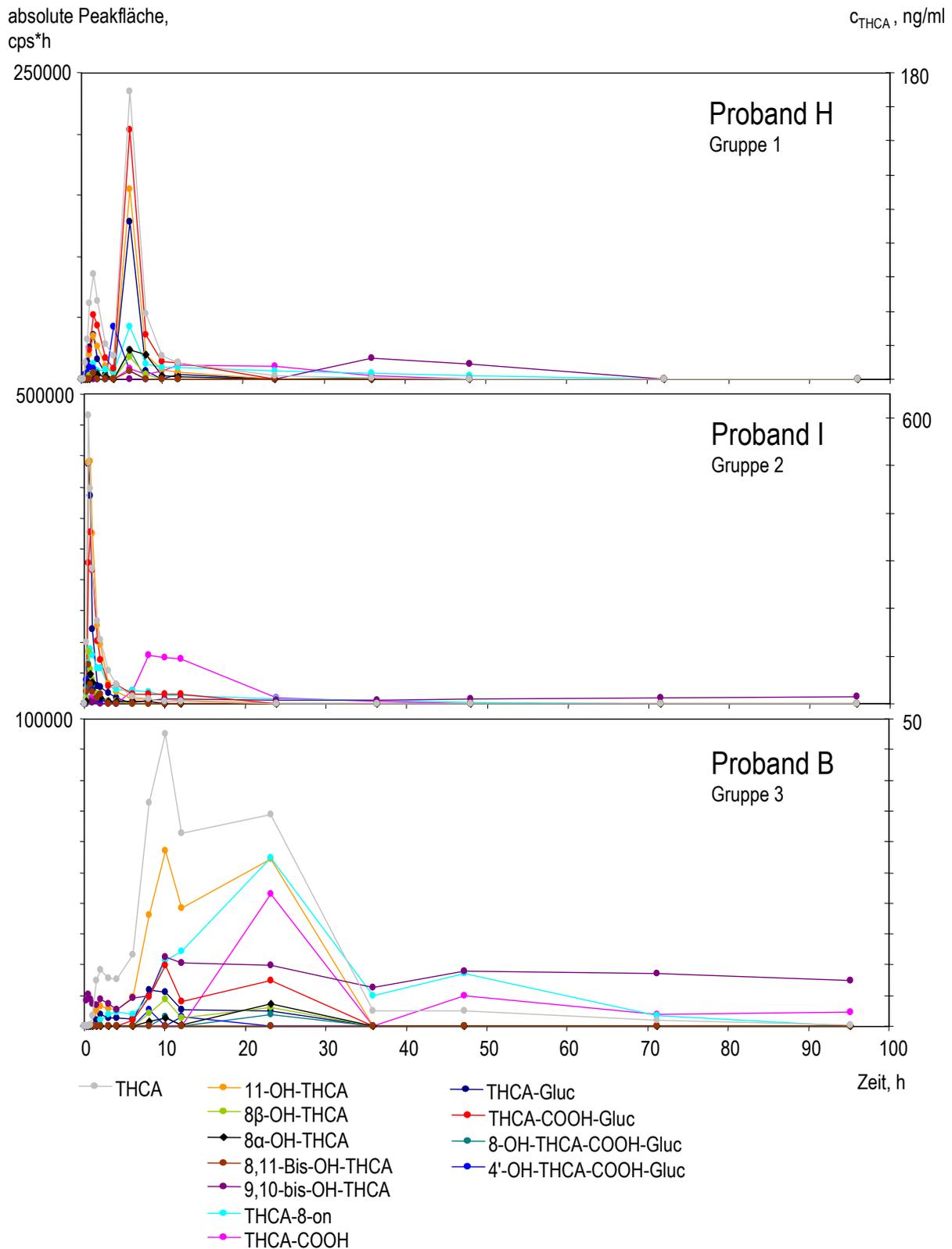


Abb. 31: Metabolitenprofile im Serum von Proband H, I und B nach oraler Applikation von 10 mg THCA: Diese drei Probanden wurden beispielhaft für die in Abb. 29 dargestellten drei Gruppen ausgewählt. Für die Metaboliten wurden die absoluten Peakflächen (linke Achse), für THCA die Konzentration (rechte Achse) gegen die Zeit aufgetragen.

Es bleibt zu klären, wieso THCA-COOH-Glucuronid im Metabolitenprofil ein durchschnittliches Maximum nach ungefähr 40 Minuten und sein Edukt THCA-COOH ein nachgelagertes Maximum bei 10 Stunden nach Applikation zeigt. Hier existiert keine Analogie zu THC. Betrachtet man die Konzentrationen von THC-COOH und THC-COOH-Glucuronid nach inhalativer Resorption, entdeckt man zwar ebenfalls ein interessantes Phänomen, aber ein anders geartetes.

Generell liegen im Plasma die mittleren Glucuronid-Konzentrationen höher als die des Aglykons THC-COOH, wobei sich das Verhältnis von Glucuronid zu Aglykon mit der Zeit ändert. Interessanterweise sinkt es ungefähr 15 – 30 min nach der Applikation, da vermehrt THC-Carbonsäure gebildet wird und die nachfolgende Glucuronidierungsreaktion „nicht so schnell nachkommt“. Ist die Umsetzung aus 11-OH-THC zur THC-Carbonsäure erst einmal abgeschlossen, entsteht im Verhältnis wieder mehr Glucuronid. Schwoppe et al. [74] spekulieren, ob eventuell dieses sich ändernde Verhältnis als ein Marker für kurz zurückliegenden Konsum verwendet werden könnte. Die Schwierigkeit besteht darin, dass die auffällige Änderung des Verhältnisses bereits nach 15 bis 30 Minuten auftritt, die Proben in der forensischen Praxis aber meist im Zeitfenster von 2 bis 4 Stunden gewonnen werden. Zu diesem Zeitpunkt ist das Verhältnis bereits wieder bei Normalwerten angelangt und lässt keine Schlüsse über den Konsumzeitpunkt mehr zu.

Für die hohe THCA-COOH-Glucuronid-Menge kurze Zeit nach der intravenösen Applikation und das nachgelagerte Maximum für THCA-COOH gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zuerst muss sicher feststehen, dass es sich bei der gemessenen Substanz um THCA-COOH-Glucuronid handelt. Die drei Übergänge und die zugeordnete Struktur sind zwar plausibel, die Analogie zum THC-Metabolismus an vielen Stellen offensichtlich, doch theoretisch wären auch Oxidationen an anderen Positionen im THCA-Molekül möglich. Für den Fall, dass es sich tatsächlich um einen anderen Metaboliten handelte, gäbe es keinen Zusammenhang mehr zwischen beiden Substanzen. Für eine eindeutige Identifizierung müsste die Substanz in ausreichender Menge isoliert vorliegen und dann mit NMR-Analytik vermessen werden.

Angenommen die Zuordnung bestätigte sich durch NMR-Messungen, bleibt die Möglichkeit einer Produkthemmung des Enzyms durch das entstandene THCA-COOH-Glucuronid. Es ist vorstellbar, dass die zu Beginn entstehende THCA-COOH sehr schnell zum Glucuronid umgesetzt wird und das Produkt THCA-COOH-Glucuronid das Enzym im Anschluss daran hemmt. Später entstehende THCA-COOH wird dann langsamer glucuronidiert. Eine rundum schlüssige Erklärung ist das aber nicht. Warum zeigt sich das Maximum der THCA-COOH mit so großer Zeitverzögerung, wenn zu Beginn die Oxidation und Glucuronidierung sehr schnell ablaufen? Gibt es konkurrierende Alternativreaktionen für die beteiligte(n) Glucuronosyltransferase(n)?

Was auch immer die Erklärung für dieses Phänomen ist – sollte es sich bestätigen, könnte das Verhältnis beider Substanzen zueinander ein Anhaltspunkt für den Konsumzeitpunkt werden. Eine hohe THCA-COOH-Glucuronid-Konzentration bei gleichzeitig geringer THCA-COOH-Konzentration würde dann für einen kurz zurückliegenden Konsum sprechen, während ein umgekehrtes Verhältnis auf länger zurückliegenden Konsum deuten würde.

6.5 THCA und ihre Metabolite in Urin

Im Unterschied zu den Blutproben wurden die Urinproben nicht nach einem festen und für alle Probanden identischen Zeitschema abgenommen, sondern *ad libitum*. So kamen verschiedene Zeitabstände, unterschiedliche Probenanzahl und teils größere Lücken zustande. Für die Erstellung von Metabolitenprofilen im Urin wurden für jeden Probanden maximal 5 Urinproben verteilt über die Studientage gemessen. Die Urinproben wurden wie unter 5.3.1 beschrieben aufbereitet und mit beiden MRM-Methoden analysiert. Einzig und allein die Fällung mit Acetonitril erfolgte nicht fraktioniert, da bei Urin erwartungsgemäß nur kleine Substanzmengen ausfallen.

6.5.1 Intravenöse Applikation

Ein erster Blick bei der Auswertung richtete sich auf THCA. Findet sich unmetabolisierte Ausgangssubstanz im Urin und wenn ja, in welchem Ausmaß? Eine Quantifizierung der THCA in Urin war zwar nicht möglich, da aber D₃-THCA zudotiert wurde, konnten die absoluten Peakflächen der THCA auf den internen Standard bezogen werden. Bei den Probanden F und O waren deutliche Signale erkennbar, das höchste Peakflächenverhältnis von THCA zu D₃-THCA belief sich jedoch nur auf 0,207 (Urinprobe von F nach 1,6 Stunden). Die Konzentration von D₃-THCA in einer Probe beträgt ca. 7,5 ng/ml. Geht man von annähernd gleicher Ionisierbarkeit der beiden Substanzen aus, ergibt sich aus dem höchsten Peakflächenverhältnis von allen eine ungefähre THCA-Konzentration von 1,5 ng/ml. Es findet sich demnach zwar unmetabolisierte THCA im Urin, aber nur in Spuren.

In Bezug auf die Anwesenheit bestimmter Metabolite differiert das Bild im Urin nur leicht von dem im Serum. Bis auf 8,11-Bis-OH-THCA fanden sich alle auch im Serum detektierten Metabolite und zusätzlich drei weitere Substanzen. Aus der Betrachtung herausgenommen wurde Proband K, der erst nach zwei Tagen die erste Urinprobe abgab. Aussagen über Metaboliten, die vor allem kurz nach der Injektion im Urin auftauchten, sind bei diesem Probanden deshalb unmöglich. Bei allen anderen 15 Probanden konnten nach intravenöser Applikation folgende Metaboliten im Urin nachgewiesen werden:

- THCA-COOH
- 4'-OH-THCA-COOH
- 9,10-Bis-OH-HHCA
- THCA-Glucuronid
- 11-OH-THCA-Glucuronid
- THCA-8-on-Glucuronid
- THCA-COOH-Glucuronid
- 8-OH-THCA-Glucuronid
- 4'-OH-THCA-Glucuronid
- 8,11-Bis-OH-THCA-Glucuronid

Nicht bei allen der 15 Probanden nachweisbar waren:

- 11-OH-THCA
- 8 α -OH-THCA
- 8 β -OH-THCA
- THCA-8-on
- 8-OH-THCA-COOH

Generell nicht detektierbar waren zwei Metabolite:

- 8,11-Bis-OH-THCA
- 9,10-Bis-OH-THCA-Glucuronid

In Bezug auf die Höhe der Signale bei den verschiedenen Probanden unterscheidet sich das Bild im Urin stärker von dem im Serum. Trägt man die absoluten Peakflächen der Metabolite gegen die Zeit nach der Applikation des THCA-Bolus auf, ergeben sich Metabolitenprofile, von denen drei in Abb. 32 dargestellt sind. Aufgrund der verschiedenen Probennahmezeitpunkte und unterschiedlichen Verdünnungsgraden des Urins erscheinen die Profile auf den ersten Blick wenig ähnlich. Eine Gemeinsamkeit lässt sich jedoch bei allen feststellen: Die intensivsten Signale werden durchweg von vier Glucuroniden hervorgerufen, deren Kurven sich klar über denen der anderen Substanzen abzeichnen. Diese sind: THCA-COOH-Glucuronid (—), 11-OH-THCA-Glucuronid (—) sowie 8- bzw. 4'-OH-THCA-COOH-Glucuronid (— und —).

Proband F gab drei Urinproben innerhalb von 12 Stunden ab, so dass sich anhand dieses Profils gut zeigen lässt, dass zu Beginn neben den vier bereits oben erwähnten Hauptmetaboliten auch andere Metabolite im Urin zu finden sind, unter anderem alle monohydroxylierten Produkte und nicht-glucuronidierte THCA-COOH. Das Profil von Proband E wiederum zeigt exemplarisch, wie sich die Metabolitenmengen schlagartig mit dem Verdünnungsgrad des Urins verändern. Während in der Probe nach 8,05 Stunden intensive Signale für sowohl Haupt- als auch Nebenmetabolite auftreten, brechen die Kurven anderthalb Stunden später – nach 9,25 Stunden – regelrecht ein. Im dritten Profil, das aus den Ergebnissen der Proben von Proband P erstellt wurde, zeigt sich ein Trend, der zwar nicht bei allen Probanden so deutlich wie hier, aber klar erkennbar auftrat. Der Metabolit 9,10-Bis-OH-HHCA, der schon im Serum sehr lange nachweisbar war, ist dies auch im Urin vieler Probanden, z. T. länger als alle vier oben genannten Hauptmetaboliten.

absolute Peakfläche,
cps*h

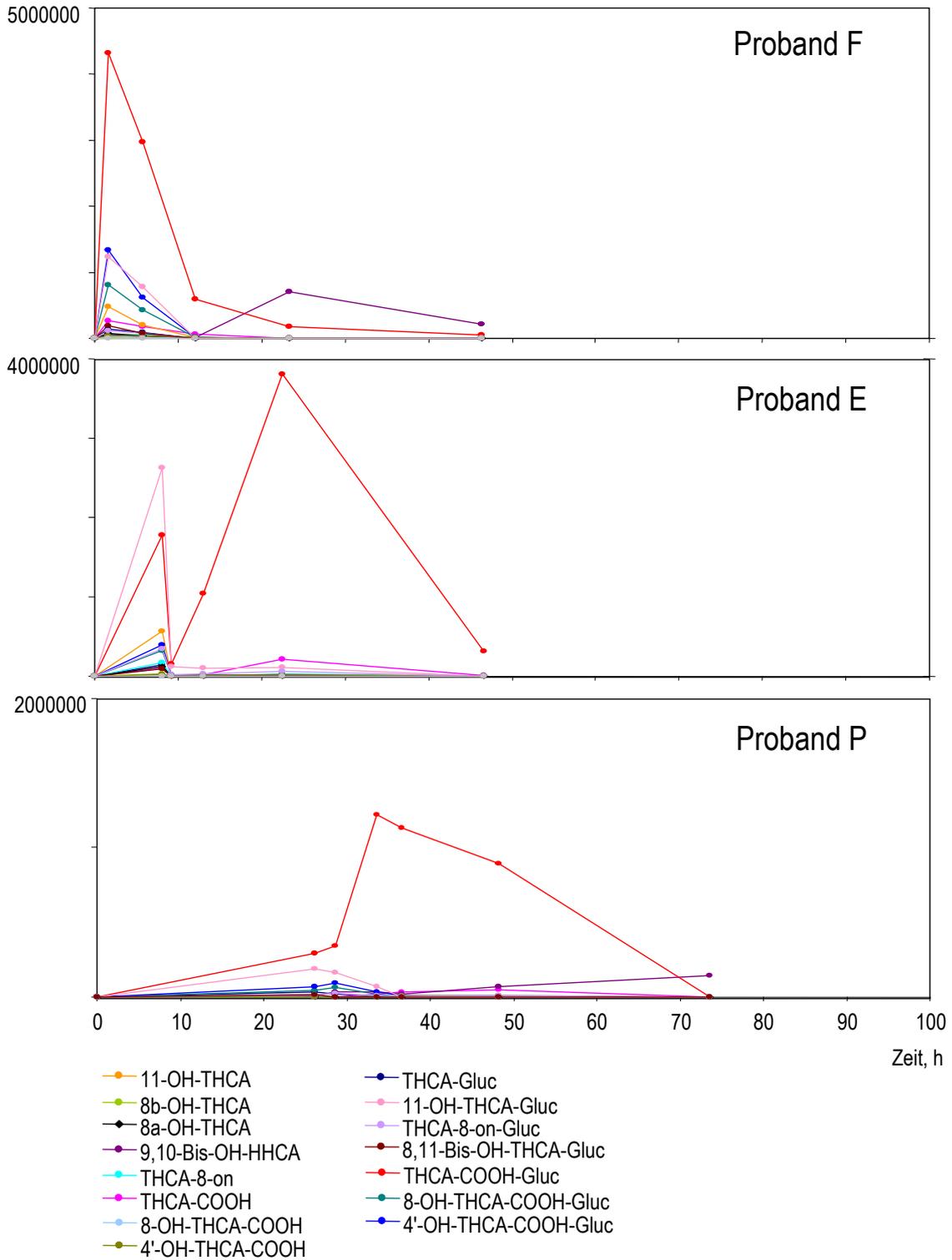


Abb. 32: Metabolitenprofile im Urin von Proband F, E und P nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA

6.5.2 Orale Applikation

Urinproben eines Probanden mit sehr schneller, eines Probanden mit durchschnittlicher und eines Probanden mit verlangsamter THCA-Resorption gemäß der Gruppeneinteilung wurden ausgewählt und vermessen. So erhält man für jede der drei Gruppen ein repräsentatives Beispielprofil. Im Nachhinein stellte sich heraus, dass die Probanden aufgrund eines Missverständnisses nach spätestens 24 Stunden keine Urinproben mehr gesammelt hatten, so dass die in Abb. 33 dargestellten Profile nur eine kurze Zeitspanne nach der Applikation abdecken.

Generell bestätigte sich das Bild, das sich schon nach der intravenösen Applikation zeigte. Nach oraler Applikation von THCA waren im Urin folgende Metabolite bei allen drei Probanden nachweisbar:

- 11-OH-THCA
- 8 β -OH-THCA
- THCA-8-on
- THCA-COOH
- 4'-OH-THCA-COOH
- THCA-Glucuronid
- 11-OH-THCA-Glucuronid
- THCA-8-on-Glucuronid
- THCA-COOH-Glucuronid
- 8-OH-THCA-Glucuronid
- 4'-OH-THCA-Glucuronid

Nicht bei allen Probanden nachweisbar waren:

- 8 α -OH-THCA (nicht bei H)
- 8-OH-THCA-COOH (nicht bei H und B)
- 8,11-Bis-OH-THCA-Glucuronid (nicht bei B)

Generell nicht detektierbar waren drei Metabolite:

- 8,11-Bis-OH-THCA
- 9,10-Bis-OH-HHCA
- 9,10-Bis-OH-THCA-Glucuronid

Die vier Metabolite, die bei allen drei Probanden die intensivsten Signale erzeugten, waren nach oraler Applikation ebenfalls THCA-COOH-Glucuronid (—), 11-OH-THCA-Glucuronid (—) sowie 8- bzw. 4'-OH-THCA-COOH-Glucuronid (— und —). 9,10-Bis-OH-HHCA war in den Urinproben nach oraler Gabe nicht nachweisbar. Die Frage, ob dieser Metabolit erst nach einigen Stunden in relevanter d.h. nachweisbarer Menge gebildet wird und dann auch nach oraler Gabe nach mehreren Tagen im Urin nachweisbar ist, muss aufgrund fehlender Urinproben zu späteren Zeitpunkten unbeantwortet bleiben.

absolute Peakfläche,
cps*h

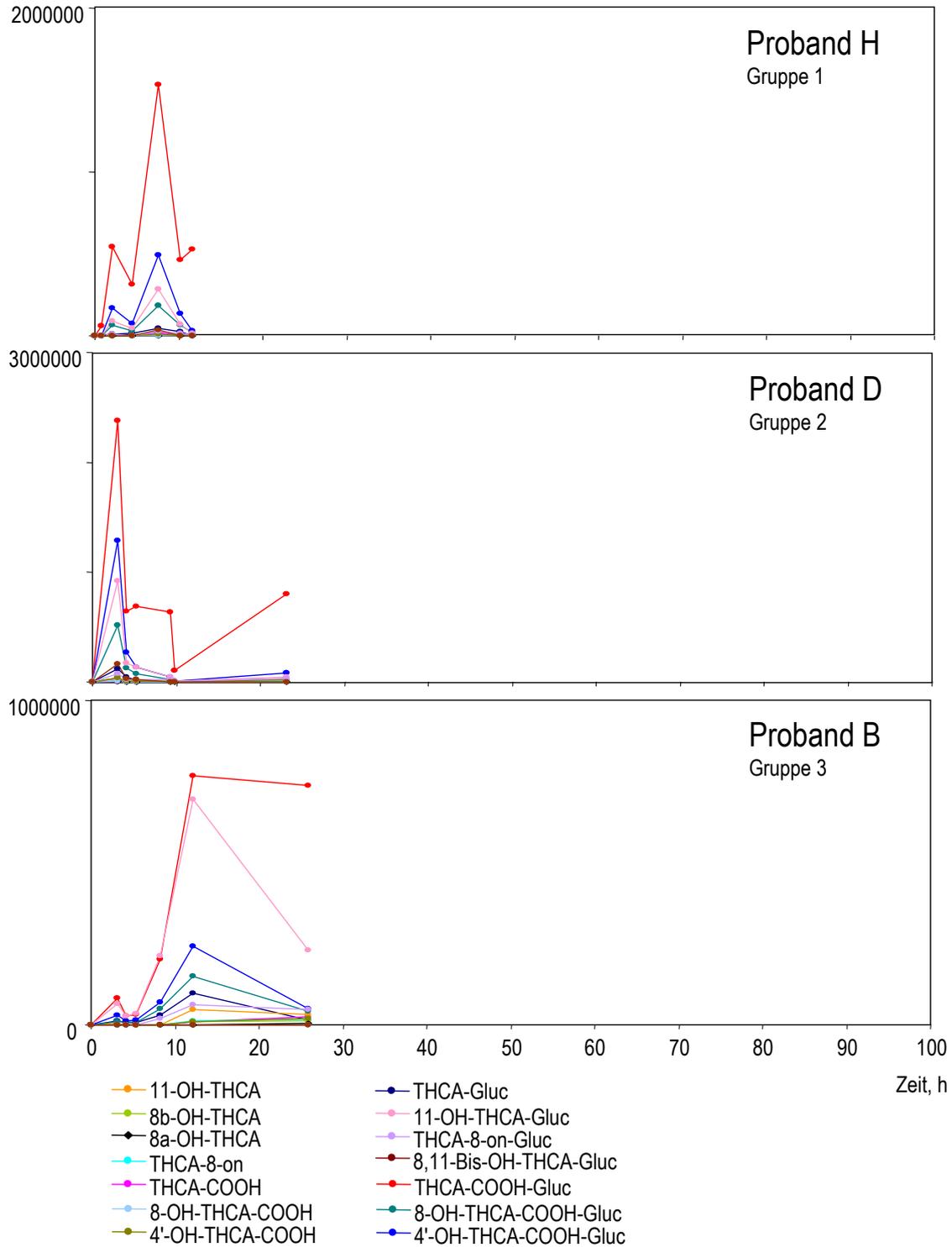


Abb. 33: Metabolitenprofile im Urin von Proband H, D und B nach oraler Applikation von 10 mg THCA. Diese drei Probanden wurden beispielhaft für die in Abb. 29 dargestellten drei Gruppen ausgewählt.

6.6 Phänotypisierung und Genotypisierung

Phänotyp und Genotyp jedes Probanden wurden nach der Methodik, wie sie unter 5.1 beschrieben ist, bestimmt. Die Messung der Nullseren zu Beginn bestätigte, dass sich alle Probanden an die vorgeschriebene Coffeinabstinenz gehalten hatten und demzufolge alle Proben verwertbar waren. Nach Erstellung von Kalibrationsgeraden für jeden Analyten wurden die 24-Stunden-Proben 1:10 verdünnt und die 4-Stunden-Proben zunächst 1:10 verdünnt, dann unverdünnt aufbereitet und gemessen. Die gefundenen Analytkonzentrationen sind in Tab. 22 zusammengefasst.

Tab. 22: Phänotypisierungsstudie: gemessene Konzentrationen der Cocktailsubstanzen Coffein, Tolbutamid, Omeprazol, Dextromethorphan und Midazolam sowie ihrer Metabolite Paraxanthin, 5-OH-Omeprazol und Dextrophan, * Werte in Klammern liegen unter der Bestimmungsgrenze

	C _{Coffein}	C _{Paraxanthin}	C _{Tolbutamid}	C _{Omeprazol}	C _{5-OH-Omeprazol}	c _{Dextromethorphan}	C _{Dextrophan}	C _{Midazolam}
	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l	µg/l
A	1660	792	2930	11	10	0,76	4,5	2,77
B	1340	671	1530	29	61	1,3	2,2	1,17
C	2360	420	1280	1100	248	0,76	2,1	4,39
D	2450	497	2970	41	34	34,9	0,3	0,898
E	1170	1160	885	12	18	0,78	2,5	1,11
F	1700	639	3260	16	34	2,2	4,3	1,7
G	2090	641	2430	283	204	1,1	1,6	2,11
H	1890	901	1030	326	132	3,9	4,1	1,49
I	1400	920	945	95	32	30,1	0,3	(0,355)*
J	1300	618	1630	9,1	25	4,7	6,3	1,01
K	2280	842	1680	369	152	40,8	0,3	2,38
L	2080	466	6640	72	79	17,5	4,8	1,79
M	1280	670	2090	58	46	3,2	2,3	1,8
N	1850	791	6990	179	199	4,6	6	1,47
O	921	755	2410	18	38	26	(0,1)*	1,47
P	1150	788	1790	35	65	1,6	3,2	0,979

Aus diesen Konzentrationen berechneten sich gemäß der in 5.1.2 aufgeführten Formeln die entsprechenden Phänotypisierungsindices für CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6 und CYP 3A4. Alle Indices und die ermittelten Genotypen sind in Tab. 23 aufgeführt.

Ein Phänotypisierungsindex (PI) allein sagt nicht viel aus, denn erst im Vergleich mit anderen Werten lässt sich diese abstrakte Größe einordnen. Referenzwerte für die verwendeten Indices aus Untersuchungen größerer Populationen liegen aber bisher nicht vor. Anhand der Berechnungsformeln gelten prinzipiell folgende Aussagen: Je größer der PI für CYP 1A2 und CYP 2C19, desto schneller baut der Körper Coffein bzw. Omeprazol ab. Und umgekehrt gilt: Je kleiner der PI für CYP 2C9, CYP 2D6 und CYP3A4, desto schneller verstoffwechselt der Körper Tolbutamid, Dextromethorphan bzw. Midazolam.

Tab. 23: Phänotypisierungsindices (PI) und Genotypen aller Probanden der Humanstudie, grün markiert ist der niedrigste, blau markiert der höchste Wert in der jeweiligen Reihe

	CYP 1A2		CYP 2C9		CYP 2C19		CYP 2D6		CYP 3A4	
	PI	Genotyp	PI	Genotyp	PI	Genotyp	PI	Genotyp	PI	Genotyp
A	0,514	*1F/WT	1,075	*2/WT	0,869	WT/WT	0,160	*2/WT	2,770	WT/WT
B	0,540	*1F/WT	0,425	*2/WT	2,010	WT/WT	0,560	*4/WT	1,170	WT/WT
C	0,192	*1F/WT	0,247	WT/WT	0,215	WT/WT	0,343	WT/WT	4,390	WT/WT
D	0,219	*1F/*1F	1,089	WT/WT	0,793	WT/WT	110	*4/*4	0,898	WT/WT
E	1,069	WT/WT	-0,122	WT/WT	1,434	WT/WT	0,296	*2/WT	1,110	WT/WT
F	0,405	*1F/*1F	1,182	WT/WT	2,031	WT/WT	0,485	WT/*2	1,700	WT/WT
G	0,331	*1F/WT	0,888	WT/WT	0,689	WT/WT	0,652	WT/*2	2,110	WT/WT
H	0,514	*1F/*1F	0,030	WT/WT	0,387	*2/WT	0,902	WT/WT	1,490	WT/WT
I	0,708	*1F/*1F	-0,057	WT/WT	0,322	WT/WT	95	*4/*4	0,355	WT/WT
J	0,512	*1F/WT	0,489	WT/WT	2,626	WT/WT	0,707	*2/WT	1,010	WT/WT
K	0,398	*1F/WT	0,519	WT/WT	0,394	*2/WT	129	*4/*4	2,380	WT/WT
L	0,241	*1F/WT	1,893	*3/WT	1,049	WT/WT	3,457	*4/WT	1,790	WT/WT
M	0,564	WT/WT	0,737	WT/WT	0,758	*2/WT	1,319	*2/*4	1,800	WT/WT
N	0,461	*1F/*1F	1,944	*3/WT	1,063	WT/WT	0,727	*2/*4	1,470	WT/WT
O	0,884	*1F/*1F	0,880	*2/WT	2,018	WT/WT	247	*4/WT	1,470	WT/WT
P	0,739	*1F/*1F	0,582	WT/WT	1,775	WT/WT	0,474	*2/WT	0,979	*1G/WT
	$\frac{C_{PX}}{C_{COFF}}$		$\ln c_{TOLB}$		$\frac{C_{5-OH-OMP}}{C_{OMP}}$		$\frac{C_{DXM}}{C_{DEX}}$		C_{MID}	

Die Genotypen, die für die 16 Probanden ermittelt wurden, stimmten teilweise gut, teilweise auch überhaupt nicht mit den Tendenzen der Enzymaktivitäten überein. Die Interpretation der Genotypen bleibt daher eher unscharf. Zu viele Einflussfaktoren bestimmen die Enzymaktivität, so dass widersprüchliche Ergebnisse durch viele andere Ursachen erklärt werden können. Zum einen sind in den seltensten Fällen beide Allele mutiert, so dass das zweite Wildtyp-Allel immer ausgleichend wirken kann, zum anderen können externe Induktoren und Inhibitoren den Einfluss eines Allels schwächen.

- CYP 1A2: *1F bedeutet generell eine gesteigerte Enzymaktivität. Es sind in dieser Richtung jedoch keine Tendenzen im Probandenkollektiv zu erkennen. Proband E mit zwei Wildtyp-Allelen zeigt entgegen den Erwartungen den höchsten Phänotypisierungsindex. Der zweite Proband mit ebenfalls zwei Wildtyp-Allelen liegt im Mittelfeld. Den niedrigsten PI hat Proband C, der sogar ein *1F-Allel besitzt. Probanden mit zwei *1F-Allelen, die sich durch besonders hohe Enzymaktivitäten bemerkbar machen sollten, unterscheiden sich nicht von den anderen Probanden mit nur einem *1F-Allel. Mögliche Ursachen könnten eine Induktion durch Coffeinkonsum im Vorfeld [129, 130] oder auch Rauchen sein.

- CYP 2C9: Die Mutationen *2 und *3 verringern die Enzymaktivität. Probanden, die ein solches Allel aufweisen, sollten theoretisch einen höheren Phänotypisierungsindex haben als die anderen. Bei den Probanden M und N, die ein *3-Allel besitzen, finden sich tatsächlich die höchsten Werte von allen, so dass in diesem Fall die Tendenz stimmt. Dagegen lässt sich bei allen Probanden, die ein *2-Allel besitzen und daher Tolbutamid ebenfalls langsamer abbauen sollten, kein Trend feststellen. Zumindest liegen die dazugehörigen Phänotypisierungsindices eher im oberen Bereich.
- CYP 2C19: Ein *2-Allel führt zu einer herabgesetzten Enzymaktivität, der dazugehörige Phänotypisierungsindex sollte im Vergleich zu reinen Wildtypen niedriger liegen. Im Probandenkollektiv gehört zwar weder der niedrigste PI einem *2-Träger noch bleiben die „mutierten“ Probanden im unteren Bereich unter sich – zu erkennen ist aber, dass ihre Werte tendenziell niedriger sind.
- CYP 2D6: Dieses Enzym ist besonders populär für seine ausgeprägten und klinisch relevanten Polymorphismen. An dieser Stelle zeigten sich die deutlichsten Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp. Besonders auffällig waren vier Probanden (D, I, K und O), die einen im Vergleich mit den anderen hohen Dextromethorphan- und extrem niedrigen Dextrorphan Spiegel aufwiesen. Diese offensichtlich schlecht abbauenden „poor metabolizer“ wiesen alle eine bzw. zwei *4-Mutationen auf, die zur Produktion eines nichtfunktionalen Enzyms führen.

Bemerkenswerterweise besitzen noch vier andere Probanden diese Mutation (B und L in Kombination mit einem Wildtyp-Allel, M und N in Kombination mit einem *2-Allel), die aber keinen eklatant hohen Phänotypisierungsindex zeigten. Während bei Proband O das zweite Wildtyp-Allel den totalen Funktionsausfall offensichtlich nicht zu kompensieren vermag, scheint bei den beiden unauffälligen Probanden das jeweils zweite Allel für eine normale CYP 2D6-Aktivität zu sorgen. Die *2-Mutation beeinflusst die Enzymaktivität weder negativ noch positiv und bleibt daher bedeutungslos. Möglicherweise weist das zweite Allel von Proband O, der den höchsten Phänotypisierungsindex von allen hat, eine noch nicht bekannte Mutation auf, die ebenfalls zu einem nichtfunktionalen Enzym führt.

- CYP 3A4: Bis auf Proband P, der als einziger Proband eine *1G-Mutation besitzt, haben alle anderen Probanden zwei Wildtyp-Allele. Eine *1G-Mutation führt zu einer Enzymaktivität, die auf dem Niveau der Wildtypen liegt. Unterschiede bei den Phänotypisierungsindices sind daher nicht mit Hilfe von Genotypen erklärbar.

Die ermittelten Phänotypisierungsindices spielen später bei der statistischen Analyse (siehe Kapitel 6.9) eine Rolle.

6.7 Pharmakokinetische Berechnungen: intravenöse Applikation

Eine Demoversion der Software Kinetica®, Version 5.0 von Thermo Fischer Scientific diente zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter. Gemäß den Beschreibungen in Kapitel 3 wurden die Daten einer Nicht-Kompartiment- und einer Kompartimentanalyse unterzogen.

6.7.1 Nicht-Kompartimentanalyse

Wie bereits erwähnt, sind aus den Konzentration-Zeit-Verläufen die c_{\max} und die t_{\max} , bei intravenöser Applikation naturgemäß der Zeitpunkt der ersten Probennahme, direkt ablesbar. Die sekundären Parameter berechnete Kinetica wie folgt:

- AUC: Kinetica ermittelt die Flächen mit dem „mixed log linear“-Modus, einer Kombination der linearen und der log-linearen Trapezregel. Für die $AUC_{0-\text{last}}$ wird nur die Fläche bis zum letzten genau quantifizierten Messwert berechnet, d. h. die Punkte unter 1 ng/ml bleiben unberücksichtigt. Aus dem Kurvenverlauf kann dann der weitere Abfall der THCA-Konzentration bis zum Punkt 0 extrapoliert und diese zusätzliche Fläche zur $AUC_{0-\text{last}}$ addiert werden. Daraus ergibt sich die AUC_{total} . Nach dem gleichen Schema berechnen sich auch die AUMCs.
- c_0 : Für die Berechnung von c_0 wurden in dieser Auswertung die ersten fünf Messwerte extrapoliert.
- $t_{1/2}$:
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{L_z}$$

Bei der Nicht-Kompartimentanalyse soll $t_{1/2}$ für die terminale Eliminationsphase gelten, L_z steht für die kleinste Verteilungskonstante. Aufgrund der sehr niedrigen THCA-Konzentrationen, die sich in der terminalen Phase größtenteils unterhalb der LOQ bewegen, lässt sich diese Phase hier schlecht abbilden. Das Zeitintervall zur Ermittlung von L_z wurde deshalb auf 45 min – 10 Stunden festgelegt. In diesem Bereich, der der zweiten Umverteilungsphase entspricht, folgen die Werte in halblogarithmischer Darstellung annähernd einer Geraden. Die berechnete Halbwertszeit gilt demzufolge nicht für die terminale, sondern für diese Umverteilungsphase (β -Phase).

Die Werte gegen Ende der Beobachtungsdauer liegen für einige Parametern unter der LOQ und dürften streng genommen nicht berücksichtigt werden. Da sie jedoch über der LOD liegen und klar erkennbar ist, dass noch THCA im Serum vorhanden ist, wurden sie für die Berechnungen der AUC und AUMC eingeschlossen. So ergibt sich zumindest für die $AUC_{0-\text{last}}$ und die $AUMC_{0-\text{last}}$ ein genauerer Wert.

Nachteilig wirkt sich der Einschluss dieser Werte dagegen auf die AUC_{total} und $AUMC_{\text{total}}$ aus. Normalerweise macht die extrapolierte Fläche nur einen relativ geringen Anteil an der Gesamtfläche aus. Verläuft die Eliminationsgerade aber sehr flach, ergeben sich große zusätzliche, extrapolierte Flächen und unrealistisch hohe Werte für die AUC_{total} und $AUMC_{\text{total}}$. Die daraus errechneten Werte für die MRT und das Verteilungsvolumen im Steady State, V_{ss} , können daher ebenfalls nicht als plausibel angesehen werden. Sie wurden deshalb in Abwandlung der in Kapitel 3 vorgestellten Formeln folgendermaßen berechnet:

$$\text{MRT} = \frac{\text{AUMC}_{0-\text{last}}}{\text{AUC}_{0-\text{last}}} \quad V_{\text{ss}} = \frac{\text{Dosis} \cdot \text{MRT}}{\text{AUC}_{0-\text{last}}}$$

Tab. 24 fasst alle pharmakokinetischen Parameter zusammen. Grau hinterlegt sind die Werte der AUC_{0-last} und der AUC_{total} der Probanden E, I und O, an denen man deutlich erkennt, wie groß die Unterschiede werden können. Diese drei Probanden sind es auch, bei denen sich in der Folge unrealistische Werte für die MRT und das Verteilungsvolumen im Steady State ergeben hätten.

Tab. 24: Nicht-Kompartimentalanalyse: Pharmakokinetische Parameter der 16 Probanden nach intravenöser Applikation von 5 mg THCA, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung

	C_{max} µg/l	AUC_{0-last} µg*h/l	AUC_{total} µg*h/l	$AUMC_{0-last}$ µg*h ² /l	$AUMC_{total}$ µg*h ² /l	C_0 µg/l	CL ml/min	MRT h	$t_{1/2\ beta}$ h	V_z l	V_{ss} l
A	879	1089.0	1091.0	2618	2682.0	1112	76	2.4	1,7	4.5	11.0
B	873	1181.0	1183.0	3186	3218.0	998	70	2.7	2,3	5.0	11.4
C	796	698.0	699.0	925	938.0	944	119	1.3	1,3	5.3	9.5
D	1030	1122.0	1128.0	2662	3604.0	1089	73	2.4	1,5	4.6	10.6
E	846	1221.0	1319.0	5307	38109.0	959	63	4.3	1,9	5.2	17.8
F	740	851.0	853.0	2479	2672.0	849	97	2.9	1,6	5.9	17.1
G	867	1238.0	1239.0	2830	2861.0	1014	67	2.3	1,8	4.9	9.2
H	935	765.0	794.0	2049	9202.0	1171	104	2.7	1,2	4.3	17.5
I	891	876.0	1117.0	3221	176326.0	1066	74	3.7	1,4	4.7	21.0
J	653	1104.0	1164.0	4975	20204.0	715	71	4.5	1,9	7.0	20.4
K	912	1439.0	1449.0	4528	6175.0	1045	57	3.1	1,9	4.8	10.9
L	960	1277.0	1277.0	3854	3923.0	1015	65	3.0	2	4.9	11.8
M	955	1088.0	1091.0	3932	4251.0	969	76	3.6	1,8	5.2	16.6
N	1010	1359.0	1413.0	5041	17569.0	1167	58	3.7	1,6	4.3	13.6
O	799	1178.0	1299.0	4702	59375.0	949	64	4.0	1,8	5.3	16.9
P	1060	1233.0	1300.0	4184	23704.0	1336	64	3.4	1,5	3.7	13.8
MW	888	1107	1151	3531	23426	1025	75	3,1	1,7	5,0	14,3
SD	107	210	214	1237	43795	141	17	0,8	0,3	0,7	3,9

6.7.2 Kompartimentalanalyse

Fitting

Für die Auswertung der im Humanversuch erhaltenen Konzentrations-Zeit-Kurven wurden das Zwei- und Drei-Kompartiment-Modell in Kombination mit verschiedenen Wichtungen (keine Wichtung, $1/c_{real}$, $1/c_{real}^2$, $1/c_{berechnet}$, $1/c_{berechnet}^2$) getestet. Da ganz offensichtlich bei den meisten Probanden eine dritte, terminale Phase mit sehr niedrigen Analytkonzentrationen vorliegt, wurden auch THCA-Konzentrationen unter der LOQ (aber über der LOD) eingeschlossen, um einen prinzipiellen Eindruck vom Verlauf der Fitting-Funktion und der Größenordnung der Makrokonstanten zu erhalten. Diese Werte sind allerdings nur als Anhaltspunkt zu betrachten. In Tab. 25 sind die statistischen Parameter für alle Kombinationen eines Probanden aufgelistet, deren Fitting-Funktionen sich nach visueller Beurteilung als prinzipiell passend herausstellten. Je kleiner die Werte für „objective function“, Akaike-Kriterium und Schwartz-Kriterium, desto besser passt die errechnete Funktion.

Tab. 25: Statistische Parameter für die Fitting-Funktionen mit verschiedenen Wichtungsfaktoren und unter Annahme eines Zwei- oder Drei-Kompartiment-Modells, **fett** markiert ist das jeweils beste Modell (Err = keine Rückrechnung auf Basis des Drei-Kompartiment-Modells mit der Residualmethode möglich – wahrscheinlich aufgrund fehlender Werte für die terminale Phase)

	Kompartimente	Wichtung	objective function	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium	
A	3	$1/C_{real}^2$	0,214331	-15,7242	-19,0531	terminale Phase nicht gut erkennbar, da ab 36 h THCA nicht mehr nachweisbar
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,192435	-17,664	-20,9928	
	2	$1/C_{real}^2$	0,528733	-3,47088	-5,69014	
	2	$1/C_{berechnet}^2$	0,638085	-0,0871046	-2,30636	
B	3	$1/C_{real}^2$	Err	Err	Err	terminale Phase nicht gut erkennbar, da ab 36 h THCA nicht mehr nachweisbar
	3	$1/C_{berechnet}^2$	Err	Err	Err	
	2	$1/C_{real}^2$	0,0806961	-29,756	-32,3399	
	2	$1/C_{berechnet}^2$	0,0908338	-27,9808	-30,5647	
C	3	$1/C_{real}^2$	Err	Err	Err	terminale Phase nicht gut erkennbar da ab 24 h THCA nicht mehr nachweisbar
	3	$1/C_{berechnet}^2$	Err	Err	Err	
	2	$1/C_{real}^2$	0,286497	-10,7504	-13,3343	
	2	$1/C_{berechnet}^2$	0,224011	-14,4409	-17,0248	
D	3	$1/C_{real}^2$	0,326813	-9,24896	-12,4156	
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,505317	-0,968807	-4,13549	
	2	$1/C_{real}^2$	5,0359	38,7152	36,6041	
E	3	$1/C_{real}^2$	0,205317	-19,664	-22,6768	
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,355052	-8,70984	-11,7226	
F	3	$1/C_{real}^2$	0,244314	-16,186	-19,1988	
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,285534	-13,0679	-16,0807	
G	3	$1/C_{real}^2$	0,0311279	-43,5144	-47,1966	terminale Phase nicht erkennbar, da ab 36 h THCA nicht mehr nachweisbar
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,0326443	-42,7534	-46,4356	
	2	$1/C_{real}^2$	0,136073	-23,913	-26,3678	
	2	$1/C_{berechnet}^2$	0,149835	-22,3715	-24,8263	
H	3	$1/C_{real}^2$	0,234813	-16,9793	-19,9922	
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,222856	-18,0246	-21,0374	
I	3	$1/C_{real}^2$	0,314443	-11,1391	-14,1519	
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,331349	-10,0916	-13,1044	
J	3	$1/C_{real}^2$	0,135517	-27,9732	-30,986	
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,156521	-25,0913	-28,1041	
	2	$1/C_{real}^2$	1,14245	10,6635	8,65492	
	2	$1/C_{berechnet}^2$	1,97327	21,5939	19,5853	
K	3	$1/C_{real}^2$	0,30332	-11,8594	-14,8722	
	3	$1/C_{berechnet}^2$	0,347177	-9,15842	-12,1712	
	2	$1/C_{real}^2$	0,968085	7,3513	5,34276	
	2	$1/C_{berechnet}^2$	2,08374	22,6833	20,6748	

	Kompartimente	Wichtung	objective function	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium
L	3	$1/C_{\text{real}}^2$	1,43332	19,1999	16,1871
	3	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	1,09715	13,8544	10,8416
	2	$1/C_{\text{real}}^2$	1,98964	21,7591	19,7505
	2	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	10,4458	54,9241	52,9155
M	3	$1/C_{\text{real}}^2$	0,173859	-22,9902	-26,003
	3	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	0,227227	-17,6361	-20,6489
	2	$1/C_{\text{real}}^2$	1,27763	12,9001	10,8916
	2	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	3,39737	32,46	30,4515
N	3	$1/C_{\text{real}}^2$	0,0925414	-35,602	-38,6148
	3	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	0,103724	-33,3205	-36,3333
	2	$1/C_{\text{real}}^2$	1,11342	10,1487	8,1402
	2	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	1,25808	12,5917	10,5832
O	3	$1/C_{\text{real}}^2$	0,300186	-12,0671	-15,0799
	3	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	0,849482	8,73742	5,72462
P	3	$1/C_{\text{real}}^2$	0,176613	-22,6759	-25,6887
	3	$1/C_{\text{berechnet}}^2$	0,220515	-18,2358	-21,2486

Kurvenanpassung, Wichtung und Evaluierung lieferten zusammengefasst folgende Ergebnisse:

1. Funktionen ohne Wichtung oder mit $1/C_{\text{real}}$ - bzw. $1/C_{\text{berechnet}}$ -Wichtung erwiesen sich generell als ungeeignet. Auch einige Zwei-Kompartiment-Modelle gaben den Kurvenverlauf nur unzureichend wieder.
2. Abgesehen von zwei Probanden (B und C), bei denen mangels ausreichend genau bestimmbarer terminaler Phase keine Fitting-Funktion ermittelt werden konnte, beschrieb bei allen anderen ein Drei-Kompartiment-Modell mit Wichtung den Verlauf am besten. Für 10 Probanden ergab eine Wichtung mit dem Faktor $1/C_{\text{berechnet}}^2$ das beste Ergebnis, für 4 Probanden eine Wichtung mit $1/C_{\text{real}}^2$, wobei an dieser Stelle aber nur geringe Unterschiede auftraten.
3. Die Kurven der Probanden B und C ließen sich nur mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben. Bei B ergab eine Wichtung mit $1/C_{\text{real}}^2$, bei C mit $1/C_{\text{berechnet}}^2$ das beste Ergebnis.

Makro- und Mikrokonstanten

Für die Berechnung der Makro- und Mikrokonstanten galten folgende Regeln: Wenn möglich wurden die Kurven auf Basis eines Drei-Kompartiment-Modells angepasst. Da es nur geringe Unterschiede bei der Anpassungsgüte unter Verwendung der zwei verschiedenen Wichtungsfaktoren $1/C_{\text{berechnet}}^2$ bzw. $1/C_{\text{real}}^2$ gab, wurde für alle Kurven zur besseren Vergleichbarkeit einheitlich der Wichtungsfaktor $1/C_{\text{real}}^2$ eingesetzt. Die Kurven der Probanden A, B, C und G wurden außerdem unter der Annahme eines Zwei-Kompartiment-Modells gefittet und daraus die Konstanten berechnet. Wichtungsfaktor war $1/C_{\text{real}}^2$, der gemäß Tab. 25 die besten Resultate lieferte. In Tab. 26 findet sich eine Übersicht über alle berechneten Makro- und Mikrokonstanten sowie die abgeleiteten pharmakokinetischen Parameter. Folgende Schlussfolgerungen lassen sich daraus ziehen:

1. Die von Kinetica eingezeichneten Fitting-Funktionen entsprechen generell sehr gut den gemessenen Verläufen und sind ebenfalls gut mit einem Drei-Kompartiment-Modell in Einklang zu bringen.
2. Nur die Profile von A und G stellen eine Ausnahme dar. Wie schon bei B und C, bei denen in Ermangelung einer nachvollziehbaren dritten Phase kein mathematisches Modell erstellt werden konnte, ergaben sich für A und G aus dem gleichen Grund stark von allen anderen abweichende Werte für die Makrokonstanten der dritten Phase (C , γ) und deren Halbwertszeit $t_{1/2 \gamma}$. Diese Werte sind in Tab. 26 grau unterlegt und blieben bei der Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen außen vor. Auch in alle Geschwindigkeitskonstanten und die fiktive Anfangskonzentration c_0 gehen C und γ ein, allerdings nur als ein Term unter mehreren. Diese Werte fielen daher nicht durch extreme Abweichungen auf.
3. In der Tabelle ist gut zu erkennen, dass die Steigungen der rückgerechneten Geraden genauso wie ihre theoretischen Schnittpunkte mit der y-Achse zur terminalen Phase hin abnehmen: $\alpha \gg \beta \gg \gamma$ und $A > B \gg C$. Das entspricht dem nach dem Modell logischen Verlauf.
4. Interessant sind die Halbwertszeiten, die sich den drei Phasen zuordnen lassen: Diese betragen im Mittel $0,32 \pm 0,1$ h für die α -Phase, $1,8 \pm 0,3$ h für die β -Phase und 66 ± 24 h für die terminale Phase.
5. Die Erwartung, für A und G mit dem Zwei-Kompartiment-Modell plausiblere Ergebnisse zu erhalten, erfüllte sich nicht – im Gegenteil. Die fiktive Anfangskonzentration c_0 ergibt sich bei der Kompartimentanalyse aus der Summe aller präexponentiellen Faktoren. Für A und G errechneten sich c_0 -Werte unterhalb der nach 5 Minuten gemessenen Plasmakonzentration, was darauf schließen lässt, dass die angepassten Fitting-Funktionen kaum der Realität entsprechen. Auch in alle Berechnungen der Mikrokonstanten fließt c_0 ein. Ist dieser Wert unplausibel, sind auch die berechneten Mikrokonstanten als wenig sinnvoll zu erachten. Der beste Kompromiss für die Probanden A und G bestand schließlich darin, die Kurven zwar mit einem Drei-Kompartiment-Modell anzupassen, die berechneten Werte der terminalen Phase jedoch außer Acht zu lassen. Offensichtlich bieten drei Kompartimente größere Freiheit für die Regressionsgeraden der α - und β -Phase, so dass diese besser mit den gemessenen Punkten in Übereinstimmung gebracht werden können.

Tab. 26 (nächste Seite): Kompartimentanalyse: Übersicht über Makro- und Mikrokonstanten und die daraus berechneten pharmakokinetischen Parameter auf Basis eines Drei- bzw. Zwei-Kompartimentmodells, für die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden die grau markierten Werte ausgeschlossen (Näheres im Text), * unplausible Werte, die berechneten Konzentrationen zum Zeitpunkt $t = 0$ sind niedriger als die tatsächlich beobachteten zum Zeitpunkt $t = 5$ Minuten

DREI-KOMPARTIMENT-MODELL (Wichtungsfaktor für alle: $1/C_{real}^2$)

Makrokonstanten			Mikrokonstanten					pharmakokinetische Parameter												
A	α	B	β	C	Y	k_e	k_{12}	k_{21}	k_{13}	k_{31}	AUC	C_0	V_z	CL	$t_{1/2\alpha}$	$t_{1/2\beta}$	$t_{1/2\gamma}$	MRT	V_{ss}	
$\mu\text{g/l}$	h^{-1}	$\mu\text{g/l}$	h^{-1}	$\mu\text{g/l}$	h^{-1}	h^{-1}	h^{-1}	h^{-1}	h^{-1}	h^{-1}	$\mu\text{g}^*\text{h/l}$	$\mu\text{g/l}$	l	ml/min	h	h	h	h	h	l
A	664,9	3,93	306,4	0,46	49,7	0,2042	0,9482	1,6766	0,0799	0,2364	1076	1021	4,9	77	0,18	1,50	3,39	2,5	11,5	
D	789,5	2,10	303,5	0,43	0,45	0,0176	0,9874	0,6275	0,0221	0,0181	1107	1093	4,6	75	0,33	1,61	39	3,0	13,4	
E	679,9	2,49	293,9	0,34	0,86	0,0083	0,7833	0,9843	0,0683	0,0090	1244	975	5,1	67	0,28	2,04	83	12,2	49,1	
F	588,3	1,81	195,4	0,39	0,45	0,0130	0,8946	0,5071	0,0362	0,0136	843	754	6,6	99	0,38	1,77	53	4,9	28,8	
G	485,0	2,65	357,0	0,54	93,1	0,2452	0,7652	0,7529	0,0846	0,3004	1223	936	5,3	68	0,26	1,28	2,83	2,3	9,5	
H	906,4	2,77	187,5	0,49	0,50	0,0118	1,4544	0,8366	0,0833	0,0125	752	1094	4,6	111	0,25	1,41	58	5,9	39,4	
I	760,7	2,38	223,4	0,47	0,64	0,0062	1,0944	0,7115	0,1389	0,0070	900	985	5,1	93	0,29	1,48	112	19,8	110	
J	502,0	1,36	188,1	0,28	0,95	0,0108	0,6197	0,3949	0,0500	0,0117	1115	691	7,2	75	0,51	2,42	64	9,6	43,1	
K	589,0	2,02	355,8	0,33	0,51	0,0168	0,6722	0,6977	0,0136	0,0171	1406	945	5,3	59	0,34	2,11	41	3,7	13,3	
L	627,3	2,99	360,8	0,37	0,54	0,0285	0,8254	1,1954	0,0115	0,0288	1198	989	5,1	70	0,23	1,86	24	2,8	11,6	
M	652,0	2,20	251,9	0,34	0,57	0,0093	0,8187	0,8148	0,0459	0,0099	1105	904	5,5	76	0,32	2,06	74	8,1	36,5	
N	731,7	1,34	252,4	0,35	0,94	0,0095	0,7203	0,3085	0,0539	0,0102	1367	985	5,1	61	0,52	1,98	73	9,4	34,5	
O	468,2	2,60	352,8	0,38	0,68	0,0080	0,6825	0,9111	0,0398	0,0086	1204	822	6,1	69	0,27	1,84	86	11,0	45,5	
P	728,6	2,48	364,0	0,43	0,73	0,0087	0,8878	0,8433	0,0620	0,0094	1231	1093	4,6	68	0,28	1,63	79	9,5	38,4	
MW	653,1	2,4	285,2	0,4	0,65	0,0124	0,8682	0,8044	0,0564	0,0495	1126	949,1	5,4	76	0,32	1,79	65,5	7,5	34,6	
SD	125,9	0,7	68,2	0,1	0,18	0,0061	0,2140	0,3415	0,0339	0,0938	187,4	122,6	0,8	15	0,10	0,32	24,2	4,9	26,0	

ZWEI-KOMPARTIMENT-MODELL (Wichtungsfaktor für alle: $1/C_{real}^2$)

Makrokonstanten			Mikrokonstanten			pharmakokinetische Parameter							
A	α	B	β	k_e	k_{12}	AUC	C_0	V_z	CL	$t_{1/2\alpha}$	$t_{1/2\beta}$	MRT	V_{ss}
$\mu\text{g/l}$	h^{-1}	$\mu\text{g/l}$	h^{-1}	h^{-1}	h^{-1}	$\mu\text{g}^*\text{h/l}$	$\mu\text{g/l}$	l	ml/min	h	h	h	l
A	528,8	1,04	131,1	0,25	0,6413	1029	660*	7,6	81	0,67	2,75	2,5	12,1
B	712,5	2,44	248,1	0,28	0,8216	1169	961	5,2	71	0,28	2,45	2,8	11,8
C	669,0	2,30	190,9	0,50	1,2775	673	860	5,8	124	0,30	1,39	1,3	9,8
G	607,5	0,94	151,3	0,27	0,6261	1211	759*	4,7	69	0,74	2,58	2,3	9,5
MW	629,5	1,68	180,4	0,33	0,8416	1021	810	5,8	86	0,50	2,29	2,2	10,8
SD	79,7	0,80	51,5	0,12	0,3038	244	130	1,3	26	0,24	0,61	0,6	1,3

Vergleicht man die Ergebnisse der Nicht-Kompartimentanalyse und der Kompartimentanalyse, lässt sich prinzipiell eine gute Übereinstimmung feststellen. Abweichungen traten nur bei der mittleren Verweilzeit MRT und dem scheinbaren Volumen zum Zeitpunkt des Steady State auf. Wie oben erwähnt, musste bei der Nicht-Kompartimentanalyse für die Berechnung dieser beiden Parameter ein Kompromiss gefunden werden. Korrekt wäre es gewesen, die totale AUC und AUMC zu verwenden, die jedoch aufgrund semiquantitativer Werte in der terminalen Phase nur ungenau zu ermitteln waren. Da die terminale Phase letzten Endes unberücksichtigt blieb, um nicht unrealistische Werte zu produzieren, müssen die Werte für die MRT und V_{ss} generell als zu niedrig angesehen werden.

Bei der Kompartimentanalyse wird die AUC anders berechnet. Anhand der ermittelten Fitting-Funktionen wird die Fläche unter der Kurve durch Integration ermittelt. Es ergeben sich deshalb bei beiden Verfahren AUC-Werte, die zwar sehr ähnlich sind, sich aber letztlich doch voneinander unterscheiden.

In Tab. 27 sind alle Parameter mit ihren Minimal- und Maximalwerten, Mittelwerten und Standardabweichungen zusammengefasst und gegenübergestellt, sofern für beide Analysenformen Werte vorlagen. Es flossen alle Resultate aus der Drei-Kompartiment-Modellierung, ausgenommen die Parameter der terminalen Phase bei A und G, sowie die Resultate aus der Zwei-Kompartiment-Modellierung bei B und C ein.

Tab. 27: Zusammenfassung aller Parameter der Nicht-Kompartimentanalyse und der Kompartimentanalyse, Angabe der Minimal- und Maximalwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen; AUC: bei der Nicht-Kompartimentanalyse ist die $AUC_{0-\infty}$ (berechnet mit mixed lin-log-Modus) angegeben, bei der Kompartimentanalyse die partielle AUC (berechnet nach Fitting)

	Einheit	Nicht-Kompartimentanalyse			Kompartimentanalyse		
		Bereich	MW	SD	Bereich	MW	SD
AUC	$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$	698 – 1359	1107	210	673 – 1406	1100	208
c_0	$\mu\text{g/l}$	715 – 1336	1024	141	691 – 1094	944	116
V_z	l	3,7 – 5,9	5,0	0,7	4,6 – 7,2	5,4	0,7
CL	ml/min	57 – 119	75	17	59 – 124	79	18
$t_{1/2\alpha}$	h				0,18 – 0,52	0,31	0,09
$t_{1/2\beta}$	h	1,2 – 2,3	1,7	0,3	1,28 – 2,45	1,80	0,36
$t_{1/2\gamma}$	h				24 – 112	66	24
V_{ss}	l	9,2 – 21,0	14,3	3,9	9,5 – 110	31,6	25,5
MRT	h	1,3 – 4,5	3,1	0,8	1,3 – 19,8	6,8	5,0
A	$\mu\text{g/l}$				468 – 906	658	118
α	h^{-1}				1,34 – 3,93	2,37	0,62
B	$\mu\text{g/l}$				187 – 364	277	68
β	h^{-1}				0,28 – 0,54	0,40	0,08
C	$\mu\text{g/l}$				0,45 – 0,95	0,65	0,18
γ	h^{-1}				0,0062 – 0,0285	0,0124	0,0061
k_e	h^{-1}				0,6197 – 1,4544	0,8908	0,2246
k_{12}	h^{-1}				0,3085 – 1,6766	0,8090	0,3280
k_{21}	h^{-1}				0,5788 – 1,6499	1,0074	0,3076
k_{13}	h^{-1}				0,0115 – 0,1389	0,0564	0,0339
k_{31}	h^{-1}				0,0070 – 0,3004	0,0495	0,0938

6.8 Pharmakokinetische Berechnungen: orale Applikation

Der entscheidende Vorteil bei intravenöser Applikation ist der Wegfall des Auflösungs- und Resorptions-schrittes. Diese beiden Prozesse, die individuell sehr unterschiedlich verlaufen, kommen bei der oralen Gabe nun hinzu. Zusätzlich zu den oben berechneten Parametern, die man theoretisch ebenso aus den Konzentrationzeitdaten nach oraler Gabe ermitteln kann, kommen zur Charakterisierung der Pharmakokinetik die orale Bioverfügbarkeit BV_{oral} und die Resorptionskonstante k_a hinzu.

Die Bioverfügbarkeit errechnet sich gemäß [79] nach folgender Formel:

$$\frac{AUC_{\text{oral}} \cdot \text{Dosis}_{\text{iv}} \cdot t_{1/2\text{iv}}}{AUC_{\text{iv}} \cdot \text{Dosis}_{\text{oral}} \cdot t_{1/2\text{oral}}}$$

Angenommen die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ nach intravenöser und oraler Gabe unterscheiden sich nicht (wo-von auszugehen ist), ergibt sich für die 16 Probanden eine mittlere orale Bioverfügbarkeit von $41 \pm 8 \%$. Die Einzelwerte sind zusammen mit den Parametern der Nicht-Kompartimentanalyse in Tab. 28 aufgeführt.

6.8.1 Nicht-Kompartimentanalyse

Diese Methode stellt hier ihren enormen Vorteil – von einem Kompartimentmodell unabhängig zu sein – unter Beweis. Aufgrund der zum Teil verzögerten Resorption und dem Auftreten von Doppelpeaks zeigten die Plasmakonzentrationen Verläufe, die nur selten einer mathematischen Funktion nahe kamen. Wie sich später bei der Kompartimentanalyse zeigte, erschwerte dies eine Modellierung erheblich. Tab. 28 fasst die berechneten Parameter der Nicht-Kompartimentanalyse zusammen.

Tab. 28: Nicht-Kompartimentanalyse: Parameter nach oraler Applikation von 10 mg THCA in einer Hartgelatine kapsel, zusätzlich angegeben ist die orale Bioverfügbarkeit

	BV_{oral} %	C_{max} $\mu\text{g/l}$	t_{max} h	$AUC_{0-\text{last}}$ $\mu\text{g}^*\text{h/l}$	AUC_{tot} $\mu\text{g}^*\text{h/l}$	CL ml/min	MRT h
A	45	149	6	988	989	77	8.9
B	36	48	10	851	855	71	20.6
C	35	153	6	481	489	119	8.4
D	59	560	0.5	1270	1295	76	3.9
E	46	107	6	1087	1087	70	12.8
F	51	239	6	837	837	101	8.6
G	38	235	6	949	950	68	9.5
H	42	169	6	623	627	112	8
I	49	605	0.5	813	817	100	2.5
J	37	53	23	789	797	78	21.4
K	41	234	1.5	1155	1157	59	6.8
L	28	39	24	693	694	66	18.9
M	48	336	0.7	1004	1004	79	5.9

	BV_{oral} %	C_{max} µg/l	t_{max} h	AUC_{0-last} µg*h/l	AUC_{tot} µg*h/l	CL ml/min	MRT h
N	31	113	6	797	804	64	12.5
O	40	200	2	911	914	72	9
P	31	150	4	734	734	70	6.4
MW	41	211.9	6.8	873.9	878.1	80.0	10.3
SD	8	165.1	7.1	201.1	202.8	17.9	5.7

6.8.2 Kompartimentanalyse

Die Verläufe der Plasmakonzentrationen nach oraler Gabe waren aufgrund der verzögerten Resorption so unregelmäßig, dass eine Modellierung kaum möglich war. Da die Kurven nach intravenöser Gabe gut mit einem Drei-Kompartiment-Modell beschrieben werden konnten, hätte man auch hier annehmen können, dass dieses Modell anwendbar ist. Die Berechnungen der Kinetica-Software bestätigten diese Annahme jedoch nicht. Abgesehen davon, dass die Kurven keineswegs einer idealen Bateman-Funktion ähnelten, kam hinzu, dass bei den Kurven nach oraler Applikation nur wenige Datenpunkte existierten, die die terminale Phase wiedergaben. Doch auch ein Zwei-Kompartiment-Modell war nicht in der Lage, die Kurven adäquat zu beschreiben.

Schließlich wurden alle denkbaren Kombinationsmöglichkeiten (1/2/3 Kompartimente mit verschiedenen Wichtungsfaktoren) getestet, doch bei allen Modellierungsversuchen ergaben sich – verglichen mit der Modellierung der Daten nach intravenöser Applikation – vergleichsweise hohe Werte für die Evaluierungsparameter. Tab. 29 listet die Ergebnisse für das Akaike-Kriterium sowie die beiden anderen Parameter für alle Kombinationen auf, vorausgesetzt Kinetica konnte sie berechnen. Die visuelle Beurteilung der Fitting-Funktionen unterstützte die Schlussfolgerung, dass eine Kompartimentanalyse für die Plasmakonzentrationszeitverläufe nach oraler Applikation wenig brauchbare Ergebnisse liefert. Zu dieser Entscheidung kam auch die Software, die jede statistische Berechnung folgendermaßen kommentierte: „Standard deviation of some parameters is too big for a good fit. The model may not be the good one.“

Tab. 29: Evaluierung der Kompartiment-Modellierung für die Plasmakonzentrationszeitverläufe nach oraler Gabe

	Kompartimente	Wichtung	objective function	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium
A	1	1	8147	170	167
	1	1/C _{real}	122	94	92
	1	1/C_{real}²	3,6	31	29
	1	1/C _{berechnet}	134	96	94
	1	1/C _{berechnet} ²	10504	174	172
B	1	1	806	128	126
	1	1/C _{real}	55	80	78
	1	1/C_{real}²	2,9	27	24
	1	1/C _{berechnet}	44	76	74
	1	1/C _{berechnet} ²	3,1	28	26
C	1	1	25003	190	188
	1	1/C_{real}²	11	51	48
	1	1/C _{berechnet}	7042	167	165
D	1	1	648966	248	246
	1	1/C _{real}	1284	136	134
	1	1/C_{real}²	5,4	38	36
	1	1/C _{berechnet}	6 x 10 ¹³	580	577
D	2	1	345	117	113
	2	1/C _{real}	27	71	68
	2	1/C_{real}²	2,4	28	24
	2	1/C _{berechnet}	15	61	58
	3	1	346	121	116
E	1	1	2743	150	148
	1	1/C _{real}	54	79	77
	1	1/C_{real}²	4,1	33	31
	1	1/C _{berechnet}	2 x 10 ¹²	522	520
	1	1/C _{berechnet} ²	5,4	38	36
F	1	1	28741	192	190
	1	1/C _{real}	212	104	102
	1	1/C_{real}²	5,8	39	37
	1	1/C _{berechnet}	2 x 10 ⁸	354	352
	1	1/C _{berechnet} ²	2 x 10 ⁸	354	352
G	1	1	2005	144	142
	1	1/C _{real}	78	86	84
	1	1/C_{real}²	7	43	40
	1	1/C _{berechnet}	1 x 10 ¹¹	471	469
	1	1/C _{berechnet} ²	1 x 10 ¹¹	471	469
H	1	1	17855	184	182
	1	1/C _{real}	423	116	114
	1	1/C_{real}²	12	54	51
	1	1/C _{berechnet}	3 x 10 ⁷	320	318
	1	1/C _{berechnet} ²	1 x 10 ¹⁶	675	673
	2	1	17872	188	184
	2	1/C _{real} ²	370555	242	239
	2	1/C _{berechnet}	332	116	113
	2	1/C _{berechnet} ²	3,9 x 10 ¹²	533	530
I	1	1	286662	234	231
	1	1/C _{real}	833	129	126
	1	1/C _{berechnet}	3 x 10 ¹³	570	568
	2	1	16509	186	183
	2	1/C _{real}	137	100	97

	Kompartimente	Wichtung	objective function	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium
	2	1/C_{real}²	2,7	30	36
	2	1/C _{berechnet}	1,6 x 10 ¹²	518	514
	2	1/C _{berechnet} ²	1,6 x 10 ¹²	518	514
	3	1	2082	153	149
J	1	1	2421	148	146
	1	1/C _{real}	5 x 10 ⁷	329	327
	1	1/C _{real} ²	5 x 10 ⁷	329	327
	1	1/C _{berechnet}	90	89	86
	1	1/C_{berechnet}²	59	81	79
K	1	1	3287	153	151
	1	1/C _{real}	55	80	77
	1	1/C_{real}²	2,9	27	25
	1	1/C _{berechnet}	2 x 10 ⁷	314	312
	1	1/C _{berechnet} ²	47569	201	199
L	1	1	990	132	129
	1	1/C_{real}²	7,4	44	41
	1	1/C _{berechnet}	8 x 10 ⁷	336	334
	1	1/C _{berechnet} ²	8 x 10 ⁷	336	334
M	1	1	4777	160	158
	1	1/C _{real}	89	88	86
	1	1/C _{real} ²	4,1	33	31
	1	1/C _{berechnet}	1,4 x 10 ¹⁰	429	426
	1	1/C _{berechnet} ²	15	57	55
	2	1	497	123	120
	2	1/C _{real}	23	69	66
	2	1/C_{real}²	3,5	34	31
	2	1/C _{berechnet}	1,4 x 10 ¹⁰	433	429
	2	1/C _{berechnet} ²	1,4 x 10 ¹⁰	433	429
	3	1/C _{real}	23	73	68
	3	1/C _{real} ²	3,5	38	34
	3	1/C _{berechnet} ²	119	102	97
N	1	1	5542	163	160
	1	1/C _{real}	80	87	84
	1	1/C_{real}²	5,2	38	35
	1	1/C _{berechnet}	7 x 10 ⁸	375	373
	1	1/C _{berechnet} ²	7 x 10 ⁸	375	373
	2	1	5545	167	163
	2	1/C _{real}	80	91	87
	2	1/C _{real} ²	5,3	42	38
	2	1/C _{berechnet}	7 x 10 ⁸	379	376
	2	1/C _{berechnet} ²	7 x 10 ⁸	379	376
O	1	1	1650	148	146
	1	1/C _{real}	52	83	80
	1	1/C_{real}²	5	38	36
	1	1/C _{berechnet}	5 x 10 ⁹	434	432
	1	1/C _{berechnet} ²	5 x 10 ⁹	434	432
P	1	1	11506	176	174
	1	1/C _{real}	74248	209	207
	1	1/C_{real}²	4,9	36	34
	1	1/C _{berechnet}	255	107	105
	1	1/C _{berechnet} ²	8,5	46	44

6.9 Statistische Analyse

Lässt sich mit statistischen Mitteln ein Zusammenhang zwischen den Enzymaktivitäten der abbauenden CYP-Isoenzyme und dem Ausmaß des THCA-Abbaus nachweisen? Um diese Frage zu klären, wurden die Phänotypisierungsindices der CYP-Enzyme 2C9, 2C19 und 3A4, die sich in den Inkubationsversuchen als aktiv am THCA-Abbau beteiligt erwiesen hatten (siehe 5.4.3), mit den intravenösen und oralen Serumclearances der sechzehn Probanden korreliert. Alle Werte, die für die statistische Analyse verwendet wurden, sind in der nachfolgenden Übersicht zusammengefasst.

	A	B	C	D	E	F	G	H
Phänotypisierungsindices								
CYP 2C9	1.075	0.425	0.247	1.089	-0.122	1.182	0.888	0.030
CYP 2C19	0.869	2.010	0.215	0.793	1.434	2.031	0.689	0.387
CYP 3A4	2.770	1.170	4.390	0.898	1.110	1.700	2.110	1.490
THCA-Clearance (in ml/min)								
iv	76	70	119	73	63	97	67	104
oral	77	71	119	76	70	101	68	112
	I	J	K	L	M	N	O	P
Phänotypisierungsindices								
CYP 2C9	-0.057	0.489	0.519	1.893	0.737	1.944	0.880	0.582
CYP 2C19	0.322	2.626	0.394	1.049	0.758	1.063	2.018	1.775
CYP 3A4	0.355	1.010	2.380	1.790	1.800	1.470	1.470	0.979
THCA-Clearance (in ml/min)								
iv	74	71	57	65	75	58	64	64
oral	100	78	59	66	79	64	72	70

Die Tests führte Dr. Björn Schelter vom Freiburg Center for Data Analysis and Modeling mit Hilfe des Statistikprogramms R durch. R ist ein frei verfügbares Statistikprogramm, das seit Anfang der 1990er Jahre als GNU Projekt von Anwendern weltweit weiterentwickelt wird. In R wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt, mit der die Prädiktivität der Phänotypisierungsindices auf die Variablen CL_{THCA} nach intravenöser bzw. oraler Applikation angegeben werden kann. Getestet wurde, ob sich anhand der Phänotypisierungsindices von CYP 2C9 Vorhersagen treffen lassen bezüglich der CL_{THCA} nach intravenöser Gabe bzw. oraler Gabe. Dieselbe Fragestellung wurde analog für die Phänotypisierungsindices von CYP 2C19 und CYP 3A4 untersucht. Interessant wäre auch gewesen abzuschätzen, inwieweit die Phänotypisierungsindices im Zusammenhang mit der Bildung einzelner Metaboliten stehen. Da die Mengen der Metaboliten aber nur mit AUCs und nicht mit quantitativen Konzentrationsdaten beschrieben werden können, blieben diese Fragestellungen außen vor.

In der Praxis kommt es häufig vor, dass ein Phänomen nicht nur von einer, sondern von mehreren Ursachen gleichzeitig abhängt. Dann kann eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt werden, die eine abhängige Variable Y (hier CL_{THCA}) mit mehreren unabhängigen Variablen X_1, X_2 etc. (hier die Phänotypisierungsindices bzw. Enzymaktivitäten von verschiedenen CYP-Isoenzymen) erklärt. Die Funktionsgleichung eines einfachen linearen Regressionsmodells wird für die multiple Regressionsana-

lyse erweitert und lautet allgemein bzw. angepasst an die konkrete Fragestellung folgendermaßen [131, 132]:

$$Y = a + b_1 \cdot X_1 + b_2 \cdot X_2 + \dots + e$$

$$CL_{THCA} = a + b_1 \cdot PI_{CYP2C9} + b_2 \cdot PI_{CYP3A4} + b_3 \cdot PI_{CYP2C19} + e$$

Der Term a steht für den Achsenabschnitt (Intercept), b_1 und b_2 sind die multiplen Regressionskoeffizienten und e die Fehlervariable. Wie bei der einfachen Regression müssen auch bei der multiplen Variante die Regressionsparameter so abgeschätzt werden, dass die Differenzen der Datenpunkte zur Ausgleichsgeraden minimal sind. Das ist aufwändiger als bei der einfachen Regression und wird von der Software durchgeführt.

R gibt nach der Berechnung eine Reihe von Daten zurück: Es liefert zuerst eine deskriptive Statistik der Residuen, d. h. der nicht erklärbaren Differenzen zwischen den beobachteten und den geschätzten Werten. Die Verteilung der Residuen sollte annähernd normalverteilt sein. Danach berechnet R die sogenannten Kleinste-Quadrate-Schätzer der Regressionsparameter für Intercept a und die übrigen Variablen b . Zum Schluss folgen drei Werte, mit denen die Güte dieser Schätzwerte beurteilt werden kann: der Standardfehler des Kleinste-Quadrate-Schätzers (KQS), der errechnete t -Wert und die Wahrscheinlichkeit, dass dieser t -Wert bei der gegebenen Stichprobe überschritten wird [$\Pr(>t)$] [131].

Auch für multiple Regressionen lassen sich Determinationskoeffizienten r^2 ermitteln, die Aussagen über die Güte des Modells machen. Auch für diese gilt, dass sie zwischen 0 und 1 liegen, wobei 0 „keine Aussagekraft“ und 1 „volle Aussagekraft“ bedeutet. Man unterscheidet multiple und korrigierte Determinationskoeffizienten. Beim korrigierten r^2 wird der Wert für jede in das Modell integrierte Variable nach unten korrigiert. Dieser Koeffizient ist für die Untersuchung der Modellanpassung am besten geeignet, da jede zusätzliche begünstigende Variable „bestraft“ wird [133].

Um die Frage zu beantworten, ob der gezeigte Zusammenhang zwischen der Ausprägung (CL_{THCA}) und den Merkmalen (Phänotypisierungsindices) auch statistisch signifikant und nicht nur zufällig ist, unterzieht man den Determinationskoeffizienten einem Hypothesentest. Die Nullhypothese lautet: Es gibt keinen Zusammenhang. Der Freiheitsgrad ermittelt sich aus der Anzahl der Wertepaare minus 2, beträgt demnach in diesem konkreten Fall 14. Liegt die berechnete Prüfgröße über dem Tabellenwert und der p -Wert unter der vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit α (meist 5 %), kann man die Nullhypothese ablehnen. Das bedeutet dann, dass ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Variablen besteht und die Korrelation $\neq 0$ ist. Andernfalls muss man schließen, dass nicht genügend Beweise vorliegen, um zu zeigen, dass die Variablen miteinander zusammenhängen [133, 134].

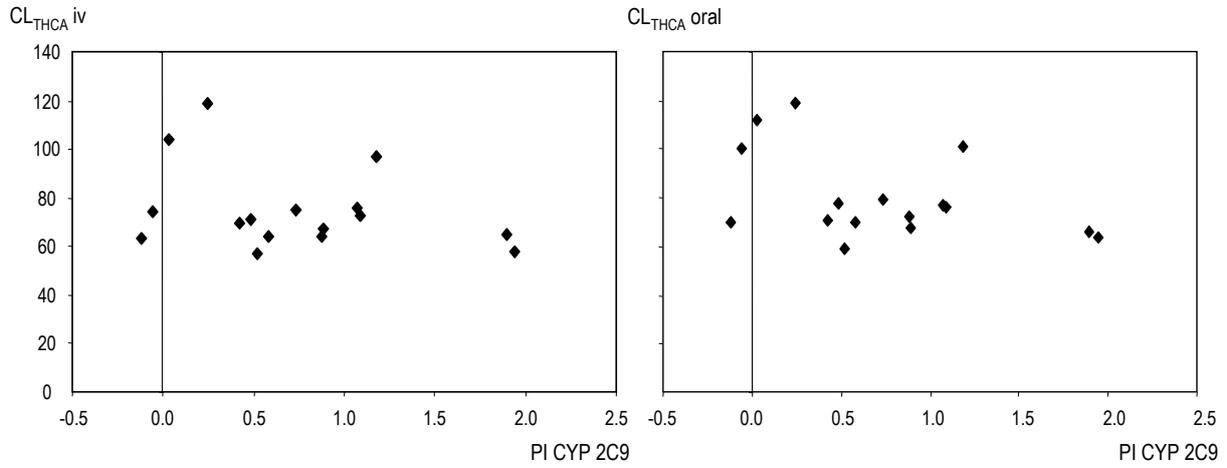
Letzteres war der Fall bei fünf von sechs Tests. Nur für den Zusammenhang zwischen dem Phänotypisierungsindex von CYP 3A4 und der THCA-Clearance nach intravenöser Gabe ließ sich bei einem Signifikanzniveau von 5 % eine Korrelation zeigen. Die Ergebnisse der Prädiktivitätsanalyse mit R im Detail für die ausgewählten Fragestellungen sind in Tab. 30 zusammen gefasst.

Tab. 30: Ergebnisse der Prädiktivitätsanalyse mit R, alle Kombinationen wurden getrennt voneinander getestet

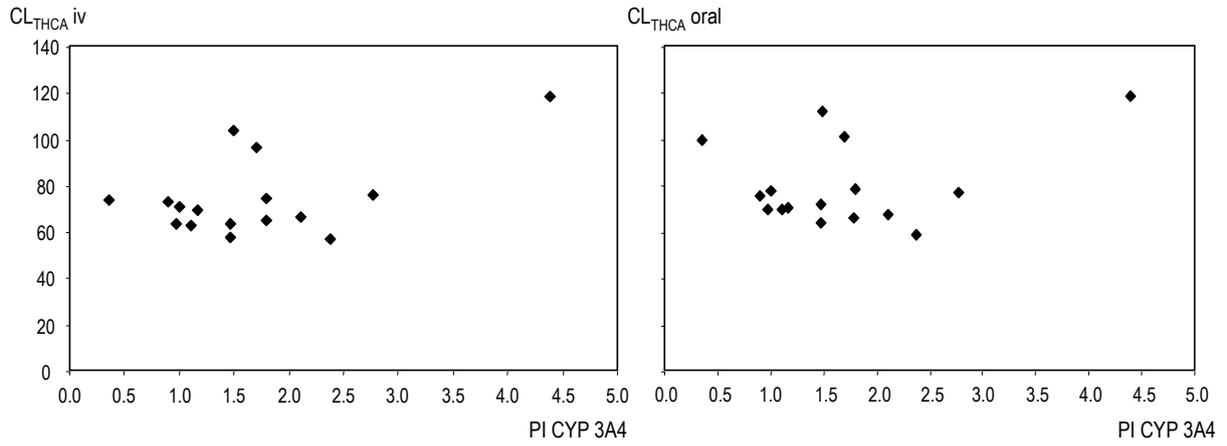
	CYP 2C9 → CL _{THCA} iv	CYP 2C9 → CL _{THCA} oral	CYP 3A4 → CL _{THCA} iv	CYP 3A4 → CL _{THCA} oral	CYP 2C19 → CL _{THCA} iv	CYP 2C19 → CL _{THCA} oral
Residuen						
Minimalwert	-19,690	-23,895	-24,497	-25,112	-22,686	-26,545
1. Quartil	-8,127	-10,688	-9,633	-10,644	-10,119	-9,797
Median	-6,197	-0,983	-2,528	-6,169	-4,683	-4,546
3. Quartil	1,927	3,315	7,218	6,466	1,944	9,795
Maximalwert	39,972	32,657	31,011	32,963	38,163	32,175
Koeffizienten						
<i>Intercept</i>						
Schätzwert	81,150	89,474	58,745	70,543	82,220	88,362
Standardfehler des KQS	6,797	6,661	8,012	9,273	8,128	8,367
t-Wert für KQS	11,939	13,43	7,332	7,607	10,116	10,56
Pr (>t)	9,98e ⁻⁹	2,17e ⁻⁹	3,72e ⁻⁶	2,45e ⁻⁶	8,1e ⁻⁸	4,73e ⁻⁸
<i>Variable PI_{CYP}</i>						
Schätzwert	-8,592	-12,675	9,560	5,701	-6,429	-7,150
Standardfehler des KQS	7,186	7,043	4,192	4,852	5,990	6,166
t-Wert für KQS	-1,196	-1,80	2,281	1,175	-1,073	-1,16
Pr (>t)	0,252	0,0935	0,0387	0,26	0,301	0,266
Angaben zum Modell						
Standardfehler der Residuen (Freiheitsgrade)	17,02 (14)	16,68 (14)	15,26 (14)	17,66 (14)	17,18 (14)	17,68 (14)
Determinationskoeffizient	0,09267	0,1879	0,2709	0,08977	0,07603	0,08762
korrigierter Determinationskoeffizient	0,02786	0,1299	0,2188	0,02476	0,01004	0,02245
Hypothesentest						
F-Teststatistik (Freiheitsgrade)	1,43 (14)	3,239 (14)	5,201 (14)	1,381 (14)	1,152 (14)	1,344 (14)
p-Wert	0,2516	0,09348	0,03875	0,2596	0,3013	0,2656
Ergebnis	nicht signifikant	nicht signifikant	signifikant zu 5 %	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant

Auch in der grafischen Darstellung erkennt man, wie schwierig es ist, einen eventuellen Zusammenhang zwischen den Enzymaktivitäten und den THCA-Clearances zu finden. Abb. 34 zeigt die Plots. Aufgetragen sind die THCA-Clearance nach intravenöser bzw. oraler Gabe gegen die Phänotypisierungsindices der drei ausgewählten CYP-Isoenzyme. In die Punktwolken lassen sich kaum zufriedenstellende Regressionsgeraden legen. Da die THCA-Clearances trotz verschiedener Phänotypisierungsindices für alle Probanden in einem relativ engen Bereich liegen (75 ± 17 ml/min, Nicht-Kompartimentalanalyse), erhält man den Eindruck, dass die einzelnen Enzymaktivitäten kaum einen Einfluss haben.

CYP 2C9



CYP 3A4



CYP 2C19

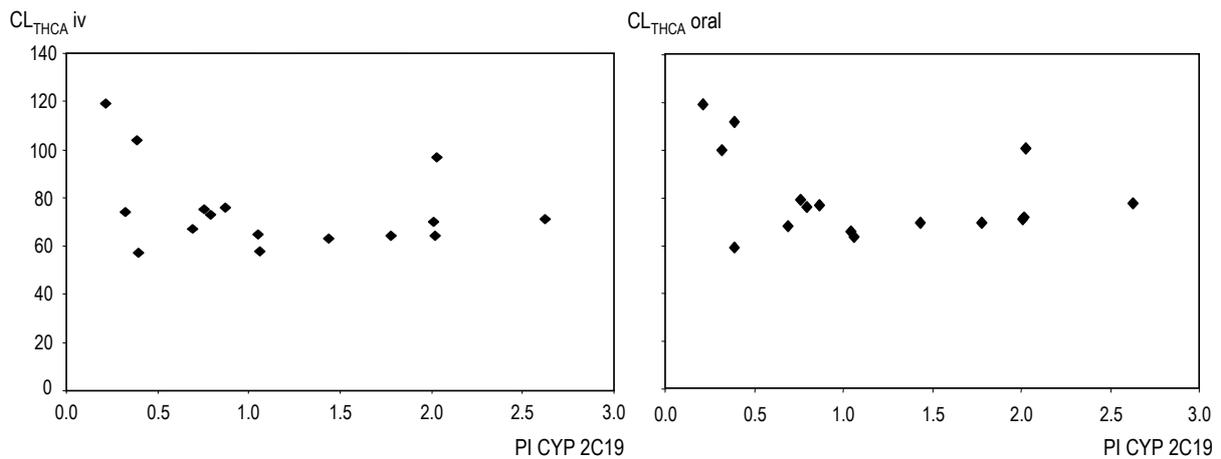


Abb. 34: Plots für die Zusammenhänge zwischen den Phänotypisierungsindices der drei CYP-Isoenzyme 2C9, 3A4 und 2C19 den THCA-Clearances nach intravenöser und oraler Gabe

Dass die THCA-Clearance mit den Enzymaktivitäten der abbauenden Isoenzyme CYP 2C9, 3A4 und 2C19 zusammenhängt, kann nur für CYP 3A4 statistisch untermauert werden – und auch nur bei einem Signifikanzniveau von 5 %. Alle anderen getesteten Korrelationen sind statistisch nicht signifikant. Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Erstens: Es besteht kein Zusammenhang zwischen den Enzymaktivitäten und der THCA-Clearance. Oder zweitens: Die Anzahl der Probanden reichte nicht aus, um eine eventuelle nur geringe Clearance-Steigerung in Abhängigkeit einer nur geringen Aktivitätssteigerung mit statistischer Signifikanz zeigen zu können.

Da bei mehreren abbauenden Enzymen eines für ein anderes „einspringen“ kann, wird es bei nur 16 Probanden umso schwieriger, die Einzeleffekte aufzuzeigen. Zu beachten ist, dass hier die THCA-Clearance untersucht wurde, in die die Geschwindigkeit aller Abbauprozesse einfließt. Andere Ergebnisse könnten sich ggf. ergeben, würde man die AUCs der einzelnen Metabolite (berechnet aus Konzentrationen, die mit einem validierten Verfahren ermittelt wurden) mit den Enzymaktivitäten in Zusammenhang setzen. Hinzu kommt, dass Enzymaktivitäten nicht die einzige Variable in Bezug auf die Clearance darstellen. Der gesamte Resorptionsprozess, die Nieren- und auch die Gallenfunktion spielen ebenfalls eine Rolle.

7 Schlussfolgerungen

7.1 THCA-Pharmakokinetik im Vergleich

Der einzige Unterschied zwischen THC und THCA ist die Carboxylfunktion an Position 2 des THCA-Moleküls. Metabolische THC-COOH und THCA unterscheiden sich zusätzlich darin, dass die Methylgruppe an Position 11 (THCA) bei THC-COOH zur Carboxylfunktion oxidiert ist. Aufgrund der ähnlichen Struktur und Lipophilie sind relativ ähnliche Pharmakokinetiken zu erwarten. Tab. 31 stellt die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter der drei Substanzen gegenüber.

Tab. 31: Vergleich wichtiger pharmakokinetischer Parameter von THC, THC-COOH und THCA nach intravenöser Applikation von jeweils 5 mg Substanz, alle Werte für THCA sind bis auf V_z mit Kompartimentanalyse ermittelt, * die MRT für THC wurde im Nachhinein anhand von Mittelwerten der THC-Konzentrationen berechnet (Daten aus Ohlsson et al. [50])

Parameter	Einheit	THC	THC-COOH	THCA
		Werte aus der Literatur	Werte aus der Literatur	experimentell bestimmte Werte
C_{\max} (nach 5 min)	$\mu\text{g/l}$	161 – 316 386 \pm 29	337 \pm 62	887 \pm 107
AUC	$\mu\text{g}\cdot\text{h/l}$	72 \pm 10 118 \pm 37	919 \pm 269	1100 \pm 208
CL	ml/min	950 \pm 200 771 \pm 287	97 \pm 24	79 \pm 18
V_z	l	2,5 \pm 1,9 (gel.) 6,3 \pm 4,1 (chron.)		5,0 \pm 0,7 ^{comp}
MRT	h	13,1 \pm 5,3 (gel.) 8,1 \pm 1,3 (chron.) *	19,9 \pm 6,4	6,8 \pm 5,0
$t_{1/2\alpha}$	h		0,12 \pm 0,04	0,31 \pm 0,09
$t_{1/2\beta}$	h	1,6 \pm 0,5	1,6 \pm 0,4	1,8 \pm 0,36
$t_{1/2\gamma}$	h	18 – 36	22 \pm 7	66 \pm 24
V_{ss}	l	75 \pm 16 (gel.) 74 \pm 35 (chron.)	114 \pm 38	32 \pm 26

Ein deutlicher Unterschied zwischen THC und THCA ist die Plasmaclearance. Offensichtlich ist der Körper in der Lage, THC mit einer im Vergleich zu THCA zehnfach höheren Geschwindigkeit aus dem Plasma zu eliminieren. Damit im Einklang steht auch die höhere Bioverfügbarkeit von THCA nach oraler Gabe, die offenbar durch einen schwächer ausgeprägten First-Pass-Effekt zustande kommt. Da die Leber THCA weniger gut und schnell bei der ersten Leberpassage verstoffwechseln kann, kommt prozentual mehr THCA im systemischen Kreislauf an.

Die gemessenen Maximalkonzentrationen täuschen auf den ersten Blick ein unterschiedliches Verteilungsverhalten der beiden Substanzen im Blutplasma vor. Dies ist jedoch nicht der Fall, da es sich bei den ersten messbaren Konzentrationen um die Werte nach fünf Minuten handelt. Nach Extrapolation der verschiedenen steilen Kurven ergeben sich schließlich sehr ähnliche fiktive Anfangskonzentrationen. Die scheinbaren initialen Verteilungsvolumina der beiden Substanzen unterscheiden sich daher kaum und lassen auf eine annähernd gleiche, d. h. hohe, Plasmaproteinbindung schließen.

Anlass zu der Spekulation, dass THCA bei chronischem Konsum nicht im gleichen Ausmaß wie THC im Fettgewebe akkumuliert, liefert das Verteilungsvolumen im Steady State. Auch wenn für dessen Berechnung semiquantitative Werte verwendet wurden und der Wert (32 ± 26 l) mit Unsicherheiten behaftet ist, zeigt sich in der Tendenz, dass das Verteilungsvolumen für THCA unter dem von THC liegt. Die Carboxylfunktion allein kann nicht der Grund sein, da THC-COOH im Gegensatz sogar ein höheres V_{ss} aufweist. Wahrscheinlich bewirken die zusätzlichen Wechselwirkungen der aromatischen Carboxylfunktion in Nachbarschaft einer OH-Gruppe, die den deprotonierten Zustand stabilisieren und somit den Säurecharakter verstärken, eine geringere Umverteilung ins Fettgewebe (pK_s -Wert THCA 3,3 vs. pK_s -Wert THC-COOH 4,5).

Die Halbwertszeiten der verschiedenen Phasen liegen, soweit aus der Literatur ersichtlich, in ähnlichen Größenbereichen oder sind nahezu identisch. Die mittleren Verweilzeiten MRT von THC und THCA scheinen ebenfalls ähnlich zu sein, allerdings müssen beide Werte als fehlerbehaftet angesehen werden. Zum einen sind die Konzentrationszeitdaten für THC in Ermangelung einer aktuellen Studie einer Publikation von 1982 entnommen, die zwar schon GC-MS-Analytik nutzte, aber nicht mit weit empfindlicheren Methoden von heute verglichen werden kann. Zum anderen wurden zur Berechnung der MRT von THCA wie oben erwähnt unter anderem semiquantitative Werte unterhalb der LOQ verwendet, was bei einem sensiblen Parameter im Hinblick auf den Kurvenverlauf im niedrigen Konzentrationsbereich in der terminalen Phase wie der MRT kritisch ist. Trotz allem lässt sich feststellen, dass beide Substanzen im Mittel eine ähnliche Zeit benötigen, um aus dem Körper eliminiert zu werden.

7.2 THCA-Metabolismus: Analogien zu THC, Besonderheiten und Interpretationsmöglichkeiten

Die Inkubationsversuche mit heterolog exprimierten CYP-Isoenzymen und die Ergebnisse der Humanstudie bestätigten die Annahme, dass THCA in Analogie zu THC verstoffwechselt wird. Die hauptsächlich am Metabolismus beteiligten Enzyme sind CYP 2C9, CYP 3A4 und nachrangig CYP 2C19 für die Phase-1-Reaktionen.

Hauptmetabolite im Serum sind 11-OH-THCA, THCA-8-on, 9,10-Bis-OH-HHCA, THCA-COOH und sein Glucuronid. Hauptmetabolite im Urin sind vor allem Glucuronide und zwar 11-OH-Glucuronid, THCA-COOH-Glucuronid, 8- bzw. 4'-OH-THCA-COOH-Glucuronid und 9,10-Bis-OH-THCA-HHCA. Eine Übersicht liefert Abb. 35.

THCA └─ Gluc	11-OH-THCA └─ Gluc	THCA-8-on └─ Gluc	THCA-COOH └─ Gluc	8-OH-THCA-COOH └─ Gluc
	8 α -OH-THCA └─ Gluc	8,11-Bis-OH-THCA └─ Gluc		4'-OH-THCA-COOH └─ Gluc
	8 β -OH-THCA └─ Gluc	9,10-Bis-OH-HHCA		

Abb. 35: THCA, Metabolite nach ein, zwei, drei oder vier Oxidationsschritten sowie deren Glucuronide: **rot** markiert sind die Hauptmetabolite im Serum, **blau** die Hauptmetabolite im Urin

Wie bereits unter 2.8.4 beschrieben, können auch Metabolite als Marker für kurz zurückliegenden Konsum in Betracht gezogen werden. THC-Glucuronid ist dafür ein Beispiel für einen aussichtsreichen Kandidaten. Es stellt sich daher die Frage, ob man auch anhand von Metaboliten für THCA Rückschlüsse auf den Konsumzeitpunkt ziehen könnte. In den Metabolitenprofilen der THCA zeigten sich einige Metabolite, die nur kurz nach der intravenösen Applikation nachweisbar waren, z. B. 8 β -OH-THCA und 8-OH-THCA-Glucuronid. Beide Substanzen waren maximal 4 Stunden detektierbar und traten bei allen bzw. bei 15 von 16 Probanden auf. Für die orale Gabe lassen sich solche Aussagen nicht treffen, da die Resorption zu variabel war. Wie bereits erwähnt, könnte auch das Verhältnis von THCA-COOH zu THCA-COOH-Glucuronid ein weiterer Anhaltspunkt für den Konsumzeitpunkt werden.

7.3 THCA als Kurzzeitmarker für Cannabiskonsum?

Gesucht wird ein Marker für kurz zurückliegenden Cannabiskonsum, mit dem sich der Konsumzeitpunkt genauer als bisher eingrenzen lässt. Hat die THCA das Potential, ein solcher Marker zu werden? Folgende Kriterien für den „idealen Kurzzeitmarkerkandidaten“ sollten – zumindest in den wichtigsten Punkten – erfüllt sein.

1. Direkter und spezifischer Marker

Vorteilhaft wäre es, wenn es sich um einen direkten Marker handelte, d.h. die Markersubstanz entweder in der konsumierten Droge selbst vorliegt oder einen Metaboliten darstellt. Der Marker sollte spezifisch sein, das heißt nur dann auftreten, wenn die Droge wirklich konsumiert wurde. Diese Bedingungen erfüllt THCA ohne Einschränkungen. Sie kommt in hoher Konzentration in der Cannabispflanze vor, wird zwar beim Rauchen abgebaut, aber nur zum Teil. Die Gruppe der Cannabinoide ist bisher nur in der Gattung Cannabis nachgewiesen worden.

2. Kurze Nachweisbarkeit

Der Marker sollte nur kurzzeitig nach dem Konsum nachweisbar sein oder alternativ mit einer bekannten, immer gleichen Rate abgebaut werden: Voraussetzungen für ersteres ist eine Pharmakokinetik gemäß dem Motto „Fast in - fast out“.

Um einen Eindruck von den Parametern einer Substanz mit solch einem pharmakokinetischen Verhalten zu bekommen, sollen γ -Aminobuttersäure (GHB) und Nikotin als Beispiele für Substanzen dienen, die relativ schnell aus dem Körper eliminiert werden. Die Pharmakokinetik des Paradebeispiels GHB lässt sich mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschreiben, dessen zweiter Phase eine terminale Halbwertszeit von 30 min [135] zugeordnet werden kann. GHB akkumuliert nicht, wenn es mehrfach verabreicht wird [136], und bindet nicht an Plasmaproteine, was eine schnelle Metabolisierung begünstigt. Die extrem kurze Nachweisbarkeit von GHB von maximal 5 bis 6 Stunden im Blut und maximal 24 Stunden im Urin kann die Aufklärung in forensisch interessanten Fragestellungen erheblich erschweren oder sogar verhindern. Palatini et al. [137] bestimmten die orale Clearance auf 7 – 14 ml/min·kg, bei einem typischen Probanden mit 70 kg Körpergewicht entspräche das 490 – 980 ml/min. Die MRT von GHB ist ebenfalls sehr kurz und beträgt nur ca. 45 – 70 min.

Ein anderes, weniger extremes Beispiel aus dem Bereich der Forensischen Toxikologie ist Nikotin, das wie THCA vor allem inhalativ appliziert wird. Seine Pharmakokinetik folgt ebenfalls einem Zwei-Kompartiment-Modell, die Halbwertszeiten für die α - und die β -Phase betragen im Mittel 9 bzw. 133 min [138]. Nikotin wird mit einer Clearance von 915 ml/min eliminiert und hat ein Verteilungsvolumen im Steady State von ungefähr 180 l (2,6 l/kg) [139]. Ungefähr 10 Minuten nach dem Rauchen einer Zigarette erreichen die Nikotinplasmakonzentrationen ihr Maximum von circa 15 - 20 ng/ml [140] und sinken durch Umverteilung in das Muskelgewebe, das zweite Kompartiment, und Elimina-

tion innerhalb von 6 bis 8 Stunden auf unter 1 ng/ml (eigene Berechnungen).

Vergleicht man die pharmakokinetischen Parameter von GHB und Nikotin, die theoretisch gute Kurzzeitmarker wären, mit denen von THCA, kristallisieren sich zwei wesentliche Unterschiede heraus, die der Anwendung von THCA als Kurzzeitmarker entgegenstehen. Zum einen ist die THCA-Clearance relativ gering, sie beträgt durchschnittlich nur 75 ml/min. Zum anderen folgt die Pharmakokinetik einem Drei-Kompartiment-Modell. Die Akkumulation in einem dritten Kompartiment, die verhindert, dass nach einem relativ kurzen Zeitraum von einigen Stunden die THCA-Konzentrationen auf Null sinken können, ist als das eigentliche Knock-out-Kriterium anzusehen. Wie bei Nikotin gut zu erkennen, wäre ein hohes Verteilungsvolumen allein kein Hinderungsgrund – vorausgesetzt die Substanz wird mit einer kurzen Halbwertszeit zurückverteilt und eliminiert, was aber bei THCA nicht der Fall ist.

3. Interindividuell ähnliche Pharmakokinetik

Ein weiteres Kriterium wäre eine möglichst ähnliche Pharmakokinetik bei verschiedenen Individuen. Voraussetzungen dafür sind eine gleichmäßige Bioverfügbarkeit nach oraler bzw. inhalativer Aufnahme, und keine großen Unterschiede bei der Verteilung, bei der Metabolisierung und bei der Eliminierung der Substanz. Diese Anforderungen erfüllt THCA im Hinblick auf eine relativ konstante Plasmaclearance (75 ± 17 ml/min, RSD 23 %), eine nur sehr gering schwankende orale Bioverfügbarkeit (41 ± 8 %, RSD 20 %) und eine ähnliche Eliminationshalbwertszeit in der β -Phase von $1,8 \pm 0,36$ h (RSD 20 %). Auch die Tatsache, dass die am Abbau beteiligten drei CYP-Isoenzyme zwar phenotypische und genotypische Variabilitäten aufweisen können, aber in einem wesentlich geringeren Ausmaß als bei CYP 2D6, ist einem ähnlichen pharmakokinetischen Verhalten zuträglich. Dagegen sprechen die terminale Halbwertszeit von 66 ± 24 h (RSD 36 %) und das Verteilungsvolumen im Steady State von $31,6 \pm 25,5$ l (RSD 81 %).

Bei der Verwendung von THCA als Markersubstanz stellt sich ein zusätzliches Problem. Es ist nicht bekannt, wie viel THCA beim Rauchen aufgenommen wird und in welchen Bereichen die THCA-Anfangskonzentrationen liegen. Wie in der Literatur erwähnt, titrieren sich Cannabis-Konsumenten häufig auf bestimmte THC-Plasmakonzentrationen, die bei ihnen den gewünschten Effekt erzeugen. Diese lagen in einer Studie zwischen 33 – 187 ng/ml [33]. Individuell völlig verschiedene Rauchtchniken führen also letzten Endes trotzdem dazu, dass die Anfangskonzentrationen der gewünschten Substanz THC in einem relativ engen Bereich liegen. THCA ist aber ein Begleitstoff, selbst psychoaktiv wirkungslos und für das Rauchverhalten nicht ausschlaggebend. Hinzu kommt, dass der THCA-Gehalt im Ursprungsmaterial je nach Lagerung und Alter variieren und auch das Ausmaß der Decarboxylierung zu THC aufgrund der Temperaturunterschiede in der Zigarettenglut sehr variabel sein kann. Die resultierende THCA-Anfangskonzentration nach Rauchen eines Joints ist demnach eher ein Produkt des Zufalls, so dass Nachweiszeiten von THCA und ihrer Metaboliten einem weiteren Unsicherheitsfaktor unterworfen sind.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass THCA einige Kriterien (direkter Marker, spezifischer Marker, geringe Schwankungen in der Plasmaclearance, oralen Bioverfügbarkeit, Abbau über CYP 450-Isoenzyme ohne extreme Variabilitäten) erfüllt, andere wiederum nicht (kurze Nachweisbarkeit, keine Akkumulation in einem dritten, tiefen Kompartiment). Als alleinige Markersubstanz wird sie daher nicht geeignet sein, möglicherweise aber in Kombination mit anderen Substanzen und vor allem ihren Metaboliten. Die ursprüngliche Hypothese, dass THCA eine wesentlich verschiedene Pharmakokinetik im Vergleich mit THC besitzt und weniger ausgeprägt im Fettgewebe akkumuliert, muss in Anbetracht der Erkenntnisse aus der Humanstudie verworfen werden. Sie war von Beobachtungen abgeleitet worden,

dass THCA nach oraler Einnahme von 50 mg eine höhere Bioverfügbarkeit als THC besaß und in den Serumproben bereits 12 Stunden nach der Applikation keine THCA mehr nachweisbar war. Die beobachtete hohe orale Bioverfügbarkeit lässt sich nun plausibel mit der zehnfach niedrigeren Clearance von THCA, einer somit geringeren Metabolisierungsaktivität und einem im Vergleich zu THC verminderten First-Pass-Effekt erklären. Der Grund für das scheinbar kurze Nachweiszeitfenster war eine unempfindlichere Analysenmethode, mit der sehr niedrige Konzentrationen im unteren ng/ml-Bereich nicht mehr erfasst wurden.

7.4 Andere Einsatzgebiete in der Forensischen Toxikologie

Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A ist neben seiner möglichen Anwendung als Cannabiskonsummarker auch in der Diskussion für die Beantwortung anderer Fragestellungen in der Forensischen Toxikologie. Dazu gehören die Klärung der Frage, ob eine Person legal synthetisches THC als Medikament oder illegal Cannabis als Rauschmittel konsumiert hat oder ob ein oraler oder ein inhalativer Konsum stattgefunden hat.

7.4.1 Unterscheidung von Dronabinol- und Cannabiskonsum

Dronabinol ist halb-synthetisch gewonnenes THC, das zur Anwendung als Arzneimittel produziert wird. Zu seiner Herstellung verwendet man Cannabidiol aus Nutzhanf und stellt daraus durch Cyclisierung THC her. Dieses Verfahren war erforderlich, da THC selbst bis vor kurzem nicht verkehrsfähig und daher eine direkte Isolierung für medizinische Zwecke aus Pflanzenmaterial nicht möglich war.

Cannabis-typische Begleitstoffe wie THCA und andere Cannabinoide fehlen grundsätzlich in Dronabinol. Der Nachweis eines illegalen Cannabiskonsums kann daher über den Nachweis dieser Cannabisinhaltsstoffe erfolgen. Wie sensitiv THCA in dieser Hinsicht als Marker ist, müsste man jedoch in weiteren Studien abklären. Neben THCA wurden für den gleichen Zweck in der Vergangenheit auch das C3-Homologe von THC Tetrahydrocannabivarin und sein Abbauprodukt Tetrahydrocannabivarin-Carbonsäure [141] sowie Tetrahydrocannabivarinensäure A [142] eingesetzt. In Einzelfällen konnte anhand dieser Substanzen Cannabiskonsum nachgewiesen werden. In einer größeren Studie mit 117 Probanden konnte allerdings für Tetrahydrocannabivarin eine nur geringe Sensitivität gezeigt werden [143].

7.4.2 Unterscheidung von oralem und inhalativem Konsum

Ein Unterschied zwischen beiden Konsumarten ist das Ausmaß der thermischen Belastung, der die Cannabinoide ausgesetzt sind. Während beim Backen über einige Minuten Temperaturen von nur ca. 150 °C herrschen, werden beim Rauchen 500 - 600 °C in der Zigarettenglut erreicht. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass bei Konsum cannabishaltiger Backwaren verhältnismäßig mehr THCA aufgenommen wird als bei inhalativem Konsum, was sich in den Serumkonzentrationen von THCA und THC und deren Verhältnis widerspiegeln sollte. Dies gilt in verstärktem Maße für andere Formen des oralen Konsums, z. B. „Bhang“ (Zubereitungen von Cannabismaterial in Milch, Jogurt, Butter oder als Konfekt) und den direkten Verzehr. Versuche zur Bestimmung des THCA-Gehalts in Zubereitungen zur oralen Applikation und ein direkter Vergleich beider Konsumformen in einer kontrollierten Studie stehen aber noch aus.

Ein weiterer Unterschied zwischen oralem und inhalativem Konsum ist der First-Pass-Effekt, der bei oraler Resorption dazu führen kann, dass bereits ein großer Anteil der resorbierten Substanzmenge bei

der ersten Leberpassage verstoffwechselt wird, bevor er systemisch zur Verfügung steht. Die orale Bioverfügbarkeit für THCA betrug bei den Probanden der Humanstudie ~ 40 %. Da bei der inhalativen Applikation die Substanz über die Alveolen direkt in den Körperkreislauf gelangt, wird die Bioverfügbarkeit nur durch Resorptionsverluste, nicht aber durch eine vorzeitige Metabolisierung verringert. Infolgedessen können sich für beide Applikationsarten unterschiedliche Verhältnisse von Ausgangssubstanz zu Metaboliten im Serum ergeben.

In der Humanstudie wurde THCA nicht inhalativ verabreicht, so dass für diese Applikationsart keine Daten zu Konzentrationzeitverläufen von THCA und THCA-Metaboliten existieren. Inhalative und intravenöse Applikation zeigen aber – abgesehen von einer kurzen Verschiebung auf der Zeitachse nach rechts, die der Resorptionszeit in der Lunge entspricht – sehr ähnliche Kurvenverläufe und auch bei intravenöser Applikation tritt kein First-Pass-Effekt durch hepatischen Metabolismus auf. Die THCA-Konzentrationen und Metabolitenprofile nach intravenöser Applikation wurden daher verwendet, um eventuelle Unterschiede bei den Metabolitenverhältnissen zu untersuchen.

Für eine erste Abschätzung wurden die absoluten Peakflächen der fünf Hauptmetabolite im Serum (11-OH-THCA, THCA-8-on, THCA-COOH, THCA-COOH-Glucuronid und 9,10-Bis-OH-HHCA) auf die in der jeweiligen Serumprobe gemessene THCA-Konzentration bezogen. Für die Unterscheidung zwischen oralem und inhalativem Konsum steht in der Praxis in der Regel nur eine einzige Blutprobe zur Verfügung. Um anhand von THCA-Metaboliten zwischen beiden Applikationsformen unterscheiden zu können, müssten bei den Metabolitenverhältnissen gravierende Unterschiede bei oraler und intravenöser Applikation bestehen und zwar über einen längeren Zeitraum hinweg, da der Konsumzeitpunkt in der Regel nicht bekannt ist. Dies war jedoch nicht der Fall.

Einschränkend ist zu sagen, dass für diese erste Analyse nur absolute Peakflächen verwendet werden konnten, die Matrixeffekten unterliegen und deshalb stark schwanken können. Ob sich aber bei Verwendung von Konzentrationsangaben, die mit einer validierten Methode ermittelt wurden, ein anderes Bild ergeben würde, bleibt offen.

7.5 Zukunftsvision

Angesichts verschiedener Konsummuster und Rauchtchniken, variabler Enzymaktivitäten und unterschiedlicher Konstitutionen der Konsumenten wird es extrem schwierig bleiben, eine einzige Substanz zu finden, anhand derer ein Konsumzeitpunkt errechnet werden kann. Damit das Ergebnis forensisch verwertbar ist, müsste es mit „einer an Sicherheit grenzende Wahrscheinlichkeit“ richtig sein, was aufgrund unterschiedlicher Pharmakokinetik ein schier unmögliches Unterfangen zu sein scheint. Anstatt diesen Weg zu verfolgen und sich an jeder neuen potentiell geeigneten Substanz zu probieren, könnte ein anderer Ansatz erfolgversprechender sein.

Dieser würde sich nicht auf eine Substanz konzentrieren, sondern mehrere, noch besser viele Parameter einbeziehen, um so aus einem umfassenden Gesamtbild mit immer höherer Sicherheit Rückschlüsse zu ziehen. Alle Vorschläge, die bisher von anderen Autoren zu diesem Thema gemacht wurden, sind dafür grundsätzlich geeignet. Zusammengefasst wird ein nur kurz zurückliegender Konsum umso wahrscheinlicher,

- je höher die THC-Konzentration im Serum ist
- wenn Cannabidiol im Serum nachweisbar ist
- wenn Cannabinol im Serum nachweisbar ist

- wenn THC-Glucuronid im Serum nachweisbar ist
- wenn das Verhältnis von THC-COOH-Glucuronid zu THC-COOH im Serum ein bestimmtes Verhältnis annimmt

Als Erkenntnisse aus der klinischen Studie mit THCA käme hinzu, dass ein zurückliegender Konsum umso wahrscheinlicher wird,

- wenn THCA-COOH-Glucuronid in hohen und THCA-COOH in nur geringen Mengen im Serum nachweisbar sind
- wenn die nur wenig gebildeten Metabolite 8α -OH-THCA, 8β -OH-THCA, 8,11-Bis-OH-THCA, THCA-Glucuronid, 8-OH-THCA-COOH-Glucuronid und 4'-OH-THCA-COOH-Glucuronid im Serum nachweisbar sind

Je mehr Anhaltspunkte es gibt, desto stichhaltiger können die Aussagen werden. Für die Einschätzung des Konsumzeitpunktes müsste eine Probe mit einer umfassenden analytischen Methode vermessen werden, die das gesamte Spektrum der in Cannabis enthaltenen Cannabinoide sowie THC-Metabolite und THCA-Metabolite enthält. Eventuell würde eine detaillierte Analyse von Cannabisrauchkondensaten zur Identifikation weiterer Substanzen führen, die ebenfalls im Körper nachweisbar wären, typische Metabolitenmuster hätten und das Spektrum erweitern könnten. Die variable Zusammensetzung des Cannabismaterials würde aber als Unsicherheitsfaktor bestehen bleiben.

Ergänzen könnte diesen Ansatz auch die Suche nach anderen Substanzen, die in Cannabis enthalten sind, aber nach einer Zwei-Kompartiment-Kinetik abgebaut werden und nicht akkumulieren. Dies müssen dann auch nicht zwangsläufig Cannabinoide sein. Diese anderen Substanzen würden das Cannabinoid-Spektrum ergänzen und könnten ebenfalls wertvolle Hinweise geben.

8 Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Frage nach Pharmakokinetik und dem Metabolismus von Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A im Menschen. Dazu wurde eine klinische Studie durchgeführt, in der sechzehn Probanden die Testsubstanz THCA zuerst oral in Form einer Kapsel (10 mg) und zwei Wochen später intravenös als Emulsion (5 mg) erhielten. Blutproben wurden in festgelegten Intervallen bis zu 96 Stunden und Urinproben *ad libitum* abgegeben. Zwischen beiden Studienabschnitten wurden die Probanden mit Hilfe eines Cocktails aus fünf Testsubstanzen, von denen jede spezifisch durch ein CYP 450-Isoenzym metabolisiert wird, phänotypisiert und in der DNA-Abteilung des Instituts zusätzlich genotypisiert. Die betrachteten Isoenzyme waren CYP 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4. Um herauszufinden, welche Isoenzyme in erster Linie für den THCA-Metabolismus verantwortlich sind, wurden außerdem im Institut für Experimentelle Toxikologie in Homburg *in vitro* Versuche mit einzelnen Isoenzymen bzw. humanen Lebermikrosomen durchgeführt.

Blut- und Urinproben wurden umfangreich analysiert. Mit einer neu entwickelten und nach den GTFCh-Richtlinien für forensisch-toxikologische Untersuchungen validierten Aufbereitungs- und LC-MS/MS-Methode wurden die THCA-Konzentrationen bestimmt und die entstandenen Metabolite nach oraler und intravenöser Applikation identifiziert. Im Anschluss daran erfolgte eine pharmakokinetische Analyse der THCA-Serumdaten gemäß den Prinzipien der Kompartiment- und Nicht-Kompartimentanalyse, mit der erstmals grundlegende pharmakokinetische Parameter der THCA bestimmt werden konnten. Außerdem wurden die aus der Phänotypisierungsstudie ermittelten Phänotypisierungsindices mit einigen der berechneten pharmakokinetischen Parameter korreliert und statistisch untersucht.

Erwartungsgemäß zeigten die Probanden nach intravenöser Bolusgabe sehr ähnliche Konzentrations-Zeit-Kurven von THCA im Serum. Ausgehend von der Maximalkonzentration 5 Minuten nach der Applikation fielen die THCA-Konzentrationen kontinuierlich ab, allerdings sanken sie nur bei drei Probanden innerhalb des 96-stündigen Beobachtungszeitraums auf einen Wert unter der Nachweisgrenze. Bei allen anderen Probanden waren bis zur letzten Probe noch geringe Konzentrationen zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze zu sehen. Die Kompartimentanalyse dieser Konzentrations-Zeit-Daten nach intravenöser Applikation ergab, dass die Pharmakokinetik von THCA sehr gut durch ein Drei-Kompartiment-Modell beschrieben werden kann.

Es existiert demnach ein drittes, d.h. tiefes Kompartiment, in dem THCA akkumuliert und schließlich mit einer langen Halbwertszeit eliminiert wird. Die auf Grundlage der semiquantitativen Werte in der terminalen Eliminationsphase ermittelte Halbwertszeit beträgt ungefähr 66 ± 24 h und ist damit sehr lang. Die meisten pharmakokinetischen Parameter – das scheinbare initiale Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment, die Eliminationshalbwertszeit in der β -Phase, die mittlere Verweilzeit und das Verteilungsvolumen im Steady State – ähneln prinzipiell denen von THC und widerlegen damit die These, dass sich THCA pharmakokinetisch grundlegend anders als THC verhält. Der einzige fundamentale Unterschied zu THC ist die Plasmaclearance, die für THCA um Faktor 10 geringer ist. Die niedrige Plasmaclearance lässt auf eine niedrigere Metabolisierungsaktivität und damit einen geringeren First-Pass-Effekt schließen, der als Ursache der relativ hohen oralen Bioverfügbarkeit von ~ 40 % angesehen werden kann.

Die Resorption der THCA nach oraler Gabe war starken Schwankungen unterworfen. Drei Probanden zeigten bereits nach 30 bis 45 Minuten Maximalkonzentrationen, der Großteil nach ungefähr 1,5 bis 6 Stunden und drei Probanden erst nach 10 bzw. 24 Stunden. Die zeitlich nach hinten verschobenen

Konzentrationsmaxima deuten auf eine stark verzögerte Freisetzung der THCA aus der Kapsel hin. Unterstützt wird diese These durch ein Experiment, in dem die Löslichkeit der verwendeten Gelatinekap- sel bei verschiedenen pH-Werten getestet wurde. Es ist daher anzunehmen, dass zwar in der Realität die Aufnahme von THCA nach oraler Applikation ebenfalls variabel sein wird, aber vermutlich nicht in diesem Ausmaß.

Der Metabolismus von THCA verläuft analog zum Metabolismus von THC. Die Phase-1-Reaktionen finden an den gleichen Positionen im Molekül statt wie bei THC und auch die Glucuronidierung erfolgt nach dem typischen THC-Muster. Einziger Unterschied: THCA selbst kann bereits an der Carboxylfunk- tion an Position 2 glucuronidiert werden. Hauptmetabolite im Serum sind 11-OH-THCA, THCA-8-on und THCA-COOH-Glucuronid (mit einem ausgeprägtem Maximum kurz nach der Applikation), THCA-COOH (mit einem flacheren, nach hinten verschobenen Maximum) sowie 9,10 Bis-OH-HHCA (ohne ausge-prägtes Maximum, aber kontinuierlich messbar über einen längeren Zeitraum, z. T. bis zur letzten Probe nach 96 h). Diese Profile wurden zuerst aus den Daten der intravenösen Applikation gewonnen und bestätigten sich prinzipiell für die orale Applikation. Wie zu erwarten war, liegen die Hauptmetabolite im Urin vor allem als Glucuronide vor. Die intensivsten Signale liefern THCA-COOH-Glucuronid, 11-OH- THCA-Glucuronid sowie 8- und 4'-OH-THCA-COOH-Glucuronid. Interessanterweise findet sich wie auch im Serum häufig und oft bis zur letzten abgegebenen Urinprobe unglucuronidierte 9,10-Bis-OH- HHCA.

In den *in vitro* Versuchen stellte sich heraus, dass THCA vor allem von drei CYP 450-Isoenzymen um- gesetzt wird. CYP 2C9 katalysiert die Hydroxylierung zum Hauptmetaboliten 11-OH-THCA sowie zu 8 α - OH-THCA. Im Inkubat mit CYP 3A4 fanden sich eine Reihe verschiedener Hydroxymetabolite: Das intensivste Signal zeigte 8 β -OH-THCA, kleinere Peaks waren für 11-OH-THCA, 9,10-Bis-OH-HHCA, 8,x-Bis-OH-THCA und einen unbekanntem, wahrscheinlich monohydroxylierten Metabolit zu erkennen. CYP 2C19, das wie CYP 2C9 ebenfalls die Reaktion zu 8 α -OH-THCA katalysiert, spielte im Vergleich zu den beiden erstgenannten Isoenzymen nur eine untergeordnete Rolle. Die statistische Analyse von möglichen Korrelationen einzelner Phänotypisierungsindices mit THCA-Clearances konnte einen Ein- fluss verschiedener Enzymaktivitäten für CYP 3A4 bestätigen (Signifikanzniveau 5 %). Für die anderen Phänotypisierungsindices war das nicht möglich, was entweder daran lag, dass die Probandenanzahl sehr gering war - zu gering für Aussagen mit statistischer Signifikanz bei nur geringen Effekten - oder, dass die Enzyme ausgleichend „einspringen“ und Einzeleffekte sich an dem alle Abbauprozesse ein- schließenden Parameter Clearance nicht mehr erkennen ließen.

Die Akkumulation der THCA in einem tiefen Kompartiment ist der Hauptgrund dafür, dass THCA allein wahrscheinlich nicht als Kurzzeitmarker für Cannabiskonsum und auch nicht zur Unterscheidung von gelegentlichem und chronischem Konsum geeignet sein wird. Um diese Frage endgültig zu klären, müsste den Probanden mehrfach und in kurzen Zeitintervallen eine Dosis THCA verabreicht werden. Verlängert sich die Nachweisbarkeit und addieren sich die Konzentrationen auf (wie nach den vorlie- genden Ergebnissen zu erwarten wäre), muss man davon ausgehen, dass die gleichen Phänomene und Probleme wie bei THC auftreten, nämlich eine Anreicherung der lipophilen Substanz in tiefen Kom- partimenten und eine noch tage- bis wochenlange andauernde Rückverteilung nach Abstinenzbeginn.

Wahrscheinlich wird sich die Suche nach einer Substanz, die als alleiniger Marker für einen kurz zurück- liegenden Cannabiskonsum in der Forensischen Toxikologie eingesetzt werden kann, weiterhin schwie- rig gestalten. Denn es bleibt fragwürdig, ob eine einzelne Substanz jemals diese Markerfunktion zufrie- denstellend, präzise und sicher ausfüllen kann - zu verschieden sind die individuellen Konstitutionen, das Rauchverhalten und die Zusammensetzung der Cannabisprodukte.

Neue Chancen könnte eine anders gerichtete Strategie bieten: Es gibt mittlerweile mehrere Ansätze verschiedener Forschungsgruppen, die Cannabinhaltsstoffe oder -metabolite auf ihre Aussagekraft bezüglich dieser Fragestellung untersucht haben und feststellen konnten, dass einige nur kurz nach dem Konsum nachweisbar sind. Eine hundertprozentige Sicherheit, anhand dieser Substanzen einen korrekten Konsumzeitpunkt zu errechnen, gab es zwar bisher nicht. Es würde sich jedoch der Versuch lohnen, das Spektrum der gemessenen Cannabinoide in den Proben von verdächtigen Straßenverkehrsteilnehmern, Leistungssportlern oder Straftätern zu erweitern, nachdem in kontrollierten Studien eine erhöhte Aussagesicherheit gezeigt werden konnte. Dann könnte man durch Vergleich mit bekannten Konzentrations-Zeit-Profilen und gemessenen Konzentrationen nicht nur einer Substanz, sondern möglicherweise von zehn, fünfzehn oder zwanzig typischer sekundärer Cannabinhaltsstoffen und nachrangig gebildeten Abbauprodukten erheblich präzisere Aussagen über den Konsumzeitpunkt treffen.

9 Literaturverzeichnis

1. Hillig, K.W., Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2005. **52**(2): p. 161-180.
2. ElSohly, M., Marijuana and the cannabinoids. 2007: Humana Press.
3. Anderson, L.C., A study of systematic wood anatomy in Cannabis. *Harvard University Botanical Museum Leaflets*, 1974. **24**: p. 29-36.
4. de Lamarck, J.-B., *Encyclopédie Méthodique de Botanique*. Vol. 1. 1785, Paris, France.
5. Emboden, W., Cannabis — a polytypic genus. *Economic Botany*, 1974. **28**(3): p. 304-310.
6. Schultes, R., et al., Cannabis: an example of taxonomic neglect. *Harvard University Botanical Museum Leaflets*, 1974. **23**: p. 337-367.
7. Small, E. and A. Cronquist, A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis. *Taxon*, 1976. **25**(4): p. 405-435.
8. Vavilov, N.I., The origin of the cultivation of primary crops, in particular cultivated hemp, in *Studies on the Origin of Cultivated Plants*. 1926, Institute of Applied Botany and Plant Breeding: Leningrad, USSR. p. 221-233.
9. Hillig, K.W. and P.G. Mahlberg, A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany*, 2004. **91**(6): p. 966-975.
10. Fetterman, P.S., et al., Mississippi-grown cannabis sativa L.: Preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. 1971, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. p. 1246-1249.
11. Small, E. and H.D. Beckstead, Cannabinoid Phenotypes in Cannabis sativa. *Nature*, 1973. **245**(5421): p. 147-148.
12. Grotenhermen, F.H., Cannabis und Cannabinoide: Pharmakologie, Toxikologie und therapeutisches Potenzial. 2. Auflage ed. 2004, Bern: Verlag Hans Huber.
13. World Drug Report 2010. 2011, United Nations Office on Drugs and Crime: Wien.
14. Drogen- und Suchtbericht 2011. 2011, Bundesministerium für Gesundheit.
15. Mehmedic, Z., et al., Potency Trends of Δ^9 -THC and Other Cannabinoids in Confiscated Cannabis Preparations from 1993 to 2008*. *Journal of Forensic Sciences*. **55**(5): p. 1209-1217.
16. King, L.A., C. Carpentier, and P. Griffiths, Cannabis potency in Europe. *Addiction*, 2005. **100**(7): p. 884-886.
17. Geschwinde, T., Rauschdrogen - Marktformen und Wirkungsweisen. 5. Auflage ed. 2007: Springer.
18. ElSohly, M.A. and D. Slade, Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 2005. **78**(5): p. 539-548.
19. ElSohly, M.A. and D. Slade, Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 2005. **78**(5): p. 539.
20. Grotenhermen, F., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinetics*, 2003. **42**(4): p. 327-60.
21. Taura, F., et al., First direct evidence for the mechanism of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 1995. **117**(38): p. 9766-9767.

22. Taura, F., et al., Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent Studies on Biosynthetic Enzymes. *Chemistry & Biodiversity*, 2007. **4**(8): p. 1649-1663.
23. Martin, B.R., et al., Pharmacological evaluation of agonistic and antagonistic activity of cannabinoids. *NIDA Research Monographies*, 1987. **79**: p. 108.
24. Herkenham, M., et al., Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990. **87**(5): p. 1932-1936.
25. Matsuda, L., et al., Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 1990. **346**: p. 561.
26. Barnett-Norris, J., et al., Conformational Memories and the Endocannabinoid Binding Site at the Cannabinoid CB1 Receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002. **45**(17): p. 3649-3659.
27. Svabo, B., Pharmacology of cannabinoid receptors. *Biotrend Rev*, 2008(2): p. 1-13.
28. Kumar, R.N., W.A. Chambers, and R.G. Pertwee, Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia*, 2001. **56**(11): p. 1059-1068.
29. Perez-Reyes, M., et al., Pharmacology of orally administered delta9-Tetrahydrocannabinol. *Clin Pharmacol Ther*, 1973. **14**(1): p. 48-55.
30. Berghaus, G. and H.-P. Krüger, *Cannabis im Straßenverkehr*. 1998: Urban & Fischer Verlag.
31. Rieder, S.A., et al., Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology*. **215**(8): p. 598-605.
32. Hunt, C.A. and R.T. Jones, Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1980. **215**(1): p. 35-44.
33. Huestis, M.A., J.E. Henningfield, and E.J. Cone, Blood Cannabinoids. I. Absorption of THC and Formation of 11-OH-THC and THCCOOH During and After Smoking Marijuana. *Journal of Analytical Toxicology*, 1992. **16**(5): p. 276-282.
34. Lambert, D.M.E., *Cannabinoids in Nature and Medicine*. 2009, Zürich: VHCA, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich und Wiley-VHC, Weinheim.
35. Garrett, E.R., Pharmacokinetics and disposition of delta 9-tetrahydrocannabinol and its metabolites. *Adv Biosci*, 1978(Jul 22-23): p. 105-121.
36. Brunet, B., et al., Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues. *Forensic science international*, 2006. **161**(2-3): p. 169-174.
37. Huestis, M.A., Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*, 2007. **4**(8): p. 1770-804.
38. Matsunaga, T., et al., Metabolism of [Delta]9-tetrahydrocannabinol by cytochrome P450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life Sciences*, 1995. **56**(23-24): p. 2089-2095.
39. Harvey, D.J. and N.K. Brown, Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1991. **40**(3): p. 533-540.
40. Watanabe, K., et al., Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinal by human hepatic microsomes. *Life Sciences*, 2007. **80**(15): p. 1415-1419.
41. Bland, T.M., et al., CYP2C-catalyzed delta(9)-tetrahydrocannabinol metabolism: Kinetics, pharmacogenetics and interaction with phenytoin. *Biochemical Pharmacology*, 2005. **70**(7): p. 1096-1103.

42. Maurer, H.H., C. Sauer, and D.S. Theobald, Toxicokinetics of drugs of abuse: current knowledge of the isoenzymes involved in the human metabolism of tetrahydrocannabinol, cocaine, heroin, morphine, and codeine. *Ther Drug Monit*, 2006. **28**(3): p. 447-53.
43. Watanabe, K., et al., Brain microsomal oxidation of [Delta]8- and [Delta]9-tetrahydrocannabinol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988. **157**(1): p. 75-80.
44. Wall, M.E., et al., Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin. Pharm. Ther.*, 1983. **34**(3): p. 352-363.
45. Hunt, C.A., et al., Evidence that cannabidiol does not significantly alter the pharmacokinetics of tetrahydrocannabinol in man. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 1981. **9**(3): p. 245-260.
46. Toennes, S.W., et al., Comparison of Cannabinoid Pharmacokinetic Properties in Occasional and Heavy Users Smoking a Marijuana or Placebo Joint. *Journal of Analytical Toxicology*, 2008. **32**(7): p. 470-477.
47. Hollister, L.E., et al., Do plasma concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol reflect the degree of intoxication? *J Clin Pharmacol*, 1981. **21**(8-9 Suppl): p. 171S-177S.
48. Ohlsson, A., et al., Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther*, 1980. **28**(3): p. 409-16.
49. Lindgren, J.-E., et al., Clinical effects and plasma levels of Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology*, 1981. **74**(3): p. 208-212.
50. Ohlsson, A., et al., Single dose kinetics of deuterium labelled Δ 1-tetrahydrocannabinol in heavy and light cannabis users. 1982, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. p. 6-10.
51. Kelly, P. and R.T. Jones, Metabolism of Tetrahydrocannabinol in Frequent and Infrequent Marijuana Users. *Journal of Analytical Toxicology*, 1992. **16**(4): p. 228-235.
52. D'Souza, D.C., et al., The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology*, 2004. **29**(8): p. 1558-72.
53. Kauert, G.F., et al., Pharmacokinetic Properties of 9-Tetrahydrocannabinol in Serum and Oral Fluid. *Journal of Analytical Toxicology*, 2007. **31**(5): p. 288-293.
54. Ramaekers, J., et al., Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users. *Journal of Psychopharmacology*, 2009. **23**(3): p. 266-277.
55. Brenneisen, et al., The effect of orally and rectally administered delta[9]-tetrahydrocannabinol on spasticity : A pilot study with 2 patients. Vol. 34. 1996, München, ALLEMAGNE: Dustri.
56. Sporkert, F., F. Pragst, and C.J. Ploner, Pharmacokinetic investigation of delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites after single administration of 10 mg Marinol in attendance of a psychiatric study with 17 volunteers, in 39th Annual International Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists. 2001: Prag.
57. Goodwin, R.S., et al., Delta(9)-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-delta(9)-tetrahydrocannabinol in human plasma after controlled oral administration of cannabinoids. *Ther Drug Monit*, 2006. **28**(4): p. 545-51.
58. Musshoff, F., Beurteilungskriterien zur Fahreignungsdiagnostik aus toxikologischer Sicht. Tagungsband zum XV. GTFCh-Symposium 18.-24.04.2007, 2007: p. 34-43.

59. Johansson, E.V.A., et al., Prolonged apparent half-life of Δ 1-tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. 1988, Blackwell Publishing Ltd. p. 374-375.
60. Gustafson, R.A., et al., Urinary pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol after controlled oral Δ 9-tetrahydrocannabinol administration. *J Anal Toxicol*, 2004. **28**(3): p. 160-7.
61. Glaz-Sandberg, A., et al., Pharmacokinetics of 11-nor-9-Carboxy-[Δ]9-Tetrahydrocannabinol (CTHC) After Intravenous Administration of CTHC in Healthy Human Subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **82**(1): p. 63-69.
62. ElSohly, M.A., Marijuana and the cannabinoids. 2007: Humana Press.
63. Drummer, O.H., et al., The involvement of drugs in drivers of motor vehicles killed in Australian road traffic crashes. *Accident Analysis & Prevention*, 2004. **36**(2): p. 239-248.
64. Grenzwertkommission, Beschluss zu §24a (2) StBG vom 20.11.2002. *Toxichem und Krimtech*, 2002. **69**(3): p. 127.
65. Müller, C., B. Topic, and J.P. Huston, Cannabis und Verkehrssicherheit, in *Berichte der Bundesanstalt für Straßenwesen - Mensch und Sicherheit*. 2006, Bundesanstalt für Straßenwesen: Bremerhaven.
66. Mauden, M., G. Skopp, and R. Mattern, GC/MS-Bestimmung von THC-COOH im Serum. Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden und Einfluss von THC-COOH-Glucuronid. *Blutalkohol*, 2000.
67. Nadulski, T., et al., Simultaneous and Sensitive Analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GCMS in Plasma after Oral Application of Small Doses of THC and Cannabis Extract. *Journal of Analytical Toxicology*, 2005. **29**(8): p. 782-789.
68. Daldrop, T., et al., Entscheidung zwischen einmaligem/gelegentlichem und regelmäßigem Cannabiskonsum. *Blutalkohol*, 2000. **37**(1).
69. Huestis, M.A., A. Barnes, and M.L. Smith, Estimating the Time of Last Cannabis Use from Plasma Δ 9-Tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-Carboxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol Concentrations. *Clin Chem*, 2005. **51**(12): p. 2289-2295.
70. Huestis, M.A., et al., Estimating time of last oral ingestion of cannabis from plasma THC and THCCOOH concentrations. *Ther Drug Monit*, 2006. **28**(4): p. 540-4.
71. Manno, J.E., et al., Temporal Indication of Marijuana Use Can Be Estimated From Plasma and Urine Concentrations of Δ 9-Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol, and 11-Nor- Δ 9-Tetrahydrocannabinol-9-Carboxylic Acid. *Journal of Analytical Toxicology*, 2001. **25**(7): p. 538-549.
72. Skopp, G., et al., Freie und glucuronidierte Cannabinoide im Urin - Untersuchungen zur Einschätzung des Konsumverhaltens. *Rechtsmedizin*, 1999. **10**(1): p. 21-28.
73. Mareck, U., et al., Temporal indication of cannabis use by means of THC glucuronide determination. *Drug Testing and Analysis*, 2009. **1**(11-12): p. 505-510.
74. Schwöpe, D.M., et al., Identification of Recent Cannabis Use: Whole-Blood and Plasma Free and Glucuronidated Cannabinoid Pharmacokinetics following Controlled Smoked Cannabis Administration. *Clinical Chemistry*. **57**(10): p. 1406-1414.
75. Karschner, E.L., et al. Free and glucuronide conjugate plasma cannabinoid pharmacokinetics after ad libitum smoking of a 6.8 % Δ 9-tetrahydrocannabinol cigarette. in *49th Annual Meet-*

- ing of The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT). 2011. San Francisco, USA.
76. Verhoeckx, K.C.M., et al., Unheated Cannabis sativa extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways. *International Immunopharmacology*, 2006. **6**(4): p. 656-665.
 77. Jung, J., delta9-Tetrahydrocannabinolsäure A - ein neuer Cannabis-Konsum-Marker, in Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften 2009, Albert-Ludwigs-Universität: Freiburg.
 78. Auwärter, V., et al., Hair analysis for delta9-tetrahydrocannabinolic acid A: New insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair. *Forensic science international* 2010. **196**(1): p. 10-13.
 79. Riviere, J.E., *Comparative Pharmacokinetics: Principles, Techniques and Applications*. 2nd ed. 2011: Wiley-Blackwell.
 80. Borchert, H.-H., *Klinische Pharmakokinetik (II)*, Vorlesung, Freie Universität: Berlin.
 81. Schiffter, H.A., *Pharmakokinetik - Modelle und Berechnungen*. 1. Auflage ed. 2009, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
 82. Frye, R.F., et al., Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther*, 1997. **62**(4): p. 365-76.
 83. Petsalo, A., et al., Analysis of nine drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites from urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry utilizing sub 2 [mu]m particle size column. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1215**(1-2): p. 107.
 84. Streetman, D.S., J.S. Bertino, Jr., and A.N. Nafziger, Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics*, 2000. **10**(3): p. 187-216.
 85. Rodrigues, A.D., *Drug-drug interactions*. 2 ed. 2008: Informa Healthcare.
 86. Fuhr, U., A. Jetter, and J. Kirchheiner, Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the "cocktail" approach. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **81**(2): p. 270-83.
 87. Evans, W.E. and M.V. Relling, Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 1999. **286**(5439): p. 487-91.
 88. Zhou, H., Z. Tong, and J.F. McLeod, "Cocktail" approaches and strategies in drug development: valuable tool or flawed science? *J Clin Pharmacol*, 2004. **44**(2): p. 120-34.
 89. Blakey, G.E., et al., Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of a five-probe metabolic cocktail for CYPs 1A2, 3A4, 2C9, 2D6 and 2E1. *Br J Clin Pharmacol*, 2004. **57**(2): p. 162-9.
 90. Chainuvati, S., et al., Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". *Clin Pharmacol Ther*, 2003. **74**(5): p. 437-47.
 91. Christensen, M., et al., The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther*, 2003. **73**(6): p. 517-28.
 92. Scott, R.J., et al., Determination of a 'GW cocktail' of cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in plasma and urine using automated solid phase extraction and fast gradient

- liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999. **13**(23): p. 2305-19.
93. Zhu, B., et al., Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach. *Clin Pharmacol Ther*, 2001. **70**(5): p. 455-61.
94. Ghassabian, S., et al., A high-throughput assay using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous in vivo phenotyping of 5 major cytochrome p450 enzymes in patients. *Ther Drug Monit*, 2009. **31**(2): p. 239-46.
95. Yin, O.Q., et al., Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004. **18**(23): p. 2921-33.
96. Ryu, J.Y., et al., Development of the "Inje cocktail" for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo. *Clin Pharmacol Ther*, 2007. **82**(5): p. 531-40.
97. Jetter, A., et al., Cytochrome P450 2C9 phenotyping using low-dose tolbutamide. *Eur J Clin Pharmacol*, 2004. **60**(3): p. 165-71.
98. Hu, O.Y., et al., Novel single-point plasma or saliva dextromethorphan method for determining CYP2D6 activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. **285**(3): p. 955-60.
99. Lin, Y.S., et al., In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics*, 2001. **11**(9): p. 781-91.
100. Penzak, S.R., et al., Limitations of Using a Single Postdose Midazolam Concentration to Predict CYP3A-Mediated Drug Interactions. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2008. **48**(6): p. 671-680.
101. Peters, F.T., O.H. Drummer, and F. Musshoff, Validation of new methods. *Forensic Sci Int*, 2007. **165**(2-3): p. 216-24.
102. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem*, 2003. **75**(13): p. 3019-30.
103. Wohlfarth, A., et al., Cocktail Approach for In Vivo Phenotyping of 5 Major CYP450 Isoenzymes: Development of an Effective Sampling, Extraction, and Analytical Procedure and Pilot Study With Comparative Genotyping. *The Journal of Clinical Pharmacology*.
104. Lehmann, T. and R. Brenneisen, A new chromatographic method for the isolation of (-)- Δ^9 -(trans)-tetrahydrocannabinolic acid A. *Phytochemical Analysis*, 1992. **3**(2): p. 88.
105. Flockhart, I., et al., Patent WO/2004/026857: Methods of purifying cannabinoids from plant material. 2004.
106. Hazekamp, A., et al., Preparative Isolation of Cannabinoids from Cannabis sativa by Centrifugal Partition Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2004. **27**(15): p. 2421 - 2439.
107. Dussy, F.E., et al., Isolation of Delta9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products. *Forensic Sci Int*, 2005. **149**(1): p. 3-10.
108. Pragst, F., et al., UV Spectra of Toxic Compounds: Database of Photodiode Array UV Spectra of Illegal and Therapeutic Drugs, Pesticides, Ecotoxic Substances and Other Poisons. 2001.
109. Jung, J., et al., Detection of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *J Mass Spectrom*, 2007. **42**(3): p. 354-60.

110. Roth, N., et al., submitted. 2011.
111. Mechoulam, R. and Z. Ben-Zvi, Carboxylation of Resorcinols with methylmagnesium carbonat. Synthesis of cannabinoid acids. *Chemical Communications*, 1969: p. 343-344.
112. Roth, N., A. Wohlfarth, and V. Auwärter, Regioselective synthesis of THCA-A and THCA-B by reaction of THC with magnesium methyl carbonate. *Toxichem und Krimtech*, 2011. **35**(78 (Proceedings of the XVII. GTFCh-Symposium)): p. 316-319.
113. Chebbah, C., et al., Direct quantification of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in relation to doping control analysis, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1133-1141.
114. del Mar Ramirez Fernandez, M., et al., Simultaneous analysis of THC and its metabolites in blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2008. **875**(2): p. 465-470.
115. Grauwiler, S.B., A. Scholer, and J. Drewe, Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts. *Journal of Chromatography B*, 2007. **850**(1-2): p. 515-522.
116. Jagerdeo, E., et al., A fast method for screening and/or quantitation of tetrahydrocannabinol and metabolites in urine by automated SPE/LC/MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **398**(1): p. 329-338.
117. König, S., et al., On-line SPE LC-MS/MS for the quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its two major metabolites in human peripheral blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **400**(1): p. 9-16.
118. Vlase, L., et al., High-throughput toxicological analysis of THC and 11-nor-9-carboxy-THC by LC/MS/MS. *Rom J Leg Med*, 2010. **2**: p. 133-140.
119. Weinmann, W., et al., Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC/MS/MS. *Forensic science international*, 2000. **113**(1-3): p. 381-387.
120. Nahas, G., *Marihuana and Medicine*. 1999, Totowa: Humana Press.
121. Peters, F.T., et al., Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden (Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen), GTFCh, Editor. 2009, GTFCh.
122. Bonfiglio, R., et al., The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1999. **13**(12): p. 1175-1185.
123. De Gregori, M., et al., How and Why to Screen for CYP2D6 Interindividual Variability in Patients Under Pharmacological Treatments, in *Current Drug Metabolism*, Bentham Science Publishers Ltd. p. 276-282.
124. Neafsey, P., et al., Genetic Polymorphism in Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Population Distribution of CYP2D6 Activity, in *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part B*. 2009, Taylor & Francis Ltd. p. 334-361.
125. Bauer, K.H., K. Frömring, and C. Führer, *Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie: Mit einer Einführung in die Biopharmazie*. 8. Auflage ed. 2006: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
126. Malvern, http://www.malvern.de/LabGer/technology/zeta_potential/zeta_potential_LDE.htm.

127. Giroud, C., et al., Delta(9)-THC, 11-OH-Delta(9)-THC and Delta(9)-THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people. *Forensic science international*, 2001. **123**(2-3): p. 159-64.
128. Rehner, G. and H. Daniel, *Biochemie der Ernährung*. 2. Auflage ed. 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
129. Chen, L., et al., Caffeine induces cytochrome P4501A2: induction of CYP1A2 by tea in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 1996. **24**(5): p. 529-533.
130. Djordjevic, N., et al., Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2008. **64**(4): p. 381-385.
131. Dolic, D., *Statistik mit R*. 2004.
132. Faes, G. *Statistik - Anwendungsorientierte statistische Grundlagen*. Available from: <http://www.faes.de>.
133. Rumsey, D., *Weiterführende Statistik für Dummies*. 1. Auflage ed. 2008, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
134. Dolic, D., *Statistik mit R*. 2004: Oldenbourg Wissenschaftsverlag.
135. Brenneisen, R., et al., Pharmacokinetics and Excretion of Gamma-Hydroxybutyrate (GHB) in Healthy Subjects. *Journal of Analytical Toxicology*, 2004. **28**(8): p. 625-630.
136. Ferrara, S.D., et al., Pharmacokinetics of gamma-hydroxybutyric acid in alcohol dependent patients after single and repeated oral doses. *Br J Clin Pharmacol*, 1992. **34**(3): p. 231-235.
137. Palatini, P., et al., Dose-dependent absorption and elimination of gamma-hydroxybutyric acid in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 1993. **45**(4): p. 353-356.
138. Feyerabend, C., R.M. Ings, and M.A. Russel, Nicotine pharmacokinetics and its application to intake from smoking. *Br J Clin Pharmacol*, 1985. **19**(2): p. 239-47.
139. Le Houezec, J., Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2003. **7**(9): p. 811-819.
140. Haustein, K. and D. Groneberg, *Tabakabhängigkeit*. 2. Auflage ed. 2008, Heidelberg: Springer-Verlag.
141. ElSohly, M.A., et al., Delta9-Tetrahydrocannabinol as a Marker for the Ingestion of Marijuana versus Marinol: Results of a Clinical Study. *Journal of Analytical Toxicology*, 2001. **25**(7): p. 565-571.
142. Radünz, L., et al., THCVA-A: A new additional marker for illegal cannabis consumption. *Forensic science international*, (0).
143. Levin, F.R., et al., Delta9-Tetrahydrocannabinol testing may not have the sensitivity to detect marijuana use among individuals ingesting dronabinol. *Drug and Alcohol Dependence*. **106**(1): p. 65.

10 Lebenslauf

Diese Seite enthält persönliche Daten und ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.