
**SYNTHETISCHE CANNABINOIDE IN DER FORENSISCHEN
TOXIKOLOGIE**

**METABOLISMUS UND NACHWEIS IN UNTERSCHIEDLICHEN
MATRICES**



INAUGURALDISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG IM BREISGAU

vorgelegt von
Melanie Hutter
geboren am 11.03.1984 in München

2014

Die praktischen Arbeiten zur Erstellung dieser Dissertation wurden im Zeitraum von Mai 2010 bis Dezember 2013 am Institut für Rechtsmedizin des Klinikums der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Breit

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Prof. Dr. Thorsten Koslowski

Referent:

Prof. Dr. Michael Müller

Betreuer der Arbeit und Koreferent:

PD Dr. Volker Auwärter

Tag der Promotion:

10.02.2014

Danksagung

Mit Fertigstellung dieser Dissertationsschrift ist es mir nun am Herzen gelegen mich bei all jenen zu bedanken, die mich auf meinem bisherigen Weg so wundervoll unterstützt haben. Mein großer Dank geht an meinen Betreuer PD Dr. Volker Auwärter. Lieber Volker, neben der Aufnahme in deinen noch jungen Arbeitskreis und die Bereitstellung des interessanten und wirklich praxisnahen Dissertationsthemas bedanke ich mich für all das Vertrauen, dass du in mich gesetzt hast. Ich denke gerne zurück an ertragsreiche Diskussionen, all deine Ideen und Anregungen. Mit deiner unvergleichlichen Natur warst du mir in vielen Belangen ein Vorbild.

Herrn Prof. Dr. Michael Müller danke ich besonders für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Betreuung meiner Arbeit vonseiten der Fakultät für Chemie und Pharmazie.

Großer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Stefan Pollak für sein Einverständnis zu der Durchführung der vorliegenden Arbeit am Institut für Rechtsmedizin in Freiburg. Vielen Dank für die finanziellen Unterstützungen, nicht zuletzt für die Möglichkeit wissenschaftliche Ergebnisse national und international präsentieren zu können.

Mein Dank geht ebenfalls an Prof. Dr. Wolfgang Weinmann, dem ich zunächst meine Einstellung und Einführung in das Institut für Rechtsmedizin in Freiburg zu verdanken habe.

Viel Motivation und Kraft habe ich während meiner Dissertationszeit vor allem aus dem wohl besten Arbeitsumfeld der Welt schöpfen können. Ich bedanke mich bei allen jetzigen und auch ehemaligen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts, besonders aber der Abteilung für Forensische Toxikologie.

Niemals da wo ich heute bin, wäre ich wohl ohne meine Familie und Freunde. Ich danke euch allen für eure immerwährende Unterstützung, Zusprüche, Aufbaumaßnahmen und euer Vertrauen mich ich selbst seien zu lassen.

Während der Promotionszeit veröffentlichte Publikationen

A) Als Erstautor

Hutter M., Moosmann B., Wurst F.M., Auwärter V.

Benzodiazepine in der Fahreignungsdiagnostik – Immunoassay versus Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS); Fehlverhalten als Unfallfaktor – Kriterien und Methoden der Risikobeurteilung, Tagungsband 7. Gemeinsamen Symposium der DGVP und DGVM; **2012**, 135-138.

Hutter M., Broecker S., Kneisel S., Auwärter V.

Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques; Journal of Mass. Spectrometry, **2012**, 47, 54–65.

Hutter M., Kneisel S., Auwärter V., Neukamm M.A.

Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Journal of Chromatography B, **2012**, 903, 95– 101.

Hutter M., Moosmann B., Kneisel S., Auwärter V.

Characteristics of the designer drug and synthetic cannabinoid receptor agonist AM-2201 regarding its chemistry and metabolism; Journal of Mass Spectrometry, **2013**, 48, 885–894.

B) Als Co-Author

Weinmann W., König S., Lanz S., Hutter M., Dresen S., Köhler C., Grobosch T.

Modified Multi Target Screening (MTS) with QTrap 3200 and methanol as eluent with Luna PFP column, Toxichem Krimtech, **2011**; 78, 240-243.

Willecke F., Zeschky K., Ortiz Rodriguez A., Colberg C., Auwärter V., Kneisel S, Hutter M., Lozhkin A., Hoppe N., Wolf D., von zur Mühlen C., Moser M., Hilgendorf I., Bode C, Zirlik A.

Cannabinoid receptor 2 signaling does not modulate atherogenesis in mice; PLoS ONE, **2011**, 6(4), e19405.

Auwärter A., Kneisel S., Hutter M., Thierauf A.

Synthetic cannabinoids. Forensic relevance and interpretation of analytical findings; Rechtsmedizin, **2012**, 22(4), 259-269.

Moosmann B., Huppertz L., Hutter M., Buchwald A., Ferlino S., Auwärter V.

Detection and identification of the designer benzodiazepine flubromazepam and preliminary data on its metabolism and pharmacokinetics; Biological Mass Spectrometry, **2013**, 48(11), 1150-1159.

Moosmann B., Hutter M., Huppertz L., Ferlino S., Redlingshöfer L., Auwärter V.

Characterization of the designer benzodiazepine pyrazolam and its detectability in human serum and urine; Forensic Toxicology, **2013**, 31(2), 263-271.

Sundström M., Pelander A., Angerer V., Hutter M., Kneisel S., Ojanperä I.

A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine; Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2013**, 405, 8463–8474.

Hermanns-Clausen M., Kneisel S., Hutter M., Szabo B., Auwärter V.

Acute intoxication by synthetic cannabinoids - Four case reports; Drug Testing and Analysis, **2013**, 5, 790–794.

Musshoff F., Madea B., Kernbach-Wighton G., Bicker W, Kneisel S., Hutter M., Auwärter V

Driving under the influence of synthetic cannabinoids ("Spice"): a case series; International Journal of Legal Medicine, **2014**,128(1), 59-64.

C) In Vorbereitung:

Hutter M., Moosmann B., Auwärter V. Neukamm M.A.

Hair analysis for JWH-018, JWH-122 and JWH-210 after passive in vivo exposure to synthetic cannabinoid smoke.

Hutter M., Broecker S., Kneisel S., Auwärter V.

Updates in metabolism of synthetic cannabinoids: Identification of the major urinary metabolites of nine common synthetic cannabinoids.

Hutter M., Shuster O., Dahm P., Redlingshöfer L., Müller M., Auwärter V.

LC-MS/MS based method for the detection and partial quantification of the major metabolites of 18 synthetic cannabinoids in human urine samples.

Vorträge

Hutter M., Kneisel S., Broecker S., Auwärter V.

Identification of the Major Metabolites of 6 Synthetic Cannabinoids Present in "Herbal Mixtures" in Human Urine Samples Using LC-MS/MS Techniques, 2011, Joint Meeting of the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) & The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), San Francisco, 25.-30.9.2011.

Hutter M., Moosmann B., Wurst F.M., Auwärter V.

Benzodiazepine in der Fahreignungsdiagnostik - Immunoassay versus Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS), 2011 ,7. Gemeinsames Symposium der Deutschen Gesellschaft für Verkehrspsychologie und der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin, 09.-10.09.2011.

Hutter M., Broecker S., Auwärter V.

LC-MS/MS based screening-method for the detection of the major metabolites of 12 synthetic cannabinoids in human urine samples, 2012, The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Hamamatsu, Japan, 03.-08.06.2012.

Hutter M., Ippisch J., Schultis H-W., Auwärter V.

Evaluation of an ELISA for synthetic cannabinoids applied to urine samples by comparison with a comprehensive and highly sensitive LC-MS/MS method, 2012, 91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Freiburg, 18.-22.09.2012.

Hutter M., Broeker S., Kneisel S., Moosmann B., Auwärter V.

Major Urinary Metabolites of Synthetic Cannabinoids in Humans – An Update, 2013, 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Funchal, Madeira, Portugal. 2.-6.09.2013.

Hutter M., Ippisch J., Hermeling J., Schultis H-W., Auwärter V.

The role of synthetic cannabinoids in fitness to drive testing, 2013, 23rd World Congress International Traffic Medicine Association, Hamburg, 19.-20.05.2013.

Poster

Hutter M., Ippisch J., Schultis H-W., Auwärter V.

Evaluation of an ELISA for synthetic cannabinoids applied to urine samples by comparison with a comprehensive and highly sensitive LC-MS/MS method, 2012, The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), Hamamatsu, Japan, 03.-08.06.2012.

Hutter M., Redlingshöfer L., Auwärter V.

LC-MS/MS based method for the detection and partial quantification of the major metabolites of 15 synthetic cannabinoids in human urine samples, 2013, XVIII. GTFCh-Symposium, Moosbach (Baden), 18.-20.04.2013.

Hutter M., Ippisch J., Hermeling J., Schultis H-W., Auwärter V.

Synthetische Cannabinoide in der Fahreignungsdiagnostik, 2013, 9. Gemeinsames Symposium der DGVP und DGVM, Heringsdorf, 27.-28.09.13.

Hutter M, Rudloff H, Moosmann B, Auwärter V, Neukamm M: Hair Analysis for Synthetic Cannabinoids: A Study on the Issue of Passive Contamination by Side-Stream Smoke, 2013, 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT), , Funchal, Madeira, Portugal. 2.-6.09.2013.

Auszeichnungen

Melanie Hutter: Springer Paper Award, TIAFT Young Scientists Committee at the Annual Meeting of TIAFT, Hamamatsu, 2012, 04.06.2012 für:

Hutter M., Broecker S., Kneisel S., Auwärter V.

Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques; *Journal of Mass. Spectrometry*, **2012**, 47, 54–65

Melanie Hutter: Posterpreis anlässlich des 9. Gemeinsamen Symposium der DGVP & DGVM für den Beitrag:

Hutter M., Ippisch J., Hermeling J., Schultis H-W., Auwärter V.

Synthetische Cannabinoide in der Fahreignungsdiagnostik, 2013, 9. Gemeinsames Symposium der DGVP und DGVM, Heringsdorf, 27.-28.09.13

Abkürzungsverzeichnis

ACMD	Advisory Council on the Misuse of Drugs, UK
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CB ₁	Cannabinoidrezeptoren Typ 1
CB ₂	Cannabinoidrezeptoren Typ 2
CE	Collision energy
CEM	Channel Elektron Multiplier
CID	Collision induced dissociation
CL	Clearance
CL _{int}	Intrinsic Clearance
CRM	Charge Residue Model
CYP	Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen
CXP	Collision-cell-exit-potential
DC	Dünnschichtchromatographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	Declustering Potential
EDDP	2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin
EM	extensive metabolizer
EMCDDA	European Monitoring Centre for Drugs and Drugs of Abuse
EP	Entrance Potential
EPI	Enhanced Product Ion
ESI	Electrospray Ionisation
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FT	Fourier Transformation
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GSH	Glutathion

Abkürzungsverzeichnis

GST	Glutathion-S-transferase
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
HR	High Resolution
IDM	Ion Desorption Model
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LC	Flüssigchromatographie
LIT	Lineare Ionenfalle
MDA	3,4-Methylendioxyamphetamin
MDEA	Methylendioxyethylamphetamin
MDMA	3,4-Methylendioxymethamphetamin
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
NAT	N-Acetyltransferase
NMR	Kernresonanzspektrometrie
PM	Poor Metabolizer
PAR	Peak Area Ratio
QC	Quality Control
RAF	Relative-Activity-Factor
RSD	relative Standardabweichung
RT	Retentionszeit
SIM	Selected Ion Monitoring
sMRM	scheduled Multiple-Reaction-Monitoring
SULT	Sulfotransferase
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
ToF	Time-of-Flight
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
UDP-GT	Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronidyltransferase

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Theoretische Grundlagen	1
1.1 Synthetische Cannabinoide	1
1.1.1 Einführung	1
1.1.2 Strukturelle Klassifizierung	2
1.1.3 Anwendung als Droge.....	4
1.2 Aktuelle Situation	5
1.2.1 Prävalenz und Konsummotivation	5
1.2.2 Marktdynamik	6
1.2.3 Legaler Status	7
1.2.4 Analysemethoden.....	7
1.3 Pharmakologische und toxikologische Aspekte	8
1.3.1 Pharmakologie.....	8
1.3.2 Toxizität	11
1.4 Metabolismus.....	12
1.4.1 Metabolismus synthetischer Cannabinoide.....	16
1.5 Massenspektrometrie	18
1.5.1 Electrospray Ionisation	18
1.5.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionisation.....	19
1.5.3 Tandemmassenspektrometrie	19
1.5.3.1 Messmodi in der Tandemmassenspektrometrie	20
2 Ziel der Arbeit.....	23
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Chemikalien	25
3.2 Referenzsubstanzen	25

3.3 Enzymkomponenten.....	28
3.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
3.5 Herstellen von Lösungen	30
3.5.1 Phosphatpuffer pH 6 (0,1 M).....	30
3.5.2 Boratpuffer pH 9 (gesättigt).....	30
3.5.3 Fließmittel A für die LC-MS/MS-Analytik.....	30
3.5.4 Herstellung der Standardlösungen.....	30
3.5.5 Herstellung der Arbeitslösungen für nicht-deuterierte und deuterierte Standards	31
3.5.5.1 Herstellung der D _x -Lösung für die Urinanalytik.....	31
3.5.5.2 Herstellung der D ₀ -Lösungen für die Urinanalytik.....	32
3.5.5.3 Herstellung der D _x -Lösung für die Haaranalytik	33
3.5.5.4 Herstellung der D ₀ -Lösungen für die Haaranalytik.....	34
3.6 Methodik für das Screening auf die Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide.....	35
3.6.1 Anwendung für Urinproben.....	35
3.6.1.1 Probenvorbereitung	35
3.6.2 Anwendung für humane Lebermikrosomenansätze.....	35
3.6.2.1 Enzyminkubationen.....	35
3.6.2.2 HPLC-Methode	37
3.6.2.3 MS/MS-Methode.....	37
3.7 Methodik der Analyse der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urin-/Serumproben: ...	39
3.7.1 Probenvorbereitung.....	39
3.7.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	39
3.7.2 HPLC-Methode.....	39
3.7.3 MS/MS-Methode.....	40
3.8 Methodik der Analyse synthetischer Cannabinoide in Haarproben	44
3.8.1 Segmentierung der Haarproben.....	44
3.8.2 Dekontamination der Haarproben	44
3.8.3 Zerkleinern und Einwaage der Haarproben.....	44
3.8.4 Probenvorbereitung.....	45
3.8.4.1 Zugabe der deuterierten Standards	45
3.8.4.2 Ethanolische Ultraschall-Extraktion und Vorbereitung für die LC-MS/MS-Analyse	45
3.8.5 HPLC-Methode.....	45
3.8.6 MS/MS-Methode	46

4	Experimenteller Teil	49
4.1	Besonderheiten im Metabolismus von AM-2201	49
4.1.1	<i>Untersuchung authentischer Urinproben</i>	49
4.1.2	<i>Untersuchung von Rauchkondensat</i>	49
4.1.3	<i>Orale Applikation von AM-2201</i>	50
4.2	In vitro Untersuchungen des Metabolismus ausgewählter synthetischer Cannabinoide	51
4.2.1	<i>Optimierung der Reaktionsparameter</i>	51
4.2.2	<i>Initial Screenings</i>	51
4.2.3	<i>Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit</i>	51
4.2.4	<i>Bestimmung der Enzymkinetiken</i>	52
4.2.4.1	Wahl der Reaktionsparameter	52
4.2.4.2	Bestimmung der kinetischen Konstanten	53
4.3	Validierung der Urin- und Haaranalytik nach forensischen Richtlinien	55
4.3.1	<i>Selektivität</i>	55
4.3.2	<i>Linearität der Kalibration</i>	56
4.3.3	<i>Genauigkeit</i>	56
4.3.4	<i>Stabilität aufgearbeiteter Proben</i>	56
4.3.5	<i>Analytische Grenzen – Nachweis- und Bestimmungsgrenze</i>	56
4.3.6	<i>Matrixeffekt, Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute</i>	57
4.4	Studie zur Rauchkontamination von Haarproben	58
4.4.1	<i>Studiendesign</i>	58
4.4.2	<i>Probenahme</i>	58
4.4.3	<i>Probenvorbereitung</i>	59
5	Ergebnisse und Diskussion	61
5.1	Identifizierung der Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide	61
5.1.1	<i>JWH-018</i>	64
5.1.2	<i>JWH-073</i>	67
	<i>Bindungsaffinitäten der Metaboliten von JWH-018 und JWH-073 zum CB₁-Rezeptor</i>	69
5.1.3	<i>JWH-250</i>	71
5.1.4	<i>JWH-081</i>	73
5.1.5	<i>AM-694</i>	75
5.1.5.1	In vivo	75
5.1.5.2	In vitro	76

Inhaltsverzeichnis

5.1.6	<i>JWH-122</i>	79
5.1.6.1	In vivo	79
5.1.6.2	In vitro.....	80
5.1.7	<i>JWH-210</i>	83
5.1.8	<i>JWH-019</i>	85
5.1.9	<i>RCS-4</i>	87
5.1.9.1	In vivo	87
5.1.9.2	In vitro.....	88
5.1.10	<i>JWH-007</i>	90
5.1.11	<i>JWH-203</i>	92
5.1.12	<i>AM-2201</i>	94
5.1.12.1	Besonderheiten im Metabolismus von <i>AM-2201</i>	96
5.1.13	<i>MAM-2201</i>	104
5.1.13.1	In vivo	104
5.1.13.2	In vitro.....	105
5.1.14	<i>JWH-307</i>	107
5.1.15	<i>UR-144</i>	109
5.1.16	<i>XLR-11</i>	112
5.1.17	<i>Feinmassenexperimente zur Absicherung der identifizierten Metaboliten</i>	113
5.2	Cytochrom P450 Reaction Phenotyping.....	115
5.2.1	<i>Initial Screenings</i>	115
5.2.1.1	<i>AM-694</i>	116
5.2.1.2	<i>RCS-4</i>	117
5.2.1.3	<i>JWH-122</i>	118
5.2.1.4	<i>MAM-2201</i>	119
5.2.2	<i>Kinetikstudien</i>	121
5.2.2.1	<i>AM-694 und MAM-2201</i>	121
5.2.2.2	<i>RCS-4 und JWH-122</i>	122
5.3	Methode zum Nachweis der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urinproben	128
5.3.1	<i>Validierung der Methode</i>	130
5.3.1.1	Kalibrationsmodell, Selektivität und Spezifität	130
5.3.1.2	Genauigkeit und Präzision	131
5.3.1.3	Analytische Grenzen.....	132

5.3.1.4	Stabilität aufgearbeiteter Proben (Autosampler-Stabilität).....	132
5.3.1.5	Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute und Matrixeffekte	132
5.4	Untersuchung von Urinproben mit forensischer Relevanz	135
5.4.1	<i>Nachweisbarkeitsdauer</i>	140
5.5	Haaranalytik zum Nachweis synthetischer Cannabinoide	142
5.5.1	<i>Validierung der Methode</i>	142
5.5.1.1	Kalibrationsmodell, Selektivität und Spezifität	142
5.5.1.2	Genauigkeit und Präzision	143
5.5.1.3	Analytische Grenzen	143
5.5.1.4	Stabilität aufgearbeiteter Proben (Autosampler-Stabilität).....	143
5.5.1.5	Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute und Matrixeffekte	143
5.6	Untersuchung von Haarproben mit forensischer Relevanz	147
5.7	Studie zur Rauchkontamination von Haarproben	149
5.8	Synthetische Cannabinoide in der Fahreignungsdiagnostik.....	156
5.9	Evaluierung eines ELISA-basierten Schnelltests zum Nachweis synthetischer Cannabinoide im Urin	159
6	Zusammenfassung	163
7	Literaturverzeichnis	167
Anhang	181
	Strukturen der synthetischen Cannabinoide und ihrer Metaboliten (alphabetisch)	181
	Feinmassen der in Humanurin identifizierten Metaboliten synthetischer Cannabinoide	198
	Kinetikdiagramme	207
	<i>RCS-4</i>	207
	N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4	207
	Hydroxyindol-RCS-4	209
	O-Desmethyl-RCS-4	211
	<i>JWH-122</i>	212
	N-(4-Hydroxypentyl)-JWH-122	212
	Hydroxynaphthyl-JWH-122	214
	6-Hydroxyindol-JWH-122	216
	Ableich der identifizierten Hauptmetaboliten mit Referenzstandards	218

Herstellerblatt zur Kreuzreaktivität des evaluierten ELISA222

1 Theoretische Grundlagen

1.1 Synthetische Cannabinoide

1.1.1 Einführung

Cannabis ist eine der ältesten und am häufigsten konsumierten Drogen weltweit^[1, 2]. Der psychotrope Effekt der Cannabispflanze (*Cannabis sativa*) geht hauptsächlich auf deren aktiven Inhaltsstoff Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC, Abbildung 1) zurück, der als Partialagonist am CB₁-Rezeptor des Endocannabinoidsystems wirkt. Nach der Beschreibung der Totalsynthese von THC durch Mechoulam u. Gaoni^[3] im Jahr 1965 und der Entdeckung des Endocannabinoidsystems sowie der Cannabinoidrezeptoren Typ 1 (CB₁) und Typ 2 (CB₂) in den frühen 1990er Jahren^[4, 5], nahm die Forschungsaktivität auf dem Gebiet der Synthese und pharmakologischen Charakterisierung synthetischer Cannabinoide stark zu.

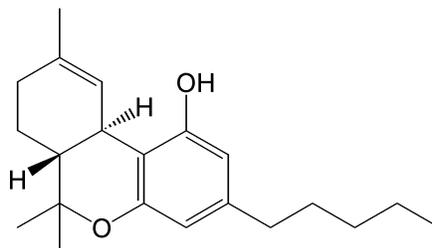


Abbildung 1: Struktur des Δ^9 -Tetrahydrocannabinols.

Die Entdeckung der positiven Wirkungen von Cannabinoiden bei zahlreichen Krankheitsbildern wie Krebs^[6], multiple Sklerose^[7] und Huntington Disease^[8] gaben Anlass dazu, den therapeutischen Nutzen der Cannabinoide zu evaluieren. In manchen Ländern werden mittlerweile Medikamente auf Basis von Cannabisextrakt (Sativex®) bzw. auf Basis von teilsynthetisch hergestelltem THC wie Dronabinol (Marinol®) oder THC-Derivaten wie Nabilon (Cesamet®) verabreicht, um durch Chemotherapie induzierte Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen sowie Krankheiten wie multiple Sklerose, Anorexie und Glaukome zu behandeln^[9-11]. Neben synthetisch hergestelltem THC wurden bald auch die ersten Cannabinoidanaloga

synthetisiert. Während diese sich zunächst chemischstrukturell stark am THC orientierten, wie CP-47, 497^[12] und HU-210^[13], wurden nach Entdeckung und Klonung der CB-Rezeptoren später auch völlig neue Strukturtypen wie Beispiel die Aminoalkylindole als potente Bindungspartner am Cannabinoidrezeptor erkannt^[14]. Seitdem ist das wissenschaftliche Interesse an diesen Verbindungen kontinuierlich gestiegen und führte zu der Synthese hunderter Substanzen mit hoher oder mittlerer Bindungsaffinität zu einem oder beiden bisher bekannten Cannabinoidrezeptoren.

1.1.2 Strukturelle Klassifizierung

Strukturell unterscheiden sich die meisten der bisher in Räuchermischungen identifizierten synthetischen Cannabinoide stark von THC. Die Entwicklung der Cannabimimetika trieb besonders die Arbeitsgruppe um John W. Huffman im Rahmen eines vom amerikanischen National Institute on Drug Abuse geförderten Forschungsprojekts durch umfangreiche Struktur-Wirkungsbeziehungs-Studien voran^[15, 16]. Die so entwickelten bioaktiven Substanzen, die zur Klasse der Naphthoylindole, Naphthoylpyrrole oder Phenylacetylindole zählen, tragen deshalb nach John W. Huffman die Initialen „JWH“ im Namen. In den meisten Fällen lassen sich die Abkürzungen aus den Laboratorien ableiten, in welchen die Substanzen das erste Mal synthetisiert wurden: AM – Alexandros Makriyannis, Northwestern University, Boston, CP – Pfizer Inc., Groton, HU – Hebrew University, Jerusalem^[17].

Generell lassen sich die auch als Cannabimimetika bezeichneten Substanzen wie von der Advisory Council on the Misuse of Drugs, UK, (ACMD) vorgeschlagen einordnen^[18]:

- (1) Naphthoylindole (z.B. JWH-018, JWH-073, JWH-122, AM-2201)
- (2) Naphthylmethylindole (z.B. JWH-175)
- (3) Naphthoylpyrrole (z. B. JWH-307)
- (4) Naphthylmethylindene (z.B. JWH-176)
- (5) Phenylacetylindole (z.B. JWH-203, JWH-250);
- (6) Cyclohexylphenole (z.B. CP-47,497-C8)
- (7) Klassische Cannabinoide (z.B. THC, Cannabinol, HU-210)

Diesen hinzuzufügen sind desweiteren die Eicosanoide (zum Beispiel Anandamid (Endocannabinoid) oder Methanandamid (synthetisch)) (8) und weitere synthetische Cannabinoide, welche sich in keine der oben genannten Gruppen einordnen lassen (z.B. AM-694, UR-144, XLR-11). Eine Übersicht über die Strukturen der unterschiedlichen Klassen gibt Abbildung 2.

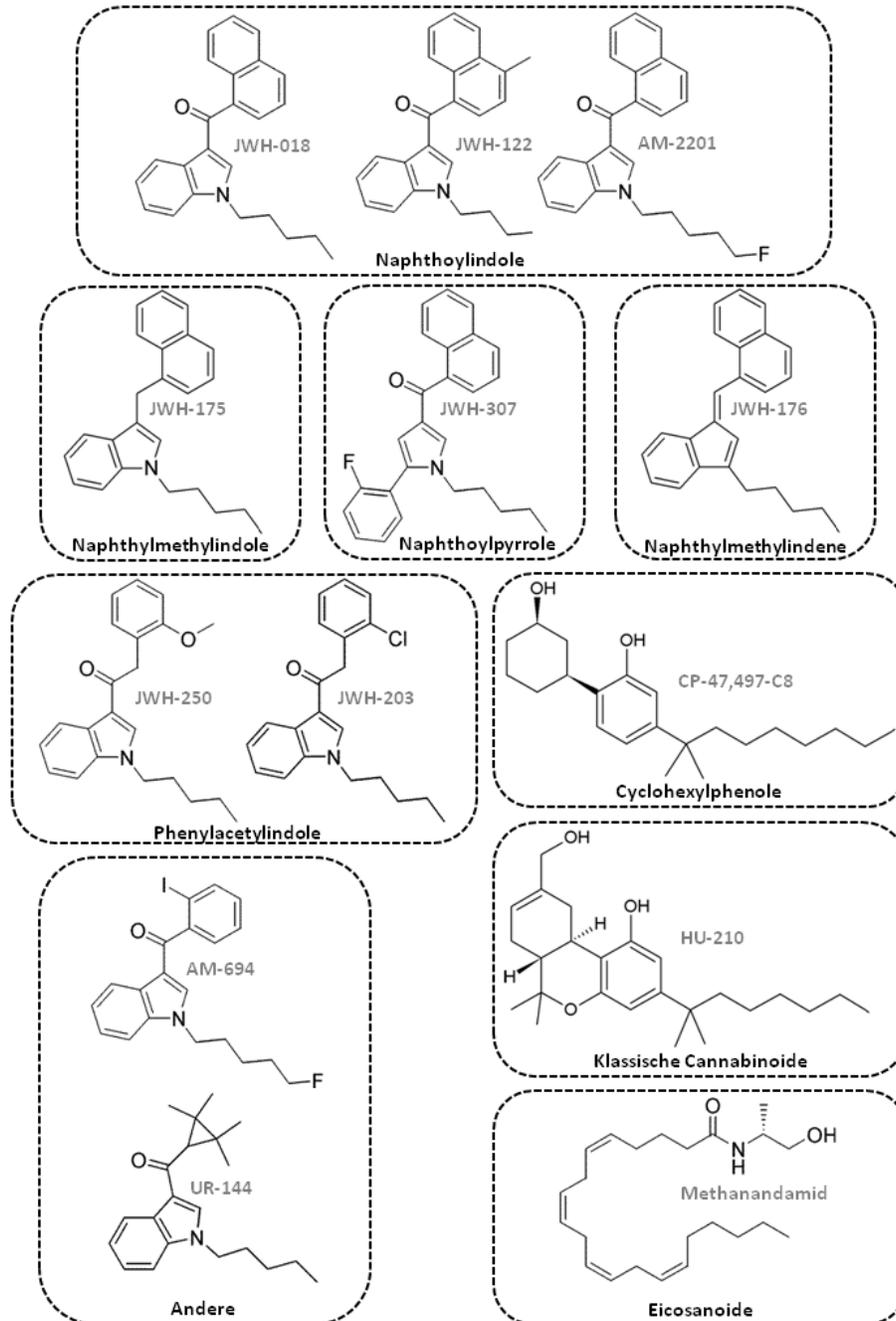


Abbildung 2: Klassifizierung synthetischer Cannabinoide.

1.1.3 Anwendung als Droge

Wie Lysergsäurediethylamid (LSD) und 3,4-Methylenedioxy-N-methylamphetamin (MDMA, Ecstasy) der Sprung aus dem Feld der pharmazeutischen Forschung in die Welt der Drogen gelang, ist nun nach Jahren der Forschung und Entwicklung auch der Missbrauch synthetischer Cannabinoide als Droge zu beobachten^[19]. Hierzu werden die Chemikalien in Untergrundlaboratorien hergestellt, auf getrocknetes Pflanzenmaterial aufgesprüht und in kleinen bunt bedruckten Folienpäckchen unter einer unermüdlichen Vielzahl an Namen wie „Spice“, „Maya“ oder „Jamaican Gold“ vermarktet. In Deutschland begann um 2004 der Vertrieb synthetischer Cannabinoide in Kräutermischungen über das Internet, wobei der Markt seither eine hohe Dynamik aufweist. Großflächig bekannt wurde „Spice“ im Jahr 2008, und die Popularität und Verbreitung ähnlicher Produkte ist seither noch immer nicht abgebrochen. Dies liegt insbesondere daran, dass die meisten synthetischen Cannabinoide, die auf die Kräutermischungen aufgebracht werden, eine extrem hohe Affinität zu den Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und/oder CB₂ aufweisen und „Spice“ somit einen zunächst legalen Ersatz für Cannabis darzustellen scheint.



Abbildung 3: Kräutermischungen in ihrer bunten und besonders für Jugendliche attraktiven Aufmachung.

In Europa und den USA werden die Päckchen, die in der Regel zwischen 1-3 g Kräutermischung enthalten, für 20-30 Euro (bzw. 30-40 US-Dollar) in Head-Shops oder über das Internet angeboten^[20, 21]. Der Gehalt an synthetischen Cannabinoiden schwankt beträchtlich. So wurden beispielsweise zwischen 1-17 mg/g für CP-47,497-C8, zwischen 2-36 mg/g für JWH-018, zwischen 6-23 mg/g JWH-073 in verschiedenen Kräutermischungen nachgewiesen^[22, 23]. Auch wenn die Päckchen den Aufdruck „not for human consumption“ (o.ä. Formulierungen) tragen und durch Verräuchern angeblich zur Verbesserung der Raumluft beitragen sollen, werden sie doch von den

Käufern in erster Linie in einer Pfeife oder einem „Joint“ geraucht, um einen Marijuana-ähnlichen Rauschzustand zu erlangen. Weitere, aber wenig verbreitete Konsumformen sind die intravenöse Applikation oder orale Aufnahme, beispielsweise in Form eines Tees.

Die Synthese der synthetischen Cannabinoide selbst findet wahrscheinlich in China^[1] und anderen asiatischen Ländern, der Vertrieb vor allem über das Internet statt. Interessanterweise sind die Substanzen meist von relativ hoher Reinheit^[24]. Wo genau die Produktion der Verkaufsprodukte bewerkstelligt wird, ist bis heute unklar^[25]. Auffallend sind die signifikanten Unterschiede in Typ und Menge der synthetischen Cannabinoide in denselben Produkten unterschiedlicher Chargen^[26]. Neben den synthetischen Cannabinoiden werden gelegentlich andere Zusätze, wie Konservierungsmittel, Fettsäuren, deren Amide und Ester oder andere Wirkstoffe, wie zum Beispiel das Benzodiazepin Phenazepam, sowie psychotrope Pflanzen wie *Salvia divinorum*, Kratom oder Cannabis in den Kräutermischungen detektiert^[27-30].

1.2 Aktuelle Situation

1.2.1 Prävalenz und Konsummotivation

Basierend auf Informationen aus einem „Epidemiologischen Suchtsurvey“ aus dem Jahre 2009, lag die Prävalenz von „Spice“ unter Erwachsenen bei ca. 0,8% (18- bis 64-Jährige). Dabei sind die Konsumenten vor allem männlich und der Großteil zwischen 18 und 29 Jahren alt^[31]. Schülerbefragungen aus dem Raum Frankfurt ergaben Prävalenzen von 6% im Jahr 2008, 7% im Jahr 2009, 9% im Jahr 2010 und jeweils 7% in den Jahren 2011 und 2012^[32]. Im Vergleich dazu gaben nach einer landesweiten Umfrage an High-Schools in den USA 11,3% der 12. Klässler einen Konsum der Produkte im vorangegangenen Jahr zu. In dieser Gruppe konsumierten 36,4% im selben Zeitraum Cannabisprodukte^[33].

Die einfache Verfügbarkeit beispielsweise über das Internet, die ausgesprochen starke Wirkung, die Erschwinglichkeit und die Annahme, die Produkte seien legal, zählen zu den Hauptmotiven für die Konsumenten. Vor allem die Tatsache, dass die synthetischen Cannabinoide bisher mit immunologischen Methoden oder Schnelltests nicht sicher erfasst werden können, macht den Konsum der Produkte vor allem für Personen, die sich regelmäßigen Drogentests unterziehen müssen (zum Beispiel in Therapieeinrichtungen, forensischen Psychiatrien oder Strafvollzugsanstalten), sehr attraktiv^[20, 34].

1.2.2 Marktdynamik

Ein besonderer Aspekt des „Spice“-Phänomens liegt in der ständigen Veränderung der Kräutermischungen hinsichtlich der enthaltenen synthetischen Cannabinoide. Durch die kontinuierliche Unterstellung neuer Substanzen unter das Betäubungsmittelgesetz (BtMG) werden die Hersteller zur Verwendung immer wieder neuer, strukturell abgewandelter Substanzen veranlasst^[23, 35, 36].

Die ersten „Spice“-Produkte waren noch fast ausschließlich mit CP-47,497-C8 oder dem Aminoalkylindol JWH-018 versetzt^[19, 22, 23, 29, 37, 38]. Kurz nach der Aufnahme dieser Substanzen in Anlage II des BtMG in Deutschland im Januar 2009^[39] tauchten strukturell ähnliche Substanzen auf dem Markt auf, welche noch nicht dem Betäubungsmittelgesetz unterstellt waren^[23, 40-44].

Einen Überblick über die europäische Marktentwicklung gibt jährlich das European Monitoring Centre for Drugs and Drugs of Abuse (EMCDDA): Wie in Abbildung 4 zu erkennen ist, nimmt die Anzahl der pro Jahr festgestellten „Neuen Drogen“ stetig zu. Neben den synthetischen Cannabinoiden, die einen erheblichen Anteil ausmachen, zählen zu dieser auch als „Legal Highs“ bekannten Gruppe sogenannte Designerstimulanzien, darunter Cathinone, Phenylpiperazine, Tryptamine und Phenethylamine^[2].

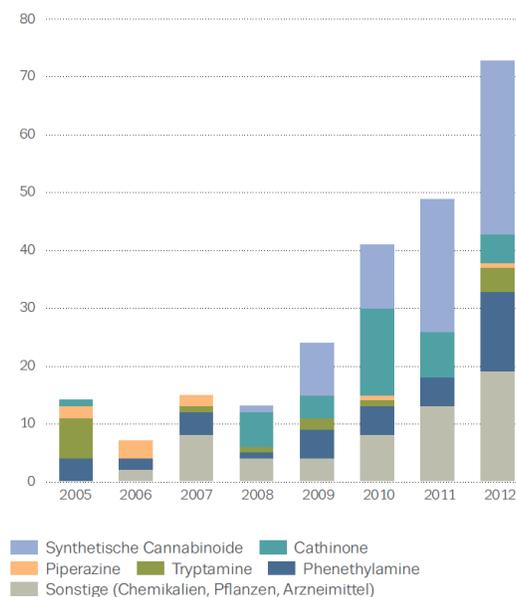


Abbildung 4: Anzahl und Hauptgruppen der an das EU-Frühwarnsystem gemeldeten neuen psychoaktiven Substanzen^[2].

1.2.3 Legaler Status

Der legale Status der synthetischen Cannabinoide variiert durch das Aufkommen immer wieder neuer Substanzen stark. In Deutschland wurden JWH-018, CP-47,497 sowie dessen C6-, C8- und C9-Homologe 2009 relativ kurz nach ihrer Entdeckung im Dezember 2008 dem Betäubungsmittelgesetz unterstellt^[39]. Ein Jahr später wurden zusätzlich JWH-019 und JWH-073 unterstellt und viele weitere folgten^[45-47]. Die Substanzen werden in Anlage II des BtMG aufgeführt und sind daher als verkehrsfähige, aber nicht verschreibungsfähige Betäubungsmittel einzustufen. Andere Länder nutzen entweder ebenfalls die Einzelunterstellung der Substanzen oder sogenannte „generische“ Unterstellungen, in denen eine gemeinsame Grundstruktur mit definierten Substituenten dem jeweiligen Gesetz unterstellt wird^[48].

1.2.4 Analysenmethoden

Welche Inhaltsstoffe für die psychoaktive Wirkung der „Spice“-Produkte verantwortlich sind, war zunächst unbekannt und blieb seit deren Aufkommen im Jahr 2004 einige Jahre ungeklärt. Potenziell psychoaktive Substanzen pflanzlichen Ursprungs, die zunächst für die hervorgerufene Wirkung verantwortlich gemacht wurden, konnten in den Produkten nicht nachgewiesen werden. Erst im Jahr 2008 gelang es, die synthetischen Cannabinoide CP-47-497-C8 sowie JWH-018 in Kräutermischungen zu identifizieren^[19, 49]. Aufgrund der häufig geänderten Zusätze bleibt es nach wie vor eine Herausforderung, die psychoaktiv wirksamen Substanzen, welche den „Spice“-Produkten zugesetzt werden, durch analytische Methoden zu identifizieren. In vielen Fällen führt nur die Kombination mehrerer analytischer Verfahren, wie zum Beispiel Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), Dünnschichtchromatographie, Feinmassenexperimente und Kernresonanzspektroskopie (NMR) zur Aufklärung der Struktur der neuen Verbindungen. Aufgrund der strukturellen Unterschiede der synthetischen Cannabinoide zu THC ist eine Detektion mit beispielsweise THC-üblichen Schnelltests nicht möglich. Die Entwicklung vergleichbar zuverlässiger Tests scheint aufgrund der sich ständig ändernden Strukturen praktisch unmöglich. Inzwischen haben sich vor allem Massenspektrometrie (MS)-basierte Verfahren zur Detektion der Verbindungen etabliert. Viele der in Kräutermischungen enthaltenen synthetischen Cannabinoide können mittlerweile durch Abgleich mit GC-MS-Datenbanken identifiziert werden^[29, 50-52]. Auch eine Vielzahl analytischer Methoden, meistens LC-MS/MS basiert, die zum Nachweis einer Aufnahme synthetischer Cannabinoide in Serum, Blut oder Speichel dienen,

wurden bisher entwickelt^[53-58]. Wichtig ist hierbei vor allem das Substanzspektrum immer an den aktuellen Markt anzupassen. Um einer invasiven Probenahme (Blut) aus dem Weg zu gehen, werden oft Urin, Speichel oder Haare als alternative Matrices herangezogen. Haare eignen sich vor allem zur Erfassung eines bereits länger zurückliegenden Konsums. Im Gegensatz zu Urin, in dem in der Regel nur die Metaboliten der synthetischen Cannabinoide detektiert werden können, erlaubt die Haaranalytik eine schnelle Anpassung an alle „marktrelevanten“ Substanzen, da die Muttersubstanzen selbst detektiert werden. Die Haaranalytik wird in der forensischen Praxis hauptsächlich zur Abstinenzkontrolle herangezogen. Zur Einlagerung von Substanzen in die Haare werden aktuell mehrere Mechanismen diskutiert. Neben der Einlagerung von Substanzen durch passive Diffusion aus den Blutkapillaren in die Zellen des Haarfolikels kommt auch eine Einlagerung auch aus tieferen Hautkompartimenten, während der Bildung des Haarschafts, oder durch Diffusion aus Sebum- und Schweißsekreten in das ausgebildete Haar in Frage. Zusätzlich sollte die Einlagerung von Substanzen aus dem Umfeld in Betracht gezogen werden^[59, 60].

1.3 Pharmakologische und toxikologische Aspekte

1.3.1 Pharmakologie

Bisher wurden zwei CB-Rezeptortypen identifiziert: die CB₁- und CB₂-Rezeptoren. CB₁-Rezeptoren werden vorrangig im Gehirn exprimiert und sind unter anderem für die psychoaktiven Effekte der Cannabinoide verantwortlich. CB₂-Rezeptoren werden dagegen hauptsächlich im peripheren Gewebe oder in Immunzellen exprimiert, wo sie die immunmodulatorischen Effekte der Cannabinoide vermitteln^[61-63]. Die Cannabinoidrezeptoren gehören zur Gruppe der transmembranen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Eine agonistische Stimulation führt über die Abspaltung der α -Einheit des G-Proteins zur Hemmung der Adenylatcyclase und damit zu einer verminderten Produktion des sekundären Botenstoffes, dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Desweiteren kommt es durch einen veränderten Ca²⁺-Influx zu einer Hyperpolarisation, die eine Hemmung der Neurotransmitterausschüttung zur Folge hat, sowie zur Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen und einer Stimulation einwärts gerichteter Kaliumkanäle^[64, 65]. CB₁-Rezeptoren regulieren im Gehirn vor allem die Ausschüttung der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat, CB₂-Rezeptoren vermitteln u.a. eine anti-inflammatorische oder schmerzstillende Wirkung^[66, 67].

Die meisten der bisher in Kräutermischungen identifizierten synthetischen Cannabinoide (wie zum Beispiel JWH-018) besitzen hohe Bindungsaffinitäten zum CB₁-Rezeptor und induzieren so THC-ähnliche Effekte^[15, 16, 68-70]. Im Gegensatz zu THC sind die meisten der bisher untersuchten synthetischen Cannabinoide keine Partial-, sondern Vollagonisten am CB₁ Rezeptor^[16, 69, 71-73].

Tabelle 1: *In vitro* ermittelte Rezeptoraffinitäten einiger ausgewählter synthetischer Cannabinoide im Vergleich zu THC.

Substanz	K _i CB ₁ [nM]	Vielfaches der Affinität im	
		Vergleich zu THC	Referenz
Δ ⁹ -THC	40,7		[74]
<i>Extrem hochaffine Cannabimimetica im Vergleich zu THC</i>			
AM-694	0,08	500x	[75]
AM-2201	1,0	40x	[75]
JWH-081	1,2	34x	[73]
JWH-122	0,69	59x	[76]
JWH-210	0,46	87x	[70]
<i>Hochaffine Cannabimimetica im Vergleich zu THC</i>			
CP-47,497-C8	4,7	8x	[77]
JWH-007	9,5	4x	[73]
JWH-018	9	5x	[15]
JWH-073	8,9	5x	[73]
JWH-203	8	5x	[70]
JWH-250	11	4x	[70]
JWH-307	7,7	5x	[78]
<i>Affinität vergleichbar mit THC</i>			
UR-144	29	1.4x	[17]
XLR-11	24	1.7x	[17]

Während für einige der in Kräutermischungen enthaltenen Substanzen *in vitro* Daten bezüglich ihrer CB₁- und CB₂-Rezeptoraffinitäten publiziert wurden^[79], ist der Großteil *in vivo* noch weitgehend unerforscht. Es wird allerdings davon ausgegangen, dass das Potential dieser Verbindungen cannabimimetische Effekte auszulösen, in ihrer Wechselwirkung mit dem CB₁-Rezeptoren verankert ist^[15, 80-82], und dass die *in vitro* Untersuchungen der CB₁-Rezeptoraffinitäten möglicherweise erste Schlüsse auf deren Potenz *in vivo* zulassen. Grob lässt sich zwischen Cannabimimetica mit einer extrem hohen Affinität und solchen mit einer relativ hohen Affinität zum CB₁-Rezeptor im Vergleich zu THC unterscheiden (Tabelle 1). Inwieweit das

Vielfache der *in vitro* festgestellten Affinität eine Abschätzung auf die Potent *in vivo* zulässt, ist bisher noch unklar.

Für die Wirkungen, die durch den Konsum synthetischer Cannabinoide hervorgerufen werden, existieren keinerlei kontrollierte klinische Studien. Allerdings sind aus berichteten Selbstversuchen von Autoren^[19, 53], aus Internetforen sowie aus Daten von Fallberichten oder solchen, welche nach Intoxikationen mit diesen Substanzen erhoben wurden, einige Effekte ableitbar. Eine beispielhafte Darstellung gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Von Konsumenten selbst eingeschätzte Effekte nach dem Konsum von Produkten des „Spice“-Typs, gesammelt mittels Erowid nach^[20].

Symptom	Häufigkeit [%]
Veränderung der Sinneswahrnehmung	49
Positive Gemütslage	48
Negative Gemütslage	45
Kognitive Effekte	39
Herzrasen	30
Denkstörung	37
Ängstliche Reaktionen	37
Halluzinationen	26
Paranoia	24
Übelkeit/Erbrechen	21
Depersonalisation/Entfremdung	19
Xerostomie	18
„Hang-over“-Effekt	17
Appetitanregung	15
Amnestische Effekte	12
Okulare Veränderungen	11
Respiratorische Effekte	10
Krämpfe	2
Verlust des Bewusstseins	1

Während die meisten der akuten Effekte nach dem Konsum von „Spice“-Produkten denen nach Konsum von Cannabis stark ähneln, existieren auch entscheidende Unterschiede im Spektrum und in der Intensität der Effekte. So wurde im Falle von Intoxikationen über Beschwerden wie Agitation, Krämpfe, Bluthochdruck, starkes Erbrechen und Hypokaliämie, welche auch nach dem Konsum einer hohen Dosis THC nicht beobachtet wurden, berichtet^[83]. Zusätzlich wurden Symptome wie Psychosen, starke Stimmungsveränderungen bis hin zu suizidalen Intentionen, Panikattacken, Beeinträchtigungen des Erinnerungsvermögens, starke Arrhythmien bis hin zum Myokardinfarkt, gastroenterologische Auffälligkeiten, Nierenversagen und vielem anderen beobachtet^[20].

Zur Dauer der Wirkung nach dem Konsum liegen Daten aus einem Selbstversuch der Autoren vor. Dabei scheint die Wirkung im Vergleich zu THC nach Konsum von CP-47,497-C8 länger (5-6 h) und

nach dem Konsum von JWH-018 eher kürzer (1-2 h) zu sein^[19]. Eine verkürzte Wirkdauer im Vergleich zu THC beschreiben auch *Ginsburg et al.* im Affen. Weiter wurde hier *in vivo* gezeigt, dass THC, JWH-018 und JWH-073 ihre Wirkung über die gleichen Rezeptoren vermitteln, wie bereits aus *in vitro* Studien anzunehmen war^[84].

1.3.2 Toxizität

Die Charakterisierung vieler synthetischer Cannabinoide als Vollagonisten des CB₁-Rezeptors lässt vermuten, dass diese Substanzen hinsichtlich ihrer Toxizität die des Partialagonisten THC übersteigen. Bisher liegen nur sehr wenige toxikologische Daten aus *in vitro* Studien vor^[85, 86] und epidemiologische Studien zur akuten oder chronischen Toxizität synthetischer Cannabinoide existieren gar nicht. Aus Fallberichten sowie einigen Übersichtsartikeln zu Intoxikationen von Konsumenten synthetischer Cannabinoide sind einige Symptome ableitbar^[87-89]. So entwickelten einige Patienten nach dem Konsum synthetischer Cannabinoide Unruhe, Agitation, Schläfrigkeit und Myoklonien, Halluzinationen, Angstzustände, Tachykardie, Bluthochdruck, generalisierte Krämpfe, Übelkeit und Erbrechen, Pupillenerweiterung, akute Psychosen, Anstieg des Blutglukose-Spiegels sowie Hypokaliämie^[83, 90-96].

Bei den Effekten, welche von synthetischen Cannabinoiden ausgelöst werden, finden sich einige Gemeinsamkeiten mit denen nach einem hochdosierten THC-Konsum^[83]. Die Ursache hierfür ist möglicherweise in ihrer meist höheren Affinität zum CB₁-Rezeptor, gepaart mit einer erhöhten intrinsischen Aktivität im Vergleich zum THC, zu finden. Synthetische Cannabinoide agieren im Gegensatz zu THC als Vollagonisten am CB₁-Rezeptor^[71, 97]. Hierfür spricht ebenfalls, dass nach Auftauchen einiger hochpotenter synthetischer Cannabinoide wie JWH-122 und JWH-210 in verschiedenen Kräutermischungen, die Anzahl der gemeldeten Intoxikationen stark zunahm. Vor allem Fälle bei denen sich Symptome wie Agitation, Panikattacken, Aggressivität und Krämpfe einstellten, welche für die „milderen“ natürlichen oder synthetischen Cannabinoide seltener beobachtet wurden, häuften sich^[83].

Darüber hinaus wurden in Einzelfällen Entzugerscheinungen und Toleranzentwicklung beobachtet^[98]. Inzwischen werden auch einige Todesfälle diskutiert, die direkt oder indirekt mit dem Konsum synthetischer Cannabinoide in Verbindung stehen^[99-101].

In vitro Studien zur Toxizität einiger synthetischer Cannabinoide wurden jüngst von *Koller et al.* publiziert. Zwei im Vergleich zu THC hochaffine synthetische Cannabinoide (JWH-018, JWH-073)

und drei Substanzen (JWH-122, JWH-210, AM-694) mit extrem hoher Affinität zum CB₁-Rezeptor (vergleiche auch Tabelle 1) wurden hinsichtlich ihrer zytotoxischen, genotoxischen, immunmodulatorischen und hormonellen Eigenschaften in unterschiedlichen Zellsystemen getestet. Alle untersuchten Substanzen induzierten Zellmembranschäden, wobei die toxischen Konzentrationen mit $\geq 75 - 100 \mu\text{M}$ weit über den bisher nachgewiesenen Konzentrationen im Serum liegen (maximal 560 nM nach^[55]). Desweiteren wurden antiöstrogene Effekte sowie vereinzelt DNS-Migration und Suppression der Cytokinexpression beobachtet, wobei die toxischen Effekte jeweils erst bei relativ hohen Konzentrationen erreicht wurden. Generell kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Epithelien lokal zum Beispiel während des inhalativen Konsums weitaus höheren Konzentrationen ausgesetzt sind, als die im Serum erreichten, und dabei einige der beobachteten Effekte zum Tragen kommen^[86].

1.4 Metabolismus

Im menschlichen Organismus werden Xenobiotica über zwei Phase-I-Reaktionen und Phase-II-Reaktionen metabolisiert. Phase-I-Reaktionen, auch Funktionalisierungsreaktion genannt, bestehen aus: Hydroxylierungen, Epoxidierung, Desalkylierung, Desaminierung, Oxidation, Reduktion und Hydrolyse. Dabei wird in der Regel eine funktionelle Gruppe in das Molekül eingeführt um dessen Hydrophilie zu erhöhen. Diese Phase-I-Reaktionen werden in erster Linie durch Enzyme in der Leber katalysiert, wie zum Beispiel den Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (CYP), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-abhängige Monooxygenasen, Monoaminoxidasen, Aldehydoxidase/Xanthinoxidase, Alkoholdehydrogenase, Aldo-Ketoreduktase, Esterasen, Dehydropeptidasen oder Epoxidhydrolasen. Phase-II-Reaktionen, auch Konjugationsreaktionen genannt, beinhalten Glucuronidierung, Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung sowie Konjugation mit Aminosäuren oder Glutathion (GSH). Diese Reaktionen werden durch konjugierende Enzyme, wie die UDP-Glucuronyltransferase (UGT), Sulfotransferase (SULT), Glutathion-S-transferase (GST), N-Acetyltransferase (NAT) oder Methyltransferasen katalysiert. Glutathionkonjugate werden oft zu Cystein und N-Acetylcystein-Addukten weiter metabolisiert. In vielen Fällen führen Phase-II-Reaktionen zu einer Erhöhung der Hydrophilie und einer Herabsetzung des Verteilungsvolumens. Diese beiden Faktoren erleichtern die effektive Ausscheidung der Verbindung aus dem Körper.

Zur frühen Identifizierung möglicher Metaboliten einer Substanz können *in vitro* Systeme, wie subzelluläre Leberzellfraktionen oder Hepatocyten verwendet werden. Informationen, welche mit Hilfe dieser Ansätze gewonnen werden, können dann weiter am Menschen untersucht werden.

Anfänglich wurde vor allem GC-MS/MS zur Identifizierung und Quantifizierung der Metaboliten in den komplexen Gemischen verwendet. Aufgrund der teilweise aufwändigen Derivatisierungsprozesse, die der GC-MS-Analyse in der Regel vorausgehen, hat sich inzwischen weitgehend die LC-MS/MS mit erhöhter Schnelligkeit, verbesserter Auflösung und höherer Sensitivität und Spezifität zur schnellen Identifizierung von Metaboliten durchgesetzt. Üblicherweise verwendete Massenspektrometer sind dabei Triple-Quadrupolinstrumente, Dreidimensionale Ionenfallen und Time-of-Flight (ToF)-Massenspektrometer. Während der Großteil der analytischen Charakterisierung neuer Metaboliten mittels Triple-Quadrupol-MS durchgeführt werden kann, können zusätzliche Instrumente (Q-TOF- oder Fourier Transformation (FT)-MS) weitere wertvolle Informationen liefern. Zur vollständigen Strukturaufklärung sind MS-Experimente oft nicht ausreichend und es müssen weitere instrumentelle Methoden wie beispielsweise NMR herangezogen werden^[102].

Die kinetischen Eigenschaften von CYP Enzymen werden in den meisten Fällen ausreichend durch die Michaelis-Menten-Kinetik (Gleichung 1) beschrieben:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

wobei v die Umsatzgeschwindigkeit der metabolischen Reaktion und $[S]$ die Substratkonzentration beschreibt. K_m beschreibt die Substratkonzentration bei 50% V_{max} . Während bei Einsatz von Lebermikrosomen, die eine Vielzahl an unterschiedlichen CYP Isoformen mit unterschiedlichen Spezifitäten enthalten, die beobachteten Metabolisierungsraten nur den Netto-Effekt mehrerer Protein-Wirkstoff-Interaktionen darstellen, können beim Einsatz der rekombinanten Isoformen in isolierten Experimenten die einzelnen Umsätze genauer betrachtet werden. Eine wertvolle Anwendung des Michaelis-Menten Modells liegt in der Normierung von *in vitro* Kinetiken auf die *in vivo Clearance* von Xenobiotica^[103]. Da die therapeutischen Konzentrationen vieler Medikamente unterhalb des K_m -Wertes liegen, ist die Michaelis-Menten-Gleichung zur Beschreibung des Metabolismus *in vivo* anwendbar. Die „*intrinsic Clearance*“

(CL_{int}) (Gleichung 2) definiert die Rate des Metabolismus einer Substanz und wird aus dem Verhältnis von V_{max} und K_m gebildet:

$$CL_{int} = \frac{v}{[S]} = \frac{V_{max}}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{V_{max}}{K_m} \quad (2)$$

Alternativ kann CL_{int} über eine Einpunktbestimmung bei einer einzelnen Substratkonzentration berechnet werden, vorausgesetzt, die Substratkonzentration ist $< 10\%$ des K_m -Wertes. In diesem Falle entspricht die „Clearance“ (CL) $\frac{v}{[S]}$ bei gegebener Substratkonzentration. Der *in vitro* Parameter CL_{int} drückt die vorgegebene metabolische Aktivität einer Enzymeinheit aus und kann näherungsweise auf den korrespondierenden *in vivo* Parameter angepasst werden, wenn der Gehalt des jeweiligen Enzyms in der Leber bekannt ist^[103, 104].

In einigen Fällen lässt sich die Enzymkinetik anstelle der Michaelis-Menten-Kinetik besser über eine biphasische Kinetik, ein allosterisches Verhalten (Hill-Kinetik) oder mittels Substratinhibierung erklären. In diesen Fällen beschreibt die einfache Näherung nach Michaelis-Menten das Verhalten nicht ausreichend. Bei Auftragung der Substratkonzentration gegen die Umsatzgeschwindigkeit folgt die Michaelis-Menten-Kinetik einem hyperbolischen Verlauf, während die Hill-Kinetik eher einem sigmoidalen Kurvenverlauf entspricht und mit Gleichung 3 beschrieben werden kann:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^n}{[S]_{50}^n + [S]^n} \quad (3)$$

wobei n dem Hill-Koeffizienten und $[S]_{50}$ der Substratkonzentration bei $50\% V_{max}$ und damit K_m entspricht. Bei hohen Substratkonzentrationen tritt häufig das Phänomen der Substratinhibierung auf. Dabei bindet ein Substratmolekül an das Enzym, beispielsweise an die Produktbindungsstelle, und wirkt dadurch als Inhibitor, sodass die enzymatisch katalysierte Reaktion nicht mehr ablaufen kann (Gleichung 4)^[105].

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + 1 + \frac{[S]}{K_i} \cdot [S]} \quad (4)$$

Die Gleichgewichtskonstante K_i beschreibt hierbei das Maß der Inhibierung.

Besitzen Enzyme zwei Bindungsstellen mit bedeutend unterschiedlichen Effizienzen wird ihr Verhalten am besten durch eine biphasische Kinetik beschrieben. Die Bindungsstellen teilen sich dabei in eine „high-affinity“ Komponente (niedriger K_{m1}) und eine „low-affinity“ Komponente (hoher K_{m2}). Im Prinzip entspricht es einem Zwei-Enzym-Modell, bei dem sich die Reaktionsgeschwindigkeiten addieren und dieselbe Reaktion mit unterschiedlicher Effizienz katalysiert wird^[106].

Abbildung 5 zeigt die typischen Kurvenverläufe der Michaelis-Menten Kinetik sowie der atypischen Kinetiken. Im Falle der Eadie-Hofstee-Diagramme wird, im Gegensatz zu der üblichen direkt-linearen Auftragung von der Umsatzgeschwindigkeit v gegen die Substratkonzentration $[S]$, v über $\frac{v}{[S]}$ aufgetragen. Dadurch können zum einen V_{max} und K_m leicht über die Steigung und den y-Achsenabschnitt ermittelt werden. Zudem wird durch den Kurvenverlauf direkt ersichtlich, ob es sich um eine Michaelis-Menten Kinetik oder ein atypisches Verhalten handelt (Abbildung 5).

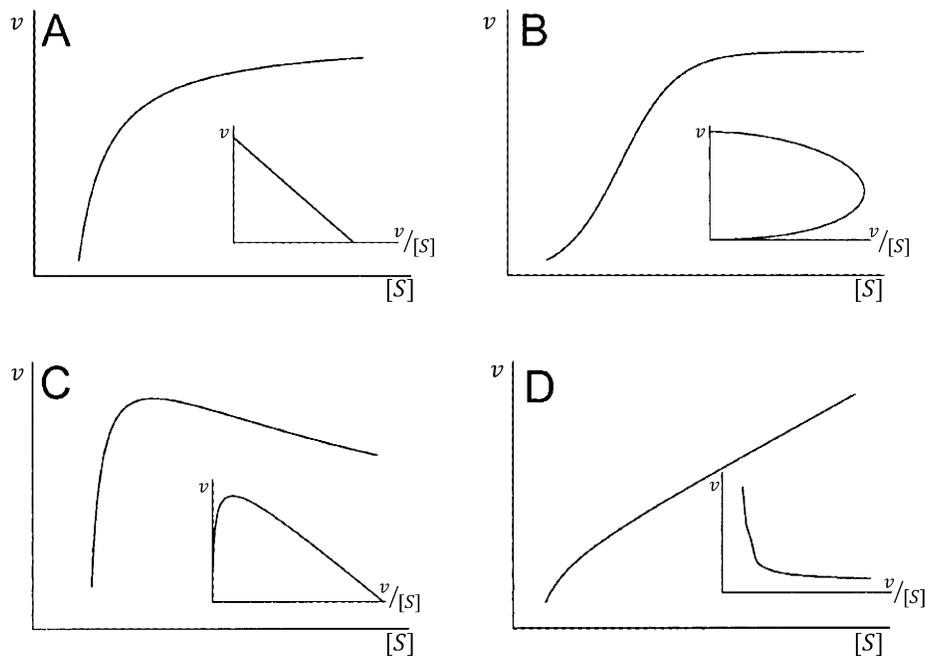


Abbildung 5: Kinetikdiagramme und entsprechende Eadie-Hofstee-Plots. A: Michealis-Menten-Kinetik, B: Allosterisch sigmoide Kinetik, C: Substratinhibierung, D: Biphasische Kinetik^[106].

Aus der Eadie-Hofstee-Gleichung (Gleichung 5) ergibt sich auch der Nachteil der Methode.

$$v = v_{max} - K_m \frac{v}{[S]} \quad (5)$$

So fallen die Standardabweichungen bei Messungen mit niedrigen Substratkonzentrationen aufgrund von $[S]$ im Nenner besonders ins Gewicht, weshalb eine computerunterstützte nichtlineare Regressionsanalyse vorzuziehen ist. Dabei können vor allem unter Zuhilfenahme des statistischen F-Tests unterschiedliche Kinetikmodelle verglichen werden^[107].

1.4.1 Metabolismus synthetischer Cannabinoide

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Studien zum Metabolismus synthetischer Cannabinoide verfügbar. Dabei handelte es sich um *in vitro* Untersuchungen nach Inkubation der synthetischen Cannabinoide JWH-015 und JWH-018 mit Lebermikrosomen (human oder von Ratten)^[108-113] oder Untersuchungen von Urinproben von Konsumenten^[112, 113]. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass synthetische Cannabinoide sehr umfangreich metabolisiert werden und die Muttersubstanzen in der Regel nicht im Urin zu detektieren sind. Eine Übersicht über die Vielzahl der *in vitro* gebildeten Metaboliten am Beispiel des JWH-015 gibt Abbildung 6. Zur tieferen Betrachtung des Metabolismus synthetischer Cannabinoide sei auf den Inhalt dieser Arbeit verwiesen. Eine Übersicht über die Strukturen der in dieser Arbeit beschriebenen synthetischen Cannabinoide sowie deren Metaboliten befindet sich im Anhang.

Theoretische Grundlagen

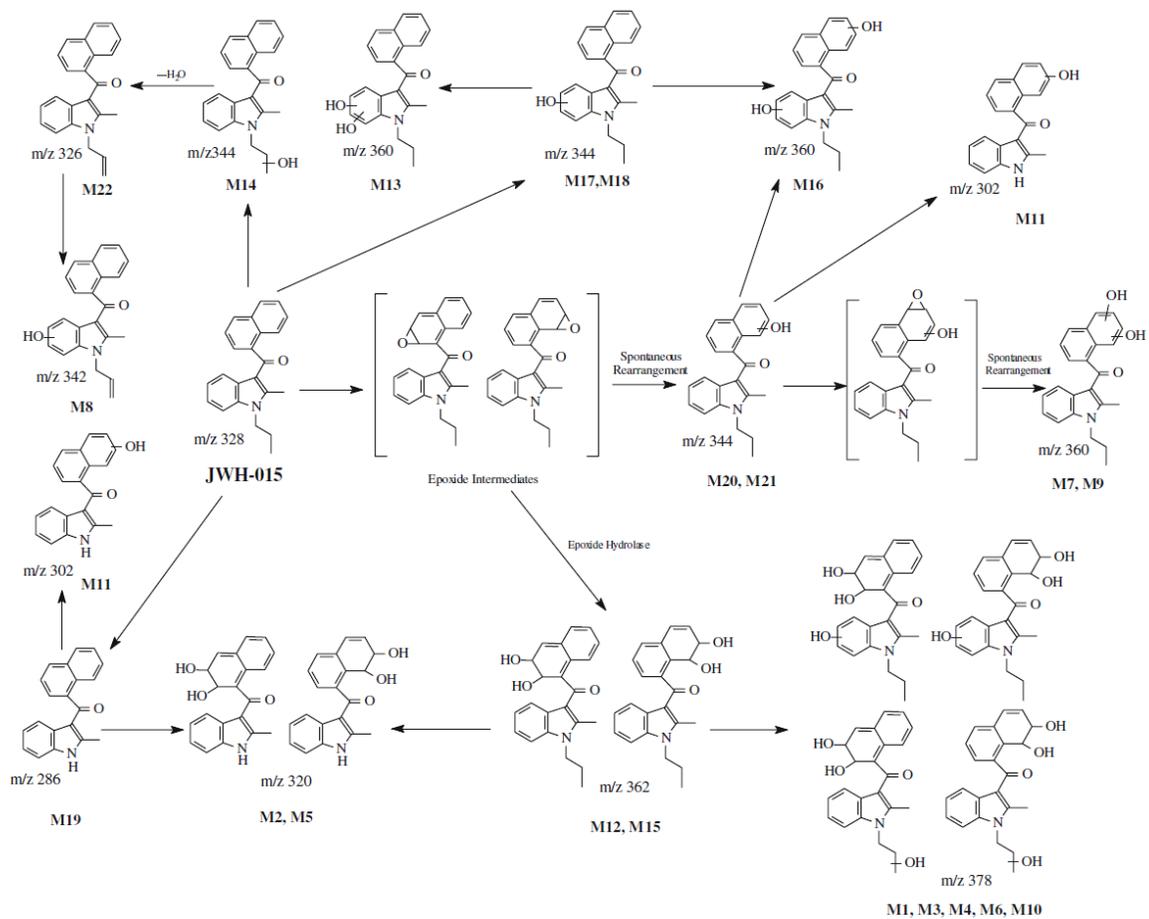


Abbildung 6: Postulierte metabolische Transformationen von JWH-015 nach Zhang et al.^[108].

1.5 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie beschreibt die Auftrennung von ionisierten Atomen oder Molekülen und ihren Fragmenten in einem Trennfeld nach ihrer Masse, um Informationen über die chemische Natur der Atome/Moleküle zu erhalten. Ihre Geburt kann im Jahr 1910 festgemacht werden, als es J.J. Thompson gelang die Neon-Isotope 20 und 22 erstmals zu trennen^[114]. In den 50er Jahren gelang es Roland Gohlke und Fred McLafferty zum ersten Mal einen Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer („Time-of-flight“ Massenspektrometer) zu koppeln. Massenspektrometrie hat die analytische Chemie revolutioniert und zählt inzwischen in der forensischen Analytik, wie auch in vielen anderen Arbeitsgebieten, zu den Standardverfahren für die Detektion. Massenspektrometrie erlaubt die Analyse komplexer Gemische auf Komponenten im Spurenbereich und bietet dabei nicht nur die Möglichkeit der Detektion einer bestimmten Masse, sondern auch der Erstellung eines Fragmentationenspektrums einer Verbindung und kann damit die strukturelle Aufklärung einer Substanz unterstützen. Hierbei sind vor allem Kopplungen mit Gaschromatographie oder Flüssigchromatographie am Häufigsten verbreitet und werden so zur Strukturaufklärung unbekannter Moleküle, als auch zum spezifischen und empfindlichen Nachweis von bekannten Substanzen in komplexen Gemischen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde fast ausschließlich Flüssigkeitschromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) verwendet, weshalb die grundlegenden Verfahren hier kurz geschildert werden.

Um die Überführung des mittels Flüssigkeitschromatographie aufgetrennten Gemisches aus dem Lösungsmittelstrom in das Vakuum des Massenspektrometers zu ermöglichen, werden „Atmospheric Pressure“ Ionisationsarten verwendet. Dabei wird hauptsächlich zwischen der „Electrospray“ Ionisation (ESI) und der „Atmospheric Pressure Chemical Ionisation“ (APCI) unterschieden.

1.5.1 Electrospray Ionisation

Bei der „Electrospray“ Ionisation (ESI) wird die flüssige Probe durch eine elektrisch geladene Kapillare in eine evakuierte Kammer gesprüht. Die Kapillare kann dabei positiv oder negativ geladen sein und die Teilchen werden an eine entsprechend entgegengesetzt geladene Elektrode beschleunigt. Nach Verdampfen des Lösemittels verbleiben positiv oder negativ geladene Ionen, die als Ionenstrahl getrieben durch das elektrische Feld in den Analysatorvorraum gelangen, dort

durch elektrostatische Linsensysteme fokussiert und schließlich in das Trennfeld des Massenspektrometers gelenkt werden. Die Bildung freier Ionen wird dabei durch die hohe Anzahl gleichartiger elektrischer Ladungen in den Tröpfchen gefördert, die beim Verdampfen des Lösungsmittels durch gegenseitige Abstoßung zur sogenannten „Coulomb-Explosion“ führen. Das „Nebulizergas“ (Ionenspray, N_2), welches um die Kapillare herum angelegt ist, unterstützt dabei den Vernebelungsprozess, sodass auch bei hohen Flussraten eine vollständige Verdampfung möglich ist.

Der genaue Mechanismus der Ionenbildung vom gelösten in den gasförmigen Zustand ist noch nicht bis ins Detail geklärt, es gibt jedoch zwei Theorien: das „Charge Residue Model“ (CRM) und das „Ion Desorption Model“ (IDM). Nach dem CRM läuft die Verdampfung der Lösungsmittelmoleküle solange ab, bis nur noch der geladene Analyt verbleibt. Nach dem IDM werden die Ionen durch mehrere Coulomb-Explosionen aufgrund der dort herrschenden hohen Feldkräfte aus den Tröpfchen desorbiert^[115].

1.5.2 Atmospheric Pressure Chemical Ionisation

Die „Atmospheric Pressure Chemical Ionisation“ (APCI)-Technik kam in der vorliegenden Arbeit nicht zum Einsatz, soll aber der Vollständigkeit halber kurz erwähnt werden. Dabei wird die flüssige Probe zunächst auf 400 bis 500 °C erhitzt und versprüht, so dass das Lösungsmittel verdampft. Anschließend wird der Strom mittels eines beheizten, pneumatisch unterstützten Verneblers gegen eine Koronaentladungsnadel geleitet an der sich Gasionen (zum Beispiel N_2^+ , O_2^-) als Primärionen bilden. Diese übertragen ihre Ladung auf die Reaktandionen, die aus dem Lösungsmittel stammen und ihre Ladung wiederum auf den Analyten übertragen.

1.5.3 Tandemmassenspektrometrie

Die ionisierten Analytmoleküle gelangen bei den hier verwendeten Geräten der Firma ABSciex nach Ionisierung durch die „Curtain-“ und „Orifice-Plate“ ins Vorvakuum (8×10^{-3} torr). Direkt hinter der „Curtain-Plate“ werden die „Cluster“, welche entstehen, wenn sich den Ionen neutrale Lösungsmittelmoleküle anlagern, durch einen schwachen Gegenstrom von Stickstoffgas („Curtain Gas“) wieder zerschlagen. An der „Orifice-Plate“ liegt das „Declustering Potential“ (DP) an, welches noch weitere „Cluster“ (zum Beispiel Na^+ oder NH_4^+) entfernt. Hier kann es bei ausreichend hohen Potentialen zur „in-source-Fragmentierung“ kommen, falls die Moleküle

aufgrund der hohen Energie zu Fragmenten zerbrechen. Zwischen dem direkt hinter der „Orifice-Plate“ liegenden Fokussierring und dem Skimmer liegt das „Focussing Potential“ an, welches der Bündelung der Ionen dient, bevor diese durch den Quadrupol 0 (Q_0) geleitet ins Hochvakuum treffen. Nach Passage der Fokussierlinse gelangen die Ionen in drei in Reihe geschaltete Quadrupole Q_1 , Q_2 und Q_3 . Während Q_1 und Q_3 als Massenanalysatoren fungieren, dient der Q_2 als Kollisionszelle.

Ein Quadrupol besteht aus vier parallel angeordneten zylindrischen Metallstäben, die in Flugrichtung der Ionen angeordnet sind. Den jeweils zwei gegenüber liegenden Stäben liegt eine Gleichspannung an, zusätzlich sorgt eine überlagerte Wechselspannung für eine Oszillation der Ionen. Anhand der eingestellten Spannungen kann ein ausgewähltes Masse/Ladung (m/z)-Verhältnis oder ein bestimmter m/z -Bereich selektiert werden. Andere Ionen berühren durch zu starke Oszillation die Stäbe, werden neutralisiert und abgesaugt. Die genaue Fokussierung der Precursor-Ionen und die Ableitung der Fragmentionen werden durch das „collision-cell-entrance-“ und das „collision-cell-exit-potential“ (CXP) gesteuert. In der Kollisionszelle werden die Ionen durch Kollision mit Molekülen eines inerten Gases (hier: N_2) fragmentiert („collision induced dissociation“, CID). Der Grad der Fragmentierung kann durch die „collision energy“ (CE), welche das Potential zwischen dem Q_0 und dem Ende der Kollisionszelle beschreibt, eingestellt werden. Zuletzt gelangen die Fragmentionen in den „Channel Elektron Multiplier“ (CEM), nachdem sie durch die Deflektorspannung beschleunigt wurden.

In den QTrap Geräten der Firma ABSciex kann der Q_3 auch durch eine lineare Ionenfalle (LIT) ersetzt werden. Neben der herkömmlichen Funktion als Massenanalysator ist er auch in der Lage, Ionen über einen bestimmten Zeitraum zu sammeln, wodurch die Empfindlichkeit für Massenspektren mit weitem Massenbereich um das ca. Zehnfache gesteigert werden kann. Desweiteren können Ionen zunächst in der Falle gesammelt, anschließend fragmentiert und wiederum nach einer bestimmten Masse selektiert werden (MS^n).

1.5.3.1 Messmodi in der Tandemmassenspektrometrie

Die Kombination der drei Quadrupole erlaubt unterschiedliche Messmodi. Der Triple-Quadrupol hat natürlich die Funktion eines Single-Quadrupols und somit stehen der „Full Scan Modus“ (Q_1 - oder Q_3 -Scan) und das „Selected Ion Monitoring“ (SIM) zur Wahl. Im „Full Scan Modus“ wird ein definierter Massenbereich bzw. m/z -Bereich kontinuierlich abgescannt und alle Ionen in diesem m/z Bereich detektiert. Daraus resultiert eine geringe Empfindlichkeit. Im SIM-Modus werden nur

Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis selektiert, wodurch aufgrund der Verlängerung der Messzeit für diesen Analyten eine hohe Empfindlichkeit resultiert. Durch Einsatz des Q_3 als lineare Ionenfalle kann die Empfindlichkeit weiter gesteigert werden. Werden in einem Triple-Quadrupol alle Quadrupole genutzt, stehen die folgenden vier Messmodi zur Wahl: der „Product Ion Scan“, der „Precursor Ion Scan“, das „Multiple-Reaction-Monitoring“ (MRM) und der „Neutral Loss Scan“.

Product Ion Scan: Der Q_1 selektiert ein bestimmtes Vorläuferion („Precursor Ion“) mit einem definierten m/z -Verhältnis und nur dieses gelangt anschließend in die Kollisionszelle. Dort wird der „Precursor“ durch unterschiedliche Kollisionsenergien fragmentiert. Diese Fragmentionen gelangen weiter in den Q_3 , wo ein definierter Massenbereich abgesucht wird und sämtliche Fragmentationen anschließend detektiert werden können. Das Wissen der Fragmentmassen kann der Strukturaufklärung dienen und gibt Aufschlüsse über das Massenspektrum (Abbildung 7).

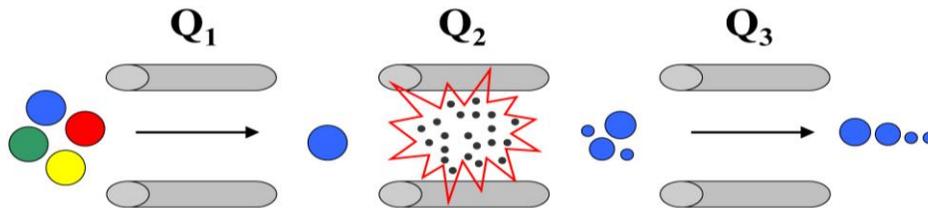


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Product Ion Scan.

Precursor Ion Scan: Dieser Scan Modus verhält sich genau gegensätzlich zu dem „Product Ion Scan“. Es wird in dem Q_1 ein bestimmter Massenbereich abgesucht und diese Ionen gelangen in die Kollisionszelle. Dort findet die Fragmentierung statt und die Fragmentionen fliegen in den Q_3 , der nur ein bestimmtes Fragmention passieren lässt, welches detektiert wird. Aus der Zeitdifferenz, die ein Ion benötigt, um von Q_1 bis zu Q_3 zu gelangen, rechnet die Software zurück, aus welchem „Precursor“ dieses Fragment entstanden ist (Abbildung 8).

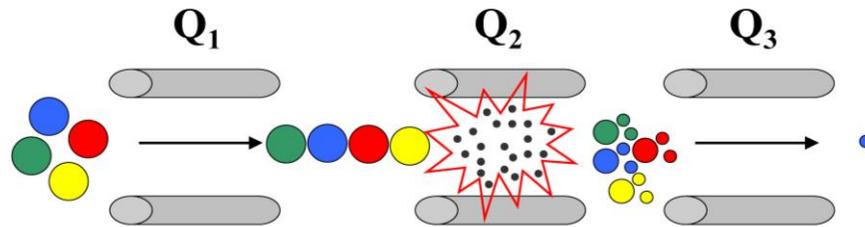


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Precursor Ion Scan.

Multiple-Reaction-Monitoring (MRM): Dieser Modus ist der empfindlichste und selektivste Modus in einem Triple-Quadrupol. Nur definierte „Precursor“ passieren den Q_1 , werden fragmentiert und nur die dazugehörigen definierten Fragmentationen passieren den Q_3 . Da dieser Prozess nur sehr wenig Zeit benötigt, kann eine Vielzahl solcher Vorgänge in einer Methode vereint werden. Als Übergang wird dabei der Verlauf des Zerfalls des Precursor Ions zu einer Fragmentation bezeichnet (Abbildung 9).

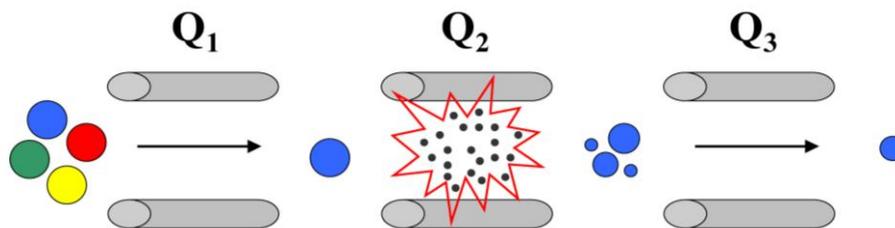


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Multiple Reaction Monitorings.

Neutral Loss Scan: Beide Massenanalysatoren suchen einen definierten Massenbereich mit einer konstanten Massendifferenz ab, bei der es sich um neutrale Gruppen handelt. Es werden nur Ionen detektiert, die diese Massendifferenz aufweisen.

2 Ziel der Arbeit

Nach dem Auftauchen der sogenannten „Kräutermischungen“ in Head-Shops oder Internetshops und der Identifizierung der ersten synthetischen Cannabinoide in diesen Produkten erfreuten sich Produkte wie „Spice“ weiterhin großer Beliebtheit. Schließlich stellten die mit synthetischen Cannabinoiden versetzten Kräutermischungen einen leicht verfügbaren und legalen Ersatz zu Cannabisprodukten dar. Der Nachweis des Konsums war auch nach Aufklärung der enthaltenen Substanzen zunächst nur in Blut- oder Serumproben in sehr aufwendigen Untersuchungen möglich. Auf Urin basierende Schnelltests, wie sie vor allem in Abstinenzkontrollprogrammen eingesetzt werden, waren nicht verfügbar und eine Urinanalytik aufgrund der umfangreichen Metabolisierung der Substanzen zunächst nicht verfügbar. Daher stieg die Popularität dieser Produkte vor allem in solchen Personenkreisen stark an, welche sich aus therapeutischen oder rechtlichen Gründen einer regelmäßigen Abstinenzkontrolle unterziehen müssen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung der Hauptmetaboliten aller marktrelevanten synthetischen Cannabinoide in Humanurin und die Entwicklung einer darauf basierenden Methode für den sensitiven und spezifischen Nachweis synthetischer Cannabinoide in Urinproben.

Neben Blut-, Serum- oder Urinproben werden in der Praxis auch Haarproben als Matrix zur Überprüfung einer Abstinenz herangezogen. Allgemein lässt sich durch Haaranalytik retrospektiv ein längerer Zeitraum überwachen. Im Vergleich mit den üblichen Untersuchungsmatrices sind Haare besonders stark äußeren Einflüssen ausgesetzt und somit anfällig für externe Kontaminationen, was bei der Interpretation der Befunde einer Haaranalyse zu berücksichtigen ist.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer Nachweismethode für synthetische Cannabinoide in Haaren sowie die Untersuchung der Beeinflussung der Analysenergebnisse durch externe Kontamination.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
2-Propanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Acetonitril	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ameisensäure	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumformiat	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Azeton	VWR International S.A.S. (Fontenay-sous-Bois,
Ethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
H ₂ O dest	Kartuschendeionisator von Momtech
Methanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
NADPH Regenerating System Solution A	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
NADPH Regenerating System Solution B	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Petrolether	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Phosphatpuffer 0,5 M, pH 7,4	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
<i>tert.</i> -Butylmethylether	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris Puffer 0,5 M, pH 7,5	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
β -Glucuronidase (<i>Escherichia coli</i> , 140 U/mg)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

3.2 Referenzsubstanzen

Substanz	Hersteller
AM-2201	Zur Verfügung gestellt vom finnischen Zolllaboratorium (Espoo, Finnland)
AM-2201	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
AM-2201 6-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
AM-2201 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
AM-694	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
D11-JWH-018	Chiron AS (Trondheim, Norwegen)
D3-11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol	LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland)
D4-JWH-018 N-Pentansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-AM-2201 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-JWH-018 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-JWH-073 N-(3-Hydroxybutyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-JWH-073 N-(4-Hydroxybutyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)

Substanz	Hersteller
D5-JWH-073 N-Butansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-JWH-122 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-JWH-200	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D5-JWH-250	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D7-Flunitrazepam	LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland)
D7-JWH-015	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D7-JWH-018 6-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D7-JWH-073 6-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D9-JWH-007	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
D9-JWH-073	Chiron AS (Trondheim, Norwegen)
D9-JWH-081	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-007	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-015	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-018	Chiron AS (Trondheim, Norwegen)
JWH-018 4-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 5-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 6-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 7-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 N-(2-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 N-(3-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-018 N-Pentansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-019	Zur Verfügung gestellt vom finnischen Zolllaboratorium (Espoo, Finnland)
JWH-019 5-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-019 N-(6-Hydroxyhexyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-020	Zur Verfügung gestellt vom Bundeskriminalamt (Wiesbaden, Deutschland)
JWH-022	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-073	Chiron AS (Trondheim, Norwegen)
JWH-073 6-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-073 N-(3-Hydroxybutyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-073 N-(4-Hydroxybutyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-073 N-Butansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-081	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-081 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-122	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-122 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-122 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-122 N-Pentansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-200	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-200 4-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)

Substanz	Hersteller
JWH-200 5-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-200 5-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-203	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-210	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-210 5-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-210 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-210 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-210 N-Pentansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-250	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-250 5-Hydroxyindol Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-250 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-250 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-251	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
JWH-398	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-398 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-398 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
JWH-398 N-Pentansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
Methanandamid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
RCS-4	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
RCS-4 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
RCS-4 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
RCS-4- <i>ortho</i> - Isomer	Zur Verfügung gestellt vom Landeskriminalamt Niedersachsen (Hannover, Deutschland)
RCS-8	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
UR-144 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
UR-144 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
UR-144 N-Pentansäure Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)
WIN 48,098	Als „Research Chemical“ von unterschiedlichen Internetanbietern erworben
WIN 55,212-2	Zur Verfügung gestellt vom Bundeskriminalamt (Wiesbaden, Deutschland)
XLR-11 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit	Cayman Chemicals (Ann Arbor, USA)

Die Identitäten und Reinheiten aller Substanzen, welche nicht von professionellen Herstellern bezogen wurden, wurden zusätzlich durch ^1H und ^{13}C Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Dünnschichtchromatographie (DC) bestätigt. Die Reinheit aller Substanzen lag bei > 98%.

3.3 Enzymkomponenten

Komponente	Konzentration	Hersteller
BD Gentest™ Humane Leber Mikrosomen (HLMs), 50-Donor Pool	20 mg/mL in 250 mM Sucrose	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP1A2 + P450 Reduktase SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP2A6 + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP2B6 + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP2C19 + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP2C8 + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP2C9*1 (Arg ₁₄₄) + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP2D6*1 (Val ₃₇₄) + P450 Reduktase SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP2E1 + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP3A4 + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Humanes CYP3A5 + P450 Reduktase + Cytochrom b ₅ SUPERSOMES™	1000 pmol/mL	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Insektenzell-Kontroll- SUPERSOMES™	5 mg/mL in 0,1 mM Phosphatpuffer (pH 7,4)	BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland)
Superoxiddismutase aus Rindererythrozyten	≥ 3000 U/mg Protein	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

3.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätebezeichnung

Hersteller

Analysengeräte:

QTrap 4000:

Tandem-Massenspektrometer:
Triple-Quadrupol mit linearer Ionenfalle
(QTrap 4000) mit TurbolonSpray Interface

ABSciex (Darmstadt, Deutschland)

HPLC:

- 3 LC-20ADsp isokratische Pumpen
- CTO-20AC Säulenofen

Prominence, Shimadzu (Duisburg, Deutschland)

Material und Methoden

- SIL-20AC Autosampler
- DGU-20A3 Degaser
- CBM-20A Controller

Säule:

Luna C18, 150 x 2 mm, 5 µm Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
C18-Vorsäule, 4 mm x 2 mm Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)

API 5000:

Tandem-Massenspektrometer: ABSciex (Darmstadt, Deutschland)
Triple-Quadrupol (API 5000) mit TurbolonSpray
Interface

HPLC:

- 3 LC-10ADVP isokratische Pumpen
- CTO-10AC Säulenofen
- ERC-3415α Degaser
- SCL-10AVP Controller
- HTC PAL MXY 04-01A Autosampler CTC Analytics (Zwingen, Deutschland)

Säule:

Luna C18, 150 x 2 mm, 5 µm Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
C18-Vorsäule, 4 mm x 2 mm Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)

HR-MS/MS:

Accurate-Mass Q-ToF-LC-MS + Jet Stream Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)

HPLC: 1200 SL Serie

- Bin Pump SL binäre Pumpe
- TCC SL Säulenofen
- Thermostat. HiP-ALS Autosampler
- Degaser

SCL-10AVP Controller

Sonstiges:

Analysenwaagen Scaltec Instruments (Heiligenstadt, Deutschland)

Centrifuge 5451 Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Pipetten: Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) bzw.
Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

- 0 – 10 mL
- 5 – 50 mL
- 20 – 200 mL
- 200 – 1000 mL

Trockenschrank Heraeus Thermo Scientific (Waltham, USA)

Vortexer Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland)

Wasserbad LaboTech DWB-16 Labo Tech GmbH (Rostock, Deutschland)

3.5 Herstellen von Lösungen

3.5.1 Phosphatpuffer pH 6 (0,1 M)

In einen 1 L Messkolben wurden 13,61 g Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen und in ca. 950 mL deion. Wasser gelöst. Mit 1 M KOH wurde der pH-Wert auf 6,0 eingestellt und mit deion. Wasser auf 1 L aufgefüllt.

3.5.2 Boratpuffer pH 9 (gesättigt)

Zur Herstellung der Lösung A wurden 61,8 g H_3BO_3 und 74,6 g KCl in einem 1 L Messkolben eingewogen und mit deion. Wasser aufgefüllt. Zur Herstellung von Lösung B wurden 106 g Na_2CO_3 in einen 1 L Messkolben eingewogen und mit deion. Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden 630 mL Lösung A mit 370 mL Lösung B versetzt und der pH-Wert mit Lösung B auf 9,0 eingestellt.

3.5.3 Fließmittel A für die LC-MS/MS-Analytik

Zur Herstellung des wässrigen Fließmittels A wurden 1,261 g Ammoniumformiat in einen 1 L Messkolben eingewogen, 20 mL Ameisensäure (98-100 %) hinzugefügt und mit deionisiertem Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt. Im Anschluss wurden 100 mL dieser Lösung 1:10 (V/V) mit deionisiertem Wasser verdünnt.

3.5.4 Herstellung der Standardlösungen

Zur Herstellung der Stammlösungen aus Reinsubstanz wurde die vom Hersteller bezogene Reinsubstanz in einer adäquaten Menge Ethanol gelöst, um eine Konzentration von 1 mg/mL zu erhalten.

3.5.5 Herstellung der Arbeitslösungen für nicht-deuterierte und deuterierte Standards

Zur Methodik der Analyse der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urin-/Serumprobe bzw von synthetischen Cannabinoiden in Haarproben wurden jeweils Referenzstandardlösungen (D_o) für die Kalibratoren, sowie Mixe der internen Standards (D_x) hergestellt.

3.5.5.1 Herstellung der D_x -Lösung für die Urinanalytik

Die Stammlösung „ D_x -Spice-Urin Stammlösung“ wurde folgendermaßen hergestellt:

Lauf. Nr.:	Substanzlösung	Benötigtes Aliquot	Erhaltene Konzentration in „ D_x -Spice-Urin Stammlösung“
1	D5-AM-2201 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
2	D7-JWH-015; 500 μ g/mL	80 μ L	10 μ g/mL
3	D4-JWH-018 N-Pentansäure-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
4	D5-JWH-018 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
5	D5-JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
6	D9-JWH-018 6-Hydroxyindol-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
7	D5-JWH-073 N-Butansäure-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
8	D5-JWH-073 N-(3-Hydroxybutyl)-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
9	D5-JWH-073 N-(4-Hydroxybutyl)-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
10	D7-JWH-073 6-Hydroxyindol-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
11	D5-JWH-122 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
12	D9-JWH-081, 500 μ g/mL	80 μ L	10 μ g/mL
13	D5-JWH-200; 500 μ g/mL	80 μ L	
14	D5-JWH-250 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit; 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
15	D5-JWH-250 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit, 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
16	D5-JWH-250, 1 mg/mL	40 μ L	10 μ g/mL
17	EtOH	3240 μ L	

Die Arbeitslösung zum Aufdotieren der Urinproben „D_x-Spice-Urin“ wird folgendermaßen hergestellt:

Lauf. Nr.:	Substanzlösung	Benötigtes Aliquot	Erhaltene Konzentration in „D _x -Spice-Urin“
1	D _x -Spice-Urin Stammlösung	10 µL	100 ng/mL
2	EtOH	900 µL	

3.5.5.2 Herstellung der D₀-Lösungen für die Urinanalytik

Die Arbeitslösungen „D₀-Spice-Urin“ zum Aufdotieren der Kalibrationslösungen wurden aus den Referenzlösungen hergestellt und entsprechend verdünnt.

Tabelle 3: Im „D₀-Spice-Urin“-Mix enthaltenen Substanzen.

Substanzen
AM-2201 6-Hydroxyindol-Metabolit
AM-2201 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-018 4-Hydroxyindol-Metabolit
JWH-018 5-Hydroxyindol-Metabolit
JWH-018 6-Hydroxyindol-Metabolit
JWH-018 7-Hydroxyindol-Metabolit
JWH-018 N-(2-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-018 N-(3-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-018 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl) -Metabolit
JWH-018 Pentansäure-Metabolit
JWH-019 5-Hydroxyindol-Metabolit
JWH-019 N-(6-Hydroxyhexyl)-Metabolit
JWH-072 Propansäure-Metabolit
JWH-073 6-Hydroxyindole-Metabolit
JWH-073 Butansäure-Metabolit
JWH-073 N-(3-Hydroxybutyl)-Metabolit
JWH-073 N-(4-Hydroxybutyl)-Metabolit
JWH-081 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-081 N-(5-Hydroxypentyl) -Metabolit
JWH-122 5-Hydroxyindol-Metabolit
JWH-122 6-Hydroxyindol-Metabolit
JWH-122 N-(2-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-122 N-(3-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-122 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-122 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit
JWH-122 Pentansäure-Metabolit
JWH-200 4-Hydroxyindol-Metabolit

Substanzen

JWH-200 5-Hydroxyindol-Metabolit
 JWH-200 6-Hydroxyindol-Metabolit
 JWH-203 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
 JWH-203 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit
 JWH-203 Pentansäure-Metabolit
 JWH-210 5-Hydroxyindol-Metabolit
 JWH-210 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
 JWH-210 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit
 JWH-210 Pentansäure-Metabolit
 JWH-250 5-Hydroxyindol-Metabolit
 JWH-250 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
 JWH-250 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit
 JWH-250 Pentansäure-Metabolit
 RCS-4 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
 RCS-4 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit
 RCS-4 Pentansäure-Metabolit
 UR-144 Isomer Pentansäure-Metabolit
 UR-144 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit
 UR-144 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit
 UR-144 Pentansäure-Metabolit
 XLR-11 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit

3.5.5.3 Herstellung der D_x-Lösung für die Haaranalytik

Die Lösung „D_x-Spice-Haare“ wurde aus verdünnten Lösungen der Referenzlösungen folgendermaßen hergestellt:

Lauf. Nr.:	Substanzlösung	Benötigtes Aliquot	Erhaltene Konzentration in „D _x -Spice-Haare“
1	JWH-007-d9 (10 µg/mL)	10 µL	100 ng/mL
2	JWH-015-d7 (1 µg/mL)	25 µL	25 ng/mL
3	JWH-018-d11 (1 µg/mL)	50 µL	50 ng/mL
4	JWH-073-d9 (1 µg/mL)	50 µL	50 ng/mL
5	JWH-081-d9 (10 µg/mL)	10 µL	100 ng/mL
6	JWH-122-d9 (10 µg/mL)	10 µL	100 ng/mL
7	JWH-200-d5 (10 µg/mL)	10 µL	100 ng/mL
8	JWH-210-d9 (10 µg/mL)	10 µL	100 ng/mL
9	JWH-250-d5 (1 µg/mL)	50 µL	50 ng/mL
10	11-OH-Δ ⁹ -THC-d3 (100 µg/mL)	25 µL	2,5 µg/mL
11	Flunitrazepam-d7 (100 µg/mL)	25 µL	2,5 µg/mL
12	EtOH	725 µL	-

3.5.5.4 Herstellung der D₀-Lösungen für die Haaranalytik

Die Arbeitslösungen „D₀-Spice-Haare“ zum Aufdotieren der Kalibrationslösungen wurden aus den Referenzlösungen hergestellt und entsprechend verdünnt.

Tabelle 4: Im „D₀-Spice-Urin“-Mix enthaltenen Substanzen.

Substanz	
AKB48-5F	JWH-210
AM-1220	JWH-250
AM-1248	JWH-251
AM-2201	JWH-307
AM-2232	JWH-370
AM-2233	JWH-387
AM-694	JWH-398
APICA	JWH-412
JWH-007	MAM-2201
JWH-015	Methanandamid
JWH-018	RCS-4
JWH-019	RCS-4 ortho Isomer
JWH-020	RCS-8
JWH-073	STS-135
JWH-081	UR-144
JWH-122	WIN 48098
JWH-200	WIN 552122
JWH-203	XLR-11

3.6 Methodik für das Screening auf die Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide

3.6.1 Anwendung für Urinproben

3.6.1.1 Probenvorbereitung

In ein Reagenzglas wurden 1000 μL 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 sowie 50 μL β -Glucuronidase (*E.coli*) vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1000 μL der Urinprobe. Die Reagenzgläser wurden mit Lamellenstopfen verschlossen, leicht geschüttelt und anschließend für 1 h bei 45 °C im Trockenschrank belassen.

3.6.1.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion:

Nach enzymatischer Hydrolyse wurden 0,5 mL gesättigter Boratpuffer pH9, sowie 2 mL *tert*-Butylmethylether zupipettiert und die Proben anschließend 5 min über Kopf geschüttelt und danach bei 2890 x g für 5 min zentrifugiert. Der klare organische Überstand wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen, in ein 2 mL Q-Trap-Vial aus Klarglas überführt und bei 40 °C unter Stickstoff abgedampft. Zur Analyse wurde der getrocknete Rückstand anschließend in 100 μL mobiler Phase, bestehend aus den Fließmitteln A/MeOH (50:50, Startzusammensetzung des Gradienten), rekonstituiert, in einen Glas- μL -Einsatz überführt und mit einer Schraubkappe für Kurzgewindeflaschen mit Teflon-Septum verschlossen.

3.6.2 Anwendung für humane Lebermikrosomenansätze

3.6.2.1 Enzyminkubationen

Ein Reaktionsmix bestehend aus humanen Lebermikrosomen, bzw. CYP-Isoformen und Negativkontrollen (durch Erhitzen inaktivierte pHLM (10 min, 100 °C) bzw. mit WT-Bacluviren transfizierte Insektenzellen) sowie den benötigten Co-Faktoren, Puffern und Substrat wurde je nach Bedarf wie in Tabelle 5 bzw. Tabelle 7 dargestellt mit einem Gesamtvolumen von 50 μL in einem Eppendorf-Cup hergestellt (Methanolkonzentration < 1 Vol.-%). Die Enzymzugabe erfolgte dabei als letzter Schritt, wodurch die Reaktion gestartet wurde.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für Inkubation mit Lebermikrosomen zur Bestimmung des Metabolitenspektrums.

Komponente	Endkonzentration
Enzym	1 mg/mL pHLM
Substrat	10 µg/mL
Puffer (KPO ₄ ⁻ pH 7,4)	0,1 M
Solution A	1,3 mM NADP ⁺ 3,3 mM MgCl 3,3 mM Glucose-6-phosphat
Solution B	0,4 U/mL Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Superoxiddismutase	200 U/mL
Wasser	Auf Endvolumen auffüllen

Tabelle 6: Reaktionsansatz für *Initial Screenings*.

Komponente	Endkonzentration
Enzym	2 pmol CYP/50 µL
Substrat	10 µg/mL
Puffer (KPO ₄ ⁻ bzw. Tris pH 7,4)	0,1 M
Solution A	1,3 mM NADP ⁺ 3,3 mM MgCl 3,3 mM Glucose-6-phosphat
Solution B	0,4 U/mL Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Superoxiddismutase	200 U/mL
Wasser	Auf Endvolumen auffüllen

Anschließend wurden die Proben für 30 min im Wasserbad bei 37 °C belassen und die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µL CH₃CN (bei Initial Screening inklusive internem Standard) gestoppt, wodurch gleichzeitig eine Denaturierung der Proteine erfolgte. Diese wurden durch Zentrifugation bei 16100 x g für 5 min abgetrennt und der flüssige Überstand abgedampft (N₂, 40 °C) und bis zur Messung in einem Glasvial bei -20 °C gelagert. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, im Falle der Initial Screenings Doppelbestimmungen.

Für die Analyse mittels LC-MS/MS wurden die Proben nach Inkubation mit einer Substratkonzentration von 10 µg/mL 1:10 verdünnt. Dazu wurden 10 µL Probe abgedampft (N₂, 40 °C) und in 100 µL Fließmittelgemisch A/CH₃CN (50:50, Startzusammensetzung des Gradienten) aufgenommen. Für die Kinetikuntersuchungen wurden andere Verdünnungen gewählt, um bei Substratkonzentrationen >10 µg/mL eine Überladung der HPLC-Säule zu vermeiden, bzw. bei Substratkonzentrationen <10 µg/mL auch niedrige Produktkonzentrationen detektieren zu können. Der Verdünnungsfaktor variierte dabei entsprechend zwischen 1:3 und 1:200.

Tabelle 7: Reaktionsansatz zur Bestimmung der Enzymkinetiken.

Komponente	Endkonzentration
Enzym	20 bzw. 40 pmol/mL CYP
Substrat	0,01-250 µg/mL
Puffer (KPO ₄ ⁻ bzw. Tris pH 7,4)	0,1 M
Solution A	1,3 mM NADP ⁺ 3,3 mM MgCl 3,3 mM Glucose-6-phosphat
Solution B	0,4 U/mL Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Superoxiddismutase	200 U/mL
Wasser	Auf Endvolumen auffüllen

3.6.2.2 HPLC-Methode

Das Gemisch wurde mittels einer Shimadzu Prominence 20AD HPLC auf einer Luna C 18, 150 x 2 mm, 5 µm aufgetrennt und über eine TurbolonSpray-Quelle in ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle (Q-Trap 4000) überführt. Der binäre Gradient startet mit 50% B, 0-5 min 80% B; 5-9 min, 80-90% B; 9-11 min, 90% B; 11-12,5 min 90-50% B. Die Säule wurde anschließend 2,5 min reequilibriert. Die Ofentemperatur betrug 50 °C und die Flussrate 0,25 mL/min. Zur Erleichterung der Verdampfung der Probe und damit eingehender erhöhter Sensitivität der Messung wurde post-column 2-Propanol mit einer Flussrate von 0,2 mL/min zugepumpt. Injektionsvolumen: 20 µL.

3.6.2.3 MS/MS-Methode

In allen Messmethoden wurden die Analyten im positiven Modus unter folgenden Bedingungen detektiert:

DP: wurde näherungsweise von der Muttersubstanz übernommen

EP: wurde näherungsweise von der Muttersubstanz übernommen

Curtaingas: 30 psi

Collisionsgas: 6 psi

Ion spray voltage: 2500 V

Quellentemperatur: 600°C

Ionengas 1: 40 psi

Ionengas 2: 50 psi

Parameter der Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)-Methoden:

Dwell time jedes einzelnen Übergangs: 50 ms

Kollisionsenergie: wurde näherungsweise von der Muttersubstanz-Fragmenten übernommen.

Parameter der Enhanced-Product-Ion (EPI)-Scan-Methoden:

Scan rate: 4000 amu/s

Fixed fill time: 50 ms

untere Grenzen des Scan-Bereiches: m/z 50

obere Grenzen des Scan-Bereiches: 5-10 m / z höher als die des Precursor-Ions.

Kollisionsenergie: Collision energy spread (CES), 35 ± 15 eV; 20, 35 und 50 eV

Zur Aufklärung der Hauptmetaboliten wurden die untersuchten Urinproben auf Grundlage der für JWH-015^[108] und JWH-018^[111] publizierten Metaboliten mit unterschiedlichen massenspektrometrischen Methoden gescreent. Dazu wurden mehrere Enhanced-Product-Ion (EPI)-Scans für die Precursormassen der hypothetischen Metaboliten durchgeführt, wobei die folgenden Phase-I-Reaktionen berücksichtigt wurden: Mono- und Dihydroxylierungen, Oxidation zum Aldehyd/Keton bzw. zur Säure, Dehalogenierung, Desalkylierung, Epoxidierungen gefolgt durch Hydrolyse sowie Kombinationen aus diesen Reaktionen. In Analogie zu dem Fragmentierungsmuster der Muttersubstanz wurden die in den EPI-Experimenten erhaltenen Massenspektren interpretiert, was Art und ungefähre Lokalisation der funktionellen Gruppe erlaubte. Weiterhin wurden für alle untersuchten Phase-I-Reaktionen die hypothetischen MRM-Übergänge ermittelt und die Urinproben zusätzlich mit der weitaus sensitiveren MRM-Methode, im Vergleich zu den EPI-Scans, gemessen. Eine Bestätigung der postulierten Metaboliten erfolgte schließlich über die Messung der Feinmassen der Molekülonen sowie der Fragmentionen mittels HR-MS/MS. (Siehe dazu auch Kapitel 5.1).

3.7 Methodik der Analyse der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urin-/Serumproben:

3.7.1 Probenvorbereitung

In ein Reagenzglas wurden 500 μL 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 sowie 30 μL β -Glucuronidase (*E.coli*) vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 μL der Urin-/Serumprobe und 10 μL der „D_x-Spice-Urin“-Lösung. Die Reagenzgläser wurden mit Lamellenstopfen verschlossen, leicht geschüttelt und anschließend für 1 h bei 45 °C im Trockenschrank belassen.

3.7.1.1 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Nach enzymatischer Hydrolyse wurden 1 mL Boratpuffer pH 9, sowie 2 mL *tert*-Butylmethylether zupipettiert und die Proben anschließend 5 min über Kopf geschüttelt und danach bei 2890 x g für 5 min zentrifugiert. 1 mL des klaren organischen Überstands wurde mit einer Kolbenhubpipette vorsichtig abgenommen, in ein 2 mL Q-Trap-Vial aus Klarglas überführt und bei 40 °C unter Stickstoff abgedampft. Zur Analyse wurde der getrocknete Rückstand anschließend in 200 μL mobiler Phase, bestehend aus den Fließmitteln A/CH₃CN (50:50, Startzusammensetzung des Gradienten), rekonstituiert, in einen Glas- μL -Einsatz überführt und mit einer Schraubkappe für Kurzgewindeflaschen mit Teflon-Septum verschlossen.

3.7.2 HPLC-Methode

Das Gemisch wurde mittels einer Shimadzu Prominence 10 HPLC auf einer Luna C 18, 150 x 2 mm, 5 μm aufgetrennt und über eine TurbolonSpray-Quelle in ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (API 5000) überführt. Der binärer Gradient startet mit 50% B, 0-3,5 min 60% B; 3,5-5,5 min, 60-70% B; 5,5-6,5 min, 70-75% B; 6,5-7,5 min, 75-80% B; 7,5-9 min, 80-90% B; 9-11,5 min, 90% B; 11,5-12,5 min 90-50% B. Die Säule wurde anschließend 2,5 min reequilibriert. Die Ofentemperatur betrug 40 °C und die Flussrate 0,25 mL/min. Zur Erleichterung der Verdampfung der Probe und damit eingehender erhöhter Sensitivität der Messung wurde post-column 2-Propanol mit einer Flussrate von 0,2 mL/min zugepumpt. Injektionsvolumen: 10 μL .

3.7.3 MS/MS-Methode

Parameter der scheduled Multiple-Reaction-Monitoring (sMRM)-Methode:

DP, EP, CE und CXP: wurden für alle Substanzen mit verfügbarem Referenzstandard optimiert, andernfalls näherungsweise von der Muttersubstanz übernommen.

Curtaingas: 40 psi

Collisionsgas: 6 psi

Ion spray voltage: 4500 V

Quellentemperatur: 600°C

Ionengas 1: 40 psi

Ionengas 2: 40 psi

MRM-Detektionsfenster: 90 s

Target Scanzeit: 1 s

Die Methode enthält die in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellten MRM-Übergänge (ESI positiv).

Tabelle 8: MRM-Übergänge der Quantifier, Retentionszeiten und zugehörige Energien und Potentiale für die LC-MS/MS-Methode; Positiv ionisierte Masse [MH]⁺, Masse des intensivsten Fragments (Ion 1), Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP) und Retentionszeit (RT) der Analyten sowie Collision Energy (CE) und Collision Cell Exit Potential (CXP) des intensivsten Fragments.

Substanz (Quantifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	RT [min]	DP [eV]	EP [eV]	CE [eV]	DXP [eV]
AM-2201 4-OH-pentyl*	376,2	155,1	6	180	4	32	18
AM-2201 6-OH-indol*	376,201	155,101	6,3	160	4	35	18
AM-694 Pentansäure	448,1	231,1	4,8	160	10	35	11
AM-694 Defluoriert	434,2	231,1	5,2	160	10	35	11
AM-694 OH-pentyl	452,2	231,1	5,5	160	10	35	11
D4-JWH-018 Pentansäure	376,202	155,102	5,6	170	10	35	7
D5-AM-2201 4-OH-pentyl	381,2	155,1	5,9	190	4	33	18
D5-JWH-018 4-OH-pentyl	363,2	155,1	6,1	180	4	25	11
D5-JWH-018 5-OH-pentyl	363,201	155,101	5,9	165	10	33	12
D5-JWH-073-3-OH-butyl	349,2	155,1	5,9	170	8	30	12
D5-JWH-073-4-OH-butyl	349,201	155,101	5,3	170	8	32	12
D5-JWH-073-Butansäure	363,202	155,102	5,1	190	5	35	11
D5-JWH-122 5-OH-pentyl	377,5	169,1	6,8	185	5	29	14
D5-JWH-200	390,2	155,1	2,5	180	10	33	11
D7-JWH-015	335,2	155,1	9,4	185	10	34	11
D7-JWH-018 6-OH-indol	367,2	155,1	7,9	180	4	35	12
D7-JWH-073-6-OH-indol	351,2	155,1	6,9	170	6	35	12
JWH-007 Pentansäure	386,202	155,102	0	185	5	35	11
JWH-007 OH-pentyl	372,2	155,1	7,3	185	5	35	11
JWH-018 2-OH-pentyl*	358,201	155,101	7,9	150	10	35	12

Material und Methoden

Substanz (Quantifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	RT [min]	DP [eV]	EP [eV]	CE [eV]	DXP [eV]
JWH-018 3-OH-pentyl*	358,202	155,102	7,1	150	5	30	15
JWH-018 4-OH-indol*	358,205	155,105	10,9	150	5	30	15
JWH-018 4-OH-pentyl*	358,203	155,103	6,2	150	5	30	15
JWH-018 5-OH-indol*	358,206	155,106	7,9	150	5	30	15
JWH-018 5-OH-pentyl*	358,204	155,104	6	150	5	30	15
JWH-018 6-OH-indol*	358,207	155,107	7,9	150	5	30	15
JWH-018 7-OH-indol*	358,208	155,108	8,7	150	5	30	15
JWH-018 Pentansäure*	372,201	155,101	5,6	150	3	26	20
JWH-019 5-OH-indol*	372,202	127,101	9	190	10	70	10
JWH-019 6-OH-hexyl*	372,202	155,102	6,7	150	3	26	20
JWH-019 Hexansäure	386,203	155,103	0	190	5	26	11
JWH-073 3-OH-butyl*	344,201	155,101	6	140	7	33	18
JWH-073 4-OH-butyl*	344,202	155,102	5,4	140	7	33	18
JWH-073 6-OH-indol*	344,203	155,103	7	140	7	33	18
JWH-073 Butansäure*	358,209	155,109	5,2	150	5	30	15
JWH-081 5-OH-pentyl*	388,2	185,1	6,6	150	8	37	20
JWH-081 OH-indol	388,2	157,1	8,3	150	8	60	12
JWH-081 OH-naphthyl	388,2	201,2	9,2	175	10	33	11
JWH-122 2-OH-pentyl*	372,204	168,904	8,4	160	7	30	12
JWH-122 3-OH-pentyl*	372,203	168,903	7,9	160	7	30	12
JWH-122 4-OH-pentyl*	372,201	168,901	6,8	160	7	30	12
JWH-122 5-OH-indol*	372,202	168,902	8,9	40	5	38	10
JWH-122 5-OH-pentyl*	372,205	168,905	6,8	160	7	30	12
JWH-122 6-OH-indol*	372,206	168,906	8,9	40	5	38	10
JWH-122 Pentansäure*	386,2	169,2	6,4	190	4	35	13
JWH-122 OH-naphthyl	372,2	185,1	8,3	175	10	35	11
JWH-200 4-OH-indol*	401,2	114,1	3	180	7	40	20
JWH-200 5-+6-OH-indol*	401,201	155,101	1,6	180	7	35	20
JWH-203 Pentansäure	370,2	125,1	5,3	180	10	50	11
JWH-203 OH-indol	356,2	125,1	6,7	180	10	50	11
JWH-203 OH-alkyl	356,201	125,101	5,8	180	10	50	11
JWH-210 4-OH-pentyl*	386,2	183,1	7,9	160	5	31	15
JWH-210 5-OH-indol*	386,201	183,101	9,7	180	4	32	16
JWH-210 5-OH-pentyl*	386,202	183,102	7,9	160	5	31	15
JWH-210 Pentansäure*	400,4	183,1	7,2	160	11	35	14
JWH-210 OH-naphthyl	386,2	214,1	8,9	175	10	35	11
JWH-250 4-OH-pentyl*	352,2	121,1	5	150	8	31	15
JWH-250 5-OH-Indol*	352,202	121,102	7	150	8	31	15
JWH-250 5-OH-pentyl*	352,201	121,101	5	150	8	31	15
JWH-250 OH-indol	352,203	121,103	7,7	150	8	31	15
JWH-250 OH-phenyl	352,2	137,1	7,3	165	10	20	11
JWH-307 Di-OH-naphthyl, hydrat.	420,2	189,1	6,4	100	10	35	11
JWH-307 OH-fluorphenylpentylpyrrol-OH-naphthyl	418,2	171,1	4,9	100	10	35	11
JWH-307 OH-fluorphenylpentylpyrrol 1	402,203	155,103	6,9	100	10	35	11
JWH-307 OH-fluorphenylpentylpyrrol 2	402,204	155,104	7,7	100	10	35	11
JWH-398 5-OH-pentyl*	393,2	189,1	7,8	160	7	29	13
JWH-398 Pentansäure*	406,3	189,1	7,2	210	5	35	15
MAM-2201 OH-indol	390,2	169,1	7,1	170	10	35	10
MAM-2201 OH-naphthyl	390,2	185,1	6,5	170	10	35	10

Material und Methoden

Substanz (Quantifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	RT [min]	DP [eV]	EP [eV]	CE [eV]	DXP [eV]
RCS-4 OH-indol	338,2	135,1	4	140	11	30	10
RCS-4 OH-pentyl*	338,201	135,101	4,5	140	11	30	10
RCS-4 OH-phenyl	338,2	151,1	7,4	180	10	35	8
UR-144 4-OH-pentyl*	328,4	125,1	7,6	160	7	21	10
UR-144 5-OH-pentyl*	328,401	125,1	7,5	160	7	30	10
UR-144 Pentansäure*	342,4	125,1	7	180	5	29	10
UR-144 Isomer Pentansäure	342,401	244,1	6,1	170	10	50	10
UR-144 Isomer OH-pentyl	328,201	230,1	6,5	170	10	35	10
UR-144 OH-tetramethylcyclopropyl	328,2	214,1	7,9	170	10	35	10
UR-144 OH-pentyl	328,402	125,1	8,4	170	10	35	10
XLR-11 4-OH-pentyl*	346,3	248,1	6,6	150	9	33	20
XLR-11 Carboxylierter Tetramethylcyclopropylring	346,4	232,1	6,1	170	10	35	10

Tabelle 9: MRM-Übergänge der Qualifier und zugehörige Energien und Potentiale für die LC-MS/MS-Methode sowie die Ionenverhältnisse mit den nach Richtlinie zugelassenen Grenzen^[116]. Für alle quantifizierbaren Substanzen ist zusätzlich der Interne Standard angegeben. Positiv ionisierte Masse [MH]⁺, Masse des zweit- bzw. drittintensivsten Fragments (Ion 2 und Ion 3) sowie Collision Energy (CE) und Collision Cell Exit Potential (CXP) des zweit- bzw. drittintensivsten Fragments.

Substanz (Qualifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	CE [eV]	DXP [eV]	Flächenverhältnis Ion 1 zu Ion2/Ion3 [%]	Interner Standard
AM-2201 4-OH-pentyl	376,2	127,1	74	18	41 - 51 - 61	D5-AM-2201 4-OH-pentyl
AM-2201 6-OH-indol	376,201	127,101	67	10	41 - 51 - 61	D5-AM-2201 4-OH-pentyl
AM-694 Pentansäure	448,1	203,1	50	11	9 - 13 - 17	
AM-694 Pentansäure	448,1	244,1	50	11	0,5 - 1 - 1,5	
AM-694 Defluoriert	434,2	203,1	50	11	11 - 15 - 20	
AM-694 Defluoriert	434,2	186,1	20	11	1,5 - 3 - 4,5	
AM-694 OH-pentyl	452,2	203,1	50	11	8 - 12 - 16	
AM-694 OH-pentyl	452,2	221,1	35	11	0,2	
JWH-007 Pentansäure	386,2	258,1	35	11	n.b.	
JWH-007 OH-pentyl	372,2	158,1	50	11	n.b.	
JWH-018 2-OH-pentyl	358,201	127,101	70	15	45 - 56 - 67	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-018 3-OH-pentyl	358,202	127,102	65	15	43 - 54 - 65	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-018 4-OH-indol	358,204	127,104	65	15	68 - 85 - 102	D9-JWH-081
JWH-018 4-OH-pentyl	358,203	127,103	65	15	50 - 62 - 74	D5-JWH-018 4-OH-pentyl
JWH-018 5-OH-indol	358,205	127,105	65	15	55 - 69 - 83	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-018 5-OH-pentyl	358,207	127,107	65	15	43 - 54 - 65	D5-JWH-018 5-OH-pentyl
JWH-018 6-OH-indol	358,206	127,106	65	15	48 - 60 - 72	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-018 7-OH-indol	358,208	127,108	65	15	62 - 77 - 92	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-018 Pentansäure	372,2	127,1	70	10	59 - 74 - 89	D4-JWH-018 Pentansäure
JWH-019 5-OH-indol	372,203	145,103	62	23	78 - 98 - 118	D7-JWH-015
JWH-019 6-OH-hexyl	372,201	127,101	70	10	34 - 46 - 58	D7-JWH-073-6-OH-indol
JWH-019 Hexansäure	386,2	127,1	70	11	n.b.	
JWH-073 3-OH-butyl	344,2	127,1	65	17	33 - 44 - 55	D5-JWH-073-3-OH-butyl
JWH-073 4-OH-butyl	344,201	127,101	65	17	30 - 40 - 50	D5-JWH-073-4-OH-butyl
JWH-073 6-OH-indol	344,202	127,102	65	17	37 - 49 - 61	D7-JWH-073-6-OH-indol
JWH-073 Butansäure	358,209	127,109	65	15	43 - 54 - 65	D5-JWH-073-Pentansäure
JWH-081 5-OH-pentyl	388,201	157,101	60	12	19 - 25 - 31	D5-JWH-018 5-OH-pentyl

Material und Methoden

Substanz (Qualifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	CE [eV]	DXP [eV]	Flächenverhältnis Ion 1 zu Ion2/Ion3 [%]	Interner Standard
JWH-081 OH-indol	388,2	230,1	35	11	31 - 41 - 51	
JWH-081 OH-naphthyl	388,2	214,2	31	11	62 - 77 - 92	
JWH-122-OH-pentyl	372,204	141,204	57	16	70 - 87 - 104	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-122 3-OH-pentyl	372,203	141,103	57	16	50 - 63 - 76	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-122 4-OH-pentyl	372,201	141,101	57	16	44 - 55 - 66	D5-JWH-122 5-OH-pentyl
JWH-122 5-OH-indol	372,202	141,102	60	18	23 - 31 - 39	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-122 5-OH-pentyl	372,206	141,106	57	16	43 - 54 - 65	D5-JWH-122 5-OH-pentyl
JWH-122 6-OH-indol	372,205	141,105	60	18	62 - 78 - 94	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-122 Pentansäure	386,2	141,1	61	11	37 - 50 - 63	D5-JWH-018 4-OH-pentyl
JWH-122 OH-naphthyl	372,2	214,1	35	11	19 - 26 - 33	
JWH-200 4-OH-indol	401,2	155,1	35	20	79 - 99 - 119	D5-JWH-200
JWH-200 5-+6-OH-indol	401,201	114,101	40	20	32 - 43 - 54	D5-JWH-200
JWH-203 Pentansäure	370,2	218,1	20	11	3,5 - 7 - 11	
JWH-203 Pentansäure	370,2	244,1	35	11	1 - 2 - 3	
JWH-203 OH-indol	356,2	230,1	35	11	1,5 - 3 - 4,5	
JWH-203 OH-pentyl	356,2	186,1	35	11	20 - 27 - 34	
JWH-210 4-OH-pentyl	386,2	153,1	50	13	8 - 11 - 14	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-210 5-OH-indol	386,2	230,1	32	18	25 - 34 - 43	D5-JWH-250
JWH-210 5-OH-pentyl	386,201	153,101	50	13	4,5 - 9 - 14	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-210 Pentansäure	400,4	155,1	55	20	14 - 20 - 26	D7-JWH-073-6-OH-indol
JWH-210 OH-naphthyl	386,201	144,1	50	11	54 - 68 - 82	
JWH-250 4-OH-pentyl	352,2	91,1	60	15	50 - 62 - 74	D5-JWH-073-Pentansäure
JWH-250 5-OH-Indol	352,202	91,102	60	15	41 - 51 - 61	D7-JWH-073-6-OH-indol
JWH-250 5-OH-pentyl	352,201	91,101	60	15	35 - 47 - 59	D5-JWH-073-Pentansäure
JWH-250 OH-indol	352,203	91,103	60	15	48 - 60 - 72	
JWH-250 OH-phenyl	352,2	107,1	60	12	46 - 57 - 68	
JWH-307 Di-OH-naphthyl, hydrat.	420,2	161,1	50	11	2,5 - 5 - 7,5	
JWH-307 OH-fluorphenyl- pentylpyrrol-OH-naphthyl	418,2	143,1	50	11	n.b.	
JWH-307 OH-fluorphenylpentylpyrrol 1	402,2	127,1	50	11	12 - 17 - 22 (RT = 6.9 + 7,1)	
JWH-307 OH-fluorphenylpentylpyrrol 2	402,201	127	50	11	10 - 14 - 18	
JWH-398 5-OH-pentyl	393,2	161,1	65	24	25 - 34 - 43	D7-JWH-018 6-OH-indol
JWH-398 Pentansäure	406,3	161,1	61	14	19 - 26 - 33	D7-JWH-073-6-OH-indol
MAM-2201 OH-indol	390,2	141,1	35	10	2 - 4 - 6	
MAM-2201 OH-indol	390,2	248,1	35	10	11 - 16 - 21	
MAM-2201 OH-naphthyl	390,201	144,101	50	10	13 - 18 - 23	
MAM-2201 OH-naphthyl	390,2	232,1	35	10	29 - 39 - 49	
RCS-4 OH-indol	338,2	230,1	35	8	n.b.	
RCS-4 OH-pentyl	338,2	77,1	70	12	20 - 27 - 34	D5-JWH-073-Pentansäure
RCS-4 OH-phenyl	338,2	123,1	50	8	n.b.	
UR-144 4-OH-pentyl	328,4	97,1	39	15	25 - 33 - 41	D7-JWH-018 6-OH-indol
UR-144 5-OH-pentyl	328,401	97,1	39	15	13 - 18 - 23	D7-JWH-018 6-OH-indol
UR-144 Pentansäure	342,4	97,1	41	15	11 - 16 - 21	D5-JWH-122 5-OH-pentyl
UR-144 Isomer Pentansäure	342,401	144,1	35	10	28 - 38 - 48	
UR-144 Isomer OH-pentyl	328,201	144	35	10	8 - 12 - 16	
UR-144 OH-tetramethylcyclopropyl	328,2	144,1	35	10	8 - 11 - 14	
UR-144 OH-pentyl	328,402	97,1	35	10	10 - 15 - 20	

Substanz (Qualifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	CE [eV]	DXP [eV]	Flächenverhältnis Ion 1 zu Ion2/Ion3 [%]	Interner Standard
XLR-11 4-OH-pentyl* XLR-11 Carboxylierter	346,3	144,1	48	11	48 - 60 - 72	D5-AM-2201 4-OH-pentyl
Tetramethylcyclopropylring	346,4	144,1	50	10	44 - 55 - 66	

n.b.: nicht bestimmt

3.8 Methodik der Analyse synthetischer Cannabinoide in Haarproben

3.8.1 Segmentierung der Haarproben

Die Haarstränge wurden mit Lineal und Schere in Segmente geteilt und in 25 mL Probenröhrchen gegeben. Beschriftung der Segmente beginnend mit Seg. 1 (kopfhautnah), Seg. 2, Seg. 3 usw. Die Segmenteinteilung wurde dokumentiert. In der Regel wurden Segmente à 3 cm angefertigt.

3.8.2 Dekontamination der Haarproben

Die Haarsegmente wurden nacheinander drei Waschschritten unterzogen. Dazu wurden je 4 mL Lösungsmittel zugegeben, geschüttelt (4 min), und danach das Lösungsmittel in Aufbewahrungsgefäße (PP-Röhrchen) abgegossen.

Lösungsmittel für Waschen der Haare:

Waschlösung 1: Wasser

Waschlösung 2: Aceton

Waschlösung 3: Petrolether (40-60°C)

Nach dem dritten Dekontaminationsschritt wurden die Haare auf Papierfiltern luftgetrocknet. Die Waschlösungen wurden bis zum Abschluss der Analyse aufgehoben, damit gegebenenfalls eine Nachanalyse der Waschlösungen durchgeführt werden konnte.

3.8.3 Zerkleinern und Einwaage der Haarproben

Es wurden ungefähr 50 mg Haare (bei weniger Untersuchungsmaterial bis auf 10 mg reduzierter Ansatz) in 4 mL-Vials eingewogen. Die genaue Menge wurde dokumentiert. Das Abwiegen der Haare erfolgte auf einer Analysenwaage. Die Probenvials wurden mit 1,5 mL EtOH befüllt und die Haare mit einer schmalen, langen Schere klein geschnitten, so dass Haarstückchen mit ca. 1 – 2 mm Länge entstanden. Dabei war darauf zu achten, dass keine Verluste auftraten (z. B. Haare,

die an der Schere kleben). Nach dem Kleinschneiden wurde die Schere mit Lösemittel (Aceton und Wasser) gereinigt.

3.8.4 Probenvorbereitung

3.8.4.1 Zugabe der deuterierten Standards

Zu je ca. 50 mg Haaren wurden 5 μ L der Arbeitslösung „D_x-Spice-Haare“ pipettiert. Eine Umrechnung auf die tatsächliche eingewogene Menge erfolgte gegebenenfalls bei der Auswertung.

3.8.4.2 Ethanolische Ultraschall-Extraktion und Vorbereitung für die LC-MS/MS-Analyse

Die Probenvials wurden in einem passenden Rack ins Ultraschallbad (Bandelin Sonorex Super RK 103H) gestellt (ohne Heizen). Nach 3-stündiger Extraktion (das Wasser erhitzt sich auf ca. 50 °C) wurde mit einer Kolbenhubpipette exakt 1 mL des Überstandes in ein 1,5 mL LC-Vial aus Klarglas überführt und bei 40 °C unter Stickstoff abgedampft. Zur Analyse wurde der getrocknete Rückstand anschließend in 100 μ L mobiler Phase, bestehend aus Fließmittel A/MeOH (50:50, Startzusammensetzung des Gradienten), rekonstituiert, in ein Glas- μ L-Einsatz überführt und mit einer 8 mm Schraubkappe mit eingelegtem weißen 8 mm PTFE-Septum verschlossen.

3.8.5 HPLC-Methode

Das Gemisch wurde mittels einer Shimadzu Prominence 20AD HPLC auf einer Luna Phenyl Hexyl, 50 x 2 mm, 5 μ m aufgetrennt und über eine Turboionspray-Quelle in ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle (Q-Trap 4000) überführt. Der binärer Gradient startet mit 50% B, 0-7 min 20-90% B; 7-8,5 min, 90% B; 8,5-9 min, 90-50% B. Die Säule wurde anschließend 3 min reequilibriert. Die Ofentemperatur betrug 40 °C und die Flussrate 0,4 mL/min. Zur Erleichterung der Verdampfung der Probe und damit eingehender erhöhter Sensitivität der Messung wurde post-column 2-Propanol mit einer Flussrate von 0,2 mL/min zugepumpt. Injektionsvolumen: 20 μ L.

3.8.6 MS/MS-Methode

Parameter der scheduled Multiple-Reaction-Monitoring-Methode:

DP, EP, CE und CXP: wurden für alle Substanzen mit verfügbarem Referenzstandard optimiert.

Curtaingas: 30 psi

Collisionsgas: 6 psi

Ion spray voltage: 2500 V

Quellentemperatur: 600°C

Ionengas 1: 40 psi

Ionengas 2: 50 psi

MRM-Detektionsfenster: 50 s

Target Scanzeit: 1,2 s

Die Methode enthält die in Tabelle 10 dargestellten MRM-Übergänge (ESI positiv).

Tabelle 10: MRM-Übergänge der Quantifier, Retentionszeiten und zugehörige Energien und Potentiale für die LC-MS/MS-Methode; Positiv ionisierte Masse [MH]⁺, Masse des intensivsten Fragments (Ion 1), Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP) und Retentionszeit (RT) der Analyten sowie Collision Energy (CE) und Collision Cell Exit Potential (CXP) des intensivsten Fragments.

Substanz (Quantifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	RT [min]	DP [eV]	EP [eV]	CE [eV]	CXP [eV]
AKB48-5F	384,1	135,1	6,8	75	5	29	18
AM-1220	383,5	98,1		78	5	56	6
AM-1248	391,2	135,1		80	5	41	10
AM-2201	360,2	155	6,1	85	5	36	11
AM-2232	353,1	155,1	4,9	85	5	30	12
AM-2233	459,1	98,1		65	5	53	6
AM-694	436,3	231	5,5	80	5	40	16
APICA	365,1	135,1	6,9	80	5	41	10
JWH-007	356,1	155,2	6,8	85	5	36	12
JWH-015	328,201	155,101	5,8	85	5	34	11
JWH-018	342,2	155,1	6,7	90	5	35	7
JWH-019	356,2	155,1	7,1	90	5	36	11
JWH-020	370,3	155,1	7,5	100	5	36	10
JWH-073	328,2	155,2	6,3	90	5	32	11
JWH-081	372,2	185,1	7	80	5	35	12
JWH-122	356,2	169,1	7,1	94	5	36	12
JWH-200	385,2	155,1		80	5	33	11
JWH-203	340,1	125	6,3	80	5	36	8
JWH-210	370,2	183,1	7,5	80	5	35	8
JWH-250	336,3	121,1	6,1	75	5	30	8
JWH-251	320,2	105,1	6,2	80	5	34	6
JWH-307	386,2	155,1	7,1	60	5	30	11
JWH-370	382,2	155	7,3	45	5	29	13
JWH-387	420,1	233	7,5	80	5	38	5

Material und Methoden

Substanz (Quantifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	RT [min]	DP [eV]	EP [eV]	CE [eV]	DXP [eV]
JWH-398	376,2	189,2	7,4	85	5	37	14
JWH-412	360,4	173,2	6,9	70	5	36	13
MAM-2201	374,4	169,2	6,5	70	5	37	13
Methanandamid	362,2	76	6,7	51	5	33	4
RCS-4	322,2	135,1	5,9	80	5	34	10
RCS-4 ortho Isomer	322,1	135,1	5,6	80	5	32	10
RCS-8	376,2	121	7,1	60	5	34	8
STS-135	383,1	135,1	6,4	85	5	41	10
UR-144	312,1	125	6,6	70	5	34	16
WIN 48098	379,2	135		70	5	30	9
WIN 552122	427,2	155,1	5,6	80	5	36	11
XLR-11	330,1	125,1	5,9	80	5	32	9
d9-JWH-007	365,2	155,1	6,8	90	5	36	11
d7-JWH-015	335,2	155,1	5,8	85	5	34	11
d11-JWH-018	353,3	155,1	6,7	90	5	35	7
d9-JWH-073	337,3	155,1	6,2	90	5	32	11
d9-JWH-081	381,2	185,2	6,9	80	5	35	12
d9-JWH-122	365,2	169,2	7,1	94	5	36	12
d5-JWH-200	390,2	155,1		80	5	33	11
d9-JWH-210	379,2	183,2	7,4	80	5	35	8
d5-JWH-250	341,1	121,1	6	75	5	30	8
d9-JWH-398	385,2	189,2	7,4	85	5	37	14
d9-RCS-4	331,2	135,1	5,8	80	5	34	10
d7-Flunitrazepam	321	275,2		65	5	50	8
d3-OH-THC	334,3	316,3	5,5	65	5	20	8

Tabelle 11: MRM-Übergänge der Qualifier und zugehörige Energien und Potentiale für die LC-MS/MS-Methode sowie die Ionenverhältnisse mit den nach Richtlinie zugelassenen Grenzen^[116]. Für alle quantifizierbaren Substanzen ist zusätzlich der Interne Standard angegeben. Positiv ionisierte Masse [MH]⁺, Masse des zweitintensivsten Fragments (Ion 2), Collision Energy (CE) und Collision Cell Exit Potential (CXP) des zweitintensivsten Fragments.

Substanz (Qualifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	CE [eV]	DXP [eV]	Flächenverhältnis Ion 1 zu Ion2 [%]	Interner Standard
AKB48-5F	384,1	134,1	28	23	n.b.	d11-JWH-018
AM-1220	383,5	155,1	38	11	35 - 34 - 43	d5-JWH-200
AM-1248	391,2	112,1	41	7	n.b.	d5-JWH-200
AM-2201	360,2	127	64	8	56 - 71 - 85	d9-JWH-073
AM-2232	353,1	127,1	70	9	n.b.	d11-JWH-018
AM-2233	459,1	112,1	31	8	44 - 55 - 66	d5-JWH-200
AM-694	436,3	203	67	8	26 - 35 - 44	d9-JWH-073
APICA	365,1	107,1	62	7	n.b.	d9-JWH-081
JWH-007	356,1	127,2	70	9	56 - 70 - 84	d9-JWH-007
JWH-015	328,2	127,101	60	8	55 - 69 - 83	d7-JWH-015
JWH-018	342,2	127,1	61	8	58 - 73 - 88	d11-JWH-018
JWH-019	356,2	127,1	71	9	55 - 69 - 83	d9-JWH-210
JWH-020	370,3	127,1	65	8	65 - 81 - 97	d9-JWH-007
JWH-073	328,2	127,2	65	8	58 - 73 - 88	d9-JWH-073
JWH-081	372,2	214,2	35	10	23 - 31 - 39	d9-JWH-081
JWH-122	356,2	141,1	66	9	47 - 59 - 71	d9-JWH-122
JWH-200	385,2	114,1	37	8	45 - 57 - 68	d5-JWH-200
JWH-203	340,1	188,2	28	13	9 - 13 - 17	d11-JWH-018
JWH-210	370,2	214,2	35	10	23 - 31 - 39	d9-JWH-210
JWH-250	336,3	91,1	63	5	32 - 43 - 54	d5-JWH-250
JWH-251	320,2	214,1	34	9	54 - 68 - 82	d9-JWH-073

Material und Methoden

Substanz (Qualifier)	[MH] ⁺	Ion [m/z]	CE [eV]	DXP [eV]	Flächenverhältnis Ion 1 zu Ion2 [%]	Interner Standard
JWH-307	386,2	127	72	9	48 - 60 - 72	d9-JWH-081
JWH-370	382,2	127	75	9	n.b.	d9-JWH-398
JWH-387	420,1	205	62	15	36 - 48 - 60	d9-JWH-210
JWH-398	376,2	161,2	62	12	47 - 59 - 71	d9-JWH-398
JWH-412	360,4	145,1	66	10	53 - 66 - 79	d9-JWH-081
MAM-2201	374,4	141,1	61	10	50 - 63 - 76	d9-JWH-073
Methanandamid	362,2	91	66	5	20 - 27 - 34	d11-JWH-018
RCS-4	322,2	77,1	77	4	23 - 31 - 39	d9-RCS-4
RCS-4 ortho Isomer	322,1	77,1	74	4	27 - 36 - 45	d9-RCS-4
RCS-8	376,2	91	74	5	36 - 48 - 60	d11-JWH-018
STS-135	383,1	107,1	66	7	n.b.	d11-JWH-018
UR-144	312,1	214	32	17	n.b.	d11-JWH-018
WIN 48,098	379,2	114,1	41	8	10 - 14 - 18	d7-Flunitrazepam
WIN 55,212-2	427,2	127,1	76	8	31 - 42 - 53	d3-OH-THC
XLR-11	330,1	232,1	34	18	n.b.	d5-JWH-250

n.b.: nicht bestimmt

4 Experimenteller Teil

4.1 Besonderheiten im Metabolismus von AM-2201

4.1.1 Untersuchung authentischer Urinproben

Die forensischen Urinproben stammten von Polizei, Krankenhäusern oder Therapieeinrichtungen und wurden zur Analyse auf synthetische Cannabinoide ins Institut für Rechtsmedizin, Freiburg eingesandt. Die Urinproben der Gruppe A erwiesen sich positiv für JWH-018 und stammten aus einem Zeitraum zwischen 2008 und 2010, zu dem unseren Informationen zugrunde liegend kein AM-2201 auf dem europäischen Markt im Umlauf war. Die Urinproben der Gruppe B sind korrespondierende Proben zu Serumproben, welche positiv auf AM-2201 und negativ auf JWH-018 getestet wurden. Die Urinproben wurden mit der quantitativen LC-MS/MS Methode (siehe 3.7), welche um die erwarteten Metaboliten des JWH-022 erweitert wurde, gemessen.

4.1.2 Untersuchung von Rauchkondensat

Zur Herstellung des Rauchkondensates wurden 10 mg reines AM-2201 in Methanol gelöst und auf üblicherweise für „Kräutermischungen“ verwendetes Pflanzenmaterial, welches sich als negativ auf synthetische Cannabinoide erwiesen hatte, aufgesprüht und für 24 h getrocknet. 500 mg dieser aufdotierten Kräutermischung wurden mit 500 mg handelsüblichem Tabak vermengt und zu einem „Joint“ gedreht. Dieser „Joint“ wurde mit einer Waschflasche, ausgestattet mit einer porösen Membran und gefüllt mit 200 mL eiskaltem Methanol, verbunden und mittels einer Wasserstrahlpumpe mit 2 Zügen pro Minute (jeder Zug dauerte 2 s an) abgeraucht. Anschließend wurden alle Verbindungsstücke mit Methanol gewaschen, die Methanolfractionen vermengt und 5 mL zur Analyse mittels LC-MS/MS 1:100 verdünnt. Zur Analyse des Rauchkondensates wurde die LC-MS/MS-Methode der Serumanalytik herangezogen sowie zusätzlich EPI-Experimente durchgeführt.

4.1.3 Orale Applikation von AM-2201

Während eines Experimentes, durchgeführt von einer freiwilligen männlichen Person (42 Jahre, 75 kg Körpergewicht), wurden 5 mg reines AM-2201 mittels einer Gelatine kapsel oral aufgenommen. Zuvor war die Reinheit des verwendeten AM-2201 sichergestellt worden. Die Person erfuhr dabei keinerlei psychische oder physische Effekte. Serum- und Urinproben wurden vor der Einnahme, sowie über die folgenden elf Tage gewonnen. Zur Analyse der Serumproben wurde die von *Kneisel et al.* publizierte LC-MS/MS Methode herangezogen und um die MRM-Übergänge für JWH-022 erweitert (340,2/155,1 und 340,2/127,1)^[55]. Zur Analyse der Metaboliten in Serumproben und Urinproben wurde die oben beschriebene LC-MS/MS Methode zum Nachweis der Metaboliten synthetischer Cannabinoide verwendet.

Die Arbeiten zur Erzeugung des Rauchkondensates und der Analyse der Serumproben wurden nicht selbst durchgeführt, wurden aber im Zuge eines gemeinsamen Projektes im Institut für Rechtsmedizin in Freiburg durchgeführt^[117].

4.2 In vitro Untersuchungen des Metabolismus ausgewählter synthetischer Cannabinoide

Die *in vitro* Arbeiten wurden im Zuge der Diplomarbeit von Lisa Redlingshöfer durchgeführt, welche im Rahmen dieser Arbeit betreut wurde.

4.2.1 Optimierung der Reaktionsparameter

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden für JWH-018 als Vorläufersubstanz, welche in der Literatur beschrieben ist^[111], durch Ansätze mit den folgenden Variablen durchgeführt und für die untersuchten synthetischen Cannabinoide übernommen: Substratkonzentration, pHLM-Konzentration, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Konzentration.

4.2.2 Initial Screenings

Die *Initial Screenings* wurden in Doppelbestimmung zu den folgenden Zeitpunkten untersucht: 0 min, 5 min, 10 min (außer: JWH-122), 15 min, 30 min, 45 min und die Analyt-Peakflächen bezogen auf einen internen Standard (Peak Area Ratio – PAR) relativ ins Verhältnis gesetzt.

4.2.3 Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

Die PAR zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden mittels der Nullkontrollen (*Control Supersomes*) korrigiert und gegen die Zeit aufgetragen, der lineare Bereich visuell abgeschätzt und dessen Steigung durch lineare Regression bestimmt (GraphPad Prism 6.0 Demo, GraphPad Software, La Jolla, USA). Die Steigung drückt damit die Anfangsgeschwindigkeit bei einer Substratkonzentration von 10 µg/mL und einer Enzymkonzentration von 40 pmol/mL aus.

Zur Anpassung der Umsatzraten der CYP Isoformen an die Umsatzrate der pHLM wird die *Relative-Activity-Factor-Methode* (RAF-Methode) herangezogen. Zur Ermittlung des RAF-Wertes wird die Umsatzrate eines Substrates, welches selektiv nur durch die betrachtete CYP Isoform umgesetzt wird, sowohl in pHLM als auch für die rCYP Isoform ermittelt und diese ins Verhältnis gesetzt (Gleichung 6)^[118].

$$RAF = \frac{v_{S,pHLM}}{v_{S,rCYP}} \quad (6)$$

Mittels der RAF-Methode wurde für AM-694 und MAM-2201 näherungsweise der prozentuale Beitrag der jeweiligen Isoformen an der Umsetzung in den pHLM ermittelt. Dazu wurden die vom Hersteller angegebenen RAF-Werte herangezogen und die *Contribution* (Gleichung 7) wie folgt berechnet^[119]:

$$Contribution_{Enzym} = \frac{RAF_{Enzym} \cdot v_{max,Enzym}}{(RAF_{Enzym} \cdot v_{max,Enzym})} \cdot 100 \quad (7)$$

Dies gilt dann, wenn die Plasmakonzentration der untersuchten Substanz der Größenordnung des K_m der jeweiligen CYP Isoform entspricht oder höher liegt.

Eine Extrapolation der Ergebnisse auf das *in vivo* Verhalten ist mit dieser näherungsweisen Methodik nicht möglich, da die Plasmakonzentrationen meist weit unterhalb des ermittelten K_m liegen. Daher wurden für die Metaboliten des RCS-4 und JWH-122 die benötigten kinetischen Konstanten ermittelt, um so wie folgt die *Intrinsic Clearance* (CL_{int}) (Gleichung 8) bestimmen zu können:

$$Intrinsic\ Clearance_{Enzym} = \frac{RAF_{Enzym} \cdot v_{max,Enzym}}{K_{m,Enzym}} \quad (8)$$

Die prozentuale Clearance wird dann nach Gleichung 9 berechnet:

$$Clearance_{Enzym} = \frac{Intrinsic\ Clearance_{Enzym}}{Intrinsic\ Clearance_{Enzyme}} \quad (9)$$

4.2.4 Bestimmung der Enzymkinetiken

4.2.4.1 Wahl der Reaktionsparameter

Zur Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeiten nach Michaelis-Menten zur weiteren Ermittlung der Parameter v_{max} und K_m ist ein proportionaler Anstieg der Menge an Produkt in Abhängigkeit von Zeit und Enzymmenge gefordert. Zur Wahl der geeigneten Reaktionsparameter zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurde daher, wie oben beschrieben, der lineare Bereich

der Produktbildung in Zeitabhängigkeit bestimmt und zusätzlich die Enzymabhängigkeit überprüft. Zur Überprüfung der Enzymabhängigkeit wurde bei einer Substratkonzentration von 10 mg/mL die Produktentstehung bei 4, 10, 40 und 100 pmol/mL CYP bzw. 0,1, 0,2, 1,0 und 2,0 mg/mL pHLM gemessen und der lineare Bereich durch lineare Regression überprüft (Linearität gegeben bei $R^2 > 0,98$). Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte dann nur für solche CYP Isoformen, bei denen eine lineare Enzymabhängigkeit gegeben war.

4.2.4.2 Bestimmung der kinetischen Konstanten

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten wurden die in Tabelle 12 und Tabelle 13 dargestellten Substrat- und Enzymkonzentrationen, sowie Inkubationszeiten gewählt und die Anfangsgeschwindigkeiten durch Einpunktbestimmungen ermittelt.

Tabelle 12: Substrat- und Enzymkonzentrationen sowie Inkubationszeiten für die unterschiedlichen Isoformen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der *in vitro* Bildung der Hauptmetaboliten des RCS-4.

RCS-4		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4	3A5	pHLM	WT-IZ
Enzymkonzentration [pmol/mL]		20	40	40	40	40	40	20	20	20	40
Substratkonzentration		Inkubationszeit [min]									
[µg/mL]	[µM]										
0,05	0,16	7	15	10	10	15	5	2	2	2	5
0,1	0,31	7	15	10	10	15	5	2	2	2	5
0,05	1,56	7	15	10	10	15	5	2	2	2	5
1	3,1	7	15	10	10	15	5	2	2	2	5
5	15,6	7	15	10	10	15	5	2	2	2	5
10	31,1	7	15	10	10	15	5	2	2	2	5
50	155	7	10	5	10	7	5	2	2	2	5
100	311	7	10	5	10	7	5	2	2	2	5

Zur Identifikation des kinetischen Modells, welches das Verhalten der einzelnen Reaktionen am besten beschreibt, wurden sowohl Eadie-Hofstee-Plots als auch eine statistische Auswertung mittels F-Test ($p < 0,02$) herangezogen, welche bei unterschiedlichen Ergebnissen auch bevorzugt wurde (siehe auch 1.4.1).

Verglichen wurden die Michaelis-Menten Kinetik, Substratinhibierung bei hoher Substratkonzentration, biphasische Kinetiken und die allosterische Kinetik nach Hill.

Tabelle 13: Substrat- und Enzymkonzentrationen sowie Inkubationszeiten für die unterschiedlichen Isoformen zur Bestimmung der kinetischen Parameter der *in vitro* Bildung der Hauptmetaboliten des JWH-122.

JWH-122		1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4	3A5	pHLM	WT-IZ
Enzymkonzentration [pmol/mL]		20	40	40	40	20	40	20	20	20	40
Substratkonzentration		Inkubationszeit [min]									
[µg/mL]	[µM]										
0,05	0,14	10	15	15	5	7	10	2	2	2	5
0,1	0,28	10	15	15	5	7	10	2	2	2	5
0,05	1,4	10	15	15	5	7	10	2	2	2	5
1	2,8	10	15	15	5	7	10	2	2	2	5
2,5	7							2	2		
5	14	10	15	15	5	7	10	2	2	2	5
7,5	21,1							2	2		
10	28,1	10	15	15	5	7	10	2	2	2	5
25	70,2							2	2		
50	140	5	10	10	5	7	10	2	2	2	5

4.3 Validierung der Urin- und Haaranalytik nach forensischen Richtlinien

Die Methoden zum quantitativen Nachweis synthetischer Cannabinoide in Haarproben bzw. der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urinproben wurden nach den Richtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh) validiert^[120]. Zur statistischen Auswertung wurde die Software Valistat 2.0 (Arvecon GmbH, Walldorf) sowie MS Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) verwendet.

4.3.1 Selektivität

Sechs Leerproben aus verschiedenen Chargen (Blank-Proben) und zwei Nullproben (mit internem Standard aufdotiert) wurden nach dem Methodenprotokoll aufgearbeitet und auf Interferenzen in der MRM-Methode untersucht. Zusätzlich wurde je eine Matrixprobe mit den folgenden Wirkstoffen bzw. Metaboliten aufdotiert und auf Interferenzen untersucht: Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), 11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Amphetamin, Methamphetamin, 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDA), 3,4-Methylenedioxyamphetamin (MDMA), Methylenedioxyethylamphetamin (MDEA), Methadon, 2-Ethyliden-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidin (EDDP), Cocain, Benzoylcegonin, Methylecgonin, Tramadol, O-Desmethyltramadol, Tilidin, Nortilidin, Morphin, Dihydromorphin, Codein, Dihydrocodein, Oxymorphon, Hydrocodon, Oxycodon, Normorphen, Hydromorphen, Norcodein, Norcocain, Cocaethylen, Buprenorphin, Norbuprenorphin, 7-Aminoclonazepam, 7-Aminoflunitrazepam, Alprazolam, α -Hydroxyalprazolam, Bromazepam, Brotizolam, Camazepam, Chlordiazepoxid, Clobazam, Clonazepam, Clotiazepam, Delorazepam, Diazepam, Estazolam, Flunitrazepam, Flurazepam, Lorazepam, Lormetazepam, Medazepam, Midazolam, Nitrazepam, Nordazepam, Norflunitrazepam, Oxazepam, Temazepam, Tetrazepam, Triazolam, α -Hydroxytriazolam, Zaleplon, Zopiclon, Zolpidem (Haarprobe aufdotiert mit 1000 pg/mg, Urinprobe aufdotiert mit 10 ng/mL). Zur Bestimmung der Probenverschleppung wurde eine Probe in sehr hoher Konzentration aufdotiert (Haare: 3000 pg/mg, Urinprobe: 100 ng/mL) und die nachfolgend gemessene Nullprobe auf Interferenzen untersucht.

4.3.2 Linearität der Kalibration

Mindestens sechs Kalibratoren mit von Null verschiedene Konzentrationen wurden durch Aufstocken von Leermatrix hergestellt (Urinmethode: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10 ng/mL; Haarmethode: 0,5, 1,0, 2,5, 5, 10, 25, 50 und 75 pg/mg) und fünf (Haare) bzw. sechs (Urin) Wiederholbestimmungen durchgeführt. Der niedrigste Kalibrator entsprach dabei der Bestimmungsgrenze der Methode. Mittels Grubbs-Test (Signifikanzniveau: 95%) wurde auf Ausreißer getestet und diese ggf. eliminiert (max. 2 Ausreißer bei unterschiedlichen Konzentrationen). Die Varianzenhomogenität wurde mittels F-Test (niedrigster und höchster Kalibrator) bzw. Cochran-Test (alle Konzentrationen) (Signifikanz: 99%) ermittelt.

4.3.3 Genauigkeit

Aufstockung von Leermatrix in drei unterschiedlichen Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch, relativ zum Kalibrationsbereich) und jeweilige Doppelbestimmung an acht (Urin) bzw. fünf (Haare) verschiedenen Tagen (Konzentrationen Urin: 0,07, 0,7 und 7,0 ng/mL; Konzentrationen Haare: 2, 20 und 60 pg/mg). Über die relative Standardabweichung (RSD) bzw. Bias wurden Wiederholpräzision, tagesverschiedene Laborpräzision und Genauigkeit bestimmt.

4.3.4 Stabilität aufgearbeiteter Proben

Sechs QC-Proben bei niedriger und hoher Konzentration relativ zum Kalibrationsbereich wurden hergestellt, gepoolt und auf sechs Aliquote verteilt zu äquidistanten Zeitpunkten über den relevanten Zeitraum vermessen (Urin: 21,5 h, 0,7 bzw. 7,0 ng/mL; Haare 9 h, 2 bzw. 60 pg/mg).

4.3.5 Analytische Grenzen – Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Wiederholbestimmung von fünf aufdotierten Leermatrixproben mit der Konzentration der Bestimmungsgrenze (Urin: 0,05 ng/mL; Haare: 0,5 bzw. 5 pg/mg) und Bestimmung von Bias und RSD ($\leq 20\%$). Die Nachweisgrenze wurde für die Haarmethoden der jeweiligen Bestimmungsgrenze gleichgesetzt. Bei der Urinmethode erfolgte die Bestimmung der Nachweisgrenze über die Forderung eines Signal-Rausch-Verhältnisses > 3 .

4.3.6 Matrixeffekt, Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute

Die Bestimmung erfolgte nach der Methodik von *Matuszewski et al.*^[121]. Dabei werden durch Analyse drei unterschiedlicher Probensets Extraktionsausbeute, Wiederfindung und Matrixeffekte bestimmt. Set 1 besteht aus Referenzstandard in mobiler Phase, bei den Proben für Set 2 wird die Matrix nach vorgeschriebener Extraktion aufgearbeitet und vor der Analyse die Referenzstandards zugesetzt. Set 3 entspricht der normalen Probenaufarbeitung mit vorheriger Zugabe der Referenzstandards. Um den Einfluss unterschiedlicher Matrices untersuchen zu können, sollen mindestens fünf unterschiedliche Haar-/Urinproben nach diesem Verfahren analysiert werden.

4.4 Studie zur Rauchkontamination von Haarproben

4.4.1 Studiendesign

Ein männlicher, sowie zwei weibliche freiwillige Probanden nahmen an dem Experiment teil. Die zwei weiblichen Teilnehmerinnen hatten lange, gebleichte Haare (26 cm bzw. 42 cm Haarlänge) und der männliche Proband kurze braune Haare (5 cm). Über eine Periode von 3 Wochen wurden die Haare der Probanden fünf Tage die Woche (Montag – Freitag) dem Rauch eines mit synthetischen Cannabinoiden versetzten „Joints“ ausgesetzt. Die „Joints“ wurden aus 500 mg Kräutermischung mit einem Gehalt an 4,8 mg/g JWH-018, 20,4 mg/g JWH-122 und 62 mg/g und 500 mg handelsüblichem Tabak hergestellt. Um eine Kontamination der Hände oder Kleidungsstücke zu verhindern wurden alle Experimente mit Latexhandschuhen und Schutzanzügen durchgeführt. Das Experiment wurde in einem 2,5 x 2 x 2,5 m großen Raum durchgeführt und das Abrauchen des „Joints“ wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe gewährleistet. Um eine Inhalation des Rauches zu verhindern, erfolgte die Luftversorgung aller Probanden während des Experimentes über komprimierte Luft aus Taucherflaschen. Während des Verräucherns des „Joints“ saßen sich die drei Probanden in einem Kreis gegenüber und der „Joint“ wurde bis zu dessen vollständigem Verräuchern (ca. 15-20 min) kreis herum gereicht um eine möglichst realitätsnahe Situation zu imitieren. Die Haarpflege der Probanden erfolgte über den kompletten Zeitraum des Experimentes in gewohnter Weise.

Um den Einfluss einer einmaligen Exposition zu untersuchen wurde das Experiment mit einer weiblichen (Haarlänge: 50 cm) und einem männlichen Probanden (Haarlänge: 1,5 cm) wie oben beschrieben durchgeführt. Die Exposition bestand hierbei aus einem „Joint“ an einem einzelnen Tag.

4.4.2 Probenahme

Haarproben von allen Probanden wurden vor dem Experiment, sowie wöchentlich während des Expositionszeitraums, jeweils kurz vor erneuter Exposition und einmal wöchentlich für die folgenden drei Wochen nach Abschluss der Beräucherungsphase entnommen. Für die Teilnehmer

an dem Experiment zur einmaligen Exposition, wurde am Folgetag sowie eine Woche nach Exposition, eine Haarprobe entnommen.

Die Entnahme der Proben erfolgte möglichst nahe an der Kopfhaut in der hinteren Scheitelregion des Kopfes. Das proximale Ende der Strähne wurde gekennzeichnet und alle Proben bis zur Analyse in Aluminiumfolie bei Raumtemperatur gelagert. Zusätzlich wurde einmal wöchentlich eine Urinprobe jedes Probanden entnommen.

4.4.3 Probenvorbereitung

Während die Haare der weiblichen Probanden aufgrund der Haarlänge eine Segmentierung erlaubten, wurden die Haare der männlichen Probanden unsegmentiert analysiert. Eine Ausnahme bildete die Haarprobe, welche in der sechsten Woche nach Start des Experimentes gewonnen wurde. Diese wurde in zwei Segmente geteilt. Probenaufarbeitung und Analyse mittels LC-MS/MS erfolgten nach der in dieser Arbeit beschriebenen Methode (siehe 3.8)^[122].

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Identifizierung der Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lagen hinsichtlich des Metabolismus synthetischer Cannabinoide nur wenige *in vivo* und *in vitro* Daten vor^[108-113]. Für alle bis dato untersuchten Substanzen waren die Muttersubstanzen in humanen Urinproben oder in Urinproben von Ratten nicht detektiert worden, was auf einen umfassenden Metabolismus der Substanzen hinwies^[112, 123]. Von Zhang *et al.* wurde 2006 für JWH-015 mittels Inkubation von Rattenlebermikrosomen eine Vielzahl gebildeter Metaboliten *in vitro* identifiziert^[108]. Für die Entwicklung einer Urinanalytik, die zum Nachweis eines Konsums von Produkten, welche synthetische Cannabinoide enthalten, dienen sollte, war es daher unablässig, zunächst die Hauptmetaboliten in Humanurin zu identifizieren. Dazu wurden im Zuge dieser Arbeit Urinproben von Patienten aus Krankenhäusern, Entzugs- und Therapiezentren sowie forensischen Psychiatrien auf die Hauptmetaboliten der konsumierten Substanz untersucht. Serum- und Urinproben der Patienten wurden von den jeweiligen Einrichtungen mit dem Auftrag der Untersuchung auf synthetische Cannabinoide ins Institut für Rechtsmedizin Freiburg geschickt. Da im Serum die Muttersubstanzen unverändert nachweisbar sind, wurde diese mit der im Institut etablierten Methode zum quantitativen Nachweis synthetischer Cannabinoide untersucht. Diese Methode wurde auf der Grundlage eines europaweiten marktorientierten Produktmonitorings ständig aktualisiert und umfasste zu jedem Zeitpunkt die relevanten synthetischen Cannabinoide. Erwies sich eine Serumprobe als positiv bezüglich eines synthetischen Cannabinoids wurde der korrespondierende Urin auf die Hauptmetaboliten des jeweiligen synthetischen Cannabinoids untersucht. Diese Vorgehensweise erlaubte eine zeitnahe Identifizierung der Metaboliten derjenigen synthetischen Cannabinoide, welche aktuell auf dem „Usermarkt“ im Umlauf waren und ermöglichte so eine realistische und „marktnahe“ Überwachung.

Zur Identifizierung der Phase-I-Hauptmetaboliten wurden die Urinproben mittels einer Flüssigflüssig-Extraktion nach Glucuronidasespaltung extrahiert und mittels unterschiedlicher massenspektrometrischer Techniken identifiziert. Es wurden EPI-, MRM- und Precursor-Ion-Experimente durchgeführt und die somit postulierten Metaboliten mittels Messung der

Feinmassen (High Resolution (HR)-MS und HR-MS/MS) bestätigt. Nach diesem Verfahren wurden in der vorliegenden Arbeit die Hauptmetaboliten von 16 synthetischen Cannabinoiden identifiziert. Das experimentelle Protokoll dieser Studien wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Freiburg geprüft und genehmigt (Konformität mit der *Declaration of Helsinki*, 1965).

Zur Bestimmung der metabolisch gebildeten Hauptmetaboliten wurde zur Auswertung der LC-MS/MS Experimente die Struktur und das massenspektrometrische Verhalten der Muttersubstanz zugrunde gelegt. So fragmentiert JWH-018 beispielsweise in vier typische Fragmentationen (siehe Abbildung 10). Die Fragmentationen m/z 214 und m/z 144 beschreiben dabei den Indolrest mit bzw. ohne den aliphatischen Rest und die Fragmentationen m/z 127 und m/z 155 den Naphthylrest mit bzw. ohne Carbonylgruppe. Diese vier Fragmentationen wurden als diagnostische Ionen für die Identifizierung der Hauptmetaboliten herangezogen, da aus einigen *in vitro* Studien bekannt war, dass die gebildeten Metaboliten ein ähnliches Fragmentierungsmuster aufweisen^[111].

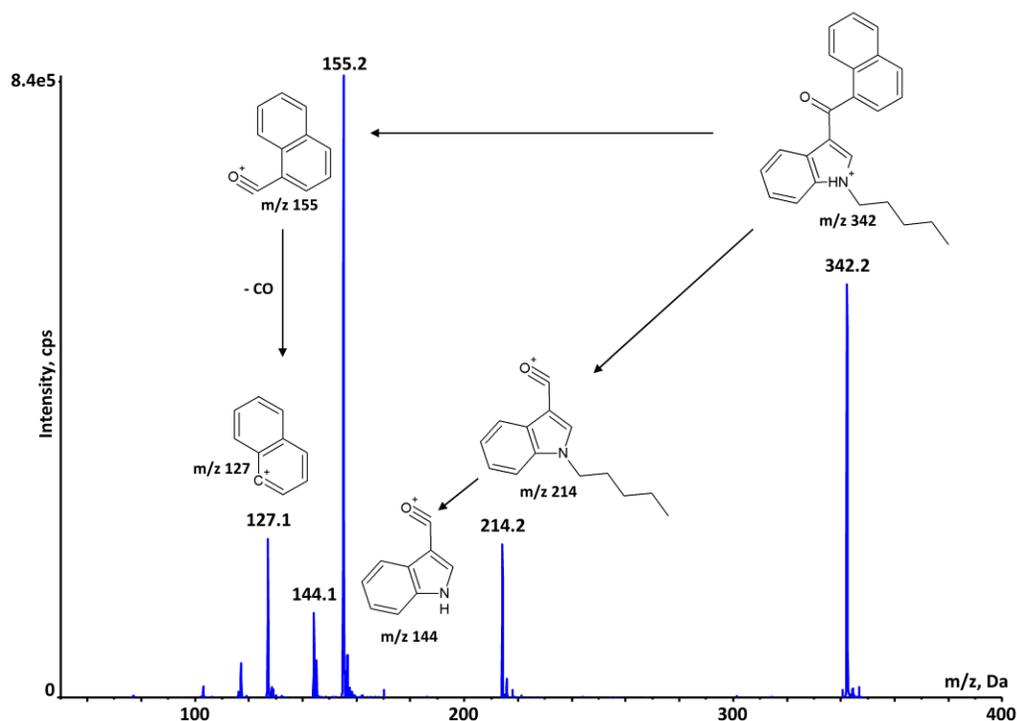


Abbildung 10: ESI(+)-MS/MS-Spektrum des protonierten JWH-018 und dessen Fragmentierungsschema.

Im Nachfolgenden ist die Aufklärung der Hauptmetaboliten von 16 synthetischen Cannabinoiden dargestellt, chronologisch sortiert nach dem Zeitpunkt ihres Auftretens in Kräutermischungen auf dem europäischen Markt. Da die Entwicklung einer Analysenmethode zum Nachweis des Konsums synthetischer Cannabinoide im Fokus dieser Arbeit stand, beschränkt sich die metabolische Aufklärung auf die Hauptmetaboliten der jeweiligen Verbindungen, welche mittels LC-MS/MS detektierbar waren. Eine Übersicht über die Strukturen der in dieser Arbeit beschriebenen synthetischen Cannabinoide sowie deren Metaboliten befindet sich im Anhang.

5.1.1 JWH-018

Abbildung 11 zeigt ein exemplarisches Chromatogramm einer Urinprobe und die ESI-MS/MS Spektren der Muttersubstanz JWH-018 (Naphthalen-1-yl(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanon) sowie der drei identifizierten Hauptmetaboliten.

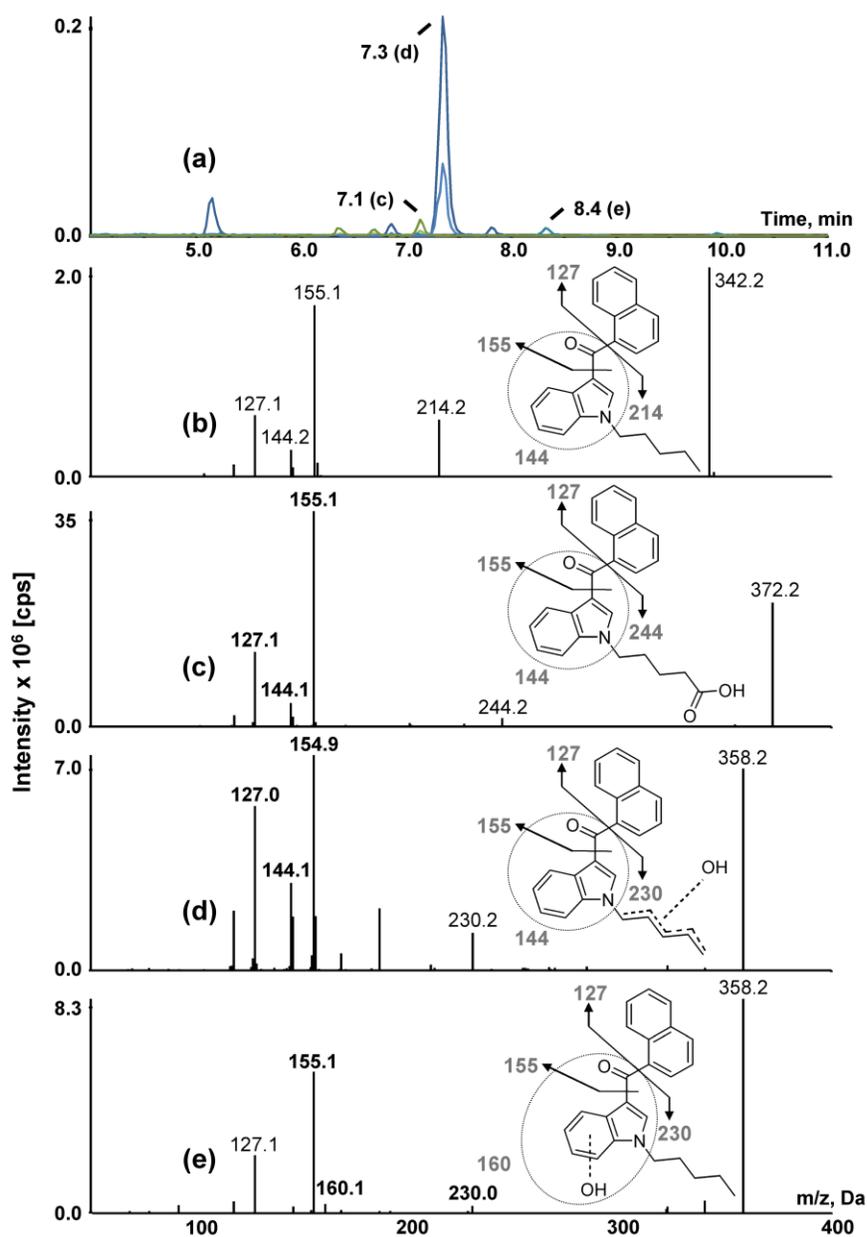


Abbildung 11: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-018 (b); Metabolit 1: An der N-Pentylkette zur Säure oxidiert (c); Metabolit 2: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (d); Metabolit 3: Monohydroxyliert am Indolring (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Zwei monohydroxylierte und eine zur Säure oxidierte Verbindung wurden als Hauptmetaboliten in allen untersuchten Urinproben identifiziert. Beide monohydroxylierten Verbindungen mit $[M]^+ = 358$ amu zeigen unveränderte Naphthylfragmentionen (m/z 127 und m/z 155, Abbildung 11d+e). Das Fragmention mit m/z 230 weist auf eine Hydroxylgruppe entweder am Indolrest oder der N-Pentylkette hin. Ein Metabolit (Abbildung 11d) besitzt ein unveränderten Indolrest (m/z 144), was auf eine Hydroxylierung an der N-Alkylkette hinweist, wohingegen der andere Metabolit (Abbildung 11e) ein Fragmention aufweist, welches typisch für einen hydroxylierten Indolrest (m/z 160) ist. Das Massenspektrum des Säuremetaboliten (Abbildung 11c) zeigt eine um 30 amu höhere Masse des Precursorions und unveränderte Fragmentionen für den Naphthyl- und den Indolrest. In Kombination mit dem Fragmention m/z 244 ist davon auszugehen, dass eine weitere Oxidation der am C-Terminus der Alkylkette eingeführten Hydroxylgruppe zur Bildung der Säure führte. JWH-018 wurde in keiner der untersuchten Urinproben detektiert.

In *in vitro* Arbeiten zum Phase-I-Metabolismus von JWH-018 wurden neben den hier identifizierten Monohydroxy- und Säuremetaboliten eine Vielzahl an weiteren monohydroxylierten, di- und trihydroxylierten, dehydrierten, dehydriert-mono- oder dihydroxylierten, N-desalkylierten und N-desalkyliert-monohydroxylierten Metaboliten detektiert, sowie die Bildung von Dihydrodiolen (mono- bzw. dihydroxyliert oder N-desalkyliert) beobachtet^[111]. Ein ähnlich großes Spektrum an Metaboliten wurde auch in humanen Urinproben detektiert, mit Ausnahme der dehydrierten Metaboliten^[112, 113].

N-desalkylierte Metaboliten wurden in einigen, jedoch nicht allen Studien in Humanurin detektiert, wobei hier möglicherweise Art der Extraktion und Detektion großen Einfluss auf die Nachweisbarkeit nehmen. Des Weiteren scheinen diese Verbindungen mit endogenen Substanzen gleicher Q_1 -Masse zu koeluiieren, was deren Detektion zusätzlich erschwert^[112, 123]. In allen Arbeiten wurden analog zu den eigenen Ergebnissen monohydroxylierte Verbindungen und Säuremetaboliten als Hauptmetaboliten identifiziert^[113, 123-125]. In Arbeiten zum Phase-II-Metabolismus von JWH-018 wurden ausschließlich glucuronidierte Verbindungen und keine Sulfate identifiziert. Bis auf den Säuremetabolit, welcher auch ohne vorherige Hydrolyse der konjugierten Verbindung in Urinproben detektiert wurde, werden die restlichen Metaboliten fast vollständig glucuronidiert^[112, 113]. Katalysiert werden diese Reaktionen in erster Linie hepatisch durch die UGT1A1, UGT1A9 und UGT2B6 Isoformen der Uridin-5'-Diphosphat-Glucuronidyltransferase (UDP-GT), aber auch extrahepatisch mittels der UGT1A10 sowie

interessanterweise durch die UGT1A7 in den Lungen und die UGT1A3 im Gehirn, zwei Gewebe, welche während des Rauchens besonders exponiert sind^[126].

5.1.2 JWH-073

Die Aminoalkylindole JWH-018 und JWH-073 ((1-Butyl-1*H*-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanon) unterscheiden sich einzig in der Länge der N-Alkylkette. Beide Verbindungen weisen damit auch einen ähnlichen Metabolismus auf. Wie in Abbildung 12 dargestellt gehören Hydroxylierungen am Indolrest (m/z 160, Abbildung 12e) oder der N-Alkylkette (m/z 230, Abbildung 12d) sowie Oxidation zur Säure (Abbildung 12c) zu den Hauptmetabolisierungsreaktionen.

Eine chromatographische Trennung des Säuremetaboliten und des N-(Hydroxybutyl)-Metaboliten war unter den hier gewählten Bedingungen nicht möglich (Abbildung 12a). Zusätzlich wurden ein zweiter N-(Hydroxybutyl)-Metabolit mit hoher Peakintensität ($RT = 7,3$ min) und zwei weitere indolhydroxylierte Metaboliten ($RT = 7,7$ min und $8,4$ min) detektiert. Die Muttersubstanz JWH-073 selbst wurde in den untersuchten Urinproben nicht nachgewiesen. Die identifizierten Hauptmetaboliten von JWH-073 sind analog derer von JWH-018. Interessanterweise wurden in allen Urinproben, welche von Patienten stammen, in deren Serumproben JWH-018 aber kein JWH-073 nachgewiesen wurde, Metaboliten des JWH-073 detektiert. Dies ist wahrscheinlich auf eine enzymatisch katalysierte Decarboxylierungsreaktion des Säuremetaboliten von JWH-018 zurückzuführen, welche zu dem N-terminal hydroxylierten Metaboliten von JWH-073 führt. Ähnliche Beobachtungen machten auch *Moran et al.*, vermuteten eine Desmethylierung der Muttersubstanz JWH-018^[127]. In den von uns untersuchten Serumproben wurde nach ausschließlichem Konsum von JWH-018 kein JWH-073 detektiert, was eher für eine Decarboxylierung der Metaboliten des JWH-018 spricht (eigene Daten). Decarboxylierungsreaktionen in biologischen Systemen sind bisher hauptsächlich für α - oder β -Ketosäuren bzw. für α -Aminosäuren oder Thioester über unterschiedliche Enzyme beschrieben^[128]. Im vorliegenden Falle wäre daher zu erwarten, dass die Decarboxylierung eines Keto-Carbonsäure-Metaboliten zu dem hydroxylierten Metaboliten des JWH-073 führt. Es wäre daher zu überprüfen, ob der entsprechende Keto-Carbonsäure-Metabolit des JWH-018 auch in Serum- oder Urinproben zu detektieren ist.

Auch in den Urinproben zweier Probanden, welche während eines Selbstexperimentes mit einmaligem Konsum einer Kräutermischung, welche JWH-018 enthielt, entnommen worden waren, wurden geringe Mengen des Säuremetaboliten von JWH-073 detektiert. Desweiteren wurde auch eine um eine zweite Methylgruppe verkürzte und zur Säure oxidierte Verbindung

nach dem Konsum von JWH-018 in Urinproben detektiert. Namentlich handelt es sich um den Propansäure-Metaboliten von JWH-072, welcher demnach als gemeinsamer Metabolit nach dem Konsum von JWH-018, JWH-073 und AM-2201 auftritt^[129]. Der Phase-II Metabolismus der Verbindungen läuft analog zu JWH-018 über dieselben Isoformen der UDP-GT^[126].

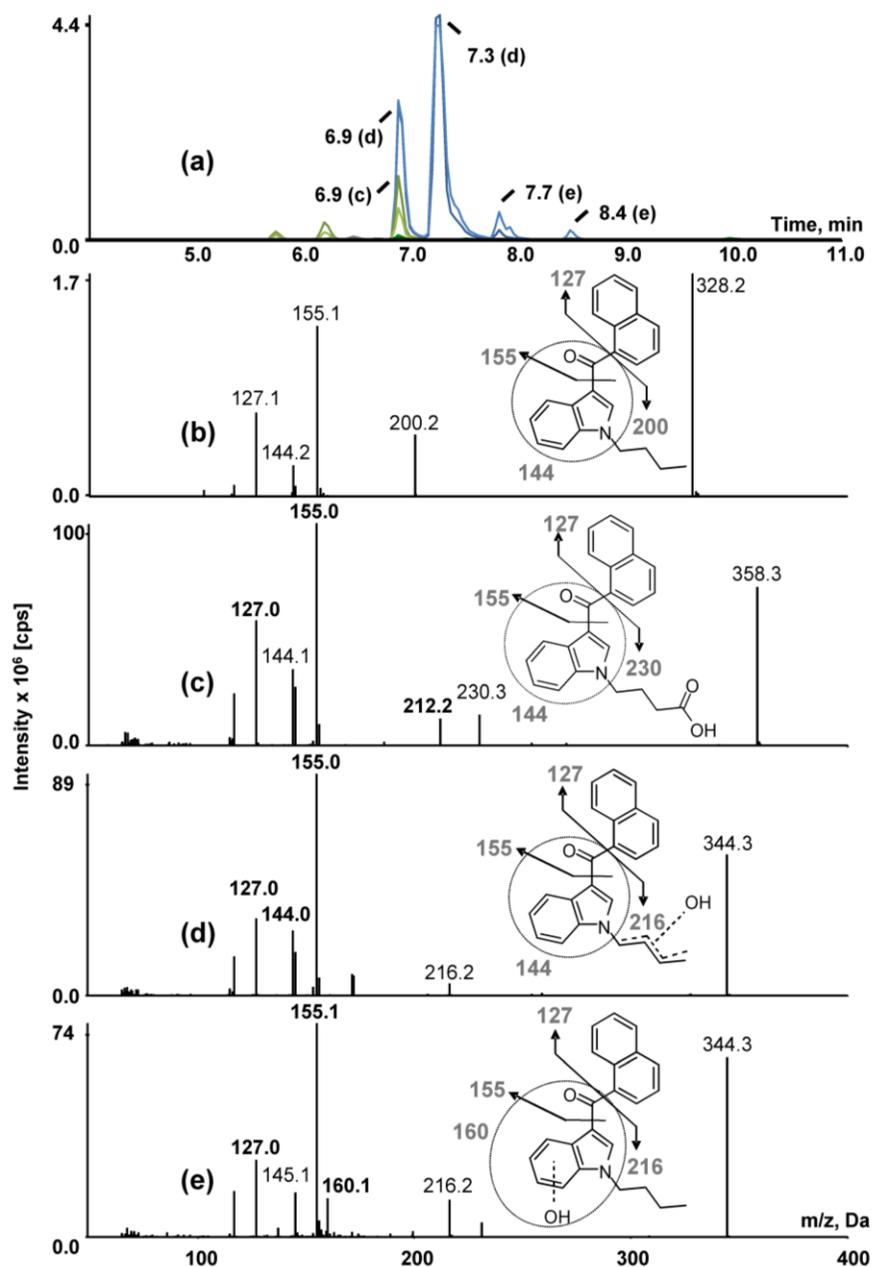


Abbildung 12: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-073 (b); Metabolit 1: An der N-Butylkette zur Säure oxidiert (c); Metabolit 2+3: Monohydroxyliert an der N-Butylkette (d); Metabolit 4+5: Monohydroxyliert am Indolring (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Bindungsaffinitäten der Metaboliten von JWH-018 und JWH-073 zum CB₁-Rezeptor

In Studien der Arbeitsgruppe um *Moran et al.* wurden mittels eines Bindungsverdrängungs-Assays die CB₁-Rezeptoraffinitäten (K_i -Werte) sechs bzw. vier monohydroxylierter Metaboliten und eines Säuremetaboliten von JWH-018 und JWH-073 sowie von JWH-018 und JWH-073 im Vergleich zu Δ^9 -THC *in vitro* untersucht. Eine Übersicht über die Strukturen der untersuchten Metaboliten von JWH-018 gibt Abbildung 13.

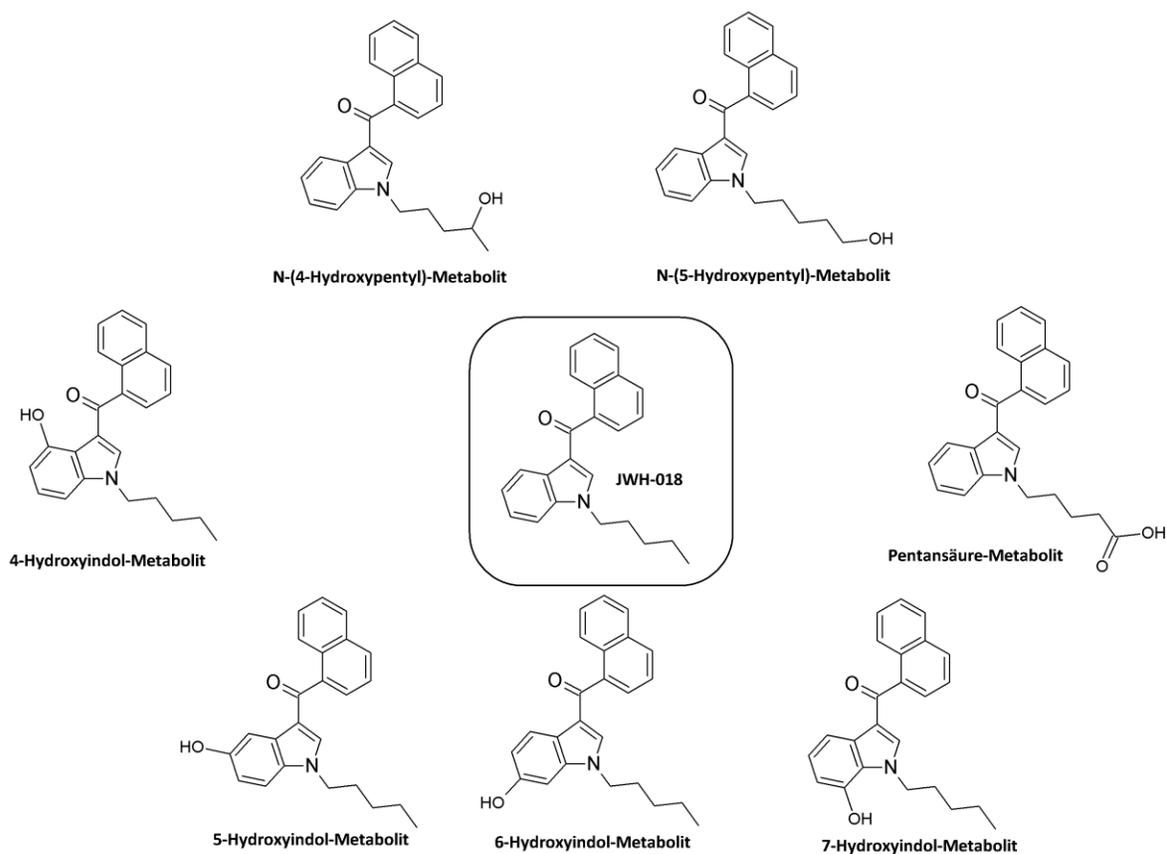


Abbildung 13: Strukturen von JWH-018, sowie der acht monohydroxylierten Metaboliten und des Säuremetaboliten, die als Referenzsubstanzen verfügbar sind.

Die Bindungsaffinitäten liegen im nanomolaren Bereich und nehmen, wie in Abbildung 14 schematisch dargestellt, ab. Die intrinsische Aktivität derselben Substanzen auf den CB₁-Rezeptor wurde mittels eines [³⁵S]GTPγS-Bindungsassay getestet. Dabei wurden JWH-018 und dessen Metaboliten, der 5-, und 6-Hydroxyindol-Metabolit und der N-(4- und N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit sowie JWH-073 als Vollagonisten und der 4- und 7-Hydroxyindol-Metabolit des JWH-018 sowie die 4-, und 6-Hydroxyindol-Metaboliten und der N-(4-Hydroxybutyl)-Metabolit

von JWH-073 als Partialagonisten entsprechend THC identifiziert. Interessanterweise fungiert der 7-Hydroxyindol-Metabolit des JWH-073 nicht als Partialagonist, sondern als kompetitiver Neutralantagonist^[130-132]. Die Glucuronidierung des N-(5-Hydroxypentyl)-Metaboliten von JWH-018 führt *in vitro* zur Bildung eines kompetitiven Neutralantagonisten^[133]. JWH-018 und JWH-073 sowie einige derer monohydroxylierten Metaboliten agieren *in vitro* ebenfalls als Voll- bzw. Partialagonisten in Bezug auf den CB₂-Rezeptor^[134].

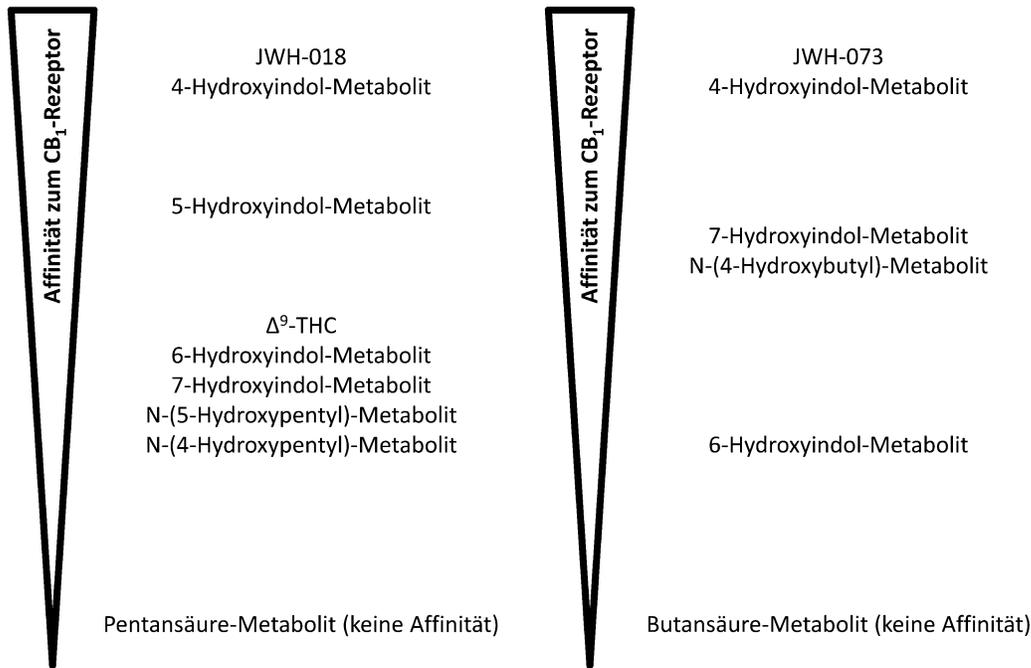


Abbildung 14: Schematische Darstellung der relativen Bindungsaffinitäten zum CB₁-Rezeptor von JWH-018 und JWH-073 und deren Metaboliten nach ^[130-132].

Falls eine derartige Wechselwirkung der Substanzen sich im Menschen erweisen sollte, bedeutet dies eine erhebliche Erschwerung der Einschätzung der pharmakologischen Auswirkungen des Konsums der Produkte. Vor allem die Interaktionen mehrerer Substanzen inklusive ihrer Metaboliten – in vielen Fällen wurden in Serum- und Urinproben der Probanden Metaboliten von drei oder mehr Wirksubstanzen nachgewiesen – mit beiden Rezeptoren potenziert sich zu einem nicht einschätzbaren gesundheitlichen Risiko nach akutem und/oder chronischem Konsum.

5.1.3 JWH-250

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Verbindungen besitzt JWH-250 (2-(2-Methoxyphenyl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)ethanon) einen Methoxybenzylrest anstelle des Naphthylrestes. Dennoch scheint sich der Metabolismus nicht weitgehend von den vorherigen Substanzen zu unterscheiden. Abbildung 15 zeigt die MS/MS-Spektren der Hauptmetaboliten von JWH-250. Monohydroxylierung an der N-Alkylkette (Abbildung 15c) und am Indolrest (Abbildung 15d) sind die am stärksten ausgeprägten Metabolisierungsreaktionen. Interessanterweise wurden in den meisten der untersuchten Urinproben zwei unterschiedliche Metaboliten detektiert, die eine Hydroxylierung am N-Pentylrest aufweisen (Abbildung 15a). Zusätzlich wurde ein Metabolit mit Hydroxylierung am Benzylrest detektiert (Abbildung 15e). Dass die Hydroxylierung hierbei am Benzylrest und nicht am Methoxyrest vonstattenging wird durch das Nichtvorhandensein der Fragmentionen m/z 91 sowie m/z 107 bekräftigt. Im Falle von JWH-250 sind einige der auftauchenden Fragmentionen durch Dehydratisierung erklärbar. Besonders tritt dieses Phänomen im Spektrum des N-(Hydroxypentyl)-Metaboliten hervor (Abbildung 15c). Im MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz beschreibt das Fragmention m/z 188 das Aminoalkylindolfragmention (Abbildung 15b). Die Addition einer Hydroxylgruppe (16 amu) führt zu dem Fragmention m/z 204, welches in sehr geringer Intensität detektiert wird. Eine sehr viel höhere Intensität weist das Fragmention m/z 186 ($\Delta m/z = 18$) auf, was für eine nachfolgende Dehydratisierung spricht (Abbildung 15c). Im Falle des indolhydroxylierten Metaboliten wird dieses Fragmention weniger häufig geformt, da in hier ein Ringschluss zur Bildung des Fragmentionenes nötig wäre.

Eine Vielzahl weiterer Metaboliten, darunter mono-, di und trihydroxylierte sowie N-desalkylierte (mit und ohne weitere Oxidation) Verbindungen wurden darüber hinaus in Studien einer anderen Arbeitsgruppe in Urin und Blutproben von Ratten bzw. von Konsumenten detektiert. Desalkylierte Produkte waren dabei hauptsächlich in Ratten zu finden. Eine O-Desmethylierung wurde interessanterweise weder in den eigenen Studien noch in anderen Studien beobachtet und weitere Gemeinsamkeiten bestehen in der Identifizierung eines monohydroxylierten Metaboliten als Hauptmetabolit sowie der Nicht-Detektierbarkeit der Muttersubstanz im Urin^[135, 136].

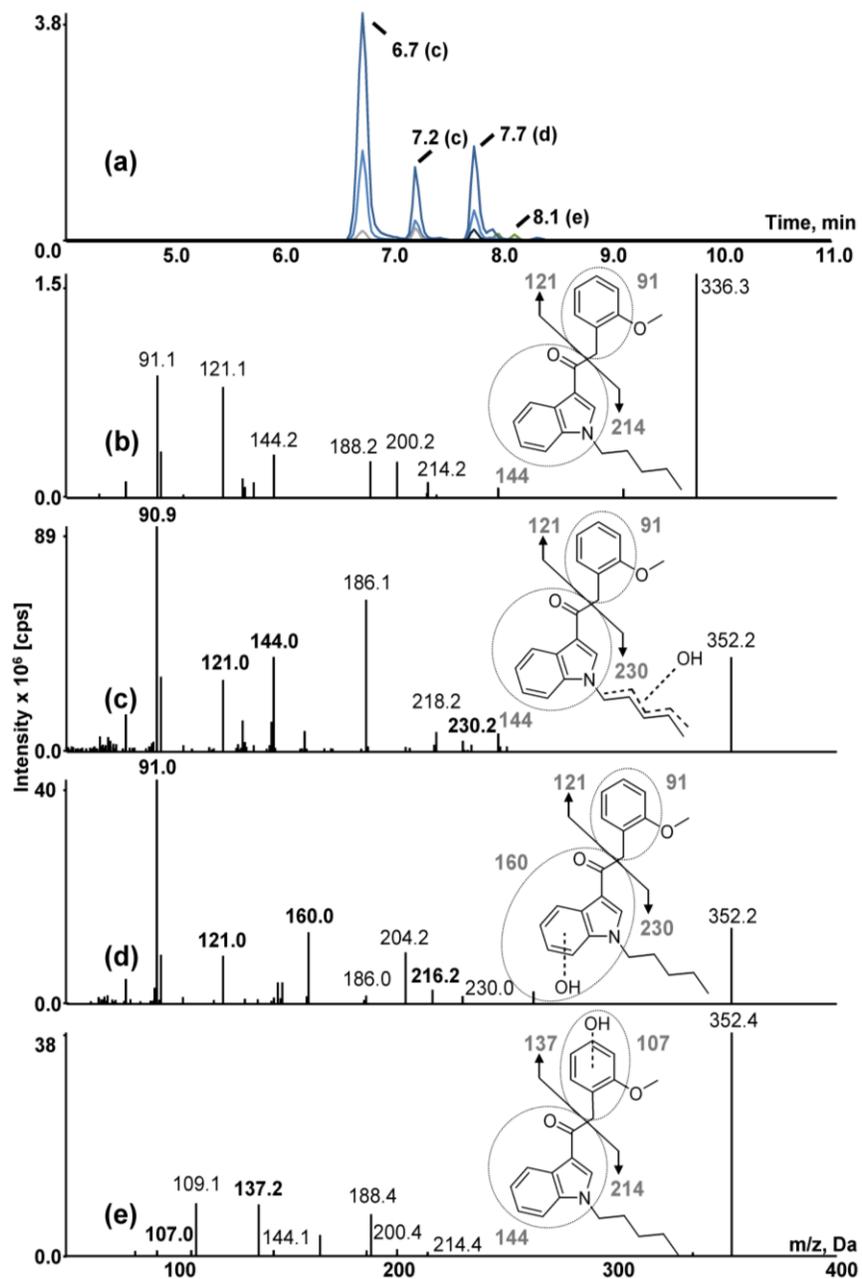


Abbildung 15: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-250 (b); Metabolit 1+2: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (c); Metabolit 3: Monohydroxyliert am Indolrest (d); Metabolit 4: Monohydroxyliert am Methoxyphenylrest (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

5.1.4 JWH-081

Die Hauptmetaboliten des Aminoalkylindols JWH-081 ((4-Methoxynaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanon) sind in Abbildung 16 dargestellt.

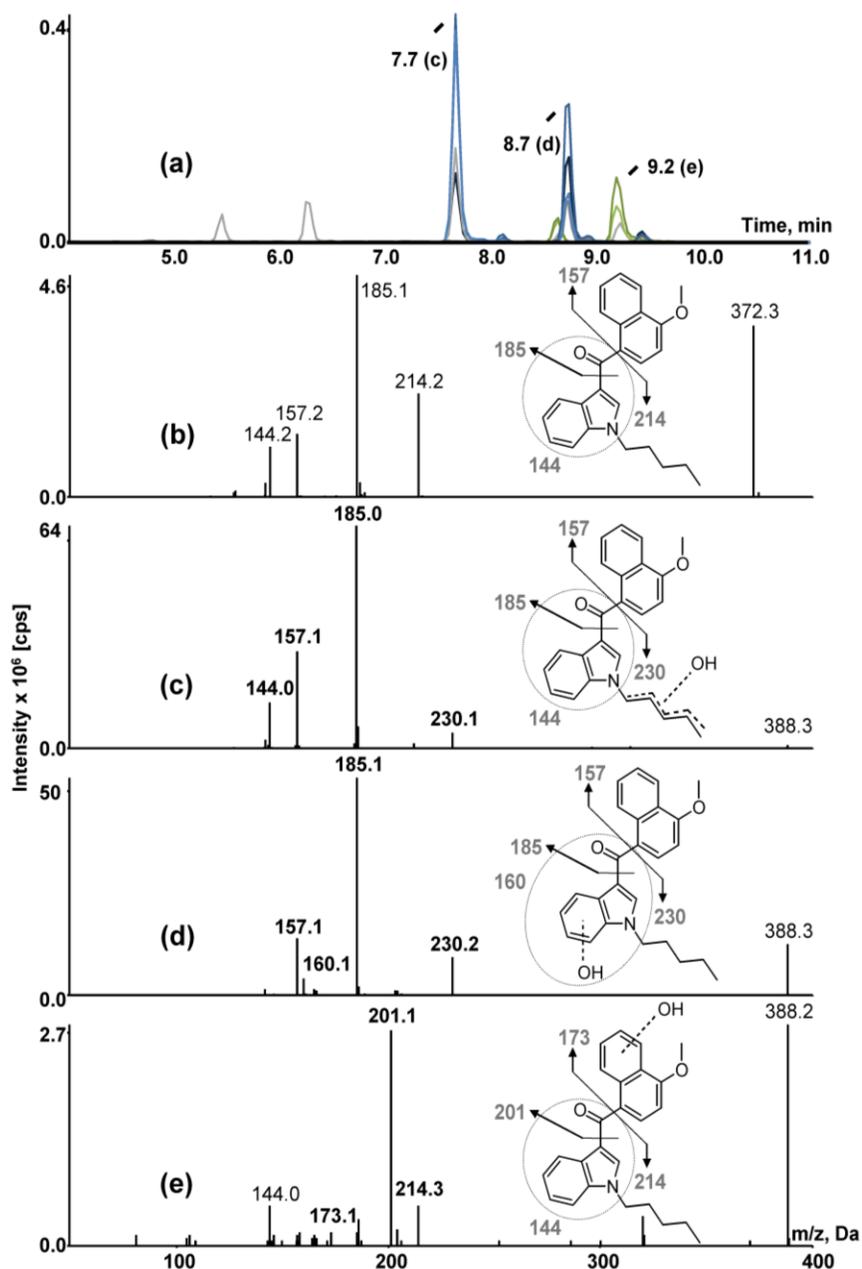


Abbildung 16: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-081 (b); Metabolit 1: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (c); Metabolit 2: Monohydroxyliert am Indolrest (d); Metabolit 3: Monohydroxyliert am Methoxynaphthylrest (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Drei monohydroxylierte Verbindungen wurden identifiziert. Ein um 16 amu erhöhtes Aminoalkylindolfragmention (m/z 214) und ein unverändertes Indolfragmention weisen auf eine Hydroxylierung an der N-Alkylseitenkette hin (Abbildung 16 c), wogegen die Kombination mit dem Fragmention m/z 160 eine Hydroxylierung am Indolrest beschreibt (Abbildung 16 d).

Interessanterweise wurde im Falle des JWH-081 ein weiterer monohydroxylierter Metabolit und nicht wie erwartet der Säuremetabolit als Hauptmetabolit detektiert. Ein unverändertes Aminoalkylindolfragmention und ein um 16 amu erhöhtes Naphthylfragmention weisen auf eine Hydroxylierung am Naphthylrest hin (Abbildung 16e). Basierend auf den MS/MS-Daten ist die Position der Hydroxylierung entweder am Naphthylrest selbst oder am Methoxyrest möglich, wobei im letzteren Falle eine schnelle Eliminierung von Formaldehyd zu erwarten wäre und daher weniger plausibel scheint. JWH-081 wurde in den Urinproben nicht nachgewiesen.

5.1.5 AM-694

5.1.5.1 In vivo

Das synthetische Cannabinoid AM-694 ([1-(5-Fluorpentyl)-1*H*-indol-3-yl](2-iodphenyl)methanon) war das erste einer Vielzahl noch folgender Verbindungen mit der strukturellen Besonderheit einer 5-Fluorpentylgruppe (Abbildung 17b). Wie aus den vorhergehenden Studien zum Metabolismus synthetischer Cannabinoide erwartet, wurden zwei monohydroxylierte Metaboliten in Humanurin identifiziert, wobei die Hydroxylgruppe in beiden Fällen an der 5-Fluorpentylgruppe lokalisiert ist (Abbildung 17c). Zwar wurde das hydroxylierte Aminoalkylindolfragmention selbst nicht detektiert, aufgrund der Precursormasse m/z 452 (16 amu höher als die Muttersubstanz) und der unveränderten Iodbenzoyl- bzw. Iodphenylfragmentionen (m/z 231 und m/z 203) lässt sich auf die postulierten Metaboliten schließen.

Interessanterweise wurde ein weiterer Metabolit detektiert, bei dem das Fluoratom durch eine Hydroxylgruppe substituiert vorlag (Abbildung 17d). Die Bildung dieses zunächst unerwarteten Metaboliten wird durch den vierten identifizierten Metaboliten bekräftigt, den Pentansäure-Metaboliten, welcher durch erneute Oxidation des N-(5-Hydroxypentyl)-Metaboliten gebildet wird (Abbildung 17e). Interessanterweise ist im MS/MS-Spektrum der N-(5-Hydroxypentyl)-Metaboliten das hydroxylierte Aminoalkylindolfragmention (m/z 204) kaum, das dehydratisierte Fragmention (m/z 186) dagegen mit relativ hoher Intensität zu erkennen (Abbildung 17d). Eine Substitution des Iodatoms wurde nicht beobachtet. Zwei dihydroxylierte Metaboliten mit eher geringen Intensitäten wurden zusätzlich zu den bereits beschriebenen Metaboliten von *Grigoryev et al.* mittels GC-MS/MS *in vivo* detektiert ^[137]. AM-694 selbst wurde nicht in den Urinproben detektiert.

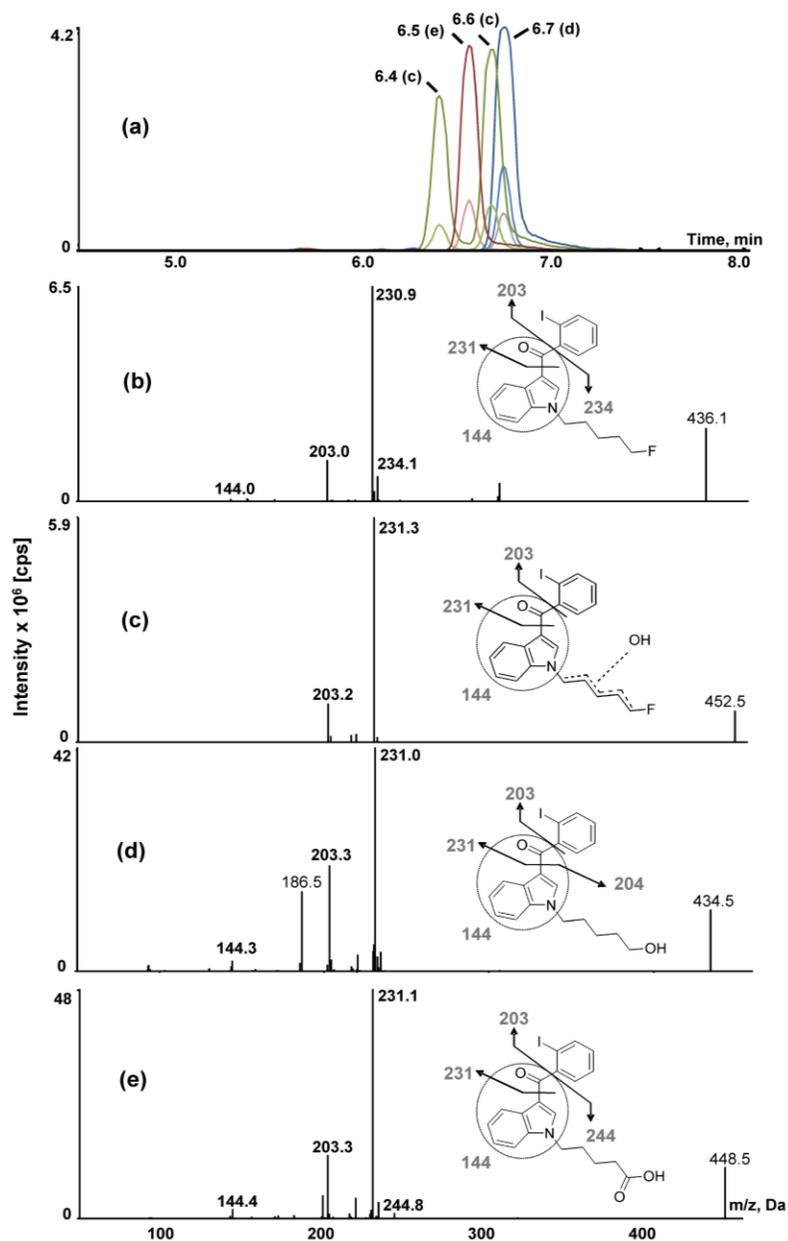


Abbildung 17: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz AM-694 (b); Metabolit 1+2: Monohydroxyliert an der N-Fluorpentylkette (c); Metabolit 3: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (Fluor substituiert durch eine Hydroxylgruppe) (d); Metabolit 4: An der N-Pentylkette zur Säure oxidiert (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

5.1.5.2 In vitro

Zur Aufklärung des Metabolismus von AM-694 *in vitro* wurden Inkubationen von humanen Leberzellmikrosomen durchgeführt (siehe auch 5.2.1.1). Auffällig hierbei war das relativ kleine Metabolitenspektrum im Vergleich zu anderen *in vitro* untersuchten synthetischen

Cannabinoiden. Der Grund hierfür ist vermutlich in der Fluorierung der N-Pentylkette zu finden: Fluorierung von Substanzen kann zu einem verlangsamten Metabolismus führen, was sich vor allem im Drugdesign zu Nutze gemacht wird^[138]. Sechs unterschiedliche Metaboliten wurden nach der *in vitro* Umsetzung detektiert, darunter drei N-Hydroxyfluorpentyl-Metaboliten, ein N-desalkylierter Metabolit und zusätzlich, wie bereits im Humanurin detektiert wurde, der N-(5-Hydroxypentyl)- sowie der Pentansäure-Metabolit (Abbildung 18).

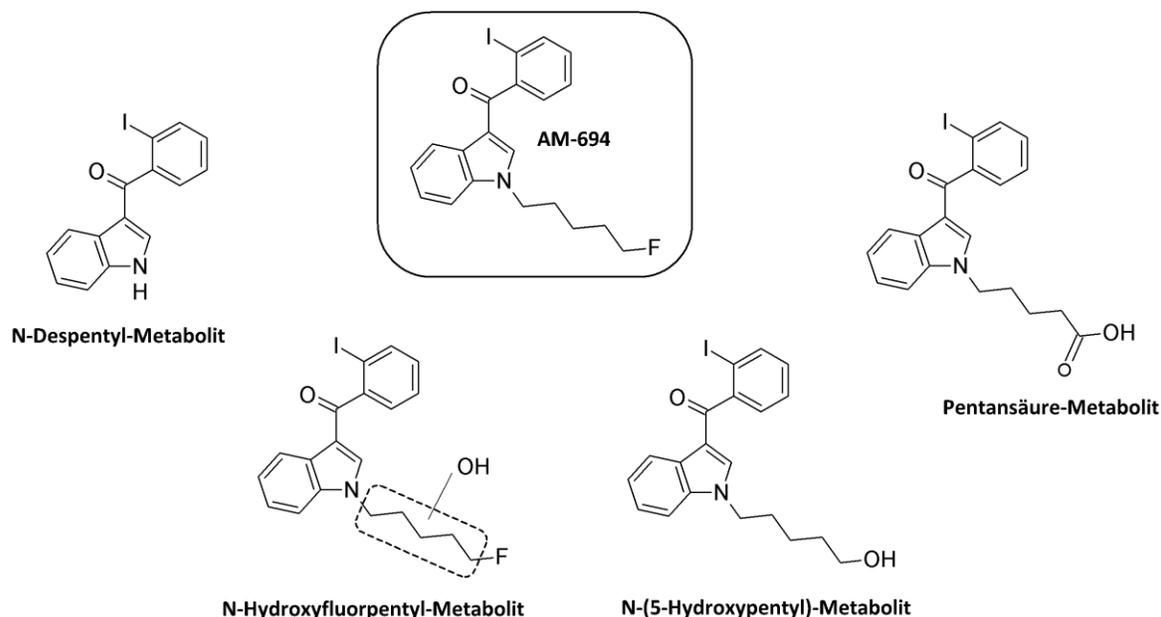


Abbildung 18: Struktur von AM-694 und der *in vitro* identifizierten Metaboliten des AM-694.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Substitution des Fluoratoms durch eine Hydroxylgruppe CYP-vermittelt stattfindet. Dihydroxylierte Metaboliten, wie von *Grigoryev et al.* *in vivo* detektiert, wurden auch in den *in vitro* Versuchen nicht nachgewiesen. Welcher Mechanismus zur Substitution des Fluoratoms führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Zwar wurden CYP-katalysierte Mechanismen zur Substitution von Fluoratom an aromatischen Systemen beschrieben^[139, 140], für aliphatische Systeme sind bisher nur bakterielle Enzyme zum Beispiel Fluoracetat Dehalogenasen, welche die starke kovalente Bindung zwischen Kohlenstoff und Fluor zu spalten vermögen, beschrieben worden. Dabei wird durch nucleophilen Angriff des Aspartats Fluorid freigesetzt (S_N2 -Reaktion) und anschließend die kovalente Enzym-Substrat Bindung durch Hydrolyse gebrochen (Abbildung 19)^[141].

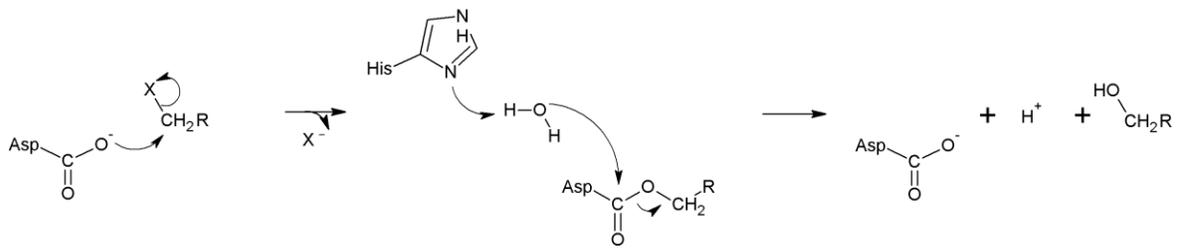


Abbildung 19: Reaktionsmechanismus der Fluoracetat Dehalogenase ($X = F$; $R = COO^-$) bzw. der Haloalkan Dehalogenase ($X = Br, Cl, I$)^[142].

Bakterielle Haloalkan Dehalogenasen, welche über einen ähnlichen Mechanismus, zur Substitution von Halogenen durch eine Hydroxygruppe führen, wurden bisher nur für Halogene wie Chlor, Iod und Brom, nicht aber für Fluor beschrieben^[143-145]. Für das Anästhetikum Sevofluran (1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-(fluormethoxy)propan) wurde eine katalytische Defluorierung durch die CYP 2E1 Isoform beschrieben, der Mechanismus ist auch weitestgehend unaufgeklärt^[146].

5.1.6 JWH-122

5.1.6.1 In vivo

Das Screening der Urinproben auf die Hauptmetaboliten des synthetischen Cannabinoids JWH-122 ((4-Methylnaphthalen-1-yl)(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanon) ergab ebenfalls drei monohydroxylierte, aber keine zur Säure oxidierte Verbindung. Wie in Abbildung 20 zu erkennen wurden die Hydroxylierungen an der N-Alkylkette (m/z 230) in Kombination mit dem unveränderten Indolfragmention m/z 144) (Abbildung 20c), am Naphthylrest (m/z 157) (Abbildung 20d) und am Indolrest (m/z 160) (Abbildung 20e) beobachtet. Interessanterweise war in manchen Urinproben der naphthylhydroxylierte Metabolit das intensivste Signal, wogegen bei den bisher diskutierten synthetischen Cannabinoiden üblicherweise der N-alkylhydroxylierte Metabolit dominierte.

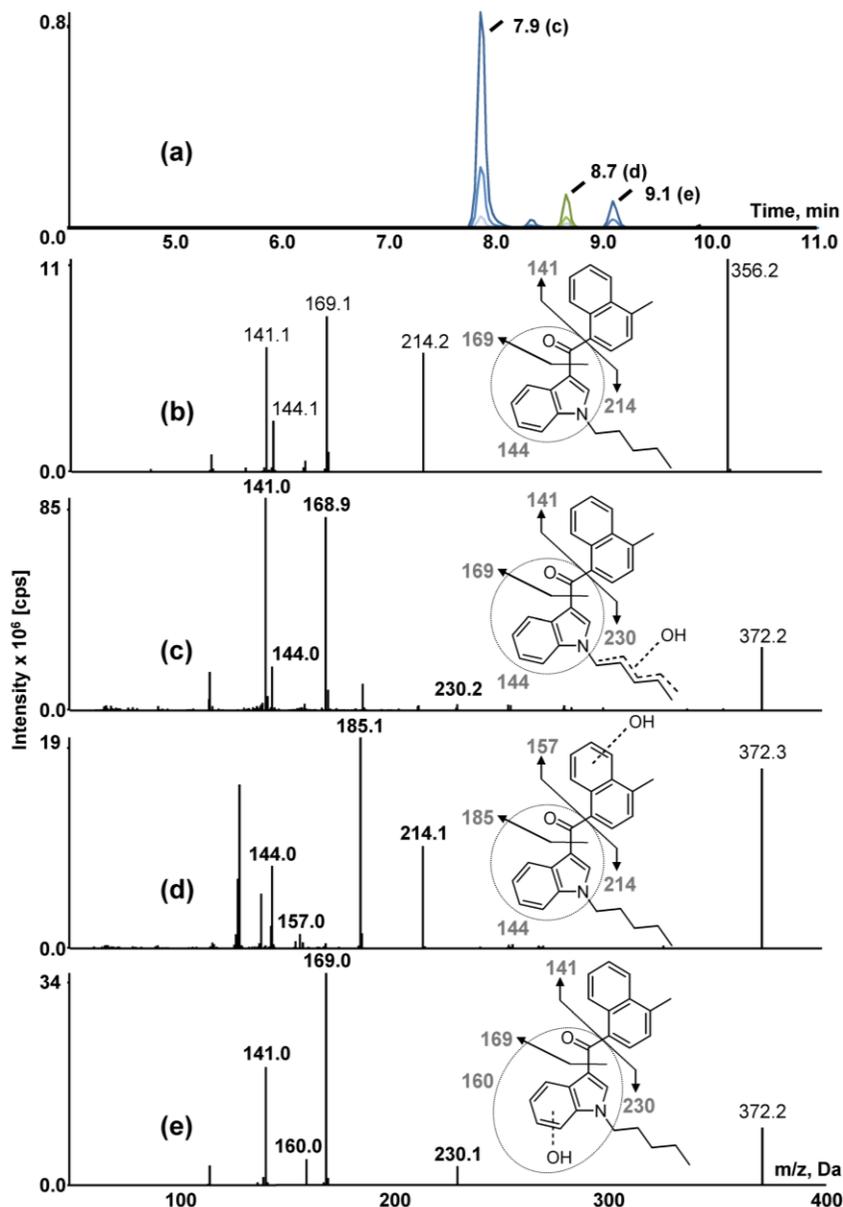


Abbildung 20: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-122 (b); Metabolit 1: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (c); Metabolit 2: Monohydroxyliert am Naphthylrest (d); Metabolit 3: Monohydroxyliert am Indolring (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

5.1.6.2 In vitro

Zur Untersuchung des Metabolismus von JWH-122 wurden zusätzlich Inkubationen mit humanen Leberzellmikrosomen durchgeführt (siehe auch 5.2.1.3). Hierbei entstand wie erwartet eine Vielzahl an Metaboliten. Neben den drei im Urin identifizierten Hauptmetaboliten, wurden weitere monohydroxylierte sowie di- und trihydroxylierte, weiter oxidierte Verbindungen

(Aldehyde, auch hydratisiert, Ketone und Säuren) sowie N-desalkylierte Metaboliten bzw. Kombinationen daraus identifiziert (siehe Abbildung 21). Unter den gewählten Bedingungen wurden bevorzugt ein N-(Hydroxypentyl)-4-carboxynaphthyl-Metabolit (Kombination aus M3 und M2, Abbildung 21), ein Hydroxynaphthyl-Metabolit (M1, Abbildung 21) und ein N-(Hydroxypentyl)-hydroxynaphthyl-Metabolit (Kombination aus M3 und M1, Abbildung 21) gebildet. Vor allem lässt sich aus den *in vitro* Daten ableiten, dass das methylierte Naphthylsystem, sowie die aliphatische Seitenkette bevorzugte Reaktionszentren für die Oxidation darstellen. Hauptmetaboliten der *in vivo* und *in vitro* Daten sind bis auf den naphthylhydroxylierten Metabolit nicht identisch, dennoch wurden die zwei weiteren *in vivo* identifizierten Metaboliten mit geringeren Intensitäten auch unter den *in vitro* Bedingungen nachgewiesen. Daraus ergibt sich, dass *in vitro* Daten nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können.

De Brabanter et al. detektierten in *in vitro* Versuchen nach der Inkubation humaner Leberzellmikrosomen ebenfalls eine Vielzahl unterschiedlicher Metaboliten, die sich weitestgehend mit den hier vorgestellten Ergebnissen decken^[147]. Zusätzlich wurden dehydrierte Verbindungen und der Pentansäure-Metabolit sowie Dihydrodiol nachgewiesen. Letztere werden wahrscheinlich, wie von Zangh *et al.* postuliert, über ein Epoxidintermediat und anschließende Hydrolyse gebildet^[108].

Die Unterschiede zu den eigenen Inkubationsversuchen lassen sich möglicherweise durch den geänderten Versuchsaufbau erklären. So unterschieden sich zum einen Inkubationszeit, Konzentrationen und Lösemittel zum anderen wurde beim Ansatz dieser Arbeit in der Anwesenheit von Superoxiddismutase gearbeitet. Desweiteren untersuchten *De Brabanter et al.* Urine von Mäusen nach Applikation von JWH-122. Wie auch in den eigenen Urinscreenings wurde die Muttersubstanz selbst nicht detektiert, jedoch eine Vielzahl der *in vitro* identifizierten Metaboliten, wobei die Anzahl der jeweiligen Varianten geringer war. Vor allem dehydrierte Metaboliten und Dihydrodiol waren kaum detektierbar. Während mono- und dihydroxylierte Metaboliten fast vollständig als Glucuronide oder Sulfate ausgeschieden wurden, waren 50% der restlichen Metaboliten auch ohne vorherige Hydrolyse im Urin der Mäuse detektierbar. Die Ergebnisse decken sich mit den eigenen Urinscreenings, da in erster Linie monohydroxylierte Verbindungen als Hauptmetaboliten detektiert wurden^[147].

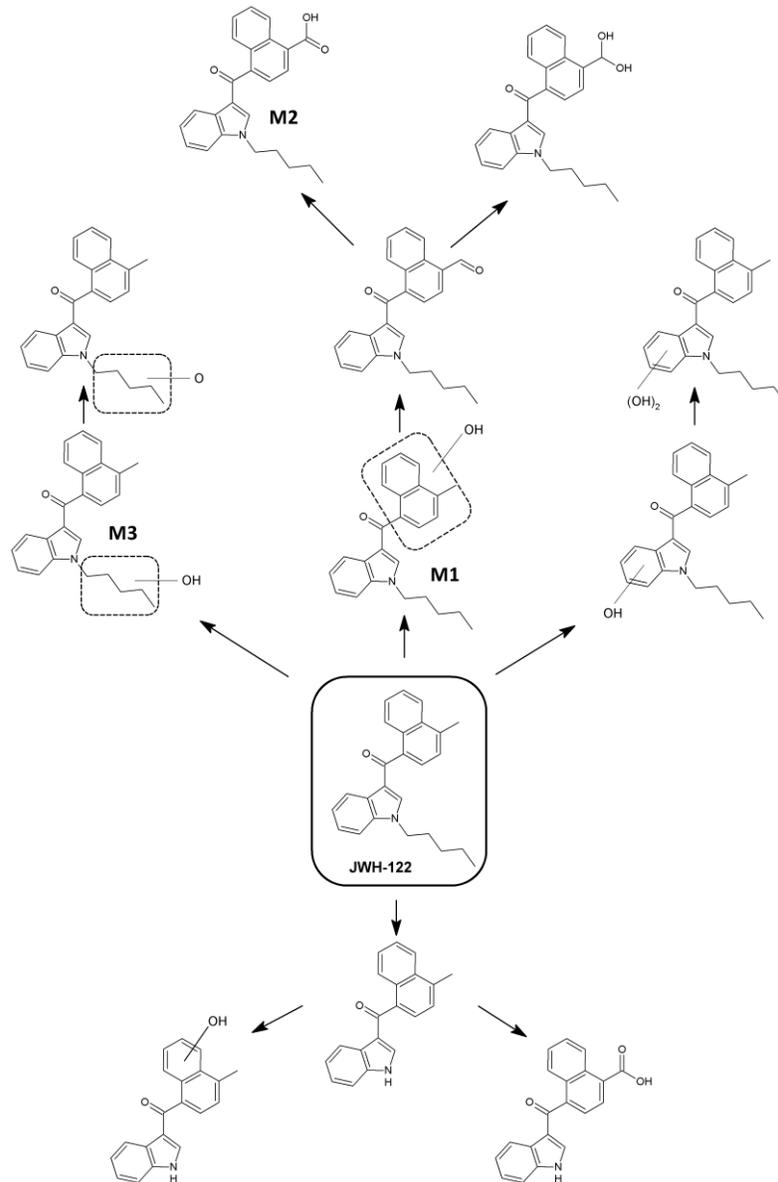


Abbildung 21: Hauptmetabolisierungswege von JWH-122 *in vitro*. Die abgebildeten Metabolite sowie Kombinationen aus den Einzelschritten wurden als Metabolite nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen identifiziert. M1: Hydroxynaphthyl-Metabolit; M2: 4-Carboxynaphthyl-Metabolit; M3: Hydroxypentyl-Metabolit

5.1.7 JWH-210

Das Aminoalkylindol JWH-210 ((4-Ethyl-naphthalen-1-yl)(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanon) unterscheidet sich strukturell von JWH-122 nur in der Länge des Alkylrestes am Naphthylrest – es besitzt hier eine Ethylgruppe anstatt einer Methylgruppe.

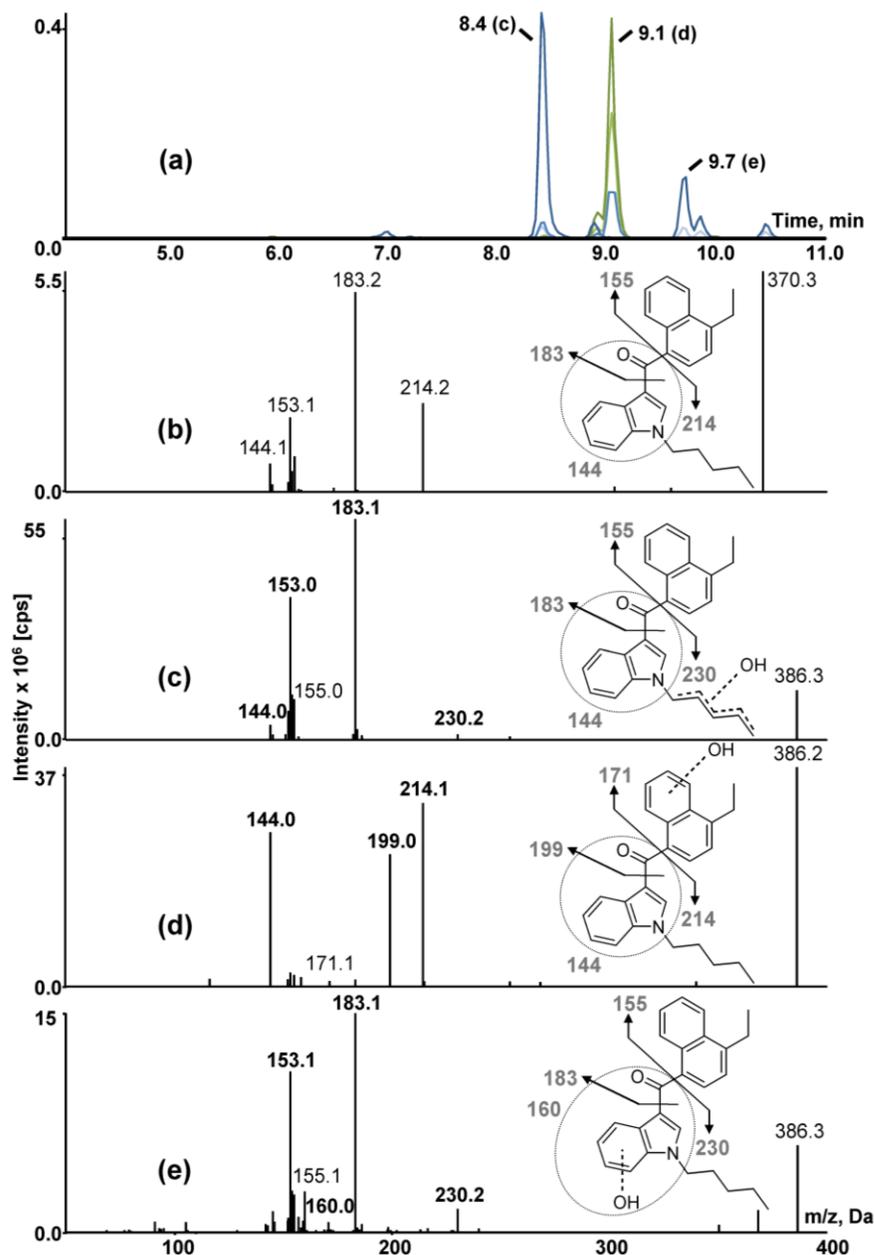


Abbildung 22: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-210 (b); Metabolit 1: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (c); Metabolit 2: Monohydroxyliert am Naphthylrest (d); Metabolit 3: Monohydroxyliert am Indolring (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Die MS/MS Spektren der beiden Substanzen unterscheiden sich allerdings in ihren charakteristischen Fragmentationen (Abbildung 22b). Im Falle von JWH-210 ist das dehydrierte Naphthylfragmention (m/z 153) intensiver ausgeprägt als das unveränderte Naphthylfragmention (m/z 155) selbst. Die Hauptmetaboliten der beiden synthetischen Cannabinoide werden hingegen analog gebildet. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, führt eine Erhöhung um 16 amu zum Aminoalkylindolfragmention (m/z 214) in Kombination mit einem unveränderten Indolfragmention (m/z 144) zu einem Metaboliten hydroxyliert an der N-Alkylkette (Abbildung 22 c), wogegen die Hydroxylierung im Falle der Kombination mit dem Fragmention m/z 160 am Indolrest lokalisiert ist (Abbildung 22e). In beiden Fällen ist das dehydrierte Fragmention (m/z 153) zu erkennen. Im Falle des dritten Metaboliten ist weder das Fragmention m/z 183 noch das Fragmention m/z 153 bzw. m/z 155 zu erkennen, es kann daher vor allem durch die Anwesenheit des Fragmention m/z 199 (m/z 183 + 16 amu) auf eine Hydroxylierung am Naphthylrest bzw. am Ethylrest geschlossen werden (Abbildung 22 d). Das Fragmention m/z 171 (m/z 155 + 16 amu) ist mit sehr geringer Intensität vorhanden und das entsprechende dehydrierte Fragmention m/z 169 wurde gar nicht detektiert, was eine Hydroxylierung am Ethylrest vermuten lässt, wodurch eine Bildung des dehydrierten Fragmention beeinträchtigt wäre. Interessant zu beobachten ist, dass der Hydroxynaphthyl-Metabolit, wie auch bei JWH-122, in vielen der untersuchten Urinproben eine höhere Intensität aufweist als der N-(Hydroxypentyl)-Metabolit. Ob die Hydroxylierung dabei am Naphthylsystem oder am Ethylrest stattfindet, war mit der verwendeten Methodik nicht aufzuklären. Eine Alkylierung des Naphthylsystems scheint die Oxidation an diesem Teil des Moleküls zu begünstigen. Im Vergleich dazu wurden beispielsweise für JWH-018 und JWH-073 keine naphthylhydroxylierten Metaboliten in relevantem Ausmaß detektiert.

5.1.8 JWH-019

Das Fragmentierungsmuster von JWH-019 ((1-Hexyl-1*H*-indol-3-yl)naphthalen-1-yl)methanon) zu Grunde gelegt wurden zwei monohydroxylierte (m/z 372) und ein carboxylierter Metabolit (m/z 386) als Hauptmetaboliten identifiziert (Abbildung 23).

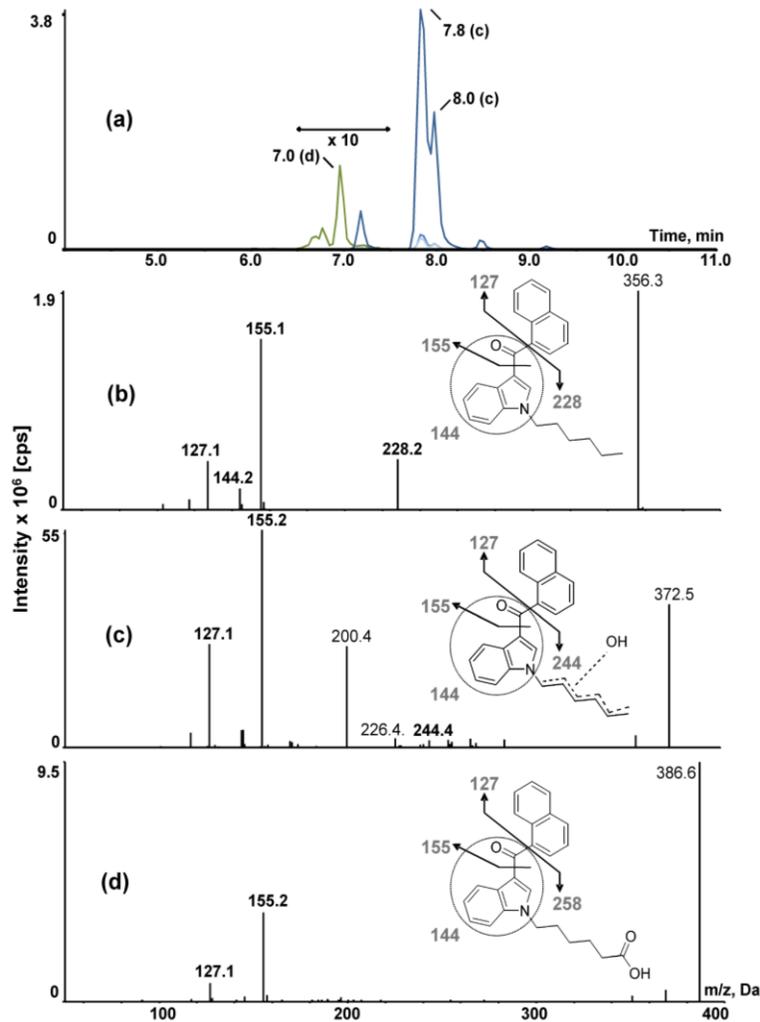


Abbildung 23: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-019 (b); Metabolit 1+2: Monohydroxyliert am der N-Hexylkette (c); Metabolit 3: An der N-Hexylkette zur Säure oxidiert. Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Die Position der Hydroxylierung ist für beide monohydroxylierten Metaboliten aufgrund des um 16 amu erhöhten Aminoalkylindolfragmentions (m/z 244) an der N-Hexylkette festzumachen (Abbildung 23c). Eine Abspaltung von CO und Dehydratisierung des Fragmentions führt dann zu dem relativ stark ausgeprägten Fragmention m/z 200. Unter den hier gewählten

chromatographischen Bedingungen war eine Basislinientrennung der beiden N-(Hydroxyhexyl)-Metaboliten (Abbildung 23a) nicht vollständig möglich. Mit viel geringerer Intensität wurde der Säuremetabolit detektiert (Abbildung 23d). Im MS/MS-Spektrum dieser Verbindung ist wahrscheinlich aufgrund der geringen Intensität die Fragmentation mit der Carboxygruppe nicht mehr zu detektieren. Aufgrund der unveränderten Naphthylfragmentationen (m/z 155 und m/z 127) ist in Verbindung mit der Precursormasse m/z 386 auf einen zur Säure oxidierten Metaboliten zu schließen.

Die identifizierten Metaboliten stehen in Analogie mit den für JWH-018 detektierten Metaboliten, was sicherlich auf die strukturelle Ähnlichkeit dieser Verbindungen zurückzuführen ist. Auffällig ist, dass bei JWH-019 der indolhydroxylierte Metabolit nicht und der Säuremetabolit nur mit geringer Intensität nachgewiesen wurden. In den untersuchten Urinproben wurden zusätzlich Metaboliten von JWH-018 detektiert, obwohl in den korrespondierenden Serumproben kein JWH-018 nachgewiesen wurde. Dies legt nahe, dass es in Analogie zu JWH-018, durch Decarboxylierungsreaktionen zur Bildung der um eine Methylgruppe verkürzten Analoga kommt.

5.1.9 RCS-4

5.1.9.1 In vivo

Eine Hydroxylierung an der N-Alkylkette wäre auch für RCS-4 (4-Methoxyphenyl)(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)methanon, Abbildung 24b) aufgrund dessen struktureller Ähnlichkeit zu den bisher diskutierten Aminoalkylindolen zu erwarten.

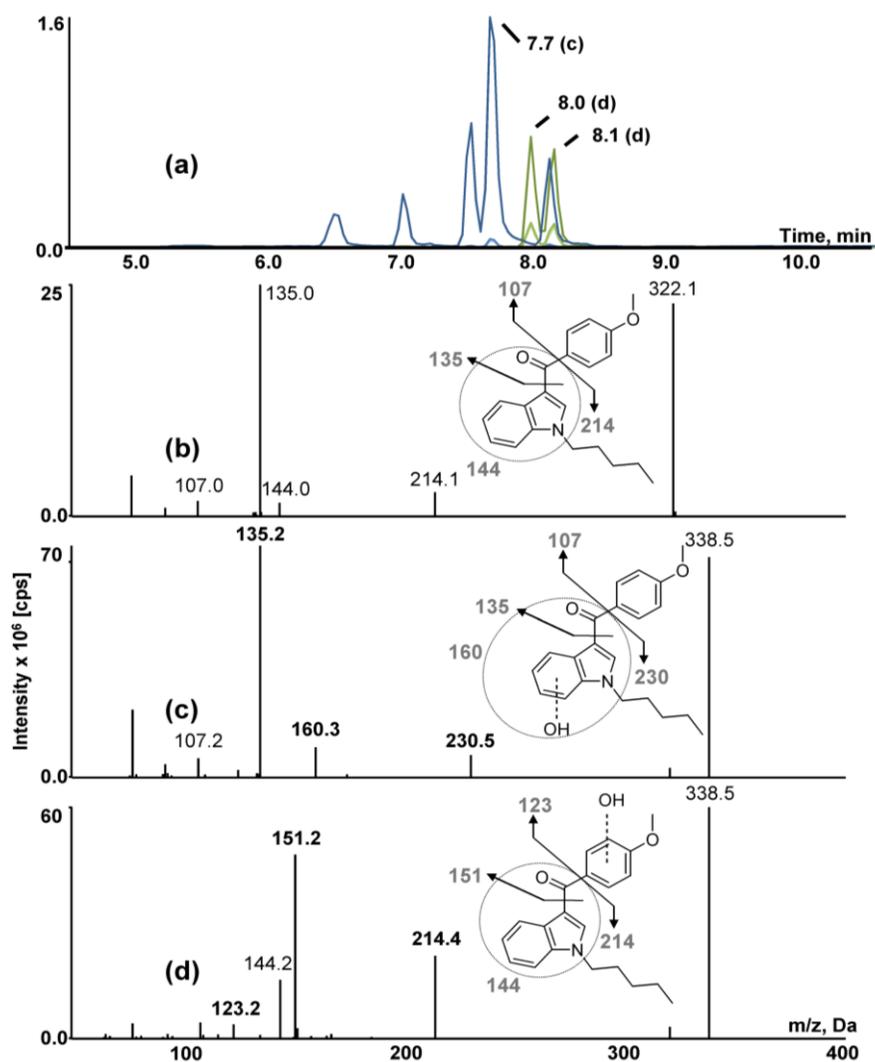


Abbildung 24: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz RCS-4 (b); Metabolit 1: Monohydroxyliert am Indolring (c); Metabolit 2+3: Monohydroxyliert am Methoxyphenylrest (d). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Allerdings wurde dieser Metabolit in den untersuchten Urinproben nicht als Hauptmetabolit detektiert. Zu den Hauptmetaboliten zählen hier: der indolhydroxylierte Metabolit (m/z 160 und m/z 230, Abbildung 24c) sowie die beiden Metaboliten mit Monohydroxylierung am Phenylring (m/z 151 und m/z 123, Abbildung 24d). Eine Hydroxylierung am Pentylrest wurde auch von *Kavangh et al.* in einer Studie zur Identifizierung der Metaboliten von RCS-4 in Humanurinen mittels GC-MS/MS nicht nachgewiesen. Zu den Hauptmetabolisierungsreaktionen, welche in dieser Studie detektiert wurden, zählten O-Desmethylierung kombiniert mit Monohydroxylierung der N-Pentylkette und weitere Oxidation der N-Pentylkette zum Keton. Monohydroxylierungen an den aromatischen Systemen alleine, wie in der vorliegenden Arbeit identifiziert, wurden auch von *Kavangh et al.* mit einer geringeren Intensität detektiert^[148]. Die hier festgestellten Unterschiede des Metabolitenmusters lassen sich eventuell auf eine Zeitabhängigkeit der Bildung der unterschiedlich Metaboliten nach Konsumzeitpunkt zurückführen. Auch eine unterschiedliche genetische Ausstattung der Patienten könnte maßgeblich zur Bildung unterschiedlicher Hauptmetaboliten beitragen. Ebenfalls können Art der Extraktion und Detektion Einfluss auf das Spektrum der detektierten Metaboliten nehmen^[102].

5.1.9.2 In vitro

Inkubation von RCS-4 mit humanen Lebermikrosomen ergaben wie erwartet eine Vielzahl unterschiedlicher Metaboliten. Neben dem O-desmethylierten Metabolit wurde auch ein N-(Hydroxypentyl)-Metabolit als Hauptmetabolit *in vitro* detektiert. Darüber hinaus wurden weitere mono- sowie dihydroxylierte, N-desalkylierte, dehydrierte und zum Keton oder zur Säure oxidierte Verbindungen sowie Kombinationen aus den einzelnen Funktionalisierungsreaktionen identifiziert (Abbildung 25).

Auffällig ist, dass der N-(Hydroxypentyl)-Metabolit, welcher in den *in vitro* Versuchen als Hauptmetabolit detektiert wurde, in den *in vivo* Studien nicht nachzuweisen war. Auch die Hydroxylierungspositionen der dihydroxylierten Metabolite unterscheiden sich zwischen den *in vitro*-Daten und den von *Kavangh et al.* charakterisierten Metaboliten^[148]. Gründe dafür sind vor allem in der Komplexität des menschlichen Organismus, aber auch wie oben erwähnt in einer möglichen Abhängigkeit des Metabolitenprofils von der Zeit sowie in der individuellen genetischen Ausstattung der Patienten zu suchen.

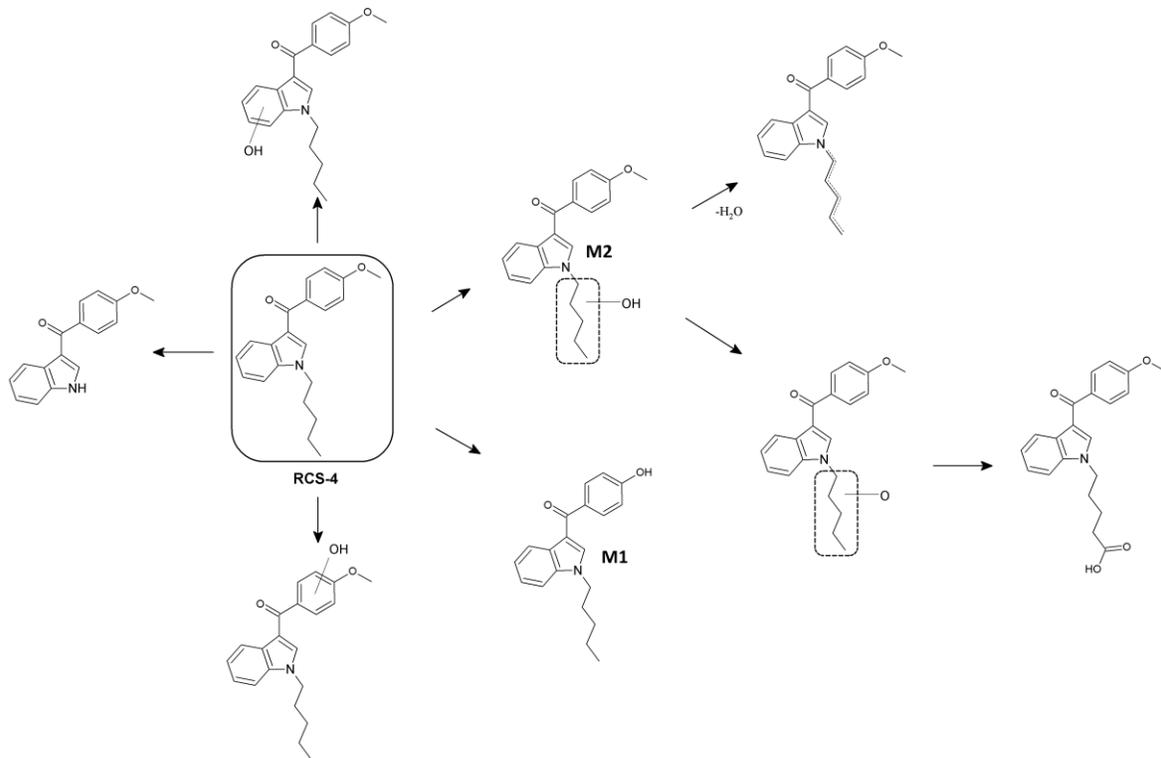


Abbildung 25: Hauptmetabolisierungswege von RCS-4 *in vitro*. Die abgebildeten Metabolite sowie Kombinationen aus den Einzelschritten wurden als Metabolite nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen identifiziert. M1: O-Desmethyl-Metabolit; M2: N-(Hydroxypentyl)-Metabolit.

5.1.10 JWH-007

JWH-007 ((2-methyl-1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)(naphthalen-1-yl)methanon) unterscheidet sich von JWH-018 lediglich darin, dass es eine zusätzliche Methylgruppe in Position 2 des Indolrings trägt.

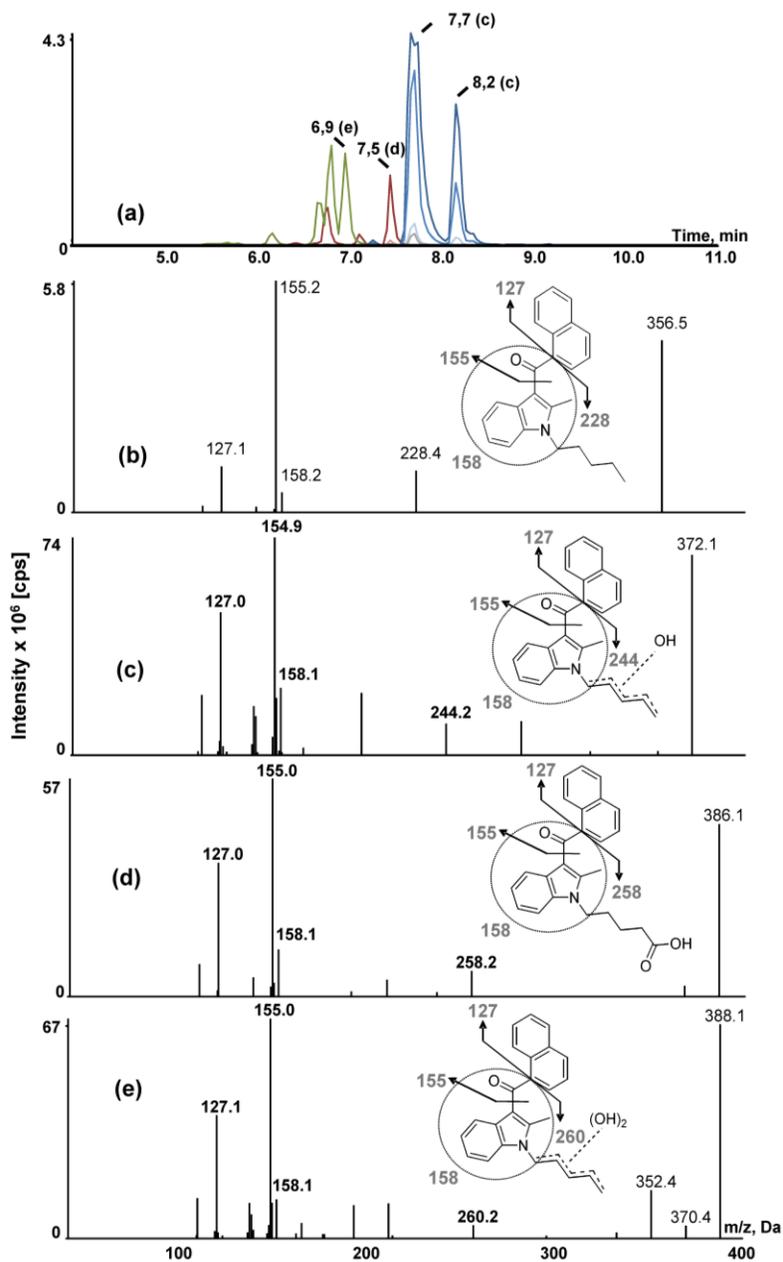


Abbildung 26: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-007 (b); Metabolit 1+2: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (c); Metabolit 3: An der N-Pentylkette zur Säure oxidiert (d); Metabolit 4: Dihydroxyliert an der N-Pentylkette (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Daher ähneln sich auch die Hauptmetaboliten weitestgehend. Es wurden zwei N-(Hydroxypentyl)-Metaboliten sowie ein Säuremetabolit detektiert (Abbildung 26). Dies wurde aus den um 16 amu bzw. 30 amu erhöhten Precursormassen (m/z 372 und m/z 386) in Kombination mit den jeweils um dieselbe Masse erhöhten Aminoalkylfragmentationen (m/z 244 und m/z 258) bei unveränderten Massen der restlichen Fragmentationen geschlossen.

Hierbei ist zu beachten, dass die Hauptfragmentationen des monohydroxylierten Metaboliten analog zu denen des Säuremetaboliten von JWH-018 und zu den monohydroxylierten Metaboliten von JWH-019 sind. Die chromatographischen Bedingungen sollten daher so gewählt werden, dass eine Differenzierung der Substanzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten möglich ist (hier: $RT = 7,1$ min JWH-018 Pentansäure-Metabolit und 7,8 min und 8,0 min N-(Hydroxyhexyl)-Metaboliten des JWH-019 und 7,7 min bzw. 8,2 min N-(Hydroxypentyl)-Metaboliten des JWH-007). Weiterhin wurde ein dihydroxylierter Metabolit identifiziert, wobei beide Hydroxylgruppen an der N-Pentylseitenkette lokalisiert sind (m/z 260), worin auch der Hauptunterschied zu JWH-018 zu finden ist; dort wurde ein indolhydroxylierter Metabolit identifiziert. Ein weiterer Peak bei $RT = 6,8$ min mit dem Übergang $388 \rightarrow 155$ wurde nicht als Metabolit von JWH-007 bestätigt.

5.1.11 JWH-203

Drei monohydroxylierte Metaboliten und ein zur Säure oxidierter Metabolit wurden als Hauptmetaboliten des synthetischen Cannabinoids JWH-203 (2-(2-chlorphenyl)-1-(1-pentyl-1*H*-indol-3-yl)ethanon) identifiziert (Abbildung 27). Bei zwei der monohydroxylierten Metaboliten ist die Hydroxylgruppe an der Seitenkette (RT = 7,2 min und 7,7 min) lokalisiert, was aus dem um 16 amu erhöhten Aminoalkylindolfragmention m/z 204 (bzw. m/z 186 nach Wasserabspaltung) in Kombination mit dem unveränderten Indolfragmention m/z 144 zu schließen ist (Abbildung 27c). Der dritte monohydroxylierte Metabolit (RT = 8,3 min) ist dagegen am Indolrest hydroxyliert (m/z 160, Abbildung 27d) und bei dem vierten identifizierten Metaboliten handelt es sich wiederum um die Carbonsäure, die durch Oxidation des N-(5-Hydroxypentyl)-Metaboliten gebildet wird (Abbildung 27e). Auch hier wurde wieder das Fragmention m/z 200, welches durch Dehydratisierung und CO-Abspaltung des Aminoalkylindolfragmentions (m/z 244) entsteht, mit erhöhter Intensität detektiert. In den untersuchten Urinproben wurde kein unverändertes JWH-203 detektiert.

Vier N-(Hydroxypentyl)-Metaboliten, ein indolhydroxylierter, zwei benzylhydroxylierte, zwei dihydroxylierte, sechs trihydroxylierte, ein zur Säure oxidierter Metabolit, ein hydroxyliertes Keton sowie ein monohydroxylierter und N-desalkylierter Metabolit wurden *in vivo* von *Kavanagh et al.* mittels GC-MS/MS detektiert. Zu den Hauptmetaboliten zählten dabei wie in den eigenen Untersuchungen zwei N-(Hydroxypentyl)-Metaboliten, aber auch ein dihydroxylierter und ein Monohydroxy-N-despentyl-Metabolit^[149]. Bei den hier zusätzlich detektierten Metaboliten dürfte es sich um Nebenmetaboliten handeln, denen mit hoher Wahrscheinlichkeit weder eine pharmakologische noch eine analytische Bedeutung zukommt.

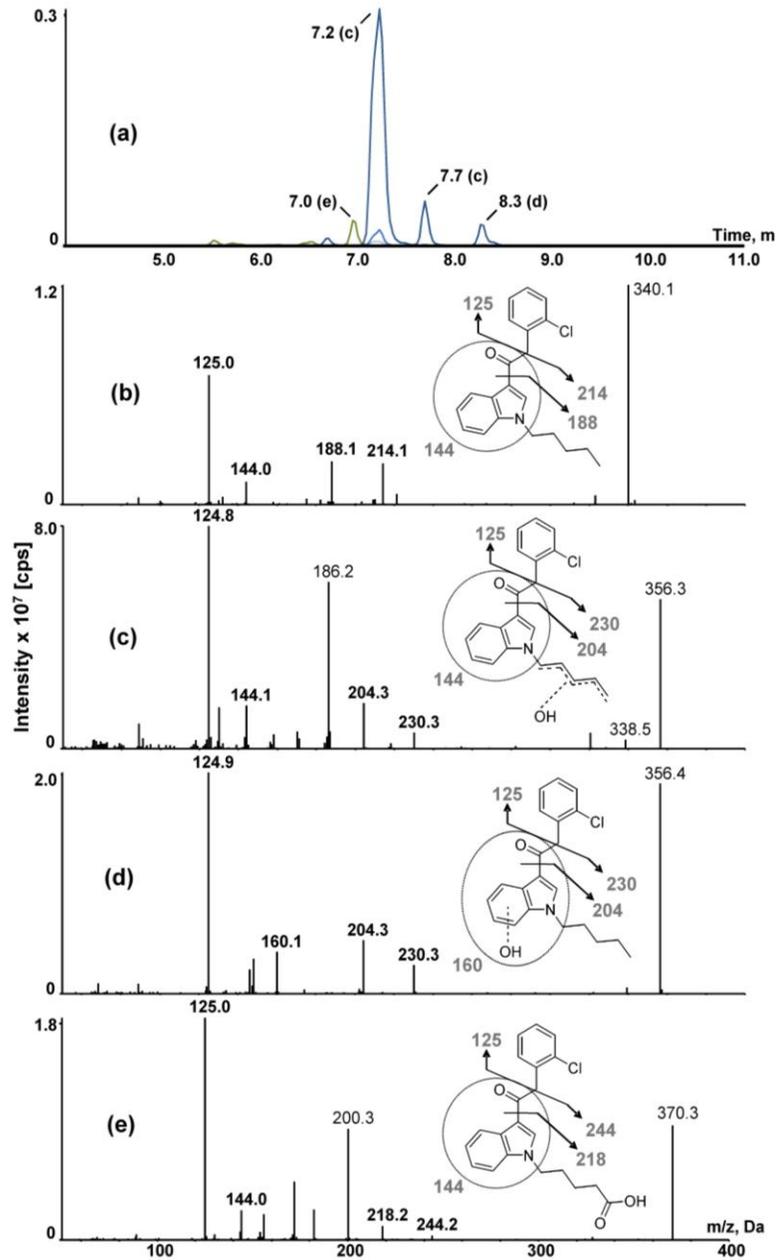


Abbildung 27: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-203 (b); Metabolit 1+2: Monohydroxyliert an der N-Pentylkette (c); Metabolit 3: Monohydroxyliert am Indolring (d); Metabolit 4: An der N-Pentylkette zur Säure oxidiert (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

5.1.12 AM-2201

AM-2201 ([1-(5-Fluoropentyl)-1*H*-indol-3-yl](naphthalen-1-yl)methanon) war zwar nicht das erste synthetische Cannabinoid mit einer 5-Fluoropentylgruppe auf dem europäischen Markt, allerdings das erste fluorierte Analogon einer weit verbreiteten Substanz (hier: JWH-018). Zwei monohydroxylierte Metaboliten des AM-2201 wurden in den untersuchten Urinproben identifiziert (Abbildung 28).

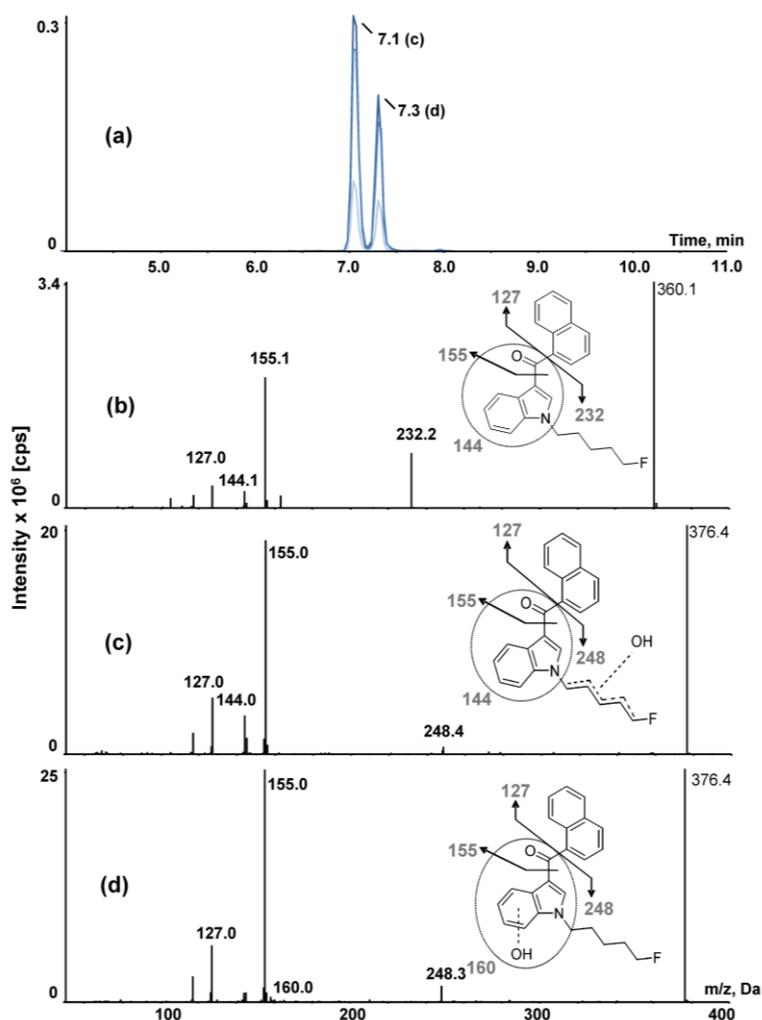


Abbildung 28: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz AM-2201 (b); Metabolit 1: Monohydroxyliert an der N-Fluoropentylkette (c); Metabolit 2: Monohydroxyliert am Indolring (d). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Beide Metaboliten weisen eine Hydroxylierung am Aminoalkylindolfragmention (m/z 248) auf. Während der erste Metabolit (RT= 7,01 min) ein unverändertes Indolfragmention (m/z 144)

besitzt und die Hydroxylierung damit an der N-Fluorpentylgruppe festzumachen ist (Abbildung 28c), besitzt der zweite Metabolit (RT = 7,3 min) mit dem Fragmention m/z 160 eine hydroxylierte Indolgruppe (Abbildung 28d). Wie schon für AM-694 beobachtet, wurden auch Metaboliten identifiziert, bei denen das Fluoratom durch eine Hydroxy- oder Carboxygruppe substituiert vorlag. Im Gegensatz zu AM-694, zu dem bisher noch kein nicht-fluoriertes Analogon auf dem Markt zu finden ist, handelt es sich im Fall von AM-2201 hier um Metaboliten, welche auch aus JWH-018 gebildet werden (Abbildung 29).

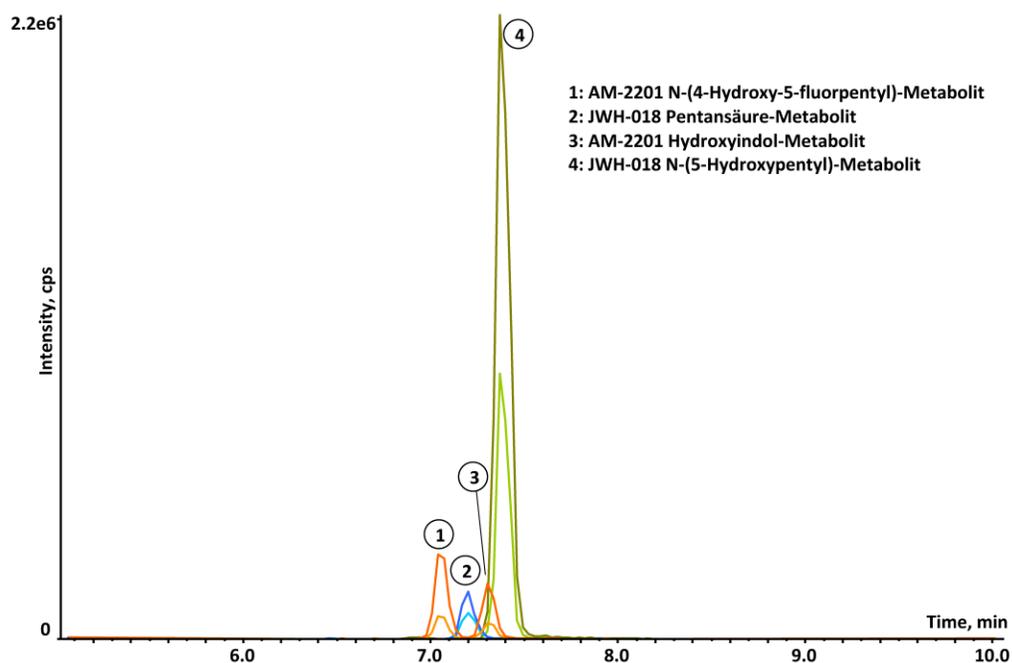


Abbildung 29: MRM-Chromatogramm einer humanen Urinprobe nach Konsum von AM-2201. Neben den zwei Hauptmetaboliten mit N-Fluorpentylgruppe wurden auch Metaboliten, die typisch für JWH-018 sind, detektiert.

5.1.12.1 Besonderheiten im Metabolismus von AM-2201

Zum Zeitpunkt der ersten Aufklärungsversuche des Metabolismus von AM-2201 war JWH-018 als verkehrsfähiges, aber nicht verschreibungsfähiges Betäubungsmittel nach Anlage II des BtMG eingestuft, AM-2201 dagegen nicht. Basierend auf dem damaligen Kenntnisstand war bei einer Detektion der Metaboliten von JWH-018 in Urinproben der Konsum von AM-2201 oder JWH-018 nicht zu unterscheiden, was vor allem aus forensischer Sicht zu Beurteilungsschwierigkeiten führte. Während in fast allen AM-2201 positiven Urinproben (n = 186), welche in unserem Routinelabor untersucht wurden, ebenfalls Metaboliten von JWH-018 detektiert wurden, ergaben Daten aus einer fortwährend durchgeführten marktüberwachenden „Produktanalyse“ der Kräutermischungen keine Hinweise auf eine Koexistenz der beiden synthetischen Cannabinoide in ein und demselben Produkt.

Tabelle 14: Quantitative Analysenergebnisse der authentischen Urinproben. Gruppe A: Urinproben korrespondierend zu JWH-018 positiven Serumproben; Gruppe B: Urinproben korrespondierend zu AM-2201 positiven Serumproben (negativ für JWH-018). Die angegebenen Konzentrationen wurden auf den Kreatininwert korrigiert. LOD = LLOQ = 0,05 ng/mL; n.n.: nicht nachgewiesen; Konzentrationen welche mit einem Sternchen gekennzeichnet sind lagen oberhalb des höchsten Kalibrators und wurden extrapoliert.

Probe #	C _{urine} AM-2201 [ng/mg]		C _{urine} JWH-018 [ng/mg]						C _{urine} JWH-073 [ng/mg]			
	N-(4-OH-pentyl)	6-OH-indol	N-(3-OH-pentyl)	N-(4-OH-pentyl)	N-(5-OH-pentyl)	Pentansäure	5-OH-indol	6-OH-indol	N-(3-OH-butyl)	N-(4-OH-butyl)	Butansäure	6-OH-indol
A1	n.n.	n.n.	n.n.	0,05	n.n.	0,11	n.n.	n.n.	0,13	0,05	0,11	0,09
A2	n.n.	n.n.	0,36	0,19	0,07	0,14	n.n.	0,01	n.n.	n.n.	0,07	n.n.
A3	n.n.	n.n.	0,15	0,27	0,12	0,13	n.n.	n.n.	0,07	0,03	0,09	n.n.
A4	n.n.	n.n.	0,04	0,78	0,35	0,43	n.n.	0,08	n.n.	n.n.	0,26	n.n.
A5	n.n.	n.n.	0,09	0,86	0,40	0,23	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,20	n.n.
A6	n.n.	n.n.	0,04	1,0	0,32	0,61	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,39	n.n.
A7	n.n.	n.n.	0,40	1,2	0,36	0,47	n.n.	0,04	n.n.	n.n.	0,32	n.n.
A8	n.n.	n.n.	n.n.	1,2	0,38	0,78	n.n.	n.n.	0,23	0,21	0,89	n.n.
A9	n.n.	n.n.	1,2	1,8	0,68	0,81	0,02	0,04	n.n.	n.n.	0,40	n.n.
A10	n.n.	n.n.	0,57	2,3	0,68	0,69	n.n.	0,06	0,47	0,10	0,43	0,07
A11	n.n.	n.n.	0,18	22,7	5,1	11	0,13	0,49	n.n.	n.n.	4,9	n.n.
A12	n.n.	n.n.	4,7	16*	40*	61*	0,66	3,3	26*	18	33*	2,5
A13	n.n.	n.n.	0,69	25*	8,3	5,3	0,10	0,55	n.n.	n.n.	1,8	n.n.
A14	n.n.	n.n.	0,61	330*	50*	42*	0,55	3,7	n.n.	0,28	23	n.n.
A15	n.n.	n.n.	0,99	50*	28*	24*	0,26	1,1	33*	4,4	18	0,86
A16	n.n.	n.n.	45*	60*	24	150*	2,5	22	n.n.	0,56	64*	n.n.
B1	0,05	0,04	n.n.	n.n.	5,1	8,3	n.n.	n.n.	n.n.	0,21	0,94	n.n.
B2	0,40	0,47	n.n.	n.n.	0,33	0,12	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B3	0,41	0,37	n.n.	n.n.	18	12	n.n.	n.n.	n.n.	0,20	0,41	n.n.

Probe #	Curine AM-2201 [ng/mg]		Curine JWH-018 [ng/mg]						Curine JWH-073 [ng/mg]			
	N-(4-OH-pentyl)	6-OH-indol	N-(3-OH-pentyl)	N-(4-OH-pentyl)	N-(5-OH-pentyl)	Pentansäure	5-OH-indol	6-OH-indol	N-(3-OH-butyl)	N-(4-OH-butyl)	Butansäure	6-OH-indol
B4	0,44	0,26	n.n.	n.n.	6,8	2,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B5	0,65	0,60	n.n.	n.n.	0,62	0,21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
B6	0,87	0,65	n.n.	n.n.	5,5	5,2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,08	n.n.
B7	0,92	0,92	n.n.	n.n.	28*	13	n.n.	n.n.	n.n.	0,14	0,31	n.n.
B8	0,99	0,52	n.n.	n.n.	35*	72*	n.n.	n.n.	n.n.	0,43	1,9	n.n.
B9	1,0	1,0	n.n.	n.n.	50*	23	n.n.	n.n.	n.n.	0,35	0,76	n.n.
B10	2,0	1,3	n.n.	n.n.	46*	98*	n.n.	n.n.	n.n.	0,85	2,4	n.n.
B11	2,3	1,5	0,02	n.n.	94*	160*	n.n.	n.n.	n.n.	1,2	5,3	n.n.
B12	2,7	1,7	n.n.	n.n.	11*	3,3	n.n.	n.n.	n.n.	0,08	0,08	n.n.
B13	3,6	2,9	n.n.	n.n.	0,81	1,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,02	n.n.
B14	4,2	3,4	n.n.	n.n.	2,4	1,8	n.n.	n.n.	n.n.	0,01	0,04	n.n.
B15	8,2	5,3	n.n.	n.n.	10*	8*	n.n.	n.n.	n.n.	0,17	0,26	n.n.
B16	61*	57*	0,24	n.n.	26*	280*	n.n.	0,81	n.n.	5,9	14	n.n.

Zwar war hier die Erklärung in der Besonderheit der metabolischen Defluorierung der N-(5-Fluorpentyl)-Derivate zu finden, welche in einigen *in vitro* Studien^[132, 150], sowie für AM-694 beschrieben wurde (siehe 5.1.5), es stellte sich dennoch die Frage, ob die Defluorierung ausschließlich metabolisch vermittelt ist, oder eventuell Verunreinigungen der Ausgangsprodukte (Chemikalien, Kräutermischungen) oder möglicherweise eine pyrolytische Zersetzung der Verbindungen während des Rauchens erheblich zu der Entstehung der Metaboliten der defluorierten Analoga beitragen. Zur Aufklärung wurden im Rahmen dieser Arbeit Urinproben aus der Routineanalytik verglichen (1), ein Rauchkondensat nach Verbrennung eines mit AM-2201 versetzten „Joints“ analysiert (2) sowie ein Experiment mit oraler Applikation von AM-2201 durchgeführt (3).

5.1.12.1 Betrachtung der authentischen Urinproben aus der Routineanalytik

In Tabelle 14 dargestellt sind exemplarische Analysenergebnisse von Urinproben aus den Jahren zwischen 2008 und 2010, als noch kein AM-2201 auf dem europäischen Markt in Kräutermischungen zu finden war (Gruppe A) sowie von zu AM-2201 positiv befundenen Serumproben korrespondierende Urinproben (Gruppe B). (Informationen zur verwendeten quantitativen Analysenmethode finden sich in Kapitel 3.7). Auffallend ist, dass in fast allen Urinproben der Gruppe A N-(4-Hydroxypentyl)-JWH-018 in der höchsten Konzentration vorliegt, gefolgt von Pentansäure-JWH-018. Zusätzlich wurden in den meisten Urinproben N-(5-Hydroxypentyl)-JWH-018, N-(3-Hydroxypentyl)-JWH-018 sowie Butansäure-JWH-073

detektiert. N-(Hydroxybutyl)-Metaboliten des JWH-073 sowie indolhydroxylierte Metaboliten wurden in nur einigen der untersuchten Urinproben in eher geringen Konzentrationen detektiert. In Gruppe B wurden in allen untersuchten Urinproben beide Metaboliten von AM-2201 (inklusive Fluoratom) detektiert, wobei die Konzentrationen des N-(4-Hydroxy-5-fluorpentyl)-AM-2201 etwas über denen des 6-Hydroxylindol-AM-2201 lagen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Urinproben der Gruppe A wurde N-(4-Hydroxypentyl)-JWH-018 gar nicht, aber N-(5-Hydroxypentyl)-JWH-018 bzw. Pentansäure-JWH-018 in den höchsten Konzentrationen sowie Butansäure-JWH-073 nachgewiesen. Zusammenfassend wurden in den Urinproben der Gruppe B Metaboliten von drei unterschiedlichen synthetischen Cannabinoiden detektiert.

5.1.12.1.2 Analyse des Rauchkondensates

In der LC-MS/MS-Analyse des Rauchkondensates wurden neben AM-2201 geringe Mengen an JWH-018 (ca. 3%) sowie dessen ungesättigten Isomern JWH-022 detektiert. Zusätzlich wurden geringe Spuren einer weiteren Verbindung mit den MRM-Übergängen (340,2 → 155,1 und 340,2 → 127,1) von JWH-022 nachgewiesen (ca. 8% der Signalintensität von JWH-022) (Abbildung 30). Die Fragmentierungsmuster der unbekanntes Verbindung und des JWH-022 waren fast identisch. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine Substanz mit isomerisierter Doppelbindung handelt (Abbildung 31).

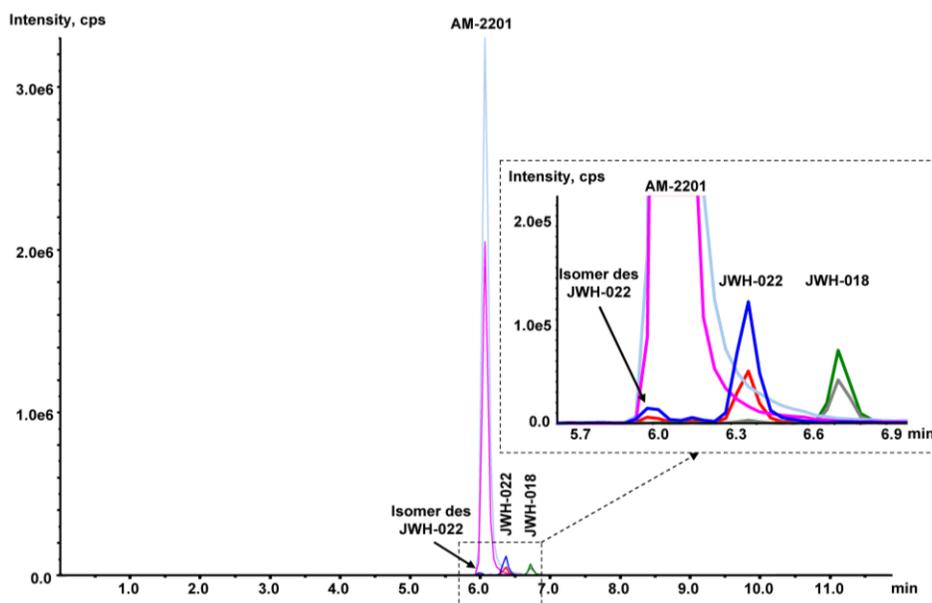


Abbildung 30: Chromatogramm des Rauchkondensates nach dem Verräuchern eines „Joints“ versetzt mit 10 mg AM-2201.

Ähnliche Ergebnisse erhielten auch *Donohue et al.* bei der Analyse einer Lösung welche durch Ausspülen einer Pfeife nach Verräuchern einer Kräutermischung, welche AM-2201 enthielt, gewonnen worden war, berichteten allerdings nicht über das postulierte Isomer von JWH-022^[151]. Aufgrund der Erkenntnisse aus dieser Studie kann davon ausgegangen werden, dass beim Rauchkonsum von Produkten, welche AM-2201 enthalten, auch geringe Mengen an JWH-018 und JWH-022 aufgenommen werden, welche aber aufgrund der geringen Menge nicht in erheblichem Umfang zur Bildung der defluorierten Metaboliten beitragen dürften.

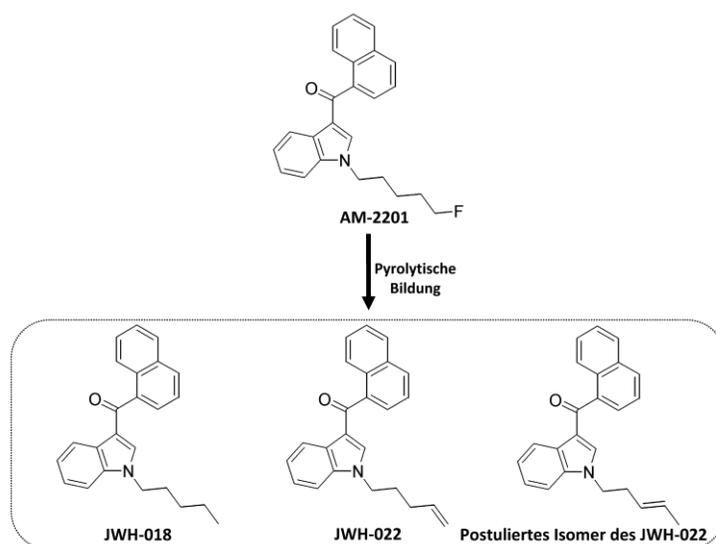


Abbildung 31: Strukturen der thermischen Artefakte des AM-2201.

5.1.12.1.3 Orale Applikation von AM-2201

Die quantitativen Analysenergebnisse der Urin- und Serumproben nach oraler Applikation von 5 mg reinem AM-2201 an einen freiwilligen, männlichen Probanden (Alter: 42 Jahre, 75 kg Körpergewicht) sind in Tabelle 15 und Tabelle 16 dargestellt. Die Serum- und Urinproben wurden vor der Applikation, sowie über die folgenden elf Tage erhoben. Besonders hervorzuheben ist, dass der Proband zu keinem Zeitpunkt der Studie physische oder psychische Effekte erfuhr. Dies könnte sowohl durch einen stark ausgeprägten First-Pass-Effekt der Substanz, als auch durch eine verlangsamte Resorption im Vergleich zur inhalativen Aufnahme begründet sein. Auch nach oraler Aufnahme von 10 mg AM-694 bzw. 26 mg AB-001 in zwei Studien anderer Arbeitsgruppen wurden nicht von psychischen oder physischen Auffälligkeiten berichtet^[137, 152]. Bisher gibt es kaum Daten zu Bioverfügbarkeit und zu den pharmakokinetischen Eigenschaften synthetischer Cannabinoide. Einzig ein Fall ist bekannt, bei dem eine Intoxikation nach oraler Aufnahme von

JWH-018-haltigem Pulver beobachtet wurde. Die hierbei detektierten Metabolitenkonzentrationen ($200 \text{ nM} \approx 74 \text{ ng/mL}$ berechnet als Pentansäuremetabolit des JWH-018) im Urin lagen dabei weit über den in der vorliegenden Studie nachgewiesenen Konzentrationen. Zu diesem Fall gibt es keine Informationen zur konsumierten Wirkstoffmenge^[95]. Im Gegensatz dazu werden bei oraler Aufnahme von 20 mg THC bereits deutlich ausgeprägte Auffälligkeiten beobachtet^[153], obwohl THC eine geringere CB_1 -Rezeptoraffinität als JWH-018 besitzt und nur als Partialagonist einzustufen ist^[154].

5.1.12.1.3.1 Serumproben:

Abbildung 32 zeigt das Konzentrations-Zeitprofil von AM-2201 in den untersuchten Serumproben. Die höchste Konzentration an AM-2201 ($0,56 \text{ ng/mL}$) wurde in der Serumprobe, die 95 Minuten nach Applikation erhoben wurde, gemessen und AM-2201 war über 21 Stunden quantitativ (LLOQ = 20 pg/mL) und fünf Tage qualitativ (LOD ca. $0,8 \text{ pg/mL}$ über Signal-Rausch-Verhältnis >3) in den Serumproben nachweisbar. JWH-018 und JWH-022 wurden in keiner der untersuchten Serumproben nachgewiesen.

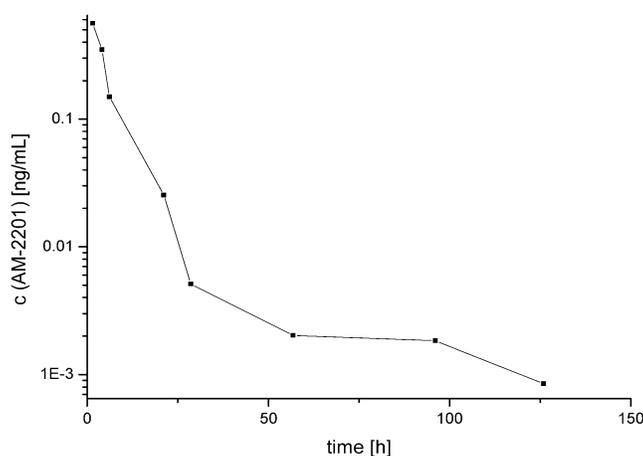


Abbildung 32: Konzentrations-Zeitprofil von AM-2201 in Serumproben nach oraler Applikation von 5 mg AM-2201 (logarithmische Darstellung). LOD = $\sim 0,8 \text{ pg/mL}$; LLOQ = 20 pg/mL .

Zieht man auch die eigentlich unterhalb des LLOQ bestimmten semi-quantitativen Konzentrationen in Betracht, kann aufgrund des Konzentrations-Zeitprofils auf eine terminale Eliminationshalbwertszeit von zumindest mehreren Tagen geschlossen werden (siehe auch Kapitel 5.4.1 zur Nachweisdauer).

Neben der Muttersubstanz wurden vier Metaboliten in den untersuchten Serumproben nachgewiesen (Tabelle 15). Da aufgrund des Studiendesigns eine Koadministration von JWH-018 auszuschließen ist, wird deutlich, dass die Defluorierung metabolisch veranlasst ist. Auffallend ist, dass die defluorierten Metaboliten (JWH-018 Metaboliten) in allen Serumproben in höherer Konzentration vorliegen und auch über einen längeren Zeitraum nachweisbar waren, als die noch das Fluoratom tragenden Metaboliten. Die Konzentrationen des Pentansäure-Metaboliten von JWH-018 lagen dabei in allen Serumproben sogar über denen des AM-2201 selbst, was auf eine sehr rasche Metabolisierung der Verbindung nach oraler Aufnahme schließen lässt. Da in der verwendeten Messmethode die Sensitivität für den N-(5-Hydroxypentyl)-Metaboliten des JWH-018 im Vergleich zum Pentansäuremetaboliten erhöht ist, ist hierin zumindest teilweise die Erklärung für dessen längere Nachweisbarkeit zu finden.

Tabelle 15: Metabolitenkonzentrationen in humanen Serumproben nach oraler Applikation von 5 mg AM-2201. Metaboliten von JWH-073 wurden nicht nachgewiesen. LOD = LLOQ = 0,05 ng/mL; n.n.: nicht nachgewiesen.

Probe #	t [h]	<u>c_{serum} AM-2201 [ng/mL]</u>		<u>c_{serum} JWH-018 [ng/mL]</u>	
		N-(4-OH-pentyl)	6-OH-indol	Pentansäure	N-(5-OH-pentyl)
1	0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2	1.5	0,05	0,21	0,62	0,42
3	4.1	0,04	0,22	0,73	0,31
4	6.2	0,02	0,14	0,57	0,19
5	21	0,01	0,05	0,25	0,07
6	28	n.n.	0,02	0,13	0,04
7	57	n.n.	n.n.	0,07	0,02
8	96	n.n.	n.n.	n.n.	0,01
9	126	n.n.	n.n.	n.n.	0,01
10	151	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
11	267	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

5.1.12.1.3.2 Urinproben:

Neben den im Serum detektierten Metaboliten wurden in den untersuchten Urinproben zusätzlich Metaboliten, die typisch für JWH-073 sind, detektiert (Tabelle 16). Diese sind, wie bereits beschrieben, mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Decarboxylierungsreaktionen aus Metaboliten des JWH-018 entstanden. Es wurden weder indolhydroxylierte Metaboliten noch N-(2-, N-(3- oder N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten des JWH-018 bzw. der N-(3-Hydroxybutyl)-Metabolit des JWH-073 detektiert. Die höchsten Konzentrationen der Metaboliten wurden in den

Urinproben #1 und #2 (Abnahme 200 min bzw. 440 min nach Applikation) gemessen. Analog zu den Ergebnissen der Serumanalytik wurden die Metaboliten des JWH-018 in den höchsten Konzentrationen detektiert. Die Nachweisbarkeit nach einmaligem oralen Konsum von 5 mg AM-2201 im Urin lag bei knapp vier Tagen für die fluorierten Metaboliten, bei zehn Tagen für die JWH-018-typischen Metaboliten und bei knapp drei Tagen für den Butansäure-Metabolit des JWH-073. Wie zuvor in der Betrachtung der Urinproben aus der Routine beschrieben, wurde auch nach oraler Applikation der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit des JWH-018 in keiner der untersuchten Urinproben detektiert. JWH-022 und dessen postulierte Metaboliten wurden weder in den Serumproben noch in den Urinproben detektiert. Die Ergebnisse dieser Studie werden ausführlich in einer Publikation im Journal of Mass Spectrometry dargelegt ^[117].

Tabelle 16: Metabolitenkonzentrationen der Urinproben nach oraler Applikation von 5 mg AM-2201. Die angegebenen Konzentrationen wurden auf den Kreatininwert korrigiert. LOD = LLOQ = 0,05 ng/mL; n.n.: nicht nachgewiesen.

Probe #	t [h]	<u>C_{urine} AM-2201 [ng/mg]</u>		<u>C_{urine} JWH-018 [ng/mg]</u>		<u>C_{urine} JWH-073 [ng/mg]</u>	
		N-(4-OH-pentyl)	6-OH-indol	N-(5-OH-pentyl)	Pentansäure	N-(4-OH-butyl)	Butansäure
1	0.3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2	3.3	0,94	0,76	5,8	6,9	0,11	0,10
3	7.3	0,74	0,67	6,2	4,9	0,10	0,12
4	11	0,33	0,34	3,5	2,4	0,05	0,09
5	18	0,14	0,11	1,3	0,9	0,03	0,04
6	23	0,21	0,15	1,9	1,3	0,06	0,06
7	24	0,20	0,14	1,7	1,1	n.n.	0,09
8	28	0,12	0,09	1,3	0,76	n.n.	0,06
9	31	0,12	0,07	0,74	0,60	n.n.	0,05
10	35	0,10	0,05	0,96	0,57	n.n.	0,04
11	41	0,07	0,04	0,58	0,43	n.n.	0,04
12	44	0,02	0,02	0,13	0,10	n.n.	0,02
13	52	0,05	0,03	0,38	0,30	n.n.	0,03
14	57	0,05	0,03	0,32	0,26	n.n.	0,03
15	68	0,04	0,02	0,32	0,22	n.n.	0,02
16	80	0,03	0,03	0,22	0,15	n.n.	n.n.
17	90	0,03	0,03	0,20	0,13	n.n.	n.n.
18	113	0,02	n.n.	0,10	0,07	n.n.	n.n.
19	138	n.n.	n.n.	0,08	0,06	n.n.	n.n.
20	168	n.n.	n.n.	0,03	0,03	n.n.	n.n.
21	192	n.n.	n.n.	0,06	0,04	n.n.	n.n.
22	238	n.n.	n.n.	0,03	0,02	n.n.	n.n.
23	266	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer Studie von Jang *et al.* bei der Untersuchung von Rattenurin nach Applikation von AM-2201 als auch von Urin von Konsumenten, wobei ein Beikonsum von JWH-018 nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnte^[155].

In Arbeiten weiterer Arbeitsgruppen zum Metabolismus von AM-2201 wurde *in vitro* ebenfalls eine metabolische Defluorierung zum N-(5-Hydroxypentyl)-JWH-018 und zum Pentansäure-JWH-018 beobachtet. Als katalysierende CYP-Enzyme wurden dabei die Isoformen 1A2 und 2C9 identifiziert. Die relative Verteilung der *in vitro* detektierten Metaboliten steht in guter Übereinstimmung mit der relativen Verteilung der Metaboliten in den Serumproben der eigenen Studie^[132]. Zusätzlich wurden N-Despentyl-, Mono- und Dihydroxy- und Dihydrodiol-Metaboliten von AM-2201 identifiziert. Die defluorierten Metaboliten wurden in beiden Studien auch in Urinproben detektiert, ein möglicher Beikonsum von JWH-018 konnte nicht ausgeschlossen werden, da keine Informationen über die Zusammensetzung der konsumierten Kräutermischungen vorlagen^[132, 150].

In vitro Studien zeigten, dass der N-(4- und N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit des JWH-018, sowie der N-(4-Hydroxy-5-fluorpentyl)-Metabolit des AM-2201 ebenfalls Affinität zum CB1-Rezeptor besitzen und als Vollagonisten agieren^[132]. Zieht man die Ergebnisse der vorliegenden Studie unter diesem Gesichtspunkt in Betracht, ist nach einem Konsum von AM-2201 aufgrund des breiten Metabolitenspektrums und der möglichen pharmakologischen Wechselwirkungen eine pharmakodynamische Abschätzung enorm erschwert. Zum Vergleich dazu besitzt THC nur einen pharmakologisch aktiven Metaboliten, der in eher geringen Mengen gebildet wird^[156].

5.1.13 MAM-2201

5.1.13.1 In vivo

Fast zeitgleich mit AM-2201 tauchte das synthetische Cannabinoid MAM-2201 ([1-(5-Fluoropentyl)-1H-indol-3-yl](4-methylnaphthalen-1-yl)methanon) auf dem europäischen Markt auf, wobei es sich um das 5-Fluoropentyl-Analogon von JWH-122 handelt.

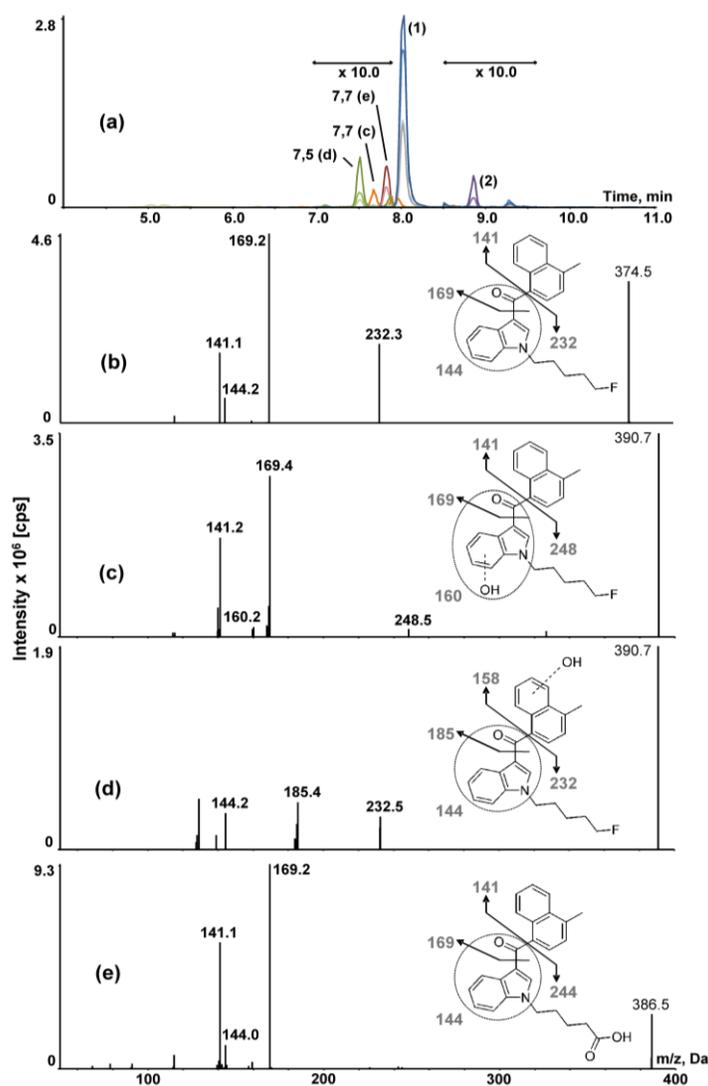


Abbildung 33: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz MAM-2201 (b); Metabolit 1: Monohydroxyliert am Indolring (c); Metabolit 2: Monohydroxyliert am Naphthylrest (d); Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Zwei monohydroxylierte Metaboliten wurden als Hauptmetaboliten des MAM-2201 identifiziert (Abbildung 33). Während einer der Metabolite wie bei AM-2201 am Indolrest hydroxyliert vorliegt (m/z 248 und m/z 160, Abbildung 33c), ist der zweite Metabolit nicht wie bei AM-2201 an der N-Fluorpentylkette hydroxyliert, sondern am Naphthylsystem (m/z 158 und m/z 185, Abbildung 33d). Weiter wurden auch hier Metaboliten, die typisch für JWH-122 sind, detektiert (Abbildung 34). Dabei handelt es sich um den N-(5-Hydroxypentyl)-, den Hydroxynaphthyl- und den Pentansäure-Metabolit. Letzterer wurde interessanterweise nach Konsum von JWH-122 nicht als Hauptmetabolit identifiziert. Vergleichbar zu AM-2201 kann davon ausgegangen werden, dass in erster Linie eine metabolische Defluorierung zur Bildung der JWH-122 typischen Metaboliten führt und der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit wiederum als Marker zur Unterscheidung zwischen einem Konsum von MAM-2201 und JWH-122 genutzt werden kann.

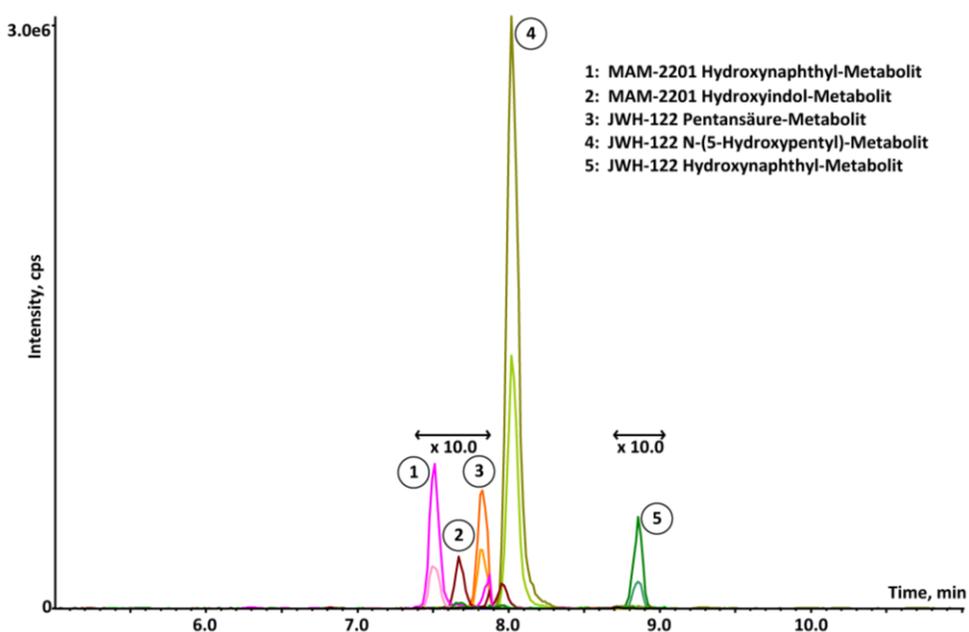


Abbildung 34: MRM-Chromatogramm einer humanen Urinprobe nach Konsum von MAM-2201. Neben den zwei Hauptmetaboliten mit N-Fluorpentylgruppe wurden auch für JWH-122 typische Metaboliten detektiert.

5.1.13.2 In vitro

Ähnliche Erkenntnisse erbrachten auch die *in vitro* Ergebnisse nach Inkubation humaner Leberzellmikrosomen mit MAM-2201. Neben einer Vielzahl an mono- und dihydroxylierten, N-desalkylierten und zum Aldehyd oder zur Säure oxidierten Metaboliten (sowie Kombinationen aus den einzelnen Reaktionen), bei denen das Fluoratom im Molekül noch vorhanden war, wurden auch einige defluorierte Metaboliten identifiziert. Die *in vitro* gebildeten defluorierten

Metaboliten deckten sich dabei weitestgehend mit den *in vitro* identifizierten Metaboliten nach Inkubation mit JWH-122 (siehe Abbildung 21). Als Hauptmetaboliten der *in vitro* Versuche mit MAM-2201 wurden der 4-Formylnaphthyl-Metabolit (Abbildung 35, M1), der Hydroxynaphthyl-Metabolit (Abbildung 35, M2) und der 4-Carboxynaphthyl-Metabolit (Abbildung 35, M3), sowie die defluorierten Metaboliten, der N-(5-Hydroxypentyl)-hydroxynaphthyl-Metabolit (Abbildung 35, M4) und der N-(5-Hydroxypentyl)-4-carboxynaphthyl-Metabolit (Abbildung 35, M5) identifiziert.

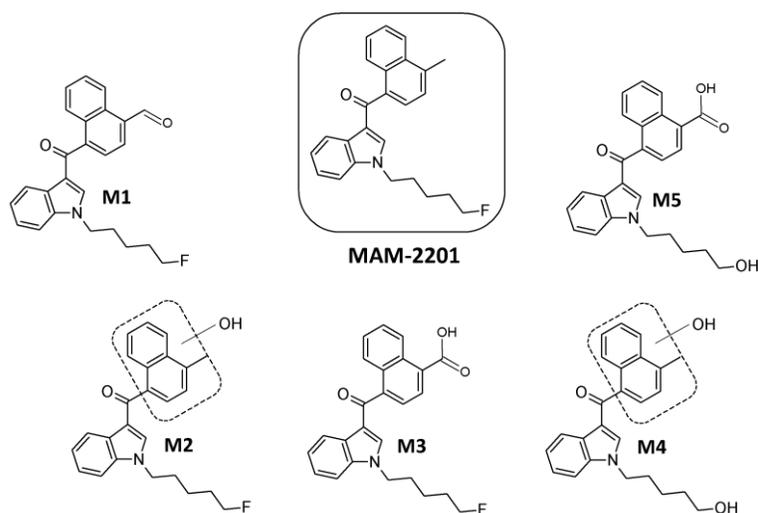


Abbildung 35: Hauptmetaboliten des MAM-2201 nach Inkubation mit pHLM. M1: 4-Formylnaphthyl-Metabolit; M2: Hydroxynaphthyl-Metabolit; M3: 4-Carboxynaphthyl-Metabolit; M4: N-(5-Hydroxypentyl)-hydroxynaphthyl-Metabolit; M5: N-(5-Hydroxypentyl)-4-carboxynaphthyl-Metabolit.

5.1.14 JWH-307

Die strukturelle Besonderheit des JWH-307 ([5-(2-Fluorphenyl)-1-pentyl-1*H*-pyrrol-3-yl](naphthalen-1-yl)methanon), welche es von den Aminoalkylindolen unterscheidet, liegt in der Fluorphenyl-pentylpyrrolgruppe (Abbildung 36b).

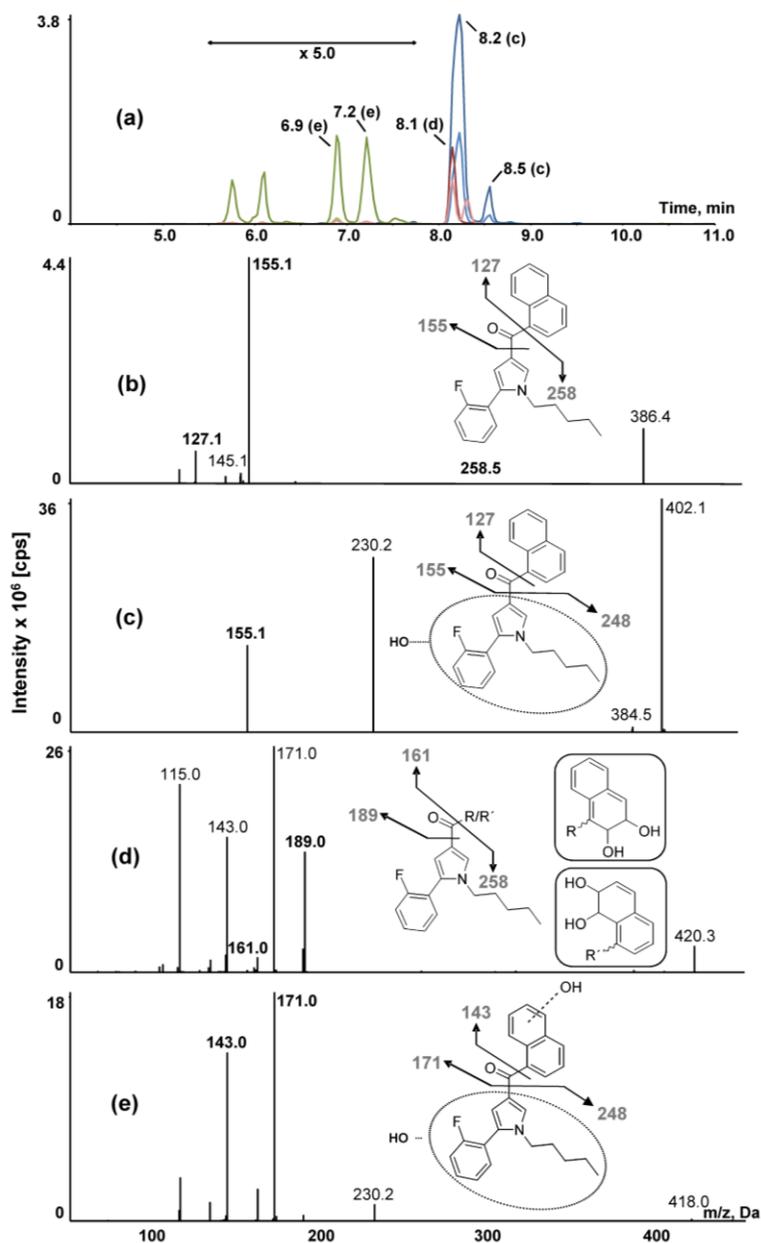


Abbildung 36: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz JWH-307 (b); Metabolit 1+2: Monohydroxyliert am Fluorphenyl-pentylpyrrolrest (c); Metabolit 3: Dihydroxyliert, hydratisiert am Indolring (d); Metabolit 4+5: Monohydroxyliert am Fluorphenyl-pentylpyrrolrest und monohydroxyliert am Naphthylrest (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

In Abbildung 36 sind die Hauptmetaboliten von JWH-307, die in humanen Urinproben identifiziert wurden, dargestellt. Neben zwei monohydroxylierten Metaboliten wurden auch drei dihydroxylierte Metaboliten detektiert. Aufgrund der schwachen Fragmentierung des Fluorphenyl-pentylpyrrolfragmentions war eine Zuordnung der Hydroxylgruppe an die genaue Position des Fragments erschwert. Beide monohydroxylierten Metaboliten tragen die Hydroxylgruppe allerdings an diesem Fragmention (Abbildung 36c). Das intensive Fragmention m/z 230, welches durch Wasserabspaltung von dem hydroxylierten Fragmention (m/z 248) entsteht, deutet auf eine Hydroxylierung an der Pentylkette hin, da eine Abspaltung vom aromatischen System energetisch ungünstiger wäre.

Neben diesen zwei Metaboliten wurde in den untersuchten Urinproben eine Vielzahl unterschiedlicher dihydroxylierter Metaboliten detektiert, wobei diese sich in ihren Intensitäten von Urinprobe zu Urinprobe stark unterschieden. Neben zwei dihydroxylierten Metaboliten, die je eine Hydroxylgruppe am Fluorphenyl-pentylpyrrolrest bzw. am Naphthylrest tragen (Abbildung 36e), wurde auch ein dihydroxylierter, hydratisierter Metabolit als Target für die Urinanalytik gewählt (Abbildung 36d), um über ein größeres Metabolitenspektrum trotz der individuellen Varianten die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises zu erhöhen. Der letzt genannte Metabolit entsteht, wie von *Zhang et al.* postuliert, wahrscheinlich über die Hydrolyse eines intermediär gebildeten Epoxids (Abbildung 37)^[108]. Die Fragmentionen m/z 171 ($\Delta 18$ amu) und m/z 143 ($\Delta 18$ amu + $\Delta 28$ amu) (siehe Abbildung 36 (e)) sind durch Wasserabspaltung unter Rückbildung des aromatischen Systems bzw. weiterer Abspaltung von CO vom Fragmention m/z 189 zu erklären.

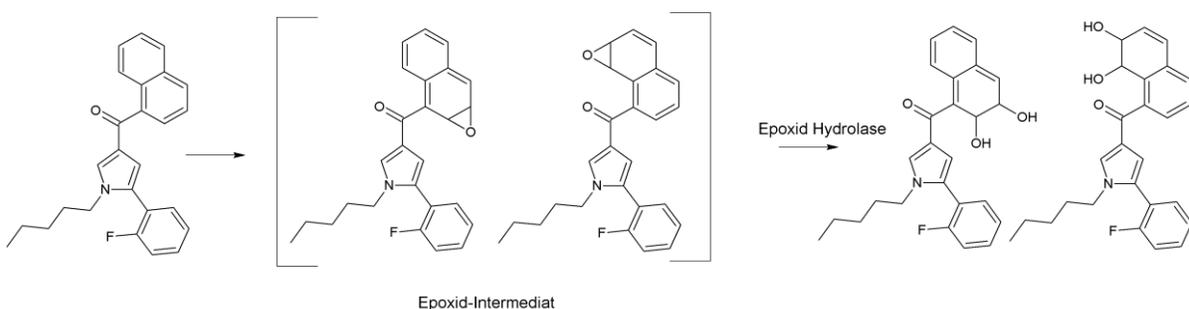


Abbildung 37: Postulierte Bildung des dihydroxylierten, hydratisierten Metaboliten über ein Epoxid-Intermediat^[108].

Eine Substitution des Fluors wurde nicht beobachtet, was für Fluoratome in *ortho*-Position auch nicht zu erwarten ist^[138].

5.1.15 UR-144

Eine neue Generation synthetischer Cannabinoide kam mit UR-144 ((1-Pentyl-1*H*-indol-3-yl)(2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanon) auf den Markt. Die Besonderheit besteht in der Tetramethylcyclopropyl-Gruppe anstelle des bekannten Naphthylrestes. Der Tetramethylcyclopropylrest neigt aufgrund der Ringspannung zu Ringöffnungsreaktionen. Diese treten unter anderem bei Erhitzungsvorgängen, wie beispielsweise während des Rauchens, auf und können zu einem ungesättigten Isomer führen. Unter sauren Bedingungen kann eine hydrolytische Ringöffnung zur hydroxylierten Verbindung stattfinden (4-HTMPIPO, Abbildung 38). Beide Verbindungen wurden sowohl in Serumproben, als auch in den Kräutermischungen selbst detektiert^[157] und können ebenfalls verstoffwechselt werden. Nach dem Konsum werden daher in den untersuchten Urinproben neben den Metaboliten von UR-144 typischerweise auch Metaboliten des ringgeöffneten Isomers detektiert.

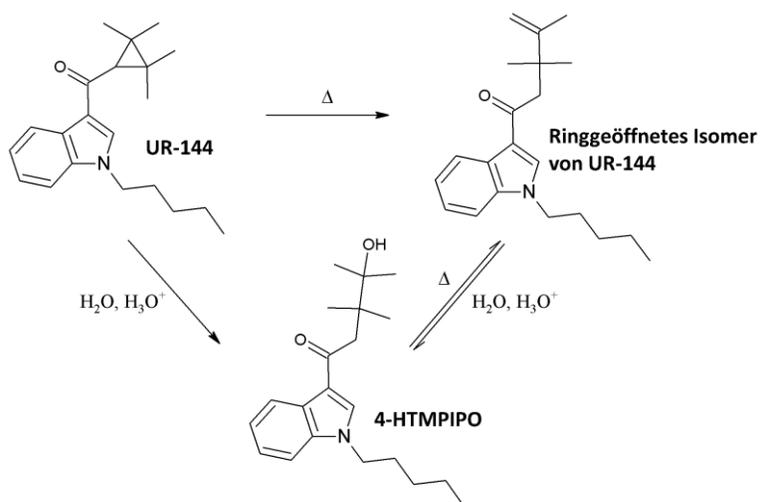


Abbildung 38: UR-144 sowie dessen Folgeprodukte^[157].

Die Unterscheidung von UR-144 und dessen ringgeöffneten Isomers gelingt massenspektrometrisch aufgrund der unterschiedlichen Fragmentierungsmuster. Während UR-144 wie in Abbildung 39b dargestellt zu vier typischen Fragmentationen zerfällt, werden für das ringgeöffnete Isomer die Tetramethylcyclopropylfragmentationen m/z 125 und m/z 97 nicht mehr detektiert. Bei weiteren Untersuchungen zum Metabolismus der beiden Substanzen wurde davon

ausgegangen, dass die Metaboliten von UR-144 bzw. des ringgeöffneten Isomers sich in ihrem Fragmentierungsmuster analog zur jeweiligen Muttersubstanz verhalten^[158].

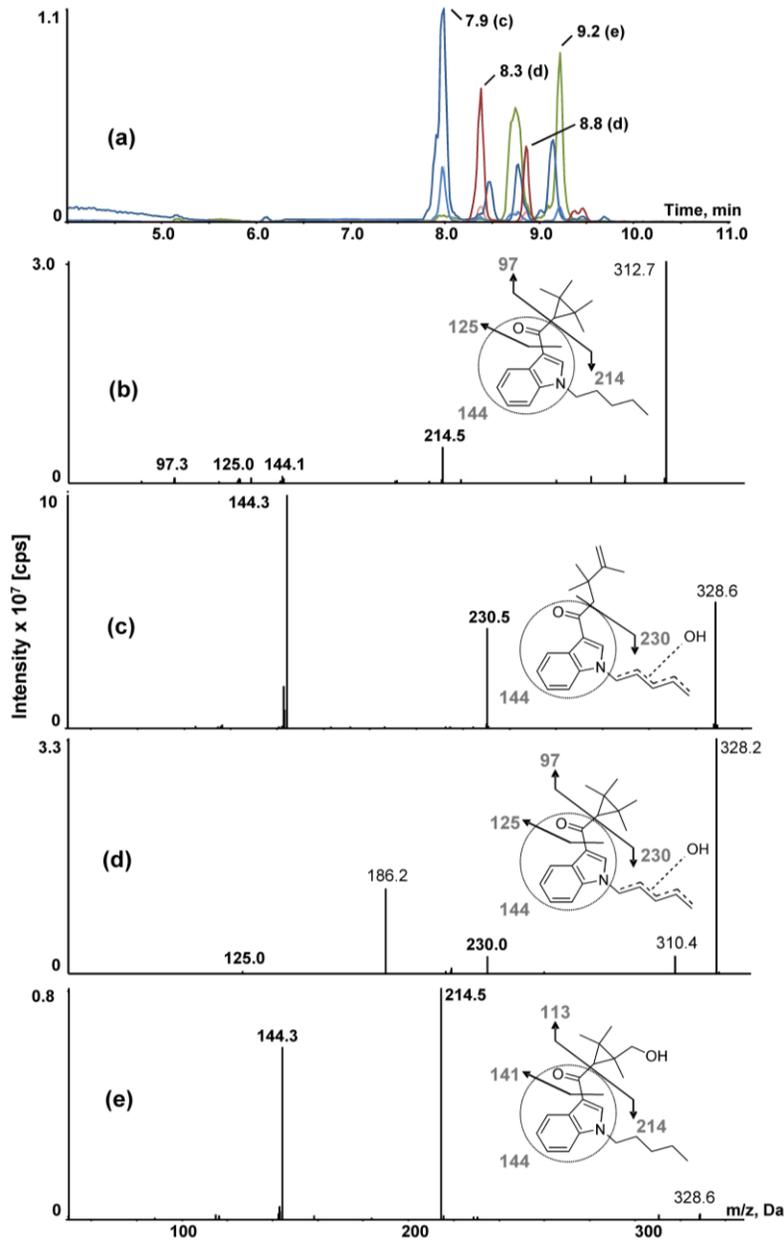


Abbildung 39: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz UR-144 (b); Metabolit 1: Ringgeöffnetes Isomer monohydroxyliert an der N-Pentylkette (c); Metabolit 2+3: Monohydroxyliert an der N-Alkylkette (d); Metabolit 4: Monohydroxyliert am Tetramethylcyclopropylring (e). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden.

Es wurden ein monohydroxylierter Metabolit des ringgeöffneten Isomers (monohydroxylierte N-Pentylkette, Abbildung 39c) und drei monohydroxylierte Metaboliten mit intaktem Tetramethylcyclopropylring identifiziert (Monohydroxylierung an N-Pentylkette (Abbildung 39d)

bzw. Tetracyclopropylring (Abbildung 39e)), welche in Urinproben zum Nachweis des Konsums eines Produktes, das UR-144 enthält, verwendet werden können. *Sobolevsky et al.* identifizierten *in vitro* N-Despentylierte-, monohydroxylierte N-despentylierte- sowie mono- und dihydroxylierte und dehydriert-monohydroxylierte Verbindungen als Metabolite von UR-144, wobei die monohydroxylierten Metaboliten die intensivsten Signale darstellen. Bis auf die monhydroxylierten N-Despentyli- und die dehydrierten-monohydroxylierten Verbindungen wurden die identifizierten Metabolite auch *in vivo* nachgewiesen^[150]. Später beschäftigte sich dieselbe Arbeitsgruppe auch mit der Identifizierung bzw. Unterscheidung der Metaboliten, welche aus UR-144 selbst oder aus den Isomeren gebildet werden. Die Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den eigenen, wobei noch eine Vielzahl an weiteren Metaboliten mit schwachen Intensitäten identifiziert wurden, darunter hauptsächlich verschiedene monohydroxylierte Isomere sowie di- und trihydroxylierte und N-desalkylierte Verbindungen, ein Säuremetabolit und einige Ketone^[158]. Diese eignen sich aufgrund der schwachen Signalintensitäten nicht für den Einsatz als Konsummarker in der Urinanalytik.

5.1.16 XLR-11

Das fluoridierte Analogon zu UR-144 ist das synthetische Cannabinoid XLR-11 ([1-(5-Fluorpentyl)-1*H*-indol-3-yl](2,2,3,3-tetramethylcyclopropyl)methanon, Abbildung 40b).

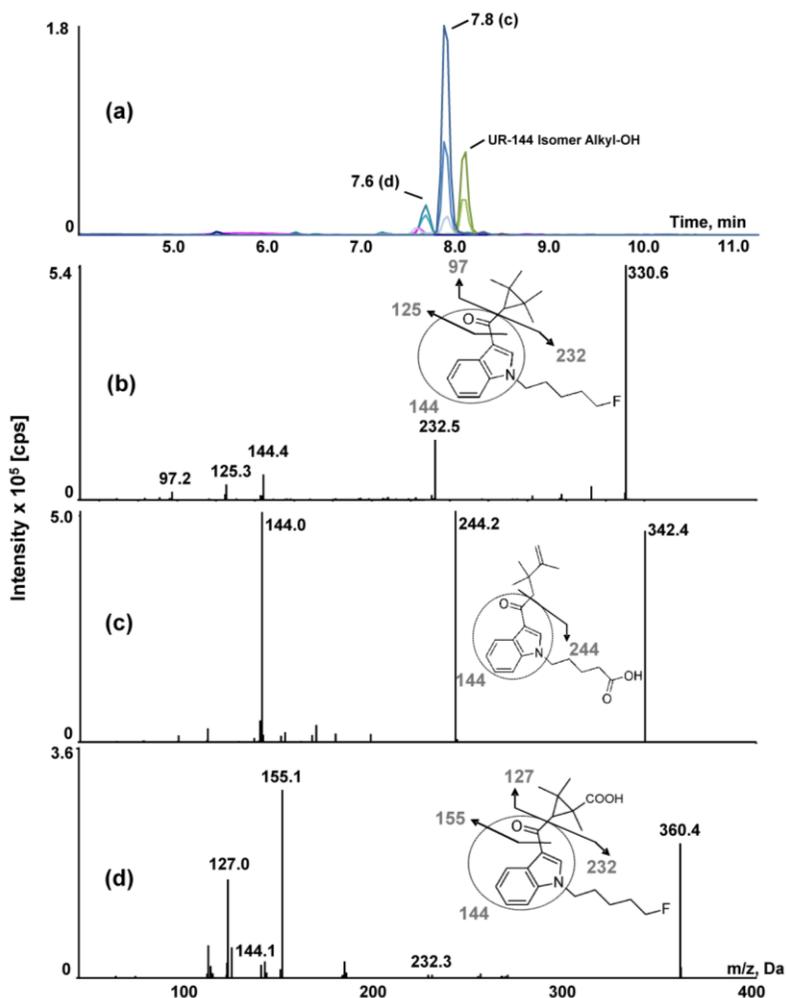


Abbildung 40: Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Chromatogramm einer Urinprobe nach Glucuronidasespaltung und Extraktion (a); ESI (+)-MS/MS-Spektrum der Muttersubstanz XLR-11 (b); Metabolit 1: Ringgeöffnetes Isomer carboxyliert an der Alkylkette (c); Metabolit 2: Am Tetramethylcyclopropylrest zur Säure oxidiert (d). Die verwendeten Kollisions-Energien in MRM-Modus und EPI-Modus können sich unterscheiden. Zusätzlich wurde auch ein Alkylketten hydroxylierter Metabolit des ringgeöffneten Isomers des UR-144 nachgewiesen.

Wie schon für UR-144 beschrieben wird neben XLR-11 selbst auch dessen ringgeöffnetes Isomer in Kräutermischungen und Serumproben von Konsumenten detektiert. Die massenspektrometrische Unterscheidung gelingt auch hier über die tetramethylcyclopropyl-typischen Fragmentationen (m/z 125 und m/z 97).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten zu UR-144 wurde angenommen, dass der Metabolismus analog abläuft. Zudem muss mit Reaktionen gerechnet werden, wie sie bereits für andere Fluorpentyl-Analoga gezeigt wurden (metabolische Defluorierung). Abbildung 40 zeigt die identifizierten Hauptmetaboliten von XLR-11. Als Hauptmetabolit wurde ein an der Pentylkette zur Säure oxidiertes Metabolit des ringgeöffneten Isomers identifiziert (Abbildung 40c). Interessanterweise wurde dieser Metabolit im Metabolismus des UR-144 nicht detektiert, obwohl bei dieser Substanz der Vorläufermetabolit (monohydroxylierte Pentylkette) zu den Hauptmetaboliten zählt. Desweiteren wurde ein Metabolit mit einer Carboxygruppe am Tetramethylcyclopropylring identifiziert (Abbildung 40d). Diese Verbindung wurde auch von *Wohlfarth et al.* nach Inkubation von Hepatocysten mit XLR-11 als Hauptmetabolit charakterisiert^[159].

In den untersuchten Urinproben wurden des Weiteren auch geringe Mengen des UR-144 N-(5-Hydroxypentyl)- und des UR-144 Pentansäure-Metaboliten detektiert. Wie für AM-2201 beschrieben, kann davon ausgegangen werden, dass diese Metaboliten im Zuge einer metabolischen Defluorierung gebildet werden. Die Eignung des UR-144 N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten als analytischer Marker zur Unterscheidung eines Konsums von UR-144 und XLR-11 ist zwar anzunehmen, wurde aber noch nicht experimentell überprüft. Auffallend ist, dass sowohl für UR-144 als auch für XLR-11 vor allem die Metaboliten der ringgeöffneten Isomere in den Urinproben detektiert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass während des Rauchens ein Großteil der jeweiligen Substanz in das ringgeöffnete Isomer umgewandelt wird. Studien zur metabolischen Ringöffnung existieren bisher nicht.

5.1.17 Feinmassenexperimente zur Absicherung der identifizierten Metaboliten

Zur weiteren Absicherung der postulierten Metaboliten wurden HR-MS sowie HR-MS/MS Experimente durchgeführt. Die Hochauflösung eines Time-of-Flight-Massenspektrometers (ToF-MS) ermöglicht auch im Falle von überlappenden Peaks und starken Matrixeffekten eine hohe Selektivität. Das verwendete ToF-MS erlaubt eine Detektion der Massensignale mit einer Massengenauigkeit < 3 ppm im MS-Modus und < 5 ppm im MS/MS-Modus. Ein großer Vorteil dieser Messtechnik ist, dass in den meisten Fällen die Summenformel des Analyten direkt aus der Feinmasse des Moleküls und dem sich ergebenden Isotopenmuster abgeleitet werden kann. Zusätzlich ist es möglich in gewissem Umfang Strukturinformationen zu erhalten. Durch einen

Vergleich der Feinmassen der Fragmentationen und die Addition von Neutralverlusten zu den postulierten Strukturen der Fragmente können Informationen über die chemische Struktur des Moleküls erhalten werden. Von einer Bestätigung der postulierten Summenformel wird dann ausgegangen, wenn die kalkulierte und die gemessene Feinmasse sich nicht um mehr als 5 ppm voneinander unterscheiden. Mittels dieser Technik wurden die postulierten Metabolite für alle oben dargestellten synthetischen Cannabinoide weiter bestätigt (Tabelle A 1 im Anhang). Soweit Referenzmaterial verfügbar war, wurden die postulierten Metaboliten zusätzlich durch chromatographischen Abgleich identifiziert. Siehe hierzu Kapitel 5.3.

5.2 Cytochrom P450 Reaction Phenotyping

Der oxidative Metabolismus durch CYP450 Enzyme stellt für viele Xenobiotica eine wichtige Voraussetzung für die Eliminierung aus dem Körper dar. Es ist daher von Interesse die CYP Isoformen zu identifizieren, die hauptsächlich für den oxidativen Metabolismus verantwortlich sind. *In vitro* Phenotyping hat sich dabei als wertvolles Werkzeug zur Identifizierung potentieller Wirkstoff-Wirkstoff Interaktionen und zur Aufklärung von möglichen gesundheitlichen Risiken, die durch Polymorphismen verursacht werden können, herausgestellt. Der Einsatz rekombinant exprimierter CYP Isoformen in Kombination mit exprimiertem Cytochrom b_5 und NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase hat sich hier als einfache und schnelle Methodik etabliert. In *Initial Screenings* werden dabei jene Isoformen identifiziert, die am Metabolismus der untersuchten Verbindung beteiligt sind. Zusätzlich können durch die Bestimmung kinetischer Parameter erste Informationen über die Pharmakokinetik erhalten werden. So kann über die Bestimmung von v_{max} und K_m letztlich beurteilt werden, welche der im *Initial Screening* identifizierten CYP Isoformen aufgrund ihrer Aktivität maßgeblich am Metabolismus der Substanzen beteiligt sind.

Während die *Initial Screenings* für alle identifizierten Metaboliten durchgeführt wurden, konzentrieren sich die kinetischen Untersuchungen nur auf einige ausgewählte Metaboliten von besonderem Interesse.

5.2.1 Initial Screenings

Nachdem wie in Kapitel 5.1.5.2, 5.1.6.2, 5.1.9.2 und 5.1.13.2 beschrieben für die vier synthetischen Cannabinoide AM-694, JWH-122, RCS-4 und MAM-2201 durch Inkubation mit pHLM das Spektrum der *in vitro* gebildeten Metaboliten untersucht wurde, erfolgte das *Reaction Phenotyping* für dieselben Substanzen. Die *Initial Screenings* wurden mit den zehn CYP Isoformen durchgeführt, welche im Fremdstoffmetabolismus bekanntlich eine große Rolle spielen. Dazu zählen: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 und CYP3A5.

5.2.1.1 AM-694

Abbildung 41 zeigt den relativen Beitrag der zehn untersuchten Isoformen an der Bildung der sechs identifizierten Metaboliten nach 30-minütiger Inkubation. Alle Umsetzungen zu den sechs der *in vitro* gebildeten Metaboliten von AM-694 (Abbildung 42) werden von mehreren CYP Isoformen katalysiert. CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 und CYP3A5 kommt hierbei die größte Bedeutung zu, CYP2A6 und CYP2E1 haben dagegen nur einen geringen bis gar keinen Anteil an der Bildung der Metaboliten. Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass die Bildung des defluorierten Metaboliten N-(5-Hydroxypentyl)-AM-694 vor allem durch die Isoformen 1A2 und 3A5 katalysiert wird. Die Substitution eines Fluoratoms am aromatischen System wurde für den antiviralen Wirkstoff GW420867X durch Katalyse mittels CYP1A2 beschrieben^[160]. Die Umsetzungen zu zwei der monohydroxylierten Metaboliten werden durch CYP2B6 katalysiert.

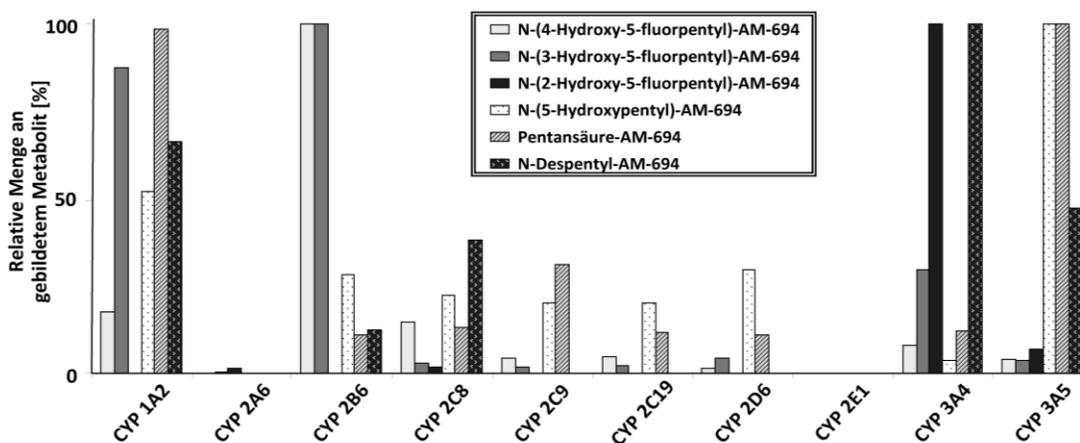


Abbildung 41: Relativer Anteil der zehn untersuchten CYP Isoformen an der Bildung der sechs identifizierten Metaboliten des AM-694 in den *Initial Screenings*.

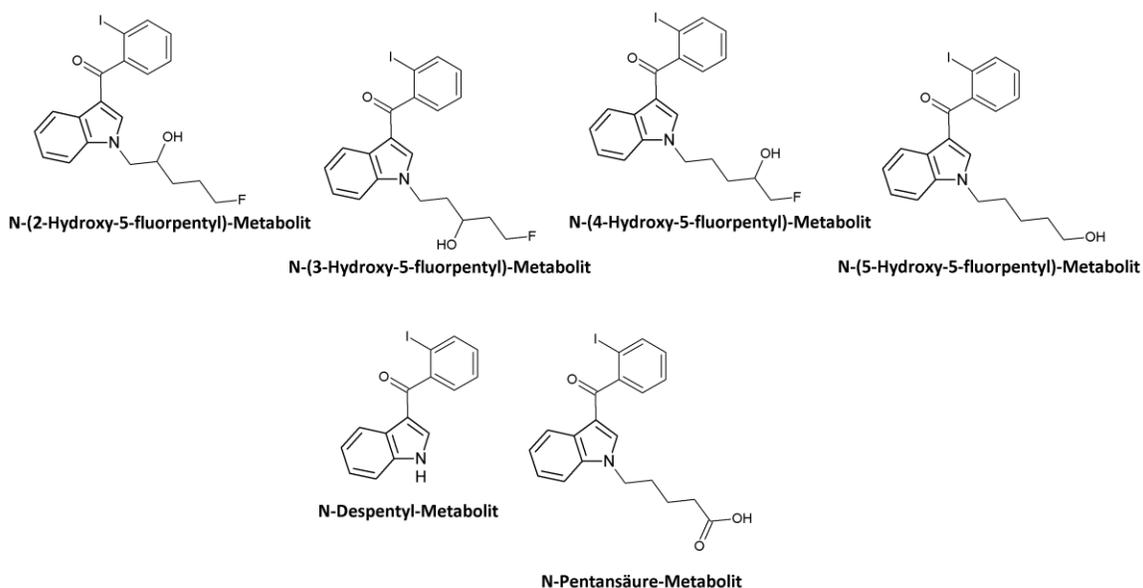


Abbildung 42: Strukturen der *in vitro* untersuchten Metaboliten des AM-694.

Aufgrund der Vielzahl der *in vitro* gebildeten Metaboliten der übrigen untersuchten Substanzen werden im Folgenden nur die Metaboliten diskutiert, welche aufgrund ihrer Identifizierung als Hauptmetaboliten von besonderem Interesse waren.

5.2.1.2 RCS-4

Für RCS-4 wurden die folgenden drei Metaboliten zur weiteren Betrachtung ausgewählt: Der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit und der Hydroxyindol-Metabolit, da es sich hierbei um die Hauptmetaboliten in Humanurin handelt, sowie der O-Desmethyl-Metabolit, der zwar *in vitro* einen Hauptmetaboliten darstellt, in Humanurin aber nicht als Hauptmetabolit detektiert wurde (Abbildung 43). Alle drei Metabolisierungsreaktionen werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Isoformen katalysiert. Der O-Desmethyl-Metabolit wird vorrangig durch CYP2D6, der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit durch CYP2C8 und der Hydroxyindol-Metabolit durch 1A2 gebildet. O-Desmethylierungen wurden bisher für eine Vielzahl an CYP Isoformen beschrieben, was gut in Einklang mit den hier erhaltenen Daten steht^[161].

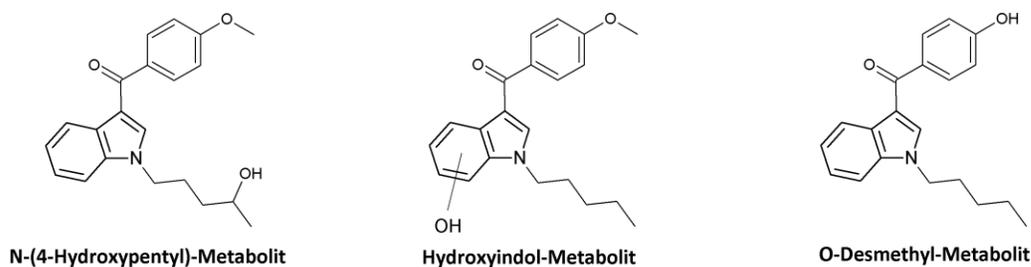


Abbildung 43: Strukturen der *in vitro* untersuchten Metaboliten des RCS-4.

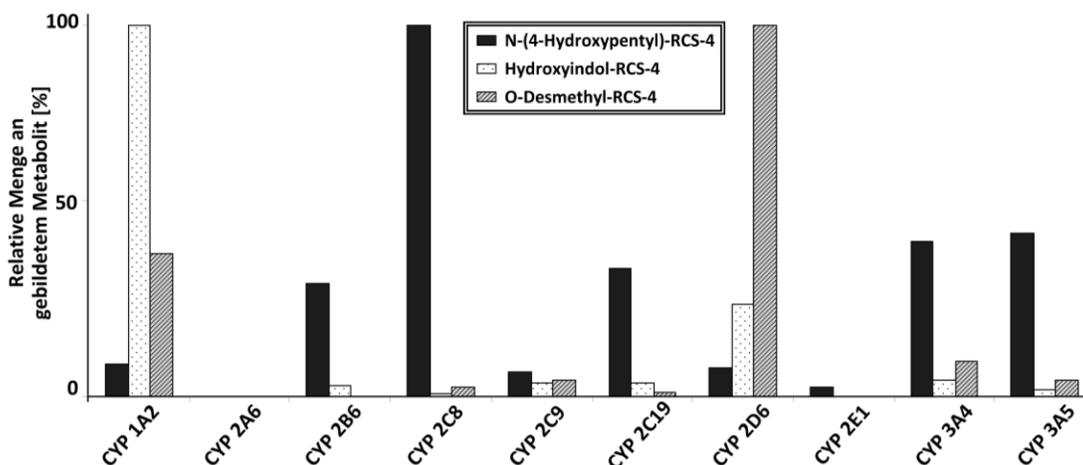


Abbildung 44: Relativer Anteil der zehn untersuchten CYP Isoformen an der Bildung der drei ausgewählten Metaboliten des RCS-4 in den *Initial Screenings*.

5.2.1.3 JWH-122

Der N-(4-Hydroxyphenyl)-Metabolit, der Hydroxynaphthyl-Metabolit sowie der 6-Hydroxyindol-Metabolit des JWH-122 (Abbildung 45) wurden als in Humanurin identifizierte Hauptmetaboliten *in vitro* weiter untersucht.

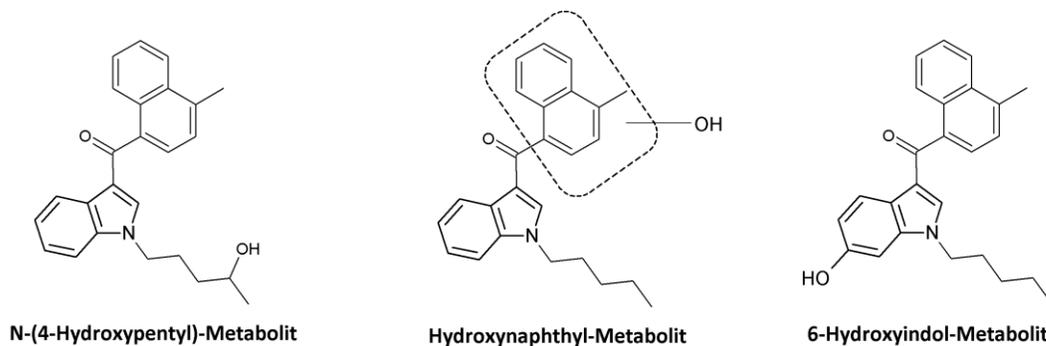


Abbildung 45: Strukturen der *in vitro* untersuchten Metaboliten des JWH-122.

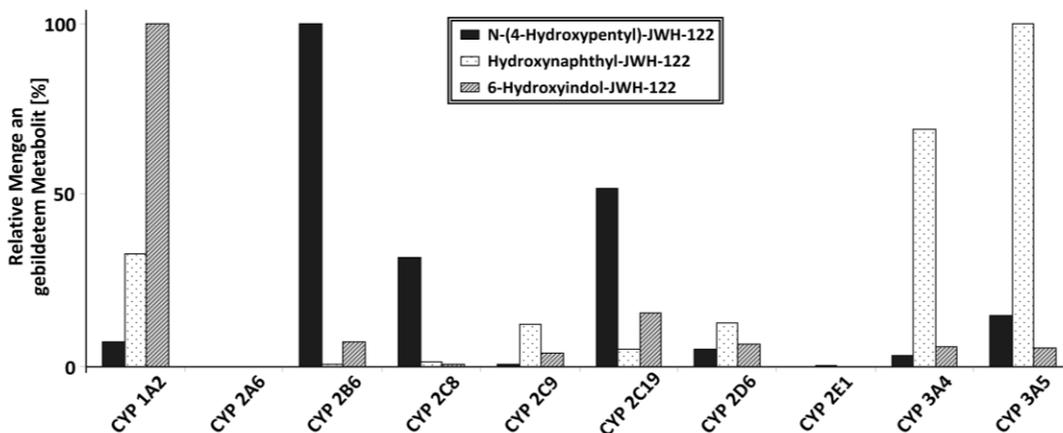


Abbildung 46: Relativer Anteil der zehn untersuchten CYP Isoformen an der Bildung der drei ausgewählten Metaboliten des JWH-122 in den *Initial Screenings*.

Wie Abbildung 46 zeigt, werden alle drei untersuchten Metaboliten von mehreren Isoformen gebildet. Die Hydroxylierung an der Pentylkette wird vorrangig durch CYP2B6, am Naphthylrest durch CYP3A4 und CYP3A5 und am Indolrest durch CYP1A2 katalysiert.

5.2.1.4 MAM-2201

In Abbildung 48 dargestellt sind die Ergebnisse des *Initial Screenings* zweier ausgewählter Metaboliten von MAM-2201 (Abbildung 47). Dabei handelt es sich um die zwei sowohl *in vivo* als auch *in vitro* identifizierten Metaboliten: der Hydroxynaphthyl-Metabolit sowie der N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit, bei dem das Fluoratom durch eine Hydroxylgruppe substituiert vorliegt. Beide Metaboliten werden von mehreren Isoformen gebildet, vor allem durch CYP3A5 bzw. CYP2C8.

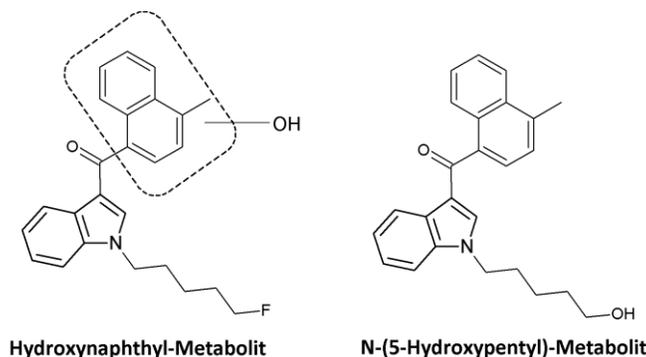


Abbildung 47: Strukturen der *in vitro* untersuchten Metaboliten des MAM-2201.

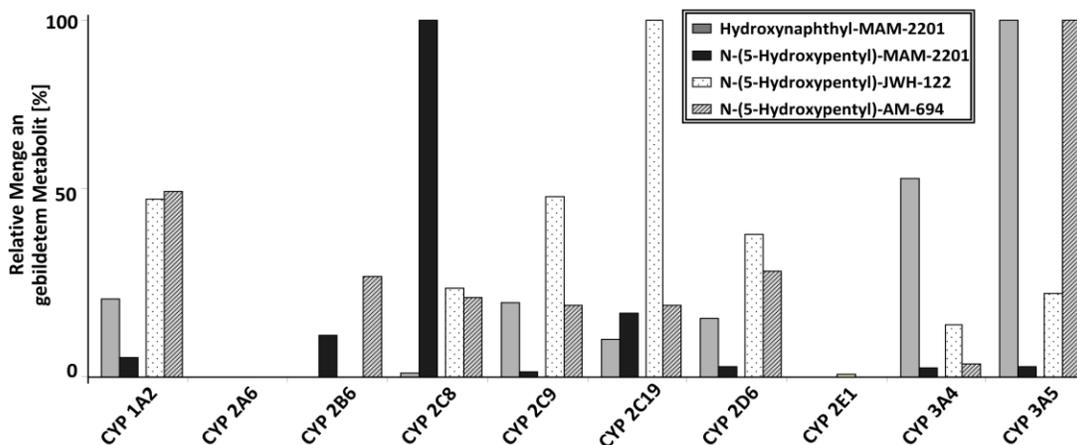


Abbildung 48: Relativer Anteil der zehn untersuchten CYP Isoformen an der Bildung der zwei ausgewählten Metaboliten des MAM-2201 in den *Initial Screenings*. Zum Vergleich ist die Bildung des N-(5-Hydroxypentyl)-JWH-122 (entspricht strukturell dem N-(5-Hydroxypentyl)-MAM-2201) sowie die des Analogons des AM-694 dargestellt.

Der N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit des MAM-2201 und der N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit des JWH-122 sind identisch. Ihre Bildung verläuft wie in Abbildung 48 dargestellt bevorzugt über unterschiedliche CYP Isoformen, was aufgrund der unterschiedlichen zugrundeliegenden Mechanismen nicht überraschend ist. Während die Bildung des N-(5-Hydroxypentyl)-MAM-2201 größtenteils von CYP2C8 katalysiert wird und die restlichen Isoformen einen eher untergeordneten Beitrag leisten, wird N-(5-Hydroxypentyl)-JWH-122 größtenteils über CYP2C19, 2C9, 1A2 und 2D6 gebildet.

Vergleicht man die beiden fluorierten synthetischen Cannabinoide AM-694 und MAM-2201, so fällt auf, dass die Substitution des Fluoratoms durch eine Hydroxylgruppe durch unterschiedliche CYP Isoformen katalysiert wird (Abbildung 48). Bei *in vitro* Untersuchungen von *Chimalakonda et al.* wurde CYP2C9 als die Isoform identifiziert, die hauptsächlich für die Umsetzung von AM-2201 zum korrespondierenden N-(5-Hydroxypentyl)-Metaboliten verantwortlich ist^[132].

Auffällig für alle vier synthetischen Cannabinoide ist sowohl die Vielfalt der an der Bildung beteiligten Isoformen, als auch dass CYP2A6 und CYP2E1 nur eine untergeordnete Rolle im Metabolismus der Substanzen aufzuweisen scheinen.

5.2.2 Kinetikstudien

5.2.2.1 AM-694 und MAM-2201

Während die *Initial Screenings* nur einen Überblick über die generell zu der Reaktion befähigten Isoformen geben, kann über die Bestimmung bestimmter kinetischer Parameter ein erster Einblick in die Pharmakokinetik der Substanzen gewonnen werden. Zudem kann ermittelt werden, welche Isoformen wahrscheinlich maßgeblich am Metabolismus beteiligt sind. Zunächst wurde mittels der *Relative Activity Factor* (RAF)-Methode (siehe 4.2.3) der prozentuale Beitrag der jeweiligen Isoformen an der Umsetzung durch pHLM ermittelt. Die Ergebnisse für die Metaboliten von AM-694 und MAM-2201 sind in Tabelle 17 und Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 17: Beitrag [%] der jeweiligen Isoformen zur Bildung der sechs Metaboliten des AM-694 durch pHLM.

	N-(4-Hydroxy-5-fluorpentyl)-AM-694	N-(3-Hydroxy-5-fluorpentyl)-AM-694	N-(2-Hydroxy-5-fluorpentyl)-AM-694	N-(5-Hydroxy-pentyl)-AM-694	Pentansäure-AM-694	N-Despentyl-AM-694
1A2	19	54	-	13	11	24
2A6	-	2	22	-	-	-
2B6	28	23	-	2	-	1
2C8	24	2	3	12	2	20
2C9	13	3	-	15	69	-
2C19	-	-	-	-	-	-
2D6	-	-	-	1	-	-
2E1	1	-	-	-	-	-
3A4	4	10	56	1	-	18
3A5	11	5	19	57	17	37

Unter Einbeziehung des RAF-Faktors wird deutlich, dass sich die Beiträge der einzelnen Isoformen im Vergleich zu den Daten aus den *Initial Screenings* etwas verschieben. Somit tragen beispielsweise zur Bildung des N-(4-Hydroxy-5-fluorpentyl)-AM-694 vor allem CYP2B6, 2C8 und 1A2 bei, während in den Initial Screenings CYP2B6 klar dominierte. Vor allem wird deutlich, dass CYP 2C8 und CYP3A4 maßgeblich am Metabolismus von AM-694 beteiligt sind, da sie fast alle Metaboliten zu bilden vermögen. CYP3A5 ist mit 57% stark an der Bildung des defluorierten Metaboliten beteiligt. Da für CYP2C9 einige Polymorphismen bekannt sind, wären hier individuelle Varianten im Metabolismus denkbar. Die Bestimmung weiterer kinetischer Parameter, sowie der substratspezifischen Aktivitätsverringering der unterschiedlichen

allelischen Varianten des CYP2C9 wären nötig, um genauere Aussagen über die möglichen Wechselwirkungen im Metabolismus von genetisch disponierten Individuen treffen zu können.

Tabelle 18: Beitrag [%] der jeweiligen Isoformen zur Bildung zweier Metaboliten des MAM-2201 durch pHLM.

	Hydroxynaphthyl- MAM-2201	N-(5-Hydroxypentyl)- MAM-2201
1A2	4	3
2A6	0	0
2B6	0	11
2C8	0	75
2C9	2	2
2C19	0	0
2D6	0	0
2E1	0	0
3A4	8	1
3A5	85	8

Interessanterweise ist für die Defluorierung des MAM-2201 nicht wie bei AM-694 CYP3A5, sondern CYP2C8 maßgeblich verantwortlich. Der Hydroxynaphthyl-Metabolit wird fast ausschließlich durch CYP3A5 gebildet. CYP3A4, welches in den *Initial Screenings* noch einen erheblichen Anteil zur Bildung zu leisten schien, ist mit 8% nur noch in geringem Ausmaß an der Hydroxylierung am Naphthylrest beteiligt.

5.2.2.2 RCS-4 und JWH-122

Für die synthetischen Cannabinoide RCS-4 und JWH-122 wurden zusätzlich weitere kinetische Parameter bestimmt, welche eine Normierung von *in vitro* Kinetiken auf die *in vivo Clearance* („*in vitro-in vivo scaling*“) ermöglichen. Dazu wurden zunächst über Eadie-Hofstee-Diagramme die Kinetikmodelle ermittelt, die für die jeweilige CYP-katalysierte Reaktion am geeignetsten erschienen und diese dann weiter über den F-Test verifiziert (siehe 4.2.4.2). Verwendete Zeitpunkte und Enzymkonzentrationen wurden so gewählt, dass sie innerhalb des linearen Bereiches der Metabolitenbildung lagen (Enzym- und Zeitabhängigkeit). Die verwendeten Substratkonzentrationen waren kleiner als 10% K_m . Die Kinetikdiagramme sind im Anhang (Abbildung A1 bis Abbildung A 51) dargestellt.

Tabelle 19: Kinetische Daten und angewandte Kinetikmodelle zur Bildung des N-(4-Hydroxyphenyl)-RCS-4. K ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) steht für K_m im Falle einer Michaelis-Menten Kinetik bzw. für K_{half} im Falle eines allosterischen Verhaltens (Hill Kinetik); v_{max} ist in $\text{PAR} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol Enzym} \pm \text{SD}$ angegeben.

	N-(4-Hydroxyphenyl)-RCS-4							
	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	3A4	3A5	pHLM
Kinetik	MM	MM	Hill	MM	Hill	MM	MM	MM
K	$9,4 \pm 2,4$	$12,5 \pm 1,9$	$7,0 \pm 0,77$	$1,0 \pm 0,44$	$1,6 \pm 0,11$	$3,8 \pm 0,7$	$4,4 \pm 0,8$	$42 \pm 5,2$
v_{max}	$0,15 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01$	$0,54 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	$3,7 \pm 0,13$	$3,6 \pm 0,13$	$3,6 \pm 0,13$
h			$1,73 \pm 0,19$		$3,46 \pm 1,15$			
RAF	21,6	6,5	48,0	107,4	1,5	13,2	49,0	
Contribution ($v_{\text{max}} \cdot \text{RAF}$)	3,3415	2,2003	25,7952	6,8365	0,4287	49,2982	177,1583	
Intrinsic Clearance (contribution/K)	0,3543	0,1755	3,6620	9,9382	0,2686	13,0350	40,6420	
Clearance	0,52%	0,26%	5,38%	14,60%	0,39%	19,15%	59,70%	

Tabelle 20: Kinetische Daten und angewandte Kinetikmodelle zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4. K ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) steht für K_m im Falle einer Michaelis-Menten Kinetik; v_{max} ist in $\text{PAR} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol Enzym} \pm \text{SD}$ angegeben.

	Hydroxyindol-RCS-4							
	1A2	2B6	2C9	2C19	2D6	3A4	3A5	pHLM
Kinetik	MM	MM	SI	MM	MM	BP	SI	BP
K	$13 \pm 2,7$	$7,4 \pm 1,5$	$2,9 \pm 0,68$	$4,4 \pm 0,83$	$26 \pm 7,8$	$4,7 \pm 1,9$	$20 \pm 7,1$	$5,1 \pm 1,1$
v_{max}	$0,8 \pm 0,04$	$0,01 \pm 4,5 \cdot 10^{-4}$	$0,013 \pm 9,4 \cdot 10^{-4}$	$0,016 \pm 6,3 \cdot 10^{-4}$	$0,26 \pm 0,02$	$1,0 \pm 0,01$	$0,062 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,009$
K_i bzw. L			757 ± 301			$2,4 \cdot 10^{-4} \pm 5,3 \cdot 10^{-5}$	388 ± 184	$2,8 \cdot 10^{-4} \pm 3,6 \cdot 10^{-5}$
RAF	21,6	6,5	107,4	1,5	1,7	13,2	49,0	
Contribution ($v_{\text{max}} \cdot \text{RAF}$)	17,3189	0,0681	1,4274	0,0253	0,4485	1,3033	3,0554	
Intrinsic Clearance (contribution/K)	1,3302	0,0092	0,4955	0,0057	0,0171	0,2757	0,1525	
Clearance	58,19%	0,40%	21,67%	0,25%	0,75%	12,06%	6,67%	

Tabelle 21: Kinetische Daten und angewandte Kinetikmodelle zur Bildung des O-Desmethyl-RCS-4. K ist in $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ angegeben; v_{max} ist in $\text{PAR} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}$ Enzym $\pm \text{SD}$ angegeben.

	O-Desmethyl-RCS-4				
	1A2	2D6	3A4	3A5	pHLM
Kinetik	Hill	BP	BP	BP	BP
K	$17 \pm 1,0$	$8,8 \pm 5,8$	$5,2 \pm 2,3$	$13 \pm 3,5$	$6,8 \pm 1,7$
v_{max}	$2,0 \pm 0,07$	$3,1 \pm 0,76$	$1,3 \pm 0,18$	$1,1 \pm 0,12$	$1,2 \pm 0,10$
h bzw. L	$3,7 \pm 0,86$	$0,009 \pm 0,002$	$0,007 \pm 7,5 \cdot 10^{-4}$	$0,001 \pm 4,2 \cdot 10^{-4}$	$0,009 \pm 3,9 \cdot 10^{-4}$
RAF	21,6	1,7	13,2	49,0	
Contribution ($v_{\text{max}} \cdot \text{RAF}$)	42,7248	5,3397	17,4087	55,1965	
Intrinsic Clearance (contribution/K)	2,4526	0,6084	3,3325	4,0378	
Clearance	23,51%	5,83%	31,95%	38,71%	

Tabelle 22: Kinetische Daten und angewandte Kinetikmodelle zur Bildung des N-(4-Hydroxyphenyl)-JWH-122. K ($\mu\text{M} \pm \text{SD}$) steht für K_m im Falle einer Michaelis-Menten Kinetik bzw. für K_{half} im Falle eine allosterischen Verhaltens (Hill Kinetik); v_{max} ist in $\text{PAR} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol}$ Enzym $\pm \text{SD}$ angegeben.

	N-(4-Hydroxyphenyl)-JWH-122							
	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A5	pHLM
Kinetik	MM	MM	Hill	MM	MM	Hill	MM	MM
K	$6,4 \pm 2,7$	$5,9 \pm 1,6$	$5,0 \pm 0,46$	$2,9 \pm 1,5$	$2,7 \pm 0,28$	$3,9 \pm 4,4$	$10 \pm 2,2$	$6,2 \pm 2,0$
v_{max}	$0,15 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,01$	$0,016 \pm 0,002$	$0,82 \pm 0,02$	$0,011 \pm 6,6 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \pm 0,08$	$0,31 \pm 0,02$
h			$1,5 \pm 0,13$			$4,8 \pm 16$		
RAF	21,6	6,5	48,0	107,4	1,5	13,2	49,0	
Contribution ($v_{\text{max}} \cdot \text{RAF}$)	3,1860	3,6933	17,4768	1,7593	1,2513	0,1553	56,4220	
Intrinsic Clearance (contribution/K)	0,4938	0,6245	3,4683	0,6139	0,4676	0,0397	5,6694	
Clearance	4,34%	5,49%	30,48%	5,40%	4,11%	0,35%	49,83%	

Tabelle 23: Kinetische Daten und angewandte Kinetikmodelle zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH-122. K_m ist in $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ angegeben; v_{max} ist in $\text{PAR} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol Enzym} \pm \text{SD}$ angegeben.

	Hydroxynaphthyl-JWH-122						
	1A2	2C8	2C9	2C19	3A4	3A5	pHLM
Kinetik	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
K_m	$6,5 \pm 2,9$	$12 \pm 3,7$	$1,6 \pm 0,54$	$11 \pm 1,8$	$7,8 \pm 3,4$	$8,3 \pm 1,9$	$5,4 \pm 2,1$
v_{max}	$0,15 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,01$	$1,6 \pm 0,12$	$0,92 \pm 0,04$	$28 \pm 5,0$	$35 \pm 2,6$	$15,7 \pm 1,5$
RAF	21,6	48,0	107,4	1,5	13,2	49,0	
Contribution ($v_{\text{max}} \cdot \text{RAF}$)	3,1860	6,4848	176,5778	1,4078	372,0221	1740,2100	
Intrinsic Clearance (contribution/K)	0,4939	0,5209	113,7011	0,1231	47,9163	208,8336	
Clearance	0,13%	0,14%	30,60%	0,03%	12,89%	56,20%	

Tabelle 24: Kinetische Daten und angewandte Kinetikmodelle zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH-122. K_m ist in $\mu\text{M} \pm \text{SD}$ angegeben; v_{max} ist in $\text{PAR} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{pmol Enzym} \pm \text{SD}$ angegeben.

	6-Hydroxyindol-JWH-122								
	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4	3A5	pHLM
Kinetik	MM	MM	SI	MM	MM	SI	MM	MM	MM
K_m	$6,1 \pm 2,5$	$5,2 \pm 1,7$	63 ± 30	$0,92 \pm 0,25$	$1,7 \pm 0,22$	$13 \pm 5,1$	$6,8 \pm 2,7$	$9,9 \pm 2,5$	$6,3 \pm 2,1$
v_{max}	$5,8 \pm 0,60$	$0,15 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,04$	$0,82 \pm 0,13$	$1,0 \pm 0,08$	$0,66 \pm 0,06$
K_i			32 ± 15			76 ± 28			
RAF	21,6	6,5	48,0	107,4	1,5	1,7	13,2	49,0	
Contribution ($v_{\text{max}} \cdot \text{RAF}$)	126,1008	0,9490	3,9235	25,7885	1,1594	0,3026	10,8944	49,2161	
Intrinsic Clearance (contribution/K)	20,5443	0,1825	0,0620	27,8825	0,6959	0,0222	1,6106	4,9955	
Clearance	36,69%	0,33%	0,11%	49,79%	1,24%	0,04%	2,88%	8,92%	

Zur Berechnung der *intrinsic Clearance* (CL_{int}) wurden die ermittelten kinetischen Konstanten (K) unabhängig vom kinetischen Modell angewandt. Eine Übertragung der *in vitro* Daten auf eine *in vivo* Clearance ist nicht ohne weiteres möglich, kann aber in einigen Fällen zur Aufklärung bestimmter Metabolisierungsfragen beitragen.

Die kinetischen Daten zu den drei untersuchten Metaboliten des RCS-4 sind in den Tabelle 19, Tabelle 20 und Tabelle 21 aufgeführt. Die Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten folgt bei den meisten Isoformen einer Michaelis-Menten-Kinetik, mit Ausnahme der Isoformen 2C8 und 3A5, deren kooperatives Verhalten besser durch die Hill-Kinetik beschrieben wird. CYP3A5 ist mit fast 60% hauptsächlich an der Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten beteiligt. Die Bildung des Hydroxyindol-Metaboliten wird größtenteils von CYP1A2 vermittelt und folgt einer Michaelis-Menten Kinetik. CYP2C9 und CYP3A4 tragen mit 22% und 12% ebenfalls zu dieser Metabolisierungsreaktion bei, diese Reaktionen lassen sich kinetisch besser mittels Substratinhibierung bzw. einer biphasischen Kinetik beschreiben. Auffallend ist die hohe CL_{int} des N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten bei CYP3A5 im Vergleich zu der des CYP1A2 des Hydroxyindol-Metaboliten. Möglicherweise trägt die schnelle Verstoffwechslung des N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten dazu bei, dass dieser bisher in den untersuchten Urinproben nicht detektiert wurde. Dafür spricht unter anderem auch, dass mehrfach oxidierte Metaboliten mit einer Hydroxygruppe an der Alkylkette in Urinproben detektiert wurden^[148]. Der O-Desmethyl-Metabolit wird zu ungefähr gleichen Teilen von CYP1A2, CYP3A4 und CYP3A5 gebildet. Dass dieser Metabolit in den untersuchten Urinproben nicht detektiert wurde, lässt sich mit Hilfe der dargestellten kinetischen Parameter nicht ohne weiteres erklären.

Die *in vitro* untersuchten Metabolisierungsreaktionen des JWH-122 zu den drei Hauptmetaboliten lassen sich in den meisten Fällen mittels einer Michaelis-Menten Kinetik beschreiben (Tabelle 22, Tabelle 23, Tabelle 24). Die Umsetzungen durch CYP2C8 und CYP2D6 zum N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten folgen einer Hill-Kinetik. Für die Bildung des 6-Hydroxyindol-Metaboliten durch CYP2C8 bzw. durch CYP2D6 wurde eine Inhibierung bei hoher Substratkonzentration beobachtet. CYP3A5 und CYP2C8 sind maßgeblich an der Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-Metaboliten beteiligt, CYP3A5 und CYP2C9 an der Bildung des Hydroxynaphthyl-Metaboliten und CYP3C9 und CYP1A2 an der des 6-Hydroxyindol-Metaboliten. Dass in einigen untersuchten Urinproben der Hydroxynaphthyl-Metabolit als der Metabolit mit der höchsten Signalstärke detektiert wurde, lässt sich aufgrund der auffallend hohen *Intrinsic Clearance* der durch die CYP2C9 und CYP3A5 Isoformen katalysierten Reaktionen begründen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass vor allem die Isoformen CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 und CYP3A5 maßgeblich an der Metabolisierung von RCS-4 und JWH-122 beteiligt sind. Die untersuchten Metaboliten des RCS-4 und des JWH-122 werden meist durch mehrere CYP Isoformen

gebildet, womit sich möglicherweise vorliegende Polymorphismen wahrscheinlich nur in geringem Maße auf die Metabolisierung dieser synthetischen Cannabinoide auswirken.

Die Übertragbarkeit der *in vitro* ermittelten kinetischen Konstanten auf das *in vivo* Verhalten der hepatischen Enzyme ist zwar näherungsweise gegeben^[118, 162], es sind ihr jedoch auch Grenzen gesetzt. Weitere Reaktionswege im komplexen menschlichen Organismus, wie zum Beispiel Phase-II-Reaktionen, Metabolisierung durch andere Nicht-CYP-Enzyme oder extrahepatische Metabolisierungsreaktionen können das Metabolitenprofil entscheidend beeinflussen. Zusätzliche Untersuchungen zur Aufklärung dieser Fragestellungen, sowie zur Verifizierung der hier dargestellten Daten in beispielsweise Zellsystemen (Hepatocyten) oder mittels enzymselektiver Inhibitoren sind notwendig.

Polymorphismen mit klinischer Bedeutung sind vor allem bei den CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 Genen zu finden^[163]. Wie die oben bestimmten kinetischen Parameter zeigen, werden einige der untersuchten Metaboliten intensiv durch CYP2C9 metabolisiert. Zwar kann nach den vorliegenden Daten im Falle eines „*poor metabolizers*“ (PM) die Reaktion durch andere CYP Isoformen katalysiert werden, eine erhöhte Aktivität des CYP2C9 im Falle eines „*extensive metabolizers*“ (EM) könnte allerdings zu einer beschleunigten Bildung der Metaboliten und deren Anreicherung im Plasma führen. Da für einige Metaboliten von JWH-018 und JWH-073 gezeigt wurde, dass diese eine CB₁-Rezeptoraffinität aufweisen, welche noch höher ist, als die des THC^[130-132], können erhöhte Plasmakonzentrationen der Metaboliten unter anderem Auswirkungen auf die Intensität oder die Dauer der ausgelösten Wirkung haben. Da Polymorphismen jedoch substratabhängig sind^[164], wäre in weiteren Studien zunächst eine genauere Untersuchung der allelischen Varianten in Bezug auf den Metabolismus der diskutierten synthetischen Cannabinoide notwendig. Kinetische Untersuchungen zum Phase-II-Metabolismus der Substanzen und deren Eliminierung aus dem Körper wären hilfreich. Wechselwirkungen beim Beikonsum anderer Substanzen oder Medikamente können durch Inhibierung der beteiligten CYP Isoformen das Profil des Metabolismus verschieben.

5.3 Methode zum Nachweis der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urinproben

Die in Kapitel 5.1 identifizierten Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide wurden zur Entwicklung einer LC-MS/MS Methode herangezogen, welche durch die kontinuierliche Aufnahme neu identifizierter Metaboliten ständig aktualisiert wurde, um so eine Detektion aller praxisrelevanten synthetischen Cannabinoide zu ermöglichen. Zu Beginn dieser Arbeit war der Nachweis des Konsums synthetischer Cannabinoide nur in Blut- oder Serumproben etabliert. Bei einigen Fragestellungen ist die Untersuchung von Urinproben von Vorteil. Die Probenahme ist im Vergleich zu einer Blutabnahme nicht invasiv und ermöglicht somit eine Untersuchung in solchen Fällen, in denen eine Blutentnahme aus beispielsweise rechtlichen Gründen nicht möglich ist. Vor allem zum Abstinenznachweis bei Fahreignungsuntersuchungen oder in Therapieeinrichtungen bietet die Urinanalytik hier einen entscheidenden Vorteil. Zudem sind konsumierte Substanzen im Urin meist über einen längeren Zeitraum nachweisbar als in Blut- oder Serumproben, weshalb mittels der Urinanalytik in vielen Fällen auch ein bereits länger zurückliegender Konsum noch nachgewiesen werden kann.

Zur Erstellung der LC-MS/MS-Methode wurden zunächst für alle identifizierten Hauptmetaboliten selektive Ionenübergänge in eine MRM-Methode integriert und zur Erhöhung der Sensitivität der Methode das „*scheduled*-MRM (sMRM)“ eingeführt. Dabei werden die substanzspezifischen MRM-Übergänge nur in einem festgelegten Zeitfenster um die definierte Retentionszeit gemessen, wodurch die Anzahl der gemessenen MRM-Übergänge pro Zeiteinheit verringert und die Sensitivität der Methode erhöht wird. Sobald Referenzmaterialien erwerblich waren wurden die identifizierten Hauptmetaboliten mit den Referenzstandards verglichen, um die genaue Position der eingeführten funktionellen Gruppe zu bestimmen. Für einige synthetische Cannabinoide wurden im Zuge einer Kooperation mit dem Institut für pharmazeutische Chemie der Universität Freiburg Metaboliten als Referenzsubstanzen synthetisiert. Der Vergleich der Referenzsubstanzen mit den identifizierten Hauptmetaboliten erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten sowie der MS/MS-Spektren.

Abbildung 49 zeigt das MRM-Chromatogramm einer Leerurinprobe, welche mit einer Referenzlösung der erhältlichen Metaboliten von JWH-018 (Konzentration 1 ng/mL) aufdotiert wurde sowie zum Abgleich ein MRM-Chromatogramm einer authentischen Urinprobe nach erfolgter Probenaufarbeitung. Bis auf den N-(2-Hydroxypentyl)-Metaboliten werden alle N-Pentylkettenhydroxylierten Metaboliten detektiert, wobei der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit in der höchsten Konzentration vorliegt. Bezüglich der Hydroxyindol-Metaboliten wurde vor allem der 6-Hydroxyindol-Metabolit, sowie in geringen Konzentrationen der 5-Hydroxyindol-Metabolit in den authentischen Urinproben detektiert. Während der 7-Hydroxyindol-Metabolit bisher in keiner der untersuchten

Urinproben detektiert wurde (n = 7099, davon 742 Proben positiv auf Metaboliten des JWH-018), war der 4-Hydroxyindol-Metabolit in wenigen Urinproben mit sehr hohen Konzentrationen der restlichen Metaboliten nachweisbar.

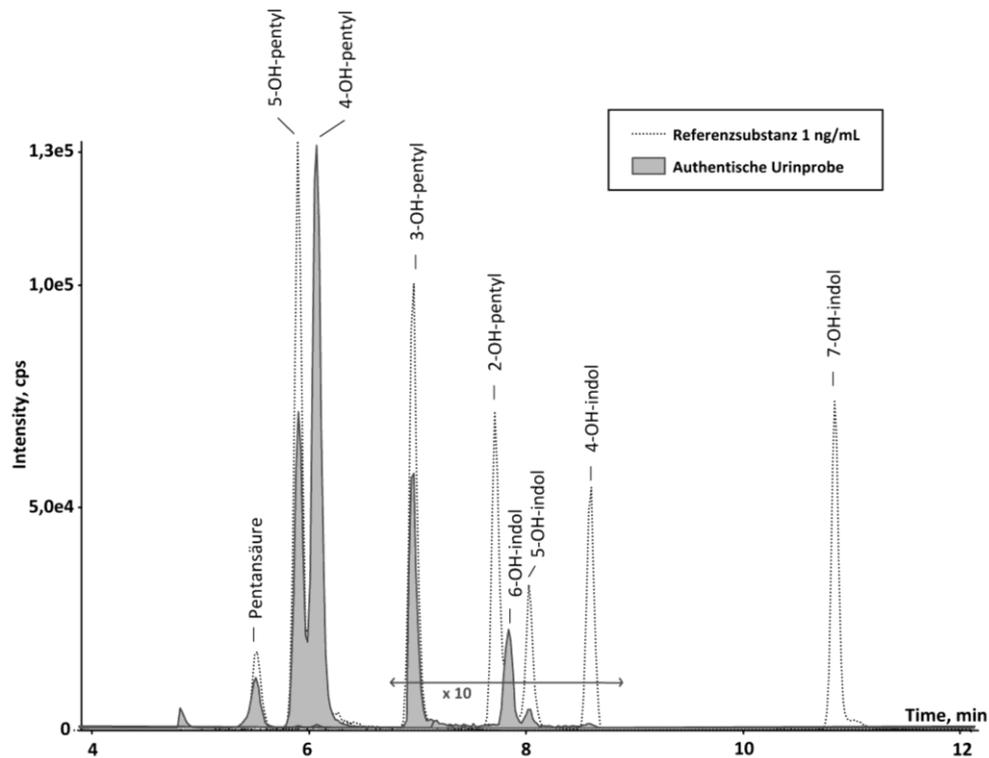


Abbildung 49: MRM-Chromatogramme einer mit Referenzstandardlösung der Metaboliten des JWH-018 aufdotierten Leerurinprobe (Konzentration 1 ng/mL) sowie einer authentischen Urinprobe, die positiv auf die Metaboliten des JWH-018 getestet wurde.

Über den Abgleich der Retentionszeiten der übrigen Metaboliten anderer synthetischer Cannabinoide wurden entsprechend dem dargestellten Beispiel die identifizierten Metaboliten in Humanurin genauer charakterisiert. Eine Übersicht ist in Tabelle A 2 und Tabelle A 3 im Anhang zu finden.

5.3.1 Validierung der Methode

Die hier vorgestellte Methode zum Nachweis der Metaboliten synthetischer Cannabinoide im Urin wurde auf Grundlage der in Kapitel 5.1 identifizierten Hauptmetaboliten entwickelt. Soweit Referenzmaterial vorhanden war, erfolgte die Entwicklung einer quantitativen Methode, welche gleichzeitig für alle nicht quantifizierbaren Metaboliten als qualitative Screeningmethode diene. Die Methode wurde nach den Richtlinien der GTFCh validiert^[120].

5.3.1.1 Kalibrationsmodell, Selektivität und Spezifität

Für alle quantitativ zu bestimmenden Verbindungen wurde eine Linearität zwischen der Peakfläche und der Konzentration vom niedrigsten zum höchsten Kalibrator mittels Mandel-Test (Signifikanz 99%) gezeigt (Linearitätsbereiche siehe Tabelle 25). Um eine Varianzenhomogenität zu erreichen, wurde für alle Substanzen der Wichtungsfaktor 1/x herangezogen. Leer- und Nullproben zeigten keinerlei Interferenzen in den verwendeten MRM-Übergängen, mit der Ausnahme des N-(3-Hydroxybutyl)-JWH-073, dessen Nachweisgrenze daher auf 0,25 ng/mL erhöht wurde.

Tabelle 25: Linearitätsbereich, LOD (Limit of Detection = Nachweisgrenze) und LLOQ (Lower Limit of Quantification = Bestimmungsgrenze) der Metaboliten.

Analyt	Linearitätsbereich [ng/mL]	LOD [ng/mL]	LLOQ [ng/mL]
AM-2201 4-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
AM-2201 6-OH-indol	0,05-10	0,010	0,05
JWH-018 2-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
JWH-018 3-OH-pentyl	0,05-10	0,010	0,05
JWH-018 4-OH-indol	0,05-10	0,001	0,05
JWH-018 4-OH-pentyl	0,05-10	0,010	0,05
JWH-018 5-OH-indol	0,05-10	0,025	0,05
JWH-018 5-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
JWH-018 6-OH-indol	0,05-10	0,050	0,05
JWH-018 Pentansäure	0,1-10	0,010	0,10
JWH-019 6-OH-hexyl	0,05-10	0,010	0,05
JWH-019 5-OH-indol	0,05-10	0,025	0,05
JWH-073 3-OH-butyl	0,25-10	0,100	0,25
JWH-073 4-OH-butyl	0,1-10	0,025	0,10
JWH-073 6-OH-indol	0,05-10	0,050	0,05
JWH-073 Butansäure	0-1-10	0,025	0,10
JWH-081 5-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
JWH-122 2-OH-pentyl	0,05-10	0,010	0,05
JWH-122 3-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
JWH-122 4-OH-pentyl	0,05-10	0,010	0,05
JWH-122 5-OH-indol	0,05-10	0,010	0,05
JWH-122 5-OH-pentyl	0,05-10	0,001	0,05
JWH-122 6-OH-indol	0,05-10	0,025	0,05
JWH-122 Pentansäure	0,05-10	0,010	0,05
JWH-210 4-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
JWH-210 5-OH-indol	0,05-10	0,025	0,05

Analyt	Linearitätsbereich [ng/mL]	LOD [ng/mL]	LLOQ [ng/mL]
JWH-210 5-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
JWH-210 Pentansäure	0,05-10	0,025	0,05
JWH-250 4-OH-pentyl	0,05-10	0,025	0,05
JWH-250 5-OH-Indol	0,1-10	0,100	0,10
JWH-250 5-OH-pentyl	0,1-10	0,050	0,10
JWH-398 4-OH-pentyl	0,25-10	0,050	0,25
JWH-398 5-OH-pentyl	0,1-10	0,050	0,10
JWH-398 Pentansäure	0,05-10	0,050	0,05
UR-144 4-OH-pentyl	0,05-10	0,050	0,05
UR-144 5-OH-pentyl	0,05-10	0,010	0,05
UR-144 Pentansäure	0,05-10	0,050	0,05

Eine mit anderen relevanten Wirkstoffen (darunter Benzodiazepine, THC, basische Drogen) oder deren Metaboliten aufdotierte Leerprobe zeigte keine Interferenzen. Das Carry-over nach der Injektion einer Probe, aufdotiert auf 100 ng/mL, lag unterhalb der Detektionslimits der jeweiligen Substanzen.

5.3.1.2 Genauigkeit und Präzision

Die Daten zu Genauigkeit und Präzision sind in Tabelle 26 dargestellt. Die RSDs für Wiederhol- und tagesverschiedene Laborpräzision bzw. die Werte des systematischen Fehlers (Bias) zur Bestimmung der Genauigkeit liegen wie nach den Richtlinien der GTFCh gefordert für alle Analyten unter 15% bzw. unter 20% nahe der Bestimmungsgrenze.

Tabelle 26: Genauigkeitsdaten der Methode. Relative Standardabweichungen liegen wie gefordert $\leq 15\%$ bzw. $\leq 20\%$ nahe der Bestimmungsgrenze.

Analyt	Wiederholpräzision (RSD,%) (n=16)			Laborpräzision (RSD,%) (n=8)			Genauigkeit (Bias,%) (n=8)		
	0,07 ng/mL	0,7 ng/mL	7 ng/mL	0,07 ng/mL	0,7 ng/mL	7 ng/mL	0,07 ng/mL	0,7 ng/mL	7 ng/mL
AM-2201 4-OH-pentyl	8,3	6,3	3,5	9	8,8	3,8	-9,8	-2,1	-0,4
AM-2201 6-OH-indol	7,4	6,4	2,9	8	7,5	4	-8,4	1,1	4
JWH-018 2-OH-pentyl	10,9	6,6	6,5	11,9	9,9	7,8	-8,1	1,2	1,1
JWH-018 3-OH-pentyl	6,90	6,8	5,7	8,6	9,1	6,2	-2,3	-2,1	0,9
JWH-018 4-OH-indol	14,2	6,7	4,4	16,6	8,4	4,5	-0,8	1,4	4,3
JWH-018 4-OH-pentyl	7,7	4,4	8,7	10,8	10,6	9,9	-10,1	-0,1	1,8
JWH-018 5-OH-indol	5,2	7,3	7	10,5	9,7	7,3	8	-3,3	1,7
JWH-018 5-OH-pentyl	9	5,1	2,3	14,8	7,7	5,5	-10,3	2,9	2,2
JWH-018 6-OH-indol	11,3	12,1	7,8	13,7	12,1	7,6	6,7	-0,01	1,5
JWH-018 Pentansäure	-	7,4	4	-	9,3	4	-	-3,3	-2,5
JWH-019 6-OH-hexyl	9,5	6,4	7,3	12	10,4	7,7	-9,5	3,1	2,1
JWH-019 5-OH-indol	7,8	5,3	3,3	11,1	7,1	3,3	-5	-0,7	3,2
JWH-073 3-OH-butyl	-	5,8	2,5	-	9,7	4,1	-	-3,4	1
JWH-073 4-OH-butyl	-	6,1	2,8	-	8,4	3,5	-	-4,5	-3,4
JWH-073 6-OH-indol	10	8,1	6,1	13,3	10,9	6,1	3,7	-0,05	0,81
JWH-073 Butansäure	-	6	3,5	-	3,1	4	-	-3,1	-3,5

Analyt	Wiederholpräzision (RSD,%) (n=16)			Laborpräzision (RSD,%) (n=8)			Genauigkeit (Bias,%) (n=8)		
	0,07 ng/mL	0,7 ng/mL	7 ng/mL	0,07 ng/mL	0,7 ng/mL	7 ng/mL	0,07 ng/mL	0,7 ng/mL	7 ng/mL
JWH-081 5-OH-pentyl	9,5	7,1	2,4	9,5	8,9	3,9	-12,5	1,7	2,9
JWH-122 2-OH-pentyl	8,2	5,6	6,4	10,3	10,2	7,7	4,6	-3	0,4
JWH-122 3-OH-pentyl	7,3	8	5,3	9,6	9,3	5,6	-3,7	0,33	-0,36
JWH-122 4-OH-pentyl	10,1	6,7	4,4	13,5	9,8	4,4	-7,3	-0,6	0,9
JWH-122 5-OH-indol	5	7,3	6	10,5	9,9	6,3	1,9	-1,5	4,9
JWH-122 5-OH-pentyl		4,3	2,3		8,7	4,9		4,4	3,2
JWH-122 6-OH-indol	6,8	8,3	6,8	8,9	10	6,8	1,7	0,65	5,1
JWH-122 Pentansäure	14,6	7,3	9,4	15,1	12	9,4	-0,5	0,73	6,5
JWH-210 4-OH-pentyl	8,2	5,8	5,8	11,5	11,5	8,4	-9,1	1,5	-0,5
JWH-210 5-OH-indol	8,6	6,1	3,8	13,4	8,6	4	3,6	-1,3	3,4
JWH-210 5-OH-pentyl	14	9,1	6,1	14	12	9,2	-15	12,2	1,7
JWH-210 Pentansäure	13,5	7,1	5,6	13,5	11,2	6,5	8,8	0,43	0,68
JWH-250 4-OH-pentyl	8,6	9,1	3	14,1	10,3	5,6	-13	-7,2	-10,9
JWH-250 5-OH-Indol	-	6,9	5,6	-	10,1	5,7	-	-3,3	-0,73
JWH-250 5-OH-pentyl	-	8,7	4,7	-	9,8	6,8	-	-5,2	-8
JWH-398 4-OH-pentyl	-	8	6,6	-	13,1	7,2	-	0,7	-0,4
JWH-398 5-OH-pentyl	-	11,4	6,6	-	11,5	7,8	-	-3	-1,7
JWH-398 Pentansäure	15,6	6	5,7	15,6	11,6	7,8	2,1	-0,1	1,8
UR-144 4-OH-pentyl	7,1	9,9	7,6	8,1	11,1	7,6	1,9	-3,6	-3,5
UR-144 5-OH-pentyl	9,3	8,7	6,8	13,2	11,6	7,8	-15,2	3,9	1,32
UR-144 Pentansäure	12,1	5,5	1,7	12,4	7,4	3,6	-6,7	2,1	3,1

5.3.1.3 Analytische Grenzen

Die Nachweisgrenze der Methode liegt je nach Analyt zwischen 0,05 ng/mL und 0,25 ng/mL, die Bestimmungsgrenze zwischen 0,05 ng/mL und 0,5 ng/mL (siehe Tabelle 25).

5.3.1.4 Stabilität aufgearbeiteter Proben (Autosampler-Stabilität)

Die meisten Proben zeigten eine Autosampler-Stabilität von mindestens 21,5 Stunden (Abweichung $\leq \pm 23\%$ für die Qualitätskontrollprobe 0,7 ng/mL und $\leq \pm 25\%$ für die Qualitätskontrollprobe 7 ng/mL). N-(4-Hydroxypentyl)-JWH-018, 6-Hydroxyindol-JWH-018 und Pentansäure-UR-144 zeigten nach 21,5 Stunden eine Zunahme $> 25\%$.

5.3.1.5 Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute und Matrixeffekte

In Tabelle 27 und Tabelle 28 sind die nach *Matuszewski et al.*^[121] ermittelten Matrixeffekte, Wiederfindungsraten und Extraktionsausbeuten für alle Analyten dargestellt. Für die QC-Kontrolle mit niedriger Konzentration liegen die Matrixeffekte zwischen 88% und 110% (RSD $\leq 20\%$), die Extraktionsausbeuten zwischen 46% und 121% (RSD $\leq 31\%$), wobei die geringeren

Extraktionsausbeuten vorrangig bei den Säuren zu finden sind. Die Wiederfindungen liegen zwischen 43% und 120% (RSD \leq 27%).

Tabelle 27: Matrixeffekte, Extraktionsausbeute und Wiederfindung für die Qualitätskontrolle bei niedriger Konzentration bestimmt nach dem Verfahren von *Matuszewski et al.*^[121].

Analyt	Kleine QC-Kontrolle (2 pg/mg)					
	Matrixeffekt [%]	RSD (n=5) [%]	Extraktionsausbeute [%]	RSD (n=5) [%]	Wiederfindung [%]	RSD (n=5) [%]
AM-2201 4-OH-pentyl	95	13	119	21	109	11
AM-2201 6-OH-indol	107	20	115	24	120	12
JWH-018 2-OH-pentyl	99	14	114	22	109	13
JWH-018 3-OH-pentyl	90	10	113	20	101	12
JWH-018 4-OH-indol	99	8	108	25	107	27
JWH-018 4-OH-pentyl	99	18	115	25	110	11
JWH-018 5-OH-indol	99	16	114	25	110	13
JWH-018 5-OH-pentyl	98	15	114	20	108	8
JWH-018 6-OH-indol	93	16	109	22	99	13
JWH-018 Pentansäure	97	12	69	19	54	12
JWH-019 6-OH-hexyl	110	13	111	24	120	19
JWH-019 5-OH-indol	96	11	106	19	99	9
JWH-073 3-OH-butyl	99	12	115	20	110	11
JWH-073 4-OH-butyl	104	13	115	22	117	20
JWH-073 6-OH-indol	94	11	111	20	102	11
JWH-073 Butansäure	97	13	46	22	43	10
JWH-081 5-OH-pentyl	101	18	113	26	111	13
JWH-122 2-OH-pentyl	101	18	112	24	109	12
JWH-122 3-OH-pentyl	98	13	114	22	104	9
JWH-122 4-OH-pentyl	101	12	116	23	113	12
JWH-122 5-OH-indol	95	13	107	19	99	10
JWH-122 5-OH-pentyl	102	12	116	21	115	12
JWH-122 6-OH-indol	95	13	106	21	99	12
JWH-122 Pentansäure	97	12	91	21	86	12
JWH-210 4-OH-pentyl	96	17	114	22	106	10
JWH-210 5-OH-indol	88	13	115	22	98	11
JWH-210 5-OH-pentyl	102	12	112	22	106	14
JWH-210 Pentansäure	94	12	107	19	99	8
JWH-250 4-OH-pentyl	96	14	117	23	110	12
JWH-250 5-OH-Indol	88	13	110	21	108	15
JWH-250 5-OH-pentyl	99	14	117	22	112	13
JWH-398 4-OH-pentyl	97	17	116	31	108	15
JWH-398 5-OH-pentyl	97	10	108	21	105	11
JWH-398 Pentansäure	96	11	108	13	102	14
UR-144 4-OH-pentyl	100	17	121	22	116	11
UR-144 5-OH-pentyl	103	9	118	25	118	22
UR-144 Pentansäure	95	15	82	20	76	8

Für die QC-Kontrolle mit hoher Konzentration liegen die Matrixeffekte zwischen 100% und 128% (RSD \leq 16%), die Extraktionsausbeuten zwischen 33% und 81% (RSD \leq 11%) und die Wiederfindungen zwischen 35% und 101% (RSD \leq 15%).

Wiederfindung und Extraktionsausbeuten für die meisten Analyten liegen wie nach GTFCh gefordert über 50%. Da es sich bei der vorgestellten Methode um eine Multianalyt-Methode handelt, sind Abweichungen für einzelne Analyten hinnehmbar und können gegebenenfalls bei der Interpretation der analytischen Ergebnisse berücksichtigt werden.

Tabelle 28: Matrixeffekte, Extraktionsausbeute und Wiederfindung für die Qualitätskontrolle bei hoher Konzentration bestimmt nach dem Verfahren von *Matuszewski et al.*^[121].

Analyt	Hohe QC-Kontrolle (7 ng/mL)					
	Matrixeffekt [%]	RSD (n=5) [%]	Extraktionsausbeute [%]	RSD (n=5) [%]	Wiederfindung [%]	RSD (n=5) [%]
AM-2201 4-OH-pentyl	109	11	81	5	91	10
AM-2201 6-OH-indol	117	9	79	6	96	8
JWH-018 2-OH-pentyl	110	11	79	6	90	11
JWH-018 3-OH-pentyl	105	11	81	5	86	9
JWH-018 4-OH-indol	100	11	79	9	89	11
JWH-018 4-OH-pentyl	113	8	81	5	93	9
JWH-018 5-OH-indol	115	11	78	5	92	10
JWH-018 5-OH-pentyl	109	13	81	7	90	10
JWH-018 6-OH-indol	103	16	78	7	84	15
JWH-018 Pentansäure	110	14	48	5	52	10
JWH-019 6-OH-hexyl	128	8	77	11	101	11
JWH-019 5-OH-indol	107	12	76	4	84	10
JWH-073 3-OH-butyl	108	11	80	5	90	9
JWH-073 4-OH-butyl	123	15	80	5	98	14
JWH-073 6-OH-indol	108	12	78	7	86	10
JWH-073 Butansäure	102	14	33	4	35	12
JWH-081 5-OH-pentyl	113	10	82	6	95	8
JWH-122 2-OH-pentyl	111	12	80	5	92	9
JWH-122 3-OH-pentyl	107	10	81	5	88	10
JWH-122 4-OH-pentyl	117	7	80	6	93	4
JWH-122 5-OH-indol	108	13	76	5	83	10
JWH-122 5-OH-pentyl	118	7	80	7	96	8
JWH-122 6-OH-indol	109	11	76	4	85	10
JWH-122 Pentansäure	102	12	65	6	69	11
JWH-210 4-OH-pentyl	112	13	79	8	91	11
JWH-210 5-OH-indol	102	12	80	4	83	10
JWH-210 5-OH-pentyl	109	13	80	5	89	12
JWH-210 Pentansäure	105	12	76	7	82	13
JWH-250 4-OH-pentyl	114	12	80	5	93	10
JWH-250 5-OH-Indol	111	13	79	5	90	11
JWH-250 5-OH-pentyl	110	9	81	6	93	8
JWH-398 4-OH-pentyl	114	9	78	4	91	9
JWH-398 5-OH-pentyl	110	11	80	7	89	8
JWH-398 Pentansäure	102	16	77	7	83	14
UR-144 4-OH-pentyl	118	10	81	6	95	8
UR-144 5-OH-pentyl	121	19	81	5	97	15
UR-144 Pentansäure	109	11	58	5	65	9

5.4 Untersuchung von Urinproben mit forensischer Relevanz

Mit der hier vorgestellten Methode wurden seit deren Einführung in die Routineanalytik des Instituts für Rechtsmedizin Freiburg, im Jahr 2011, insgesamt 7453 Urinproben vermessen. Abbildung 50 gibt eine Übersicht über die Zeiträume, in denen die jeweiligen synthetischen Cannabinoide in Urinproben nachgewiesen wurden, sowie über den Zeitpunkt der erstmaligen Identifizierung der Substanzen auf dem europäischen Markt (Euro-Symbol) bzw. der Unterstellung der Substanzen unter das BtMG (Paragraphen-Symbol). Während die synthetischen Cannabinoide der „3. Generation“ (BtMG-Unterstellung im Juli 2012^[45], wie zum Beispiel JWH-250, JWH-081 usw.) größtenteils schon nach der Ankündigung der Unterstellung sowohl aus den Produkten als auch aus den Urinproben verschwanden, ist JWH-018 trotz dessen frühzeitiger Unterstellung noch immer in Urinproben nachzuweisen. JWH-073 und JWH-019, welche in einem „ad hoc“-Verfahren aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu JWH-018 im Januar 2010 unterstellt wurden^[39], spielten in den von uns untersuchten Urinproben erst zu einem viel späteren Zeitpunkt eine Rolle.

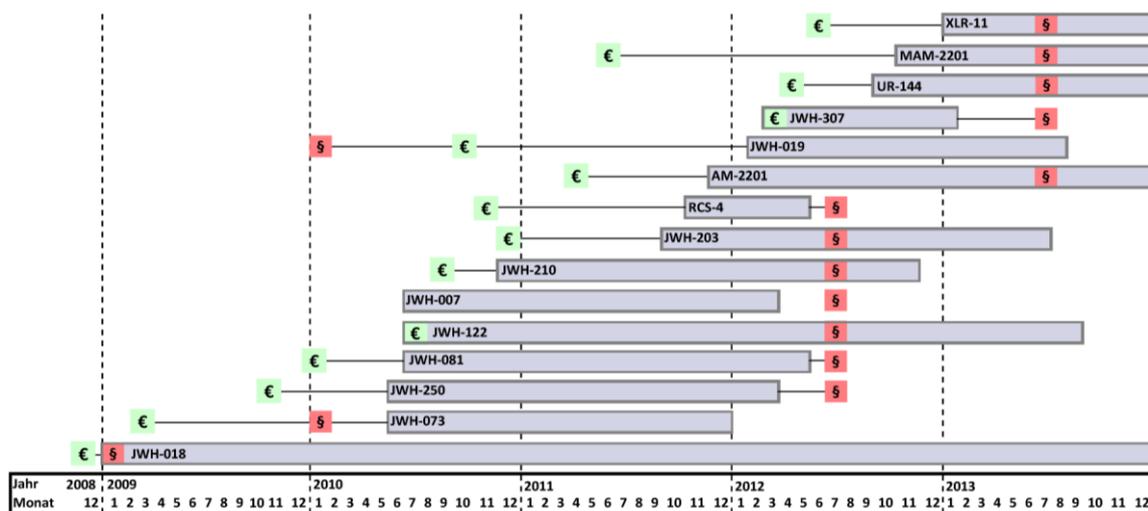


Abbildung 50: Graphische Übersicht über den Zeitraum, in dem das jeweilige synthetische Cannabinoid positiv in Urinproben getestet wurde. Die erste Identifizierung der Substanzen auf dem europäischen Markt ist mit dem Euro-Symbol, die Unterstellung der Substanz im BtMG mit dem roten Paragraphen-Symbol gekennzeichnet.

Bis zum Ende der Untersuchungen im Dezember 2013 sind auch die synthetischen Cannabinoide der „4. Generation“ (Unterstellung im Juli 2013^[46]) in den untersuchten Urinproben vertreten, allerdings wurden seitdem neue Substanzen identifiziert, die noch nicht dem BtMG unterstellt sind (zum Beispiel PB-22, 5-Fluor-PB-22, AB-001, EAM-2201). Die Unterstellung der Substanzen unter das BtMG führt nach den vorliegenden Daten also nur bedingt zu deren Rückgang auf dem Markt. Substanzen, wie JWH-018, haben sich möglicherweise aufgrund einer für den Konsumenten „angenehmen Wirkung“ bis zum jetzigen Zeitpunkt auf dem Markt gehalten, während andere Substanzen, wie zum

Beispiel JWH-015 oder AM-694, welche zeitweise in einigen Produkten nachgewiesen wurden, nicht in den untersuchten Urinproben detektiert wurden.

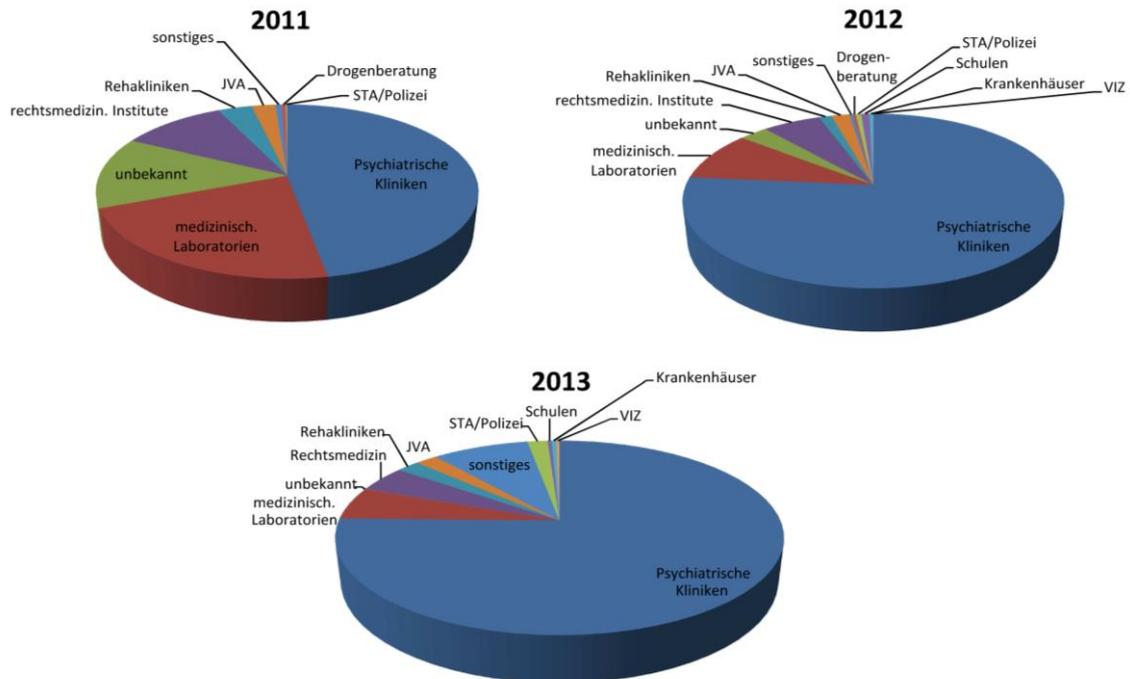


Abbildung 51: Übersicht über die Einsender der untersuchten Urinproben in den Jahren 2011, 2012 und 2013. JVA: Justizvollzugsanstalt; STA: Staatsanwaltschaft; VIZ: Vergiftungsinformationszentrum Freiburg.

Unter den 7453 untersuchten Proben, die in den Jahren von 2011 bis 2013 untersucht wurden, erwiesen sich 19% (n = 1429) als positiv auf die Metaboliten mindestens eines synthetischen Cannabinoides. Eine Übersicht über die Herkunft der untersuchten Proben gibt Abbildung 51. In den Jahren 2012 und 2013 stammten über 75% der untersuchten Proben aus Therapieeinrichtungen (psychiatrische Kliniken, Rehakliniken). Dabei handelte es sich vorrangig um regelmäßig durchgeführte Abstinenzkontrollen. Die Proben wurden ohne vorherige Selektion, zum Beispiel mittels eines Schnelltests auf synthetische Cannabinoide, eingesandt und untersucht. Die Einführung von solchen Schnelltests in medizinischen Laboratorien führte zu einer geringeren Probeneinsendung, da nur noch solche Proben eingesandt wurden, welche im Schnelltest positiv getestet wurden. Obwohl durch diese Vorauswahl die Positivrate der von medizinischen Laboratorien eingesandten Proben leicht anstieg war zu beobachten, dass die Positivraten seit 2011 stetig abnahmen. Dies ist möglicherweise dadurch zu begründen, dass die regelmäßige Abstinenzkontrolle in Therapieeinrichtungen zu einer Abnahme des Konsums synthetischer Cannabinoide unter den Patienten führte. Während 2011 noch 42% der untersuchten Urinproben positiv waren, waren es 2012 noch 24% und 2013 noch 8,6% (Tabelle 29).

Die Anzahl der untersuchten Proben und die Häufigkeiten der nachgewiesenen synthetischen Cannabinoide in den einzelnen Jahren sind in Tabelle 29 dargestellt. Auch hier wird deutlich, dass

JWH-018 trotz seiner recht frühen Unterstellung unter das BtMG in allen drei Untersuchungsjahren relativ dominant auftritt. Im Jahr 2011 wurden zusätzlich in den Urinproben sehr häufig Metaboliten von JWH-122 und JWH-210 detektiert, in 2012 Metaboliten von JWH-122 und in 2013 Metaboliten des AM-2201.

Tabelle 29: Übersicht über die Ergebnisse der Urinanalytik auf synthetischen Cannabinoide aus den Jahren 2011, 2012 und 2013.

	2011		2012		2013	
	Anzahl [n]	[%]	Anzahl [n]	[%]	Anzahl [n]	[%]
Untersuchte Proben:	753		3827		2873	
Positive Proben insgesamt	320	43	859	22	250	9
AM-2201	18	6	161	17	106	43
AM-694	1	0,3				
JWH-007	1	0,3	3	0,3		
JWH-018	166	52	450	49	43	17
JWH-019	-	-	21	2	5	2
JWH-073	9	3	-	-	-	-
JWH-081	9	3	11	1	-	-
JWH-122	216	68	509	55	9	4
JWH-203	28	9	86	9	4	2
JWH-210	207	65	216	23	-	-
JWH-250	19	6	11	1	-	-
JWH-307	-	-	167	18	-	-
MAM-2201	-	-	1	0,1	48	20
RCS-4	16	5	14	2	-	-
UR-144	-	-	40	4	10	4
XLR-11	-	-	-	-	56	23

Weiter hervorzuheben ist, dass in einem Großteil der positiv befundeten Urinproben Metaboliten mehrerer (bis maximal acht) synthetischer Cannabinoide nebeneinander nachweisbar waren (Abbildung 52). Dies ist zum einen dadurch zu erklären, dass in vielen Fällen mehrere synthetische Cannabinoide nebeneinander in den Produkten vorkommen oder Produkte mit den gleichen Namen unterschiedliche synthetische Cannabinoide enthalten, zum anderen wurden wahrscheinlich auch unterschiedliche Produkte von den Konsumenten konsumiert. Eine weitere Erklärung findet sich in der langen Nachweisbarkeit (siehe unten) der synthetischen Cannabinoide in Urinproben und einer daraus resultierenden Aufsummierung unterschiedlicher synthetischer Cannabinoide bei chronischem Konsum.

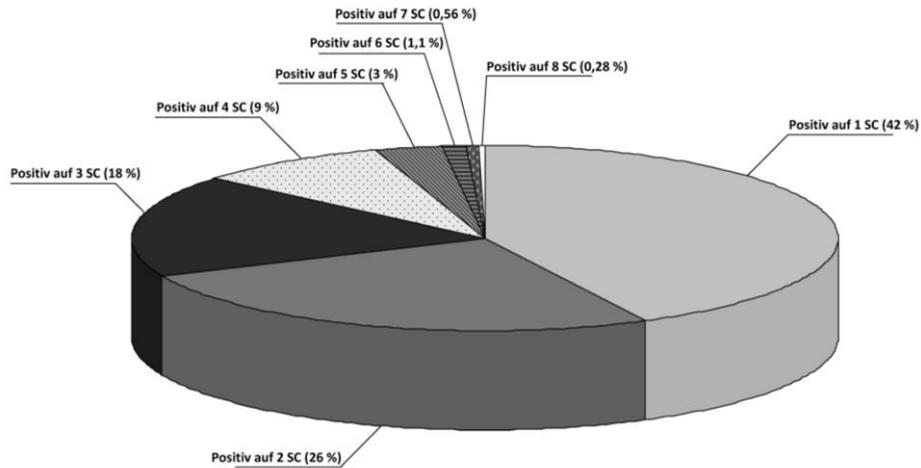


Abbildung 52: Verteilung der Anzahl nebeneinander nachgewiesener synthetischer Cannabinoide (SC) in den untersuchten Urinproben.

Das Metabolitenprofil, welches durch Verstoffwechslung der einzelnen synthetischen Cannabinoide entsteht, ist aufgrund des umfangreichen Metabolismus und der hohen strukturellen Ähnlichkeit dieser Substanzen sehr komplex. So werden nach dem Konsum einer Substanz durch metabolische Decarboxylierungs- und/oder Defluorierungsreaktionen Metaboliten gebildet, welche den Metaboliten einer anderen, strukturell verwandten Verbindung entsprechen. Wie in Kapitel 5.1.12.1 näher erläutert, werden beispielsweise nach dem Konsum von AM-2201 neben den AM-2201-„typischen“-Metaboliten – monohydroxylierte Verbindungen, die das Fluoratom noch tragen – durch eine Defluorierungsreaktion ebenfalls Metaboliten, die denen des JWH-018 entsprechen, sowie durch eine anschließende Decarboxylierungsreaktion Metaboliten, die denen des des JWH-073 entsprechen, gebildet. Ein ähnliches Verhalten tritt für die fluorierten Verbindungen MAM-2201, EAM-2201 und XLR-11 auf, wobei in diesen Fällen die Metaboliten mit verkürzter Alkylkette (Alkyl - 1) keiner anderen bisher aufgetretenen Substanz als Metaboliten zuzuordnen sind. Neben den in Abbildung 53 dargestellten Metaboliten werden noch eine Reihe weiterer monohydroxylierter Verbindungen als Hauptmetaboliten gebildet. Da für die fluorierten Metaboliten dieser Substanzen noch keinerlei Referenzsubstanzen vorhanden sind, ist die Rangfolge der gebildeten Metaboliten nur über eine Abschätzung der Peakflächen möglich. Bei allen Substanzen wird bei der Verstoffwechslung der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit nicht oder nur in unwesentlichem Ausmaß gebildet. Der N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit sowie die entsprechende Alkylcarbonsäure stellen die Hauptmetaboliten dar, gefolgt von monohydroxylierten Metaboliten der noch fluorierten Substanzen, wobei die Hydroxylierung an der Pentylkette, am Indol- oder am Naphthylrest auftreten kann.

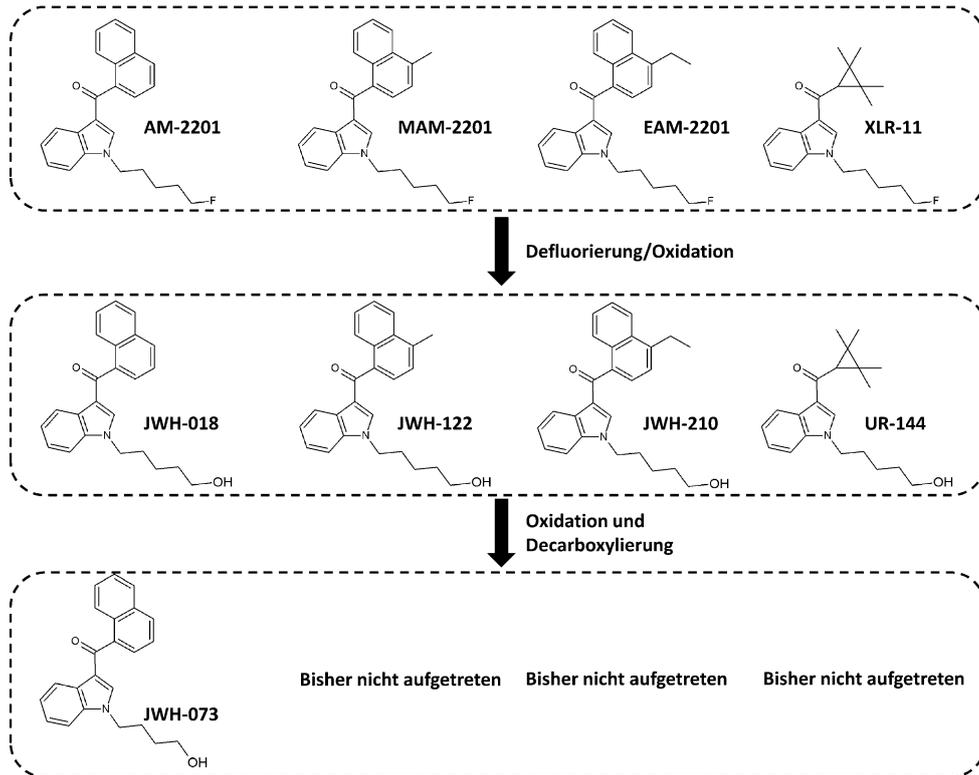


Abbildung 53: Mechanistische Grundlage des breiten Metabolitenspektrums, das nach Konsum von Substanzen mit einer 5-Fluoropentyl-Gruppe gefunden wird. Defluorierungs-, Oxidations- und Decarboxylierungsreaktionen führen zu Metaboliten strukturell verwandter Substanzen.

Die Metabolitenprofile der einzelnen Substanzen in den Urinproben unterschiedlicher Individuen unterscheiden sich dabei kaum. Wie sich aus den oben beschriebenen *in vitro* Daten (Kapitel 5.2) ableiten lässt, scheinen unterschiedliche genetische Ausstattungen in Bezug auf die metabolisierenden Enzyme das Metabolitenprofil nicht wesentlich zu beeinflussen. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Daten ist bisher keine Tendenz zu einer Verschiebung des Metabolitenspektrums in Abhängigkeit von der Zeit, die zwischen letztem Konsum und Probenabgabe gelegen hat, zu beobachten.

5.4.1 Nachweisbarkeitsdauer

Abbildung 54 zeigt einige exemplarische Beispiele für die Nachweisbarkeitsdauer der Metaboliten unterschiedlicher synthetischer Cannabinoide. Herangezogen wurden die Analysenergebnisse zweier Patienten einer forensischen Psychiatrie, sowie die Analysenergebnisse nach einem einmaligen Rauchkonsum (durchgeführt in einem Experiment eines freiwilligen Probanden). Die Daten der beiden Patienten stammen aus einer kontinuierlichen therapiebedingten Urinkontrolle. Für beide Patienten erfolgte während des kompletten Überwachungszeitraums eine tägliche Urinabgabe.

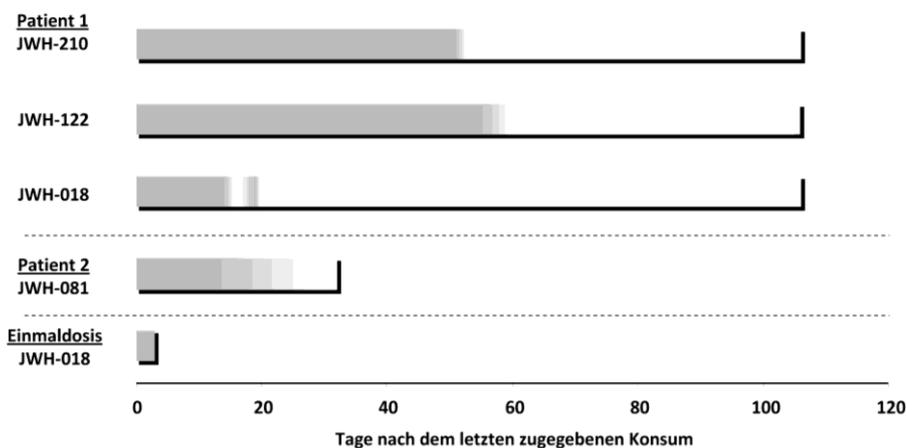


Abbildung 54: Nachweisbarkeitsdauer der Metabolite unterschiedlicher synthetischer Cannabinoide in Urinproben von zwei Patienten einer forensischen Psychiatrie, sowie nach einmaligem Konsum. Die Ergebnisse der Einmaldosis JWH-018 stammen aus dem Versuch einer freiwilligen Person. Die Gesamtlänge der Balken spiegeln den Untersuchungszeitraum wider, die grauen Bereiche markieren die Nachweisbarkeit des jeweiligen synthetischen Cannabinoides in den Urinproben.

Nach dem Einmalkonsum eines „Joints“, gefertigt aus einer Kräutermischung, welche JWH-018 enthielt, wurden noch drei Tage nach dem Konsum Metaboliten von JWH-018 nachgewiesen. Da für die darauffolgenden Tage keine Urinproben mehr verfügbar waren, wurde die Nachweisdauer nach Einmalkonsum von JWH-018 mit minimal 3 Tagen bestimmt. Patient 1 der forensischen Psychiatrie wurde zu Beginn der Urinkontrolle auf JWH-018, JWH-122 und JWH-210 positiv getestet. JWH-210 war für 53 Tage, JWH-122 für 61 Tage und JWH-018 für 20 Tage nachweisbar. Da sich die Konzentrationen der Analyten zum Ende der Ausscheidungsphase um die Nachweisbarkeitsgrenze bewegten, tritt bei JWH-018 ein kurzer Zeitraum auf, in dem keine Metaboliten von JWH-018 im Urin nachgewiesen wurden. Genau Daten zum Konsummuster und letzten Konsumzeitpunkt lagen nicht vor. Dennoch erlauben die Ergebnisse zumindest eine grobe Schätzung der Nachweisdauer der synthetischen Cannabinoide in Urinproben. Es ist zu erwarten, dass sich die lipophilen Substanzen nach einem chronischen Konsum in tieferen Kompartimenten (zum Beispiel Fettgewebe) anreichern und so aufgrund der Rückverteilung aus diesen Kompartimenten zu erhöhten Eliminationshalbwertszeiten und damit zu verlängerten Nachweisfenstern führen. Vergleichbare

Daten wurden zu Serumuntersuchungen chronischer Konsumenten synthetischer Cannabinoide publiziert. *Kneisel et al.* berichteten den Nachweis von JWH-081, JWH-122 und JWH-210 über 102 Tage im Serum mit einer abgeschätzten terminalen Eliminationshalbwertszeit von 41 Tagen^[165], was weit über der berichteten Eliminationshalbwertszeit des THC mit 13 Tagen liegt^[166].

Die enorm hohen Eliminationshalbwertszeiten der synthetischen Cannabinoide in Kombination mit den breit gefächerten Metabolitenspektren erschweren damit vor allem die Interpretation positiver Befunde bei chronischen Konsumenten hinsichtlich der Einschätzung, ob ein erneuter Konsum stattgefunden hat. Während im Serum über die Betrachtung des Konzentrationsverlaufes eine Abschätzung getroffen werden kann, gelingt eine solche für Urinbefunde nur näherungsweise über eine Normierung auf den Kreatininwert^[167].

5.5 Haaranalytik zum Nachweis synthetischer Cannabinoide

5.5.1 Validierung der Methode

Die vorgestellte Methode zum Nachweis 22 synthetischer Cannabinoide (Abbildung 55) im Haar wurde im Zuge dieser Arbeit etabliert und nach den Richtlinien der GTFCh validiert^[120]. Zur Detektion wurde die vorhandene LC-MS/MS-Methode zum Nachweis synthetischer Cannabinoide im Serum herangezogen. Dies hat den Vorteil, dass die ständig zu aktualisierende Methode automatisch zum Nachweis synthetischer Cannabinoide in unterschiedlichen Matrices herangezogen werden kann.

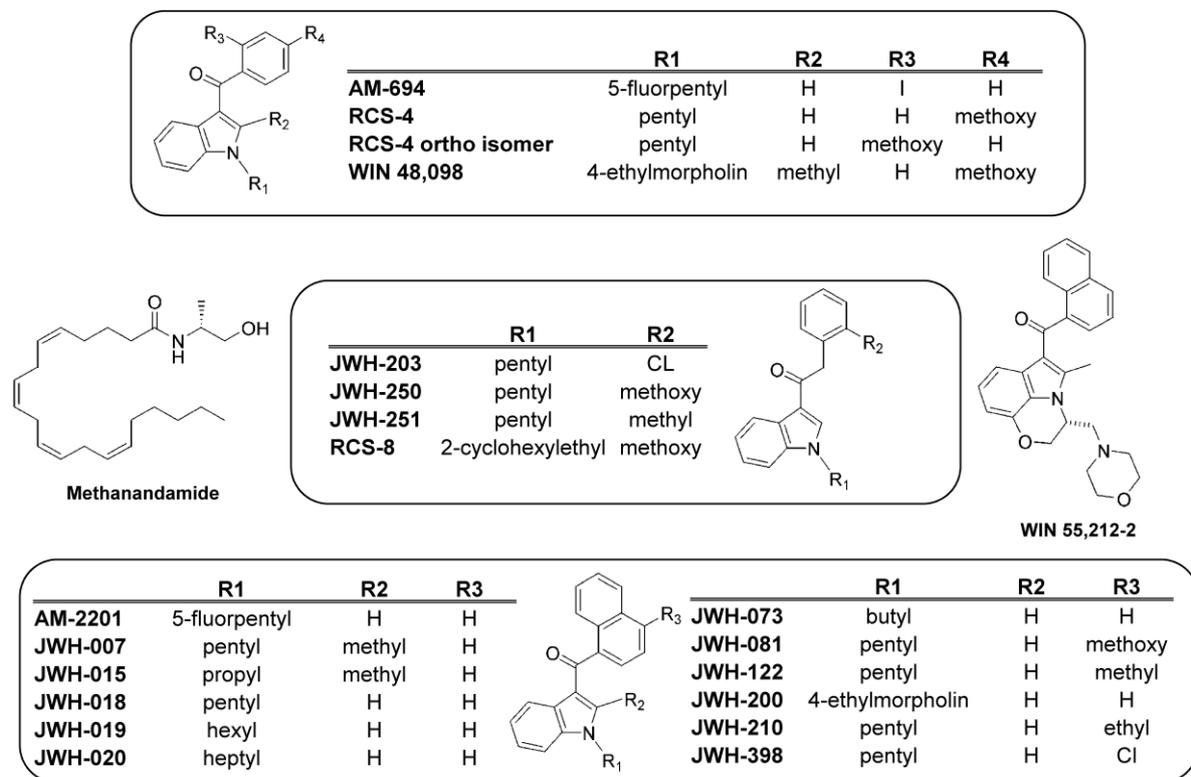


Abbildung 55: Synthetische Cannabinoide, welche von der entwickelten Methode zum Nachweis synthetischer Cannabinoide in Haaren erfasst werden^[122].

5.5.1.1 Kalibrationsmodell, Selektivität und Spezifität

Für alle Verbindungen wurde eine Linearität zwischen der Peakfläche und der Konzentration vom niedrigsten zum höchsten Kalibrator mittels Mandel-Test (Signifikanz 99%) gezeigt. Um eine Varianzhomogenität zu erreichen wurde für fast alle Substanzen der Wichtungsfaktor $1/x$ herangezogen. Ausnahmen waren: Wichtungsfaktor $1/x^2$ für JWH-020 und JWH-200, Wichtungsfaktor $1/x^3$ für WIN 48,098 und AM-2201 und kein Wichtungsfaktor für JWH-398.

Leer- und Nullproben zeigten keinerlei Interferenzen in den verwendeten MRM-Übergängen. Eine mit anderen relevanten Wirkstoffen (darunter Benzodiazepine, THC, basische Drogen) oder deren Metaboliten aufdotierte Leerprobe zeigte ebenfalls keine Interferenzen. Das Carry-over nach der Injektion einer auf 3000 pg/mg aufdotierten Probe lag unterhalb der Nachweisgrenze der jeweiligen Substanzen.

5.5.1.2 Genauigkeit und Präzision

Die Daten zu Genauigkeit und Präzision sind in Tabelle 30 dargestellt. Wiederhol- und tagesverschiedene Laborpräzision lagen für alle Analyten bei allen drei Konzentrationen (2 pg/mg, 20 pg/mg und 60 pg/mg) unter 12% ($RSD \leq 12\%$), der systematische Fehler (Bias) zur Bestimmung der Genauigkeit lag bei $\leq 6.9\%$.

5.5.1.3 Analytische Grenzen

Die Bestimmungsgrenze der Methode lag bei 5 pg/mg für Methanandamid und JWH-398; für alle übrigen Verbindungen bei 0.5 pg/mg. Die Nachweisgrenzen der Methode wurden den Bestimmungsgrenzen gleichgesetzt.

5.5.1.4 Stabilität aufgearbeiteter Proben (Autosampler-Stabilität)

Alle Proben zeigten eine Autosampler-Stabilität von mindestens 9 Stunden (Abnahme $\leq 18\%$ für die Qualitätskontrollprobe 2 pg/mg und $\leq 13\%$ für die Qualitätskontrollprobe 60 pg/mg) mit der Ausnahme von JWH-020, welches nur für 8 Stunden (kleine Qualitätskontrollprobe) bzw. 6 Stunden (hohe Qualitätskontrollprobe) Stabilität zeigte.

5.5.1.5 Wiederfindungsrate, Extraktionsausbeute und Matrixeffekte

In Tabelle 27, Tabelle 28 und Tabelle 33 dargestellt sind die nach Matuszewski *et al.* ermittelten Matrixeffekte, Wiederfindungsraten und Extraktionsausbeuten für alle Analyten sowie für die internen Standards. Für die QC-Kontrolle mit niedriger Konzentration liegen die Matrixeffekte zwischen 17% und 98% ($RSD \leq 26\%$), die Extraktionsausbeuten zwischen 79% und 95% ($RSD \leq 16\%$) und die Wiederfindungen zwischen 13% und 85% ($RSD \leq 19\%$).

Für die QC-Kontrolle mit hoher Konzentration liegen die Matrixeffekte zwischen 17% und 87% ($RSD \leq 8\%$), die Extraktionsausbeuten zwischen 95% und 100% ($RSD \leq 22\%$) und die Wiederfindungen zwischen 17% und 83% ($RSD \leq 20\%$). Matrixeffekte, Extraktionsausbeuten und Wiederfindungen der internen Standards lagen im Bereich der korrespondierenden Analyten.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 30: Genauigkeitsdaten der Methode. Relative Standardabweichungen liegen wie gefordert unter 15%.

Analyt	Wiederholpräzision			Laborpräzision			Genauigkeit		
	(RSD [%]) (n=10)			(RSD [%]) (n=5)			(Bias [%]) (n=5)		
	2 pg/mg	20 pg/mg	60 pg/mg	2 pg/mg	20 pg/mg	60 pg/mg	2 pg/mg	20 pg/mg	60 pg/mg
AM-694	7,8	4,1	3,1	7,8	4,1	5,9	-6,1	5,2	-0,7
AM-2201	4,8	2,4	2,4	10,3	5,7	4,6	-3,1	4,8	-3,0
JWH-007	3,0	3,7	4,4	8,4	3,7	5,4	-6,9	-1,8	-3,4
JWH-015	5,6	3,8	4,4	6,7	3,8	4,4	-0,1	0,0	1,3
JWH-018	6,7	1,8	5,5	8,2	4,1	5,5	-3,8	3,5	-0,8
JWH-019	4,5	4,8	5,3	6,5	6,4	5,3	-2,5	4,2	-2,6
JWH-020	11,1	4,5	9,1	11,1	8,0	9,1	-6,3	-0,8	-1,0
JWH-073	8,2	7,7	5,9	11,6	7,8	7,9	-4,6	1,9	-0,9
JWH-081	6,9	3,2	4,7	9,5	6,1	5,9	-3,0	4,0	-4,5
JWH-122	7,1	2,8	5,3	7,1	6,6	5,3	-4,2	1,8	-4,3
JWH-200	5,0	1,6	3,7	8,1	4,7	5,1	-6,9	-0,8	-0,5
JWH-203	3,6	4,3	2,8	5,1	8,1	3,6	-6,1	0,3	-2,5
JWH-210	8,9	3,7	8,0	9,5	8,3	8,0	-6,2	-0,1	-0,9
JWH-250	4,5	4,3	4,2	9,2	5,7	4,2	-0,1	6,1	-3,2
JWH-251	6,6	3,0	1,2	10,9	3,7	3,0	-4,1	-0,5	-4,3
JWH-398	8,2	3,1	1,4	9,8	8,8	10,5	-4,5	1,1	-1,0
Methanandamid	6,7	2,4	4,2	8,8	4,8	5,8	-4,1	-0,5	-6,3
RCS-4	6,3	3,1	3,4	8,7	4,5	5,1	1,2	5,2	-0,3
RCS-4 ortho Isomer	4,4	2,6	7,1	6,8	2,6	3,5	-3,8	2,7	-1,2
RCS-8	8,6	2,9	3,9	8,7	4,5	4,1	-4,4	3,1	-0,2
WIN 48,098	7,8	1,8	3,9	9,9	5,2	4,7	-6,4	1,9	0,5
WIN 55,212-2	8,2	6,0	7,6	9,9	6,3	7,6	-3,8	3,9	0,3

Tabelle 31: Matrixeffekte, Extraktionsausbeute und Wiederfindung für die Qualitätskontrolle bei niedriger Konzentration bestimmt nach dem Verfahren von Matuszewski^[121].

Kleine QC-Kontrolle (2 pg/mg)						
Analyt	Matrixeffekt [%]	RSD (n=5) [%]	Extraktions- ausbeute [%]	RSD (n=5) [%]	Wiederfindung [%]	RSD (n=5) [%]
AM-694	60	13	84	8	50	7
AM-2201	46	18	85	11	38	9
JWH-007	30	25	81	14	24	14
JWH-015	57	15	83	8	47	8
JWH-018	34	25	83	12	28	14
JWH-019	22	20	82	13	18	11
JWH-020	21	15	79	12	17	11
JWH-073	21	17	83	9	17	13
JWH-081	22	16	85	9	18	11
JWH-122	18	18	82	16	15	9
JWH-200	89	15	86	9	76	6
JWH-203	20	15	83	11	17	13
JWH-210	50	10	95	11	47	11
JWH-250	49	19	84	8	41	12
JWH-251	20	19	81	12	16	13
JWH-398	17	22	80	15	13	12
Methanandamid	30	26	82	9	24	19
RCS-4	45	18	81	12	36	12
RCS-4 ortho Isomer	58	13	83	8	48	7
RCS-8	18	19	80	11	14	12
WIN 48,098	98	15	87	9	85	8

Tabelle 32: Matrixeffekte, Extraktionsausbeute und Wiederfindung für die Qualitätskontrolle bei hoher Konzentration bestimmt nach dem Verfahren von Matuszewski^[121].

Hohe QC-Kontrolle (60 pg/mg)						
Analyt	Matrixeffekt [%]	RSD (n=5) [%]	Extraktions- ausbeute [%]	RSD (n=5) [%]	Wiederfindung [%]	RSD (n=5) [%]
AM-694	61	4	96	7	60	7
AM-2201	56	3	97	7	55	8
JWH-007	36	6	96	14	26	15
JWH-015	67	3	97	6	65	6
JWH-018	38	5	97	13	38	14
JWH-019	26	4	98	16	26	17
JWH-020	22	6	99	18	21	16
JWH-073	31	7	98	15	31	16
JWH-081	21	5	99	16	22	18
JWH-122	25	3	97	16	24	16
JWH-200	79	4	95	6	77	5
JWH-203	28	8	99	16	29	17
JWH-210	24	7	97	17	23	17
JWH-250	59	5	96	7	58	6
JWH-251	28	6	98	13	29	15
JWH-398	17	8	100	22	17	20
Methanandamid	29	7	98	19	29	17

Analyt	Hohe QC-Kontrolle (60 pg/mg)					
	Matrixeffekt	RSD (n=5)	Extraktions-	RSD (n=5)	Wiederfindung	RSD (n=5)
	[%]	[%]	ausbeute [%]	[%]	[%]	[%]
RCS-4	56	4	97	9	56	10
RCS-4 ortho Isomer	70	2	98	5	69	6
RCS-8	27	4	97	15	26	17
WIN 48,098	87	4	95	4	83	3

Tabelle 33: Matrixeffekte, Extraktionsausbeute und Wiederfindung der internen Standard in der jeweilig relevanten Konzentration bestimmt nach dem Verfahren von Matuszewski^[121].

Interner Standard	Konzentration [pg/mg]	Matrixeffekt [%]	RSD (n=5) [%]	Extraktions- ausbeute [%]	RSD (n=5) [%]	Wieder- findung [%]	RSD (n=5) [%]
JWH-007-D9	10	30	19	90	12	26	13
JWH-018-D11	5	23	20	91	15	21	13
JWH-073-D9	5	26	19	91	15	24	13
JWH-250-D5	5	49	11	92	11	45	9
Flunitrazepam-D7	10	87	9	96	13	83	8
OH-THC-d3	20	45	18	88	16	39	17

Der variierende Einsatz unterschiedlicher Mengen an Haarmatrix (10, 20, 30, 40 und 50 mg) wirkte sich nicht erheblich auf die gemessenen Werte aus (Standardabweichung < 20% bei 20 pg/mg).

Die Methode wurde seither ständig um weitere synthetische Cannabinoide, welche relevant wurden, erweitert. Neben den hier vorgestellten wurden zusätzlich AKB-48-5-F, AM-1220, AM-1248, AM-2232, AM-2233, APICA, JWH-307, JWH-370, JWH-387, JWH-412, MAM-2201, STS-135, UR-144, WIN 55,212-2 und XLR-11 in die Methode aufgenommen (siehe auch Tabelle 10 und Tabelle 11), um eine zuverlässige Detektion aller relevanten Substanzen zu gewährleisten. Die Nachvalidierung der erweiterten Methode erfolgt in regelmäßigen Zeitabständen.

5.6 Untersuchung von Haarproben mit forensischer Relevanz

Seit Einführung der Methode zum Nachweis synthetischer Cannabinoide in Haaren in die Routineanalytik des Institut für Rechtsmedizin in Freiburg im Jahre 2011 wurden 49 Haarproben zur Analyse eingesandt, die je nach Fragestellung segmentiert oder unsegmentiert untersucht wurden. Ein Überblick gibt Abbildung 56. Der Altersdurchschnitt der Positivproben lag bei 27,3 Jahren, der Median bei 26 Jahren (soweit Informationen über das Alter vorlagen). 4% der Positivproben stammten von weiblichen Personen, 88% von männlichen (für die restlichen Fälle lag keine Information vor). Auffällig ist vor allem, dass nur ein geringer Teil der Proben lediglich auf ein synthetisches Cannabinoid positiv getestet wurde. Im Großteil der Positivproben wurden zwei bis elf synthetische Cannabinoide nebeneinander nachgewiesen, wobei ein Maximum bei sechs gleichzeitig nachgewiesenen Wirkstoffen lag. Dies ist im Falle der Haaranalyse plausibel, da sie die Betrachtung über einen längeren Zeitpunkt erlaubt.

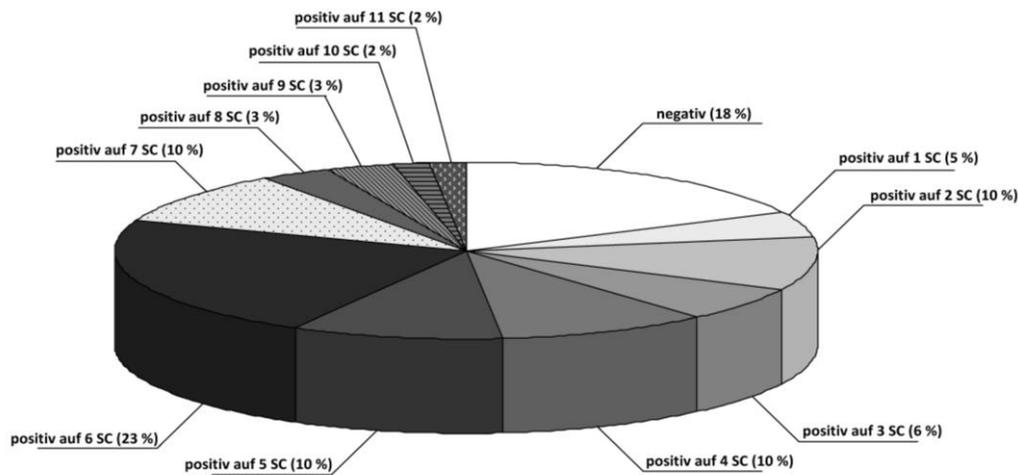


Abbildung 56: Ergebnisse der Routine-Haaranalytik. Dargestellt sind der Anteil der negativen Proben sowie der Anteil der positiven Proben mit Angabe der Anzahl der positiven synthetischen Cannabinoide (SC) pro analysierter Haarprobe.

Für einige der untersuchten Proben lagen neben den Haarproben auch Serum- und/oder Urinproben der jeweiligen Patienten sowie Angaben zu Konsummuster und letztem Konsumzeitpunkt vor. Diese Daten wurden im Zuge einer freiwilligen Patientenbefragung während der Probenentnahme gewonnen (Tabelle 34).

Zwei bis sechs unterschiedliche synthetische Cannabinoide wurden in den untersuchten Haarproben detektiert, wobei sich die Konzentrationen über einen sehr großen Bereich verteilen. Von einem Patienten waren lediglich Arm- und Beinhaare verfügbar. Die ermittelten Konzentrationen der beiden Proben unterscheiden sich innerhalb der zu erwartenden Messungenauigkeit (< 20%).

Tabelle 34: Konzentrationen [pg/mg] der synthetischen Cannabinoide in den Haarproben der befragten Patienten. LOD = LLOQ = 0,5 pg/mg; Datum der Probenentnahme: 16.02.2011.

Patient	Stelle der Probenentnahme	Haarlänge [cm]	Konsumzeitraum (Jahr 2010)	JWH-018	JWH-073	JWH-081	JWH-200	JWH-210	JWH-250
1	Kopf	4	Januar - Juni	n.n.	2	n.n.	n.n.	Spur	0,5
2	Kopf	3,5	Mai - August	Spur	2,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
3	Kopf	1	November - Dezember	Spur	n.n.	10	n.n.	Spur	2,9
4	Kopf	3,5	Juni - Dezember	Spur	0,7	7,3	Spur	0,5	4,8
5	Kopf	3,5	September - November	5,1	21	31	n.n.	2,7	11
6	Arm	0,5	Juli - August	n.n.	Spur	6,1	Spur	n.n.	14,7
6	Bein	0,5	Juli - August	0,4	0,7	5,1	n.n.	n.n.	17,3
7	Kopf	0-3	September - November	5,7	3,2	260*	Spur	5,2	24
7	Kopf	3-6	September - November	5,2	1,4	460*	3,4	6,5	26
7	Kopf	6-12	September - November	31	6,2	1600*	15	38	120*
8	Kopf	0-3	September - November	0,4	0,7	12	n.n.	n.n.	1,2
8	Kopf	3-6	September - November	2,1	2,5	130*	n.n.	2	9,2
8	Kopf	6-9	September - November	11	1,7	1100*	1,4	24	89*
8	Kopf	9-12	September - November	16	1,2	590*	1,1	15	46
8	Kopf	12-24	September - November	24	4	960*	2,6	37	113*

*Konzentration liegt oberhalb des höchsten Kalibrators und wurde extrapoliert; n.n.: nicht nachgewiesen

Betrachtet man die Segmentanalysen der Patienten #7 und #8 ergeben sich zwei Auffälligkeiten: Die Konzentrationen nehmen für die meisten Substanzen vom proximalen zum dritten Segment zu und die höchsten Konzentrationen liegen unter der Annahme einer Wachstumsgeschwindigkeit der Haare von 1 cm/Monat vor dem Zeitpunkt des berichteten ersten Konsumzeitpunktes bzw. zumindest für einige synthetische Cannabinoide rechnerisch vor dem ersten Erscheinen der jeweiligen Substanz auf dem europäischen Markt. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine externe Einlagerung der Substanzen in die Haare durch beispielsweise den Nebenstromrauch in Betracht zu ziehen ist. Um dies näher zu untersuchen wurde wie folgt beschrieben ein Experiment zur Einlagerung synthetischer Cannabinoide in Haare durch Nebenstromrauchkontamination durchgeführt.

5.7 Studie zur Rauchkontamination von Haarproben

Die Ergebnisse der segmentierten Haaranalyse aller drei Probanden nach dreiwöchiger Beräucherung mit einem „Joint“, welcher JWH-018, JWH-122 und JWH-210 enthielt, sind in Tabelle 35 dargestellt. In keiner der parallel dazu untersuchten Urinproben wurden Metaboliten synthetischer Cannabinoide nachgewiesen, weshalb eine versehentliche Aufnahme während des Experimentes ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 35: Konzentrationen der synthetischen Cannabinoide JWH-018, JWH-122 und JWH-210 in den untersuchten Haarproben, entnommen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der durchgeführten Beräucherungsstudie. LOD = LLOQ = 0,5 pg/mg.

Zeitpunkt	Segment [cm]	JWH-018 [pg/mg]	JWH-122 [pg/mg]	JWH-210 [pg/mg]
Proband 1				
vor Studienbeginn	0-4,5	n.n.	1.5	9.0
Anfang Woche 2	0-5	7.3	26	97*
Anfang Woche 3	0-5	15	62	150*
Ende der Exposition	0-5	4.6	13	62
1 Woche nach Exposition	0-5	3.8	12	57
2 Wochen nach Exposition	0-5	n.n.	2.1	7.0
3 Wochen nach Exposition	0-3,5	n.n.	2.3	13
	3,5-7	n.n.	2.7	6.5
	komplette Haarsträhne	n.n.	2.5	9.8
Proband 2				
vor Studienbeginn	0-6	n.n.	n.n.	n.n.
	6-12	n.n.	n.n.	n.n.
	12-18	n.n.	n.n.	n.n.
	18-24	n.n.	n.n.	n.n.
	24-27	n.n.	n.n.	n.n.
	komplette Haarsträhne	n.n.	n.n.	n.n.
Anfang Woche 2	0-3	n.n.	2.6	n.n.
	3-6	1.4	10	14
	6-9	n.n.	16	77
	9-12	n.n.	26	130*
	12-15	n.n.	9	87
	15-18	n.n.	9	56
	18-21	3.8	23	96
	21-25	12	49	210*
	komplette Haarsträhne	2	18	83
Anfang Woche 3	0-3	0.7	3.9	10
	3-6	2.4	20	49
	6-9	2.2	18	110*
	9-12	2.1	23	110*
	12-15	2.7	29	150*
	15-18	4.5	53	280*
	18-21	8.7	59	300*
	21-24	12	82*	200*
	24-26	24	120	290*
	komplette Haarsträhne	7	45	167
Ende der Exposition	0-3	2.7	14	15
	3-6	9.5	64	93
	6-9	12	120*	450*
	9-12	21	170*	950*
	12-15	22	170*	830*
	15-18	21	140	800*
	18-21	27	180*	640*

Ergebnisse und Diskussion

Zeitpunkt	Segment [cm]	JWH-018 [pg/mg]	JWH-122 [pg/mg]	JWH-210 [pg/mg]	
1 Woche nach Exposition	21-24	47	200*	570*	
	24-26	52	250*	520*	
	komplette Haarsträhne	24	145	541	
	0-3	0.5	1.7	6.4	
	3-6	2.1	13	37	
	6-9	2.2	15	57	
	9-12	4.0	19	62	
	12-15	1.6	11	39	
	15-18	6.0	33	120*	
	18-21	10	46	210*	
2 Wochen nach Exposition	21-24	7.8	45	130*	
	komplette Haarsträhne	4.3	23	83	
	0-3	1.5	7.6	20	
	3-6	10	87*	290*	
	6-9	9.9	95*	290*	
	9-12	6.8	48	160*	
	12-15	6.4	32	110*	
	15-18	3.6	15	72*	
	18-21	1.9	7.9	26	
	21-24	1.1	6.9	24	
Proband 3					
vor Studienbeginn	0-6	n.n.	n.n.	n.n.	
	6-12	n.n.	n.n.	n.n.	
	12-18	n.n.	n.n.	n.n.	
	18-24	n.n.	n.n.	n.n.	
	24-30	n.n.	n.n.	n.n.	
	30-36	n.n.	n.n.	n.n.	
	36-42	n.n.	n.n.	n.n.	
	komplette Haarsträhne	n.n.	n.n.	n.n.	
	Anfang Woche 2	0-3	n.n.	n.n.	1.2
		3-6	0.66	1.7	5.0
6-9		1.5	4.7	13	
9-12		3.4	9.4	27	
12-15		7.9	16	51	
15-18		11	29	90*	
18-21		16	43	130*	
21-24		18	52	160*	
24-27		30	93	280*	
27-30		50	130*	390*	
Anfang Woche 3	30-33	46	160*	410*	
	33-36	42	140*	370*	
	36-42	44	130*	340*	
	komplette Haarsträhne	21	62	174	
	0-5	0.99	2.1	4.8	
	5-10	3.3	8.2	20	
	10-15	5.1	15	44	
	15-20	5.8	14	45	
	20-25	6.5	25	73	
	25-30	15	55	160*	
Ende der Exposition	30-35	35	110*	300*	
	35-42	41	110*	310*	
	komplette Haarsträhne	14	42	120	
	0-5	1.1	2.5	6.8	
	5-10	5.6	14	34	
	10-15	7.2	22	54	
	15-20	8.0	23	60	
	20-25	17	57	140*	
	25-30	54	170*	450*	
	30-35	70	260*	590*	

Ergebnisse und Diskussion

Zeitpunkt	Segment [cm]	JWH-018 [pg/mg]	JWH-122 [pg/mg]	JWH-210 [pg/mg]
1 Woche nach Exposition	35-45	37	110*	300*
	komplette Haarsträhne	25	82	204
	0-5	0.82	1.3	3.3
	5-10	3.8	9.9	26
	10-15	5.6	16	53
	15-20	5.5	14	42
	20-25	10	36	92*
	25-30	21	75*	240*
2 Wochen nach Exposition	30-35	50	140*	420*
	35-45	25	67	200*
	komplette Haarsträhne	15	45	135
	0-5	0.73	0.78	2.5
	5-10	10	20	53
	10-15	7.0	22	56
	15-20	5.9	13	30
	20-25	13	30	63
	25-30	20	67	140*
	30-35	36	90	200*
3 Wochen nach Exposition	35-45	21	54	130
	komplette Haarsträhne	14	37	84
	0-5	n.n.	n.n.	0.5
	5-10	1.8	2.8	7.4
	10-15	3.1	6.8	17
	15-20	4.1	8.5	21
	20-25	9.3	21	53
	25-30	25	62	150*
	30-35	32	99	290*
	35-45	26	64	140*
	komplette Haarsträhne	13	33	85

*Konzentration liegt oberhalb des höchsten Kalibrators und wurde extrapoliert; n.n.: nicht nachweisbar

Interessanterweise wurde in den Nullhaarprobe des Probanden 1 geringe Konzentrationen an JWH-122 und JWH-210 detektiert, welche zumindest auf einen vorhergehenden Kontakt mit diesen Substanzen schließen lassen. Dies lässt sich möglicherweise auf einen arbeitsbedingten Umgang des Probanden mit diesen Substanzen im Labor erklären.

Die Konzentrationsrangfolge der synthetischen Cannabinoide, welche sich in den „Joints“ befand, spiegelt sich auch in den Analysendaten der Haarproben wider: JWH-018 < JWH-122 < JWH-210.

Abbildung 57 zeigt die Konzentrationsprofile der untersuchten synthetischen Cannabinoide in den Haaren der drei Probanden für den kompletten Studienverlauf. Während die Maximalkonzentrationen für die Probanden mit langen Haaren (Proband 2 und 3) zum Ende der dritten Woche, also nach Abschluss der Beräucherungen erreicht werden, nehmen die Konzentrationen bei Proband 1 mit kurzen Haaren bereits nach der zweiten Expositionswoche ab. Dies ist möglicherweise durch eine erleichterte Auswaschung der Substanzen aus kurzen Haaren während der täglichen Haarwäsche, verbunden mit einer effektiveren Entfernung des Sebums von der Kopfhaut begründet, was einer Einlagerung der Substanzen entlang der Haarsträhne entgegenwirkt.

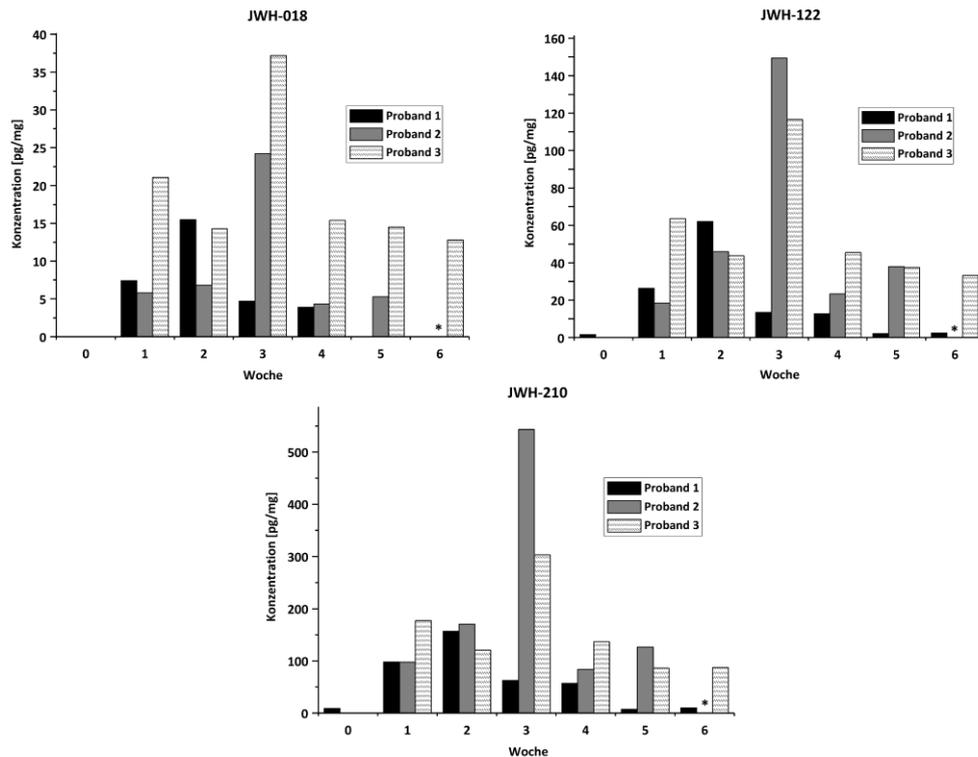


Abbildung 57: Konzentrationen [pg/mg] der untersuchten synthetischen Cannabinoide in den Haaren der drei Probanden über den Versuchszeitraum. Dargestellt sind die gemittelten Werte aus allen untersuchten Segmenten. *Für Proband 2 erfolgte in Woche 6 keine Haarabnahme.

Bei Proband 3 sind alle drei synthetischen Cannabinoide selbst in Woche 6 noch detektierbar. Bei einer erneuten Haarentnahme von Proband 3 nach einem Jahr waren keine synthetischen Cannabinoide mehr nachweisbar.

Bei der Betrachtung der segmentweisen Haaranalyse fällt auf, dass die untersuchten Substanzen während der Expositionsphase in den höchsten Konzentrationen in die distalen Segmente eingelagert werden (Abbildung 58). Nach Beendigung der Beräucherung nehmen die Konzentrationen in den distalen Segmenten auch am stärksten ab (Tabelle 37). Die geringen Konzentrationen in den proximalen Segmenten im Vergleich zu den distalen lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass die proximalen Segmente, entnommen am Hinterkopf, durch andere Haare überdeckt und somit dem Rauch weniger ausgesetzt waren als die freiliegenden Haarspitzen. Die starken Konzentrationsabnahmen in den distalen Segmenten nach Beendigung der Beräucherungsphase sind möglicherweise durch eine erhöhte Auswaschung der Substanzen aufgrund der meist stärkeren Beschädigungen der Haarstruktur in den Spitzen zu erklären.

Ähnliche Ergebnisse zeigte ein analog durchgeführter Beräucherungsversuch mit Marihuana in unserem Arbeitskreis. Neben THC wurde in den untersuchten Haarproben der drei Probanden auch THC-Säure-A, die natürliche Vorläufersubstanz des THCs, sowie Cannabinol detektiert. Die höchsten

Konzentrationen wurden bei allen Probanden unabhängig von der Haarlänge in der Woche nach der dritten Beräucherung nachgewiesen. Bei der Untersuchung des kompletten Kopfhaares eines der teilnehmenden Probanden wurden die höchsten Konzentrationen in der hinteren Scheitelregion detektiert. Dass die Einlagerung durch externe Kontamination an dieser Stelle am stärksten stattzufinden scheint, ist dahingehend problematisch, dass die hintere Scheitelregion üblicherweise als Probeentnahmestelle zur Haaranalyse herangezogen wird, da hier das Haarwachstum relativ gleichmäßig stattfindet.

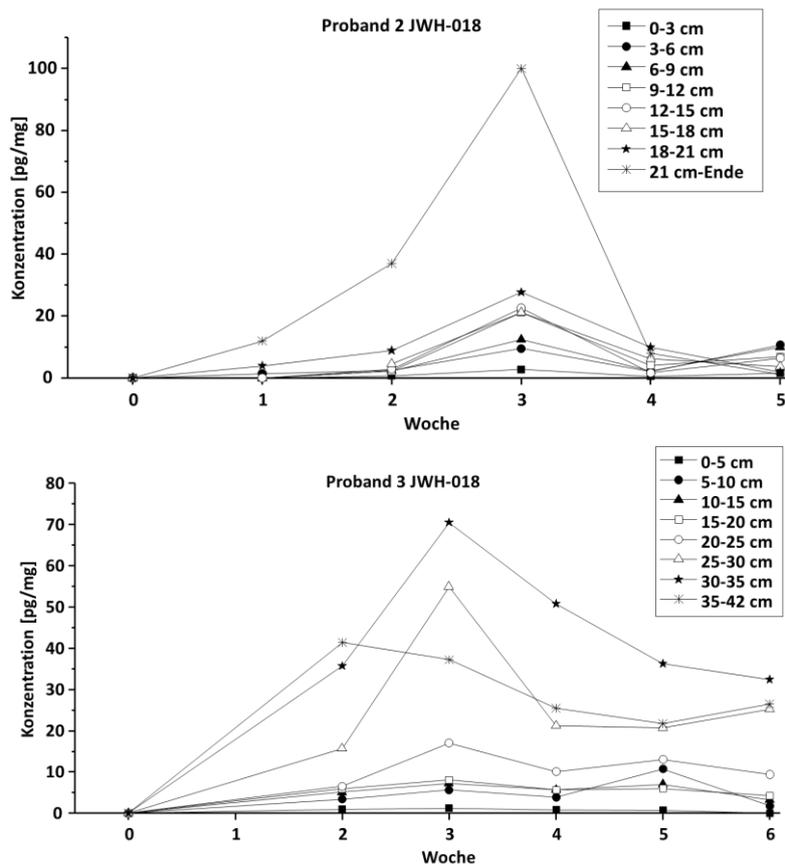


Abbildung 58: Zeitprofil der gemessenen JWH-018 Konzentrationen in den untersuchten Segmenten von Proband 2 und Proband 3. Woche 3 entspricht dem Ende der Expositionsperiode. Bei Proband 3 erfolgte in Woche 1 eine von den restlichen Proben abweichende Segmentierung der Haarsträhne, weshalb diese aus Gründen der Vergleichbarkeit weggelassen wurde. Die Profile der beiden weiteren synthetischen Cannabinoide zeigen ein vergleichbares Bild.

Die Konzentrationen der untersuchten synthetischen Cannabinoide in den Haaren der Probanden, die sich einer einmaligen Beräucherung ausgesetzt hatten, sind in Tabelle 36 dargestellt. Bei beiden Probanden waren alle drei untersuchten synthetischen Cannabinoide noch eine Woche nach der Exposition nachzuweisen. Bei Proband 4 ist die beobachtete starke Verringerung der Konzentration wahrscheinlich auf die kurze Haarlänge zurückzuführen. Bei der Segmentanalyse der Haarproben von Proband 5 sind in den distalen Segmenten die höchsten Konzentrationen zu finden und der Effekt der Auswaschung ist im Vergleich zu Proband 4 weniger stark ausgeprägt. Interessanterweise wurden in

den proximalen Haarsegmenten keine synthetischen Cannabinoide nachgewiesen. Wie sich vermuten ließ, sind die Konzentrationen der synthetischen Cannabinoide in den Haaren der Probanden nach einwöchiger Beräucherung höher, als die der Probanden nach einmaliger Beräucherung.

Tabelle 36: Konzentrationen der synthetischen Cannabinoide JWH-018, JWH-122 und JWH-210 in den untersuchten Haarproben nach einmaliger Exposition. LOD = LLOQ = 0,5 µg/mg.

	Segment [cm]	JWH-018	JWH-122	JWH-210
Proband 4				
vor Studienbeginn	1.5	n.n.	n.n.	n.n.
ein Tag nach Exposition	1.5	13	46	50
eine Woche nach Exposition	1.5	1,8	6,3	4,5
Proband 5				
vor Studienbeginn	0-6	n.n.	n.n.	n.n.
	6-12	n.n.	n.n.	n.n.
	12-18	n.n.	n.n.	n.n.
	18-24	n.n.	n.n.	n.n.
	24-30	n.n.	n.n.	n.n.
	30-36	n.n.	n.n.	n.n.
	36-42	n.n.	n.n.	n.n.
	42-50	n.n.	n.n.	n.n.
ein Tag nach Exposition	0-3	n.n.	n.n.	n.n.
	3-6	n.n.	n.n.	n.n.
	6-9	n.n.	n.n.	n.n.
	9-12	n.n.	n.n.	n.n.
	12-15	n.n.	1,4	3,5
	15-18	n.n.	4,4	14
	18-21	n.n.	16	43
	21-24	n.n.	8,0	11
	24-27	2,3	8,0	17
	27-30	2,7	9,3	21
	30-33	4,6	8,6	22
	33-36	4,4	13	26
	36-39	3,3	13	35
	39-42	6,2	15	40
	42-45	1,5	8,4	21
	45-48	4,3	17	64
eine Woche nach Exposition	0-3	n.n.	n.n.	n.n.
	3-6	n.n.	n.n.	n.n.
	6-9	n.n.	n.n.	n.n.
	9-12	n.n.	n.n.	n.n.
	12-15	n.n.	n.n.	n.n.
	15-18	n.n.	4,9	n.n.
	18-21	n.n.	6,5	n.n.
	21-24	n.n.	kein IS	kein IS
	24-27	n.n.	8,4	12
	27-30	n.n.	9,5	19
	30-33	n.n.	9,5	23
	33-36	3,6	14	28
	36-39	2,9	12	24
	39-44	2,4	9,7	20

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass synthetische Cannabinoide durch Nebenstromrauch nach ein- oder mehrmaliger Rauchexposition in die Haarstruktur eingelagert werden was somit zu Positivbefunden bei der Haaranalytik auf synthetische Cannabinoide führen kann. Die Interpretation der Ergebnisse einer Haaranalyse wird dahingehend erschwert, dass beim momentanen Wissenstand eine externe Kontamination der Haare von einem Konsum der Produkte nicht unterschieden werden kann. Aufklärung könnte hier gegebenenfalls die Detektion der Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Haaren schaffen. Während bei eigenen Untersuchungen noch keine Metaboliten in Haarextrakten detektiert wurden, berichteten *Kim et al.* den Nachweis des N-(3-Hydroxybutyl)-Metaboliten und des Butansäure-Metaboliten von JWH-073 im Haar von Ratten nach intraperitonealer Applikation von JWH-073 sowie des N-(5-Hydroxypentyl)-Metaboliten von JWH-018 in sehr geringen Konzentrationen in Haarproben von Konsumenten^[168]. Es ist dabei zu beachten, dass die Einlagerung der Metaboliten in die Rattenhaare auch durch Kontamination der Haare mit dem Speichel während der Fellpflege beeinflusst werden kann. Weiter liegen in dieser Studie zu den Patientendaten keine Informationen zum Konsummuster oder der konsumierten Substanz vor. Bei einem Konsum von JWH-018 wäre der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit, bei dem es sich um den Hauptmetaboliten von JWH-018 handelt, in den Haarproben erwartet worden, während der N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit hauptsächlich nach dem Konsum von AM-2201 entsteht (siehe 5.1.12.1). Leider liegen keine Informationen vor, ob AM-2201 in den Haarproben der Konsumenten detektiert wurde. Auch liegen keinerlei Daten zur Einlagerung der unterschiedlichen Metaboliten in die Haarstruktur vor, was eine Interpretation der Ergebnisse weiter erschwert. Weitere Studien sind nötig, um zu untersuchen, ob die Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Haaren möglicherweise als Konsummarker herangezogen werden können.

5.8 Synthetische Cannabinoide in der Fahreignungsdiagnostik

Besonders für Personen, die in Zusammenhang mit einem zu erbringenden Abstinenznachweis Urinproben abgeben müssen, ist die Verwendung synthetischer Cannabinoide als Ersatz für Cannabis attraktiv, da synthetische Cannabinoide bisher nicht in routinemäßigen Drogenscreenings erfasst werden. Die Urinanalytik auf synthetische Cannabinoide gestaltet sich besonders schwierig, da in schneller Folge neue Substanzen auftreten und im Urin in der Regel nur Stoffwechselprodukte der Wirksubstanzen nachgewiesen werden können.

Um einen Einblick in das Ausmaß einer gegebenenfalls stattfindenden „Substitution“ von Cannabis durch synthetische Cannabinoide in der Fahreignungsdiagnostik zu gewinnen, wurden stichprobenartig ausgewählte Urin- und Haarproben aus der Fahreignungsdiagnostik, die in den Standardassays unauffällig waren, mit den entwickelten LC-MS/MS-Methoden untersucht.

495 negativ auf THC-COOH(-Gluc) getestete Urinproben aus dem Jahr 2012 sowie 87 Haarproben aus dem Jahr 2010 aus der Fahreignungsdiagnostik aus verschiedenen Regionen Deutschlands wurden mittels zweier umfassender LC-MS/MS-Methoden auf synthetische Cannabinoide untersucht. 231 der Urinproben stammten von Personen, denen aufgrund einer Auffälligkeit mit THC die Fahrerlaubnis entzogen wurde. Die restlichen Urinproben (n = 264) sowie die Haarproben wurden rein zufällig ausgewählt. Informationen über die konsumierten Substanzen, welche in diesen Fällen zum Entzug der Fahrerlaubnis geführt hatten, waren aufgrund der Anonymisierung nicht vorhanden. Eine Übersicht über die Verteilung der Herkunft der untersuchten Urinproben sowie über die Positivraten in den einzelnen Bundesländern gibt Abbildung 59. Ca. 6% der untersuchten Urinproben wurden positiv auf die Metaboliten mindestens eines Wirkstoffs getestet. In den meisten Fällen wurde der Konsum mehrerer Cannabinoide nachgewiesen. Auffällig waren vor allem die unterschiedlichen Positivraten bezogen auf einzelne Bundesländer: Keine der untersuchten Urinproben aus Hessen (n = 68), Mecklenburg-Vorpommern (n = 1), Saarland (n = 6) und Sachsen (n = 26) wurde positiv auf synthetische Cannabinoide getestet, während Nordrhein-Westfalen (n = 61) (1,6%), Berlin (n = 44) (2,3%), Hamburg (n = 29) (3,5%) und Baden-Württemberg (n = 25) (4,0%) sich unterhalb des ermittelten Durchschnitts bewegten. Thüringen (n = 43) (7,0%), Brandenburg (n = 9) (11,1%), Bayern (n = 112) (12,5%) und Rheinland-Pfalz (n = 71) (12,6%) zeigten Positivraten oberhalb des Durchschnitts.

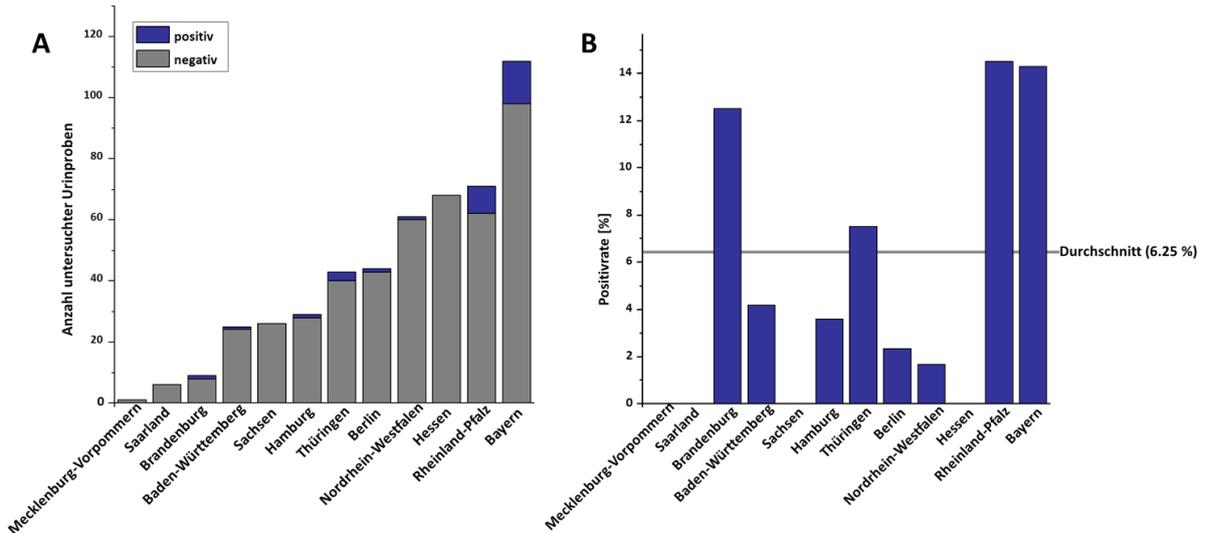


Abbildung 59: (A) Übersicht über die Herkunft der untersuchten Urinproben mit dem Anteil der positiv getesteten Proben auf synthetische Cannabinoide (blau); (B) Positivraten dargestellt nach den Bundesländern.

In ca. 11% (n = 20) der untersuchten Haarproben wurden ein oder mehrere synthetische Cannabinoide nachgewiesen (Tabelle 37). Bei den nachgewiesenen Substanzen handelt es sich um Verbindungen, die im Jahr 2010 häufig in Kräutermischungen enthalten waren (Daten aus einem internen Produktmonitoring). Die nachgewiesenen Konzentrationen sind bis auf zwei Ausnahmen sehr niedrig. Da es sich bei den Haarproben um Rückstellproben handelte, die zwei Jahre aufbewahrt worden waren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest eine teilweise Degradation der Verbindungen stattgefunden hat. Daten zur Stabilität synthetischer Cannabinoide in gelagerten Haaren liegen bisher nicht vor. Für THC wurde gezeigt, dass eine Exposition der Haarproben mit Sonnenlicht zu einer deutlichen Verringerung der THC-Konzentration führt^[169].

Tabelle 37: Analyseergebnisse der positiv getesteten Haarproben aus der Fahreignungsdiagnostik aus dem Jahr 2010.

Haarlänge [cm]	Haarfarbe	nachgewiesene Substanz	Konzentration [pg/mg]
4	dunkelbraun	JWH-018	0,77
4,5	dunkelblond	JWH-073	nachgewiesen < 0,8
5	braun	JWH-018	2,6
		JWH-073	570*
5	blond	JWH-018	nachgewiesen < 1,2
6	braun	JWH-210	nachgewiesen < 0,7
6	braun	JWH-122	nachgewiesen < 0,5
		JWH-210	nachgewiesen < 0,5
6,5	schwarz	JWH-122	0,77
8	braun	RCS-4	190*
8	schwarz	JWH-018	0,68
		JWH-122	2
8	hellbraun	JWH-018	0,5
		JWH-122	2
		JWH-210	2
8	braun	JWH-018	nachgewiesen < 0,8

Haarlänge [cm]	Haarfarbe	nachgewiesene Substanz	Konzentration [µg/mg]
		JWH-122	3
		JWH-210	6,8
9	braun	AM-2201	nachgewiesen < 0,5
9	schwarz	JWH-018	nachgewiesen < 0,5
		JWH-122	1,1
		JWH-210	1,6
9,5	schwarz	RCS-4	63
10	braun	JWH-018	0,84
11	braun	JWH-018	0,6
		JWH-122	2,5
		JWH-210	4,7
11	dunkelbraun	JWH-015	nachgewiesen < 0,5
		JWH-018	0,5
11	braun	JWH-018	nachgewiesen < 0,5
		JWH-073	0,7
26	braun	JWH-018	0,6
		JWH-122	2,7
		JWH-210	5,8
30	dunkelbraun	JWH-018	9,6

* Die Konzentration lag oberhalb dem höchsten Kalibrator und wurde extrapoliert

Auffallend ist, dass die Positivraten in Urin- und Haarproben in ungefähr derselben Größenordnung liegen. In der Studie einer italienischen Arbeitsgruppe, in der 344 Haarproben aus Fahreignungsdiagnostik und Entzugsprogrammen auf synthetische Cannabinoide untersucht wurden, liegt die Positivrate mit 4,4% (n = 15) etwas unterhalb der hier vorgestellten^[170]. Ein Großteil der Positivproben (n = 12) war dabei, wie zu erwarten war, in der Gruppe der chronischen THC-Konsumenten (n = 129, Positivrate 9,3%) zu finden, drei positive Haarprobe stammten aus der Gruppe mit chronischem Konsum mindestens einer Substanz einer anderen Drogenklasse (Kokain, Opiate, Amphetamine) (n = 135; Positivrate 2,2%) und keine positive Haarprobe wurde in der Alkohol-Gruppe (n = 80) ermittelt. Bei Betrachtung der Haaranalytik muss vor allem in Betracht gezogen werden, dass auch eine externe Kontamination der Haare zu positiven Analyseergebnissen führen kann. Wie in Kapitel 5.7 erläutert, ist bei derzeitigem Kenntnisstand der Konsum der Substanzen nicht von einem Umgang mit den Substanzen zu unterscheiden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Substitution eines Cannabiskonsums durch synthetische Cannabinoide in der Drogenabstinenzkontrolle bei Fahreignungsuntersuchungen eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt.

5.9 Evaluierung eines ELISA-basierten Schnelltests zum Nachweis synthetischer Cannabinoide im Urin

Neben der zunächst angenommenen Legalität der Kräutermischungen wurde als Konsumgrund von einem Großteil der Konsumenten auch die Nichtnachweisbarkeit der Substanzen vor allem in Schnelltests angegeben. Immunoassays stellen eine kostengünstige Methodik dar, mit der ein hohes Probenaufkommen in relativ kurzer Zeit analysiert werden kann. Inzwischen wurden einige Schnelltests zum Nachweis synthetischer Cannabinoide in Blut oder Urinproben entwickelt. Auch wenn diese Schnelltests zunächst attraktiv erscheinen, stoßen sie häufig an ihre Grenzen. Vor allem dann, wenn wie im Falle der synthetischen Cannabinoide ein großes Spektrum strukturell unterschiedlicher Substanzen in sehr niedrigen Konzentrationen (<1 ng/mL) vorliegt, können geringe Sensitivität und Spezifität des Tests schnell zu falschen Ergebnissen führen. Wie bereits erwähnt liegt in der Urinanalytik von synthetischen Cannabinoiden die Schwierigkeit darin, dass die Muttersubstanzen selbst nicht im Urin zu finden sind und daher zunächst der Metabolismus aufgeklärt werden muss. Die in Immunoassay für Urinproben verwendeten Antikörper müssen daher auf die Metaboliten gerichtet sein. Ziel der hier vorgestellten Studie war es, durch den Vergleich eines kommerziellen Immunoassays zum Screening auf synthetische Cannabinoide mit einer umfassenden und hoch-sensitiven LC-MS/MS-Screening-Methode die Leistungsfähigkeit des Assays zu evaluieren.

Getestet wurden zwei unterschiedliche Chargen des „Synthetic Cannabinoids (Spice)“-ELISA der Firma Randox (Crumlin, UK). Die vom Hersteller angegebenen Kreuzreaktivitäten des Immunoassay finden sich im Anhang. Es sind für einige Metaboliten sehr hohe Kreuzreaktivitäten angegeben (vor allem für Metaboliten des JWH-018), für viele andere Substanzen allerdings nur geringe oder keine. Zur Interpretation der durch den Immunoassays ermittelten Daten wird ein Cut-off-Wert definiert, für den alle darunter liegenden Werte als „negativ“ und darüber liegenden Werte als „positiv“ bewertet werden. Die Festlegung dieses „Cut-offs“ auf einen bestimmten Wert ist somit – in Verbindung mit der Kalibration des Assays – ausschlaggebend für die Sensitivität und Spezifität der Methode. Erzeugt eine Methode eine sehr hohe Rate an „richtig-positiven“ Befunden, ist dies gleichbedeutend mit einer hohen Sensitivität der Methode, eine niedrige Rate „falsch-positiver“ Befunde bedeutet eine hohe Spezifität der Methode. Angaben zu einem empfohlenen Cut-off, ab wann das Ergebnis des Immunoassay als positiv zu werten ist, wurden seitens des Herstellers nicht gegeben. Die Leistungsfähigkeit des Tests wurde daher unter Anwendung mehrerer Cut-offs mittels einer „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Analyse getestet. Dabei wird die Abhängigkeit der Entscheidungsgüte (Sensitivität) von der Fehlerrate (Spezifität) für verschiedene Cut-off-Werte visuell dargestellt. Je näher die daraus ermittelte AUC („area under the curve“) am Wert 1 liegt, desto höher

ist die Leistungsfähigkeit der Methode einzuschätzen. Liegt die AUC bei 0,5 ist die Methode einer rein zufälligen Zuordnung zu „positiv“ bzw. „negativ“ nicht überlegen. Eine Übersicht über die Verteilung der mittels LC-MS/MS nachgewiesenen Substanzen in den Positivproben gibt Abbildung 60. Deutlich wird vor allem, dass neben den Metaboliten des JWH-018 auch eine Vielzahl anderer Substanzen in den Urinproben nachgewiesen wurde, zu denen keine Informationen über die Kreuzreaktivität des verwendeten Immunoassay vorliegen. Allerdings wurden in 70% der positiv getesteten Urinproben Metaboliten von zwei oder mehr (bis hin zu sieben) unterschiedlichen synthetischen Cannabinoide nachgewiesen (Abbildung 61), wodurch die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses des Immunoassays enorm erhöht sein sollte, da die Kreuzreaktivität auf die Metaboliten einer Substanz für ein positives Ergebnis ausreicht. In der Übersicht der Verteilung der synthetischen Cannabinoide wird deutlich, wie stark sich das Substanzenprofil zwischen den zwei Untersuchungszeiträumen verschob.

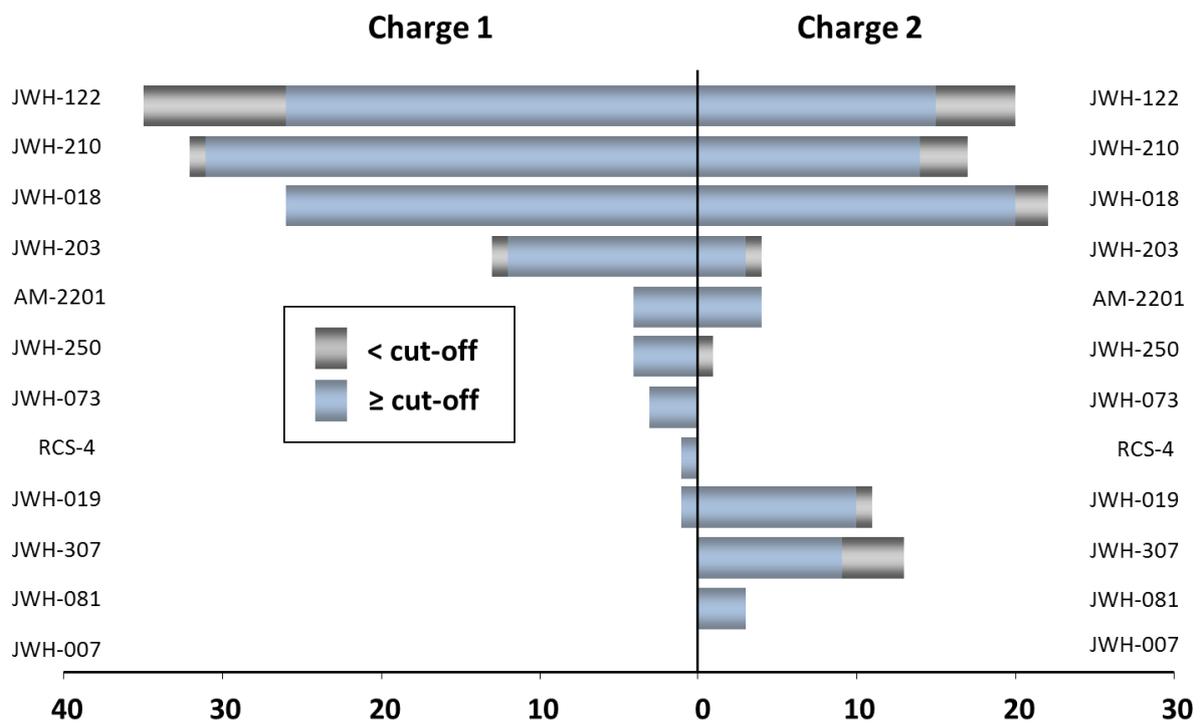


Abbildung 60: Verteilung der mittels LC-MS/MS nachgewiesenen Substanzen in den untersuchten Urinproben. Charge 1: Cut-off festgelegt auf 4 µg Eq./L, Anzahl analysierter Urinproben = 119; davon wurden 51 Proben (42,9%) mittels LC-MS/MS positiv getestet, Zeitraum: September bis Dezember 2011. Charge 2: Cut-off festgelegt auf 1,2 µg Eq./L, Anzahl analysierter Urinproben = 375; davon wurden 38 Proben (10,19%) mittels LC-MS/MS positiv getestet, Zeitraum: März bis April 2012.

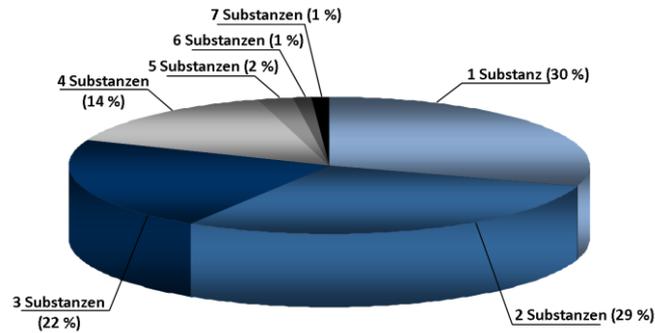


Abbildung 61: Verteilung der Anzahl nachgewiesener synthetischer Cannabinoide nebeneinander in den untersuchten Urinproben (n = 494).

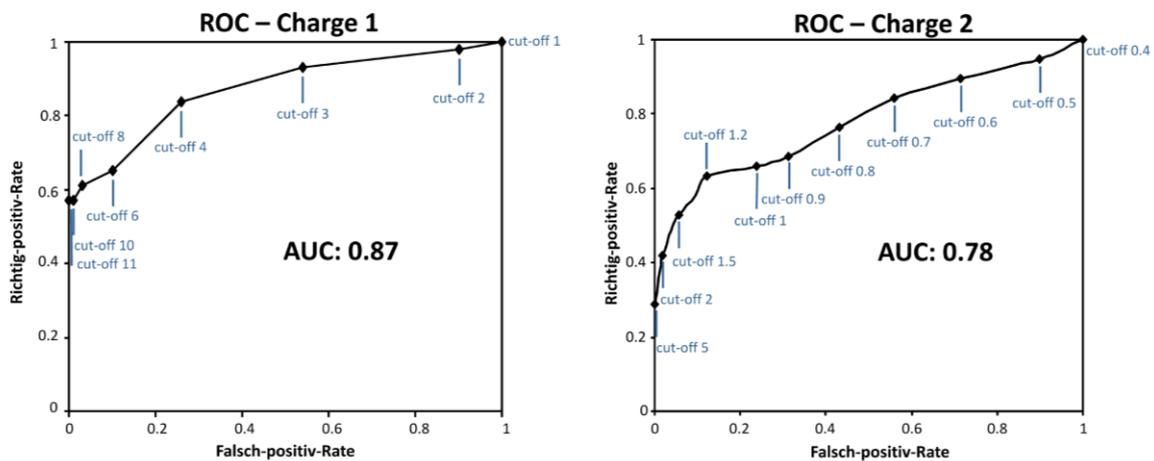


Abbildung 62: ROC-Kurven für die zwei evaluierten Chargen des Immunoassays zum Nachweis synthetischer Cannabinoide in Urinproben mit den jeweiligen „Area under the curve“ (AUC)-Werten. Die Cut-off-Werte sind in $\mu\text{g Eq./L}$ angegeben. Ein AUC-Wert von ≈ 1 entspricht einer 100%-igen Trefferquote der Methode, ein AUC = 0,5 entspricht einer Methode, die nach Zufallsprinzip entscheidet.

In Abbildung 62 sind die ROC-Kurven zu den beiden untersuchten Chargen dargestellt. Für die erste Charge wurde der Cut-off nach Auswertung der 119 untersuchten Urinproben auf $4 \mu\text{g Eq./L}$ festgelegt (Zeitraum der Probenahme: September bis Dezember 2011). Ein Vergleich der ELISA-Ergebnisse mit den Ergebnissen der LC-MS/MS-Methode resultierte dabei in einer Sensitivität von 84,3% und einer Spezifität von 73,5%. Eine Erhöhung der Sensitivität (= Richtig-positiv-Rate; vgl. Cut-off $3 \mu\text{g Eq./L}$) geht mit einer drastischen Verschlechterung der Spezifität (Falsch-positiv-Rate = $1 - \text{Spezifität}$) einher. Für die Evaluierung der zweiten Charge musste, wahrscheinlich aufgrund einer neuen Zusammensetzung der verwendeten Antikörper, nach Auswertung der 375 untersuchten Urinproben (Zeitraum der Probenahme: März bis April 2012) der Cut-off-Wert neu bestimmt werden. Um eine Sensitivität über 60% zu erreichen wurde der Cut-off auf $1,2 \mu\text{g Eq./L}$ festgelegt (Sensitivität = 63,2%). Die resultierende Selektivität lag dann bei 87,8%. Auch hier führte eine Erhöhung der Sensitivität zu einer enormen Verschlechterung der Selektivität (vgl. Cut-off = $1 - 0,4 \mu\text{g Eq./L}$). Die AUC-Werte der beiden ROC-Kurven wurden auf 0,87 (Charge 1) bzw. 0,78 (Charge 2) kalkuliert. Die

AUC der ROC-Kurve der zweiten Charge liegt damit noch weiter unter dem optimalen AUC-Wert von 1, als die AUC der ROC-Kurve der Charge 1. Wie in Abbildung 60 gut zu erkennen ist, änderte sich das Spektrum der in den Urinproben nachgewiesenen synthetischen Cannabinoide innerhalb nur weniger Monate enorm. Die Strukturvielfalt der synthetischen Cannabinoide, die hohe Fluktuation der Substanzen sowie die sehr geringen Konzentrationen der in den Urinproben vorliegenden Metaboliten erschweren die Entwicklung eines zuverlässigen Schnelltests auf Antikörperbasis enorm.

6 Zusammenfassung

Unter Zuhilfenahme unterschiedlicher flüssigkeitschromatographisch-massenspektrometrischer Messtechniken wurden die Hauptmetaboliten von 16 synthetischen Cannabinoiden in Humanurin von Drogenkonsumenten identifiziert. Basierend auf einer ständigen Marktüberwachung der Kräutermischungen vom „Spice“-Typ wurden die Metaboliten der synthetischen Cannabinoide, welche häufiger auftreten, zeitnah identifiziert. Für alle untersuchten synthetischen Cannabinoide wurden Mono- und Dihydroxylierungen sowie Oxidationen zur Carbonsäure als Hauptreaktionen des Phase-I-Metabolismus beobachtet. Die unverstoffwechselten Muttersubstanzen wurden in den untersuchten Urinproben nicht detektiert. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit einer Vielzahl weiterer Arbeiten, welche sich ebenfalls mit dem Metabolismus synthetischer Cannabinoide beschäftigen^[108, 111-113, 123, 124, 135, 137, 148-150, 158]. Desalkylierte Verbindungen, welche in einigen Arbeiten als Metaboliten synthetischer Cannabinoide gefunden wurden, traten in der vorliegenden Arbeit nicht als Hauptmetaboliten auf. Für den sensitiven Nachweis eines Konsums der hier untersuchten synthetischen Cannabinoide sind diese Metaboliten daher nicht relevant. Die Struktursicherung der postulierten Metaboliten erfolgte durch Bestimmung der Feinmassen, sowie –falls erhältlich – durch Abgleich mit den entsprechenden Referenzsubstanzen. Da als Referenzstandards, welche üblicherweise zur Entwicklung einer LC-MS/MS basierten Nachweismethode verwendet werden, von den meisten Herstellern die unkonjugierten Verbindungen angeboten werden, fokussierte sich die vorliegende Arbeit auf die Aufklärung der Phase-I-Metaboliten. Wie in der Literatur beschrieben^[126], werden die funktionalisierten Verbindungen größtenteils als Glucuronide ausgeschieden. Dies wurde bei der Methodenentwicklung durch Spaltung dieser Verbindungen mittels β -Glucuronidase berücksichtigt.

In den *in vitro* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zum Metabolismus ausgewählter synthetischer Cannabinoide zeigte sich, dass alle zehn untersuchten CYP Isoformen zur Oxidation von AM-694, MAM-2201, JWH-122 und RCS-4 beitragen können. Es liegen aber erhebliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Aktivität und der Vielfalt der katalysierten Reaktionen vor. Über die Ermittlung einiger kinetischer Parameter für den *in vitro* Metabolismus von JWH-122 und RCS-4 wurde gezeigt, dass vor allem die Isoformen CYP1A2, CYP2A8, CYP2C9, CYP3A4 und CYP3A5 an deren Umsatz beteiligt sind. Ob es durch den Polymorphismus des CYP2C9 zu deutlichen interindividuellen Unterschieden in der Metabolisierung kommen kann, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen werden die Hauptmetabolisierungsreaktionen durch

mehrere CYP-Isoformen katalysiert. Individuelle genetische Varianten sollten daher beim Metabolismus synthetischer Cannabinoide nur eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Neben den oben genannten Hauptmetabolisierungsreaktionen wurden im Metabolismus einiger synthetischer Cannabinoide Besonderheiten festgestellt. Dabei handelt es sich zum einen um die *in vivo* beobachtete Decarboxylierung der Säuremetaboliten. Diese Reaktion führt über einen noch ungeklärten Mechanismus zu einer Verkürzung der Alkylkette. In einigen Fällen können dabei Metaboliten entstehen, die üblicherweise aus dem Konsum eines anderen synthetischen Cannabinoides resultieren. Beispielsweise werden nach Konsum des synthetischen Cannabinoides JWH-019 sowohl Metaboliten des Pentylanalogons JWH-018 als auch des Butylanalogons JWH-073 und des Propylanalogons JWH-072 in den Urinproben der Konsumenten detektiert.

Eine weitere Besonderheit liegt im Metabolismus der synthetischen Cannabinoide, die eine 5-Fluoropentylgruppe am Indolstickstoff tragen. Neben den üblichen Monohydroxylierungen der Verbindungen kommt es bei diesen Substanzen auch zu einer metabolischen Substitution des Fluoratoms durch eine Hydroxygruppe. Dadurch werden Metaboliten gebildet, welche typisch für das nicht-fluorierte Analogon sind. Dies kann zu Problemen führen, wenn die nicht-fluorierten Analoga auch in Kräutermischungen auftreten, da in diesen Fällen nicht ohne weiteres auf die konsumierte Substanz geschlossen werden kann. So werden nach dem Konsum des synthetischen Cannabinoids AM-2201, neben den „typischen AM-2201-Metaboliten“, zusätzlich Metaboliten des JWH-018, sowie die durch weitere Decarboxylierung gebildeten Metaboliten des JWH-073 im Urin nachgewiesen.

Demnach kann der Nachweis von Metaboliten des JWH-073 in einer Urinprobe unterschiedliche Ursachen haben: 1) Es wurde JWH-073 als Substanz konsumiert, 2) Die JWH-073 Metaboliten wurden durch Decarboxylierung nach dem Konsum von JWH-018 gebildet, 3) Der Konsum von JWH-019 führte durch Decarboxylierungsreaktionen zu den Metaboliten des JWH-018 und des JWH-073 oder 4) Es fand eine Defluorierung mit anschließender Decarboxylierung von AM-2201 statt.

Eine Aufklärung kann im Falle des Konsums von AM-2201 mittels der Betrachtung der Metaboliten des JWH-018 gelingen, da im Rahmen dieser Arbeit der N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit als Konsummarker für JWH-018 identifiziert wurde. Entsprechende Analogieschlüsse sind nach ersten Beobachtungen in Patientenproben wahrscheinlich auch für strukturell analog aufgebaute synthetische Cannabinoide (wie EAM-2201, MAM-2201 und XLR-11) zulässig. Vor allem aus forensischer Sicht kann die sichere Identifizierung der konsumierten Substanz von besonderem Interesse sein, da die fluorierten Verbindungen im Vergleich zu ihren defluorierten Analoga oft erst zeitlich verzögert dem BtMG unterstellt wurden und in manchen Fällen die Zuordnung zu einem bestimmten Produkt von Interesse für die Strafverfolgung sein kann. (Unerlaubte Abgabe von

Betäubungsmitteln oder Arzneimitteln mit gesundheitlichen Folgen kann als Körperverletzung geahndet werden.)

Zusätzlich zu den metabolisch bedingten Besonderheiten treten häufig bereits während des Rauchens der synthetischen Cannabinoide Transformationen auf, welche das Metabolitenspektrum zusätzlich erweitern. So kann die Hitzeeinwirkung während des Rauchens zu Defluorierung, Dehydrierung oder Öffnungen instabiler Ringsysteme führen. Auch die dabei entstehenden Verbindungen werden beim Rauchen aufgenommen und metabolisiert.

Durch den Konsum nur einer Substanz wird so in einigen Fällen eine Vielzahl unterschiedlicher Metaboliten vermeintlich verschiedener Substanzen gebildet. Dies kann auch Einfluss auf die Pharmakodynamik haben, da inzwischen bekannt ist, dass einige Metaboliten synthetischer Cannabinoide zumindest *in vitro* eine Rezeptoraffinität aufweisen, die noch oberhalb der des THCs liegt^[130-133]. Sollten diese Metaboliten auch intrinsisch aktiv sein und in größerer Menge entstehen, können unberechenbare Veränderungen des Wirkstoffprofils und gegebenenfalls auch unbeabsichtigte akute Vergiftungen die Folge sein. Handelt es sich gar um chronische Konsumenten, welche unterschiedliche Produkte mit verschiedenen synthetischen Cannabinoiden konsumieren, wird die Situation aufgrund der langsamen Eliminierung der Substanzen aus dem Körper noch komplexer. Die enorm lange Nachweisbarkeit der synthetischen Cannabinoide in Urinproben deutet darauf hin, dass die Substanzen durch ausgeprägte Umverteilungsprozesse eine lange Verweildauer im Körper aufweisen. All diese Faktoren addieren sich zu einem gesundheitlich nicht abschätzbaren Risiko für den Konsumenten.

Weiter wird die Interpretation der Ergebnisse aus forensisch-toxikologischer Sicht aufgrund der ausgeprägten Umverteilungsprozesse, durch die Metabolismusbesonderheiten und Pyrolyseprodukte, die während des Rauchens entstehen, erschwert.

Die im Zuge dieser Arbeit entwickelte Nachweismethode für Metaboliten synthetischer Cannabinoide in Urinproben liefert vor allem für die Abstinenzkontrolle ein effizientes Werkzeug. Die Verbindungen können aufgrund der hohen Sensitivität der Methode und der damit verbundenen langen Nachweisdauer der Substanzen über ein großes Zeitfenster erfasst werden. Zwar ist der Aufwand, die Methode aktuell zu halten, im Vergleich zur Serum- oder Haaranalytik deutlich erhöht, da zunächst die Hauptmetaboliten identifiziert werden müssen, dem stehen aber auch große Vorteile gegenüber. So ist die Probengewinnung im Vergleich zu Serum oder Blut nicht invasiv und erlaubt eine verhältnismäßig einfache Abstinenzkontrolle über ein meist größeres Zeitfenster. Die Haaranalytik erlaubt zwar eine retrospektive Bewertung, die noch viel weiter zurück reichen kann, allerdings ist aufgrund möglicher externer Kontamination bei der Bewertung der Befunde Vorsicht geboten. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, kann der auf das Haar einwirkende

Nebenstromrauch eines Joints, welcher mit synthetischen Cannabinoiden versetzt wurde, zu beträchtlichen und lange nachweisbaren Kontaminationen im Haar führen. Bei bisherigem Wissensstand ist daher bei einem positiven Haarbefund nicht zwischen einem Konsum und einer externen Kontamination zu unterscheiden.

Auch wenn die Methodenentwicklung sich durch die oftmals nicht gegebene Verfügbarkeit von Referenzstandards sehr komplex gestaltet und die Auswertung und Interpretation vergleichsweise aufwendig bleibt, ist ein LC-MS/MS basiertes Screeningverfahren der Verwendung eines antikörperbasierten Schnelltests zum Nachweis synthetischer Cannabinoide im Urin unbedingt vorzuziehen. In der vorliegenden Arbeit hat sich gezeigt, dass zum sicheren Nachweis eines Konsums synthetischer Cannabinoide in Urinproben nur umfassende, hoch-sensitive und ständig aktualisierte LC-MS/MS-Methoden eine wirksame Abstinenzkontrolle ermöglichen. Dies kommt vor allem im Bereich der Fahreignungsüberprüfung und in forensisch-psychiatrischen Einrichtungen zum Tragen, wo die Substitution von Cannabis mit synthetischen Cannabinoiden eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt.

Die *in vitro* nachgewiesene sehr hohe Potenz der synthetischen Cannabinoide, die große strukturelle Vielfalt und die schwer abzuschätzenden Interaktionen der einzelnen Substanzen sowie deren aktiver Metaboliten lassen den Konsum synthetischer Cannabinoide wesentlich gefährlicher erscheinen, als den von Cannabis. Aus Fallberichten geht hervor, dass vor allem unerfahrene Erstkonsumenten und Personen mit chronischem, starkem Konsum besonders gefährdet sind.

Der Einsatz der entwickelten Nachweismethoden in die Routineanalytik hat sich als wertvolles Instrument in der Prävention entwickelt, da durch die Nachweismöglichkeit in Urinproben eine für die meisten Konsumentengruppen wichtige Konsummotivation entfällt. Allerdings ist darauf zu achten, die analytischen Methoden immer auf dem neuesten Stand zu halten. Dazu ist sowohl ein systematisches Marktmonitoring als auch eine schnelle Adaption der Methoden trotz des hohen Aufwands absolut unumgänglich.

7 Literaturverzeichnis

- [1] UNODC. Synthetic cannabinoids in herbal products, *UNODC* **2011**, *SCITEC/24*, 24.
- [2] Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA). Europäischer Drogenbericht - Trends und Entwicklung, **2013**.
- [3] R. Mechoulam, Y. Gaoni. A Total Synthesis of delta-9-Tetrahydrocannabinol, the Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87*, 3273-3275.
- [4] L.A. Matsuda, S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, T.I. Bonner. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **1990**, *346*, 561-564.
- [5] S. Munro, K.L. Thomas, M. Abu-Shaar. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **1993**, *365*, 61-65.
- [6] S. Sarfaraz, V.M. Adhami, D.N. Syed, F. Afaq, H. Mukhtar. Cannabinoids for cancer treatment: progress and promise. *Cancer Research* **2008**, *68*, 339-342.
- [7] J.P. Zajicek, V.I. Apostu. Role of cannabinoids in multiple sclerosis. *CNS drugs* **2011**, *25*, 187-201.
- [8] O. Sagredo, M. Ruth Pazos, S. Valdeolivas, J. Fernandez-Ruiz. Cannabinoids: Novel Medicines for the Treatment of Huntingtons Disease. *Recent Patents on CNS Drug Discovery* **2012**, *7*, 41-48.
- [9] J.L. Croxford. Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS drugs* **2003**, *17*, 179-202.
- [10] A.C. Porter, C.C. Felder. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacology and Therapeutics* **2001**, *90*, 45-60.
- [11] G.A. Thakur, R. Tichkule, S. Bajaj, A. Makriyannis. Latest advances in cannabinoid receptor agonists. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2009**, *19*, 1647-1673.
- [12] A. Weissman, G.M. Milne, L. Melvin. Cannabimimetic activity from CP-47,497, a derivative of 3-phenylcyclohexanol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1982**, *223*, 516-523.
- [13] A. Howlett, T. Champion, G. Wilken, R. Mechoulam. Stereochemical effects of 11-OH- Δ -8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology* **1990**, *29*, 161-165.
- [14] J.W. Huffman, D. Dai, B.R. Martin, D.R. Compton. Design, synthesis and pharmacology of cannabimimetic indoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **1994**, *4*, 563-566.

- [15] J.L. Wiley, D.R. Compton, D. Dai, J.A. Lainton, M. Phillips, J.W. Huffman, B.R. Martin. Structure-activity relationships of indole- and pyrrole-derived cannabinoids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1998**, *285*, 995-1004.
- [16] J.W. Huffman, G. Zengin, M.-J. Wu, J. Lu, G. Hynd, K. Bushell, A.L. Thompson, S. Bushell, C. Tartal, D.P. Hurst. Structure-activity relationships for 1-alkyl-3-(1-naphthoyl) indoles at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors: steric and electronic effects of naphthoyl substituents. New highly selective CB2 receptor agonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 89-112.
- [17] J.L. Wiley, J.A. Marusich, T.W. Lefever, M. Grabenauer, K.N. Moore, B.F. Thomas. Cannabinoids in disguise: delta-9-Tetrahydrocannabinol-like effects of tetramethylcyclopropyl ketone indoles. *Neuropharmacology* **2013**, *75*, 145-154.
- [18] Advisory Council on the Misuse of Drugs (ACMD). Consideration of the major cannabinoid agonists, **2009**.
- [19] V. Auwärter, S. Dresen, W. Weinmann, M. Müller, M. Pütz, N. Ferreira. "Spice" and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *Journal of Mass Spectrometry* **2009**, *44*, 832-837.
- [20] M. Spaderna, P.H. Addy, D.C. D'Souza. Spicing things up: synthetic cannabinoids. *Psychopharmacology* **2013**, *228*, 525-540.
- [21] J. Wehrman. Fake Marijuana Spurs More than 3,000 Calls to US Poison Centers. **2011** erreichbar via <http://www.drugcaucus.senate.gov/hearing-4-6-11/AAPCC%20National%20Press%20Release%20K2,%20Spice%203-28-2011.pdf> [Stand 21.01.2014].
- [22] N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, J. Ogata, Y. Goda. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Science International* **2010**, *198*, 31-38.
- [23] R. Lindigkeit, A. Boehme, I. Eiserloh, M. Luebbecke, M. Wiggermann, L. Ernst, T. Beuerle. Spice: a never ending story? *Forensic Science International* **2009**, *191*, 58-63.
- [24] B.C. Ginsburg, L.R. McMahon, J.J. Sanchez, M.A. Javors. Purity of synthetic cannabinoids sold online for recreational use. *Journal of Analytical Toxicology* **2012**, *36*, 66-68.
- [25] I. Vardakou, C. Pistos, C. Spiliopoulou. Spice drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation. *Toxicology Letters* **2010**, *197*, 157-162.
- [26] Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA). Stand der Drogenproblematik in Europa, **2009**.
- [27] K. Brown. New Zealand bans synthetic cannabinoids. *BMJ* **2011**, *343*, d5935.
- [28] D. Zuba, B. Byrska, M. Maciow. Comparison of "herbal highs" composition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *400*, 119-126.

- [29] S. Dresen, N. Ferreiros, M. Pütz, F. Westphal, R. Zimmermann, V. Auwärter. Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *Journal of Mass Spectrometry* **2010**, *45*, 1186-1194.
- [30] J. Ogata, N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda. DNA sequence analyses of blended herbal products including synthetic cannabinoids as designer drugs. *Forensic Science International* **2013**, *227*, 33-41.
- [31] A. Pabst, D. Piontek, L. Kraus, S. Müller. Substanzkonsum und substanzbezogene Störungen. *SUCHT-Zeitschrift für Wissenschaft und Praxis/Journal of Addiction Research and Practice* **2010**, *56*, 327-336.
- [32] C. Bernard, B. Werse, C. Schell-Mack. MoSyD Jahresbericht 2012. *Drogentrends in Frankfurt am Main. Centre for Drug Research (CDR), Frankfurt* **2013**.
- [33] Institute for Social Research, The University of Michigan. Monitoring the Future national results on drug use: 2012 Overview, Key Findings on Adolescence Drug Use, **2013**.
- [34] B. Werse, C. Morgenstern. Abschlussbericht - Online-Befragung zum Thema "Legal Highs". *Frankfurt a.M.: Goethe-Universität, Centre for Drug Research* **2011**.
- [35] P.I. Dargan, S. Hudson, J. Ramsey, D.M. Wood. The impact of changes in UK classification of the synthetic cannabinoid receptor agonists in "Spice". *International Journal of Drug Policy* **2011**, *22*, 274-277.
- [36] R. Kikura-Hanajiri, N. Uchiyama, Y. Goda. Survey of current trends in the abuse of psychotropic substances and plants in Japan. *Legal Medicine* **2011**, *13*, 109-115.
- [37] N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, N. Kawahara, Y. Haishima, Y. Goda. Identification of a cannabinoid analog as a new type of designer drug in a herbal product. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2009**, *57*, 439-441.
- [38] N. Uchiyama, R. Kikura-Hanajiri, N. Kawahara, Y. Goda. Identification of a cannabimimetic indole as a designer drug in a herbal product. *Forensic Toxicology* **2009**, *27*, 61-66.
- [39] Bundesgesetzblatt Jahrgang 2009 Teil I Nr. 3, 22. Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften. **21.01.2009**.
- [40] F. Westphal, T. Junge, F. Sönnichsen, P. Rösner, J. Schäper. Ein neuer Wirkstoff in SPICE-artigen Kräutermischungen: Charakterisierung von JWH-250, seinen Methyl- und Trimethylsilylderivaten. *Toxichem Krimtech* **2010**, *77*, 8.
- [41] L. Ernst, H.M. Schiebel, C. Theuring, R. Lindigkeit, T. Beuerle. Identification and characterization of JWH-122 used as new ingredient in "Spice-like" herbal incenses. *Forensic Science International* **2011**, *208*, e31-35.
- [42] J. Nakajima, M. Takahashi, R. Nonaka, T. Seto, J. Suzuki, M. Yoshida, C. Kanai, T. Hamano. Identification and quantitation of a benzoylindole (2-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl) methanone and a naphthoylindole 1-(5-fluoropentyl-1H-indol-3-yl)-(naphthalene-1-yl) methanone (AM-2201) found in illegal products obtained via the Internet and their cannabimimetic effects evaluated by in vitro [35S] GTP-gamma-S binding assays. *Forensic Toxicology* **2011**, *29*, 132-141.

- [43] J. Nakajima, M. Takahashi, T. Seto, C. Kanai, J. Suzuki, M. Yoshida, T. Hamano. Identification and quantitation of two benzoylindoles AM-694 and (4-methoxyphenyl)(1-pentyl-1H-indol-3-yl) methanone, and three cannabimimetic naphthoylindoles JWH-210, JWH-122, and JWH-019 as adulterants in illegal products obtained via the Internet. *Forensic Toxicology* **2011**, *29*, 95-110.
- [44] N. Uchiyama, M. Kawamura, R. Kikura-Hanajiri, Y. Goda. Identification and quantitation of two cannabimimetic phenylacetylindoles JWH-251 and JWH-250, and four cannabimimetic naphthoylindoles JWH-081, JWH-015, JWH-200, and JWH-073 as designer drugs in illegal products. *Forensic Toxicology* **2011**, *29*, 25-37.
- [45] Bundesgesetzblatt Jahrgang 2012 Teil I Nr. 35, 26. Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften. **20.07.2012**.
- [46] Bundesgesetzblatt Jahrgang 2013 Teil I Nr. 37, 27. Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften. **16.07.2013**.
- [47] Bundesgesetzblatt Jahrgang 2009 Teil I Nr. 80, 24. Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften. **23.09.2009**.
- [48] L. Fattore, W. Fratta. Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **2011**, *5*, 60.
- [49] Mitteilung der THC Pharm. Untersuchung des Handelsproduktes "Spice", **2008** erreichbar via <http://usualredant.de/drogen/download/analyse-thc-pharm-spice-jwh-018.pdf> [Stand 21.01.2014].
- [50] H. Choi, S. Heo, S. Choe, W. Yang, Y. Park, E. Kim, H. Chung, J. Lee. Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**, *405*, 3937-3944.
- [51] S. Kneisel, F. Westphal, P. Rösner, V. Brecht, A. Ewald, B. Klein, M. Pütz, S. Thiemt, V. Auwärter. Cannabinoidmimetika: Massenspektren und IR-ATR-Spektren neuer Verbindungen aus den Jahren 2009/2010. *Toxichem Krimtech* **2011**, *78*, 23-35.
- [52] S. Kneisel, F. Westphal, B. Moosmann, V. Brecht, P. Bisel, C. Vidal, A. Jacobsen-Bauer, W.-R. Bork, V. Auwärter. Trends auf dem Gebiet der synthetischen Cannabinoidmimetika: Massenspektren und ATR-IR-Spektren neuer Verbindungen aus dem Zeitraum Ende 2010 bis Ende 2011. *Toxichem Krimtech* **2011**, *78*, 468.
- [53] J. Teske, J.P. Weller, A. Fieguth, T. Rothämel, Y. Schulz, H.D. Träger. Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2010**, *878*, 2659-2663.
- [54] S. Dresen, S. Kneisel, W. Weinmann, R. Zimmermann, V. Auwärter. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples. *Journal of Mass Spectrometry* **2011**, *46*, 163-171.

- [55] S. Kneisel, V. Auwärter. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*, 825-835.
- [56] C. Coulter, M. Garnier, C. Moore. Synthetic cannabinoids in oral fluid. *Journal of Analytical Toxicology* **2011**, *35*, 424-430.
- [57] S. Kneisel, V. Auwärter, J. Kempf. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis* **2012**, *5*, 657-669.
- [58] M. Dziadosz, J.P. Weller, M. Klintschar, J. Teske. Scheduled multiple reaction monitoring algorithm as a way to analyse new designer drugs combined with synthetic cannabinoids in human serum with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2013**, *929C*, 84-89.
- [59] V. Auwärter, A. Wohlfarth, J. Traber, D. Thieme, W. Weinmann. Hair analysis for delta-9-tetrahydrocannabinolic acid A - New insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair. *Forensic Science International* **2010**, *196*, 10-13.
- [60] F. Pragst, M.A. Balikova. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* **2006**, *370*, 17-49.
- [61] W.A. Devane, F.r. Dysarz, M.R. Johnson, L.S. Melvin, A.C. Howlett. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology* **1988**, *34*, 605-613.
- [62] R. Pertwee. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153*, 199-215.
- [63] A.R. Schatz, M. Lee, R.B. Condie, J.T. Pulaski, N.E. Kaminski. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1997**, *142*, 278-287.
- [64] A. Ameri. The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology* **1999**, *58*, 315-348.
- [65] K. Mackie, B. Hille. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, *89*, 3825-3829.
- [66] P. Pacher, S. Bátkai, G. Kunos. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* **2006**, *58*, 389-462.
- [67] N. Hájos, T.F. Freund. Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition. *Chemistry and Physics of Lipids* **2002**, *121*, 73-82.
- [68] L.S. Melvin, G.M. Milne, M.R. Johnson, B. Subramaniam, G.H. Wilken, A. Howlett. Structure-activity relationships for cannabinoid receptor-binding and analgesic activity: studies of bicyclic cannabinoid analogs. *Molecular Pharmacology* **1993**, *44*, 1008-1015.

- [69] J. Huffman, L. Padgett. Recent developments in the medicinal chemistry of cannabimimetic indoles, pyrroles and indenes. *Current Medicinal Chemistry* **2005**, *12*, 1395-1411.
- [70] J.W. Huffman, P.V. Szklennik, A. Almond, K. Bushell, D.E. Selley, H. He, M.P. Cassidy, J.L. Wiley, B.R. Martin. 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles, a new class of cannabimimetic indoles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 4110-4113.
- [71] B.K. Atwood, J. Huffman, A. Straiker, K. Mackie. JWH018, a common constituent of 'Spice' herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB receptor agonist. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *160*, 585-593.
- [72] B.K. Atwood, D. Lee, A. Straiker, T.S. Widlanski, K. Mackie. CP-47,497-C8 and JWH-073, commonly found in "Spice" herbal blends, are potent and efficacious CB1 cannabinoid receptor agonists. *European Journal of Pharmacology* **2011**, *659*, 139-145.
- [73] M.M. Aung, G. Griffin, J.W. Huffman, M. Wu, C. Keel, B. Yang, V.M. Showalter, M.E. Abood, B.R. Martin. Influence of the N-1 alkyl chain length of cannabimimetic indoles upon CB(1) and CB(2) receptor binding. *Drug and Alcohol Dependence* **2000**, *60*, 133-140.
- [74] V.M. Showalter, D.R. Compton, B.R. Martin, M.E. Abood. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1996**, *278*, 989-999.
- [75] A. Makriyannis, H. Deng. Cannabimimetic indole derivatives. *United States Patent Application, US 2008/0090871 A1*, **2008**.
- [76] J.W. Huffman, R. Mabon, M.-J. Wu, J. Lu, R. Hart, D.P. Hurst, P.H. Reggio, J.L. Wiley, B.R. Martin. 3-Indolyl-1-naphthylmethanes: new cannabimimetic indoles provide evidence for aromatic stacking interactions with the CB1 cannabinoid receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2003**, *11*, 539-549.
- [77] D. Compton, K.C. Rice, B.R. De Costa, R. Razdan, L.S. Melvin, M.R. Johnson, B.R. Martin. Cannabinoid structure-activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1993**, *265*, 218-226.
- [78] J.W. Huffman, L.W. Padgett, M.L. Isherwood, J.L. Wiley, B.R. Martin. 1-Alkyl-2-aryl-4-(1-naphthoyl) pyrroles: New high affinity ligands for the cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 5432-5435.
- [79] C. Manera, T. Tuccinardi, A. Martinelli. Indoles and related compounds as cannabinoid ligands. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 370-387.
- [80] J.L. Wiley, J.A. Marusich, B.R. Martin, J.W. Huffman. 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles and JWH-018 share in vivo cannabinoid profiles in mice. *Drug and Alcohol Dependence* **2012**, *123*, 148-153.
- [81] J.L. Wiley, D.E. Selley, P. Wang, R. Kottani, S. Gadthula, A. Mahadeven. 3-Substituted pyrazole analogs of the cannabinoid type 1 (CB1) receptor antagonist rimonabant: cannabinoid agonist-like effects in mice via non-CB1, non-CB2 mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2012**, *340*, 433-444.

- [82] J.L. Wiley, V.J. Smith, J. Chen, B.R. Martin, J.W. Huffman. Synthesis and pharmacology of 1-alkyl-3-(1-naphthoyl) indoles: Steric and electronic effects of 4-and 8-halogenated naphthoyl substituents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 2067-2081.
- [83] M. Hermanns-Clausen, S. Kneisel, B. Szabo, V. Auwärter. Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: clinical and laboratory findings. *Addiction* **2013**, *108*, 534-544.
- [84] B.C. Ginsburg, D.R. Schulze, L. Hrubá, L.R. McMahon. JWH-018 and JWH-073: delta-9-tetrahydrocannabinol-like discriminative stimulus effects in monkeys. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2012**, *340*, 37-45.
- [85] K. Tomiyama, M. Funada. Cytotoxicity of synthetic cannabinoids found in "Spice" products: The role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicology Letters* **2011**, *207*, 12-17.
- [86] V.J. Koller, G.J. Zlabinger, V. Auwärter, S. Fuchs, S. Knasmueller. Toxicological profiles of selected synthetic cannabinoids showing high binding affinities to the cannabinoid receptor subtype CB1. *Archives of Toxicology* **2013**, *87*, 1287-1297.
- [87] A.B. Schneir, T. Baumbacher. Convulsions associated with the use of a synthetic cannabinoid product. *Journal of Medical Toxicology* **2012**, *8*, 62-64.
- [88] E.W. Gunderson, H.M. Haughey, N. Ait-Daoud, A.S. Joshi, C.L. Hart. "Spice" and "K2" herbal highs: a case series and systematic review of the clinical effects and biopsychosocial implications of synthetic cannabinoid use in humans. *The American Journal on Addictions* **2012**, *21*, 320-326.
- [89] C.R. Harris, A. Brown. Synthetic cannabinoid intoxication: A case series and review. *The Journal of Emergency Medicine* **2013**, *44*, 360-366.
- [90] M. Hermanns-Clausen, S. Kneisel, M. Hutter, B. Szabo, V. Auwärter. Acute intoxication by synthetic cannabinoids - Four case reports. *Drug Testing and Analysis* **2013**, *5*, 790-794.
- [91] A. Mir, A. Obafemi, A. Young, C. Kane. Myocardial infarction associated with use of the synthetic cannabinoid K2. *Pediatrics* **2011**, *128*, e1622-e1627.
- [92] S. Peglow, J. Buchner, G. Briscoe. Synthetic cannabinoid induced psychosis in a previously nonpsychotic patient. *The American Journal on Addictions* **2012**, *21*, 287-288.
- [93] D. VeARRIER, K.C. Osterhoudt. A teenager with agitation: higher than she should have climbed. *Pediatric Emergency Care* **2010**, *26*, 462-465.
- [94] H. Müller, H. Huttner, M. Köhrmann, J. Wielopolski, J. Kornhuber, W. Sperling. Panic attack after spice abuse in a patient with ADHD. *Pharmacopsychiatry* **2010**, *43*, 152-153.
- [95] J. Lapoint, L. James, C. Moran, L. Nelson, R. Hoffman, J. Moran. Severe toxicity following synthetic cannabinoid ingestion. *Clinical Toxicology* **2011**, *49*, 760-764.
- [96] D. McQuade, S. Hudson, P.I. Dargan, D.M. Wood. First European case of convulsions related to analytically confirmed use of the synthetic cannabinoid receptor agonist AM-2201. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2012**, *69*, 373-376.

- [97] R. Pertwee, A. Howlett, M.E. Abood, S. Alexander, V. Di Marzo, M. Elphick, P. Greasley, H.S. Hansen, G. Kunos, K. Mackie. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews* **2010**, *62*, 588-631.
- [98] U.S. Zimmermann, P.R. Winkelmann, M. Pilhatsch, J.A. Nees, R. Spanagel, K. Schulz. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of "spice gold". *Deutsches Arzteblatt International* **2009**, *106*, 464.
- [99] V. Auwärter, S. Kneisel, M. Hutter, A. Thierauf. Synthetische Cannabinoide. *Rechtsmedizin* **2012**, *22*, 259-271.
- [100] A.L. Patton, K.C. Chimalakonda, C.L. Moran, K.R. McCain, A. Radominska-Pandya, L.P. James, C. Kokes, J.H. Moran. K2 toxicity: Fatal case of psychiatric complications following AM2201 exposure. *Journal of Forensic Sciences* **2013**, *58*, 1676-1680.
- [101] T. Saito, A. Namera, N. Miura, S. Ohta, S. Miyazaki, M. Osawa, S. Inokuchi. A fatal case of MAM-2201 poisoning. *Forensic Toxicology* **2013**, *31*, 333-337.
- [102] C. Prakash, C.L. Shaffer, A. Nedderman. Analytical strategies for identifying drug metabolites. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 340-369.
- [103] J.B. Houston. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochemical Pharmacology* **1994**, *47*, 1469-1479.
- [104] J.B. Houston, K.E. Kenworthy. In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model. *Drug Metabolism and Disposition* **2000**, *28*, 246-254.
- [105] H. Bisswanger, *Enzyme kinetics*, **2008**, Wiley-VCH, Weinheim, 2. überarbeitete Auflage
- [106] J.M. Hutzler, T.S. Tracy. Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, *30*, 355-362.
- [107] S. Clarke. In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica* **1998**, *28*, 1167-1202.
- [108] Q. Zhang, P. Ma, R.B. Cole, G. Wang. Identification of in vitro metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB2) by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2006**, *386*, 1345-1355.
- [109] Q. Zhang, P. Ma, M. Iszard, R.B. Cole, W. Wang, G. Wang. In vitro metabolism of R(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo [1,2,3-de]1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate, a cannabinoid receptor agonist. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, *30*, 1077-1086.
- [110] Q. Zhang, P. Ma, W. Wang, R.B. Cole, G. Wang. Characterization of rat liver microsomal metabolites of AM-630, a potent cannabinoid receptor antagonist, by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 672-681.
- [111] A. Wintermeyer, I. Möller, M. Thevis, M. Jübner, J. Beike, M.A. Rothschild, K. Bender. In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 2141-2153.

- [112] T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Science International* **2010**, *200*, 141-147.
- [113] I. Möller, A. Wintermeyer, K. Bender, M. Jübner, A. Thomas, O. Krug, W. Schänzer, M. Thevis. Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls. *Drug Testing and Analysis* **2010**, *3*, 609.
- [114] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, **2005**, Thieme Verlag, 7. überarbeitete Auflage.
- [115] S.J. Gaskell. Electrospray: principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 677-688.
- [116] L. Paul, F. Musshoff. Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen. *Toxichem Krimtech* **2009**, *76*, 142-176.
- [117] M. Hutter, B. Moosmann, S. Kneisel, V. Auwärter. Characteristics of the designer drug and synthetic cannabinoid receptor agonist AM-2201 regarding its chemistry and metabolism. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *48*, 885-894.
- [118] C.L. Crespi, V.P. Miller. The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes - state of the art and prospects for the future. *Pharmacology and Therapeutics* **1999**, *84*, 121-131.
- [119] F.T. Peters, M.R. Meyer. In vitro approaches to studying the metabolism of new psychoactive compounds. *Drug Testing and Analysis* **2011**, *3*, 483-495.
- [120] F. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, F. Mühlhoff. Anhang B zur Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. *Toxichem Krimtech* **2009**, *76*, 185-208.
- [121] B. Matuszewski, M. Constanzer, C. Chavez-Eng. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3019-3030.
- [122] M. Hutter, S. Kneisel, V. Auwärter, M.A. Neukamm. Determination of 22 synthetic cannabinoids in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2012**, *903*, 95-101.
- [123] A. Grigoryev, S. Savchuk, A. Melnik, N. Moskaleva, J. Dzhurko, M. Ershov, A. Nosyrev, A. Vedenin, B. Izotov, I. Zabirowa, V. Rozhanets. Chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, psychoactive components of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2011**, *879*, 1126-1136.
- [124] S. Beuck, I. Möller, A. Thomas, A. Klose, N. Schlörer, W. Schänzer, M. Thevis. Structure characterisation of urinary metabolites of the cannabimimetic JWH-018 using chemically synthesised reference material for the support of LC-MS/MS-based drug testing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *401*, 493-505.

- [125] M.A. ElSohly, W. Gul, K.M. Elsohly, T.P. Murphy, V.L. Madgula, S.I. Khan. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine specimens for K2 (JWH-018) metabolites. *Journal of Analytical Toxicology* **2011**, *35*, 487-495.
- [126] K.C. Chimalakonda, S.M. Bratton, V.H. Le, K.H. Yiew, A. Dineva, C.L. Moran, L.P. James, J.H. Moran, A. Radomska-Pandya. Conjugation of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073, metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition* **2011**, *39*, 1967-1976.
- [127] C.L. Moran, V.H. Le, K.C. Chimalakonda, A.L. Smedley, F.D. Lackey, S.N. Owen, P.D. Kennedy, G.W. Endres, F.L. Ciske, J.B. Kramer, A.M. Kornilov, L.D. Bratton, P.J. Dobrowolski, W.D. Wessinger, W.E. Fantegrossi, P.L. Prather, L.P. James, A. Radomska-Pandya, J.H. Moran. Quantitative Measurement of JWH-018 and JWH-073 Metabolites Excreted in Human Urine. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 4228-4236.
- [128] T. Li, L. Huo, C. Pulley, A. Liu. Decarboxylation mechanisms in biological system. *Bioorganic Chemistry* **2012**, *43*, 2-14.
- [129] D.P. Lovett, E.G. Yanes, T.W. Herbelin, T.A. Knoerzer, J.A. Levisky. Structure elucidation and identification of a common metabolite for naphthoylindole-based synthetic cannabinoids using LC-TOF and comparison to a synthetic reference standard. *Forensic Science International* **2013**, *226*, 81-87.
- [130] L.K. Brents, E.E. Reichard, S.M. Zimmerman, J.H. Moran, W.E. Fantegrossi, P.L. Prather. Phase I hydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-018 retain in vitro and in vivo cannabinoid 1 receptor affinity and activity. *PLoS One* **2011**, *6*, e21917.
- [131] L.K. Brents, A. Gallus-Zawada, A. Radomska-Pandya, T. Vasiljevik, T.E. Prisinzano, W.E. Fantegrossi, J.H. Moran, P.L. Prather. Monohydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-073 retain intermediate to high cannabinoid 1 receptor (CB1R) affinity and exhibit neutral antagonist to partial agonist activity. *Biochem Pharmacol* **2012**, *83*, 952-961.
- [132] K.C. Chimalakonda, K.A. Seely, S.M. Bratton, L.K. Brents, C.L. Moran, G.W. Endres, L.P. James, P.F. Hollenberg, P.L. Prather, A. Radomska-Pandya, J.H. Moran. Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metabolism and Disposition* **2012**, *40*, 2174-2184.
- [133] K.A. Seely, L.K. Brents, A. Radomska-Pandya, G.W. Endres, G.S. Keyes, J.H. Moran, P.L. Prather. A major glucuronidated metabolite of JWH-018 is a neutral antagonist at CB1 receptors. *Chemical Research in Toxicology* **2012**, *25*, 825-827.
- [134] M. Rajasekaran, L.K. Brents, L.N. Franks, J.H. Moran, P.L. Prather. Human metabolites of synthetic cannabinoids JWH-018 and JWH-073 bind with high affinity and act as potent agonists at cannabinoid type-2 receptors. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2013**, *269*, 100-108.
- [135] A. Grigoryev, A. Melnik, S. Savchuk, A. Simonov, V. Rozhanets. Gas and liquid chromatography-mass spectrometry studies on the metabolism of the synthetic phenylacetylindole cannabimimetic JWH-250, the psychoactive component of smoking mixtures. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2011**, *879*, 2519-2526.

- [136] D.K. Wissenbach, M.R. Meyer, D. Remane, A.A. Philipp, A.A. Weber, H.H. Maurer. Drugs of abuse screening in urine as part of a metabolite-based LC-MS⁽ⁿ⁾ screening concept. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *400*, 3481-3489.
- [137] A. Grigoryev, P. Kavanagh, A. Melnik. The detection of the urinary metabolites of 1-[(5-fluoropentyl)-1H-indol-3-yl]-(2-iodophenyl) methanone (AM-694), a high affinity cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis* **2013**, *5*, 110-115.
- [138] B.K. Park, N.R. Kitteringham, P.M. O'Neill. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2001**, *41*, 443-470.
- [139] G. Dear, I. Ismail, P. Mutch, R. Plumb, L. Davies, B. Sweatman. Urinary metabolites of a novel quinoxaline non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor in rabbit, mouse and human: identification of fluorine NIH shift metabolites using NMR and tandem MS. *Xenobiotica* **2000**, *30*, 407-426.
- [140] I.M. Rietjens, C. den Besten, R.P. Hanzlik, P.J. van Bladeren. Cytochrome P450-catalyzed oxidation of halobenzene derivatives. *Chemical Research in Toxicology* **1997**, *10*, 629-635.
- [141] T. Kurihara, T. Yamauchi, S. Ichiyama, H. Takahata, N. Esaki. Purification, characterization, and gene cloning of a novel fluoroacetate dehalogenase from Burkholderia sp. FA1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, *23*, 347-355.
- [142] T. Kurihara, N. Esaki. Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: occurrences, reaction mechanisms, and applications. *The Chemical Record* **2008**, *8*, 67-74.
- [143] K.H.G. Verschueren, F. Seljée, H.J. Rozeboom, K.K. H., B.W. Dijkstra. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* **1993**, *363*, 693-698.
- [144] D.B. Janssen, A. Scheper, L. Dijkhuizen, B. Witholt. Degradation of halogenated aliphatic compounds by Xanthobacter autotrophicus GJ10. *Applied and environmental microbiology* **1985**, *49*, 673-677.
- [145] S. Keuning, D.B. Janssen, B. Witholt. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from Xanthobacter autotrophicus GJ10. *Journal of bacteriology* **1985**, *163*, 635-639.
- [146] E.D. Kharasch, A.S. Armstrong, K. Gunn, A. Artru, K. Cox, M.D. Karol. Clinical sevoflurane metabolism and disposition: II. The role of cytochrome P450 2E1 in fluoride and hexafluoroisopropanol formation. *Anesthesiology* **1995**, *82*, 1379-1388.
- [147] N. De Brabanter, S. Esposito, L. Geldof, L. Lootens, P. Meuleman, G. Leroux-Roels, K. Deventer, P. Van Eenoo. In vitro and in vivo metabolisms of 1-pentyl-3-(4-methyl-1-naphthoyl) indole (JWH-122). *Forensic Toxicology* **2013**, *31*, 212-222.
- [148] P. Kavanagh, A. Grigoryev, A. Melnik, A. Simonov. The identification of the urinary metabolites of 3-(4-methoxybenzoyl)-1-pentylindole (RCS-4), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* **2012**, *36*, 303-311.
- [149] P. Kavanagh, A. Grigoryev, A. Melnik, S. Savchuk, A. Simonov, V. Rozhanets. Detection and tentative identification of urinary phase I metabolites of phenylacetylindole cannabimimetics

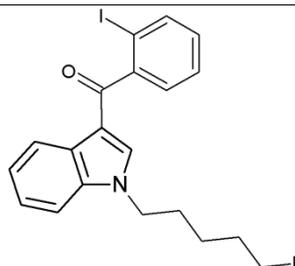
- JWH-203 and JWH-251, by GC-MS and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **2013**, *934*, 102-108.
- [150] T. Sobolevsky, I. Prasolov, G. Rodchenkov. Detection of urinary metabolites of AM-2201 and UR-144, two novel synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis* **2012**, *4*, 745-753.
- [151] K.M. Donohue, R.R. Steiner. JWH-018 and JWH-022 as combustion products of AM2201. *Microgram Journal* **2012**, *9*, 52-56.
- [152] A. Grigoryev, P. Kavanagh, A. Melnik. The detection of the urinary metabolites of 3-[(adamantan-1-yl)carbonyl]-1-pentylindole (AB-001), a novel cannabimimetic, by gas chromatography-mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis* **2011**, *4*, 519-524.
- [153] A. Ohlsson, J. Lindgren, A. Wahlen, S. Agurell, L. Hollister, H. Gillespie. Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **1980**, *28*, 409-416.
- [154] C.A. Paronis, S.P. Nikas, V.G. Shukla, A. Makriyannis. Delta-9-Tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist/antagonist in mice. *Behavioural Pharmacology* **2012**, *23*, 802-805.
- [155] M. Jang, W. Yang, I. Shin, H. Choi, H. Chang, E. Kim. Determination of AM-2201 metabolites in urine and comparison with JWH-018 abuse. *International Journal of Legal Medicine* **2013**, DOI: 10.1007/s00414-013-0884-x.
- [156] I.B. Adams, B.R. Martin. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction* **1996**, *91*, 1585-1614.
- [157] P. Kavanagh, A. Grigoryev, S. Savchuk, I. Mikhura, A. Formanovsky. UR-144 in products sold via the Internet: Identification of related compounds and characterization of pyrolysis products. *Drug Testing and Analysis* **2013**, *5*, 683-692.
- [158] A. Grigoryev, P. Kavanagh, A. Melnik, S. Savchuk, A. Simonov. Gas and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Detection of the Urinary Metabolites of UR-144 and Its Major Pyrolysis Product. *Journal of Analytical Toxicology* **2013**, *37*, 265-276.
- [159] A. Wohlfarth, S. Pang, M. Zhu, A.S. Gandhi, K.B. Scheidweiler, H.-f. Liu, M.A. Huestis. First Metabolic Profile of XLR-11, a Novel Synthetic Cannabinoid, Obtained by Using Human Hepatocytes and High-Resolution Mass Spectrometry. *Clinical chemistry* **2013**, *59*, 1638-1648.
- [160] P.J. Mutch, G.J. Dear, I.M. Ismail. Formation of a defluorinated metabolite of a quinoxaline antiviral drug catalysed by human cytochrome P450 1A2. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2001**, *53*, 403-408.
- [161] S. Rendic. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metabolism Reviews* **2002**, *34*, 83-448.
- [162] E. Störmer, L.L. von Moltke, D.J. Greenblatt. Scaling drug biotransformation data from cDNA-expressed cytochrome P-450 to human liver: a comparison of relative activity factors and human liver abundance in studies of mirtazapine metabolism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, *295*, 793-801.

- [163] N. Bozina, V. Bradamante, M. Lovric. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **2009**, *60*, 217-242.
- [164] H.-G. Xie, R.B. Kim, A.J. Wood, C.M. Stein. Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annual review of pharmacology and toxicology* **2001**, *41*, 815-850.
- [165] S. Kneisel, J. Teske, V. Auwärter. Analysis of synthetic cannabinoids in abstinence control: long drug detection windows in serum and implications for practitioners. *Drug Testing and Analysis* **2014**, *6*, 135-136.
- [166] E. Johansson, M. Halldin, S. Agurell, L. Hollister, H. Gillespie. Terminal elimination plasma half-life of delta-1-tetrahydrocannabinol (delta-1-THC) in heavy users of marijuana. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1989**, *37*, 273-277.
- [167] E. Gowans, C. Fraser. Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance: ramifications for interpretation of results and patient care. *Annals of Clinical Biochemistry* **1988**, *25*, 259-263.
- [168] J. Kim, S. In, Y. Park, M. Park, E. Kim, S. Lee. Deposition of JWH-018, JWH-073 and their metabolites in hair and effect of hair pigmentation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, *405*, 9769-9778.
- [169] G. Skopp, L. Pötsch, M. Mauden. Stability of cannabinoids in hair samples exposed to sunlight. *Clinical Chemistry* **2000**, *46*, 1846-1848.
- [170] A. Salomone, C. Luciano, D. Di Corcia, E. Gerace, M. Vincenti. Hair analysis as a tool to evaluate the prevalence of synthetic cannabinoids in different populations of drug consumers. *Drug Testing and Analysis* **2014**, *6*, 126-134.

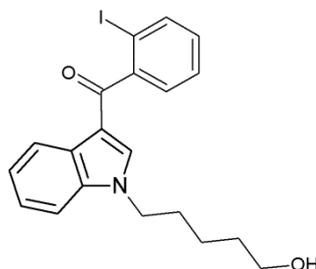
Anhang

Strukturen der synthetischen Cannabinoide und ihrer Metaboliten
(alphabetisch)

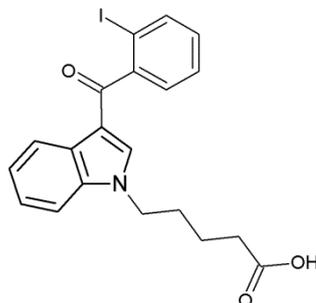
AM-694



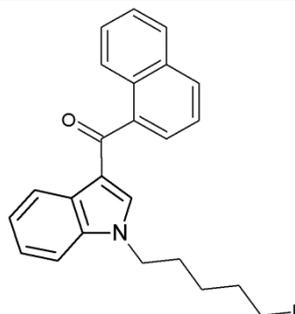
AM-694 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit

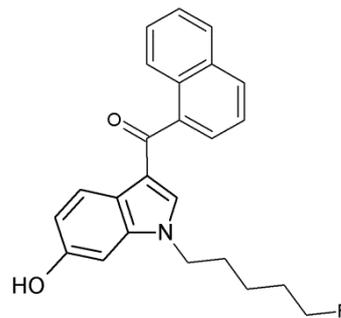
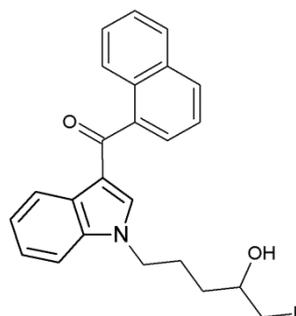
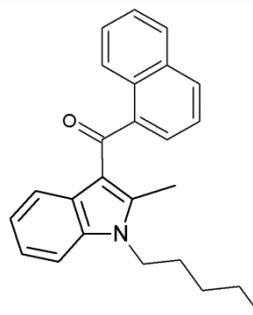
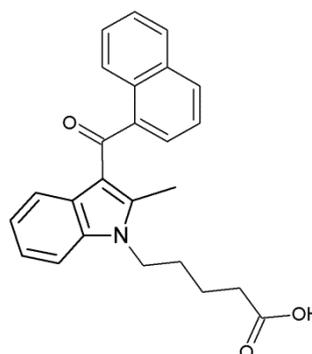
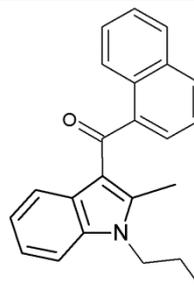


AM-694 Pentansäure-Metabolit

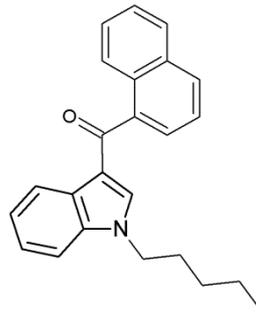


AM-2201

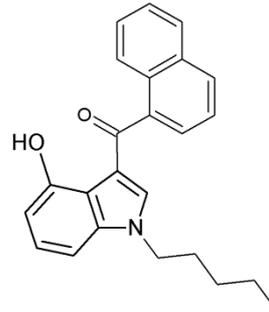


AM-2201 6-Hydroxyindol-Metabolit**AM-2201 N-(4-Hydroxy-5-fluorpentyl)-Metabolit****JWH-007****JWH-007 Pentansäure-Metabolit****JWH-015**

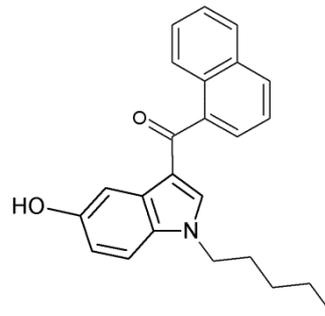
JWH-018



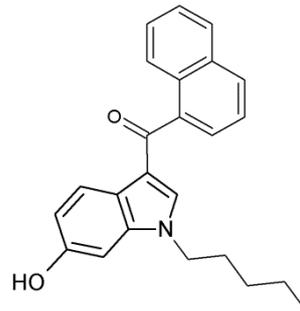
JWH-018 4-Hydroxyindol-Metabolit



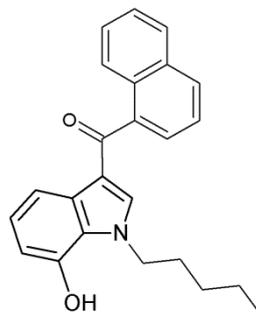
JWH-018 5-Hydroxyindol-Metabolit

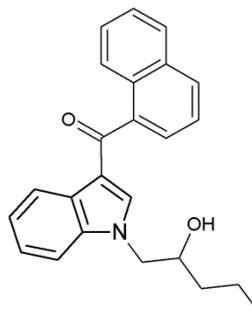
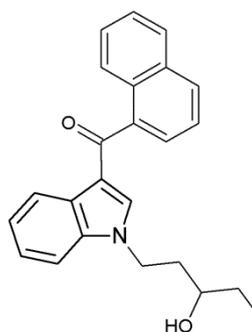
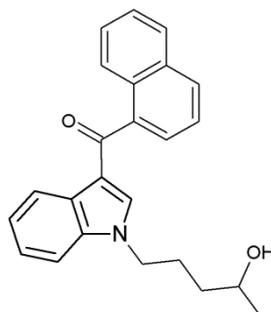
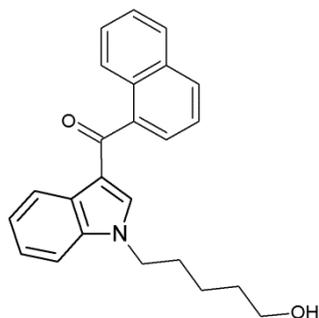
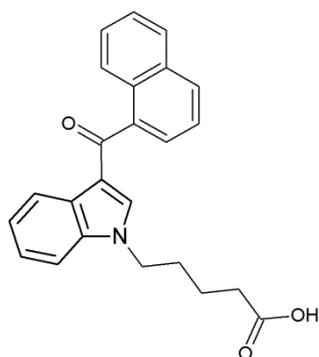


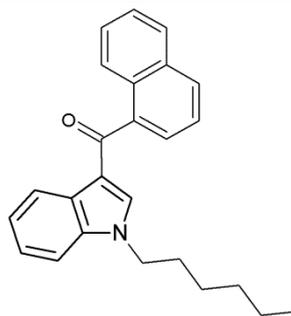
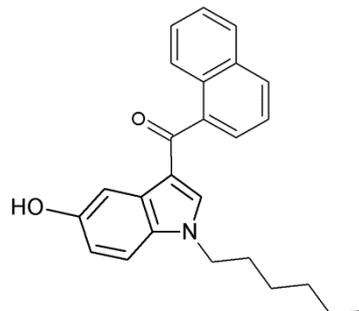
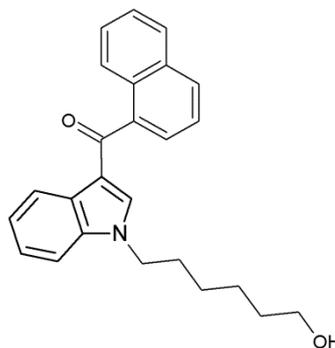
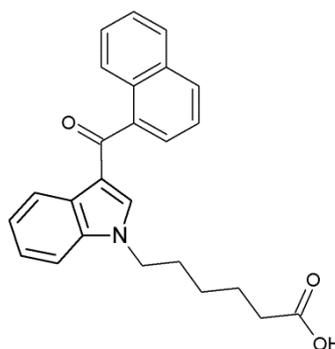
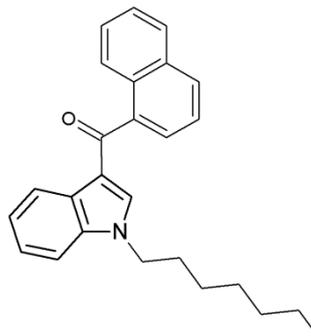
JWH-018 6-Hydroxyindol-Metabolit



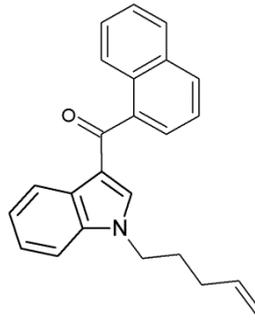
JWH-018 7-Hydroxyindol-Metabolit



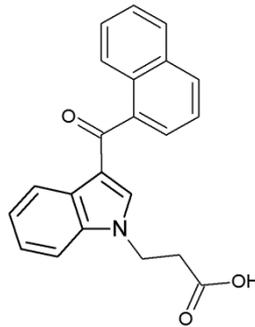
JWH-018 N-(2-Hydroxypentyl)-Metabolit**JWH-018 N-(3-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-018 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-018 Pentansäure-Metabolit**

JWH-019**JWH-019 5-Hydroxyindol-Metabolit****JWH-019 N-(6-Hydroxyhexyl)-Metabolit****JWH-019 Hexansäure-Metabolit****JWH-020**

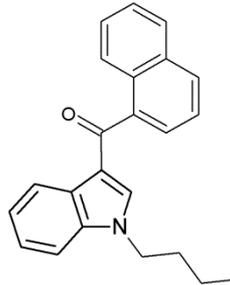
JWH-022



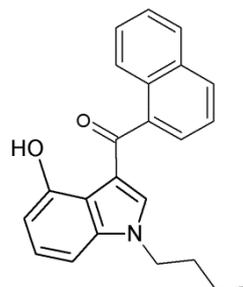
JWH-072 Propansäure-Metabolit



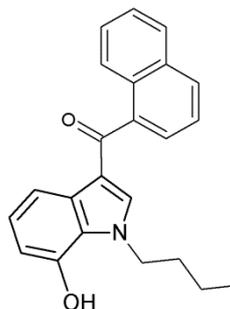
JWH-073

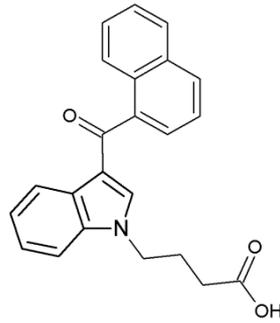
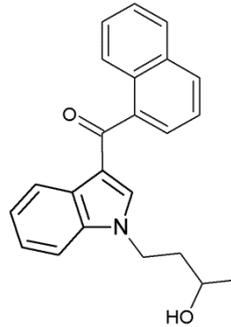
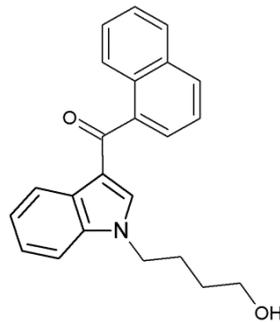
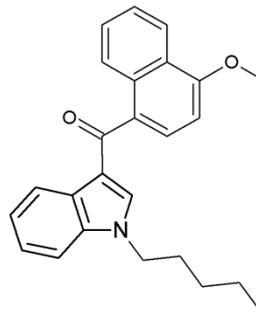
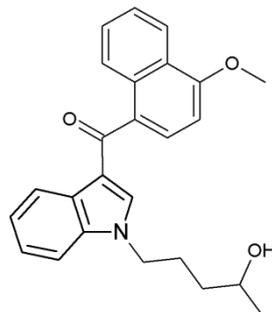


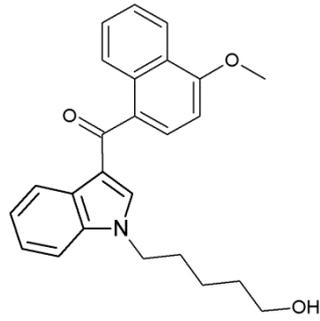
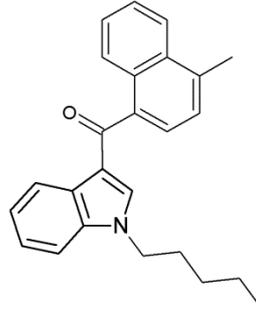
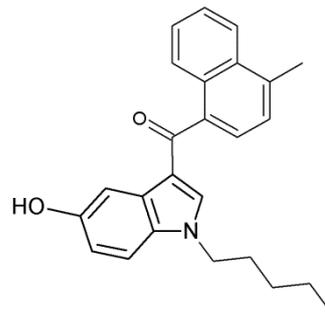
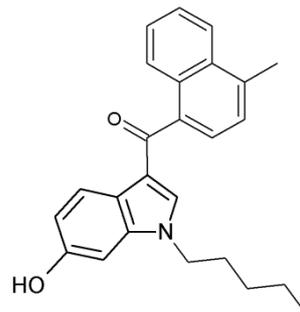
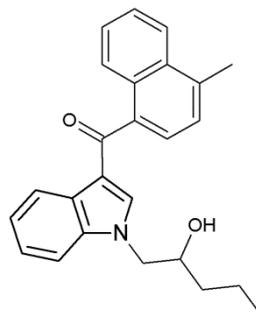
JWH-073 4-Hydroxyindol-Metabolit

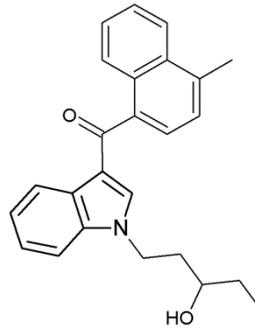
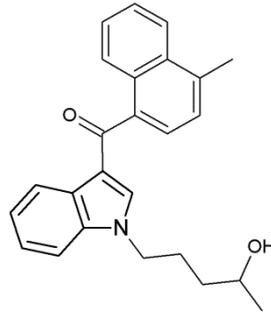
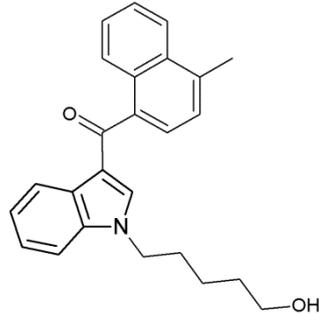
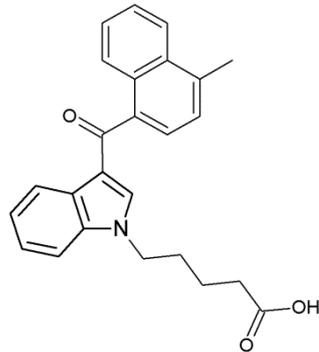
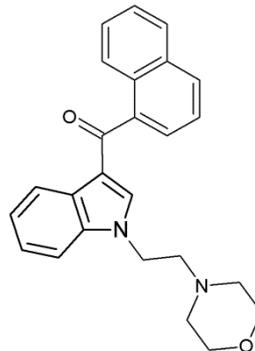


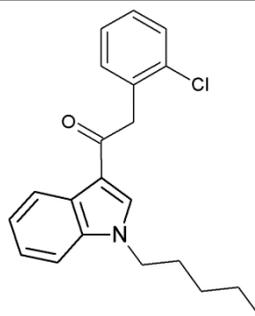
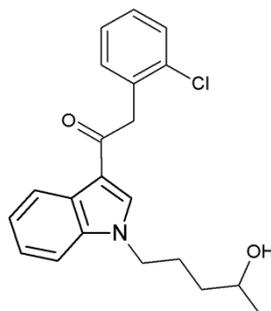
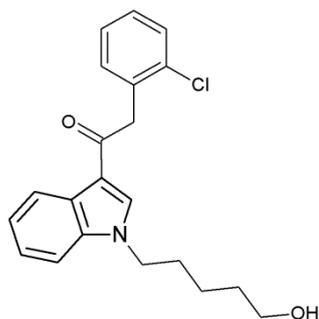
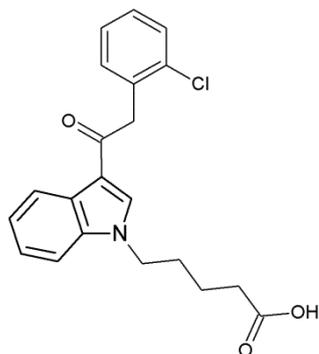
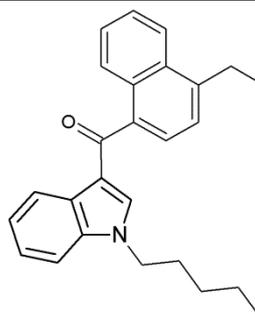
JWH-073 6-Hydroxyindol-Metabolit

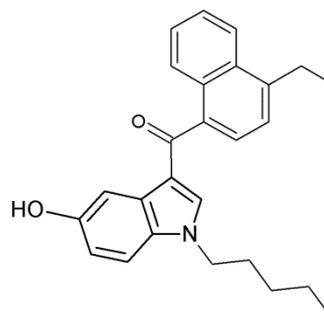
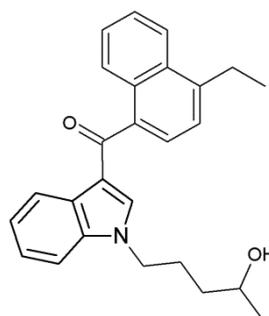
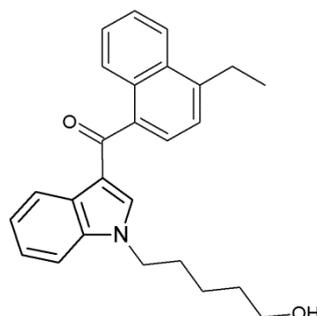
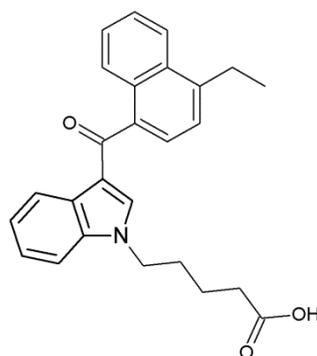
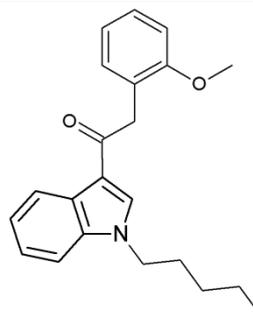


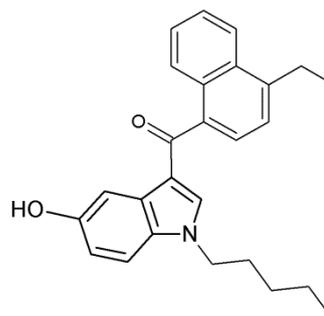
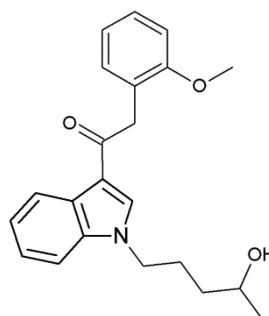
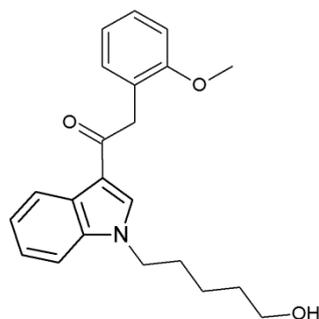
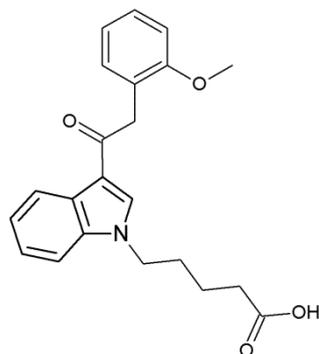
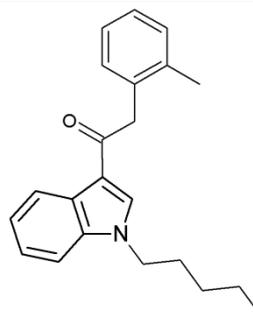
JWH-073 Butansäure-Metabolit**JWH-073 N-(3-Hydroxybutyl)-Metabolit****JWH-073 N-(4-Hydroxybutyl)-Metabolit****JWH-081****JWH-081 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit**

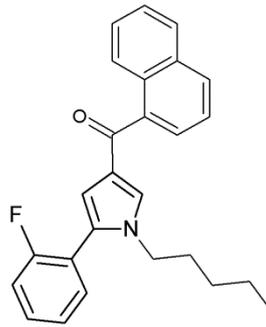
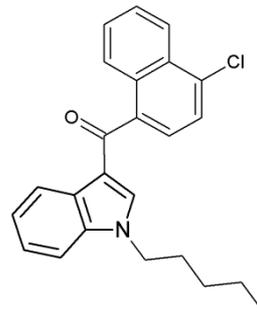
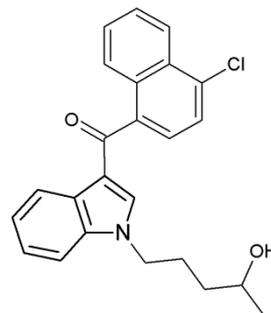
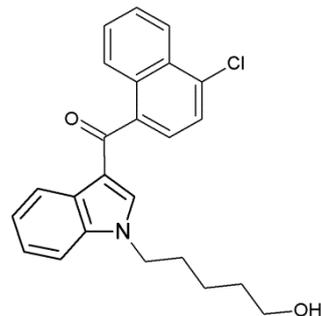
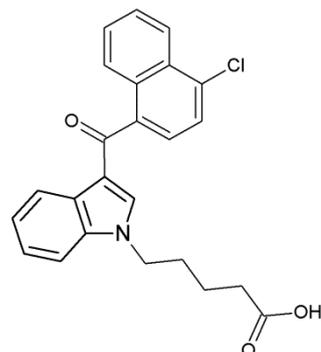
JWH-081 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit**JWH-122****JWH-122 5-Hydroxyindol-Metabolit****JWH-122 6-Hydroxyindol-Metabolit****JWH-122 N-(2-Hydroxypentyl)-Metabolit**

JWH-122 N-(3-Hydroxypentyl)-Metabolit**JWH-122 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-122 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-122 Pentansäure-Metabolit****JWH-200**

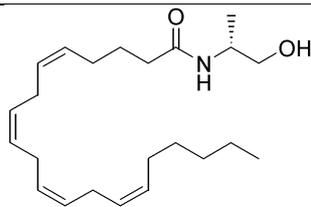
JWH-203**JWH-203 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-203 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-203 Pentansäure-Metabolit****JWH-210**

JWH-210 5-Hydroxyindol-Metabolit**JWH-210 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-210 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-210 Pentansäure-Metabolit****JWH-250**

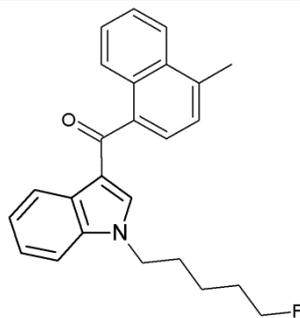
JWH-250 5-Hydroxyindol-Metabolit**JWH-250 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-250 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-250 Pentansäure-Metabolit****JWH-251**

JWH-307**JWH-398****JWH-398 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-398 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit****JWH-398 Pentansäure-Metabolit**

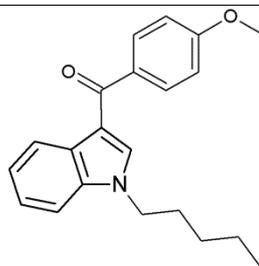
Methanandanamid



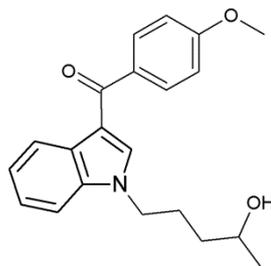
MAM-2201



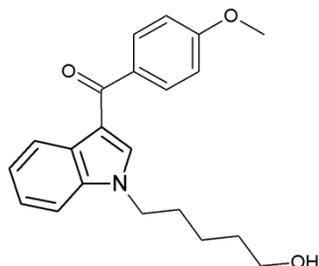
RCS-4



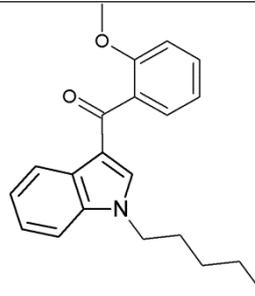
RCS-4 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit



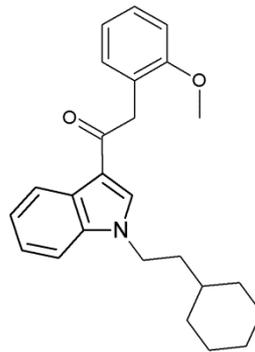
RCS-4 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit



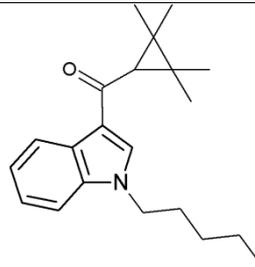
RCS-4 *ortho*-Isomer



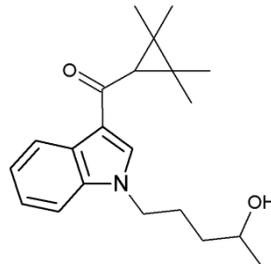
RCS-8



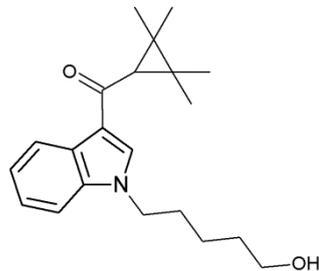
UR-144

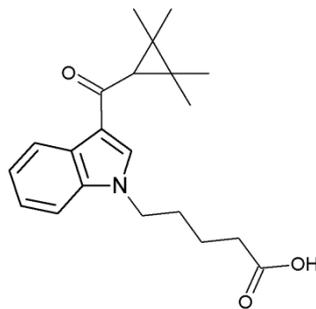
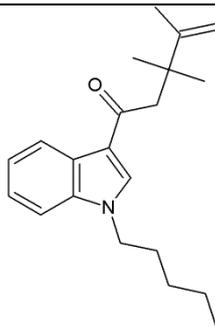
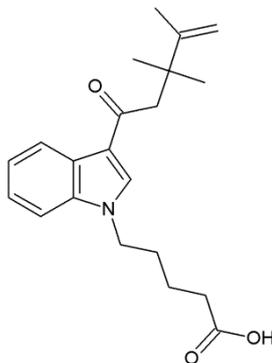
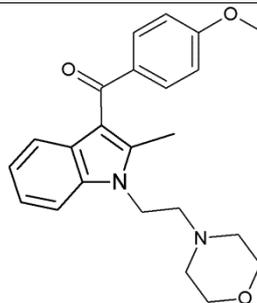


UR-144 N-(4-Hydroxypentyl)-Metabolit

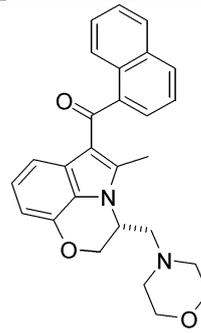


UR-144 N-(5-Hydroxypentyl)-Metabolit

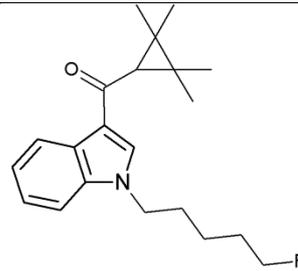


UR-144 Pentansäure-Metabolit**UR-144 Isomer****UR-144 Isomer Pentansäure-Metabolit****WIN-48,098**

WIN-52,212-2



XLR-11



Feinmassen der in Humanurin identifizierten Metaboliten synthetischer Cannabinoide

Tabelle A 1: Feinmassen der identifizierten Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide in Humanurin

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
AM-2201:				
Monohydroxylierte Alkylkette				7,1
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 376)	376,1707	C ₂₅ H ₂₂ FNO ₂	-0,7	
Fragment (m/z = 155)	155,0484	C ₁₁ H ₇ O	4,81	
Fragment (m/z = 127)	127,0537	C ₁₀ H ₇	4,18	
Fragment (m/z = 144)	144,044	C ₉ H ₆ NO	2,73	
Monohydroxylierter Indolrest				7,3
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 376)	376,1706	C ₂₄ H ₂₂ FNO ₂	0,36	
Fragment (m/z = 248)	248,1077	C ₁₄ H ₁₅ FNO ₂	1,75	
Fragment (m/z = 160)	160,039	C ₉ H ₆ NO ₂	1,92	
Fragment (m/z = 155)	155,0488	C ₁₁ H ₇ O	2,22	
Fragment (m/z = 127)	127,054	C ₁₀ H ₇	1,8	
AM-694:				
Monohydroxylierte Alkylkette				6,4
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 452)	452,0516	C ₂₀ H ₂₀ FINO ₂	0,28	6,6
Fragment (m/z = 231)	230,9293	C ₇ H ₄ IO	3,63	
Fragment (m/z = 203)	202,9353	C ₆ H ₄ I	-0,4	
Monohydroxylierte Alkylkette - defluoriert				6,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 434)	434,0611	C ₂₀ H ₂₁ INO ₂	0	
Fragment (m/z = 231)	230,9296	C ₇ H ₄ IO	2,32	
Fragment (m/z = 203)	202,9353	C ₆ H ₄ I	-0,4	
Fragment (m/z = 186)	186,1277	C ₁₃ H ₁₆ N	0,14	
Fragment (m/z = 144)	144,0446	C ₉ H ₆ NO	-1,47	
Carboxylierte Alkylkette				6,5
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 448)	448,0408	C ₂₀ H ₁₉ INO ₃	-0,87	
Fragment (m/z = 244)	244,0969	C ₁₄ H ₁₄ NO ₃	-0,33	

Anhang

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
Fragment (m/z = 231)	230,9293	C7H4IO	3,63	
Fragment (m/z = 203)	202,9357	C6H4I	-2,38	
Fragment (m/z = 144)	144,0446	C9H6NO	-1,47	
JWH-007:				
Monohydroxylierte Alkylkette				7,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 372)	372,1961	C25H25NO2	-0,79	8,2
Fragment (m/z = 244)	244,1336	C15H18NO2	-1,62	
Fragment (m/z = 158)	158,0604	C10H8NO	-2,29	
Fragment (m/z = 155)	155,0492	C11H7O	-0,38	
Fragment (m/z = 127)	127,0541	C10H7	1	
Carboxylierte Alkylkette				7,5
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 386)	386,175	C25H24NO3	0,18	
Fragment (m/z = 258)	258,1131	C15H16NO3	-2,45	
Fragment (m/z = 158)	158,0598	C10H8NO	1,53	
Fragment (m/z = 155)	155,0487	C11H7O	2,86	
Fragment (m/z = 127)	127,0539	C10H7	2,59	
Dihydroxylierte Alkylkette				6,9
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 388)	388,191	C25H26NO3	-0,72	
Fragment (m/z = 260)	260,1276	C15H18NO3	2	
Fragment (m/z = 158)	158,0598	C10H8NO	1,53	
Fragment (m/z = 155)	155,0492	C11H7O	-0,38	
Fragment (m/z = 127)	127,0541	C10H7	1	
JWH 018:				
Monohydroxylierte Alkylkette				7,3
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 358)	358,1802	C24H23NO2	-2,98	
Fragment (m/z = 127)	127,0543	C10H7	0,6	
Fragment (m/z = 155)	155,0491	C11H7O	0,27	
Fragment (m/z = 144)	144,0442	C9H6NO	1,33	
Monohydroxylierter Indolrest				8,5
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 358)	358,1802	C24H23NO2	-0,98	
Fragment (m/z = 127)	127,0533	C10H7	0,21	
Fragment (m/z = 155)	155,048	C11H7O	0,92	

Anhang

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
Fragment (m/z = 160)	160,0393	C9H6NO2	0,03	
Fragment (m/z = 230)	230,1162	C14H16NO2	3,3	
Carboxylierte Alkylkette				7,1
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 372)	372,1594	C24H21NO3	0,5	
Fragment (m/z = 127)	127,054	C10H7	1,8	
Fragment (m/z = 155)	155,0486	C11H7O	3,51	
Fragment (m/z = 144)	144,0439	C9H6NO	3,43	
JWH-019:				
Monohydroxylated alkyl chain				7,2
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 372)	372,1958	C25H25NO2	-0,23	8
Fragment (m/z = 155)	155,0486	C11H7O	3,51	
Fragment (m/z = 127)	127,0536	C10H7	4,97	
Carboxylated alkyl chain				7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 386)	386,1751	C25H23NO3	-1,67	
Fragment (m/z = 155)	155,0488	C11H7O	2,22	
Fragment (m/z = 127)	127,0537	C10H7	4,18	
JWH 073:				
Monohydroxylierte Alkylkette				6,8
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 344)	344,1645	C23H21NO2	1,76	
Fragment (m/z = 127)	127,0541	C10H7	1	
Fragment (m/z = 155)	155,0489	C11H7O	1,57	
Fragment (m/z = 144)	144,0441	C9H6NO	2,03	
Monohydroxylierter Indolrest				7,8
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 344)	344,1645	C23H21NO2	-1,13	
Fragment (m/z = 127)	127,0541	C10H7	-0,58	
Fragment (m/z = 155)	155,0491	C11H7O	0,27	
Fragment (m/z = 160)	160,0389	C9H6NO2	2,55	
Carboxylierte Alkylkette				6,8
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 358)	358,1436	C23H19NO3	-1,62	
Fragment (m/z = 127)	127,0541	C10H7	1	
Fragment (m/z = 155)	155,0492	C11H7O	-0,38	
Fragment (m/z = 230)	230,0805	C13H12NO3	2,92	

Anhang

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
JWH 081:				
Monohydroxylierte Alkylkette				7,7
Molekulation [M+H] ⁺ (m/z = 388)	388,1907	C25H25NO3	-0,26	
Fragment (m/z = 185)	185,059	C12H9O2	-1,05	
Fragment (m/z = 157)	157,0638	C11H9O	-3,26	
Fragment (m/z = 230)	230,1167	C14H16NO2	1,99	
Fragment (m/z = 144)	144,0432	C9H6NO	0,63	
Monohydroxylierter Indolrest				8,7
Molekulation [M+H] ⁺ (m/z = 388)	388,1907	C25H25NO3	2,95	
Fragment (m/z = 185)	185,059	C12H9O2	2,21	
Fragment (m/z = 157)	157,0642	C11H9O	3,79	
Fragment (m/z = 230)	230,1158	C14H16NO2	2,42	
Fragment (m/z = 160)	160,0387	C9H6NO2	3,8	
Monohydroxylierter Naphthylrest				9,2
Molekulation [M+H] ⁺ (m/z = 388)	388,1907	C25H25NO3	1,87	
Fragment (m/z = 201)	201,0546	C12H9O3	0,1	
Fragment (m/z = 173)	173,0598	C11H9O2	-0,55	
Fragment (m/z = 214)	214,1227	C14H16NO	-0,28	
Fragment (m/z = 144)	144,0448	C9H6NO	-2,86	
JWH 122:				
Monohydroxylierte Alkylkette				7,9
Molekulation [M+H] ⁺ (m/z = 372)	372,1958	C25H25NO2	1,08	
Fragment (m/z = 169)	169,0637	C12H9O	2,33	
Fragment (m/z = 141)	141,069	C11H9	2,69	
Fragment (m/z = 144)	144,0439	C9H6NO	3,43	
Fragment (m/z = 230)	230,1169	C14H16NO2	2,86	
Monohydroxylierter Indolrest				9,1
Molekulation [M+H] ⁺ (m/z = 372)	372,1958	C25H25NO2	2,15	
Fragment (m/z = 169)	169,0649	C12H9O	-0,7	
Fragment (m/z = 141)	141,0703	C11H9	-4,45	
Fragment (m/z = 230)	230,1182	C14H16NO2	-2,4	
Fragment (m/z = 160)	160,0407	C9H6NO2	-1,86	

Anhang

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
Monohydroxylierter Naphthylrest				8,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 372)	372,1958	C25H25NO2	0,78	
Fragment (m/z = 185)	185,0594	C12H9O2	1,66	
Fragment (m/z = 214)	214,1213	C14H16NO	-1,69	
Fragment (m/z = 144)	144,0437	C9H6NO	4,83	
Fragment (m/z = 157)	157,0653	C11H9O	-3,3	
JWH-203:				
Monohydroxylierte Alkylkette				7,2
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 356)	356,1412	C21H22ClNO2	0,13	7,7
Fragment (m/z = 125)	125,0147	C7H6Cl	4,47	
Fragment (m/z = 186)	186,1271	C13H15N	3,38	
Fragment (m/z = 204)	204,1379	C13H18NO	1,92	
Fragment (m/z = 144)	144,0801	C9H6NO	0,53	
Monohydroxylierter Indolrest				8,3
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 356)	356,1412	C21H22ClNO2	-1,59	
Fragment (m/z = 125)	125,0147	C7H6Cl	4,47	
Fragment (m/z = 204)	204,138	C13H18NO	1,43	
Fragment (m/z = 160)	160,0386	C9H6NO2	4,43	
Fragment (m/z = 230)	230,1175	C14H16NO2	0,24	
Carboxylierte Alkylkette				7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 370)	370,1204	C21H20ClNO3	1,03	
Fragment (m/z = 125)	125,0147	C7H6Cl	4,47	
Fragment (m/z = 200)	200,1061	C13H14NO	4,47	
Fragment (m/z = 144)	144,0809	C9H6NO	2,63	
Fragment (m/z = 218)	218,1184	C13H16NO2	-3,89	
Fragment (m/z = 244)	244,0975	C14H14NO3	-2,8	
JWH 210:				
Monohydroxylierte Alkylkette				8,4
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 386)	386,2115	C26H27NO2	1,04	
Fragment (m/z = 183)	183,0798	C13H11O	3,52	

Anhang

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
Fragment (m/z = 230)	230,1169	C14H16NO2	2,86	
Fragment (m/z = 144)	144,0441	C9H6NO	2,03	
Fragment (m/z = 153)	153,0689	C12H9	5,11	
Monohydroxylierter Indolrest				9,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 386)	386,2115	C26H27NO2	-2,38	
Fragment (m/z = 183)	183,0799	C13H11O	2,97	
Fragment (m/z = 230)	230,1177	C14H16NO2	-0,6	
Fragment (m/z = 153)	153,0689	C12H9	0,5	
Fragment (m/z = 160)	160,0383	C9H6NO2	-3,74	
Monohydroxylierter Naphthylrest				9,1
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 386)	386,2115	C26H27NO2	0,93	
Fragment (m/z = 199)	199,0748	C13H11O2	-4,77	
Fragment (m/z = 214)	214,1205	C14H16NO	0,19	
Fragment (m/z = 144)	144,0431	C9H6NO	0,63	
JWH 250:				
Monohydroxylierte Alkylkette				6,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 352)	352,1907	C22H25NO3	-1,48	
Fragment (m/z = 121)	121,0639	C8H9O	4,93	
Fragment (m/z = 91)	91,0538	C7H7	3,63	
Fragment (m/z = 230)	230,116	C14H6NO2	3,73	
Fragment (m/z = 144)	144,0431	C9H6NO	2,73	
Monohydroxylierter Indolrest				7,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 352)	352,1907	C22H25NO3	-0,22	
Fragment (m/z = 121)	121,0643	C8H9O	4,09	
Fragment (m/z = 91)	91,0544	C7H7	-1,9	
Fragment (m/z = 216)	216,138	C14H18NO	1,35	
Fragment (m/z = 160)	160,0378	C9H6NO2	9,46	
Monohydroxylierter Phenylrest				8,1
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 352)	352,1907	C22H25NO3	1,73	
Fragment (m/z = 137)	137,0588	C8H9O2	5,19	
Fragment (m/z = 144)	144,0441	C9H6NO	2,03	
Fragment (m/z = 107)	107,0484	C7H7O	0,39	
Fragment (m/z = 214)	214,1246	C14H16NO	2,07	

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
JWH-307:				
Monohydroxylierte Fluorphenylpentylpyrrol				8,2
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 402)	402,1864	C26H24FNO2	0,38	8,5
Fragment (m/z = 230)	230,1329	C15H17FN	4,6	
Fragment (m/z = 155)	155,0484	C11H7O	4,81	
Dihydroxylierter, hydrierter Naphthylrest				8,1
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 420)	420,1967	C26H27FNO3	0,59	
Fragment (m/z = 258)	258,1283	C16H17FNO	2,21	
Fragment (m/z = 189)	189,0543	C11H9O3	1,7	
Fragment (m/z = 171)	171,0437	C11H7O2	2,09	
Fragment (m/z = 161)	161,06	C10H9O2	-1,84	
Fragment (m/z = 143)	143,0491	C10H7O	0	
Dihydroxyliert (Naphthyl- und Fluorphenylpentylrest)				6,9
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 418)	418,1813	C26H24FNO3	-0,51	7,2
Fragment (m/z = 248)	248,1435	C15H19FNO	4,12	
Fragment (m/z = 230)	230,1339	C15H17FN	0,24	
Fragment (m/z = 171)	171,0435	C11H7O2	3,3	
MAM-2201:				
Monohydroxylierter Indolrest				7,9
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 390)	390,1863	C25H24FNO2	0,21	
Fragment (m/z = 248)	248,1076	C14H15FNO2	2,16	
Fragment (m/z = 169)	169,0644	C12H9O	2,33	
Fragment (m/z = 160)	160,0392	C9H6NO2	0,66	
Monohydroxylierter Naphthylrest				7,5
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 390)	390,1862	C25H24FNO2	0,47	
Fragment (m/z = 232)	232,1128	C14H15FNO	1,81	
Fragment (m/z = 185)	185,0596	C12H9O2	0,58	
Fragment (m/z = 144)	144,0446	C9H6NO	-1,47	
Carboxylierte Pentylkette (= Carboxyliertes JWH-122)				7,8
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 386)	386,1747	C25H24NO3	0,96	
Fragment (m/z = 169)	169,0647	C12H9O	0,54	

Anhang

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
Fragment (m/z = 144)	144,0444	C9H6NO	-0,07	
Fragment (m/z = 141)	141,0696	C11H9	1,98	
RCS-4:				
Monohydroxylierter Indolrest				7,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 338)	338,1751	C21H23NO3	2,06	
Fragment (m/z = 135)	135,0437	C8H7O2	2,66	
Fragment (m/z = 160)	160,0386	C9H6NO2	4,43	
Fragment (m/z = 230)	230,1175	C14H16NO2	0,24	
Monohydroxylierter Methoxyphenylrest				8
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 338)	338,1751	C21H23NO3	-0,48	
Fragment (m/z = 151)	151,0389	C8H7O3	0,47	
Fragment (m/z = 144)	144,0441	C9H6NO	2,03	
Fragment (m/z = 214)	214,1229	C14H16NO	-1,22	
Fragment (m/z = 123)	123,044	C7H7O2	0,46	
UR-144:				
Monohydroxylierte Alkylkette des ringgeöffneten Isomers				7,9
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 328)	328,2273	C21H30NO2	-0,59	
Fragment (m/z = 230)	230,1176	C14H16NO2	0	
Fragment (m/z = 144)	144,0441	C9H6NO	2,03	
Fragment (m/z = 125)	125,0963	C8H13O	-1,68	
Monohydroxylierte Alkylkette				9,2
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 328)	328,2268	C21H30NO2	0,93	
Fragment (m/z = 214)	214,1221	C14H16NO	2,54	
Fragment (m/z = 144)	144,0444	C9H6NO	0	
Fragment (m/z =)				
Monohydroxylierter Tetramethylcyclopropylrest				8,7
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 328)	328,2272	C21H30NO2	-0,29	
Fragment (m/z = 214)	214,1221	C14H16NO	2,54	
Fragment (m/z = 188)	188,1434	C13H18N	-0,13	
Fragment (m/z = 144)	144,0447	C9H6NO	-2,17	
Fragment (m/z = 99)	99,0801	C6H11O	2,46	

Anhang

Metabolit und charakteristische Übergänge	Monoisotopische Feinmasse	Elementare Zusammensetzung	Error [ppm]	Retentionszeit [min]
XLR-11:				
Carboxylierte Pentylkette des ringgeöffneten Isomers (= Carboxyliertes, ringgeöffnetes UR-144)				7,8
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 342)	342,2074	C21H28NO3	-3	
Fragment (m/z = 244)	244,0977	C14H14NO3	-3,8	
Fragment (m/z = 144)	144,0447	C9H6NO	-2,2	
Carboxyliert am Tetramethycyclopropylring				7,6
Molekülion [M+H] ⁺ (m/z = 360)	360,1966	C21H27FNO3	0,9	
Fragment (m/z = 232)	232,1136	C14H15FNO	-1,5	
Fragment (m/z = 144)	144,0447	C9H6NO	-2	

Kinetikdiagramme

RCS-4

N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

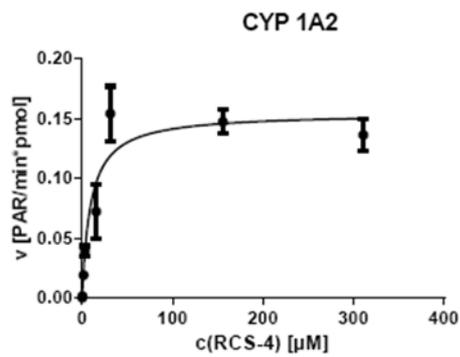


Abbildung A1: Kinetikdiagramm für CYP1A2 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

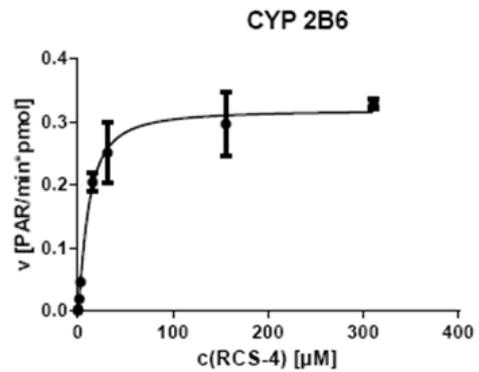


Abbildung A2: Kinetikdiagramm für CYP2B6 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

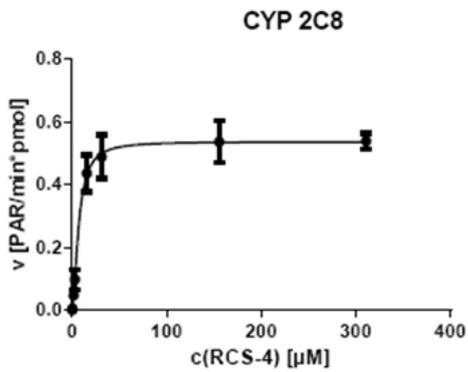


Abbildung A3: Kinetikdiagramm für CYP2C8 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

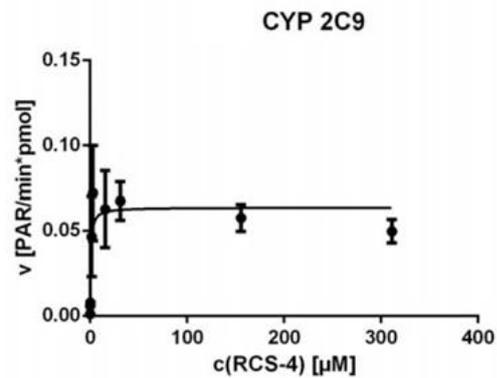


Abbildung A4: Kinetikdiagramm für CYP2C9 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

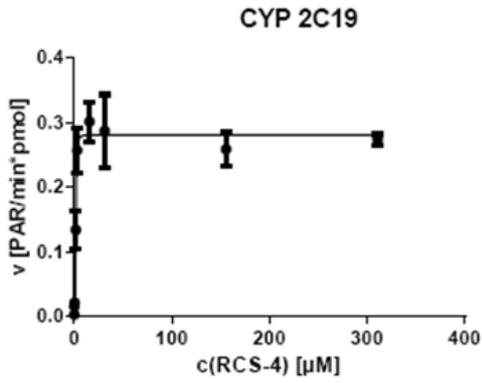


Abbildung A5: Kinetikdiagramm für CYP2C19 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

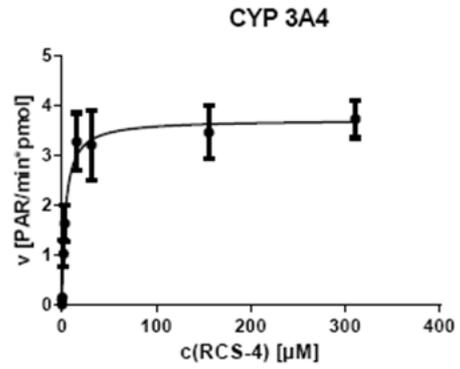


Abbildung A6: Kinetikdiagramm für CYP3A4 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

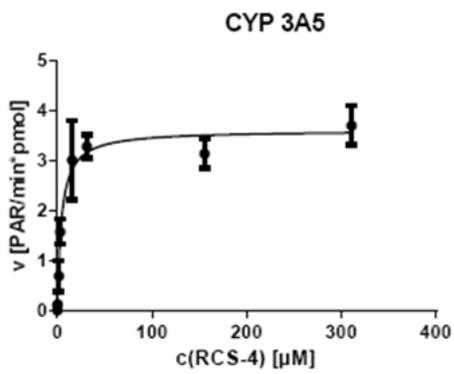


Abbildung A7: Kinetikdiagramm für CYP3A5 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

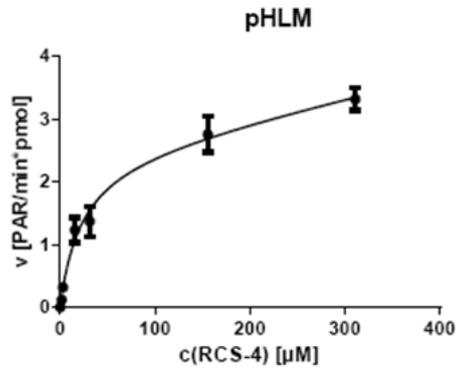


Abbildung A8: Kinetikdiagramm für pHLM zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

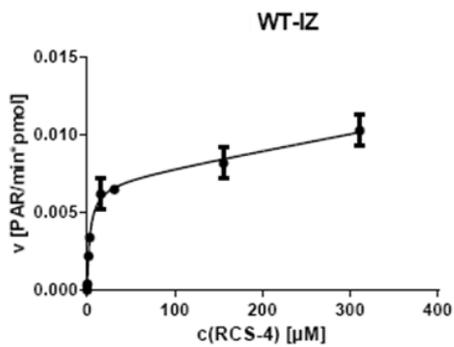


Abbildung A9: Kinetikdiagramm für Wildtyp-Insektenzellen (WT-IZ, entspricht den Control Supersomes) zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-RCS-4

Hydroxyindol-RCS-4

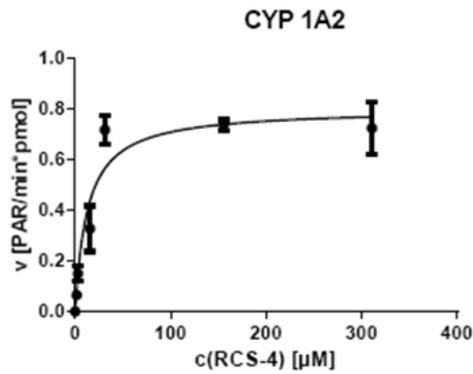


Abbildung A10: Kinetikdiagramm für CYP1A2 zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

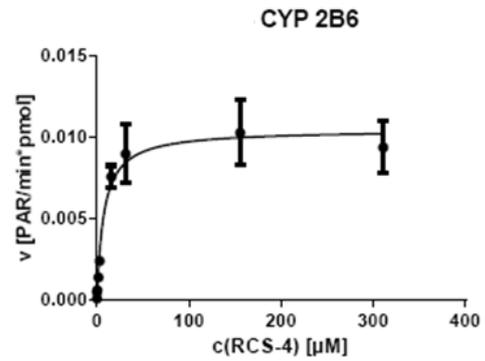


Abbildung A11: Kinetikdiagramm für CYP2B6 zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

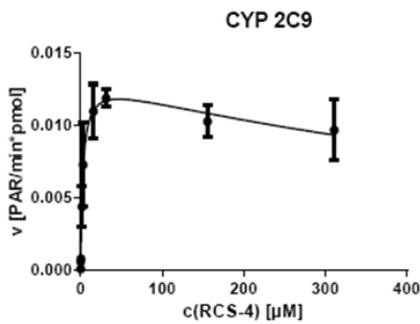


Abbildung A12: Kinetikdiagramm für CYP2C9 zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

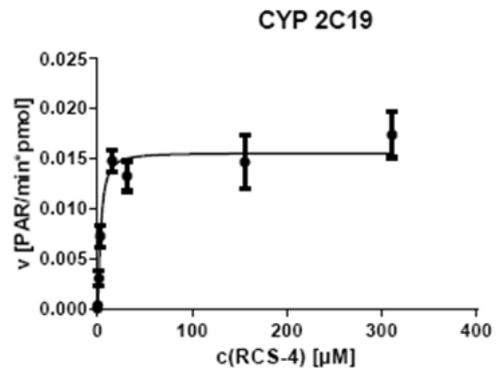


Abbildung A13: Kinetikdiagramm für CYP2C19 zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

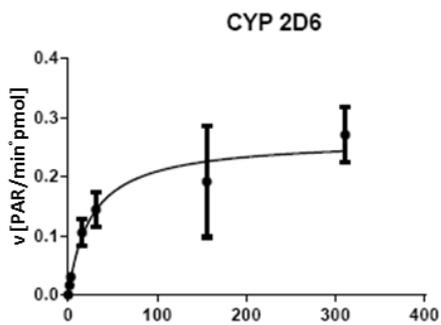


Abbildung A14: Kinetikdiagramm für CYP2D6 zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

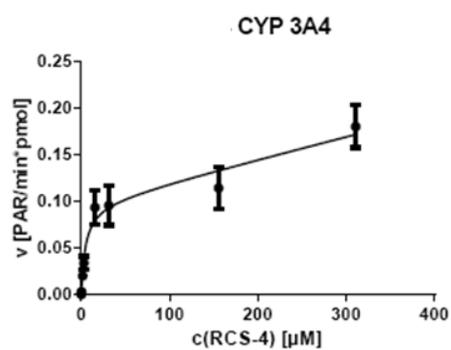


Abbildung A15: Kinetikdiagramm für CYP3A4 zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

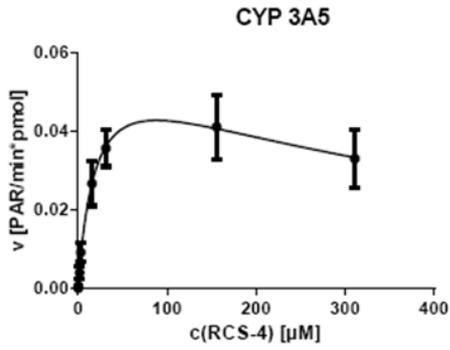


Abbildung A16: Kinetikdiagramm für CYP3A5 zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

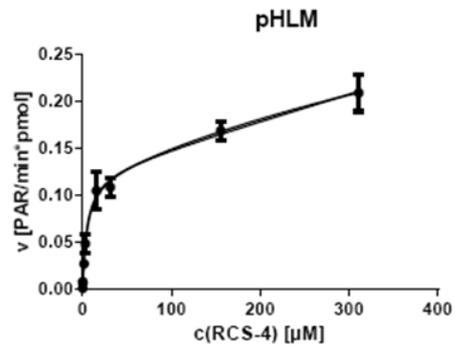


Abbildung A17: Kinetikdiagramm für pHLM zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

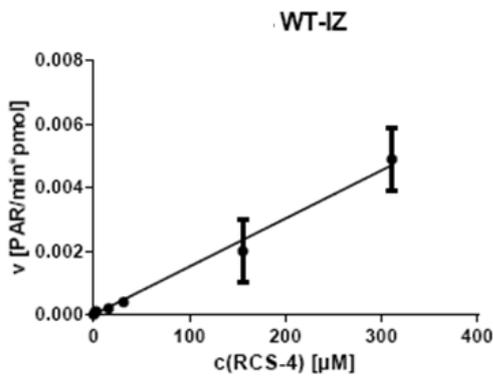


Abbildung A18: Kinetikdiagramm für Wildtyp-Insektenzellen (WT-IZ, entspricht den Control Supersomes) zur Bildung des Hydroxyindol-RCS-4

O-Desmethyl-RCS-4

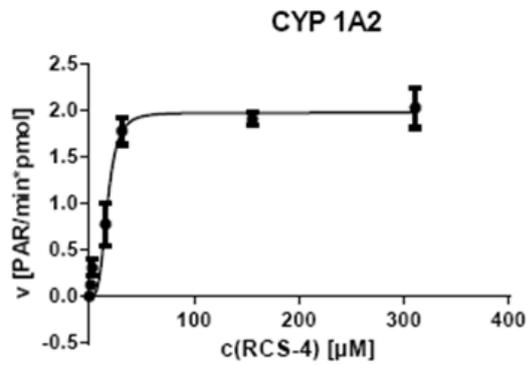


Abbildung A19: Kinetikdiagramm für CYP1A2 zur Bildung des O-Desmethyl-RCS-4

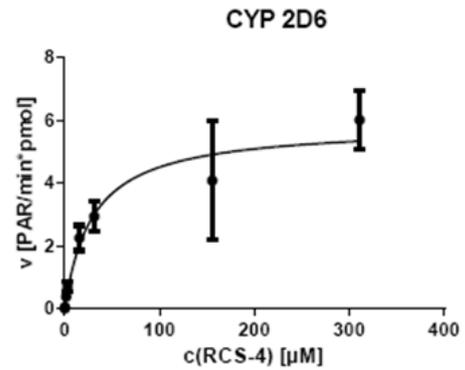


Abbildung A20: Kinetikdiagramm für CYP2D6 zur Bildung des O-Desmethyl-RCS-4

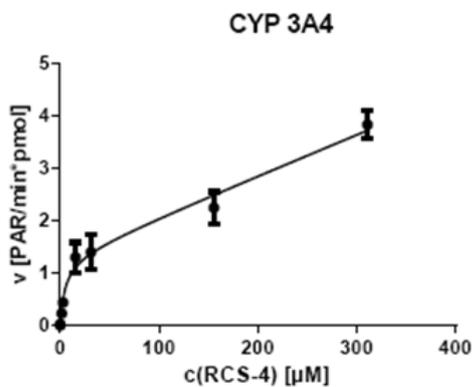


Abbildung A21: Kinetikdiagramm für CYP3A4 zur Bildung des O-Desmethyl-RCS-4

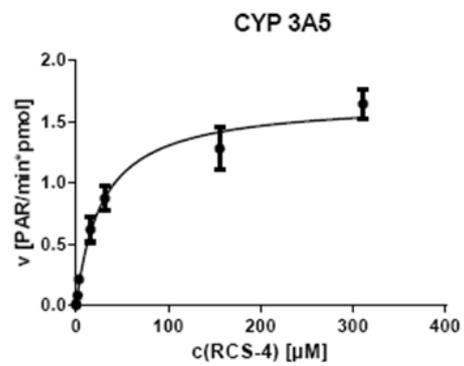


Abbildung A22: Kinetikdiagramm für CYP3A5 zur Bildung des O-Desmethyl-RCS-4

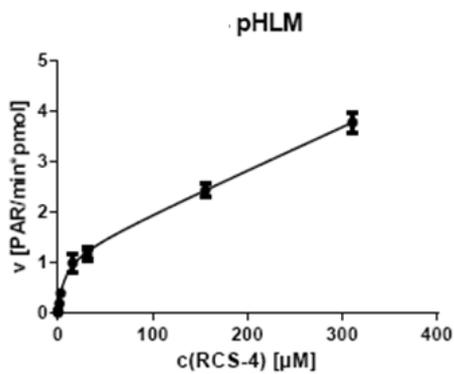


Abbildung A23: Kinetikdiagramm für pHLM zur Bildung des O-Desmethyl-RCS-4

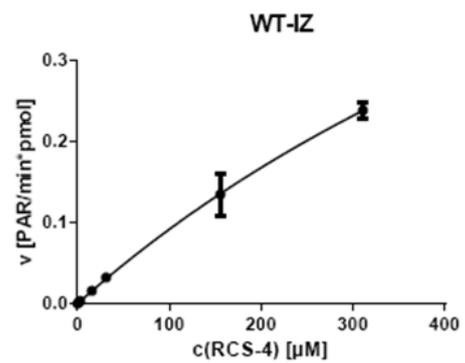


Abbildung A24: Kinetikdiagramm für Wildtyp-Insektenzellen (WT-IZ, entspricht den Control Supersomes) zur Bildung des O-Desmethyl-RCS-4

JWH-122

N-(4-Hydroxypentyl)-JWH-122

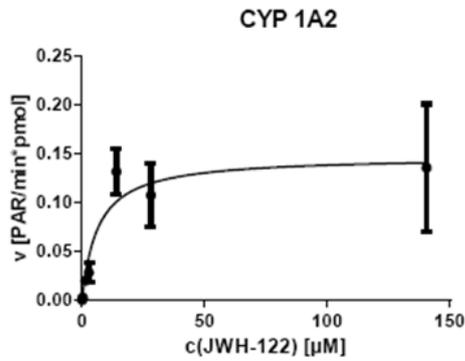


Abbildung A25: Kinetikdiagramm für CYP1A2 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-JWH122

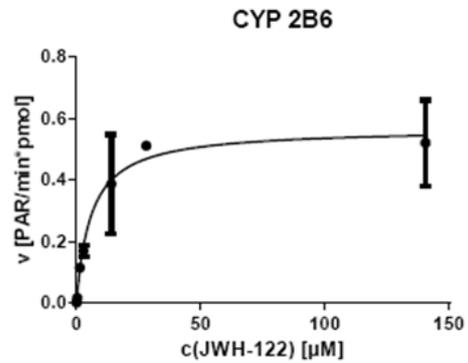


Abbildung A26: Kinetikdiagramm für CYP2B6 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-JWH122

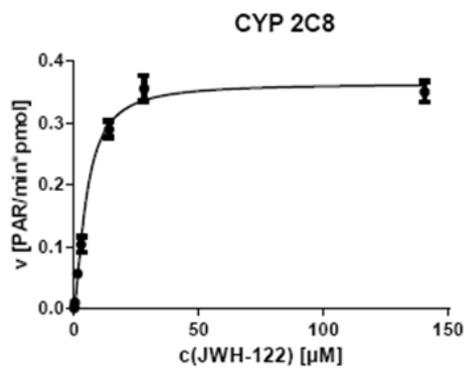


Abbildung A27: Kinetikdiagramm für CYP2C8 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-JWH122

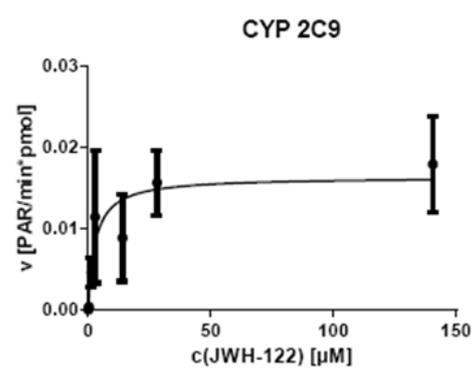


Abbildung A28: Kinetikdiagramm für CYP2C9 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-JWH122

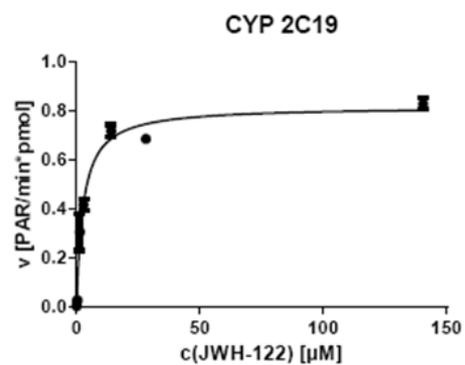


Abbildung A29: Kinetikdiagramm für CYP2C19 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-JWH122

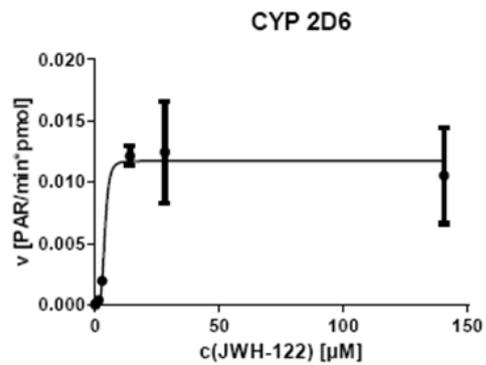


Abbildung A30: Kinetikdiagramm für CYP2D6 zur Bildung des N-(4-Hydroxypentyl)-JWH122

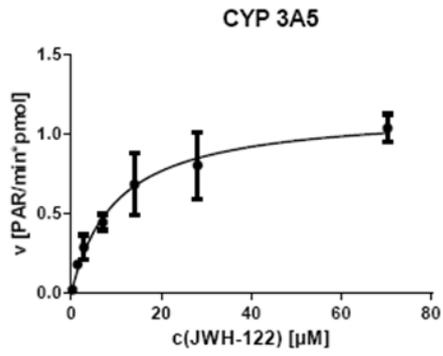


Abbildung A31: Kinetikdiagramm für CYP3A5 zur Bildung des N-(4-Hydroxyphenyl)-JWH122

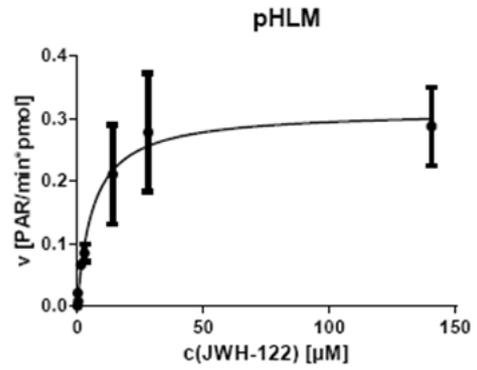


Abbildung A32: Kinetikdiagramm für pHLM zur Bildung des N-(4-Hydroxyphenyl)-JWH122

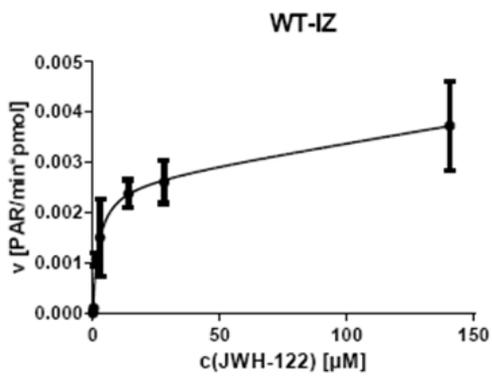


Abbildung A33: Kinetikdiagramm für Wildtyp-Insektenzellen (WT-IZ, entspricht den Control Supersomes) zur Bildung des N-(4-Hydroxyphenyl)-JWH122

Hydroxynaphthyl-JWH-122

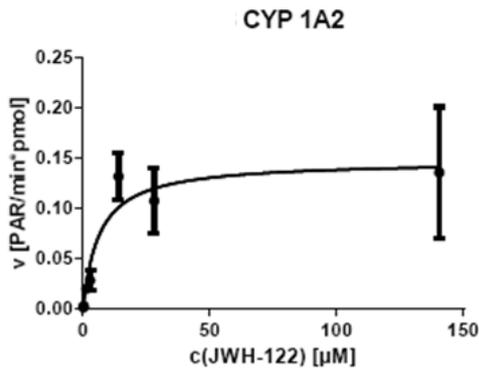


Abbildung A34: Kinetikdiagramm für CYP1A2 zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

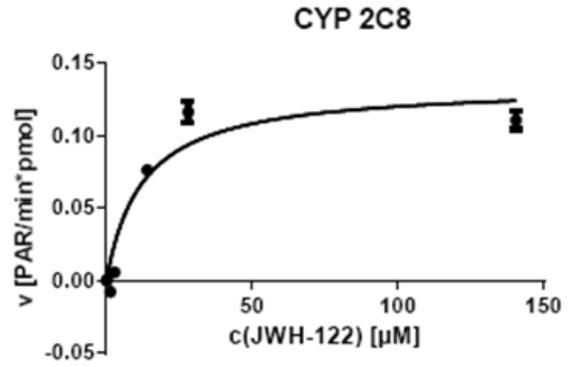


Abbildung A35: Kinetikdiagramm für CYP2C8 zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

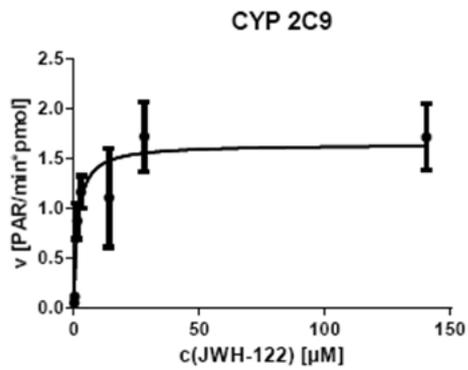


Abbildung A36: Kinetikdiagramm für CYP2C9 zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

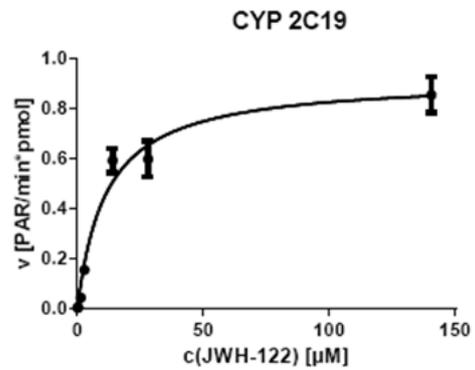


Abbildung A37: Kinetikdiagramm für CYP2C19 zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

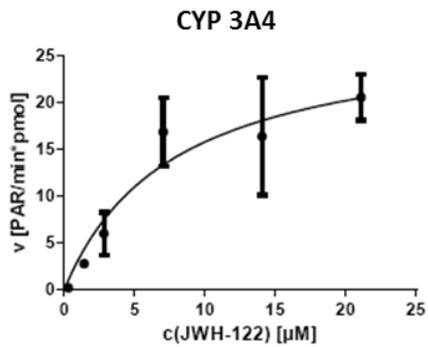


Abbildung A38: Kinetikdiagramm für CYP3A4 zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

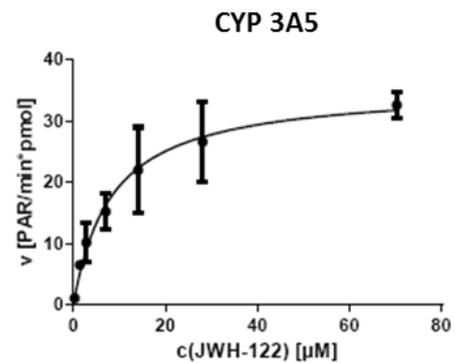


Abbildung A39: Kinetikdiagramm für CYP3A5 zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

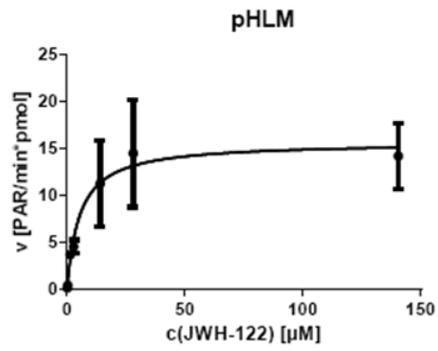


Abbildung A40: Kinetikdiagramm für pHLM zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

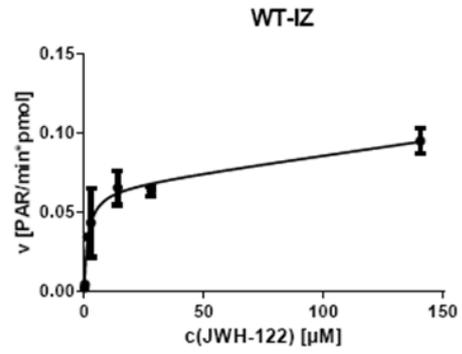


Abbildung A41: Kinetikdiagramm für Wildtyp-Insektenzellen (WT-IZ, entspricht den Control Supersomes) zur Bildung des Hydroxynaphthyl-JWH122

6-Hydroxyindol-JWH-122

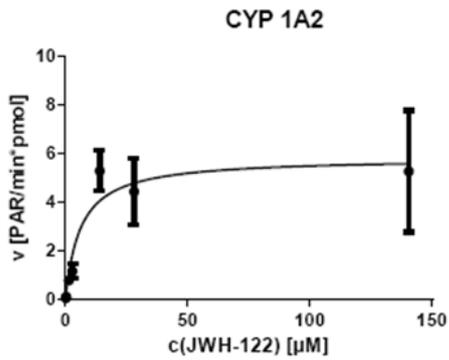


Abbildung A42: Kinetikdiagramm für CYP1A2 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

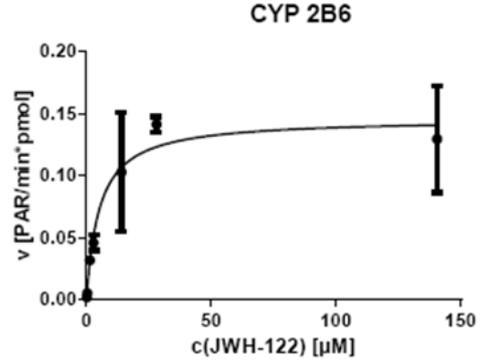


Abbildung A43: Kinetikdiagramm für CYP2B6 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

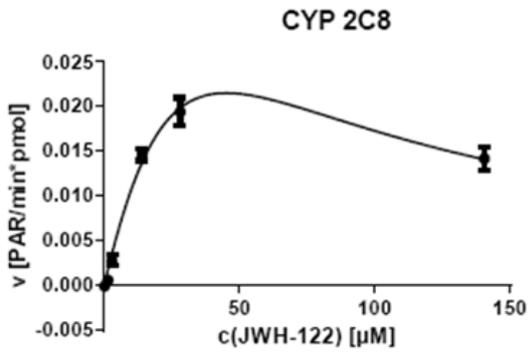


Abbildung A44: Kinetikdiagramm für CYP2C8 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

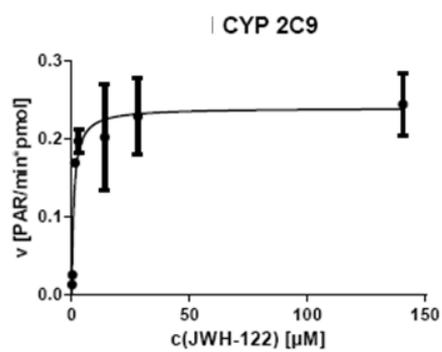


Abbildung A45: Kinetikdiagramm für CYP2C9 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

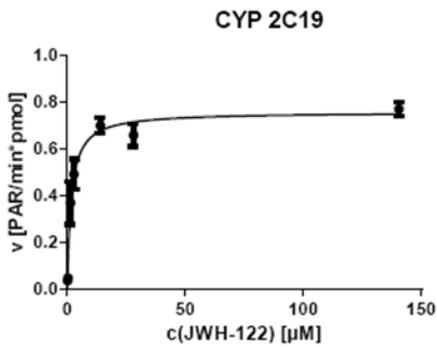


Abbildung A46: Kinetikdiagramm für CYP2C19 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

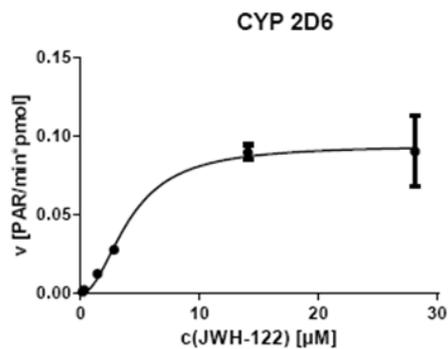


Abbildung A47: Kinetikdiagramm für CYP2D6 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

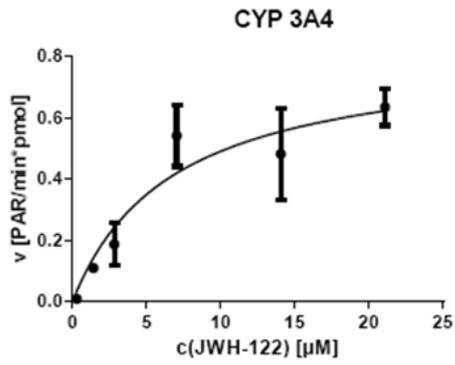


Abbildung A48: Kinetikdiagramm für CYP3A4 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

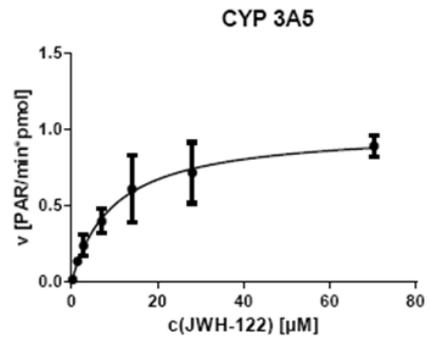


Abbildung A49: Kinetikdiagramm für CYP3A5 zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

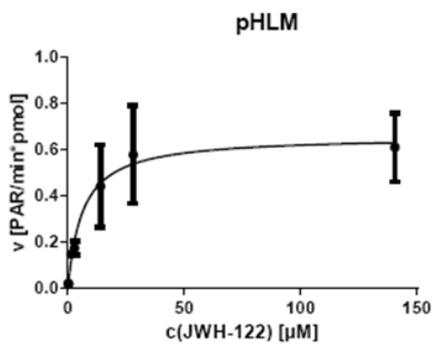


Abbildung A 50: Kinetikdiagramm für pHLM zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

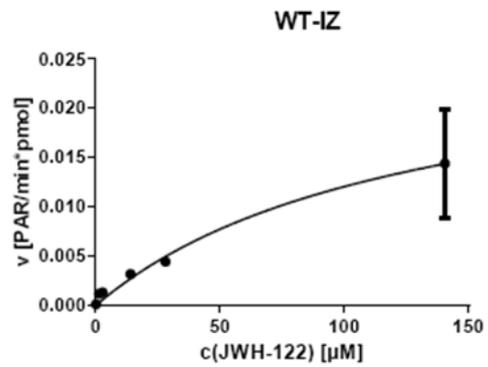


Abbildung A 51: Kinetikdiagramm für Wildtyp-Insektenzellen (WT-IZ, entspricht den Control Supersomes) zur Bildung des 6-Hydroxyindol-JWH122

Abgleich der identifizierten Hauptmetaboliten mit Referenzstandards

Teil 1:

Tabelle A 2: Abgleich der identifizierten Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide in humanen Urinproben mit verfügbarem Referenzmaterial. Die mit Sternchen gekennzeichneten Referenzsubstanzen wurden im Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Freiburg synthetisiert.

identifizierte Metaboliten in Urinproben	AM-694 N-Hydroxyfluorpentyl	AM-694 N-Hydroxypentyl	AM-694 Pentansäure	AM-2201 N-Hydroxyfluorpentyl	AM-2201 Hydroxyindol	JWH-007 N-Hydroxypentyl	JWH-007 Pentansäure	JWH-007 Dihydroxypentyl	JWH-018 Pentansäure	JWH-018 N-Hydroxypentyl	JWH-018 Hydroxyindol	JWH-019 N-Hydroxyhexyl	JWH-019 Hexansäure	JWH-073 Butansäure	JWH-073 N-Hydroxybutyl	JWH-073 Hydroxyindol	JWH-081 N-Hydroxypentyl	JWH-081 Hydroxyindol	JWH-081 Hydroxymethoxynaphthyl	JWH-122 N-Hydroxypentyl	JWH-122 Hydroxynaphthyl	JWH-122 Hydroxyindol	JWH-122 Pentansäure	JWH-203 N-Hydroxypentyl	JWH-203 Hydroxyindol	JWH-203 Pentansäure	JWH-210 N-Hydroxypentyl	JWH-210 Hydroxynaphthyl	JWH-210 Hydroxyindol	JWH-250 N-Hydroxypentyl	JWH-250 Hydroxyindol	JWH-250 Hydroxyphenyl	JWH-307 Hydroxyfluorphenylpyrrol	JWH-307 Dihydroxynaphthyl (hydrat.)	JWH-307 Hydroxyfluorphenylpyrrol-Hydroxynaphthyl		
Referenzsubstanz																																					
AM-2201 4-OH-fluorpentyl				X																																	
AM-2201 6-OH-indol					X																																
JWH-018 2-OH-pentyl																																					
JWH-018 3-OH-pentyl										X																											
JWH-018 4-OH-indol											X																										
JWH-018 4-OH-pentyl										X																											
JWH-018 5-OH-indol											X																										
JWH-018 5-OH-pentyl										X																											
JWH-018 6-OH-indol											X																										

Anhang

	identifizierte Metaboliten in Urinproben	AM-694 N-Hydroxyfluorpentyl	AM-694 N-Hydroxypentyl	AM-694 Pentansäure	AM-2201 N-Hydroxyfluorpentyl	AM-2201 Hydroxyindol	JWH-007 N-Hydroxypentyl	JWH-007 Pentansäure	JWH-007 Dihydroxypentyl	JWH-018 Pentansäure	JWH-018 N-Hydroxypentyl	JWH-018 Hydroxyindol	JWH-019 N-Hydroxyhexyl	JWH-019 Hexansäure	JWH-073 Butansäure	JWH-073 N-Hydroxybutyl	JWH-073 Hydroxyindol	JWH-081 N-Hydroxypentyl	JWH-081 Hydroxyindol	JWH-081 Hydroxymethoxynaphthyl	JWH-122 N-Hydroxypentyl	JWH-122 Hydroxynaphthyl	JWH-122 Hydroxyindol	JWH-122 Pentansäure	JWH-203 N-Hydroxypentyl	JWH-203 Hydroxyindol	JWH-203 Pentansäure	JWH-210 N-Hydroxypentyl	JWH-210 Hydroxynaphthyl	JWH-210 Hydroxyindol	JWH-250 N-Hydroxypentyl	JWH-250 Hydroxyindol	JWH-250 Hydroxyphenyl	JWH-307 Hydroxyfluorphenylpyrrol	JWH-307 Dihydroxynaphthyl (hydrat.)	JWH-307 Hydroxyfluorphenylpyrrol-Hydroxynaphthyl		
JWH-018 7-OH-indol																																						
JWH-018 Pentansäure										X																												
JWH-019 5-OH-indol																																						
JWH-019 6-OH-hexyl													X																									
JWH-073 3-OH-butyl																X																						
JWH-073 4-OH-butyl																X																						
JWH-073 6-OH-indol																X																						
JWH-073 Butansäure															X																							
JWH-081 4-OH-pentyl																		X																				
JWH-081 5-OH-pentyl																	X																					
JWH-122 2-OH-pentyl*																																						
JWH-122 3-OH-pentyl*																					X																	
JWH-122 4-OH-pentyl*																					X																	
JWH-122 5-OH-indol*																							X															
JWH-122 5-OH-pentyl*																						X																
JWH-122 6-OH-indol*																							X															
JWH-122 Pentansäure																								X														
JWH-203 4-OH-pentyl																										X												
JWH-203 5-OH-pentyl																										X												

Teil 2:

Tabelle A 3: Abgleich der identifizierten Hauptmetaboliten synthetischer Cannabinoide in humanen Urinproben mit verfügbarem Referenzmaterial.

identifizierte Metaboliten in Urinproben	MAM-2201 Hydroxyindol	MAM-2201 Hydroxynaphthyl	RCS-4 Hydroxyindol	RCS-4 Hydroxymethoxyphenyl	UR-144 N-Hydroxypentyl	UR-144 Hydroxytetramethylcyclopropyl	UR-144 Pentansäure	UR-144 Isomer N-Hydroxypentyl	UR-144 Isomer Pentansäure
Referenzsubstanz									
RCS-4 4-OH-pentyl									
RCS-4 5-OH-pentyl									
RCS-4 Pentansäure									
UR-144 4-OH-pentyl					X				
UR-144 5-OH-pentyl					X				
UR-144 Pentansäure							X		
UR-144 Isomer Pentansäure									X

Herstellerblatt zur Kreuzreaktivität des evaluierten ELISA

Synthetic Cannabinoids ELISA SC3474

Analyte	% Crossreactivity
JWH-018	100
JWH-018 6-hydroxyindole	215
JWH-018 N-5-hydroxypentyl	184
JWH-073	135
JWH-200	127
5-hydroxy JWH-018	130
AM2201	119
JWH-N-(3-Hydroxybutane)	106
JWH-073 N-Butanol	96
JWH-018 N-pentanoic acid	85
JWH-018 5-hydroxyindole	56
JWH-073 N-Butanoic acid	37
JWH-019	35
JWH-018 4-hydroxyindole	23
JWH-398	12
JWH-122	10
WIN 55,212-3 mesylate	3
JWH-015	3
3-(1-naphthoyl)-1H-Indole	3
JWH-007	2
JWH-250	<1
JWH-081	<1
4-methoxy-N,N-dimethyltryptamine	<1
1-pentyl-1-hydroxyindole-3-carboxylic acid	<1
5-hydroxyindole-3-acetic acid	<1
5-hydroxytryptophol	<1
11-Hydroxy- Δ^9 -THC	<1
Indole-3-carboxylic acid	<1
Cannabinol	<1
Psilocybin	<1
JWH-018 2-hydroxyindole	<1
RCS-4	<1
RCS-8	<1
CP-47-947	<1
HU-210	<1
HU331	<1
HU308	<1
JWH-133	<1
(+/-) CP47,497	<1
HU211	<1
JWH-203	<1