

**Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure A –
ein neuer Cannabis-Konsum-Marker**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Julia Jung
aus Püttlingen

2009

Dekan:

Prof. Dr. Harald Hillebrecht

Vorsitzender des Promotionsausschusses:

Prof. Dr. Rolf Schubert

Referent:

Prof. Dr. Rolf Schubert

Leiter der Arbeit und Korreferent:

Prof. Dr. Wolfgang Weinmann

Drittprüfer:

Prof. Dr. Regine Süss

Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses:

17. Dezember 2009

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weinmann im Institut für Rechtsmedizin des Klinikums der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. in der Zeit von Juni 2005 bis September 2008.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Weinmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe eines interessanten und abwechslungsreichen Dissertationsthemas, die Betreuung und rege Unterstützung der vorliegenden Arbeit, die Möglichkeit der aktiven Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen und Tagungen sowie die umfangreiche Förderung der Zusammenarbeit mit anderen Laboren,

Herrn Prof. Dr. Rolf Schubert für die Betreuung der vorliegenden Arbeit seitens der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., die Aufnahme in seinen Arbeitskreis sowie die ständige Diskussionsbereitschaft,

Herrn Prof. Stefan Pollak für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg durchführen zu können, sowie für die Ermöglichung der Teilnahme an zahlreichen Kongressen und weiterbildenden Tagungen im In- und Ausland,

Herrn Prof. Dr. Michael Müller und Frau Elke Breitling, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., für die ausgezeichnete Betreuung und Zusammenarbeit bei der Isolierung von Δ^9 -THCA-A,

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Hans H. Maurer, Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie der Universität des Saarlandes, für die Ermöglichung der tierexperimentellen Studien in seinem Arbeitskreis, seine wissenschaftliche Expertise und die anregenden Ideen und Diskussionen im Rahmen der Identifizierung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite,

Herrn Prof. Dr. Christian Neusüß, Fakultät für Chemie der Fachhochschule Aalen, für die Messungen am LC-QTOF MS und die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse,

Herrn Prof. Dr. Manfred Jung, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br., für die Überlassung der Prep-HPLC-Trennsäule,

Herrn PD Dr. Frank Peters, Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie der Universität des Saarlandes, für die unbürokratische Bereitstellung der Prep-HPLC-Anlage und die produktive Zusammenarbeit bei der Methodenentwicklung,

Herrn Dr. Hellmut Mahler vom Landeskriminalamt Nordrhein-Westfalen für die Bereitstellung von Rohextrakt für die Isolierung von Δ^9 -THCA-A und die Unterstützung bei speziellen Fragestellungen,

Herrn Dr. Volker Auwärter für seine Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit, seine Hilfsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen und kritischen Diskussionen, welche zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben,

Herrn Jürgen Kempf für die Einführung in die LC-MS/MS-Analytik, seine fachmännische Unterstützung, geduldige Art und immer währende Hilfe bei Problemen,

allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Rechtsmedizin für die angenehme Atmosphäre, gute Zusammenarbeit und stetige Hilfsbereitschaft sowie

meinen Eltern, die mich stets gefördert und unterstützt haben.

Es ist nicht so sehr der Nutzen der Freunde, den wir brauchen,
als vielmehr die Zuversicht, ihre Hilfe in Anspruch nehmen zu können.

Philosophie des Glücks

Epikur von Samos

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Publikationen:

1. S. Vogt, A. Mehlig, P. Hunziker, A. Scholer, J. Jung, A. B. González, W. Weinmann, S. Marsch. Survival of severe amlodipine intoxication due to medical intensive care. *Forensic Science International*. 2006; 161(2-3): 216-20.
2. J. Jung, M. Hermanns-Clausen, W. Weinmann. Anorectic sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss. *Forensic Science International*. 2006; 161(2-3): 221-2.
3. J. Jung, J. Kempf, H. Mahler, W. Weinmann. Detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*. 2007; 42(3): 354-60.
4. J. Jung, M. R. Meyer, H. H. Maurer, C. Neusüß, W. Weinmann, A. Auwaerter. Studies on the metabolism of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol precursor Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) in rat using LC-MS/MS, LC-QTOF MS and GC-MS techniques. *Journal of Mass Spectrometry*. Online-Publikation: 02. September 2009.
5. J. Jung, H. Mahler, E. Breitling, M. Mueller, F. T. Peters, H. H. Maurer, A. Wohlfarth, W. Weinmann, A. Auwaerter. New chromatographic method for the isolation of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) from *Cannabis sativa*. In Vorbereitung.
6. A. Auwaerter, J. Jung, C. Neusüß, W. Weinmann. Studies on the metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) in human urine using LC-MS/MS and LC-QTOF MS techniques and comparison to the *in-vivo* metabolism in rats. In Vorbereitung.

Vorträge:

1. J. Jung, V. Auwärter, G. Herzog, H. Mahler, J. Kempf, W. Weinmann. Determination of Δ^9 -Tetrahydrocannabinolic Acid A in Serum Samples by GC-MS. Vortrag während des 15. Symposiums der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie (GTFCh) vom 18. bis 21. April 2007 in Mosbach/Baden (Deutschland).
2. J. Jung. Cannabis sativa - Pharmakologische Eigenschaften und therapeutischer Einsatz. Vortrag im Rahmen der Vorlesung Pharmazeutische Chemie der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br. im Wintersemester 2007/2008.
3. J. Jung, C. Steinert, G. Herzog, W. Weinmann, V. Auwärter. Artefaktische Erhöhung der freien Δ^9 -THC-COOH im Serum. Vortrag während des 38. Treffens der Oberrheinischen Rechtsmediziner vom 25. bis 26. April 2008 in Mainz (Deutschland).
4. J. Jung, V. Auwaerter, M. R. Meyer, H. H. Maurer, C. Neusüß, W. Weinmann. Studies on the metabolism of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol precursor Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) in rat using LC-MS/MS techniques. Vortrag während des 46. Internationalen Treffens der The International Association of Forensic Toxicology (TIAFT) vom 02. bis 09. Juni 2008 in La Martinique (Frankreich).
5. J. Jung, V. Auwaerter, M. R. Meyer, H. H. Maurer, C. Neusüß, W. Weinmann. Studies on the metabolism of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol precursor Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) in rat using LC-MS/MS techniques. Vortrag während der 87. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) vom 24. bis 27. September 2008 in Dresden (Deutschland).

Poster:

1. J. Jung, M. Hermanns-Clausen, W. Weinmann. Anorectic Sibutramine detected in a Chinese herbal drug for weight loss – a case report. Poster während des 43. Internationalen Treffens der The International Association of Forensic Toxicology (TIAFT) vom 29. August bis 2. September 2005 in Seoul (Korea).

2. J. Jung, J. Kempf, W. Weinmann. Detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) in human urine and blood serum by LC-MS/MS and GC-MS. Poster während des 44. Internationalen Treffens der The International Association of Forensic Toxicology (TIAFT) vom 27. August bis 1. September 2006 in Ljubljana (Slowenien).
3. J. Jung, V. Auwärter, W. Weinmann. Nachweis von Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (Δ^9 -THCA-A-Glucuronid) mittels LC-MS/MS. Poster während der 86. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) vom 26. bis 29. September 2007 in Mainz (Deutschland).
4. W. Weinmann, J. Jung, V. Auwärter. GC-MS/MS für den gezielten Nachweis von Cannabinoiden in der Forensischen Toxikologie. Poster während der 41. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS) vom 02. bis 05. März 2008 in Gießen (Deutschland).
5. J. Jung, H. Mahler, E. Breitling, M. Mueller, F. T. Peters, H. H. Maurer, W. Weinmann, A. Auwaerter. New chromatographic method for the isolation of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) from Cannabis sativa. Poster während des 46. Internationalen Treffens der The International Association of Forensic Toxicology (TIAFT) vom 02. bis 09. Juni 2008 in La Martinique (Frankreich).

Wissenschaftliche Auszeichnung:

Young Scientist Award

für die Posterpräsentation „Detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) in human urine and blood serum by LC-MS/MS and GC-MS“

überreicht während des 44. Internationalen Treffens der “The International Association of Forensic Toxicology” (TIAFT) vom 27. August bis 1. September 2006 in Ljubljana (Slowenien)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Cannabis	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Inhaltsstoffe	3
1.1.3	Biogenese	7
1.1.4	Physikalisch-chemische Eigenschaften	9
1.1.5	Cannabisprodukte	11
1.1.6	Gesetzliche Bestimmungen	12
1.2	Pharmakokinetik von Δ^9-THC	13
1.2.1	Absorption	14
1.2.2	Distribution	15
1.2.3	Metabolismus	17
1.2.4	Elimination	19
1.2.5	Modelle zur Abschätzung des Konsumzeitpunktes und der akuten Wirkung	20
1.3	Instrumenteller Teil	24
1.3.1	LC-MS/MS mit linearer Ionenfalle	24
1.3.2	LC-QTOF MS	26
1.4	Ziele der Arbeit	27
2	EXPERIMENTELLER TEIL	28
2.1	Materialien	28
2.1.1	Referenzstandards	28
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	30
2.2	Geräte	31
2.3	Methoden	33
2.3.1	Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten	33
2.3.2	Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Körperflüssigkeiten	34
2.3.3	Studien zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A	37
2.3.4	Elimination von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten	42
2.4	Probenaufarbeitung	43
2.4.1	Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten	43
2.4.2	Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Körperflüssigkeiten	44
2.4.3	Isolierung von Δ^9 -THCA-A aus Marihuana	50
2.4.4	Studien zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A	52
2.4.5	Studien zur Elimination von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten	55

3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	58
3.1	Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten	58
3.2	Quantifizierung von Δ9-THCA-A in Körperflüssigkeiten	60
3.2.1	Quantifizierung von Δ 9-THCA-A in Serum und Urin mittels LC-MS/MS	60
3.2.2	Quantifizierung von Δ 9-THCA-A im Serum mittels GC-MS	69
3.2.3	Quantifizierung von Δ 9-THCA-A und weiteren Cannabinoiden im Serum mittels GC-MS/MS ..	76
3.3	Isolierung von Δ9-THCA-A aus Marihuana	91
3.3.1	Aufreinigung des Rohextraktes mittels Säulenchromatographie	91
3.3.2	Aufreinigung der Δ 9-THCA-A mittels semipräparativer HPLC-DAD	94
3.4	Studien zum Metabolismus von Δ9-THCA-A	96
3.4.1	Studie zum Metabolismus von Δ 9-THCA-A an Ratten	96
3.4.2	Studien zum humanen Metabolismus von Δ 9-THCA-A	107
3.4.3	Vergleich des <i>in-vivo</i> Metabolismus von Ratte und Mensch	124
3.4.4	Studien zum Metabolismus von Δ 9-THCA-A mit Rattenlebermikrosomen	125
3.5	Studien zur Elimination von Δ9-THCA-A und ihren Metaboliten	134
3.5.1	Eliminationsprofile von Δ 9-THCA-A und ihren Metaboliten in Serum und Plasma	134
3.5.2	Eliminationsprofile von Δ 9-THCA-A und ihren Metaboliten im Urin	138
3.5.3	Eliminationsprofile von Δ 9-THCA-A und ihren Metaboliten im Speichel	143
4	SCHLUSSFOLGERUNGEN	145
5	ZUSAMMENFASSUNG	149
6	LITERATURVERZEICHNIS	153
7	ANHANG	172
7.1	Strukturen der Inhaltsstoffe von Cannabis sativa L.	172
7.1.1	Terpene	172
7.1.2	Nicht-terpenoide Verbindungen	173
7.1.3	Nicht-cannabinoide Phenole	173
7.1.4	Stickstoffhaltige Verbindungen	173
7.1.5	Alkaloide	174
7.1.6	Flavonoide	175
7.2	Ergebnisse der 200 Serumproben aus Straßenverkehrsfällen	176
8	CURRICULUM VITAE	183

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[M+H] ⁺	protoniertes Molekülion
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekülion
ΔEMV	Differenz zur Autotune-Spannung
Δ8-THC	Δ8-Tetrahydrocannabinol
Δ9-THC	Δ9-Tetrahydrocannabinol
Δ9-THC-D ₃	Δ9-Tetrahydrocannabinol, dreifach deuteriert
11-OH-Δ9-THC	11-Hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinol
11-OH-Δ9-THC-D ₃	11-Hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinol, dreifach deuteriert
Δ9-THC-COOH	11-Nor-9-carboxy-Δ9-tetrahydrocannabinol
Δ9-THC-COOH-D ₃	11-Nor-9-carboxy-Δ9-tetrahydrocannabinol, dreifach deuteriert
Δ9-THCA	Δ9-Tetrahydrocannabinolsäure
Δ9-THCA-A	Δ9-Tetrahydrocannabinolsäure-A
Δ9-THCA-B	Δ9-Tetrahydrocannabinolsäure-B
11-OH-Δ9-THCA-A	11-Hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
8α-OH-Δ9-THCA-A	8α-Hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
8β-OH-Δ9-THCA-A	8β-Hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
8α,11-Bis-OH-Δ9-THCA-A	8α,11-Bis-hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
8β,11-Bis-OH-Δ9-THCA-A	8β,11-Bis-hydroxy-Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
Δ9-THCA-A-8-on	Δ9-Tetrahydrocannabinolsäure-A-8-on
Δ9-THCA-A-COOH	11-Nor-9-carboxy-Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
4'-OH-Δ9-THCA-A-COOH	11-Nor-9-carboxy-4'-hydroxy- Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
8-OH-Δ9-THCA-A-COOH	11-Nor-9-carboxy-8-hydroxy- Δ9-tetrahydrocannabinolsäure-A
9,10-Bis-OH-HHCA-A	9,10-Bis-hydroxy-hexahydrocannabinolsäure-A
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome)
APCI	Atmosphärendruck-Chemische-Ionisation (engl. Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BtMG	Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln

CAD	Collision Activated Dissociation
CBC	Cannabichromen
CBCA	Cannabichromensäure (engl. Cannabichromic Acid)
CBD	Cannabidiol
CBDA	Cannabidiolsäure (engl. Cannabidiolic Acid)
CBE	Cannabielsoin
CBG	Cannabigerol
CBGA	Cannabigerolsäure (engl. Cannabigerolic Acid)
CBL	Cannabicyclol
CBN	Cannabinol
CBND	Cannabinodiol
CBNRA	Cannabinerolsäure (engl. Cannabinerolic Acid)
CBT	Cannabitriol
CE	Kollisionsenergie (engl. Collision Energy)
CEP	Cell Entrance Potential
CIF	Cannabis-Influence-Factor
CXP	Cell Exit Potential
CYP	Cytochrom P450
DAD	Dioden-Array-Detektion
DC	Dünnschichtchromatographie, dünnschichtchromatographisch
DP	Declustering Potential
EI	Elektronenstoß-Ionisation (engl. Electron Impact Ionization)
EMS	Enhanced-MS-Scan
EP	Entrance Potential
EPI	Enhanced-Product-Ion-Scan
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation (engl. Electrospray Ionization)
FP	Focusing Potential
GC	Gaschromatographie, gaschromatographisch
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-MS/MS	Gaschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
GOT	Geranylpyrophosphat : Olivetolat-Geranyltransferase

GPP	Geranylpyrophosphat
High	Qualitätskontrollprobe, hohe Konzentration
HIV	Humanes Immundefizienz Virus (engl. Human Immunodeficiency Virus)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigchromatographie-Dioden-Array-Detektion
I.D.	Innendurchmesser (engl. Internal Diameter)
IS	Interner Standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
L.	nach Carl von Linné
LAM	nach Jean-Baptiste de Lamarck
LC	Flüssigchromatographie (engl. Liquid Chromatography)
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
LC-QTOF MS	Flüssigchromatographie-Flugzeitmassenspektrometrie
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion (engl. Liquid-Liquid Extraction)
LOD	Nachweisgrenze (engl. Limit Of Detection)
LOQ	Bestimmungsgrenze (engl. Limit Of Quantification)
Low	Qualitätskontrollprobe, niedrige Konzentration
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
Medium	Qualitätskontrollprobe, mittlere Konzentration
MPW-Spektrenbibliothek	Maurer-Pfleger-Weber-Spektrenbibliothek
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometrie, massenspektrometrisch
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-Trifluoracetamid
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH/H ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NPP	Nerylpyrophosphat
OLA	Olivetolsäure (engl. Olivetolic acid)
PIS	Product-Ion-Scan

ppm	parts per million
QK	Qualitätskontrolle
R^2	Korrelationskoeffizient
RT	Retentionszeit
RIC	rekonstruiertes Ionenchromatogramm
RP	Umkehrphase (engl. Reversed Phase)
S/N	Signal-Rausch (engl. Signal to noise)
SD	Standardabweichung (engl. Standard Deviation)
SIM	Selected-Ion-Monitoring
SPE	Festphasenextraktion (engl. Solid Phase Extraction)
ssp.	Subspecies
StGB	Strafgesetzbuch
StVG	Straßenverkehrsgesetz
t	Target-Ion
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertszeit
$t_{1/2\beta}$	terminale Eliminationshalbwertszeit
TBME	<i>tert.</i> -Butyl-Methyl-Ether
UV	Ultraviolett
V_D	Verteilungsvolumen
VK	Variationskoeffizient
XIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
z	Anzahl an Elementarladungen e

1 EINLEITUNG

1.1 Cannabis

Cannabis gehört nach Alkohol zu den weltweit am häufigsten konsumierten Drogen. In Deutschland missbrauchen nach Schätzungen des Bundesministerium für Gesundheit zurzeit etwa 600.000 Personen zwischen 18 und 64 Jahren Cannabis oder sind davon abhängig ^[1]. Aufgrund seines weit verbreiteten Missbrauchs kommt Cannabis bei Straßenverkehrsdelikten die größte Bedeutung unter den illegalen Drogen zu. Andererseits konnten in den letzten Jahren positive Effekte beim therapeutischen Einsatz von Cannabis-Zubereitungen verzeichnet werden, wie z.B. zur Behandlung von Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust bei HIV bzw. AIDS ^[2-4], zur Linderung von Übelkeit und Erbrechen während einer Chemotherapie ^[5-7], in der Therapie verschiedener Schmerzerkrankungen ^[8, 9] sowie zur Minderung von Symptomen, welche mit neurologischen Erkrankungen wie Multiple Sklerose ^[10-16] assoziiert sind. Neben der Aufklärung der Wirkungsmechanismen von Cannabinoiden ^[17-19], der Evaluation therapeutischer Anwendungsgebiete ^[10, 20-25] und der Untersuchung psychischer Störungen im Zusammenhang mit Cannabis-Konsum ^[26-28] ist auch die Untersuchung von Zusammenhängen, welche für die Begutachtung analytischer Befunde in der forensisch-toxikologischen Praxis nutzbar sind, von zentralem Interesse.

1.1.1 Taxonomie

Die Gattung Cannabis L. (nach Carl von Linné, L.) bildet zusammen mit der Gattung Humulus L. die Familie der Cannabaceae (Hanfgewächse) ^[29, 30] und wird wie in Abb. 1.1 dargestellt eingeordnet:

Abteilung	Spermatophyta
Unterabteilung	Magnoliophytina
Klasse	Rosopsida
Unterklasse	Rosidae
Ordnung	Urticales
Familie	Cannabaceae
Gattung	Cannabis L.

Abb. 1.1 Einordnung der Gattung Cannabis L. ^[30].

Für die Untergliederung der Gattung *Cannabis* L. existieren zwei voneinander abweichende Konzepte ^[29]. Während ein Teil der Autoren eine Untergliederung in die Arten *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* LAM. (nach Jean-Baptiste de Lamarck, LAM.) und *Cannabis ruderalis* JANISCH vornimmt ^[31-33], existiert für andere Autoren aufgrund einer starken Variabilität und Plastizität der taxonomisch nutzbaren Merkmale, einer hohen Übereinstimmung reproduktiver Strukturen und einer uneingeschränkten Interfertilität nur die Sammelart *Cannabis sativa* L. ^[34, 35]. Deren weitere Untergliederung in Unterarten und Varietäten ist aufgrund hoher Variabilität infolge von Anbau, Züchtung und stetem Einfluss von Wildbeständen umstritten. Unterschieden werden die Unterarten *Cannabis sativa* subspecies (ssp.) *indica*, ssp. *sativa* und ssp. *spontanea* ^[36, 37]. Die Unterart *sativa* repräsentiert v.a. Fasern und Öl liefernde Sorten, während der Unterart *indica* überwiegend zur Drogengewinnung geeignete Sorten angehören.

Neben der taxonomischen Klassifizierung wurde eine biochemische Klassifizierung in verschiedene Phänotypen (Drogen- und Faser-Typ) vorgeschlagen, welche auf quantitativen Unterschieden in den Gehalten spezifischer Cannabinoide basiert ^[38-41]. Für forensische Zwecke wird hauptsächlich zwischen Drogen- und Faserhanf unterschieden, wobei als Unterscheidungskriterium der Gehalt des psychoaktiven Wirkstoffs Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) herangezogen wird. Drogenhanf zeichnet sich durch hohe Δ 9-THC-Gehalte aus, während Faserhanf nur einen geringen Δ 9-THC-Gehalt von maximal 0,2 % aufweist.

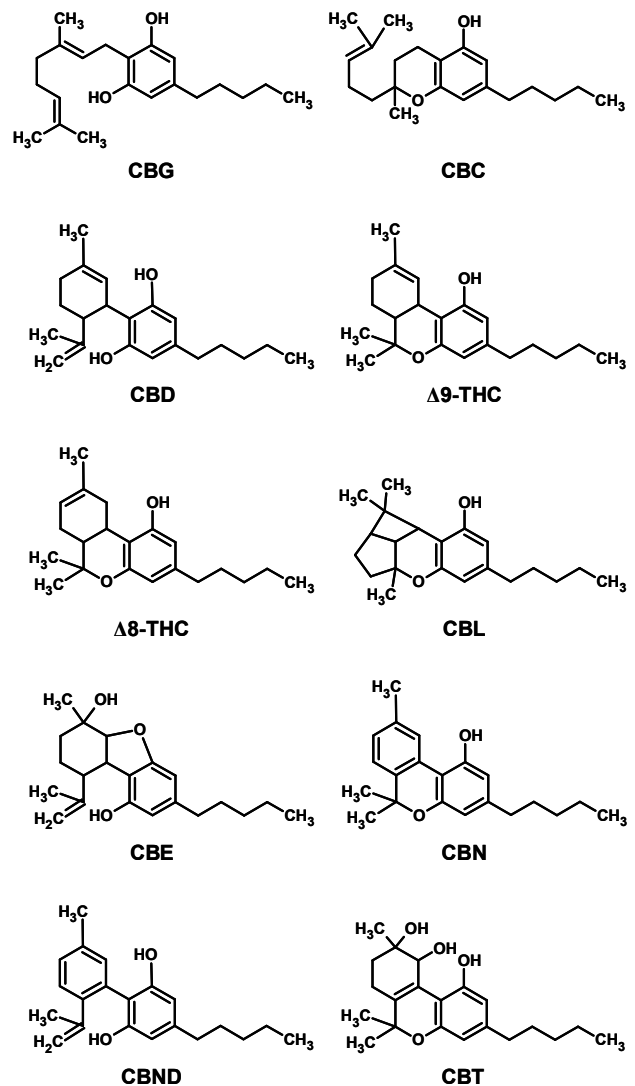
Bei den Vertretern der Gattung *Cannabis* L. handelt es sich um ein- bis zweijährige, anemogame Kräuter ^[29]. Sie weisen einen kurzhaarig-rauen mit angedrückten Borsten besetzten Stängel auf, an welchem die Zweige und Blätter im unteren Abschnitt gegenständig, im oberen Abschnitt teilweise auch wechselständig angeordnet sind. Die drei- bis siebenteiligen Laubblätter sind lang gestielt und gefiedert, die einzelnen, schmalen Laubblättchen wiederum lanzettlich und gesägt. Die Gattung ist diözisch (zweihäusig), selten aber auch monözisch (einhäusig). Weibliche Pflanzen sind größer und dichter belaubt als männliche. Die weiblichen Blütenstände sind seitenständig, in den Achseln schuppenartiger Laubblätter am Grund der Zweige lokalisiert und bilden eine beblätterte Scheinähre. Die einzelnen, fünfblättrigen Blüten weisen ein stark reduziertes Perianth auf und sind lediglich von einem Deckblatt umhüllt. Bei den männlichen Blütenständen handelt es sich um lockere, rispenartige Trugdolden. Die Samen sind arm an Nährgewebe. Der Keimling ist weiß, ölig-fleischig und hakenförmig gekrümmt.

1.1.2 Inhaltsstoffe

Insgesamt wurden mehr als 400 Inhaltsstoffe in *Cannabis sativa* L. identifiziert, davon allein über 60 verschiedene Cannabinoide [42]. Darüber hinaus enthält *Cannabis sativa* L. jedoch zahlreiche Verbindungen anderer chemischer Stoffgruppen (Tab. 1.1).

Tab. 1.1 Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* L. sowie Strukturen der Cannabinoid-Typen [42].

1 Cannabinoide
Cannabigerol (CBG)*
Cannabichromen (CBC)
Cannabidiol (CBD)*
Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC)*
Δ 8-Tetrahydrocannabinol (Δ 8-THC)*
Cannabicyclol (CBL)
Cannabielsoin (CBE)
Cannabinol (CBN)*
Cannabinodiol (CBND)
Cannabitrinol (CBT)
andere Cannabinoide
2 Stickstoff-Verbindungen
Quartäre Basen
Amide
Amine
Spermidinalkaloide
3 Aminosäuren
4 Proteine, Glycoproteine
5 Zucker
Monosaccharide
Disaccharide
Polysaccharide
Cyclitole
Aminozucker
6 Kohlenwasserstoffe
7 Alkohole
8 Aldehyde
9 Ketone
10 Säuren
11 Fettsäuren
12 Ester und Laktone
13 Steroide
14 Terpene
Monoterpene
Sesquiterpene
Diterpene
Triterpene
15 Nicht-cannabinoide Phenole
16 Flavonoide
17 Vitamine
18 Pigmente



* Diese Cannabinoide wurden auch im Rahmen der Untersuchungen von Cannabis-Rauchkondensaten nachgewiesen (Kapitel 3.1).

Ursprünglich wurden unter der Bezeichnung Cannabinoide nur die Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* L. mit einem charakteristischen C₂₁-Grundgerüst sowie deren Abbauprodukte verstanden ^[43]. Diese rein pharmakognostische Definition wurde in den vergangenen Jahren aufgrund neuer Erkenntnisse in der Cannabis-Forschung durch eine umfassendere Definition basierend auf pharmakologischen Eigenschaften abgelöst. Heute versteht man unter Cannabinoiden alle Liganden an Cannabinoid-Rezeptoren ^[44], also die klassischen Phytocannabinoide, endogene Cannabinoide wie Arachidonylethanolamid (Anandamid), Palmitylethanolamid oder 2-Arachidonylglycerol sowie synthetische Cannabinoid-Analoga wie Nabilon, Dexabinol oder die erst kürzlich in der Modedroge „Spice“ nachgewiesenen Analoga JWH-018 und CP-47,497 ^[45].

Für die Nummerierung der Phytocannabinoide werden in der Literatur hauptsächlich zwei Konzepte verwendet: das Monoterpenoid-System und das auf den Regeln der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) beruhende Dibenzopyran-System (Abb. 1.1), welches in dieser Arbeit zugrunde gelegt wird.

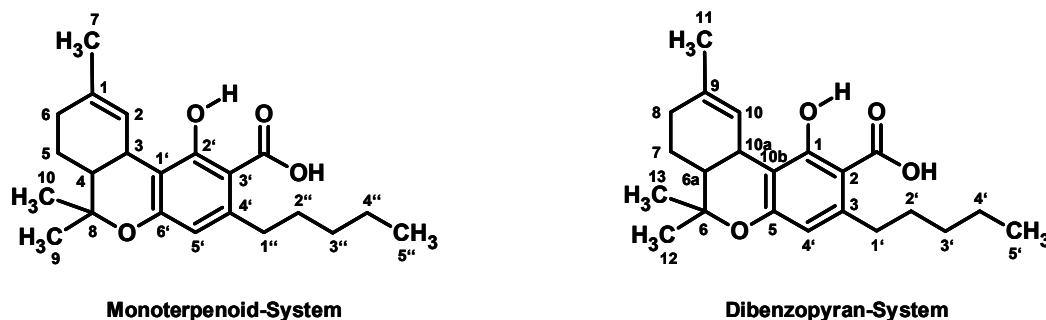


Abb. 1.2 Chemische Struktur von Δ⁹-THCA-A, dem biogenetischen Vorläufer von Δ⁹-THC, nummeriert nach dem Monoterpenoid-System (Δ¹-THCA-A) und nach dem Dibenzopyran-System (Δ⁹-THCA-A).

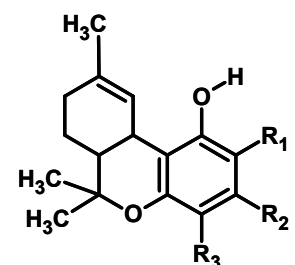
Cannabinoide sind außer in den Samen in allen Teilen der Pflanze enthalten ^[29], wobei keine wesentlichen qualitativen Unterschiede im Cannabinoid-Spektrum zwischen den verschiedenen Pflanzenteilen zu beobachten sind ^[38, 46]. Die höchsten Cannabinoid-Konzentrationen (bezogen auf das getrocknete Pflanzenmaterial) weisen die Deckblätter der Blüten- bzw. Fruchtblätter auf. Die Laubblätter enthalten im Vergleich dazu geringere Konzentrationen, während Stängel und Wurzeln dagegen kaum Cannabinoid-haltig sind ^[29, 47]. Auf den Deckblättern der weiblichen Blüten sowie auf den Laubblättern befinden sich mehrzellige, teilweise gestielte Drüschuppen, welche ein Cannabinoid-haltiges, harzartiges Sekret bilden. Dieses wird im Raum zwischen der

Epidermis-Außenwand und Kutikula akkumuliert und besteht zu mehr als 90 % aus Cannabinoiden. Nach Einsetzen der Blüte wird im Bereich der Triebspitzen der weiblichen Blüten der Inhalt der Drüsenhaare als harzartiges Sekret abgesondert, in welchem im weiteren Verlauf neben Cannabinoid-Carbonsäuren zunehmend auch die decarboxylierten phenolischen Cannabinoide vorliegen^[48].

Cannabinoiden stellen die auffälligsten Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* L. dar. In Abhängigkeit von der Ausgestaltung der Terpen-Struktur lassen sich Cannabinoide vom CBG-, CBC-, CBD-, Δ 9-THC-, Δ 8-THC-, CBL-, CBN-, CBND- und CBT-Typ unterscheiden (Tab. 1.1)^[42]. Für die verschiedenen Cannabinoid-Typen sind die zugehörigen Carbonsäuren und deren Stellungsisomere, die durch Decarboxylierung entstehenden Phenole und die Phenolmethylether beschrieben, wobei zusätzlich die Länge der aliphatischen Seitenkette variieren kann. Zu dem am weitesten verbreiteten Δ 9-THC-Typ gehören insgesamt neun Verbindungen, deren Seitenkette aus einem, drei, vier oder fünf Kohlenstoffatomen besteht (Tab. 1.2).

Tab. 1.2 Cannabinoide des Δ 9-THC-Typs.

Cannabinoid	R ₁	R ₂	R ₃
Δ 9-Tetrahydrocannabinolsäure A	COOH	n-C ₅ H ₁₁	H
Δ 9-Tetrahydrocannabinolsäure B	H	n-C ₅ H ₁₁	COOH
Δ 9-Tetrahydrocannabinol	H	n-C ₅ H ₁₁	H
Δ 9-Tetrahydrocannabinolsäure-C ₄	COOH / H	n-C ₄ H ₉	COOH / H
Δ 9-Tetrahydrocannabinol-C ₄	H	n-C ₄ H ₉	H
Δ 9-Tetrahydrocannabivarinsäure	COOH	n-C ₃ H ₇	H
Δ 9-Tetrahydrocannabivarin	H	n-C ₃ H ₇	H
Δ 9-Tetrahydrocannabiorcolsäure	COOH / H	CH ₃	COOH / H
Δ 9-Tetrahydrocannabiorcol	H	CH ₃	H



Verbindungen des Δ 9-THC-Typs besitzen zwei Chiralitätszentren an C_{6a} und C_{10a}. Bei den natürlich vorkommenden Verbindungen handelt es sich um die (-)-*trans*-Isomere^[44].

Die Cannabinoid-Carbonsäuren von CBND, Δ 9-THC, CBC und CBG sind die quantitativ bedeutendsten, genuin in der Pflanze vorliegenden Cannabinoide^[29, 44]. Ihr relativer Anteil kann stark variieren. So sind Pflanzen beschrieben, die jeweils eines der genannten Cannabinoide mit einer n-Pentyl-Seitenkette (C₅-Seitenkette) oder im Falle des Δ 9-THC-Typs auch das n-Propyl-Analogon (C₃-Seitenkette) als Hauptcannabinoid

enthalten ^[46, 49, 50]. Die Konzentrationen der Methyl- (C₁-Seitenkette) und n-Butyl-Analoga (C₄-Seitenkette) sind dagegen normalerweise sehr gering ^[51, 52].

Die qualitativen und quantitativen Unterschiede im Cannabinoid-Spektrum werden auch zur chemotypischen Unterscheidung von Faser- und Drogenhanf herangezogen. Die dabei verwendeten Kriterien reichen vom einfachen Verhältnis von Δ 9-THC bzw. Δ 9-Tetrahydrocannabinolsäure (Δ 9-THCA) zu CBD bzw. Cannabidiolsäure (CBDA) ^[38] über Formeln, welche aufgrund der Variabilität des Cannabinoid-Spektrum bis zu zehn Cannabinoide einbeziehen ^[49], bis hin zu phänotypischen Konzepten, welche auf empirisch festgelegte Konzentrationsgrenzen zurückgreifen ^[37].

Die Carbonsäuren von Δ 9-THC besitzen keine psychoaktiven Eigenschaften ^[53]. Um die typischen Cannabis-Effekte hervorzurufen, müssen sie durch Decarboxylierung, z. B. durch Rauchen von getrocknetem Pflanzenmaterial oder durch Backen, in die korrespondierenden Phenole überführt werden. Das Verhältnis zwischen der Summe der Cannabinoid-Carbonsäuren Δ 9-THCA-A und Δ 9-THCA-B und dem phenolischen Δ 9-THC in den Laubblättern und Blütenständen von *Cannabis sativa* L. reicht von 2 : 1 bis > 20 : 1 ^[44, 50]. Dabei scheinen klimatische Bedingungen Einfluss auf das Verhältnis zwischen beiden Δ 9-THCA und Δ 9-THC zu nehmen. Während Pflanzen aus gemäßigten Regionen ein Verhältnis von 17 : 1 aufweisen, beträgt dieses in Pflanzen aus den ursprünglichen Verbreitungsgebieten mit wärmerem Klima lediglich 2 : 1. In Cannabis-Harz (Haschisch) reicht das Verhältnis zwischen beiden Δ 9-THCA und Δ 9-THC von 0,5 : 1 bis 6,1 : 1 ^[44, 54].

Neben Cannabinoiden enthält *Cannabis sativa* L. im harzartigen Sekret der Drüschuppen ätherisches Öl (0,1 - 0,3 % bezogen auf das luftgetrocknete Pflanzenmaterial) ^[55], welches zu 85 % aus weit verbreiteten Monoterpenen (u.a. α -Pinen, β -Pinen, Limonen, Myrcen, Ocimen) und Sesquiterpenen (u.a. α - und β -Caryophyllen) besteht ^[29]. Daneben sind im ätherischen Öl auch Spuren nicht-terpenoider Verbindungen (u.a. *cis*- und *trans*-Anethol, Eugenol, *iso*-Eugenol) enthalten. Der typische Cannabis-Geruch, auf welchen auch Drogenspürhunde dressiert werden, ist auf Caryophyllenepoxid zurückzuführen.

Bei den in *Cannabis sativa* L. nachgewiesenen nicht-cannabinoiden Phenolen (Cannabipren, Cannabispiron, Cannithren-1) handelt es sich um Spiroindane, Dihydrostilbene und Verbindungen mit einer Dihydrophenanthren-Struktur ^[29]. Sie sind überwiegend in den Laubblättern lokalisiert und kommen einzeln in Konzentrationen bis zu 0,05 % bezogen auf das getrocknete Pflanzenmaterial vor. Für *Cannabis sativa* L.

sind nur wenige stickstoffhaltige Verbindungen beschrieben ^[29, 42]. Neben quartären Basen (Cholin, Trigonellin, L-(+)-Isoleucin-betain) und Aminen (Piperidin und Hordenin) wurde aus den Wurzeln *N*-(*p*-Hydroxyphenylethyl)-*p*-hydroxy-(*trans*)-cinnamid, ein als Pflanzeninhaltsstoff selten vorkommendes Amid, isoliert ^[56]. In den Laubblättern, Stängeln und Wurzeln sind die Sperminalkaloide Cannabisativin und Anhydrocannabisativin enthalten. Daneben enthalten die Laubblätter von *Cannabis sativa* L. auch für andere Arten beschriebene Flavonoidglykoside wie Orientin, Vitexin und Isovitexin ^[29, 42].

Die Strukturen der hier genannten nicht-cannabinoiden Inhaltsstoffe sind im Anhang (Kapitel 7.1) aufgeführt.

1.1.3 Biogenese

Biogenetisch besitzen alle Cannabinoide den gleichen Ursprung. Heute ist allgemein anerkannt, dass die Biogenese der Monoterpen-Struktur über den Deoxyxylulose-Weg verläuft, während die Alkylresorcinol-Struktur über den Polyketid-Weg aufgebaut wird ^[57]. Deshalb wird angenommen, dass eine Polyketid-Synthase für die Biogenese der Olivetolsäure (OLA) verantwortlich ist. Dabei wird aus einer Hexanoyl-CoA-Einheit und drei Malonyl-CoA-Einheiten zunächst eine Tetraketid-Zwischenstufe aufgebaut, welche über eine Aldol-Kondensation zur Bildung von OLA führt ^[58]. Allerdings ist der Mechanismus der OLA-Biogenese bisher noch nicht aufgeklärt ^[59-61].

Durch eine Kondensation von Geranylpyrophosphat (GPP) (Terpen-Struktur) und OLA (Alkylresorcinol-Struktur) entsteht Cannabigerolsäure (CBGA), welche eine Schlüsselrolle in der Cannabinoid-Biogenese besitzt. Die Biogenese von CBGA wird durch die Geranylpyrophosphat : Olivetolat-Geranyltransferase (GOT), eine Prenyltransferase, katalysiert ^[62]. Während die meisten anderen pflanzlichen Prenyltransferasen membrangebunden sind ^[61, 63-66], ist die GOT löslich ^[61]. Substrat der GOT ist neben GPP auch Nerylpyrophosphat (NPP), dessen Kondensation mit OLA zur Bildung von Cannabinerolsäure (CBNRA) führt. Allerdings erfolgt die Umsetzung von GPP deutlich schneller als die von NPP, so dass der Gehalt an CBGA in *Cannabis sativa* L. höher ist als der von CBNRA. Darüber hinaus ist die GOT spezifisch für OLA, d.h. Olivetol, das Decarboxylierungsprodukt von OLA, ist kein Substrat der GOT ^[61]. Wird GPP anstelle von OLA (2,4-Dihydroxy-6-n-pentyl-benzoessäure) dagegen mit 2,4-Dihydroxy-6-n-butyl-benzoessäure, 2,4-Dihydroxy-6-n-propyl-benzoessäure oder

2,4-Dihydroxy-6-methyl-benzoessäure verknüpft, entstehen Homologe mit variierender Länge der aliphatischen Seitenkette (C₄-, C₃- und C₁- Seitenkette).

CBGA wird schließlich unter Katalyse der Oxidoreduktasen Cannabichromensäure-(CBCA)-Synthase, CBDA-Synthase und Δ 9-THCA-Synthase durch eine oxidative Cyclisierung der Geranyl-Gruppe zu CBCA, CBDA und Δ 9-THCA oder ihren Homologen umgesetzt ^[61]. Für die Reaktion sind keine Metallionen, Co-Faktoren oder Co-Enzyme erforderlich. Die Umsetzung erfolgt für Δ 9-THCA und CBGA stereoselektiv, d.h. durch die Δ 9-THCA-Synthase bzw. CBDA-Synthase werden zu mehr als 95 % (-)- Δ 9-THCA bzw. (-)-CBDA gebildet. Die Stereospezifität der Umsetzung von CBCA ist dagegen geringer, so dass CBCA als Gemisch von (-)- und (+)-Enantiomeren im Verhältnis 5:1 gebildet wird ^[61]. Bislang ist jedoch nicht bekannt, welches Enantiomer bei der Biosynthese überwiegt. Neben CBGA wird auch dessen Z-Isomer CBNRA durch die Δ 9-THCA-Synthase bzw. die CBDA-Synthase zu Δ 9-THCA bzw. CBDA umgesetzt. Allerdings weist die höhere Spezifität beider Enzyme für CBGA darauf hin, dass Δ 9-THCA und CBDA überwiegend aus CBGA gebildet werden.

Wie auch bereits für die GOT beschrieben, ist die Carbonsäure-Gruppe für die Erkennung des Substrates durch die Δ 9-THCA-Synthase essentiell ^[61]. Die Charakterisierung der strukturellen und funktionalen Eigenschaften der Δ 9-THCA-Synthase gelang erst kürzlich durch Klonierung ^[67]. Durch eingehende Untersuchungen konnte dabei der Reaktionsmechanismus der Flavin-Adenin-Dinukleotid-(FAD)-abhängigen Δ 9-THCA-Synthase aufgeklärt werden. Ferner konnte kürzlich das Enzym kristallisiert werden ^[68]. Die Δ 9-THCA-Synthase wird in den Subkutikularraum der Drüsenhaare sezerniert und katalysiert dort die Bildung von Δ 9-THCA ^[69]. Die Sekretion der Δ 9-THCA-Synthase ist erforderlich, da Δ 9-THCA für Pflanzenzellen ein potentes Toxin darstellt und bei der Umsetzung von CBGA neben Δ 9-THCA auch Wasserstoffperoxid entsteht. Darüber hinaus induziert Δ 9-THCA in Pflanzen- wie auch in Insektenzellen den Zelltod. Physiologisch dient die Δ 9-THCA-Synthase damit wahrscheinlich der Abwehr von Fraßschädlingen. Eine ausführliche biochemische Untersuchung der CBDA-Synthase bzw. CBCA-Synthase zur Aufklärung ihrer Struktur und des Reaktionsmechanismus ist bisher noch nicht beschrieben.

Die Decarboxylierung der Cannabinoid-Carbonsäuren zu den phenolischen Cannabinoiden CBC, CBD und Δ 9-THC erfolgt schließlich durch eine nicht-enzymatische Reaktion.

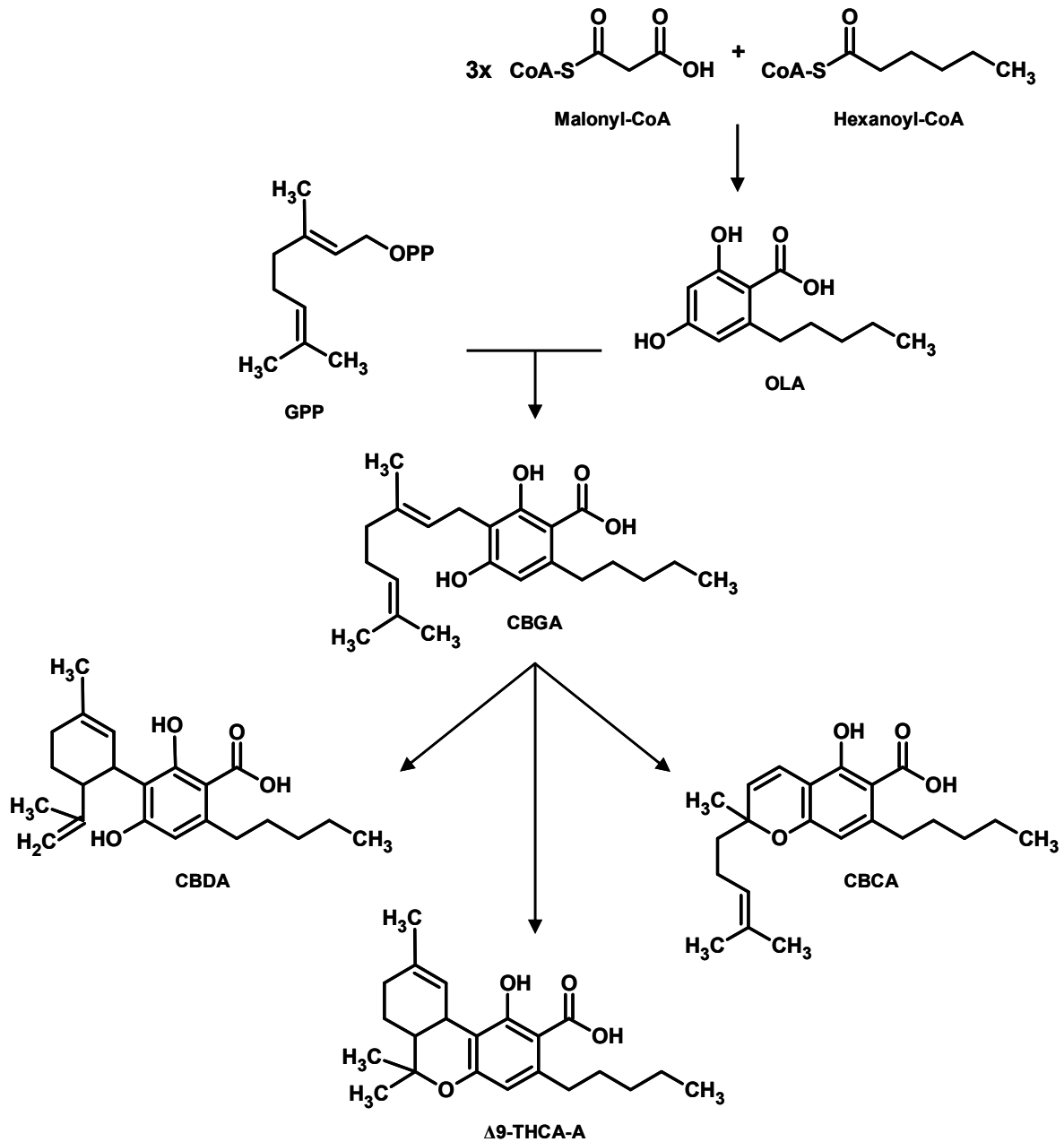


Abb. 1.3 Biogenese der Cannabinoide am Beispiel der Hauptinhaltsstoffe von Drogen- und Faserhanf Δ 9-THCA, CBDA und CBCA.

1.1.4 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Δ 9-THC und dessen biogenetischem Vorläufer Δ 9-THCA-A sind in Tab. 1.3 zusammengefasst.

Tab. 1.3 Physikalisch-chemischen Eigenschaften von Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A.

	Δ 9-THC	Δ 9-THCA-A
Systematische Bezeichnung (nach IUPAC)	(-)-(6aR,10aR)-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol	1-Hydroxy-(-)-(6aR,10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-2-carbonsäure
Summenformel	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	C ₂₂ H ₃₀ O ₄
Molekulargewicht	314,4647 g/mol	358,4712 g/mol
Schmelzpunkt	40°C ^[70]	70°C ^[71]
Siedepunkt	220°C ^[70]	Zersetzung oberhalb 120°C ^[72]
Brechungsindex	α_{20}^D -150,5° (c = 0,53 in CHCl ₃)	α_{24}^D -220,0° (c = 0,75 in CHCl ₃) ^[73, 74]
UV λ_{\max}	λ_{\max} 283 nm (in Ethanol)	λ_{\max} 224 nm, 266 nm, 304 nm (in Methanol) ^[75] λ_{\max} 226 nm, 280 nm, 312 nm (in Cyclohexan) ^[75]
Löslichkeit	2,8 g/l Wasser (bei 23°C) ^[76]	nicht bekannt
pKs	10,6 ^[76, 77]	3,31 ± 0,60 (bei 25°C)
Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient	7,6 ^[76]	nicht bekannt
logP	5,346 ^[78]	5,045 ^[78]

Cannabinoid-Carbonsäuren sind instabile Verbindungen und werden leicht zu den entsprechenden phenolischen Cannabinoiden abgebaut. Während der Lagerung bei Raumtemperatur erfolgt diese Decarboxylierung nur langsam, erhöhte Lagertemperaturen beschleunigen den Abbauprozess dagegen^[29, 44, 75, 79]. Für die thermisch induzierte Freisetzung von Δ 9-THC aus seinem biogenetischen Vorläufer Δ 9-THCA wurde ein Erhitzen auf 200-210°C für 5 Minuten als optimal beschrieben, allerdings sind für diese Umsetzung auch wenige Sekunden in einem brennenden Cannabis-Joint ausreichend^[44, 80]. Darüber hinaus induzieren Lichteinwirkung^[75, 79] sowie alkalische Bedingungen ebenfalls die Decarboxylierung^[44].

Die phenolischen Cannabinoide können ihrerseits oxidativ oder photochemisch weiter abgebaut werden^[29, 44]. Für die Lagerung (dunkel, trocken) von Marihuana über einen Zeitraum von 47 Wochen wurde beschrieben, dass der Δ 9-THC-Gehalt bei einer Lagertemperatur von 5°C um 7 %, bei einer von 20°C dagegen um 13 % abnahm^[44, 81]. Bedeutende Abbauprodukte sind CBN aus Δ 9-THC, CBL aus CBC und CBE aus CBD. Darüber hinaus haben Untersuchungen an Lösungen von Cannabinoid-Reinsubstanzen, Cannabis-Extrakten, getrocknetem Pflanzenmaterial und gepresstem Harz gezeigt, dass die phenolischen Cannabinoide lichtempfindlich sind und ihr Abbau durch die Einwirkung von UV-Licht beschleunigt wird^[29]. Für das halbsynthetische

Δ^9 -THC-Analogon Dronabinol ist ein schneller Abbau unter sauren Bedingungen beschrieben, der durch Wasserstoff-Ionen katalysiert wird und einer Kinetik 1. Ordnung folgt^[77].

1.1.5 Cannabisprodukte

Als Marihuana oder Cannabis-Kraut bezeichnet man die getrockneten, zerkleinerten und von groben Stängelteilen befreiten blühenden Spitzentriebe der weiblichen Pflanzen^[82]. Für die Herstellung von Marihuana werden die Spitzentriebe geerntet, an der Luft getrocknet und anschließend zu kleinen Ballen gepresst^[82]. Gelegentlich erfolgt zusätzlich eine Fermentation durch kontrolliertes Schimmeln. Der Gesamt- Δ^9 -THC-Gehalt von Marihuana variiert mit 1 - 20 % (bezogen auf das getrocknete Pflanzenmaterial) stark^[83] und liegt üblicherweise bei 10 - 20 %.

Als Haschisch oder Cannabis-Harz bezeichnet man das von den Laubblättern und Blütenständen der weiblichen Pflanzen ausgeschiedene Harz^[82]. Die Gewinnung des Harzes erfolgt entweder durch Abreiben oder Ausklopfen^[82]. Beim Abreiben werden die harzreichen Pflanzenteile vorsichtig zwischen den Handflächen gerieben, wobei die Drüsenhaare aufbrechen und das austretende Harz auf den Handflächen kleben bleibt, wo es zu Kugeln geformt wird. Um das Harz auszuklopfen, werden die Blütenstände der geernteten und etwa einen Monat getrockneten Pflanzen über einem Sieb ausgeschüttelt. Dabei fallen die größeren und harzreichen Drüsenhaare als Harzstaub an und werden durch das Sieb von den anderen Pflanzenteilen und dem Samen getrennt. Anschließend wird das Harz zu Haschisch-Platten verpresst. Zur Charakterisierung unterschiedlicher Haschischqualitäten anhand ihrer Farbe sind Bezeichnungen wie „Blonder Marokkaner“, „Grüner Türke“, „Roter Libanese“ und „Schwarzer Afghane“ üblich^[82]. Der Gesamt- Δ^9 -THC-Gehalt variiert mit 1 - 20 % ebenfalls stark^[83] und beträgt in der Regel 5 - 15 %.

Unter Haschisch-Öl versteht man einen sirupartigen Cannabis-Extrakt, der sich mit zunehmendem Alter teerartig verfestigt. Zu seiner Gewinnung wird Marihuana in einem Destillationsapparat erhitzt, wobei das Harz verdampft. Daneben ist auch eine Extraktion von Marihuana mit organischen Lösungsmitteln möglich, welche anschließend durch Destillation entfernt werden. Der Gesamt- Δ^9 -THC-Gehalt von Haschisch-Öl reicht bis 85 %^[82].

1.1.6 Gesetzliche Bestimmungen

In der Bundesrepublik Deutschland (BRD) sowie in den meisten anderen Ländern weltweit ist der Anbau, die Herstellung, der Handel, die Ein- und Ausfuhr, die Abgabe, die Veräußerung, das in Verkehr bringen sowie der Erwerb von Cannabis und seinen Produkten verboten. In der BRD werden Pflanzen, Pflanzenteile und Harz in Anlage I des Gesetzes über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (BtMG) als nicht verkehrsfähige und nicht verschreibungsfähige Betäubungsmittel eingestuft ^[84]. Davon ausgenommen sind die Samen, sofern sie nicht zum unerlaubten Anbau bestimmt sind, die Pflanzen, wenn ihr Gehalt an Δ 9-THC 0,2 % nicht übersteigt und der Verkehr mit ihnen (Ausnahme der Anbau) ausschließlich gewerblichen Zwecken dient, die einen Missbrauch zu Rauschzwecken ausschließen, sie als Schutzstreifen bei der Rübenzüchtung gepflanzt und vor der Blüte vernichtet werden oder ihr Anbau ausschließlich aus zertifiziertem Saatgut erfolgt, bei dessen Sorten der Gehalt an Δ 9-THC von 0,2 % nicht überschritten wird (Nutzhanf). Dronabinol, halbsynthetisch hergestelltes Δ 9-THC, wird dagegen in Anlage III des BtMG als verkehrsfähiges und verschreibungsfähiges Betäubungsmittel geführt, d.h. Dronabinol kann auf Rezept verordnet werden. Da in Deutschland jedoch zurzeit kein entsprechendes Fertigarzneimittel im Handel erhältlich ist, muss dieses entweder aus dem Ausland importiert werden (z.B. Marinol[®] aus den USA) oder eine Apotheke stellt eine Dronabinol-haltige Rezeptur her.

Die Erteilung einer Erlaubnis zum Verkehr mit Pflanzen der Gattung Cannabis sowie Cannabisprodukten ist nur ausnahmsweise zu wissenschaftlichen oder anderen im öffentlichen Interesse liegenden Zwecken möglich. Nach einem Urteil des Bundesverwaltungsgerichts stellt die ausreichende Therapie eines einzelnen Patienten ebenfalls ein Anliegen der Allgemeinheit dar. So wurde im August 2007 erstmals die Erlaubnis für den Bezug eines Cannabis-haltigen Arzneimittels über eine Apotheke erteilt.

Da der Konsum von Cannabis ein erhebliches Gefahrenpotential für die Verkehrssicherheit bedeutet, wurde Cannabis bei der Neuregelung des § 24a Straßenverkehrsgesetz (StVG) in der entsprechenden Anlage berücksichtigt ^[85]. Ordnungswidrig handelt demnach, wer unter Wirkung von Cannabis im Straßenverkehr ein Kraftfahrzeug führt. Eine Wirkung liegt vor, wenn der psychoaktive Hauptwirkstoff Δ 9-THC im Blut nachgewiesen wird. Eine Ordnungswidrigkeit liegt dagegen nicht vor,

wenn der Wirkstoff aus der bestimmungsgemäßen Einnahme eines für einen konkreten Krankheitsfall verschriebenen Arzneimittels herrührt.

Bei der Neuregelung des § 24a StVG ging der Gesetzgeber allerdings davon aus, dass sich Wirkungs- und Nachweisdauer von Δ 9-THC wie bei anderen psychoaktiven Wirkstoffen decken. Da Δ 9-THC jedoch weit über seine Wirkungsdauer hinaus im Blut nachgewiesen werden kann, setzt die aktuelle Rechtsprechung für eine Verurteilung wegen einer Ordnungswidrigkeit nach § 24a StVG mindestens den Nachweis von 1,0 ng/ml Δ 9-THC voraus. Es handelt sich bei diesem Grenzwert jedoch nicht um einen feststehenden Wert, ab dem eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit zu erwarten ist, sondern um einen vom wissenschaftlichen Fortschritt abhängigen, analytischen Grenzwert. Damit ist der festgelegte Grenzwert von 1 ng/ml im Blut eines Betroffenen gemäß geltender Rechtsprechung lediglich als Entscheidungsgrenze anzusehen, ab der ein abstraktes Gefährdungspotential vorliegt.

Eine strafrechtliche Verurteilung nach den §§ 315c und 316 Strafgesetzbuch (StBG) setzt voraus ^[86], dass zusätzlich Cannabis-bedingte Ausfallerscheinungen als Beweis für eine Fahruntüchtigkeit festgestellt wurden, so dass ein sicheres Führen eines Kraftfahrzeugs nicht möglich ist.

1.2 Pharmakokinetik von Δ 9-THC

Da in der pflanzlichen Biogenese Cannabinoid-Carbonsäuren als biogenetische Vorläufer der phenolischen Cannabinoide gebildet werden ^[61], liegen in frischem Pflanzenmaterial mehr als 95 % des verfügbaren Δ 9-THC in Form von Δ 9-THCA-A ^[75, 80] vor. Δ 9-THCA-B, das Strukturisomer von Δ 9-THCA-A mit der Carbonsäure-Gruppe in Position 4, ist dagegen nur in geringen Mengen oder gar nicht vorhanden. Aufgrund der bekannten thermischen Instabilität der Cannabinoid-Carbonsäuren ging man lange davon, dass Δ 9-THCA-A – sofern nicht bereits teilweise durch Temperatur- und UV-Lichteinwirkung während der Lagerung oder durch Fermentationsprozesse abgebaut – aufgrund der starken Hitze einwirkung während des Rauchens oder Backens durch Decarboxylierung vollständig in Δ 9-THC umgewandelt wird. Versuche in einer Rauchapparatur haben jedoch gezeigt, dass entgegen dieser Annahme während des Rauchens nur etwa 30 % der im Pflanzenmaterial enthaltenen Δ 9-THCA-A als Δ 9-THC im Rauch verfügbar werden ^[72]. Ein gewisser Anteil der nicht in Δ 9-THC

umgewandelten Δ 9-THCA-A wird zwar durch Pyrolyse zerstört, der verbleibende Anteil der nicht-decarboxylierten Δ 9-THCA-A steht jedoch zur inhalativen Absorption zur Verfügung.

Während zahlreiche Publikationen zur Absorption und Distribution, zum Metabolismus und zur Elimination des psychoaktiven Hauptwirkstoffs Δ 9-THC, dessen oxidativen Hauptmetaboliten 11-Hydroxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol (11-OH- Δ 9-THC) und 11-Nor-9-Carboxy- Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC-COOH), CBD sowie CBN zur Verfügung stehen und kürzlich in mehreren Reviews zusammengefasst wurden [44, 87, 88], liegen bislang keine publizierten Daten zur Pharmakokinetik von Δ 9-THCA-A vor. Dies ist wahrscheinlich auf die bislang geltende Annahme zurückzuführen, dass Δ 9-THCA-A beim Rauchen nahezu vollständig in Δ 9-THC umgewandelt wird. Auch über die Wirkung von Δ 9-THCA-A ist bisher wenig bekannt, allerdings werden immunmodulatorische Effekte diskutiert [89].

Nachfolgend werden die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter von Δ 9-THC beschrieben. Es wurden keine wesentlichen Unterschiede in der Pharmakokinetik zwischen Männern und Frauen sowie zwischen Gelegenheits- und Dauerkonsumenten festgestellt [44, 87, 88, 90-93].

1.2.1 Absorption

Zu Rauschzwecken erfolgt die Absorption der in Cannabisprodukten enthaltenen Wirkstoffe meistens inhalativ durch Rauchen eines Joints oder einer Wasserpfeife sowie oral in Form von Gebäck. Für therapeutische Anwendungen wurden jedoch auch zahlreiche andere Darreichungsformen und Applikationswege wie Augentropfen für ophthalmische, Extrakte für sublinguale oder Suppositorien für rektale Applikation in Betracht gezogen [94-101].

1.2.1.1 Inhalative Absorption

Für viele Cannabis-Konsumenten ist die inhalative Absorption die bevorzugte Applikationsart, da sie sich durch schnelle Freisetzung und rasches Anfluten des psychoaktiven Hauptwirkstoffs Δ 9-THC auszeichnet [87, 88]. Darüber hinaus ist eine biologische Titration der Dosis und damit eine Steuerung der gewünschten Wirkungsstärke möglich [87, 88].

Bei inhalativer Absorption ist Δ 9-THC innerhalb weniger Sekunden nach Absorptionsbeginn im Plasma nachweisbar und erreicht nach 3 bis 10 Minuten die maximale Plasmakonzentration ^[102-106]. Parallel dazu treten die ersten Cannabis-Effekte auf. Die systemische Bioverfügbarkeit schwankt bei dieser Applikationsform stark und reicht von 2 bis 56 %, wobei die Inhalationstechnik (Zahl, Dauer und Abstand der Inhalationen), -tiefe sowie -dauer großen Einfluss auf die systemische Bioverfügbarkeit nehmen ^[87, 88, 107-109]. So wird für regelmäßige Konsumenten eine systemische Bioverfügbarkeit von 23 ± 16 % bzw. 27 ± 10 % ^[102, 107], für Gelegenheitskonsumenten dagegen nur eine von 10 ± 7 % bzw. 14 ± 1 % berichtet ^[44]. Untersuchungen an Rauchmaschinen haben gezeigt, dass der Δ 9-THC-Gehalt im Hauptstromrauch 16-19 % beträgt und maximal einen Gehalt von 69 % erreichen kann ^[44]. Die verbleibenden 30 % werden vermutlich durch Pyrolyse zerstört. Beim realen Cannabis-Konsum führen eine partielle Zerstörung in der Glut, Verluste über den Nebenstromrauch sowie unvollständige Absorption in der Lunge zu zusätzlichen Verlusten an Δ 9-THC. Durch die Verwendung einer Wasserpfeife kann eine effektivere Absorption erzielt werden, da bei dieser Konsumart weniger Nebenstromrauch entsteht und so ein Δ 9-THC-Gehalt von bis zu 45 % im Hauptstromrauch erreicht wird ^[109].

1.2.1.2 Orale Absorption

Bei oraler Applikation erfolgt die Absorption langsamer und ungleichmäßiger, so dass die maximale Plasmakonzentration erst nach etwa 60 bis 120 Minuten erreicht wird ^[44, 92, 105]. Die systemische Bioverfügbarkeit ist im Vergleich zur inhalativen Applikation deutlich geringer, was einerseits auf einen partiellen Abbau von Δ 9-THC im Magen-Darm-Trakt und andererseits auf einen ausgeprägten First-Pass-Metabolismus in der Leber zurückzuführen ist ^[44]. Der niedrige pH-Wert in Magen und Dünndarm führt teilweise zur Isomerisierung von Δ 9-THC zu Δ 8-THC sowie zur Protonierung des Pyranringes, gefolgt von einem weiteren Abbau ^[77]. In der Literatur wird die systemische Bioverfügbarkeit mit 6 ± 3 % bzw. 7 ± 3 % angegeben ^[44, 105], wobei jedoch starke interindividuelle Schwankungen zu beobachten sind.

1.2.2 Distribution

Aufgrund seiner hohen Lipophilie erfolgt die Verteilung von Δ 9-THC im Körper in mehreren Phasen ^[110]. In der primären Umverteilungsphase findet eine rasche

Umverteilung von $\Delta 9$ -THC aus dem Blut in stark durchblutete Gewebe wie Lunge, Herz, Gehirn und Leber statt. Diese Umverteilung sowie der Metabolismus in der Leber führen zu einem raschen Absinken der $\Delta 9$ -THC-Konzentration im Blut kurz nach dem Ende der Inhalation [44, 87, 88, 111]. Zum Zeitpunkt der maximalen psychoaktiven Wirkung befindet sich jedoch nur etwa 1 % der intravenös verabreichten $\Delta 9$ -THC-Dosis im Gehirn [44, 112]. Es wird angenommen, dass nach intravenöser Applikation innerhalb von sechs Stunden ein Ausgleich der $\Delta 9$ -THC-Konzentrationen zwischen Plasma und Gewebe erreicht wird [44, 91]. In der sekundären Umverteilungsphase erfolgt eine Akkumulation in schwächer durchbluteten Geweben und schließlich im Fettgewebe [44, 113-115]. Das Fettgewebe bildet den Langzeitspeicher für $\Delta 9$ -THC, wobei bereits nach einer Einmaldosis ein Konzentrationsverhältnis von Fettgewebe zu Plasma von bis zu $10^4 : 1$ erreicht wird [44, 116]. Ein beachtlicher Teil wird als Fettsäurekonjugate von $\Delta 9$ -THC und 11-OH- $\Delta 9$ -THC eingelagert [44, 117, 118].

Treibende Kraft dieser Umverteilungsprozesse scheinen allein die physikalisch-chemischen Eigenschaften von $\Delta 9$ -THC zu sein, ohne dass aktive Transportvorgänge oder spezifische Barrieren Einfluss auf die $\Delta 9$ -THC-Konzentration in den Geweben nehmen [44, 119]. Im Blut werden etwa 90 % des $\Delta 9$ -THC im Plasma verteilt, während die übrigen 10 % in die roten Blutkörperchen verteilt werden [44, 120]. Im Plasma wiederum werden 95-99 % des $\Delta 9$ -THC an Plasma-Proteine gebunden, wobei die Bindung hauptsächlich an Lipoproteine und nur in geringerem Ausmaß an Albumin erfolgt [44, 90, 120-122].

Der Plasma-Konzentrations-Zeit-Verlauf wurde mit verschiedenen pharmakokinetischen Modellen beschrieben [44], darunter einfachere Modelle wie offene Zwei- [92, 123], Drei- [124-126] oder Vier-Kompartiment-Modelle [90], aber auch deutlich komplexere Modelle wie Fünf- oder Sechs-Kompartiment-Modelle [119]. Initial ist das Verteilungsvolumen (V_D) mit etwa 2,3-3 l für eine lipophile Substanz wie $\Delta 9$ -THC ungewöhnlich gering und gleich dem Plasmavolumen [44]. Für Gelegenheitskonsumenten wird ein initiales V_D von $2,55 \pm 1,93$ l, für Dauerkonsumenten dagegen eines von $6,38 \pm 4,1$ l beschrieben [44, 90]. Kürzlich wurde das mittlere V_D neu bestimmt und wird nun mit 236 l angegeben [44, 127]. Dieses V_D zeigt, dass der Großteil des aufgenommenen $\Delta 9$ -THC im Gewebe verteilt wird [44].

$\Delta 9$ -THC passiert die Plazenta-Schranke [44, 87, 88, 128]. Dabei ist der Konzentrations-Zeit-Verlauf von $\Delta 9$ -THC im fetalen gleich dem im maternalen Plasma, allerdings werden im fetalen Plasma geringe $\Delta 9$ -THC-Konzentrationen verzeichnet als im maternalen [44, 129,

^{130]}. Aufgrund seiner hohen Lipophilie geht Δ 9-THC außerdem in die Milch über und kann dort bei Dauerkonsum akkumulieren ^[44, 87, 88, 131, 132].

1.2.3 Metabolismus

1.2.3.1 Hepatischer Metabolismus

Der Metabolismus von Δ 9-THC erfolgt hauptsächlich in der Leber durch Hydroxylierung und Oxidation, welche durch Cytochrom P450-(CYP)-Isoenzyme katalysiert werden ^[44, 133, 134]. Zwischen verschiedenen Spezies wurden deutliche Unterschiede im Ausmaß der Bildung bestimmter Metabolite beobachtet, welche auf unterschiedliche Ausstattung mit CYP-Isoenzymen zurückzuführen sind ^[135-145]. Annähernd 100 Δ 9-THC-Metabolite wurden inzwischen identifiziert ^[136], darunter viele monohydroxylierte, aber auch di- und trihydroxylierte Verbindungen, Aldehyde, Ketone sowie Carbonsäuren ^[87, 88, 108]. Beim humanen Metabolismus dominieren Oxidation in Allyl-Position, Epoxidierung, aliphatische Oxidation, Decarboxylierung und Konjugation ^[91].

Beim Menschen wie auch in anderen Spezies wird Δ 9-THC v.a. in Position 11 unter Bildung des psychoaktiven Metaboliten 11-OH- Δ 9-THC hydroxyliert ^[136, 146, 147], daneben erfolgen Hydroxylierungen in Position 8 überwiegend unter Bildung von 8 β -Hydroxy- Δ 9-THC, aber auch von 8 α -Hydroxy- Δ 9-THC. Beide 8-Hydroxy- Δ 9-THC-Metabolite können zum entsprechenden Keton, Δ 9-THC-8-on, weiter oxidiert werden ^[148-150]. Δ 9-THC wird außerdem in Position 9-10 epoxidiert und anschließend mit Glutathion konjugiert ^[134, 151]. Untersuchungen an humanen Lebermikrosomen haben gezeigt, dass CYP2C9 v.a. für die Hydroxylierung in Position 11 verantwortlich zu sein scheint, während CYP3A4 die Bildung von 8 β -Hydroxy- Δ 9-THC, Epoxyhexahydrocannabinol und einigen Nebenmetaboliten katalysiert ^[133, 152, 153]. In Rattenlebermikrosomen hingegen ist bei männlichen Tieren CYP2C11 ^[154], bei weiblichen Tieren CYP2C6 verantwortlich für die Hydroxylierung in Position 11 ^[155, 156]. 11-OH- Δ 9-THC wird, vermutlich katalysiert von einer mikrosomalen Oxygenase, über die Aldehyd-Zwischenstufe 11-Oxo- Δ 9-THC zu Δ 9-THC-COOH oxidiert ^[152] und schließlich als Δ 9-THC-COOH-Glucuronid ausgeschieden ^[157]. Daneben wird 11-OH- Δ 9-THC jedoch auch an Fettsäuren gebunden und stellt als Fettsäurekonjugat eine Speicherform von Δ 9-THC im Körper dar ^[118]. Darüber hinaus wurden weitere Phase I-Metabolite mit Hydroxyl-Gruppen in Position 1' bis 5' der Pentyl-Seitenkette beschrieben, welche über eine β -Oxidation in die

korrespondierenden Carbonsäuren überführt werden ^[151, 158-160]. Δ 9-THC wird jedoch auch direkt glucuronidiert und als Δ 9-THC-Glucuronid im Urin eliminiert ^[108, 161]

Δ 9-THC-COOH, der Hauptmetabolit im Phase I-Metabolismus beim Menschen sowie den meisten anderen Spezies ^[87, 88, 151], wird in Phase II v.a. mit Glucuronsäure konjugiert ^[87, 88]. Daneben schließt der Phase II-Metabolismus auch die Bildung von Sulfaten, Glutathion-, Aminosäure- oder Fettsäure-Konjugaten ein. Die Konjugationsreaktionen erfolgen hauptsächlich an der Carboxyl-Gruppe in Position 11, allerdings ist auch ein Angriff an der phenolischen Hydroxyl-Gruppe möglich. Deshalb ist auch die Bildung von zweifach glucuronidierten Metaboliten denkbar, obwohl dabei eine sterische Hinderung in Betracht kommt.

Die systemische Clearance beträgt bei Gelegenheitskonsumenten ungefähr 36 l/h, bei regelmäßigen Konsumenten dagegen bis zu 60 l/h ^[90]. Damit kommt die systemische Clearance dem Volumen des hepatischen Blutflusses gleich ^[90, 107], so dass die Durchblutung der Leber der limitierende Faktor beim Metabolismus von Δ 9-THC zu sein scheint. Diese hohe systemische Clearance erklärt auch den ausgeprägten First-Pass-Metabolismus von Δ 9-THC bei oraler Absorption, der zur vermehrten Bildung von 11-OH- Δ 9-THC führt ^[44]. Demgegenüber wird bei Inhalation deutlich weniger 11-OH- Δ 9-THC gebildet ^[87, 88, 92], da in der Lunge nur ein geringer Anteil des absorbierten Δ 9-THC präsystemisch metabolisiert wird.

1.2.3.2 Extrahepatischer Metabolismus

Die CYP-Familien 1 bis 4 sind hauptsächlich für den Metabolismus von Xenobiotica verantwortlich und finden sich neben der Leber, auch in geringem Ausmaß in Lunge, Dünndarm, Knochenmark, Mastzellen, Gehirn, Pankreas, Gallenblase, Niere, Haut, Speicheldrüsen und Hoden ^[87, 88, 162]. Im Gehirn weisen insbesondere Hirnstamm, bestehend aus Mesencephalon (Mittelhirn), Pons (Brücke) und Medulla oblongata (verlängertes Rückenmark) sowie Cerebellum (Kleinhirn) eine hohe Dichte an CYP-Isoenzymen auf ^[87, 88, 162]. Deshalb sind neben der Leber, auch andere Gewebe wie Darm, Lunge und Gehirn am Metabolismus von Δ 9-THC beteiligt ^[87, 88, 162-165]. In Lunge und Gehirn werden dabei v.a. monohydroxylierte Δ 9-THC-Metabolite gebildet, wobei die Monohydroxylierung in Position 4 der Pentyl-Seitenkette vorherrscht. Beim Metabolismus im Gastro-Intestinal-Trakt finden dagegen alle Arten von Hydroxylierungen statt.

1.2.4 Elimination

1.2.4.1 Elimination aus dem Plasma

Die Elimination von Δ^9 -THC aus dem Plasma erfolgt nur langsam. So sinkt nach intravenöser Applikation die Δ^9 -THC-Konzentration im Plasma aufgrund der Umverteilung in die Gewebe zwar zunächst rasch, mit zunehmendem zeitlichen Abstand zum Konsum verlangsamt sich die Elimination jedoch ^[44, 103]. Die langsame Elimination aus dem Plasma beruht dabei auf der langsamen Rückdiffusion von Δ^9 -THC aus dem Fettgewebe bzw. anderen Gewebe in das Blut ^[44, 119]. In der Literatur wird die terminale Plasma-Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2\beta}$) von Δ^9 -THC sehr unterschiedlich angegeben, da diese aufgrund des langsamen Ausgleichs zwischen Plasma und Fettgewebe und der daraus resultierenden geringen Plasmakonzentrationen schwierig zu bestimmen ist ^[44]. Wall et al. haben die $t_{1/2\beta}$ von Δ^9 -THC mit 25-36 Stunden bestimmt ^[92]. Dabei wurde allerdings ein Beobachtungszeitraum von 72 Stunden gewählt, der für eine exakte Bestimmung nicht ausreichend ist und dadurch zu einer Unterschätzung der $t_{1/2\beta}$ führt ^[87, 88]. Auch in anderen Studien mit ähnlichen Beobachtungszeiträumen wurden für Δ^9 -THC eine $t_{1/2\beta}$ von 20-30 Stunden ermittelt ^[90, 107, 123]. In einer Studie mit einem Beobachtungszeitraum von 13 Tagen wurde unter Verwendung von deuteriertem Δ^9 -THC dagegen eine $t_{1/2\beta}$ von $98,4 \pm 26,4$ Stunden ermittelt ^[166].

Die Plasma-Eliminationshalbwertszeit der Δ^9 -THC-Metabolite ist länger als die von Δ^9 -THC ^[44]. So wird die mittlere Plasma-Eliminationshalbwertszeit von Δ^9 -THC-COOH für Dauerkonsumenten mit $124,8 \pm 19,2$ Stunden und für Gelegenheitskonsumenten mit $148,8 \pm 160,8$ Stunden angegeben ^[44, 87, 88].

1.2.4.2 Elimination mit Urin und Fäzes

Δ^9 -THC wird kaum unverändert eliminiert, sondern hauptsächlich in Form von Hydroxy- und Carboxy-Metaboliten ^[92, 108, 151], wobei etwa 65-80 % über die Fäzes und etwa 20-35 % im Urin ausgeschieden werden ^[44, 87, 88, 92]. In den Fäzes dominiert 11-OH- Δ^9 -THC ^[87, 88]. Im Urin erfolgt die Elimination von Δ^9 -THC dagegen hauptsächlich als Δ^9 -THC-COOH-Glucuronid ^[157], während die freie Δ^9 -THC-COOH nicht in relevanten Konzentrationen ausgeschieden wird ^[93, 167, 168]. Daneben finden sich im Urin jedoch zahlreiche andere Δ^9 -THC-Metabolite, darunter v.a. Carbonsäuren, welche ebenfalls mit Glucuronsäure konjugiert sind ^[87, 88]. Die Eliminationshalbwertszeit

für $\Delta 9$ -THC-COOH wird in der Literatur in Abhängigkeit vom Beobachtungszeitraum mit 24-72 Stunden angegeben [44, 93, 169, 170]. Die renale Clearance von $\Delta 9$ -THC ist nicht konstant, sondern sinkt ausgehend von einer maximalen Clearance von 20 ml/min mit zunehmendem zeitlichem Abstand zum Konsum bis auf eine Clearance von 1 ml/min [44, 90]. Die hohe Lipophilie von $\Delta 9$ -THC und die dadurch bedingte hohe tubuläre Rückresorptionsrate in der Niere erklären, warum im Urin kaum unverändertes $\Delta 9$ -THC ausgeschieden wird [44, 77].

$\Delta 9$ -THC-Metabolite unterliegen einem ausgeprägten enterohepatischen Kreislauf [44, 92, 171]. Aufgrund dieses enterohepatischen Kreislaufs und der hohen Plasma-Protein-Bindung erfolgt die Elimination von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten hauptsächlich biliär, [44], wobei sie allerdings nur in unkonjugierter Form ausgeschieden werden [92, 172].

1.2.5 Modelle zur Abschätzung des Konsumzeitpunktes und der akuten Wirkung

In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze und Berechnungsmodelle zur Abschätzung des Zeitpunkts des letzten vorangegangenen Cannabis-Konsums, zur Beurteilung des Vorhandenseins einer akuten Cannabis-Wirkung sowie zur Einschätzung des Konsumverhaltens entwickelt.

1.2.5.1 Abschätzung des Zeitpunkts des letzten Cannabis-Konsums

Durch Auswertung der Daten aus klinischen Cannabis-Konsum-Studien wurden zwei mathematische Berechnungsmodelle entwickelt, die es erlauben sollen, anhand einer einzigen Plasmaprobe Aussagen über den Zeitpunkt des letzten Cannabis-Konsums zu treffen [103, 173].

In Modell I wurde zunächst versucht, allein anhand der $\Delta 9$ -THC-Konzentration im Plasma abzuschätzen, wie lange der letzte Cannabis-Konsum zurückliegt. Grundlage für dieses Modell war eine klinische Studie, bei welcher die Probanden unter kontrollierten Bedingungen eine Einmaldosis $\Delta 9$ -THC in Form eines Cannabis-Joints konsumiert hatten. Aus den erhaltenen Daten wurde eine empirische Berechnungsformel abgeleitet und ein Konfidenzintervall definiert, innerhalb dessen die Voraussagen des Modells in 95 % der untersuchten Fälle richtig waren.

Da Modell I jedoch die komplexen Umverteilungsprozesse, denen $\Delta 9$ -THC im Körper unterliegt, nicht angemessen abbilden kann, wurde in Modell II die $\Delta 9$ -THC-COOH-Konzentration im Plasma als zusätzlicher Parameter aufgenommen. Die empirische

Berechnungsformel wurde ebenfalls aus dem Datensatz der oben beschriebenen Studie abgeleitet und wiederum ein 95 % Konfidenzintervall angegeben.

Die Richtigkeit der Voraussagen wurde anhand von Daten aus anderen klinischen Studien überprüft, in dem die ermittelten Cannabinoid-Konzentrationen in die Berechnungsformeln eingesetzt, die Konsumzeitpunkte berechnet und anschließend mit den Daten der Studienprotokolle verglichen wurden. Die Voraussagen der Modelle waren zwar im Allgemeinen korrekt, allerdings wurde der Zeitraum unmittelbar nach dem Konsum überschätzt, während Zeiträume mit deutlichem Abstand zum Konsum unterschätzt wurden. Zusätzlich wurde überprüft, ob die in den Studienprotokollen verzeichneten Konsumzeitpunkte innerhalb der Konfidenzintervalle lagen. Die Voraussagen trafen für etwa 90 % der untersuchten Fälle zu, allerdings war trotz der beachtlichen Breite der Konfidenzintervalle teilweise eine erhebliche Abweichung von den in den Studienprotokollen dokumentierten Konsumzeitpunkten zu verzeichnen.

Diese Beobachtung dürfte hauptsächlich auf die starken interindividuellen Schwankungen in der Pharmakokinetik der Cannabinoide zurückzuführen sein. Darüber hinaus wurden bei dem für die Entwicklung der Berechnungsformeln und dem für die Überprüfung der Modelle herangezogenen Datensatz unterschiedliche Verfahren für Extraktion und Derivatisierung sowie verschiedene Messmethoden verwendet. Neben der Probenlagerung nehmen auch Aufarbeitung und Messmethode entscheidenden Einfluss darauf, in welchem Ausmaß das auch im Plasma in erheblicher Menge vorhandene $\Delta 9$ -THC-COOH-Glucuronid durch artefaktische Freisetzung als freie $\Delta 9$ -THC-COOH miterfasst wird ^[174]. Entscheidend ist jedoch, dass sich die Modelle nicht ohne weiteres auf reale Proben aus forensischen Fällen (Fahren unter dem Einfluss von Cannabis) anwenden lassen, da in vielen dieser Fälle von einem chronischen Konsum auszugehen ist. Chronischer Konsum kann jedoch zur Akkumulation der Cannabinoide und damit zu teilweise erheblichen Abweichungen von den in kontrollierten klinischen Studien erhaltenen Daten führen, so dass $\Delta 9$ -THC-Konzentrationen unter 2 ng/ml im Plasma von den Berechnungen über diese Modelle ausgeschlossen wurden. Allerdings ist gerade dieser Konzentrationsbereich in Straßenverkehrsfällen besonders häufig vertreten.

1.2.5.2 Beurteilung des Vorhandenseins einer akuten Cannabis-Wirkung

Es ist bekannt, dass bei Cannabis-Konsum keine Korrelation zwischen der $\Delta 9$ -THC-Konzentration im Serum und dem Ausmaß der psychotropen Wirkung zu

einem bestimmten Zeitpunkt festgestellt werden kann. Damit scheint bei $\Delta 9$ -THC wie auch bei vielen anderen zentralwirksamen Stoffen die Wirkungsintensität weniger mit der Konzentration im Serum als vielmehr mit der Konzentration am Wirkort, d.h. am entsprechenden Rezeptor zu korrelieren. Diese Annahme wird durch die beschriebenen, komplexen Umverteilungsprozesse von $\Delta 9$ -THC im Körper gestützt, welche zu unterschiedlichen $\Delta 9$ -THC-Konzentrationen im Serum und am Wirkort führen. Bedingt durch Polymorphismen der metabolisierenden Enzyme sowie durch Toleranzentwicklung unterliegt die Wirkungsintensität zudem starken interindividuellen Schwankungen.

Mit dem Cannabis-Influence-Factor (CIF) wurde deshalb versucht, eine rechnerische Größe zu schaffen, welche wesentlich besser mit der $\Delta 9$ -THC-Konzentration am Wirkort und damit mit der Wirkungsintensität korreliert als die reine $\Delta 9$ -THC-Konzentration im Serum ^[175]. Der CIF errechnet sich aus der Summe der molaren Konzentration von $\Delta 9$ -THC und dessen psychoaktivem Metaboliten 11-OH- $\Delta 9$ -THC dividiert durch die molare Konzentration des psychoinaktiven Metaboliten $\Delta 9$ -THC-COOH, multipliziert mit dem Faktor zehn. Es handelt sich um eine ganzzahlige, dimensionslose Größe. Wird ein CIF größer zehn errechnet soll nach Daldrup von einer absoluten Fahruntüchtigkeit ausgegangen werden.

Die Evaluation des CIF als rechnerische Größe zur Beurteilung einer akuten Cannabis-Wirkung und damit einer Fahruntüchtigkeit erfolgte bislang fast ausschließlich anhand von Daten aus forensischen Fällen (Fahren unter dem Einfluss von Cannabis). Aus den ermittelten Cannabinoid-Konzentrationen im Serum wurde der CIF errechnet und mit den in den zugehörigen Untersuchungsprotokollen dokumentierten Ausfallerscheinungen verglichen. Diese sind jedoch nur teilweise objektiv zu überprüfen.

Auch bei diesem Modell erweist sich die fehlende Standardisierung der Cannabinoid-Analytik als problematisch, da $\Delta 9$ -THC-COOH-Glucuronid durch eine methodenabhängige, artefaktische Freisetzung als freie $\Delta 9$ -THC-COOH miterfasst und damit der CIF entscheidend beeinflusst werden kann ^[174]. Konstitutionsbedingt variierende Verteilungsvolumina, interindividuelle Unterschiede im Metabolismus sowie Akkumulation der Cannabinoide bei chronischem Konsum stellen weitere Probleme dar.

1.2.5.3 *Einschätzung des Konsumverhaltens*

Die Einschätzung des Konsumverhaltens, also die Unterscheidung zwischen einmaligem, seltenem bis gelegentlichem oder häufigem bis regelmäßigem Konsum, ist für die Feststellung der Fahreignung von Cannabis-Konsumenten von entscheidender Bedeutung. Während die Führerscheinebehörden in Deutschland bei regelmäßigem Cannabis-Konsum grundsätzlich von einer fehlenden Fahreignung ausgehen, wird bei einmaligen bis gelegentlichem Konsum dagegen vom Entzug der Fahrerlaubnis abgesehen, wenn der Nachweis erbracht wird, dass die Fähigkeit zur Trennung von Cannabis-Konsum und des Führens eines Kraftfahrzeugs vorhanden und auch strikt eingehalten wird. Für die Einschätzung des Konsumverhaltens werden Befunde aus Urin-, Blut- und Haaranalysen herangezogen.

Der Nachweis von Cannabinoiden im Urin erlaubt zwar eine Aussage darüber, ob in den Tagen oder Wochen zuvor ein Cannabis-Konsum stattgefunden hat, allerdings erschwert die lange Eliminationshalbwertszeit von $\Delta 9$ -THC-COOH insbesondere bei regelmäßigem Konsum eine enge zeitliche Eingrenzung des Konsumzeitpunktes und eine Einschätzung des Konsumverhaltens.

Deshalb wurde zur Einschätzung des Konsumverhaltens vorgeschlagen, auf die $\Delta 9$ -THC-COOH-Konzentration im Serum zurückzugreifen ^[176]. Dabei werden die Probanden aufgefordert, sich innerhalb von 5 Werktagen zur Blutentnahme einzufinden und in dieser Einbestellungsfrist auf einen Cannabis-Konsum zu verzichten. Wird für die freie $\Delta 9$ -THC-COOH im Serum eine Konzentration von mehr als 75 ng/ml festgestellt, wird ein regelmäßiger Konsum bzw. ein Kontrollverlust, d.h. die Unfähigkeit zur Abstinenz innerhalb der Einbestellungsfrist, angenommen. Angesichts des vorgeschlagenen „Grenzwertes“ erweist sich auch bei diesem Ansatz die fehlende Standardisierung der Cannabinoid-Analytik aufgrund der methodenabhängigen, partiellen Miterfassung des $\Delta 9$ -THC-COOH-Glucuronid als problematisch ^[174]. Weitere Einflussfaktoren wie interindividuell variierende Unterschiede in pharmakokinetischen Parametern sowie Beeinflussung des Metabolismus aufgrund interindividueller Unterschiede in der Ausstattung der metabolisierenden Enzyme oder Enzyminduktion bzw. –hemmung durch Medikamente bzw. Nahrungsmittelbestandteile wurden bislang ebenfalls nicht berücksichtigt.

Für die Feststellung der Fahreignung von Cannabis-Konsumenten wird seit einigen Jahren auch die Haaranalyse eingesetzt ^[177], da im Rahmen medizinisch-psychologischer Untersuchungen häufig zum Ausschluss eines regelmäßigen Konsums

der Nachweis einer längeren Abstinenz gefordert wird. Zwar ist die Haaranalyse grundsätzlich geeignet, retrospektiv eine Einschätzung des Konsumverhaltens vorzunehmen, allerdings besteht bei der Interpretation der analytischen Befunde die Schwierigkeit, eine externe Kontamination von einer tatsächlichen Einlagerung ins Haar zu unterscheiden ^[178]. In der Regel gelingt im Haar neben $\Delta 9$ -THC nur der Nachweis von CBD und CBN, während $\Delta 9$ -THC-COOH aufgrund ineffektiver Einlagerung auch bei regelmäßigem Konsum nur mit extrem empfindlicher Analytik nachgewiesen werden kann ^[179]. $\Delta 9$ -THC-COOH kann jedoch nur aufgrund eines vorangegangenen Cannabis-Konsums in das Haar gelagert werden, so dass sich über deren Nachweis, ein Cannabis-Konsum sicher von einer externen Kontamination durch Cannabisrauch abgrenzen lässt.

1.3 Instrumenteller Teil

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben den klassischen Analysemethoden wie HPLC-DAD, GC-MS, GC-MS/MS und LC-MS/MS auch neuere Techniken wie LC-MS/MS mit linearer Ionenfalle und LC-QTOF MS eingesetzt. Die klassischen chromatographischen Trennverfahren und Detektionstechniken sind bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben ^[180-182], so dass an dieser Stelle lediglich auf LC-MS/MS mit linearer Ionenfalle sowie LC-QTOF MS eingegangen wird. Im Vergleich zur klassischen Tandemmassenspektrometrie lassen sich durch den Einsatz einer linearen Ionenfalle deutlich geringere Nachweisgrenzen erzielen, so dass sich diese Technik insbesondere für den Nachweis und die Bestimmung niedrig konzentrierter Substanzen eignet. Darüber hinaus haben sich LC-MS/MS und LC-QTOF MS im Bereich der Wirkstoffforschung und der die Wirkstoffentwicklung begleitenden Metabolismusforschung als Technik der Wahl etabliert hat.

1.3.1 LC-MS/MS mit linearer Ionenfalle

Wie die klassischen Tandemmassenspektrometer sind die Tandemmassenspektrometer mit linearer Ionenfalle aus drei Quadrupolen aufgebaut, wobei die Quadrupole 1 (Q1) und 3 (Q3) als Massenanalysatoren fungieren, während der Quadrupol 2 als Kollisionszelle dient. Diese Geräte bieten den Vorteil, dass der Q3 sowohl als klassischer Quadrupol als auch als lineare Ionenfalle genutzt werden kann.

Bei Verwendung als Ionenfalle werden die aus der Kollisionszelle stammenden Ionen im Q3 über einen zuvor definierten (fixed fill time) oder automatisch an den Ionenstrom angepassten (dynamic fill time) Zeitraum eingefangen. Anschließend werden die Ionen sequentiell nach ihrem Masse-Ladungs-(m/z)-Verhältnis aus der Ionenfalle Richtung Detektor beschleunigt und detektiert.

Das für die vorliegende Arbeit eingesetzte QTrap MS/MS (Applied Biosystems/Sciex, Darmstadt, Deutschland) verfügt bei Verwendung des Q3 als Quadrupol mit Q1-Scan, Q1-Selected-Ion-Monitoring (SIM), Product-Ion-Scan (PIS), Precursor-Ion-Scan, Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) und Neutral Loss über alle Messmodi eines klassischen Tandemmassenspektrometers. Wird der Q3 als lineare Ionenfalle genutzt, stehen zusätzlich folgende Messmodi zur Verfügung:

- Enhanced-MS-Scan (EMS)
- Enhanced-Multiply-Charged-Scan
- Enhanced-Resolution
- Enhanced-Product-Ion-Scan (EPI)
- MS/MS/MS-Scan
- Time-Delayed-Fragmentation-Scan
- Ion-Trap-MS/MS-Scan.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Messmodi Q1-Scan, EMS, PIS, EPI, Precursor-Ion-Scan und MRM eingesetzt, welche nachfolgend erläutert werden.

Im Q1-Scan-Modus wird ein definierter m/z-Bereich kontinuierlich von einem Start-m/z bis zu einem End-m/z gescannt und alle in der Ionenquelle gebildeten Ionen in diesem Bereich werden detektiert.

Wie im Q1-Scan-Modus werden auch im EMS-Modus alle Ionen in einem definierten m/z-Bereich detektiert. Alle in der Ionenquelle gebildeten Ionen passieren Q1 und Kollisionszelle (RF-only-Modus) und werden in der Ionenfalle eingefangen. Sobald die Ionenfalle gefüllt ist, werden die Ionen ausgelesen und detektiert.

Beim PIS-Modus wird im Q1 ein Precursor-Ion mit definierten m/z-Verhältnis selektiert und dieses in der Kollisionszelle zu charakteristischen Produkt-Ionen fragmentiert. Diese werden anschließend im Q3 ausgelesen und detektiert. Als Precursor-Ionen werden dabei häufig die deprotonierten ($[M-H]^-$ bei negativer Ionisierung) oder protonierten Molekülonen ($[M+H]^+$ bei positiver Ionisierung) Molekülonen herangezogen.

Der EPI-Modus arbeitet nach dem gleichen Prinzip wie der PIS-Modus, allerdings werden die in der Kollisionszelle entstehenden Produkt-Ionen zunächst in der Ionenfalle eingefangen und nacheinander ausgelesen.

Für einen Precursor-Ion-Scan wird im Quadrupol 3 das m/z -Verhältnis eines Produkt-Ions mit definiertem m/z -Verhältnis vorgegeben. Wird dieses Produkt-Ion detektiert, erfolgt im scannenden Q1 eine Zuordnung zu einem Precursor-Ion, aus dem durch Fragmentierung in der Kollisionszelle das Produkt-Ion entstanden ist.

Das Multiple-Reaction-Monitoring (MRM-Modus) ist der empfindlichste und selektivste Messmodus in der Tandemmassenspektrometrie. Im Q1 wird das gewünschte Precursor-Ion selektiert, in der Kollisionszelle fragmentiert und anschließend wiederum ausgewählte Produkt-Ionen im Q3 selektiert und detektiert. Die Fragmentierung eines Precursor-Ions zu einem charakteristischen Produkt-Ion wird als Übergang bezeichnet.

1.3.2 LC-QTOF MS

Bei einem Flugzeitmassenspektrometer (TOF) erfolgt die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit, die zwischen dem Start der Ionen bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Die Ionen werden am Ausgang des Quadrupols durch ein elektrostatisches Feld auf eine definierte kinetische Energie beschleunigt und durchlaufen anschließend eine feldfreie Drift-Strecke, in der sie nach ihrem m/z -Verhältnis aufgetrennt werden. Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen werden bei gleicher kinetischer Energie auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Deshalb lässt sich bei bekannter Beschleunigungsspannung und Flugstrecke der Ionen in der feldfreien Drift-Strecke durch die Messung der Flugzeit das m/z -Verhältnis bestimmen. Dabei ist das m/z -Verhältnis proportional zum Quadrat der Flugzeit, so dass sich die jeweilige Masse aus der gemessenen Flugzeit ermitteln lässt. Die Kalibrierung erfolgt über Referenzsubstanzen mit bekannten Massen.

Für die Identifizierung von Substanzen wie beispielsweise Metaboliten wird zunächst die Molekülmasse der erwarteten Summenformel aus dem Totalionenstrom extrahiert. Diese wird anschließend einerseits über die Abweichung der Masse, angegeben als Fehler in ppm, und andererseits über den Sigma Fit, d.h. die Übereinstimmung zwischen theoretischem und gemessenem Isotopenverhältnis, bestätigt.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung potentieller neuer Cannabis-Konsum-Marker, welche die in der forensischen Praxis bislang zur Anwendung kommenden Ansätze und Berechnungsmodelle zur Abschätzung des Zeitpunkts des letzten Cannabis-Konsums, zur Beurteilung einer akuten Cannabis-Wirkung sowie zur Einschätzung des Konsumverhaltens sinnvoll erweitern können.

1. Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten (Marihuana und Haschisch) auf quantitativ relevante Cannabinoide und Cannabinoid-Abbauprodukte, welche für eine Absorption in der Lunge zur Verfügung stehen.

Aus diesen ersten Versuchen kristallisierte sich $\Delta 9$ -THCA-A als Zielsubstanz heraus. Deshalb wurden weitere Schritte zur Charakterisierung dieses potentiellen Cannabis-Konsum-Markers verfolgt:

2. Screening von Serum- und Urinproben auf den potentiellen Cannabis-Konsum-Marker $\Delta 9$ -THCA-A,
3. Entwicklung einer geeigneten chromatographischen Messmethode zur Quantifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A in Körperflüssigkeiten,
4. Entwicklung einer einfachen und kostengünstigen Methode zur Isolierung größerer Mengen $\Delta 9$ -THCA-A aus Pflanzenmaterial für weitere Studien,
5. Pilotstudien zum Metabolismus von $\Delta 9$ -THCA-A: Strukturaufklärung von $\Delta 9$ -THCA-A-Metaboliten in Rattenurin und Humanurin sowie Vergleich des *in-vivo*-Metabolismus beider Spezies,
6. Pilotstudie zur Elimination des potentiellen Cannabis-Konsum-Markers $\Delta 9$ -THCA-A und dessen Metaboliten in Humanurin nach oraler Aufnahme von $\Delta 9$ -THCA-A.

2 EXPERIMENTELLER TEIL

2.1 Materialien

2.1.1 Referenzstandards

Tab. 2.1 Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Referenzstandards.

Substanz	Menge bzw. Konzentration	Hersteller	verwendet für Kapitel
$\Delta 9$ -THCA-A	1 mg (kalibriert)	Lipomed (Bad Säckingen, Deutschland)	2.4.2.1, 2.4.2.2
$\Delta 9$ -THCA-A	10 mg (nicht kalibriert)	Lipomed (Bad Säckingen, Deutschland)	2.4.2.3, 2.4.3.2
$\Delta 9$ -THCA-A		isoliert	2.4.4.1, 2.4.4.2, 2.4.4.3, 2.4.5.1
(-)- $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol ($\Delta 9$ -THC)	1 mg/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.2, 2.4.2.3, 2.4.3.2
(-)- $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol- D_3 ($\Delta 9$ -THC- D_3)	100 μ g/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.2, 2.4.2.3, 2.4.4.1, 2.4.4.2, 2.4.5.1
(\pm)-11-Hydroxy- $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol (11-OH- $\Delta 9$ -THC)	100 μ g/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.2, 2.4.2.3
(\pm)-11-Hydroxy- $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol- D_3 (11-OH- $\Delta 9$ -THC- D_3)	100 μ g/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.2, 2.4.2.3, 2.4.4.1, 2.4.4.2, 2.4.5.1
(-)-11-Nor-9-Carboxy- $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol ($\Delta 9$ -THC-COOH)	1 mg/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.3
(\pm)-11-Nor-9-Carboxy- $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol- D_3 ($\Delta 9$ -THC-COOH- D_3)	1 mg/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.1
$\Delta 9$ -THC-COOH	100 μ g/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.2
$\Delta 9$ -THC-COOH- D_3	100 μ g/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.2, 2.4.2.3, 2.4.4.1, 2.4.4.2, 2.4.4.3, 2.4.5.1, 2.4.5.2
CBD	1 mg/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.3
CBN	1 mg/ml (in Methanol)	Promochem (Wesel, Deutschland)	2.4.2.3

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.2 Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Substanz bzw. Reagenz	Reinheit	Hersteller
Aceton	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acetonitril	gradient grade für LC	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Aktivkohle	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ameisensäure, 98-100 %	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumacetat	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cer(VI)sulfat-Tetrahydrat	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Cyclohexan	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure, 96 %	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäureethylester, wasserfrei	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, 96 %	gradient grade für LC	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Iodmethan	zur Synthese	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Isocitrat-Kalium	purum, ≥98,0 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Isocitrat-Dehydrogenase	löslich	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Isooctan	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Isopropanol	gradient grade für LC	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumcarbonat	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumfluorid	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol	gradient grade für LC	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Dinatrium (NADP ⁺)	>97%	Biomol (Hamburg, Deutschland)
Natriumacetat, wasserfrei	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid-Plätzchen	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumsulfat, wasserfrei	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
N-Methyl-N-(Trimethylsilyl)-Trifluoracetamid (MSTFA)	für GC	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
MSTFA	puriss. p.a., für GC, ≥98,5 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Salzsäure, rauchend, 37 %	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Schwefelsäure, 95-97 %	zur Analyse, Reag. Ph Eur	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Superoxiddismutase	2000 – 10000 U/mg (aus Rindererythrozyten)	Fluka (Steinheim, Deutschland)
<i>tert.</i> -Butyl-Methyl-Ether (TBME)	zur Analyse	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tetramethylammoniumhydroxid-Pentahydrat (TMAH)	>97 %	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β -D-Glucuronidase/ Arylsulfatase aus <i>Helix pomatia</i>	40 U/ml (β -D-Glucuronidase) 20 U/ml (Arylsulfatase)	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Tab. 2.2 (Fortsetzung).

Deionisiertes Wasser wurde mittels einer Kartuschen-Deionisierungsanlage von Memtech (Moorenweis, Deutschland) hergestellt.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.3 Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Festphasenextraktionssäulen (SPE-Säulen) Chromabond C ₁₈ , 3 ml, 500 mg	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Kieselgel 60 (40-63 μ m)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Dünnschichtplatten auf Aluminium Kieselgel 60 F ₂₅₄ (20 x 20 cm, 0,25 mm)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.2 Geräte

Tab. 2.4 Im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Analysegeräte.

Gerät	Bestandteil	Hersteller	verwendet für Kapitel
GC-MS	7683 B Series Injektor	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	2.3.1
	6890 N Series GC System	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	5973 Inert Massenspektrometer	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	Chem Station Software G1701DA (Version D.02.00.237)	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
GC-MS	Combi Pal Probengeber	CTC Analytics (Zwingen, Schweiz)	2.3.2.2
	6890 N Series GC System	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	5973 Massenspektrometer	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	Chem Station Software G1701DA (Version D.00.00.38)	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
GC-MS	7683 B Series Injektor	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	2.3.3.1.3, 2.3.3.2.2, 2.3.4
	6890 N Series GC System	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	5973 Massenspektrometer	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	Chem Station Software G1701GA (Version D.03.00.611)	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
GC-MS/MS	Combi Pal Probengeber	CTC Analytics (Zwingen, Schweiz)	2.3.2.3
	6890 N Series GC System	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	Evolution Triple-Quadrupol- Massenspektrometer (basierend auf einem Agilent 5973 Inert Massenspektrometer)	Chromtech (Idstein, Deutschland)	
	Chem Station Software G1701GA (Version D.03.00.611)	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	

Gerät	Bestandteil	Hersteller	verwendet in Kapitel
LC-MS/MS	HTC PAL Flüssigprobengeber	CTC Analytics (Zwingen, Schweiz)	2.3.2.1
	SCL-10A Systemsteuerung	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	
	CTO-10AC Säulenofen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	
	3 LC-10AD VP HPLC-Pumpen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	
	ERC 3415α Degasser	ERC GmbH (Riemerling, Deutschland)	
	API 365 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit TurbolonSpray Ionenquelle	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)	
	Analyst Software (Version 1.3.1)	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)	
LC-MS/MS	1100 Series G1313A Probengeber	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	2.3.3.2.1
	Säulenofen	Knaur (Berlin, Deutschland)	
	1100 Series G1312A binäre Pumpe	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	1100 Series G1310A isokratische Pumpe	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	1100 Series G1379A Degasser	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	QTrap 2000 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit TurbolonSpray Ionenquelle	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)	
	Analyst Software (Version 1.4.1)	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)	
LC-MS/MS	SIL-20AC <i>prominence</i> Probengeber	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	2.3.3.1.1
	CBM-20A Systemsteuerung	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	
	CTO-20AC <i>prominence</i> Säulenofen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	
	DGM-20A3 <i>prominence</i> Degasser	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	
	2 LC-20AD SP <i>prominence</i> LC-Pumpen	Shimadzu GmbH (Duisburg, Deutschland)	
	QTrap 3200 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit TurbolonSpray Ionenquelle	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)	
	Analyst Software (Version 1.4.2)	Applied Biosystems/Sciex (Darmstadt, Deutschland)	

Tab. 2.4 (Fortsetzung).

Gerät	Bestandteil	Hersteller	verwendet in Kapitel
LC-QTOF MS	UltiMate 3000 Probengeber	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)	2.3.3.1.2
	UltiMate 3100 Säulenofen	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)	
	2 UltiMate 3000 analytische Pumpen	Dionex Corporation (Sunnyvale, USA)	
	micrOTOFQ	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)	
	DataAnalysis Software (Version 3.4)	Bruker Daltonics (Bremen, Deutschland)	
HPLC-DAD	1050 Series Injektor	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	3.3.2
	1200 Series präparative Pumpe	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	1100 Serie Dioden-Array-Detektor	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	
	Chem Station Software B.02.01-SR2	Agilent (Waldbronn, Deutschland)	

Tab. 2.4 (Fortsetzung).

2.3 Methoden

2.3.1 Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten

Die GC-Bedingungen waren wie folgt: Injektionsmodus, splitlos; Injektortemperatur, 250°C; Kapillarsäule, HP-5-MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke) (Agilent, Waldbronn, Deutschland); Trägergas, Helium; Flussrate, 1,0 ml/min; Ofentemperatur, 100°C für 3,0 min, auf 310°C mit 30°C/min, 310°C für 10,0 min.

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Kapillareinlass, 280°C; Ionenquellentemperatur, 230°C; Elektronenstoß-Ionisation (EI); Ionisierungsenergie, 70 eV, Full-Scan-Modus; solvent delay, 3,0 min; Scan-Bereich m/z 50-550 u. Für die Differenz zur Autotune-Spannung (Δ EMV) wurden +200 V eingestellt.

2.3.2 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Körperflüssigkeiten

2.3.2.1 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Serum und Urin mittels LC-MS/MS

Die LC-Bedingungen waren wie folgt: Ofentemperatur, 40°C; Trennsäule, Luna[®] Phenylhexyl (50 mm x 2 mm, 3 μ m); Vorsäule, Phenylpropyl (4 x 2 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA); Laufmittel A, 5 mM Ammoniumacetat pH 6,5; Laufmittel B, Acetonitril; Gesamtflussrate, 0,25 ml/min; Laufmittelgradient: 0,0-1,0 min, 30 % B; 1,0-4,0 min linear von 30 % auf 90 % B; 4,0-5,0 min, 90 % B; 5,0-6,0 min linear von 90 % auf 30 % B; 6,0-10,0 min, 30 % B. Mittels eines Schaltventils (Rheodyne, Bensheim, Deutschland) wurde das LC-Eluat nur zwischen 1,0 min und 5,0 min der chromatographischen Retentionszeit dem MS zugeführt. Post-Column, Isopropanol; Gesamtflussrate, 0,4 ml/min.

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Nebulizer-Gas, Stickstoff (10 psi; 68,9 kPa); Curtain-Gas, Stickstoff (11 psi; 75,8 kPa); Ionenquellentemperatur, 350°C.

Q1-Scan-Modus, negativ: Elektrospray-Ionisation (ESI), negativ; Ionisierungsspannung, -4200 V; Scan-Bereich, m/z 30-700 u; Declustering Potential (DP), -20, -50 und -80 V; Focusing Potential (FP), -200 V; Entrance Potential (EP), -7 V; Auflösung Q1, Unit.

Q1-Scan-Modus, positiv: ESI, positiv; Ionisierungsspannung, 5250 V; Scan-Bereich, m/z 30-700 u; DP, 20, 50 und 80 V; FP, 200 V; EP, 7 V; Auflösung Q1, Unit.

Product-Ion-Scan-(PIS)-Modus: ESI, negativ; Ionisierungsspannung, -4200 V; Kollisionsgas, Stickstoff (4 psi; 27,6 kPa), Scan-Bereich, m/z 33-400 u; DP, -20 V; FP, -230 V; EP, -10 V; Cell Entrance Potential (CEP), -10 V; Kollisionsenergie (CE), -20, -35 und 50 eV; Cell Exit Potential (CXP), -15 V; Auflösung Q1 und Q3, Unit.

Multiple-Reaction-Monitoring-(MRM)-Modus: ESI, negativ; Ionisierungsspannung, -4200 V; Kollisionsgas, Stickstoff (4 psi; 27,6 kPa); DP, -20 V; FP, -230 eV; EP, -10 V; CXP, -15 V; Auflösung Q1 und Q3, Unit; dwell time, 50 ms. Die für die Cannabinoide ausgewählten MRM-Übergänge und Kollisionsenergien sind in Tab. 2.5 zusammengefasst.

Tab. 2.5 Analyten, MRM-Übergänge (Target, t) und Kollisionsenergien der LC-MS/MS-Methode.

Analyt	MRM-Übergänge [u]	Kollisionsenergie [eV]
Δ^9 -THC-COOH- D_3	346-302	-20
Δ^9 -THC-COOH	343-299 (t)	-20
	343-245	-35
	343-191	-35
Δ^9 -THCA-A	357-313 (t)	-35
	357-245	-50
	357-191	-50
11-OH- Δ^9 -THC- D_3	332-314	-20
11-OH- Δ^9 -THC	329-311 (t)	-20
	329-268	-35
	329-173	-35
Δ^9 -THC- D_3	316-248	-35
Δ^9 -THC	313-313 (t)	-20
	313-245	-35
	313-203	-50

2.3.2.2 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Serum mittels GC-MS

Die GC-Bedingungen waren wie folgt: Injektionsmodus, splitlos; Injektortemperatur, 250°C; Kapillarsäule, Optima-5-MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μ m Filmdicke) (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland); Trägergas, Helium; Flussrate, 1,0 ml/min; Ofentemperatur, 140°C für 3,0 min, auf 200°C mit 30°C/min, auf 210°C mit 5°C/min, auf 240°C mit 2°C/min, auf 310°C mit 30°C/min, 310°C für 4,0 min.

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Kapillareinlass, 280°C; Ionenquellentemperatur, 230°C; EI; Ionisierungsenergie, 70 eV; Δ EMV, +200V. Nach 25,5 min wurde der Detektor ausgeschaltet.

Full-Scan-Modus: Solvent delay, 16,5 min; Scan-Bereich m/z 50-550 u.
 Selected-Ion-Monitoring-(SIM)-Modus: Solvent delay, 16,5 min. Die Retentionszeitfenster und SIM-Ionen sind in Tab. 2.6 zusammengefasst.

Tab. 2.6 Analyten, Retentionszeitfenster und SIM-Ionen (Target-Ion, t) der GC-MS-Methode.

Analyt	Zeitfenster	Zeit [min]	SIM-Ionen [u]
CBD	I	16,50-17,20	301,2 390,3 (t) 458,4
Δ^9 -THC- D_3	II	17,20-18,30	306,2 374,3 389,3 (t)
Δ^9 -THC	II	17,20-18,30	303,2 371,3 386,3 (t)
CBN	III	18,30-23,10	310,2 367,3 (t) 382,3
11-OH- Δ^9 -THC- D_3	IV	23,10-23,65	374,3 (t) 462,4 477,4
11-OH- Δ^9 -THC	IV	23,10-23,65	371,3 (t) 459,4 474,4
Δ^9 -THCA-A	V	23,65-24,30	487,4 (t) 488,3 489,4
Δ^9 -THC-COOH- D_3	VI	24,30-25,50	374,3 (t) 476,3 491,3
Δ^9 -THC-COOH	VI	24,30-25,50	371,3 (t) 473,3 488,3

2.3.2.3 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A und weiteren Cannabinoiden in Serum mittels GC-MS/MS

Die GC-Bedingungen waren wie folgt: Injektionsmodus, gepulst splitlos; Injektortemperatur, 250°C; Kapillarsäule, HP-5-MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μ m Filmdicke) (Agilent, Waldbronn, Deutschland); Trägergas, Helium; Flussrate, 1,0 ml/min; Ofentemperatur, 140°C für 1,0 min, auf 310°C mit 30°C/min, 310°C für 3,0 min.

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Kapillareinlass, 280°C; Ionenquellentemperatur, 230°C; EI; Ionisierungsenergie, 70 eV; Kollisionsgas, Argon; Auflösung Q1 und Q3, 1,5. PIS-Modus: Solvent delay, 5,0 min; Scan-Bereich, m/z 50-500 u; CE, -12 eV; Δ EMV, +1000°V. MRM-Modus: Solvent delay, 6,0 min, Die Retentionszeitfenster, MRM-Übergänge, Kollisionsenergien und Δ EMV sind in Tab. 2.7 zusammengefasst.

Tab. 2.7 Analyten, Retentionszeitfenster, MRM-Übergänge (Target, t), Kollisionsenergien und Δ EMV der GC-MS/MS-Methode.

Analyt	Zeitfenster	Zeit	MRM-Übergänge [u]	Kollisionsenergie [eV]	Δ EMV [V]
CBD	I	6,00-6,70	390-301 (t)	-9	+847
			390-319	-12	
			390-231	-12	
Δ 9-THC- D_3	II	6,70-6,95	389-374 (t)	-9	+1000
			374-292	-12	
			389-306	-15	
Δ 9-THC	II	6,70-6,95	386-371 (t)	-9	+1000
			371-289	-12	
			386-303	-15	
CBN	III	6,95-7,58	367-310 (t)	-12	+647
			382-367	-12	
			367-295	-12	
11-OH- Δ 9-THC- D_3	IV	7,58-7,75	374-292 (t)	-12	+1000
			374-308	-9	
			374-268	-12	
11-OH- Δ 9-THC	IV	7,58-7,75	371-289 (t)	-12	+1000
			371-305	-9	
			371-265	-12	
Δ 9-THCA-A	V	7,75-8,00	487-365 (t)	-12	+1000
			487-407	-12	
			487-379	-12	
Δ 9-THC-COOH- D_3	VI	8,00-9,67	476-358 (t)	-12	+847
			374-292	-12	
			374-268	-9	
Δ 9-THC-COOH	VI	8,00-9,67	473-355 (t)	-12	+847
			371-289	-12	
			371-265	-9	

2.3.3 Studien zum Metabolismus von Δ 9-THCA-A

2.3.3.1 Studie zum Metabolismus von Δ 9-THCA-A an Ratten

2.3.3.1.1 Identifizierung von Δ 9-THCA-A-Metaboliten in Rattenurin mittels LC-MS/MS

Die LC-Bedingungen waren wie folgt: Ofentemperatur, 40°C; Trennsäule, Luna Phenylhexyl (50 mm x 2 mm, 5 μ m); Vorsäule, Phenylpropyl (4 x 2 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA); Laufmittel A, 5 mM Ammoniumacetat pH 6,5; Laufmittel B, Acetonitril; Gesamtflussrate, 0,2 ml/min; Laufmittelgradient: 0,0-3,0 min, 10 % B; 3,0-20,0 min linear von 10 % auf 70 % B; 20,0-21,0 min linear von 70 % auf 95 % B; 21,0-23,0 min, 95 % B; 23,0-25,0 min linear von 95 % auf 10 % B; 25,0-30,0 min, 10 % B. Mittels eines Schaltventils (Rheodyne, Bensheim, Deutschland) wurde das

LC-Eluat nur zwischen 5,0 min und 21,0 min der chromatographischen Retentionszeit dem MS zugeführt.

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: ESI, negativ; Curtain-Gas, Stickstoff (10 psi; 68,9 kPa); Collision Activated Dissociation (CAD), High; Ionisierungsspannung, -4500 V; Ionenquellentemperatur, 400°C; Gas 1, Stickstoff (40 psi; 275,8 kPa); Gas 2, Stickstoff (70 psi; 482,6 kPa).

Q1-Scan-Modus: Scan-Bereich, m/z 50-600 u; DP, -30, -90 und -130 V; EP, -10 V; Auflösung Q1, Unit.

Enhanced-MS-Scan-(EMS)-Modus: Scan-Bereich, m/z 50-600 u; DP, -30, -90 und -130 V; EP, -10 V; CE, -10 eV; Füllzeit der Ionenfalle, dynamisch; Scan-Rate, 4000 u/s.

Precursor-Ion-Scan-Modus: Δ 9-THCA-A-Glucuronid, Precursor von m/z 357 u; 11-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid, Precursor von m/z 373 u; Δ 9-THCA-A-8-on-Glucuronid, Precursor von m/z 371 u; Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid, Precursor von m/z 387 u; 8 α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid bzw. 8 β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid, Precursor von m/z 389 u; Scan-Bereich, m/z 345-745 u; DP, -30 V; EP, -10 V; CE, -50 eV; CXP, -1; Auflösung Q1 und Q3, Unit.

Enhanced-Product-Ion-Scan-(EPI)-Modus: Scan-Bereich, m/z 50-400 u (für die Aglyka, mit Ausnahme von m/z 403 u: m/z 50-410 u) bzw. m/z 50-600 u (für die Glucuronide); DP, -90 V (für die Aglyka), -30 V (für die Glucuronide); EP, -10 V; CE, -20, -35 und -50 eV; Füllzeit der Ionenfalle, dynamisch; Scan-Rate, 4000 u/s; Auflösung Q1, Unit.

MRM-Modus: DP, -30 V; EP, -10 V; CXP, -3 V; CAD, Medium; Auflösung Q1, Unit; Auflösung Q3, Low; dwell time, 25 ms. Die MRM-Übergänge und Kollisionsenergien sind in Tab. 2.8 zusammengefasst.

Die beschriebene EMS-Methode wurde auch für die Identifizierung von Δ 9-THCA-A-Metaboliten nach Inkubation von Δ 9-THCA-A mit Rattenlebermikrosomen (Kapitel 3.4.4) eingesetzt.

2.3.3.1.2 Identifizierung von Δ 9-THCA-A-Metaboliten in Rattenurin mittels LC-QTOF MS

Die LC-Bedingungen entsprachen den unter 2.3.3.1.1 beschriebenen LC-Bedingungen, allerdings wurde kein Schaltventil verwendet. Die MS-Bedingungen waren wie folgt: ESI, negativ; Ionisierungsspannung, -4500 V; RF-only-Modus; Ionentransfer-Optimierung, Natriumacetat-Cluster (5mM Natronlauge in 0,2 %iger Essigsäure in Isopropanol : Wasser, 1 : 1, V : V).

Diese Methode wurde auch für die Identifizierung von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten in Humanurin (Kapitel 3.4.2.1) eingesetzt.

Tab. 2.8 Δ^9 -THCA-A und Metabolite, MRM-Übergänge (* Übergang anhand des Fragmentierungsmusters des Aglykons berechnet) und Kollisionsenergien der MRM-Methode

Δ^9 -THCA-A bzw. Metabolit	MRM-Übergänge [u]	Kollisionsenergie [eV]
Δ^9 -THCA-A	357,2-313,2	-35
	357,2-245,2	-50
	357,2-191,1	-50
Δ^9 -THCA-A-Glucuronid	533,2-357,2	-35
	533,2-313,2	-50
	533,2-245,2*	-50
11-OH- Δ^9 -THCA-A	373,2-311,2	-35
	373,2-268,2	-50
	373,2-173,1	-50
11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid	549,2-373,2	-35
	549,2-311,2	-50
	549,2-268,2*	-50
8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A	389,2-327,2	-35
	389,2-309,2	-50
	389,2-269,2	-50
8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid	565,2-389,2	-35
	565,2-327,2*	-50
	565,2-309,2*	-50
Δ^9 -THCA-A-8-on	371,2-327,2	-35
	371,2-284,2	-35
	371,2-189,1	-50
Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid	547,2-371,2	-35
	547,2-327,2	-50
	547,2-284,2	-50
Δ^9 -THCA-A-COOH	387,2-299,2	-35
	387,2-245,2	-50
	387,2-191,1	-50
Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid	563,2-387,2	-35
	563,2-299,2	-50
	563,2-245,2	-50
Δ^9 -THC-COOH- D_3	346,2-302,2	-35

2.3.3.1.3 Identifizierung von Δ^9 -THC und dessen Metaboliten in Rattenurin mittels GC-MS

Die GC-Bedingungen waren wie folgt: Injektionsmodus, splitlos; Injektortemperatur, 250°C; Kapillarsäule, Optima-5-MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μ m Filmdicke) (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland); Trägergas, Helium; Flussrate, 1,5 ml/min;

Ofentemperatur, 140°C für 2,0 min, auf 200°C mit 60°C/min, auf 230°C mit 2,5°C/min, auf 310°C mit 60°C/min, 310°C für 3,0 min.

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Kapillareinlass, 280°C; Ionenquellentemperatur, 230°C; EI; Ionisierungsenergie, 70 eV; SIM-Modus; solvent delay, 12,0 min, Δ EMV, +200 V. Die Retentionszeitfenster und SIM-Ionen sind in Tab. 2.9 zusammengefasst.

Tab. 2.9 Analyten, Retentionszeitfenster und SIM-Ionen (Target-Ion, t) der GC-MS-Methode.

Analyt	Zeitfenster	Zeit [min]	SIM-Ionen [u]
Δ 9-THC- D_3	I	12,0-16,0	306,2 374,3 389,3 (t)
Δ 9-THC	I	12,0-16,0	303,2 371,3 386,3 (t)
11-OH- Δ 9-THC- D_3	II	16,0-17,0	374,3 (t) 462,4 477,4
11-OH- Δ 9-THC	II	16,0-17,0	371,3 (t) 459,4 474,4
Δ 9-THC-COOH- D_3	III	17,0-18,0	374,3 (t) 476,3 491,3
Δ 9-THC-COOH	III	17,0-18,0	371,3 (t) 473,3 488,3

2.3.3.2 Studie zum humanen Metabolismus von Δ 9-THCA-A

2.3.3.2.1 Identifizierung von Δ 9-THCA-A-Metaboliten in Humanurin mittels LC-MS/MS

Die LC-Bedingungen entsprachen den unter 2.3.3.1.1 beschriebenen LC-Bedingungen, wobei post-column Isopropanol (Gesamtflussrate, 0,2 ml/min) zugegeben wurde.

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: ESI, negativ; Curtain-Gas, Stickstoff (20 psi; 137,9 kPa); Ionisierungsspannung, -4200 V; Ionenquellentemperatur, 400°C; Gas 1, Stickstoff (40 psi; 275,8 kPa); Gas 2, Stickstoff (70 psi; 482,6 kPa).

Q1-Scan-Modus: Scan-Bereich, m/z 50-600 u; DP, -30, -90 und -130 V; EP, -10 V; Auflösung Q1, Unit.

Precursor-Ion-Scan-Modus: Δ 9-THCA-A-Glucuronid, Precursor von m/z 357 u; 11-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid, Precursor von m/z 373 u; Δ 9-THCA-A-8-on-Glucuronid, Precursor von m/z 371 u; Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid, Precursor von m/z 387 u;

8 α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid bzw. 8 β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid, Precursor von m/z 389 u; Scan-Bereich, m/z 345-745 u; DP, -30 V; EP, -10 V; CE, -30 eV; CXP, -3; CAD, Medium; Auflösung Q1 und Q3, Unit.

EPI-Modus: Scan-Bereich, m/z 50-400 u (für die Aglyka, mit Ausnahme von m/z 403 u: m/z 50-425 u) bzw. m/z 50-600 u (für die Glucuronide); DP, -30 V; EP, -10 V; CE, -20, -35 und -50 eV; CAD, High; Füllzeit der Ionenfalle, dynamisch; Scan-Rate, 4000 u/s; Auflösung Q1, Unit.

MRM-Modus: DP, -30 V; EP, -10 V; CXP, -3 V; CAD, Medium; Auflösung Q1, Unit; Auflösung Q3, Low; dwell time, 25 ms. Die MRM-Übergänge und Kollisionsenergien sind in Tab. 2.10 zusammengefasst.

Die beschriebene MRM-Methode wurde auch für Bestimmung der Eliminationsprofile der Δ 9-THCA-A-Metabolite im Humanurin (Kapitel 3.5.1-3.5.3) eingesetzt.

Tab. 2.10 Δ 9-THCA-A und Metabolite, MRM-Übergänge (* Übergang anhand des Fragmentierungsmusters des Aglykons berechnet) und Kollisionsenergien der MRM-Methode.

Δ 9-THCA-A bzw. Metabolit	MRM-Übergänge [u]	Kollisionsenergie [eV]
Δ 9-THCA-A	357,2-313,2	-35
	357,2-245,2	-50
	357,2-191,1	-50
Δ 9-THCA-A-Glucuronid	533,2-357,2	-35
	533,2-313,2	-50
	533,2-245,2*	-50
11-OH- Δ 9-THCA-A 8 α -OH- Δ 9-THCA-A 8 β -OH- Δ 9-THCA-A	373,2-311,2	-35
	373,2-268,2	-50
	373,2-173,1	-50
11-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid 8 α -OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid 8 β -OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid	549,2-373,2	-35
	549,2-311,2	-50
	549,2-268,2*	-50
8 α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A 8 β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A	389,2-327,2	-35
	389,2-309,2	-50
	389,2-269,2	-50
8 α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid 8 β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid	565,2-389,2	-35
	565,2-327,2*	-50
	565,2-309,2*	-50
Δ 9-THCA-A-8-on	371,2-327,2	-35
	371,2-284,2	-35
	371,2-189,1	-50
Δ 9-THCA-A-8-on-Glucuronid	547,2-371,2	-35
	547,2-327,2	-50
	547,2-284,2	-50
Δ 9-THCA-A-COOH	387,2-299,2	-35
	387,2-245,2	-50
	387,2-191,1	-50

$\Delta 9$ -THCA-A bzw. Metabolit	MRM-Übergänge [u]	Kollisionsenergie [eV]
$\Delta 9$ -THCA-A-COOH-Glucuronid	563,2-387,2	-35
	563,2-299,2	-50
	563,2-245,2	-50
8-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH	403,2-385,2	-50
	403,2-297,2	-35
8-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH-Glucuronid	579,1-403,2	-35
	579,1-385,2	-50
	579,1-297,2	-50
4'-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH	403,2-315,2	-35
	403,2-261,1	-50
4'-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH-Glucuronid	579,1-403,2	-35
	579,1-315,2	-50
	579,1-261,1	-50
9,10-Bis-OH-HHCA-A	391,2-329,2	-35
	391,2-311,2	-50
	391,2-191,2	-50
9,10-Bis-OH-HHCA-A-Glucuronid	567,2-391,2	-35
	567,2-329,2	-50
	567,2-311,2	-50
$\Delta 9$ -THC-COOH- D_3	346,2-302,2	-35

Tab. 2.10 (Fortsetzung).

2.3.3.2.2 Identifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A-Metaboliten in Humanurin mittels GC-MS

Die GC-Bedingungen waren wie folgt: Injektionsmodus, splitlos; Injektortemperatur, 250°C; Kapillarsäule, Optima-5-MS (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μ m Filmdicke) (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland); Trägergas, Helium; Flussrate, 1,5 ml/min; Ofentemperatur, 140°C für 2,0 min, auf 200°C mit 60°C/min, auf 230°C mit 2,5°C/min, auf 310°C mit 60°C/min, 310°C für 10,0 min,

Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Kapillareinlass, 280°C; Ionenquellentemperatur, 230°C; EI; Ionisierungsenergie, 70 eV; Full-Scan-Modus; solvent delay, 10,0 min; Scan-Bereich, m/z 50-650 u; Δ EMV, +400°V.

2.3.4 Elimination von $\Delta 9$ -THCA-A und ihren Metaboliten

Die GC-Bedingungen entsprachen den unter 2.3.3.2.2 beschriebenen GC-Bedingungen. Die MS-Bedingungen waren wie folgt: Kapillareinlass, 280°C; Ionenquellentemperatur, 230°C; EI; Ionisierungsenergie, 70 eV; SIM-Modus; solvent

delay, 11,0 min; Δ EMV, +200°V. Die Retentionszeitfenster und SIM-Ionen sind in Tab. 2.11 zusammengefasst.

Tab. 2.11 Analyten, Retentionszeitfenster und SIM-Ionen (Target-Ion, t) der GC-MS-Methode.

Analyt	Zeitfenster	Zeit [min]	SIM-Ionen [u]
CBD	I	11,0-13,5	301,2
			337,2
			390,3 (t)
Δ 9-THC- D_3	II	13,5-15,0	306,2
			374,3
			389,3 (t)
Δ 9-THC	II	13,5-15,0	303,2
			371,3
			386,3 (t)
CBN	III	15,0-16,0	310,1
			367,2 (t)
			382,2
11-OH- Δ 9-THC- D_3	IV	16,0-16,6	374,3 (t)
			462,4
			477,4
11-OH- Δ 9-THC	IV	16,0-16,6	371,3 (t)
			459,4
			474,4
Δ 9-THCA-A	V	16,6-16,9	487,3 (t)
			488,3
			489,3
			502,3
Δ 9-THC-COOH- D_3	VI	16,9-18,0	374,3 (t)
			476,3
			491,3
Δ 9-THC-COOH	VI	16,9-18,0	371,3 (t)
			473,3
			488,3

2.4 Probenaufarbeitung

2.4.1 Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten

Das für diese Untersuchungen eingesetzte Marihuana und Haschisch wurde vom Landeskriminalamt Nordrhein-Westfalen zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt. 0,5 g Marihuana bzw. Haschisch wurden jeweils mit 0,5 g kommerziell erhältlichem Tabak verbrannt und der entstehende Rauch in einer Kühlfalle aufgefangen. Das Kondensat wurde in 1 ml Methanol rekonstituiert. Jeweils 10 μ l dieser Lösung wurden

bei 60°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft und anschließend trimethylsilyliert, einfach methyliert und extraktiv methyliert. Jeweils 1 µl der derivatisierten Extrakte wurde in das GC-MS-System injiziert.

Trimethylsilylierung: Der Rückstand wurde mit 25 µl wasserfreiem Essigsäureethylester und 25 µl MSTFA versetzt und für 45 min bei 90°C inkubiert.

Einfache Methylierung: Der Rückstand wurde mit einer Spatelspitze Kaliumcarbonat, 200 µl wasserfreiem Aceton und 100 µl Iodmethan versetzt und für 60 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft und in 50 µl wasserfreiem Essigsäureethylester aufgenommen.

Extraktive Methylierung: Der Rückstand wurde mit drei Tropfen einer 5 %igen Lösung von TMAH in Dimethylsulfoxid versetzt. Nach zwei Minuten wurden fünf Tropfen Iodmethan und nach weiteren fünf Minuten 200 µl 0,1 N Salzsäure zugegeben. Anschließend wurde mit 1 ml Isooctan für 30 sek extrahiert. 800 µl der oberen Phase wurden abgenommen, bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft und in 30 µl Isooctan aufgenommen.

2.4.2 Quantifizierung von Δ 9-THCA-A in Körperflüssigkeiten

Für die Methodenentwicklung, Validierung und Quantifizierung wurden gepoolte, drogenfreie Serum- bzw. Urinproben verwendet, die von gesunden Spendern zur Verfügung gestellt wurden. Die untersuchten Serum- und Urinproben wurden im Rahmen von Polizeikontrollen zu Fahren unter dem Einfluss von Drogen gewonnen und zur toxikologischen Untersuchung in das Institut für Rechtsmedizin eingesandt. Alle Proben wurden vor der Analyse bei -20°C gelagert.

2.4.2.1 Quantifizierung von Δ 9-THCA-A in Serum und Urin mittels LC-MS/MS

2.4.2.1.1 Herstellung der Standardlösungen

Zunächst wurden methanolische Δ 9-THCA-A-Stammlösungen mit 1 µg/ml bzw. 10 µg/ml hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden methanolische Δ 9-THCA-A-Arbeitslösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 20, 40, 100, 200, 300, 400, 1000, 2000, 3000 und 4000 ng/ml. Alle Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2.1.2 Aufnahme der Spektren

Für die Aufnahme der Q1-Scan-Spektren wurde die Δ^9 -THCA-A-Lösung mit 10 $\mu\text{g/ml}$, für die Aufnahme der Produkt-Ionen-Spektren die Δ^9 -THCA-A-Lösung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Es wurden jeweils 100 μl der Δ^9 -THCA-A-Lösung bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 100 μl mobiler Phase (Laufmittel A : B, 70 : 30, V : V) aufgenommen. 20 μl wurden in das LC-MS/MS-System injiziert.

2.4.2.1.3 Quantifizierung

Zur Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A wurde das Peakflächenverhältnis (Δ^9 -THCA-A vs. Δ^9 -THC-COOH- D_3) mit denen von Kalibrationskurven verglichen, bei welchen die Peakflächenverhältnisse dotierter Kalibratoren gegen die entsprechenden Δ^9 -THCA-A-Konzentrationen aufgetragen worden waren.

Die Kalibratoren wurden durch Zugabe von 25 μl internem Standard (IS) (50 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) und 25 μl der entsprechenden Δ^9 -THCA-A-Arbeitslösung zu 1 ml Serum bzw. Urin hergestellt. Die Kalibratoren entsprachen den folgenden Serum- bzw. Urinkonzentrationen (ng/ml): 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 25,0, 50,0, 75,0 und 100,0. Im Serum wurde von 0,5 bis 75,0 ng/ml, im Urin von 0,5 bis 100,0 ng/ml kalibriert.

Für die Probenvorbereitung wurde eine Festphasenextraktion (SPE) gewählt: 1 ml Probenmaterial (Serum bzw. Urin) wurde mit 25 μl IS (50 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) dotiert, mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und auf eine C_{18} -SPE-Säule überführt, welche mit 2 ml Methanol und 2 ml 0,1 M Essigsäure konditioniert worden war. Nach dem Beladen mit der Probe, wurde die C_{18} -SPE-Säule mit 1 ml 0,1 M Essigsäure und 1 ml Acetonitril/Wasser (40 : 60, V : V) gewaschen und für 10 min unter Vakuum getrocknet. Eluiert wurde mit 1,5 ml Acetonitril. Der Extrakt wurde bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Für die LC-MS/MS-Analyse wurde der Rückstand in 100 μl mobiler Phase (Laufmittel A : B, 70 : 30, V : V) aufgenommen. 20 μl wurden in das LC-MS/MS-System injiziert.

2.4.2.2 Quantifizierung von Δ 9-THCA-A in Serum mittels GC-MS

2.4.2.2.1 Herstellung der Standardlösungen

Zunächst wurde eine methanolische Δ 9-THCA-A-Stammlösung mit 100 $\mu\text{g/ml}$ angesetzt, aus welcher wiederum eine methanolische Δ 9-THCA-A-Arbeitslösung mit 100 ng/ml hergestellt wurde. Aus den Stammlösungen von Δ 9-THC und 11-OH- Δ 9-THC wurden zunächst methanolische Arbeitslösungen mit 20 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Die Stammlösung von Δ 9-THC-COOH wurde unverdünnt eingesetzt. Aus diesen Lösungen wurde eine methanolische T3D0-Arbeitslösung mit folgenden Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) hergestellt: jeweils 0,2 für Δ 9-THC und 11-OH- Δ 9-THC sowie 2,0 für Δ 9-THC-COOH. Aus den Stammlösungen von Δ 9-THC- D_3 , 11-OH- Δ 9-THC- D_3 und Δ 9-THC-COOH- D_3 wurde eine methanolische T3D3-Arbeitslösung mit folgenden Konzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) hergestellt: jeweils 0,2 für Δ 9-THC- D_3 und 11-OH- Δ 9-THC- D_3 sowie 1,0 für Δ 9-THC-COOH- D_3 . Alle Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2.2.2 Aufnahme der Spektren

Für die Aufnahme der Q1-Scan-Spektren wurde eine methanolische Δ 9-THCA-A-Lösung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt und jeweils 200 μl der Δ 9-THCA-A-Lösung bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Für die Trimethylsilylierung und die extraktive Methylierung wurde wie unter 2.4.1 beschriebenen aufgearbeitet. Jeweils 1 μl der derivatisierten Extrakte wurde in das GC-MS-System injiziert.

2.4.2.2.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung von Δ 9-THCA-A, Δ 9-THC, 11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THC-COOH erfolgte anhand entsprechender Kalibrationskurven, wobei folgende Kombinationen von IS und Analyten für die Berechnung der Peakflächenverhältnisse gewählt wurden: Δ 9-THC- D_3 für Δ 9-THC, 11-OH- Δ 9-THC- D_3 für 11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THC-COOH- D_3 für Δ 9-THC-COOH und Δ 9-THCA-A.

Die Kalibratoren wurden durch Zugabe von 25 μl T3D3-Arbeitslösung sowie von entsprechenden Volumina an Δ 9-THCA-A- und T3D0-Arbeitslösung zu 1 ml Serum hergestellt (Tab. 2.4). Die Kalibratoren entsprachen den folgenden Serumkonzentrationen (ng/ml): 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 und 7,5 für Δ 9-THCA-A und 1,0,

2,0, 3,0, 5,0, 10,0 und 20,0 für Δ^9 -THC und 11-OH- Δ^9 -THC sowie 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0 und 100,0 für Δ^9 -THC-COOH.

Tab. 2.12 Für die Kalibration eingesetzte Volumina der Δ^9 -THCA-A- und T3D0-Arbeitslösung sowie resultierende Serumkonzentrationen [ng/ml] von Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH.

Volumen Δ^9 -THCA-A- Arbeitslösung [μ l]	Volumen T3D0- Arbeitslösung [μ l]	Δ^9 -THCA-A [ng/ml]	Δ^9 -THC [ng/ml]	11-OH- Δ^9 -THC [ng/ml]	Δ^9 -THC-COOH [ng/ml]
10	5	1	1	1	5
20	10	2	2	2	10
30	15	3	3	3	15
40	25	4	5	5	25
50	50	5	10	10	50
75	100	7,5	20	20	100

Zur Probenaufarbeitung wurde 1 ml Serum mit 25 μ l IS (5 ng Δ^9 -THC- D_3 , 5 ng 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 , 25 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) dotiert, mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und auf eine C_{18} -SPE-Säule überführt, welche mit 2 ml Methanol und 2 ml 0,1 M Essigsäure bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml/min konditioniert worden war. Nach dem Beladen mit der Probe bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min, wurde die C_{18} -SPE-Säule mit 1 ml 0,1 M Essigsäure und 1 ml Acetonitril/Wasser (70 : 30, V : V) bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 1 ml/min gewaschen und für 2 min unter Stickstoff getrocknet. Eluiert wurde mit 1,5 ml Acetonitril. Der Extrakt wurde bei 60°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Nach Zugabe von 25 μ l Ethylacetat und 25 μ l MSTFA wurde für 45 min bei 90°C derivatisiert. 1 μ l des derivatisierten Extraktes wurde in das GC-MS-System injiziert.

2.4.2.3 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A und weiteren Cannabinoiden in Serum mittels GC-MS/MS

2.4.2.3.1 Herstellung der Standardlösungen

Da Δ^9 -THCA-A in methanolischer Lösung allmählich zu Δ^9 -THC decarboxyliert, wurden getrennte Arbeitslösungen für Δ^9 -THCA-A und die weiteren Cannabinoide hergestellt. Außerdem wurden jeweils getrennte Arbeitslösungen für einen niedrigen (0,2 bzw.

1,0 ng/ml bis 5,0 bzw. 25,0 ng/ml) und einen hohen (10,0 bzw. 50,0 ng/ml bis 30,0 bzw. 150,0 ng/ml) Kalibrationsbereich hergestellt.

Zunächst wurde eine Δ^9 -THCA-A-Stammlösung mit 1 mg/ml in Acetonitril hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden die beiden methanolischen THCA-Arbeitslösungen mit 2 μ g/ml (THCA-High-Arbeitslösung) bzw. 0,2 μ g/ml (THCA-Low-Arbeitslösung) hergestellt. Aus den methanolischen Stammlösungen von CBD, Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH wurden die beiden T5D0-Arbeitslösungen hergestellt. Die Konzentrationen (μ g/ml) der Cannabinoide in diesen Arbeitslösungen waren wie folgt: 2,0 für CBD, Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC und 10,0 für Δ^9 -THC-COOH (T5D0-High-Arbeitslösung) bzw. 0,2 für CBD, Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC und 1,0 für Δ^9 -THC-COOH (T5D0-Low-Arbeitslösung). Die Herstellung des IS wurde bereits unter 2.4.2.2.1 beschrieben.

Darüber hinaus wurden zum Ansetzen der Qualitätskontrollproben wiederum getrennte Arbeitslösungen für Δ^9 -THCA-A und die weiteren Cannabinoide hergestellt. Die Konzentrationen (μ g/ml) der Cannabinoide in diesen Arbeitslösungen waren wie folgt: 0,4 für Δ^9 -THCA-A; 0,4 für CBD, Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC und 10,0 für Δ^9 -THC-COOH. Alle Lösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.4.2.3.2 Aufnahme der Produkt-Ionen-Spektren

Für Aufnahme der Produkt-Ionen-Spektren wurden methanolische Lösungen der Cannabinoide mit 1 μ g/ml verwendet, von denen jeweils 10 μ l bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft und wie unter 2.4.1 beschriebenen trimethylsilyliert wurden.

2.4.2.3.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung der Cannabinoide erfolgt anhand entsprechender Kalibrationskurven, wobei folgende Kombinationen von IS und Analyten für die Berechnung der Peakflächenverhältnisse gewählt wurden: Δ^9 -THC- D_3 für Δ^9 -THC, CBD und CBN, 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 für 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH- D_3 für Δ^9 -THC-COOH und Δ^9 -THCA-A.

Die Kalibratoren wurden durch Zugabe von 25 μ l T3D3-Arbeitslösung und von entsprechenden Volumina der Δ^9 -THCA- und T5D0-Arbeitslösungen zu 1 ml Serum hergestellt (Tab. 2.10). Da für die einzelnen Serumkonzentrationen unterschiedliche Volumina der Arbeitslösungen dotiert wurden, erfolgte ein Volumenausgleich mit

Methanol (50 µl dotiertes Volumen/ml Serum). Die Kalibratoren I bis XII entsprachen den folgenden Serumkonzentrationen (ng/ml): 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 20,0 und 30,0 für CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A sowie 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0, 12,5, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 100,0 und 150,0 für Δ 9-THC-COOH. Für jeden Kalibrator wurden sechs Bestimmungen durchgeführt. Die Probenaufarbeitung entsprach der unter 2.4.2.2.3 beschriebenen Probenaufarbeitung.

Tab. 2.13 Für die Kalibration eingesetzte Volumina der Δ 9-THCA-A- und T5D0-Arbeitslösungen sowie resultierende Serumkonzentrationen [ng/ml] von CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH- Δ 9-THC, Δ 9-THCA-A und Δ 9-THC-COOH (x5).

Kalibrator	Serum-Konzentration [ng/ml]	Volumen THCA-Low Arbeitslösung [µl]	Volumen T5D0-Low-Arbeitslösung [µl]	Volumen THCA-High-Arbeitslösung [µl]	Volumen T5D0-High-Arbeitslösung [µl]
I	0,2	1	1	/	/
II	0,5	2,5	2,5	/	/
III	1,0	5	5	/	/
IV	1,5	7,5	7,5	/	/
V	2,0	10	10	/	/
VI	2,5	12,5	12,5	/	/
VII	3,0	15	15	/	/
VIII	4,0	20	20	/	/
IX	5,0	25	25	/	/
X	10,0	/	/	5	5
XI	20,0	/	/	10	10
XII	30,0	/	/	15	15

2.4.2.3.4 Selektivität

Zehn verschiedene Leerseren sowie zwei Nullseren (Leerserum mit 25 µl IS) wurden wie unter 2.4.2.3.3 beschrieben aufgearbeitet.

2.4.2.3.5 Richtigkeit und Präzision

Zur Bestimmung der Richtigkeit sowie Wiederhol- und Zwischenpräzision wurden Qualitätskontrollen (QK) mit folgenden Konzentrationen angesetzt: 1,0 ng/ml für CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A sowie 5,0 ng/ml für Δ 9-THC-COOH (Low), 5,0 ng/ml für CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A sowie 25,0 ng/ml für Δ 9-THC-COOH (Medium) und 10,0 ng/ml für CBD, Δ 9-THC, CBN,

11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A sowie 50,0 ng/ml für Δ 9-THC-COOH (High). Die QK wurden wie unter 2.4.2.3.3 beschrieben jeweils zweifach an sechs verschiedenen Tagen aufgearbeitet und die Konzentrationen anhand von täglichen Kalibrationskurven ermittelt.

2.4.2.3.6 Extraktionsausbeute

Für die Extraktionsproben bei niedrigen (1 ng/ml für CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A bzw. 5 ng/ml für Δ 9-THC-COOH) und hohen (10 ng/ml für CBD, Δ 9-THC, CBN, 11-OH- Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A bzw. 50 ng/ml für Δ 9-THC-COOH) Konzentrationen (jeweils $n = 6$) wurde 1 ml Leerserum mit je 5 μ l T5D0-Low-Arbeitslösung und THCA-Low-Arbeitslösung bzw. mit je 5 μ l T5D0-High-Arbeitslösung und THCA-High-Arbeitslösung sowie 65 μ l Methanol zum Volumenausgleich dotiert. Nach Verdünnen mit 2 ml 0,1 M Essigsäure wurden die Proben kurz gemischt und wie unter 2.4.2.3.3 beschrieben extrahiert. Die Eluate wurden vor dem Eindampfen mit 25 μ l IS versetzt und anschließend wie unter 2.4.1 beschrieben trimethylsilyliert.

Für die Kontrollproben wurde 1 ml Leerserum mit 75 μ l Methanol dotiert, mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und wie unter 2.4.2.3.3 beschrieben extrahiert. Die Eluate wurden vor dem Eindampfen mit je 5 μ l T5D0-Low-Arbeitslösung und THCA-Low-Arbeitslösung für die niedrige Kontrollprobe ($n = 6$) bzw. mit je 5 μ l T5D0-High-Arbeitslösung und THCA-High-Arbeitslösung für die hohe Kontrollprobe ($n = 6$) sowie mit 25 μ l IS versetzt. Anschließend wurden die Proben wie unter 2.4.1 beschrieben trimethylsilyliert.

Die Extraktionsausbeuten (Mittelwert und Standardabweichung) der Analyten bei niedriger und hoher Konzentration wurden durch Vergleich der Peakflächenverhältnisse (Analyt vs. IS) der Extraktionsproben mit denen der Kontrollproben bestimmt.

2.4.3 Isolierung von Δ 9-THCA-A aus Marihuana

Das für die Isolierung von Δ 9-THCA-A verwendete Marihuana (Gesamt- Δ 9-THC-Gehalt, 15,4 %; bestimmt mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion) wurde vom Landeskriminalamt Nordrhein-Westfalen zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt.

2.4.3.1 Herstellung des Rohextraktes

50 g des pulverisierten Pflanzenmaterials wurden mit 100 ml Ethanol unter gelegentlichem Umschütteln für 48 h bei 4°C extrahiert. Nach dem Filtrieren wurde der Rohextrakt in einem Rotationsverdampfer bei 30°C auf ein Volumen von etwa 80 ml eingengt. Anschließend wurde der Rohextrakt in Aliquoten von 15 ml für jeweils 30 min mit Aktivkohle (1,5 g Aktivkohle/15 ml Rohextrakt) inkubiert und nach dem Abfiltrieren in einem Rotationsverdampfer bei 30°C zur Trockne eingedampft. Aus 15 ml Rohextrakt konnten dabei etwa 290 mg eines brauen, amorphen Rückstandes gewonnen werden.

2.4.3.2 Aufreinigung der Δ 9-THCA-A mittels Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung wurde der Rückstand des Rohextraktes (290 mg) in 0,5 ml mobiler Phase I (500 ml Cyclohexan, 25 ml Essigsäureethylester, 10 Tropfen konzentrierte Ameisensäure) rekonstituiert. Die Auftrennung erfolgte an einer mit Aluminiumfolie umhüllten Chromatographiesäule (40 x 400 mm) mit 120 g Kieselgel 60 als stationärer Phase. Zunächst wurde Δ 9-THC mit der mobilen Phase I abgetrennt, für die Elution der polareren Δ 9-THCA-A wurde anschließend die mobile Phase II (500 ml Cyclohexan, 50 ml Essigsäureethylester, 10 Tropfen konzentrierte Ameisensäure) verwendet. Beide Lösungsmittelgemische passierten die Chromatographiesäule mit einer Geschwindigkeit von etwa 7,5 ml/min unter Druckluft. Die einzelnen Fraktionen (15 ml) wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) auf Δ 9-THC bzw. Δ 9-THCA-A überprüft. Die Kieselgel 60 F254 Dünnschichtplatten (5 x 10 cm) wurden mit mobiler Phase I entwickelt und zur Identifizierung der Cannabinoide in Färbereagenz (2,5 g Ammoniummolybdat, 1,0 g Cer(IV)sulfat, 100 ml 1 M Schwefelsäure) getaucht und anschließend bei 100°C entwickelt. Δ 9-THC und Δ 9-THCA-A ergaben blaue Zonen bei $R_f = 0,65$ bzw. $R_f = 0,45$. Die Elution von Δ 9-THCA-A begann bei Fraktion 58, d.h. nach 870 ml mobiler Phase I. Die Fraktionen 59 bis 167 wurden vereinigt (1635 ml), in einem Rotationsverdampfer bei 30°C zur Trockne eingedampft und letzte Lösungsmittelrückstände mit einer Drehschieber-Vakuumpumpe entfernt. Aus 290 mg Rohextrakt konnten 114,5 mg eines gelben, amorphen Rückstandes gewonnen werden.

2.4.3.3 Aufreinigung der Δ 9-THCA-A mittels semipräparativer HPLC-DAD

Für die weitere Aufreinigung wurde dieser Rückstand (114,5 mg) in Methanol rekonstituiert (10 mg Rückstand/ml Methanol). Aliquote (250 μ l) wurden bei

Raumtemperatur auf einer Synergi[®] Hydro-RP-Säule (250 mm x 15 mm, 10 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) isokratisch mit einem Laufmittelgemisch aus 5 mM Ammoniumacetat pH 6,5 und Methanol (25 : 75, V : V) bei einer Gesamtflussrate von 30,0 ml/min innerhalb von 10 min getrennt. Für die UV-Detektion wurde eine Wellenlänge von 220 nm eingestellt. Das HPLC-Eluat wurde während der Elution von Δ^9 -THCA-A gesammelt.

Nach dem Vereinigen der Eluate, wurde der Methanol-Anteil des Laufmittelgemisches in einem Rotationsverdampfer bei 30°C entfernt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit konzentrierter Ameisensäure auf einen pH-Wert von 3 bis 4 eingestellt und mit 100 ml TBME extrahiert (n = 5). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und anschließend in einem Rotationsverdampfer bei 30°C zur Trockne eingedampft. Aus 25 mg Rückstand konnten 19,6 mg Δ^9 -THCA-A als schwach gelber, amorpher Rückstand gewonnen werden.

2.4.4 Studien zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A

2.4.4.1 Studie zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A an Ratten

Für die toxikologisch-diagnostischen Untersuchungen wurde der Urin männlicher Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) unter Berücksichtigung des entsprechenden Deutschen Gesetzestextes verwendet. Zwei Ratten wurde eine Einmaldosis von 15 mg Δ^9 -THCA-A/kg Körpergewicht (10,1 mg Δ^9 -THCA-A/0,5 ml Ethanol) per Schlundsondierung verabreicht. Urin und Kot wurden getrennt voneinander über einen Zeitraum von 24 h in fluoridierten Erlenmeyerkolben gesammelt (~2,5 mg Kaliumfluorid/ml Urin). Zur Prüfung auf Störkomponenten wurde vor der Verabreichung von Δ^9 -THCA-A der Leerurin der Ratten gesammelt. Alle Proben wurden vor der Analyse bei -20°C gelagert.

2.4.4.1.1 Probenaufbereitung zur Identifizierung von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten in Rattenurin mittels LC-MS/MS und LC-QTOF MS

200 µl Urin wurden mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt, mit 20 µl einer Mischung von β -D-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* versetzt und für 1,5 h bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Acetonitril (-18°C) zur Proteinfällung wurde die Probe für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert, 540 µl des

Überstandes abgenommen und in ein Probengeber-Gläschen überführt. Nach Zugabe von 50 µl IS (50 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) als Retentionszeitmarker wurde die Probe bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Für die LC-MS/MS-Analyse wurde der Rückstand in 100 µl mobiler Phase (Laufmittel A : B, 90 : 10, V : V) aufgenommen. 20 µl wurden in das LC-MS/MS- bzw. LC-QTOF MS-System injiziert.

Weitere 200 µl Urin wurden ohne enzymatische Konjugatspaltung wie oben beschrieben aufgearbeitet.

2.4.4.1.2 Probenaufbereitung zur Identifizierung von Δ^9 -THC und dessen Metaboliten in Rattenurin mittels GC-MS

1 ml Urin wurde mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt, mit 25 µl IS (5 ng Δ^9 -THC- D_3 , 5 ng 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 , 25 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) dotiert, zur enzymatischen Konjugatspaltung mit 100 µl einer Mischung von β -D-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* versetzt und für 1,5 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet.

Weitere 1 ml des Urins wurden ohne enzymatische Konjugatspaltung wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Darüber hinaus wurde 1 ml des Urins zur Konjugatspaltung durch alkalische Hydrolyse mit 250 µl 10 M Natriumhydroxid-Lösung versetzt, für 45 min bei 60°C inkubiert und wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet.

2.4.4.2 Studie zum humanen Metabolismus von Δ^9 -THCA-A

In einem Selbstversuch wurde von einem gesunden, männlichen Probanden (BMI, 25,1; Alter, 37 Jahre) eine Einmaldosis von 50 mg Δ^9 -THCA-A (50 mg Δ^9 -THCA-A/ml Sojaöl) in einer Hartgelatine kapsel oral eingenommen. Es wurden 13 Serum- und Plasmaproben innerhalb von 32 h, 29 Urinproben innerhalb von vier Tagen sowie neun Speichelproben innerhalb von 32 h nach Einnahme von Δ^9 -THCA-A gesammelt. Zur Prüfung auf Störkomponenten wurden vor der Verabreichung von Δ^9 -THCA-A Leerproben von Serum, Plasma, Urin und Speichel des Probanden gesammelt. Alle Proben wurden vor der Analyse bei -20°C gelagert.

Für die Identifizierung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite wurde der fünf Stunden nach Verabreichung von Δ^9 -THCA-A gewonnene Urin verwendet.

2.4.4.2.1 Probenvorbereitung zur Identifizierung von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten in Humanurin mittels LC-MS/MS und LC-QTOF MS

100 μ l Urin wurden mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt, mit 10 μ l einer Mischung von β -D-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* versetzt und für 1,5 h bei 50°C inkubiert. Nach Zugabe von 250 μ l Acetonitril (-18°C) zur Proteinfällung wurde die Probe für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert, 270 μ l des Überstandes abgenommen und in ein Probengeber-Gläschen überführt. Nach Zugabe von 50 μ l IS (50 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) als Retentionszeitmarker wurde die Probe bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Für die LC-MS/MS-Analyse wurde der Rückstand in 100 μ l mobiler Phase (Laufmittel A : B, 90 : 10, V : V) aufgenommen. 20 μ l wurden in das LC-MS/MS- bzw. LC-QTOF MS-System injiziert.

Weitere 100 μ l Urin wurden ohne enzymatische Konjugatsspaltung wie oben beschrieben aufgearbeitet.

2.4.4.2.2 Probenvorbereitung zur Identifizierung von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten in Humanurin mittels GC-MS

1 ml Urin wurde mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt, zur enzymatischen Konjugatsspaltung mit 75 μ l einer Mischung von β -D-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* versetzt und für 1,5 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet.

Weitere 1 ml des Urins wurden ohne enzymatische Konjugatsspaltung wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet.

2.4.4.3 Studie zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A in Rattenlebermikrosomen

Die Rattenlebermikrosomen wurden in einem hauseigenen Verfahren durch fraktionierte Zentrifugation aus Rattenlebern selbst hergestellt. Die erhaltenen Mikrosomen (Proteingehalt: 35 mg/ml) wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Der Inkubationsansatz (Endvolumen: 155 μ l) bestand aus 44 μ l Phosphatpuffer pH 7,4, 56 μ l NADPH/ H^+ -regenerierendes System (25 μ l Isocitrat-Lösung, 25 μ l NADP⁺, 6 μ l Isocitrat-Dehydrogenase), 10 μ l Superoxiddismutase (2 U/ml) und 30 μ l Δ^9 -THCA-A-Lösung (2,5 mM). Das Substrat wurde nach Verdünnung einer methanolischen Δ^9 -THCA-A-Stammlösung (25 mM) mit deionisiertem Wasser zugegeben. Die Reaktion

wurde durch Zugabe von 15 µl der eisgekühlten Mikrosomen gestartet und der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 375 µl Acetonitril (-18°C) wurde die Reaktion gestoppt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert, 270 µl des Überstandes wurden abgenommen und in ein Probengeber-Gläschen überführt. Nach Zugabe von 50 µl IS (50 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) als Retentionszeitmarker wurde die Probe bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Für die LC-MS/MS-Analyse wurde der Rückstand in 100 µl mobiler Phase (Laufmittel A : B, 90 : 10, V : V) aufgenommen. 20 µl wurden in das LC-MS/MS-System injiziert.

2.4.5 Studien zur Elimination von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten

Für die Untersuchungen zur Elimination von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten wurden die im Rahmen des unter 2.4.4.2 beschriebenen Selbstversuches gewonnenen Serum-, Urin- und Speichelproben herangezogen.

2.4.5.1 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Serum, Plasma und Urin mittels GC-MS

Für die quantitativen Bestimmungen wurden die unter 2.4.2.3.1 beschriebenen Standardlösungen verwendet. Die Kalibratoren wurden durch Zugabe von 25 µl T3D3-Arbeitslösung und von entsprechenden Volumina der Δ^9 -THCA- und T5D0-Arbeitslösungen zu 1 ml Serum bzw. Urin hergestellt (Tab. 2.14). Da unterschiedliche Volumina der Arbeitslösungen dotiert wurden, erfolgte ein Volumenausgleich mit Methanol (50 µl dotiertes Volumen/ml Serum). Die Kalibratoren I bis V entsprachen den folgenden Serum- und Urinkonzentrationen (ng/ml): 0,5, 1,0, 5,0, 7,5 und 10,0 für CBD, Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THCA-A sowie 2,5, 5,0, 25,0, 37,5 und 50,0 für Δ^9 -THC-COOH. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Extrakte wurden für die Studien jedoch bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft.

Tab. 2.14 Für die Kalibration eingesetzte Volumina der Δ^9 -THCA-A- und T5D0-Arbeitslösungen sowie resultierende Serum- und Urinkonzentrationen [ng/ml] von CBD, Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A und Δ^9 -THC-COOH (x5).

Kalibrator	Konzentration [ng/ml]	Volumen THCA-Low Arbeitslösung [μ l]	Volumen T5D0-Low-Arbeitslösung [μ l]	Volumen THCA-High-Arbeitslösung [μ l]	Volumen T5D0-High-Arbeitslösung [μ l]
I	0,5	2,5	2,5	/	/
II	1,5	7,5	7,5	/	/
III	5,0	25	25	/	/
IV	7,5	/	/	3,75	3,75
V	10,0	/	/	5	5

2.4.5.1.1 Probenvorbereitung zur Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Serum und Plasma mittels GC-MS

Nach Verdünnung von Serum und Plasma gemäß Tab. 2.15 wurden 25 μ l IS (5 ng Δ^9 -THC- D_3 , 5 ng 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 , 25 ng Δ^9 -THC-COOH- D_3) zu 1 ml Serum bzw. Plasma (Gesamtvolumen) zugegeben, die Probe mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt, mit 25 μ l einer Mischung von β -D-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* versetzt und für 12 h bei 37°C inkubiert.

Tab. 2.15 Verdünnung von Serum und Plasma für die quantitative Bestimmung von Δ^9 -THCA-A mittels GC-MS (* 2 ml angesetzt, aber nur 1 ml aufgearbeitet).

	Volumen Serumprobe [μ l]	Volumen Leerserum [μ l]		Volumen Plasmaprobe [μ l]	Volumen Leerplasma [μ l]
Serum 1	1000	0	Plasma 1	500	500
Serum 2	200	800	Plasma 2	100	900
Serum 3	50	950	Plasma 3	50	950
Serum 4	50	950	Plasma 4	25	975
Serum 5	20	980	Plasma 5	50	950
Serum 6	5	1995*	Plasma 6	5	1995*
Serum 7	5	1995*	Plasma 7	5	995
Serum 8	5	1995*	Plasma 8	5	995
Serum 9	20	980	Plasma 9	10	990
Serum 10	50	950	Plasma 10	100	900
Serum 11	200	800	Plasma 11	500	500
Serum 12	200	800	Plasma 12	500	500
Serum 13	500	500	Plasma 13	500	500

Anschließend wurde die Probe mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Extrakte wurden für die Studien jedoch bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft.

Darüber hinaus wurden Serum und Plasma ohne enzymatische Konjugatsspaltung wie oben beschrieben aufgearbeitet.

2.4.5.1.2 Probenvorbereitung zur Quantifizierung von Δ 9-THCA-A in Urin mittels GC-MS

Nach Verdünnung von 100 μ l Urin mit 900 μ l deionisiertem Wasser wurden 25 μ l IS (5 ng Δ 9-THC- D_3 , 5 ng 11-OH- Δ 9-THC- D_3 , 25 ng Δ 9-THC-COOH- D_3) zugegeben, die Probe mit 1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,2 eingestellt, mit 25 μ l einer Mischung von β -D-Glucuronidase und Arylsulfatase aus *Helix pomatia* versetzt und für 12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Extrakte wurden für die Studien jedoch bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft. Darüber hinaus wurde 1 ml Urin in gleicher Weise aufgearbeitet.

2.4.5.1.3 Probenvorbereitung zur Quantifizierung von Δ 9-THCA-A in Speichel mittels GC-MS

Nach Zugabe von 25 μ l IS (5 ng Δ 9-THC- D_3 , 5 ng 11-OH- Δ 9-THC- D_3 , 25 ng Δ 9-THC-COOH- D_3) zu 1 ml Speichel, wurde die Probe mit 2 ml 0,1 M Essigsäure verdünnt, kurz gemischt und wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Extrakte wurden für die Studien jedoch bei 40°C unter Stickstoff zur Trockne eingedampft.

2.4.5.2 Probenvorbereitung zur Bestimmung von Δ 9-THCA-A-Metaboliten in Serum, Plasma und Urin mittels LC-MS/MS

100 μ l Probe (Serum, Plasma, Urin bzw. Speichel) wurden wie unter 2.4.4.2.1 beschrieben aufgearbeitet, jedoch ohne enzymatische Konjugatsspaltung.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten

Grundlage für die Beschäftigung mit $\Delta 9$ -THCA-A waren qualitative Untersuchungen zu im Rauch von Cannabisprodukten (Marihuana und Haschisch) enthaltenen Cannabinoiden und Cannabinoid-Abbauprodukten, welche für eine Absorption in der Lunge zur Verfügung stehen. In Nordrhein-Westfalen wurde in den letzten Jahren ein stetiger Anstieg des Gesamt- $\Delta 9$ -THC-Gehaltes von Marihuana und Haschisch (bezogen auf das getrocknete Material) von 6,5 % 1995 auf 11,4 % 2005 beobachtet [183]. Dieser Anstieg wird einerseits auf neue Varietäten von *Cannabis sativa* L., andererseits auf ausgefeilte Anbautechniken in Gewächshäusern mit speziellen Substraten für einzelne Wachstumsphasen, Hormonbehandlung für verbesserte Keimung und Wurzelbildung sowie automatische Beleuchtung und Bewässerung bei ständiger Kontrolle des pH-Wertes und des Nährstoffangebotes zurückgeführt.

Für die Untersuchung der im Rauch verfügbaren Inhaltsstoffe wurden Marihuana und Haschisch mit hohem Gesamt- $\Delta 9$ -THC-Gehalt zusammen mit kommerziell erhältlichem Tabak verbrannt. Der Zusatz von Tabak war erforderlich, da die Verbrennung von Marihuana und Haschisch allein kaum in Gang gehalten werden konnte. Der bei der Verbrennung entstehende Rauch wurde aufgefangen und das Kondensat wie unter 2.4.1 beschrieben in Methanol gelöst, verdünnt und für die GC-MS-Analyse derivatisiert (Trimethylsilylierung, direkte Methylierung sowie extraktive Methylierung).

Sowohl nach Trimethylsilylierung als auch nach Methylierung wurde wie erwartet in beiden Cannabisprodukten hauptsächlich das psychoaktiv wirksame $\Delta 9$ -THC detektiert. Daneben konnten das ebenfalls psychoaktiv wirksame CBD, das psychoinaktive CBG sowie das ebenfalls psychoinaktive $\Delta 9$ -THC-Abbauprodukt CBN nachgewiesen werden. Nach Methylierung wurde darüber hinaus $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabivarin identifiziert. Diese Substanz ist wie $\Delta 9$ -THC psychoaktiv wirksam und wurde zur Abgrenzung eines missbräuchlichen Cannabis-Konsums gegenüber einer therapeutischen Einnahme des reinen $\Delta 9$ -THC-Präparates Marinol® vorgeschlagen [134, 184-187].

Nach Trimethylsilylierung wurde neben dem Hauptwirkstoff $\Delta 9$ -THC zusätzlich dessen biogenetischer Vorläufer $\Delta 9$ -THCA-A (Abb. 3.1) nachgewiesen. Der Nachweis von $\Delta 9$ -THCA-A nach Methylierung gelang nicht, was möglicherweise auf eine artefaktische Freisetzung von $\Delta 9$ -THC zurückzuführen ist.

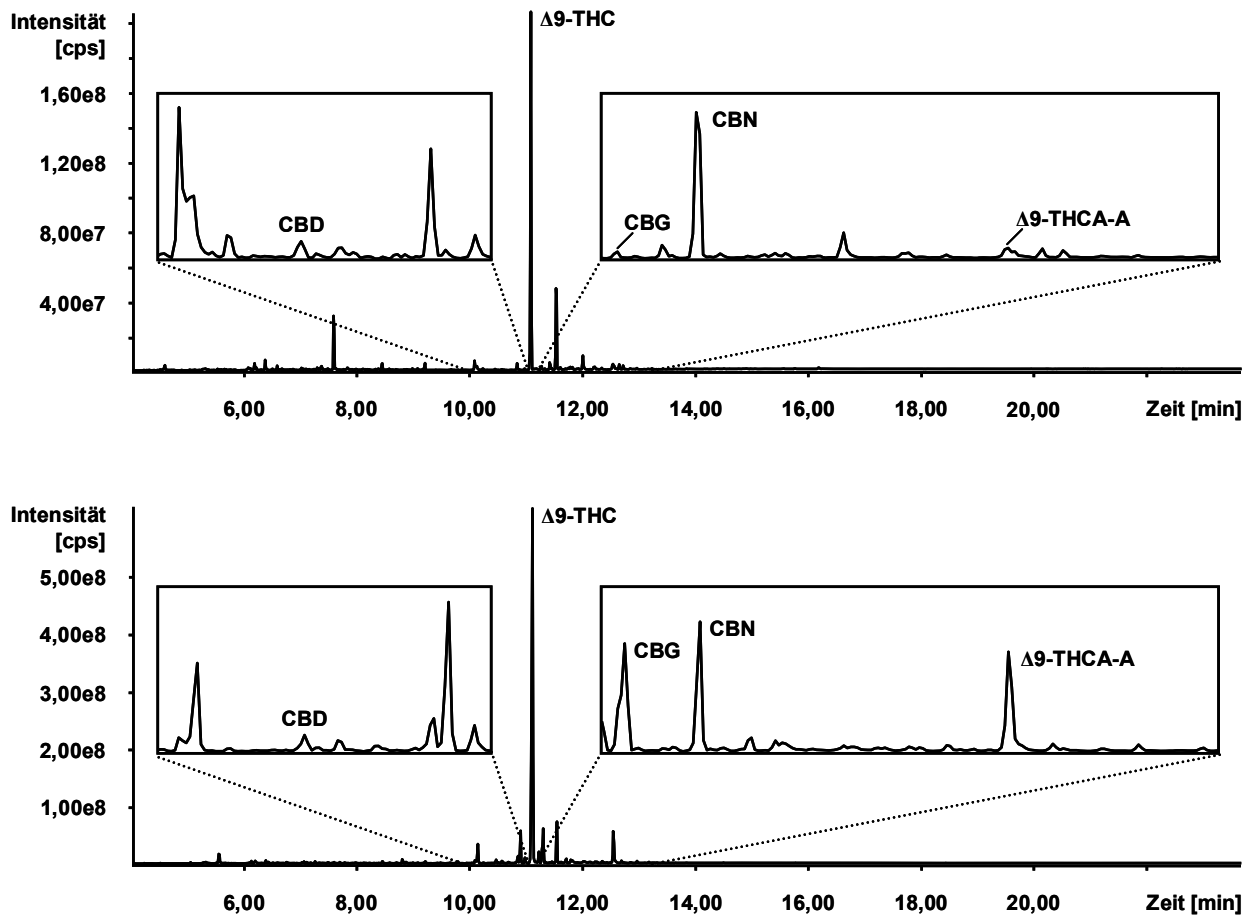


Abb. 3.1 GC-EI-MS Chromatogramm nach Trimethylsilylierung des kondensierten Rauches nach Verbrennung von Marihuana (oben) und Haschisch (unten).

In frischem Pflanzenmaterial liegen etwa 95 % des Gesamt- $\Delta 9$ -THC in Form der inaktiven $\Delta 9$ -THCA-A vor. Während Lagerung und Fermentation erfolgt jedoch ein allmählicher Abbau zu $\Delta 9$ -THC [29, 44, 75, 79]. Neben den Ausgangsgehalten in der Pflanze trägt dieser Abbauprozess sicher mit zu den deutlichen Unterschieden der $\Delta 9$ -THCA-A-Gehalte in einzelnen Cannabisprodukten bei [83].

Bislang wurde angenommen, dass $\Delta 9$ -THCA-A beim Rauchen von Marihuana bzw. Haschisch vollständig in das psychoaktive $\Delta 9$ -THC umgewandelt wird. Dussy et. al [72] zeigten, dass unter analytischen Bedingungen ca. 70 % der $\Delta 9$ -THCA-A zu $\Delta 9$ -THC umgesetzt, während bei Simulation des Rauchens jedoch nur etwa 30 % der Vorläufersubstanz als $\Delta 9$ -THC verfügbar werden. Aufgrund dieser Ergebnisse sowie des Nachweises relevanter Mengen an $\Delta 9$ -THCA-A in Rauchkondensaten von Haschisch und Marihuana war anzunehmen, dass beim Rauchen neben $\Delta 9$ -THC auch dessen biogenetischer Vorläufer in der Lunge absorbiert wird. Deshalb erfolgten weitere Untersuchungen zur Charakterisierung dieses potentiellen Cannabis-Konsum-Markers.

3.2 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Körperflüssigkeiten

3.2.1 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Serum und Urin mittels LC-MS/MS

3.2.1.1 Methodenentwicklung

Zum Nachweis sowie zur Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A in Serum und Urin von Cannabis-Konsumenten wurde eine LC-MS/MS-Methode mit ESI entwickelt, da sich die ESI besonders für die Analyse thermolabiler Verbindungen wie Δ^9 -THCA-A eignet. Zunächst wurden Single-Quadrupol-Massenspektren von Δ^9 -THCA-A im Q1-Scan-Modus mit positiver und negativer ESI bei drei verschiedenen DP (20, 50 und 80 V) aufgenommen (Abb. 3.2 und Abb. 3.3).

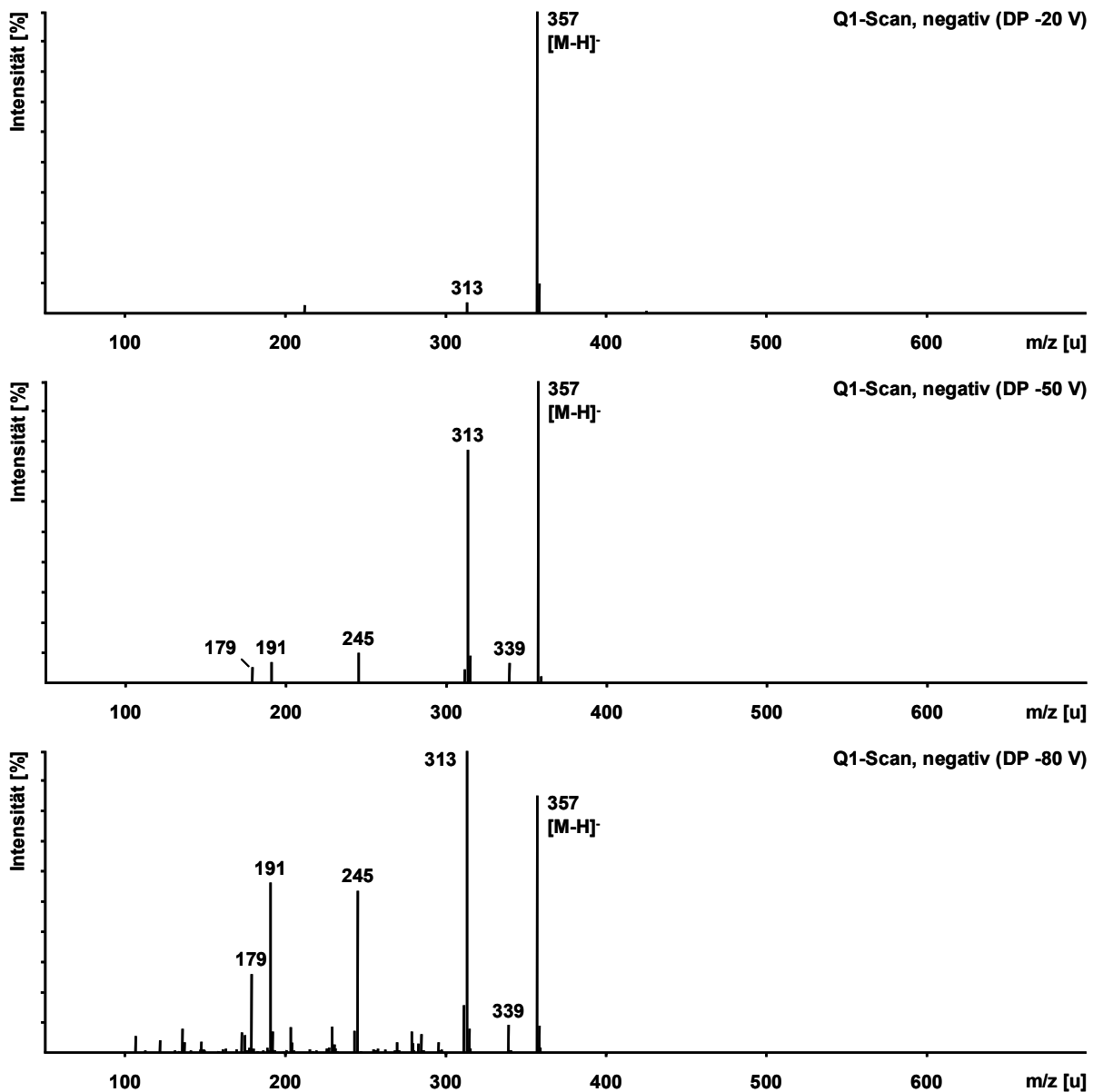


Abb. 3.2 Q1-Scan-Spektrum von Δ^9 -THCA-A mit negativer ESI bei DP -20 V (oben), DP -50 V (Mitte) und DP -80 V (unten).

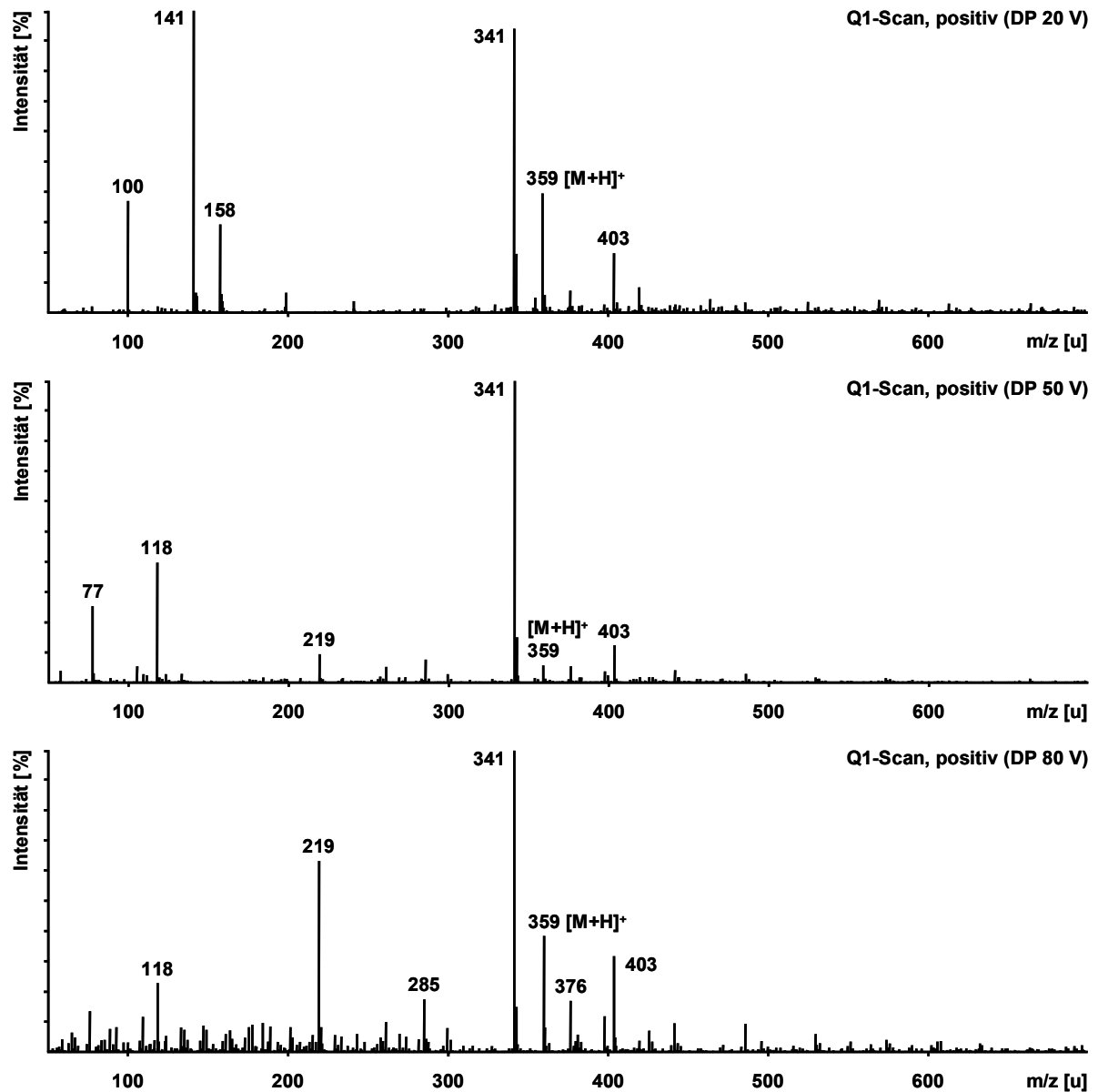


Abb. 3.3 Q1-Scan-Spektrum von Δ^9 -THCA-A mit positiver ESI bei DP 20 V (oben), DP 50 V (Mitte) und DP 80 V (unten).

Aufgrund der Molekülstruktur von Δ^9 -THCA-A war anzunehmen, dass die Carboxyl-Gruppe in Position 2 sehr leicht deprotoniert wird und sich Δ^9 -THCA-A dadurch besonders für negative ESI eignet. Wie erwartet, wurde Δ^9 -THCA-A bei negativer ESI mit deutlich höherer Empfindlichkeit detektiert als bei positiver. Mit positiver ESI zerfiel das Molekülion bereits bei einem DP von 20 V durch eine Wasserelimination in eine Fragmentation mit m/z 341, während die Fragmentierung in der Ionenquelle mit negativer ESI bei einem DP von -20 V nur sehr gering ausgeprägt war. Für die nachfolgenden Experimente wurde deshalb die negative Ionisierung gewählt.

Zum Vergleich von ESI und Atmosphärendruck-Chemischer-Ionisation (APCI) wurde zusätzlich ein Single-Quadrupol-Massenspektrum von Δ^9 -THCA-A im Q1-Scan-Modus mit negativer APCI bei drei verschiedenen DP (-20, -50 und -80 V) aufgenommen (Abb. 3.4).

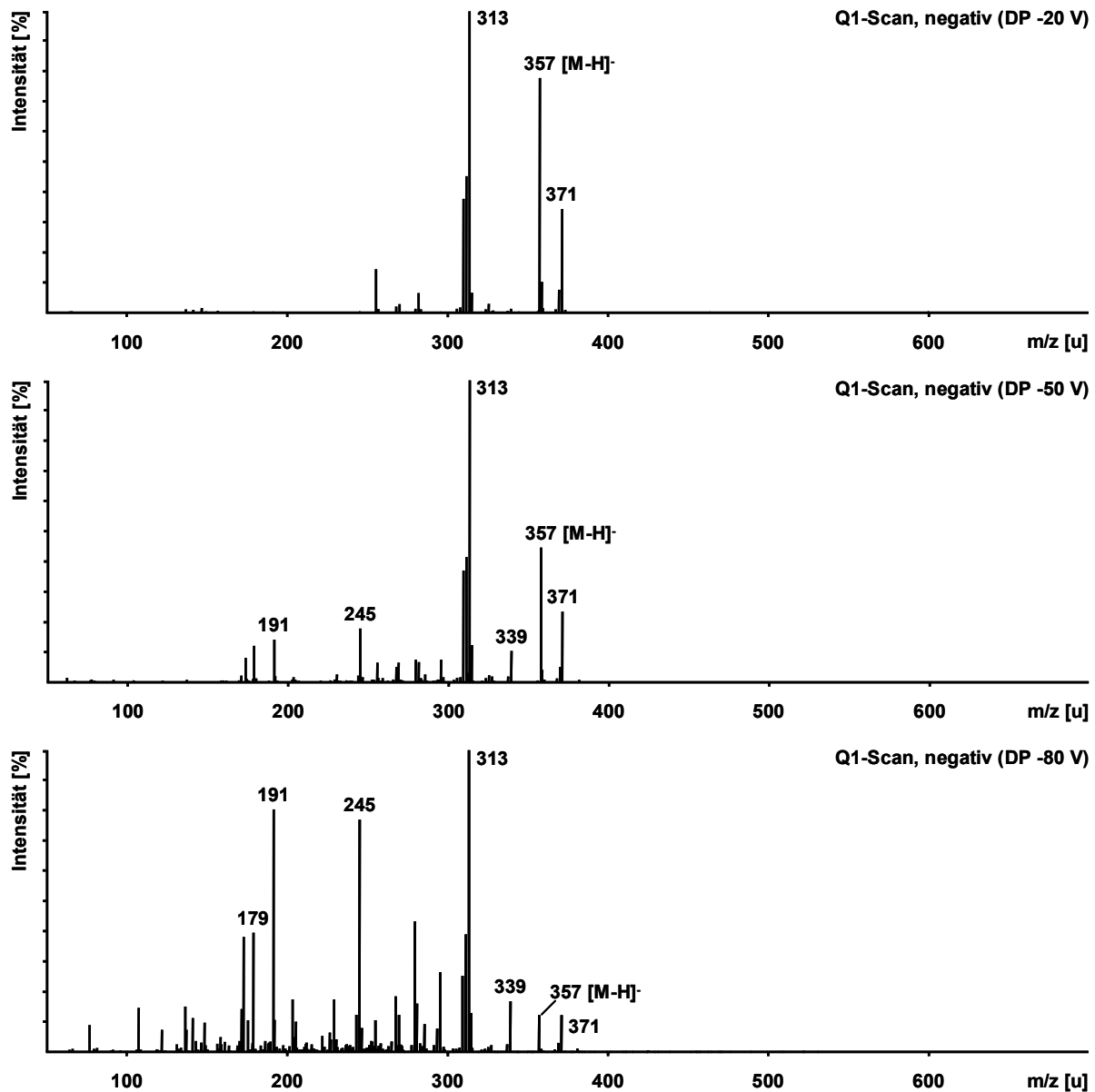


Abb. 3.4 Q1-Scan-Spektrum von Δ^9 -THCA-A mit negativer APCI bei DP -20 V (oben), DP -50 V (Mitte) und DP -80 V (unten).

Im Gegensatz zur relativ schonenden ESI zerfiel das deprotonierte Molekülion mit negativer APCI bereits bei einem DP von -20 V durch Abspaltung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 größtenteils in Δ^9 -THC mit dem charakteristischen Fragmentation mit m/z 313. Bei dem Ion mit m/z 371 handelt es sich um ein Methyl-Addukt, welches durch die

Verwendung einer methanolischen Δ^9 -THCA-A-Lösung entstand. Da die Fragmentierung in der Ionenquelle bei ESI deutlich geringer ausgeprägt war als bei APCI und Δ^9 -THCA-A bei ESI zudem mit deutlich höherer Empfindlichkeit detektiert wurde als bei APCI, wurden die nachfolgenden MS/MS-Experimente mit negativer ESI bei einem DP von -20 V durchgeführt.

Gemäß dem Standardverfahren zur Aufnahme einer MS/MS-Spektren-Bibliothek^[188, 189] wurden anschließend Produkt-Ionen-Spektren des deprotonierten Molekülions von Δ^9 -THCA-A bei den Kollisionsenergien -20 eV, -35 eV und -50 eV aufgenommen (Abb. 3.5).

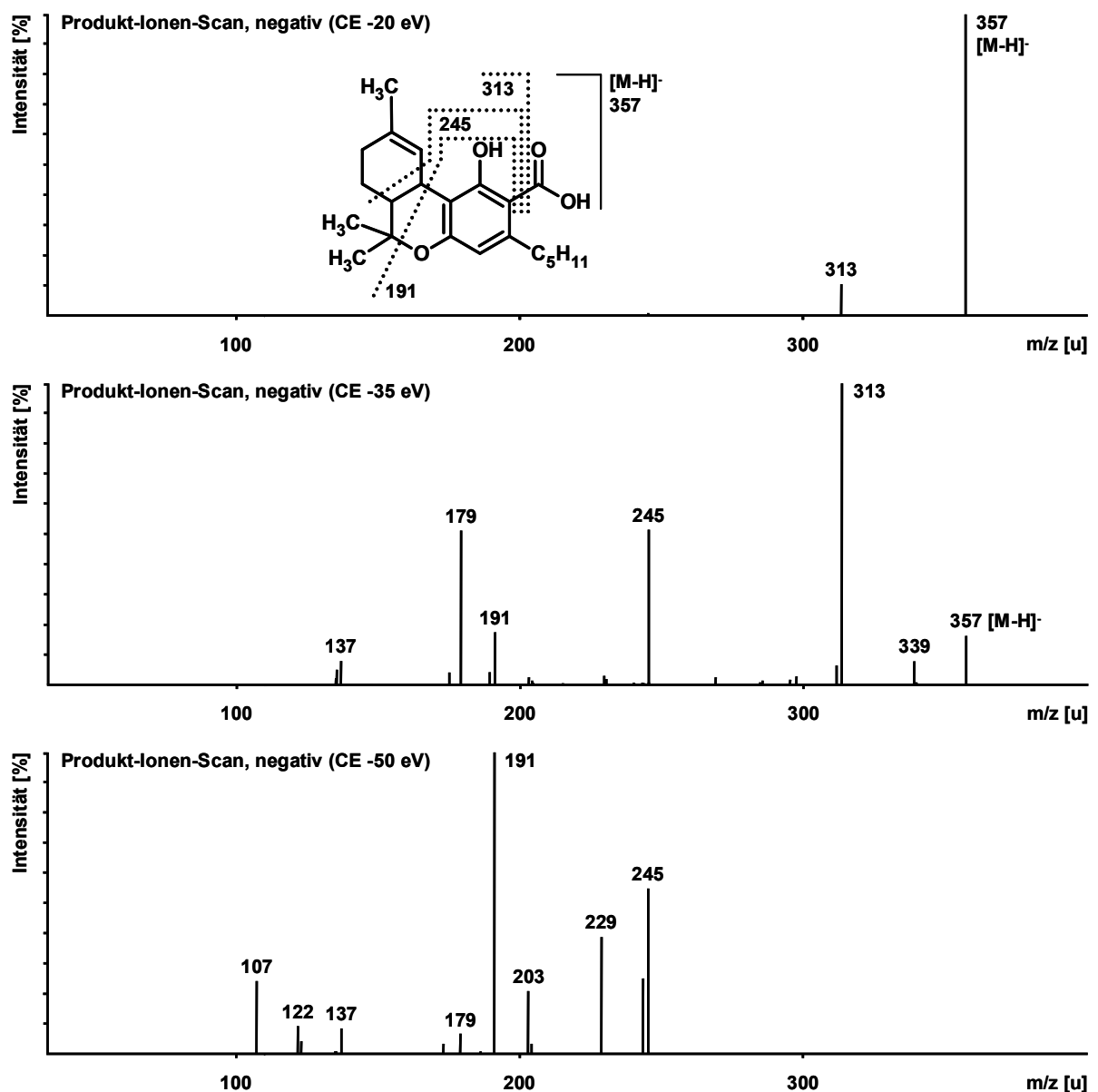


Abb. 3.5 Produkt-Ionen-Spektrum und vorherrschendes Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A mit negativer ESI bei CE -20 eV (oben), CE -35 eV (Mitte) und CE -50 eV (unten).

$\Delta 9$ -THCA-A zeigt bei negativer ESI ein Molekülion von m/z 357. Das Fragmention mit m/z 313 entsteht aus dem Molekülion durch Abspaltung der Carboxyl-Gruppe in Position 2. Eine Wasserabspaltung aus dem Molekülion hingegen führt zu einem Fragmention mit m/z 339. Durch eine neutrale Abspaltung von C_5H_8 aus dem Ringsystem des Fragmentions mit m/z 313 entsteht ein Fragmention mit m/z 245, aus welchem wiederum durch eine weitere Ringöffnung das Fragmention mit m/z 191 gebildet wird. Alle anderen Fragmentionen konnten keiner Struktur zugeordnet werden. Zur Erstellung der unter 2.3.2.1 beschriebenen MRM-Methode wurden aus diesen Produkt-Ionen-Spektren mit den Übergängen m/z 357-313, m/z 357-245 und m/z 357-191 drei für $\Delta 9$ -THCA-A charakteristische Übergänge ausgewählt. Der Übergang m/z 357-313 wurde zur Quantifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A verwendet, während die Übergänge m/z 357-245 und m/z 357-191 zur sicheren Identifizierung dienen.

Als Ausgangspunkt für die Entwicklung einer geeigneten Probenaufarbeitung wurde zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit Essigsäureethylester : Diethylether (1 : 1, V : V) bei einem pH-Wert von 6,0 getestet, welche sich als Probenaufarbeitung für die Bestimmung von $\Delta 9$ -THC-COOH und $\Delta 9$ -THC-COOH-Glucuronid in Urin mittels LC-MS/MS bewährt hatte ^[190]. Zunächst wurde versucht, die Extraktion durch Variation des pH-Wertes zu verbessern, wobei für verschiedene pH-Werte jedoch kein signifikanter Unterschied beobachtet wurde. Deshalb wurden im Anschluss verschiedene Lösungsmittel für die LLE getestet (Abb. 3.6). Dabei wurde das zunächst verwendete Lösungsmittelgemisch mit einem Gemisch aus Essigsäureethylester : n-Hexan (4 : 1, V : V), den Lösungsmitteln Essigsäureethylester und n-Hexan sowie einem Gemisch aus Essigsäureethylester : n-Hexan : Isopropanol (1 : 1 : 1, V : V : V) verglichen (jeweils $n = 5$). Unter Verwendung des unpolaren n-Hexans verlief die Extraktion deutlich schlechter als mit Essigsäureethylester bzw. dessen Gemischen. Eine verbesserte Extraktion ergab sich für das durch den Isopropanol-Anteil leicht polarere Gemisch aus gleichen Teilen Essigsäureethylester : n-Hexan : Isopropanol. Allerdings wurde bei allen für die LLE getesteten Lösungsmitteln ein hohes Rauschen beobachtet. Deshalb wurde die LLE zusätzlich mit einer standardisierten C_{18} -SPE verglichen. Mit der SPE-basierten Probenaufarbeitung (siehe Kapitel 2.4.2.1.3) konnte das Rauschen bei gleichzeitig guter Extraktion deutlich reduziert werden. Um einen Verlust von $\Delta 9$ -THCA-A im Waschschrift zu vermeiden, wurde die Zusammensetzung der Acetonitril-Wasser-Waschlösung von 70 : 30 (V : V) auf 40 : 60 (V : V) umgestellt ^[191].

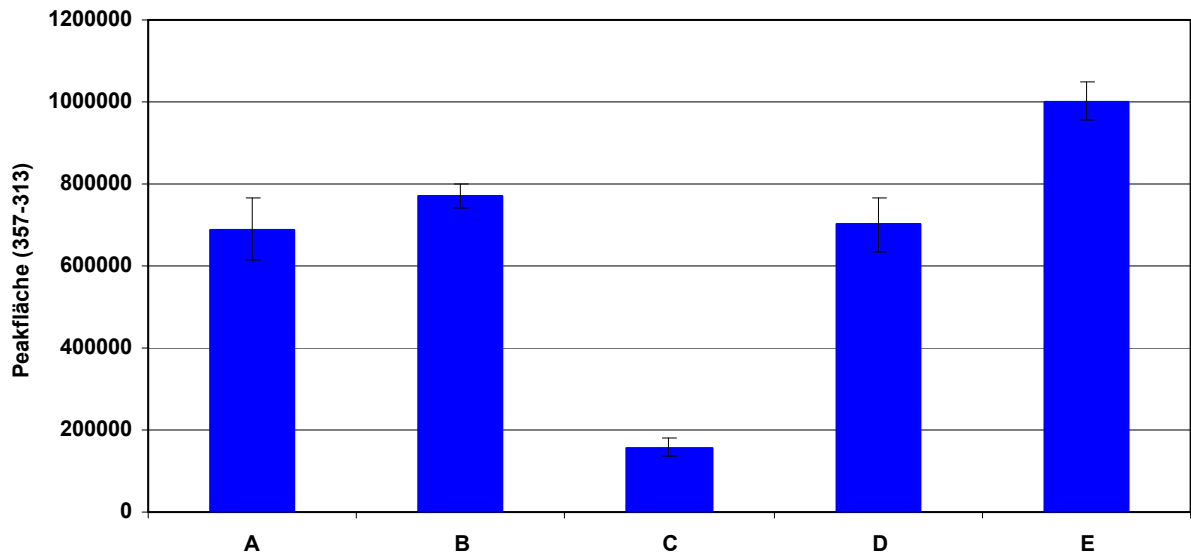


Abb. 3.6 Vergleich der Extraktion von $\Delta 9$ -THCA-A bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel für die LLE: Essigsäureethylester : Ether (1 : 1, V : V) (A), Essigsäureethylester : n-Hexan (4 : 1, V : V) (B), n-Hexan (C), Essigsäureethylester (D), Essigsäureethylester : n-Hexan : Isopropanol (1 : 1 : 1, V : V : V) (E).

Für die Quantifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A wurde im Serum von 0 bis 75 ng/ml, im Urin von 0 bis 100 ng/ml $\Delta 9$ -THCA-A kalibriert. Mit einem ungewichteten, linearen Kalibrationsmodell wurden mit Korrelationskoeffizienten (R^2) von 0,997 für Serum bzw. 0,998 für Urin gute Linearitäten erzielt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze der LC-MS/MS-Methode wurden durch die Berechnung von Signal-Rausch-Verhältnissen (S/N) ermittelt. Der Nachweisgrenze (LOD) wurde ein S/N größer drei, der Bestimmungsgrenze (LOQ) ein S/N größer 10 zugrunde gelegt. Für Serum und Urin ergab sich jeweils eine Nachweisgrenze von 2,5 ng/ml. Die Bestimmungsgrenzen lagen für Serum bei 7,5 ng/ml und für Urin bei 5,0 ng/ml.

Zusätzlich wurde die Wiederholpräzision ($n = 5$) der Methode bei 7,5 ng/ml und 25 ng/ml in Serum und Urin bestimmt. Die relativen Standardabweichungen betragen 8,5 % für Serum bzw. 2,0 % für Urin bei der niedrigen Konzentration sowie 7,1 % für Serum bzw. 4,0 % für Urin bei der hohen Konzentration.

3.2.1.2 Anwendung auf Realproben

Im Rahmen von Polizeikontrollen zu Fahren unter dem Einfluss von Drogen gewonnene Serum- und Urinproben wurden auf die Anwesenheit von $\Delta 9$ -THCA-A untersucht. In

Tabelle 3.1 sind die Konzentrationen von $\Delta 9$ -THCA-A sowie von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH zusammengefasst.

Tab. 3.1 Serum- und Urinkonzentrationen von $\Delta 9$ -THCA-A (LC-MS/MS) sowie von $\Delta 9$ -THC, 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH (GC-MS). (n.n.: nicht nachgewiesen).

Matrix	Probe	$\Delta 9$ -THCA-A [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC [ng/ml]	11-OH- $\Delta 9$ -THC [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC-COOH [ng/ml]
Serum	T-0074-06	n.n.	34	17	275
Serum	T-0086-06	< LOQ	43	16	208
Serum	T-0128-06	n.n.	85	38	325
Serum	T-0336-06	< LOQ	51	31	275
Serum	T-0424-06	< LOQ	39	31	223
Serum	T-0668-06	< LOQ	37	16	190
Serum	T-0821-06	< LOQ	49	8,4	107
Serum	T-0885-06	n.n.	35	9,2	101
Serum	T-1098-06	n.n.	34	11	117
Serum	T-1743-06	n.n.	31	11	89
Serum	T-2285-06	14,8	70	32	219
Serum	T-2292-06	< LOQ	39	22	227
Urin	T-0824-06	n.n.	n.n.	n.n.	675
Urin	T-0984-06	n.n.	n.n.	n.n.	117
Urin	T-0985-06	n.n.	n.n.	n.n.	275
Urin	T-1014-06	n.n.	n.n.	n.n.	275
Urin	T-1354-06	n.n.	n.n.	n.n.	600
Urin	T-1552-06	n.n.	n.n.	n.n.	625
Urin	T-1610-06	n.n.	n.n.	n.n.	425
Urin	T-1627-06	n.n.	n.n.	n.n.	600
Urin	T-1698-2-06	5,0	n.n.	n.n.	4395
Urin	T-1698-3-06	10,9	n.n.	n.n.	2155
Urin	T-1795-06	n.n.	n.n.	n.n.	6525
Urin	T-1829-06	n.n.	n.n.	n.n.	275

Die Konzentrationen von $\Delta 9$ -THCA-A wurden mit der neu entwickelten LC-MS/MS-Methode, die Konzentrationen von $\Delta 9$ -THC, 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH hingegen mit dem Labor-internen, validierten Standardverfahren zur Bestimmung von Cannabinoiden in Serum und Urin mittels GC-MS ermittelt.

Mit den oben genannten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gelang der Nachweis von unkonjugierter $\Delta 9$ -THCA-A nur in sieben der zwölf untersuchten Serumproben und sogar nur in zwei der zwölf untersuchten Urinproben. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass $\Delta 9$ -THCA-A nicht unverändert im Urin ausgeschieden wird, sondern *in-vivo* einer metabolischen Veränderung unterliegt. Wie für $\Delta 9$ -THC sind einerseits vielfältige oxidative Veränderungen möglich, andererseits kommt aber auch eine direkte Umsetzung von $\Delta 9$ -THCA-A durch die UDP-Glucuronyl-Transferase zu $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid in Betracht.

In allen zwölf untersuchten Serumproben wurden Spuren von $\Delta 9$ -THCA-A detektiert, allerdings wurde nur in sechs Serumproben die Nachweisgrenze von 2,5 ng/ml und sogar nur in einer Serumprobe die Bestimmungsgrenze von 7,5 ng/ml überschritten (Abb. 3.7, oben).

Charakteristisch für alle Serumproben waren die im Vergleich zu den $\Delta 9$ -THC-Konzentrationen relativ geringen $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen. Daraus ergaben sich molare Verhältnisse von $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC von 5,0 bis 18,6 %. Nur in der Serumprobe mit einer $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration von 14,8 ng/ml ergab sich mit 18,6 % ein hoher Wert für das molare Verhältnis von $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC. Die hohe $\Delta 9$ -THC-Konzentration von 70 ng/ml deutet dabei auf einen kurzen zeitlichen Abstand zwischen dem letztem Cannabis-Konsum und der Blutentnahme hin. In diesem speziellen Fall vergingen zwischen der Verkehrskontrolle durch die Polizei und der Blutentnahme nur ungefähr 17 min, eine relativ geringe Zeitspanne verglichen mit der durchschnittlichen Zeitspanne von etwa 60 min bei Proben aus Straßenverkehrsfällen, die im Institut für Rechtsmedizin untersucht wurden. Darüber hinaus ist aufgrund der hohen $\Delta 9$ -THC-COOH-Konzentration im Serum ein regelmäßiger Cannabis-Konsum anzunehmen.

Nimmt man für $\Delta 9$ -THCA-A eine deutlich kürzere Eliminationshalbwertszeit an als für $\Delta 9$ -THC, so korreliert ein hoher Wert für das molare Verhältnis von $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC mit einer kurzen Zeitspanne zwischen letztem Cannabis-Konsum und Blutentnahme.

Im Urin konnte unkonjugierte Δ^9 -THCA-A nur bei sehr hohen Δ^9 -THC-COOH-Konzentrationen (2135 ng/ml bzw. 4395 ng/ml) nachgewiesen werden (Abb. 3.7, unten), welche auf einen regelmäßigen Cannabis-Konsum schließen lassen. In der Urinprobe mit der höchsten Δ^9 -THC-COOH-Konzentration (6525 ng/ml) gelang der Nachweis jedoch nicht. Möglicherweise liegt der überwiegende Teil der im Urin ausgeschiedenen Δ^9 -THCA-A in Form oxidativer Metabolite oder Glucuronide vor. Bei einer deutlich kürzeren Eliminationshalbwertszeit von Δ^9 -THCA-A bzw. von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten verglichen mit Δ^9 -THC-COOH, würde deren Nachweis wiederum auf einen kurz zurückliegenden Cannabis-Konsum hindeuten.

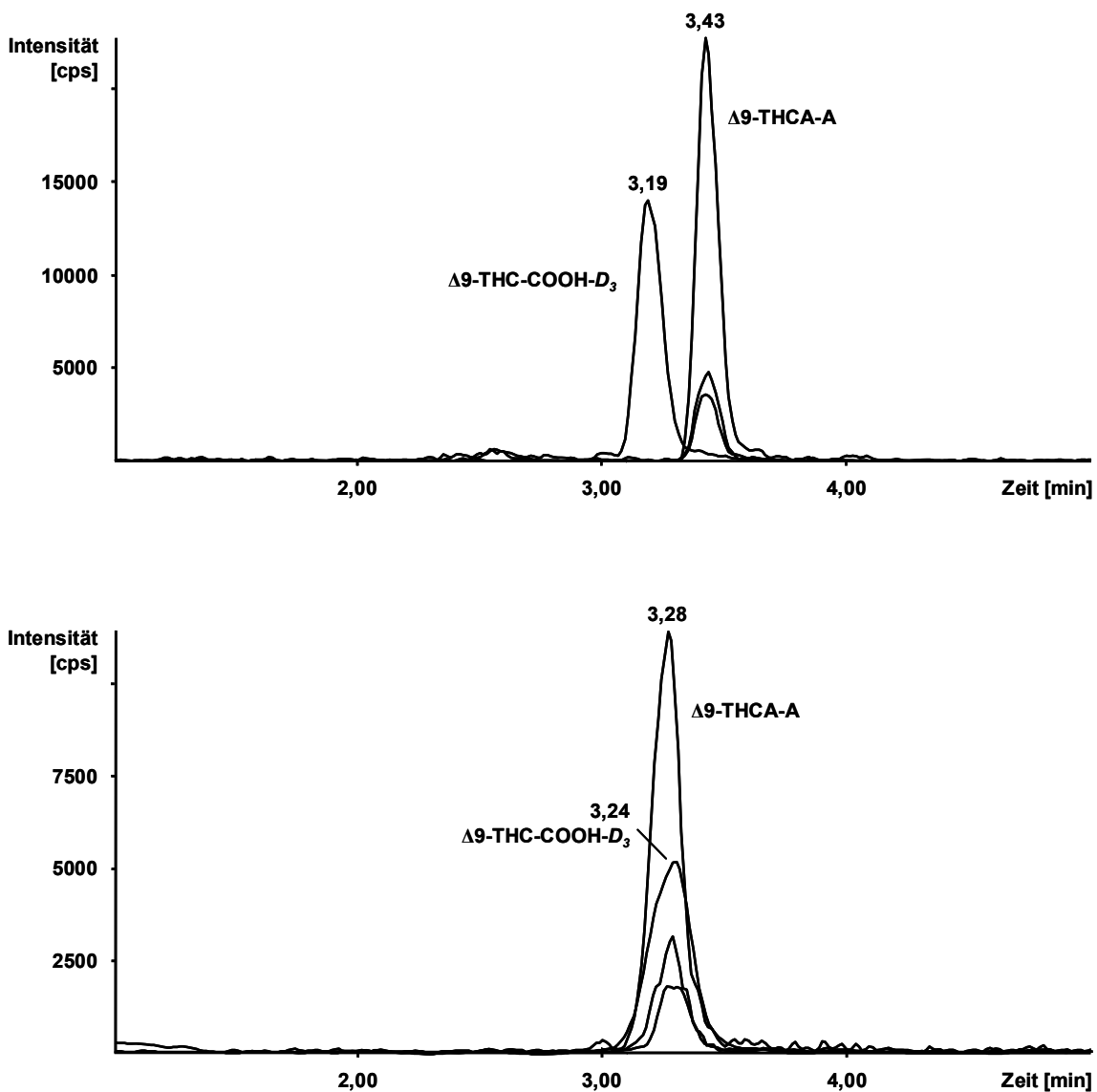


Abb. 3.7 Rekonstruierte LC-ESI-MRM Ionenchromatogramme von Δ^9 -THCA-A (m/z 357-313, m/z 357-245 und m/z 357-191) und dem IS Δ^9 -THC-COOH- D_3 (m/z 346-302) in der Serumprobe mit 14,8 ng/ml Δ^9 -THCA-A (oben) bzw. in der Urinprobe mit 10,9 ng/ml Δ^9 -THCA-A (unten). Die unterschiedlichen Retentionszeiten ergaben sich durch die Messung der Serum- und Urinproben in unterschiedlichen Serien.

3.2.2 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A im Serum mittels GC-MS

3.2.2.1 Methodenentwicklung

Zunächst wurde ein EI-Massenspektrum von Δ^9 -THCA-A nach Trimethylsilylierung im Full-Scan-Modus aufgenommen und mit dem Referenzspektrum aus der MPW-Spektrenbibliothek verglichen (Abb. 3.8) ^[192].

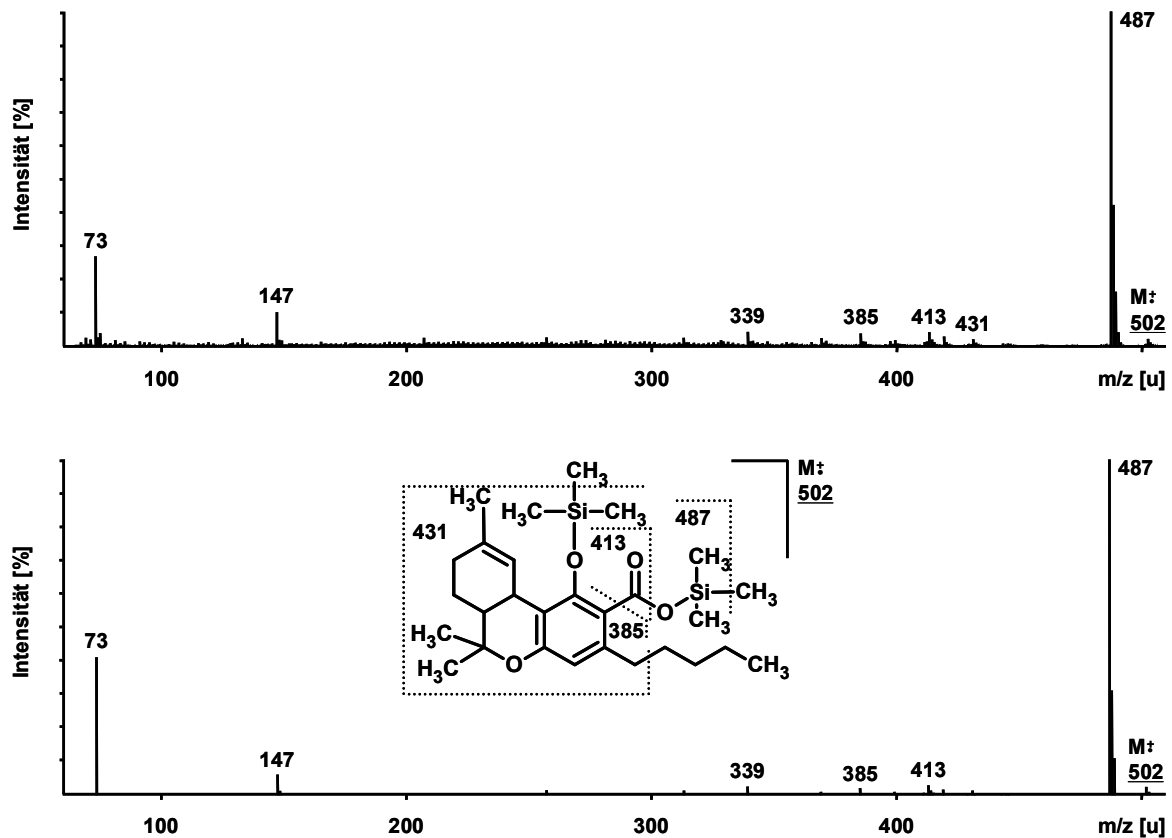


Abb. 3.8 GC-EI-MS-Spektrum und vorherrschendes Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A nach Trimethylsilylierung: Aufgenommenes Spektrum (oben), Referenzspektrum aus der MPW-Spektrenbibliothek (unten).

Δ^9 -THCA-A zeigt nach Trimethylsilylierung ein Moleküllion von m/z 502. Aus diesem entsteht durch die Abspaltung einer Methyl-Gruppe aus der trimethylsilylierten Carboxyl-Gruppe das Fragmentation mit m/z 487 ^[193]. Bei den Fragmentationen mit m/z 488 (40,2 % der Intensität des Fragmentions mit m/z 487 ^[194]) und m/z 489 (15,2 % der Intensität des Fragmentions mit m/z 487 ^[194]) handelt es sich um Isotopenpeaks des Fragmentions mit m/z 487. Kommt es nach Abspaltung der Methyl-Gruppe zusätzlich zu einer Allyl-Spaltung der Pentyl-Seitenkette führt dies zu einem Fragmentation mit

m/z 431. Das Fragmentation mit m/z 413 entsteht durch die Abspaltung von $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$ aus der trimethylsilylierten Carboxyl-Gruppe unter Bildung eines stabilen Acyliumions ($\text{R}-\text{C}^+=\text{O}$) [193]. Durch Abspaltung der trimethylsilylierten Carboxyl-Gruppe aus dem Molekülion entsteht dagegen das Fragmentation mit m/z 385. Das Fragmentation mit m/z 339 konnte keiner Struktur zugeordnet werden.

Für die Extraktion der Cannabinoide wurde die unter 2.4.2.2.3 beschriebene, SPE-basierte Probenvorbereitung verwendet. Dieses Verfahren wird auch im Rahmen des Labor-internen, validierten Standardverfahrens zur Bestimmung von Cannabinoiden in Serum und Urin mittels GC-MS eingesetzt und hat sich in der Vergangenheit aufgrund hoher Extraktionsausbeuten und geringer Matrixbelastung für die Extraktion von Δ^9 -THC und dessen Metaboliten aus Serum und Urin bewährt. Um auch bei niedrigen Konzentrationen eine zuverlässige Quantifizierung der Cannabinoide gewährleisten zu können, ist jedoch ein Probenvolumen von 1 ml Serum erforderlich.

Zur Quantifizierung wurden die Cannabinoide mit der unter 2.3.2.2 beschriebenen GC-MS-Methode im SIM-Modus detektiert. Zur routinemäßigen Erfassung von Δ^9 -THCA-A wurde die oben genannte GC-MS-Methode um ein zusätzliches Zeitfenster erweitert. Gemäß den forensischen Richtlinien werden dabei für jeden Analyten drei charakteristische Ionen (ein Ion für die Quantifizierung, zwei weitere Ionen für die sichere Identifizierung) aufgezeichnet. Die Auswahl geeigneter Ionen war jedoch sehr begrenzt, da das Massenspektrum von Δ^9 -THCA-A mit dem Fragmentation m/z 487 lediglich ein intensives Ion aufweist. Die hohe Intensität dieses Fragmentations ist darauf zurückzuführen, dass nach Abspaltung einer Methyl-Gruppe aus der trimethylsilylierten Carboxyl-Gruppe des Molekülions ein stabiles, cyclisches Ion gebildet wird, dessen Ladung an den beiden derivatisierten funktionellen Gruppen lokalisiert ist (Abb. 3.9) [193].

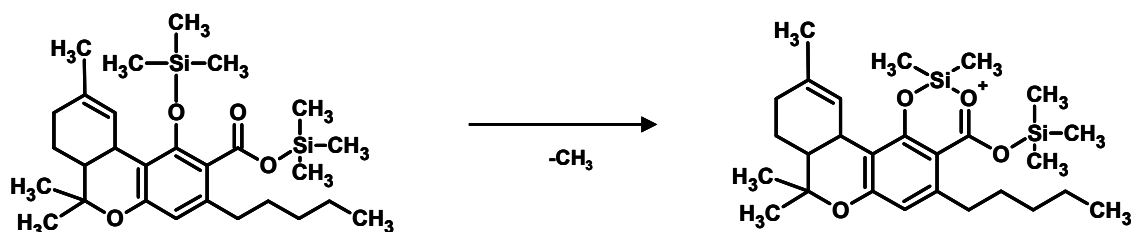


Abb. 3.9 Bildung des stabilen, cyclischen Fragmentions mit m/z 487.

Aus dem Massenspektrum wurden die Ionen m/z 487, m/z 488 und m/z 489 als charakteristische Fragmentationen für das trimethylsilylierte Δ^9 -THCA-A-Derivat ausgewählt. Das Massenspektrum von Δ^9 -THCA-A weist zwar noch weitere charakteristische Ionen (m/z 502, m/z 431, m/z 413, m/z 385 und m/z 339) auf, allerdings war deren Intensität zu gering, um diese für eine sichere Identifizierung heranziehen zu können.

Die Methylierung, welche vielfach für den Cannabinoid-Nachweis eingesetzt worden war ^[195-200], wurde als alternative Derivatisierungsmethode getestet. Dazu wurde Δ^9 -THCA-A sowohl durch direkte Umsetzung mit Kaliumcarbonat/Iodmethan als auch extraktiv methyliert. Von einer Methylierung mit Diazomethan wurde aufgrund der Toxizität des Reagenzes abgesehen. Bei der direkten Methylierung konnte keine Derivatisierung von Δ^9 -THCA-A erzielt werden, während die extraktive Methylierung zu einem zweifach methylierten Δ^9 -THCA-A-Derivat führte (Abb. 3.10).

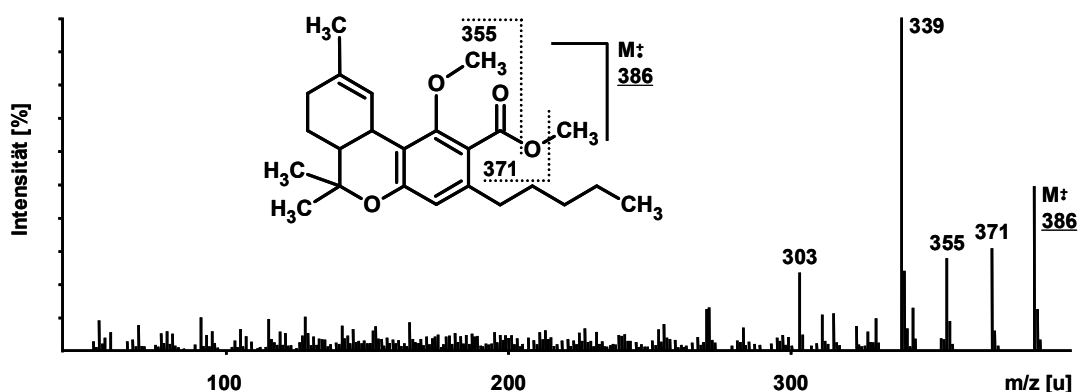


Abb. 3.10 GC-EI-MS-Spektrum von Δ^9 -THCA-A nach extraktiver Methylierung.

Δ^9 -THCA-A zeigt nach vollständiger Methylierung ein Molekülion von m/z 386. Das Fragmentation mit m/z 371 wird aus dem Molekülion durch die Abspaltung der Methylgruppe aus der methylierten Carboxyl-Gruppe gebildet. Durch die Abspaltung von OCH_3 aus der methylierten Carboxyl-Gruppe entsteht unter Bildung eines stabilen Acyliumions (R-C=O^+) ein Fragmentation mit m/z 355 ^[193]. Die Fragmentationen mit m/z 339 und mit m/z 303 konnten keiner Struktur zugeordnet werden.

Nach extraktiver Methylierung wurden neben zweifach methylierter Δ^9 -THCA-A jedoch Spuren von methyliertem sowie underivatisiertem Δ^9 -THC nachgewiesen. Da Δ^9 -THCA-A im Alkalischen leicht unter Bildung von Δ^9 -THC decarboxyliert ^[44], ist davon

auszugehen, dass $\Delta 9$ -THCA-A während der Methylierung durch die alkalischen Bedingungen nach Zugabe von TMAH teilweise zu $\Delta 9$ -THC zersetzt wird. Folglich eignet sich die Methylierung nicht als Derivatisierung für die quantitative Bestimmung von $\Delta 9$ -THCA-A.

Die GC-MS-Methode nach Trimethylsilylierung zeigte wie bereits für $\Delta 9$ -THC und dessen Metabolite 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH auch für $\Delta 9$ -THCA-A eine hohe Selektivität. In zehn verschiedenen Leerseren ergaben sich keine Störsignale in den Ionenspuren bei der Retentionszeit von $\Delta 9$ -THCA-A. Die Quantifizierung der Cannabinoide erfolgte unter Verwendung von Kalibrationskurven, welche mit dotierten Serum-Kalibratoren erstellt worden waren. Um zu überprüfen, ob $\Delta 9$ -THCA-A die Quantifizierung von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten beeinflusst, wurden zwei Sechs-Punkt-Kalibrationen (1,0 bis 7,5 ng/ml) für $\Delta 9$ -THCA-A erstellt, zum einen in Anwesenheit von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten bei einer Konzentration von 2,0 ng/ml $\Delta 9$ -THC, 2,0 ng/ml 11-OH- $\Delta 9$ -THC und 10,0 ng/ml $\Delta 9$ -THC-COOH, zum anderen ohne deren Anwesenheit. Die Konzentrationen von $\Delta 9$ -THC, 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH wurden anschließend unter Verwendung entsprechender Kalibrationskurven berechnet (Tab. 3.2).

Tab. 3.2 Berechnete Konzentrationen von $\Delta 9$ -THC, 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH bei der Kalibration für $\Delta 9$ -THCA-A in Anwesenheit einer nominalen Konzentration von 2 ng/ml $\Delta 9$ -THC, 2 ng/ml 11-OH- $\Delta 9$ -THC und 10 ng/ml $\Delta 9$ -THC-COOH.

	$\Delta 9$ -THCA-A, dotiert [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC [ng/ml]	11-OH- $\Delta 9$ -THC [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC-COOH [ng/ml]
Kalibrator 1	1,0	1,85	1,84	9,32
Kalibrator 2	2,0	1,90	1,84	9,27
Kalibrator 3	3,0	1,89	1,88	9,48
Kalibrator 4	4,0	1,96	1,92	9,69
Kalibrator 5	5,0	1,97	1,90	9,89
Kalibrator 6	7,5	1,96	1,84	9,43
Sollwert [ng/ml]	-	2,00	2,00	10,00
Mittelwert [ng/ml]	-	1,92	1,87	9,51
Bias [%]	-	-3,92	-6,50	-4,87

$\Delta 9$ -THCA-A beeinflusst die Quantifizierung von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten nicht. Für die Quantifizierung anhand der Peakflächenverhältnisse (Analyt vs. IS) wurden deuterierte Analoga von $\Delta 9$ -THC, 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH verwendet, da für $\Delta 9$ -THCA-A kein deuteriertes Analogon kommerziell verfügbar war. Die

Kalibrationskurven von $\Delta 9$ -THCA-A beider Sechs-Punkt-Kalibrationen wurden jeweils mit $\Delta 9$ -THC- D_3 , 11-OH- $\Delta 9$ -THC- D_3 und $\Delta 9$ -THC-COOH- D_3 als IS ermittelt (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Kalibrationskurven von $\Delta 9$ -THCA-A beider Sechs-Punkt-Kalibrationen unter Verwendung von $\Delta 9$ -THC- D_3 , 11-OH- $\Delta 9$ -THC- D_3 und $\Delta 9$ -THC-COOH- D_3 als IS.

IS	Kalibration $\Delta 9$ -THCA-A			Kalibration $\Delta 9$ -THCA-A + 2/2/10		
	Steigung	y-Achsenabschnitt	R^2	Steigung	y-Achsenabschnitt	R^2
$\Delta 9$ -THC- D_3	0,2429	0,1121	0,9816	0,2174	0,0144	0,9866
11-OH- $\Delta 9$ -THC- D_3	0,0541	0,0311	0,9763	0,0479	0,0008	0,9903
$\Delta 9$ -THC-COOH- D_3	0,0321	0,0154	0,9931	0,0293	0,0011	0,9851

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit und damit vergleichbaren Polarität sowie des guten Korrelationskoeffizienten (R^2) wurde $\Delta 9$ -THC-COOH- D_3 als IS für $\Delta 9$ -THCA-A gewählt. Mit einem ungewichteten, linearen Regressionsmodell wurde in einem Konzentrationsbereich von 1,0 bis 7,5 ng/ml eine gute Linearität ($R^2 = 0,9931$) erzielt. Nach DIN 32645 ^[201] wurden für die Methode ein LOD von 0,6 ng/ml (α -Fehler 0,05) und ein LOQ von 2,0 ng/ml (α -Fehler 0,05) berechnet. Die Wiederholpräzision (n = 8) der Methode wurde mit zwei Qualitätskontrollen bei 1,0 ng/ml (Low) und 5 ng/ml (High) ermittelt, welche in jeder Serie mitgeführt wurden (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 Wiederholpräzision der GC-MS-Methode für $\Delta 9$ -THCA-A.

Serie	Qualitätskontrolle Low		Qualitätskontrolle High	
	Nominelle Konzentration [ng/ml]	Berechnete Konzentration [ng/ml]	Nominelle Konzentration [ng/ml]	Berechnete Konzentration [ng/ml]
1	1,0	1,16	5,0	3,97
2	1,0	1,08	5,0	4,42
3	1,0	1,13	5,0	3,95
4	1,0	1,18	5,0	4,50
5	1,0	1,07	5,0	4,37
6	1,0	1,05	5,0	3,75
7	1,0	1,06	5,0	3,50
8	1,0	1,04	5,0	3,81
Mittelwert [ng/ml]	-	1,10	-	4,03
Standardabweichung [%]	-	5,32	-	35,98
Bias [%]	-	+9,62	-	-19,33

Beim Einsatz der erweiterten GC-MS-Methode in der Routineanalytik zeigte sich, dass mit zunehmendem Verschmutzungsgrad des Injektors (Glasliner) die Stabilität des trimethylsilylierten $\Delta 9$ -THCA-A-Derivates abnahm. Es ist anzunehmen, dass die durch die Verschmutzung entstehende, aktive Stellen für eine partielle Zerstörung des Derivates verantwortlich sind. Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein speziell beschichteter Glasliner (Siltek[®], Restek, Bad Homburg, Deutschland) getestet. Zwar wurden beim Einsatz dieses Siltek[®]-Liners hinsichtlich der Stabilität des trimethylsilylierten $\Delta 9$ -THCA-A-Derivates Verbesserungen erzielt, allerdings verbunden mit einer deutlichen Abnahme der Intensitäten und Peakflächen aller in der Methode erfassten Cannabinoide. Eine plausible Erklärung für diese Beobachtung konnte nicht gefunden werden. Von einem Einsatz der Siltek[®]-Liner in der Routineanalytik wurde deshalb abgesehen.

3.2.2.2 Anwendung auf Realproben

Mit der erweiterten GC-MS-Methode wurden 200 Serumproben aus Straßenverkehrsfällen analysiert (Abb. 3.11). Der Konsum von Cannabis konnte in 187 Fällen (93,5 %) durch den Nachweis von $\Delta 9$ -THC bzw. dessen Metaboliten 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH bestätigt werden. In 153, d.h. in 81,8 % dieser positiven Fälle wurde ebenfalls $\Delta 9$ -THCA-A nachgewiesen, die Bestimmungsgrenze von 2,0 ng/ml wurde jedoch nur in 30 Fällen (16,0 %) überschritten.

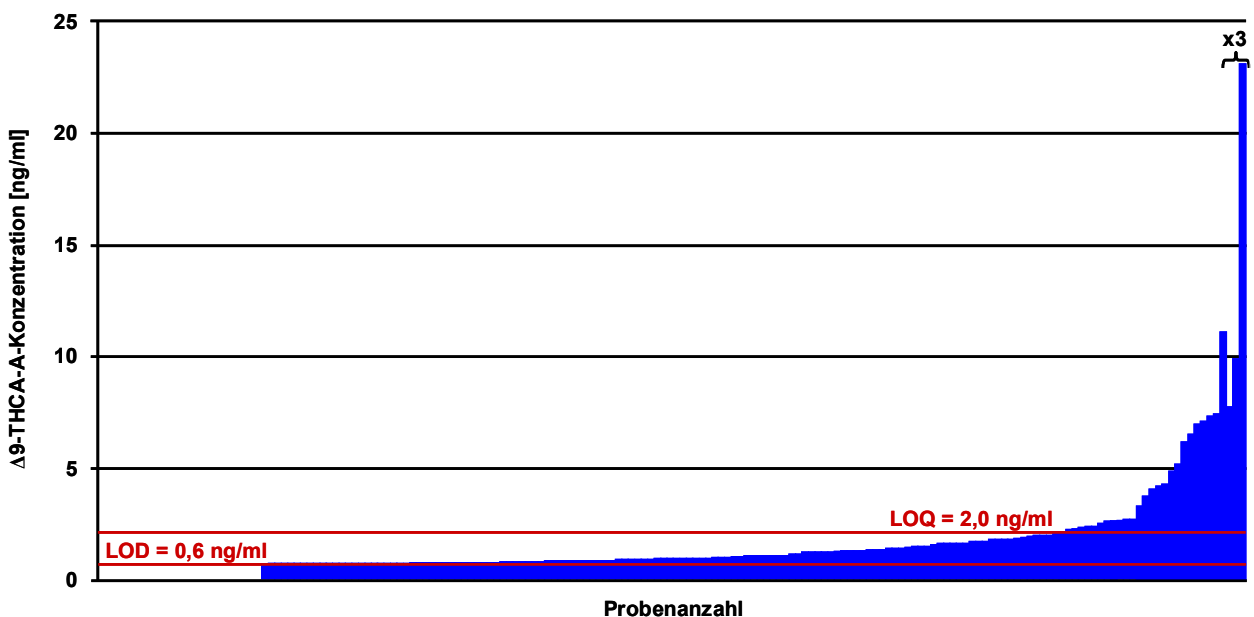


Abb. 3.11 Verteilung der $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen in 200 untersuchten Serumproben.

In keinem dieser 200 Fälle gelang bei negativem $\Delta 9$ -THC-Befund der Nachweis von $\Delta 9$ -THCA-A. Die berechneten $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen bewegten sich in einem Konzentrationsbereich von 0,6 bis 69,0 ng/ml, wobei die Konzentrationen von $\Delta 9$ -THCA-A in der Mehrzahl der Fälle niedriger waren als die von $\Delta 9$ -THC. Nur in 17 Fällen lagen die $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen über der $\Delta 9$ -THC-Konzentration, wobei wiederum lediglich in vier Fällen eine deutlich höhere $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration zu verzeichnen war. Die Konzentrationen von $\Delta 9$ -THCA-A, $\Delta 9$ -THC, 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH sind für alle untersuchten Proben im Anhang (Kapitel 7.2) aufgeführt. In Abb. 3.12 ist exemplarisch das GC-EI-SIM-Ionenchromatogramm eines Serumextraktes mit 7,8 ng/ml $\Delta 9$ -THC, 3,9 ng/ml 11-OH- $\Delta 9$ -THC, 5,1 ng/ml $\Delta 9$ -THCA-A und 41,0 ng/ml $\Delta 9$ -THC-COOH dargestellt. CBD und CBN wurden in dieser Probe nicht nachgewiesen.

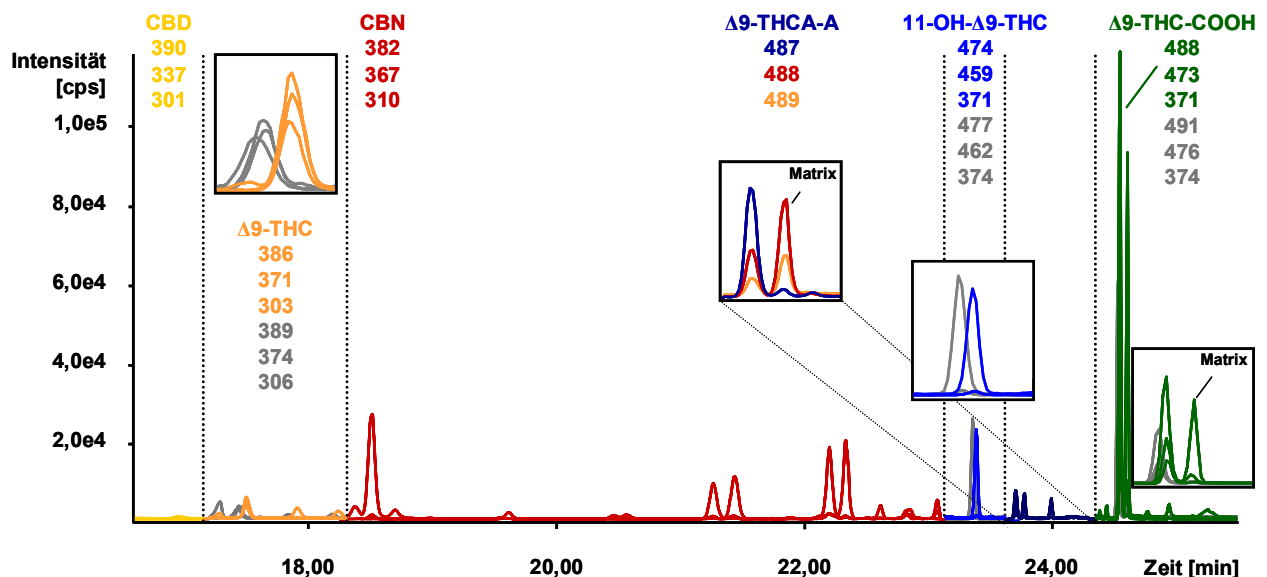


Abb. 3.12 Rekonstruiertes GC-EI-SIM Ionenchromatogramm einer Serumprobe mit 7,8 ng/ml $\Delta 9$ -THC, 3,9 ng/ml 11-OH- $\Delta 9$ -THC, 5,1 ng/ml $\Delta 9$ -THCA-A und 41,0 ng/ml $\Delta 9$ -THC-COOH. Die IS sind in Grau dargestellt. Die gepunkteten Linien markieren die SIM-Zeitfenster.

Eine Korrelation zwischen den Konzentrationen von $\Delta 9$ -THCA-A und denen von $\Delta 9$ -THC oder dessen Metaboliten wurde nicht festgestellt. Hierfür können u. a. variierende Gehalte an $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC im konsumierten Material, unterschiedliche Konsumtechniken verbunden mit verschieden ausgeprägter Decarboxylierungsrate von $\Delta 9$ -THCA-A, Unterschiede in den Bioverfügbarkeiten (orale vs. inhalative Absorption) sowie intra-interindividuelle Variationen in Metabolismus, Umverteilung und Elimination von $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC verantwortlich sein.

3.2.3 Quantifizierung von Δ^9 -THCA-A und weiteren Cannabinoiden im Serum mittels GC-MS/MS

3.2.3.1 Methodenentwicklung

Seit Mitte 2007 stand eine Aufrüstung des zuvor eingesetzten GC-MS zum GC-MS/MS zur Verfügung, dessen Anwendbarkeit für die Quantifizierung von Cannabinoiden und Potential zur Empfindlichkeitssteigerung v.a. hinsichtlich Δ^9 -THCA-A untersucht werden sollte. Für die Methodenentwicklung wurden aus den Single-Quadrupol-Massenspektren der Cannabinoide und ihrer deuterierten Analoga zunächst Precursor-Ionen für die Aufnahme von Produkt-Ionen-Spektren ausgewählt (Abb. 3.13).

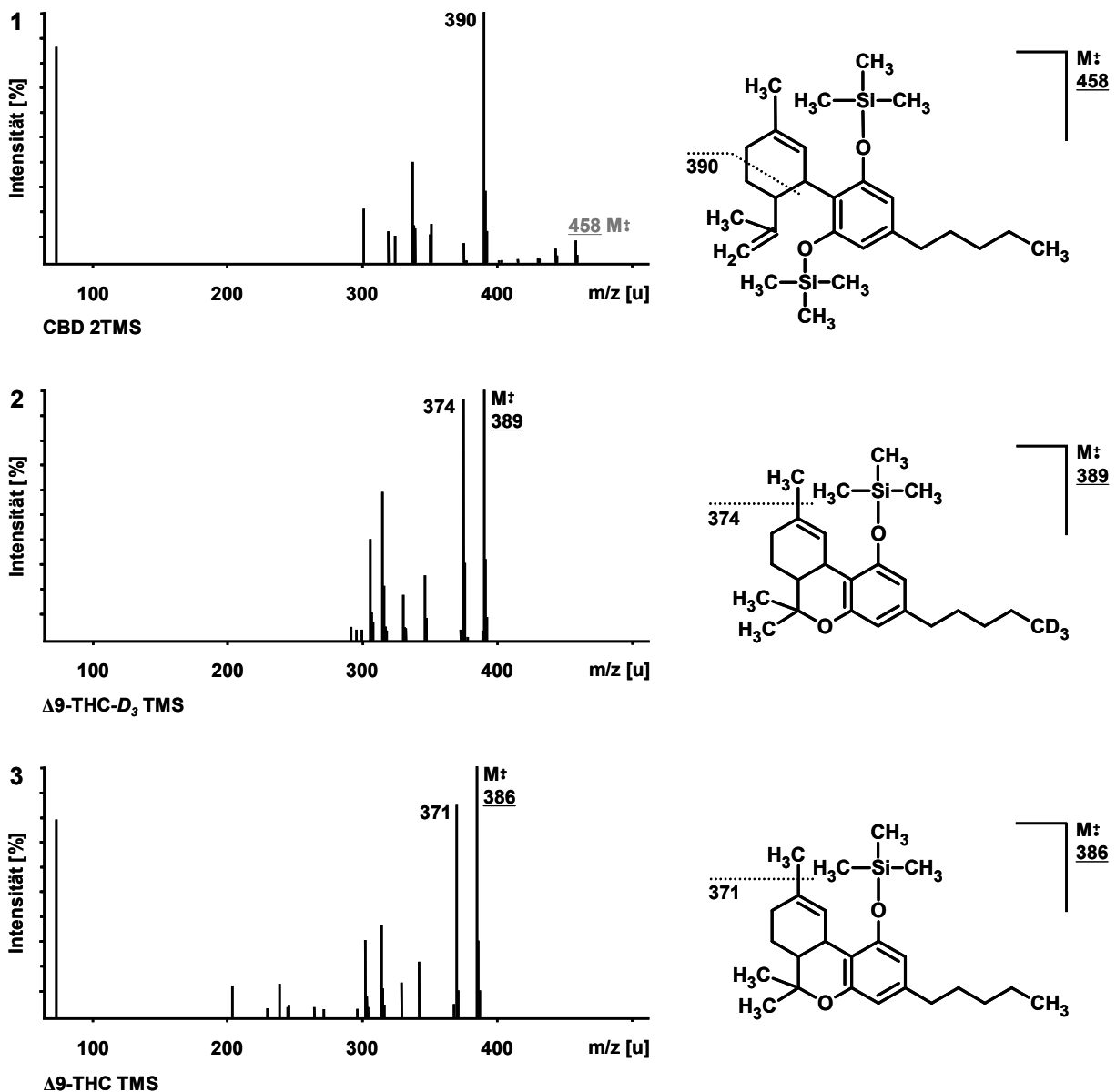


Abb. 3.13 GC-EI-MS-Spektren und ausgewählte Precursor-Ionen von CBD, Δ^9 -THC- D_3 , Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 , 11-OH- Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THC-COOH- D_3 und Δ^9 -THC-COOH.

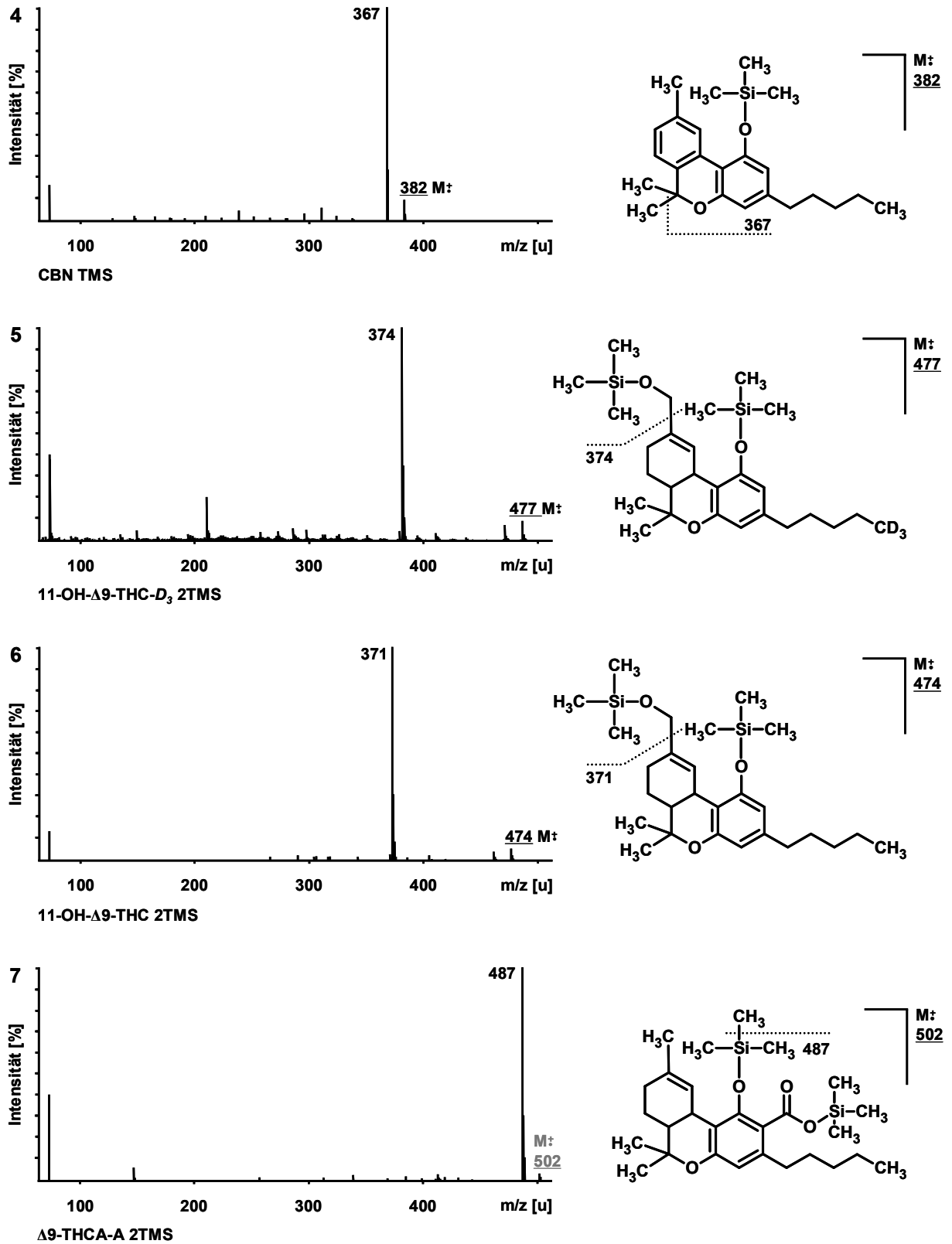


Abb. 3.13 (Fortsetzung).

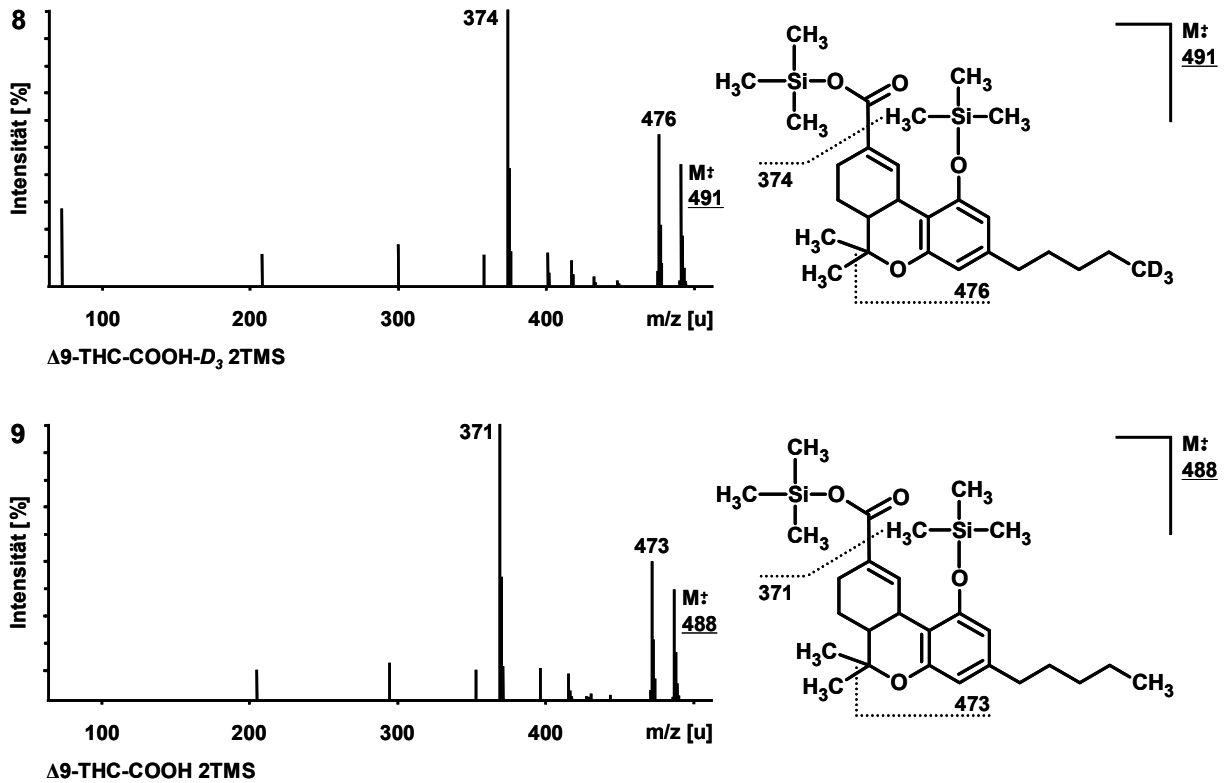


Abb. 3.13 (Fortsetzung).

Mit Ausnahme von CBD und Δ^9 -THCA-A, deren Molekülonen eine zu geringe Intensität für die Aufnahme von Produkt-Ionen-Spektren besaßen, wurden die Molekülonen der trimethylsilylierten Derivate sowie ein oder zwei intensive Fragmentationen als Precursor-Ionen herangezogen. Es wurden folgende Fragmentationen ausgewählt: Für CBD das durch eine Retro-Diels-Alder-Spaltung des Terpenrings entstehende Fragmentation mit m/z 390, für CBN sowie für Δ^9 -THC-COOH- D_3 und Δ^9 -THC-COOH die durch Abspaltung einer der beiden geminalen Methyl-Gruppen entstehenden Fragmentationen mit m/z 367, m/z 473 bzw. m/z 476 sowie für Δ^9 -THC- D_3 , Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 , 11-OH- Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH- D_3 und Δ^9 -THC-COOH das durch Abspaltung des Restes in Position 11 entstehende Fragmentation mit m/z 371 bzw. m/z 374 [193, 202].

Alle Produkt-Ionen-Spektren wurden bei einer Kollisionsenergie von -12 eV aufgenommen (Abb. 3.14). Diese Kollisionsenergie wird einerseits vom Hersteller für die Aufnahme von Produkt-Ionen-Spektren empfohlen, andererseits haben Vorversuche gezeigt, dass sich die bei einer Kollisionsenergie von -12 eV aufgenommenen Produkt-Ionen-Spektren nicht wesentlich von den bei anderen Kollisionsenergien (-9 eV bzw. -15 eV) aufgenommenen Produkt-Ionen-Spektren unterscheiden.

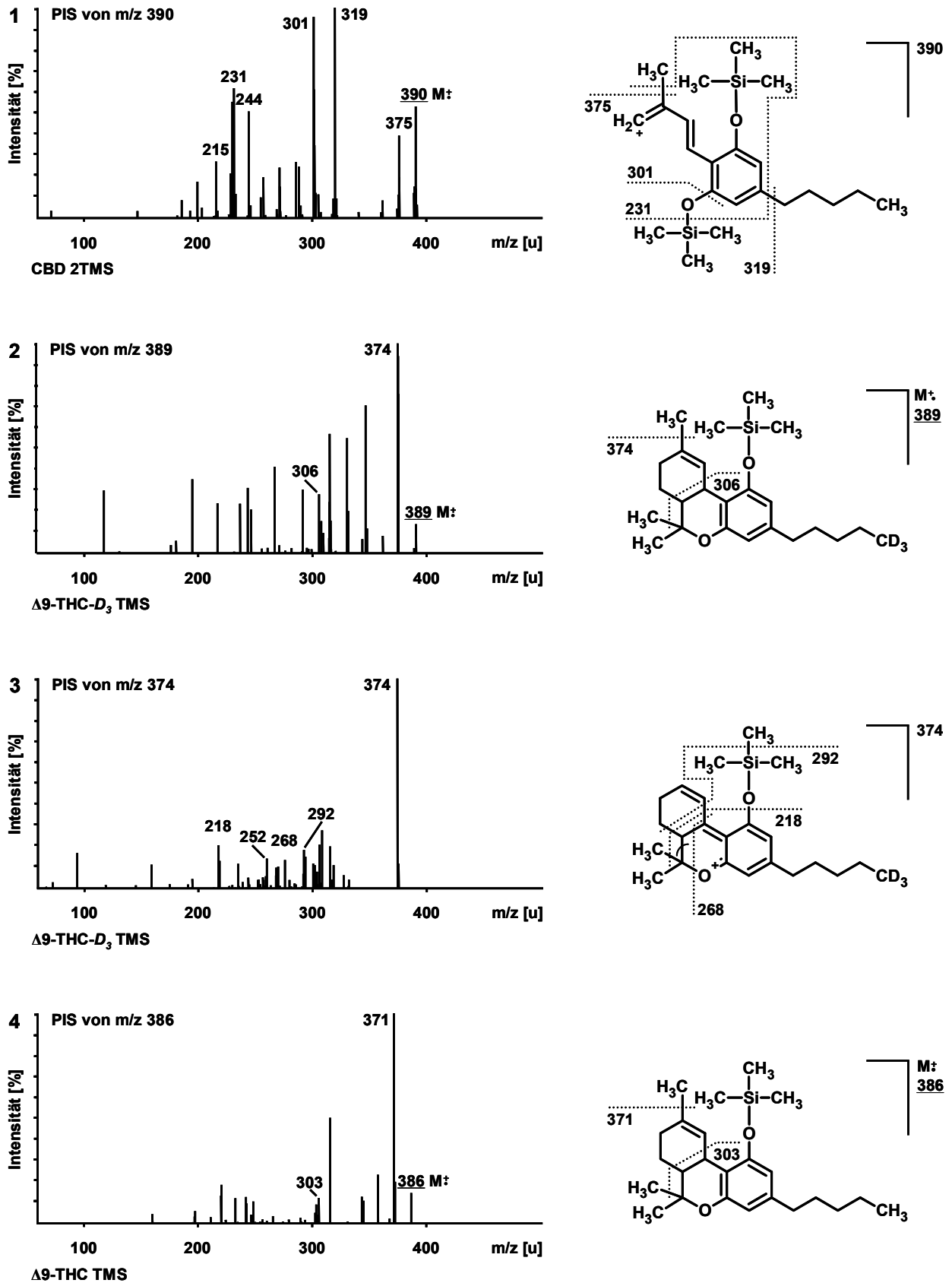


Abb. 3.14 GC-EI-MS/MS-Produkt-Ionen-Spektren (PIS) von CBD, $\Delta 9$ -THC- D_3 , $\Delta 9$ -THC, CBN, 11-OH- $\Delta 9$ -THC- D_3 , 11-OH- $\Delta 9$ -THC, $\Delta 9$ -THCA-A, $\Delta 9$ -THC-COOH- D_3 und $\Delta 9$ -THC-COOH.

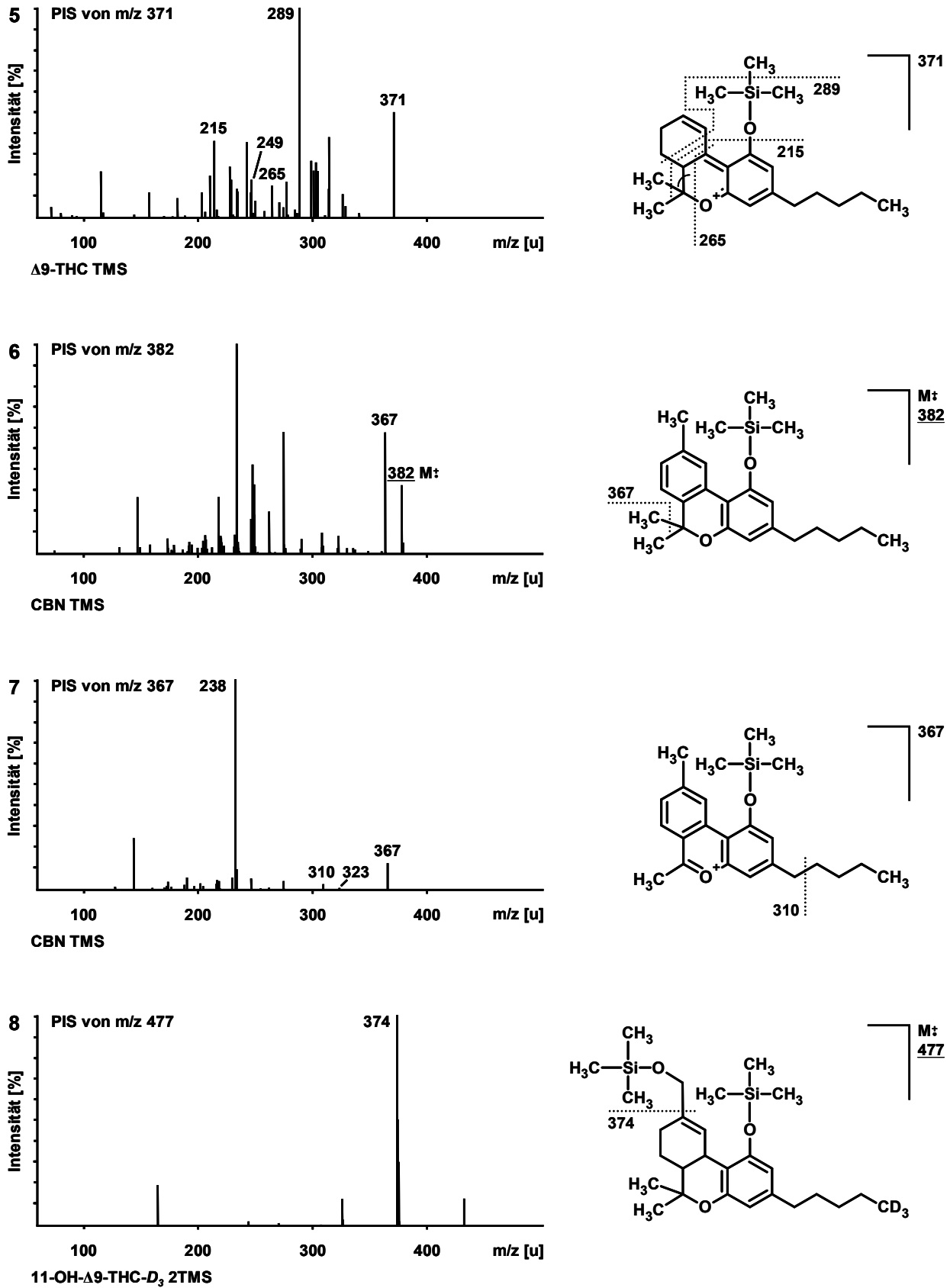


Abb. 3.14 (Fortsetzung).

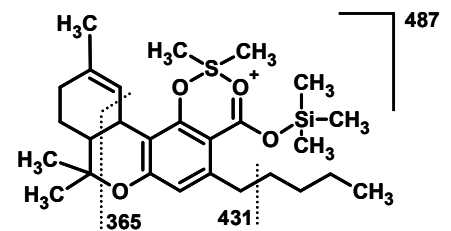
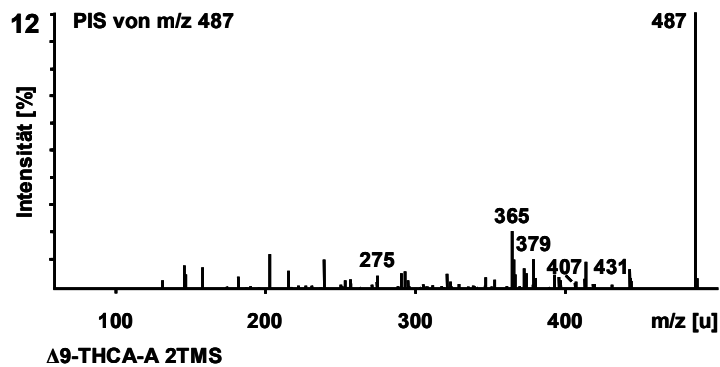
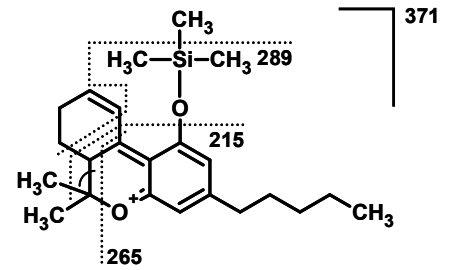
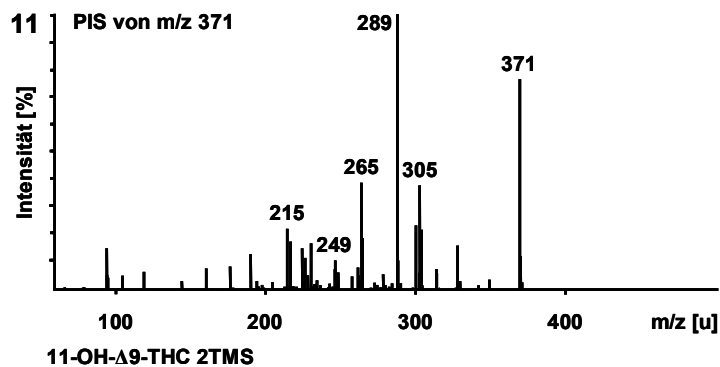
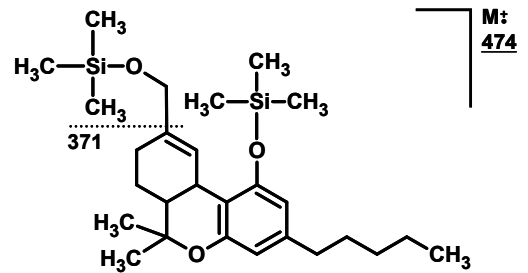
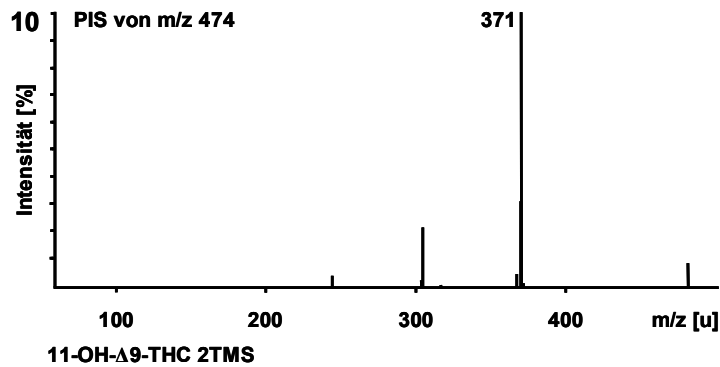
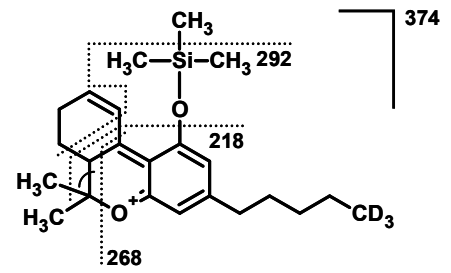
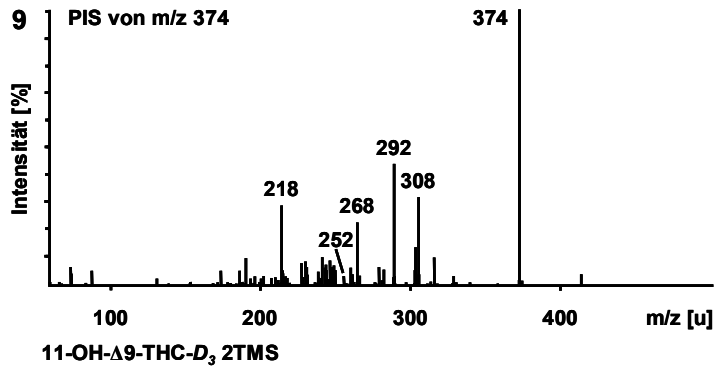


Abb. 3.14 (Fortsetzung).

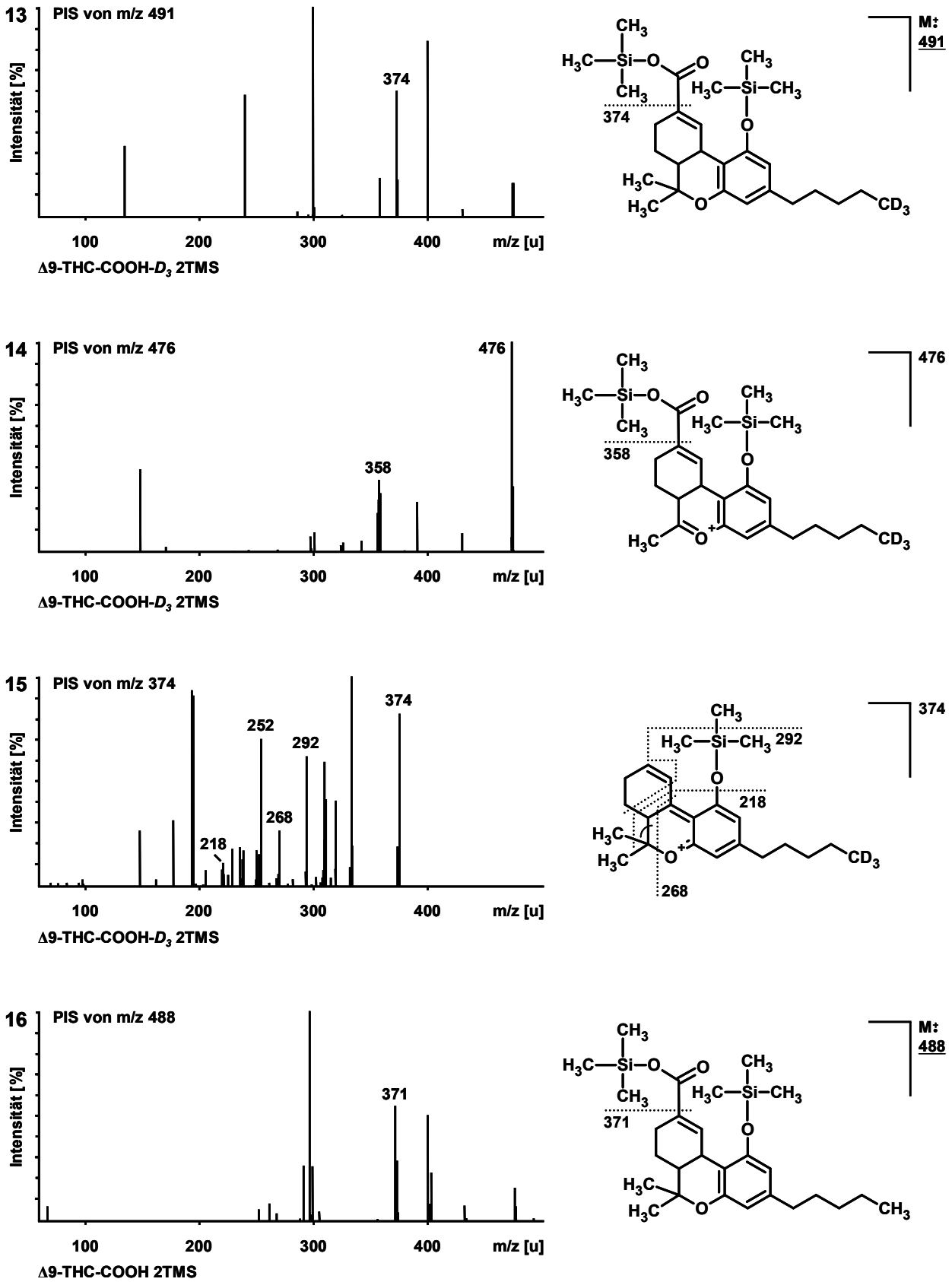


Abb. 3.14 (Fortsetzung).

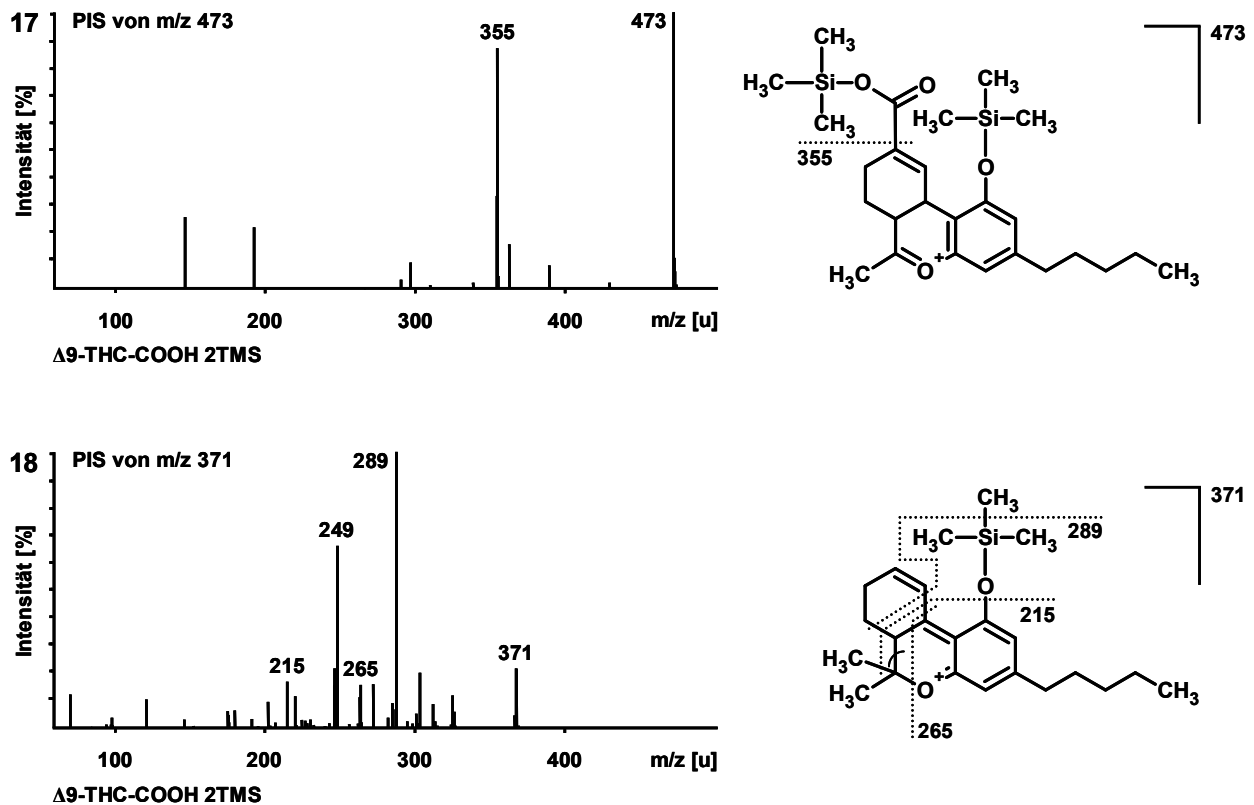


Abb. 3.14 (Fortsetzung).

Im folgenden Abschnitt werden mögliche Fragmentierungsmuster von CBD, $\Delta 9$ -THC- D_3 , $\Delta 9$ -THC, CBN, 11-OH- $\Delta 9$ -THC- D_3 , 11-OH- $\Delta 9$ -THC, $\Delta 9$ -THCA-A, $\Delta 9$ -THC-COOH- D_3 und $\Delta 9$ -THC-COOH in Anlehnung an die für Single-Quadrupol-Massenspektren beschriebenen Fragmentierungsmuster erörtert [193, 202]. Die Nummern der entsprechenden Massenspektren in Abb. 3.14 sind in Klammern angegeben.

Aus dem Precursor-Ion von CBD (1) entsteht durch die Abspaltung der Methyl-Gruppe der Terpen-Seitenkette und anschließender Cyclisierung ein Produkt-Ion mit m/z 375. Durch die Abspaltung der Trimethylsilyl-Gruppe des cyclisierten Rings und der Pentyl-Seitenkette geht aus diesem ein Produkt-Ion mit m/z 231 hervor. Wird dagegen direkt aus dem Precursor-Ion die Pentyl-Seitenkette abgespalten, entsteht ein Produkt-Ion mit m/z 319. Das Produkt-Ion mit m/z 301 entsteht ebenfalls direkt aus dem Precursor-Ion durch Abspaltung einer trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe. Die Produkt-Ionen mit m/z 244 und m/z 215 konnten keiner Struktur zugeordnet werden.

Aus dem Precursor-Ion mit m/z 389 von $\Delta 9$ -THC- D_3 (2) entsteht durch die Abspaltung der Methyl-Gruppe in Position 11 ein Produkt-Ion mit m/z 374. Die weitere Abspaltung von C_4H_6 aus dem Ringsystem und einer der beiden geminalen Methyl-Gruppen führt

zu einem Produkt-Ion mit m/z 306. Aus dem Precursor-Ion mit m/z 374 (3) entsteht durch die Abspaltung von C_4H_6 aus dem Ringsystem und einer Methyl-Gruppe aus der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe ein Produkt-Ion mit m/z 292. Kommt es nach Spaltung des Ringsystems zur Elimination einer der beiden geminalen Methyl-Gruppen sowie der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe, entsteht ein Produkt-Ion mit m/z 218. Durch Abspaltung von C_8H_{13} aus dem Precursor-Ion wird ein Produkt-Ion mit m/z 268 gebildet. Das Produkt-Ion mit m/z 252 konnte keiner Struktur zugeordnet werden. Die Fragmentierung der Precursor-Ionen mit m/z 386 (4) und m/z 371 (5) von Δ^9 -THC erfolgt in Analogie zu der der Precursor-Ionen von Δ^9 -THC- D_3 .

Aus dem Molekülion von CBN (6) entsteht durch Elimination einer der beiden geminalen Methyl-Gruppen ein Produkt-Ion mit m/z 367. Die Abspaltung von C_4H_8 aus der Pentyl-Seitenkette des Produkt-Ions mit m/z 367 (7) führt zu einem Produkt-Ion mit m/z 310. Die Produkt-Ionen mit m/z 323 und m/z 238 konnten keiner Struktur zugeordnet werden.

Aus dem Precursor-Ion mit m/z 477 von 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 (8) entsteht durch die Abspaltung der $CH_2OSi(CH_3)_3$ -Gruppe in Position 11 ein Produkt-Ion mit m/z 374. Aus dem Precursor-Ion mit m/z 374 (9) entsteht durch die Abspaltung von C_4H_6 aus dem Ringsystem und einer Methyl-Gruppe aus der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe ein Produkt-Ion mit m/z 292. Kommt es nach Spaltung des Ringsystems zur Elimination einer der beiden geminalen Methyl-Gruppen sowie der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe, entsteht ein Produkt-Ion mit m/z 218. Durch Abspaltung von C_8H_{13} aus dem Precursor-Ion wird ein Produkt-Ion mit m/z 268 gebildet. Entsteht das Precursor-Ion mit m/z 374 jedoch durch Elimination einer der beiden geminalen Methyl-Gruppen, kann durch Abspaltung des Ringsystems, welches die 11-Hydroxy-Gruppe trägt, ein Produkt-Ion mit m/z 308 entstehen. Das Produkt-Ion mit m/z 252 konnte keiner Struktur zugeordnet werden. Die Fragmentierung der Precursor-Ionen mit m/z 474 (10) und m/z 374 (11) von 11-OH- Δ^9 -THC erfolgt in Analogie zu der der Precursor-Ionen von 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 .

Aus dem Precursor-Ion mit m/z 487 von Δ^9 -THCA-A (12) entsteht durch eine Allyl-Spaltung der Pentyl-Seitenkette ein Produkt-Ion mit m/z 431. Die Spaltung des Ringsystems führt zu einem Produkt-Ion mit m/z 365. Die Produkt-Ionen mit m/z 407, m/z 379 und m/z 275 konnten keiner Struktur zugeordnet werden.

Aus dem Precursor-Ion mit m/z 491 von Δ^9 -THC-COOH- D_3 (13) entsteht durch die Abspaltung der $COOSi(CH_3)_3$ -Gruppe in Position 11 ein Produkt-Ion mit m/z 374.

Ebenfalls durch die Abspaltung der $\text{COOSi}(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe in Position 11 entsteht aus dem Precursor-Ion mit m/z 476 (14) ein Produkt-Ion mit m/z 358. Aus dem Precursor-Ion mit m/z 374 (15) entsteht durch die Abspaltung von C_4H_6 aus dem Ringsystem und einer Methyl-Gruppe aus der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe ein Produkt-Ion mit m/z 292. Kommt es nach Spaltung des Ringsystems zur Elimination einer der beiden geminalen Methyl-Gruppen sowie der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe, entsteht ein Produkt-Ion mit m/z 218. Durch Abspaltung von C_8H_{13} aus dem Precursor-Ion wird ein Produkt-Ion mit m/z 268 gebildet. Das Produkt-Ion mit m/z 252 konnte keiner Struktur zugeordnet werden. Die Fragmentierung der Precursor-Ionen mit m/z 488 (16), m/z 473 (17) und m/z 371 (18) von Δ^9 -THC-COOH erfolgt in Analogie zu der der Precursor-Ionen von Δ^9 -THC-COOH- D_3 .

Aus diesen Produkt-Ionen-Spektren wurden für jeden Analyten sechs charakteristische Übergänge ausgewählt, welche für die Erstellung der MRM-Methode in Betracht kamen (Tab. 3.5).

Tab. 3.5 Übergänge, welche für die Erstellung der MRM-Methode in Betracht kamen.

Analyt	Übergänge					
CBD	390-301	390-319	390-231	390-244	390-375	390-215
Δ^9-THC-D_3	389-374	374-292	389-306	374-268	374-252	374-218
Δ^9-THC	386-371	371-289	386-303	371-265	371-249	371-215
CBN	367-310	382-367	367-295	367-323	367-238	367-279
11-OH-Δ^9-THC-D_3	374-292	374-308	374-268	374-252	477-374	374-218
11-OH-Δ^9-THC	371-289	371-305	371-265	371-249	474-371	371-215
Δ^9-THCA-A	487-365	487-407	487-379	487-419	487-431	487-275
Δ^9-THC-COOH-D_3	476-358	374-292	374-268	491-374	374-252	374-218
Δ^9-THC-COOH	473-355	371-289	371-265	488-371	371-249	371-215

Anschließend wurde die Kollisionsenergie für jeden einzelnen Übergang optimiert. Dazu wurden MRM-Methoden mit Retentionszeitfenstern für CBD, Δ^9 -THC und Δ^9 -THC- D_3 , CBN, 11-OH- Δ^9 -THC und 11-OH- Δ^9 -THC- D_3 , Δ^9 -THCA-A sowie Δ^9 -THC-COOH und Δ^9 -THC-COOH- D_3 erstellt, in welchen für jeden Analyten jeweils ein Übergang bei drei verschiedenen Kollisionsenergien (-9 eV, -12 eV und -15 eV) aufgezeichnet wurde. Für jeden Übergang wurde dann die Kollisionsenergie ausgewählt, bei der sich die höchste Intensität ergab. Wurde kein Intensitätsmaximum erzielt, so wurde die Optimierung für

den entsprechenden Übergang mit den Kollisionsenergien -6 eV, -9 eV und -12 eV bzw. -12 eV, -15 eV und -18 eV wiederholt.

Für die unter 2.3.2.3 beschriebene MRM-Methode wurden für jeden Analyten die drei Übergänge (ein Übergang für die Quantifizierung, zwei Übergänge für die sichere Identifizierung) ausgewählt, bei denen sich die höchsten Intensität ergaben (Tab. 3.6).

Tab. 3.6 Übergänge, welche für die Erstellung der MRM-Methode ausgewählt wurden.

Analyt	Übergang	Kollisionsenergie [eV]
CBD	390-301	-9
	390-319	-12
	390-231	-12
Δ9-THC-D_3	389-374	-9
	374-292	-12
	389-306	-12
Δ9-THC	386-371	-9
	371-289	-12
	386-303	-12
CBN	367-310	-12
	382-367	-12
	367-295	-12
11-OH-Δ9-THC-D_3	374-292	-12
	374-308	-9
	374-268	-12
11-OH-Δ9-THC	371-289	-12
	371-305	-9
	371-265	-12
Δ9-THCA-A	487-365	-12
	487-407	-12
	487-379	-12
Δ9-THC-COOH-D_3	476-358	-12
	374-292	-12
	374-268	-9
Δ9-THC-COOH	473-355	-12
	371-289	-12
	371-265	-9

Im Rahmen des Labor-internen, validierten Standardverfahrens zur Bestimmung von Cannabinoiden in Serum und Urin mittels GC-MS werden die Cannabinoide mittels GC innerhalb von 24 min getrennt und im SIM-Modus detektiert. Die Verwendung kürzerer gaschromatographischer Trennmethode in Kombination mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer war dabei aufgrund koeluierender Matrixbestandteile nicht möglich. Wie Abb. 3.15 zeigt, wurden hingegen bei Verwendung eines Triple-

Quadrupol-Massenspektrometers kaum Matrixbestandteile detektiert und somit Matrixbereinigte Chromatogramme erhalten.

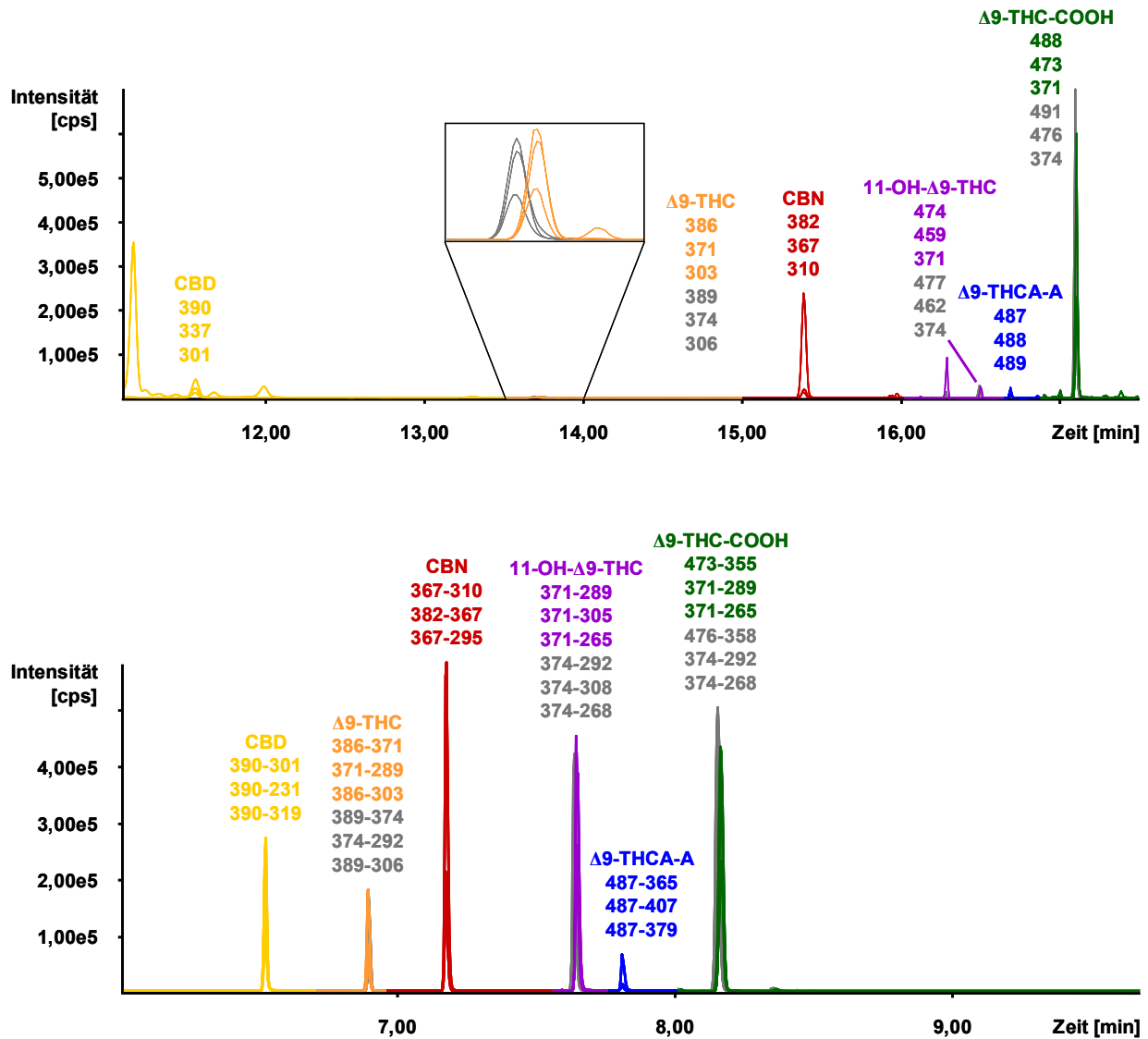


Abb. 3.15 Rekonstruierte Ionenchromatogramme einer dotierten Serumprobe mit 5,0 ng/ml CBD, Δ^9 -THC, CBN, 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THCA-A sowie 25 ng/ml Δ^9 -THC-COOH (oben: GC-MS; unten: GC-MS/MS). Die IS sind in Grau dargestellt.

Die hohe Selektivität erlaubte deshalb eine deutliche Verkürzung der gaschromatographischen Trennmethode auf weniger als 10 min. Bei weiterer Verkürzung wurde zwar noch eine gute chromatographische Trennung der Analyten erzielt, allerdings insbesondere bei den polarerer Cannabinoiden verbunden mit einem Peak-Tailing. Um bei der verringerten Transmission des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers eine mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer

vergleichbare Sensitivität zu erzielen, wurde die Auflösung der Quadrupole 1 und 3 jeweils auf eine Peakhalbwertsbreite von 1,5 u eingestellt. Die Δ EMV (siehe Kapitel 2.3.2.3) wurde für jeden Analyten so angepasst, dass vergleichbare linear-dynamische Bereiche für alle Analyten erzielt wurden. Die Empfindlichkeit im Bereich niedriger Konzentrationen konnte durch die Verwendung des Injektionsmodus „gepulst splitlos“ deutlich gegenüber der des Injektionsmodus „splitlos“ erhöht werden.

3.2.3.2 Methodvalidierung

Zur Extraktion der Cannabinoide aus Serum wurde die unter 2.4.2.3.3 beschriebene SPE-basierte Probenaufarbeitung eingesetzt. Für Δ 9-THCA-A wurde Δ 9-THC-COOH- D_3 als IS verwendet, während für CBD und CBN Δ 9-THC- D_3 als IS gewählt wurde. Die Extraktionsausbeuten wurden wie unter 2.4.2.3.6 beschrieben bestimmt und sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Die Extraktionsausbeute für Δ 9-THCA-A war relativ niedrig und mit großen Schwankungen behaftet. Dies ist möglicherweise auf einem hohen Acetonitril-Anteil im Waschschrift der SPE und eine damit eventuell verbundene, partielle Elution von Δ 9-THCA-A zurückzuführen. Die schlechte Reproduzierbarkeit könnte durch ein unterschiedliches Elutionsverhalten von Δ 9-THCA-A im Vergleich zu Δ 9-THC-COOH- D_3 sowie durch eine Instabilität des Trimethylsilyl-Derivats von Δ 9-THCA-A im Injektor bzw. Probengeber bedingt sein.

Tab. 3.7 Extraktionsausbeuten der untersuchten Cannabinoide bei niedriger und hoher Konzentration.

Analyt	Niedrige Konzentration		Hohe Konzentration	
	Nominelle Konzentration [ng/ml]	Extraktionsausbeute Mittelwert \pm SD [%]	Nominelle Konzentration [ng/ml]	Extraktionsausbeute Mittelwert \pm SD [%]
CBD	1,0	93,00 \pm 17,85	10,0	89,90 \pm 5,16
Δ9-THC	1,0	79,77 \pm 9,56	10,0	77,00 \pm 11,96
CBN	1,0	83,36 \pm 15,57	10,0	82,73 \pm 7,62
11-OH-Δ9-THC	1,0	89,53 \pm 10,79	10,0	90,77 \pm 5,11
Δ9-THCA-A	1,0	24,74 \pm 15,39	10,0	41,60 \pm 95,65
Δ9-THC-COOH	5,0	78,57 \pm 7,87	50,0	85,75 \pm 5,62

In Vergangenheit hat sich gezeigt, dass Δ 9-THCA-A in Lösung allmählich unter Freisetzung von Δ 9-THC decarboxyliert, wobei Ausmaß und Geschwindigkeit dieses Abbaus mit der Anzahl der Einfrier-/Auftauzyklen zu korrelieren scheinen. Δ 9-THC,

11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH sind dagegen in Lösung stabil. Deshalb wurden getrennte Arbeitslösungen für $\Delta 9$ -THCA-A und die weiteren Cannabinoide hergestellt. Da maximal 50 μ l Lösungsmittel zu 1 ml Serum dotiert werden sollten, wurden darüber hinaus getrennte Arbeitslösungen zur Herstellung der Kalibratoren für den niedrigen bzw. den hohen Kalibrationsbereich angesetzt.

Die Methode zeigte für alle Cannabinoide eine hohe Selektivität. In zehn verschiedenen Leerseren ergaben sich keine Störsignale, welche die Identifizierung oder Quantifizierung der Analyten oder IS hätten beeinträchtigen können. Die Quantifizierung der Cannabinoide erfolgte anhand von Kalibrationskurven, welche mit dotierten Serum-Kalibratoren erstellt worden waren. Zur Bestimmung eines geeigneten Kalibrationsmodells wurden Kalibrationskurven aus zwölf Konzentrationen mit sechs Wiederholungen pro Konzentration erstellt. Mit einem ungewichteten, linearen Kalibrationsmodell wurden in einem Bereich von 0,2 ng/ml bis 20,0 ng/ml für CBD, $\Delta 9$ -THC, CBN, 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THCA-A bzw. 1,0 ng/ml bis 100,0 ng/ml für $\Delta 9$ -THC-COOH gute Linearitäten erhalten. Damit scheint der dynamische Bereich des GC-MS/MS allerdings kleiner zu sein als der des GC-MS, was möglicherweise auf die hohe Spannung des Sekundär-Elektronen-Vervielfachers zurückzuführen ist, die zum Erreichen einer ausreichenden Sensitivität erforderlich ist. LOD und LOQ wurden durch statistische Auswertung der Kalibrationsdaten gemäß DIN 32645 ^[201] berechnet und sind in Tab. 3.8 zusammengefasst. Unter Verwendung des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers war jedoch nur für $\Delta 9$ -THC-COOH eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zum Single-Quadrupol-Massenspektrometer zu erzielen, dessen LOD bei 0,2 ng/ml für $\Delta 9$ -THC, 0,1 ng/ml für 11-OH- $\Delta 9$ -THC und 2,0 ng/ml für $\Delta 9$ -THC-COOH und LOQ bei 0,2 ng/ml für $\Delta 9$ -THC, 0,3 ng/ml für 11-OH- $\Delta 9$ -THC und 5,7 ng/ml für $\Delta 9$ -THC-COOH lagen.

Tab. 3.8 LOD und LOQ der GC-MS/MS-Methode.

Analyt	LOD (Mittelwert) [ng/ml]	LOQ (Mittelwert) [ng/ml]
CBD	0,42	1,35
$\Delta 9$-THC	0,39	1,26
CBN	0,22	0,72
11-OH-$\Delta 9$-THC	0,17	0,63
$\Delta 9$-THCA-A	0,73	2,62
$\Delta 9$-THC-COOH	0,71	2,41

Dies ist sicher auf die geringe Matrixbelastung der Extrakte und die hohe chromatographische Trenneffektivität des für die GC-MS-Bestimmung verwendeten Temperaturgradienten zurückzuführen. Für Vollblut hingegen dürfte die Sensitivität deutlich höher sein, da bei dieser Matrix üblicherweise zahlreiche, störende Komponenten detektiert werden.

Richtigkeit und Präzision wurden wie unter 2.4.2.3.5 beschrieben anhand von Qualitätskontroll-(QK)-Proben (Low, Medium, High) ermittelt (Tab. 3.9). Die Konzentrationen der Cannabinoide wurden anhand von täglichen Kalibrationskurven bestimmt. Lediglich für CBD und $\Delta 9$ -THC wurde eine ausreichende Richtigkeit und Präzision erreicht, während diese v.a. für CBN, $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC-COOH nicht akzeptabel waren. Insgesamt konnten somit keine zufrieden stellenden Ergebnisse erzielt werden. Wie sich erst später herausstellte, war dies vermutlich auf einen Fehler am GC-MS/MS-Gerät zurückzuführen, der durch den Einbau einer Thermostasierung eines elektronischen Bauteils zur Steuerung der Quadrupole behoben werden musste.

Tab. 3.9 Richtigkeit, Wiederholpräzision und Laborpräzision für die GC-MS/MS-Bestimmung.

Analyt	QK-Probe	Nominelle Konzentration [ng/ml]	Ermittelte Konzentration Mittelwert [ng/ml]	Richtigkeit des Mittelwertes Bias [%]	Wiederhol-Präzision (n = 2) VK [%]	Labor-Präzision (n = 6) VK [%]
CBD	Low	1,0	1,19	19,2	5,3	35,8
	Medium	5,0	5,06	1,2	13,8	14,9
	High	10,0	10,00	-0,1	8,1	11,7
$\Delta 9$-THC	Low	1,0	1,09	9,4	8,5	12,0
	Medium	5,0	5,75	15,1	7,8	9,5
	High	10,0	10,93	9,3	5,6	7,2
CBN	Low	1,0	0,62	-38,3	7,4	30,2
	Medium	5,0	4,60	-8,0	5,8	10,3
	High	10,0	8,84	-11,6	7,6	12,6
11-OH-$\Delta 9$-THC	Low	1,0	0,99	-0,8	4,7	8,6
	Medium	5,0	6,21	24,1	2,1	3,9
	High	10,0	11,91	19,1	4,6	5,2
$\Delta 9$-THCA-A	Low	1,0	1,34	34,0	18,0	31,5
	Medium	5,0	5,96	19,3	17,6	20,7
	High	10,0	10,94	9,4	18,7	44,7
$\Delta 9$-THC-COOH	Low	5,0	7,11	42,3	3,4	7,8
	Medium	25,0	31,24	25,0	3,5	10,4
	High	50,0	65,99	32,0	2,3	9,9

3.3 Isolierung von Δ^9 -THCA-A aus Marihuana

3.3.1 Aufreinigung des Rohextraktes mittels Säulenchromatographie

Um Reinsubstanz für die Studien zum Metabolismus und zur Elimination von Δ^9 -THCA-A zu gewinnen, wurde Δ^9 -THCA-A aus Marihuana isoliert. In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Isolierung von Δ^9 -THCA-A aus Pflanzenmaterial beschrieben. Lehmann et al. [75] und Dussy et al. [72] stellen zunächst durch Extraktion mit Petrolether, Fraktionierung durch Natronlauge und nachfolgende Re-Extraktion mit Diethylether einen Rohextrakt her. Während Lehman et al. für die Aufreinigung dieses Rohextraktes eine zweifache Trennung mittels HPLC-DAD auf einer Umkehrphase (RP) mit einem Gemisch aus Methanol und Essigsäure einsetzen, nutzen Dussy et al. eine klassische, präparative Säulenchromatographie mit Kieselgel und einer Mischung aus n-Hexan, Toluol und Aceton als mobiler Phase. Demgegenüber wird beim patentierten Verfahren nach Flockhart et al. [71] ein einfacher Rohextrakt in essigsauerm n-Hexan hergestellt, der an einer mit Sephadex LH20 gepackten Säule mit einem Gemisch aus Dichlormethan und Chloroform getrennt und anschließend zweimal umkristallisiert wird. Da diese Methoden entweder relativ kostenintensive Materialien oder toxische Lösungsmittel einsetzen, wurde ein einfaches, kostengünstiges Verfahren zur Isolierung von Δ^9 -THCA-A aus Marihuana entwickelt, welches ohne den Einsatz gesundheitsschädlicher Lösungsmittel wie Toluol, Dichlormethan oder Chloroform auskommt [203].

Wie unter 2.4.3.1 beschrieben wurde für die Herstellung des Rohextraktes grob zerkleinertes Marihuana mit Ethanol bei 4°C unter gelegentlichem Umschütteln extrahiert. Auf den Deckblättern der weiblichen Blüten von *Cannabis sativa* L. befinden sich Drüsenschuppen, deren harzartiges Sekret die Cannabinoide enthält. Da die Kutikula dieser Drüsenschuppen beim Versetzen mit Ethanol sehr schnell platzt, werden die im Subkutikularraum befindlichen Cannabinoide gelöst, ohne dass größere Mengen der in den Zellen lokalisierten Bestandteile wie Chlorophyll in den Extrakt gelangen. Verglichen mit den beschriebenen Extraktionsverfahren bietet dieser Kaltauszug den Vorteil, dass er einerseits mit deutlich geringerem Aufwand verbunden ist und andererseits wesentlich weniger lipophile Bestandteile der Kutikula mitextrahiert werden als bei einer Extraktion mit n-Hexan (Abb. 3.16). Darüber hinaus handelt es sich um ein sehr schonendes Extraktionsverfahren für thermolabile Verbindungen wie Δ^9 -THCA-A.

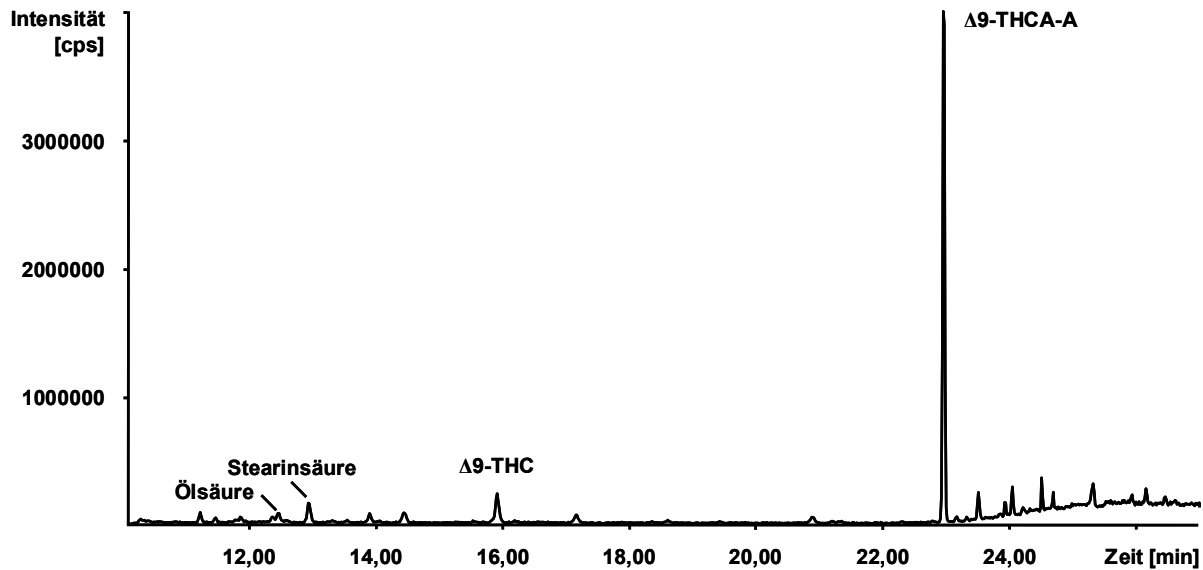


Abb. 3.16 GC-EI-MS Chromatogramm des Rohextraktes nach Trimethylsilylierung.

Mitextrahierte lipophile Bestandteile der Kutikula sowie sekundäre Pflanzenstoffe konnten durch eine Aktivkohle-Behandlung bereits vor der Aufreinigung mittels Säulenchromatographie weitgehend aus dem Rohextrakt entfernt werden. Dabei wurden jeweils Rohextrakt-Aliquote von 15 ml eingesetzt, welche anschließend wie unter 2.4.3.2 beschrieben mittels Säulenchromatographie aufgereinigt wurden.

Zunächst wurde eine Trennung mit Kieselgel als stationärer Phase und verschiedenen Gemischen aus n-Hexan und Essigsäureethylester als Laufmittel versucht. Bei der Verwendung von Gemischen mit geringem Essigsäureethylester-Anteil wurde eine gute Trennung von $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THCA-A erzielt, allerdings wurden die Cannabinoide nur sehr langsam eluiert. Neben einem hohen Lösungsmittelverbrauch hatte die langsame Elution zur Folge, dass die lange Verweilzeit von $\Delta 9$ -THCA-A auf der stationären Phase zu einer partiellen Decarboxylierung zu $\Delta 9$ -THC führte. Zwar konnte die Elution durch den Einsatz von Gemischen mit höherem Essigsäureethylester-Anteil bzw. verschiedener Polarität beschleunigt werden, jedoch wurde mit diesen eine deutlich schlechtere Trennung erzielt. Da bei Verwendung eines RP-Materials $\Delta 9$ -THCA-A vor ihrem Decarboxylierungsprodukt $\Delta 9$ -THC eluiert, wurde diese stationäre Phase in Kombination mit Ethanol sowie Methanol/Wasser-Gemischen getestet. Während Gemische mit einem Alkohol/Wasser-Verhältnis von 9 : 1 (V : V) nur eine schlechte Trennung erzielten, führte eine Erhöhung des Wasseranteils auf etwa 20 % zwar zu einer verbesserten Trennung, aber auch zu einer deutlich langsameren Elution. Um

eine ausreichende Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase zu gewährleisten, musste darüber hinaus insbesondere bei Ethanol/Wasser-Gemischen ein sehr hoher Druck angelegt werden. Die Verwendung von wässrigen Laufmittelgemischen machte außerdem eine Re-Extraktion der isolierten Δ^9 -THCA-A aus der mobilen Phase erforderlich.

Da die Trennung durch die Verwendung von RP-Material nicht verbessert werden konnte sowie aufgrund der erforderlichen Re-Extraktion und höheren Materialkosten, wurde auf Trennung des Rohextraktes mit Kieselgel zurückgegriffen. Gute Ergebnisse wurden mit einem Gemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester erreicht. Bei einem Mischungsverhältnis von 20 : 1 (V : V) wurden zunächst Δ^9 -THC sowie weitere lipophile Bestandteile entfernt. Für die Elution der polareren Δ^9 -THCA-A wurde die mobile Phase anschließend auf ein Verhältnis von 10 : 1 (V : V) eingestellt. Dieses Mischungsverhältnis war so polar, dass Δ^9 -THCA-A gerade eluiert wurde, andere, im Ethanolzug gelöste polare Verbindungen jedoch noch von der stationären Phase zurückgehalten wurden.

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels DC überprüft. Die Kieselgel 60 F₂₅₄ Dünnschichtplatten wurden in einem Gemisch aus Cyclohexan und Essigsäureethylester von 20 : 1 (V : V) entwickelt und zur Identifizierung der Cannabinoide zunächst unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm betrachtet. Der auf den Dünnschichtplatten aufgetragene Fluoreszenzindikator wird durch das UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt und lässt die Dünnschichtplatte als hell leuchtende Fläche erscheinen. Die Cannabinoide absorbieren die UV-Strahlung, so dass sie aufgrund der Fluoreszenzminderung als dunkle Banden detektiert werden können. Im Anschluss wurden die Dünnschichtplatten in einer Lösung aus Cer(IV)sulfat und Ammoniummolybdat gefärbt, wodurch Δ^9 -THCA-A ($R_f = 0,45$) und Δ^9 -THC ($R_f = 0,65$) als blaue Banden sichtbar wurden. Diese Farbreaktion mit Cer(IV)sulfat und Ammoniummolybdat beruht auf einer Oxidation der Cannabinoide durch Cer(IV), deren Reaktionsprodukte in der Folge Molybdän(VI) zu Molybdänblau reduzieren.

Bei Aufgabe von 290 mg des nach Aktivkohle-Behandlung braunen Rohextraktes (entsprechend 15 ml) begann die Elution von Δ^9 -THCA-A mit Fraktion 58, d.h. nach 870 ml mobiler Phase I. Die Fraktionen (15 ml) 59 bis 167 wurden gesammelt und schonend bei 30°C im Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Nach dem Entfernen letzter Lösungsmittelreste durch eine Drehschieber-Vakuumpumpe wurden 114,5 mg eines gelben, amorphen Rückstandes erhalten. In einem hauseigenen

Verfahren wurde mittels HPLC-DAD ein Δ^9 -THCA-A-Gehalt von 91,6 % bei einem Δ^9 -THC-Gehalt von 0,4 % ermittelt. Die weiteren säulenchromatographisch aufgereinigten Aliquote wiesen Δ^9 -THCA-A-Gehalte von 87,6 – 98,5 % bei Δ^9 -THC-Gehalten von 0,3 - 0,4 % auf.

3.3.2 Aufreinigung der Δ^9 -THCA-A mittels semipräparativer HPLC-DAD

Die isolierte Δ^9 -THCA-A und das nach Aufreinigung des Rohextraktes in Spuren verbliebene Δ^9 -THC wurden wie unter 2.4.3.3 beschrieben mittels semipräparativer HPLC getrennt und anhand ihrer UV-Spektren identifiziert (Abb. 3.17). Die Δ^9 -THC-freie Δ^9 -THCA-A wurde anschließend mit TBME aus dem Laufmittelgemisch re-extrahiert.

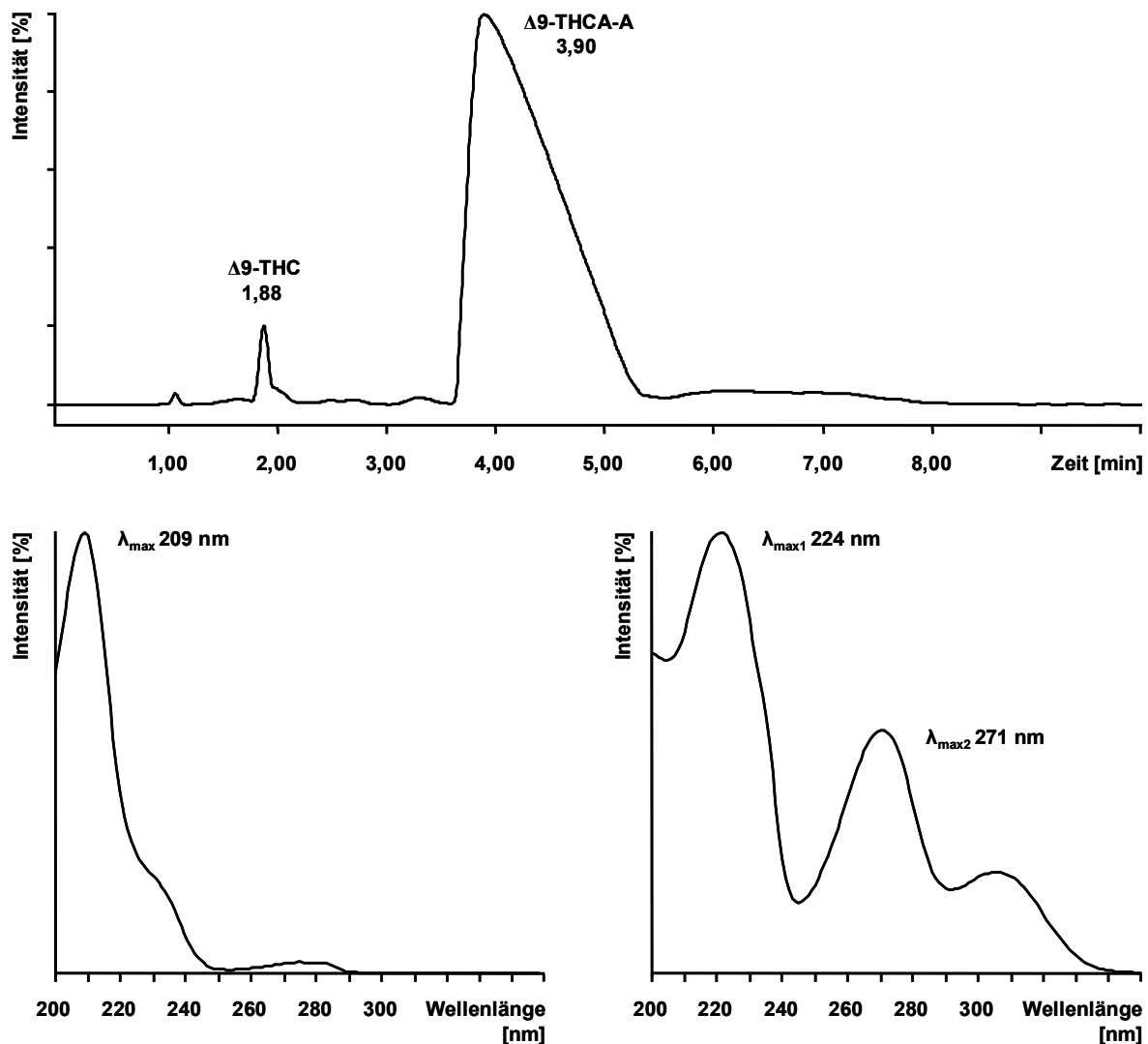


Abb. 3.17 Chromatogramm der Aufreinigung der isolierten Δ^9 -THCA-A mittels semipräparativer HPLC-DAD (oben) sowie UV-Spektren (unten) von Δ^9 -THC (links) und Δ^9 -THCA-A (rechts).

Bei der Auswahl eines geeigneten Laufmittels für die HPLC-Trennung waren mehrere Aspekte zu berücksichtigen: Einerseits durfte das verwendete Laufmittelgemisch mit dem für die Re-Extraktion verwendeten TBME nicht mischbar sein, andererseits sollte der organische Anteil des Laufmittelgemischs einen relativ geringen Siedepunkt besitzen, damit das Lösungsmittel bei 30°C im Rotationsverdampfer aus dem Gemisch zu entfernen war. Mit einem Gemisch aus Ammoniumacetat 5 mM pH 6,5 und Methanol im Verhältnis 25 : 75 (V : V) wurde innerhalb von zehn Minuten eine gute Trennung von Δ^9 -THC und Δ^9 -THCA-A erreicht. Ein Abstand der Retentionszeiten von etwa zwei Minuten war erforderlich, damit das HPLC-Eluat während der Elution von Δ^9 -THCA-A ohne Spuren von Δ^9 -THC aufgefangen werden konnte.

Für die Re-Extraktion von Δ^9 -THCA-A aus dem Laufmittelgemisch wurde TBME eingesetzt, da dieser ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie der klassischerweise verwendete Diethylether besitzt, jedoch keine explosiven Peroxide bildet. Aufgrund des niedrigen Siedepunktes konnte das Lösungsmittel wiederum bei geringer thermischer Belastung der isolierten Δ^9 -THCA-A entfernt werden, so dass eine partielle Decarboxylierung zu Δ^9 -THC auszuschließen war. Im Gegensatz zur leicht zu kristallisierenden Δ^9 -THCA-B ^[75], konnte Δ^9 -THCA-A aufgrund intramolekularer Wasserstoffbrücken zwischen der phenolischen Hydroxyl-Gruppe in Position 1 und der benachbarten Carboxyl-Gruppe in Position 2 jedoch lediglich als amorphes Pulver dargestellt werden (Abb. 3.18).

Aus 25 mg säulenchromatographisch aufgereinigtem Rückstand konnten 19,6 mg Δ^9 -THC-freie Δ^9 -THCA-A gewonnen werden. Aufgrund des allmählichen Abbaus von Δ^9 -THCA-A zu Δ^9 -THC während der Lagerung wurde beschlossen, die verbleibende säulenchromatographisch isolierte Δ^9 -THCA-A ohne weitere Aufreinigung einzulagern und diese erst vor ihrer Verwendung mittels semipräparativer HPLC-DAD zu trennen.

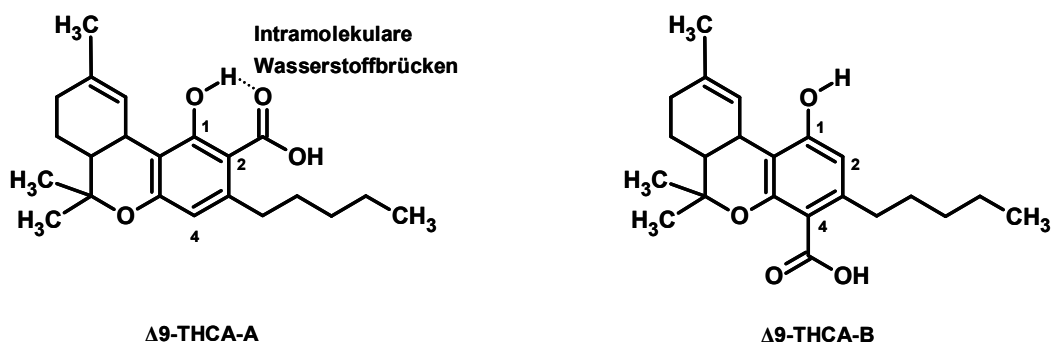


Abb. 3.18 Strukturen von Δ^9 -THCA-A und Δ^9 -THCA-B.

3.4 Studien zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A

3.4.1 Studie zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A an Ratten

3.4.1.1 Identifizierung von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten in Rattenurin mittels LC-MS/MS und LC-QTOF MS

Der Rattenurin wurde wie unter 2.4.4.1.1 beschrieben sowohl nativ als auch nach enzymatischer Konjugatspaltung durch Proteinfällung aufgearbeitet und die Δ^9 -THCA-A-Metabolite wie unter 2.3.3.1.1 beschrieben mittels LC-ESI-MS detektiert. Zur Identifizierung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite anhand ihrer deprotonierten Molekülionen wurden zunächst Single-Quadrupol-Massenspektren (DP -30, -90 und -130 V) im Q1-Scan-Modus sowie im EMS-Modus aufgenommen. Die Glucuronidierung der dabei identifizierten Phase I-Metabolite wurde unter Verwendung des Precursor-Ion-Scan-Modus bestätigt. Anschließend wurden für jeden Δ^9 -THCA-A-Metaboliten EPI-Massenspektren der deprotonierten Molekülionen bei den Kollisionsenergien -20 eV, -35 eV und -50 eV aufgenommen. Die Molekülmassen der mittels LC-MS/MS identifizierten Δ^9 -THCA-A-Metabolite wurden wie unter 2.3.3.1.2 beschrieben zusätzlich mittels LC-QTOF MS durch Bestimmung der exakten Masse mit einer Toleranz von ± 10 ppm sowie durch Zuordnung der korrekten Isotopenverteilung (Sigma Fit) bestätigt.

Die für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen wurden aus den im EPI-Modus aufgenommenen Fragmenten abgeleitet und in Anlehnung an das Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A (Abb. 3.19) sowie das von Δ^9 -THC und dessen Metaboliten interpretiert ^[204]. Die EPI-Massenspektren, Retentionszeiten, Strukturen und vorherrschenden Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten sind in Abb. 3.19 dargestellt. Die Nummern der entsprechenden Massenspektren in Abb. 3.19 sind in Klammern angegeben.

Im Rattenurin konnten folgende Metabolite von Δ^9 -THCA-A (RT: 15,84 min) (1) identifiziert werden: Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (Δ^9 -THCA-A-Glucuronid) (RT: 14,74 min bzw. 12,40 min) (2 bzw. 2'), 11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A (11-OH- Δ^9 -THCA-A) (RT: 13,54 min) (3), 11-Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid) (RT: 12,63 min) (4), $8\alpha,11$ -Bis-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A ($8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A) (RT: 11,94 min) (5), $8\alpha,11$ -Bis-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid ($8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid)

(RT: 11,05 min) (6), 8β ,11-Bis-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A (8β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A) (RT: 11,56 min) (7), 8β ,11-Bis-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (8β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid) (RT: 10,60 min) (8), Δ^9 -THCA-A-8-on (RT: 13,79 min) (9), Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid (RT: 12,79 min) (10), 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A (Δ^9 -THCA-A-COOH) (RT: 12,01 min) (11) und 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid) (RT: 10,83 min) (12).

Im folgenden Abschnitt werden mögliche Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten in Bezug auf die für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen erörtert. Die Nummern der entsprechenden Massenspektren in Abb. 3.19 sind wiederum in Klammern angegeben.

Δ^9 -THCA-A (1) zeigt ein Molekülion mit m/z 357. Eine Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 führt zu einem Fragmention mit m/z 313. Durch eine zusätzliche neutrale Abspaltung von C_5H_8 aus dem Ringsystem entsteht ein Fragmention mit m/z 245, aus welchem wiederum durch eine weitere Ringöffnung ein Fragmention mit m/z 191 gebildet wird. Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (2 bzw. 2') zeigt ein Molekülion mit m/z 533. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu Δ^9 -THCA-A und damit zu dem Fragmention mit m/z 357. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons Δ^9 -THCA-A.

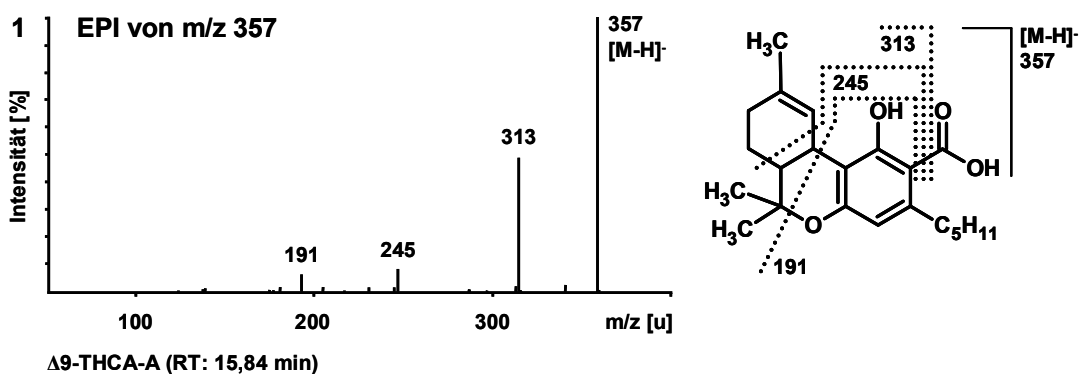


Abb. 3.19 LC-ESI-MS/MS-Spektren (CE -20, -35, -50 eV, summiert) bzw. rekonstruiertes Ionenchromatogramm (RIC), Retentionszeiten, Strukturen und vorherrschende Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten. Die Nummerierung der Spektren korrespondiert mit der Nummerierung in den Abb. 3.20 und 3.22.

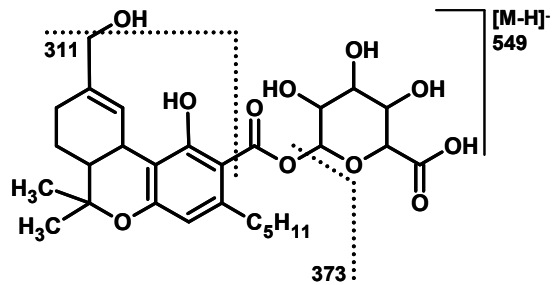
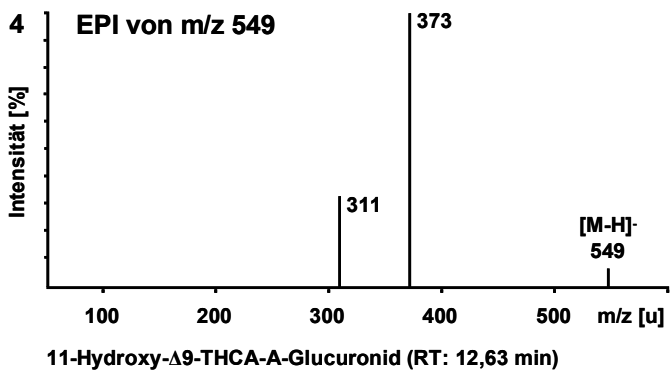
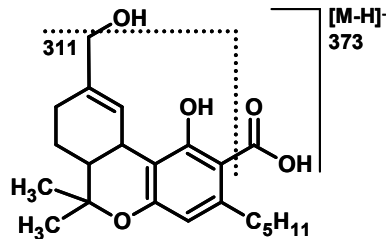
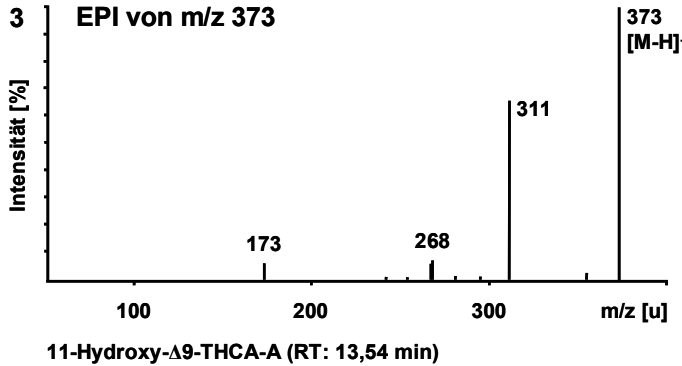
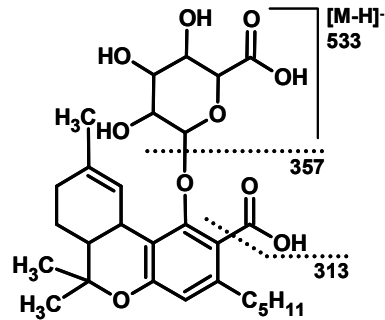
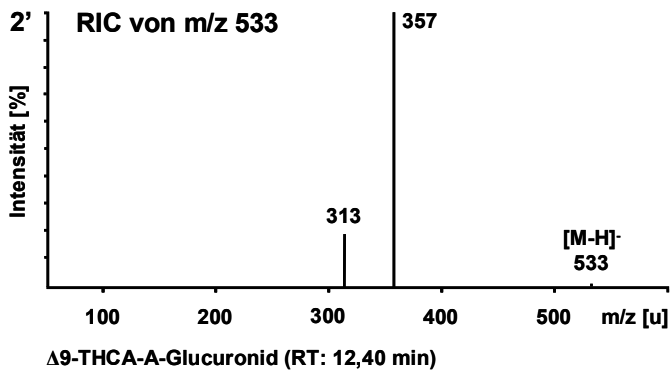
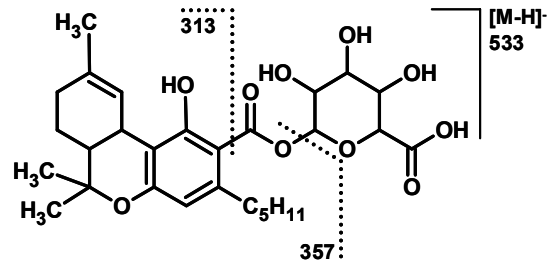
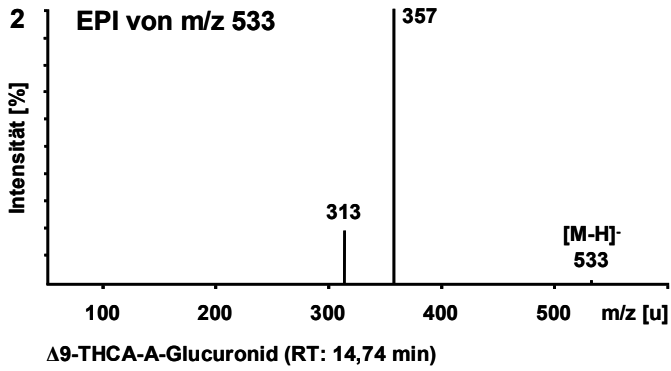


Abb. 3.19 (Fortsetzung).

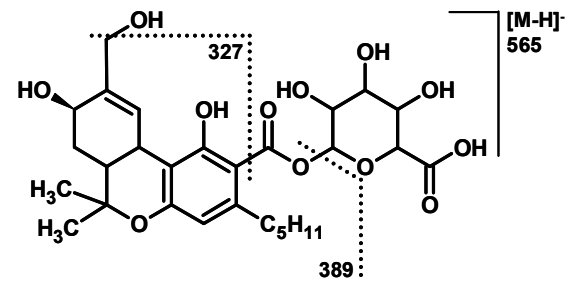
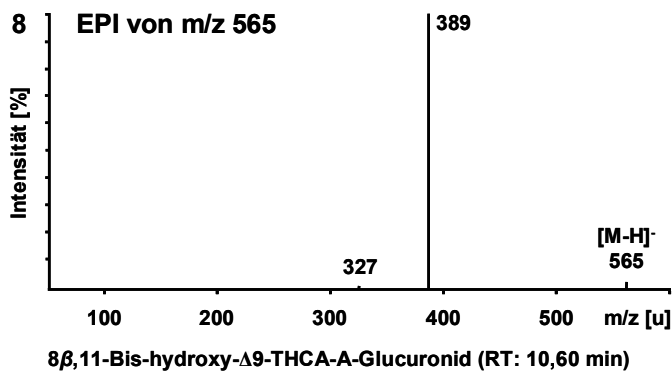
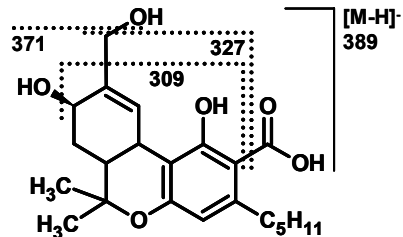
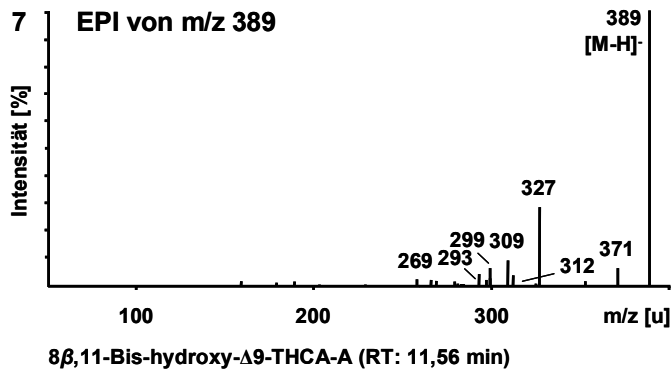
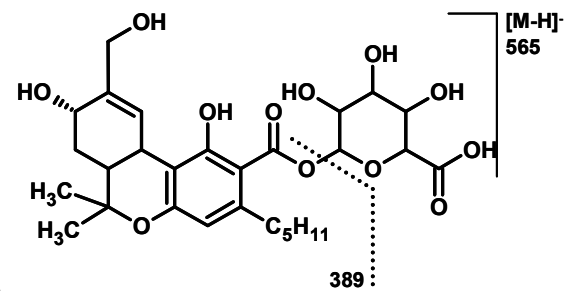
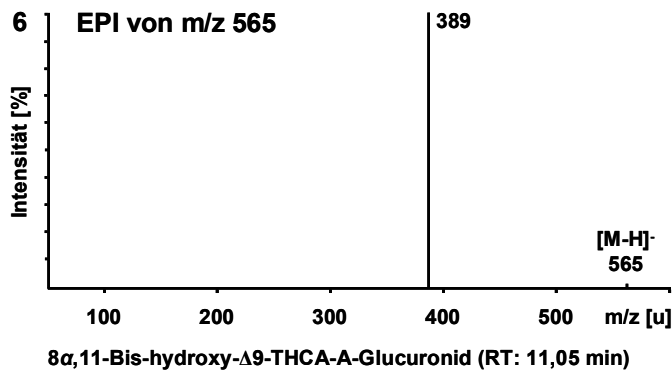
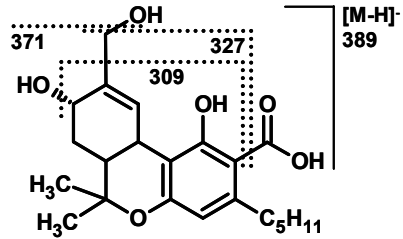
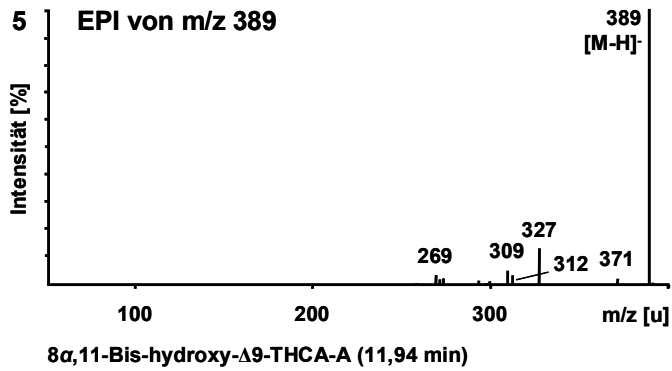


Abb. 3.19 (Fortsetzung).

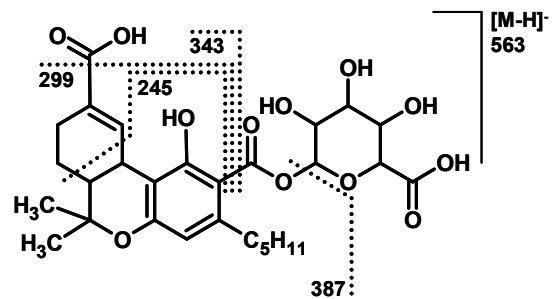
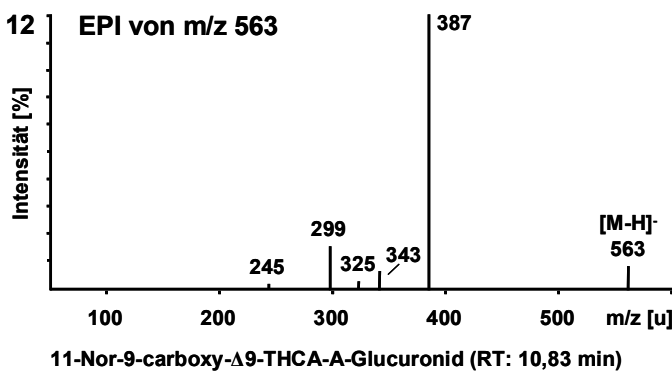
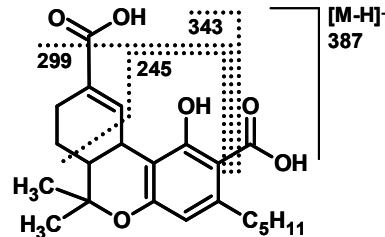
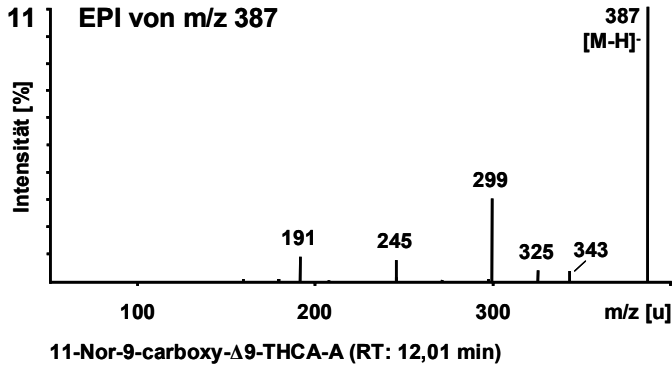
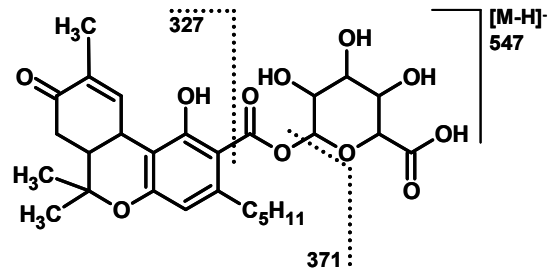
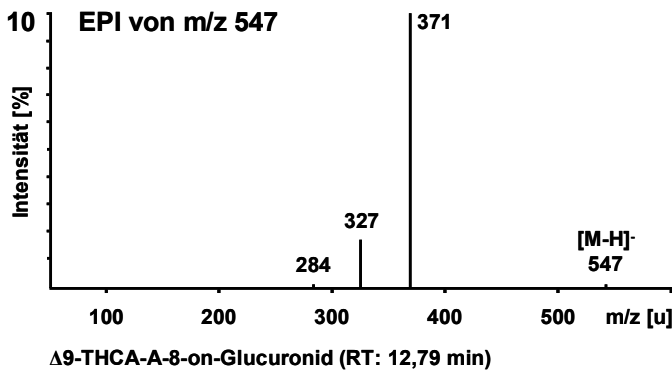
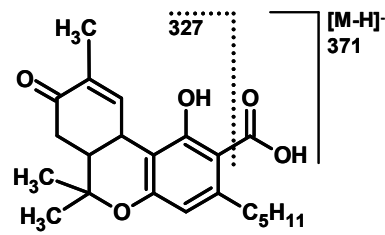
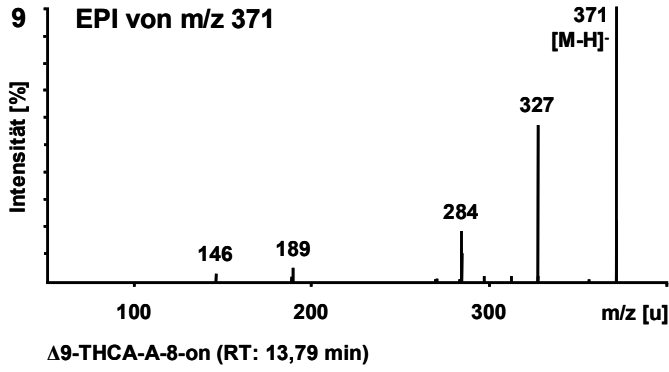


Abb. 3.19 (Fortsetzung).

11-OH- Δ^9 -THCA-A (3) zeigt ein Molekülion mit m/z 373. Durch eine Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 entsteht ein Fragmention mit m/z 329, aus welchem durch eine zusätzliche Wasserelimination in Position 11 ein Fragmention mit m/z 311 gebildet wird. Die Fragmentionen mit m/z 268 und m/z 173 konnten keiner Struktur zugeordnet werden. 11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (4) zeigt ein Molekülion mit m/z 549. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu 11-OH- Δ^9 -THCA-A und damit zu dem Fragmention mit m/z 373. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons 11-OH- Δ^9 -THCA-A.

$8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A (5) und $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A (7) zeigen Molekülionen mit m/z 389. Eine Wasserelimination führt zu einem Fragmention mit m/z 371, aus welchem durch eine zusätzliche Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 ein Fragmention mit m/z 327 gebildet wird. Durch eine weitere Wasserelimination entsteht daraus ein Fragmention mit m/z 309. Das Fragmention mit m/z 312 konnte keiner Struktur zugeordnet werden. $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (6) und $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (8) zeigen Molekülionen mit m/z 565. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A bzw. $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A und damit jeweils zu dem Fragmention mit m/z 389. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der der Aglyka $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A und $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A.

Δ^9 -THCA-A-8-on (9) zeigt ein Molekülion mit m/z 371. Durch eine Decarboxylierung der Carbonsäure-Gruppe in Position 2 entsteht ein Fragmention mit m/z 327. Die Fragmentionen mit m/z 284 und m/z 189 konnten keiner Struktur zugeordnet werden. Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid (10) zeigt ein Molekülion von m/z 547. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu Δ^9 -THCA-A-8-on und damit zu dem Fragmention mit m/z 371. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons Δ^9 -THCA-A-8-on.

Δ^9 -THCA-A-COOH (11) zeigt ein Molekülion mit m/z 387. Eine Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 führt zu einem Fragmention mit m/z 343. Durch eine zusätzliche Wasserelimination in Position 1 entsteht ein Fragmention mit m/z 325, durch eine zusätzliche Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 11 ein Fragmention mit m/z 299. Durch eine neutrale Abspaltung von C_4H_6 aus dem Ringsystem kommt es zur Bildung eines Fragmentions mit m/z 245, aus welchem durch eine weitere Ringöffnung ein Fragmention mit m/z 191 entsteht. Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid (12) zeigt ein Molekülion mit m/z 563. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt

zu Δ^9 -THCA-A-COOH und damit zu dem Fragmentation mit m/z 387. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons Δ^9 -THCA-A-COOH. Anhand der aus den EPI-Massenspektren (Abb. 3.19) erhaltenen Übergänge wurde eine MRM-Methode erstellt (Abb. 3.20).

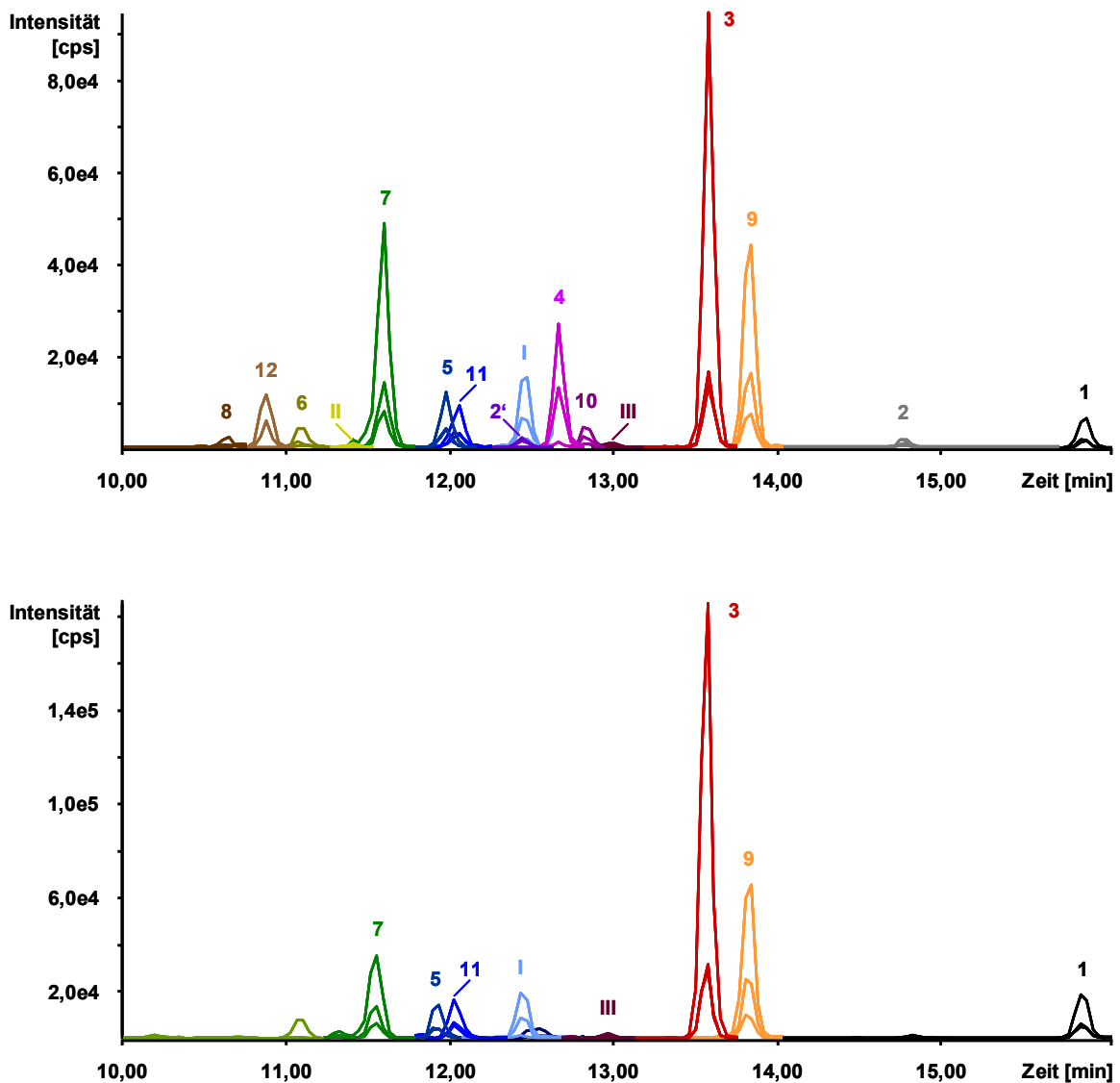


Abb. 3.20 Rekonstruierte LC-ESI-MRM Ionenchromatogramme des Rattenurins 24 h nach oraler Verabreichung von 15 mg Δ^9 -THCA-A/kg Körpergewicht (Oben: keine Konjugatspaltung; Unten: Konjugatspaltung durch β -D-Glucuronidase/Arylsulfatase). Die Nummerierung korrespondiert mit der Nummerierung der Spektren und Strukturen in den Abb. 3.19 bzw. Abb. 3.22.

Im MRM-Modus konnten zwei Δ^9 -THCA-A-Glucuronide nachgewiesen werden, die massenspektrometrisch allerdings nicht zu unterscheiden waren. Aufgrund der

Retentionszeiten ist jedoch anzunehmen, dass es sich bei dem früher eluierenden (RT: 12,40 min) (2') um das polarere Etherglucuronid (Glucuronidierung an der Hydroxyl-Gruppe in Position 1), bei dem später eluierenden Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (RT: 14,74 min) (2) dagegen um das Esterglucuronid (Glucuronidierung an der Carboxyl-Gruppe in Position 2) handelt. Durch die Empfindlichkeitssteigerung bei Verwendung des MRM-Modus wurden darüber hinaus ein weiterer monohydroxylierter Δ^9 -THCA-A-Metabolit (RT: 12,40 min) (I) sowie dessen Glucuronid (RT: 11,37 min) (II) nachgewiesen, denen aber keine Struktur zugeordnet werden konnte. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf einen weiteren monohydroxylierten Δ^9 -THCA-A-Metaboliten (RT: 12,96 min) (III), dessen Struktur ebenfalls nicht aufgeklärt werden konnte. Möglicherweise liegt bei diesen Metaboliten eine Hydroxylierung in der Seitenkette vor. Die genauen Molekülmassen der mittels LC-MS/MS identifizierten Δ^9 -THCA-A-Metabolite wurden wie unter 2.4.4.1.1 beschrieben mit LC-QTOF MS (siehe Kapitel 2.3.3.1.2) durch exakte Massenbestimmung bei einer Toleranz von ± 10 ppm sowie durch Zuordnung der korrekten Isotopenverteilung (Sigma Fit) ermittelt (Tab. 3.10).

Tab. 3.10 Ergebnisse der LC-QTOF MS-Suchanalyse zur Bestätigung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite im Rattenurin (a: Signale mit geringer Intensität, für eine eindeutige Identifizierung jedoch nicht ausreichend, b: Störkomponente, teilweise abgetrennt; c: überlagernde Isotopenverteilung)

Δ^9 -THCA-A bzw. Metabolit	[M-H] ⁻ berechnet	Summen- formel [M-H] ⁻	[M-H] ⁻ gemessen	Fehler [ppm]	Sigma Fit
Δ^9 -THCA-A	357,2071	C ₂₂ H ₂₉ O ₄	357,2089	-4,9	0,0214
Δ^9 -THCA-A-Glucuronid	533,2390	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₀	-	-	-
11-OH- Δ^9 -THCA-A	373,2020	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373,2016	1,1	0,0096
11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid	549,2341	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₁	549,2346	-0,9	0,0232
8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A	389,1970	C ₂₂ H ₂₉ O ₆	389,2005 ^a	-9,8 ^b	-
8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid	565,2284	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₂	+ ^a	+ ^a	+ ^a
8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A	389,1970	C ₂₂ H ₂₉ O ₆	389,1959	2,6	0,0224
8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid	565,2284	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₂	+ ^a	+ ^a	+ ^a
Δ^9 -THCA-A-8-on	371,1864	C ₂₂ H ₂₇ O ₅	371,1864	0,1	0,0433
Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid	547,2178	C ₂₈ H ₃₅ O ₁₁	+ ^a	+ ^a	+ ^a
Δ^9 -THCA-A-COOH	387,1813	C ₂₂ H ₂₇ O ₆	387,1815	-0,4	-
Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid	563,2134	C ₂₈ H ₃₅ O ₁₂	563,2119	2,7	0,139 ^c

3.4.1.2 Identifizierung von Δ 9-THC und dessen Metaboliten in Rattenurin mittels GC-MS

Zur Identifizierung von Δ 9-THC und dessen Metaboliten wurde der Rattenurin wie unter 2.4.4.1.2 beschrieben ohne Konjugatspaltung, nach enzymatischer Konjugatspaltung sowie nach Konjugatspaltung durch alkalische Hydrolyse, SPE und Trimethylsilylierung mittels GC-EI-MS im SIM-Modus (siehe Kapitel 2.3.3.1.3) untersucht (Abb. 3.21).

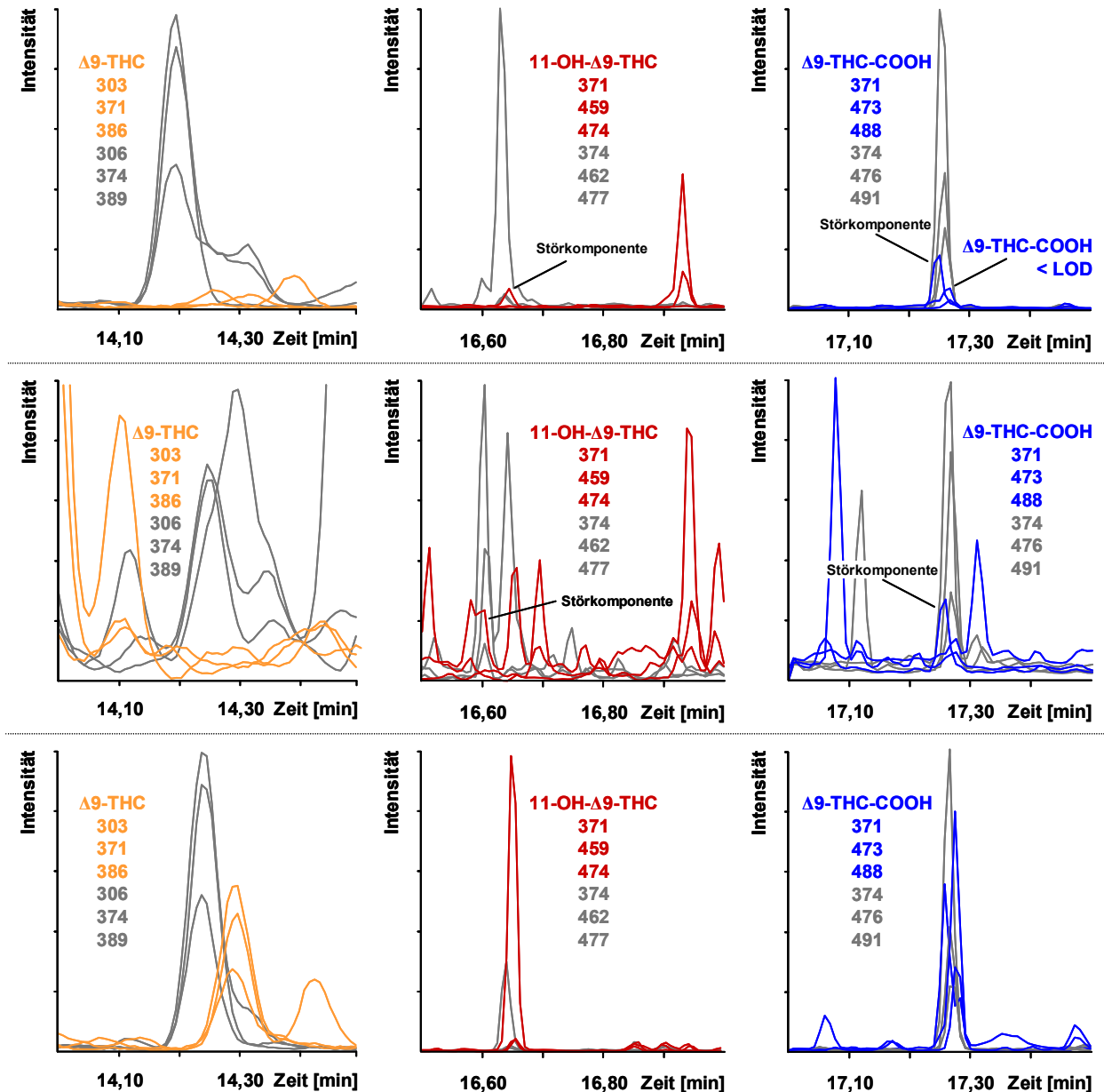


Abb. 3.21 Rekonstruierte GC-EI-SIM Ionenchromatogramme des Rattenurins 24 h nach oraler Verabreichung von 15 mg Δ 9-THCA-A/kg Körpergewicht (Oben: keine Konjugatspaltung; Mitte: Konjugatspaltung durch β -D-Glucuronidase/Arylsulfatase; Unten: Konjugatspaltung durch alkalische Hydrolyse). Die IS sind in Grau dargestellt.

Weder im nativen noch im enzymatisch gespaltenen Urin konnten Δ^9 -THC oder dessen Metabolite nachgewiesen werden. Obwohl die β -D-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *E. coli* eine höhere Effektivität in der Spaltung der Glucuronide von Δ^9 -THC und dessen Metaboliten aufweist als die aus *Helix pomatia*, wird Δ^9 -THC-COOH-Glucuronid aber auch von der β -D-Glucuronidase/Arylsulfatase aus *Helix pomatia* effektiv gespalten, so dass zumindest Δ^9 -THC-COOH als Hauptmetabolit von Δ^9 -THC im Urin bei einer metabolischen Umwandlung von Δ^9 -THCA-A zu Δ^9 -THC hätte nachgewiesen werden können. Damit scheint der Rattenorganismus nicht - zumindest im relevanten Ausmaß - über eine Enzymaktivität zu verfügen, welche die *in-vivo* Decarboxylierung von Δ^9 -THCA-A katalysiert. Die Spuren von Δ^9 -THC-COOH im nativen Urin sind auf einen geringen Δ^9 -THC-Gehalt in der für die Studie eingesetzten Δ^9 -THCA-A zurückzuführen. Nach alkalischer Hydrolyse wurden jedoch sowohl Δ^9 -THC als auch 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH identifiziert. Da Δ^9 -THCA-A im Alkalischen leicht unter Bildung von Δ^9 -THC decarboxyliert ^[44], ist anzunehmen, dass Δ^9 -THCA-A und deren Metabolite 11-OH- Δ^9 -THCA-A und Δ^9 -THCA-A-COOH während der alkalischen Hydrolyse (pH-Wert ~ 10) teilweise unter Abspaltung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 zu Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH zersetzt wurden.

3.4.1.3 Postulierung des Stoffwechselwegs anhand der identifizierten Metabolite

Anhand der mittels LC-MS/MS und LC-QTOF MS identifizierten Metabolite kann für Δ^9 -THCA-A folgender Stoffwechselweg postuliert werden (Abb. 3.22):

Δ^9 -THCA-A wird in Position 11 zu 11-OH- Δ^9 -THCA-A monohydroxyliert und zu Δ^9 -THCA-A-COOH weiter oxidiert. Darüber hinaus erfolgen Monohydroxylierungen in Position 8 zu 8α -OH- Δ^9 -THCA-A und 8β -OH- Δ^9 -THCA-A, gefolgt von einer Dehydrierung zu Δ^9 -THCA-A-8-on. Beide 8-OH-Metabolite werden in Position 11 zu $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A und $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A weiter oxidiert.

Alle Phase I-Metabolite werden auch in glucuronidierter Form ausgeschieden, d.h. als Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid, Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid, $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid und $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid. Anhand der Massenspektren dieser Glucuronide konnte nicht unterschieden werden, ob die Glucuronidierung an einer Carboxyl- (Esterglucuronide) oder Hydroxyl-Gruppe (Etherglucuronide) erfolgte. Allerdings überwiegt bei Δ^9 -THC-COOH, welche an beiden funktionellen Gruppen von der UDP-Glucuronyl-Transferase angegriffen wird, die Bildung des Esterglucuronides. Es ist

deshalb anzunehmen, dass es sich bei den identifizierten Phase II-Metaboliten von Δ^9 -THCA-A um Esterglucuronide handelt. Obwohl einige Δ^9 -THCA-A-Metabolite mehrere Hydroxyl- und Carboxyl-Gruppen aufweisen, wurde eine mehrfache Glucuronidierung nicht beobachtet. Ferner ergaben sich keine Hinweise auf eine Sulfatierung oder metabolische Umwandlung von Δ^9 -THCA-A zu Δ^9 -THC.

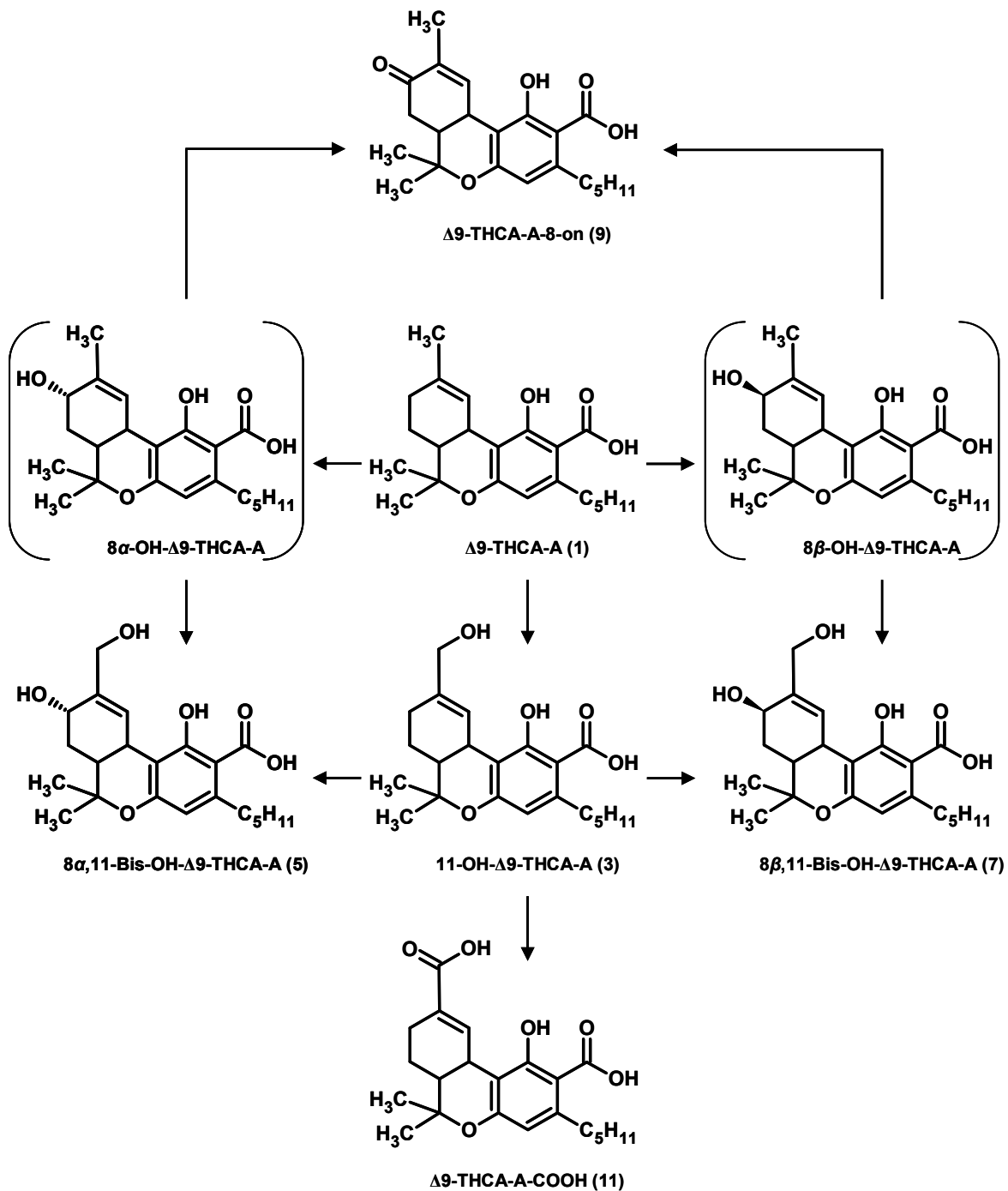


Abb. 3.22 Postulierter Phase I-Stoffwechselweg für Δ^9 -THCA-A in Ratten. Die Nummerierung korrespondiert mit der Nummerierung der Spektren und Strukturen in den Abb. 3.19 und Abb. 3.20. Bei den Strukturen in Klammern handelt es sich um postulierte Zwischenstufen.

3.4.2 Studien zum humanen Metabolismus von Δ^9 -THCA-A

3.4.2.1 Identifizierung von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten in Humanurin mittels LC-MS/MS und LC-QTOF MS

Der im Rahmen eines Pilotversuches zum Metabolismus und zur Elimination von Δ^9 -THCA-A fünf Stunden nach deren oraler Aufnahme gewonnene Humanurin wurde wie unter 2.4.4.2.1 beschrieben sowohl nativ als auch nach enzymatischer Konjugatspaltung durch Proteinfällung aufgearbeitet und die Δ^9 -THCA-A-Metabolite wie unter 2.3.3.2.1 beschrieben mittels LC-ESI-MS detektiert.

Die Identifizierung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite und Postulierung ihrer Strukturen erfolgte wie unter 3.4.1.1 bereits für den Rattenurin dargestellt. Wurden bei der Aufnahme der EPI-Massenspektren für ein deprotoniertes Molekülion mehrere Massenspektren erhalten, erfolgte die Zuordnung der für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen zu den entsprechenden Massenspektren anhand des Fragmentierungsmusters, der Retentionszeiten und der Polaritätsindices (logP-Werte). Die Berechnung der logP-Werte war erforderlich, da sich die Massenspektren der deprotonierten Moleküle teilweise nur in der Intensität der entstehenden Fragmentationen unterschieden. Außerdem wurden die Retentionszeiten der Δ^9 -THCA-A-Metabolite bei der Trennung mit einer Phenylhexyl-Phase sowohl durch Wechselwirkungen mit dem Kohlenstoff-Grundgerüst der stationären Phase als auch durch π - π -Wechselwirkungen mit deren Phenyl-Ring beeinflusst. Diese Säule wurde ausgewählt, da sie sich bereits für die Bestimmung von Δ^9 -THC und dessen Metaboliten 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH bewährt hatte [204].

Die EPI-Massenspektren, Retentionszeiten, Strukturen und vorherrschenden Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten sind in Abb. 3.23 dargestellt. Die Nummern der entsprechenden Massenspektren in Abb. 3.23 sind in Klammern angegeben.

Im Humanurin konnten folgende Metabolite von Δ^9 -THCA-A (RT: 15,82 min) (1) identifiziert werden: Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (RT: 14,73 min) (2), 11-OH- Δ^9 -THCA-A (RT: 13,53 min) (3), 11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (RT: 12,62 min) (4), 8 α -Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A (8 α -OH- Δ^9 -THCA-A) (RT: 12,93 min) (5), 8 α -Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (8 α -OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid) (RT: 12,05 min) (6), 8 β -Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A (8 β -OH- Δ^9 -THCA-A) (RT: 12,41 min) (7), 8 β -Hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinolsäure-A-

Glucuronid (8β -OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid) (RT: 11,34 min) (8), Δ 9-THCA-A-8-on (RT: 13,78 min) (9), Δ 9-THCA-A-8-on-Glucuronid (RT: 12,78 min) (10), 8α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A (RT: 11,93 min) (11), 8α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid (RT: 11,04 min) (12), 8β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A (RT: 11,54 min) (13), 8β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid (RT: 10,56 min) (14), Δ 9-THCA-A-COOH (RT: 11,95 min) (15) Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid (RT: 10,80 min) (16), 11-Nor-9-carboxy-8-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure-A (8 -OH- Δ 9-THCA-A-COOH) (RT: 10,18 min) (17), 11-Nor-9-carboxy-8-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (8 -OH- Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid) (RT: 9,41 min) (18), 11-Nor-9-carboxy-4'-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure-A ($4'$ -OH- Δ 9-THCA-A-COOH) (RT: 9,22 min) (19), 11-Nor-9-carboxy-4'-hydroxy- Δ 9-tetrahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid ($4'$ -OH- Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid) (RT: 8,41 min) (20), 9,10-Bis-hydroxy-hexahydrocannabinolsäure-A (9,10-Bis-OH-HHCA-A) (RT: 12,14 min) (21), 9,10-Bis-hydroxy-hexahydrocannabinolsäure-A-Glucuronid (9,10-Bis-OH-HHCA-A-Glucuronid) (RT: 11,39 min) (22).

Im folgenden Abschnitt werden mögliche Fragmentierungsmuster von Δ 9-THCA-A und ihren Metaboliten in Bezug auf die für die Δ 9-THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen erörtert. Die Nummern der entsprechenden Massenspektren in Abb. 3.23 sind wiederum in Klammern angegeben.

Δ 9-THCA-A (1) zeigt ein Molekülion von m/z 357. Eine Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 führt zu einem Fragmention mit m/z 313. Durch eine zusätzliche neutrale Abspaltung von C_5H_8 aus dem Ringsystem entsteht ein Fragmention mit m/z 245, aus welchem durch eine weitere Ringöffnung ein Fragmention mit m/z 191 gebildet wird.

Δ 9-THCA-A-Glucuronid (2) zeigt ein Molekülion von m/z 533. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu Δ 9-THCA-A mit einem Fragmention mit m/z 357. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons Δ 9-THCA-A.

11-OH- Δ 9-THCA-A (3), 8α -OH- Δ 9-THCA-A (5) und 8β -OH- Δ 9-THCA-A (7) zeigen Molekülionen von m/z 373. Durch eine Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 entsteht ein Fragmention mit m/z 329, aus welchem durch eine zusätzliche Wasserabspaltung in Position 11 bzw. 8 ein Fragmention mit m/z 311 gebildet wird. Die Fragmentionen mit m/z 268 und m/z 173 konnten keiner Struktur zugeordnet werden. 11-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid (4), 8α -OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid (6) und 8β -OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid (8) zeigen ein Molekülion von m/z 549. Die Abspaltung

von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu 11-OH- Δ^9 -THCA-A, 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A bzw. 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A und damit jeweils zu einem Fragmentation mit m/z 373. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der der Aglyka.

Δ^9 -THCA-A-8-on (9) zeigt ein Molekülion von m/z 371. Durch eine Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 entsteht ein Fragmentation mit m/z 327. Die Fragmentationen mit m/z 284 und m/z 189 konnten keiner Struktur zugeordnet werden.

Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid (10) zeigt ein Molekülion von m/z 547. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu Δ^9 -THCA-A-8-on mit einem Fragmentation mit m/z 371. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons Δ^9 -THCA-A-8-on.

8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A (11) und 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A (13) zeigen Molekülionen von m/z 389. Eine Wasserelimination führt zu einem Fragmentation mit m/z 371 und eine zusätzliche Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 zu einem Fragmentation mit m/z 327. Durch eine weitere Wasserabspaltung entsteht ein Fragmentation mit m/z 309. Das Fragmentation mit m/z 312 konnte keiner Struktur zugeordnet werden.

8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (12) und 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (14) zeigen Molekülionen von m/z 565. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu 8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A bzw. 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A und damit jeweils zu einem Fragmentation mit m/z 389. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der der Aglyka 8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A und 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A.

Δ^9 -THCA-A-COOH (15) zeigt ein Molekülion von m/z 387. Eine Decarboxylierung einer der beiden Carboxyl-Gruppen führt zu einem Fragmentation mit m/z 343. Durch eine zusätzliche Wasserelimination in Position 1 entsteht ein Fragmentation mit m/z 325, durch eine zusätzliche Decarboxylierung der zweiten Carboxyl-Gruppe dagegen ein Fragmentation mit m/z 299. Durch eine neutrale Abspaltung von C₄H₆ aus dem Ringsystem kommt es zur Bildung eines Fragmentions mit m/z 245, aus welchem durch eine weitere Ringöffnung ein Fragmentation mit m/z 191 entsteht.

Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid (16) zeigt ein Molekülion von m/z 563. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu Δ^9 -THCA-A-COOH mit einem Fragmentation mit m/z 387. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons Δ^9 -THCA-A-COOH.

8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH (17) zeigt ein Molekülion von m/z 403. Eine Wasserelimination in Position 8 führt zu einem Fragmentation mit m/z 385. Durch eine

zusätzliche Decarboxylierung beider Carboxyl-Gruppe entsteht ein Fragmention mit m/z 297. Das Fragmention mit m/z 159 konnte keiner Struktur zugeordnet werden.

8-OH- Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid (18) zeigt ein Molekülion von m/z 579. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu 8-OH- Δ 9-THCA-A-COOH und einem Fragmention mit m/z 403. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons 8-OH- Δ 9-THCA-A-COOH.

4'-OH- Δ 9-THCA-A-COOH (19) zeigt ein Molekülion von m/z 403. Eine Decarboxylierung einer der beiden Carboxyl-Gruppen führt zu einem Fragmention mit m/z 359. Durch eine zusätzliche Decarboxylierung der zweiten Carboxyl-Gruppe kommt es zur Bildung eines Fragmentions mit m/z 315. Durch neutrale Abspaltung von C_4H_6 aus dem Ringsystem entsteht daraus ein Fragmention mit m/z 261.

4'-OH- Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid (20) zeigt ein Molekülion von m/z 579. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu 4'-OH- Δ 9-THCA-A-COOH mit einem Fragmention mit m/z 403. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons 4'-OH- Δ 9-THCA-A-COOH.

9,10-Bis-OH-HHCA-A (21) zeigt ein Molekülion von m/z 391. Eine Wasserelimination sowie eine zusätzliche Decarboxylierung der Carboxyl-Gruppe in Position 2 führen zu einem Fragmention mit m/z 329. Durch eine weitere Wasserelimination entsteht ein Fragmention mit m/z 311, aus welchem nach Ringöffnung ein Fragmention mit m/z 191 gebildet wird. Das Fragmention mit m/z 345 konnte keiner Struktur zugeordnet werden.

9,10-Bis-OH-HHCA-A-Glucuronid (16) zeigt ein Molekülion von m/z 567. Die Abspaltung von Glucuronsäure ($\Delta m = 176$) führt zu 9,10-Bis-OH-HHCA-A mit einem Fragmention mit m/z 391. Die weitere Fragmentierung erfolgt in Analogie zu der des Aglykons 9,10-Bis-OH-HHCA-A.

Bei der Aufnahme der EPI-Massenspektren der Molekülionen mit m/z 389 wurden neben den bereits beschriebenen bishydroxylierten Δ 9-THCA-A-Metaboliten zwei weitere bishydroxylierte Δ 9-THCA-A-Metabolite (RT: 12,60 min bzw. 13,24 min) (I bzw. II, Abb. 3.24) identifiziert. Diese Metabolite konnten zwar keiner Struktur zugeordnet werden, allerdings ist aufgrund des in beiden Spektren auftretenden Fragmentions mit m/z 191 anzunehmen, dass diese eine unsubstituierte Seitenkette aufweisen.

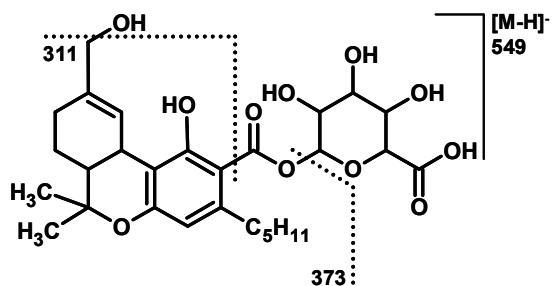
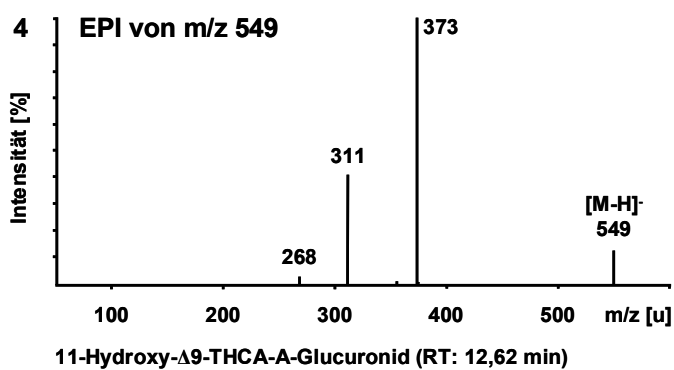
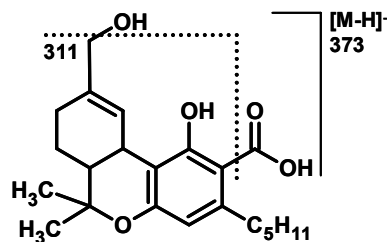
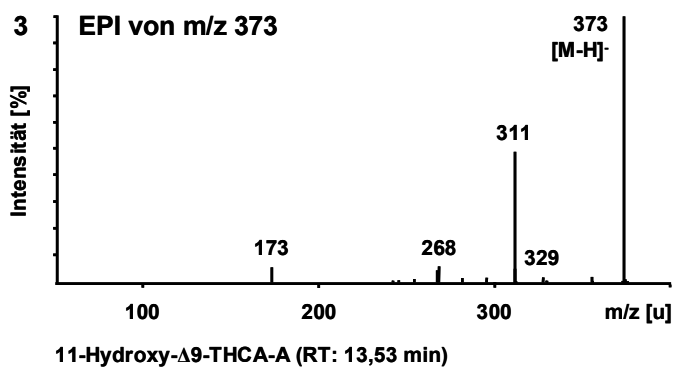
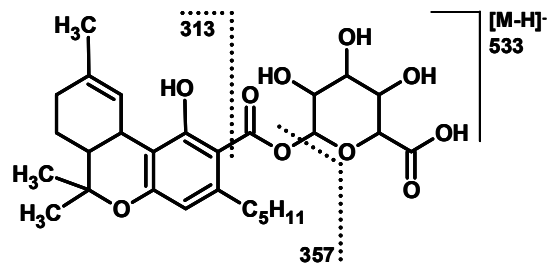
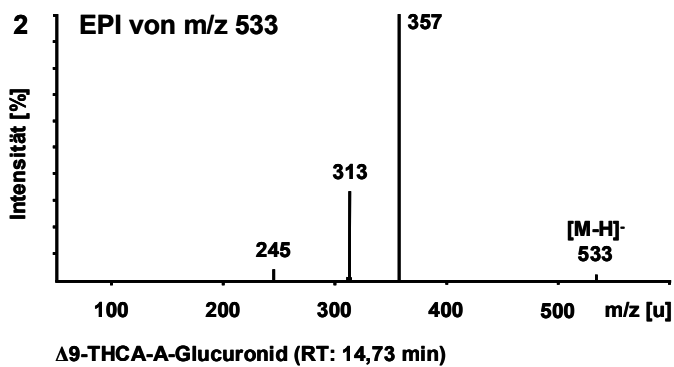
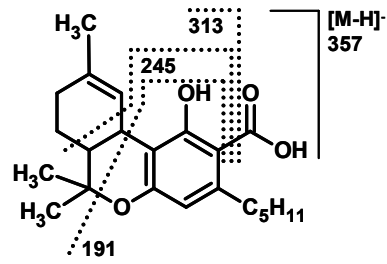
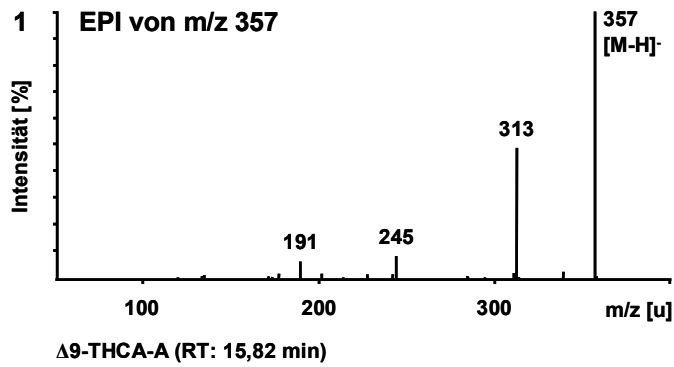


Abb. 3.23 LC-ESI-MS/MS-Spektren (CE -20, -35, -50 eV, summiert), Retentionszeiten, Strukturen und vorherrschende Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten. Die Nummerierung der korrespondiert mit der Nummerierung in den Abb. 3.24 und 3.26.

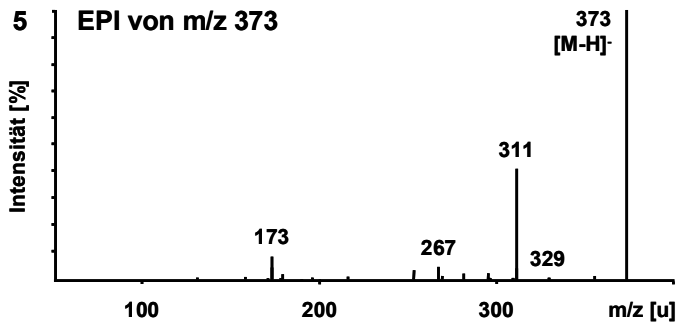
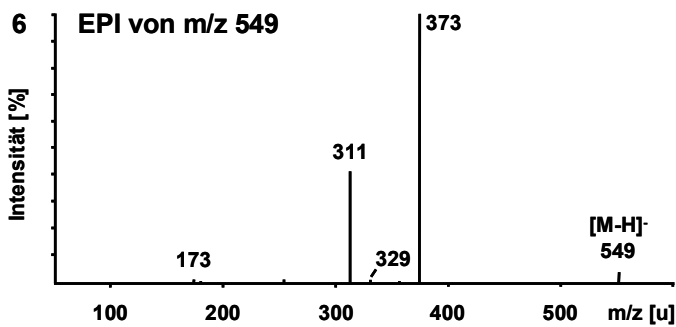
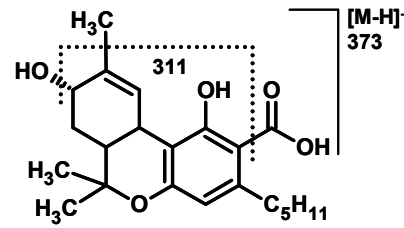
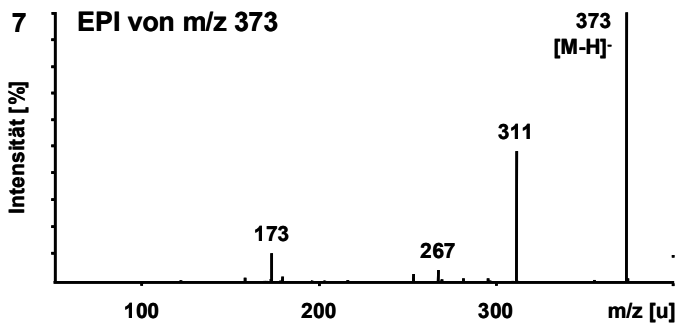
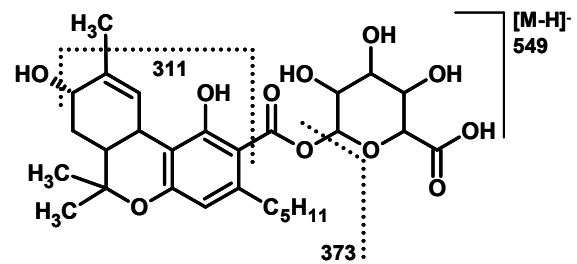
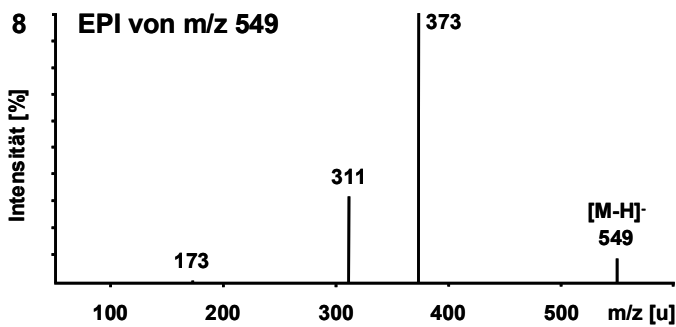
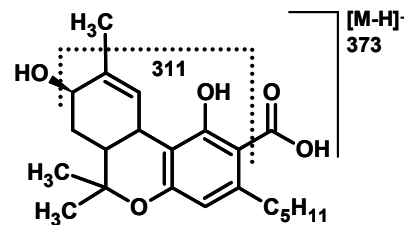
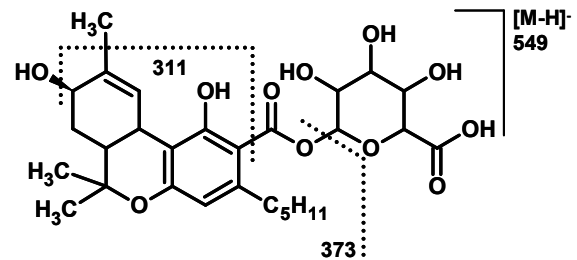
8 α -Hydroxy- Δ 9-THCA-A (RT: 12,92 min)8 α -Hydroxy- Δ 9-THCA-A-Glucuronid (RT: 12,05 min)8 β -Hydroxy- Δ 9-THCA-A (RT: 12,40 min)8 β -Hydroxy- Δ 9-THCA-A-Glucuronid (RT: 11,34 min)

Abb. 3.23 (Fortsetzung).

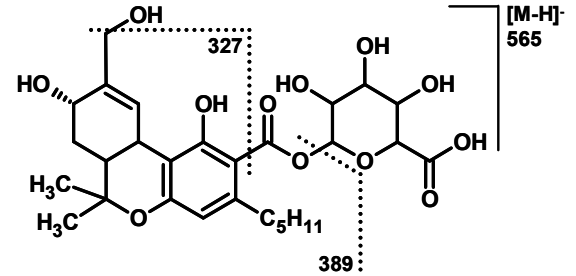
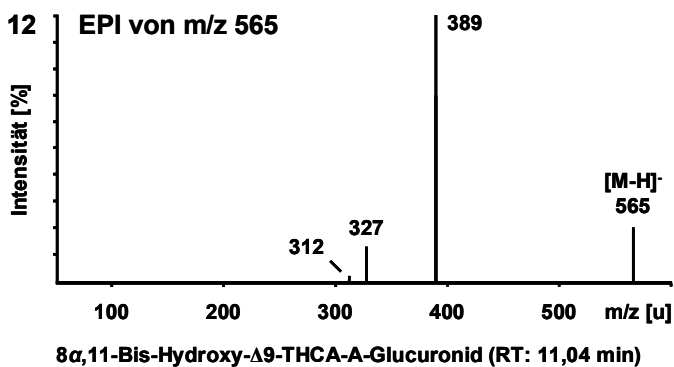
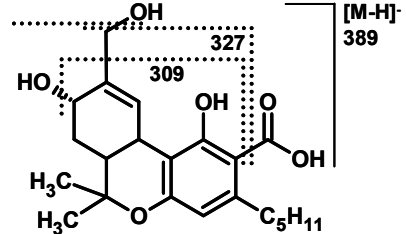
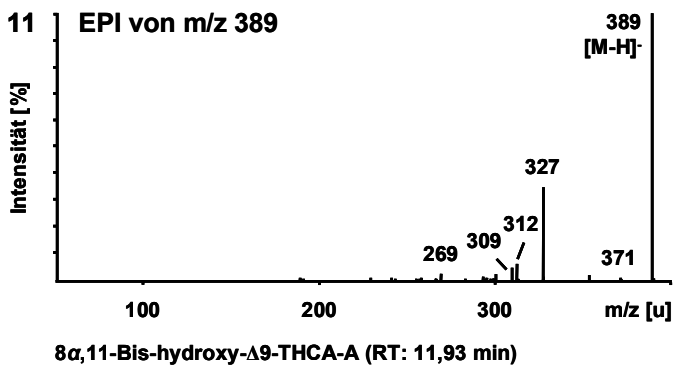
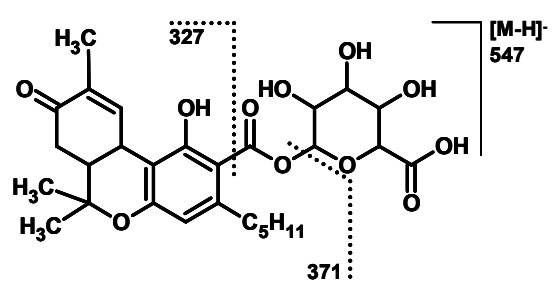
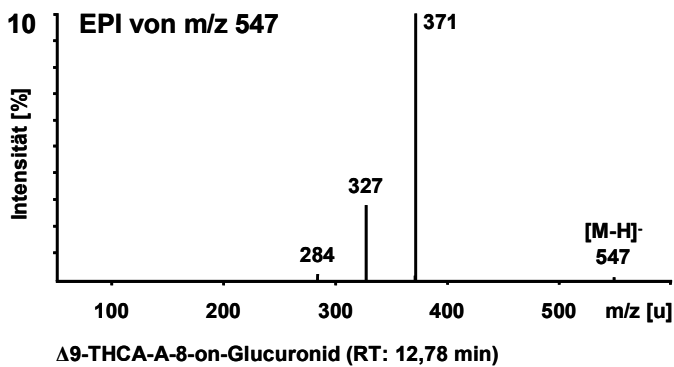
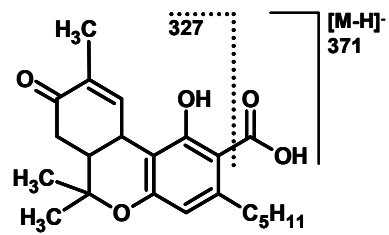
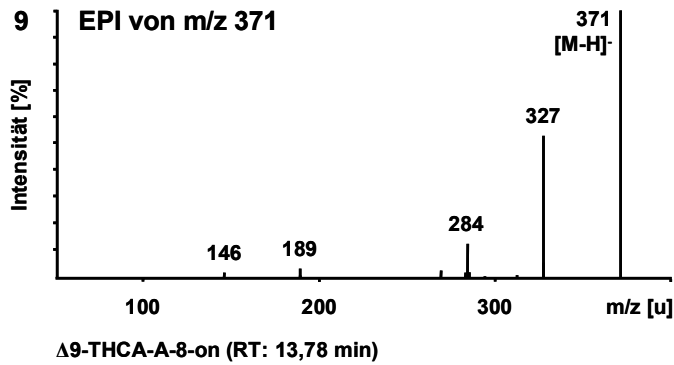


Abb. 3.23 (Fortsetzung).

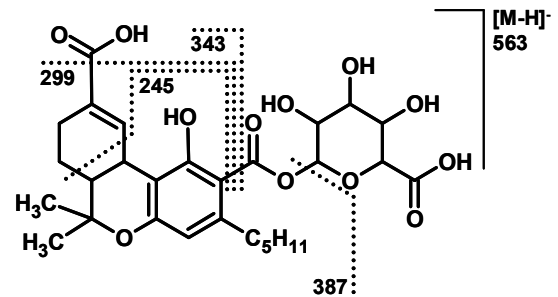
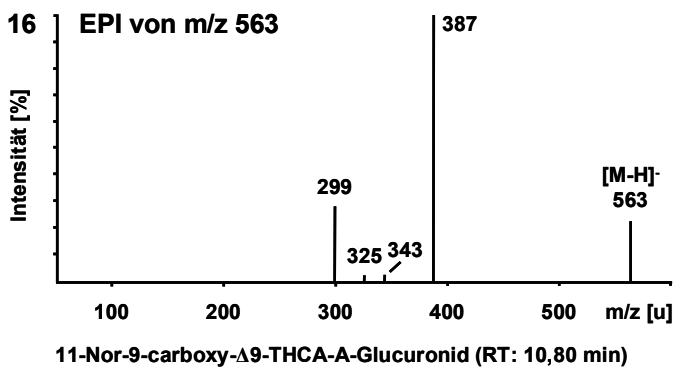
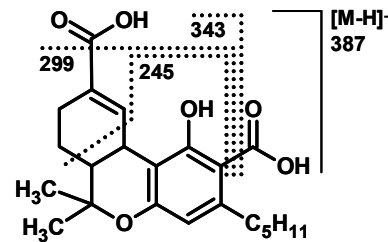
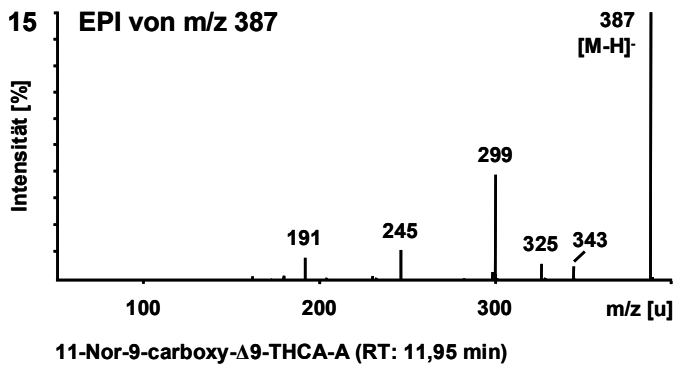
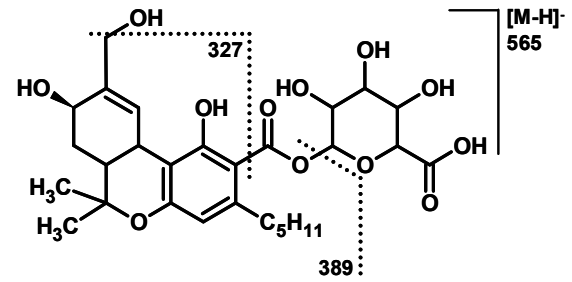
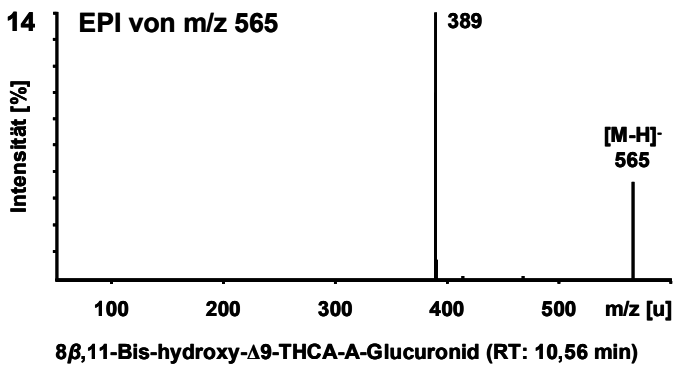
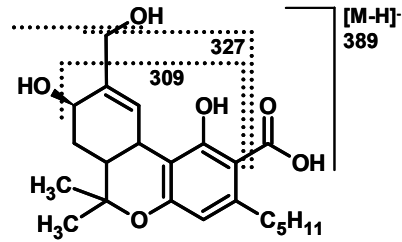
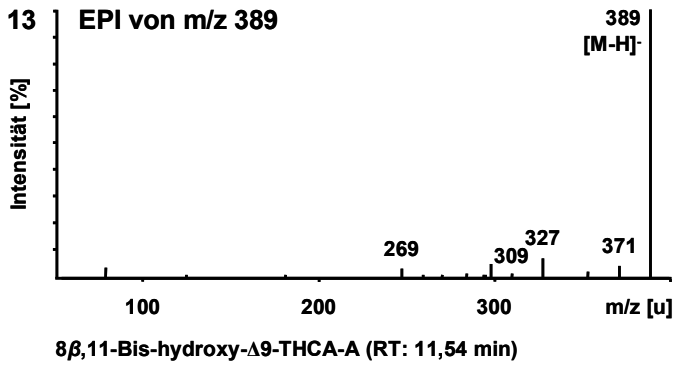


Abb. 3.23 (Fortsetzung).

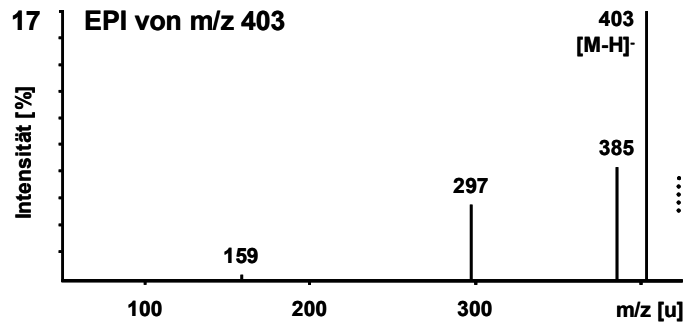
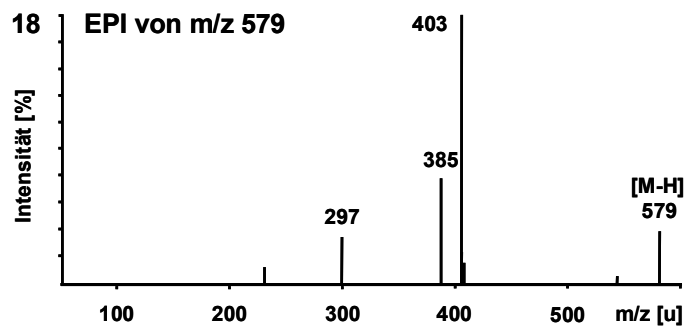
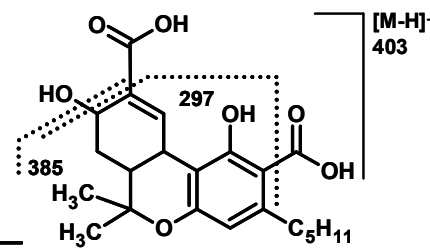
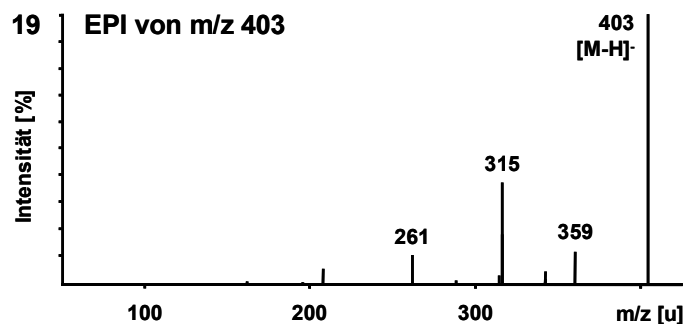
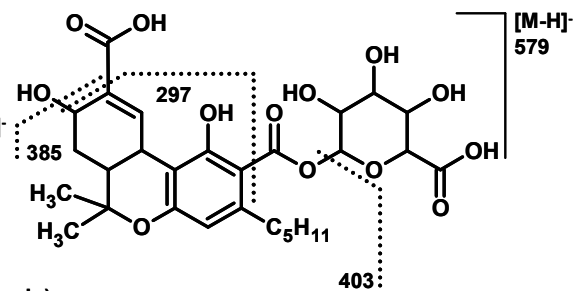
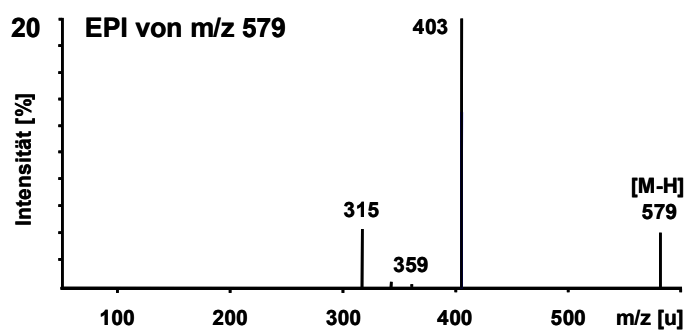
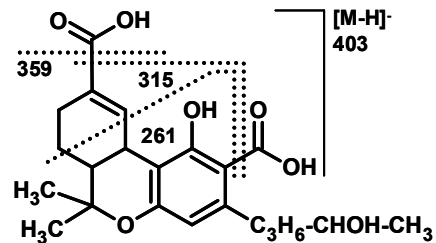
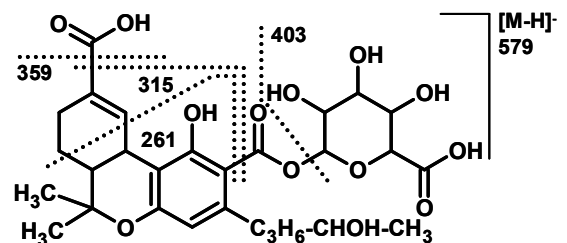
11-Nor-9-carboxy-8-hydroxy- Δ^9 -THCA-A (RT: 10,18 min)11-Nor-9-carboxy-8-hydroxy- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (RT: 9,41 min)11-Nor-9-carboxy-4'-hydroxy- Δ^9 -THCA-A (RT: 9,22 min)11-Nor-9-carboxy-4'-hydroxy- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid (RT: 8,41 min)

Abb. 3.23 (Fortsetzung).

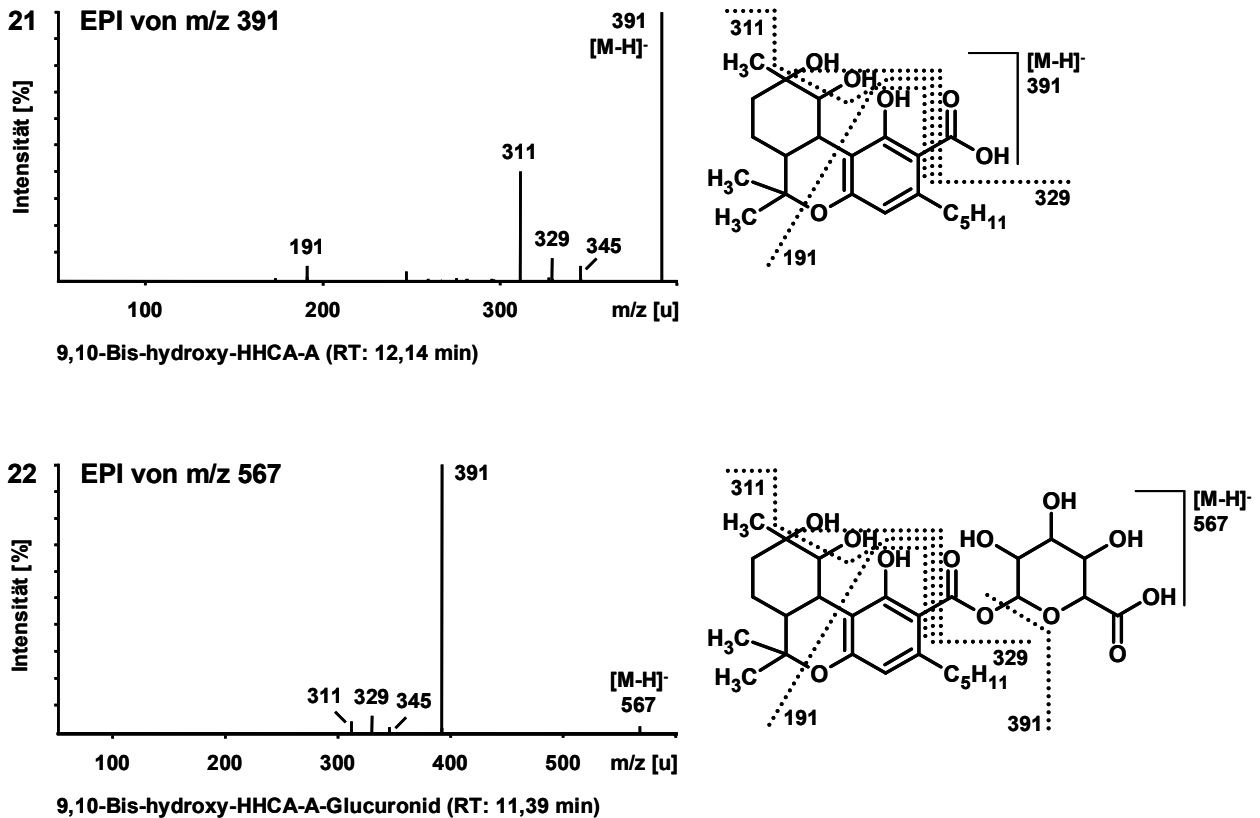


Abb. 3.23 (Fortsetzung).

Anhand der aus den EPI-Massenspektren (Abb. 3.23) erhaltenen Übergänge wurde die bereits bestehende MRM-Methode um die zusätzlich zu den im Rattenurin identifizierten Metabolite erweitert (Abb. 3.24). Im MRM-Modus ergaben sich Hinweise auf ein zweites $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid. Wie bereits für die $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronide im Rattenurin beschrieben, ist anzunehmen, dass es sich bei dem früher eluierenden $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid (RT: 12,40 min) (2') um das polarere Etherglucuronid (Glucuronidierung an der Hydroxyl-Gruppe in Position 1), bei dem später eluierenden $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid (RT: 14,73 min) (2) hingegen um das Esterglucuronid (Glucuronidierung an der Carboxyl-Gruppe in Position 2) handelt.

Aufgrund höherer Empfindlichkeit des MRM-Modus gegenüber dem EPI-Modus wurden darüber hinaus ein weiterer monohydroxylierter $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolit (RT: 14,35 min) (III) sowie dessen Glucuronid (RT: 13,42 min) (IV) nachgewiesen, die jedoch keiner Struktur zugeordnet werden konnten.

Mittels MRM wurde bestätigt, dass es sich bei den beiden im EPI-Modus identifizierten bishydroxylierten $\Delta 9$ -THCA-A-Metaboliten um Aglyka handelt. Zusätzlich wurde ein

weiteres Glucuronid eines bishydroxylierten Metaboliten detektiert (RT: 9,67 min) (V), das aber ebenfalls keiner Struktur zugeordnet werden konnte.

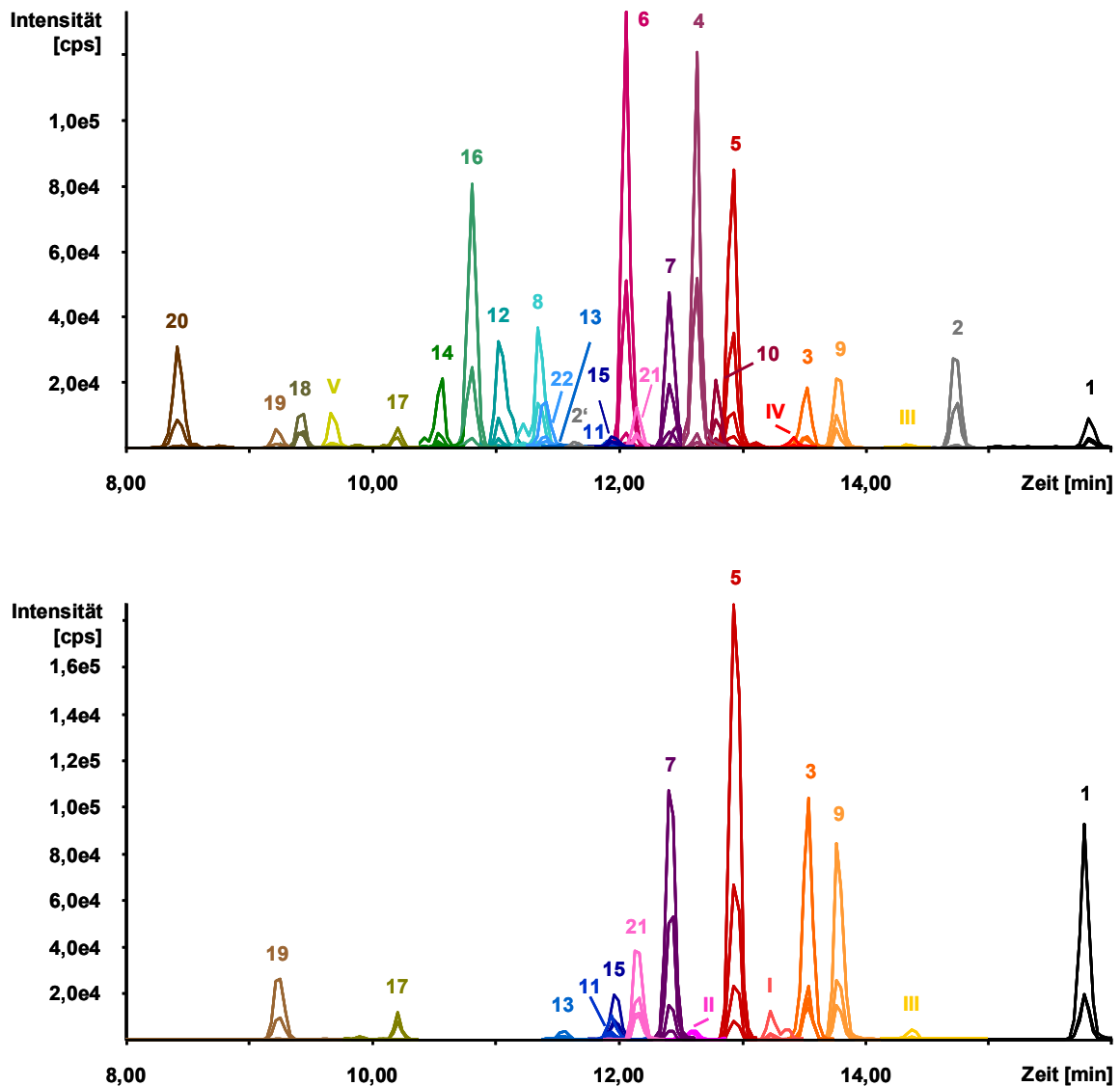


Abb. 3.24 Rekonstruierte LC-ESI-MRM Ionenchromatogramme des Humanurins 5 h nach oraler Aufnahme von 50 mg Δ^9 -THCA-A (Oben: keine Konjugatspaltung; Unten: Konjugatspaltung durch β -D-Glucuronidase/Arylsulfatase). Die Nummerierung korrespondiert mit der Nummerierung in den Abb. 3.23 und 3.26.

Mit der unter 2.3.3.1.2 beschriebenen LC-QTOF MS-Methode wurde die exakte Molekülmasse der mittels LC-MS/MS identifizierten Δ^9 -THCA-A-Metabolite durch Massenbestimmung mit einer Toleranz von ± 10 ppm und Zuordnung der korrekten Isotopenverteilung (Sigma Fit) ermittelt (Tab. 3.11).

Tab. 3.11 Ergebnisse der LC-QTOF MS-Suchanalyse zur Bestätigung der Δ 9-THCA-A-Metabolite im Humanurin

Δ 9-THCA-A bzw. Metabolit	[M-H] ⁻ berechnet	Summenformel [M-H] ⁻	[M-H]-gemessen	Fehler [ppm]	Sigma Fit
Δ 9-THCA-A	357,2071	C ₂₂ H ₂₉ O ₄	357,2080	-2,47	0,013
Δ 9-THCA-A-Glucuronid	533,2392	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₀	533,2393	-0,20	0,023
11-OH- Δ 9-THCA-A	373,2020	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373,2024	-0,81	0,017
11-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid	549,2341	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₁	549,2355	-2,44	0,023
8 α -OH- Δ 9-THCA-A	373,2020	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373,2029	-2,27	0,013
8 α -OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid	549,2341	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₁	549,2360	-3,36	0,026
8 β -OH- Δ 9-THCA-A	373,2020	C ₂₂ H ₂₉ O ₅	373,2011	1,48	0,015
8 β -OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid	549,2341	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₁	549,2372	-5,62	0,023
Δ 9-THCA-A-8-on	371,1864	C ₂₂ H ₂₇ O ₅	371,1866	-0,56	0,024
Δ 9-THCA-A-8-on-Glucuronid	547,2185	C ₂₈ H ₃₅ O ₁₁	547,2200	-2,73	0,100
8 α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A	389,1970	C ₂₂ H ₂₉ O ₆	389,1970	2,18	0,022
8 α ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid	565,2291	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₂	565,2320	-5,20	0,029
8 β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A	389,1970	C ₂₂ H ₂₉ O ₆	389,1970	3,37	0,143
8 β ,11-Bis-OH- Δ 9-THCA-A-Glucuronid	565,2291	C ₂₈ H ₃₇ O ₁₂	565,2342	-10,76	0,037
Δ 9-THCA-A-COOH	387,1813	C ₂₂ H ₂₇ O ₆	387,1810	0,84	0,022
Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid	563,2134	C ₂₈ H ₃₅ O ₁₂	563,2151	-3,03	0,025
8-OH- Δ 9-THCA-A-COOH	403,1762	C ₂₂ H ₂₇ O ₇	403,1730	7,42	0,029
8-OH- Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid	579,2083	C ₂₈ H ₃₅ O ₁₃	579,2115	-5,60	0,017
4'-OH- Δ 9-THCA-A-COOH	403,1762	C ₂₂ H ₂₇ O ₇	403,1737	6,35	0,018
4'-OH- Δ 9-THCA-A-COOH-Glucuronid	579,2083	C ₂₈ H ₃₅ O ₁₃	579,2100	-2,97	0,019
9,10-Bis-OH-HHCA-A	391,2126	C ₂₂ H ₃₁ O ₆	391,2117	2,34	0,026
9,10-Bis-OH-HHCA-A-Glucuronid	567,2447	C ₂₈ H ₃₉ O ₁₂	567,2480	-5,90	0,088

Von den in MRM-Modus zusätzlich identifizierten Δ 9-THCA-A-Metaboliten konnten mittels LC-QTOF MS allerdings nur die beiden bishydroxylierten Δ 9-THCA-A-Metabolite (I bzw. II) bestätigt werden. Für alle anderen Δ 9-THCA-A-Metabolite gelang dies - wahrscheinlich aufgrund zu geringer Konzentrationen - nicht.

3.4.2.2 Identifizierung von Δ^9 -THCA-A-Metaboliten in Humanurin mittels GC-MS

Der bereits mittels LC-MS/MS und LC-QTOF MS untersuchte Humanurin wurde wie unter 2.4.4.2.2 beschrieben nativ sowie nach enzymatischer Konjugatsspaltung durch SPE und Trimethylsilylierung aufgearbeitet und die Δ^9 -THCA-A-Metabolite mit der unter 2.3.3.2.2 beschriebenen GC-EI-MS-Methode identifiziert. Die für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen wurden aus den aufgenommenen Fragmenten abgeleitet und in Anlehnung an das Fragmentierungsmuster der Δ^9 -THCA-A sowie des Δ^9 -THC und dessen Metaboliten interpretiert ^[202]. Die EI-Massenspektren, Retentionszeiten, Strukturen und vorherrschenden Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten sind in Abb. 3.25 dargestellt. Die Nummern der entsprechenden Massenspektren in Abb. 3.25 sind in Klammern angegeben.

Im Humanurin konnten folgende Metabolite von Δ^9 -THCA-A (RT: 16,64 min) (1) identifiziert werden: 11-OH- Δ^9 -THCA-A (RT: 17,56 min) (2), 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A (RT: 17,46 min) (3), 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A (RT: 17,48 min) (4) und Δ^9 -THCA-A-COOH (RT: 18,16 min) (5).

Im folgenden Abschnitt werden mögliche Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten in Bezug auf die für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen erörtert. Die Nummern der entsprechenden Massenspektren in Abb. 3.25 sind wiederum in Klammern angegeben.

Δ^9 -THCA-A (1) zeigt ein Molekülion mit m/z 502. Durch die Abspaltung einer Methyl-Gruppe aus der trimethylsilylierten Carboxyl-Gruppe entsteht ein Fragmention mit m/z 487 ^[193]. Bei den Fragmentionen m/z 488 und m/z 489 handelt es sich um Isotopenpeaks des Fragmentions m/z 487 ^[194]. Kommt es nach Abspaltung einer Methyl-Gruppe zusätzlich zu einer Allyl-Spaltung der Pentyl-Seitenkette, entsteht ein Fragmention mit m/z 431. Das Fragmention mit m/ 413 entsteht durch die Abspaltung von OSi(CH₃)₃ aus der trimethylsilylierten Carboxyl-Gruppe in Position 2 unter Bildung eines stabilen Acyliumions ^[193]. Eine weitere Abspaltung von Kohlenmonoxid aus diesem Fragmention führt zum Fragmention mit m/z 385. Das Fragmention mit m/z 339 konnte keiner Struktur zugeordnet werden.

11-OH- Δ^9 -THCA-A (2) zeigt ein Molekülion mit m/z 590. Eine Abspaltung einer Methyl-Gruppe führt zu einem Fragmention mit m/z 575. Bei den Fragmentionen m/z 576 und m/z 577 handelt es sich um Isotopenpeaks des Fragmentions m/z 575 ^[194]. Durch eine zusätzliche Abspaltung der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe in Position 11 entsteht

ein Fragmentation mit m/z 487. Wird hingegen die trimethylsilylierte Carboxyl-Gruppe in Position 2 abgespalten, so entsteht ein Fragmentation mit m/z 473.

8α -OH- Δ 9-THCA-A (3) und 8β -OH- Δ 9-THCA-A (4) zeigen Molekülionen mit m/z 590. Eine Abspaltung einer Methyl-Gruppe führt zu einem Fragmentation mit m/z 575. Bei den Fragmentationen m/z 576 und m/z 577 handelt es sich um Isotopenpeaks des Fragmentations m/z 575 ^[194]. Wird aus dem Molekülion dagegen die trimethylsilylierte Hydroxyl-Gruppe in Position 8 abgespalten, entsteht ein Fragmentation mit m/z 500. Durch Abspaltung der trimethylsilylierten Hydroxyl-Gruppe in Position 8 aus dem Fragmentation mit m/z 575 entsteht ein Fragmentation mit m/z 485. Wird aus dem Molekülion die trimethylsilylierte Carboxyl-Gruppe in Position 2 abgespalten, so entsteht ein Fragmentation mit m/z 459. Die hohe Intensität der durch Abspaltung von Trimethylsilanol entstehenden Fragmentationen mit m/z 500 bzw. 485 im Spektrum von 8α -OH- Δ 9-THCA-A (3) ist auf die leichte Ablösung des Wasserstoffatoms in Position 10a zurückzuführen, da dieses in Allyl-Stellung zur Doppelbindung und in Benzyl-Stellung zum Aromaten angeordnet ist. Darüber hinaus begünstigt die pseudoaxiale 8α -OSi(CH₃)₃-Gruppe dessen Abspaltung. Dagegen ist bei β -Stellung der OSi(CH₃)₃-Gruppe kein geeignetes Wasserstoffatom zur Bildung von Trimethylsilanol verfügbar, was die geringe Intensität der Fragmentationen mit m/z 500 und 485 erklärt.

Δ 9-THCA-A-COOH (5) zeigt ein Molekülion mit m/z 604. Eine Abspaltung einer Methyl-Gruppe führt zu einem Fragmentation mit m/z 589. Bei den Fragmentationen m/z 590 und m/z 591 handelt es sich um Isotopenpeaks des Fragmentations m/z 589 ^[194]. Durch die Abspaltung einer der beiden trimethylsilylierten Carboxyl-Gruppen entsteht ein Fragmentation mit m/z 487. Die Fragmentationen mit m/z 537 und m/z 514 konnten keiner Struktur zugeordnet werden.

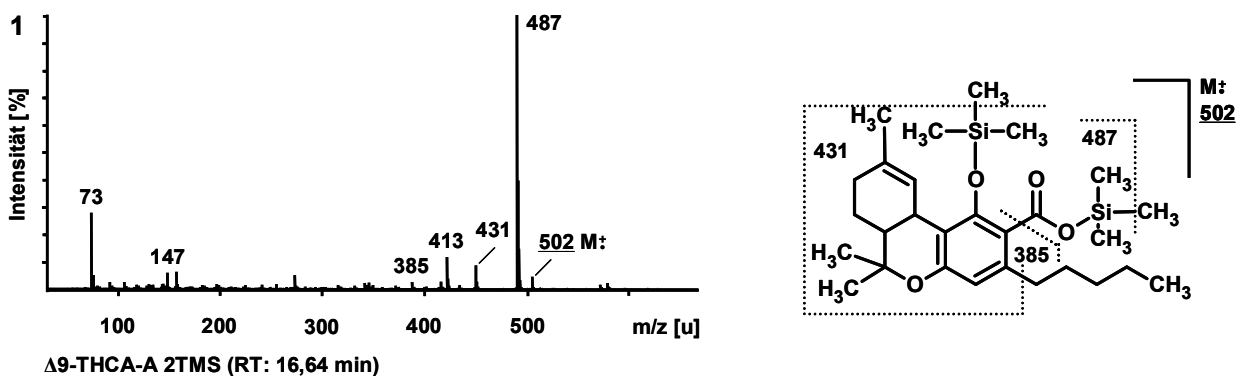


Abb. 3.25 GC-EI-MS-Spektren, Retentionszeiten, Strukturen und vorherrschende Fragmentierungsmuster von Δ 9-THCA-A und ihren Hauptmetaboliten.

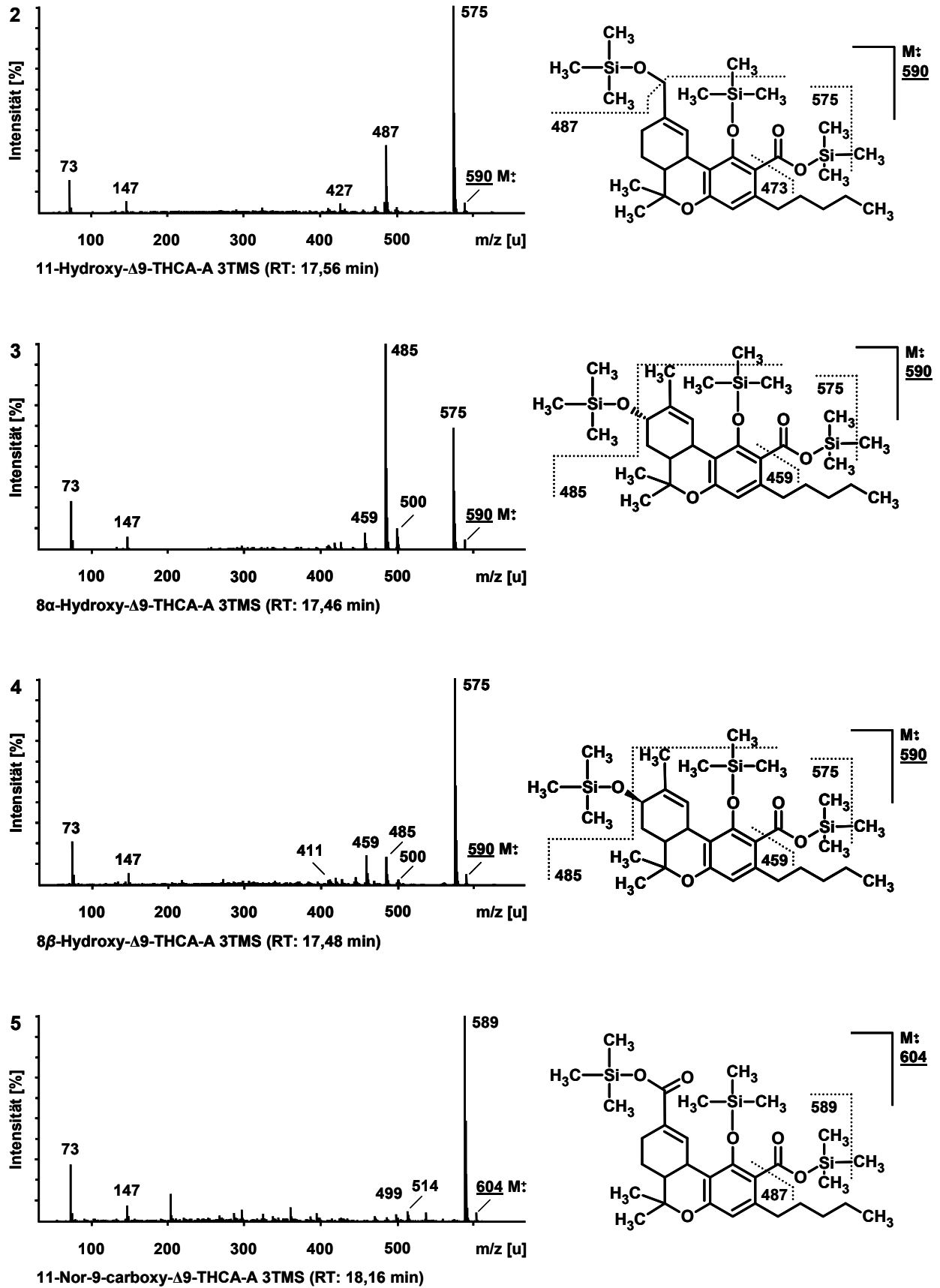


Abb. 3.25 (Fortsetzung).

Weitere mittels LC-MS/MS identifizierte Δ^9 -THCA-A-Metabolite wurden mittels GC-MS nicht detektiert. Mit Ausnahme von Δ^9 -THCA-A-8-on, ergeben sich für diese Metaboliten nach vollständiger Trimethylsilylierung Molekülionen mit einem m/z größer 650 u. Da bei dem für die Aufnahme der Massenspektren eingesetzten GC-MS-Gerät die Massenachse jedoch nur im Bereich von m/z 50 bis 650 u kalibriert wird, konnten lediglich für die Hauptmetabolite 11-OH- Δ^9 -THCA-A, 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A, 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A und Δ^9 -THCA-A-COOH aussagekräftige Massenspektren aufgenommen werden. Für alle weiteren Δ^9 -THCA-A-Metabolite war dies bedingt durch die Massenachsenkalibration nicht möglich.

Die Aufnahme von GC-MS/MS-Spektren der Δ^9 -THCA-A-Metabolite war - vermutlich aufgrund zu geringer Konzentrationen - nicht möglich.

3.4.2.3 Postulierung des Stoffwechselwegs anhand der identifizierten Metabolite

Anhand der mittels LC-MS/MS, LC-QTOF MS und GC-MS identifizierten Metabolite kann für Δ^9 -THCA-A folgender Stoffwechselweg postuliert werden (Abb. 3.26):

Δ^9 -THCA-A wird in Position 11 zu 11-OH- Δ^9 -THCA-A monohydroxyliert, welches zu Δ^9 -THCA-A-COOH weiter oxidiert wird. Des Weiteren erfolgen Monohydroxylierungen in Position 8 zu 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A und 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A, gefolgt von einer Dehydrierung zu Δ^9 -THCA-A-8-on. Darüber hinaus werden die in Position 8 monohydroxylierten Metabolite zu 8 α ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A und 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A weiter oxidiert. Ausgehend von Δ^9 -THCA-A-COOH entstehen durch eine Monohydroxylierung in Position 8 bzw. in Position 4' der Seitenkette 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH und 4'-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH. Darüber hinaus erfolgt eine Epoxidierung der olefinischen Doppelbindung zu Epoxy-HHCA-A, welches aufgrund seiner Instabilität umgehend zu 9,10-Bis-OH-HHCA-A hydrolysiert wird.

Alle Phase I-Metabolite werden auch in glucuronidierter Form ausgeschieden, d.h. als Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 8 α - und 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid, 8 α - und 8 β ,11-Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid, 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid, 4'-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid und 9,10-Bis-HHCA-A-Glucuronid. Wie bereits für die im Rattenurin identifizierten Glucuronide beschrieben, ist anzunehmen, dass es sich bei den identifizierten Phase II-Metaboliten von Δ^9 -THCA-A um Esterglucuronide handelt. Auch im Humanurin ergaben sich keine Hinweise auf eine mehrfache Glucuronidierung oder Sulfatierung.

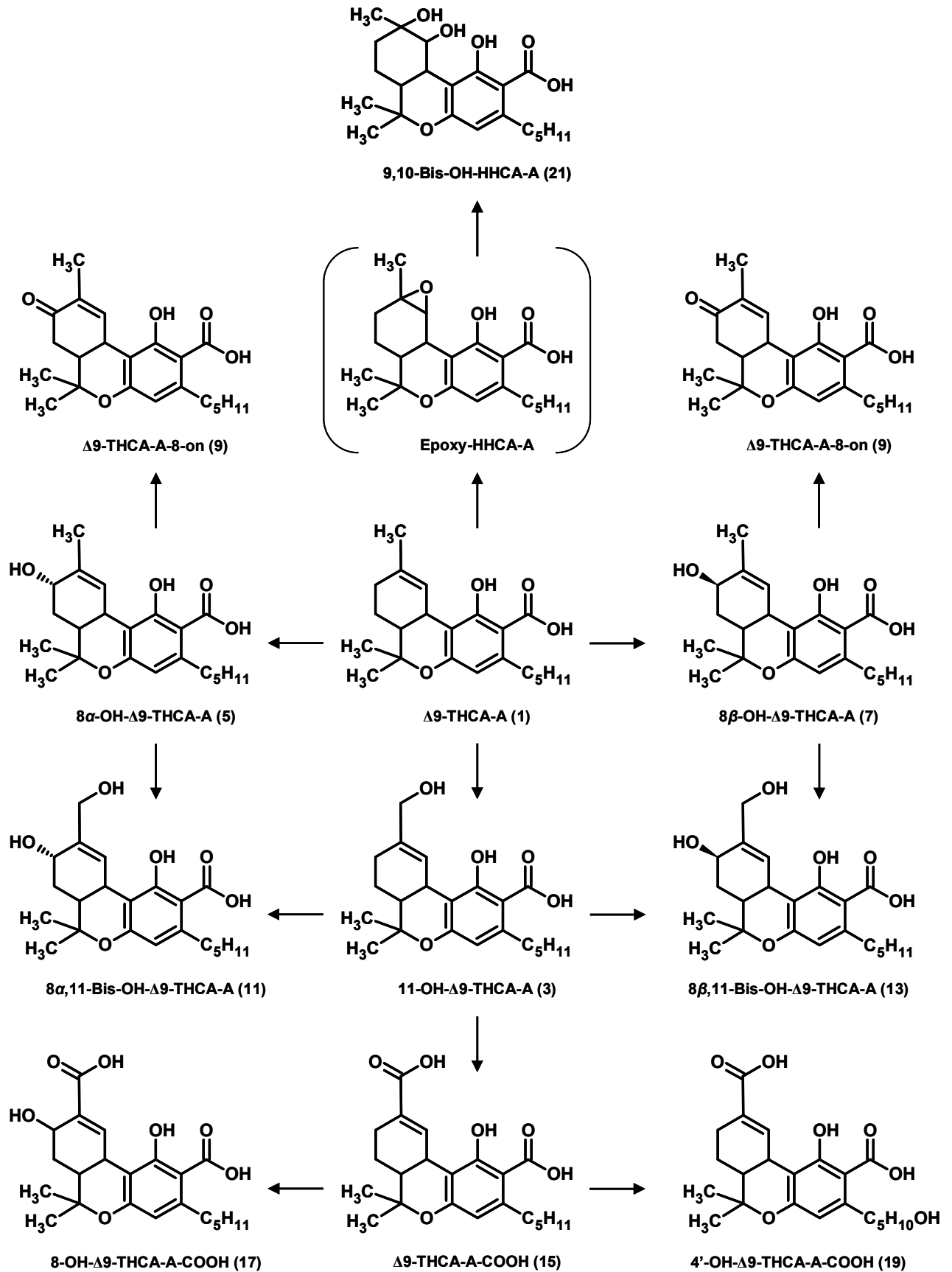


Abb. 3.26 Postulierter Phase I-Stoffwechselweg für Δ^9 -THCA-A beim Menschen. Die Nummerierung korrespondiert mit der Nummerierung der Spektren und Strukturen in den Abb. 3.23 und Abb. 3.24. Bei der Struktur in Klammern handelt es sich um eine postulierte Zwischenstufe.

3.4.3 Vergleich des *in-vivo* Metabolismus von Ratte und Mensch

Zum Vergleich des Metabolismus von Δ^9 -THCA-A in beiden untersuchten Spezies wurden Rattenurin und Humanurin sowohl nativ als auch nach enzymatischer Konjugatspaltung mit der im Anschluss an die Studien zum Metabolismus im Humanurin erstellten MRM-Methode (siehe 2.3.3.2.1) analysiert. Ein Vergleich des qualitativen Metabolismus zwischen beiden Spezies ist anhand dieser Proben jedoch nur eingeschränkt möglich, da für die Studien zum Metabolismus verschiedene Δ^9 -THCA-A-Dosierungen und unterschiedliche Applikationsarten verwendet wurden. Darüber hinaus wurde bei der Studie an Ratten ein Sammelurin über 24 h gewonnen, während für die Studie zum humanen Metabolismus ein Spot-Urin eingesetzt wurde, der im Rahmen eines Pilotversuches zur Untersuchung des Ausscheidungsverhaltens von Δ^9 -THCA-A als eine von vielen Urinproben gewonnen wurde. Unterschiede zwischen Ratte und Mensch sind möglicherweise auch auf diese variierenden Versuchsparameter zurückzuführen.

Das Muster an Δ^9 -THCA-A-Metaboliten ist bei Ratte und Mensch weitgehend identisch. Lediglich 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH, 4'-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH sowie deren Glucuronide 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid und 4'-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid konnten im Rattenurin nicht nachgewiesen werden. Dies ist möglicherweise auf die Art der Δ^9 -THCA-A-Applikation zurückzuführen, da Δ^9 -THCA-A für die Studie zum Metabolismus in Rattenurin Form einer ethanolischen Lösung verabreicht wurde, während für die Untersuchungen in Humanurin eine Lösung von Δ^9 -THCA-A in Sesamöl in Anlehnung an Formulierungen für Dronabinol[®] eingesetzt wurde [205]. Es ist anzunehmen, dass der Ethanolabbau in Konkurrenz zur Bildung der Δ^9 -THCA-A-COOH stand. Die Oxidation von 11-OH- Δ^9 -THCA-A zu Δ^9 -THCA-A-COOH dürfte ebenso wie die Oxidation von 11-OH- Δ^9 -THC zu Δ^9 -THC-COOH zunächst über eine Aldehyd-Zwischenstufe erfolgen [152, 206-211], welche wahrscheinlich durch eine Alkoholdehydrogenase oder mikrosomale Alkoholoxigenase katalysiert wird. Die Umwandlung von 11-Oxo-Metaboliten zur entsprechen Carbonsäure wird anschließend durch eine mikrosomale Aldehydoxygenase (MALDO), ein Enzym der CYP2C-Familie katalysiert. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass sich nur im Rattenurin zusätzlich zu Δ^9 -THCA-A-8-on Hinweise auf jeweils einen weiteren Metaboliten mit einem Precursor-Ion von m/z 371 bzw. von m/z 547 ergaben. 11-Oxo- Δ^9 -THCA-A und Δ^9 -THCA-A-8-on besitzen ebenso wie ihre Glucuronide das gleiche Molekulargewicht. Darüber hinaus werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zumindest teilweise

dieselben Produkt-Ionen erwartet. Alle weiteren Δ^9 -THCA-A-Metabolite wurden in beiden Spezies identifiziert.

Während das Metaboliten-Muster für beide Spezies weitgehend identisch war, wurden für die Intensitäten der gebildeten Δ^9 -THCA-A-Metabolite jedoch Unterschiede beobachtet. Für alle Glucuronide der Δ^9 -THCA-A-Metabolite waren im Rattenurin deutlich geringe Intensitäten zu verzeichnen als im Humanurin. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Grenze für eine uneingeschränkte glomeruläre Filtration und damit renale Elimination bei der Ratte etwa 600 u beträgt, während die humane Niere Stoffe mit einem Molekulargewicht von bis zu 5000 u uneingeschränkt filtrieren kann. Darüber hinaus ergaben sich Unterschiede im Verhältnis der Δ^9 -THCA-A-Metabolite zueinander. Während das Verhältnis der Intensitäten von Δ^9 -THCA-A-Esterglucuronid und -Etherglucuronid im Rattenurin etwa 2:1 betrug, wurde im Humanurin fast ausschließlich das Esterglucuronid nachgewiesen. Derartige Unterschiede wurden auch für die monohydroxylierten Metabolite festgestellt. Im Humanurin wurden 11-OH- Δ^9 -THCA-A, 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A und 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A mit annähernd gleicher Intensität detektiert, im Rattenurin hingegen betrug das Verhältnis der Intensitäten von 11-OH- Δ^9 -THCA-A und 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A ungefähr 6:1. 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A konnte sogar nur in Spuren nachgewiesen werden. Für die entsprechenden Glucuronide ergab sich ein ähnliches Bild.

3.4.4 Studien zum Metabolismus von Δ^9 -THCA-A mit Rattenlebermikrosomen

Mikrosome sind membranumhüllte Vesikel mit einem Durchmesser von etwa 100 nm, die als Fragmente des endoplasmatischen Retikulums (ER) bei der Homogenisierung von Gewebe entstehen und durch fraktionierte Zentrifugation isoliert werden. In Mikrosomen sind alle am ER gebunden Enzyme wie Monooxygenasen, Epoxidhydratasen und Glucuronyltransferasen vorhanden. Die größte Bedeutung für die oxidative Biotransformation von Fremdstoffen besitzen dabei die CYP-Monooxygenasen. Untersuchungen an Mikrosomen bieten gegenüber Tierversuchen den Vorteil, dass sie mit deutlich geringerem Aufwand durchzuführen sind und – unter Verwendung spezieller Mikrosome – die Beteiligung einzelner CYP-Isoenzyme am Metabolismus untersucht werden kann. Nachteilig ist, dass aufgrund der Verdünnung der benötigten Ko-Faktoren in Mikrosomen kein oder nur ein rudimentärer Phase II-Metabolismus erfolgt.

Der Mikrosomenansatz wurde wie unter 2.4.4.3 beschrieben hergestellt und aufgearbeitet und die Δ^9 -THCA-A-Metabolite mit der unter 2.3.3.1.1 aufgeführten LC-ESI-MS-Methode detektiert. Die Identifizierung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite erfolgte anhand ihrer deprotonierten Molekülionen im EMS-Modus unter Verwendung der linearen Ionenfalle (DP -30, -90 und -130 V).

Da nur wenig Probenmaterial zur Verfügung stand, war die Aufnahme von EPI-Massenspektren der deprotonierten Molekülionen für die einzelnen Δ^9 -THCA-A-Metabolite nicht möglich. Deshalb wurde für die Identifizierung der EMS-Modus gewählt, da in diesem Modus eine höhere Empfindlichkeit erzielt wird als im Q1-Scan-Modus und er gegenüber dem zwar noch empfindlicheren MRM-Modus zumindest EMS-Massenspektren der Δ^9 -THCA-A-Metabolite liefert.

Die für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen wurden aus den im EMS-Modus aufgenommenen Molekül- und Fragmentationen abgeleitet und in Anlehnung an das Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A sowie das der im Ratten- und Humanurin bereits identifizierten Δ^9 -THCA-A-Metabolite interpretiert. Die Zuordnung der für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite postulierten Strukturen zu den entsprechenden EMS-Massenspektren erfolgte durch Vergleich des Fragmentierungsmusters und der Retentionszeit mit denen der im Ratten- und Humanurin identifizierten Δ^9 -THCA-A-Metabolite.

Die EMS-Massenspektren, Strukturen und vorherrschenden Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten sind in Abb. 3.27 dargestellt. Nach Inkubation von Δ^9 -THCA-A (RT: 16,93 min) in Rattenlebermikrosomen konnten 11-OH- Δ^9 -THCA-A (RT: 15,57 min), Δ^9 -THCA-A-8-on (RT: 15,08 min) und 9,10-Bis-OH-HHCA-A (RT: 13,44 min) identifiziert werden. Zusätzlich ergaben sich Hinweise auf einen weiteren monohydroxylierten Δ^9 -THCA-A-Metaboliten (RT: 14,78 min), der jedoch keiner Struktur zugeordnet werden konnte.

Darüber hinaus ergaben sich Hinweise auf drei bishydroxylierte Δ^9 -THCA-A-Metabolite (RT: 12,35 min, 13,83 min bzw. 14,66 min), die jedoch weder anhand des Fragmentierungsmusters noch der Retentionszeit eindeutig einer Struktur zugeordnet werden konnten (Abb. 3.28). Die Massenspektren der beiden potentiellen, bishydroxylierten Δ^9 -THCA-A-Metaboliten bei 13,83 min bzw. 14,66 min weisen ein Fragmentation mit m/z 191 auf, welches eine unsubstituierte Seitenkette vermuten lässt. Weitere im Rattenurin bzw. Humanurin identifizierte Metabolite konnten nach Inkubation von Δ^9 -THCA-A mit Rattenlebermikrosomen nicht nachgewiesen werden.

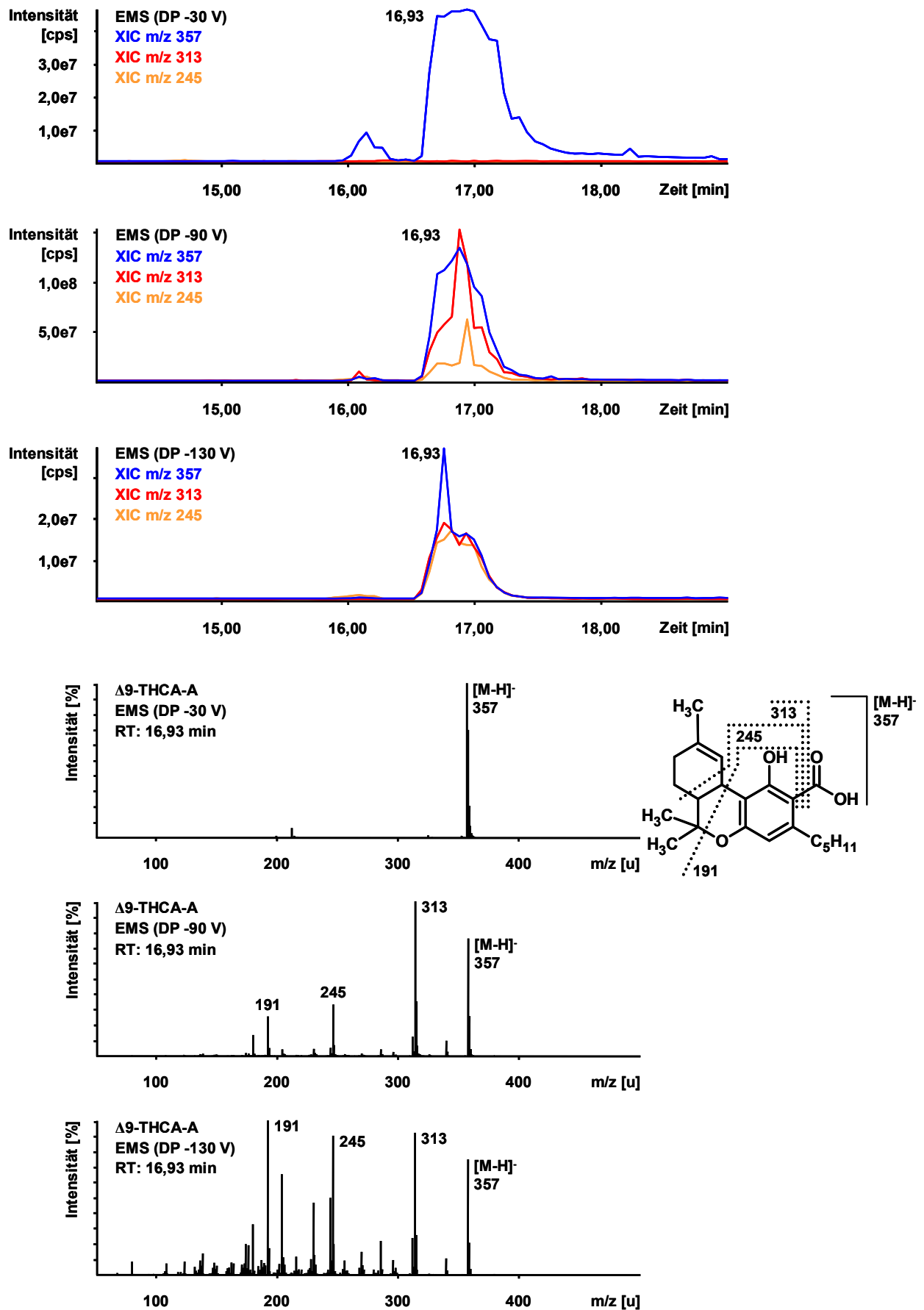


Abb. 3.27 Extrahierte Ionenchromatogramme (XIC), LC-ESI-MS-Spektren (DP -30, -90, -130 V), Strukturen und vorherrschende Fragmentierungsmuster von Δ^9 -THCA-A und ihren Metaboliten.

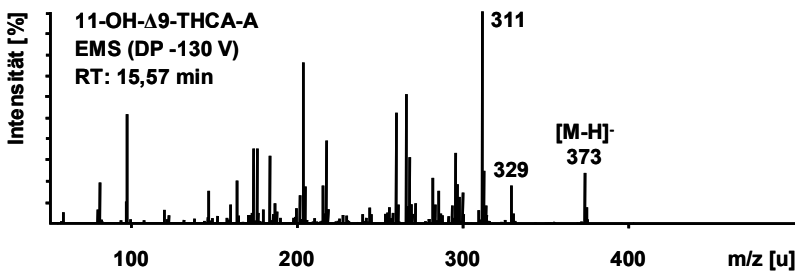
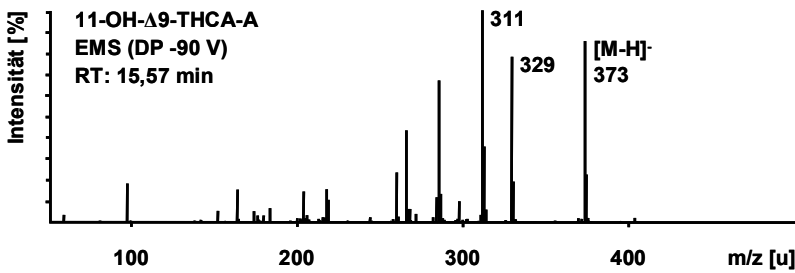
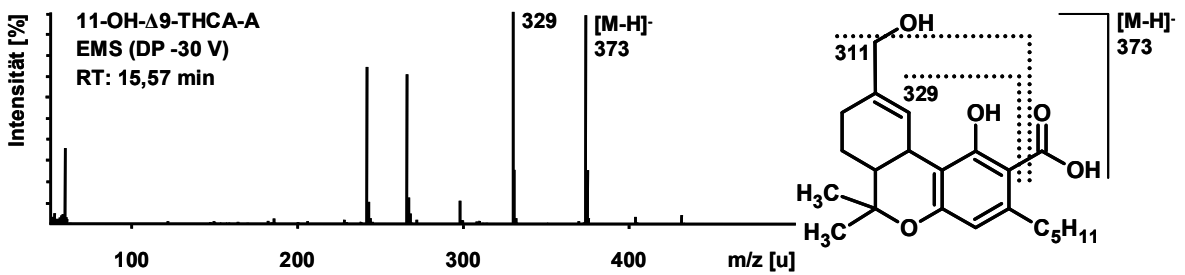
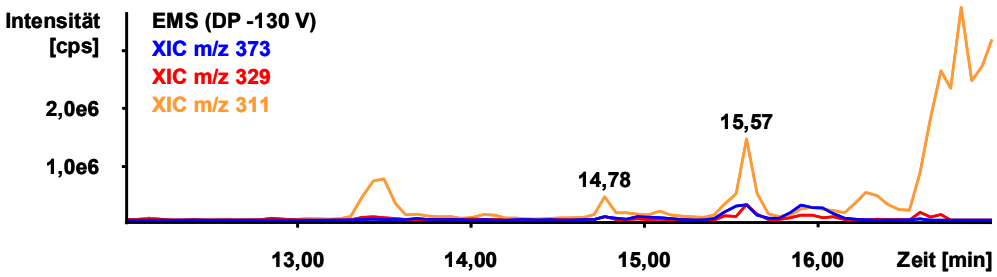
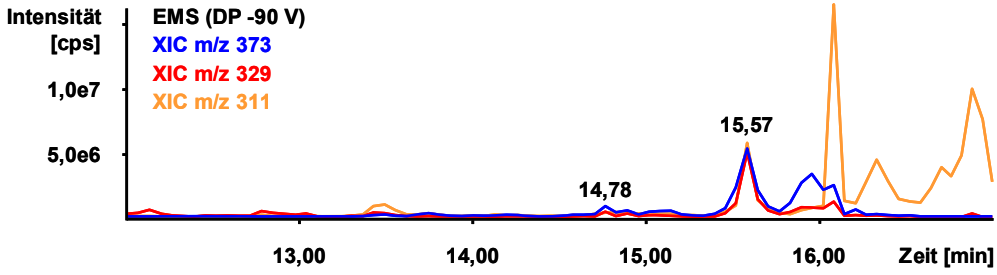
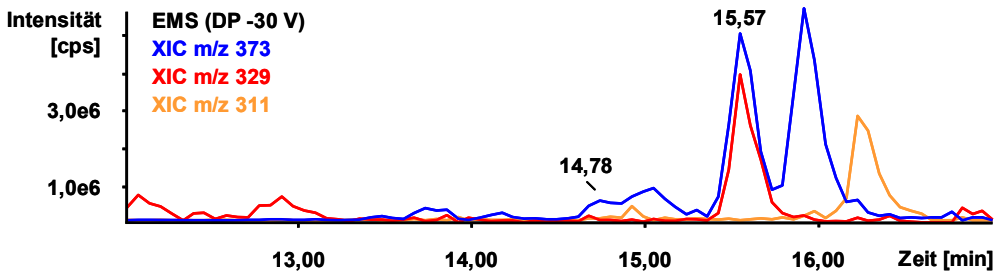


Abb. 3.27 (Fortsetzung).

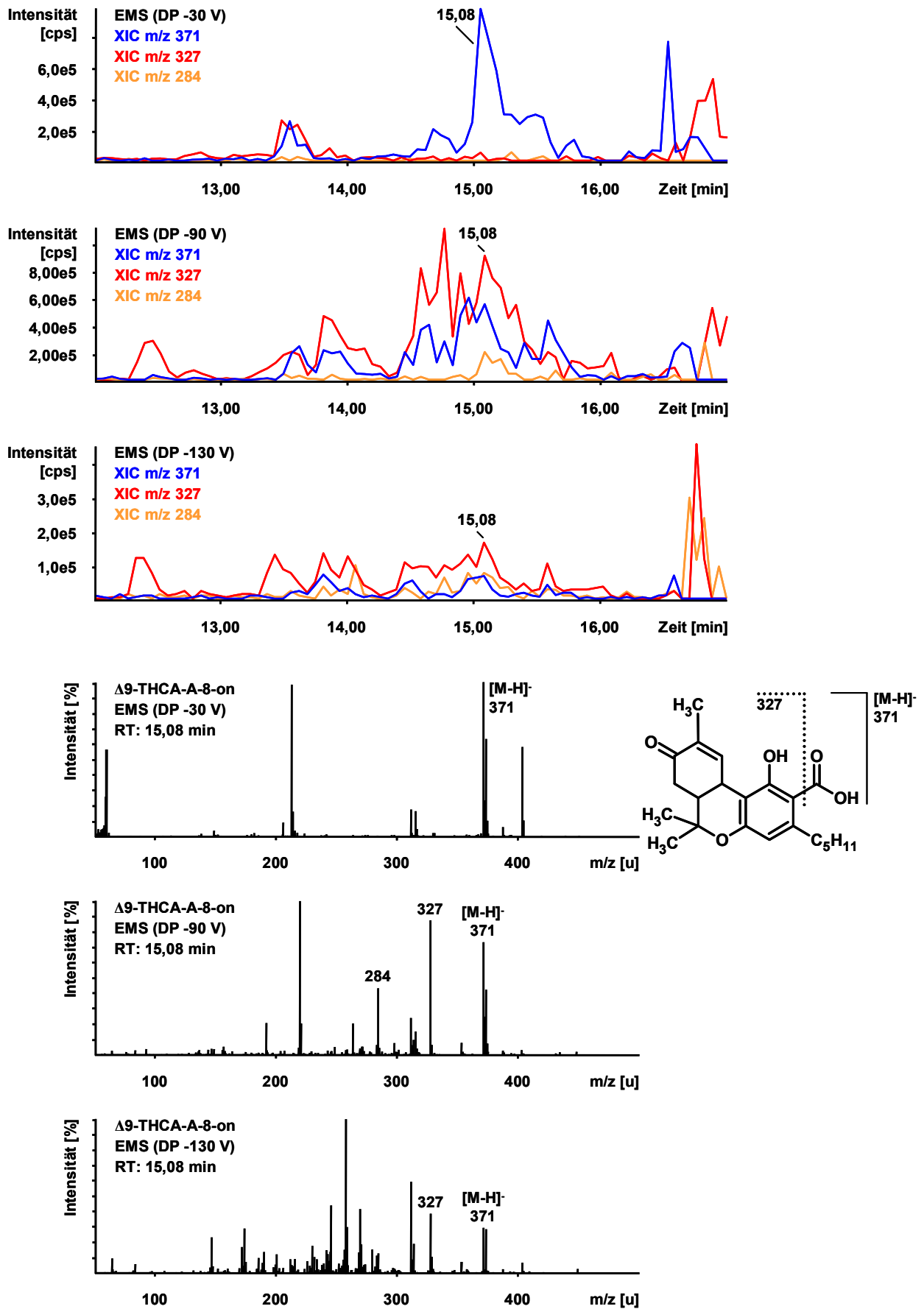


Abb. 3.27 (Fortsetzung).

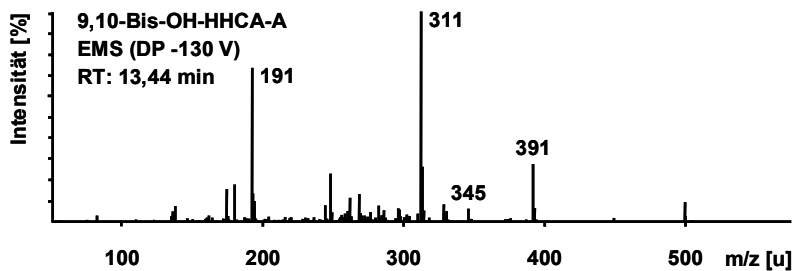
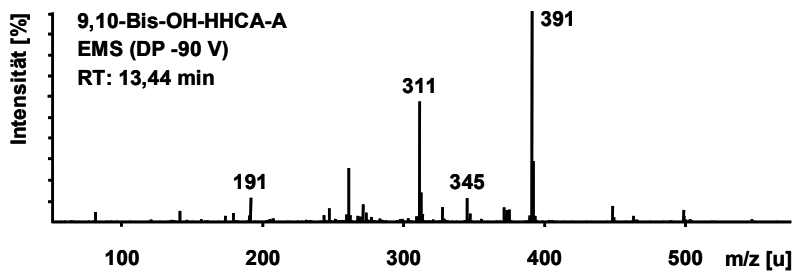
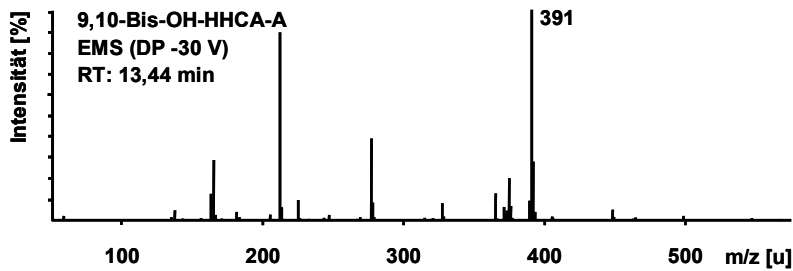
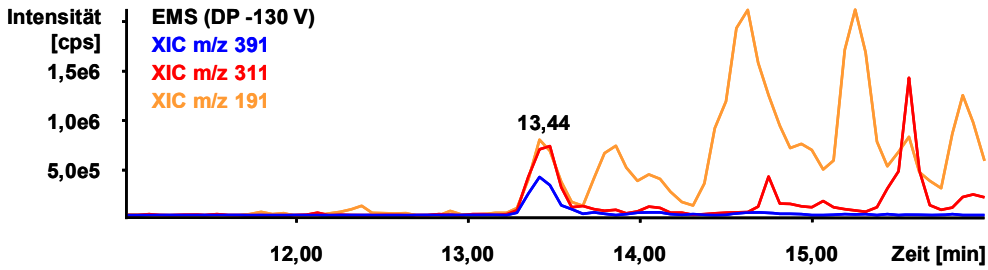
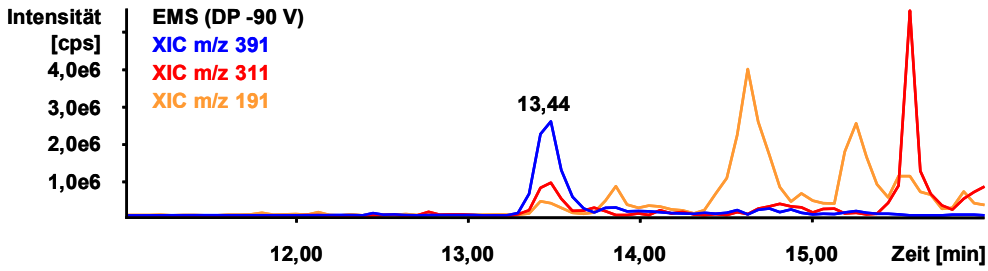
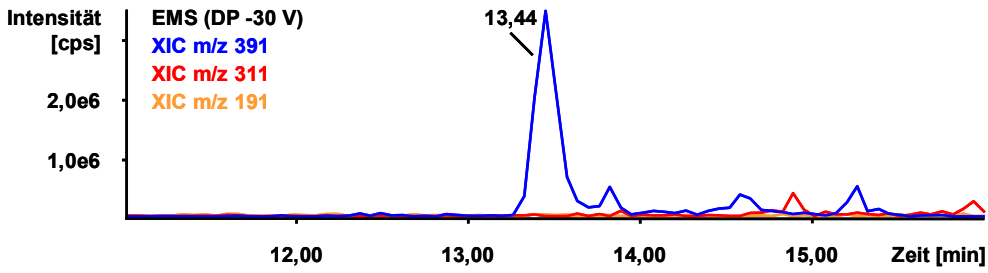


Abb. 3.27 (Fortsetzung).

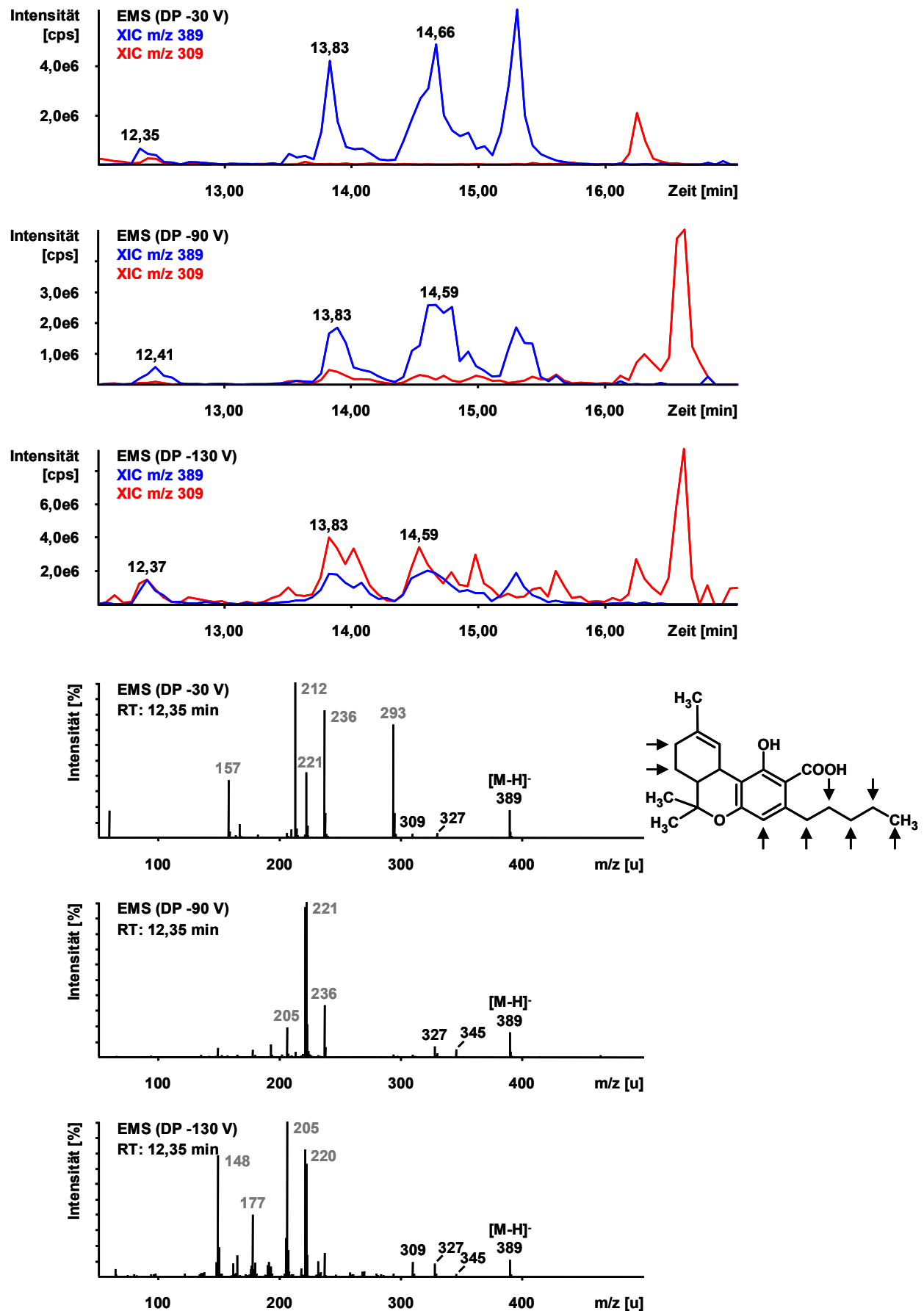


Abb. 3.28 XIC und LC-ESI-MS-Spektren (DP -30, -90, -130 V) der drei potentiellen, bishydroxylierten Δ^9 -THCA-A-Metabolite. Die Ionen in Grau sind wahrscheinlich nicht Teil der LC-ESI-MS-Spektren. Die möglichen Hydroxylierungs-Positionen sind mit Pfeilen markiert.

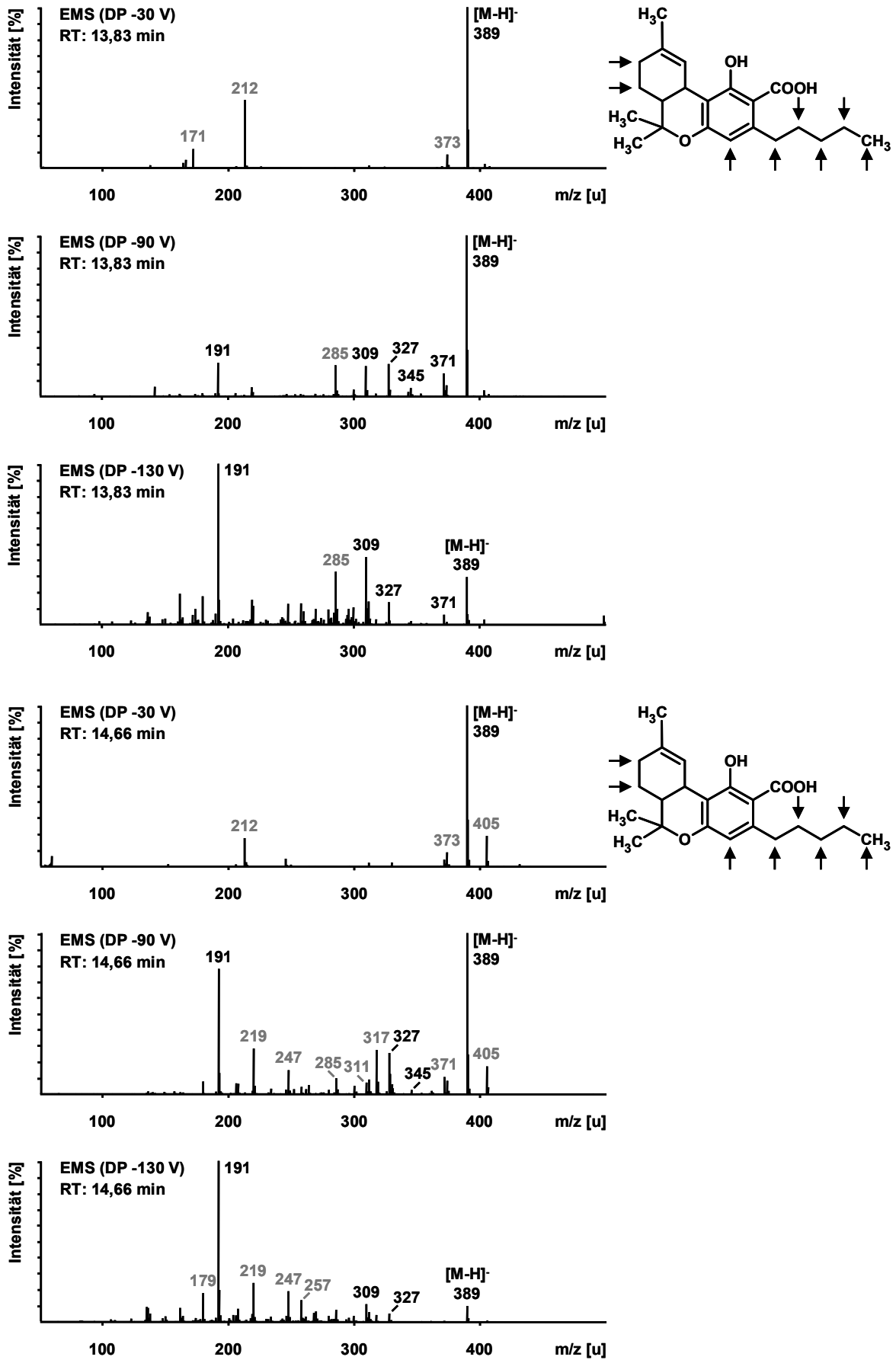


Abb. 3.28 (Fortsetzung).

Unter Berücksichtigung der gerätebedingten Retentionszeitverschiebung, waren die Retentionszeiten der nach Inkubation von Δ^9 -THCA-A in Rattenlebermikrosomen identifizierten Metabolite mit Ausnahme der von 11-OH- Δ^9 -THCA-A identisch mit denen, welche für diese Metabolite in Ratten- und Humanurin beobachtet wurden. Es ist jedoch trotz dieser Retentionszeitverschiebung anzunehmen, dass es sich dabei um 11-OH- Δ^9 -THCA-A handelt.

Dies wird ebenso wie die übrigen Ergebnisse durch die Parallelen zum *in-vitro*-Metabolismus von Δ^9 -THC gestützt: Die Inkubation von Δ^9 -THC in Rattenlebermikrosomen führt zu einer Vielzahl von Metaboliten, wobei allerdings hauptsächlich mono- und bishydroxylierte Metabolite gebildet werden ^[212]. 11-OH- Δ^9 -THC wird dabei als einer der Hauptmetaboliten beschrieben, dessen Bildung über eine Aldehyd-Zwischenstufe verläuft. Auch für die Inkubation von Δ^9 -THC in humanen Lebermikrosomen sind zahlreiche Metabolite beschrieben, darunter v.a. 11-OH- Δ^9 -THC, 8-OH- Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-8-on und 9,10-Epoxyhexahydrocannabinol ^[134, 151]. Für die Hydroxylierung in Position 11 ist dabei v.a. CYP2C9 verantwortlich, während die Hydroxylierung in Position 8 sowie die Epoxidierung hauptsächlich durch CYP3A4 katalysiert werden ^[133]. Es ist deshalb davon auszugehen, dass diese CYP-Isoenzyme auch am *in-vitro*-Metabolismus von Δ^9 -THCA-A beteiligt sind.

Insgesamt wurde jedoch nur ein geringer Anteil der eingesetzten Δ^9 -THCA-A während der Inkubation in den Rattenlebermikrosomen umgesetzt, so dass in den Extrakten eine wesentlich höhere Intensität für Δ^9 -THCA-A als für die Δ^9 -THCA-A-Metabolite erzielt wurde. Dies ist wahrscheinlich auf eine verminderte Aktivität des Mikrosomenansatzes zurückzuführen. Möglicherweise wurde ein Teil der CYP-Isoenzyme durch Denaturierung inaktiviert, da Δ^9 -THCA-A aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Wasser in einer Mischung aus Wasser und Methanol zugesetzt wurde. Für zukünftige Untersuchungen sollte deshalb versucht werden, den Anteil des organischen Lösungsmittels im Inkubationsansatz noch weiter zu verringern. Möglicherweise könnte durch die Verwendung einer Öl-in-Wasser-Emulsion von Δ^9 -THCA-A vollständig auf den Einsatz organischer Lösungsmittel verzichtet werden.

3.5 Studien zur Elimination von Δ 9-THCA-A und ihren Metaboliten

3.5.1 Eliminationsprofile von Δ 9-THCA-A und ihren Metaboliten in Serum und Plasma

Zur Quantifizierung von Δ 9-THCA-A wurden Serum und Plasma wie unter 2.4.5.1.1 beschrieben sowohl nativ als auch nach enzymatischer Konjugatsspaltung mittels SPE aufgearbeitet und Δ 9-THCA-A mit der unter 2.3.4 aufgeführten GC-EI-MS-Methode quantifiziert.

Da keine Informationen über die orale Bioverfügbarkeit von Δ 9-THCA-A und damit über die zu erwartenden Serum- bzw. Plasmakonzentrationen verfügbar waren, wurde zur Orientierung auf die entsprechenden Daten von Δ 9-THC zurückgegriffen. Die orale Bioverfügbarkeit von Δ 9-THC liegt unter 10 %, so dass nach oraler Aufnahme von 20 mg Δ 9-THC maximale Plasmakonzentrationen von 4,4 bis 11,0 ng/ml bzw. nach oraler Aufnahme von 15 mg Δ 9-THC maximale Plasmakonzentrationen von 2,7 bis 6,3 ng/ml erreicht werden ^[44]. Nimmt man für Δ 9-THCA-A eine vergleichbare orale Bioverfügbarkeit an, sollten die nach Aufnahme von 50 mg Δ 9-THCA-A und Einsatz von 0,5 ml Serum bzw. Plasma resultierenden Konzentrationen im Kalibrationsbereich von 0,5 bis 20,0 ng/ml liegen. Allerdings ergaben sich unerwartet hohe Serum- und Plasmakonzentrationen, welche auch nach Verdünnung von 0,5 ml Probenmaterial mit 0,5 ml Leerserum bzw. –plasma weit außerhalb des kalibrierten Konzentrationsbereichs lagen. Ausgehend von diesen semiquantitativen Werten wurden die einzelnen Serum- und Plasmaproben für die nachfolgenden Analysen so verdünnt, dass die resultierenden Serum- bzw. Plasmakonzentrationen im kalibrierten Konzentrationsbereich lagen.

Nach oraler Aufnahme von 50 mg Δ 9-THCA-A betrug die maximale Serumkonzentration 1182 ng/ml bei nativer Aufarbeitung und 4256 ng/ml bei Aufarbeitung nach enzymatischer Konjugatsspaltung und wurde nach 190 min (3,17 h) bzw. 255 min (4,25 h) erreicht (Abb. 3.29). Die maximale Plasmakonzentration betrug 1704 ng/ml bei nativer Aufarbeitung bzw. 3084 ng/ml bei Aufarbeitung nach enzymatischer Konjugatsspaltung und wurde nach 190 min (3,17 h) erreicht (Abb. 3.30). Damit liegt Δ 9-THCA-A scheinbar auch in Serum und Plasma größtenteils als Glucuronid vor. Die maximale Serum- bzw. Plasmakonzentration wurde etwa drei Stunden nach der oralen Aufnahme durch einen sprunghaften Anstieg der Δ 9-THCA-A-Konzentration erreicht. Anschließend fiel die Δ 9-THCA-A-Konzentration stetig ab, wobei nach

ungefähr zehn Stunden ein deutlich langsames Absinken der $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen zu beobachten war. Nach weiteren zwölf Stunden war die Elimination von $\Delta 9$ -THCA-A weitgehend abgeschlossen.

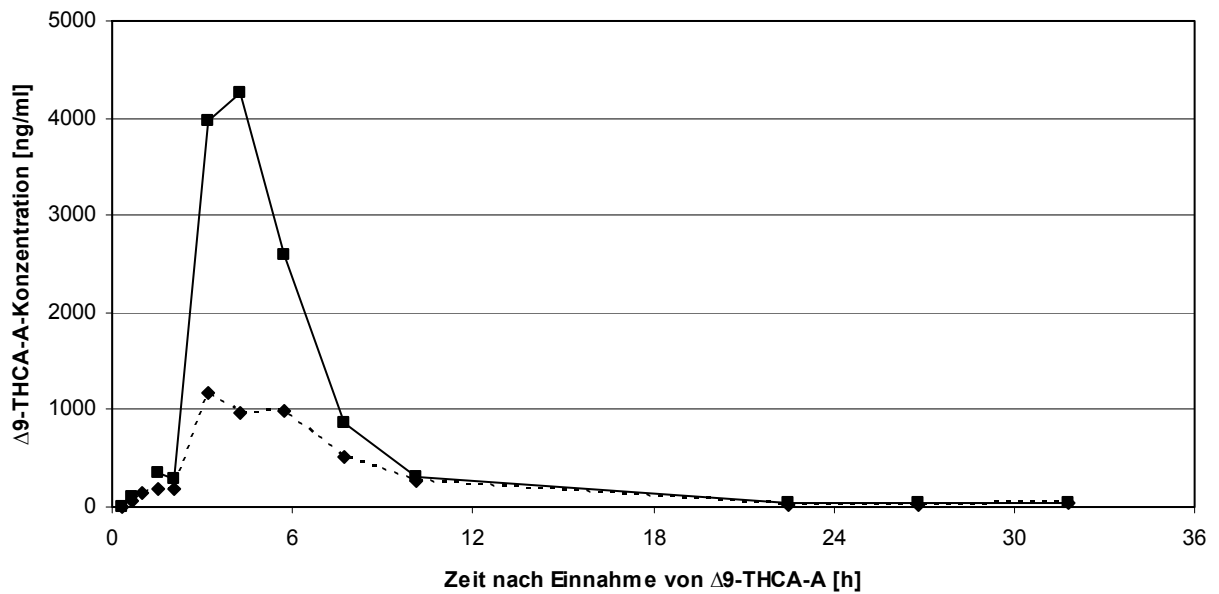


Abb. 3.29 $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration im Serum nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THCA-A (gestrichelte Linie: nativ; durchgezogene Linie: β -D-Glucuronidase/Arylsulfatase-Spaltung).

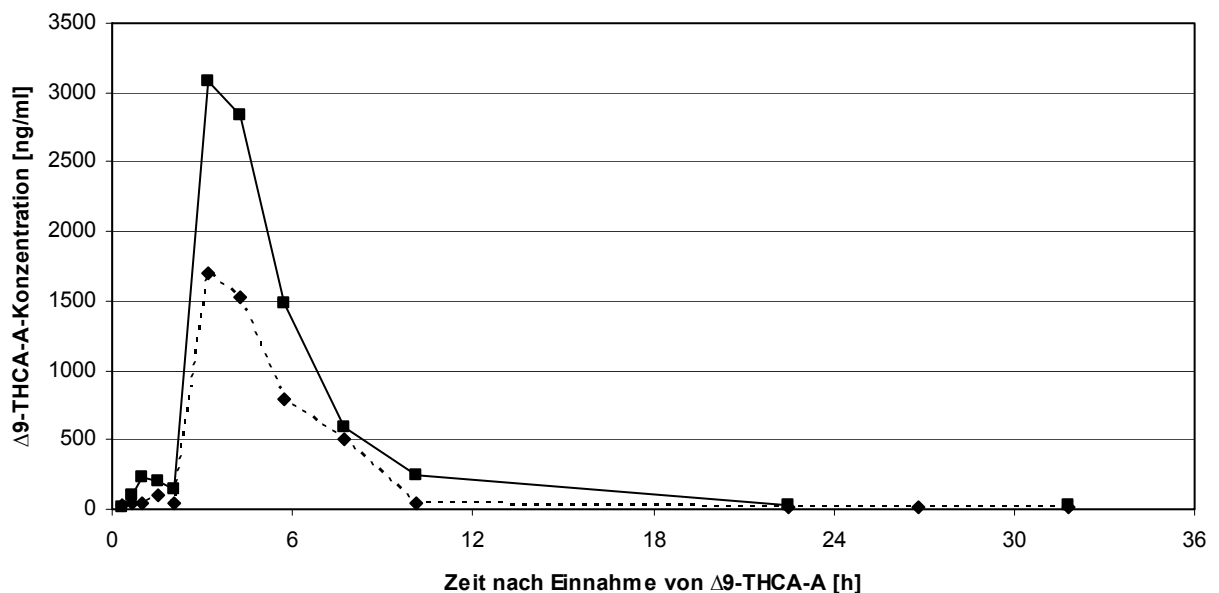


Abb. 3.30 $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration im Plasma nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THCA-A (gestrichelte Linie: nativ; durchgezogene Linie: β -D-Glucuronidase/Arylsulfatase-Spaltung).

Zur Bestimmung der $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite wurden Serum und Plasma wie unter 2.4.5.2 beschrieben mittels Proteinfällung aufgearbeitet und die $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite mit der unter 2.3.3.2.1 aufgeführten LC-ESI-MS-Methode identifiziert.

In Serum und Plasma wurden folgende $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite nachgewiesen: $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid, 11-OH- $\Delta 9$ -THCA-A, 8α -OH- $\Delta 9$ -THCA-A, 8β -OH- $\Delta 9$ -THCA-A, $\Delta 9$ -THCA-A-8-on und $\Delta 9$ -THCA-A-COOH. Im Serum konnten zusätzlich die beiden bishydroxylierten $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite III und IV identifiziert werden, während diese Metabolite im Plasma lediglich in Spuren vorhanden waren. Darüber hinaus wurden Spuren von $\Delta 9$ -THCA-A-COOH-Glucuronid sowie von 9,10-Bis-OH-HHCA-A nachgewiesen. 11-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid, 8α -OH- $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid, 8β -OH- $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid, $\Delta 9$ -THCA-A-8-on-Glucuronid, $8\alpha,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A, $8\alpha,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid, $8\beta,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A, $8\beta,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-Glucuronid, 8-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH, 8-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH-Glucuronid, 4'-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH, 4'-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH-Glucuronid und 9,10-Bis-OH-HHCA-A-Glucuronid konnten dagegen weder im Serum noch im Plasma identifiziert werden.

Da eine Quantifizierung der $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite aufgrund nicht verfügbarer Referenzstandards ausgeschlossen war, wurde zur Erstellung der Eliminationsprofile das Intensitätsverhältnis der $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite zu $\Delta 9$ -THC-COOH- D_3 gegen die Zeit nach oraler Aufnahme von $\Delta 9$ -THCA-A aufgetragen (Abb. 3.31 und Abb. 3.32).

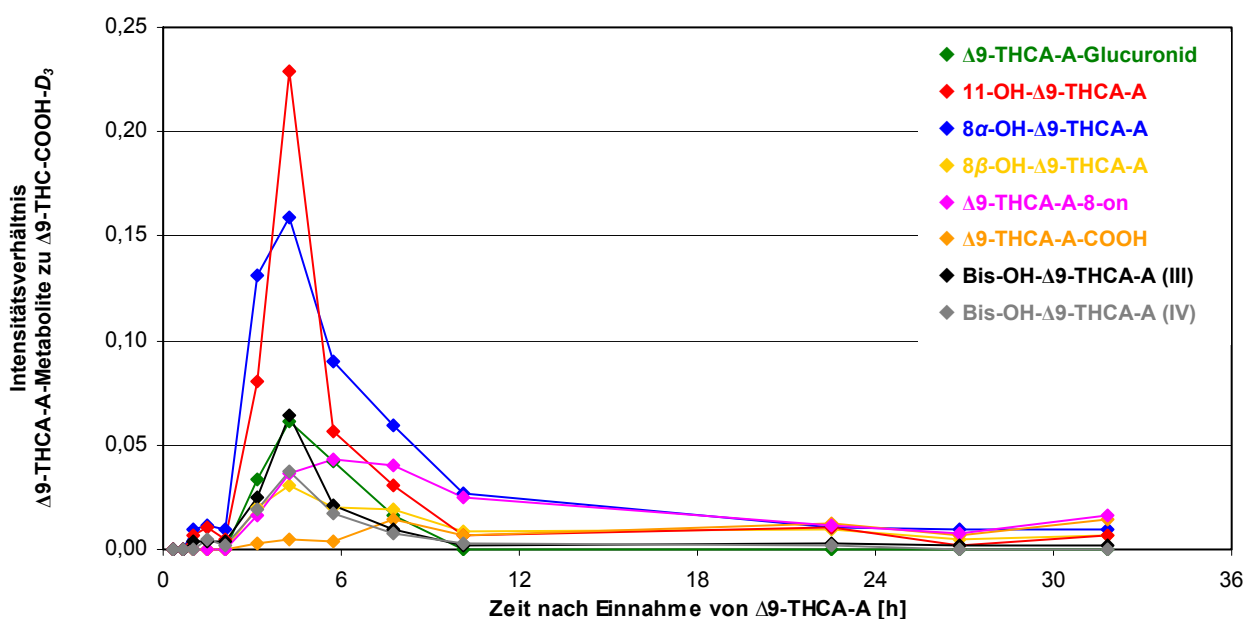


Abb. 3.31 Eliminationsprofile der $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite im Serum nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THCA-A.

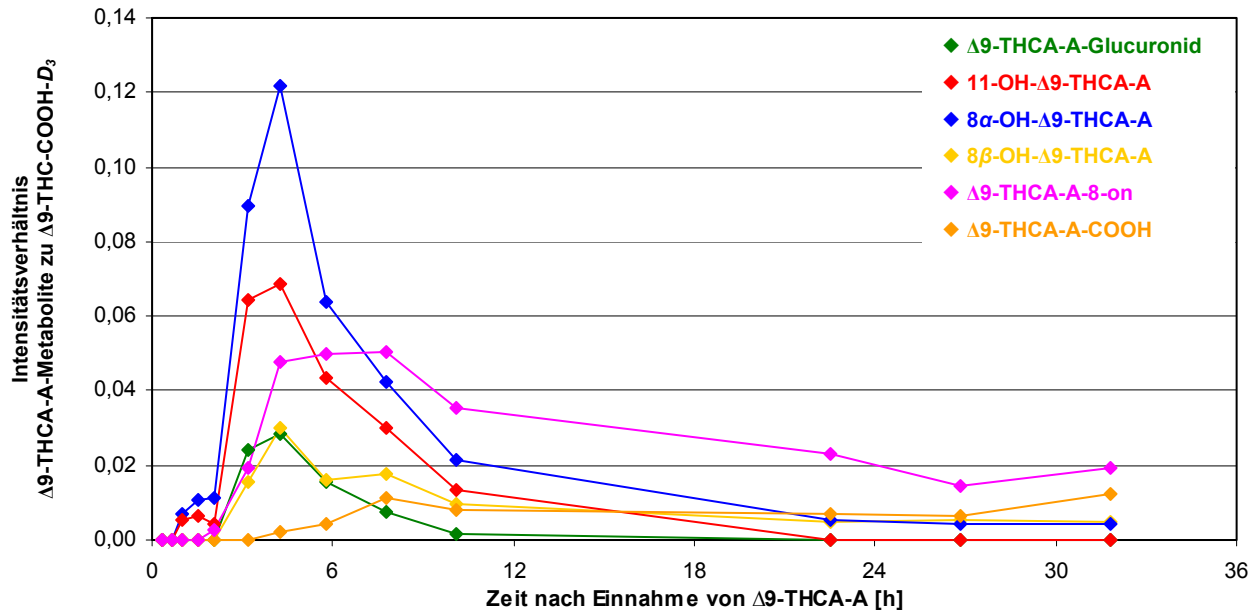


Abb. 3.32 Eliminationsprofile der Δ^9 -THCA-A-Metabolite im Plasma nach oraler Aufnahme von 50 mg Δ^9 -THCA-A.

Nach oraler Aufnahme von 50 mg Δ^9 -THCA-A wurden die maximalen Intensitäten von Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 11-OH- Δ^9 -THCA-A, 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A, 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A sowie von beiden bishydroxylierten Δ^9 -THCA-A-Metabolite im Serum nach 255 min (4,25 h) erreicht. Das Maximum von Δ^9 -THCA-A-8-on wurde mit einer Verzögerung von 90 min nach 345 min (4,75 h), während das Maximum von Δ^9 -THCA-A-COOH sogar erst nach 465 min (7,75 h) erzielt wurde. Im Plasma wurden die maximalen Intensitäten von Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 11-OH- Δ^9 -THCA-A, 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A und 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A ebenfalls nach 255 min (4,25 h) erreicht. Die Maxima von Δ^9 -THCA-A-8-on und Δ^9 -THCA-A-COOH wurden wiederum mit einer Verzögerung erst nach 465 min (7,75 h) erzielt.

Ungefähr zwei Stunden oraler Aufnahme von 50 mg Δ^9 -THCA-A war mit Ausnahme von Δ^9 -THCA-A-COOH ein deutlicher Anstieg der Intensitäten zu beobachten. Wie bereits beschrieben wurden nach weiteren zwei Stunden die Maxima erreicht. Damit war im Vergleich zu Δ^9 -THCA-A eine Verzögerung von etwa einer Stunde zu verzeichnen. Lediglich für Δ^9 -THCA-A-COOH war ein langsamerer Anstieg der Intensität über einen Zeitraum von ungefähr 4,5 Stunden zu beobachten.

Anschließend fielen die Konzentrationen der Δ^9 -THCA-A-Metabolite stetig ab, so dass die Elimination im Serum nach ungefähr 26 Stunden weitgehend abgeschlossen war. Im Plasma war die Elimination von 11-OH- Δ^9 -THCA-A bereits nach etwa 22 Stunden

abgeschlossen, während alle übrigen $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite auch nach mehr als 31 Stunden noch nachgewiesen werden konnten.

Vergleicht man die Eliminationsprofile von $\Delta 9$ -THCA-A und ihren Metaboliten mit denen von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH besteht ein wesentlicher Unterschied in der maximalen Serum- bzw. Plasmakonzentration. Die nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THCA-A resultierenden $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen sind ungefähr zwei Zehnerpotenzen höher als die $\Delta 9$ -THC-Konzentrationen, welche nach einer vergleichbaren oralen $\Delta 9$ -THC-Dosis zu erwarten wären. Damit scheint die orale Bioverfügbarkeit von $\Delta 9$ -THCA-A vergleichsweise hoch zu sein. Ein weiterer bedeutender Unterschied liegt im Konzentrations-Zeit-Verlauf von $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC. Während die $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration nach Erreichen des Maximums innerhalb weniger Stunden stark absinkt, ist für $\Delta 9$ -THC eine deutlich langsamere Konzentrationsabnahme beschrieben. Darüber hinaus haben die LC-MS/MS-Messungen gezeigt, dass für die $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite wesentlich geringere Intensitäten erzielt werden als für $\Delta 9$ -THCA-A. Aufgrund ihrer zusätzlichen funktionellen Gruppen sollten die $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite jedoch bessere Ionisierungseigenschaften besitzen als $\Delta 9$ -THCA-A und damit bei gleicher Konzentration höhere Intensitäten ergeben. Deshalb ist anzunehmen, dass nach oraler Aufnahme von $\Delta 9$ -THCA-A deutlich weniger oxidative Metabolite gebildet werden als nach oraler Aufnahme von $\Delta 9$ -THC, wo ein ausgeprägter First-Pass-Effekt beschrieben ist.

3.5.2 Eliminationsprofile von $\Delta 9$ -THCA-A und ihren Metaboliten im Urin

Zur Quantifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A wurde der Urin wie unter 2.4.5.1.2 beschrieben nach enzymatischer Konjugatsspaltung mittels SPE aufgearbeitet und $\Delta 9$ -THCA-A mit der unter 2.3.4 aufgeführten GC-EI-MS-Methode quantifiziert.

Aufgrund der sehr hohen $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen in Serum und Plasma wurden für die Quantifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A zunächst lediglich 0,1 ml Urin eingesetzt. Die maximale Urinkonzentration von 495 ng/ml wurde nach 295 min (4,92 h) erreicht. Im Vergleich zu Serum und Plasma trat die maximale Urinkonzentration mit einer Verzögerung von etwa zwei Stunden auf. Wie bereits in Serum und Plasma beobachtet, erfolgte nach Erreichen des Maximums eine stetige Abnahme der $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration, wobei auch im Urin nach ungefähr zehn Stunden eine deutliche Verlangsamung der Elimination eintrat (Abb. 3.33).

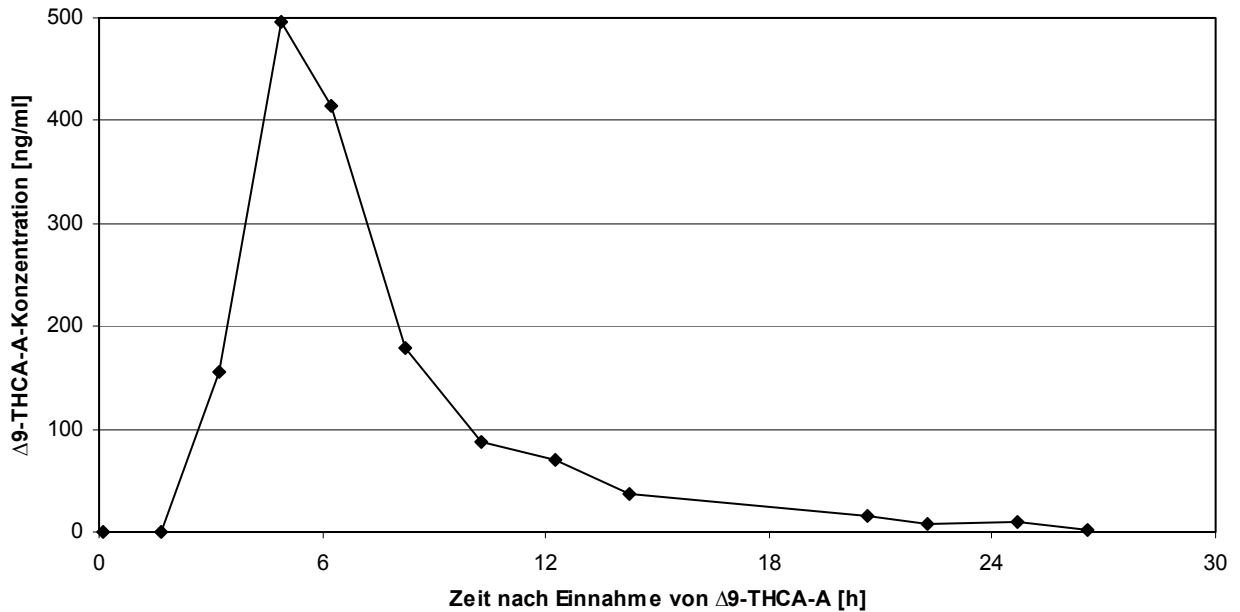


Abb. 3.33 $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration im Urin nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THCA-A (Probenvolumen: 0,1 ml).

Bei Einsatz von 0,1 ml Urin konnte $\Delta 9$ -THCA-A nach 26,5 Stunden nur noch in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Damit scheint die Elimination nach 26,5 Stunden weitgehend abgeschlossen zu sein. Um zu bestimmen, wie lange $\Delta 9$ -THCA-A nach oraler Aufnahme von 50 mg im Urin nachgewiesen werden kann, wurde die Quantifizierung mit einem Probenvolumen von 1 ml Urin wiederholt (Abb. 3.34).

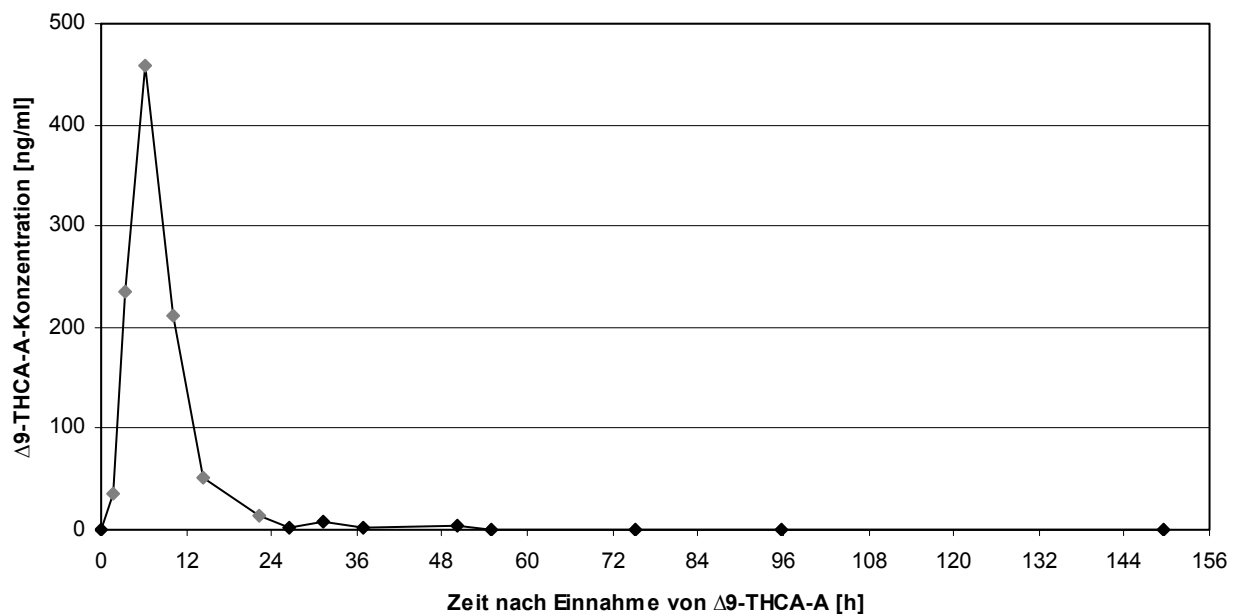


Abb. 3.34 $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration im Urin nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THCA-A (Probenvolumen: 1 ml). Bei den in Grau dargestellten Punkten handelt es sich um semiquantitative Werte.

Die Elimination von Δ^9 -THCA-A war etwa 22 Stunden nach oraler Aufnahme weitgehend abgeschlossen. Zwar konnte Δ^9 -THCA-A noch bis 50 Stunden nachgewiesen werden, allerdings lagen die dabei ermittelten Konzentrationen im Bereich von 0,51 bis 1,66 % der maximalen Urinkonzentration. Nach mehr als 50 Stunden konnte keine Δ^9 -THCA-A mehr nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite wurden der Urin wie unter 2.4.5.2 beschrieben durch eine Proteinfällung aufgearbeitet und die Δ^9 -THCA-A-Metabolite mit der unter 2.3.3.2.1 aufgeführten LC-ESI-MS-Methode identifiziert.

Im Urin konnte für folgende Δ^9 -THCA-A-Metabolite ein Eliminationsprofil erstellt werden (Abb. 3.35 und Abb. 3.36): Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 11-OH- Δ^9 -THCA-A, 11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 8α -OH- Δ^9 -THCA-A, 8α -OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 8β -OH- Δ^9 -THCA-A, 8β -OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, Δ^9 -THCA-A-8-on, Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid, $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, Δ^9 -THCA-A-COOH, Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid, 9,10-Bis-OH-HHCA-A-Glucuronid, 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid und 4'-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid. Die unkonjugierten Metabolite 9,10-Bis-OH-HHCA-A, $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A, $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A, 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH und 4'-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH wurden lediglich in wenigen Urinen (< drei Urinproben) nachgewiesen. Deshalb konnte für diese Metabolite kein Eliminationsprofil erstellt werden.

Wie bereits erwähnt, war eine Quantifizierung der Δ^9 -THCA-A-Metabolite nicht möglich, so dass zur Erstellung der Eliminationsprofile wiederum auf das Intensitätsverhältnis der Δ^9 -THCA-A-Metabolite zu Δ^9 -THC-COOH- D_3 zurückgegriffen wurde. Nach oraler Aufnahme von 50 mg Δ^9 -THCA-A wurden die maximalen Intensitäten der Δ^9 -THCA-A-Metabolite nach 375 min (6,25 h) erreicht. Mit Ausnahme von 8β -OH- Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THCA-A-8-on, Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid, $8\alpha,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid und $8\beta,11$ -Bis-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid wurden alle weiteren Metabolite bereits in der ersten Urinprobe nach 100 min (1,67 h) detektiert. Innerhalb von etwa drei Stunden wurde anschließend das Intensitätsmaximum erreicht. Damit war im Vergleich zu Δ^9 -THCA-A eine Verzögerung von 80 min (1,33 h) zu verzeichnen.

Mit Ausnahme von Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid wurden alle weiteren Glucuronide innerhalb von 24 Stunden weitgehend eliminiert. Lediglich 11-OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 8α -OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid, 8β -OH- Δ^9 -THCA-A-Glucuronid,

Δ^9 -THCA-A-8-on-Glucuronid und 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH-Glucuronid konnten in Spuren bis 50 Stunden nach oraler Aufnahme nachgewiesen werden.

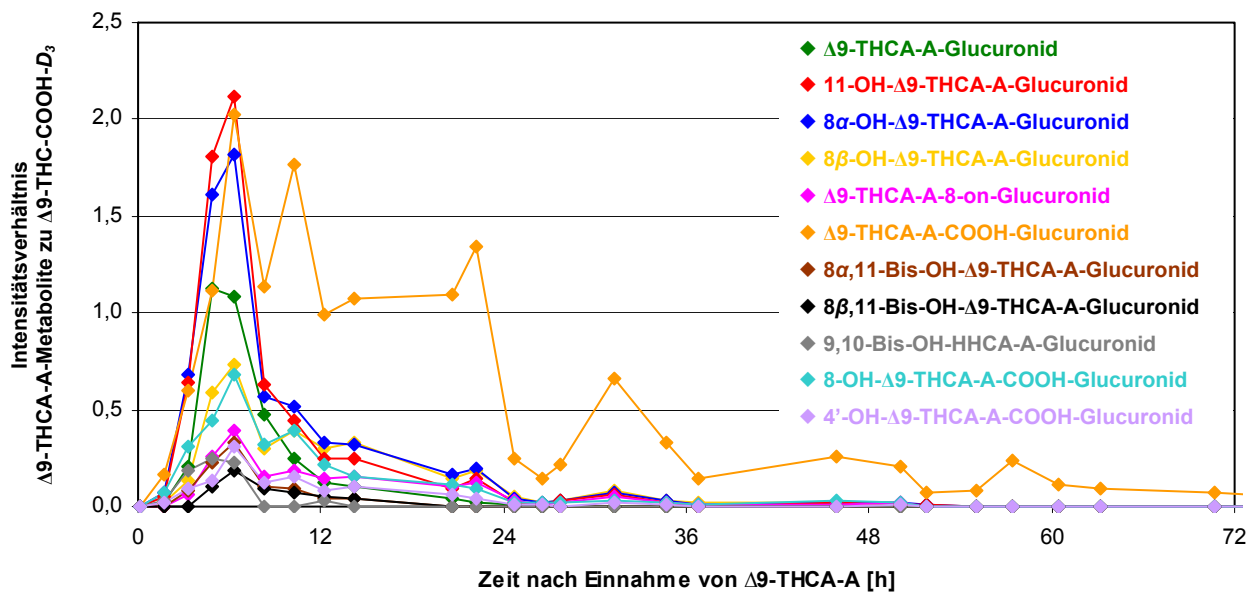


Abb. 3.35 Δ^9 -THCA-A-Metabolite im Urin: Eliminationsprofile der Glucuronide nach oraler Aufnahme von 50 mg Δ^9 -THCA-A.

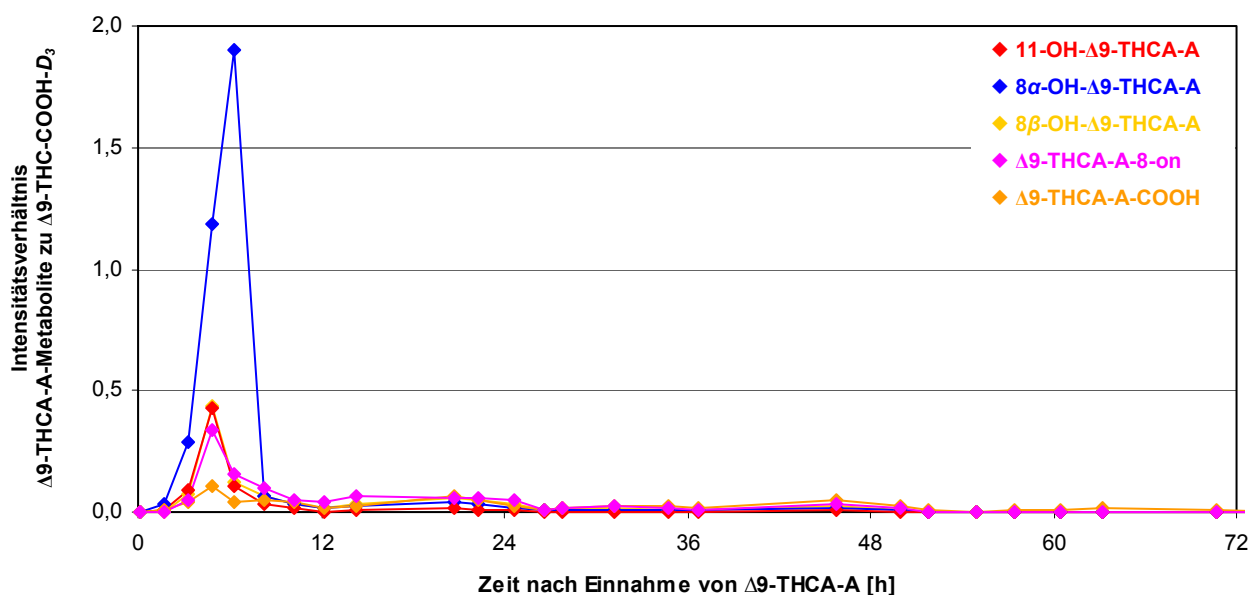


Abb. 3.36 Δ^9 -THCA-A-Metabolite im Urin: Eliminationsprofile der Aglyka nach oraler Aufnahme von 50 mg Δ^9 -THCA-A.

Auch die Elimination der Aglyka 11-OH- Δ^9 -THCA-A, 8 α -OH- Δ^9 -THCA-A, 8 β -OH- Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THCA-A-8-on und Δ^9 -THCA-A-COOH war nach etwas mehr als

24 Stunden weitgehend abgeschlossen. Im Zeitfenster von 24 bis 50 Stunden nach oraler Aufnahme wurden lediglich noch Spuren dieser Metabolite nachgewiesen.

Vergleicht man wiederum die Eliminationsprofile von $\Delta 9$ -THCA-A und ihren Metaboliten mit denen von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten ergibt sich ein ähnliches Bild wie im Serum: Während nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THC im Urin kaum unkonjugiertes $\Delta 9$ -THC zu erwarten ist, ergibt sich jedoch nach oraler Aufnahme von 50 mg $\Delta 9$ -THCA-A eine relativ hohe $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration im Urin. Außerdem nehmen sowohl die Konzentration von $\Delta 9$ -THCA-A als auch die Intensitäten der $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite innerhalb von 24 Stunden deutlich ab. Darüber hinaus wurden die Intensitäten von $\Delta 9$ -THCA-A und mit denen ihrer Metabolite verglichen, wobei sich aufgrund der zu erwartenden, besseren Ionisierungseigenschaften der Metabolite bei gleicher Konzentration höhere Intensitäten ergeben sollten. Da die Intensitäten jedoch vergleichbar waren, ist anzunehmen, dass nach oraler Aufnahme von $\Delta 9$ -THCA-A deutlich weniger oxidative Metabolite gebildet werden als nach oraler Aufnahme von $\Delta 9$ -THC, welches aufgrund eines ausgeprägten First-Pass-Effektes fast ausschließlich als $\Delta 9$ -THC-COOH im Urin ausgeschieden wird.

Bereits die Aufnahme relativ geringer Mengen $\Delta 9$ -THCA-A führt zu verhältnismäßig hohen Serum- und Plasmakonzentrationen, welche innerhalb eines kurzen Intervalls deutlich absinken. Da $\Delta 9$ -THCA-A hydrophiler ist als $\Delta 9$ -THC, sollte die Plasma-Protein-Bindung von $\Delta 9$ -THCA-A geringer sein als die von $\Delta 9$ -THC. Zusammen mit der hohen Plasmakonzentration lässt dies - verglichen mit $\Delta 9$ -THC - auf ein kleineres V_D und damit weniger ausgeprägte Anreicherung im Fettgewebe schließen. Außerdem scheint $\Delta 9$ -THCA-A keinem ausgeprägten First-Pass-Effekt zu unterliegen. Damit ist die orale Bioverfügbarkeit von $\Delta 9$ -THCA-A offensichtlich deutlich höher als die von $\Delta 9$ -THC, da diese neben der Geschwindigkeit und dem Prozentsatz der Wirkstoff-Freisetzung und der Wirkstoff-Resorption v.a. durch den First-Pass-Effekt beeinflusst wird.

Die für $\Delta 9$ -THCA-A und ihre Metabolite ermittelten Eliminationsprofile legen die Vermutung nahe, dass $\Delta 9$ -THCA-A im Vergleich zu $\Delta 9$ -THC nicht in demselben Ausmaß umverteilt und deshalb deutlich schneller eliminiert wird. Sollten im Serum relevante $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen tatsächlich nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters nach einem Konsum von Cannabis nachgewiesen werden können, liegen ideale Voraussetzungen für einen Cannabis-Konsum-Marker vor, welcher einen kurz zurückliegenden Konsum anzeigt.

Aufgrund der Annahmen zum Ausmaß des First-Pass-Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur Anreicherung im Fettgewebe sollten sich für oralen und inhalativen Cannabis-Konsum unterschiedliche Verhältnisse von $\Delta 9$ -THCA-A zu $\Delta 9$ -THC ergeben, da für $\Delta 9$ -THC nach oraler Aufnahme ein ausgeprägter First-Pass-Effekt beschrieben ist, während dieser im Lungengewebe deutlich geringer ausgeprägt ist. Nach oraler Aufnahme wäre dann ein höherer Wert für das Verhältnis von $\Delta 9$ -THCA-A zu $\Delta 9$ -THC zu erwarten als nach Inhalation. Anhand des Verhältnisses von $\Delta 9$ -THCA-A zu $\Delta 9$ -THC könnten damit beide Konsumarten sicher unterschieden werden. Dies ist bislang nicht möglich, obwohl beobachtet wurde, dass das Verhältnis von 11-OH- $\Delta 9$ -THC zu $\Delta 9$ -THC nach oraler Aufnahme tendenziell größer ist als nach inhalativer^[44]. Für die forensische Begutachtung wäre eine sichere Unterscheidung der beiden Konsumarten jedoch von großem Interesse, da sich Pharmakokinetik und -dynamik von $\Delta 9$ -THC nach oraler und inhalativer Aufnahme deutlich von einander unterscheiden.

3.5.3 Eliminationsprofile von $\Delta 9$ -THCA-A und ihren Metaboliten im Speichel

Zur Quantifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A wurde der Speichel wie unter 2.4.5.1.3 beschrieben mittels SPE aufgearbeitet und $\Delta 9$ -THCA-A mit der unter 2.3.4 aufgeführten GC-EI-MS-Methode quantifiziert.

Nach oraler Aufnahme wurden lediglich in den nach 335 min (5,58 h) und 460 min (7,67 h) gewonnenen Speichelproben Spuren von $\Delta 9$ -THCA-A nachgewiesen. In allen anderen Speichelproben konnte keine $\Delta 9$ -THCA-A identifiziert werden.

Moore et. al konnten $\Delta 9$ -THCA-A dagegen bis zu acht Stunden nach dem Rauchen von Marihuana im Speichel nachweisen^[213]. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Studien besteht in der Art der $\Delta 9$ -THCA-A-Aufnahme: Bei der hier vorgestellten Studie wurde die Substanz in einer Hartgelatine kapsel verabreicht, während bei der von Moore et al. beschriebenen Untersuchung $\Delta 9$ -THCA-A als Begleitstoff im Rauch von Marihuana aufgenommen wurde. Die Verabreichung einer Hartgelatine kapsel verhindert eine Kontamination der Mund- und Rachenschleimhäute mit $\Delta 9$ -THCA-A, da diese Applikationsform $\Delta 9$ -THCA-A erst im Magen-Darm-Trakt freisetzt. Beim Rauchen haben die Mund- und Rachenschleimhäute dagegen direkten Kontakt mit $\Delta 9$ -THCA-A. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass die von Moore et al. beschriebenen positiven $\Delta 9$ -THCA-A-Befunde im Speichel auf eine Kontamination der Mund- und Rachenschleimhäute mit $\Delta 9$ -THCA-A während des Rauchens von Marihuana

zurückzuführen sind. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass die maximale $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration in der ersten, nach dem Konsum gewonnenen Speichelprobe ermittelt wurde und anschließend ein rascher Abfall der $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration zu verzeichnen war.

Zur Identifizierung von $\Delta 9$ -THCA-A-Metaboliten wurde der Speichel wie unter 2.4.5.2 beschrieben mittels Proteinfällung aufgearbeitet und die Extrakte mit der unter 2.3.3.2.1 aufgeführten LC-ESI-MS-Methode analysiert. Allerdings konnten keine $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite im Speichel nachgewiesen werden. Damit scheinen weder $\Delta 9$ -THCA-A noch deren Metabolite aus der Blutbahn in den Speichel überzutreten.

4 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Bislang wurde die Annahme vertreten, dass $\Delta 9$ -THCA-A - sofern nicht bereits durch Fermentationsprozesse oder Oxidation unter UV-Licht während der Lagerung geschehen – spätestens durch die Hitzeinwirkung beim Rauchen oder Backen von Cannabisprodukten unter CO_2 -Abspaltung vollständig in das psychoaktiv wirksame $\Delta 9$ -THC umgewandelt wird. Obwohl $\Delta 9$ -THCA-A bei Simulation des Rauchvorgangs weitgehend in $\Delta 9$ -THC überführt wird, wurden relevante Mengen an $\Delta 9$ -THCA-A in Rauchkondensaten von Haschisch und Marihuana nachgewiesen. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass neben $\Delta 9$ -THC auch ein gewisser Anteil der unverändert im Rauch enthaltenen $\Delta 9$ -THCA-A inhalativ resorbiert wird.

Nach gezielter Suche mittels LC-MS/MS gelang daraufhin erstmals der Nachweis von $\Delta 9$ -THCA-A in Serum und Urin von Cannabis-Konsumenten. Im Serum ergab sich die höchste $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration bei gleichzeitig hoher $\Delta 9$ -THC-Konzentration, was einen kurzen zeitlichen Abstand zwischen dem letztem Cannabis-Konsum und der Blutentnahme vermuten lässt. Im Urin war der Nachweis von $\Delta 9$ -THCA-A lediglich in Fällen mit sehr hohen $\Delta 9$ -THC-COOH-Konzentrationen möglich. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass $\Delta 9$ -THCA-A nicht unverändert im Urin ausgeschieden wird, sondern *in-vivo* einer metabolischen Veränderung unterliegt und im Urin überwiegend in Form oxidativer Metabolite oder Glucuronide vorliegt. Bei einer deutlich kürzeren Eliminationshalbwertszeit von $\Delta 9$ -THCA-A bzw. von $\Delta 9$ -THCA-A-Metaboliten verglichen mit $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten, würde deren Nachweis auf einen kurz zurückliegenden Cannabis-Konsum hindeuten.

Nach der Erweiterung des Labor-internen Standardverfahrens zur Bestimmung von Cannabinoiden in Serum und Urin mittels GC-MS ermöglicht dieses die gleichzeitige Bestimmung von $\Delta 9$ -THCA-A sowie von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH und damit die Erfassung von $\Delta 9$ -THCA-A in der Routineanalytik von Proben aus Fällen zu Fahren unter dem Einfluss von Drogen. Die Ergebnisse von 200 untersuchten Serumproben zeigen, dass in mehr als 80 % der bestätigten Cannabis-Fälle ebenfalls der Nachweis von $\Delta 9$ -THCA-A gelang. In keinem der untersuchten Fälle wurde bei negativem Cannabis-Befund die Vorläufersubstanz von $\Delta 9$ -THC nachgewiesen. Damit stellt $\Delta 9$ -THCA-A einen potentiellen Cannabis-

Konsum-Marker dar, wobei für weitergehende Untersuchungen niedrigere Nachweis- und Bestimmungsgrenzen anzustreben sind. Eine Interpretation der $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen und damit Nutzung von $\Delta 9$ -THCA-A als Cannabis-Konsum-Marker setzt jedoch Untersuchungen zum Metabolismus und zur Eliminationskinetik von $\Delta 9$ -THCA-A voraus.

Im Vergleich zum Labor-internen Standardverfahren zur Bestimmung von Cannabinoiden in Serum und Urin mittels GC-MS erlaubt die Verwendung der beschriebenen GC-MS/MS-Methode eine deutliche Verkürzung der gaschromatographischen Trennmethode, so dass eine Gesamtmesszeit von weniger als 10 min bei gleich bleibend guten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erzielt wurde. Aufgrund einer sehr effektiven SPE sowie eines optimierten GC-Temperaturprogramms konnte gegenüber der GC-MS-Bestimmung keine Empfindlichkeitssteigerung erreicht werden. Die geringe Präzision der GC-MS/MS-Methode ist vermutlich auf einen erst nachträglich identifizierten Gerätefehler in der Steuerung der Quadrupole zurückzuführen.

Das beschriebene Isolierungsverfahren stellt eine einfache und kostengünstige Methode zur Gewinnung von $\Delta 9$ -THCA-A aus Marihuana dar. Die Trennung des Rohextraktes mittels klassischer Säulenchromatographie gefolgt von einer weiteren Aufreinigung durch eine semipräparative HPLC erwiesen sich als gut geeignet für die Extraktion größerer Mengen $\Delta 9$ -THCA-A, wie sie für Studien zum Metabolismus sowie zur Eliminationskinetik dieses potentiellen neuen Cannabis-Konsum-Markers erforderlich sind.

Im Rattenurin wurden insgesamt zwölf $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite identifiziert. Hydroxylierung von $\Delta 9$ -THCA-A in Position 11 zu 11-OH- $\Delta 9$ -THCA-A gefolgt von einer Oxidation zu $\Delta 9$ -THCA-A-COOH sind die vorherrschenden Funktionalisierungsreaktionen im Phase I-Metabolismus. Darüber hinaus erfolgen Monohydroxylierungen in Position 8 zu 8α -OH- $\Delta 9$ -THCA-A und 8β -OH- $\Delta 9$ -THCA-A, gefolgt von einer Dehydrierung zu $\Delta 9$ -THCA-A-8-on. Diese Metabolite werden in Position 11 zu $8\alpha,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A und $8\beta,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A weiter oxidiert. Alle Phase I-Metabolite werden auch in glucuronidierter Form ausgeschieden. Damit werden die $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite in enger Übereinstimmung zum Metabolismus von $\Delta 9$ -THC gebildet. Weder $\Delta 9$ -THC noch dessen Metabolite wurden im Rattenurin nachgewiesen,

so dass eine Enzymaktivität, die zur *in-vivo*-Decarboxylierung von Δ^9 -THCA-A und/oder ihren Hauptmetaboliten führt, im Rattenorganismus nicht in relevantem Ausmaß vorhanden zu sein scheint.

Die Untersuchungen zum humanen Metabolismus von Δ^9 -THCA-A zeigen, dass der qualitative Metabolismus bei Ratte und Mensch im Wesentlichen identisch ist. Hydroxylierung in Position 11 zu 11-OH- Δ^9 -THCA-A und nachfolgende Oxidation zu Δ^9 -THCA-A-COOH dominieren wiederum den Phase I-Metabolismus. Darüber hinaus entstehen durch eine Monohydroxylierung von Δ^9 -THCA-A-COOH in Position 8 bzw. in Position 4' der Seitenkette 8-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH bzw. 4'-OH- Δ^9 -THCA-A-COOH sowie durch eine Epoxidierung der olefinischen Doppelbindung von Δ^9 -THCA-A Epoxy-HHCA-A, welches aufgrund seiner Instabilität umgehend zu 9,10-Bis-OH-HHCA-A hydrolysiert wird, weitere, im Rattenurin nicht oder nur in Spuren vorhandene Δ^9 -THCA-A-Metabolite.

Bei der Untersuchung des *in-vitro*-Metabolismus von Δ^9 -THCA-A mit Rattenlebermikrosomen konnten neben nicht umgesetzter Δ^9 -THCA-A 11-OH- Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THCA-A-8-on und 9,10-Bis-OH-HHCA-A identifiziert werden. Zusätzlich wurden mehrere bishydroxylierte Δ^9 -THCA-A-Metabolite detektiert. Daraus lässt sich ableiten, dass die entsprechenden Funktionalisierungsreaktionen vermutlich in Analogie zu Δ^9 -THC durch mikrosomale CYP-Isoenzyme katalysiert werden.

Während der qualitative Metabolismus von Δ^9 -THCA-A in enger Übereinstimmung zum Metabolismus von Δ^9 -THC erfolgt, unterscheiden sich die Konzentrations-Zeit-Profile von Δ^9 -THCA-A und Δ^9 -THC. Als Hauptgründe für die unerwartet hohen Δ^9 -THCA-A-Konzentrationen im Serum wird vermutet, dass im Vergleich zu Δ^9 -THC für Δ^9 -THCA-A die orale Bioverfügbarkeit deutlich höher ist, der First-Pass-Metabolismus schwächer ausgeprägt ist und die Umverteilung in das Fettgewebe in deutlich geringerem Ausmaß stattfindet. Eine Anreicherung im Fettgewebe nach regelmäßigem Cannabis-Konsum dürfte daher bei Δ^9 -THCA-A in geringerem Ausmaß stattfinden als bei Δ^9 -THC. Sollten sich diese Ergebnisse in weiterführenden Studien bestätigen, könnte anhand des Konzentrationsverhältnisses von Δ^9 -THC zu Δ^9 -THCA-A eine orale Aufnahme sicher von einer inhalativen unterschieden werden. Der Ausschluss einer oralen Aufnahme ist in der forensischen Begutachtung von großem Interesse, da sich die Pharmakokinetik und -dynamik nach oraler erheblich von der nach inhalativer Aufnahme unterscheiden.

Die für die $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite erhaltenen Eliminationsprofile stützen die Vermutung, dass $\Delta 9$ -THCA-A nicht in demselben Ausmaß umverteilt wie $\Delta 9$ -THC und deshalb deutlich schneller eliminiert wird. Sollten im Serum relevante $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen tatsächlich nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters nach einem Konsum von Cannabis nachgewiesen werden können, liegen ideale Voraussetzungen für einen Cannabis-Konsum-Marker vor. Für dessen weitergehende Evaluierung ist jedoch die vollständige Aufklärung des Metabolismus und der Eliminationskinetik in umfangreichen Probandenstudien unter Berücksichtigung pharmakogenetischer Aspekte erforderlich. In Abhängigkeit von Metabolismus und Eliminationskinetik könnte der Nachweis von $\Delta 9$ -THCA-A und/oder $\Delta 9$ -THCA-A-Metaboliten neben den bisher üblichen Cannabis-Konsum-Markern beispielsweise eine verbesserte Abschätzung des letzten Konsumzeitpunkts zulassen. Darüber hinaus könnten möglicherweise Rückschlüsse auf die Konsumfrequenz, die Applikationsart und/oder die Beschaffenheit des konsumierten Materials gezogen werden. Die in der Praxis bisher für diese Fragestellungen verwendeten Ansätze und Berechnungsmodelle ermöglichen dies nicht mit der erwünschten Schärfe und Sicherheit.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde mit $\Delta 9$ -THCA-A ein neuer, potentieller Cannabis-Konsum-Marker etabliert, welcher die in der forensischen Praxis bislang zur Anwendung kommenden Ansätze und Berechnungsmodelle zur Abschätzung des Zeitpunkts des letzten Cannabis-Konsums, zur Beurteilung einer akuten Cannabis-Wirkung sowie zur Einschätzung des Konsumverhaltens sinnvoll erweitern kann.

Im Rahmen der Untersuchung von Cannabis-Rauchkondensaten auf quantitativ relevante Cannabinoide und Cannabinoid-Abbauprodukte, welche neben dem psychoaktiven Hauptwirkstoff $\Delta 9$ -THC für eine Absorption in der Lunge zur Verfügung stehen, kristallisierte sich $\Delta 9$ -THCA-A als Zielsubstanz heraus. $\Delta 9$ -THCA-A ist die nicht psychoaktiv wirksame, biogenetische Vorläufersubstanz von $\Delta 9$ -THC und Hauptbestandteil der Cannabinoid-Fraktion in frischem Pflanzenmaterial. Entgegen der bislang vertretenen Annahme, dass $\Delta 9$ -THCA-A - sofern nicht bereits durch Fermentationsprozesse oder Oxidation unter UV-Licht während der Lagerung geschehen – spätestens beim Rauchen oder Backen von Cannabisprodukten durch eine thermisch induzierte Decarboxylierung vollständig in $\Delta 9$ -THC umgewandelt wird, wurden relevante Mengen an $\Delta 9$ -THCA-A in Rauchkondensaten von Haschisch und Marihuana nachgewiesen.

Da anzunehmen war, dass ein gewisser Anteil der unverändert im Rauch enthaltenen $\Delta 9$ -THCA-A inhalativ absorbiert wird, wurden Serum- und Urinproben von Cannabis-Konsumenten auf den potentiellen Cannabis-Konsum-Marker $\Delta 9$ -THCA-A untersucht. Dazu wurde zunächst eine LC-ESI-MRM-Methode entwickelt, da sich die ESI besonders für die Analyse thermolabiler Verbindungen wie $\Delta 9$ -THCA-A eignet. Daraufhin gelang erstmals der Nachweis von $\Delta 9$ -THCA-A in Serum und Urin von Cannabis-Konsumenten. Die höchste $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentration war im Serum bei einer hohen $\Delta 9$ -THC-Konzentration zu verzeichnen, was auf einen kurzen Zeitabstand zwischen letztem Cannabis-Konsum und Blutentnahme hindeutet. Im Urin gelang der Nachweis dagegen nur bei sehr hohen $\Delta 9$ -THC-COOH-Konzentrationen.

Daraufhin wurde das Labor-interne Standardverfahren zur Bestimmung von Cannabinoiden in Serum und Urin mittels GC-MS so erweitert, dass dieses die gleichzeitige Bestimmung von $\Delta 9$ -THCA-A sowie von $\Delta 9$ -THC und dessen Metaboliten 11-OH- $\Delta 9$ -THC und $\Delta 9$ -THC-COOH und damit die Erfassung von $\Delta 9$ -THCA-A in der

Routineanalytik von Proben aus Fällen zu Fahren unter dem Einfluss von Drogen ermöglicht. Mit der so angepassten GC-MS-Methode wurden 200 Serumproben aus Straßenverkehrsfällen untersucht, deren Ergebnisse zeigen, dass in mehr als 80 % der bestätigten Cannabis-Fälle ebenfalls $\Delta 9$ -THCA-A nachgewiesen werden kann. In keinem der untersuchten Fälle wurde dagegen bei negativem Cannabis-Befund die Vorläufersubstanz von $\Delta 9$ -THC detektiert.

Da seit Mitte 2007 eine Aufrüstung des zuvor eingesetzten GC-MS zum GC-MS/MS zur Verfügung stand, wurde dessen Anwendbarkeit für die Quantifizierung von Cannabinoiden und dessen Potential zur Empfindlichkeitssteigerung v.a. hinsichtlich der Bestimmung von $\Delta 9$ -THCA-A untersucht. Dazu wurden zunächst GC-MS/MS-Spektren aller relevanten Cannabinoide aufgenommen und daraus eine GC-EI-MRM-Methode entwickelt, welche anschließend optimiert wurde. Im Vergleich zur GC-MS-Methode erlaubt diese eine deutliche Verkürzung der gaschromatographischen Trennmethode, so dass eine Gesamtmesszeit von weniger als 10 min bei gleich bleibend guten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erzielt werden konnte. Aufgrund einer sehr effektiven SPE sowie eines optimierten GC-Temperaturprogramms konnte gegenüber der GC-MS-Bestimmung jedoch keine Empfindlichkeitssteigerung erreicht werden.

Grundlegend für eine Interpretation von $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen sind Untersuchungen zum Metabolismus und zur Eliminationskinetik von $\Delta 9$ -THCA-A erforderlich, so dass größere Mengen an $\Delta 9$ -THCA-A benötigt werden. Zwar sind in der Literatur verschiedene Methoden zur Isolierung von $\Delta 9$ -THCA-A aus Pflanzenmaterial beschrieben, allerdings werden dabei entweder relativ kostenintensive Materialien oder toxische Lösungsmittel eingesetzt. Deshalb wurde ein einfaches, kostengünstiges Verfahren zur Isolierung von $\Delta 9$ -THCA-A aus Marihuana entwickelt, welches ohne den Einsatz gesundheitsschädlicher Lösungsmittel auskommt. Die Trennung eines durch Kaltauszug mit Ethanol gewonnenen Rohextraktes mittels klassischer Säulenchromatographie unter Verwendung von Kieselgel als stationärer Phase und einem Cyclohexan-Essigsäureethylester-Gemisch als Laufmittel ermöglichen die Extraktion größerer Mengen $\Delta 9$ -THCA-A aus Marihuana. Bereits die durch diesen Aufreinigungsschritt erhaltene $\Delta 9$ -THCA-A weist mit durchschnittlich > 90 % eine hohe Reinheit auf. Das noch in Spuren verbliebene $\Delta 9$ -THC (< 0,4 %) wurde anschließend mittels semipräparativer HPLC-DAD abgetrennt und die $\Delta 9$ -THC-freie $\Delta 9$ -THCA-A mit TBME wieder aus dem Laufmittelgemisch extrahiert.

Da eine Interpretation von $\Delta 9$ -THCA-A-Konzentrationen und damit der Nutzung von $\Delta 9$ -THCA-A als Cannabis-Konsum-Marker Untersuchungen zum Metabolismus und zur Eliminationskinetik von $\Delta 9$ -THCA-A voraussetzt, wurden Pilotstudien zum Metabolismus von $\Delta 9$ -THCA-A durchgeführt. Zunächst erfolgt eine Studie am Rattenmodell zur Strukturaufklärung von $\Delta 9$ -THCA-A-Metaboliten und insbesondere zur Überprüfung, ob eine metabolische Umwandlung von $\Delta 9$ -THCA-A zu $\Delta 9$ -THC erfolgt. Unter Verwendung von LC-ESI-MS/MS wurden im Rattenurin insgesamt zwölf $\Delta 9$ -THCA-A-Metabolite identifiziert, welche in enger Übereinstimmung zum Metabolismus von $\Delta 9$ -THC gebildet werden: Hydroxylierung in Position 11 zu 11-OH- $\Delta 9$ -THCA-A und anschließende Oxidation zu $\Delta 9$ -THCA-A-COOH dominieren den Phase I-Metabolismus. Daneben erfolgen Monohydroxylierungen in Position 8 zu 8α -OH- $\Delta 9$ -THCA-A und 8β -OH- $\Delta 9$ -THCA-A, gefolgt von einer Dehydrierung zu $\Delta 9$ -THCA-A-8-on. Diese Metabolite werden darüber hinaus in Position 11 zu $8\alpha,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A und $8\beta,11$ -Bis-OH- $\Delta 9$ -THCA-A weiter oxidiert. Die Glucuronidierung dieser Metabolite stellt die Hauptkonjugationsreaktion im Phase II-Metabolismus dar. Es ergaben sich keine Hinweise auf metabolische Umwandlung von $\Delta 9$ -THCA-A zu $\Delta 9$ -THC.

In einem zweiten Abschnitt wurde der humane Metabolismus untersucht. Der Vergleich der Metabolitenmuster bei Ratte und Mensch zeigt, dass der qualitative Metabolismus im Wesentlichen identisch ist. Zusätzlich wurden die durch eine Monohydroxylierung von $\Delta 9$ -THCA-A-COOH in Position 8 bzw. in Position 4' der Seitenkette entstehenden 8-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH und 4'-OH- $\Delta 9$ -THCA-A-COOH sowie das durch eine Epoxidierung der olefinischen Doppelbindung von $\Delta 9$ -THCA-A entstehende Epoxy-HHCA-A identifiziert, welches aufgrund seiner Instabilität umgehend zu 9,10-Bis-OH-HHCA-A hydrolysiert wird.

Durch Untersuchungen mit Rattenlebermikrosomen konnten gezeigt werden, dass die entsprechenden Funktionalisierungsreaktionen durch mikrosomale CYP-Isoenzyme katalysiert werden.

Nachfolgend wurde das Eliminationsverhalten des potentiellen Cannabis-Konsum-Markers $\Delta 9$ -THCA-A und dessen Metaboliten nach oraler Aufnahme von $\Delta 9$ -THCA-A untersucht, wobei auffallende Unterschiede in Konzentrations-Zeit-Profile von $\Delta 9$ -THCA-A und $\Delta 9$ -THC beobachtet wurden. Aus den Ergebnissen wurde abgeleitet, dass für $\Delta 9$ -THCA-A die orale Bioverfügbarkeit deutlich höher ist, der First-Pass-Metabolismus schwächer ausgeprägt ist und die Umverteilung in das Fettgewebe in deutlich geringerem Ausmaß stattfindet. Diese Annahme wird auch von den

Konzentrations-Zeit-Profilen der Δ 9-THCA-A-Metabolite gestützt. Sollte sich in weiterführenden Studien bestätigen, dass im Serum relevante Δ 9-THCA-A-Konzentrationen tatsächlich nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters nach einem Konsum von Cannabis nachgewiesen werden können, liegen ideale Voraussetzungen für einen Cannabis-Konsum-Marker vor, der die in der forensischen Praxis bislang zur Anwendung kommenden Ansätze und Berechnungsmodelle zur Abschätzung des Zeitpunkts des letzten Cannabis-Konsums, zur Beurteilung einer akuten Cannabis-Wirkung sowie zur Einschätzung des Konsumverhaltens sinnvoll erweitern kann.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bundesministerium für Gesundheit. Drogen- und Suchtbericht. 2009.
2. Beal, J. E., Olson, R., Lefkowitz, L., Laubenstein, L., Bellman, P., Yangco, B., Morales, J. O., Murphy, R., Powderly, W., Plasse, T. F., Mosdell, K. W. and Shepard, K. V. Long-term efficacy and safety of dronabinol for acquired immunodeficiency syndrome-associated anorexia. *J Pain Symptom Manage.* 1997: 14, 7-14.
3. Beal, J. E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J. O., Bellman, P., Yangco, B., Lefkowitz, L., Plasse, T. F. and Shepard, K. V. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage.* 1995: 10, 89-97.
4. Plasse, T. F., Gorter, R. W., Krasnow, S. H., Lane, M., Shepard, K. V. and Wadleigh, R. G. Recent clinical experience with dronabinol. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991: 40, 695-700.
5. Lane, M., Vogel, C. L., Ferguson, J., Krasnow, S., Saiers, J. L., Hamm, J., Salva, K., Wiernik, P. H., Holroyde, C. P., Hammill, S. and Et Al. Dronabinol and prochlorperazine in combination for treatment of cancer chemotherapy-induced nausea and vomiting. *J Pain Symptom Manage.* 1991: 6, 352-9.
6. Sallan, S. E., Cronin, C., Zelen, M. and Zinberg, N. E. Antiemetics in patients receiving chemotherapy for cancer: a randomized comparison of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and prochlorperazine. *N Engl J Med.* 1980: 302, 135-8.
7. Abrahamov, A., Abrahamov, A. and Mechoulam, R. An efficient new cannabinoid antiemetic in pediatric oncology. *Life Sci.* 1995: 56, 2097-102.
8. Walker, J. M. and Huang, S. M. Cannabinoid analgesia. *Pharmacol Ther.* 2002: 95, 127-35.
9. Elsner, F., Radbruch, L. and Sabatowski, R. [Tetrahydrocannabinol for treatment of chronic pain]. *Schmerz.* 2001: 15, 200-4.
10. Pertwee, R. G. Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* 2002: 95, 165-74.
11. Killestein, J., Hoogervorst, E. L., Reif, M., Kalkers, N. F., Van Loenen, A. C., Staats, P. G., Gorter, R. W., Uitdehaag, B. M. and Polman, C. H. Safety,

- tolerability, and efficacy of orally administered cannabinoids in MS. *Neurology*. 2002: 58, 1404-7.
12. Martyn, C. N., Illis, L. S. and Thom, J. Nabilone in the treatment of multiple sclerosis. *Lancet*. 1995: 345, 579.
 13. Meinck, H. M., Schonle, P. W. and Conrad, B. Effect of cannabinoids on spasticity and ataxia in multiple sclerosis. *J Neurol*. 1989: 236, 120-2.
 14. Ungerleider, J. T., Andyrsiak, T., Fairbanks, L., Ellison, G. W. and Myers, L. W. Δ 9-THC in the treatment of spasticity associated with multiple sclerosis. *Adv Alcohol Subst Abuse*. 1987: 7, 39-50.
 15. Petro, D. J. and Ellenberger, C., Jr. Treatment of human spasticity with Δ 9-tetrahydrocannabinol. *J Clin Pharmacol*. 1981: 21, 413S-6S.
 16. Petro, D. J. Marijuana as a therapeutic agent for muscle spasm or spasticity. *Psychosomatics*. 1980: 21, 81 and 85.
 17. Grotenhermen, F. Cannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005: 4, 507-30.
 18. Rukwied, R., Gauter, B., Schley, M. and Konrad, C. [Cannabinoids - signal transduction and mode of action]. *Schmerz*. 2005: 19, 528-34.
 19. Pfitzer, T., Niederhoffer, N. and Szabo, B. Search for an endogenous cannabinoid-mediated effect in the sympathetic nervous system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2005: 371, 9-17.
 20. Seamon, M. J., Fass, J. A., Maniscalco-Feichtl, M. and Abu-Shraie, N. A. Medical marijuana and the developing role of the pharmacist. *Am J Health Syst Pharm*. 2007: 64, 1037-44.
 21. Kumar, R. N., Chambers, W. A. and Pertwee, R. G. Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia*. 2001: 56, 1059-68.
 22. Costa, B. On the pharmacological properties of Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC). *Chem Biodivers*. 2007: 4, 1664-77.
 23. Croxford, J. L. Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS Drugs*. 2003: 17, 179-202.
 24. Schwenkreis, P. and Tegenthoff, M. [Therapeutic use of cannabinoids in neurology]. *Schmerz*. 2003: 17, 367-73.
 25. Hall, W., Christie, M. and Currow, D. Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *Lancet Oncol*. 2005: 6, 35-42.

26. Grotenhermen, F. The toxicology of cannabis and cannabis prohibition. *Chem Biodivers.* 2007: 4, 1744-69.
27. Sewell, R. A., Ranganathan, M. and D'souza, D. C. Cannabinoids and psychosis. *Int Rev Psychiatry.* 2009: 21, 152-62.
28. Sugranyes, G., Flamarique, I., Parellada, E., Baeza, I., Goti, J., Fernandez-Egea, E. and Bernardo, M. Cannabis use and age of diagnosis of schizophrenia. *Eur Psychiatry.* 2009.
29. Blaschek, W. (Hrsg.). *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis.* Berlin, Heidelberg: Springer. 5. Auflage (1998), Vol. 2, S. 640-55.
30. Frohne, D. and Jensen, U. *Systematik des Pflanzenreichs - Unter besonderer Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. 5. Auflage (1998), S. 159-63.
31. Schultes, R. E., Klein, W. M., Plowman, T. and T.E., L. *Cannabis*, an example of taxonomic neglect. *Botanical Museum leaflets, Harvard University.* 1974: 23, 337-67.
32. Anderson, L. C. A study of systematic wood anatomy in *Cannbis*. *Botanical Museum leaflets, Harvard University.* 1974: 24, 29-36.
33. Emboden, W. A. *Cannabis* - a polytypic genus. *Economic botany.* 1974: 28, 304-10.
34. Beutler, J. A. and Der Marderosian, A. H. Crossbreeding between *Cannabis sativa* and *C. ruderalis*, with analysis of cannabinoid content. *Economic botany.* 1978: 32, 378-94.
35. Brenneisen, R. Psychotrope Drogen I. *Cannabis sativa* L. *Pharm. Acta Helv.* 1983: 58, 314-20.
36. Small, E., Jui, P. Y. and Lefkovitch, L. P. A numerical taxonomic analysis of *Cannabis* with special reference to species delimitation. *System. Bot.* 1976: 1, 67-84.
37. Small, E. and Cronquist, A. A practical and natural taxonomy for *Cannabis*. *Taxon.* 1976: 25, 405-35.
38. Fetterman, P. S., Keith, E. S., Waller, C. W., Guerrero, O., Doorenbos, N. J. and Quimby, M. W. Mississippi-grown *Cannabis sativa* L: preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. *J Pharm Sci.* 1971: 60, 1246-9.

39. Small, E. and Beckstead, H. D. Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of Cannabis. *Lloydia*. 1973: 36, 144-65.
40. Turner, C. E., Elsohly, M. A., Cheng, P. C. and Lewis, G. Constituents of Cannabis sativa L., XIV: intrinsic problem in classifying Cannabis based on a single cannabinoid analysis. *J. Nat. Prod.* 1979: 42, 317-19.
41. Brenneisen, R. and Kessler, T. [Psychotropic drugs. V. Variability of cannabinoid liberation from Cannabis plants grown in Switzerland in relation to genetic and ecologic factors]. *Pharm Acta Helv.* 1987: 62, 134-9.
42. Turner, C. E., Elsohly, M. A. and Boeren, E. G. Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents. *J Nat Prod.* 1980: 43, 169-234.
43. Razdan, R. K. Structure-activity relationships in cannabinoids. *Pharmacol Rev.* 1986: 38, 75-149.
44. Grotenhermen, F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet.* 2003: 42, 327-60.
45. Auwärter, V., Dresen, S., Weinmann, W., Müller, M., Pütz, M. and Ferreirós, N. "Spice" and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drugs? *Journal of Mass Spectrometry*. 2009: 44, 832-7.
46. Field, B. I. and Arndt, R. R. Cannabinoid compounds in South African Cannabis sativa L. *J Pharm Pharmacol.* 1980: 32, 21-4.
47. Hemphill, J. K., Turner, J. C. and Mahlberg, P. G. Cannabinoid Content of Individual Plant Organs From Different Geographical Strains of Cannabis sativa L. *Journal of Natural Products*. 1980: 43, 112-22.
48. Claussen, U. and Korte, F. Haschisch, XVI. Phenolische Inhaltsstoffe der Hanf-Pflanze und ihre Umwandlung zu Haschisch-Inhaltsstoffen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1968: 713, 166-74.
49. Rowan, M. G. and Fairbairn, J. W. Cannabinoid patterns in seedlings of Cannabis sativa L. and their use in the determination of chemical race. *J Pharm Pharmacol.* 1977: 29, 491-4.
50. Pitts, J. E., Neal, J. D. and Gough, T. A. Some features of Cannabis plants grown in the United Kingdom from seeds of known origin. *J Pharm Pharmacol.* 1992: 44, 947-51.
51. Harvey, D. J. Characterization of the butyl homologues of Δ^1 -tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in samples of cannabis by

- combined gas chromatography and mass spectrometry. *J Pharm Pharmacol.* 1976: 28, 280-5.
52. Vree, T. B., Breimer, D. D., Van Ginneken, C. A. and Van Rossum, J. M. Identification in hashish of tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol analogues with a methyl side-chain. *J Pharm Pharmacol.* 1972: 24, 7-12.
53. Dewey, W. L. Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1986: 38, 151-78.
54. Baker, P. B., Taylor, B. J. and Gough, T. A. The tetrahydrocannabinol and tetrahydrocannabinolic acid content of cannabis products. *J Pharm Pharmacol.* 1981: 33, 369-72.
55. Malingre, T., Hendriks, H., Batterman, S., Bos, R. and Visser, J. The essential oil of *Cannabis sativa*. *Planta Med.* 1975: 28, 56-61.
56. Slatkin, D. J., Doorenbos, N. J., Harris, L. S., Masoud, A. N., Quimby, M. W. and Schiff, P. L., Jr. Chemical constituents of *Cannabis sativa* L. root. *J Pharm Sci.* 1971: 60, 1891-2.
57. Fellermeier, M., Eisenreich, W., Bacher, A. and Zenk, M. H. Biosynthesis of cannabinoids. Incorporation experiments with (¹³C)-labeled glucoses. *Eur J Biochem.* 2001: 268, 1596-604.
58. Dewick, R. M. *Medicinal natural products, a biosynthetic approach.* Chichester: Wiley. 2. Auflage (2002), S. 60 ff.
59. Raharjo, T. J., Widjaja, I., Roytrakul, S. and Verpoorte, R. Comparative proteomics of *Cannabis sativa* plant tissues. *J Biomol Tech.* 2004: 15, 97-106.
60. Raharjo, T. J., Chang, W. T., Verberne, M. C., Peltenburg-Looman, A. M., Linthorst, H. J. and Verpoorte, R. Cloning and over-expression of a cDNA encoding a polyketide synthase from *Cannabis sativa*. *Plant Physiol Biochem.* 2004: 42, 291-7.
61. Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Shoyama, Y. and Morimoto, S. Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: recent studies on biosynthetic enzymes. *Chem Biodivers.* 2007: 4, 1649-63.
62. Fellermeier, M. and Zenk, M. H. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* 1998: 427, 283-5.
63. Hamerski, D., Schmitt, D. and Matern, U. Induction of two prenyltransferases for the accumulation of coumarin phytoalexins in elicitor-treated *Ammi majus* cell suspension cultures. *Phytochemistry.* 1990: 29, 1131-5.

64. Yamamoto, H., Senda, M. and Inoue, K. Flavanone 8-dimethylallyltransferase in *Sophora flavescens* cell suspension cultures. *Phytochemistry*. 2000: 54, 649-55.
65. Zhao, P., Inoue, K., Kouno, I. and Yamamoto, H. Characterization of leachianone G 2"-dimethylallyltransferase, a novel prenyl side-chain elongation enzyme for the formation of the lavandulyl group of sophoraflavanone G in *Sophora flavescens* Ait. cell suspension cultures. *Plant Physiol*. 2003: 133, 1306-13.
66. Yazaki, K., Kuniyama, M., Fujisaki, T. and Sato, F. Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a ket enzyme in shikonin biosynthesis. *J Biol Chem*. 2002: 277, 6240-6.
67. Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y. and Taura, F. The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ 1-tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J Biol Chem*. 2004: 279, 39767-74.
68. Shoyama, Y., Takeuchi, A., Taura, F., Tamada, T., Adachi, M., Kuroki, R., Shoyama, Y. and Morimoto, S. Crystallization of Δ 1-tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase from *Cannabis sativa*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2005: 61, 799-801.
69. Sirikantaramas, S., Taura, F., Tanaka, Y., Ishikawa, Y., Morimoto, S. and Shoyama, Y. Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol*. 2005: 46, 1578-82.
70. Caesar und Loretz GmbH. Dronabinol - Sicherheitsdatenblatt gemäß 2001/58/EG. 2006.
71. Patent WO/2004/026857. Methods of purifying cannabinoids from plant material. Flockhart, I., Wheatley, G. W., Dring, S. and Archer, L. 2004.
72. Dussy, F. E., Hamberg, C., Luginbuhl, M., Schwerzmann, T. and Briellmann, T. A. Isolation of Δ 9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ 9-THC in cannabis products. *Forensic Sci Int*. 2005: 149, 3-10.
73. Korte, F., Haag, M. and Claussen, U. Tetrahydrocannabinolcarboxylic acid, a component of hashish. 1. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1965: 4, 872.
74. Yamauchi, T., Shoyama, Y., Aramaki, H., Azuma, T. and Nishioka, I. Tetrahydrocannabinolic acid, a genuine substance of tetrahydrocannabinol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1967: 15, 1075-6.

75. Lehmann, T. and Brenneisen, R. A new chromatographic method for the isolation (-)- Δ^9 -(trans)-tetrahydrocannabinolic acid A. *Phytochemical analysis*. 1992: 3, 88-90.
76. United States National Library of Medicine. ChemID plus advanced.
77. Garrett, E. R. and Hunt, C. A. Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci*. 1974: 63, 1056-64.
78. Honorio, K. M. and Da Silva, A. B. A study on the influence of molecular properties in the psychoactivity of cannabinoid compounds. *J Mol Model*. 2005: 11, 200-9.
79. Shoyama, Y., Yamauchi, T. and Nishioka, I. Cannabis V. Cannabigerolic acid monomethyl ether and cannabinolic acid. *Chem. Pharm. Bull*. 1970: 18, 1327-32.
80. Brenneisen, R. [Psychotropic drugs. II. Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. and in cannabis products with high pressure liquid chromatography (HPLC)]. *Pharm Acta Helv*. 1984: 59, 247-59.
81. Fairbairn, J. W., Liebmann, J. A. and Rowan, M. G. The stability of cannabis and its preparations on storage. *J Pharm Pharmacol*. 1976: 28, 1-7.
82. Geschwinde, T. *Rauschdrogen - Marktformen und Wirkungsweisen*. Springer. 5. Auflage (2007), S. 8-65.
83. Jacobsen-Bauer, A. (Landeskriminalamt Baden-Württemberg, Kriminaltechnisches Institut). Untersuchungen des Gehaltes an Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THC, CBN, CBDA und CDB in Marihuana und Haschisch (unveröffentlicht). 2008.
84. Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelgesetz - BtMG). 28.07.1981, neugefasst durch Bek. v. 1.3.1994; zuletzt geändert durch V v. 19.1.2009.
85. Straßenverkehrsgesetz (StVG). 03.05.1909, neugefasst durch Bek. v. 5.3.2003; zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 22.12.2008.
86. Strafgesetzbuch (StGB). 15.05.1871, neugefasst durch Bek. v. 13.11.1998; zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 31.10.2008.
87. Huestis, M. A. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*. 2007: 4, 1770-804.
88. Huestis, M. A. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Handb Exp Pharmacol*. 2005: 657-90.

89. Verhoeckx, K. C., Korthout, H. A., Van Meeteren-Kreikamp, A. P., Ehlert, K. A., Wang, M., Van Der Greef, J., Rodenburg, R. J. and Witkamp, R. F. Unheated *Cannabis sativa* extracts and its major compound THC-acid have potential immuno-modulating properties not mediated by CB1 and CB2 receptor coupled pathways. *Int Immunopharmacol.* 2006: 6, 656-65.
90. Hunt, C. A. and Jones, R. T. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980: 215, 35-44.
91. Chiang, C. N. and Rapaka, R. S. Pharmacokinetics and disposition of cannabinoids. *NIDA Res Monogr.* 1987: 79, 173-88.
92. Wall, M. E., Sadler, B. M., Brine, D., Taylor, H. and Perez-Reyes, M. Metabolism, disposition, and kinetics of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther.* 1983: 34, 352-63.
93. Kelly, P. and Jones, R. T. Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users. *J Anal Toxicol.* 1992: 16, 228-35.
94. Valiveti, S., Hammell, D. C., Earles, D. C. and Stinchcomb, A. L. In vitro/in vivo correlation studies for transdermal Δ^8 -THC development. *J Pharm Sci.* 2004: 93, 1154-64.
95. Brenneisen, R., Egli, A., Elsohly, M. A., Henn, V. and Spiess, Y. The effect of orally and rectally administered Δ^9 -tetrahydrocannabinol on spasticity: a pilot study with 2 patients. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1996: 34, 446-52.
96. Stinchcomb, A. L., Valiveti, S., Hammell, D. C. and Ramsey, D. R. Human skin permeation of Δ^8 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *J Pharm Pharmacol.* 2004: 56, 291-7.
97. Valiveti, S., Agu, R. U., Hammell, D. C., Paudel, K. S., Earles, D. C., Wermeling, D. P. and Stinchcomb, A. L. Intranasal absorption of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and WIN55,212-2 mesylate in rats. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007: 65, 247-52.
98. Tomida, I., Azuara-Blanco, A., House, H., Flint, M., Pertwee, R. G. and Robson, P. J. Effect of sublingual application of cannabinoids on intraocular pressure: a pilot study. *J Glaucoma.* 2006: 15, 349-53.
99. Lichtman, A. H., Peart, J., Poklis, J. L., Bridgen, D. T., Razdan, R. K., Wilson, D. M., Poklis, A., Meng, Y., Byron, P. R. and Martin, B. R. Pharmacological evaluation of aerosolized cannabinoids in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000: 399, 141-9.

100. Hazekamp, A., Ruhaak, R., Zuurman, L., Van Gerven, J. and Verpoorte, R. Evaluation of a vaporizing device (Volcano) for the pulmonary administration of tetrahydrocannabinol. *J Pharm Sci.* 2006: 95, 1308-17.
101. Mirken, B. Vaporizers for medical marijuana. *AIDS Treat News.* 1999: 1, 5-7.
102. Lindgren, J. E., Ohlsson, A., Agurell, S., Hollister, L. and Gillespie, H. Clinical effects and plasma levels of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology (Berl).* 1981: 74, 208-12.
103. Huestis, M. A., Henningfield, J. E. and Cone, E. J. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol.* 1992: 16, 276-82.
104. Chiang, C. W. and Barnett, G. Marijuana effect and Δ^9 -tetrahydrocannabinol plasma level. *Clin Pharmacol Ther.* 1984: 36, 234-8.
105. Ohlsson, A., Lindgren, J. E., Wahlen, A., Agurell, S., Hollister, L. E. and Gillespie, H. K. Plasma Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther.* 1980: 28, 409-16.
106. Perez-Reyes, M., Di Guiseppi, S., Davis, K. H., Schindler, V. H. and Cook, C. E. Comparison of effects of marijuana cigarettes to three different potencies. *Clin Pharmacol Ther.* 1982: 31, 617-24.
107. Ohlsson, A., Lindgren, J. E., Wahlen, A., Agurell, S., Hollister, L. E. and Gillespie, H. K. Single dose kinetics of deuterium labelled Δ^1 -tetrahydrocannabinol in heavy and light cannabis users. *Biomed Mass Spectrom.* 1982: 9, 6-10.
108. Agurell, S., Halldin, M., Lindgren, J. E., Ohlsson, A., Widman, M., Gillespie, H. and Hollister, L. Pharmacokinetics and metabolism of Δ^1 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev.* 1986: 38, 21-43.
109. Agurell, S. and Leander, K. Stability, transfer and absorption of cannabinoid constituents of cannabis (hashish) during smoking. *Acta Pharm Suec.* 1971: 8, 391-402.
110. Ryrfeldt, A., Ramsay, C. H., Nilsson, I. M., Widman, M. and Agurell, S. Whole-body autoradiography of Δ^1 -tetrahydrocannabinol and $\Delta^1(6)$ -tetrahydrocannabinol in mouse. Pharmacokinetic aspects of Δ^1 -tetrahydrocannabinol and its metabolites. *Acta Pharm Suec.* 1973: 10, 13-28.

111. Ho, B. T., Fritchie, G. E., Kralik, P. M., Englert, L. F., Mcisaac, W. M. and Idanpaan-Heikkila, J. Distribution of tritiated-1- Δ 9-tetrahydrocannabinol in rat tissues after inhalation. *J Pharm Pharmacol.* 1970: 22, 538-9.
112. Gill, E. W. and Jones, G. Brain levels of Δ 1-tetrahydrocannabinol and its metabolites in mice - correlation with behaviour, and the effect of the metabolic inhibitors SKF 525A and piperonyl butoxide. *Biochem Pharmacol.* 1972: 21, 2237-48.
113. Agurell, S., Nilsson, I. M., Ohlsson, A. and Sandberg, F. On the metabolism of tritium-labelled Δ 1-tetrahydrocannabinol in the rabbit. *Biochem Pharmacol.* 1970: 19, 1333-9.
114. Johansson, E., Noren, K., Sjoval, J. and Halldin, M. M. Determination of Δ 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marihuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 1989: 3, 35-8.
115. Kreuz, D. S. and Axelrod, J. Δ 9-tetrahydrocannabinol: localization in body fat. *Science.* 1973: 179, 391-3.
116. Harvey, D. J., Leuschner, J. T. and Paton, W. D. Gas chromatographic and mass spectrometric studies on the metabolism and pharmacokinetics of Δ 1-tetrahydrocannabinol in the rabbit. *J Chromatogr.* 1982: 239, 243-50.
117. Haggerty, G. C., Deskin, R., Kurtz, P. J., Fentiman, A. F. and Leighty, E. G. The pharmacological activity of the fatty acid conjugate 11-palmitoyloxy- Δ 9-tetrahydrocannabinol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986: 84, 599-606.
118. Leighty, E. G., Fentiman, A. F., Jr. and Foltz, R. L. Long-retained metabolites of Δ 9- and Δ 8-tetrahydrocannabinols identified as novel fatty acid conjugates. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1976: 14, 13-28.
119. Leuschner, J. T., Harvey, D. J., Bullingham, R. E. and Paton, W. D. Pharmacokinetics of Δ 9-tetrahydrocannabinol in rabbits following single or multiple intravenous doses. *Drug Metab Dispos.* 1986: 14, 230-8.
120. Widman, M., Agurell, S., Ehrnebo, M. and Jones, G. Binding of (+)- and (-)- Δ 1-tetrahydrocannabinols and (-)-7-hydroxy- Δ 1-tetrahydrocannabinol to blood cells and plasma proteins in man. *J Pharm Pharmacol.* 1974: 26, 914-6.
121. Wahlqvist, M., Nilsson, I. M., Sandberg, F. and Agurell, S. Binding of Δ 1-tetrahydrocannabinol to human plasma proteins. *Biochem Pharmacol.* 1970: 19, 2579-84.

122. Fehr, K. O. and Kalant, H. Fate of ^{14}C - Δ^1 -THC in rat plasma after intravenous injection and smoking. *Eur J Pharmacol.* 1974: 25, 1-8.
123. Lemberger, L., Tamarkin, N. R., Axelrod, J. and Kopin, I. J. Δ^9 -tetrahydrocannabinol: metabolism and disposition in long-term marijuana smokers. *Science.* 1971: 173, 72-4.
124. Timpone, J. G., Wright, D. J., Li, N., Egorin, M. J., Enama, M. E., Mayers, J. and Galetto, G. The safety and pharmacokinetics of single-agent and combination therapy with megestrol acetate and dronabinol for the treatment of HIV wasting syndrome. The DATRI 004 Study Group. Division of AIDS Treatment Research Initiative. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1997: 13, 305-15.
125. Barnett, G., Chiang, C. W., Perez-Reyes, M. and Owens, S. M. Kinetic study of smoking marijuana. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1982: 10, 495-506.
126. Brewster, M. E., Pop, E., Foltz, R. L., Reuschel, S., Griffith, W., Amselem, S. and Biegon, A. Clinical pharmacokinetics of escalating i.v. doses of dexanabinol (HU-211), a neuroprotectant agent, in normal volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1997: 35, 361-5.
127. Sticht, G. and Käferstein, H. Grundbegriffe, Toxikokinetik und Toxikodynamik in Cannabis im Straßenverkehr. Berghaus, G. and Krüger, H. P. (Hrsg.). Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag. (1998) S. 1-11.
128. Blackard, C. and Tennes, K. Human placental transfer of cannabinoids. *N Engl J Med.* 1984: 311, 797.
129. Bailey, J. R., Cunny, H. C., Paule, M. G. and Slikker, W., Jr. Fetal disposition of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) during late pregnancy in the rhesus monkey. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987: 90, 315-21.
130. Hutchings, D. E., Martin, B. R., Gamagaris, Z., Miller, N. and Fico, T. Plasma concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. *Life Sci.* 1989: 44, 697-701.
131. Perez-Reyes, M. and Wall, M. E. Presence of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human milk. *N Engl J Med.* 1982: 307, 819-20.
132. Atkinson, H. C., Begg, E. J. and Darlow, B. A. Drugs in human milk. Clinical pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet.* 1988: 14, 217-40.
133. Watanabe, K., Yamaori, S., Funahashi, T., Kimura, T. and Yamamoto, I. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinal by human hepatic microsomes. *Life Sci.* 2007: 80, 1415-9.

134. Bornheim, L. M., Lasker, J. M. and Raucy, J. L. Human hepatic microsomal metabolism of Δ 1-tetrahydrocannabinol. *Drug Metab Dispos.* 1992: 20, 241-6.
135. Burstein, S. and Shoupe, T. S. Metabolic pathways for the transformation of Δ 1-tetrahydrocannabinol in mouse hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos.* 1981: 9, 94-6.
136. Harvey, D. J. and Brown, N. K. Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991: 40, 533-40.
137. Borys, H. K. and Karler, R. Cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabinol metabolism. In vitro comparison of mouse and rat liver crude microsome preparations. *Biochem Pharmacol.* 1979: 28, 1553-9.
138. Ben-Zvi, Z. and Burstein, S. Transformation of Δ 1-tetrahydrocannabinol (THC) by rabbit liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 1975: 24, 1130-1.
139. Gurny, O., Maynard, D. E., Pitcher, R. G. and Kierstead, R. W. Metabolism of (-)- Δ 9- and (-)- Δ 8-tetrahydrocannabinol by monkey liver. *J Am Chem Soc.* 1972: 94, 7928-9.
140. Harvey, D. J. In vivo metabolism of (+)-trans- Δ 9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1988: 15, 117-22.
141. Harvey, D. J., Martin, B. R. and Paton, W. D. Identification of in vivo liver metabolites of Δ 1-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, and cannabinol produced by the guinea-pig. *J Pharm Pharmacol.* 1980: 32, 267-71.
142. Klausner, H. A. and Dingell, J. V. The metabolism and excretion of Δ 9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Life Sci I.* 1971: 10, 49-59.
143. Leighty, E. G. Metabolism and distribution of cannabinoids in rats after different methods of administration. *Biochem Pharmacol.* 1973: 22, 1613-21.
144. Matsunaga, T., Iwawaki, Y., Watanabe, K., Yamamoto, I., Kageyama, T. and Yoshimura, H. Metabolism of Δ 9-tetrahydrocannabinol by cytochrome P450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life Sci.* 1995: 56, 2089-95.
145. Siemens, A. J. and Kalant, H. Metabolism of Δ 1-tetrahydrocannabinol by the rat in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol.* 1975: 24, 755-62.
146. Wall, M. E. The in vivo and in vitro metabolism of tetrahydrocannabinol. *Ann N Y Acad Sci.* 1971: 191, 23-9.

147. Widman, M., Halldin, M. and Martin, B. In vitro metabolism of tetrahydrocannabinol by rhesus monkey liver and human liver. *Adv Biosci.* 1978: 22-23, 101-3.
148. Harvey, D. J., Martin, B. R. and Paton, W. D. Identification of di- and tri-substituted hydroxy and ketone metabolites of Δ^1 -tetrahydrocannabinol in mouse liver. *J Pharm Pharmacol.* 1977: 29, 482-6.
149. Matsunaga, T., Kishi, N., Tanaka, H., Watanabe, K., Yoshimura, H. and Yamamoto, I. Major cytochrome P450 enzyme responsible for oxidation of secondary alcohols to the corresponding ketones in mouse hepatic microsomes. Oxidation of 7-hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol to 7-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol. *Drug Metab Dispos.* 1998: 26, 1045-7.
150. Matsunaga, T., Tanaka, H., Higuchi, S., Shibayama, K., Kishi, N., Watanabe, K. and Yamamoto, I. Oxidation mechanism of 7-hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol and 8-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol to the corresponding ketones by CYP3A11. *Drug Metab Dispos.* 2001: 29, 1485-91.
151. Halldin, M. M., Widman, M., C, V. B., Lindgren, J. E. and Martin, B. R. Identification of in vitro metabolites of Δ^1 -tetrahydrocannabinol formed by human livers. *Drug Metab Dispos.* 1982: 10, 297-301.
152. Watanabe, K., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Funae, Y. and Yoshimura, H. Involvement of CYP2C in the metabolism of cannabinoids by human hepatic microsomes from an old woman. *Biol Pharm Bull.* 1995: 18, 1138-41.
153. Matsunaga, T., Kishi, N., Higuchi, S., Watanabe, K., Ohshima, T. and Yamamoto, I. CYP3A4 is a major isoform responsible for oxidation of 7-hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol to 7-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 2000: 28, 1291-6.
154. Narimatsu, S., Watanabe, K., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Imaoka, S., Funae, Y. and Yoshimura, H. Cytochrome P-450 isozymes in metabolic activation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos.* 1990: 18, 943-8.
155. Narimatsu, S., Watanabe, K., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Imaoka, S., Funae, Y. and Yoshimura, H. Cytochrome P-450 isozymes involved in the oxidative metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinol by liver microsomes of adult female rats. *Drug Metab Dispos.* 1992: 20, 79-83.

156. Narimatsu, S., Watanabe, K., Yamamoto, I. and Yoshimura, H. Sex difference in the oxidative metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the rat. *Biochem Pharmacol.* 1991: 41, 1187-94.
157. Williams, P. L. and Moffat, A. C. Identification in human urine of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite. *J Pharm Pharmacol.* 1980: 32, 445-8.
158. Nordqvist, M., Lindgren, J. E. and Agurell, S. Acidic metabolites of Δ^1 -tetrahydrocannabinol isolated from rabbit urine. *J Pharm Pharmacol.* 1979: 31, 231-7.
159. Harvey, D. J. Further studies on the oxidative cleavage of the pentyl side-chain of cannabinoids: identification of new biotransformation pathways in the metabolism of 3'-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol by the mouse. *Xenobiotica.* 1989: 19, 1437-47.
160. Harvey, D. J. Oxidative cleavage of the pentyl side-chain of cannabinoids. Identification of new biotransformation pathways in the metabolism of 4'-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the mouse. *Drug Metab Dispos.* 1990: 18, 350-5.
161. Halldin, M. M. and Widman, M. Glucuronic acid conjugate of Δ^1 -tetrahydrocannabinol identified in the urine of man. *Arzneimittelforschung.* 1983: 33, 177-8.
162. Krishna, D. R. and Klotz, U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* 1994: 26, 144-60.
163. Greene, M. L. and Saunders, D. R. Metabolism of tetrahydrocannabinol by the small intestine. *Gastroenterology.* 1974: 66, 365-72.
164. Watanabe, K., Tanaka, T., Yamamoto, I. and Yoshimura, H. Brain microsomal oxidation of Δ^8 - and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988: 157, 75-80.
165. Widman, M., Nordqvist, M., Dollery, C. T. and Briant, R. H. Metabolism of Δ^1 -tetrahydrocannabinol by the isolated perfused dog lung. Comparison with in vitro liver metabolism. *J Pharm Pharmacol.* 1975: 27, 842-8.
166. Johansson, E., Agurell, S., Hollister, L. E. and Halldin, M. M. Prolonged apparent half-life of Δ^1 -tetrahydrocannabinol in plasma of chronic marijuana users. *J Pharm Pharmacol.* 1988: 40, 374-5.

167. Law, B., Mason, P. A., Moffat, A. C., Gleadle, R. I. and King, L. J. Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin. *J Pharm Pharmacol.* 1984: 36, 289-94.
168. Alburges, M. E. and Peat, M. A. Profiles of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolites in urine of marijuana users: preliminary observations by high performance liquid chromatography-radioimmunoassay. *J Forensic Sci.* 1986: 31, 695-706.
169. Johansson, E. and Halldin, M. M. Urinary excretion half-life of Δ^1 -tetrahydrocannabinol-7-oic acid in heavy marijuana users after smoking. *J Anal Toxicol.* 1989: 13, 218-23.
170. Huestis, M. A. and Cone, E. J. Urinary excretion half-life of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in humans. *Ther Drug Monit.* 1998: 20, 570-6.
171. Wall, M. E. and Perez-Reyes, M. The metabolism of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in man. *J Clin Pharmacol.* 1981: 21, 178S-89S.
172. Mikes, F., Hofmann, A. and Waser, P. G. Identification of (-)- Δ^9 -6a,10a-trans-tetrahydrocannabinol and two of its metabolites in rats by use of combination gas chromatography-mass spectrometry and mass fragmentography. *Biochem Pharmacol.* 1971: 20, 2469-76.
173. Huestis, M. A., Henningfield, J. E. and Cone, E. J. Blood cannabinoids. II. Models for the prediction of time of marijuana exposure from plasma concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCCOOH). *J Anal Toxicol.* 1992: 16, 283-90.
174. Mauden, M., Skopp, G., Mattern, R. and Aderjan, R. GC/MS-Bestimmung von THC-COOH im Serum: Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden und Einfluss von THC-COOH-Glucuronid. *Blutalkohol.* 2000: 37, 48-56.
175. Daldrup, T. and Meininger, I. Der Cannabis-Influence-Factor (CIF) in Cannabis im Straßenverkehr. Berghaus, G. and Krüger, H. P. (Hrsg.). Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag. (1998) S. 193-5.
176. Daldrup, T., Käferstein, H., Köhler, H., Maier, R. D. and Musshoff, F. Entscheidung zwischen einmaligem/gelegentlichem und regelmäßigem Konsum. *Blutalkohol.* 2000: 37, 39-47.
177. Skopp, G., Strohbeck-Kuehner, P., Mann, K. and Hermann, D. Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis. *Forensic Sci Int.* 2007: 170, 46-50.

178. Tsanaclis, L. and Wicks, J. F. Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. *Forensic Sci Int.* 2008: 176, 19-22.
179. Uhl, M. and Sachs, H. Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci Int.* 2004: 145, 143-7.
180. Müller, C. A. Entwicklung von Screeningverfahren für Arzneistoffe und Metaboliten mittels LC-MS und LC-MS/MS. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften. Dissertation (2004).
181. Kempf, J. Entwicklung eines Target Screening Verfahrens für Benzodiazepine mit LC-MS/MS für Serum und Urin. Fachhochschule Offenburg, Fachrichtung Verfahrens- und Biotechnik. Diplomarbeit (2005).
182. Rücker, G., Neugebauer, M. and Willems, G. G. Instrumentelle pharmazeutische Analytik - Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 4. Auflage (2008)
183. Mahler, H. Moderne Methoden zur Anzucht von Cannabispflanzen - Berechnung des Ertrags von Indoor-Plantagen. XV. Symposium der GTFCh, Mosbach/Baden, 18.-21. April 2007.
184. Elsohly, M. A., Feng, S., Murphy, T. P., Ross, S. A., Nimrod, A., Mehmedic, Z. and Fortner, N. Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (Δ^9 -THCV) as a marker for the ingestion of cannabis versus Marinol. *J Anal Toxicol.* 1999: 23, 222-4.
185. Sedgwick, B. Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) as a marker of cannabis use: is the methodology forensically acceptable? *J Anal Toxicol.* 2000: 24, 73-5.
186. Elsohly, M. A., Dewit, H., Wachtel, S. R., Feng, S. and Murphy, T. P. Δ^9 -tetrahydrocannabivarin as a marker for the ingestion of marijuana versus Marinol: results of a clinical study. *J Anal Toxicol.* 2001: 25, 565-71.
187. Elsohly, M. A., Feng, S., Murphy, T. P., Warrington, A. W., Ross, S., Nimrod, A., Mehmedic, Z. and Fortner, N. Identification and quantitation of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabivarin-9-carboxylic acid, a major metabolite of Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *J Anal Toxicol.* 2001: 25, 476-80.
188. Dresen, S., Kempf, J. and Weinmann, W. Electrospray-ionization MS/MS library of drugs as database for method development and drug identification. *Forensic Sci Int.* 2006: 161, 86-91.

189. Mueller, C. A., Weinmann, W., Dresen, S., Schreiber, A. and Gergov, M. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005: 19, 1332-8.
190. Weinmann, W., Vogt, S., Goerke, R., Muller, C. and Bromberger, A. Simultaneous determination of THC-COOH and THC-COOH-glucuronide in urine samples by LC/MS/MS. *Forensic Sci Int.* 2000: 113, 381-7.
191. Weinmann, W., Goerner, M., Vogt, S., Goerke, R. and Pollak, S. Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI). *Forensic Sci Int.* 2001: 121, 103-7.
192. Maurer, H. H., Pflieger, K. and Weber, A. *Mass Spectral and GC Data of Drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites.* Weinheim: Wiley-VCH. 2. Auflage (2007).
193. Harvey, D. J. Mass spectrometry of the cannabinoids and their metabolites. *Mass Spectrometry Reviews* 1. 1987: 6, 135-229.
194. Shattuck, T. W. <http://www.colby.edu/chemistry/NMR/IsoClus.html>. Colby College Chemistry and Los Alamos National Laboratory. 2000.
195. Cirimele, V., Villain, M., Mura, P., Bernard, M. and Kintz, P. Oral fluid testing for cannabis: on-site OraLine IV s.a.t. device versus GC/MS. *Forensic Sci Int.* 2006: 161, 180-4.
196. Kintz, P., Bernhard, W., Villain, M., Gasser, M., Aebi, B. and Cirimele, V. Detection of cannabis use in drivers with the drugwipe device and by GC-MS after Intercept device collection. *J Anal Toxicol.* 2005: 29, 724-7.
197. Kintz, P. and Cirimele, V. Testing human blood for cannabis by GC-MS. *Biomed Chromatogr.* 1997: 11, 371-3.
198. Kudo, K., Nagata, T., Kimura, K., Imamura, T. and Jitsufuchi, N. Sensitive determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human tissues by GC-MS. *J Anal Toxicol.* 1995: 19, 87-90.
199. Moeller, M. R., Doerr, G. and Warth, S. Simultaneous quantitation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in serum by GC/MS using deuterated internal standards and its application to a smoking study and forensic cases. *J Forensic Sci.* 1992: 37, 969-83.

200. Steinmeyer, S., Bregel, D., Warth, S., Kraemer, T. and Moeller, M. R. Improved and validated method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in serum, and in human liver microsomal preparations using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002: 772, 239-48.
201. B.E.N. - Programm zur statistischen Auswertung von Kalibrationsdaten nach DIN 32645. Version 2.0 (2000). Herbold, M. and Schmitt, G. Heidelberg.
202. Harvey, D. J. The mass spectra of the trimethylsilyl derivatives of the hydroxy and acid metabolites of Δ^1 - and Δ^6 -tetrahydrocannabinol. *Biomed Mass Spectrom.* 1981: 8, 579-88.
203. Jung, J., Mahler, H., Breitling, E., Müller, M., Peters, F. T., Maurer, H. H., Weinmann, W. and Auwärter, V. New chromatographic method for the isolation of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (Δ^9 -THCA-A) from *cannabis sativa*. Poster im Rahmen des 46. International Meeting of the TIAFT, 2-8 June 2008, Martinique, French West Indies. *Annales de toxicologie analytique.* 2008: 20 (S1), 75-6.
204. Maralikova, B. and Weinmann, W. Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004: 39, 526-31.
205. Bundesvereinigung Deutscher Apothekerverbände (ABDA). Rezepturhinweise: Dronabinol und Cannabis in Neues Rezeptur-Formularium. (Hrsg.). Eschborn: Govi-Verlag. (2006)
206. Watanabe, K., Hirahashi, N., Narimatsu, S., Yamamoto, I. and Yoshimura, H. Mouse hepatic microsomal enzyme that catalyzes oxidation of 11-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol to Δ^8 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid. *Drug Metab Dispos.* 1991: 19, 218-21.
207. Watanabe, K., Matsunaga, T., Narimatsu, S., Yamamoto, I., Imaoka, S., Funae, Y. and Yoshimura, H. Catalytic activity of cytochrome P450 isozymes purified from rat liver in converting 11-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol to Δ^8 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid. *Biochem Pharmacol.* 1991: 42, 1255-9.
208. Watanabe, K., Matsunaga, T., Narimatsu, S., Yamamoto, I. and Yoshimura, H. Mechanism of hepatic microsomal oxidation of 11-hydroxy-

-
- Δ^8 -tetrahydrocannabinol to 11-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol. Evidence for hydration of the aldehyde formed. *J Pharmacobiodyn.* 1992: 15, 311-7.
209. Watanabe, K., Yamamoto, I., Oguri, K. and Yoshimura, H. Identification and determination of 11-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol as an intermediate metabolite of Δ^8 -tetrahydrocannabinol in the mouse brain and liver. *J Pharmacobiodyn.* 1980: 3, 686-91.
210. Watanabe, K., Yamamoto, I., Oguri, K. and Yoshimura, H. Metabolic disposition of Δ^8 -tetrahydrocannabinol and its active metabolites, 11-hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol and 11-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol, in mice. *Drug Metab Dispos.* 1981: 9, 261-4.
211. Watanabe, K., Yamamoto, I., Oguri, K. and Yoshimura, H. Microsomal oxygenase catalyzed oxidation of 11-hydroxy- Δ^8 -tetrahydrocannabinol to 11-oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1979: 88, 178-82.
212. Burstein, S. Labeling and Metabolism of the Tetrahydrocannabinols in Marihuana, Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects. Mechoulam, R. (Hrsg.). Academic Press. (1973)
213. Moore, C., Rana, S. and Coulter, C. Simultaneous identification of 2-carboxy-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in oral fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007: 852, 459-64.

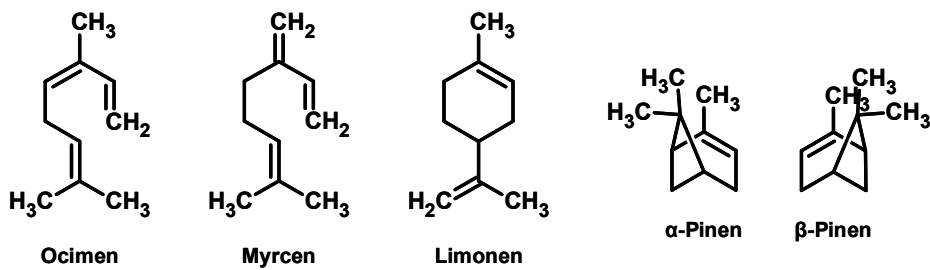
7 ANHANG

7.1 Strukturen der Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* L.

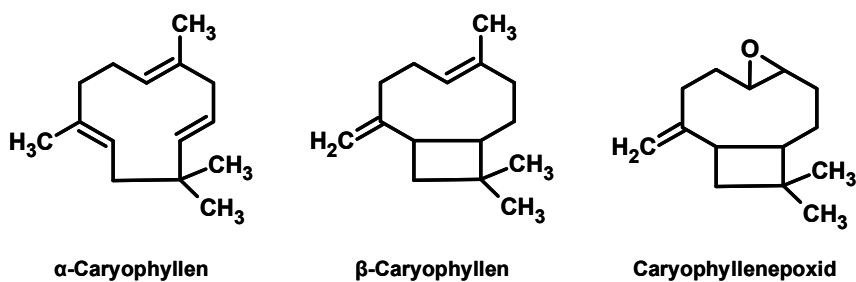
Nachfolgend sind die Strukturen der nicht-cannabinoiden Inhaltsstoffe von *Cannabis sativa* L. dargestellt. Die Strukturen der verschiedenen Cannabinoid-Typen wurden bereits in Kapitel 1.1.2 aufgeführt.

7.1.1 Terpene

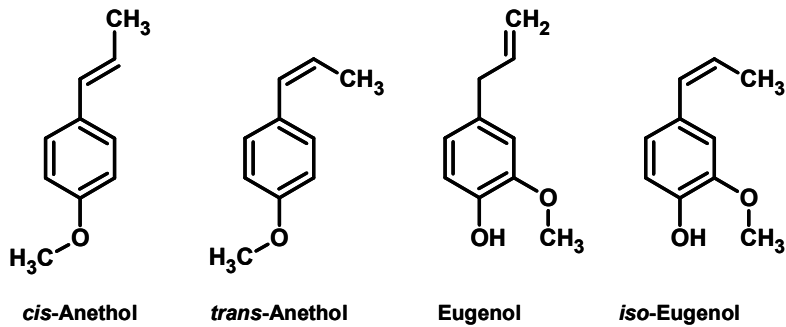
7.1.1.1 Monoterpene



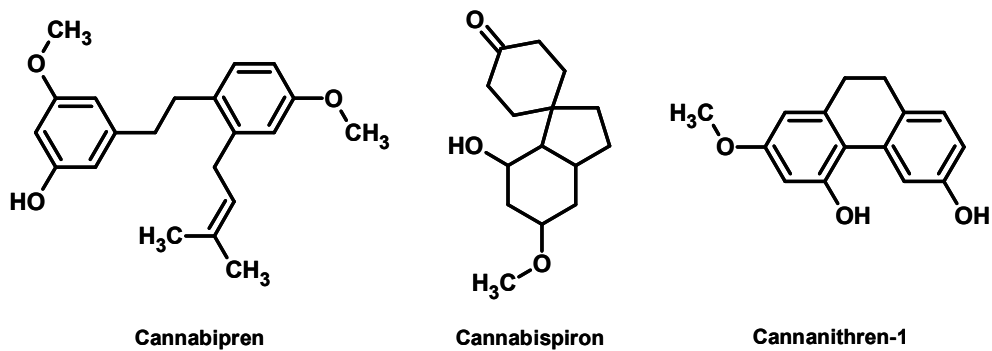
7.1.1.2 Sesquiterpene



7.1.2 Nicht-terpenoide Verbindungen

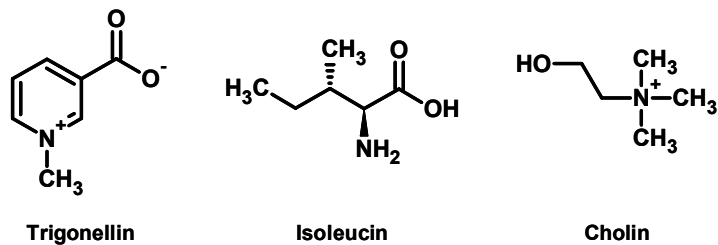


7.1.3 Nicht-cannabinoide Phenole

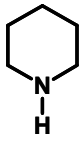


7.1.4 Stickstoffhaltige Verbindungen

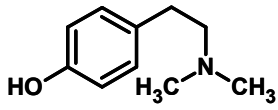
7.1.4.1 Quartäre Basen



7.1.4.2 Amine

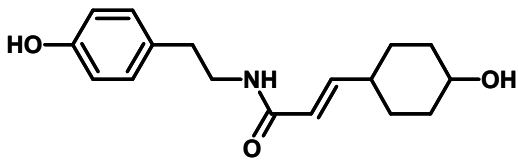


Piperidin

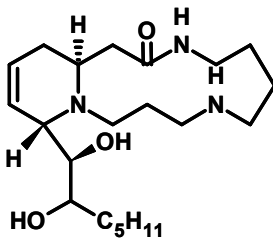


Hordenin

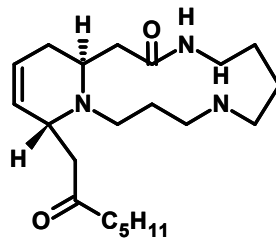
7.1.4.3 Amid


N-(*p*-Hydroxyphenylethyl)-*p*-hydroxy-(*trans*)-cinnamid

7.1.5 Alkaloide

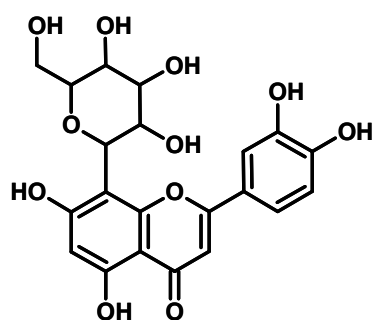


Cannabissativin

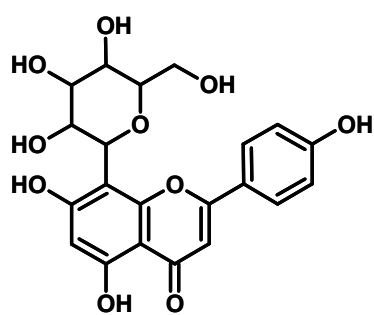


Anhydrocannabissativin

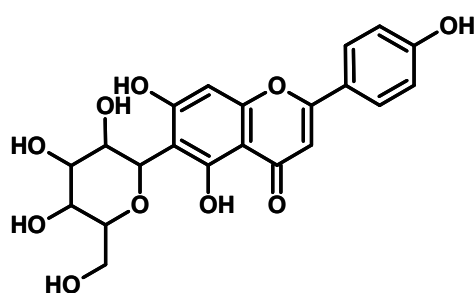
7.1.6 Flavonoide



Orientin



Vitexin



Isovitexin

7.2 Ergebnisse der 200 Serumproben aus Straßenverkehrsfällen

In der nachfolgenden Tabelle sind die Konzentrationen von Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH der 200 Serumproben aus Straßenverkehrsfällen zusammengefasst, welche mit der unter 3.2.2 beschriebenen GC-MS-Methode analysiert wurden. Für die GC-MS-Methode ergaben sich ein LOD von 0,6 ng/ml für Δ^9 -THCA-A, 0,2 ng/ml für Δ^9 -THC, 0,1 ng/ml für 11-OH- Δ^9 -THC und 2,0 ng/ml für Δ^9 -THC-COOH sowie ein LOQ von 2,0 ng/ml für Δ^9 -THCA-A, 0,2 ng/ml für Δ^9 -THC, 0,3 ng/ml für 11-OH- Δ^9 -THC und 5,7 ng/ml für Δ^9 -THC-COOH.

Tab. 7 Serumkonzentrationen von Δ^9 -THCA-A, Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-COOH (n.n.: nicht nachgewiesen).

Probe	Δ^9 -THCA-A [ng/ml]	Δ^9 -THC [ng/ml]	11-OH- Δ^9 -THC [ng/ml]	Δ^9 -THC-COOH [ng/ml]
T-2168-06	n.n.	0,8	0,4	15
T-2923-06	< LOQ	1,0	n.n.	< LOQ
T-2927-06	< LOQ	0,7	n.n.	14
T-2955-06	< LOQ	4,3	n.n.	< LOQ
T-2959-06	< LOQ	5,6	2,8	95
T-2960-06	< LOQ	7,2	3,0	96
T-2961-06	< LOQ	1,1	n.n.	8,9
T-2962-06	2,2	23	4,9	60
T-2970-06	< LOQ	4,7	1,2	53
T-2984-06	< LOQ	4,3	4,1	76
T-2985-06	< LOQ	4,8	2,6	91
T-2991-06	n.n.	0,8	n.n.	11
T-2994-06	4,8	20	10	163
T-2995-06	< LOQ	25	13	65
T-2996-06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T-2997-06	< LOQ	1,1	0,9	24
T-2998-06	< LOQ	10	6,4	70
T-3000-06	n.n.	2,2	1,0	24
T-3004-06	2,2	18	7,4	50
T-3008-06	2,5	10	8,3	75
T-3014-06	< LOQ	9,8	6,2	55
T-3015-06	< LOQ	2,2	1,1	27
T-3018-06	n.n.	2,4	1,3	44
T-3020-06	< LOQ	3,7	1,3	54

Probe	$\Delta 9$ -THCA-A [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC [ng/ml]	11-OH- $\Delta 9$ -THC [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC-COOH [ng/ml]
T-3022-06	< LOQ	2,3	1,6	27
T-3023-06	< LOQ	2,4	1,0	27
T-3024-06	3,2	9,7	4,0	104
T-3038-06	< LOQ	0,6	0,5	15
T-3039-06	< LOQ	0,7	n.n.	< LOQ
T-3040-06	< LOQ	0,5	n.n.	14
T-3041-06	< LOQ	0,4	0,3	9,1
T-3042-06	< LOQ	4,1	2,3	78
T-3043-06	n.n.	n.n.	n.n.	11
T-3045-06	4,2	28	10	234
T-3048-06	< LOQ	7,2	1,7	16
T-3049-06	< LOQ	4,0	2,1	31
T-3050-06	7,2	34	18	201
T-3053-06	< LOQ	11	4,4	34
T-3054-06	< LOQ	6,6	2,6	191
T-3055-06	< LOQ	2,5	1,2	18
T-3056-06	2,5	1,4	0,8	14
T-3057-06	< LOQ	11	5,7	190
T-3058-06	< LOQ	4,9	3,1	57
T-3059-06	< LOQ	8,2	2,9	58
T-3060-06	n.n.	0,8	n.n.	< LOQ
T-3061-06	< LOQ	1,9	0,7	26
T-3062-06	< LOQ	6,9	2,9	83
T-3063-06	< LOQ	3,9	1,0	31
T-3064-06	< LOQ	1,8	1,3	66
T-3073-06	< LOQ	0,3	n.n.	< LOQ
T-3074-06	< LOQ	1,6	1,5	34
T-3079-06	< LOQ	5,9	2,3	64
T-3080-06	< LOQ	1,8	1,0	39
T-3081-06	< LOQ	0,9	0,7	10
T-3082-06	< LOQ	2,9	1,9	41
T-3083-06	< LOQ	2,5	2,0	21
T-3084-06	< LOQ	3,9	2,1	89
T-3085-06	< LOQ	4,8	2,5	22
T-3087-06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T-3093-06	n.n.	0,8	1,0	52

Tab. 7 (Fortsetzung).

Probe	$\Delta 9$ -THCA-A [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC [ng/ml]	11-OH- $\Delta 9$ -THC [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC-COOH [ng/ml]
T-3094-06	n.n.	0,5	n.n.	8,0
T-3106-06	< LOQ	2,1	1,6	25
T-3110-06	9,8	19	9,2	135
T-3111-06	< LOQ	0,2	n.n.	< LOQ
T-3112-06	< LOQ	2,6	0,6	23
T-3115-06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T-3116-06	< LOQ	2,9	1,3	73
T-3117-06	< LOQ	6,9	3,5	73
T-3123-06	2,6	8,4	7,3	137
T-3128-06	6,4	50	23	335
T-3131-06	< LOQ	1,8	1,0	10
T-3132-06	< LOQ	9,7	8,0	106
T-3133-06	n.n.	n.n.	n.n.	< LOQ
T-3134-06	< LOQ	1,6	1,1	26
T-3136-06	n.n.	53	39	172
T-3137-06	< LOQ	61	20	225
T-3151-06	n.n.	2,6	0,9	25
T-3162-06	n.n.	0,9	0,7	12
T-3163-06	< LOQ	30	16	174
T-3166-06	< LOQ	1,1	0,5	13
T-3168-06	n.n.	12	2,6	13
T-3169-06	< LOQ	10	3,1	132
T-3170-06	< LOQ	1,5	2,0	23
T-3179-06	4,0	54	26	262
T-3180-06	< LOQ	36	16	218
T-3188-06	< LOQ	4,9	0,9	37
T-3195-06	n.n.	0,6	n.n.	< LOQ
T-3197-06	< LOQ	8,8	5,4	87
T-3198-06	< LOQ	8,9	3,3	52
T-3199-06	n.n.	0,7	n.n.	8,6
T-3200-06	< LOQ	4,6	2,2	24
T-3201-06	< LOQ	0,5	0,4	8,0
T-3206-06	n.n.	0,8	0,2	10
T-3209-06	< LOQ	2,0	0,7	19
T-3210-06	n.n.	0,7	< LOQ	40
T-3211-06	< LOQ	3,1	1,0	24

Tab. 7 (Fortsetzung).

Probe	$\Delta 9$ -THCA-A [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC [ng/ml]	11-OH- $\Delta 9$ -THC [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC-COOH [ng/ml]
T-3212-06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T-3213-06	< LOQ	2,0	0,6	46
T-3214-06	< LOQ	3,1	1,5	48
T-3215-06	n.n.	0,4	n.n.	7,1
T-3216-06	< LOQ	1,6	0,8	44
T-3218-06	3,7	20	11	133
T-3220-06	< LOQ	52	1,1	n.n.
T-3221-06	n.n.	1,5	0,3	10
T-3222-06	< LOQ	15	5,8	100
T-3223-06	n.n.	4,5	1,9	34
T-3224-06	< LOQ	8,8	3,5	112
T-3232-06	< LOQ	0,3	n.n.	n.n.
T-3235-06	n.n.	n.n.	n.n.	7,86
T-3236-06	< LOQ	5,3	4,6	48
T-3237-06	< LOQ	4,7	4,4	59
T-3238-06	n.n.	0,8	0,4	18
T-3239-06	< LOQ	14	6,9	117
T-3241-06	n.n.	0,8	0,5	12
T-3242-06	< LOQ	0,3	n.n.	7,5
T-3245-06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T-3250-06	< LOQ	7,2	2,1	27
T-3251-06	n.n.	0,5	0,4	14
T-3252-06	2,2	3,8	1,5	20
T-3253-06	< LOQ	7,9	4,3	35
T-3254-06	< LOQ	1,0	0,5	17
T-3256-06	n.n.	n.n.	n.n.	< LOQ
T-3260-06	5,1	7,8	3,9	41
T-3261-06	< LOQ	4,6	3,5	39
T-3262-06	2,0	8,6	2,1	88
T-3263-06	< LOQ	8,7	4,0	82
T-3267-06	< LOQ	7,4	3,9	86
T-3270-06	< LOQ	10	3,8	26
T-3278-06	< LOQ	0,3	n.n.	6,5
T-3284-06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T-3293-06	< LOQ	8,2	3,9	46
T-3294-06	2,4	5,0	3,5	89

Tab. 7 (Fortsetzung).

Probe	$\Delta 9$ -THCA-A [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC [ng/ml]	11-OH- $\Delta 9$ -THC [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC-COOH [ng/ml]
T-3297-06	< LOQ	8,1	5,0	87
T-3298-06	< LOQ	6,6	5,6	87
T-3300-06	< LOQ	3,3	2,2	30
T-3302-06	< LOQ	1,6	0,8	14
T-3305-06	n.n.	0,6	n.n.	< LOQ
T-3306-06	n.n.	n.n.	n.n.	< LOQ
T-3307-06	< LOQ	3,2	1,2	60
T-3316-06	< LOQ	12	4,5	86
T-3318-06	7,0	0,4	0,5	14
T-3319-06	< LOQ	1,9	1,3	18
T-3320-06	n.n.	2,2	0,4	41
T-3321-06	< LOQ	10	2,9	29
T-3322-06	< LOQ	3,6	3,6	62
T-3325-06	< LOQ	2,2	1,2	36
T-3328-06	< LOQ	0,5	n.n.	6,2
T-3329-06	< LOQ	8,1	5,6	81
T-3331-06	< LOQ	5,7	2,6	20
T-3339-06	< LOQ	4,0	2,0	23
T-3340-06	< LOQ	1,6	0,7	17
T-3341-06	n.n.	0,9	0,3	22
T-3351-06	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
T-3352-06	4,1	23	10	88
T-3360-06	< LOQ	10	5,7	106
T-3361-06	n.n.	1,5	0,6	15
T-3363-06	< LOQ	1,1	0,6	10
T-3373-06	n.n.	2,2	2,5	16
T-3375-06	< LOQ	5,0	1,0	10
T-3382-06	< LOQ	10	7,1	95
T-3391-06	< LOQ	2,8	1,6	63
T-3397-06	< LOQ	7,3	6,8	40
T-3398-06	23	4,5	3,7	34
T-3402-06	2,0	49	29	102
T-3407-06	< LOQ	0,6	0,3	6,9
T-3408-06	6,1	11	4,9	132
T-3418-06	< LOQ	0,5	< LOQ	13
T-3419-06	< LOQ	1,3	0,7	20

Tab. 7 (Fortsetzung).

Probe	$\Delta 9$ -THCA-A [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC [ng/ml]	11-OH- $\Delta 9$ -THC [ng/ml]	$\Delta 9$ -THC-COOH [ng/ml]
T-3421-06	33	56	24	300
T-3424-06	< LOQ	4,8	2,4	68
T-3432-06	n.n.	0,5	n.n.	< LOQ
T-3433-06	69	6,2	1,6	25
T-3438-06	n.n.	0,5	< LOQ	< LOQ
T-3439-06	< LOQ	0,4	< LOQ	10
T-3440-06	< LOQ	10	3,6	151
T-3442-06	n.n.	n.n.	n.n.	< LOQ
T-3445-06	< LOQ	3,3	3,6	92
T-3447-06	n.n.	n.n.	n.n.	7,5
T-3449-06	< LOQ	2,3	0,6	44
T-3451-06	< LOQ	0,7	0,5	9,4
T-3452-06	< LOQ	0,6	< LOQ	13
T-0004-07	< LOQ	28	13	172
T-0005-07	< LOQ	6,3	4,0	64
T-0006-07	2,6	11	6,3	98
T-0007-07	6,9	21	7,3	145
T-0009-07	< LOQ	8,4	2,3	68
T-0014-07	< LOQ	32	16	150
T-0015-07	< LOQ	8,7	4,6	56
T-0016-07	n.n.	n.n.	n.n.	< LOQ
T-0017-07	< LOQ	0,5	< LOQ	8,0
T-0018-07	2,3	5,9	1,8	46
T-0019-07	< LOQ	2,3	2,1	28
T-0020-07	n.n.	2,0	0,7	9,0
T-0021-07	n.n.	0,3	n.n.	< LOQ
T-0022-07	22	3,0	0,9	20
T-0023-07	n.n.	n.n.	n.n.	< LOQ
T-0024-07	n.n.	1,8	0,5	38
T-0030-07	2,6	1,7	2,1	27
T-0031-07	< LOQ	4,9	1,4	38
T-0041-07	2,3	13	8,7	136

Tab. 7 (Fortsetzung).

8 CURRICULUM VITAE

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