

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Institut für Rechtsmedizin
Direktor: Professor Dr. Marcel A. Verhoff

**Pharmakokinetik von JWH-018 und seinen Metaboliten in
menschlichen Serum-, Urin- und Speichelproben**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Anna Geraths

aus Heinsberg

Frankfurt am Main, 2019

Dekan/in:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent/in:	Prof. Dr. Stefan Tönnies
Korreferent/in:	Prof. Dr. Heiko Mühl
Tag der mündlichen Prüfung:	31. Oktober 2019

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Stefan Tönnies für die wirklich hervorragende Betreuung. Von der Laborarbeit über die Datenanalyse bis hin zur Fertigstellung der Dissertation erhielt ich dank Ihm erstklassige fachliche Unterstützung und zu jeder Frage oder Problematik eine zeitnahe Hilfestellung. Darüber hinaus hat mich seine Einführung in die wissenschaftliche Arbeit sowie die Möglichkeit einen Teil meiner Arbeit auf einem Kongress vorzutragen auch in persönlicher Hinsicht wesentlich bereichert.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der forensischen Toxikologie für die nette Zusammenarbeit und die Hilfestellungen im Labor, insbesondere Werner Pogoda für die Betreuung der Laborarbeit und Erstellung dieser Messmethode, die meine Analysen und Ergebnisse erst möglich gemacht hat.

Schließlich möchte ich mich natürlich bei meinen Eltern bedanken, die mir stets Vertrauen entgegengebracht haben und ohne deren Unterstützung sowohl mein Studium als auch diese Arbeit niemals zustande gekommen wären.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Cannabinoide	1
1.2	Synthetische Cannabinoide	2
1.3	JWH-018	3
1.3.1	Toxizität	4
1.3.2	Gesetzeslage	5
1.4	Problemstellung	6
2	Material und Methoden	7
2.1	Referenzsubstanzen	7
2.2	Chemikalien	8
2.3	Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)	8
2.4	Studiendesign der Probandenstudie	10
2.5	Bestimmung von JWH-018 und seinen Metaboliten im Serum	12
2.5.1	Probenvorbereitung und Extraktionsverfahren	12
2.5.2	Kalibratoren und Qualitätskontrollproben	12
2.5.3	Validierung	12
2.6	Bestimmung von JWH-018 und seinen Metaboliten im Urin	13
2.6.1	Probenvorbereitung und Extraktionsverfahren	13
2.6.2	Kalibratoren und Qualitätskontrollproben	14
2.6.3	Validierung	14
2.7	Bestimmung von JWH-018 und seinen Metaboliten im Speichel	15
2.7.1	Speichelprobenentnahme	15
2.7.2	Probenvorbereitung	15
2.7.3	Kalibratoren und Qualitätskontrollproben	16
2.7.4	Validierung	16
2.8	Untersuchung der Glaspfeifen auf Rückstände von JWH-018	17
2.9	Pharmakokinetische Auswertung	17
3	Ergebnisse	19
3.1	Serumanalyse	19
3.1.1	Validierung	19
3.1.2	Pharmakokinetik von JWH-018 im Serum	21
3.1.3	Pharmakokinetik der hydroxylierten Metaboliten im Serum	29
3.1.4	Pharmakokinetik der JWH-018 Pentansäure	31
3.1.5	Baseline Serumproben	33

3.2	Urinanalyse	35
3.2.1	Validierung	35
3.2.2	Besonderheiten in der Auswertung der Urinanalyse	37
3.2.3	Pharmakokinetik der hydroxylierten Metaboliten im Urin	39
3.2.4	Pharmakokinetik der Carbonsäuremetaboliten im Urin	42
3.2.5	Baseline Urinproben	44
3.3	Speichelanalyse	46
3.3.1	Validierung	46
3.3.2	Pharmakokinetik von JWH-018 im Speichel	49
3.3.3	Speichel/Serum Verhältnis	50
3.4	Rückstände von JWH-018 in den Glaspfeifen	51
4	Diskussion	53
4.1	Kompartiment Serum	54
4.1.1	JWH-018 im Serum	54
4.1.2	Metabolite von JWH-018 im Serum	55
4.2	Ausscheidung im Urin	56
4.2.1	Analysemethode	56
4.2.2	JWH-018 im Urin	57
4.2.3	Metabolite von JWH-018 im Urin	57
4.2.4	JWH-073 Butansäure im Urin nach Konsum von JWH-018	58
4.2.5	Glukuronidierung der Metaboliten	58
4.2.6	Metabolitenkonzentrationen im Urin	59
4.3	Speichelanalyse	61
4.3.1	Speichelprobengewinnung und Analysemethode	61
4.3.2	JWH-018 im Speichel	61
4.3.3	Metabolite von JWH-018 im Speichel	62
4.3.4	Aspekt der Mundhöhlenkontamination	63
4.3.5	Speichel/Serum Verhältnis	63
4.4	Positive Ergebnisse in Baselineproben	65
4.4.1	Serum Baselineproben	65
4.4.2	Urin Baselineproben	66
4.4.3	Speichel Baselineproben	66
4.4.4	Interpretation	66
4.5	Hydroxy-Keto-Metabolite	67
4.6	Rückstände von JWH-018 in den Glaspfeifen	68
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	68
5	Zusammenfassung	71

6 Abstract	73
7 Literaturverzeichnis	75
8 Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9 Schriftliche Erklärung	87

1 EINLEITUNG

1.1 Cannabinoide

Als Cannabinoide wird eine Gruppe von Substanzen bezeichnet, die an den körpereigenen Cannabinoidrezeptoren wirken. Die erstmalige Entdeckung der Cannabinoide erfolgte als Bestandteil der Hanfpflanze *Cannabis sativa*, die Namensgeber der Substanzgruppe wurde^{1,2}. Mit Abstand die größte Bekanntheit erlangte dabei das Cannabinoid delta9-Tetrahydrocannabinol (THC), dessen erste Isolation 1964 dem Chemiker Raphael Mechoulam in Israel gelang³. Insbesondere die weiblichen Blüten der Hanfpflanze, sowie das daraus gewonnene Harz, enthalten THC als psychoaktiven Bestandteil. Dem Konsum von THC werden zahlreiche positive psychoaktive Effekte wie Entspannung, Euphorie und Verträumtheit nachgesagt. Eben diese Wirkungen führten seit jeher zur Nutzung der Cannabispflanze als Rauschmittel. Die ältesten archäologischen Hinweise über den Anbau von *Cannabis sativa* in Zentraleuropa reichen über 7.000 Jahre zurück⁴. Auch im alten Ägypten war Cannabis bekannt und aus Indien stammt bereits von 1.600 v. Chr. eine Textpassage, in der Cannabis als von Angst befreiende Pflanze beschrieben wird⁵. Bis in die Gegenwart hat der Reiz des Cannabiskonsums angehalten. Heutzutage ist bei anonymen Schülerumfragen in Europa Cannabis das am häufigsten genutzte Rauschmittel, mit einer Lebenszeitprävalenz von durchschnittlich 16 %⁶ in 2015. Im Jahr 2017 gaben in den Vereinigten Staaten von Amerika 26 Millionen Menschen an, im letzten Monat Cannabis konsumiert zu haben. Dies entspricht 9,6 % der Bevölkerung ab 12 Jahren und älter⁷. Damit gilt Cannabis nicht nur als eine der ältesten, sondern auch heutzutage immer noch als die weltweit am häufigsten konsumierte Droge.

Auch für medizinische Zwecke werden Cannabinoide erfolgreich genutzt. Der Anbau von Cannabis und der Einsatz für therapeutische Heilzwecke wurden bereits um 2.700 v. Chr. in China beschrieben⁴. Heutzutage ist die positive Wirkung insbesondere in der Behandlung von Patienten mit chronischen Schmerzsyndromen und Spastiken belegt⁸, bei denen nach Ausschöpfung herkömmlicher Medikamente die Wirkung von Cannabis

eine deutliche Symptomlinderung verschaffen kann. Auch bei Tumorschmerz, sowie zur Behandlung von Übelkeit und Erbrechen bei Strahlentherapiepatienten, wird Cannabis mit Erfolg eingesetzt. Erst 2017 wurden die Verordnungsmöglichkeiten von Cannabis in der Medizin durch das „Gesetz zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften“⁹ erweitert, sodass Patienten nun darüber hinaus auch Medizinal-Cannabisblüten und Cannabisextrakte verordnet werden können.

Neben vielen positiven Effekten der Cannabinoide kann der Konsum jedoch auch zu Angstgefühlen und Paranoia führen. Weiterhin zeigten Studien, dass bei Dosierungen zwischen 40 und 500 µg/kg dosisabhängige Einschränkungen bei Gedächtnis-, Aufmerksamkeits- und Reaktionszeittests, sowie Beeinträchtigung motorischer Fähigkeiten nachgewiesen werden können^{10,11}.

Die Frage nach der detaillierten Wirkweise von Cannabinoiden auf den Menschen führte zur Entdeckung und Erforschung des Endocannabinoidsystems sowie spezialisierter Rezeptoren.

1.2 Synthetische Cannabinoide

Synthetische Cannabinoide sind eine große Gruppe von chemischen Substanzen, die wie THC an Cannabinoidrezeptoren binden. Somit werden beim Konsum der Substanzen ähnliche Effekte wie bei dem Konsum von Cannabis hervorgerufen. Viele synthetische Cannabinoide wirken jedoch deutlich potenter als THC und können stärkere und langanhaltende Wirkungen produzieren, die für Cannabis nicht bekannt sind (siehe 1.3.1). Einige der über 160 verschiedenen Substanzen lassen sich zu Untergruppen zusammenfassen und sind teilweise nach den Initialen ihres Entdeckers benannt, JWH nach John W. Huffman und AM nach Alexandros Makriyannis. Andere Substanzgruppen tragen als Namen die Abkürzung ihres Entdeckungsortes, z.B. HU nach der Hebrew University in Jerusalem¹². Weitere Bezeichnungen sind heute oft von dem chemischen Namen der Substanz abgeleitet. Synthetische Cannabinoide wurden Anfang der 2000er Jahre in Europa als Räuchermischungen populär, die als Joint geraucht zu Cannabis ähnlichen Effekten führten¹³. Da diese Produkte als natürliche Kräutermischungen angepriesen wurden, führten diese rapide zu großer Beliebtheit als legale Alternative zu Marihuana („legal highs“). Angeboten wurden diese unter

verschiedensten Namen wie zum Beispiel „Spice“, „K2“, „black mamba“ und viele mehr. Inzwischen fasst man diese Kräutermischungen häufig unter „Spice“ als Oberbegriff zusammen¹⁴. Jahrelang war nicht bekannt, welcher Inhaltsstoff für die Rauscheffekte ursächlich war, bis schließlich 2008 in Frankfurt (THC Pharma) das erste Mal das synthetische Cannabinoid JWH-018 als Bestandteil in der Marke Spice identifiziert wurde¹⁵. Es stellte sich heraus, dass die Kräutermischungen als Pflanzenanteil in der Regel auf Melisse, Minze oder Thymian basierten und das in Aceton oder Methanol gelöste synthetische Cannabinoid auf das Pflanzenmaterial gesprüht wurde.

1.3 JWH-018

Im Rahmen von Forschungen an Cannabinoidrezeptoren wurde 1994 in der Arbeitsgruppe von John W. Huffman unter anderem eine neue Gruppe von cannabimimetischen Indolen hergestellt, die eine ähnliche Aktivität wie traditionelle Cannabinoide zeigten. Dies gilt als die Geburtsstunde der nach den Initialien seines Entdeckers als JWH benannten synthetischen Cannabinoide¹⁶. Eine Substanz der damals hergestellten cannabimimetischen Indole, das 1-Pentyl-3-naphthoylindol, bekam den Namen JWH-018 (chemische Struktur siehe Abbildung 1, zusammen mit den Hauptmetaboliten).

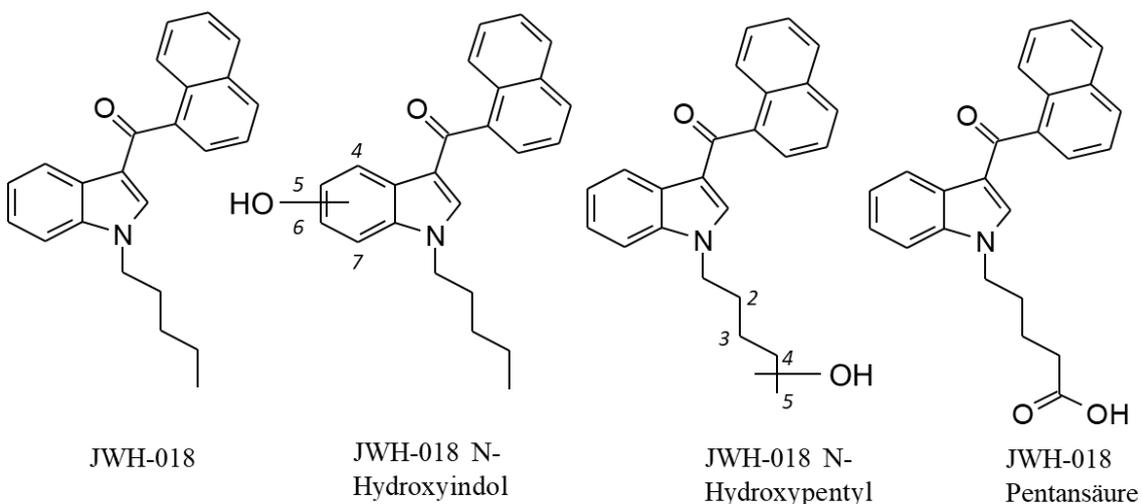


Abbildung 1: Strukturformeln von JWH-018 und seinen Hauptmetaboliten

Durch die Identifizierung als erste psychoaktive Substanz in einem Spice-Produkt wurde JWH-018 zu einem „Klassiker“ unter den synthetischen Cannabinoiden. Darauffolgend konnte JWH-018 allein in Deutschland in mehr als 60 unterschiedlichen Ausführungen der Kräutermischungen nachgewiesen werden¹⁷. Konsumentenbefragungen ergaben als Beweggründe für den Konsum dieser Kräutermischungen, die mit denen von Cannabis vergleichbaren psychoaktiven Effekte, den legalen Erwerb und Konsum sowie fehlende Nachweisbarkeit im Urin bei Standarddrogentests. Weiterhin wurden diese als natürlich und daher ungefährlich angesehen¹⁸.

1.3.1 Toxizität

JWH-018 produziert cannabimimetische Effekte schon in niedrigeren Dosen als THC. Viele der Nebenwirkungen von THC können bei JWH-018 Konsum ebenfalls auftreten und aufgrund seiner Rolle als voller Agonist am Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB1) in höheren Dosierungen auch lebensbedrohlich sein¹⁷. Diese Gefahr ist verstärkt durch die immer unterschiedlichen Mengen an JWH-018 auf den vielen verschiedenen über den Schwarzmarkt verkauften Produkten. Allgemein gibt es bislang nur wenige Informationen zu den Wirkungen und dosisabhängigen Effekten von synthetischen Cannabinoiden. In einem Versuch mit zwei freiwilligen Testpersonen von Teske et al.¹⁹ wurden zum Beispiel Übelkeit, leichte Sedierung und Mundtrockenheit im Anschluss an die Inhalation einer Kräutermischung, die JWH-018 enthielt, berichtet, ebenso wurden Augenbrennen und Gedankenunterbrechungen angegeben. In Fallberichten werden weiterhin Angstgefühle und Herzrasen angegeben²⁰, außerdem ergaben sich einige teils sehr schwerwiegende Herzkreislaufnebenwirkungen. So präsentierte sich ein 45 Jähriger mit ST-Hebungsinfarkt, Subarachnoidalblutung, akuter Rhabdomyolyse und starken Stoffwechsellentgleisungen nach regelmäßigem K2 Konsum²¹. Ein 17 Jähriger beklagte Brustschmerzen, sowie Tachykardie gefolgt von Bradykardie nach JWH-018 und JWH-073 Konsum²². Drei Jugendliche wurden in der Notaufnahme mit Herzinfarktsymptomatik (Brustschmerzen, ST-Streckenhebungen und erhöhten Troponinwerten) im Zusammenhang mit K2 Konsum aufgenommen²³. Neben akuten körperlichen Beeinträchtigungen zeigt ein systematischer Überblick verschiedener publizierter Fallberichte zu synthetischen Cannabinoiden von Castaneto et al.²⁴, dass

auch länger andauernde Psychosen (einschließlich Paranoia, Gedankensprüngen und Suizidüberlegungen), sowie Entzugssymptome bei Abstinenzversuchen nach längerfristiger Einnahme synthetischer Cannabinoide beschrieben wurden. Darüber hinaus erwähnen Castaneto et al. vier Berichte, bei denen schwere Intoxikationen mit synthetischen Cannabinoiden als Todesursache diskutiert werden. Diese vielfältigen Berichte mit JWH-018 als Ursache für eine steigende Anzahl von Einweisungen in Notaufnahmen zeigen die Gefährlichkeit und Lebensbedrohlichkeit der Substanz. Diese gefährlichen Nebenwirkungen stehen deutlich im Gegensatz zum Cannabiskonsum, bei dem keine schweren Intoxikationen und Todesfälle bekannt sind. Eine besondere Schwierigkeit ist die Unberechenbarkeit der körperlichen und geistigen Nebenwirkungen aufgrund unbekannter Dosierungen. Da das synthetische Cannabinoid in den meisten Fällen als nicht sichtbare Lösung auf Pflanzenmaterial gesprüht wurde, kann der Konsument nicht einschätzen, wieviel er überhaupt konsumiert. Die aufgenommene Menge kann von Joint zu Joint stark variieren, ohne dass der Konsument darauf Einfluss nehmen kann. Somit kann ohne kontrollierte Studien keine Aussage dazu getroffen werden, welche Wirkungen und Nebenwirkungen durch eine bestimmte Dosis des synthetischen Cannabinoids hervorgerufen werden.

1.3.2 Gesetzeslage

Im Anschluss an die Entdeckung von JWH-018 als psychoaktive Substanz in diversen Kräutermischungen wurde JWH-018 im Januar 2009 in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz hinzugefügt²⁵. Nachdem JWH-018 als aktiver Bestandteil dieser Produkte zwischenzeitlich vom Markt verschwunden war, wurde es jedoch seit 2012 wieder häufiger in Kräutermischungen nachgewiesen²⁶. Um die Gesetzeslage zu umgehen wurden weitere, in der Struktur leicht veränderte synthetische Cannabinoide hergestellt und dann wieder solange legal verkauft, bis diese auch explizit verboten wurden. Dies führte zu einem Wechselspiel zwischen verzögerter Gesetzgebung und einer immer größer werdenden Diversität im Labor hergestellter cannabimimetisch aktiver Substanzen, um zu dem jeweiligen Zeitpunkt legale Verbindungen auf den Markt zu bringen. Schließlich sind im Dezember 2015 beim European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) 160 verschiedene synthetische Cannabinoide eingetragen gewesen¹². Daraufhin wurden 2016 mit dem Neue-

psychoaktive-Stoffe-Gesetz (NpSG)²⁷ nicht nur einzelne chemische Verbindungen, sondern ganze Stoffklassen erfasst. Laut NpSG sind aktuell Herstellung und Handel mit neuen psychoaktiven Stoffen verboten, ausgenommen wissenschaftliche oder industrielle Zwecke.

1.4 Problemstellung

Obwohl die Entdeckung von JWH-018 als Rauschmittel nun schon einige Jahre zurückliegt wurden bislang, aufgrund der bereits beschriebenen vielfältigen und schwerwiegenden Nebenwirkungen, keine kontrollierten Studien zur Erforschung der pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften am Menschen durchgeführt. Wissenschaftliche Daten stützten sich bislang auf Fallberichte und wenige Selbstexperimente. Nun wurde zu dem synthetischen Cannabinoid JWH-018 erstmals im klinischen Setting unter kontrollierten Bedingungen an der Universität Maastricht (Niederlande) eine Pilotstudie mit sechs Probanden durchgeführt. Ziele dieser Studie waren zum einen die Erfassung des Sicherheitsprofils und der Nebenwirkungen der Substanz, sowie die Untersuchung der Auswirkungen von JWH-018 auf kognitive und motorische Fähigkeiten. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Bestimmung der pharmakokinetischen Eigenschaften und des Metabolismus von JWH-018. So sollte untersucht werden, wie schnell JWH-018 im Blut anflutet, wann die Maximalkonzentration erreicht wird und wie schnell die Substanz wieder abgebaut wird. Insbesondere sollte nachgewiesen werden, welche Metaboliten beim Konsum von JWH-018, insbesondere im Urin entstehen, und wie lange diese nach dem Konsum nachzuweisen sind. Im Hinblick auf forensische Fragestellungen war es außerdem wichtig Daten zu erheben, inwieweit Urin- und Speichelproben zur Feststellung vorangegangenen JWH-018 Konsums dienen und wie empfindlich die Analysemethoden für einen erfolgreichen Nachweis sein müssen. Zu diesem Zwecke wurden in regelmäßigen Abständen entnommene Serum-, Urin- und Speichelproben analysiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Referenzsubstanzen

Tabelle 1: Referenzsubstanzen

Referenzsubstanz	Hersteller
JWH-018	Lipomed AG (Arlesheim, Schweiz)
JWH-018 N-(2-Hydroxypentyl) Metabolit (2-HOpentyl-JWH-018)	
JWH-018 N-(3-Hydroxypentyl) Metabolit (3-HOpentyl-JWH-018)	
JWH-018 N-(4-Hydroxypentyl) Metabolit (4-HOpentyl-JWH-018)	
JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit (5-HOpentyl-JWH-018)	Cayman Chemical Company (Ann Arbor, USA)
JWH-018 4- Hydroxyindol Metabolit (4-HOindol-JWH-018)	
JWH-018 5- Hydroxyindol Metabolit (5-HOindol-JWH-018)	
JWH-018 6-Hydroxyindol Metabolit (6-HOindol-JWH-018)	
JWH-018 7-Hydroxyindol Metabolit (7-HOindol-JWH-018)	
JWH-018 N-Pentansäure Metabolit (JWH-018 Pentansäure)	
JWH-073 Butansäure Metabolit (JWH-073 Butansäure)	
JWH-018-d ₁₁	
JWH-018 N-(5-Hydroxypentyl) Metabolit-d ₅ (5-HOpentyl-JWH-018-d ₅)	
JWH-018 4-Hydroxyindol Metabolit-d ₉ (4-HOindol-JWH-018-d ₉)	
JWH-018 Pentansäure Metabolit-d ₄ (JWH-018 Pentansäure-d ₄)	

2.2 Chemikalien

Acetonitril wurde von der Karl Roth GmbH aus Karlsruhe bezogen und hatte HPLC Qualität (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. high performance liquid chromatography). Das Wasser wurde von LGC Promochem (Wesel) erworben und entsprach, wie alle weiteren Chemikalien und Lösungsmittel (u.a. Methanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Butylmethylether, N-Hexan, Ethylacetat, Abalone beta-Glukuronidase) die von Sigma-Aldrich (München) bezogen wurden, analytischem oder HPLC Standard. Drogenfreier Speichel und Urin wurde vom Laborpersonal bereitgestellt. Serum stellte die Blutbank der Uniklinik Frankfurt bereit und wurde auf die Abwesenheit von Drogen und Medikamenten hin getestet.

2.3 Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS)

Alle Analysen wurden mittels Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (engl. liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) durchgeführt. Dies ist ein analytisches Verfahren, bei dem die Chromatographie zur Auftrennung der Analyten aus einem flüssigen Gemisch dient und durch die anschließende Massenspektrometrie eine Identifikation anhand charakteristischer Fragmente stattfindet. Der im nachfolgenden beschriebene Aufbau und die analytischen Parameter gelten für alle in dieser Studie analysierten Proben. Lediglich das Injektionsvolumen wurde je nach Untersuchungsmaterial variiert.

Das LC-MS/MS System von Agilent (Waldbronn) besteht aus einer 1290 Infinity LC, die mittels JetStream Electrospray Interface (ESI) an ein 6460 Triple Quadrupole Massenspektrometer (MS/MS) gekoppelt ist. Nach Injektion des Extraktes (Serum 3 μL , Urin 1 μL und Speichel 10 μL) wurden die Analyten bei 50°C auf einer Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 100 mm, 2.7 μm LC Säule getrennt. Die mobile Phase bestand zum einen aus Wasser mit 5 mM Ammoniumformat und 0,01 % Ameisensäure (A) und zum anderen aus Acetonitril mit 0,01 % Ameisensäure (B). Das Elutionsprogramm begann mit einem Anteil B von 55 % bei einer Flussrate von 0,7 ml/min. Innerhalb von vier Minuten stieg der Anteil auf 65 %, dann in zwei Minuten

auf 70 %, in 0,5 Minuten auf 75 %, weiteren 1,5 Minuten auf 85 % und anschließend auf 90 % Anteil der B Lösung, die für eine Minute gehalten wurde. Die Reäquilibration dauerte zwei Minuten.

Die Elektrosprayparameter waren wie folgt: Gasfluss 13 L/min (350°C); Vernebler 60 psi; Mantelgasfluss 12 L/min (350 °C); Kapillarspannung 3500 V. Das MS/MS wurde im Multiple Reaction Monitoring (MRM) mit einem Übergang für interne Standards und zwei Übergängen für jeden Analyten betrieben (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Parameter für die Identifikation der Analyten* (*CE = Collision Energy, Kollisionsenergie*).

Analyten in Zeitsegment 1 (Start 0,2 min)	Prekursor [m/z]	Quantifier [m/z] (CE [V])	Qualifier[m/z] (CE [V])
JWH-018 Pentansäure-d ₄	376.2	155 (20)	
JWH-018 Pentansäure	372.2	155 (20)	127 (52)
JWH-073 Butansäure	358.1	155 (20)	127 (48)
5-HOpentyl-JWH- 018-d ₅	363.2	127 (52)	
Alle JWH-018 N- hydroxypentyl Metaboliten	358.2	155 (20)	127 (20)

2.4 Studiendesign der Probandenstudie

Analyten in Zeitsegment 2 (Start 5,5 min)	Prekursor [m/z]	Quantifier [m/z] (CE [V])	Qualifier[m/z] (CE [V])
JWH-018-d ₁₁	353.3	225 (20)	
JWH-018	342.2	155 (20)	127 (48)
4-HOindol-JWH- 018-d ₉	367.2	239 (24)	
Alle JWH-018 Hydroxyindol Metaboliten	358.2	155 (24)	127 (52)

**Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Agilent MassHunter Software (B.07.00). Zur Identifikation wurde eine Zeitabweichung von $\pm 0,1$ min zur erwarteten Retentionszeit im Vergleich zu den Kalibratoren toleriert, sowie ein Quantifier/Qualifier Verhältnis innerhalb von 20 % des Verhältnisses der gemessenen Kalibratoren.*

2.4 Studiendesign der Probandenstudie

Alle authentischen Proben stammen aus der in Maastricht durchgeführten, kontrollierten Studie zum Konsum von JWH-018. Die Studie wurde vom “Medical Ethics Committee of the Maastricht University” genehmigt und jeder Teilnehmer hat eine schriftliche Einverständniserklärung unterzeichnet. Das Probandenkollektiv bestand aus zwei Männern und vier Frauen (Altersdurchschnitt 23,5 Jahre), die regelmäßig Cannabis konsumierten. An jeweils drei verschiedenen Versuchstagen wurde entweder eine 2 mg oder 3 mg Dosis JWH-018 oder ein Plazebo inhaliert. Um den Sicherheitsauflagen der Ethikkommission gerecht zu werden, wurde die höhere Dosis erst verabreicht, nachdem die niedrigere von allen Probanden gut vertragen wurde.

Die Aufnahme von JWH-018 erfolgte mittels einer 10 cm langen Glaspfeife, in welcher JWH-018 Pulver mit einer kleinen Menge getrocknetem Pflanzenmaterial erhitzt wurde.

Dabei wurde ein Plastikschauch an die Pfeife angeschlossen und, während die Luftlöcher der Pfeife zugehalten wurden, wurde diese 15 Sekunden lang erhitzt. Der Proband hat den so entstandenen Rauch mit einem tiefen Atemzug komplett eingeatmet. An jedem Versuchstag wurden von den Probanden einmal vor Substanzapplikation (Baselineproben), sowie danach über 12 Stunden hinweg regelmäßig Serum-, Urin- und Speichelproben abgegeben. An jedem Versuchstag wurden 14 Serum- und Speichelproben und mindestens fünf Urinproben (vgl. Tabelle 3) entnommen. Die Speichelproben wurden dabei mithilfe des Quantisal™ Collection Device (Immunoanalysis Corp., CA, USA, erhalten von Mahsan Diagnostika GmbH, Reinbek) gewonnen. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

Tabelle 3: Zeitschema Serum-, Speichel- und Urinprobenentnahme

Probennummer	Zeit zu T0 (Baseline)	
	Serum-/ Speichel	Urin
1 /Baseline	0:00	0:00
2	0:05	1:00
3	0:15	4:00
4	0:30	12:00
5	0:45	
6	1:00	
7	1:30	
8	2:00	
9	3:00	
10	4:00	
11	6:00	
12	8:00	
13	10:00	
14	12:00	

2.5 Bestimmung von JWH-018 und seinen Metaboliten im Serum

2.5.1 Probenvorbereitung und Extraktionsverfahren

In ein 5 ml Eppendorfgefäß wurden 0,5 ml Serum und 1 ml Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7) vorgelegt. Dann wurden 50 µL der internen Standardlösung pipettiert. Dies ist eine Lösung von 0,02 ng/µL JWH-018-d₁₁, 5-HOpentyl-JWH-018-d₅, 4-HOindol-JWH-018-d₉ und JWH-018 Pentansäure-d₄ in Methanol. Dazu kamen 3 ml eines Tert-Butylmethylether/N-Hexan/Ethylacetat Gemisches mit dem Verhältnis 45:45:10. Die Proben wurden dann zwei Minuten lang gerüttelt, bei 13000 x g für sieben Minuten zentrifugiert und der flüssige Überstand anschließend in ein silanisiertes Reagenzglas übertragen. Bei 25 °C wurden die Proben bis zur Trockne verdampft. Zur Analyse wurde der getrocknete Rückstand mit 50 µL Acetonitril/Methanol/Wasser (6:6:4) rekonstituiert.

2.5.2 Kalibratoren und Qualitätskontrollproben

Die Kalibratoren wurden mit 0,5 ml Leerserum und Zugabe von auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnten Standardlösungen, die JWH-018, 2-HOpentyl-JWH-018, 3-HOpentyl-JWH-018, 4-HOpentyl-JWH-018, 5-HOpentyl-JWH-018, 4-HOindol-JWH-018, 5-HOindol-JWH-018, 6-HOindol-JWH-018, 7-HOindol-JWH-018 und JWH-018 Pentansäure enthielten, hergestellt. Die Konzentrationen der Kalibratoren betragen 0,005, 0,025, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5 und 10 ng/ml. Auf die gleiche Weise wurden drei Qualitätskontrollproben (QC) hergestellt. Die Konzentrationen von niedriger, mittlerer und hoher QC waren 0,5, 5 und 10 ng/ml. Kalibratoren und Qualitätskontrollproben wurden wie oben beschrieben extrahiert und analysiert.

2.5.3 Validierung

Die Validierung erfolgte nach aktuellen Richtlinien²⁸. Für die statistische Auswertung wurde die Valistat 2.0 Software (Arvecon GmbH, Walldorf) genutzt. Die Selektivität

wurde mit zehn Leerseren unterschiedlicher Spender untersucht, die mit und ohne Zugabe von internen Standards analysiert wurden (Blank- und Nullproben). Interferenzen durch andere Substanzen wurden untersucht durch Analyse von Serumproben, die mit 57 häufigen Drogen, Medikamenten und deren Metaboliten aufgestockt wurden. Die Linearität der Kalibration wurde durch sechs Kalibratoren mit Konzentrationen von 0,01 bis 10,0 ng/ml, die jeweils sechsmal hintereinander gemessen wurden, erfasst. Die Sensitivität der Methode wurde durch die Bestimmung von Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und Bestimmungsgrenze (Lower limit of quantification, LLOQ) evaluiert. LOD und LLOQ wurden rechnerisch bestimmt nach den Richtlinien des Deutschen Instituts für Normung (DIN 32645, vgl. Kolb et al.²⁹). Dabei wurden Daten von sieben Konzentrationen aus unterschiedlichen Kalibrationsserien mit Konzentrationen von 0,00025 bis 0,5 ng/ml berücksichtigt. Zur Untersuchung der Präzision und Genauigkeit wurden Qualitätskontrollen in drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch) angesetzt und jeweils zwei QC jeder Konzentration an acht verschiedenen Tagen gemessen. Aus diesen Daten wurden mittlere Konzentration, relative Standardabweichung (Variationskoeffizient, CV) und systematischer Fehler (Abweichung von Messergebnis und Sollwert, Bias) bestimmt und dabei ein Variationskoeffizient und Bias unter 15 % als akzeptabel betrachtet. Matrixeffekte und Wiederfindung wurden mit zwei Konzentrationen (0,5 und 2,5 ng/ml) nach Matuszewski et al.³⁰ überprüft. Die Stabilität der aufgearbeiteten Proben auf dem Autosampler wurde getestet mit Messungen von zwei QC Proben (0,5 und 10 ng/ml) sechsmal alle 12 Stunden. Tests zur Langzeitstabilität und Einfrier-/Auftaustabilität wurden nicht durchgeführt, da bereits für diverse synthetische Cannabinoide die Stabilität bei Gefrierlagerung gezeigt werden konnte^{31,32}.

2.6 Bestimmung von JWH-018 und seinen Metaboliten im Urin

2.6.1 Probenvorbereitung und Extraktionsverfahren

Bei der Urinanalyse wurden alle Urinproben einmal mit und einmal ohne Konjugatspaltung analysiert. Dazu wurden jeweils 0,5 ml Urin und 50 µl der internen Standardlösung in ein Glasgefäß pipettiert. Die Standardlösung bestand aus Methanol

mit 0,02 ng/µl JWH-018-d₁₁, 5-HOpentyl-JWH-018-d₅, 4-HOindol-JWH-018-d₉ und JWH-018 Pentansäure-d₄. Weiterhin wurden 20 µl einer 2 M Essigsäure hinzugefügt um einen pH-Wert von 4 zu erreichen. Bei den Proben mit Konjugatspaltung wurde diese durchgeführt auf Grundlage der Methoden von Malik-Wolf et al.³³ und Scheidweiler et al.³⁴. Dafür wurden 15 µl der Abalone entrails Beta-Glukuronidase (flüssige Lösung, ≥100,000 Units/ml; Hersteller Sigma-Aldrich, München) pipettiert und die Proben für zwei Stunden bei 60 °C inkubiert. Bei den Proben ohne Konjugatspaltung wurde entsprechend keine Beta-Glukuronidase hinzugefügt, davon abgesehen wurden alle Proben gleich behandelt. Die Extraktion der vorbehandelten Proben erfolgte nach Zugabe von 1 ml 0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat (pH 7) und 3 ml eines Tert-Butylmethylether/N-Hexan/Ethylacetat Gemisches mit dem Verhältnis 45:45:10. Die Proben wurden dann zwei Minuten lang gerüttelt, bei 13000 x g für sieben Minuten zentrifugiert und der flüssige Überstand anschließend in ein silanisiertes Reagenzglas übertragen. Bei 25 °C wurden die Proben bis zur Trockne verdampft. Zur Analyse wurde der getrocknete Rückstand mit 100 µl Acetonitril/Methanol/Wasser (6:6:4) rekonstituiert.

2.6.2 Kalibratoren und Qualitätskontrollproben

Die Kalibratoren wurden mit 0,5 ml Leerurin und Zugabe von auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnten Standardlösungen, die JWH-018, 2-HOpentyl-JWH-018, 3-HOpentyl-JWH-018, 4-HOpentyl-JWH-018, 5-HOpentyl-JWH-018, 4-HOindol-JWH-018, 5-HOindol-JWH-018, 6-HOindol-JWH-018, 7-HOindol-JWH-018 und JWH-018 Pentansäure sowie JWH-073 Butansäure enthielten, vorbereitet. Die Konzentrationen der Kalibratoren betragen 0,1, 1, 10, 100 und 1.000 ng/ml. Auf die gleiche Weise wurden drei Qualitätskontrollproben hergestellt. Die Konzentrationen von niedriger, mittlerer und hoher QC waren 1, 5 und 30 ng/ml. Kalibratoren und Qualitätskontrollproben wurden wie oben beschrieben extrahiert und analysiert.

2.6.3 Validierung

Die Validierung erfolgte wie bereits in 2.5.3 beschrieben und wurde mit Konjugatspaltung durchgeführt. Abweichend waren lediglich die Konzentrationen der

Kalibratoren zur Feststellung der Linearität (0,1 bis 1.000 ng/ml), Bestimmungs- und Nachweisgrenze (je sieben Konzentrationen aus unterschiedlichen Kalibrationsserien mit Konzentrationen von 0,003 bis 0,05 ng/ml) sowie Matrixeffekte und Wiederfindung (5 und 30 ng/ml). Für die Stabilität der aufgearbeiteten Proben auf dem Autosampler wurden sechsmal alle 12 Stunden zwei QC Proben (5 und 30 ng/ml) gemessen.

2.7 Bestimmung von JWH-018 und seinen Metaboliten im Speichel

2.7.1 Speichelprobenentnahme

Die Speichelgewinnung erfolgte mithilfe des Quantisal Collection Pads. Dieses behielten die Probanden jeweils solange im Mund, bis dessen Indikator sich blau verfärbte und damit anzeigte, dass 1 ml ($\pm 10\%$)³⁵ Speichel gewonnen wurde. Das Pad wurde dann in die 3 ml der dafür vorgesehenen blauen Stabilisierungslösung eingeführt, sodass eine vierfache Verdünnung entstand. Die Proben wurden so für zwei Minuten bei 2000 x g zentrifugiert, wobei sich das Pad meist schon von dem Kollektorstab löste. Das Pad wurde dann mithilfe eines Serumfilters ("Filter sampler, 16mmx4" (Porex Technologies, Fairburn, USA, erhalten von Mahsan Diagnostika GmbH, Reinbek)) feste ausgedrückt. Die verbliebene, verdünnte Speichelflüssigkeit wurde in ein Glasgefäß gefüllt und bis zur Analyse bei -18 °C gelagert.

2.7.2 Probenvorbereitung

Zu 100 µl der verdünnten Speichelflüssigkeit wurden 50 µl interne Standardlösung pipettiert. Dies war eine Lösung bestehend aus 0,001 ng/µl JWH-018-d₁₁, 5-HOpentyl-JWH-018-d₅, 4-HOindol-JWH-018-d₉ und JWH-018 Pentansäure-d₄ in Methanol. Zusätzlich wurden 50 µl Methanol hinzugefügt. Nach je zwei Minuten Mischen und Zentrifugation bei 13.000 x g wurden 100 µl für die Analyse in Autosampler Vials übertragen.

2.7.3 Kalibratoren und Qualitätskontrollproben

Die Kalibratoren wurden hergestellt aus 100 µl Leerspeichel, der zuvor mit der Quantisal Stabilisierungslösung vierfach verdünnt wurde. Dazu wurden wie bei den authentischen Proben 50 µl interne Standardlösung pipettiert und zusätzlich 50 µl von auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnten Standardlösungen, die JWH-018, 2-HOpentyl-JWH-018, 3-HOpentyl-JWH-018, 4-HOpentyl-JWH-018, 5-HOpentyl-JWH-018, 4-HOindol-JWH-018, 5-HOindol-JWH-018, 6-HOindol-JWH-018, 7-HOindol-JWH-018 und JWH-018 Pentansäure sowie JWH-073 Butansäure enthielten. Die Konzentrationen der Kalibratoren betragen 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 50 und 100 ng/ml reinen, unverdünnten Speichels. Auf die gleiche Weise wurden drei Qualitätskontrollproben (QC) hergestellt. Die Konzentrationen von niedriger, mittlerer und hoher QC sind 1, 5 und 10 ng/ml.

2.7.4 Validierung

Die Validierung erfolgte wie bereits in 2.5.3 beschrieben. Abweichend waren lediglich die Konzentrationen der Kalibratoren zur Feststellung der Linearität (0,1 bis 100 ng/ml), Nachweis- und Bestimmungsgrenze (sechs Kalibratoren mit Konzentrationen von 0,04 bis 0,4 ng/ml), Autosamplerstabilität (1 und 10 ng/ml). Die Matrixeffekte wurden durch Vergleich der Peakflächen von je sechs Kalibratoren, die entweder verdünnte Speichelflüssigkeit oder Wasser enthielten, mit zwei Konzentrationen (1 und 10 ng/ml) überprüft. Zur Beurteilung der Wiederfindung von JWH-018 und seinen Metaboliten bei Nutzung des Quantisal Collection Systems wurden zwei Pools angesetzt, bei denen Leerspeichel mit 0,5 oder 10 ng/ml Referenzsubstanzen aufgestockt wurde. Dann wurden nacheinander je fünf Collection Pads in den Behälter mit dem vorbereiteten Speichel gehalten bis sich der Indikator blau färbte, also 1 ml Speichel aufgenommen wurde. Jedes Pad wurde dann in die 3 ml Stabilisierungspuffer eingeführt. Nach Gefrierlagerung bei -18 °C für zwei Monate wurden die Proben wie oben beschrieben analysiert.

2.8 Untersuchung der Glaspfeifen auf Rückstände von JWH-018

Alle 12 in der Studie genutzten Glaspfeifen wurden auf Rückstände von JWH-018 hin untersucht. Dazu wurde das Loch am Pfeifenkolben mit Parafilm abgeklebt, die Pfeife mit 4 ml Methanol befüllt und gut geschüttelt. Die Lösung wurde in ein Reagenzglas dekantiert und 1:10.000 mit Methanol verdünnt. Aus der Verdünnung wurden 50 µl mit 50 µl interne Standardlösung gemischt. Kalibratoren wurden hergestellt mit je 50 µl interner Standardlösung und 50 µl entsprechender Standardlösung, sodass Konzentrationen zwischen 0,4 µg bis 4 mg pro 4 ml erreicht wurden. Aliquote von 1 µl wurden analysiert.

2.9 Pharmakokinetische Auswertung

Die quantitative Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2016, nach bereits publizierten Vorgehensweisen^{36,37}. Dabei wurde zunächst für jede Matrix (Serum, Urin und Speichel) für alle Probanden und alle Analyten die Maximalkonzentration (c_{\max}), mit dem zugehörigen Zeitpunkt, an dem die Maximalkonzentration erreicht wurde (t_{\max}) ausgewertet. Weiterhin wurden eine logarithmierte Konzentrations-Zeit-Kurven angefertigt. Diese Darstellungen wurden auf das Vorhandensein linearer Phasen geprüft. Dabei wurde davon ausgegangen, dass jede lineare Phase einen Umverteilungs- oder Ausscheidungsprozess anzeigt. Die den jeweiligen Phasen zugehörigen Halbwertszeiten ($t_{1/2}$), also die Zeitspanne, in der sich die Konzentration eines Analyten um die Hälfte verringert hat, wurden durch Analyse der exponentiellen Regression der Daten bestimmt. Die Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC) wurde mithilfe der Trapezregel für die Ergebnisse im Beobachtungszeitraum von 12 Stunden angenähert und beschreibt den Anteil der Substanz, der insgesamt die jeweilige Matrix (z.B. Serum) erreicht hat. Als weiterer Auswertungsparameter wurde das Verhältnis aus den Konzentrationen der Speichelproben zu den entsprechenden Serumproben bestimmt, um einen möglichen prädiktiven Wert von der Speichelkonzentration auf die zum Zeitpunkt der Probenentnahme vorliegende Serumkonzentration von JWH-018 zu erkennen. Bei der Analyse der Urinproben wurden alle Proben zusätzlich einer enzymatischen

Konjugatspaltung unterzogen. Der konjugierte Urinanteil entspricht dabei der Analytenkonzentration in den enzymatisch behandelten Proben (konjugiert vorliegende Analyte), dividiert durch die Konzentration der zugehörigen Probe ohne Konjugatspaltung (nicht konjugierte Analyte), angegeben in Prozent.

3 ERGEBNISSE

3.1 Serumanalyse

3.1.1 Validierung

Die Validierung erfolgte für eine LC/MS-MS Methode zur Bestimmung von JWH-018 und neun bekannten Metaboliten mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Serumproben. Die Messzeit betrug 11 Minuten von Probe zu Probe. Es wurden keine störenden Signale von endogenen Komponenten oder anderen typischen Fremdstoffen beobachtet. Es konnten keine Matrixeffekte festgestellt werden. Die chromatographische Differenzierung der acht hydroxylierten Stereoisomere von JWH-018 mit gleichen Qualifier- und Quantifizierübergängen (*D* in Abbildung 4) bereitete initial insbesondere für 4- und 5-HOpentyl-JWH-018 Schwierigkeiten. Durch die Optimierung des Gradienten für die Laufmittel konnte jedoch eine gute Trennung erreicht werden. Die Validierungsergebnisse (Tabelle 4) waren alle innerhalb des Akzeptanzbereichs. Die Extraktionsausbeute für JWH-018 und die Metaboliten betrug jeweils über 75 %, mit Ausnahme von JWH-018 Pentansäure, die im Bereich von 40% lag. Die Bestimmungsgrenzen lagen unter 0,1 ng/ml und damit deutlich niedriger als bei bislang publizierten Arbeiten^{38-40,31,19,41}. Die Kalibrationskurven zeigten sich bis 10 ng/ml linear. Die relativen Standardabweichungen bei Wiederhol- und Laborpräzision lagen bei unter 13 %, größtenteils sogar unter 6 %. Die Genauigkeit konnte mit relativen Standardabweichungen von unter 9 % ermittelt werden. Die Stabilität aufgearbeiteter Proben war über 72 Stunden hinweg gegeben, Abweichungen betrugen unter 25 % der Anfangskonzentration. Somit zeigte sich diese Analysemethode für die quantitative Analyse von JWH-018 und neun seiner Metaboliten im Serum zuverlässig.

Tabelle 4: Validierungsergebnisse für JWH-018 und seine Metaboliten im Serum

Substanz	LLOQ (LOD) [ng/ml]	QC [ng/ml]	Wiederhol- präzision [%]	Labor- präzision [%]	Genauig- keit [%]	Wieder- findung [%]	72h Stabilität [Ab- nahme%]
<i>JWH-018</i>	0,001 (0,001)	0,5	10,8	3,0	-3,5	88,0	18
		2,5				85,3	
		5	2,3	2,3	4,9		
		10	6,6	5,6	1,6		17
<i>JWH-018</i> <i>N</i> -(2- <i>hydroxy-</i> <i>pentyl</i>)	0,010 (0,004)	0,5	11,0	4,4	4,6	99,0	20
		2,5				98,6	
		5	6,1	3,0	5,5		
		10	6,6	6,5	5,7		21
<i>JWH-018</i> <i>N</i> -(3- <i>hydroxy-</i> <i>pentyl</i>)	0,007 (0,004)	0,5	11,8	8,0	4,6	87,1	14
		2,5				85,9	
		5	8,2	6,0	4,5		
		10	5,6	5,2	6,4		18
<i>JWH-018</i> <i>N</i> -(4- <i>hydroxy-</i> <i>pentyl</i>)	0,011 (0,003)	0,5	3,6	6,4	7,0	81,8	19
		2,5				81,3	
		5	6,8	4,1	3,4		
		10	8,6	5,4	3,7		19
<i>JWH-018</i> <i>N</i> -(5- <i>hydroxy-</i> <i>pentyl</i>)	0,015 (0,005)	0,5	12,3	3,2	3,3	99,6	16
		2,5				105,9	
		5	4,5	2,6	7,4		
		10	5,7	5,3	7,0		21
<i>JWH-018</i> <i>N</i> -(4- <i>hydroxy-</i> <i>indol</i>)	0,081 (0,014)	0,5	9,8	2,5	1,3	103,6	22
		2,5				105,8	
		5	7,4	2,1	-0,1		
		10	6,9	6,6	-4,7		22

Substanz	LLOQ (LOD) [ng/ml]	QC [ng/ ml]	Wieder- hol- präzision [%]	Labor- präzision [%]	Genauig- keit [%]	Wieder- findung [%]	72h Stabilität [Ab- nahme%]
<i>JWH-018</i>		0,5	12,1	4,7	1,1	83,1	15
<i>N-(5- hydroxy- indol)</i>	0,116 (0,037)	2,5				79,8	
		5	8,1	4,6	-5,4		
		10	5,2	5,1	5,0		24
<i>JWH-018</i>		0,5	8,4	6,3	-4,3	79,4	18
<i>N-(6- hydroxy- indol)</i>	0,064 (0,006)	2,5				80,6	
		5	7,4	3,4	-5,6		
		10	5,1	4,7	5,0		19
<i>JWH-018</i>		0,5	11,8	8,6	-5,9	113,9	24
<i>N-(7- hydroxy- indol)</i>	0,002 (0,000)	2,5				125,3	
		5	9,4	4,5	-1,7		
		10	8,1	3,8	3,3		24
<i>JWH-018</i>		0,5	8,3	4,1	-8,9	38,2	12
<i>N- Pentan- säure</i>	0,008 (0,005)	2,5				41,6	
		5	5,2	3,1	7,5		
		10	4,4	3,7	5,9		17

3.1.2 Pharmakokinetik von JWH-018 im Serum

Die Konzentrations-Zeit-Kurven entsprachen weder einem Ein- noch einem Zweikompartimentmodell (getestet mit dem PKsolver von Zhang et al.⁴²). Ausgehend von der logarithmierten Konzentrations-Zeit-Kurve waren über die Dauer von 12 Stunden drei Distributions- bzw. Eliminierungsphasen zu unterscheiden (siehe Abbildung 2 mit einem typischen Profil).

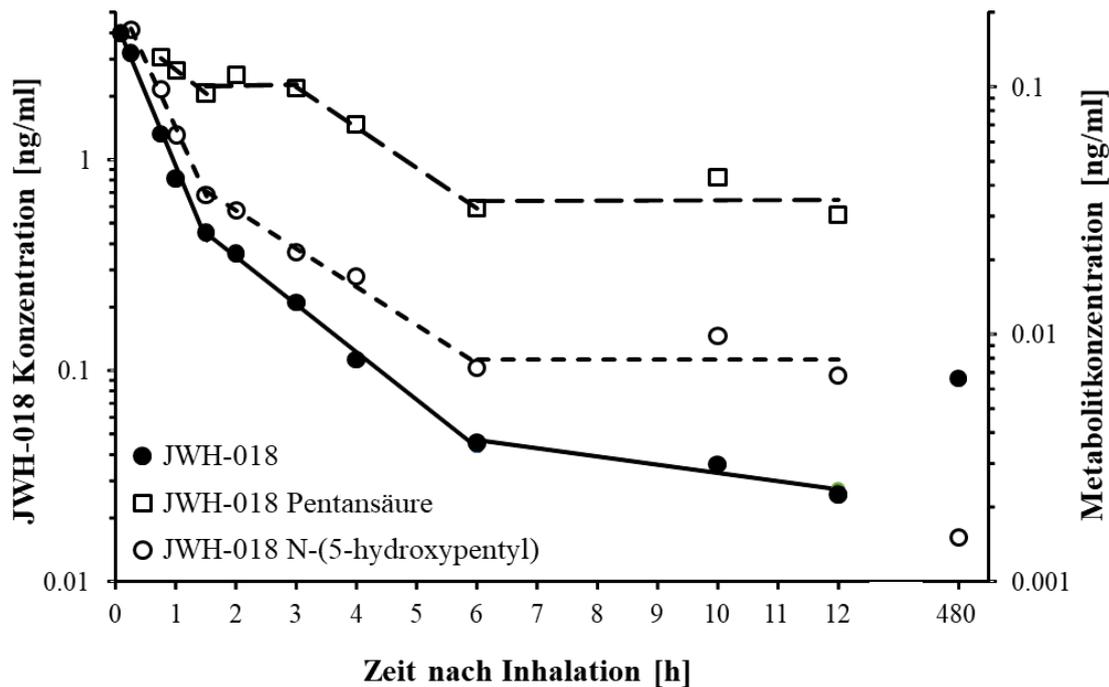


Abbildung 2: Typische Konzentrations-Zeit-Kurve (Proband #7 nach Inhalation von 2 mg JWH-018, extrahierte Ionenchromatogramme in Abbildungen 3 bis 8) von JWH-018 und den Metaboliten 5-HOpentyl-JWH-018 und JWH-018 Pentansäure in logarithmischer Skala (Konzentrationen von JWH-018 linke y-Achse, Konzentrationen der Metaboliten rechte y-Achse). Die Linien zeigen die Ergebnisse der exponentiellen Regressionsanalyse in unterschiedlichen Distributions-/Eliminierungsphasen. Die Konzentrationen von JWH-018 und 5-HOpentyl-JWH-018 in den Baselineproben vor Inhalation der 3 mg Dosis, 2,9 Wochen (480 Stunden) nach Konsum der 2 mg Dosis, sind ebenfalls dargestellt (vgl. Abbildung 8).

Dabei ist nach Erreichen der Maximalkonzentration (C_{\max}) zunächst ein starker Konzentrationsabfall infolge von Umverteilungsvorgängen (Distributionsphase) kennzeichnend, gefolgt von einer intermediären β -Phase und schließlich eine länger andauernde Ausscheidungsphase (γ -Phase). Mithilfe separater Regressionsanalysen wurden die Halbwertszeiten für die Distributions- ($t_{1/2 \text{ Distribution}}$) sowie für die beta- ($t_{1/2 \text{ beta}}$) und gamma-Eliminierungsphasen ($t_{1/2 \text{ gamma}}$) bestimmt (vgl. Tabelle 5). Die Maximalkonzentration von der Muttersubstanz JWH-018 wurde in den Blutproben bereits fünf Minuten nach Inhalation gemessen. Die Werte von C_{\max} lagen in einem

Bereich um 5 ng/ml, mit Ausnahme von einem Probanden, bei dem ca. 10 ng/ml JWH-018 detektiert wurden. Die Konzentrationen zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen der 2 mg und der 3 mg Dosis (gepaarter t-Test). Bereits drei Stunden nach Aufnahme der Substanz lagen die Serumkonzentrationen in 10 von 12 Fällen in einem Bereich von 0,2 ng/ml. Zu Beginn der gamma-Phase, im Median nach sechs Stunden (t_{gamma}), betrug alle Werte maximal 0,2 ng/ml (C_{gamma} , vgl. Tabelle 5). Es konnte für keinen pharmakokinetischen Parameter signifikante Unterschiede zwischen der 2 mg und der 3 mg Dosis beschrieben werden (gepaarter t-Test).

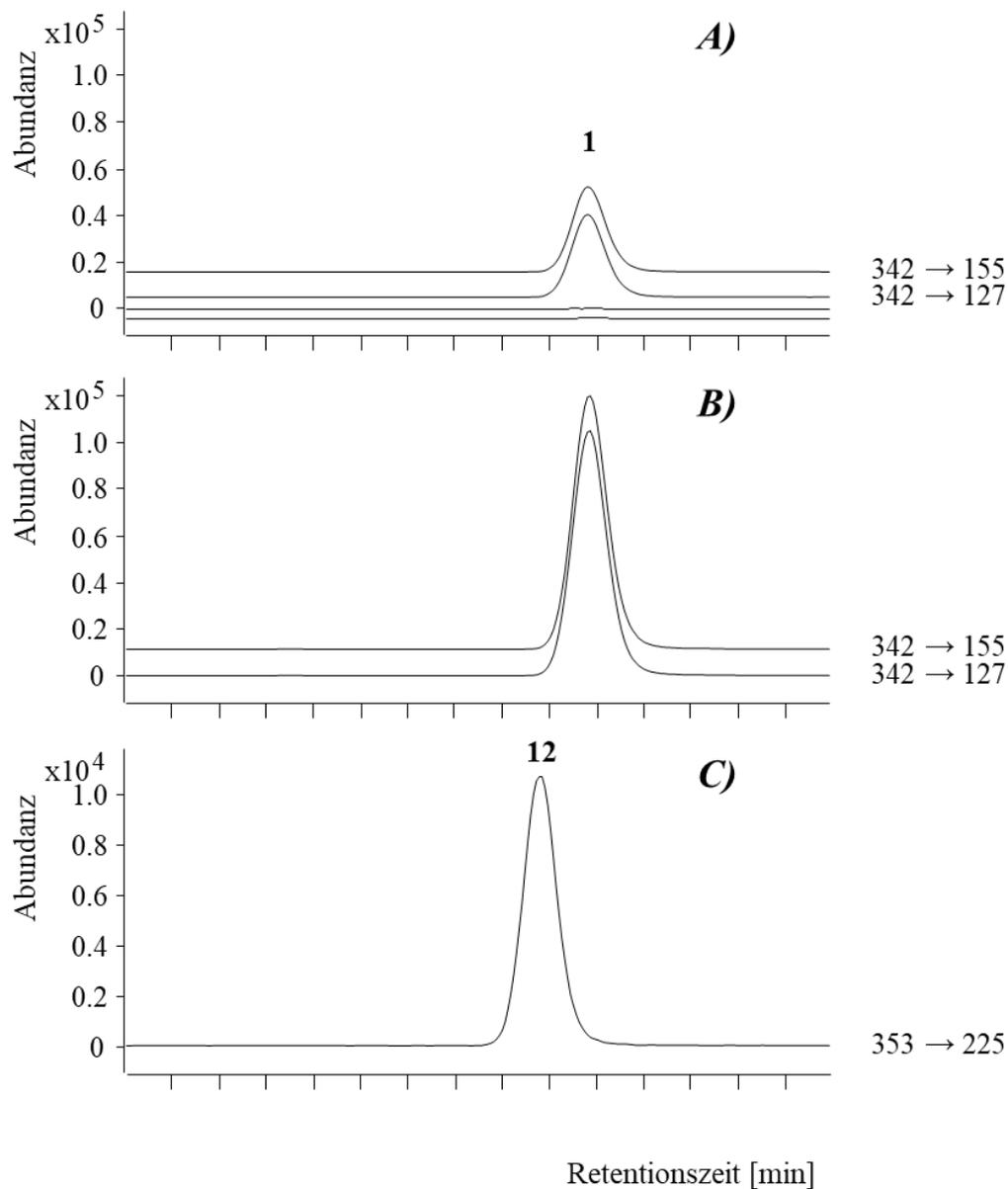


Abbildung 3: Extrahierte Ionenchromatogramme von Quantifier und Qualifier MRMs von Kalibrator (**A**: 1 ng/ml JWH-018), sowie einer Blankprobe mit internem Standard (**C**: Serumprobe von Proband #7 vor Inhalation der 2 mg Dosis). In identischer Skalierung verglichen mit den Kalibratorkonzentrationen stellt **B** ein typisches Chromatogramm einer Serumprobe 15 min nach JWH-018 Konsum dar (Proband #7, vgl. Abbildung 2 und 4 bis 8). Dargestellt sind: JWH-018 (**A1**, **B1**) und JWH-018-d₁₁ (**C12**).

Tabelle 5: Pharmakokinetische Eigenschaften* von JWH-018 und seinen Metaboliten im Serum von 6 Probanden nach Inhalation von 2 oder 3 mg JWH-018 (Teil 1). Alle Daten sind als Median und Bereich (in Klammern) angegeben.

<i>Substanz</i>	t_{\max} [h]	C_{\max} [ng/ml]	$t_{1/2}$ distribution [h]	t_{β} [h]	$t_{1/2}$ beta [h]
2 mg Dosis					
<i>JWH-018</i>	0,08 (0,08- 0,08)	5,01 (3,53- 9,91)	0,40 (0,11- 0,74)	1,25 (0,50- 2,0)	1,26 (0,70- 1,37)
<i>JWH-018 Pentansäure</i>	0,88 (0,25- 1,00)	0,17 (0,10- 0,29)	1,23 (0,87- 1,66)	3,0 (2,0- 3,0)	2,83 (1,81- 3,84)
<i>5-HOpentyl- JWH-018</i>	0,25 (0,25- 0,75)	0,16 (0,11- 0,37)	0,61 (0,46- 0,82)	1,75 (1,50- 3,0)	2,42 (1,96- 5,37)
<i>4-HOpentyl- JWH-018</i>	0,25 (0,25- 0,75)	0,19 (0,10- 0,40)	0,72 (0,50- 1,00)	1,75 (1,0- 3,0)	2,74 (2,13- 3,85)
<i>3-HOpentyl- JWH-018</i>	0,38 (0,25- 0,75)	0,15 (0,10- 0,34)	1,12 (0,78- 1,42)	2,50 (1,0- 4,0)	2,98 (2,22- 4,14)
<i>6-HOindol- JWH-018</i>	0,25 (0,25- 0,75)	0,03 (0,02- 0,17)			

3.1 Serumanalyse

<i>Substanz</i>	t_{\max} [h]	C_{\max} [ng/ml]	$t_{1/2}$ distribution [h]	t_{β} [h]	$t_{1/2}$ beta [h]
3 mg Dosis					
<i>JWH-018</i>	0,08 (0,08- 0,50)	4,40 (2,90- 5,36)	0,45 (0,31- 0,98)	1,50 (0,50- 3,0)	1,33 (0,88- 2,98)
<i>JWH-018</i> <i>Pentansäure</i>	0,63 (0- 2,00)	0,14 (0,06- 1,02)	1,10 (0,66- 1,37)	3,0 (2,0- 4,0)	2,30 (1,17- 3,12)
<i>5-HOpentyl-</i> <i>JWH-018</i>	0,25 (0,25- 0,50)	0,16 (0,06- 0,27)	0,58 (0,36- 1,31)	1,75 (1,0- 4,0)	1,34 (0,87- 4,72)
<i>4-HOpentyl-</i> <i>JWH-018</i>	0,25 (0,25- 0,50)	0,17 (0,07- 0,41)	0,95 (0,67- 1,48)	2,50 (1,50- 4,0)	1,71 (1,11- 3,66)
<i>3-HOpentyl-</i> <i>JWH-018</i>	0,50 (0,25- 0,50)	0,17 (0,05- 0,28)	1,03 (0,61- 1,46)	2,0 (1,0- 3,0)	2,05 (1,81- 3,13)
<i>6-HOindol-</i> <i>JWH-018</i>	0,25 (0,25- 0,50)	0,03 (0- 0,04)			

* *Maximalkonzentration (C_{\max}) und zugehörige Zeit (t_{\max}); Ersichtliche Eliminationshalbwertszeiten wurden mithilfe exponentieller Regression der Distributionsphase ($t_{1/2}$ distribution) und der beta-Phase ($t_{1/2}$ beta) ermittelt (finale Phase ($t_{1/2}$ gamma) in Tabelle 6). Die Parameter t_{β} und t_{γ} beschreiben die Startpunkte der jeweiligen Phasen.*

Tabelle 6: Pharmakokinetische Eigenschaften* von JWH-018 und seinen Metaboliten im Serum von 6 Probanden nach Inhalation von 2 oder 3 mg JWH-018 (Teil 2). Alle Daten sind als Median und Bereich (in Klammern) angegeben.

Substanz	t _{gamma} [h]	t _{1/2 gamma} [h]	C _{t gamma} [ng/ml]	C _{12 h} [ng/ml]	C _{baseline 2} [ng/ml]	AUC _{0→12 h} [ng/ml * h]
2 mg Dosis						
<i>JWH-018</i>	6 (2-8)	5,54 (3,65- 7,75)	0,055 (0,024- 0,191)	0,027 (0,022- 0,073)	0,091 und 0,008	3,44 (2,17- 11,26)
<i>JWH-018</i> <i>Pentansäure</i>	7 (4-8)		0,032 (0,014- 0,078)	0,031 (0,015- 0,055)	0,001 [†]	0,82 (0,40- 0,97)
<i>5-HOpentyl- JWH-018</i>	7 (6-8)		0,006 (0,004- 0,012)	0,009 (0,004- 0,011)	0,0003 [†] und 0,0015	0,27 (0,13- 0,33)
<i>4-HOpentyl- JWH-018</i>	7 (6-8)		0,012 (0,004- 0,026)	0,012 (0,004- 0,016)	0,0002 [†] und 0,0024	0,36 (0,16- 0,57)
<i>3-HOpentyl- JWH-018</i>	6 (6-8)		0,020 (0,011- 0,042)	0,016 (0,008- 0,026)	0	0,51 (0,25- 0,72)
<i>6-HOindol- JWH-018</i>				0,000 (0- 0,002)	0	0,05 (0,02- 0,09)

3.1 Serumanalyse

Substanz	t_{gamma} [h]	$t_{1/2 \text{ gamma}}$ [h]	$C_t \text{ gamma}$ [ng/ml]	$C_{12 \text{ h}}$ [ng/ml]	$C_{\text{baseline 2}}$ [ng/ml]	$AUC_{0 \rightarrow 12 \text{ h}}$ [ng/ml * h]
3 mg Dosis						
<i>JWH-018</i>	7 (4-8)	5,88 (3,49- 13,09)	0,040 (0,011- 0,200)	0,023 (0,009- 0,148)		3,63 (2,27- 9,47)
<i>JWH-018</i> <i>Pentansäure</i>	6 (4-10)		0,028 (0,002- 0,124)	0,029 (0- 0,132)		0,66 (0,11- 2,16)
<i>5-HOpentyl-</i> <i>JWH-018</i>	8 (4-10)		0,005 (0,000- 0,029)	0,006 (0- 0,027)		0,25 (0,07- 0,82)
<i>4-HOpentyl-</i> <i>JWH-018</i>	8 (4-10)		0,010 (0,001- 0,057)	0,010 (0,001- 0,063)		0,34 (0,11- 1,48)
<i>3-HOpentyl-</i> <i>JWH-018</i>	8 (4-10)		0,018 (0,014- 0,081)	0,011 (0- 0,095)		0,49 (0,07- 1,63)
<i>6-HOindol-</i> <i>JWH-018</i>				0		0,04 (0- 0,05)

*Letztgemessene Konzentration nach 12 Stunden ($C_{12 \text{ h}}$); Ersichtliche Eliminationshalbwertszeit der finalen Phase ($t_{1/2 \text{ gamma}}$) wurden mithilfe exponentieller Regression ermittelt. t_{gamma} beschreibt den Startpunkt der gamma-Phase und $C_t \text{ gamma}$ die Konzentration zu Beginn der gamma-Phase. Konzentrationen der Baselineproben zweier Probanden vor Inhalation der 3 mg Dosis ($C_{\text{baseline 2}}$, † zeigt Werte < LLOQ). Die Flächen unter der Kurve (Area under the curves, AUC) wurden für den Versuchstag ohne weitere Extrapolation ermittelt ($AUC_{0 \rightarrow 12 \text{ h}}$).

3.1.3 Pharmakokinetik der hydroxylierten Metaboliten im Serum

Die als Referenzsubstanz genutzten Metaboliten 2-HOpentyl-, 4-HOindol-, 5-HOindol- und 7-HOindol-JWH-018 wurden in keiner der Serumproben detektiert (siehe *E* in Abbildung 4). Die Konzentrationen von 6-HOindol-JWH-018 waren sehr niedrig, der Median der Maximalkonzentration betrug 0,03 ng/ml, und bei den meisten Probanden war der Metabolit auch nur innerhalb der ersten drei Stunden nach Inhalation der Muttersubstanz nachweisbar. Eine Evaluierung von Distributions- oder Eliminierungsphasen war daher nicht möglich. Die Konzentrationen der anderen Metabolite (3-HOpentyl-, 4-HOpentyl- und 5-HOpentyl-JWH-018) waren ebenfalls gering, meist unter 0,2 ng/ml. Trotzdem erschienen die Konzentrations-Zeit-Kurven dieser Metaboliten ähnlich zu der von der Muttersubstanz zu verlaufen. Drei unterschiedliche Phasen konnten unterschieden werden (Daten in Tabelle 5 und Tabelle 6, exemplarisch für 5-HOpentyl-JWH-018 in Abbildung 2), aber die geringen Konzentrationen erlaubten keine verlässliche Bestimmung der Halbwertszeit der gamma-Phase. Für keinen pharmakokinetischen Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen der 2 mg und der 3 mg Dosis beschrieben werden (gepaarter t-Test).

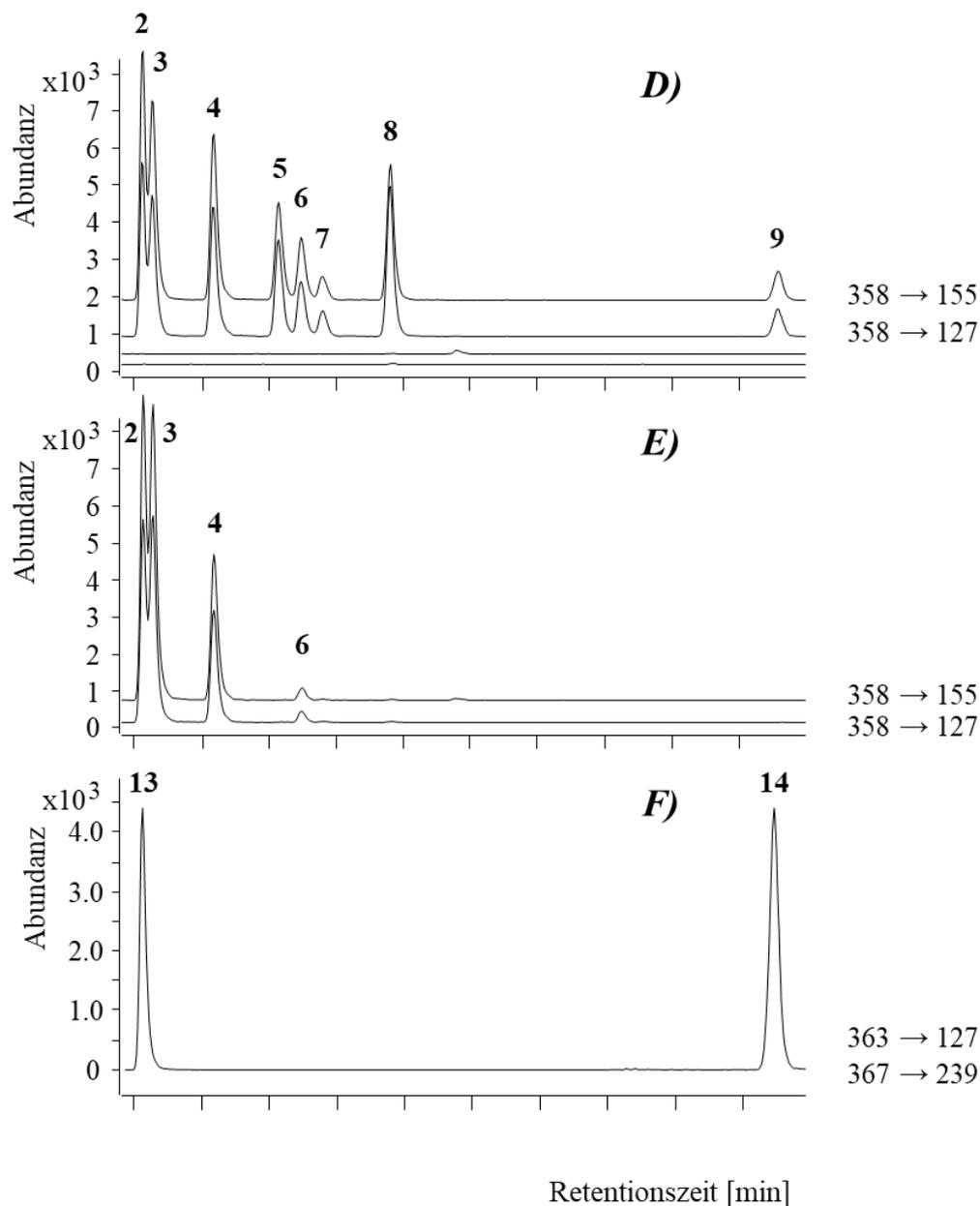


Abbildung 4: Extrahierte Ionenchromatogramme von Quantifier und Qualifier MRMs von Kalibratoren (**D**: 0,1 ng/ml der Metaboliten) sowie einer Blankprobe mit internem Standard (**F**: Serumprobe von Proband #7 vor Inhalation der 2 mg Dosis). In identischer Skalierung verglichen mit den Kalibratorkonzentrationen stellt **E** ein typisches Chromatogramm einer Serumprobe 15 min nach JWH-018 Konsum dar (Proband #7, vgl. Abbildung 2, Abbildung 3 und Abbildung 5 bis Abbildung 8). Die unterschiedlichen Analyten sind wie folgt bezeichnet: 5-HOpentyl-JWH-018 (**D2**, **E2**), 4-HOpentyl-JWH-018 (**D3**, **E3**), 3-HOpentyl-JWH-018 (**D4**, **E4**), 2-HOpentyl-JWH-018 (**D5**), 6-HOindol-JWH-018 (**D6**, **E6**), 5-HOindol-JWH-018 (**D7**), 7-HOindol-JWH-018

(**D8**), 4-HOindol-JWH-018 (**D9**) 5-HOpentyl-JWH-018-d₅ (**F13**), 4-HOindol-JWH-018-d₉ (**F14**).

3.1.4 Pharmakokinetik der JWH-018 Pentansäure

Das pharmakokinetische Profil der JWH-018 Pentansäure unterschied sich deutlich von dem der anderen Metaboliten. Die Maximalkonzentration wurde später erreicht (t_{\max} , Tabelle 5) und ein Plateau der Konzentrations-Zeit-Kurve (Abbildung 2) entstand durch ein späteres Einsetzen der beta-Eliminierungsphase (t_{β} in Tabelle 5). Eine verlässliche Bestimmung der Halbwertszeit der gamma-Eliminierungsphase war nicht möglich. Auch hier konnten für keinen pharmakokinetischen Parameter signifikante Unterschiede zwischen der 2 mg und der 3 mg Dosis beschrieben werden (paariger t-Test).

Zusätzlich wurde jedoch ein bislang unbekanntes Isomer des Pentansäuremetaboliten identifiziert (*H11* in Abbildung 5). Der Analyt wurde augenscheinlich deutlich schneller eliminiert als JWH-018-Pentansäure und war bei den meisten Probanden bis zu acht Stunden nach Inhalation nachweisbar.

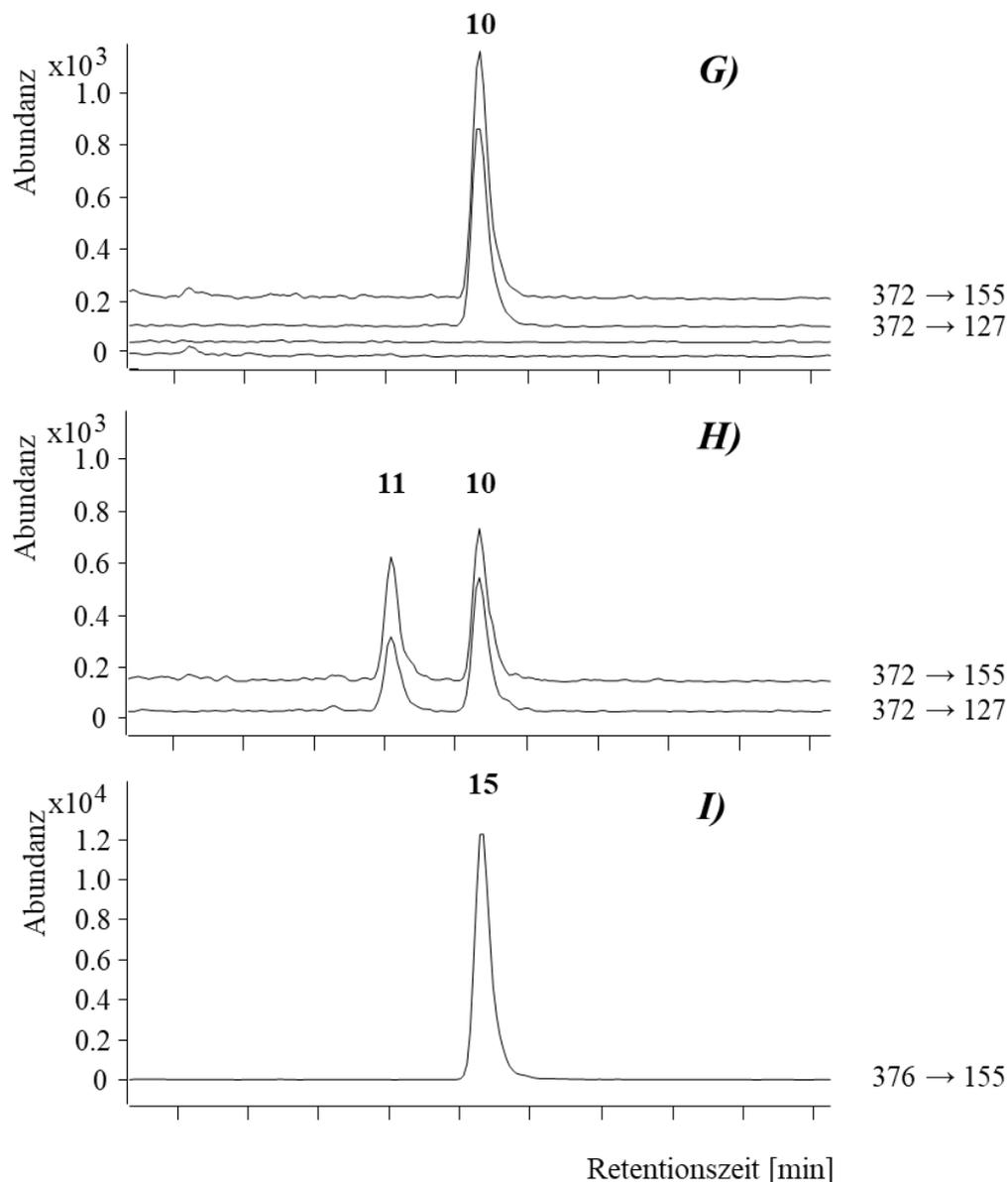


Abbildung 5: Extrahierte Ionenchromatogramme von Quantifier und Qualifier MRMs von Kalibratoren (**G**: 0,1 ng/ml der Metaboliten) sowie einer Blankprobe mit internem Standard (**I**: Serumprobe von Proband #7 vor Inhalation der 2 mg Dosis). In identischer Skalierung verglichen mit den Kalibratorkonzentrationen stellt **H** ein typisches Chromatogramm einer Serumprobe 15 min nach JWH-018 Konsum dar (Proband #7, vgl. Abbildung 2 und Abbildung 8). Die unterschiedlichen Analyten sind wie folgt bezeichnet: JWH-018 Pentansäure (**G10**, **H10**) zusammen mit einem unbekanntem Isomer (**H11**), JWH-018 Pentansäure- d_4 (**I15**).

3.1.5 Baseline Serumproben

Die Baselineproben von zwei Probanden vor Aufnahme der 3 mg Dosis (21 bzw. 31 Tage nach Inhalation der 2 mg Dosis) wurden positiv für JWH-018 getestet (0,091 und 0,008 ng/ml, $C_{\text{baseline 2}}$ in Tabelle 6, chromatographische Ergebnisse in Abbildung 6). Durch Wiederholung der Analyse von Rückstellproben, die separat von den regulären Proben aufbewahrt wurden, konnte eine Kreuzkontamination bei diesen Proben ausgeschlossen werden.

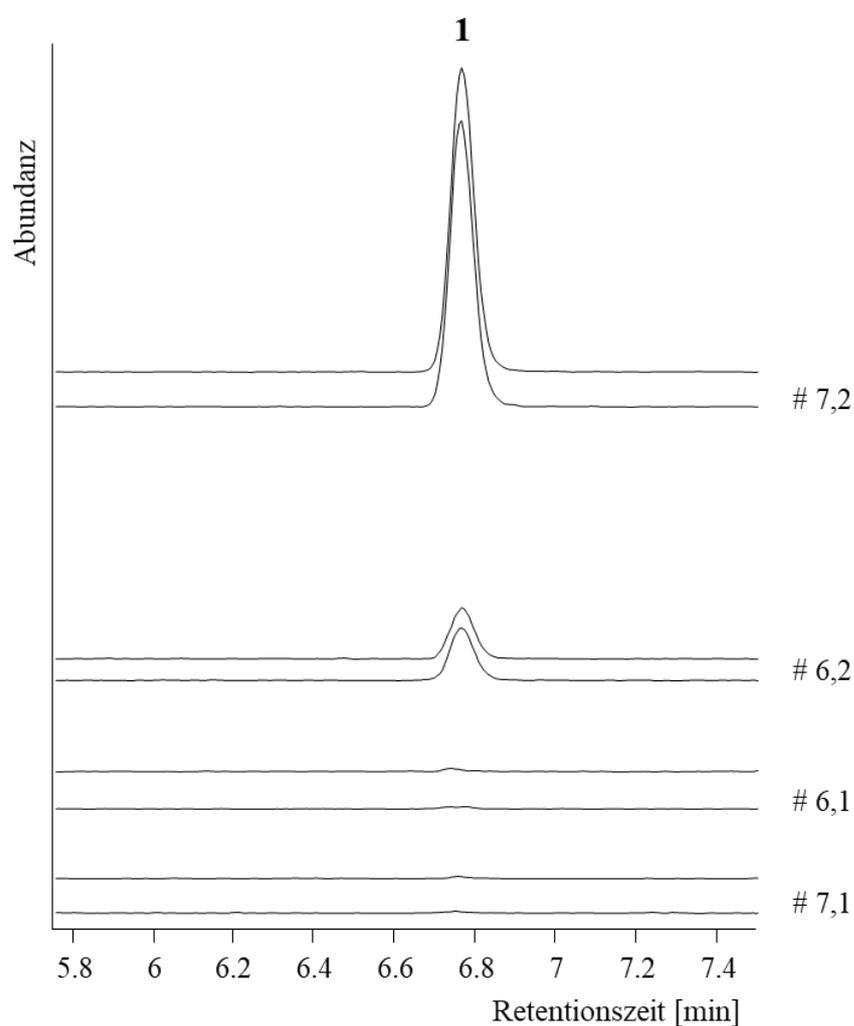


Abbildung 6: Extrahierte Ionenchromatogramme der Serum-Baselineproben vor Inhalation der 2 mg Dosis (#7,1 und #6,1) und vor der 3 mg Dosis 21 bzw. 31 Tage später (#7,2 und #6,2). Qualifier und Quantifier in identischer Skalierung. Erkennbar sind geringe Signale für **JWH-018 (1)**.

Genau wie bei JWH-018 konnten Spuren von 4-HOpentyl- und 5-HO-pentyl-JWH-018 in den Baselineproben der gleichen Probanden nachgewiesen werden. Beide Metabolite lagen ungefähr in einem Konzentrationsbereich von 2 pg/ml bzw. 0,3 pg/ml (siehe $C_{\text{baseline2}}$ in Tabelle 6 und chromatographische Ergebnisse in Abbildung 7).

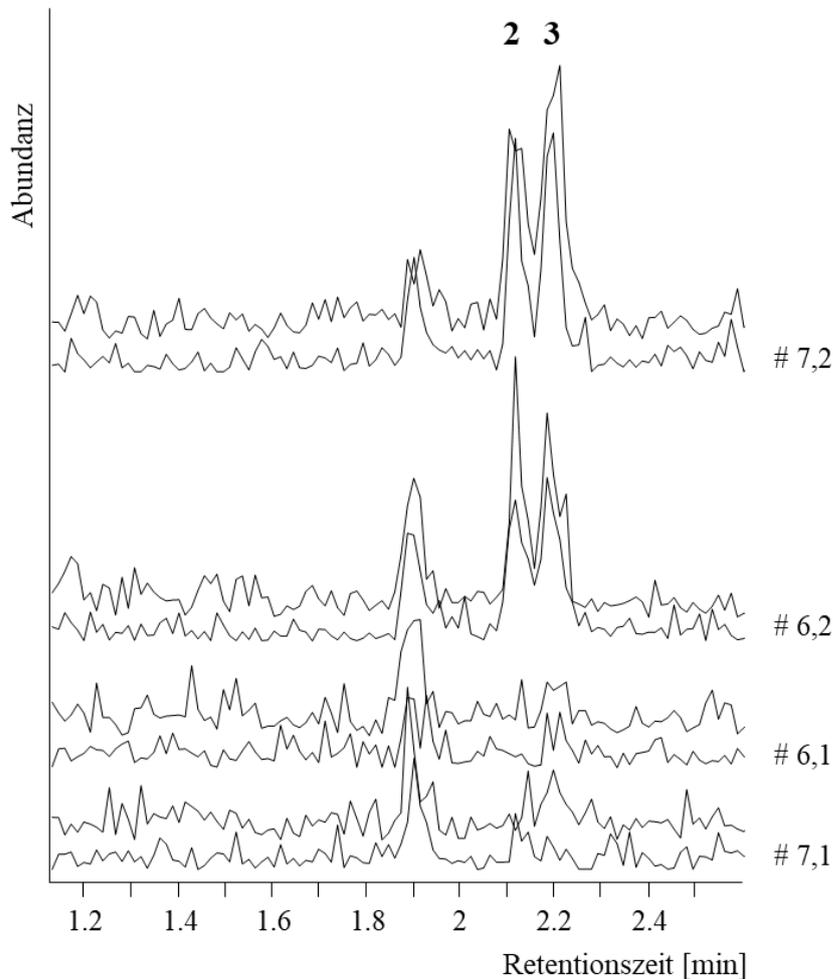


Abbildung 7: Extrahierte Ionenchromatogramme der Serum-Baselineproben vor Inhalation der 2 mg Dosis (#7,1 und #6,1) und vor der 3 mg Dosis 21 bzw. 31 Tage später (#7,2 und #6,2). Qualifier und Quantifier in identischer Skalierung. Erkennbar sind geringe Signale für 5-HOpentyl-JWH-018 (2), 4-HOpentyl-JWH-018 (3).

Weiterhin gab es in den betreffenden Baselineproben auch analytische Signale, welche die Anwesenheit von JWH-018-Pentansäure in zumindest einer der beiden Proben nahelegen (31 Tage nach der 2 mg Dosis, chromatographische Ergebnisse in Abbildung 8). Die Konzentration beträgt ca. 1 pg/ml.

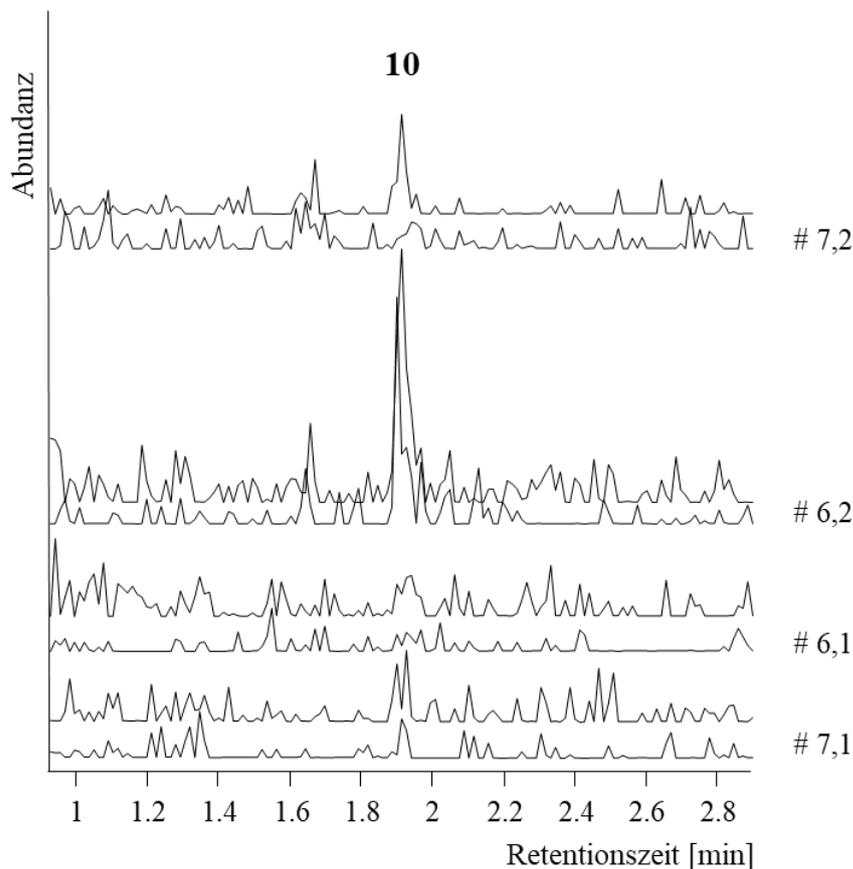


Abbildung 8: Extrahierte Ionenchromatogramme der Serum-Baselineproben vor Inhalation der 2 mg Dosis (#7,1 und #6,1) und vor der 3 mg Dosis 21 bzw. 31 Tage später (#7,2 und #6,2). Qualifier und Quantifier in identischer Skalierung. Erkennbar sind geringe Signale für **JWH-018 Pentansäure (10)**.

3.2 Urinanalyse

3.2.1 Validierung

Als LC-MS/MS Methode wurde die bereits beschriebene Serummethode mit JWH-073-Butansäure als zusätzlichen potentiellen Metaboliten für die Analyse der Urinproben validiert. Es wurden keine störenden Signale von endogenen Komponenten oder anderen typischen Fremdstoffen beobachtet. Ebenso wurden keine Matrixeffekte festgestellt. Die Validierungsergebnisse (Tabelle 7) waren alle innerhalb des

Akzeptanzbereichs. Die Extraktionsausbeute für JWH-018 und die Metaboliten lag jeweils im Bereich von 60 bis 80 %. Die Bestimmungsgrenzen waren mit Ausnahme von 5-HOindol-JWH-018 unter 0,005 ng/ml und damit deutlich niedriger als bei bisher publizierten Arbeiten^{43-48,38,49}. Die Kalibrationskurve blieb bis 1.000 ng/ml linear. Die relativen Standardabweichungen bei Wiederhol- und Laborpräzision lagen bei überwiegend unter 6,5 %, alle unter 15%. Die Genauigkeit konnte mit relativen Standardabweichungen von unter 7 % ermittelt werden. Die Stabilität aufgearbeiteter Proben war über 72 Stunden hinweg gegeben, Abweichungen betragen unter 15 % der Anfangskonzentration. Somit wurde diese Analysemethode für die quantitative Analyse von JWH-018 und zehn seiner Metaboliten im Urin erfolgreich validiert.

Tabelle 7: Validierungsergebnisse für die Analyse von JWH-018 und seiner Metaboliten im Urin.

Substanz	LLOQ (LOD) [ng/ml]	QC [ng/ml]	Laborpräzision [%]	Wiederholpräzision [%]	Genauigkeit [%]	Wiederfindung [%]
<i>JWH-018</i>	0,0016 (0,0005)	1	8,3	8,3	-5,2	
		5	5,1	5,1	1,3	61,1
		30	4,7	4,7	-5,2	62,1
<i>JWH-018 N-(2-hydroxypentyl)</i>	0,0017 (0,0006)	1	8,4	8,4	-5,4	
		5	4,3	4,3	0,5	69,5
		30	4,5	6,0	0,0	75,9
<i>JWH-018 N-(3-hydroxypentyl)</i>	0,0028 (0,0006)	1	7,6	7,6	-2,0	
		5	6,4	6,4	2,5	73,5
		30	5,4	6,5	-1,5	75,3
<i>JWH-018 N-(4-hydroxypentyl)</i>	0,0015 (0,0007)	1	6,2	6,7	-0,6	
		5	6,8	8,8	1,7	74,7
		30	4,5	4,5	-0,4	78,5
<i>JWH-018 N-(5-hydroxypentyl)</i>	0,0018 (0,0006)	1	7,8	7,8	-2,4	
		5	2,7	5,1	-0,1	80,6
		30	5,9	5,9	0,4	86,6

Substanz	LLOQ (LOD) [ng/ml]	QC [ng/ml]	Labor- präzision [%]	Wiederhol- präzision [%]	Genauig- keit [%]	Wieder- findung [%]
<i>JWH-018 N-(4- hydroxyindol)</i>	0,0033 (0,0019)	1	8,4	8,4	-6,6	
		5	6,1	6,1	-0,8	64,8
		30	6,4	6,4	-3,8	59,2
<i>JWH-018 N-(5- hydroxyindol)</i>	0,0320 (0,0185)	1	8,8	8,8	-6,1	
		5	3,8	4,8	-0,6	50,5
		30	5,2	5,2	-6,1	62,1
<i>JWH-018 N-(6- hydroxyindol)</i>	0,0030 (0,0006)	1	11,2	11,2	-2,8	
		5	5,7	5,7	1,1	66,0
		30	5,8	6,3	-4,1	63,0
<i>JWH-018 N-(7- hydroxyindol)</i>	0,0022 (0,0006)	1	10,4	14,9	-1,9	
		5	6,3	6,3	0,7	56,7
		30	3,8	5,8	1,2	57,8
<i>JWH-018 N- Pentansäure</i>	0,0021 (0,0006)	1	10,1	10,8	0,2	
		5	4,3	4,6	-0,5	65,1
		30	4,2	5,4	5,0	69,1
<i>JWH-073 N- Butansäure</i>	0,0017 (0,0008)	1	10,4	10,5	-5,3	
		5	6,0	6,0	5,8	50,5
		30	3,8	5,6	-1,2	62,1

3.2.2 Besonderheiten in der Auswertung der Urinanalyse

In der Studienplanung wurden als einheitliche Zeitpunkte der Urinprobenentnahme die Baselineprobe (Probe 1) vor Inhalation des JWH-018 sowie eine, vier und zwölf Stunden nach Inhalation veranschlagt (vgl. 2.4). In der praktischen Ausführung konnten diese Zeitpunkte nicht immer korrekt eingehalten werden. Hierdurch ergaben sich auch zusätzliche Entnahmezeitpunkte (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8: Tatsächlicher Zeitpunkt der Urinprobenentnahme

Proband (Dosis)	Probe	Zeit zu T0 [h]	Proband (Dosis)	Probe	Zeit zu T0 [h]	Proband (Dosis)	Probe	Zeit zu T0 [h]
7801-1 (0 mg)	1	0:00	7801-2 (2 mg)	1	0:00	7801-3 (3 mg)	1	0:00
	2	1:00		2	1:25		2	1:00
	3	4:00		3	4:10		3	4:00
	4	10:20		4	10:10		4	7:00
	5	12:30		5	11:45		5	8:45
					6		10:15	
					7		11:30	
7803-1 (2 mg)	1	0:00	7803-2 (0 mg)	1	0:00	7803-3 (3 mg)	1	0:00
	2	1:30		2	1:10		2	1:07
	3	4:00		3	2:50		3	4:40
	4	9:30		4	4:10		4	10:00
	5	12:00		5	5:00		5	11:15
				6	10:00			
				7	11:30			
7804-1 (2 mg)	1	0:00	7804-2 (0 mg)	1	0:00	7804-3 (3 mg)	1	0:00
	2	1:50		2	1:50		2	0:05
	3	4:00		3	3:30		3	2:10
	4	10:30		4	4:30		4	3:45
	5	11:50		5	7:00		5	5:30
				6	9:10		6	9:20
				7	11:30		7	12:00
7805-1 (0 mg)	1	0:00	7805-2 (2 mg)	1	0:00	7805-3 (3 mg)	1	0:00
	2	1:55		2	1:00		2	0:45
	3	4:15		3	1:55		3	2:30
	4	6:45		4	3:40		4	3:30
	5	9:55		5	4:15		5	9:00
	6	11:30		6	9:40		6	11:40
				7	12:00			
7806-1 (2 mg)	1	0:00	7806-2 (3 mg)	1	0:00	7806-3 (0 mg)	1	0:00
	2	1:20		2	1:50		2	2:00
	3	2:15		3	3:30		3	3:10
	4	4:10		4	6:40		4	4:50
	5	10:00		5	7:35		5	7:00
	6	12:00		6	10:30		6	10:10
				7	11:30		7	12:00

Proband (Dosis)	Probe	Zeit zu T0 [h]	Proband (Dosis)	Probe	Zeit zu T0 [h]	Proband (Dosis)	Probe	Zeit zu T0 [h]
7807-1 (2 mg)	1	0:00	7807-2 (3 mg)	1	0:00	7807-3 (0 mg)	1	0:00
	2	1:25		2	1:20		2	1:00
	3	3:00		3	3:00		3	2:40
	4	4:15		4	4:00		4	4:00
	5	8:25		5	6:30		5	6:25
	6	10:10		6	8:50		6	10:10
	7	11:30		7	11:15		7	11:05

Ein direkter Zeit-/Konzentrationsvergleich zwischen den einzelnen Studientagen war somit nicht möglich. In Anbetracht der interindividuell unterschiedlichen Exkretionsraten erschien die Auswertung der Urinkonzentrationen in Bezug auf Zeitbereiche mit Angabe eines Medians sinnvoll (s. Tabelle 9). Da insgesamt jeweils fünf bis sieben Urinproben pro Studientag analysiert wurden, konnte damit sogar noch ein zusätzlicher Zeitraum nach ungefähr zehn Stunden hinzugefügt und damit insgesamt fünf Zeiträume ausgewertet werden.

Aufgrund der Erkenntnisse durch Analyse der Rückstände in den Glaspfeifen, die eine hohe Variabilität bei der Dosierung zeigten (vgl. 3.4), wurden die Daten zum Urin ohne Differenzierung zwischen der 2 mg und 3 mg Dosis ausgewertet. Die Konzentrationen im Urin waren alle niedriger als erwartet und daher häufig kleiner als der geringste Kalibrator (0,1 ng/ml), jedoch über der Bestimmungsgrenze.

Die Muttersubstanz JWH-018 konnte weder ohne noch mit Glukuronidspaltung in einer Urinprobe nachgewiesen werden. Weiterhin wurde keiner der hydroxylierten Metaboliten ohne Glukuronidspaltung nachgewiesen.

3.2.3 Pharmakokinetik der hydroxylierten Metaboliten im Urin

Nach Zugabe der β -Glukuronidase konnten 3-HOpentyl-, 4-HOpentyl-, 5-HOpentyl- und 6-HO-indol-JWH-018 nachgewiesen werden (Chromatogramm eines repräsentativen Probanden in Abbildung 9, quantitative Daten in Tabelle 9). Die höchsten Konzentrationen zeigte 5-HOpentyl-JWH-018, während 6-HOindol-JWH-018

nur in sehr geringen Konzentrationen und nicht bei allen Probanden nachgewiesen wurde. Bei Vergleichen der chromatographischen Ergebnisse der Urinproben mit und ohne Glukuronidspaltung sowie der Baselineproben zeigten sich geringste Signale weiterer Metaboliten. Dies waren 7-HOindol-JWH-018 (9 in Abbildung 9), 2-HOpentyl-JWH-018 (6 in Abbildung 9) und 5-HOindol-JWH-018 (8 in Abbildung 9) sowie ein weiterer, nicht identifizierter, hydroxylierter Metabolit, der kurz nach 3-HOpentyl-JWH-018 eluiert (13 in Abbildung 9).

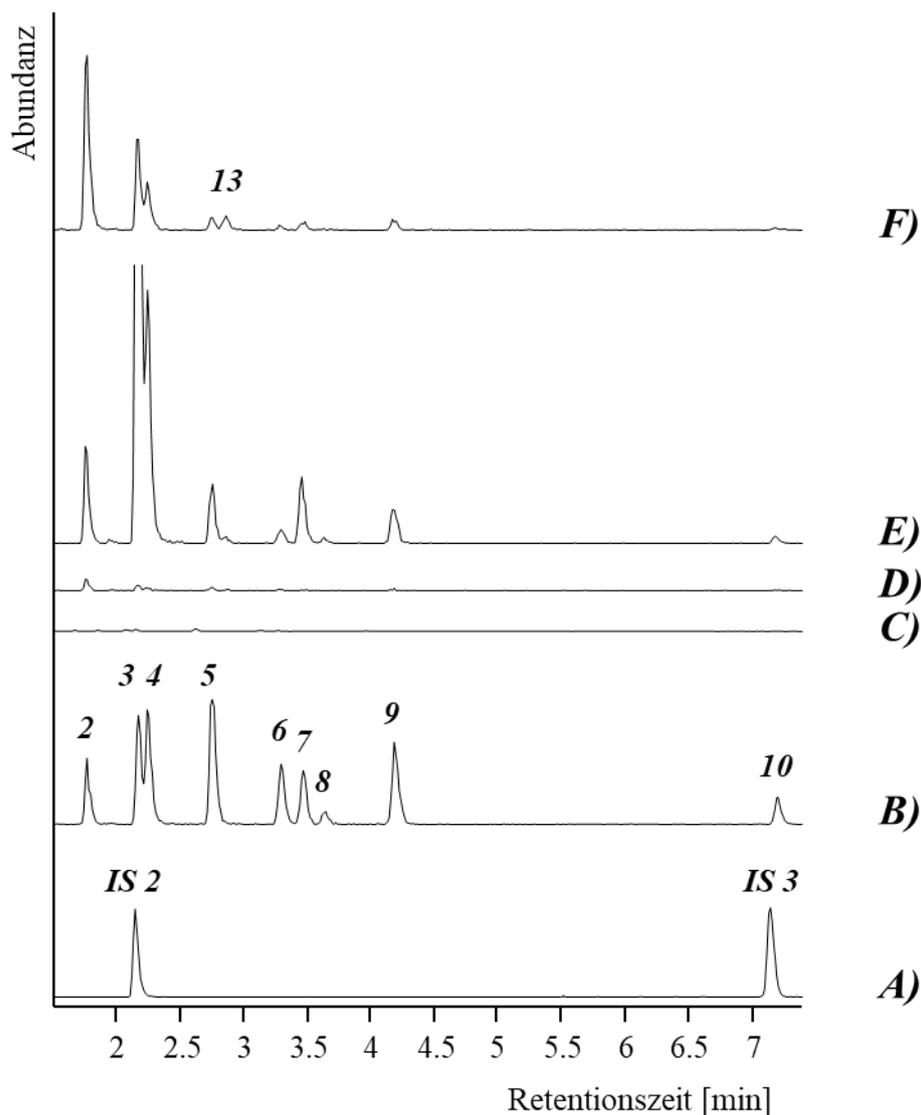


Abbildung 9: Extrahierte Ionenchromatogramme von internen Standards (A) und Quantifier MRM (für JWH-018 Pentansäure 372→155 und für alle anderen Metaboliten 358→155, identische Skala) eines 0,1 ng/ml Kalibrators (B), sowie Urinprobe eines Probanden (# 7, vgl. zugehörige Serumergebnisse in Abbildung 2).

Gezeigt sind Baselineprobe (C) sowie Urinprobe 1 Stunde (D ohne Konjugatsspaltung; E mit Konjugatsspaltung) und 12 Stunden nach Inhalation (F). Die Analyten sind wie folgt bezeichnet: JWH-073 Butansäure (2), 5-HOpentyl-JWH-018 (3), 4-HOpentyl-JWH-018 (4), 3-HOpentyl-JWH-018 (5), 2-HOpentyl-JWH-018 (6), 6-HOindol-JWH-018 (7), 5-HOindol-JWH-018 (8), 7-HOindol-JWH-018 (9), 4-HOindol-JWH-018 (10), ein nicht identifizierter hydroxylierter Metabolit (13) zusammen mit 5-HOpentyl-JWH-018- d_5 (IS 2) und 4-HOindol-JWH-018- d_9 (IS 3).

Tabelle 9: Konzentrationen von JWH-018 und seinen Metaboliten in Urinproben nach Konjugatsspaltung von 6 Probanden nach Inhalation von 2 oder 3 mg JWH-018. Die Zeitpunkte der Urinprobenabgaben waren unterschiedlich und sind daher in Bereichen angegeben. Maximalkonzentrationen (C_{max}) und zugehörige Zeit (t_{max}). Alle Daten sind als Median und Bereich (in Klammern) angegeben.

Zeit nach Inhalation [h]	JWH-018 [ng/ml]	5-HOpentyl-JWH-018 [ng/ml]	4-HOpentyl-JWH-018 [ng/ml]	3-HOpentyl-JWH-018 [ng/ml]	6-HOindol-JWH-018 [ng/ml]	JWH-018 Pentansäure [ng/ml]	JWH-073 Butansäure [ng/ml]
0	0	0	0	0	0	0 (0-0,020)	0
1,38 (0,75-2,17)	0	0,474 (0,099-2,689)	0,218 (0,054-1,010)	0,032 (0-0,189)	0,071 (0-0,362)	0,374 (0,020-1,169)	0,097 (0-0,314)
4,00 (3,50-4,67)	0	0,561 (0,103-2,139)	0,332 (0,054-1,414)	0,072 (0-0,255)	0,056 (0-0,163)	0,501 (0,109-2,753)	0,175 (0,039-1,379)
10,00 (8,83-10,50)	0	0,207 (0,034-0,503)	0,147 (0-0,385)	0,020 (0-0,338)	0 (0-0,510)	0,252 (0,085-1,122)	0,107 (0,029-0,752)
11,71 (11,25-12,00)	0	0,149 (0,039-0,841)	0,153 (0-0,378)	0,013 (0-0,112)	0 (0-0,074)	0,426 (0,054-2,267)	0,162 (0,012-1,807)

Zeit nach Inhalation [h]	JWH-018 [ng/ml]	5-HOpentyl- JWH-018 [ng/ml]	4-HOpentyl- JWH-018 [ng/ml]	3-HOpentyl- JWH-018 [ng/ml]	6-HOindol- JWH-018 [ng/ml]	JWH-018 Pentansäure [ng/ml]	JWH-073 Butansäure [ng/ml]
C_{max} [ng/ml]	0	0,687 (0,103- 2,689)	0,359 (0,084- 1,414)	0,085 (0- 0,338)	0,093 (0- 0,510)	0,586 (0,115- 2,753)	0,183 (0,039- 1,807)
t_{max} [h]	0	3,58 (1,33- 4,67)	3,71 (1,33- 11,67)	3,63 (0,00- 10,17)	1,46 (0,00- 10,17)	4,08 (1,83- 12,00)	4,21 (1,83- 12,00)

3.2.4 Pharmakokinetik der Carbonsäuremetaboliten im Urin

Die JWH-018 Pentansäure ließ sich auch ohne Glukuronidspaltung nachweisen (*I* in *D*, Abbildung 10), zeigte jedoch deutlich höhere Konzentrationen nach der Zugabe von β -Glukuronidase (*I* in *E*, Abbildung 10). Diese waren höher als von 5-HOpentyl-JWH-018 in Urinproben ab vier Stunden nach Inhalation. Als weiterer Säuremetabolit konnte die JWH-073 Butansäure (*2* in Abbildung 9) mit einer ähnlichen Konzentrations-Zeit-Kurve wie JWH-018 Pentansäure detektiert werden. Beide lagen mit einem Anteil von teils über 90 % der Gesamtkonzentration glukuronidiert vor (vgl. Tabelle 10).

In allen Urinproben nach Aufnahme von JWH-018 zeigten sich zwei weitere Peaks mit den gleichen Qualifier und Quantifier MRMs wie JWH-018-Pentansäure. Diese Signale fanden sich ausschließlich nach Konjugatsspaltung und nicht in den Baselineproben (*11* und *12* in *E*, aber nicht in *C* in Abbildung 10). Dies entspricht dem bereits im Serum registrierten Signal (siehe 3.1.4) und wird in der Diskussion weiter ausgeführt (s. 4.5).

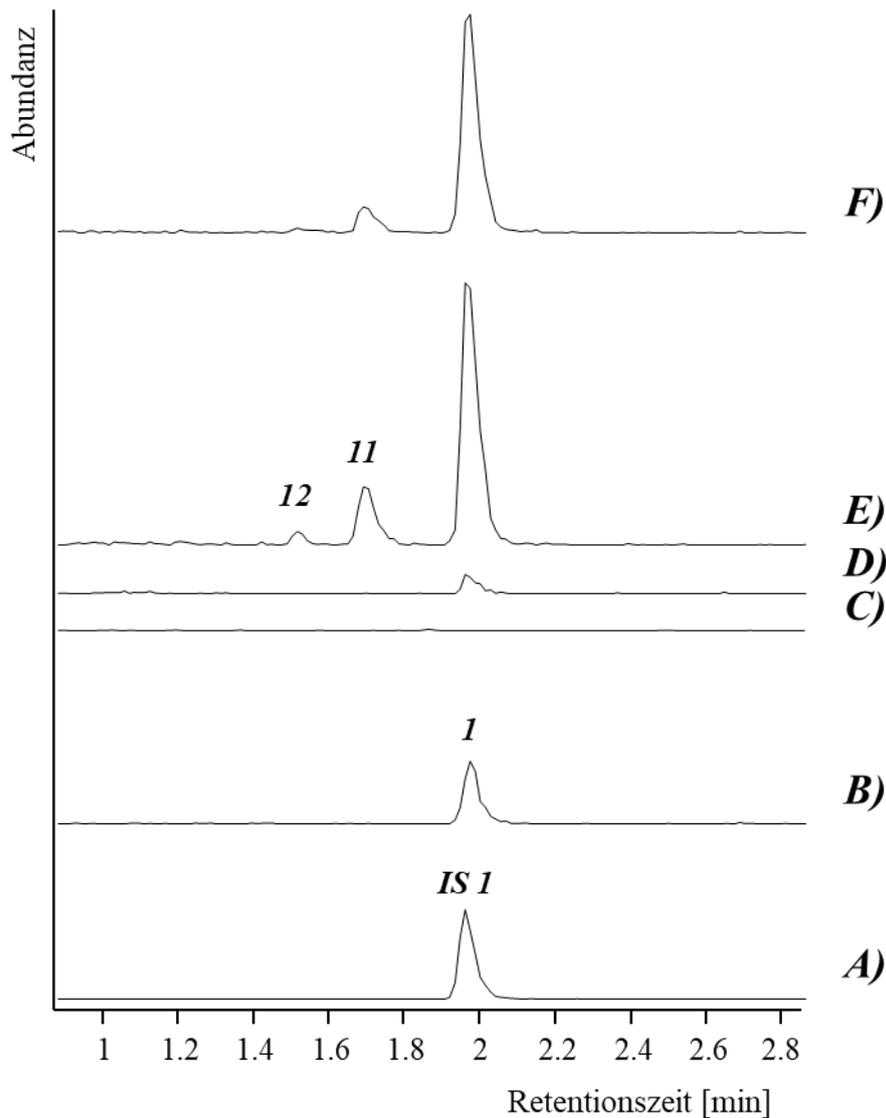


Abbildung 10: Extrahierte Ionenchromatogramme von internen Standards (A) und Quantifizier MRM (für JWH-018 Pentansäure 372→155 und für alle anderen Metaboliten 358→155, identische Skala) eines 0,1 ng/ml Kalibrators (B), sowie Urinprobe eines Probanden (# 7, vgl. zugehörige Serumergebnisse in Abbildung 2). Gezeigt sind Baselineprobe (C) sowie Urinprobe 1 Stunde (D ohne Konjugatsspaltung; E mit Konjugatsspaltung) und 12 Stunden nach Inhalation (F). Die Analyten sind wie folgt bezeichnet: JWH-018 Pentansäure (1), hypothetische dihydroxylierte und dehydrogenierte Metaboliten (11, 12) zusammen mit JWH-018 Pentansäure- d_4 (IS 1).

Tabelle 10: Anteil Glukuronide der JWH-018 Metaboliten, bestimmt aus Analysen der Urinproben mit und ohne Konjugatspaltung. Ein Wert von 100 % steht für negative Ergebnisse (Konzentration < LLOQ, vgl. Tabelle 9) im unbehandelten Urin. Alle Daten sind als Median und Bereich (in Klammern) angegeben.

Zeit nach Inhalation [h]	5-HO pentyl-JWH-018 [%]	4-HO pentyl-JWH-018 [%]	3-HO pentyl-JWH-018 [%]	6-HO indol-JWH-018 [%]	JWH-018 Pentansäure [%]	JWH-073 Butansäure [%]
0					100*	
1,38 (0,75-2,17)	100	100	100	100	91,6 (67,1-100)	83,2 (15,9-100)
4,00 (3,50-4,67)	100	100	100	100	94,1 (75,5-96,9)	91,7 (68,4-94,3)
10,00 (8,83-10,50)	100	100	100	100	96,3 (30,3-98,2)	93,0 (13,0-100)
11,71 (11,25-12,00)	100	100	100	100	96,2 (60,2-100)	90,9 (9,7-96,8)

*bezogen auf für JWH-018 Pentansäure positive Baselineproben, ausschließlich nach Konjugatspaltung nachweisbar.

3.2.5 Baseline Urinproben

Bei der Analyse der Baselineproben wurde die JWH-018-Pentansäure bei zwei Probanden (Abbildung 11) vor Inhalation der 3 mg Dosis nachgewiesen (nach Konjugatspaltung einmal geringfügig nachweisbar bzw. 0,007 ng/ml), sowie in den Proben des darauffolgenden Plazebo-Versuchstages (nach Konjugatspaltung einmal geringfügig nachweisbar und 0,02 ng/ml). Es wurden keine anderen Metabolite nachgewiesen und alle anderen Baselineproben waren für alle Analyten negativ.

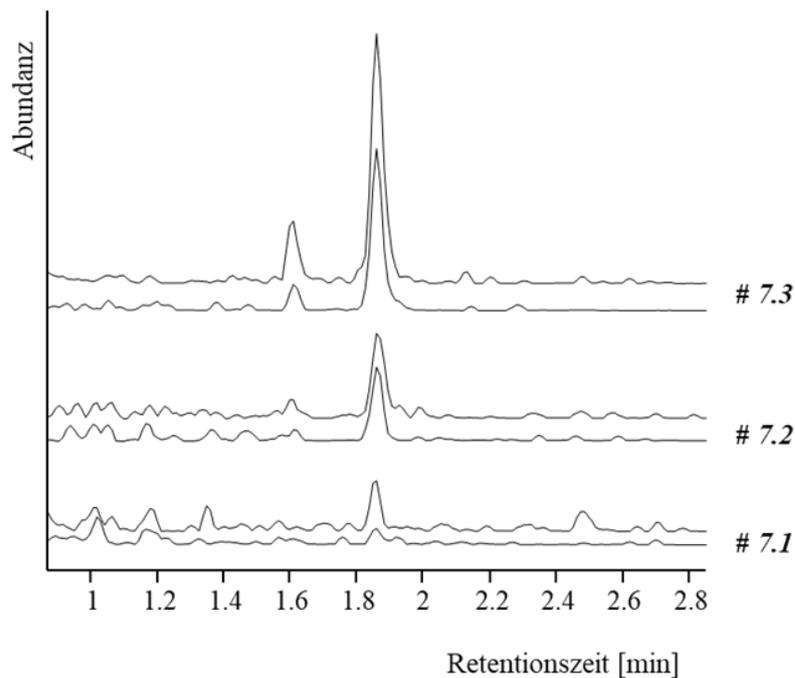
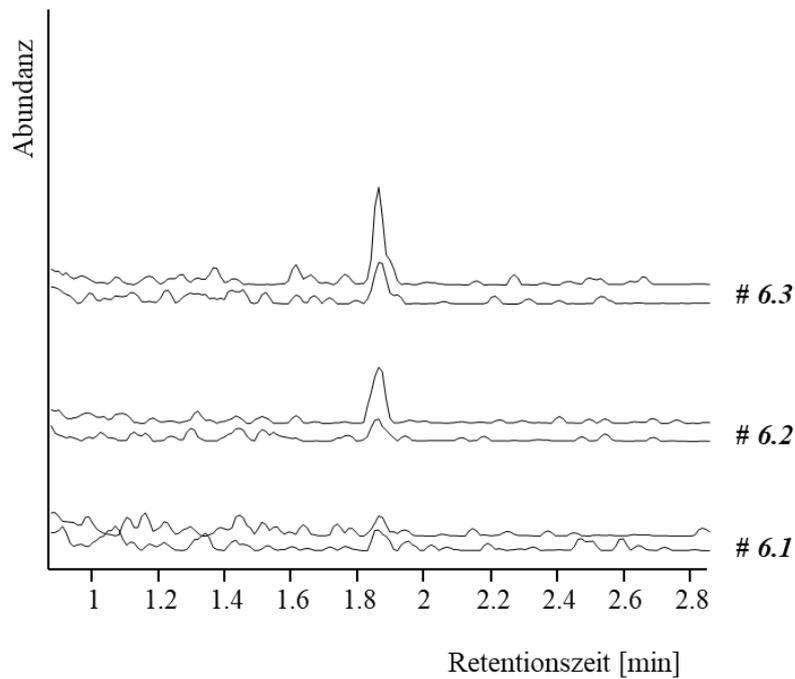


Abbildung 11: Extrahierte Ionenchromatogramme von JWH-018 Pentansäure (obere Linie 372→155, untere Linie 372→127) in den Urin-Baselineproben zweier Probanden (# 6 und # 7, vgl. zugehörige Serumdaten in Abbildung 2), vor Inhalation der ersten Dosis JWH-018 (# 6.1 und # 7.1), vor Inhalation der 3 mg Dosis 21 (# 6.2) bzw. 31 (# 6.2) Tage später und zu Beginn der Placebogabe weitere zwei Wochen später (# 6.3 und #7.3).

3.3 Speichelanalyse

3.3.1 Validierung

Es wurde die gleiche LC-MS/MS-Methode, die zur Analyse der Serum- und Urinproben genutzt wurde, auch für die Speichelproben erfolgreich für JWH-018 und zehn Metabolite validiert. Die Validierungsergebnisse befanden sich alle innerhalb des Akzeptanzbereiches (siehe Tabelle 11). Es wurden keine Matrixeffekte beobachtet. Die Nachweisgrenze lag für JWH-018 bei 0,01 ng/ml, für die Hydroxyindolisomere unter 0,09 ng/ml und für die Hydroxypentylisomere unter 0,03 ng/ml. Die Bestimmungsgrenze lag für JWH-018 bei 0,024 ng/ml und für alle Metaboliten unter 0,1 ng/ml. Die Kalibrationskurve zeigte sich bis 100 ng/ml linear. Für die Labor- und Wiederholpräzision sowie Genauigkeit ergaben sich relative Standardabweichungen von 8 % für JWH-018 und unter 13 % für alle anderen Analyten. Die Stabilität aufgearbeiteter Proben war über 72 Stunden hinweg gegeben, Abweichungen betragen unter 20 % der Anfangskonzentration. Das Quantisal Collection System zeigte eine sehr hohe Wiederfindungsrate für JWH-018 mit $99,4 \pm 9,7$ % (Median \pm SD, n=5) in Speichel, der mit einer Konzentration von 0,5 ng/ml gespiked wurde, und $92,9 \pm 5,5$ % bei einer Konzentration von 10 ng/ml.

Tabelle 11: Validierungsergebnisse für die Analyse von JWH-018 und seiner Metaboliten im Speichel.

Substanz	LLOQ (LOD) [ng/ml]	QC [ng/ml]	Labor- präzision [%]	Wiederhol- präzision [%]	Genauig- keit [%]	Wieder- findung [%]
<i>JWH-018</i>	0,0241 (0,0096)	1				96,8
		10				93,7
		4	5,7	7,8	-4,0	
		20	7,1	7,1	-1,1	
		40	4,2		-3,7	
<i>JWH-018 N-(2- hydroxypentyl)</i>	0,0727 (0,0138)	1				80,5
		10				77,2
		4	7,5	10,8	-1,0	
		20	5,4	5,9	-1,5	
		40	6,4	6,4	-1,1	
<i>JWH-018 N-(3- hydroxypentyl)</i>	0,0875 (0,0516)	1				86,1
		10				81,8
		4	5,6	6,8	-4,5	
		20	6,9	8,1	2,0	
		40	4,6	5,3	-3,6	
<i>JWH-018 N-(4- hydroxypentyl)</i>	0,0546 (0,0266)	1				85,3
		10				81,5
		4	4,8	4,8	-2,3	
		20	6,3	10,0	2,4	
		40	3,2	7,1	-0,2	
<i>JWH-018 N-(5- hydroxypentyl)</i>	0,0711 (0,0228)	1				87,0
		10				84,2
		4	3,2	8,0	-1,4	
		20	6,4	9,4	2,1	
		40	3,1	4,9	-0,4	
<i>JWH-018 N-(4- hydroxyindol)</i>	0,0890 (0,0548)	1				93,9
		10				85,4
		4	7,9	9,2	4,3	
		20	4,9	6,2	1,1	
		40	4,4	4,4	-2,3	

3.3 Speichelanalyse

Substanz	LLOQ (LOD) [ng/ml]	QC [ng/ml]	Labor- präzision [%]	Wiederhol- präzision [%]	Genauig- keit [%]	Wieder- findung [%]
<i>JWH-018 N-(5- hydroxyindol)</i>	0,0908 (0,0720)	1				74,0
		10				69,8
		4	6,2	6,9	-3,5	
		20	7,3	8,6	0,0	
		40	3,5	3,5	-4,3	
<i>JWH-018 N-(6- hydroxyindol)</i>	0,0879 (0,0246)	1				85,1
		10				83,3
		4	5,28	10,4	-5,7	
		20	5,1	5,9	-1,3	
		40	4,7	7,2	-5,2	
<i>JWH-018 N-(7- hydroxyindol)</i>	0,0760 (0,0312)	1				79,1
		10				78,9
		4	7,9	12,7	-0,1	
		20	8,4	8,4	0,3	
		40	3,2	4,8	-3,3	
<i>JWH-018 Pentansäure</i>	0,0641 (0,0244)	1				78,5
		10				75,5
		4	2,8	5,4	-2,1	
		20	6,7	9,8	2,3	
		40	3,6	4,9	0,6	
<i>JWH-073 Butansäure</i>	0,0506 (0,0174)	1				68,1
		10				63,8
		4	5,5	6,0	-5,0	
		20	5,9	7,6	-0,4	
		40	2,4	4,9	-1,9	

3.3.2 Pharmakokinetik von JWH-018 im Speichel

Bei der Speichelanalyse konnten in keiner Probe Metabolite von JWH-018 detektiert werden. Als einzige Substanz im Speichel zeigte sich die Muttersubstanz JWH-018 mit Maximalkonzentrationen von 2 bis 2036 ng/ml (vgl. Tabelle 12). Die Maximalkonzentrationen wurden jeweils in der ersten Probe nach Inhalation der Substanz gemessen. Darauf folgte ein steiler Konzentrationsabfall, der bereits zwei Stunden nach Exposition in eine exponentielle Eliminierungsphase (t_{β}) überging. Die Konzentrationen lagen nach zwei Stunden in den überwiegenden Fällen unter 1 ng/ml (C_{β}) und während der Eliminierung mit einer Halbwertszeit von im Median 1,69 Stunden sanken die Werte weiter und lagen bereits nach sechs Stunden unter der Bestimmungsgrenze von 0,024 ng/ml. Am Ende des jeweiligen Studientages, also 12 Stunden nach Konsum von JWH-018, konnten lediglich bei zwei Probandenproben noch geringe Mengen von JWH-018 nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Pharmakokinetische Eigenschaften* von JWH-018 im Speichel von 6 Probanden nach Inhalation von 2 oder 3 mg JWH-018.

Proband	C_{\max} [ng/ml]	t_{\max} [h]	C_{β} [ng/ml]	t_{β} [h]	C_{last} [ng/ml]	t_{last} [h]	$AUC_{0 \rightarrow 12 \text{ h}}$ [ng/ml * h]	$t_{1/2 \beta}$ [h]
2 mg Dosis								
1	16,2	0,08	1,26	0,50	0,05	12	6,84	2,22
3	15,5	0,08	1,25	1	0,06	12	7,09	2,58
4	61,4	0,50	0,21	2	0,04	8	25,55	2,47
5	56,6	0,08	0,87	0,75	1,18	10	15,57	1,43
6	297,9	0,08	8,42	0,75	0,15	8	62,72	1,11
7	26,4	0,08	0,66	2	0,12	6	8,71	1,69

3.3 Speichelanalyse

Proband	C_{max} [ng/ml]	t_{max} [h]	C_{beta} [ng/ml]	t_{beta} [h]	C_{last} [ng/ml]	t_{last} [h]	AUC_{0→12 h} [ng/ml * h]	t_{1/2 beta} [h]
3 mg Dosis								
1	30,1	0,08	0,91	0,75	0,05	8	7,71	1,68
3	25,0	0,08	1,33	0,75	0,05	6	6,66	1,15
4	7,6	0,08	0,08	0,50	<LLOQ	6	1,77	
5	6,5	0,08	0,14	0,75	<LLOQ	6	2,06	2,20
6	2,2	0,08	0,15	1	0,07	6	1,27	3,14
7	2036	0,08	1,94	2	0,09	8	387,73	1,35
Median (Bereich)	25,7 (2,22-2036)	0,08 (0,08-0,50)	0,89 (0,08-8,42)	0,75 (0,50-2,00)	0,05 (0,02-1,18)	8 (6-12)	7,40 (1,27-387,73)	1,69 (1,11-3,14)

* Die beobachteten Maximalkonzentrationen (C_{max}) mit der dazugehörigen Zeit (t_{max}); Beginn der beta-Phase (t_{beta}) und die zugehörige Konzentration (C_{beta}), die letzte gemessene Konzentration (C_{last}) sowie die zugehörige Zeit (t_{last}) sind dargestellt. Die Fläche unter der Kurve (Area under the curve, AUC) wurde für den Versuchstag ohne weitere Extrapolation ermittelt ($AUC_{0→12 h}$). Eliminationshalbwertszeiten wurden mithilfe exponentieller Regression der beta-Phase ermittelt ($t_{1/2 beta}$).

3.3.3 Speichel/Serum Verhältnis

Die Daten der Speichelauswertung wurden mit den zugehörigen Serumkonzentrationen in Form eines Speichel/Serum Verhältnisses verglichen (Tabelle 13). Es wurden sowohl enorme Schwankungen im Verlauf eines jeden Probandentages, als auch zwischen den Probanden festgestellt (Verhältnis Speichel/Serum als Median, Bereich: 1,38, 0,05 – 555). Der Vergleich der linearen Korrelation zwischen Speichel- und

Serumkonzentrationen ergab einen Regressionskoeffizienten von unter 0,05 und daher keine verlässliche Korrelation.

Tabelle 13: Verhältnis Speichel- zu Serumkonzentration. Angegeben als Median und Bereich (in Klammern)

Verhältnis Speichel- zu Serumkonzentration		
Proband	2 mg Dosis	3 mg Dosis
1	1,86 (0,67-3,60)	1,11 (0,67-7,76)
3	2,64 (0,47-4,60)	0,87 (0,20-5,15)
4	1,12 (0,29-80,99)	0,44 (0,05-1,42)
5	0,59 (0,19-12,41)	0,65 (0,16-2,22)
6	6,64 (3,44-84,49)	0,41 (0,20-1,65)
7	2,36 (1,07-6,66)	3,56 (0,44-554,59)
Median insgesamt	1,3	
(Bereich)	(0,05-555)	

3.4 Rückstände von JWH-018 in den Glaspfeifen

Die in Methanol gelösten Rückstände in den für die Aufnahme von JWH-018 genutzten Glaspfeifen wurden analysiert. Die Mengen der verbliebenen Rückstände von JWH-018 in den 12 Pfeifen lagen in einem Bereich von 0,09 bis 2,10 mg. Im Median blieben 1,14 mg JWH-018 der 2 und 3 mg Dosis in der Glaspfeife zurück und wurden somit nicht vom Probanden aufgenommen. Diese Ergebnisse zeigen damit deutliche Dosierungsunterschiede und eine hohe Variabilität der tatsächlich aufgenommenen Menge an JWH-018 in dieser Studie.

4 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projekts zur Feststellung des Sicherheitsprofils von JWH-018. Die Hauptintention dieser Studie war es, potentielle Risiken im Umgang mit synthetischen Cannabinoiden aufzuzeigen, sowie die pharmakokinetischen Eigenschaften von JWH-018 und der entstehenden Metaboliten zu untersuchen. Um möglichst genaue Daten über die Anflutung der Substanz in der Blutbahn, die Geschwindigkeit der Umverteilung in periphere Gewebe sowie die Bildung von Metaboliten zu erfassen, wurden Serumproben analysiert. Die Analyse der Urinproben diente zur Erfassung der Ausscheidungsprodukte sowie der Nachweisbarkeitsdauer. Letzteres ist insbesondere in Bezug auf den Einsatz von Urinkontrollen im Rahmen von Straßenverkehrs- oder Strafdelikten von Relevanz, wenn der Zeitpunkt der Aufnahme der Substanz eine Rolle spielt. Aus ähnlichem Grund spielte die Datenerhebung zur Speichelprobenentnahme nach Konsum eines synthetischen Cannabinoids eine wesentliche Rolle. Bei verlässlichem Nachweis der Droge im Speichel würde die Speichelprobenentnahme in der Forensik ein simples und nicht-invasives Verfahren darstellen.

Da es sich um die erste Probandenstudie zu dem synthetischen Cannabinoid JWH-018 handelte, wurden die verabreichten Dosierungen sehr niedrig gewählt, um mögliche Nebenwirkungen gering zu halten. Des Weiteren muss für die Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass durch die bei der Inhalation nicht vollständig verdampften Substanzanteile eine deutliche Variabilität in Bezug auf die tatsächlich aufgenommene Menge an JWH-018 vorliegt. Dies war im Vorfeld nicht erwartet worden und zeigte sich erst in einer Kontrolluntersuchung zur JWH-018 Restmenge in den für die Substanzapplikation genutzten Glaspfeifen.

4.1 Kompartiment Serum

4.1.1 JWH-018 im Serum

Die Studie ergab für JWH-018 ein ähnliches pharmakokinetisches Profil wie es von THC bekannt ist. Die Maximalkonzentrationen des Cannabinoids wurden unmittelbar nach Aufnahme erreicht und der anschließende starke Konzentrationsabfall macht eine starke Umverteilung (Distribution) wahrscheinlich. Die Distributionsphase dauerte ca. 1,5 Stunden (t_{beta} , Tabelle 5) und ist damit geringfügig länger als bei THC (1 Stunde)³⁶. Die über 12 Stunden nach Inhalation der Substanz erhobenen Daten sprechen für eine Multi-Kompartiment-Pharmakokinetik (vgl. Abbildung 2), die ebenfalls bereits für THC beschrieben worden ist⁵⁰.

Die in dieser Studie ermittelten Konzentrationen von JWH-018 im Serum sind vergleichbar mit zwei bisherigen Berichten, bei denen ein bzw. zwei Personen eine ähnliche Dosis JWH-018 in Form einer Kräutermischung geraucht haben^{19,31}. Teske et al.¹⁹ berichten z.B. über Maximalkonzentrationen im Serum von 8,1 und 10,2 ng/ml nach der Aufnahme von 2,9 mg bzw. 4,35 mg JWH-018. Nach 24 Stunden lagen die Werte für JWH-018 im Bereich der Nachweisgrenze (0,07 ng/ml) und nach 48 Stunden war JWH-018 nur noch bei einem der beiden Probanden nachweisbar. Darüber hinaus gibt es einige Fallberichte und -studien, die Serumproben u.a. aus Entzugskliniken, forensischen Psychiatriezentren oder Polizeikontrollen auf JWH-018 hin analysiert haben. Diese Daten zeigen ein großes Konzentrationsspektrum: <0,1-8,17 ng/ml (n=9, Serum)³⁹, 0,38-13 ng/ml (n=8, Serum)⁵¹, 0,02-11 ng/ml (n=23, Serum)⁴⁰, 0,08-0,46 ng/ml (n=5, Vollblut)⁵², <0,1-9,9 ng/ml (n=6, Vollblut)⁵³ und 0,3-0,8 ng/ml (n=3, Vollblut)³⁸. Deutlich höhere Konzentrationen fanden sich in post mortem Vollblutproben mit Konzentrationen von 0,1 bis 199 ng/ml (Median 17,5 ng/ml, n=18)⁴¹. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie sehr niedrige Konzentrationen in authentischen Serumproben. Damit zeigt diese Arbeit die Notwendigkeit für hochsensitive Analysemethoden zur sicheren Identifizierung synthetischer Cannabinoide.

4.1.2 Metabolite von JWH-018 im Serum

Im Serum wurden die Metaboliten 3-HOpentyl-, 4-HOpentyl-, 5-HOpentyl-, 6-HOindol-JWH-018 und JWH-018-Pentansäure identifiziert. Diese Metaboliten wurden auch bereits alle schon in Urinproben von JWH-018 Konsumenten beschrieben^{54,49,48,55}. Die JWH-018-Pentansäure zeigte in der vorliegenden Studie die höchsten Konzentrationswerte. Die Spannweite der anderen Metaboliten war untereinander sehr ähnlich (vgl. C_{max} , $C_{t\ gamma}$ und $C_{12\ h}$ in Tabelle 5 und Tabelle 6). Des Weiteren zeigten diese ebenfalls alle einen polyphasischen Konzentrationsverlauf, ähnlich zu der Muttersubstanz. Dagegen präsentierte sich bei der JWH-018 Pentansäure zunächst eine Plateauphase (vgl. Abbildung 2). Als Ursachen für dieses Plateau können eine in der Literatur beschriebene sekundäre Bildung von JWH-018 Pentansäure aus dem 5-HOpentyl Metaboliten⁵⁶ oder ein starkes enterohepatisches Cycling angesehen werden, da der Pentansäuremetabolit in hohem Maße glukuronidiert vorliegt (vgl. Tabelle 10).

Aufgrund der limitierten Beobachtungsdauer von nur 12 Stunden, konnte der weitere pharmakokinetische Verlauf nicht beurteilt werden. Hinweise darauf geben Daten einer forensischen Fallstudie mit 600 Vollblutproben, die auf die Anwesenheit von JWH-018 und den Metaboliten 5-HOpentyl-JWH-018 sowie JWH-018-Pentansäure hin analysiert wurden³⁸. Dabei wurde die JWH-018-Pentansäure in 145 Proben nachgewiesen, während 5-HOpentyl-JWH-018 nur in 92 Proben präsent war. JWH-018 wurde nur in drei Fällen über der Nachweisgrenze (0,09 ng/ml) detektiert. Die Konzentrationen der Metaboliten lagen für JWH-018-Pentansäure (Median 6,4 ng/ml, Spannweite 0,3-63,5 ng/ml) und 5-HOpentyl-JWH-018 (2,5 ng/ml, 0,3-22,7 ng/ml) insgesamt deutlich höher als in der vorliegenden Studie ($C_{max} < 0.5$ ng/ml, Tabelle 5). Diese Daten legen für reguläre Konsumenten deutlich höhere Dosen als 3 mg JWH-018 nahe. Zusätzlich könnte möglicherweise auch eine deutliche Akkumulierung der Metaboliten bei regelmäßiger Einnahme vorliegen.

Insgesamt kann aufgrund der vorliegenden Daten die JWH-018-Pentansäure als Hauptmetabolit bezeichnet werden und ist laut einer Fallstudie auch nach 20-43 (Median 27) Tagen nach Aufnahme noch nachweisbar⁵⁷.

Überraschend war das Vorkommen eines weiteren Peaks, der kurz vor der JWH-018-Pentansäure eluierte (*H11* in Abbildung 5), aber etwas unterschiedliche Qualifier/Quantifier Verhältnisse zeigte. Dieses Signal erschien in allen Serumproben im Anschluss an die Aufnahme von JWH-018 und verschwand im Verlauf schneller als JWH-018-Pentansäure. Bei diesem weiteren Metaboliten wurde zunächst ein Isomer der JWH-018-Pentansäure mit bisher unbekannter Struktur angenommen, ehe weitere Differenzierung und auch Untersuchungen der Urinproben vorgenommen wurden (siehe 4.5).

4.2 Ausscheidung im Urin

Die Urinproben der Probanden wurden sowohl auf JWH-018 als auch vermutliche Metabolite untersucht. Daten zur Urinanalyse nach der kontrollierten Drogenaufnahme sind essenziell um Verfahren zur Analyse von Proben z.B. aus Straßenverkehrskontrollen mit Verdacht auf Drogeneinfluss oder Drogenentzugsprogrammen zu und einordnen zu können.

4.2.1 Analysemethode

Das Extraktionsverfahren und die analytische Methode zur Messung der Urinproben waren grundsätzlich an das bereits für die Serumproben erfolgreich validierte Verfahren angelehnt. Mehrere Publikationen haben gezeigt, dass über den Urin größtenteils Glukuronide ausgeschieden werden^{54,43,58}, daher war zusätzlich eine Konjugatsspaltung notwendig. In früheren Arbeiten wurden dazu unterschiedliche β -Glukuronidasen, z.B. von *E. coli*, *Helix pomatia*, *Patella vulgate*, *Abalone* und Rinderleber genutzt, wobei die *Abalone* β -Glukuronidase im Hinblick auf diverse glukuronidierte JWH-018 Metabolite am detailliertesten untersucht wurde^{33,59}. Basierend auf diesen dezidierten Untersuchungen wurde eine Inkubation der Proben für zwei Stunden bei 60 °C mit 3 Units pro Mikroliter Urin bei einem pH-Wert von 4, ausgewählt.

4.2.2 JWH-018 im Urin

Die Muttersubstanz JWH-018 wurde in keiner der Urinproben innerhalb 12 Stunden nach Inhalation von bis zu 3 mg der Substanz nachgewiesen. Dieses Resultat steht im Einklang mit bisherigen Berichten zu Urinprobenanalysen, bei denen die Muttersubstanz ebenfalls nie nachgewiesen werden konnte^{48,60,38,49,61,62}. Die Ausscheidung von JWH-018 findet demnach durch die Exkretion seiner Stoffwechselprodukte in Urin statt.

4.2.3 Metabolite von JWH-018 im Urin

Bislang wurden als Hauptmetaboliten von JWH-018 im Urin Glukuronide von JWH-018-Pentansäure, 5-HOpentyl-JWH-018^{45,38} und auch 4-HOpentyl-JWH-018^{54,49} beschrieben. In-vitro Studien zum Metabolismus von JWH-018 zeigten jedoch deutlich mehr Metabolite^{47,63}, z.B. auch di- und trihydroxylierte sowie N-dealkylierte Metaboliten^{43,58}. Gleichwohl konnten in der vorliegenden Studie nur auf Metabolite, zu denen Referenzsubstanzen erhältlich waren, getestet werden. Nachgewiesen wurden daher in den Urinproben die Metabolite 3-HOpentyl-, 4-HOpentyl-, 5-HOpentyl-, 6-HOindol-JWH-018 sowie JWH-018-Pentansäure, wie von den dazugehörigen Serumproben zu erwarten war. Diese Metabolite wurden schon in Berichten zur Urinprobenanalyse von JWH-018 Konsumenten genannt^{54,49,48,47,62}. 5-HOindol-JWH-018 wurde bereits in wenigen Fällen in Urinproben nachgewiesen^{48,55} und konnte auch in dieser Studie bei einigen Probanden in Spuren gefunden werden (Daten eines repräsentativen Probanden in Abbildung 9, 8 in E). Ebenso berichtete Hutter⁵⁵ über die Anwesenheit von 4-HOindol-JWH-018 in authentischen Urinproben, was in dieser Studie ebenfalls in Spuren nachgewiesen wurde (Abbildung 9, 10 in E). Trotz der geringen Dosierung konnten auch 2-HOpentyl-JWH-018 (Abbildung 9, 6 in E) und 7-HOindol-JWH-018 (Abbildung 9, 9 in E und F) detektiert werden.

Weiterhin zeigte sich ein unbekanntes Signal, also keine für die Methode kalibrierte Substanz, neben dem 3-HOpentyl-JWH-018 (Abbildung 9, 13 in E und F). Dieses repräsentiert möglicherweise ein weiteres hydroxyliertes Isomer. Da sich das Signal weder in den Baselineproben, noch in den Proben ohne Konjugatsspaltung zeigte

(Abbildung 9, *C* und *D*) scheint es sich dabei um einen Metaboliten von JWH-018 zu handeln.

Zusätzlich enthielten alle Urinproben nach Aufnahme von JWH-018 bis zu zwei unbekannte Signale, welche die gleichen Qualifier und Quantifier Übergänge wie die JWH-018-Pentansäure zeigten (Abbildung 9, *11* in *E* und *F*, *12* in *E*), was der Beobachtung in den Serumproben entspricht. Für die weitere Ausführung siehe Kapitel 4.5.

4.2.4 JWH-073 Butansäure im Urin nach Konsum von JWH-018

Ferner wurde JWH-073 Butansäure in die Urinanalyse mit einbezogen, da diese Verbindung als weiterer Metabolit von JWH-018 fraglich war. Bei den ersten Berichten über die JWH-073 Butansäure konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, ob die gleichzeitige Aufnahme von JWH-073 und JWH-018 stattgefunden hatte^{54,46,44}, doch dann wurde die JWH-073 Butansäure im Urin zweier Testpersonen nachgewiesen, die eine nur JWH-018 enthaltende Kräutermischung konsumiert hatten⁶². Die Ergebnisse der vorliegenden kontrollierten Studie bestätigen JWH-073 Butansäure als Metaboliten von JWH-018. Die Baselineproben zeigten keine Signale für JWH-073 Butansäure (Abbildung 9, *C*), doch konnte es kurz nach Inhalation von JWH-018 detektiert werden (Abbildung 9, *2* in *D* und *E*). Des Weiteren zeigte JWH-073 Butansäure im Zeitverlauf wieder eine abnehmende Konzentration (Abbildung 9, *11* in *E* vs. *F*), was somit den direkten Zusammenhang mit der Inhalation beweist. Das Konzentrations-Zeit-Profil zeigte sich dabei ähnlich zur JWH-018-Pentansäure (Tabelle 9) und es konnte in hohem Anteil glukuronidiert nachgewiesen werden (Tabelle 10; vgl. die unterschiedlichen Signalintensitäten von *2* in *D* und *E* von Abbildung 9). Der genaue Stoffwechselweg bleibt derzeit offen.

4.2.5 Glukuronidierung der Metaboliten

Da Phase-1-Metabolite hauptsächlich glukuronidiert ausgeschieden werden⁵⁸, konnten trotz sehr geringer Nachweisgrenzen die hydroxylierten Metaboliten ohne Konjugatspaltung nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 10; vgl. Abbildung 9, *3* -

10 in *D* vs. *E*). Das in dieser Studie genutzte Enzym lag bereits in einer flüssigen Lösung einsatzbereit vor und zeigte nur geringe Sulfataseaktivität (laut Produktinformation ≤ 8000 Units/ml), sodass die Ergebnisse eine hohe Glukuronidierungsrate anzeigen. Nur JWH-018-Pentansäure und JWH-073-Butansäure lagen sowohl glukuronidiert, als auch nicht glukuronidiert vor^{44,54,33} (Abbildung 9, 1 und 2 in *D*, Tabelle 10). Das Konjugationsverhältnis wurde mit Werten von $20,4 \pm 9,0$ % und $16,9 \pm 8,6$ %³³, aber auch mit höheren Prozentanteilen bis zu 80 % berichtet^{44,54}. Die aktuellen Daten sprechen sogar für einen noch höheren Konjugatanteil (vgl. Tabelle 10), zumindest bei den sehr niedrigen Dosierungen und der Urinprobenentnahme lediglich bis zu 12 Stunden nach Inhalation. Außerdem scheint der Anteil an glukuronidierten Verbindungen bei den beiden Carbonsäuren im Zeitverlauf zuzunehmen. Es bleibt zu erwähnen, dass die ins Auge fallenden niedrigsten Konjugatverhältnisse (Tabelle 10, bspw. 15,9 % für JWH-073 Butansäure in der ersten Urinprobe nach Inhalation von JWH-018, bei einem Median von 82,3 %) aus Proben eines einzigen Teilnehmers bei der 2 mg Dosis stammen, was für eine individuell geringe Glukuronidierungsrate spricht. An dem Versuchstag der 3 mg Dosis waren für diesen Probanden die Anteile jedoch deutlich höher, was systematische, z.B. genetische Unterschiede, unwahrscheinlich erscheinen lässt.

4.2.6 Metabolitenkonzentrationen im Urin

Die Analysemethode wurde mit einem kleinsten Kalibratorlevel von 0,1 ng/ml validiert, da im Hinblick auf bisherige Literaturwerte deutlich höhere Metabolitenkonzentrationen erwartet wurden. Bei der Auswertung der Studiendaten zeigten sich jedoch einige Konzentrationen, die zwar niedriger als der geringste Kalibrator, jedoch über der Bestimmungsgrenze der Methode lagen (vgl. Tabelle 9). In bisherigen Publikationen wurden Konzentrationen von JWH-018-Pentansäure im Urin in Bereichen von 2,1 – 27.256 (Median 1.835,4, n=17)⁴⁷, <LOQ – 401 (Median 15,9, n=21)⁴⁹, 0,9 – 4,9 (Median 1,7, n=10)⁴⁵, 0,1 – 2.434 (Median 11,1, n=271)⁴⁸ oder 2,6 – 327 (Mittelwert 65,4, n=93) ng/ml³⁸ berichtet. Damit lagen die Konzentrationen in anderen Studien deutlich höher als in der vorliegenden Studie, bei der die Maximalkonzentration lediglich 5 ng/ml betrug (vgl. Tabelle 9). Somit scheinen authentische Konsumenten von JWH-018 deutlich höhere Dosierungen zu wählen, als die bis zu 3 mg wie in dieser

Studie (entspricht den Serumergebnissen, siehe 3.1.2). Die Konzentrationen der weiteren Metaboliten lagen ebenfalls deutlich unter den bisher publizierten Werten. Castaneto et al. gaben für 5-HOpentyl- und 4-HOpentyl-JWH-018, die in deren Studie nicht getrennt werden konnten, Konzentrationen zwischen 0,1 und 1.239 (Median 5,1, n=243) ng/ml an⁴⁸. Konzentrationsangaben zu 5-HOpentyl-JWH-018 reichten von 0,7 – 27 (Median 4,3, n=10)⁴⁵, 8,7 – 27,9 (Mittelwert 15,4, n=63)³⁸ und 2,5 – 511 (Median 16,5, n=21)⁴⁹ bis 2,6 – 5.530 (Median 288, n=17) ng/ml⁴⁷. Zu den übrigen Metaboliten existieren nur wenige Daten. 4-HOpentyl-JWH-018 wurde in einer Studie mit Werten kleiner der Bestimmungsgrenze bis 671 ng/ml (Median 8,4, n=20) angegeben. Zu 6-HOindol-JWH-018 wurden in drei Studien Konzentrationen von 3,1 – 36 (Median 8,3, n=6)⁴⁷, <LOQ – 4,9 (Median 2,5, n=11)⁴⁹ und 0,1 – 1,1 (Median 0,4, n=7)⁴⁸ ng/ml berichtet. Im Einklang mit diesen Berichten wurde 6-HOindol-JWH-018 nur in wenigen Urinproben und in sehr niedrigen Konzentrationen detektiert. Ebenso zeigte diese Studie für 3-HOpentyl-JWH-018 nur geringe Werte sowie 5-HOindol-JWH-018 nur in Spuren in wenigen der authentischen Proben. Letzteres wurde in einer Publikation auch nur in zwei aus 271 Urinproben regelmäßiger JWH-018 Konsumenten nachgewiesen (beide 0,2 ng/ml)⁴⁸.

Insgesamt lag die JWH-018 Pentansäure in höheren Konzentrationen vor, als die restlichen Metaboliten. Die Werte für die hydroxylierten Metaboliten erreichten bereits 10 Stunden nach Inhalation nur noch unter 1 ng/ml (Tabelle 9; Abbildung 9, 3-10 in *F* vs. 0.1 ng/ml Kalibrator *B*). Dies bestätigt die JWH-018 Pentansäure als Metaboliten mit der höchsten Konzentration und Nachweishäufigkeit in Urinproben nach Inhalation von JWH-018^{48,38}. In der gegenwärtigen Studie traten die Maximalkonzentrationen eine Stunde oder später nach Substanzaufnahme auf, was der Beobachtung einer Plateauphase in den Serumproben entspricht. Die unterschiedlichen Intensitätsverhältnisse der Signale für die JWH-018 Pentansäure oder JWH-073 Butansäure zu denen der hydroxylierten Metaboliten (z.B. 4- oder 5-HOpentyl-JWH-018) bergen Potenzial für die Bewertung des Aufnahmezeitpunkts. Die Carbonsäuren werden offensichtlich langsamer ausgeschieden als die hydroxylierten Metaboliten (vgl. Signalintensitäten von 1 oder 2 vs. 3-10 in *E* und *F* von Abbildung 9), was Rückschlüsse auf den Zeitraum des Konsums erlauben kann.

4.3 Speichelanalyse

Die Nachweisbarkeit von JWH-018 und seinen Metaboliten in Speichel wurde in diese Studie eingeschlossen, um Daten für die zukünftige Entwicklung von Drogentests und Speichelprobenanalysen zu erheben. Die einfache und daher auch für nicht-medizinisches Personal praktische Durchführung der Speichelprobenentnahme bietet in vielen Bereichen Vorteile, so zum Beispiel für Drogenkontrollen im Straßenverkehr.

4.3.1 Speichelprobengewinnung und Analyseverfahren

Das Quantisal Collection Device zeigte sich einfach in der Handhabung und bietet den Vorteil des Volumenindikators, der sich nach Aufnahme von einem Milliliter Speichel blau färbt (0.907 – 1.079 ml, n=50³⁵) und somit die Entnahme möglichst gleichbleibender Mengen Speichelflüssigkeit unterstützt. Weiterhin zeigte das Produkt für synthetische Cannabinoide eine gute Wiederfindung⁶⁴, die in der Studie für JWH-018 bei nahezu 100 % lag (vgl. Tabelle 11). Im Hinblick auf synthetische Cannabinoide zeigte sich die Aufbewahrung bei 4 °C als zufriedenstellend³⁵, und wurde auch für die Lagerung mittels Quantisal Collection Device gewonnener Speichelproben empfohlen⁶⁵. Jedoch berichtete eine aktuellere Studie die Lagerung bei -20 °C als überlegen⁶⁶, weshalb dies auch in der vorliegenden Studie praktiziert wurde. Für die Probenaufbereitung wurden statt eines separaten Extraktionsverfahrens die Eigenschaften der Quantisal Stabilisierungslösung genutzt und eine Verdünnungsmethode gewählt. Dadurch war die Sensitivität der Methode nicht mit jener der Serum- und Urinprobenanalyse vergleichbar, jedoch zeigte sich mit einem LLOQ von 0,024 ng/ml für JWH-018 eine sensitivere Nachweisbarkeit im Speichel als in bisherigen Publikationen berichtet^{67,35,68,64,66,69}.

4.3.2 JWH-018 im Speichel

JWH-018 erreichte im Speichel bereits fünf Minuten nach Konsum sehr inhomogene Spitzenwerte von 2 bis zu 2036 ng/ml (Erläuterung siehe 4.3.4). Nach der ersten Dekontaminierungsphase lagen die Konzentrationen für JWH-018 im Speichel in sehr niedrigen Bereichen und bereits eine Stunde nach Inhalation waren die Werte in 11 von

12 Fällen unter 2 ng/ml, bei einem Median von 0,89 ng/ml (Bereich 0,08 – 8,42 ng/ml). Die Angaben zum subjektiven Rauschempfinden waren jedoch auch zwei Stunden nach Aufnahme von JWH-018 noch erhöht⁷⁰. Somit wird bei der Analyse von Speichelproben bereits kurz nach Aufnahme der Substanz und noch aktivem Rauschempfinden eine sehr sensitive Analysemethode benötigt, um den Konsum von JWH-018 nachzuweisen. Die Halbwertszeit der folgenden, langsamen Eliminierungsphase zeigte eine geringe Spannweite (1,11 – 3,14 Stunden) und der Median von 1,69 Stunden ist ähnlich wie die für THC bestimmte Halbwertszeit^{36,71}. Somit scheinen ähnliche Eliminierungsmechanismen in der Mundhöhle für verschiedene inhalierte Substanzen zuzutreffen.

Die Muttersubstanz JWH-018 konnte am Ende des Studientages (12 Stunden nach Inhalation) nur noch in 2 von 12 Fällen in Konzentrationen von ca. 0,05 ng/ml nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Coulter et al.³⁵. Dort wurden Speichelproben zweier Testpersonen nach Konsum der Kräutermischungen „Blueberry Posh“ und „Black Mamba“ (Dosierung nicht angegeben) mit Maximalkonzentrationen von 35 und 3 ng/ml und demnach ähnlich wie in der vorliegenden Studie angegeben. Bei einem der Probanden war die Speichelprobe auch 12 Stunden später noch positiv (0,5 ng/ml, gleichzeitig Bestimmungsgrenze der Methode). Ähnlich niedrige Konzentrationen wurden in zwei Studien mit authentischen Speichelproben beschrieben: 0,30, 0,41, 0,53 und 1,2 ng/ml⁶⁸ sowie 0,36, 0,57, 0,59, 3,51 und 12,5 ng/ml⁶⁶. Damit bestätigt sich zum wiederholten Male die Notwendigkeit hochsensitiver Messmethoden im Nachweis synthetischer Cannabinoide.

4.3.3 Metabolite von JWH-018 im Speichel

Im Rahmen der Nachweisgrenze von ca. 0,05 ng/ml für alle validierten Metabolite, konnten in den vorliegenden Speichelproben keine Stoffwechselprodukte von JWH-018 detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie zur Nachweisbarkeit der synthetischen Cannabinoide UR-144 und XLR11 in authentischen Speichelproben auch ein hydroxylierter Metabolit von UR-144 detektiert. Allerdings kamen jeweils Proben nur mit Metaboliten- und nur mit Muttersubstanznachweis vor und die Konzentrationen der Muttersubstanz lagen meist höher als 5 ng/ml⁷². Ein Erklärungsversuch für diese

inkonsistenten Ergebnisse war die unbekannte Dauer zwischen Drogenaufnahme und Probenentnahme. Eine weitere Studie zeigte deutliche Zeitunterschiede bei der Nachweisbarkeit synthetischer Cannabinoide in Speichelproben nach oraler Aufnahme⁷³. Daher können die aktuellen Ergebnisse nicht unbedingt auf andere synthetische Cannabinoide übertragen werden.

4.3.4 Aspekt der Mundhöhlenkontamination

JWH-018 wurde in diesem Experiment durch Inhalation aufgenommen. Ergebnisse einer Studie zur Nachweisbarkeit eines weiteren synthetischen Cannabinoids (AM-2201) nach oraler Aufnahme suggerieren für synthetische Cannabinoide eine nur sehr geringe Exkretionsrate über die Speicheldrüsen⁷³. Ebenso ist aus Versuchen mit Cannabis eine Kontamination der Mundhöhle bekannt, die zu extrem hohen Messwerten im Anschluss an die Inhalation führt^{36,71}, gefolgt von einem starken Konzentrationsabfall innerhalb der nächsten Stunde. Diese pharmakokinetische Besonderheit konnte ebenfalls für JWH-018 festgestellt werden (Tabelle 12), jedoch mit einem deutlich niedrigeren Konzentrationsmaximum (Median 25,7 ng/ml, Höchstkonzentration 2036 ng/ml) als bei regelmäßigen THC Konsumenten beobachtet (Median 1242 ng/ml, Höchstkonzentration 6438 ng/ml⁷¹). Diese Tatsache kann hier sowohl an den sehr geringen Dosierungen liegen (3 mg JWH-018 vs. etwa 33 mg THC), oder die eigentliche Maximalkonzentration wurde bereits verpasst, da die erste Probe erst fünf Minuten nach Substanzaufnahme entnommen wurde. Weiterhin spielt die Kontamination der Mundhöhle eine wichtige Rolle und ist erwartungsgemäß verbunden mit großen interindividuellen Konzentrationsunterschieden⁷³.

4.3.5 Speichel/Serum Verhältnis

Tönnies untersuchte bereits mehrmals die Nachweisbarkeit von Drogen im Speichel in Korrelation zu Blut-/Serumkonzentrationen sowie beeinträchtigenden Symptomen⁷⁴, wobei im Ergebnis die Blut-/Serumkonzentrationen nicht verlässlich auf Basis der Speichelwerte hergeleitet werden konnten^{71,75}. Dies zeigte sich auch für JWH-018 in der vorliegenden Studie. Bereits der viel stärker ausgeprägte Konzentrationsabfall nach t_{\max}

beim Speichel im Vergleich zum Serum (vgl. Abbildung 12) sprach gegen eine ausgeprägte Korrelation. Die Nachweisbarkeit von JWH-018 war im Speichel kürzer als im Serum, was sich mit der höheren analytischen Sensitivität der Serummethode erklären lässt. Andererseits erfolgten bei Kneisel et al.⁶⁸ bereits Nachweise von JWH-018 im Speichel (0,41, 0,53 und 1,2 ng/ml) ohne Nachweis in den zugehörigen Serumproben, was auch schon für andere Drogen berichtet wurde⁷⁵. Insgesamt waren sich die Speichel- und Serumkonzentrationen am Ende der ersten Eliminierungsphase zwar ähnlich (vgl. Abbildung 12) mit einem Speichel/Serum Verhältnis von 1,38 im Median (vgl. Tabelle 13), jedoch mit einer sehr hohen Variabilität sowohl zwischen den Versuchstagen als auch den Versuchspersonen (Bereich 0,05 bis 555, Tabelle 13).

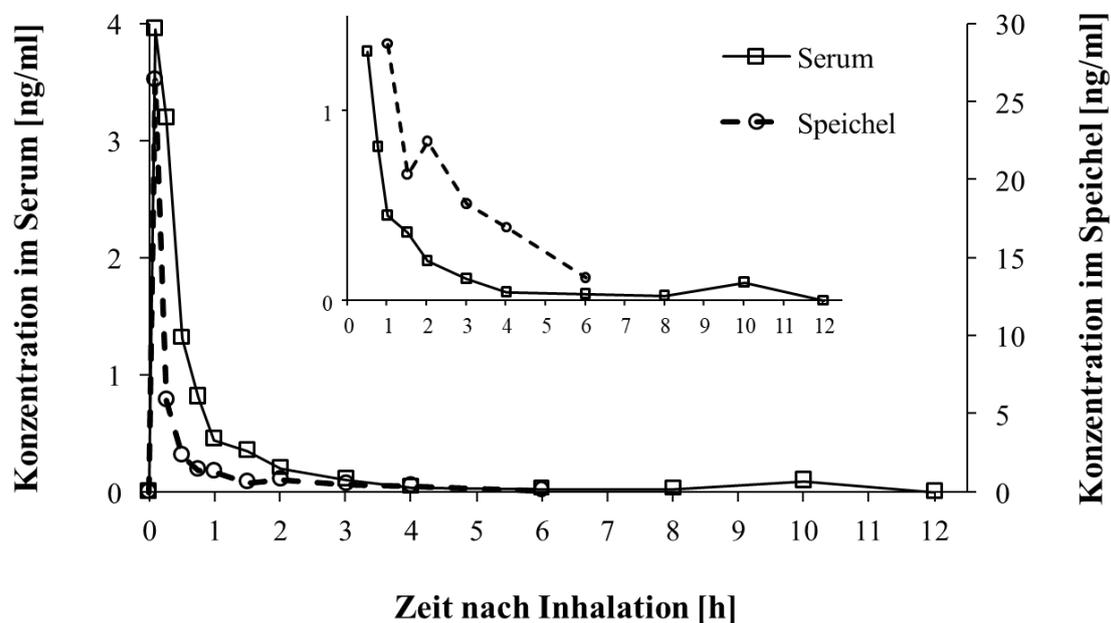


Abbildung 12: Konzentrations-Zeit-Kurve des inhalierten JWH-018 im Serum und Speichel. Konzentrations-Zeit Daten für JWH-018 sind von einem repräsentativen Probanden dargestellt (#7, 2 mg JWH-018), dessen detaillierten Serumdaten in Abbildung 2 dargestellt sind. Eingefügt ist eine Illustration des Konzentration-Zeit-Verlaufs unter 1 ng/ml.

4.4 Positive Ergebnisse in Baselineproben

Bei der Durchführung der Studie mit drei Versuchstagen (Plazebo, 2 und 3 mg JWH-018), kam es aufgrund organisatorischer Gründe zu unterschiedlich langen Abständen zwischen der Verabreichung der niedrigeren und der höheren Dosis (3, 4, 8, 9 oder 13 Wochen). Aufgrund der Ergebnisse von Teske et al.¹⁹, wurde im Vorfeld angenommen, dass ein Mindestabstand von einer Woche zwischen den Testtagen für eine vollständige Ausscheidung von JWH-018 genügen würde. Daher war es sehr überraschend, dass nicht alle der zu Beginn jeden Studientages erhobenen Baselineproben negativ waren.

4.4.1 Serum Baselineproben

Es fanden sich Spuren der Metaboliten 4-, 5-HOpentyl-JWH-018 und JWH-018-Pentansäure in den Baselineproben zweier Probanden vor Gabe der 3 mg Dosis (Abbildung 8). Diese Probanden hatten auch mit 3 und 4 Wochen die kürzesten Zeitabstände zwischen der 2 mg und der 3 mg Dosis. Nur bei einem Probanden wurde JWH-018-Pentansäure nachgewiesen, was mit individuellen Unterschieden in der Metabolitenausscheidung begründbar wäre⁴⁹. Es bestätigt in jedem Fall die Empfehlung von Hegstadt et al.⁵⁷, bei Drogentests mehr als nur einen Metaboliten zu analysieren.

Aufgrund der niedrigen, aber nur langsam abnehmenden Konzentrationen der Metaboliten (vgl. $C_{t_{\text{gamma}}}$ vs. $C_{12\text{ h}}$ in Tabelle 6 und Abbildung 2) sechs bis acht Stunden nach Applikation der Substanz (t_{gamma} in Tabelle 6), wird eine verlängerte Ausscheidung der Metaboliten angenommen. Dies lässt eine langanhaltende Detektion in Serumproben auch nach Aufnahme sehr geringer Dosen vermuten. Obwohl Teske et al.¹⁹ JWH-018 nach 48 Stunden nur noch bei einem von zwei Probanden nachgewiesen haben, lässt diese Studie Vermutungen über eine länger andauernde Nachweisbarkeit, bei einer entsprechend sensitiven analytischen Methode, zu. Eine weitere Erklärung für die positiven Baselineproben wäre der eigenständige Konsum von JWH-018 zwischen den Versuchstagen. Dies kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, da die Probanden unter keiner Überwachung standen. Andererseits zeigt ein Monitoring des niederländischen Drogenmarktes so gut wie keinen Gebrauch von synthetischen

Cannabinoiden (persönliche Mitteilung von Dr. Tibor Brunt, Trimbos instituut, Niederlande).

4.4.2 Urin Baselineproben

Die den positiven Serum Baselineproben zugehörigen Urinproben waren ebenso auffällig. Allerdings wurde als einziger Metabolit die JWH-018-Pentansäure nachgewiesen (Tabelle 9; Abbildung 11), mit Konzentrationen unter 0,02 ng/ml. Zusätzlich wurden auch zwei Baselineurinproben am Tag der Plazebogabe, zwei Wochen nach Inhalation der 3 mg Dosis, positiv getestet (# 6.3 und # 7.3, Abbildung 11). Eine lange Nachweisbarkeit des Säuremetaboliten im Urin wurde bereits von Hegstadt et al.⁵⁷ berichtet, wo Urinproben von Patienten im Rahmen eines Entzugs positiv ausfielen und der berichtete Abstand zum letzten Konsum von JWH-018 oder JWH-073 20 bzw. 43 Tage betrug. Damit bekräftigen diese Ergebnisse die Empfehlung, JWH-018-Pentansäure, nach Konjugatspaltung, als Hauptmetaboliten bei der Analyse von Urinproben anzusehen⁴⁷.

4.4.3 Speichel Baselineproben

Alle Speichel Baselineproben zeigten sich negativ für JWH-018 und seine Metabolite. Dies steht im Einklang mit der Annahme einer, wenn überhaupt, nur sehr geringen Exkretionsrate von synthetischen Cannabinoiden in den Speichel. Positive Speichelproben stehen in Verbindung mit einer erst kürzlichen oralen bzw. inhalativen Aufnahme von JWH-018 und sind daher bei einem Zeitraum von über zwei Wochen nach letztem Konsum nicht zu erwarten.

4.4.4 Interpretation

Die Ergebnisse der Baselineproben zeigen eine deutlich längere Ausscheidung von JWH-018 und seinen Metaboliten, als bisher angenommen. Es wurde bereits berichtet, dass sich die Muttersubstanz JWH-018 z.B. nach wiederholter Aufnahme, im Fettgewebe akkumuliert⁴¹. Die aktuellen Ergebnisse legen dies ebenso für die

Metabolite nahe. Dies kann verschiedene Auswirkungen zur Folge haben. Zum Beispiel kann die Dauer der cannabimimetischen Wirkweise deutlich verlängert sein. Nicht nur JWH-018 selbst, sondern auch hydroxylierte Metaboliten wirken am Cannabinoidrezeptor als Agonisten⁷⁶, wobei dies für 3- und 4-HOpentyl-JWH-018 noch nicht erforscht wurde. 5-HOpentyl-JWH-018 und 6-HOindol-JWH-018 zeigen hingegen volle Agonistaktivität und bewirken sogar eine stärkere G-Protein-Stimulation als Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. Daher wird davon ausgegangen, dass diese Metaboliten zu der Wirkung von JWH-018 beitragen⁷⁶. Die langsame Eliminierung von Hydroxymetaboliten, sowie die mögliche Akkumulierung können zu höheren Serumkonzentrationen regelmäßiger Konsumenten führen, wie Öztürk et al.³⁸ bereits zeigten. In der Schlussfolgerung können höhere Metabolitkonzentrationen zu langanhaltenden psychischen und physischen Effekten führen. Weiterhin kann durch die Anwesenheit dieser psychoaktiven Substanzen über längere Zeit eine Toleranz gegenüber deren Wirkung entstehen, sodass regelmäßige Konsumenten in der Folge immer höhere Konzentrationen von JWH-018 benötigen, um das gleiche Level an subjektiven Effekten zu erreichen.

4.5 Hydroxy-Keto-Metabolite

In dieser Studie konnten lediglich die Hydroxy- und Säuremetaboliten von JWH-018 identifiziert werden, von denen Referenzsubstanz verfügbar war. In-vitro Studien zum Metabolismus von JWH-018 zeigen die Existenz einer weiten Bandbreite an Metaboliten^{47,63}. So wurden sogar di- und trihydroxylierte, sowie N-dealkylierte Stoffwechselprodukte im Urin von Konsumenten nachgewiesen^{43,58}. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen sowohl im Serum als auch im Urin die Anwesenheit weiterer Metaboliten. Die entsprechenden Signale kommen nur in den authentischen Proben nach Inhalation und nicht in den Baselineproben vor (vgl. für Serum Abbildung 5, *II* in *H* aber nicht in *I*; für Urin Abbildung 9, *II* und *II* in *E* aber nicht in *C*). Das analytische Signal trat bereits kurz nach Inhalation von JWH-018 auf und verringerte sich im Zeitverlauf (Abbildung 9, *II* in *E* vs. *F*). Weiterhin weisen die analytischen Daten darauf hin, dass der Metabolit im Urin konjugiert vorliegt (Abbildung 9, *II* und *II* in *E* aber nicht in *D*). Die Identität des Metaboliten kann ohne das Vorliegen der passenden

Referenzsubstanz nicht sicher geklärt werden. Jedoch entsprechen seine massenspektrometrischen Eigenschaften denen von Analyten, die in einer in-vitro Metabolismusstudie gefunden und mit Prekursormassen von m/z 372 und Produktionen von 127 und 155 angegeben wurden⁶³, und auch schon in einer Urinprobe zusammen mit Glukuroniden beobachtet wurden⁵⁸. Bei diesen Analyten wurde vermutet, dass es sich um dihydroxylierte Isomere von JWH-018 mit einem dehydrierten Alkylrest - Hydroxy-Keto-Metabolite - handelt. Die Bildung ist relativ komplex und erfordert mindestens drei Stoffwechselschritte (zwei Hydroxylierungen, gefolgt von einer Glukuronidierung). Gleichwohl zeigen diese Studienergebnisse, dass die Anwesenheit eines solchen Metaboliten als reguläres Stoffwechselprodukt bereits nach Inhalation geringer Dosen JWH-018 erwartet werden kann. Die Analyse erfolgt zusammen mit dem Hauptmetaboliten JWH-018 Pentansäure.

4.6 Rückstände von JWH-018 in den Glaspfeifen

Die Variabilität der Menge des in den Glaspfeifen verbliebenen JWH-018 war mit 0,09 bis 2,10 mg enorm. Da die Pfeifen im Nachhinein nicht den jeweiligen Probanden zuzuordnen waren, konnte keine nachträgliche Bilanzierung der Pharmakokinetik durchgeführt werden. Es zeigt jedoch deutlich, dass die tatsächlich aufgenommene Menge JWH-018 in dieser Studie stark schwankte und erklärt, weshalb bei der Auswertung der Serum-, Urin- und Speichelproben kein signifikanter Unterschied zwischen der 2 mg und der 3 mg Dosis besteht. Für weiterführende Studien sollte daher die Applikation von JWH-018 verbessert werden.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser erstmalig durchgeführten kontrollierten Studie zum Konsum des synthetischen Cannabinoids JWH-018 konnten einige pharmakokinetische Eigenschaften der Substanz ermittelt werden. Im Serum zeigten sich sowohl JWH-018 als auch sechs Metabolite. Die Urinproben hingegen blieben ohne Nachweis von JWH-018, dafür wurden insgesamt 13 glukuronidierte Metabolite nachgewiesen, von denen die Struktur dreier Metabolite noch nicht abschließend geklärt ist. Die JWH-018 Pentansäure bestätigte

sich als Hauptmetabolit im Urin. Im Speichel ergibt sich nur eine kurze Nachweisbarkeitsspanne für die Muttersubstanz.

Die Pharmakokinetik sprach für die Beteiligung mehrerer Kompartimente, wie schon für THC beschrieben. Die positiven Baselineproben nach 21 und 31 Tagen zeigten eine lange Eliminationszeit und machen eine Akkumulation der Substanz wahrscheinlich. Dies kann sowohl mit langanhaltenden Effekten als auch unterschiedlichen Toleranzverhalten einhergehen. Insgesamt zeigt sich daher die Notwendigkeit weiterführender Studien zu dieser Substanz, insbesondere mit höheren, authentischen Dosierungen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Synthetische Cannabinoide sind seit Anfang der 2000er Jahre als Alternative zum Cannabiskonsum bekannt. Als erstes synthetisches Cannabinoid konnte JWH-018 in dem Produkt „Spice“ identifiziert werden. Aufgrund von teils behandlungspflichtigen, erheblichen Nebenwirkungen sowie von Todesfällen wurden bislang keine Probandenstudien durchgeführt.

Als erste kontrollierte Untersuchung wurde eine Pilotstudie mit sechs Probanden und sehr niedrigen Dosierungen (2 und 3 mg im Vergleich mit Placebo) mit der am besten erforschten Substanz, JWH-018, abgeschlossen. Mit der Entnahme von 14 Serum- und Speichel- sowie 5 Urinproben über einen Zeitraum von 12 Stunden nach Inhalation sollten Daten zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus erhoben werden.

Blut, Urin und Speichel wurden nach flüssig-flüssig Extraktion mittels Flüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie analysiert. Die Methoden wurden nach aktuellen Richtlinien vollständig validiert.

Serumkonzentrationen wurden zur Korrelation mit beobachteten Wirkungen bestimmt. Die maximale Serumkonzentration von JWH-018 erreichte bereits 5 min nach Inhalation 2,9-9,9 ng/ml und nahm innerhalb der nächsten 1,5 h deutlich ab, gefolgt von einem multiexponentiellen Abfall ($t_{1/2}$ im Median 1,3 h und 5,7 h). Bei zwei Probanden lagen noch bis zu 4 Wochen nach der Applikation Spuren von JWH-018 vor. Die Konzentration des Pentansäuremetaboliten war etwas höher als die der 3-, 4- und 5-Hydroxypentylmetaboliten und des 6-Hydroxyindolmetaboliten. Bei der JWH-018 Pentansäure zeigte sich jedoch im Vergleich ein späteres Erreichen der Maximalkonzentration sowie eine deutliche Plateauphase, was sich durch enterohepatisches Cycling erklären lassen könnte.

Speicheltests dienen im forensischen wie klinischen Umfeld häufig als Schnelltest und als Indikator für anhaltende Wirkungen. Die Speichelasservierung und -lagerung erfolgte mit dem Quantisal-System. Maximale Konzentrationen von JWH-018 waren 2,2-2036 (Median 25,7) ng/ml direkt nach Inhalation und sanken in der nächsten Stunde auf nur 0,08-8,42 (Median 0,89) ng/ml, Metabolite wurden nicht nachgewiesen. Innerhalb der Eliminationsphase (mittlere Halbwertszeit 1,69 h) konnte JWH-018 während 6-12 (Median 8) h nachgewiesen werden (0,024 ng/ml Quantifizierungs-

grenze). Das Konzentrationsverhältnis von Speichel zu Serum variierte intra- und interindividuell stark in einem Bereich von 0,05-555 (Median 1,38) ng/ml, was eine Extrapolation der Speichelkonzentrationen auf Serum/Plasma ausschließt.

Urin wurde zu mindestens 5 Zeitpunkten entnommen und sowohl mit, als auch ohne β -Glukuronidasebehandlung analysiert. Die Muttersubstanz war nicht nachweisbar, dafür 13 ihrer Metaboliten, die alle hochgradig konjugiert vorlagen. Die Konzentrationen des vorherrschenden Metaboliten, JWH-018 Pentansäure, lagen unter 5 ng/ml, wurden aber bei zwei Probanden noch bis zu 4 Wochen nach der Einnahme nachgewiesen. Die JWH-073 Butansäure wurde in die Urinanalyse miteinbezogen, da es Hinweise auf eine metabolische Bildung gab. Die Untersuchungsergebnisse können klar belegen, dass die Butansäure als Metabolit nach Konsum von JWH-018 entsteht. Wie im Serum wurden die Metabolite 3-, 4- und 5-Hydroxypentyl- sowie 6-Hydroxyindol-JWH-018 nachgewiesen. Zusätzlich zeigten sich aber auch geringe Signale von 4-, 5- und 7-Hydroxyindol- sowie von 2-Hydroxypentyl-JWH-018 und ein Signal neben dem 3-Hydroxypentylmetaboliten, welches ein weiteres hydroxyliertes Isomer repräsentieren dürfte. Weiterhin zeigten sich wie bereits im Serum auch in allen Urinproben bis zu zwei Messsignale mit den gleichen Fragmenten wie die JWH-018 Pentansäure. In Anlehnung an eine in-vitro Metabolismusstudie ist davon auszugehen, dass es sich um dihydroxylierte und dehydrierte Isomere von JWH-018 handelt, die als Hydroxy-Keto-Metabolite postuliert wurden. Im Allgemeinen lagen hydroxylierte Metaboliten bereits 10 h nach der Inhalation in Konzentrationen von weniger als 1 ng/ml vor. Die unterschiedliche Ausscheidung von Carbonsäuren und hydroxylierten Metaboliten kann bei der Einordnung des Konsumzeitpunkts helfen. Alle Konzentrationen lagen deutlich niedriger als für Urinproben von authentischen JWH-018 Konsumenten beschrieben.

Bei der Auswertung der Messdaten in Bezug auf die 2 mg und die 3 mg Dosis ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen, was sich nach Untersuchung der nicht inhalierten Restmengen durch erhebliche Schwankungen in der Applikation erklären lässt.

Die Daten sprechen für eine ausgeprägte Mehrkompartimentkinetik und eine langsame terminale Eliminierung von JWH-018 und allen Metaboliten, was zu einer Akkumulation bei chronischen Konsumenten führen kann. Dies ähnelt den Erfahrungen mit dem Cannabiswirkstoff Tetrahydrocannabinol (THC) und legt langanhaltende Effekte und eine Toleranzentwicklung nahe.

6 ABSTRACT

Synthetic cannabinoids are known as an alternative to cannabis since the beginning of the 2000s. The first synthetic cannabinoid identified in a “spice” product was JWH-018. Because of severe side effects that required medical treatment and even reported cases of death, controlled studies have been lacking.

As a first controlled study, a pilot study with six subjects and rather low doses (2 and 3 mg compared to placebo) of the best-known substance, JWH-018, was performed. To collect data on pharmacokinetics and metabolism, 14 serum- and oral fluid- and at least 5 urine samples were taken up to 12 hours after administration.

Blood, urine and oral fluid were analysed via liquid chromatography-tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. The methods were entirely validated according to current guidelines.

Serum concentrations were determined for correlation to observed effects. Maximum concentrations of JWH-018 reached 2.9-9.9 ng/ml only 5 min after inhalation and decreased significantly during the next 1.5 h, followed by an multiexponential decrease ($t_{1/2}$ as median 1.3 h and 5.7 h). In two subjects traces of JWH-018 were detected up to 4 weeks after inhalation of the substance. The concentration of the pentanoic acid metabolite was higher than those of the 3-, 4- and 5-hydroxypentyl metabolites and the 6-hydroxyindole metabolite. In comparison the pentanoic acid reached maximum concentrations later and a plateau phase was observed, for this enterohepatic cycling could be an explanation.

Oral fluid samples are often used in forensic and clinical settings as a quick test and an indicator for persistent effects. The asservation and storing of the oral fluid samples was accomplished with the quantisal-system. Maximum concentrations of JWH-018 were between 2.2 to 2036 (median 25.7) ng/ml immediately after inhalation and decreased within the next hour to only 0.08-8.42 (median 0.89) ng/ml, metabolites were not detected. For the duration of the elimination phase (mean half-life 1.69 h) JWH-018 was detected (limit of quantification 0.024 ng/ml) for 6-12 (median 8) h. The concentration

ratio of oral fluid to serum was intra- and interindividual highly variable in a range from 0.05 to 555 (median 1.38) ng/ml, which excludes an extrapolation of oral fluid to serum concentration.

At least 5 urine samples were taken and analysed with and without β -glucuronidase treatment. The parent compound was not detectable, but 13 of its metabolites, all highly glucuronidated. The concentrations of the main metabolite, JWH-018 pentanoic acid, were lower than 5 ng/ml, but still detectable up to 4 weeks after administration in two subjects. JWH-073 butanoic acid was added to the urine analysis, because there were hints on its metabolic formation. The results clearly state JWH-073 butanoic acid as a regular metabolite after consumption of JWH-018. In accordance with serum, the JWH-018 3-, 4- and 5-hydroxypentyl metabolites as well as the 6-hydroxyindole metabolite were identified. Furthermore, low signals of 4-, 5- and 7-hydroxyindole and 2-hydroxypentyl showed up as well as another signal next to the 3-hydroxypentyl metabolite, which is likely to be another hydroxylated isomer. On top of that, like in serum, all urine samples showed up to two more signals with the same fragments as JWH-018 pentanoic acid. Referring to an in-vitro metabolism study it is to assume that they are dihydroxylation isomers of JWH-018 with a dehydrated alkyl residue. In general, the concentration of the hydroxylated metabolites was under 1 ng/ml only 10 h after inhalation. The different elimination of carboxylic acids and hydroxylated metabolites may help to classify the time of consumption. All concentrations were markedly lower than found in urine samples of authentic JWH-018 consumers.

Evaluation of the data showed no significant difference between the 2 mg and 3 mg doses, explained by the analysis of the not inhaled residues, which showed high variability in the application.

The present data suggest multi-compartment pharmacokinetics and a prolonged terminal elimination of JWH-018 and all metabolites, which may cause accumulation in chronic consumer. This is similar to the active substance of cannabis, tetrahydrocannabinol (THC), and suggests long-lasting effects and tolerance development.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Synthetic cannabinoids and 'Spice' drug profile. <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids>. Zuletzt besucht am 10.12.2018.
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *European Drug Report 2016: Trends and Developments*; 2016.
3. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 1964;86(8):1646-1647.
4. Kabelik J, Krejci Z, Santavy F. Cannabis as a medicament. *bulletin on narcotics*. 1960:5-23.
5. Russo EB. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chemistry & biodiversity*. 2007;4(8):1614-1648.
6. ESPAD Group. *ESPAD Report 2015: Results from the European School Surevey Project on Alcohol and Other Drugs*; 2016.
7. Substance Abuse and Mental Health Services Administration. Key Substance Use and Mental Health Indicators in the United States: Results from the 2017 National Survey on Drug Use and Health. 2018.
8. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, et al. Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA*. 2015;313(24):2456-2473.

9. Gesetz zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften. In:
Bundesgesetzblatt Teil 1, S.403-405 (Nr.11); 2017
10. Ramaekers JG, Moeller MR, van Ruitenbeek P, Theunissen EL, Schneider E, Kauert G. Cognition and motor control as a function of Delta9-THC concentration in serum and oral fluid: Limits of impairment. *Drug Alcohol Depend.* 2006;85(2):114-122.
11. Ramaekers JG, Kauert G, van Ruitenbeek P, Theunissen EL, Schneider E, Moeller MR. High-Potency Marijuana Impairs Executive Function and Inhibitory Motor Control. *Neuropsychopharmacology.* 2006;31(10):2296.
12. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Perspectives on drugs - Synthetic cannabinoids in Europe*; 2016.
13. Simolka K, Lindigkeit R, Schiebel H-M, Papke U, Ernst L, Beuerle T. Analysis of synthetic cannabinoids in “spice-like” herbal highs: Snapshot of the German market in summer 2011. *Anal Bioanal Chem.* 2012;404(1):157-171.
14. Seely KA, Lapoint J, Moran JH, Fattore L. Spice drugs are more than harmless herbal blends: a review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;39(2):234-243.
15. Lindigkeit R, Boehme A, Eiserloh I, et al. Spice: A never ending story? *Forensic Sci Int.* 2009;191(1-3):58-63.
16. Huffman JW, Dai D, Martin BR, Compton DR. Design, Synthesis and Pharmacology of Cannabimimetic Indoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 1994;4(4):563-566.

17. Expert Committee on Drug Dependence, WHO. *JWH-018 Critical Review Report: Agenda item 4.5*. Genf; 2014.
18. Every-Palmer S. Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: An explorative study. *Drug Alcohol Depend.* 2011;117(2-3):152-157.
19. Teske J, Weller J-P, Fieguth A, Rothämel T, Schulz Y, Tröger HD. Sensitive and rapid quantification of the cannabinoid receptor agonist naphthalen-1-yl-(1-pentylindol-3-yl)methanone (JWH-018) in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(27):2659-2663.
20. Schneir AB, Cullen J, Ly BT. “Spice” Girls: Synthetic Cannabinoid Intoxication: Synthetic Cannabinoid Intoxication. *J Emerg Med.* 2011;40(3):296-299.
21. Sherpa D, Paudel BM, Subedi BH, Chow RD. Synthetic cannabinoids: the multi-organ failure and metabolic derangements associated with getting high. *J Community Hosp Intern Med Perspect.* [case report]. 2015;5(4):27540.
22. Young AC, Schwarz E, Medina G, et al. Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. *The American journal of emergency medicine.* [case report]. 2012;30(7):1320.
23. Mir A, Obafemi A, Young A, Kane C. Myocardial infarction associated with use of the synthetic cannabinoid K2. *Pediatrics.* 2011;128(6):e1622-7.
24. Castaneto MS, Gorelick DA, Desrosiers NA, Hartman RL, Pirard S, Huestis MA. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug Alcohol Depend.* 2014;144:12-41.

25. Zweiundzwanzigste Verordnung zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher Vorschriften: 22. BtMÄndV. In: *Bundesgesetzblatt Teil I, S.49 (Nr.3)*; 2009
26. Ernst L, Krüger K, Lindigkeit R, Schiebel H-M, Beuerle T. Synthetic cannabinoids in “spice-like” herbal blends: First appearance of JWH-307 and recurrence of JWH-018 on the German market. *Forensic Sci Int.* 2012;222(1-3):216-222.
27. Neue-psychoaktive-Stoffe-Gesetz (NpSG). In: *Bundesgesetzblatt Teil I, S. 2615 (Nr. 55)*; 2016.
28. Peters FT, Hartung M, Herbold M, Schmitt G, Daldrup T, Mußhoff F. Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen: Anhang B - Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden. *Toxichem Krimtech.* 2009;76(3):185-208.
29. Kolb M, Bahr A, Hippich S, Schulz W. Calculation of Detection Limit, Identification Limit and Determination Limit according to DIN 32645 with the Aid of a Computer Programs. *Acta hydrochim hydrobiol.* 1993;21(6):308-311.
30. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* 2003;75(13):3019-3030.
31. Kacinko SL, Xu A, Homan JW, McMullin MM, Warrington DM, Logan BK. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of JWH-018, JWH-073, JWH-019, and JWH-250 in human whole blood. *J Anal Toxicol.* 2011;35(7):386-393.

32. Ammann J, McLaren JM, Gerostamoulos D, Beyer J. Detection and quantification of new designer drugs in human blood: Part 1 - Synthetic cannabinoids. *J Anal Toxicol.* 2012;36(6):372-380.
33. Malik-Wolf B, Vorce S, Holler J, Bosy T. Evaluation of abalone β -glucuronidase substitution in current urine hydrolysis procedures. *J Anal Toxicol.* 2014;38(3):171-176.
34. Scheidweiler KB, Huestis MA. Simultaneous quantification of 20 synthetic cannabinoids and 21 metabolites, and semi-quantification of 12 alkyl hydroxy metabolites in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2014;1327:105-117.
35. Coulter C, Garnier M, Moore C. Synthetic cannabinoids in oral fluid. *J Anal Toxicol.* 2011;35(7):424-430.
36. Kauert GF, Ramaekers JG, Schneider E, Moeller MR, Toennes SW. Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in serum and oral fluid. *J Anal Toxicol.* 2007;31(5):288-293.
37. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J Anal Toxicol.* 2008;32(7):470-477.
38. Öztürk YE, Yeter O, Alpertunga B. Validation of JWH-018 and its metabolites in blood and urine by UPLC-MS/MS: Monitoring in forensic cases. *Forensic Sci Int.* 2015;248:88-93.

39. Dresen S, Kneisel S, Weinmann W, Zimmermann R, Auwärter V. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type and methanandamide in serum and its application to forensic samples. *J Mass Spectrom.* 2011;46(2):163-171.
40. Kneisel S, Auwärter V. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry after liquid-liquid extraction. *J Mass Spectrom.* 2012;47(7):825-835.
41. Shanks KG, Dahn T, Terrell AR. Detection of JWH-018 and JWH-073 by UPLC-MS-MS in postmortem whole blood casework. *J Anal Toxicol.* 2012;36(3):145-152.
42. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010;99(3):306-314.
43. Sobolevsky T, Prasolov I, Rodchenkov G. Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Sci Int.* 2010;200(1-3):141-147.
44. Moran CL, Le V-H, Chimalakonda KC, et al. Quantitative measurement of JWH-018 and JWH-073 metabolites excreted in human urine. *Anal Chem.* 2011;83(11):4228-4236.
45. Berg T, Kaur L, Risnes A, Havig SM, Karinen R. Determination of a selection of synthetic cannabinoids and metabolites in urine by UHPSFC-MS/MS and by UHPLC-MS/MS. *Drug Test Anal.* 2016;8(7):708-722.

46. Sundström M, Pelander A, Angerer V, Hutter M, Kneisel S, Ojanperä I. A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(26):8463-8474.
47. ElSohly MA, Gul W, Elsohly KM, Murphy TP, Madgula VLM, Khan SI. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine specimens for K2 (JWH-018) metabolites. *J Anal Toxicol.* 2011;35(7):487-495.
48. Castaneto MS, Scheidweiler KB, Gandhi A, et al. Quantitative urine confirmatory testing for synthetic cannabinoids in randomly collected urine specimens. *Drug Test Anal.* 2015;7(6):483-493.
49. Jang M, Yang W, Choi H, et al. Monitoring of urinary metabolites of JWH-018 and JWH-073 in legal cases. *Forensic Sci Int.* 2013;231(1-3):13-19.
50. Hunt CA, Jones RT. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;215(1):35-44.
51. Hermanns-Clausen M, Kneisel S, Szabo B, Auwärter V. Acute toxicity due to the confirmed consumption of synthetic cannabinoids: Clinical and laboratory findings. *Addiction.* 2013;108(3):534-544.
52. Tuv SS, Krabseth H, Karinen R, Olsen KM, Øiestad EL, Vindenes V. Prevalence of synthetic cannabinoids in blood samples from Norwegian drivers suspected of impaired driving during a seven weeks period. *Accid Anal Prev.* 2014;62:26-31.

53. Yeakel JK, Logan BK. Blood synthetic cannabinoid concentrations in cases of suspected impaired driving. *J Anal Toxicol.* 2013;37(8):547-551.
54. Chimalakonda KC, Moran CL, Kennedy PD, et al. Solid-phase extraction and quantitative measurement of omega and omega-1 metabolites of JWH-018 and JWH-073 in human urine. *Anal Chem.* 2011;83(16):6381-6388.
55. Hutter M. *Synthetische Cannabinoide in der forensischen Toxikologie: Metabolismus und Nachweis in unterschiedlichen Matrices.* [Dissertation]. Freiburg im Breisgau: Albert-Ludwigs-Universität; 2014.
56. Holm NB, Noble C, Linnet K. JWH-018 omega-OH, a shared hydroxy metabolite of the two synthetic cannabinoids JWH-018 and AM-2201, undergoes oxidation by alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase enzymes in vitro forming the carboxylic acid metabolite. *Toxicol Lett.* 2016;259:35-43.
57. Hegstad S, Westin AA, Spigset O. Detection Times of Carboxylic Acid Metabolites of the Synthetic Cannabinoids JWH-018 and JWH-073 in Human Urine. *J Anal Toxicol.* 2015;39(4):280-286.
58. Möller I, Wintermeyer A, Bender K, et al. Screening for the synthetic cannabinoid JWH-018 and its major metabolites in human doping controls. *Drug Test Anal.* 2011;3(9):609-620.
59. Scheidweiler KB, Jarvis MJY, Huestis MA. Nontargeted SWATH acquisition for identifying 47 synthetic cannabinoid metabolites in human urine by liquid chromatography-high-resolution tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(3):883-897.

60. Heltsley R, Shelby MK, Crouch DJ, et al. Prevalence of synthetic cannabinoids in U.S. athletes: initial findings. *J Anal Toxicol.* 2012;36(8):588-593.
61. ElSohly MA, Gul W, Wanas AS, Radwan MM. Synthetic cannabinoids: analysis and metabolites. *Life Sci.* 2014;97(1):78-90.
62. Hutter M, Broecker S, Kneisel S, Auwärter V. Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques. *J Mass Spectrom.* 2012;47(1):54-65.
63. Wintermeyer A, Möller I, Thevis M, et al. In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. *Anal Bioanal Chem.* 2010;398(5):2141-2153.
64. Oiestad EL, Johansen U, Christophersen AS, Karinen R. Screening of synthetic cannabinoids in preserved oral fluid by UPLC-MS/MS. *Bioanalysis.* 2013;5(18):2257-2268.
65. Moore C, Vincent M, Rana S, Coulter C, Agrawal A, Soares J. Stability of Delta(9)-tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid using the Quantisal collection device. *Forensic Sci Int.* 2006;164(2-3):126-130.
66. Rodrigues WC, Catbagan P, Rana S, Wang G, Moore C. Detection of synthetic cannabinoids in oral fluid using ELISA and LC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2013;37(8):526-533.
67. Castro A de, Piñeiro B, Lendoiro E, Cruz A, López-Rivadulla M. Quantification of selected synthetic cannabinoids and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2013;1295:99-106.

68. Kneisel S, Auwärter V, Kempf J. Analysis of 30 synthetic cannabinoids in oral fluid using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2013;5(8):657-669.
69. Strano-Rossi S, Anzillotti L, Castrignanò E, Romolo FS, Chiarotti M. Ultra high performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry screening method for direct analysis of designer drugs, “spice” and stimulants in oral fluid. *J Chromatogr A.* 2012;1258:37-42.
70. Theunissen EL, Hutten, Nadia R. P. W., Mason NL, et al. Neurocognition and subjective experience following acute doses of the synthetic cannabinoid JWH-018: A phase 1, placebo-controlled, pilot study. *Br J Pharmacol.* 2018;175:18-28.
71. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF. Pharmacokinetic properties of delta9-tetrahydrocannabinol in oral fluid of occasional and chronic users. *J Anal Toxicol.* 2010;34(4):216-221.
72. Amaratunga P, Thomas C, Lemberg BL, Lemberg D. Quantitative measurement of XLR11 and UR-144 in oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 2014;38(6):315-321.
73. Kneisel S, Speck M, Moosmann B, Corneillie TM, Butlin NG, Auwärter V. LC/ESI-MS/MS method for quantification of 28 synthetic cannabinoids in neat oral fluid and its application to preliminary studies on their detection windows. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(14):4691-4706.

74. Toennes SW, Kauert GF, Steinmeyer S, Moeller MR. Driving under the influence of drugs -- evaluation of analytical data of drugs in oral fluid, serum and urine, and correlation with impairment symptoms. *Forensic Sci Int.* 2005;152(2-3):149-155.
75. Toennes SW, Steinmeyer S, Maurer H-J, Moeller MR, Kauert GF. Screening for drugs of abuse in oral fluid--correlation of analysis results with serum in forensic cases. *J Anal Toxicol.* 2005;29(1):22-27.
76. Brents LK, Reichard EE, Zimmerman SM, Moran JH, Fantegrossi WE, Prather PL. Phase I hydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-018 retain in vitro and in vivo cannabinoid 1 receptor affinity and activity. *PLoS One.* 2011;6(7):e21917.

8 SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Pharmakokinetik von JWH-018 und seinen Metaboliten in menschlichen Serum-, Urin- und Speichelproben

im Institut für Rechtsmedizin in der Abteilung für forensischen Toxikologie unter Betreuung und Anleitung von Herrn Professor Dr. Stefan Tönnies mit Unterstützung durch Herrn Werner Pogoda ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die Ergebnisse der Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

- Toennes SW, Geraths A, Pogoda W, Paulke A, Wunder C, Theunissen EL, Ramaekers JG. **Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 and of its metabolites in serum after inhalation.**
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 140, 215-222, 2017

- Toennes SW, Geraths A, Pogoda W, Paulke A, Wunder C, Theunissen EL, Ramaekers JG. **Excretion of metabolites of the synthetic cannabinoid JWH-018 in urine after controlled inhalation.**
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 150, 162–168, 2018
- Toennes SW, Geraths A, Pogoda W, Paulke A, Wunder C, Theunissen EL, Ramaekers JG. **Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 in oral fluid after inhalation.**
Drug Testing and Analysis, 10(4), 644-650, 2018
- Geraths A, Pogoda W, Theunissen EL, Ramaekers JG, Toennes SW. **Pharmacokinetics of JWH-018 and its metabolites in serum.**
XX. Symposium der GTFCh, 28. - 29. April 2017 in Mosbach.
Toxichem Krimtech. 2017;84(2):89-90
- Toennes SW, Geraths A, Pogoda W, Theunissen EL, Ramaekers JG. **Pharmacokinetics of JWH-018 and its metabolites in serum, urine and oral fluid.**
10th International Symposium Advances in Legal Medicine combined with the 96th Annual Conference German Society of Legal Medicine, 11-15. September 2017 in Düsseldorf.
Rechtsmedizin. 2017;27(4):328.

Heinsberg, den 10.05.2019

Anna Geraths