

Für die Präsentation der nachfolgenden Beiträge auf dem 61nd TIAFT Annual Meeting (The International Association of Forensic Toxicologists) vom 2. bis 6. September 2024 in St. Gallen (Schweiz) erhielten die Autorinnen und Autoren (Name in Fettdruck) ein Reisestipendium von der GTFCh in Höhe von jeweils 1500 Euro.

Die Abstracts der Vorträge oder Poster erscheinen hier in deutscher Übersetzung aus dem Englischen und mit einem herzlichen Dank an die GTFCh von den Autorinnen und Autoren.

Vergleich von Phosphatidylethanol (PEth) in Blut und Ethylglucuronid in Haaren zur Fahreignungsbegutachtung

Matthias Bantle, Matthias Pfäffli, Wolfgang Weinmann

¹Institut für Rechtsmedizin, Universität Bern, Schweiz

Ziele. Die Analyse von Alkoholkonsummarkern stellt im Rahmen der Fahreignungsbegutachtung neben der psycho-medizinischen Untersuchung ein wesentliches Mittel zum Nachweis von Alkoholkonsum dar. In der Schweiz ist die Analyse von Ethylglucuronid (EtG) in Haaren der Goldstandard für Abstinenzkontrollen in Fahreignungsbegutachtungen. Seit Oktober 2022 werden zusätzlich PEth 16:0/18:1 und PEth 16:0/18:2 bestimmt und für weitere Abklärungen von früheren Alkoholkonsum- oder Abstinenzperioden eingesetzt.

Methoden. PEth 16:0/18:1 und PEth 16:0/18:2 wurden in Trockenblutflecken (Dried Blood Spots, DBS) mittels LC-MS/MS analysiert und anhand der Entscheidungsgrenzen des "2022 Consensus of Basel" (20 und 200 ng/mL) ausgewertet. EtG wurde in Haaren mittels LC-MS/MS und GC-MS/MS analysiert und anhand der Entscheidungsgrenzen der Schweizer Gesellschaft für Rechtsmedizin (SGRM) (7 und 30 pg/mg) ausgewertet.

Resultate und Diskussion. PEth (in Blut) und EtG (in kopfnahen Haaren von bis zu 5 cm Länge) wurden für 300 Fahreignungsbegutachtungsfälle analysiert. Die Mehrheit der Proben (201, 65 %) waren negativ für PEth, 59 (19 %) wurden positiv auf Alkoholkonsum ("sozialer Konsum") getestet und 51 (16 %) als "exzessiver Konsum" gewertet. Im Falle von EtG wurden 134 Fälle (43 %) als kompatibel mit Abstinenz ausgewertet, 70 (23 %) wurden positiv auf Alkoholkonsum ("sozialer Konsum") und 96 (31 %) als "exzessiver Konsum" gewertet. In 60 % aller Fälle waren die Interpretationen der Resultate von PEth und EtG waren im gegenseitigen Einklang. In 40 % der Fälle ergaben die Resultate von PEth und EtG eine divergierende Interpretation: in 34 % zeigten die PEth-Ergebnisse einen geringeren Konsum als die EtG-Haar-Ergebnisse an. In 6 % aller Fälle zeigten die PEth-Ergebnisse einen höheren Alkoholkonsum an als durch Analyse der Haare auf EtG. Der Beginn einer Abstinenzphase wenige Wochen vor der Probennahme kann die 34 % der Fälle erklären, wohingegen sich die höheren PEth-Ergebnisse (6 % der Fälle) über die Trinkhistorie ergeben können, welche diskutiert werden.

Schlussfolgerung. In vielen Fällen hat das Ergebnis der PEth-Analyse die Interpretation des EtG-Wertes bestätigt. Allerdings sollte bei diesem Vergleich stets der Unterschied in den Nachweiszeiträumen beachtet werden, da PEth über eine kürzere Zeit nachgewiesen werden kann als EtG in 5 cm kopfnahen Haaren. Wenn PEth regelmässig (z. B. monatlich) gemessen wird, können Veränderungen im Trinkverhalten in einem früherem Stadium festgestellt werden als bei EtG-Analysen, wenn letztere mit Segmenten von 5 cm Länge durchgeführt wird (entspricht ca. 5 bis 6 Monate).

Entwicklung einer sensitiven SPE-LC-MS/MS-Methode zur Analyse von Insulin-Varianten, C-Peptid und Hämoglobin in postmortalen Glaskörper- und Cerebrospinalflüssigkeit

Hans Brabec, Jörg Röhrich, Cora Wunder

Institut für Rechtsmedizin, Abteilung Forensische Toxikologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz

Hintergrund und Ziel. Die postmortale Analytik von Insulinen ist aufgrund des schnellen und unvorhersehbaren Abbaus in hämolytischen Blutproben sowie den geringen Konzentrationen in alternativen Matrices immer noch eine große Herausforderung. Die derzeit verwendeten immunchemischen Methoden zum Nachweis von Insulin können ein hohes Maß an Kreuzreaktivität und mangelnder Spezifität aufweisen, was die Unterscheidung zwischen endogenem Humaninsulin und exogen aufgenommenen Analoga unmöglich macht. Deshalb wurde eine sensitive, SPE- und LC-MS/MS-basierte Methode zur Analyse von 11 Insulin-Varianten, C-Peptid und Hämoglobin in Glaskörper- und Cerebrospinalflüssigkeit entwickelt. Die in die Methode eingeschlossenen Insuline waren Humaninsulin, Lispro, Aspart, Glulisin, Glargin, die Glargin-Metabolite IM (21^A-Gly-31^B-Arg-Humaninsulin) und M1 (21^A-Gly-Humaninsulin), Degludec, Detemir sowie Rinder- und Schweineinsulin. C-Peptid wird bei der Biosynthese von körpereigenem Insulin vom Proinsulin abgespalten und kommt in pharmazeutischen Insulinpräparaten nicht vor. In Abhängigkeit von der Extraktionsmethode kann Hämoglobin zur Überprüfung der Probenintegrität und zum Nachweis einer Hämolyse herangezogen werden. Die Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode für Insuline ist aufgrund möglicher Probleme in Bezug auf Löslichkeit, Adsorption, Ionisierungseffizienz und Fragmentierungsmuster anspruchsvoll. Ziel war es, eine ausreichend sensitive Methode zu entwickeln, um Insulinkonzentrationen im Pikogramm-pro-Milliliter-Bereich erfassen zu können. Zudem sollte die entwickelte Methode auf einen realen Fall angewendet werden, bei dem eine Insulin-Intoxikation vermutet wurde.

Methoden. Für die Probenvorbereitung wurden Protein-Low-Binding-Platten verwendet. Die Glargin-Metaboliten IM und M1 wurden aus Glargin durch enzymatische Spaltung mit Carboxypeptidase B hergestellt. Als initiale Matrix für die Methodenentwicklung diente gespikete künstliche Glaskörper- und Cerebrospinalflüssigkeit. Die Probenvorbereitung startete mit einer einfachen Zentrifugation von bis zu 800 µL des Probenmaterials, anschließend wurde mit 5 % NH₄OH-Lösung alkalisiert und ein zweites Mal zentrifugiert. Die Festphasenextraktion (SPE) erfolgte mit einem Biotage Extrahera Pipettier-Roboter unter Verwendung von Oasis MAX µElution 96-Well-Platten mit einem Mixed-Mode-Anionenaustausch-Sorbens. Die Extraktion begann mit der Konditionierung und Equilibrierung der Säulen unter Verwendung von Methanol und Wasser, gefolgt von der Beladung mit der Probe. Die Wells wurden danach zuerst mit 5 % NH₄OH sowie anschließend mit einer Mischung aus 5 % Methanol und 1 % Essigsäure in Wasser gewaschen. Zur Elution der Insuline wurde eine Mischung aus 60 % Methanol und 10 % Essigsäure in Wasser verwendet, abschließend wurde das Eluat 1:1 mit Wasser verdünnt. Alle Angaben v/v. Das LC-MS/MS-System bestand aus einem Agilent 1290 Infinity II Flüssigchromatographen mit einem Agilent 6495 Triple Quadrupol Massenspektrometer. Die Chromatographie wurde bei 80 °C mit einer Flussrate von 0,3 mL/min durchgeführt. Die mobile Phase war ein 10 mM Ammoniumformiat-Puffer (pH 2,6) im Gradienten mit Acetonitril. Hierbei war die Ionensuppression deutlich geringer als bei einer mobilen Phase mit Trifluor- oder Difluoressigsäure. Für die Datenanalyse wurde die Software MassHunter Qualitative und Quantitative Analysis sowie die Modde-Software verwendet.

Ergebnisse und Diskussion. Durch den Einsatz der Mikroelutions-SPE entfiel die Notwendigkeit das Eluat abzdampfen und zu rekonstituieren. Dadurch wurden Proteinverluste durch Adsorption vermieden. Die beschriebenen SPE-Bedingungen wurden gewählt, um die Löslichkeit der Insuline zu gewährleisten und unspezifische Bindungen zu minimieren. Zahlreiche Säulen wurden getestet, u. a. C18, CSH-C18 und C18-Ether-Phasen sowie vollporöse und Core-Shell-Partikel mit Porenweiten von 120 bis 300 Å. Die chromatographische Trennung der strukturell sehr ähnlichen Insuline, des C-Peptids sowie der Hämoglobin-Untereinheiten α und β gelang schließlich mit einer Supelco BIOshell A160 Peptide C18-Säule (2 μ m, 2,1 x 150 mm) in einer Laufzeit von 10 Minuten. Diese mit Core-Shell-Partikeln gefüllte Säule ermöglicht kurze Diffusionswege für Biomoleküle und weist eine mittlere Porengröße von 160 Å auf, was im Gegensatz zu einer Porenweite von 120 Å für die Analyse von Insulinen und Hämoglobin-Untereinheiten ausreichend war. Unter den Bedingungen der Methode zerfällt das Hämoglobin-Tetramer in seine Untereinheiten, d. h. in die Globin-Ketten α mit ca. 15,3 kDa (UniProt: P69905) und β mit ca. 16,0 kDa (UniProt: P68871). Um die Chromatographie auch bei niedrigen Konzentrationen durchführen zu können, wurde die Säule mit dem Überstand von gefälltem Rattenplasma konditioniert. Außerdem wurden verschiedene Säulentemperaturen und Flussraten untersucht, wobei festgestellt wurde, dass sich erhöhte Temperaturen und niedrige Flussraten positiv auf die chromatographische Trennleistung auswirken. Durch die chromatographische Trennung der Insuline wurden Probleme mit überlappenden Isotopenmustern vermieden. Für die Auswahl der Precursor-Ionen wurde die ESI-Quelle mithilfe eines Design-of-Experiments-Ansatzes optimiert. Die sieben Faktoren des *Central-Composite-Designs* waren *drying gas temperature*, *drying gas flow*, *sheath gas temperature*, *sheath gas flow*, *nebulizer pressure*, *capillary voltage* und *nozzle voltage*. Bei der Auswahl der Massenübergänge war es wichtig, die Spezifität der Fragmente mit höherem m/z gegen die Intensität der Fragmente mit niedrigerem m/z abzuwägen, um die bestmögliche Empfindlichkeit in der Matrix zu erhalten. Humaninsulin und Insulin Lispro, die sich nur durch zwei gegeneinander vertauschte Aminosäuren unterscheiden, können mit der vorliegenden Methode sowohl chromatographisch als auch durch den Erhalt spezifischer Fragmente unterschieden werden. Die vorläufigen Nachweisgrenzen für die meisten Insuline und das C-Peptid lagen zwischen 25 und 50 pg/mL. Die Methode wurde erfolgreich an einem zwei Jahre zurück liegenden Todesfall getestet, bei dem sich die Person mit Insulin suizidiert hatte. Die ursprüngliche Analyse mittels Immunoassay ergab negative Ergebnisse für Herzblut und Glaskörperflüssigkeit sowie ein positives Ergebnis in der Cerebrospinalflüssigkeit. Mit Hilfe der LC-MS/MS-basierten Methode wurde das zum Suizid verwendete Insulin in der Glaskörper- und der Cerebrospinalflüssigkeit als Insulin Lispro quantifiziert. Die Konzentrationen lagen bei 0,18 ng/mL in der Glaskörperflüssigkeit und bei ca. 6,1 ng/mL in der Cerebrospinalflüssigkeit.

Schlussfolgerung. Die LC-MS/MS-Methode zur Analytik von Insulinen in alternativen postmortalen Matrices kann die Nachteile der Immunoassays überwinden und ist sensitiv genug, um Konzentrationen im Pikogramm-pro-Milliliter-Bereich zu erfassen. In Zukunft soll die Methode weiter verbessert, validiert und auf eine größere Anzahl an Proben angewendet werden, bei denen keine Hinweise auf eine Insulin-Überdosierung vorliegen, um ein Verständnis für „postmortale therapeutische“ und endogene Insulin-Konzentrationen zu erlangen.

Das 62nd TIAFT Meeting findet vom 23. - 28. November 2025
in Auckland, New Zealand (Aotearoa) statt.

Interpretation von Mono- und Poly-SCRA-Intoxikationen aus aktivitätsbasierter Sicht: JWH-018-Äquivalente im Serum als Vergleichsmaßstab

Katharina Elisabeth Grafinger^{1,2}, Liesl K. Janssens³, Michaela J. Sommer^{1,4,5}, Maren Hermanns-Clausen^{4,6}, Volker Auwärter^{1,4}, Christophe P. Stove³

¹Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Universität Freiburg, Freiburg

²Institut für Chemie und Bioanalytik, Fachhochschule Nordwestschweiz, Muttenz, Schweiz

³Laboratory of Toxicology, Department of Bioanalysis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium

⁴Medizinische Fakultät, Universität Freiburg, Freiburg

⁵Hermann-Staudinger-Graduiertenschule, Universität Freiburg, Freiburg

⁶Vergiftungs-Informations-Zentrale Freiburg Abteilung für allgemeine Pädiatrie, Jugendmedizin und Neonatologie, Zentrum für Pädiatrie, Universitätsklinikum Freiburg

Einleitung und Ziele. Synthetische Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten (SCRAs) sind eine der größten Klassen neuer psychoaktiver Substanzen (NPS), mit mehr als 222 Einzelverbindungen in Europa, die vom Europäischen Frühwarnsystem überwacht werden. Diese Verbindungen imitieren die Wirkung von Cannabis und übertreffen oft die Wirkung von Δ^9 -THC. Aufgrund der großen Zahl neuer Verbindungen, die auf dem Drogenmarkt auftauchen, ist zum Zeitpunkt ihres Auftauchens oft nur sehr wenig über ihre Toxizität und Pharmakologie bekannt. Dies macht die Bewertung akuter SCRA-Intoxikationen für medizinisches Personal und forensische Toxikologen schwierig. Auch die Identifizierung und Quantifizierung dieser Drogen zur Bewertung des Ausmaßes einer SCRA-Intoxikation stellt ein Problem dar. **Ziel der Studie** war die Entwicklung eines neuartigen Vergleichsmaßstabs für SCRA-Vergiftungen auf der Grundlage der *ex-vivo*-Cannabinoid (CB₁)-Aktivität in Serumproben im Vergleich zu Serumkonzentrationen spezifischer SCRAs. Das vorgeschlagene JWH-018-Äquivalent beinhaltet den Bezug auf die Konzentration eines bekannten Referenz-SCRA, der ein ähnliches Ausmaß an Cannabinoid-Aktivität ausübt wie die (unbekannte(n)) SCRA im Serum.

Methoden. Für diese Studie wurden spezifische Vergiftungsfälle einer prospektiven Beobachtungsstudie von Patienten untersucht, die in der Notaufnahmen nach dem Konsum eines NPS behandelt wurden. Etwa 250 deutsche Notaufnahmen haben Vergiftungen der Vergiftungs-Informations-Zentrale Freiburg gemeldet. Davon wurden 48 nicht-tödliche Vergiftungsfälle in der vorliegenden Studie mit aufgenommen. Die folgenden Einschlusskriterien wurden angewendet: i) bestätigter SCRA Konsum mittels Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) und ii) ein ausreichendes Probenvolumen für zusätzliche Bioassays. Der Nachweis anderer Drogen war kein Ausschlusskriterium. SCRA-Serumkonzentrationen wurden mittels LC-MS/MS im MRM-Modus (Multi reaction monitoring) quantifiziert. Die SCRA-*ex-vivo*-CB₁-Aktivität in Serumproben wurde mittels eines nicht-spezifischen zellbasierten β -Arrestin2-Rekrutierungs-Bioassays bestimmt. Gleichzeitig wurden JWH-018-Kalibrationskurven mitgemessen, um das Aktivitätsäquivalent zu messen, welches eine Umrechnung verschiedener SCRA-Serumkonzentrationen in eine JWH-018 Äquivalenzkonzentration auf der Grundlage gleicher Cannabinoid-Aktivität im Bioassay ermöglicht.

Resultate & Diskussion. Die 48 eingeschlossenen Fälle umfassten mono-SCRA- (n=34) und poly-SCRA- (n=14) Vergiftungen. Andere nachgewiesene Drogen waren THC (2,4-25 ng/mL) und seine Metaboliten (n=12), verschiedene Notfallmedikationen (Lidocain, Pipamperon, Rocuronium), MDMA (n=2; 0,31-35 ng/mL), Benzodiazepine (n=6; <10-150 ng/mL), Cathinone (n=3; 0,55-320 ng/mL) and Amphetamine (n=2; 7,2-82 ng/mL).

Zwölf SCRA wurden quantifiziert: 5F-ADB (n=14; 0,4-9,7 ng/mL), MDMB-CHMICA (n=12; 0,04-10,0 ng/mL), MDMB-4en-PINACA (n=10; 0,1-0,56 ng/mL), ADB-CHMINACA (n=8; 0,23-7,80 ng/mL), 5F-MDMB-PICA (n=6; 0,1-45 ng/mL), AB-CHMINACA (n=5; 7,3-23 ng/mL), AB-FUBINACA (n=3; 0,63-4,5 ng/mL), AMB-CHMICA (n=1; 0,41 ng/mL), 5F-AKB-48 (n=1; 2,48 ng/mL), Cumyl-PEGACLONE (n=1; 1,2 ng/mL), 4F-MDMB-BICA (n=1; 5,2 ng/mL) and AB-PINACA (n=1; 0,33 ng/mL). Zwei SCRA, MDMB-4en-PINACA und 5F-MDMB-PICA, wurden unterhalb der Bestimmungsgrenze nachgewiesen.

Ex-vivo-Cannabinoid-Aktivität wurde in den Serumproben gemessen und für 30 Proben konnten JWH-018-Äquivalente ermittelt werden, die einen theoretischen JWH-018 Konzentrationsbereich von 3,6-1048 ng/mL abdecken. Zwei Proben wiesen eine ausgeprägte CB₁-Aktivität auf, mit Signalen oberhalb der Kalibrationskurve (>5000 ng/mL). Elf Proben hatten eine CB₁-Aktivität unterhalb der JWH-018 Kalibrationskurve (< 2,5 ng/mL). In fünf Proben wurde keine Aktivität festgestellt.

Die ermittelten JWH-018-Konzentrationsäquivalente korrelierten sowohl mit der Konzentration des Muttersubstanz (z. B.: höhere SCRA-Konzentrationen führen zu höheren Aktivitätsäquivalenten) als auch zu dem intrinsischem Aktivitätspotential relativ zur Referenzsubstanz JWH-018 (potentere Verbindungen führen zu höheren JWH-018-Äquivalent-Konzentrationen). Zusätzlich wurden der Zusammenhang zwischen dem JWH-018-Äquivalent in Serumproben, dem Ausmaß einer Intoxikation sowie dem klinischen Erscheinungsbild untersucht. Der Schweregrad einer Intoxikation mit dem jeweiligen SCRA wurde anhand der berichteten Symptome und den Follow-up-Informationen unter Verwendung des Poisoning Severity Scores (PSS) evaluiert. Die Vergiftungen wurden mit einem PSS von 1 (leicht), 2 (moderat) und 3 (schwer) bewertet. Es wurde ein (teilweiser) Zusammenhang zwischen dem JWH-018-Äquivalent und dem PSS sowie der Kausalität der SCRA für die akute Drogenintoxikation gefunden. Über einem Schwellenwert von > 47 ng/mL JWH-018 wurde die Kausalität zwischen SCRA und der akuten Drogenintoxikation als gesichert bewertet, über dem Schwellenwert von > 24 ng/mL JWH-018 (PSS > 1) als wahrscheinlich oder sicher. Des Weiteren wurde eine große Vielfalt an toxikologischen Symptomen erfasst und es konnte kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen Symptomen und Serumaktivität festgestellt werden.

Fazit. Wir präsentieren einen neuen Ansatz aus der Cannabinoid-Aktivität-Perspektive, nämlich ein JWH-018-Konzentrationsäquivalent als Vergleichsmaßstab für die Untersuchung von Mono- und Poly-SCRA-Intoxikationen. Die Bestimmung des Aktivitätsäquivalents als eine Form des ungezielten Screenings kann helfen, SCRA-Intoxikationen zu identifizieren und das Ausmaß einer Intoxikation abzuschätzen, ohne dass das pharmakologische Profil oder das Schadenspotenzial der einzelnen SCRA im Voraus bekannt ist. Dies gilt insbesondere für neu auftretende SCRA, die noch nicht identifiziert oder charakterisiert wurden oder für die noch keine Referenzsubstanz verfügbar ist.

Vorläufige pharmakokinetische und psychophysische Daten nach kontrolliertem inhalativem und oralem Konsum von Hexahydrocannabinol (HHC)*

Lisa Höfert, Benjamin Franz, Cedric Groß, Jan Dreßler, Susen Becker, Sven Baumann
Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Institut für Rechtsmedizin, Leipzig

Hintergrund und Ziele. Das halbsynthetische Cannabinoid Hexahydrocannabinol (HHC) hat seit Mitte 2022 als Alternative zu Tetrahydrocannabinol (THC) große Popularität erlangt. In

den meisten Ländern wurde es inzwischen durch nationale Vorschriften reglementiert. Daten zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus sind aktuell nur sehr begrenzt verfügbar. In früheren Studien wurde HHC in biologischen Proben von Verkehrsteilnehmern nachgewiesen und somit die potenzielle Auswirkung auf die Verkehrssicherheit unterstrichen. Ziel dieser Studie war die Erhebung von Daten zur Pharmakokinetik und zu psychophysischen Effekten nach HHC-Konsum. Zusätzlich wurden immunologische Tests für verschiedene Matrices zur Erkennung des Konsums evaluiert.

Methoden. Bisher konsumierten zwei Teilnehmende (I1: weiblich, 80 kg, Nichtraucherin; I2: männlich, 90 kg, regelmäßiger Raucher) drei Züge aus einem HHC-Vape und eine Freiwillige (O1: weiblich, 88 kg) nahm einen Fruchtgummi mit 25 mg HHC ein. Es wurden verschiedene psychophysische Tests durchgeführt. Zusätzlich wurden Pupillengröße, Drehnachnystagmus und subjektives „High-Gefühl“ überwacht. Immunologische Tests (DrugWipe® 5S für Speichel, SureStep™ für Urin und Immunalysis™ ELISA für Serum) wurden in verschiedenen Zeitintervallen nach dem Konsum durchgeführt. Serum- (bis zu 24/48 Stunden), Urin- (bis zu fünf Tage), Speichel- (bis zu 48 Stunden) und Haarproben (nach einem Monat) wurden zu verschiedenen relevanten Zeitpunkten gesammelt und mittels LC-MS/MS analysiert.

Ergebnisse und Diskussion. Die maximalen HHC-Serumkonzentrationen (= c_{max}) für die inhalative HHC-Aufnahme betragen 18,0 ng/mL (I1) und 172,8 ng/mL (I2) nach 3 bzw. 6 Minuten (= t_{max}). Zwei Stunden nach oraler HHC-Einnahme wurde eine maximale Serumkonzentration von 16,4 ng/mL quantifiziert. Unterschiede in der Rauchtchnik führten zu verschiedenen c_{max} -Werten. Die t_{max} -Werte entsprachen bekannten Daten für THC.

Die Ergebnisse in den psychophysischen Tests variierten zwischen den Individuen. Zwei Personen zeigten keine (I1) oder nur geringfügige (O1) Beeinträchtigungen nach HHC-Konsum. Ein Teilnehmer (I2) wies jedoch während der akuten Phase nach inhalativer HHC-Aufnahme signifikante Beeinträchtigungen auf, die den Abbruch der initialen Tests erforderten. Ein maximales subjektives „High-Gefühl“ von 0, 8 und 7 (Skala 0-10) wurde von den Teilnehmern I1, I2 bzw. O1 berichtet.

Der DrugWipe® 5S zeigte in allen drei Fällen direkt nach dem Konsum für ein kurzes Zeitintervall ein positives Ergebnis, welches prinzipiell auch aufgrund von Rückständen im Mund resultieren kann. In nur einem Fall konnte drei Stunden nach oraler HHC-Einnahme erneut ein positiver Befund erhoben werden. Daher scheint der HHC-Monokonsum in der Akutphase mit diesem Test nicht ausreichend sensitiv nachweisbar zu sein. Der SureStep™ Urintest war in allen drei Fällen positiv. Nach inhalativer Aufnahme zeigte der Urintest für maximal sechs Stunden ein positives Ergebnis. Oraler Konsum führte zu einem positiven Urintestergebnis für bis zu 72 Stunden. Schwächen zeigten sich hingegen bei der Erkennung der akuten Phase. Der Immunalysis™ ELISA für Serum konnte in allen Fällen die akute Phase des Konsums abbilden und blieb maximal 48 Stunden lang positiv. In dieser Studie wurde jedoch nur eine einzige und relativ niedrige Dosis getestet. Bei höheren Dosen oder mehrfachem Gebrauch von HHC-Produkten könnten einerseits die Nachweiszeiten mit immunologischen Tests länger und möglicherweise auch die Beeinträchtigungen signifikanter sein.

Schlussfolgerung. Diese Daten unterstreichen die unterschiedlichen pharmakokinetischen Profile von HHC in Abhängigkeit von der Konsumform sowie individuellen Faktoren. Die Ergebnisse der psychophysischen Tests variierten dabei stark zwischen den Individuen. Auch wenn in zwei Fällen keine oder nur geringfügige Beeinträchtigungen erkennbar waren, konnte HHC dennoch im Serum aller Teilnehmer nachgewiesen werden. Der immunologische Speicheltest zeigte eine begrenzte Sensitivität beim Nachweis von HHC-Monokonsum, während der Urintest methodisch bedingte Schwächen beim Nachweis der akuten Phase nach HHC-Konsum aufwies. Weitere quantitative Analysen aller gesammelten Matrices sowie ein breites Metaboliten-Screening mit besonderem Fokus auf die Diastereomere der einzelnen Analyten sind in Arbeit.

Aussagekraft von Phosphatidylethanol (PEth) in post-mortem Blutproben

Jeremai Hose¹, Martin Jübner¹, Mario Thevis², Hilke Andresen-Streichert¹

¹Institut für Rechtsmedizin, Uniklinik, ²Institut für Biochemie, Deutsche Sporthochschule, Köln

Einleitung. Phosphatidylethanol (PEth) ist ein direkter Alkoholmarker, der sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie eine lange Nachweisbarkeit auszeichnet. Zwecks Überprüfung der Alkoholabstinenz oder Einschätzung des Trinkverhaltens wird PEth im Kapillarblut lebender Personen quantitativ bestimmt. Quantitative Daten zu PEth-Konzentrationen bei Verstorbenen, z. B. zur Einschätzung einer möglichen Alkoholgewöhnung, sind praktisch kaum publiziert. Mittels dieser Studie sollte die Aussagekraft von PEth-Konzentrationen in routinemäßig gewonnenen post-mortem-Herzblut- (HB) und -Femoralvenenblutproben (FB) überprüft werden. Zudem sollte die Stabilität von PEth in den post-mortem-Blutproben bei routinemäßiger Lagerung (bei -20 °C) über einen Zeitraum von 60 Tagen bestimmt werden.

Material und Methoden. Jeweils 20 µL der im Rahmen rechtsmedizinischer Obduktionen gewonnenen Blutproben (HB und FB) wurden auf Whatman®-Filterpapier in Doppelbestimmung pipettiert, um Dried Blood Spots (DBS) herzustellen (Tag 0). Pro Probe wurden jeweils sechs Aliquote von 60 µL in Glasvials gegeben und bei -20 °C eingefroren. Aus diesen Aliquoten wurden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, 2, 7, 14, 30 und 60) ebenfalls in Doppelbestimmung weitere DBS zu je 20 µL hergestellt. Die DBS wurden bis zur Analyse bei Raumtemperatur in Wiederverschlussbeuteln mit Trockenmittel gelagert. Die Probenaufarbeitung erfolgte mit den ausgeschnittenen DBS durch Zugabe des deuterierten PEth 16:0/18:1 und eines Wasser/Isopropanol-Gemisches sowie anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion mit n-Hexan. Der Überstand wurde vollständig unter Stickstoff eingedampft und in 100 µL der mobilen Phase aufgenommen. Der Nachweis von PEth 16:0/18:1 und PEth 16:0/18:2 erfolgte mit LC-MS/MS mit einer Nachweisgrenze (NWG) von 3,0 bzw. 3,5 ng/mL. Initiale Ethanolkonzentrationen wurden mittels GC-FID bestimmt (NWG 0,05 ‰).

Ergebnisse und Diskussion. Blut von 36 verstorbenen Individuen (Alter: 0,5 - 87 Jahre; ♂ = 21; ♀ = 15) wurde untersucht. In 9 Fällen waren sowohl initial Ethanol (0,08 – 1,99 ‰) als auch PEth (70 – 2126 ng/mL) nachweisbar, in 20 Fällen war initial PEth (3,9 – 1208 ng/mL) nachweisbar, jedoch kein Ethanol. Die Analysen in den 7 weiteren Fällen verliefen negativ. Je höher die PEth-Konzentrationen im HB, desto höher die Konzentrationen im FB, wodurch sich eine gute Korrelation ergab ($r = 0,97$ für beide Homologe). Allerdings variierten die HB/FB-Verhältnisse der PEth-Werte zwischen 0,32 und 2,36 (Mittelwert = 1,00) für PEth 16:0/18:1 und zwischen 0,41 und 1,89 (Mittelwert = 0,98) für PEth 16:0/18:2, was auf eine insgesamt gute Vergleichbarkeit, aber auch auf eine sehr starke interindividuelle Variation hinweist.

In allen PEth-positiven Proben konnte ein Anstieg der PEth-Konzentrationen über den Lagerungszeitraum beobachtet werden. Ein durchschnittlicher Anstieg um ca. 20 % ergab sich bereits nach Tag 1. Nach 60 Tagen war die Konzentration für beide Homologe im Mittel um ca. 70 % gestiegen. Eine solche Bildung von PEth nach der Probenentnahme im Vollblut in Gegenwart von Ethanol wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, jedoch wurde in dieser Studie auch ein Anstieg in Blutproben ohne nachweisbare Ethanolkonzentrationen beobachtet. In 3 der 7 Proben, in denen initial weder Ethanol noch PEth vorlag, waren innerhalb von 60 Tagen sogar nachweisbare PEth-Konzentrationen detektierbar.

Schlussfolgerung. Die Konzentrationen von PEth in HB und FB scheinen nicht vergleichbar zu sein, da die Verhältnisse großen interindividuellen Schwankungen unterliegen. Daher kann keine Empfehlung darüber gegeben werden, welches post-mortem-Blut für die Analyse besser

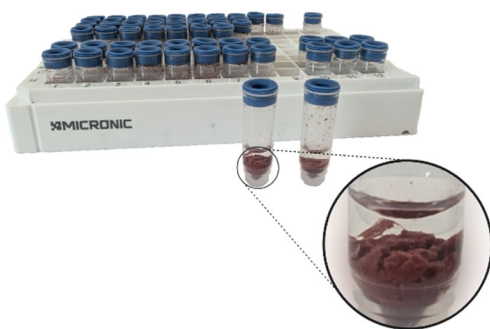
geeignet ist. Zudem kommt es unter routinemäßigen Lagerungsbedingungen (-20 °C) zu einem relevanten Anstieg der PEth-Konzentrationen, weshalb die Interpretation der gewonnenen Werte mit großer Vorsicht erfolgen sollte. Die (alleinige) Verwendung von PEth in post-mortem-Fällen, z. B. zur Einschätzung des Trinkverhaltens oder der Alkoholgewöhnung, ist somit nicht empfehlenswert. Andere Alkoholmarker (z. B. Ethylglucuronid im Haar) sollten verwendet oder zumindest zusätzlich herangezogen werden.

Entwicklung und Validierung eines einstufigen Extraktionsverfahrens für die Analyse von Tetrahydrocannabinol-, Δ 9- und Δ 8-Isomeren und Metaboliten, Hexahydrocannabinol und weiteren Phytocannabinoiden in Vollblut

Manuela C. Monti, Götz Schlotterbeck, Urs Duthaler

Institut für Rechtsmedizin, Universität Basel, Department of Biomedical Engineering, Schweiz

Hintergrund und Ziele. Cannabis ist nach wie vor eine der am weitesten verbreiteten Freizeitdrogen weltweit. Δ 9-Tetrahydrocannabinol (Δ 9-THC) ist der primäre psychoaktive Inhaltsstoff von Cannabis und spielt eine zentrale Rolle in der forensischen Toxikologie. Für Δ 9-THC und seine Metaboliten sind daher oft gesetzliche Grenz- und Richtwerte im Straßenverkehr festgelegt. In den letzten Jahren sind zusätzlich weitere Phytocannabinoide, wie Cannabidiol (CBD), sowie (semi-)synthetische Cannabinoide, wie Hexahydrocannabinol (HHC) und Δ 8-THC, auf dem regulierten und unregulierten Markt erschienen. Diese Entwicklungen erfordern neue Analysemethoden. Bisherige Analysen von Cannabinoiden in Vollblut sind oft arbeitsintensiv und mehrstufig. Ziel dieser Studie war es, eine schnelle, robuste und unkomplizierte Methode zur Quantifizierung von Δ 9-THC, Δ 8-THC, CBD, deren Metaboliten sowie HHC und ausgewählten "minor"-Phytocannabinoiden in Vollblut zu entwickeln und zu validieren.



Methoden. Es wurde ein einstufiges Extraktionsverfahren für 50 μ L Vollblut in einem 96-Well-Format entwickelt (Abb. 1). Die Blutproben wurden durch Zugabe von 150 μ L eines 1:1 Methanol-Acetonitril-Gemischs (inkl. interner Standards) präzipitiert. Nach dem Schütteln und Zentrifugieren wurden die Proben direkt in den Autosampler überführt; anschließend wurde der Überstand (das Blutpellet verbleibt im Probengefäß) zur Analyse injiziert.

Abb. 1. Probengefäße nach Probenaufarbeitung. Das ganze Probenrack wird in den Autosampler gestellt, wo zur Analyse der Überstand injiziert wird (Abbildung erstellt mit Biorender.com).

Die Methode wurde auf einem LC-40D XR Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie (UHPLC)-System (Shimadzu, Kyoto, Japan) gekoppelt mit einem QTrap 6500+ Triple-Quad Massenspektrometer (AB Sciex, Massachusetts, USA) validiert. Als analytische Säule wurde eine Kinetex XB-C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 μ m) Core-Shell-Säule (Phenomenex, Kalifornien, USA) bei 50 °C verwendet. Die Analysedauer betrug 10 Minuten, und als mobile Phasen dienten 0,1 % Ameisensäure in Wasser (Phase A) sowie Methanol (Phase B). Die Validierung erfolgte gemäß Richtlinien zur Methodvalidierung in der forensischen Toxikologie und klinischen Chemie (GTFCh, SGRM). Untersuchte Parameter waren Arbeitsbereich, Linearität,

Wiederfindung, Matrixeffekte, systematischer Fehler, Richtigkeit, Präzision, Stabilität, Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ). Die Methode wurde für 14 Cannabinoide validiert (Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-OH, Δ^9 -THC-COOH, Δ^8 -THC, Δ^8 -THC-COOH, CBD, CBD-6-OH, CBD-7-OH, CBD-COOH, Δ^9 -THC-acid (THCA), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabigerol (CBG), Cannabinol (CBN) und HHC).

Resultate und Diskussion. Das einstufige Probenvorbereitungsverfahren reduzierte den Arbeitsaufwand erheblich. Die Validierungskriterien wurden für alle Analyten erfüllt. Es wurde folglich eine geeignete Analyseverfahren entwickelt, welche die gesetzlichen Grenz- und Richtwerte für Δ^9 -THC und seine Metaboliten in Vollblut zuverlässig abdeckt. Die Methode zeigte gute Wiederfindungsraten ($\geq 88\%$), reproduzierbare Matrixeffekte bei sieben Blutspendern (%CV: $\leq 7\%$) und resultierte in geeigneten LODs und LOQs. Für Δ^8 -THC, Δ^9 -THC und Δ^9 -THC-OH lagen die LOQs bei 0,5 ng/mL, während die LOQs für Δ^8 -THC-COOH und Δ^9 -THC-COOH bei 2,5 ng/mL lagen. Für alle Analyten waren die LODs und LOQs im Bereich von 0,2 bis 0,8 ng/mL bzw. 0,5 - 2,5 ng/mL. Weitere Phytocannabinoide (CBD, CBG, THCV, THCA, CBN) wurden in die Methode aufgenommen, da sie im Zusammenhang einer verbesserten Interpretation von Cannabis-Fällen diskutiert werden. Neben diesen Phytocannabinoiden deckt die Methode auch HHC und Δ^8 -THC ab und passt sich damit den aktuellen Marktentwicklungen an. Die Methode ermöglicht die chromatographische Trennung von Δ^8 -THC-COOH und Δ^8 -THC von den entsprechenden Δ^9 -THC-Isomeren. Es ist jedoch nicht möglich, Δ^8 -THC-OH von Δ^9 -THC-OH zu unterscheiden. Daher sollte der Hydroxymetabolit als Summe beider Isomere berichtet werden.

Schlussfolgerung. Die vorgestellte Methode entspricht den aktuellen Bestrebungen, das benötigte Probenvolumen, den Verbrauch organischer Lösungsmittel sowie den Arbeitsaufwand und die Kosten zu minimieren. Zusätzlich deckt sie neue Trends ab, indem Δ^8 -THC und HHC integriert wurden. Dank des Formats und der einfachen Probenvorbereitung ist eine Automatisierung für Hochdurchsatzanwendungen denkbar. Auch die Übertragung der Methode auf andere Matrices wie Urin oder Dried Blood Spots wäre ohne großen Aufwand möglich. Die Validierung zeigte, dass die Methode für die Abdeckung der gesetzlichen Grenzwerte in der Schweiz geeignet ist. Diese Studie zeigt, dass für eine umfassende Cannabinoid-Analyse im Blut keine komplexen und mehrstufigen Verfahren erforderlich sind. Mit einer einfachen Fällung können die notwendigen Spezifikationen für eine quantitative bioanalytische Methode erreicht werden.

Vergleich von vier experimentellen Designs zur Berechnung von Bias und Präzision nach verschiedenen Richtlinien zur Methodenvalidierung am Beispiel einer LC-MS/MS-Methode für Morphin, Hydromorphon und deren Metaboliten in humanem Plasma

Lisa Oßowski, Daniela Wissenbach, Frank T. Peters

Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Hintergrund und Ziele. Zur Validierung von quantitativen Analysemethoden ist die Bestimmung von Bias- und Präzisionsdaten einer Methode notwendig. In der forensischen Toxikologie und verwandten Bereichen wird in den Richtlinien zur Methodenvalidierung übereinstimmend empfohlen, Bias und Präzision experimentell mittels wiederholter Messung von QC-Proben über mehrere Tage zu bestimmen. Allerdings gibt es keine allgemeingültige Regelung über die Mindestanzahl von Tagen und Wiederholungen pro Tag, die zur Berechnung einbezogen werden sollen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Bias- und Präzisionsergebnisse für

eine LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Morphin und Hydromorphon sowie ihrer wichtigsten Metaboliten in Plasma, die mit den in den Validierungsrichtlinien der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh; 2 Wiederholungen an jedem der 8 Tage), der Norm 036 des American National Standards Institute/AAFS Standards Board (ANSI/ASB; 3 Wiederholungen an jedem der 5 Tage) und den Empfehlungen für die Validierung bioanalytischer Methoden der US Food and Drug Administration (FDA; 5 Wiederholungen an jedem der 3 Tage) vorgeschlagenen Designs erzielt wurden zu vergleichen.

Methoden. Die Methode umfasst die Zielanalyten Morphin, Hydromorphon, Morphin-3- und -6-Glucuronid, Normorphin, Norhydromorphon, Hydromorphon-3-glucuronid und Dihydromorphin. Die proteingefällten Serumproben wurden nach einer Gradientenelution mittels UHPLC auf einem Triple-Quadrupol im MRM-Modus analysiert. Zur Bestimmung von Bias und Präzision wurden QC-Proben in vier Konzentrationsstufen an 10 Tagen (D1-D10) in jeweils 6 Wiederholungen (a-f) analysiert. Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Analysen wurden die Wiederholpräzision (Präzision innerhalb eines Tages) und Laborpräzision (Präzision zwischen den jeweiligen Tagen) als %RSD und der Bias als prozentuale Abweichung des Mittelwerts vom jeweiligen Sollwert berechnet. Aus der Gesamtmenge der Daten ergaben sich so drei verschiedene Datensätze für das GTFCh-Design (D1-D8, ab; D1-D8, cd; D1-D8, ef) und das FDA-Design (D1-D3, a-e; D4-D6, a-e; D7-D10; a-e) und vier für das ANSI/ASB-Design (D1-D5, a-c; D1-D5, d-f; D6-D10, a-c; D6-D10, d-f) für die Berechnung. Zusätzlich wurden die Ergebnisse für den gesamten Datensatz (D1-D10, a-f) berechnet. Die Differenz zwischen dem kleinsten und größten Ergebnis für Bias, Wiederholpräzision und Laborpräzision der jeweiligen Datensätze innerhalb eines Designs (GTFCh, ANSI/ASB, FDA) wurde berechnet und zwischen den Richtlinien verglichen. Geringere Unterschiede (d. h. kleinere Differenzen) der Ergebnisse innerhalb eines Designs wurden hierbei als Hinweis auf homogenere Ergebnisse der jeweiligen Validierungsparameter gewertet.

Ergebnisse und Diskussion. Für den gesamten Datensatz (D1-D10, a-f) lagen die Biasergebnisse zwischen -20,1 % und 15,6 %, die Wiederhol- zwischen 3,0 % und 8,9 % und die Laborpräzision zwischen 3,5 % und 11,8 %. Für die 10 verschiedenen Datensätze (3 GTFCh, 4 ANSI/ASB, 3 FDA) lagen die Biasergebnisse zwischen -22,9% bis 17,0%, die Wiederholpräzision zwischen 2,0 % bis 12,9 % und die Laborpräzision zwischen 2,2 % bis 15,9 %. Für die 32 Differenzen (acht Analyten x vier Konzentrationslevel) zwischen den niedrigsten und den höchsten Ergebnissen, die innerhalb eines Designs erzielt wurden, ergaben sich für die jeweiligen Parameter folgende Ergebnisse: Für den Bias wurden die geringsten Unterschiede 16 Mal mit dem GTFCh-Design, 11 Mal mit dem FDA-Design und 5 Mal mit dem ANSI/ASB-Design beobachtet. Bei der Wiederholpräzision wurden die geringsten Unterschiede 13 Mal mit dem FDA-Design, 12 Mal mit dem GTFCh-Design und 7 Mal mit dem ANSI/ASB-Design festgestellt. Bei der Laborpräzision wurden die geringsten Unterschiede 22 Mal mit der GTFCh-Design, 8 Mal mit der FDA- Design und 2 Mal mit der ANSI/ASB- Design festgestellt.

Dass kleinere Differenzen für die Laborpräzision am häufigsten mit dem GTFCh-Design beobachtet wurden, entspricht der theoretischen Erwartung, da dieses Design mit der höchsten Anzahl von Freiheitsgraden (df) für den Faktor „Tag“ verbunden ist (df=7 für GTFCh gegenüber df = 4 für ANSI/ASB und df = 2 für das FDA-Design), der im Allgemeinen den größten Beitrag zu diesem Parameter leistet.

Für den gesamten Datensatz lagen zwei der Biasergebnisse leicht über den Akzeptanzgrenzen (± 20 % bei allen Konzentrationen für ANSI/ASB; ± 20 % nahe der LLOQ und ± 15 % bei anderen Konzentrationen für GTFCh und FDA). Alle anderen Ergebnisse für Bias, Wiederholpräzision und Laborpräzision lagen innerhalb dieser Grenzen. Die Ergebnisse der einzelnen Datensätze überschritten die jeweiligen Akzeptanzgrenzen für Bias 4/96 Mal (4,2 %; GTFCh und FDA) und 7/128 Mal (5,5 %) für das ANSI/ASB-Design. Bei Wiederholpräzision und

Laborpräzision lagen alle Ergebnisse innerhalb der jeweiligen Akzeptanzkriterien, mit Ausnahme eines Ergebnisses für die Laborpräzision im FDA-Design.

Schlussfolgerung. In den untersuchten Datensätzen lieferte das GTFCh-Design, welches einen längeren Zeitraum mit weniger Wiederholungen pro Tag abdeckt, etwas konsistentere Ergebnisse für Bias, Wiederholpräzision und Laborpräzision, im Vergleich zu den ANSI/ASB- und FDA-Designs, welche mehr Wiederholungen über einen kürzeren Zeitraum abdecken, bei einer ähnlichen Gesamtzahl an Messungen ($n=16$ für GTFCh vs. $n=15$ für ANSI/ASB und FDA). Allerdings ergaben im Wesentlichen alle Designs identische Ergebnisse hinsichtlich der Einhaltung oder Nichteinhaltung der genannten Validierungsparameter innerhalb der jeweiligen Akzeptanzgrenzen. Ob sich diese Beobachtungen verallgemeinern lassen, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Struktur-Aktivitäts-Beziehung der P-gp-ATPase-Modifikation synthetischer Cannabinoide und Wechselwirkungsvorhersage

Lea Wagmann, Anna Spanier, Markus R. Meyer

Abteilung für Experimentelle und Klinische Toxikologie, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Präklinisches Zentrum für Molekulare Signalverarbeitung (PZMS), Universität des Saarlandes, Homburg

Hintergrund und Ziele. Das menschliche P-Glykoprotein (P-gp) hat als prominenter Efflux-Transporter einen großen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen. P-gp ist aufgrund seiner Präsenz im Darm, in der Blut-Hirn-Schranke und in den Ausscheidungsorganen an der Verteilung von Arzneistoffen beteiligt. Relevante Wechselwirkungen können auftreten, wenn der Transport eines Arzneistoffs durch eine zweite Substanz erhöht oder verringert wird. Leider liegen nur sehr wenige Informationen über den Einfluss von Missbrauchsdrogen, besonders von Neuen Psychoaktiven Substanzen, auf die P-gp-Aktivität vor. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, zu untersuchen, inwiefern 20 synthetische Cannabinoide (SC) mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften die P-gp-ATPase-Aktivität *in vitro* verändern. Auf der Basis dieser Ergebnisse sollten weiterführend eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung erstellt und mögliche Wechselwirkungen vorhergesagt werden.

Methoden. Membranen mit cDNA-exprimiertem menschlichen P-gp wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen (2, 20, 200 μM , $n = 3$) jedes SC (A-CHMINACA, A-FUBINACA, 3,5-AB-5F-FUPPYCA, AB-5F-P7AICA, AB-CHMFUPPYCA, ADB-BINACA, Cumyl-4CN-BINACA, DMBA-CHMINACA, MDMB-4en-PINACA, MDMB-4F-BINACA, MDMB-5F-PICA, MDMB-FUBICA, MMB-4en-PICA, MMB-CHMICA, MMB-FUBINACA, MPhP-5F-PICA, 2F-QMPSB, QMMSB, QMPCB oder SGT-233) in Gegenwart von Adenosin-5'-triphosphat (ATP, 4 mM) bei 37°C für 20 min inkubiert. Zusätzlich wurden Ko-Inkubationen der einzelnen SC (2, 20, 200 μM , $n = 3$) mit Verapamil (20 μM) durchgeführt. Die Adenosin-5'-diphosphat (ADP)-Bildung wurde mittels HILIC-HRMS/MS im negativen Ionisierungsmodus vermessen und quantifiziert und mit Referenzinkubationen, u. a. Inkubationen ohne P-gp oder Inkubationen mit dem P-gp-ATPase-Modellaktivator Verapamil, verglichen. Unterschiede der ADP-Bildung wurden auf statistische Signifikanz geprüft (one-way ANOVA plus Dunnetts Mehrfachvergleichstest).

Ergebnisse und Diskussion. Da die ATP-Hydrolyse mit anschließender Freisetzung von ADP und anorganischem Phosphat für den P-gp-Transport entscheidend ist, wurde die ADP-Bildung gemessen und als *In-vitro*-Marker für die P-gp-ATPase-Aktivität verwendet. Eine solche erhöhte Aktivität korreliert häufig mit der P-gp-Transportaktivität *in vivo*. Sechzehn von 20 SC

zeigten eine statistisch signifikante Stimulation der P-gp-ATPase. Fünfzehn von ihnen erhöhten die ADP-Bildung bei der niedrigsten Testkonzentration von 2 μM , was auf eine hohe Affinität zur P-gp-ATPase hinweist. Bei 10 SC war die ADP-Bildung höher als bei den Referenzinkubationen mit Verapamil. Im Hinblick auf die Struktur-Aktivitäts-Beziehung schien die Kopfgruppe der wichtigste Bestimmungsfaktor für die ATPase-Stimulationsfähigkeit eines SC zu sein. Kopfgruppen, die von Adamantan oder den Aminosäuren Valin oder Phenylalanin abgeleitet sind, erwiesen sich als vorteilhaft, nicht aber solche, die von *tert*-Leucin abgeleitet sind. Die Strukturen von Kern-, Verknüpfungs- und Schweifgruppe schienen einen geringen Einfluss auf die P-gp-ATPase-Affinität des SC zu haben. Ko-Inkubationen der SC mit Verapamil wurden verwendet, um mögliche In-vivo-Interaktionen mit Arzneistoffen zu testen. Acht von 20 SC zeigten eine statistisch signifikant verringerte ADP-Bildung im Vergleich zu Referenzinkubationen mit Verapamil allein. Fünf von ihnen verringerten die ADP-Bildung bei der niedrigsten Testkonzentration von 2 μM . Die verringerte ADP-Bildung in Ko-Inkubationen könnte auf eine Hemmung des P-gp und eine damit verbundene verringerte Transportkapazität hinweisen. Allerdings sind die P-gp-Membranen in ihrem Vorhersagepotenzial begrenzt, da sie nur die P-gp-ATPase-Aktivität, nicht aber den Transport durch die Zellmembran abbilden. Dennoch können membranbasierte Experimente ein guter Ausgangspunkt für Folgeexperimente mit Vesikel- oder Zellschichtmodellen sein.

Schlussfolgerung. Membranbasierte Experimente stellen ein Screening-Instrument dar, welches eine schnelle Untersuchung der P-gp-ATPase-Stimulation ermöglicht. Die vorliegenden Daten zeigen, dass viele SC mit P-gp interagieren und dass die Struktur der Kopfgruppe von besonderer Bedeutung hierfür ist. Einige SC hemmen nachweislich die P-gp-ATPase in Ko-Inkubationen. Eine umfassende Untersuchung der Toxikokinetik von Neuen Psychoaktiven Substanzen ist unerlässlich für Risikobewertungen und Präventionsvorhaben und die weitere Charakterisierung potenzieller P-gp-Substrate oder -Inhibitoren in der Gruppe der SC sollte weiter vorangetrieben werden.

Eine Metabolomics-Methode zur CYP-Phänotypisierung: Ein Proof-of-Concept zur Verwendung von enzymbasierten Versuchsansätzen

Yannick Wartmann, Thomas Kraemer, Andrea E. Steuer

Abteilung für Forensische Pharmakologie und Toxikologie, Institut für Rechtsmedizin,
Universität Zürich, Zürich, Schweiz, yannick.wartmann@irm.uzh.ch

Hintergrund und Ziele. Cytochrom-P450 (CYP)-Enzyme spielen eine entscheidende Rolle im Phase-1-Metabolismus von Medikamenten. Dabei stellt die interindividuelle Variabilität ihrer Aktivität eine große Herausforderung für die klinische und forensische Interpretation dar. Derzeit wird der Enzymphänotyp eines Individuums durch die Verabreichung etablierter CYP-Substrate und anschließender Bestimmung der Pharmakokinetik ihrer Metaboliten bestimmt. Dieses Standardverfahren ist jedoch für forensische Anwendungen, insbesondere in der Post-mortem-Toxikologie, nicht durchführbar. Die Identifizierung von endogenen Biomarkern, die eine Bestimmung des CYP-Phänotyps erlauben würden, z. B. durch Metabolomics-Techniken, könnte dieses anhaltende Problem lösen. Dabei sind streng kontrollierte In-vivo-Studien am Menschen, die den CYP-Phänotyp durch die Verabreichung von CYP-hemmenden oder -induzierenden Medikamenten modulieren, derzeit am vielversprechendsten für das Screening nach solchen endogenen CYP-Biomarkern. Allerdings schränken ethische, rechtliche, finanzielle

und/oder Komplexitätsfragen die Möglichkeiten solcher Studien ein. Daher ist es notwendig, alternative experimentelle Methoden zu finden. Eine mögliche Herangehensweise könnte die Verwendung menschlicher Lebermikrosomen (HLM) oder relevanter CYP-Isoenzyme sein, die jedoch die Zugabe endogener Substrate (bestenfalls mehrere simultan) benötigen, um nach unbekanntem, endogenen CYP-Biomarkern zu suchen. Unser Ansatz zielt darauf ab, zu untersuchen, ob komplexe Matrices, wie z. B. Blut, als Quelle endogener Metabolite in enzymatischen Inkubationen verwendet werden können. Das Hauptziel war es daher zu zeigen, dass HLMs und CYP-Isoenzyme auch nach Zugabe von humanen Matrices anstatt Pufferlösung wie erwartet metabolisieren. Dies soll durch die Analyse exogener und zuvor postulierter endogener (Bio)marker für einen bestimmten CYP-Phänotyp aufgezeigt werden, bevor eine ungerichtete Suche nach potenziell neuen Biomarkern für die CYP-Aktivität durchgeführt wird.

Methoden. Für alle Experimente wurden etablierte HLM-Assays verwendet. Diese waren wie folgt zusammengesetzt: HLMs oder Isoenzyme (2C19, 2D6 oder 3A4), CYP-Co-Substrat NADPH (Regenerationssystem: NADP⁺, G6P, G6PD), Superoxiddismutase und MgCl in Phosphatpuffer. Zusätzlich zu den exogenen Substraten (Omeprazol, Dextromethorphan und Midazolam für CYP2C19, CYP2D6 bzw. CYP3A4) wurde EDTA-Blut oder eine 50 %-Mischung (v/v) aus Blut und Phosphatpuffer als endogene Substratmischung hinzugefügt. Kontrollproben ohne endogene Substrate wurden in Phosphatpuffer durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten Inkubationen entweder ohne HLM/Isoenzyme oder ohne Zugabe des Regenerationsmixes. Alle Inkubationen (n = 5 pro Bedingung) wurden bei 37°C für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurden 50 µL eiskaltes Acetonitril hinzugefügt, und 50 µL Überstand nach Vortexen und Zentrifugation in ein konisches Reaktionsgefäß überführt. Alle Proben wurden mittels einer scheduled MRM-Methode (Sciex QTrap 5500) analysiert, wobei exogene und endogene CYP-Substrate und Metaboliten erfasst wurden. Zusätzlich wurden die Proben mit einer ungerichteten Metabolomics-Methode (Sciex TripleTOF 6600) gemessen. Die MRM-Daten wurden mit Multiquant verarbeitet, während die ungerichteten Daten mit MS-DIAL (4.9.2 und 5.2.2) prozessiert wurden. Die resultierenden Peak-Flächen wurden weiter in R analysiert.

Ergebnisse und Diskussion. Der Vergleich der exogenen Testsubstrate Dextromethorphan, Midazolam oder Omeprazol anhand der MRM-Daten aus HLM-Assays mit Puffer, 50% Blut oder nur Blut, zeigte eine leicht erhöhte Dextromethorphan-Bildung bei Anwesenheit von Blut, während die Bildung von OH-Midazolam und 5-OH-Omeprazol ähnlich war (t-Test, p = 0.001, p = 0.286, p = 0.942). Weiter konnte eine nicht signifikante Abnahme von Dextromethorphan beobachtet werden, während Midazolam und Omeprazol nach der Inkubation signifikant abnahmen (t-Test, p = 0.058, p = 0.0001, p = 0.002). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zugabe von Blut die Enzymleistung nicht behindert. Betrachtet man zuvor postulierte endogene CYP-Biomarker, so konnte in HLM-Assays eine Zunahme von (11,12)-EET (postuliertes CYP2C19-Produkt aus Arachidonsäure) beobachtet werden, welches in den Negativkontrollen nicht vorhanden war. Zusätzlich wurde eine nicht signifikante Abnahme von Desoxycholsäure und Cortisol (postulierte endogene Substrate von CYP3A4) in den jeweiligen Isoenzym-Assays festgestellt. Dies stimmt mit der Literatur überein und zeigt, dass unser Assay In-vivo-Bedingungen potenziell korrekt nachahmt. Während Serotonin (postulierter Biomarker, der von CYP2D6 aus 5-Methoxytryptamin gebildet wird) in allen unseren Assays in geringen Mengen nachweisbar war, wurde 5-Methoxytryptamin nicht detektiert. Durch die Auswertung der ungezielten Daten konnten wir eine Liste von 313 (2C19), 35 (2D6) und 22 (3A4) überwiegend unbekanntem (Bio)markern erstellen, die einen signifikanten Unterschied zwischen den CYP-Inkubationen und beiden negativen Bedingungen aufweisen, jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden negativen Bedingungen, was sie zu potenziellen (Bio)markern für die entsprechenden CYP-Enzyme macht. Omeprazol/OH-Omeprazol, Dextromethorphan/Dextromethorphan und OH-Midazolam wurden unter diesen Markern vorläufig identifiziert. Diese

Ergebnisse bestätigen die Eignung unseres Ansatzes zum Screening nach endogenen Biomarkern für den CYP-Phänotyp und bilden die Grundlage für Folgestudien zur Identifizierung dieser Biomarker.

Schlussfolgerung. Wir konnten zeigen, dass Standard-HLM- und CYP-Isoenzym-Assays auch mit der Zugabe von menschlichem Blut als Quelle zahlreicher endogener Metaboliten funktionieren. Mit unseren Experimenten konnten wir Zunahmen/Abnahmen klassischer Substrate/Metaboliten sowie die Entstehung neu gebildeter, zuvor postulierter endogener Biomarker nachweisen. Es ist möglich, in unseren experimentellen Daten mittels eines ungezielten Metabolomics-Ansatzes signifikant veränderte Merkmale zu finden, die auf potenziell neue Biomarker zur CYP-Phänotypisierung hinweisen. Es sind jedoch weitere Untersuchungen zu diesen Ansätzen, sowie geeignete Strategien zum Vergleich und zur Bestätigung mit In-vivo-Studien erforderlich.

Herausforderungen bei der Haaranalyse: Synthetische Cannabinoide und Kontamination durch eine getragene Kopfbedeckung

Annette Zschiesche, Yvonne S. Jungel, Laura M. Huppertz, Merja A. Neukamm,
Volker Auwärter

Universitätsklinikum Freiburg, Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Freiburg
im Breisgau

Hintergrund und Ziele. In Abstinenzkontrollprogrammen sind Urin und Kopfhaare übliche Matrices mit jeweils unterschiedlichen Vor- und Nachteilen. Urinproben sind minimal invasiv, während Haarproben einen längeren Nachweiszeitraum abdecken, aber anfällig für verschiedene Formen der Kontamination sind. So kann die Exposition mit dem Nebenstromrauch synthetischer Cannabinoide (SCs) auch bei Nicht-Konsumenten zu falsch positiven Ergebnissen führen, da sich sowohl die Verbindungen als auch einige spezifische Pyrolyseprodukte - welche auch als Metaboliten auftreten - auf den Haaren ablagern können. Darüber hinaus kann der Kontakt mit Drogenmaterial über die Hände ebenfalls zu falsch positiven Ergebnissen führen, ohne dass ein tatsächlicher Konsum stattgefunden hat. In einem Fall, bei dem Kopfhaarproben im August 2023 entnommen wurden, konnte ein positiver Befund mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Tragen einer Baseballkappe zurückgeführt werden. Das Basecap war zuvor während des Konsums von SCs und danach getragen worden, was zu positiven Ergebnissen führte, obwohl der Proband angab, seit Juli 2021 abstinent gewesen zu sein. Dieser Fall verdeutlicht erneut die Herausforderungen bei der Interpretation haaranalytischer Ergebnisse.

Methoden. Eine Kopfhaarprobe (Untersuchungslänge: 0 - 6 cm, Gesamtlänge: 8,5 cm), die im Rahmen eines Abstinenzkontrollprogramms abgenommen wurde, wurde in mehreren Schritten dekontaminiert (Wasser, Aceton und Petrolether). Die gewaschene Haarprobe wurde getrocknet und eine Teilmenge (35,0 mg) mit Methanol versetzt, mittels Schere in ca. 2 mm große Stücke geschnitten und nach Zugabe von internen Standards einer dreistündigen Ultraschall-extraktion unterzogen. Die Kalibrierung erfolgte unter Verwendung von aufdotierter Leerhaarmatrix, die auf analoge Weise aufgearbeitet wurde. Die Waschlösungen der Dekontaminations-schritte wurden vereint, mit deuterierten Standards versetzt, zur Trockene eingengt und in mobiler Phase rekonstituiert. Ein Stück der Baseballkappe (ca. 6 x 5 cm etwa auf Höhe des hinteren Scheitelbereiches) wurde mit Methanol extrahiert, ein Aliquot entnommen und analog zu den

vereinigten Waschlösungen aufgearbeitet. Die Extrakte wurden mit LC-MS/MS analysiert, der des Basecaps zusätzlich mittels GC-MS.

Ergebnisse und Diskussion. Die Haarprobe wurde mit ca. 8,7 pg/mg positiv auf MDMB-4en-PINACA und weitere SCs (4F-MDMB-BICA, 4F-MDMB-BINACA, 5F-MDMB-PINACA (anderer Name: 5F-ADB), 5F-CUMYL-PEGACLONE, 5F-MDMB-PICA, ADB-4en-PINACA, ADB-BUTINACA (anderer Name: ADB-BINACA), Cumyl-CBMICA, Cumyl-NBMINACA, EDMB-PINACA, JWH-122 und JWH-210) getestet. Einige Verbindungen wurden nur in Spuren nachgewiesen. Die Baseballkappe enthielt ca. 31 ng/cm² MDMB-4en-PINACA, alle in der Haarprobe detektierten SCs, sowie geringe Mengen an ADB-HEXINACA, Cumyl-CBMEGACLONE und Cumyl-CH-MEGACLONE. Im Extrakt der Baseballkappe konnten mit GC-MS keine SCs nachgewiesen werden. Die Analyse der Haarwaschlösungen bestätigte die Ergebnisse der Haaranalyse, mit Ausnahme von JWH-122. Unter der Annahme, dass 1 cm² der Baseballkappenoberfläche mit etwa 20 mg Haar interagiert, waren die Wirkstoffmengen in der Baseballkappe um ca. drei Größenordnungen höher als im Kopfhair. Dies stützt die Hypothese, dass eine Übertragung der Substanzen auf das Haar beim Tragen der kontaminierten Baseballkappe stattgefunden hat.

Schlussfolgerung. Das Spektrum der nachgewiesenen Analyten stützt die Angaben des Probanden, da alle SCs der Drogenagentur der Europäischen Union (EUDA, früher: Europäischen Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA)) vor dem behaupteten Abstinenzzeitraum gemeldet wurden. Die zuletzt in diesem Fall gemeldeten SCs - EDMB-PINACA, ADB-4en-PINACA und ADB-HEXINACA - wurden in Europa erstmalig im Januar, Februar bzw. Anfang Juli 2021 identifiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Kontamination durch getragene Kleidung, wie z. B. eine Baseballkappe, zu positiven Ergebnissen in der Haaranalyse führen kann, ohne dass zusätzliche Expositionswege, wie ein inhalativer Konsum, in Betracht gezogen werden müssen.

Accidental intoxication of three policemen with ADB-BINACA after inhaling substance containing dust

Wiebke Rudolph-Allritz

Brandenburgisches Landesinstitut für Rechtsmedizin, Potsdam

Eine Freigabe des Abstracts über den TIAFT-Vortrag in St. Gallen hinaus wurde der Autorin von den zuständigen Dienststellen nicht erteilt.

***Anmerkung von Lisa Höfert et al.** zum o. g. Abstract „Vorläufige pharmakokinetische und psychophysische Daten nach kontrolliertem inhalativem und oralem Konsum von Hexahydrocannabinol (HHC)“: Der Abstract stellt eine reine deutsche Übersetzung des zur TIAFT eingereichten Abstracts dar und enthält nur vorläufige, zum Zeitpunkt der Erstellung vorliegende Daten. Die Studie wurde mittlerweile mit insgesamt sechs Probanden abgeschlossen. Eine Publikation der vollständigen Daten ist in Arbeit.