

## 15. GTFCh Journal-Club – „Nutzung der Glucuronidase in der Forensik“

**Cornelius Heß**

MVZ Dr. Stein und Kollegen Mönchengladbach, Abteilung Forensische Toxikologie,  
Tomphecke 45, 41169 Mönchengladbach, chess@labor-stein.de

---

### Der GTFCh Journal Club – Historie und Fortbildungstyp

Der Journal Club soll ein zusätzliches Online-Fortbildungsangebot für die GTFCh-Mitglieder sein. Zu einem forensisch relevanten Thema sollen Publikationen vorgestellt und intensiv und kritisch diskutiert werden. Die Zuhörerinnen und Zuhörer werden so auf die Literatur und auf die Fragestellung aufmerksam und müssen die Literatur nicht selbst durcharbeiten. Beim entsprechenden Vortrag kann es sich um ein Fallbeispiel oder ein Gutachten handeln, dessen Bearbeitung anhand von Literatur erleichtert wurde. Eigene Forschungsarbeiten können gemeinsam mit bereits vorhandener Literatur zu diesem Thema vorgestellt werden. Doktoranden können die Literaturrecherche und die daraus hervorgehenden wichtigsten Publikationen für Ihre Doktorarbeit vorstellen.

Die seit dem Jahr 2021 abgehaltenen Journal Clubs befassten sich mit grundlegender Literatur, die man nicht nur in der Ausbildung gelesen haben sollte, wie z. B. Stefan Toennes im August 2021 – „Die Huestis Formeln“ oder Thomas Daldrup im Juni 2024 – „THC-COOH im Blutserum und Konsumregelmäßigkeit“. Es handelte sich auch um für die Forensik bedeutsame Methoden, z. B. im Journal-Club von Moritz Losacker und Cornelius Heß im Oktober 2021 – „Stereoselektive Analytik“, von Silvana Petzel-Witt im Juni 2022 – „Referenzbereiche in der Post mortem Toxikologie“, von Sven Baumann im Januar 2023 – „Haaranalytik: Dekontamination und Extraktion“, von Christopher Wiedfeld im Juni 2023 – „Einzelhaaranalytik“, von Björn Mossmann im November 2023 – „Alternative Screeningverfahren“ und von Anne Scheunemann im Januar 2024 – „Principal Component Analysis“. Einzelfragestellungen wurden diskutiert von Katja Mercer-Chalmer-Bender im Dezember 2022 – „Cannabinoid-Konzentrationen nach Konsum von CBD-Hanf“, von Michael Böttcher im August 2022 – „Peth und EtG“, von Ricarda Kegler im März 2023 – „GHB im Haar“, von Cornelius Heß im September 2023 – „THC-Säure A im Haar“, von Lina Lucuta im Februar 2024 – „Ketamin im Straßenverkehr“ und von Merja Neukamm im April 2024 – „THC-COOH und Kreatinin im Urin und erneuter Konsum“.

Dabei ist die Gesellschaft auf Freiwillige angewiesen. Interessenten können sich bei Cornelius Heß (chess@labor-stein.de) melden, der gern bei der Termin- und Themenfindung behilflich ist. Generell ist der Journal-Club freitags ab 13:15 Uhr mit einem ca. 45-60 Minuten dauernden Vortrag und einer ca. 30-minütigen Diskussion im Anschluss geplant.

Am 16.01.2026 fand nach längerer Pause der 15. Journal Club statt. Dieser hatte die Nutzung der Glucuronidase zur Spaltung von Glucuronid-Konjugaten in der Forensik zum Thema.

### Glucuronide und toxikologische Untersuchung

Glucuronide werden katalysiert über die UDP-Glucuronosyltransferase als Phase II-Metaboliten zur besseren Wasserlöslichkeit im endoplasmatischen Retikulum der Hepatocyten gebildet. Dabei werden  $\beta$ -D-Glucuronide, d. h. an  $\beta$ -Glucuronsäure gebundene Aglyka ( $\beta$ -D-Glucuronsäure = Uronsäure der Glucose, Abb. 1) gebildet. Die meisten Xenobiotika werden als O-glucuronide, manche aber auch als N-glucuronide ausgeschieden.

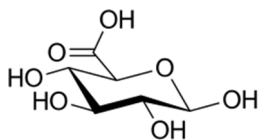


Abb. 1.  
β-D-Glucuronsäure.

Die direkte Untersuchung dieser Glucuronide ist mittels LC-MS/MS grundsätzlich möglich – für spezifische Untersuchungen oder Fragestellungen werden diese ggf. direkt bestimmt (Ethylglucuronid, Morphin-glucuronide; Glucuronide von Benzodiazepinen). Voraussetzung dafür ist allerdings die Möglichkeit des kommerziellen Erwerbs dieser Konjugate, die nicht immer gegeben ist.

Auch für die Testung der Hydrolyseeffizienz ist das Vorhandensein derartiger Standards Voraussetzung. Für die indirekte Bestimmung dieser Glucuronide ist die Hydrolyse unbedingt notwendig, dies gilt nicht nur für die gezielte Quantifizierung dieser Konjugate, sondern vor allem auch für die qualitative Detektion in ungerichteten Suchanalysen (massenspektrometrische Unknown Screenings, immunchemische Analysengänge). Für die Spaltung von Glucuronid-Konjugaten stehen sowohl die Hydrolyse unter sauren oder alkalischen Bedingungen als auch die enzymatische Spaltung oder eine Kombination aus beidem zur Verfügung. In den folgenden, im Journal-Club besprochenen, Publikationen wurden jeweils Urinproben hydrolysiert.

### Beta-Glucuronidase - Grundlagen

β-Glucuronidase-Enzyme werden einerseits aus tierischem Material gewonnen. So aus abalone entrails (Seeohr-Eingeweiden), aus *Helix pomatia* (Weinbergschnecke), *Helix aspersa* (Gefleckte Weinbergschnecke), *Patella vulgata* (Gemeine Napfschnecke), *Chlamys opercularis* (Kleine Pilgermuschel) oder Rindern (bovine β-glucuronidase). Häufig wird Glucuronidase aus *H. pomatia* genutzt. Dafür wird das Enzym aus Schneckengewebe, nicht aus dem Schleim gewonnen. Den gezüchteten oder gesammelten Schnecken werden die Verdauungsdrüsen entnommen, diese sofort gekühlt, homogenisiert, ein Puffer pH 4,5-5,0 zugegeben, zentrifugiert zur Abtrennung der Zelltrümmer, gereinigt durch Fällung, Dialyse und/oder Chromatographie und Stabilisatoren zugegeben (z. B. Glycerol). Zur Lagerung wird das Enzym dann gefriergetrocknet und meist mit Arylsulfatase (ebenfalls aus *H. pomatia*) kombiniert. Alternativ und tierfrei kann β-Glucuronidase rekombinant in *E. coli* gewonnen werden.

Aufgrund der Herstellung enthält Schnecken-Glucuronidase meist zusätzlich Arylsulfatase und weitere Varianten aus der posttranslationalen Modifikation. Es handelt sich so generell bei tierischen Produkten im Vergleich zu rekombinanten Enzymen (aus *E. coli*) nicht um ein einzelnes definiertes Enzym, sondern um einen Enzymmix, der vermehrt Nebenreaktionen hervorrufen kann, sodass man generell von reproduzierbareren Ergebnissen bei rekombinanten Enzymen sprechen kann. Die notwendige Reaktionszeit ist dabei auch kürzer und die Chargenvariabilität geringer bei rekombinanten Enzymen (Morris et al. J Anal Tox 2014; Taylor et al. J Anal Tox 2017). Die Aktivität des Enzyms ist dabei extrem von der Quelle und vom pH-Optimum abhängig. Die genauen kinetischen Parameter der enzymatischen Reaktion hängen extrem vom Substrat ab. Zu optimierende Parameter sind: Enzymtyp (Enzymaktivität), Menge Enzym, Inkubationstemperatur, Inkubationsdauer, pH des Puffers.

Für die Enzymaktivität (IE oder IU/mL) gilt dabei: 1 U ist diejenige Enzymmenge, die 1 μmol Substrat pro Minute unter definierten Standardbedingungen (pH, Temperatur, Substratkonzentration) umsetzt. Dabei handelt es sich fast immer um eine individuelle Herstellerdefinition. Meist ist 1U dabei diejenige Menge Enzym, die 1 μmol p-Nitrophenyl-β-D-glucuronid pro Minute bei 37°C und definiertem pH spaltet. Die reale Leistung bzgl. Glucuroniden von Xenobiotika kann im Vergleich dazu deutlich variieren. So sagt die Enzymmenge zwar etwas über die funktionelle Leistung des Enzyms aus, die Menge (in U/mL) ist zwischen den Enzymen aber nicht immer vergleichbar. Enzyme aus *E. coli* weisen gewöhnlich 100.000 - 300.000 U/mL auf, zum Einsatz sollten 1.000 - 10.000 U/Probe kommen. Enzyme aus *H. pomatia* weisen zu meist 50.000 - 200.000 U/mL auf, zum Einsatz sollten 5.000 - 20.000 U/Probe kommen.

## Glucuronide und Immunchemie

Die Firma ThermoFisher bietet CEDIA-Testkits für Benzodiazepine und Opiate im Urin an, bei denen die Hydrolyse von Glucuronid-Konjugaten vor der Testung unentbehrlich ist. Der „High Sensitivity („HS“) CEDIA Benzodiazepin-Assay“ beinhaltet dabei eine enzymatische Vorbehandlung, sodass relevante Glucuronide wie Lorazepam-glucuronid (Cut Off 450 ng/mL im Vergleich zu Lorazepam selbst 180 ng/mL), Oxazepam-glucuronid (Cut Off 800 ng/mL im Vergleich zu Oxazepam selbst 160 ng/mL) und Temazepam-glucuronid (Cut Off 800 ng/mL im Vergleich zu Lorazepam selbst 220 ng/mL) zumindest einen gewissen Anteil der Kreuzreaktivität aufweisen. Mit „Kreuzreaktivität“ wird dabei wahrscheinlich die nach der Hydrolyse vorherrschende Reaktivität des bereits hydrolysierten Konjugats gemeint. Ohne Nutzung dieser enzymatischen Vorbehandlung („CEDIA Benzodiazepin-Assay“) weisen die relevanten Glucuronide keine Kreuzreaktivität auf (die drei genannten weisen bei 10.000 ng/mL keine Reaktion auf), sodass bei Nutzung dieses Assays unbedingt auf eine eigene Hydrolysespaltung vor der immunchemischen Analytik zurückgegriffen werden sollte. Für den entsprechenden CEDIA Opiat-Test ist diese Vorbehandlung nicht notwendig, weist der Antikörper doch für das Morphin-3- und das Morphin-6-glucuronid ausreichende Kreuzreaktivität auf (Kreuzreaktivitätstabellen CEDIA).

### Publikation zu „Spaltung von N-glucuroniden“

Namera A, Saito T, Nagao M: Investigation of commercially available recombinant and conventional  $\beta$ -glucuronidases to evaluate the hydrolysis efficiencies against O-glucuronides and N-glucuronides in urinary drug screening. *Forensic Toxicol* 2025 Jul;43(2):356-364. doi: 10.1007/s11419-025-00715-6.

In dieser Publikation wurden die Glucuronide von Amitriptylin, Diphenhydramin und Oxazepam untersucht. Die Relevanz der Spaltung der in dieser Publikation untersuchten Glucuronide ist hoch: Nur 2 % Amitriptylin wird frei in den Urin ausgeschieden, bis zu 50 % der Dosis als glucuronidierte Metabolite (auch 11-Hydroxy-Amitriptylin-glucuronid, Nortriptylin-N-glucuronid), 10 % als Amitriptylin N-glucuronid (Dahl-Puustinen et al. 1989). Weniger als 1 % einer Diphenhydramin-Dosis wird unverändert im Urin gefunden; es wird zu 2 - 14 % als N-glucuronid in den Urin ausgeschieden (Fischer et al. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1997). Oxazepam wird zu rund 80 % als Oxazepam-glucuronid ausgeschieden, lediglich 1 % als freies Oxazepam und 5 % als unkonjugierte Metaboliten (Fachinfo Oxazepam AL).

In der Publikation wird hauptsächlich das Produkt IMCSzyme (als „RT“: bei 20 - 25°C und pH 5,5 - 6,5 und als „3S“ bei 55°C und pH 6,0 - 8,0) beworben, diese werden mit herkömmlichen Glucuronidasen (rekombinante Glucuronidase aus *P. vulgata* bei 60 - 70°C und pH 3,8 - 5,0; und Glucuronidasen aus *E. coli* (bei 37°C und pH 6,0 - 7,0) und *H.pomatia* (bei 37°C und pH 4,5 - 5,0)) verglichen. Die optimale Reaktionszeit der IMCS-Enzyme wird dabei mit 15 - 30 Minuten von Herstellerseite sehr kurz angegeben. Die Hydrolyseeffizienz für die drei Glucuronide wurde dabei bei 2 Temperaturen (37 °C und 55°C) und bei Inkubationszeiten 15, 30, 45, 60, 120, 180 und 360 min getestet. Die Menge, welche pro Enzymtyp hinzugegeben wurde, war 2000 Units/Probe.

Die Ergebnisse zeigen, dass für alle Analyten bei 37°C (IMCS „RT“ bei 25°C) bereits nach 15 Minuten die Hydrolyseeffizienz für Oxazepam enorm hoch ist (meist > 80 %) und dass diese durch eine längere Inkubationszeit kaum gesteigert werden kann. Bei höheren Temperaturen (55°C bzw. vor allem bei 70°C als optimale Temperatur für die Glucuronidase aus *P.vulgata*) sieht man einen Abfall der Hydrolyseeffizienz, die auf die Instabilität von Oxazepam bei hohen Temperaturen zurückzuführen ist (Fu et al. *J Anal Tox* 2010). Bzgl. der Hydrolyseeffizienz für die N-glucuronide konnte gezeigt werden, dass die Glucuronidasen aus *H.pomatia* und *E.coli*

im Vergleich zu den anderen drei genutzten bei niedrigen Temperaturen nur geringe Hydrolyseeffizienzen zeigt (lediglich ca. 10 % für Amitriptylin und 5 % für Diphenhydramin nach 360 Minuten). Bei höheren Temperaturen konnte zumindest die Glucuronidase aus *P. vulgata* an die hohen Effizienzen der IMCS Enzyme herankommen.

Insgesamt zeigt die Publikation deutlich, dass gerade bei Unknown Screenings die Parameter der Nutzung der Glucuronidase immer ein Kompromiss bilden müssen für die Hydrolyseeffizienz vieler verschiedener Konjugate.

### Publikationen zu „Bildung von Artefakten aus Benzodiazepinen bei Nutzung der Glucuronidase“

Fu S, Lewis J, Wang H, Keegan J, Dawson M. A novel reductive transformation of oxazepam to nordiazepam observed during enzymatic hydrolysis. *J Anal Tox* 2010; 34 (5): 243-251.

Fu S, Molnar A, Bowron P, Lewis J, Wang H. Reduction of temazepam to diazepam and lorazepam to delorazepam during enzymatic hydrolysis. *Anal Bioanal Chem* 2011 Apr;400(1): 153-64. doi: 10.1007/s00216-011-4723-y.

Die saure Hydrolyse ist für die Hydrolyse von Glucuronidkonjugaten von Benzodiazepinen nicht geeignet, da es zur Degradation der Benzodiazepine zu Benzophenonen kommt (Suzuki et al. 1987). Doch auch die Nutzung der enzymatischen Hydrolyse kann zur Bildung von Artefakten führen, die bei der Interpretation von Benzodiazepin-Befunden zu Komplikationen führen kann. Fu et al. zeigten in zwei Publikationen, dass die Nutzung von Glucuronidasen zur Bildung geringer Mengen anderer Benzodiazepine führen kann, die normalerweise nicht im Metabolismus des entsprechend anderen auftreten.

So kann aus Hydroxy-Benzodiazepinen das entsprechende Benzodiazepin entstehen, aus Oxazepam Nordiazepam (Abbildung 2), aus Temazepam Diazepam und aus Lorazepam Delorazepam. Dies gilt unabhängig von der Art der genutzten Glucuronidase (genutzt wurden Glucuronidasen aus *E. coli* und aus *H. pomatia*). Die dabei entstehenden Mengen sind umso höher, je länger die Inkubationszeit und je höher die Inkubationstemperatur ist. Die ermittelten Konzentrationen reichen in Realproben aber jeweils nur bis zu maximal 2 % der Konzentration des entsprechenden Hydroxy-Benzodiazepins. Trotzdem ist es wichtig, im Hinterkopf zu behalten, dass unspezifische Reaktionen bei Zugabe der Enzyme vor allem bei hohen Konzentrationen an Hydroxy-Benzodiazepinen zu weiteren Befunden im Spurenbereich führen können, die man metabolisch nicht erwarten würde.

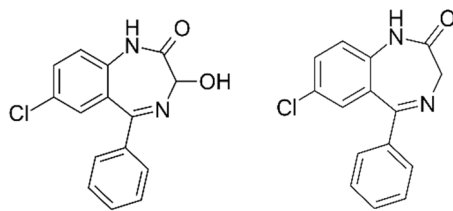


Abb. 2. Oxazepam (links) und Nordiazepam (rechts). Formeln aus Wikipedia.de, abgerufen am 11.03.2026.

### Publikationen zu „Hydrolyse von Opioid-glucuroniden“

Wang P, Stone JA, Chen KH, Gross SF, Haller CA, Wu AHB: Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. *J Anal Toxicol* 2006 Oct;30(8):570-5. doi: 10.1093/jat/30.8.570.

Skov K, Johansen SS, Linnet K, Rasmussen BS, Klose Nielsen MK. Exploring Enzymatic Hydrolysis of Urine Samples for Investigation of Drugs Associated with Drug-Facilitated Sexual Assault. *Pharmaceuticals (Basel)* 2023 Dec 21;17(1):13. doi: 10.3390/ph17010013.

Die Empfehlung für die quantitative Detektion von Morphin- und Codeinglucuroniden ist üblicherweise die saure Hydrolyse mit Salzsäure bei Temperaturen > 95°C (Hackett et al. 2002).

Im Vergleich zur enzymatischen Hydrolyse (z. B. Romberg et al. 1995) konnte gezeigt werden, dass die Inkubationszeit damit deutlich verkürzt werden kann (30 Minuten statt 24 Stunden). Allerdings kann 6-Monoacetylmorphin unter diesen Bedingungen zu Morphin hydrolysieren. Weitere Umwandlungen von Oxycodon in Oxymorphon, Hydrocodon in Hydromorphon und Codein in Morphin unter bestimmten Bedingungen sind beschrieben (Wang et al. J Anal Tox 2006; Sitasuwan et al. 2016).

Wang et al. konnten zeigen, dass Oxycodon im Gegensatz zu den weiteren getesteten Opioiden (Morphin: im Mittel zu 7 % frei in Patientenerinen ausgeschieden, Codein im Mittel zu 8 %, Hydromorphon im Mittel zu 7 % und Oxymorphon im Mittel zu 1 %) fast komplett frei ausgeschieden wird und daher für die Oxycodon-Analytik im Urin keine Hydrolyse benötigt wird. Die enzymatische Hydrolyse unter Nutzung von Glucuronidasen aus *P. vulgata*, *H. pomatia* oder *E. coli* konnte maximal 64 % der Morphin-glucuronide (mit Glucuronidase aus *P. vulgata*), unter Nutzung von Glucuronidase aus *E. coli* auch nur wenig mehr als ohne Hydrolyse erfassen.

Diese Publikation erschien allerdings im Jahr 2006. Inzwischen sind leistungsstärkere Glucuronidasen mit höherer Aktivität im Handel, die auch die Opioid-glucuronide in relativ kurzer Zeit spalten können. Skov et al. konnten zeigen, dass die heutigen Glucuronidasen sehr wohl in der Lage sind, in weniger als einer Stunde und bei niedrigen Temperaturen Morphin- und Codein-glucuronide zu spalten. Die Hydrolyseeffizienz lag bei > 90 % wenn Temperaturen von 40°C oder 55°C genutzt wurden. Dabei wurden die rekombinanten Beta-Glucuronidasen B-One und BG Turbo genutzt (beide von Kura Biotech). Der Glucuronidase/Arylsulfatase-Mix aus *H. pomatia* von Roche war für die Autoren allerdings nicht ausreichend, benötigte der Mix doch zumeist > 24 h, um die notwendigen Hydrolyseeffizienzen zu erreichen. Skov et al. konnten weiterhin zeigen, dass lange Hydrolysezeiten vor allem bei Unknown Screening Methoden den Nachteil haben, dass manche zu detektierenden Analyte (z. B. Zopiclon, Cathinone) in dieser Zeit instabil sind und degradieren können.

### **Publikation zu „Glucuronidierung von Begleitalkoholen“**

Kühnholz B, Bonte W.: Methodische Untersuchungen zur Verbesserung des Fuselalkoholnachweises. Blutalkohol 1983;20:399–410.

Es wird diskutiert, inwiefern eine Glucuronidspaltung gerade für länger-kettige Begleitalkohole sinnvoll ist. In einer Umfrage im Arbeitskreis Alkoholkonsum und Nachtrunk aus dem Jahr 2005 (Schulz et al.) nutzten 5 der 16 an der Umfrage teilnehmenden Institute die Glucuronidspaltung. Die Art der genutzten Glucuronidase wurde dabei nicht erfragt, ebensowenig die dazugehörigen Bedingungen oder mögliche getestete Hydrolyseeffizienzen. Auch bei Bonte wurden diese Effizienzen nie getestet, auch wenn „bei eigenen Trinkversuchen mit synthetischen Getränken“ gezeigt werden konnte, dass die jeweils verabreichten Mengen an Fuselalkoholen vor allem bei den höherkettigen Alkoholen zu einem relevanten Anteil in den Urin ausgeschieden werden (6,24 % bei Isobutanol, 7,53 % bei 2-Methylbutanol-1 und 3,11 % bei 3-Methylbutanol-1). Die Konjugation nehme bei den kürzerkettigen primären und sekundären Alkoholen in quantitativer Hinsicht keine bedeutsame Rolle ein, Isobutanol und die Methylbutanole werden aber kaum frei und fast ausschließlich in glucuronidierter Form ausgeschieden. Die einzige aufzufindende Publikation, welche sich tatsächlich mit einer Glucuronidspaltung von Begleitalkoholen beschäftigt, ist dabei Kühnholz und Bonte 1983.

Kühnholz und Bonte untersuchten die analytische Methode auf die Möglichkeit, die Peakflächen der einzelnen Analyte zu erhöhen. Neben der Nutzung der Ultrafiltration konnten sie in wenigen Trinkversuchen die drei längerkettigen Alkohole nur dann bzw. in erhöhten Konzentrationen nachweisen, wenn eine Glucuronidspaltung mit Glucuronidase aus *E. coli* genutzt wurde. Diese empfahlen sie. Weitere Publikationen zur Menge der Glucuronidierung

und Hydrolyseeffizienz bei Einsatz verschiedener Glucuronidasen sind in der Literatur nicht vorhanden, sodass die Interpretation vor allem der Isobutanol- und Methylbutanol-Befunde in Begleitstoffgutachten mit Vorsicht vorgenommen werden sollte.

### **Publikation zu Spaltung von Cannabinoid-glucuroniden**

Abraham TT, Lowe RH, Pirnay SO, Darwin WD, Huestis MA. Simultaneous GC–EI-MS Determination of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-Carboxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline Hydrolysis. *J Anal Tox* 2007 Oct;31(8):477–485. doi: 10.1093/jat/31.8.477.

Im Urin können neben THC-Carbonsäure-glucuroniden auch das THC-glucuronid und das Hydroxy-THC-glucuronid nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich bei den THC- (Monoether) und Hydroxy-THC-glucuroniden (Diether) um Etherglucuronide, während die Bindung der Glucuronsäure an die THC-Carbonsäure sowohl in 11-Position als Ester als auch als Diglucuronid mit Ester- und Etherbindung erfolgt. So sind für die Spaltung der einzelnen Cannabinoid-glucuronide auch unterschiedliche Hydrolysebedingungen notwendig. Abraham et al. testeten diverse Hydrolysebedingungen im Rahmen ihrer Methodvalidierung. Das THC-glucuronid konnte in Realurinen nicht nachgewiesen werden, es wird nur in den wenigen Stunden nach Konsum im Urin nachgewiesen. Das THC-glucuronid (gespikt) und das Hydroxy-THC-glucuronid (in Realproben) konnten nur unter Nutzung der enzymatischen Hydrolyse nachgewiesen werden (aus *E. coli* Type IX-A; 5000 U/mL; 37°C, 16 h).

THC-Carbonsäure-glucuronide lagen in geringem Maße auch frei im Urin vor, die enzymatische Spaltung erbrachte nur eine geringe Erhöhung der ermittelten Urin-Konzentrationen. Für die Spaltung dieser Glucuronide war die für die Cannabinoid-Urinalytik empfohlene alkalische Hydrolyse notwendig (80  $\mu$ L 10 N NaOH; 60°C, 20 min). Die Autoren entschieden sich für eine Kombination aus beidem, da alle Cannabinoid-Glucuronide erfasst werden sollten.

### **Schlussfolgerungen aus den vorgestellten Publikationen zur Glucuronid-Spaltung:**

Es wird empfohlen, die Hydrolyseeffizienz der wichtigsten Verbindungen für die individuelle Hydrolysevorschrift zu testen. Für allgemeine Suchanalysen bedeutet die Vielzahl der zu erfassenden Substanzglucuronide für die Hydrolysebedingungen immer einen notwendigen Kompromiss. Temperatur-/Säurestabilität einzelner Substanzen sollte bedacht werden.

Für Analysengänge, bei welchen quantitative Cut-Off-Analytik betrieben werden soll (z. B. Fahreignungsdiagnostik im Urin) sollte über standardisierte Hydrolysebedingungen diskutiert werden. Für diese gezielten Analysengänge sollten in jedem Fall die Glucuronid-Standards erworben und die Hydrolyseeffizienz getestet werden. Neuere Glucuronidasen können dabei schneller und unter Nutzung geringerer Temperaturen arbeiten als Glucuronidasen aus älteren Publikationen.

### **Literatur**

Abraham TT, Lowe RH, Pirnay SO, Darwin WD, Huestis MA. Simultaneous GC–EI-MS Determination of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-Carboxy- $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol in Human Urine Following Tandem Enzyme-Alkaline Hydrolysis. *J Anal Tox* 2007 Oct;31(8):477–485. doi: 10.1093/jat/31.8.477.

Dahl-Puustinen ML, Aberg-Wistedt A, Bertilsson L. Glucuronidation of amitriptyline in man in vivo, *Pharmacol Toxicol.* 1989 Jul;65(1):37-9. doi: 10.1111/j.1600-0773.1989.tb01123.x.

Fischer D, Breyer-Pfaff U. Variability of diphenhydramine N-glucuronidation in healthy subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 1997; 22: 151-154.

- Fu S, Lewis J, Wang H, Keegan J, Dawson M. A novel reductive transformation of oxazepam to nordiazepam observed during enzymatic hydrolysis. *J Anal Tox* 2010; 34 (5): 243-251.
- Fu S, Lewis J, Wang H, Keegan J, Dawson M. A novel reductive transformation of oxazepam to nordiazepam observed during enzymatic hydrolysis. *J Anal Tox* 2010; 34 (5): 243-251.
- Hackett LP, Dusci LJ, Ilett KF, Chiswell GM. Optimizing the hydrolysis of codeine and morphine glucuronides in urine. *Ther Drug Monit* 2002 Oct;24(5):652-7. doi: 10.1097/00007691-200210000-00012.
- Kühnholz B, Bonte W.: Methodische Untersuchungen zur Verbesserung des Fuselalkoholnachweises Blutalkohol 1983; 20: 399–410.
- Morris AA, Chester SA, Strickland EC, McIntire GL. Rapid enzymatic hydrolysis using a novel recombinant  $\beta$ -glucuronidase in benzodiazepine urinalysis. *J Anal Toxicol* 2014 Oct;38(8):610-4. doi: 10.1093/jat/bku083.
- Namera A, Saito T, Nagao M: investigation of commercially available recombinant and conventional  $\beta$ -glucuronidases to evaluate the hydrolysis efficiencies against O-glucuronides and N-glucuronides in urinary drug screening. *Forensic Toxicol* 2025 Jul;43(2):356-364. doi: 10.1007/s11419-025-00715-6.
- Romberg RW, Lee L. Comparison of the hydrolysis rates of morphine-3-glucuronide and morphine-6-glucuronide with acid and beta-glucuronidase. *J Anal Toxicol* 1995 May-Jun;19(3):157-62. doi: 10.1093/jat/19.3.157.
- Schulz K, Teske J, Gilg T, Aderjan R und Herbold M, unter Mitarbeit der Mitglieder des Arbeitskreises\*. *Aus dem Arbeitskreis Alkoholkonsum und Nachtrunk der GTFCh*. Bestandsaufnahme der Begleitstoffanalyse und Ergebnisse erster Ringversuche. *T + K* (2005) 72 (2): 85.
- Sitasuwan S, Melendez C, Marinova M, Mastrianni KR, Darragh A, Ryan E, Lee LA. Degradation of Opioids and Opiates During Acid Hydrolysis Leads to Reduced Recovery Compared to Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Analytical Toxicology* 2016; 40(8): 601-607, October 2016. DOI: 10.1093/jat/bkw085.
- Skov K, Johansen SS, Linnet K, Rasmussen BS, Klose Nielsen MK. Exploring Enzymatic Hydrolysis of Urine Samples for Investigation of Drugs Associated with Drug-Facilitated Sexual Assault. *Pharmaceuticals (Basel)* 2023 Dec 21;17(1):13. doi: 10.3390/ph17010013.
- Suzuki O, Hattori H, Asano M, Takahashi T, Brandenberger H (1987) Positive and negative ion mass spectrometry of benzophenones, the acid-hydrolysis products of benzodiazepines. *Z Rechtsmed* 98:1–10
- Taylor LL, Flint NA, Ma V, Hill BM, Clark CJ, Strathmann FG. Internal Hydrolysis Indicator for Sample Specific Monitoring of  $\beta$ -Glucuronidase Activity. *J Anal Toxicol* 2017 Jun 1;41(5):407-411. doi: 10.1093/jat/bkx027.
- Wang P, Stone JA, Chen KH, Gross SF, Haller CA, Wu AHB: Incomplete recovery of prescription opioids in urine using enzymatic hydrolysis of glucuronide metabolites. *J Anal Toxicol* 2006 Oct;30(8):570-5. doi: 10.1093/jat/30.8.570.