

Aus dem Forensisch Toxikologischen Centrum GmbH

Geschäftsführer: Prof. Dr. rer. nat. Frank Mußhoff

***Fallstricke in der forensisch-toxikologischen
Urinabstinenzanalytik***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Simon Willi Franz

aus

Würzburg

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Mußhoff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Gabriele Sabbioni
PD Dr. Klaus-Gustav Eckert

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2023

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Franz, Simon Willi

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Fallstricke in der forensisch-toxikologischen Urinabstinenzanalytik

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 21.06.2023

Ort, Datum

Simon Willi Franz

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Affidavit	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
Publikationsliste	7
1. Beitrag zu den Publikationen	9
1.1 Publikation 1	9
1.2 Publikation 2	10
1.3 Publikation 3	11
1.4 Publikation 4	12
2. Einleitung	13
2.1 Urin als Matrix zum Nachweis von Suchtstoffen.....	14
2.1.1 Die Bildung von Urin im menschlichen Körper	14
2.1.2 Von der Aufnahme eines Stoffes bis zur Ausscheidung in den Urin	14
2.2 Die Abstinenzkontrolle	16
2.2.1 Vergleich von Urin und Haaren als Matrices in der Abstinenzkontrolle.....	16
2.2.2 Manipulationen in der Abstinenzkontrolle	17
2.2.3 Verwertbarkeit einer Urinprobe	17
2.3 Kreatinin	19
2.3.1 Die Rolle von Kreatinin im menschlichen Körper.....	19
2.3.2 Kreatinin als Verdünnungsmarker	19
2.3.3 Methoden zur Bestimmung von Kreatinin	20
2.3.4 Messmethodenvergleich von Photometrie mit LC-MS/MS	22
2.3.5 Einfluss einer Kreatin-Aufnahme auf die Kreatinin-Konzentration im Urin	23
2.4 Mögliche Risiken einer Aufnahme von Cannabidiol	24
2.4.1 Allgemein	24
2.4.2 Bildung von Tetrahydrocannabinol durch Cannabidiol-Aufnahme?	24
3. Zusammenfassung	26
4. Abstract (English)	28
5. Paper I	29
6. Paper II	30

7. Literaturverzeichnis	31
Anhang A: Paper III	35
Anhang B: Paper IV	36
Danksagung	37

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAST	Bundesanstalt für Straßenwesen
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
CBD	Cannabidol
CBD-A	Cannabidiolsäure
Cr	Kreatin
Crn	Kreatinin
CTU	Chemisch-toxikologische Untersuchungen
DGRM	Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin
DGVM	Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin
DGVP	Deutsche Gesellschaft für Verkehrspsychologie
ESI	Elektrosprayionisation
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie
LC	Liquid chromatography (Flüssigkeitschromatographie)
MPU	Medizinisch-Psychologische Untersuchung
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
NaOH	Natriumhydroxid
PCr	Phosphokreatin
Rt	Retentionszeit
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
THC-A	Tetrahydrocannabinolsäure-A
THC-COOH	11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -THC
TIAFT	The International Association of Forensic Toxicologists

Publikationsliste

Publikationen (Peer-reviewed) als Bestandteil der kumulativen Dissertation:

Franz S, Skopp G, Boettcher M, Musshoff F. Creatinine excretion in consecutive urine samples after controlled ingestion of water. *Drug Test Anal.* 2019;11(3):435-440. DOI: 10.1002/dta.2514

Franz S, Skopp G, Dame T, Musshoff F. Verifying the validity of creatinine measurement in low-concentrated urine spot samples - Photospectrometry versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2021;13(6):1136-1144. DOI: 10.1002/dta.3003

Franz S, Skopp G, Musshoff F. The effect of creatine ingestion on urinary creatinine concentration: Does supplementation mask a heavy dilution? *Drug Test Anal.* 2022; 14(1): 162-168. DOI: 10.1002/dta.3165

Franz S, Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Will tetrahydrocannabinol be formed from cannabidiol in gastric fluid? An in vivo experiment. *Int J Legal Med.* 2023; Jan;137(1): 79-87. DOI: 10.1007/s00414-022-02896-w.

Weitere Publikationen (Peer-reviewed):

Franz S, Skopp G, Musshoff F. Manipulationen bei der Abgabe einer Urinprobe im Rahmen von Abstinenzkontrollprogrammen – Erfahrungen mit der Sichtkontrolle. *Z. f. Verkehrssicherheit* 2020, 66(1):18-20.

Franz S, Skopp G, Böttcher M, Musshoff F. Der CEDIA® Probenkontroll-Assay - Einsatzmöglichkeiten und Grenzen eines Probenintegritätstests, *Z. f. Verkehrssicherheit* 2020, 66(5): 313-316.

Groth O, Franz S, Fels H, Krueger J, Roeder G, Dame T, Musshoff F, Graw M. Unexpected results found in larvae samples from two postmortem forensic cases. *Forensic Toxicology* 2022; 40, 144–155. DOI: 10.1007/s11419-021-00601-x

Konferenzbeiträge:

Vorträge:

Franz S, Skopp G, Böttcher M, Musshoff F. Der CEDIA® Probenkontroll-Assay - Einsatzmöglichkeiten und Grenzen. Forum für Verkehrssicherheit München der Deutschen Gesellschaft für Verkehrsmedizin (DGVM). München, 06.03.2020.

Vorträge mit Posterbeitrag:

Franz S, Skopp G, Musshoff F. Kann eine Kreatin-Aufnahme die Kreatinin-Konzentration im Urin erhöhen und eine Verdünnung maskieren? 17. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Verkehrspsychologie (DGVP) und der DGVM. Dresden, 09.10.2021.

Franz S, Skopp G, Musshoff F. The effect of creatine ingestion on urinary creatinine concentration - does supplementation mask a heavy dilution? The 58th International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) Annual Meeting. Online-Konferenz, 03.02.2022.

Posterbeiträge:

Franz S, Skopp G, Böttcher M, Musshoff F. Veränderung der Kreatinin Konzentration im Urin nach erhöhter Flüssigkeitszufuhr unter Berücksichtigung des Geschlechts und Gewichts der Versuchspersonen. 14. Symposium der DGVP und DGVM. Saarbrücken, 28.09.2018.

Franz S, Herzog J, Skopp G, Musshoff F. Conversion of Cannabidiol to Tetrahydrocannabinol in Simulated Gastric Fluid - An in vitro Experiment. 21. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie (GTFCh). Mosbach, 12.04.2019.

Franz S, Skopp G, Musshoff F. Die Umwandlung von Cannabidiol zu Tetrahydrocannabinol in der Magensäure - Eine potenzielle Gefahr für den Konsumenten? 98. Internationale Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM). Hamburg, 19.09.2019. 15. Symposium der DGVP und DGVM. Bonn, 11.10.2019.

Auszeichnungen:

DGVP/DGVM Posterpreis 2019:

Franz S, Skopp G, Musshoff F. Die Umwandlung von Cannabidiol zu Tetrahydrocannabinol in der Magensäure - Eine potenzielle Gefahr für den Konsumenten? 15. Symposium der DGVP und DGVM. Bonn, 11.10.2019

DGVP/DGVM Kurzvortragspreis 2021:

Franz S, Skopp G, Musshoff F. Kann eine Kreatin-Aufnahme die Kreatinin-Konzentration im Urin erhöhen und eine Verdünnung maskieren? 17. Symposium der DGVP und DGVM. Dresden, 09.10.2021

1. Beitrag zu den Publikationen

1.1 Publikation 1

Creatinine excretion in consecutive urine samples after controlled ingestion of water

Franz, Simon; Skopp, Gisela; Boettcher, Michael; Musshoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2019; 11(3): 435-440

DOI: 10.1002/dta.2514

Autorenkürzel:

Simon Franz (SF)

Gisela Skopp (GS)

Michael Boettcher (MB)

Frank Musshoff (FM)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	SF, GS, FM
Literaturrecherche	SF, GS, FM
Methodenentwicklung/-validierung	SF, MB
Datenerhebung	SF, MB
Datenauswertung und -interpretation	SF, GS, MB, FM
Erstentwurf Manuskript	SF
Revision Manuskript	SF, GS, MB, FM
Supervision	GS, FM

1.2 Publikation 2

Verifying the validity of creatinine measurement in low-concentrated urine spot samples - Photospectrometry versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Franz, Simon; Skopp, Gisela; Dame, Torsten; Musshoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2021; 13(6): 1136-1144

DOI: 10.1002/dta.3003

Autorenkürzel:

Simon Franz (SF)

Gisela Skopp (GS)

Torsten Dame (TD)

Frank Musshoff (FM)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	SF, GS, FM
Literaturrecherche	SF, GS
Methodenentwicklung/-validierung	SF, TD
Datenerhebung	SF
Datenauswertung und -interpretation	SF, GS, TD, FM
Erstentwurf Manuskript	SF
Revision Manuskript	SF, GS, TD, FM
Supervision	GS, FM

1.3 Publikation 3

The effect of creatine ingestion on urinary creatinine concentration: Does supplementation mask a heavy dilution?

Franz, Simon; Skopp, Gisela; Musshoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2022; 14(1): 162-168

DOI: 10.1002/dta.3165

Autorenkürzel:

Simon Franz (SF)

Gisela Skopp (GS)

Frank Musshoff (FM)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	SF, GS, FM
Literaturrecherche	SF
Methodenentwicklung/-validierung	SF
Datenerhebung	SF
Datenauswertung und -interpretation	SF, GS, FM
Erstentwurf Manuskript	SF
Revision Manuskript	SF, GS, FM
Supervision	GS, FM

1.4 Publikation 4

Will tetrahydrocannabinol be formed from cannabidiol in gastric fluid? An in vivo experiment

Franz, Simon; Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Musshoff, Frank

International Journal of Legal Medicine 2023; Jan;137(1): 79-87

DOI: 10.1007/s00414-022-02896-w.

Autorenkürzel:

Simon Franz (SF)

Josefine Herzog (JH)

Gisela Skopp (GS)

Frank Musshoff (FM)

Arbeitsanteile	Autoren
Konzept und Studiendesign	SF, GS, FM
Literaturrecherche	SF, GS, FM
Methodenentwicklung/-validierung	SF, JH
Datenerhebung	SF, JH
Datenauswertung und -interpretation	SF, GS, FM
Erstentwurf Manuskript	SF
Revision Manuskript	SF, JH, GS, FM
Supervision	GS, FM

2. Einleitung

Die Verwendung von Urin als Matrix zum Nachweis des Konsums von Alkohol, Drogen oder Medikamenten ist im Bereich der forensischen Toxikologie seit vielen Jahren etabliert. Im Gegensatz zu Blutproben sind Urinproben zwar potenziell manipulierbar, in der praktischen Anwendung im Bereich der Abstinenzkontrolle überwiegen jedoch die Vorteile von Urin als Untersuchungsmatrix. Hierbei sind die besonders einfache Probengewinnung sowie die längere Nachweisbarkeit von Substanzen im Urin von Relevanz.

Neben Blut und Urin können Suchtstoffe bzw. deren Metaboliten auch in Haaren sowie in Mundhöhlenflüssigkeit, Hautausscheidungsprodukten und Fingernägeln nachgewiesen werden [1]. Für den Bereich der Abstinenzkontrolle sind Urin und Haare die Matrices der Wahl. Insbesondere bei Probanden mit fehlender Bereitschaft eines Konsumverzichts bzw. bei schwerer Abhängigkeit von Suchtstoffen besteht die Gefahr einer Manipulation der abgegebenen Probe [2–4].

In der vorliegenden Arbeit werden die wichtigsten Fallstricke im Bereich der forensisch-toxikologischen Urinabstinenzkontrolle genauer untersucht. Eine Abgrenzung zwischen einer möglicherweise manipulierten und einer verwertbaren Urinprobe gilt hierbei als Herausforderung.

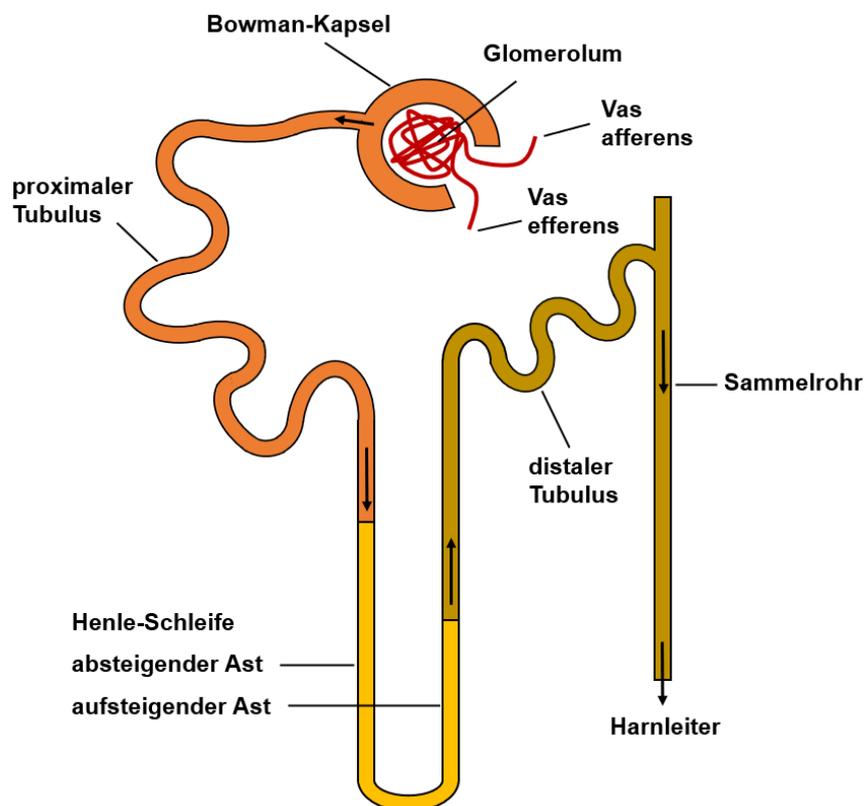
In den folgenden Betrachtungen wird Urin als Untersuchungsmaterial sowie die Vorgehensweise bei der Analyse beschrieben. Im Anschluss werden die Abstinenzkontrolle und damit einhergehende Herausforderungen dargestellt. Die Bedeutung von Kreatinin (Crn) als Verdünnungsmarker und mögliche Auswirkungen der Aufnahme von Cannabidiol(CBD)-Produkten auf die Betäubungsmittelanalytik werden in der Folge analysiert. Im letzten Teil sind die Ergebnisse der Publikationen aufgeführt, welche in der Zusammenfassung diskutiert werden, bevor abschließend ein Fazit über die gewonnenen Erkenntnisse der vorgelegten Arbeit gezogen wird.

2.1 Urin als Matrix zum Nachweis von Suchtstoffen

2.1.1 Die Bildung von Urin im menschlichen Körper

Urin entsteht durch Filtration des Blutplasmas in den Nieren und wird anschließend über die Harnwege ausgeschieden. Die Funktionen der Nieren betreffen u.a. die Regelung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts, die Regulation des Blutdrucks und die Entgiftung des Körpers, darunter auch die Exkretion von Fremdstoffen. Die elementare Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Eine menschliche Niere enthält ca. 1 Million Nephra. Ein Nephron besteht aus dem Tubulusapparat und dem Nierenkörperchen, welches sich wiederum aus Glomerulum und Bowman-Kapsel zusammensetzt (Abb. 1).

Im Nierenkörperchen wird aus einem Kapillarnetzwerk das Blut filtriert und dieses Filtrat, der Primärharn, in den Tubulusapparat abgeleitet. Im Tubulussystem werden Stoffe wie Wasser, Glukose und Elektrolyte in das Blut rückresorbiert und sogenannte harnpflichtige Substanzen wie



Harnstoff, Ammoniak und Crn sezerniert und somit der Endharn gebildet. Die menschlichen Nieren können etwa 120 ml Blut pro Minute filtrieren. Der Endharn fließt über das Nierenbecken durch die Harnleiter, wird in der Harnblase gesammelt und letztlich über die Harnröhre ausgeschieden. Ein gesunder Erwachsener produziert täglich etwa 1-1,5 L Urin [5].

Abbildung 1: Aufbau des Nephrons (Modifiziert nach [5])

2.1.2 Von der Aufnahme eines Stoffes bis zur Ausscheidung in den Urin

Nach Aufnahme bzw. Absorption eines Suchtstoffes folgt eine Verteilung im Blut, im extravasalen Raum und den Geweben. Anschließend wird die Substanz metabolisiert, über die Nieren filtriert und zuletzt zu einem gewissen Teil in den Urin ausgeschieden. Die Absorption oral eingenommener Stoffe erfolgt zu einem kleinen Anteil im Magen, zum Großteil jedoch im Dünndarm. Aufgrund der meist lipophilen Eigenschaften von Drogen bzw. Suchtstoffen ist deren Exkretion über

die Nieren nur möglich, wenn sie so verstoffwechselt werden, dass eine gewisse Wasserlöslichkeit erreicht wird. Diese Biotransformation erfolgt mittels Enzymkatalyse in der Leber und kann in zwei Phasen eingeteilt werden.

In Phase 1 finden Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse statt, wodurch funktionelle Gruppen eingefügt bzw. verändert werden. In der zweiten Phase werden endogene wasserlösliche Stoffe an diese funktionellen Gruppen der Fremdschubstanz gebunden und erhöhen deren Wasserlöslichkeit und damit die Exkretion über die Nieren. Diese Konjugation findet beispielsweise mittels Glucuronidierung oder Sulfonierung statt [5].

Die Ausscheidungsrate eines Stoffes hängt maßgeblich von dessen Polarität und Molekülgröße ab. Die Nachweisbarkeitsdauer ist daher abhängig vom molekularen Aufbau der Substanz selbst, aber auch, ob ein Einmal- oder Dauerkonsum stattgefunden hat, da regelmäßiger Konsum zur Kumulation des Stoffes oder seiner Metaboliten im Körper führen kann [6,7]. Die kontinuierliche Filtration der Droge und ihrer Metaboliten durch die Nieren aus dem Blutkreislauf geht mit einer Aufkonzentrierung in der Harnblase einher. Daneben führen eine hohe Dosis, häufige Konsumfrequenz, Lipophilie, temporäre Speicherung in den Geweben, geringe Metabolisierungsraten und ein ausgeprägter enterohepatischer Kreislauf zu einer Verlängerung des Nachweisfensters im Urin [8].

2.2 Die Abstinenzkontrolle

Untersuchungen auf Sucht- bzw. Fremdstoffe in biologischem Material werden in verschiedenen Bereichen durchgeführt. Zu nennen sind hierbei Dopinganalysen im Profisport, Drogenuntersuchungen am Arbeitsplatz sowie klinische Analysen bei Verdacht auf Intoxikationen, als Medikations-Compliance oder als Kontrollinstrument in Suchtkliniken [9,10].

Im forensischen Bereich stellen die Analysen an Leichenasservaten, an Blutproben bei strafrechtlich relevanten Fragestellungen für die Polizei und an Abstinenzkontrollproben die Hauptaufgabengebiete dar [3]. Bei Abstinenzkontrollen kann man zwischen einmaligen Untersuchungen und Programmen, die meist über einen Zeitraum von 6 bzw. 12 Monaten durchgeführt werden, unterscheiden. Diese Programme umfassen in erster Linie Abstinenzkontrollen im Rahmen einer Medizinisch-Psychologischen Untersuchung (MPU) zur Wiedererlangung des Führerscheins, eine Durchführung als Bewährungsaufgabe oder Kontrollen im Zuge von Sorgerechtskonflikten.

Eine Erhebung der Bundesanstalt für Straßenwesen (BASt) hat gezeigt, dass ca. 70% der 86.000 MPU-Gutachten aus dem Jahr 2019 aufgrund von Alkohol- oder Drogenauffälligkeit im Straßenverkehr angeordnet wurden [11].

In den Empfehlungen der Fachgesellschaften „Urteilsbildung in der Fahreignungsbegutachtung, Beurteilungskriterien“ wird anhand der sogenannten CTU-Kriterien (chemisch-toxikologische Untersuchung) der Ablauf eines Abstinenzprogrammes in der Fahreignungsdiagnostik festgelegt [3]. Abstinenzkontrollen auf Alkohol und Drogen können laut den Kriterien prinzipiell durch Überprüfung von Urin- oder Haarproben durchgeführt werden.

2.2.1 Vergleich von Urin und Haaren als Matrices in der Abstinenzkontrolle

Ob eine Abstinenzkontrolle mittels Überprüfung von Haaren oder Urin durchgeführt wird, hängt von verschiedenen Faktoren für den Teilnehmer eines solchen Programmes ab. Beide Matrices weisen sowohl Vor- als auch Nachteile auf.

Das Nachweisfenster bei Haaranalysen ist größer als das für Urin. Findet die Einlagerung von Fremdstoffen über die Blutversorgung des Haarfollikels statt, erreichen die entsprechenden Abschnitte erst nach etwa 10-14 Tagen die Kopfhautoberfläche. Neben der direkten Aufnahme von Substanzen über das Blut ist die Ein-/Auflagerung von Fremdstoffen prinzipiell möglich über Talg, Schweiß oder eine direkte Stoffanlagerung durch Kontakt mit Körperflüssigkeiten, Stäuben oder Aerosolen. Prinzipiell sind Substanzen ab etwa zwei Wochen nach dem Konsum bis mehrere Monate bzw. Jahre nachweisbar, abhängig von der Haarlänge, wobei man von einer durchschnittlichen Wachstumsrate des Kopfhaares von 1 cm pro Monat ausgeht. Im Urin hingegen sind Fremdstoffe, abhängig von ihren physikochemischen Eigenschaften, der Konsumhäufigkeit aber auch des pH-Werts des Urins, zwischen wenigen Stunden bis mehrere Tage nach Konsum nachweisbar [1].

Bei Abstinenzkontrollprogrammen mit Urin als Matrix erfolgt für den Teilnehmer ein zufälliges Einbestellungsverfahren im Untersuchungszeitraum. Hierbei werden Erreichbarkeit und Flexibilität gefordert, da die Urinabgabe spätestens am Tag nach Einbestellung erfolgen muss. Für die Untersuchung in Haaren ist aufgrund der retrospektiven Untersuchungsmöglichkeit kein striktes Verfahren zur Einbestellung notwendig.

Meist ist das Ziel eines Probanden der möglichst schnelle Abschluss des Abstinenzkontrollprogrammes, um beispielsweise den Führerschein wiederzuerlangen. Der Vorteil der Haaranalyse liegt darin, dass man bei vorbestehender Abstinenz retrospektiv einen entsprechenden Beleg erbringen kann. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass Haare auch nach Abstinenz aufgrund des zyklischen Haarwachstums noch nach Wochen positiv sein können.

2.2.2 Manipulationen in der Abstinenzkontrolle

Sowohl Haare als auch Urin sind als Probenmaterial potenziell manipulierbar, wodurch das Ergebnis einer Analyse verfälscht werden kann. So können z.B. haarkosmetische Behandlungen den Gehalt an Substanzrückständen reduzieren [12–16].

Bei Urin unterscheidet man zwischen *in-vitro*- und *in-vivo*-Manipulationen. Als *in-vitro*-Manipulation einzuordnen ist die Zugabe reaktiver Chemikalien (z.B. Oxidationsmittel) zur Urinprobe, um die zu detektierenden Drogenrückstände zu zerstören oder zu maskieren [2]. Außerdem kann versucht werden, anstelle einer eigenen Urinprobe einen drogenfreien Fremd- oder synthetischen Urin abzugeben. Da eine Urinabgabe unter Sichtkontrolle stattfindet, wird hierfür beispielsweise eine „Penisattrappe“ eingesetzt [4].

In-vivo-Manipulationen beschränken sich auf eine Aufnahme von großen Flüssigkeitsmengen, ggf. mit Einnahme von Diuretika wenige Stunden vor der Urinabgabe. Hierbei wird versucht, die Konzentration von möglicherweise vorhandenen Drogenrückständen so stark zu verdünnen, dass diese nicht mehr nachweisbar sind. Um solche Verdünnungen zu erkennen, wird zusätzlich die Crn-Konzentration im Urin bestimmt [3,10].

2.2.3 Verwertbarkeit einer Urinprobe

Um das Risiko von Manipulationen zu minimieren, werden Urinproben im forensischen Bereich unter Sichtkontrolle abgegeben. Dieser Kontrollmechanismus dient vor allem dazu, *in-vitro*-Manipulationen auszuschließen. In den CTU-Kriterien sind darüber hinaus Messgrößen zur Prüfung auf Probenverwertbarkeit definiert, um mögliche Verfälschungen erkennen zu können [3]. Ein Auszug dieser Qualitätsmarker ist in Tabelle 1 dargestellt.

Der maßgebliche Parameter zur Beurteilung der Verwertbarkeit einer Probe ist das Crn. Durch die Konzentration von Crn in einer Urinprobe können Hinweise auf eine mögliche Verdünnung erlangt werden. Die Bestimmung kann photometrisch oder massenspektrometrisch erfolgen (Abschnitt 2.3.1).

Tabelle 1: Messgrößen zur Bestimmung der Urinprobe auf Verwertbarkeit (Modifiziert nach [3]).

Messgröße	Normbereich	Grenzen der Verwertbarkeit
Zwingend erforderlich		
Crn	26-217 mg/dl (Frauen) 39-259 mg/dl (Männer)	< 20 mg/dl
Temperatur*	36-37 °C	< 32 °C oder > 39 °C
Optional		
Spezifisches Gewicht	1,003-1,030 g/ml	< 1,003 g/ml
pH-Wert	4,6-8,0	< 4,0 oder > 9,0
Nitrite	bis ca. 125 µg/ml	> 500 µg/ml

*Messung unmittelbar nach Abgabe der Urinprobe

2.3 Kreatinin

2.3.1 Die Rolle von Kreatinin im menschlichen Körper

Crn ist ein inaktives Stoffwechselprodukt, das im Muskelgewebe aus Kreatin (Cr) und Phosphokreatin (PCr) gebildet wird. Die Funktion von Cr ist die Regeneration von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP) mittels enzymatischer Übertragung einer Phosphorylgruppe, um die Muskelzellen kurzfristig bei intensiver Belastung mit Energie zu versorgen [17].

Etwa 2 % des im Muskel gespeicherten Cr wird jeden Tag in Crn umgewandelt, anschließend über die Nieren filtriert und mit dem Urin ausgeschieden [18]. Crn gehört zu den sogenannten harnpflichtigen Substanzen. Das sind Moleküle, wie auch Harnstoff und Harnsäure, die kontinuierlich von den Nieren gefiltert und anschließend über den Urin ausgeschieden werden müssen. Cr kann dem Körper durch Lebensmittel wie Fleisch, Fisch oder Nahrungsergänzungsmittel zugeführt werden. Daneben wird Cr in der Leber, Bauchspeicheldrüse und den Nieren aus den Aminosäuren Arginin und Glycin synthetisiert [17] (Abb. 2). Der Cr-Gehalt in Fleisch liegt bei ca. 5 g/kg (Rind, Schwein) und bis zu 10 g/kg in Fisch [19].

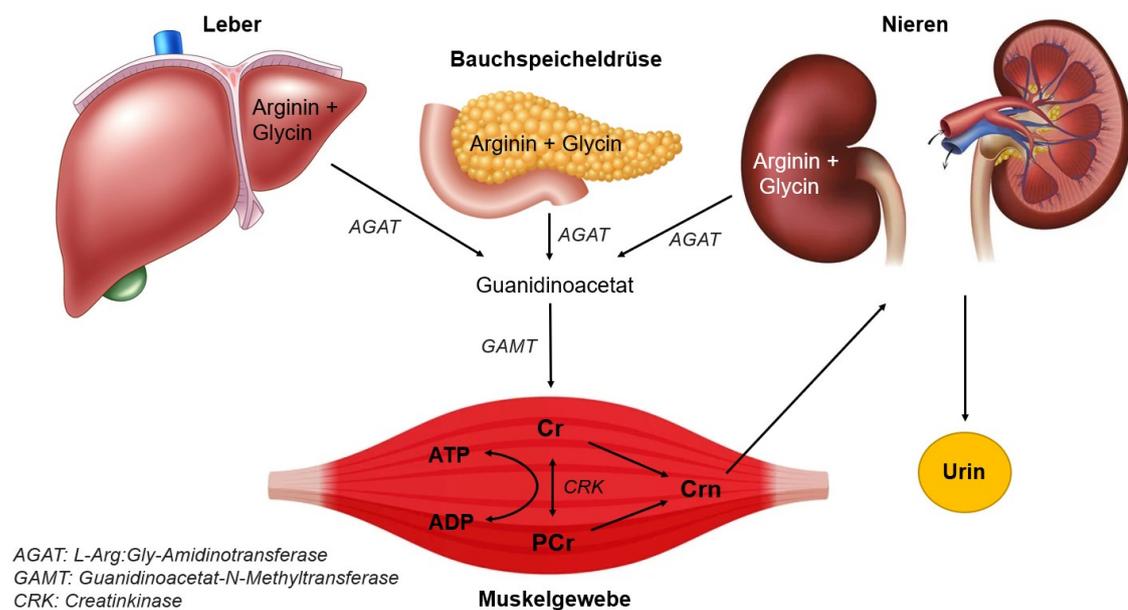


Abbildung 2. Bildung und Verstoffwechslung von Cr und Crn im menschlichen Körper

2.3.2 Kreatinin als Verdünnungsmarker

Die Menge an Crn, welche mit dem Urin ausgeschieden wird, ist weitgehend abhängig von der Muskelmasse einer Person [20,21]. Aufgrund der relativ konstanten Ausscheidungsrate über 24 Stunden ist Crn ein nützlicher Marker bei der klinischen Beurteilung der Nierenfunktion (24-Stunden-Sammelurin) und dient zudem im forensischen Bereich als Hilfsmittel zur Erkennung verdünnter Spontanurinproben bei Drogentests.

Bei einer Unterschreitung einer Crn-Konzentration von 20 mg/dl wird eine Probe in der Regel als nicht verwertbar deklariert [3]. Der Proband hat dann die Möglichkeit, eine Ersatzprobe abzugeben. Bei zweimaliger Unterschreitung dieser Entscheidungsgrenze innerhalb eines Abstinenzkontrollprogrammes hat dies den Abbruch des Programms zur Folge. Es bestehen jedoch starke interindividuelle Unterschiede in der Ausscheidungsrate von Crn bei Spontanurinproben. Besonders zu berücksichtigen ist hinsichtlich dieser Grenze, dass Personen mit einer geringen Muskelmasse niedrige Crn-Konzentrationen aufweisen können, auch ohne eine vorherige Verdünnung.

In Publikation 1 wird unter Berücksichtigung des Geschlechts und Gewichts der Versuchspersonen die Crn-Konzentration im Urin nach Aufnahme verschiedener definierter Flüssigkeitsmengen hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs bestimmt. Hierbei sollen Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Menge an zugeführter Flüssigkeit vor einer Abstinenzkontrolle zu unauffälligen Crn-Konzentrationen führt und ob die Aufnahme von hohen Trinkmengen reproduzierbar in einer Unterschreitung der Entscheidungsgrenze resultiert.

2.3.3 Methoden zur Bestimmung von Kreatinin

2.3.3.1 Photometrische Jaffé-Methode

Die Bestimmung von Crn anhand eines photometrischen Verfahrens erfolgt in der Regel auf einem Autoanalyzer, mit dem zeitgleich immunologische Vorteste auf gängige Drogen durchgeführt werden. Bei dieser Methode, der sogenannten Jaffé-Reaktion, bildet sich aus dem im Urin enthaltenen Crn nach Zugabe von Pikrinsäure in alkalischer Lösung der rot gefärbte Janovsky-Komplex (Abb. 3) [22]. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Crn-Konzentration und wird anschließend photometrisch bestimmt.

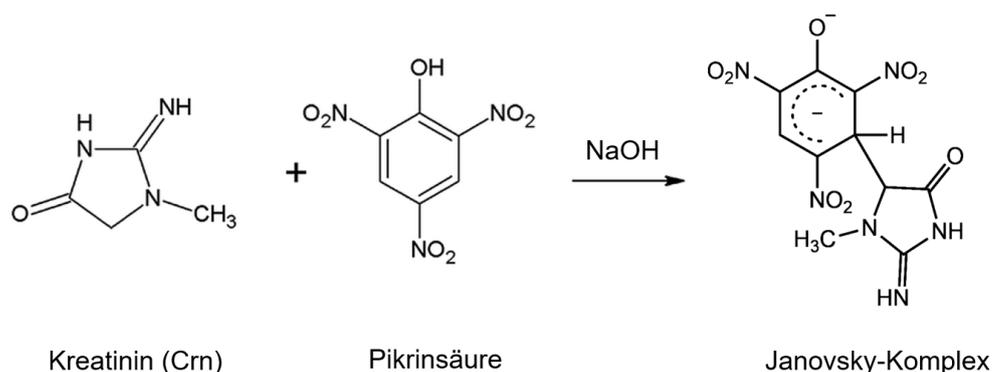


Abbildung 3. Jaffé-Reaktion von Crn mit Pikrinsäure in NaOH-Lösung mit Bildung des Janovsky Komplexes

Die Jaffé-Reaktion ist jedoch nicht zu 100% spezifisch für Crn. Mögliche Störsubstanzen wie Glukose, Ketonkörper, Cefazolin, Proteine oder andere stickstoffhaltige Verbindungen im Urin können das Ergebnis beeinflussen [22–24].

2.3.3.2 Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

2.3.3.2.1 Probenvorbereitung

Die Laboraufarbeitung von Urin für die chromatische Bestimmung von Crn lässt sich in wenige Arbeitsschritte unterteilen. Hierbei wird ein Anteil der Urinprobe nach Zugabe des deuterierten internen Standards Crn- d_3 und Pufferlösung, bestehend aus einer Mischung (1:1, V/V) von A (Ammoniumacetat, Acetonitril und Ameisensäure in Wasser) und B (Ammoniumformiat und Ameisensäuren in Methanol), abzentrifugiert und anschließend mittels LC-MS/MS analysiert.

2.3.3.2.2 Flüssigkeitschromatographie (LC)

Die LC kann in Lösung befindliche Moleküle abhängig von ihrer Größe und Polarität auftrennen. Ein Anteil der aufgearbeiteten Probe wird hierfür auf die Trennsäule injiziert. Anschließend wird mittels Pumpe ein Eluent (mobile Phase) über die Trennsäule (stationäre Phase) transportiert. Hierbei handelt es sich häufig um modifizierte Kieselgele mit Alkylketten. Die Moleküle interagieren hier mit dem Material in der Trennsäule und werden nach ihren physiko-chemischen Eigenschaften aufgetrennt. Bei Säulenmaterial mit langkettigen Kohlenstoffverbindungen finden mit lipophilen Molekülen stärkere Wechselwirkungen statt und diese eluieren somit langsamer als vergleichsweise hydrophile Moleküle. Nach Auftrennung werden die Substanzen in einem Detektor erfasst [25]. Der schematische Aufbau des beschriebenen LC-Systems ist in Abb. 4 dargestellt.

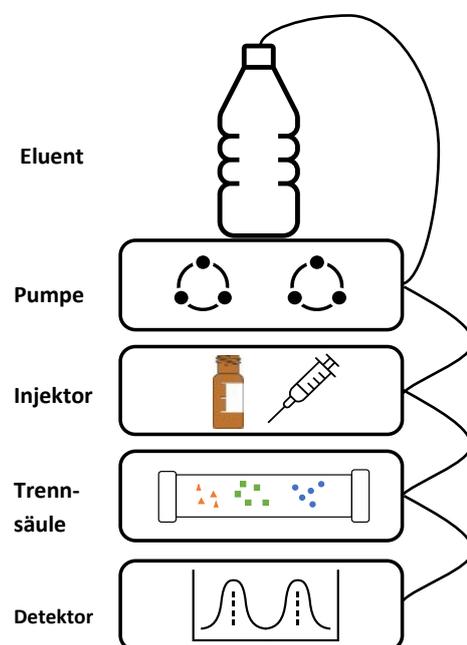


Abbildung 4. Schematischer Aufbau eines LC-Systems

2.3.3.2.3 Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS)

Bei massenspektrometrischen Detektoren/Analysatoren werden Molekülonen unter Hochvakuum anhand ihres Masse-Ladungs-Verhältnisses (m/z) detektiert. Der Probeneinlass in das MS erfolgt bei LC-gekoppelten Systemen meist mittels Elektrosprayionisation (ESI). Die Ionisierung der Moleküle findet bei der Durchführung von ESI bereits in der flüssigen Phase statt. Hierbei wird die Analytlösung durch eine Sprühkapillare geleitet. An der Spitze dieser Kapillare wird eine Spannung angelegt, wodurch ein Sprühnebel gleichgeladener Teilchen erzeugt wird. Der Einsatz von Gas und Wärme verstärkt die Verdampfung des Lösungsmittels und verringert zudem die Tröpfchengröße. Dadurch kommt es zur Erhöhung der Ladungsdichte an ihrer Oberfläche. Dies

führt zu einer Abstoßung (Coulomb-Explosion) und damit zu einem Zerfall in noch kleinere Tröpfchen. Letztlich liegen die ionisierten Moleküle in der Gasphase vor und werden anschließend massenspektrometrisch analysiert.

MS/MS-Geräte mit drei gekoppelten Quadrupolen werden als Tripel-Quadrupol-MS bezeichnet. Durch Anlegen von Gleich- und Wechselstrom an den gegenüberliegenden Elektrodenstäben eines Quadrupols werden diese auf das gleiche Potential eingestellt. Die Flugbahn eines Ions kann durch Einstellung eines bestimmten Potentials auf dessen m/z -Verhältnis stabilisiert werden. Ionen mit niedrigerer bzw. höherer Masse werden dagegen „aussortiert“.

Beim Tripel-Quadrupol-MS findet im ersten Quadrupol eine solche Vorselektierung von gesuchten Molekülen eines bestimmten m/z -Verhältnisses (Vorläufer-Ion) statt. Im Quadrupol 2 werden die ionisierten Moleküle durch ein Kollisionsgas (z.B. Stickstoff) fragmentiert. Diese Fragment-Ionen (Produkt-Ionen) können nun im Quadrupol 3 weiter aufgetrennt und anschließend im Detektor gemessen werden. Die Signalintensität ist direkt proportional zur Konzentration der entsprechenden Substanz und wird in einem Chromatogramm auf der y-Achse gegenüber der R_t auf der x-Achse aufgetragen [26].

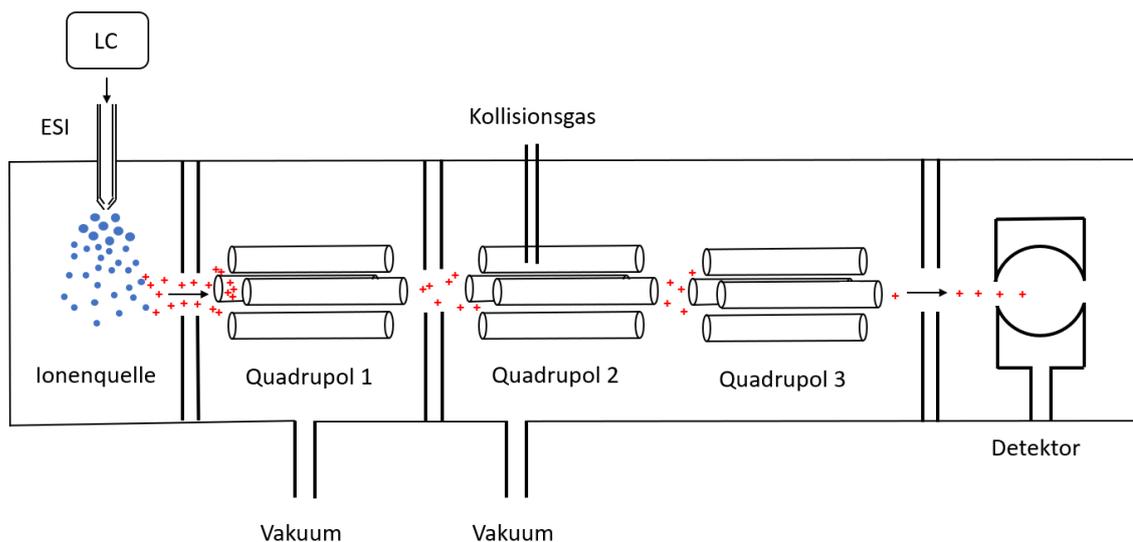


Abbildung 5. Aufbau eines Triple-Quadrupol-MS (Modifiziert nach [26])

2.3.4 Messmethodenvergleich von Photometrie mit LC-MS/MS

Durch Kopplung der LC mit einem MS ist es möglich, ionisierbare Substanzen einer bestimmten Molekülgröße eindeutig anhand ihrer physiko-chemischen Eigenschaften zu identifizieren. Im Falle der Bestimmung von Crn können somit Einflüsse potenzieller Störsubstanzen ausgeschlossen werden, anders als bei der Jaffé-Methode; die Selektivität ist deutlich erhöht. Jedoch kann die photometrische Jaffé-Methode vollständig automatisiert im Zuge der immunologischen Voruntersuchungen einer Urinprobe durchgeführt werden. Dies reduziert die Anzahl an möglichen zufälligen Fehlern (beispielsweise bei der Probenaufarbeitung) und ist zudem vergleichsweise kostengünstig.

In Publikation 2 wurde ein Messmethodenvergleich der beiden etablierten Methoden durchgeführt, unter besonderer Berücksichtigung von Crn-Konzentrationen im Bereich der Entscheidungsgrenze von 20 mg/dl.

2.3.5 Einfluss einer Kreatin-Aufnahme auf die Kreatinin-Konzentration im Urin

Die mit dem Urin ausgeschiedene Crn-Konzentration ist abhängig vom Hydrationsstatus, aber auch von der Muskelmasse eines Individuums. Darüber hinaus wird in der Literatur die Auswirkung einer Aufnahme von Cr auf die Crn-Ausscheidung in den Urin diskutiert, da verschiedene Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen gelangt sind [26–29].

Aufgrund einer gut untersuchten Wirksamkeit von Cr auf die Kraftsteigerung ist es eines der beliebtesten Nahrungsergänzungsmittel im Profi- und Amateursport, insbesondere im Fitnessbereich [30]. Daneben ist bekannt, dass Cr in gelöster Form, vor allem in leicht saurem Milieu zu Crn abgebaut wird [31,32] (Abb. 6).

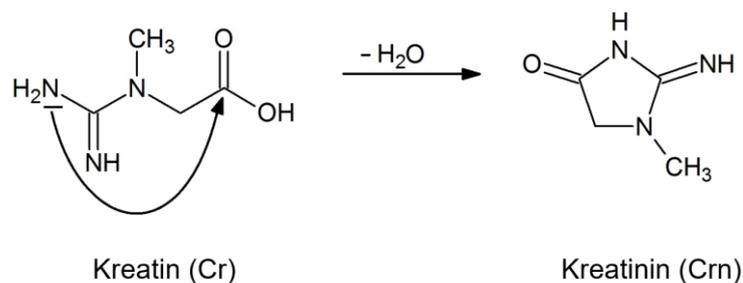


Abbildung 6. Cr-Konversion zu Crn

Der Einfluss einer definierten Aufnahme von Cr in Kombination mit einer kontrollierten, hohen Flüssigkeitsaufnahme wurde in Publikation 3 untersucht. Zudem sollte eine viertägige Inkubation von Cr in Organgensaft bei Raumtemperatur zeigen, ob ausreichend hohe Mengen Crn gebildet werden, welche bei oraler Aufnahme des Gemisches die Crn-Ausscheidung zusätzlich erhöhen. Durch diese Experimente sollte geprüft werden, ob die Einnahme von Cr oder Crn eine Verdünnung des Urins maskieren kann.

2.4 Mögliche Risiken einer Aufnahme von Cannabidiol

2.4.1 Allgemein

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD) sind die für die pharmazeutische Anwendung meistverwendeten Cannabinoide. In der Cannabispflanze liegen sie in Form ihrer Vorstufen als Tetrahydrocannabinolsäure-A (THC-A) und Cannabidiolsäure (CBD-A) vor [33]. Die wirksamen Formen THC und CBD werden durch Decarboxylierung, beispielsweise durch Hitzeeinwirkung, gebildet.

Im Gegensatz zu THC zeigt CBD keine euphorisierende bzw. rauscherzeugende Wirkung [33]. CBD wird therapeutisch zur Behandlung von bestimmten Epilepsieerkrankungen eingesetzt und zeigt sich darüber hinaus auch als vielversprechende Therapieoption aufgrund seiner anxiolytischen, anti-inflammatorischen und analgetischen Wirkungen [34–38].

In den letzten Jahren hat die weltweite kommerzielle Vermarktung von CBD-Produkten sowohl im Einzelhandel als auch in Onlineshops stark zugenommen. Diese Produkte sind meist als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen und entziehen sich somit den strengen Kontrollmechanismen von Arzneimitteln oder Medizinprodukten. Jedoch gelten CBD-Produkte mit einem THC-Gehalt von über 0,2 % in Deutschland laut Betäubungsmittelgesetz (BtMG) als nicht verkehrsfähig und dürfen somit nicht vertrieben werden [39].

2.4.2 Bildung von Tetrahydrocannabinol durch Cannabidiol-Aufnahme?

Immer wieder beteuern Personen, die positiv auf THC oder THC-Stoffwechselprodukte getestet wurden, dass sie lediglich CBD-Produkte konsumiert haben. Einerseits besteht die Gefahr von THC-Rückständen in CBD-Produkten, andererseits wird in der Literatur von der Möglichkeit einer Umwandlung von CBD zu THC in saurer Lösung wie künstlichem Magensaft berichtet (Abb. 7) [40–42].

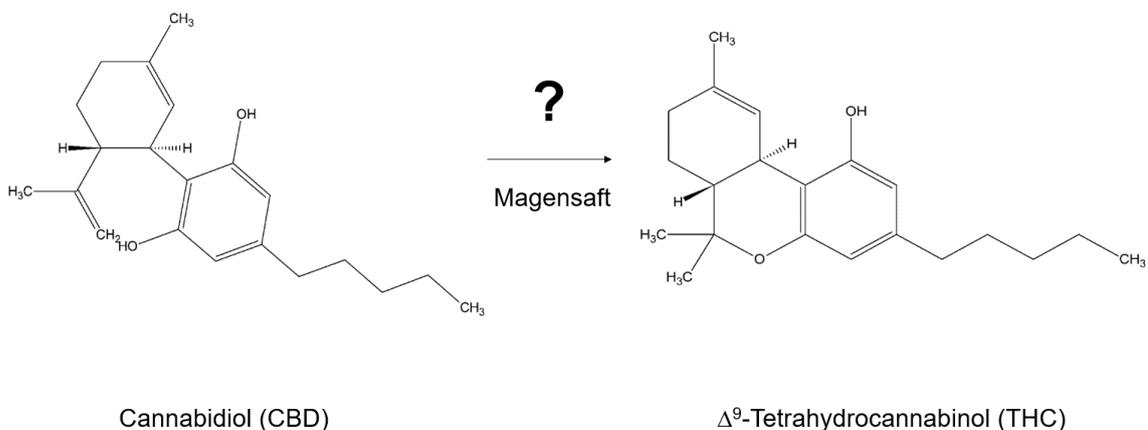


Abbildung 7. Umwandlung von CBD zu THC in der Magensäure?

In-vitro-Experimente kamen jedoch nicht zu übereinstimmenden Ergebnissen und die Bildung von THC wurde in *in-vivo*-Studien bisher kaum nachgewiesen. Lediglich bei Untersuchungen mit Ratten wurde eine Umwandlung von CBD zu THC im Serum und Gehirn festgestellt [43]. Die Umwandlung von CBD in THC durch *in-vivo*-Studien mit Menschen konnte bisher nicht aufgezeigt werden [44–48].

Die begrenzte Löslichkeit von CBD in einem wässrigen Medium kann durch Verwendung eines Tensids und/oder eines Lösungsvermittlers deutlich verbessert werden. Für Konsumenten von oral applizierbaren CBD-Produkten in Kombination mit einem Emulgator oder Lebensmitteln mit löslichkeitsverbessernden Eigenschaften besteht somit die theoretische Möglichkeit, positiv auf THC oder THC-Stoffwechselprodukte getestet zu werden.

In der vierten Veröffentlichung wurde ein *in-vivo*-Experiment unter optimierten Löslichkeitsbedingungen für CBD durchgeführt, um zu zeigen, ob unter diesen Bedingungen eine Umwandlung von CBD zu THC in der Magensäure stattfindet. Hierbei sind sowohl Analysen im Blut als auch Untersuchungen im Urin auf den THC-Hauptmetaboliten 11-Nor-9-carboxy- Δ^9 -THC (THC-COOH) durchgeführt worden. Im Urin liegt die Entscheidungsgrenze für THC-COOH künftig bei 7,5 ng/ml.

3. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte dargelegt werden, dass Untersuchungen in der forensisch-toxikologischen Urinanalytik im Rahmen von Abstinenzkontrollprogrammen mit spezifischen Herausforderungen einhergehen und Interpretationen von Analyseergebnissen mit Sorgfalt durchgeführt werden müssen.

Die Resultate von Publikation 1 zeigen einerseits, dass die Aufnahme von hohen Flüssigkeitsmengen unabhängig von Geschlecht und Gewicht zu einer deutlichen Reduktion der Crn-Konzentration im Urin unterhalb der Entscheidungsgrenze führen kann. Andererseits kann bereits die Flüssigkeitsaufnahme von 0,5 Litern, besonders bei weiblichen Personen mit geringer Körpermasse, eine Unterschreitung des Crn-Grenzwertes von 20 mg/dl im Urin zur Folge haben. Aus diesem Grund wird empfohlen, dass vor einer Urinabstinenzkontrolle in den 1,5 bis 2,5 Stunden vor Probenabgabe maximal 0,2 Liter Flüssigkeit getrunken werden sollten.

Die zweite Veröffentlichung stellt einen Messmethodenvergleich für die Bestimmung von Crn zwischen der photometrischen Jaffé-Methode und dem LC-MS/MS-Verfahren dar. Insbesondere Urinproben mit niedrigen Crn-Konzentrationen wurden hier mittels verschiedener graphischer Auswertungen verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Methoden in hohem Maße übereinstimmen und geeignet sind, Crn zuverlässig auch im niedrigen Konzentrationsbereich zu quantifizieren. Bei Unterschreitung des Grenzwertes von 20 mg/dl wird empfohlen, die photometrische Bestimmung mittels LC-MS/MS zu überprüfen.

Bei der dritten Publikation konnte aufgezeigt werden, dass eine Aufnahme von Cr bzw. Crn in Kombination mit einer hohen Trinkmenge die Crn-Konzentration im Urin erhöhen und dadurch eine Verdünnung maskieren kann. Eine Inkubation von Cr in Orangensaft führte im Experiment zu einer teilweisen Umwandlung in Crn, welches bei Aufnahme wiederum zu einer zusätzlichen Erhöhung der Crn-Konzentration im Urin führte. Bei Verdacht auf Cr-Einnahme sollte daher zusätzlich eine Bestimmung von Cr im Urin oder alternativ des spezifischen Gewichts der Probe durchgeführt werden.

In der letzten Veröffentlichung zeigte sich, dass die orale Einnahme von 400 mg CBD unter optimierten Löslichkeitsbedingungen zu keinem Nachweis relevanter THC-Konzentrationen geführt hat. Alle Serumproben wurden negativ auf THC und THC-Metabolite getestet. Lediglich in zwei Urinproben eines Probanden wurde die Entscheidungsgrenze für THC-COOH nach 6 und 12 Stunden geringfügig überschritten. Diese niedrigen THC-COOH-Konzentrationen können jedoch auch durch Spuren von THC in CBD-Präparaten verursacht werden. Zwar kann eine Umwandlung geringer Mengen CBD zu THC im Magensaft nicht vollständig ausgeschlossen werden, jedoch resultieren daraus lediglich Urin-Konzentrationen im Spurenbereich. Daher erscheinen negative Folgen für Teilnehmer eines Abstinenzkontrollprogrammes aufgrund einer Umwandlung von CBD in THC im Magensaft unwahrscheinlich, insbesondere bei einer einmaligen Einnahme einer empfohlenen Dosis eines handelsüblichen CBD-Produktes.

Durch diese Untersuchungen konnte eine Empfehlung zur maximalen Flüssigkeitsaufnahme vor der Urinabgabe einer Abstinenzkontrolle abgeleitet und die Methodik zur Bestimmung verdünnter

Urinproben evaluiert werden. Zudem wurde erstmals in einer Studie aufgezeigt, dass die Aufnahme von Cr die Crn-Konzentration im Urin erhöhen und eine Verdünnung maskieren kann. Letztlich wurde durch eine *in-vivo*-Untersuchung dargestellt, dass keine relevante CBD-Umwandlung zu THC im menschlichen Magensaft stattfindet.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden sowohl in Vorträgen als auch in Posterbeiträgen auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen vorgestellt.

4. Abstract (English)

This thesis has demonstrated that investigations in forensic toxicological urine analysis in the context of abstinence control programs are accompanied by specific challenges, and that analytical results have to be interpreted with diligence.

On the one hand, results of publication 1 show, that the intake of high volumes of fluid can lead to a significant reduction of the Crn concentration in urine below the threshold value of 20 mg/dl, irrespective of gender and weight. On the other hand, a fluid intake of as low as 0.5 liters can as well result in Crn values below this limit, especially in subjects with a low body mass. For this reason, it is recommended that participants of a urine abstinence control program should drink a maximum of 0.2 liters of fluid 1.5 to 2.5 hours before submitting a urine sample.

The second publication presents a method comparison between the photometric Jaffé and the LC-MS/MS method concerning the determination of Crn. Urine samples with low Crn concentrations were compared by applying several graphic assessments. The results show that both methods highly agree and are suitable to quantify Crn even at low concentration levels. If a photometrically determined Crn value is below the threshold, confirmation by LC-MS/MS is recommended.

In the third publication, it was demonstrated that ingestion of Cr or Crn in combination with a high volume of fluid intake can lead to an increase of the Crn concentration in urine thereby masking a previous dilution. At acidic pH, as in orange juice, a partial conversion of Cr to Crn occurred at room temperature leading to an additional increase in urinary Crn concentration upon ingestion. Therefore, if a preceding Cr ingestion is suspected, an additional determination of Cr in urine or, alternatively, of the specific gravity should be performed.

In the last publication, it has been shown that oral ingestion of 400 mg CBD under optimized solubility conditions did not lead to the detection of relevant THC concentrations. All serum samples tested negative for THC and THC metabolites. Only two urine samples of one subject revealed THC-COOH concentrations slightly above the threshold value. However, these low THC-COOH concentrations may also be explained by trace amounts of THC in CBD products. Though, the conversion of small amounts of CBD to THC in gastric juice cannot be completely excluded, it results in trace amounts. Hence, negative consequences for participants of an abstinence control program due to the conversion of CBD to THC in gastric juice appear unlikely, especially in case of a single intake of a recommended dosage of a commercially available CBD product.

Based on this research, a recommendation for maximum fluid intake prior to urine collection during an abstinence control program was stated and the methodology for determining highly diluted urine samples has been evaluated. In addition, for the first time, a study has demonstrated that Cr ingestion can increase the Crn concentration in urine and therefore mask its dilution. Lastly, an *in-vivo*-study revealed that no relevant CBD conversion to THC occurs in human gastric juice.

The results of this work have been presented by way of oral and poster presentations at national and international conferences.

5. Paper I

Creatinine excretion in consecutive urine samples after controlled ingestion of water

Franz, Simon; Skopp, Gisela; Boettcher, Michael; Musshoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2019; 11(3): 435-440

DOI: 10.1002/dta.2514

6. Paper II

Verifying the validity of creatinine measurement in low-concentrated urine spot samples - Photospectrometry versus liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Franz, Simon; Skopp, Gisela; Dame, Torsten; Musshoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2021; 13(6): 1136-1144

DOI: 10.1002/dta.3003

7. Literaturverzeichnis

- [1] Y.H. Caplan, B.A. Goldberger, Alternative specimens for workplace drug testing, *J Anal Toxicol* 25 (2001) 396–399. <https://doi.org/10.1093/jat/25.5.396>.
- [2] S. Fu, Adulterants in Urine Drug Testing, *Adv. Clin. Chem.* 76 (2016) 123–163. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.05.003>.
- [3] W. Schubert, V. Dittmann, J. Brenner-Hartmann, *Urteilsbildung in der Fahreignungsbegutachtung: Beurteilungskriterien*, third. Aufl., Kirschbaum-Verl., Bonn, 2013.
- [4] S. Franz, G. Skopp, F. Musshoff, Manipulationen bei der Abgabe einer Urinprobe im Rahmen von Abstinenzkontrollprogrammen: Erfahrungen mit der Sichtkontrolle, *Zeitschrift für Verkehrssicherheit* 66 (2020) 18–20.
- [5] E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, ninth., vollständig neu bearbeitete und erweiterte Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2008.
- [6] E.L. Karschner, E.W. Schilke, R.H. Lowe, W.D. Darwin, R.I. Hering, J.L. Cadet, M.A. Huestis, Implications of plasma Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC concentrations in chronic cannabis smokers, *J. Anal. Toxicol.* 33 (2009) 469–477. <https://doi.org/10.1093/jat/33.8.469>.
- [7] M.M. Bergamaschi, E.L. Karschner, R.S. Goodwin, K.B. Scheidweiler, J. Hirvonen, R.H.C. Queiroz, M.A. Huestis, Impact of prolonged cannabinoid excretion in chronic daily cannabis smokers' blood on per se drugged driving laws, *Clin. Chem.* 59 (2013) 519–526. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.195503>.
- [8] A.G. Verstraete, Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid, *Therapeutic Drug Monitoring* 26 (2004) 200–205. <https://doi.org/10.1097/00007691-200404000-00020>.
- [9] WADA, *International Standard for Testing and Investigations: Guidelines for Sample Collection* (2021).
- [10] SAMHSA, HHS, *Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs*, *Federal Register* 82 (2017) 7920-7970.
- [11] https://www.bast.de/DE/Presse/Downloads/2020-14-Langfassung-MPU.pdf,jsessionid=ED08802C76EAC77503A61DBAD267650D.live21303?__blob=publicationFile&v=3 (accessed 12 August 2022).
- [12] G. Skopp, L. Pötsch, M. Mauden, Stability of cannabinoids in hair samples exposed to sunlight, *Clin. Chem.* 46 (2000) 1846–1848.
- [13] C.L. Crunelle, M. Yegles, M. de Doncker, G. Dom, D. Cappelle, K.E. Maudens, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, H. Neels, Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients, *Forensic Sci. Int.* 247 (2015) 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.11.023>.
- [14] C. Jurado, P. Kintz, M. Menéndez, M. Repetto, Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing, *Int. J. Legal Med.* 110 (1997) 159–163. <https://doi.org/10.1007/s004140050056>.

- [15] M. Luginbühl, B. Bekaert, S. Suesse, F. Stöth, W. Weinmann, Detox shampoos for EtG and FAEE in hair – Results from in vitro experiments, *Toxicologie Analytique et Clinique* 31 (2019) S21-S22. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2019.03.019>.
- [16] M. Luginbühl, S. Nussbaumer, W. Weinmann, Decrease of ethyl glucuronide concentrations in hair after exposure to chlorinated swimming pool water, *Drug Test Analysis* 10 (2018) 689–693. <https://doi.org/10.1002/dta.2295>.
- [17] P.D. Balsom, K. Söderlund, B. Ekblom, Creatine in humans with special reference to creatine supplementation, *Sports Med.* 18 (1994) 268–280. <https://doi.org/10.2165/00007256-199418040-00005>.
- [18] D.B. Barr, L.C. Wilder, S.P. Caudill, A.J. Gonzalez, L.L. Needham, J.L. Pirkle, Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements, *Environ Health Perspect* 113 (2005) 192–200. <https://doi.org/10.1289/ehp.7337>.
- [19] R.C. Harris, J.A. Lowe, K. Warnes, C.E. Orme, The concentration of creatine in meat, offal and commercial dog food, *Research in Veterinary Science* 62 (1997) 58–62. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(97\)90181-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(97)90181-8).
- [20] K.D. EDWARDS, H.M. WHYTE, Creatinine excretion and body composition, *Clin. Sci.* 18 (1959) 361–366.
- [21] S. Narayanan, H.D. Appleton, Creatinine: A review, *Clin. Chem.* 26 (1980) 1119–1126.
- [22] A.R. Butler, The Jaffé reaction. Identification of the coloured species, *Clin. Chim. Acta* 59 (1975) 227–232.
- [23] E.M.K. Leung, W. Chan, A novel reversed-phase HPLC method for the determination of urinary creatinine by pre-column derivatization with ethyl chloroformate: comparative studies with the standard Jaffé and isotope-dilution mass spectrometric assays, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1807–1812. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7592-8>.
- [24] P. Dereziński, A. Klupczyńska, W. Sawicki, Z.J. Kokot, Creatinine determination in urine by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry method, *Acta Pol. Pharm.* 73 (2016) 303–313.
- [25] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden ; mit 83 Tabellen, fifth. überarbeitete Auflage*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2013.
- [26] J.H. Gross, *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 2013.
- [27] M. Engelhardt, G. Neumann, A. Berbalk, I. Reuter, Creatine supplementation in endurance sports, *Med. Sci. Sports Exerc.* 30 (1998) 1123–1129.
- [28] M. Kamber, M. Koster, R. Kreis, G. Walker, C. Boesch, H. Hoppeler, Creatine supplementation - Part I: performance, clinical chemistry, and muscle volume, *Med. Sci. Sports Exerc.* 31 (1999) 1763. <https://doi.org/10.1097/00005768-199912000-00011>.

- [29] J.-M. Schedel, M. Tanaka, H. Tanaka, A. Kiyonaga, M. Shindo, P. Terrier, Y. Schutz, Consequences of one-week creatine supplementation on creatine and creatinine levels in athletes' serum and urine, *Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie* 48 (200) 111–116.
- [30] R. Cooper, F. Naclerio, J. Allgrove, A. Jimenez, Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update, *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 9 (2012) 33. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-9-33>.
- [31] G. Edgar, H.E. Shiver, THE EQUILIBRIUM BETWEEN CREATINE AND CREATININE, IN AQUEOUS SOLUTION. THE EFFECT OF HYDROGEN ION, *J. Am. Chem. Soc.* 47 (1925) 1179–1188. <https://doi.org/10.1021/ja01681a040>.
- [32] A.N. Howard, R.C. Harris 5,968,544, 1999.
- [33] F. Taura, S. Sirikantaramas, Y. Shoyama, K. Yoshikai, Y. Shoyama, S. Morimoto, Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*, *FEBS Lett.* 581 (2007) 2929–2934. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.043>.
- [34] O. Devinsky, E. Marsh, D. Friedman, E. Thiele, L. Laux, J. Sullivan, I. Miller, R. Flamini, A. Wilfong, F. Filloux, M. Wong, N. Tilton, P. Bruno, J. Bluvstein, J. Hedlund, R. Kamens, J. Maclean, S. Nangia, N.S. Singhal, C.A. Wilson, A. Patel, M.R. Cilio, Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial, *The Lancet Neurology* 15 (2016) 270–278. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00379-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00379-8).
- [35] E.A. Thiele, E.D. Marsh, J.A. French, M. Mazurkiewicz-Beldzinska, S.R. Benbadis, C. Joshi, P.D. Lyons, A. Taylor, C. Roberts, K. Sommerville, B. Gunning, J. Gawlowicz, P. Lisewski, M. Mazurkiewicz Beldzinska, K. Mitosek Szewczyk, B. Steinborn, M. Zolnowska, E. Hughes, A. McLellan, S. Benbadis, M. Ciliberto, G. Clark, D. Dlugos, F. Filloux, R. Flamini, J. French, M. Frost, S. Haut, S. Kapoor, S. Kessler, L. Laux, P. Lyons, E. Marsh, D. Moore, R. Morse, V. Nagaraddi, W. Rosenfeld, L. Seltzer, R. Shellhaas, J. Sullivan, E. Thiele, L.L. Thio, D. Wang, A. Wilfong, Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial, *The Lancet* 391 (2018) 1085–1096. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30136-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30136-3).
- [36] C. Mannucci, M. Navarra, F. Calapai, E.V. Spagnolo, F.P. Busardò, R.D. Cas, F.M. Ippolito, G. Calapai, Neurological Aspects of Medical Use of Cannabidiol, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 16 (2017) 541–553. <https://doi.org/10.2174/1871527316666170413114210>.
- [37] A.R. de Mello Schier, N.P. de Oliveira Ribeiro, D.S. Coutinho, S. Machado, O. Arias-Carrión, J.A. Crippa, A.W. Zuardi, A.E. Nardi, A.C. Silva, Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of cannabidiol: a chemical compound of *Cannabis sativa*, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 13 (2014) 953–960. <https://doi.org/10.2174/1871527313666140612114838>.
- [38] S. Bonaccorso, A. Ricciardi, C. Zangani, S. Chiappini, F. Schifano, Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review, *Neurotoxicology* 74 (2019) 282–298. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.08.002>.
- [39] Anlage I § 1 BtMG, Cannabis, b).

- [40] Y. Gaoni, R. Mechoulam, Hashish—VII: The isomerization of cannabidiol to tetrahydrocannabinols, *Tetrahedron* 22 (1966) 1481–1488. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)99446-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)99446-3).
- [41] K. Watanabe, Y. Itokawa, S. Yamaori, T. Funahashi, T. Kimura, T. Kaji, N. Usami, I. Yamamoto, Conversion of cannabidiol to Δ^9 -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice, *Forensic Toxicol* 25 (2007) 16–21. <https://doi.org/10.1007/s11419-007-0021-y>.
- [42] J. Merrick, B. Lane, T. Sebree, T. Yaksh, C. O'Neill, S.L. Banks, Identification of Psychoactive Degradants of Cannabidiol in Simulated Gastric and Physiological Fluid, *Cannabis Cannabinoid Res.* 1 (2016) 102–112. <https://doi.org/10.1089/can.2015.0004>.
- [43] T. Hložek, L. Uttl, L. Kadeřábek, M. Balíková, E. Lhotková, R.R. Horsley, P. Nováková, K. Šíchová, K. Štefková, F. Tylš, M. Kuchař, T. Páleníček, Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC+CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC, *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 27 (2017) 1223–1237. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2017.10.037>.
- [44] P. Consroe, J. Laguna, J. Allender, S. Snider, L. Stern, R. Sandyk, K. Kennedy, K. Schram, Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40 (1991) 701–708. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90386-g](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90386-g).
- [45] R. Martin-Santos, J.A. Crippa, A. Batalla, S. Bhattacharyya, Z. Atakan, S. Borgwardt, P. Allen, M. Seal, K. Langohr, M. Farré, A.W. Zuardi, P.K. McGuire, Acute effects of a single, oral dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) administration in healthy volunteers, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 4966–4979. <https://doi.org/10.2174/138161212802884780>.
- [46] L. Wray, C. Stott, N. Jones, S. Wright, Cannabidiol Does Not Convert to Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in an In Vivo Animal Model, *Cannabis Cannabinoid Res.* 2 (2017) 282–287. <https://doi.org/10.1089/can.2017.0032>.
- [47] L. Taylor, B. Gidal, G. Blakey, B. Tayo, G. Morrison, A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects, *CNS Drugs* 32 (2018) 1053–1067. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0578-5>.
- [48] D.J. Sholler, T.R. Spindle, E.J. Cone, E. Goffi, D. Kuntz, J.M. Mitchell, R.E. Winecker, G.E. Bigelow, R.R. Flegel, R. Vandrey, Urinary Pharmacokinetic Profile of Cannabidiol (CBD), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and Their Metabolites following Oral and Vaporized CBD and Vaporized CBD-Dominant Cannabis Administration, *J. Anal. Toxicol.* 46 (2022) 494–503. <https://doi.org/10.1093/jat/bkab059>.

Anhang A: Paper III

The effect of creatine ingestion on urinary creatinine concentration: Does supplementation mask a heavy dilution?

Franz, Simon; Skopp, Gisela; Musshoff, Frank

Drug Testing and Analysis 2022; 14(1): 162-168

DOI: 10.1002/dta.3165

Anhang B: Paper IV

Will tetrahydrocannabinol be formed from cannabidiol in gastric fluid? An in vivo experiment

Franz, Simon; Herzog, Josefine; Skopp, Gisela; Musshoff, Frank

International Journal of Legal Medicine 2023; Jan;137(1): 79-87

DOI: 10.1007/s00414-022-02896-w.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen Menschen bedanken, die mich bei der Ausarbeitung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Mußhoff für die Überlassung des interessanten und praxisrelevanten Themas, die Zeit der Unterstützung und die wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Dissertation.

Bei Frau Prof. Dr. Skopp möchte ich mich herzlich für die allumfassende fachkundige Unterstützung bei der Anfertigung der wissenschaftlichen Arbeiten bedanken.

Den Mitautoren der Publikationen danke ich sehr für den wissenschaftlichen Austausch und die stets gute Zusammenarbeit.

Allen Versuchsteilnehmern ein großes Dankeschön für die Zurverfügungstellung ihrer Körperflüssigkeiten, die Bereitschaft große Mengen Wasser in kurzer Zeit zu trinken und die nicht immer einfach zu bewerkstellende Einhaltung des „Pinkelprotokolls“.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen im FTC danke ich sehr für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die großartige Unterstützung in den letzten Jahren.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Freunden für die vielseitige Unterstützung und ihr Vertrauen über all die Jahre bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner größten Unterstützung in allen Lebensbereichen bedanken. Danke Verena, dass du immer für mich da bist. Ich bin sehr glücklich dich an meiner Seite zu haben!