

**Analytik von Phytocannabinoiden in  
cannabisbasierten Medikamenten, Straßencannabis  
und Blutproben mit Fokus auf potentielle  
Konsummarker**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie und  
Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Anne Karla Scheunemann  
geboren in Frankfurt am Main

Mainz, 2021

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Tanja Schirmeister

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Irene Krämer

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Jörg Röhrich

Tag der mündlichen Prüfung:

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Scheunemann A, Potential distinguishing phytocannabinoid markers for seized cannabis and cannabis-based medicines. *Toxichem Krimtech.* 2021;88:152–5.

Scheunemann A, Elsner K, Germerott T, Groppa S, Hess C, Miederer I, Poplawski A, Röhrich J, Identification of potential distinguishing markers for the use of cannabis-based medicines or street cannabis in serum samples. *Metabolites.* 2021;11:316. doi:10.3390/metabo11050316.

Scheunemann A, Elsner K, Germerott T, Hess C, Zörntlein S, Röhrich J. Extensive phytocannabinoid profiles of seized cannabis and cannabis-based medicines - Identification of potential distinguishing markers. *Forensic Sci Int.* 2021;322:110773. doi:10.1016/j.forsciint.2021.110773.

Scheunemann A, Elsner K, Germerott T, Hess C, Röhrich J. Simultaneous quantification of 18 different phytocannabinoids in serum using a highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021;1173:122685. doi:10.1016/j.jchromb.2021.122685.

Heß C, Scheunemann A, Thomas B, Kraemer M, Bestimmung verschiedener Begleitcannabinoide in Blutproben von Cannabiskonsumenten. Kann die Einschätzung des zeitlichen Abstandes zwischen Konsum und Blutentnahme verbessert werden? *Blutalkohol.* 2019;56:351–65.

### Vorträge

Scheunemann A, Elsner K, Germerott T, Hess C, Zörntlein S, Röhrich J  
Potential distinguishing phytocannabinoid markers for seized cannabis and cannabis-based medicines  
XXII. Symposium der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh)  
„Mosbach online“, virtuelle Tagung, 15. – 17 April 2021

### Posterpräsentationen

Scheunemann A, Germerott T, Uebbing K, Zörntlein S, Röhrich J  
Cannabinoid patterns in medicinal-grade marijuana and seized cannabis plants  
XXI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh),  
Mosbach, 11. – 13. April 2019

## Wissenschaftliche Auszeichnung

Young Scientist Oral Presentation Award

für den Vortrag „Potential distinguishing phytocannabinoid markers for seized cannabis and cannabis-based medicines“ beim XXII. Symposium der Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie (GTFCh) „Mosbach online“ vom 15. – 17. April 2021

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	III
1 Hintergrund und Zielsetzung.....	1
2 Gliederung der Dissertation .....	3
3 Theoretische Einführung.....	4
3.1 Die Cannabis Pflanze .....	4
3.1.1 Morphologie, Verbreitung und Taxonomie .....	4
3.1.2 Inhaltsstoffe von Cannabis .....	5
3.1.3 Biogenese von Phytocannabinoiden .....	12
3.2 Pharmakokinetik von Cannabinoiden.....	14
3.2.1 Metabolismus von THC .....	14
3.2.2 Metabolismus weiterer Cannabinoide .....	17
3.3 Pharmakodynamik von Cannabinoiden .....	17
3.3.1 Das Endocannabinoidsystem.....	18
3.3.2 Typische Wirkungen von Cannabis .....	19
3.3.3 Der Entourage-Effekt .....	19
3.4 Cannabis als Rauschdroge.....	20
3.5 Cannabis als Arzneimittel .....	21
3.5.1 Gesicherte Indikationen und weitere Anwendungsgebiete .....	21
3.5.2 Rechtslage .....	22
3.5.3 Cannabisbasierte Arzneimittel.....	23
3.6 Cannabis im Straßenverkehr .....	25
3.7 Marker für verschiedene Cannabisprodukte – Aktueller Stand der Literatur .....	26
3.8 Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) .....	27
3.9 Extraktion von Cannabinoiden aus Stoff- und Serumproben .....	29
3.10 Grundlagen der Hauptkomponentenanalyse .....	29
4 Ergebnisse.....	33
4.1 Simultane und hochsensible Analytik von 18 verschiedenen Phytocannabinoiden mittels LC-MS/MS.....	33

4.1.1	Kurzprofil der Publikation .....	33
4.1.2	Abgrenzung des Eigenanteils.....	33
4.1.3	Artikel.....	35
4.2	Phytocannabinoidprofile von beschlagnahmtem Cannabis und cannabisbasierten Arzneimitteln – Identifikation potentieller Unterscheidungsmerkmale .....	45
4.2.1	Kurzprofil der Publikation .....	45
4.2.2	Abgrenzung des Eigenanteils.....	45
4.2.3	Artikel.....	47
4.3	Identifizierung potentieller Unterscheidungsmarker für Konsum von cannabisbasierten Arzneimitteln oder Straßencannabis in Serumproben.....	61
4.3.1	Kurzprofil der Publikation .....	61
4.3.2	Abgrenzung des Eigenanteils.....	61
4.3.3	Artikel.....	63
5	Gesamtdiskussion und Ausblick .....	100
5.1	Grundlagen und Analytik von Phytocannabinoiden.....	100
5.2	Phytocannabinoidprofile und Unterscheidungsmarker in cannabisbasierten Arzneimitteln und Straßencannabis .....	101
5.3	Phytocannabinoidprofile und Konsummarker verschiedener Cannabisprodukte in Serum.....	106
5.4	Ausblick .....	110
6	Zusammenfassung .....	112
7	Literaturverzeichnis.....	115
8	Danksagung .....	127
9	Wissenschaftlicher Werdegang .....	129
10	Versicherung an Eides statt.....	130

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CBC	Cannabichromen
CBCA	Cannabichromensäure
CBCVA	Cannabichromevarinsäure
CBD	Cannabidiol
CBDA	Cannabidiolsäure
CBDV	Cannabidivarin
CBDVA	Cannabidivarinsäure
CBE	Cannabielsoin
CBG	Cannabigerol
CBGA	Cannabigerolsäure
CBGVA	Cannabigerovarinsäure
CBL	Cannabicyclol
CBLA	Cannabicyclolsäure
CBN	Cannabinol
CBNA	Cannabinolsäure
CBND	Cannabinodiol
CBR	Cannabinoidrezeptor
CBT	Cannabitriol
Delta-8-THC/ $\Delta$ 8-THC	Delta-8-Tetrahydrocannabinol
ESI	Elektrosprayionisation

et al.	et aliis (und andere)
ggf.	gegebenenfalls
GTFCh	Gesellschaft für Toxikologie und Forensische Chemie
h	Stunde
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
L.	nach Carl von Linné
lat.	Latein
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry)
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
ng	Nanogramm
NRF	Neues Rezeptur-Formularium
PC	Hauptkomponente (Principal component)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal component analysis)
SPE	Festphasenextraktion (Solid-phase extraction)
THC/Delta-9-THC/ $\Delta$ 9-THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
THCAA	Tetrahydrocannabinolsäure A
THC-COOH	11-Nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol
THC-OH/ 11-OH-THC	11-Hydroxy-tetrahydrocannabinol
THCV	Tetrahydrocannabivarin
THCVA	Tetrahydrocannabivarinensäure
v. Chr.	vor Christus
z.B.	zum Beispiel

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellen:

Tabelle 1: Beispieldatensatz mit mehreren Variablen zur Illustration der Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	30
---	----

### Abbildungen:

Abbildung 1: Chemische Strukturen von THC und THCAA.....	6
Abbildung 2: Chemische Strukturen von THCV und THCVA.....	6
Abbildung 3: Chemische Struktur von $\Delta$ 8-THC. ....	7
Abbildung 4: Chemische Strukturen von CBD und CBDA.....	7
Abbildung 5: Chemische Strukturen von CBDV und CBDVA. ....	7
Abbildung 6: Chemische Strukturen von CBN und CBNA.....	8
Abbildung 7: Chemische Strukturen von CBG und CBGA.....	8
Abbildung 8: Chemische Strukturen von CBC und CBCA.....	9
Abbildung 9: Chemische Strukturen von CBL und CBLA. ....	9
Abbildung 10: Chemische Struktur von Cannabinodiol (CBND). ....	10
Abbildung 11: Chemische Struktur von Cannabielsoin (CBE). ....	10
Abbildung 12: Chemische Struktur von Cannabitrinol- $C_5$ (CBT- $C_5$ ).....	10
Abbildung 13: Biogenese verschiedener saurer Cannabinoide mit Pentyl- oder Propyl-Seitenkette aus Geranylpyrophosphat und Olivetoläure bzw. Divarinsäure. ....	13
Abbildung 14: Chemische Strukturen von THC-OH und THC-COOH. ....	16
Abbildung 15: Mittlere Plasmaspiegel bei Konsum eines Joints mit 33,8 mg THC (Daten nach einer Studie von Huestis et al. [47]). ....	16
Abbildung 16: Chemische Strukturen der endogenen Cannabinoide Anandamid und 2-Arachidonylglycerol.....	18

Abbildung 17: Schema eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit Ionenquelle, Analysator und Detektor.....28

Abbildung 18: Biplot von Hauptkomponente (PC) 1 und PC 2 für die PCA des Beispieldatensatzes aus Tabelle 1.....31

Abbildung 19: Loading Plots von PC 1 und PC 2.....32

# 1 Hintergrund und Zielsetzung

*Cannabis sativa L.* ist seit Jahrzehnten die am häufigsten konsumierte illegale Rauschdroge weltweit. Für 2018 wurde die globale Konsumprävalenz auf 192 Million geschätzt, und steigende Konsumentenzahlen werden verzeichnet [1, 2]. Hauptwirkstoffe der monospezifischen Pflanze sind das psychoaktive Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD), welche in der Pflanze in Form ihrer sauren Vorstufen, der Tetrahydrocannabinolsäure (THCAA) bzw. Cannabidiolsäure (CBDA), vorliegen und unter Einwirkung von Luft, Licht oder Wärme aus diesen gebildet werden. Darüber hinaus enthält Cannabis, meist in geringeren Konzentrationen, eine Vielzahl weiterer (seltener) Cannabinoide wie Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabinol (CBN) oder Cannabigerol (CBG), wobei das Gesamtcannabinoidprofil von Pflanze zu Pflanze je nach Genetik und Anbaubedingungen stark variiert [3].

Insbesondere die Teilnahme am Straßenverkehr unter Einfluss von Cannabis ist problematisch. Eine Beeinträchtigung von Aufmerksamkeit, Wahrnehmung, Impulskontrolle und psychomotorischen Funktionen führt zu einer verminderten Fahrfähigkeit, und das Unfallrisiko ist deutlich erhöht [4–7]. In Deutschland ist nach § 24a StVG Abs. 2 das Führen eines Kraftfahrzeugs unter Cannabiseinfluss mit THC Serumspiegeln ab 1 ng/mL ordnungswidrig und hat eine Geldbuße, Fahrverbot, Eintragung ins Verkehrsregister sowie Einschaltung der Führerscheinbehörde zur Folge [8].

Das therapeutische Potenzial von Cannabis ist in den vergangenen Jahrzehnten ebenfalls in den Interessenfokus der Wissenschaft gerückt und wurde bereits in einer Reihe von Studien erforscht. Als am besten untersucht gelten die Wirkstoffe THC und CBD, welche unter anderem zur Behandlung von schwerer Spastik bei Multipler Sklerose, Übelkeit und Erbrechen bei Chemotherapie, Epilepsie oder zur Schmerzbehandlung eingesetzt werden. Therapeutische Effekte und Wirkstoffspiegel anderer, häufig nur in geringen Konzentrationen in der Pflanze anwesender Cannabinoide sind dagegen bislang kaum erforscht [9, 10]. In Deutschland werden in den letzten Jahren zunehmende Verschreibungszahlen cannabisbasierter Medikamente verzeichnet [11–13]. Neben Rezeptur- und Fertigarzneimitteln wie Dronabinol, also reinem THC, und Sativex®, einer Mischung zweier auf THC bzw. CBD standardisierter Pflanzenextrakte, steht unter anderem auch Medizinalcannabis selbst als Therapieoption zur Verfügung. Letzteres ist in vielen THC- oder CBD-dominanten sowie Mischformen erhältlich [14].

Das Führen von Kraftfahrzeugen unter Medikation mit Cannabis oder cannabisbasierten Arzneimitteln ist von der oben beschriebenen gesetzlichen Regelung ausgenommen. Dennoch wird in einigen Fällen im Nachgang einer Verkehrskontrolle von den

Führerscheinbehörden eine Medizinisch-Psychologische Untersuchung angeordnet, um die generelle Fahreignung von Cannabispatienten zu begutachten. Hier ist unter anderem zu prüfen, ob neben der Cannabistherapie ein Freizeitkonsum von (Straßen-) Cannabis erfolgt [15].

In der Vergangenheit wurden als Marker für einen solchen Freizeitkonsum bestimmte seltene Cannabinoide vorgeschlagen, wenn das abzugrenzende Cannabismedikament nur THC enthält [16–18]. Die Zuverlässigkeit dieser Marker steht jedoch in Frage, wenn die applizierten Cannabismedikamente auf Pflanzenextrakten basieren und, durch den Herstellungsprozess bedingt, ebenfalls seltene Cannabinoide enthalten können. Dies ist der Fall für die beiden am häufigsten verordneten cannabisbasierten Wirkstoffe Sativex® und Dronabinol [13]. Sativex® enthält laut Literatur einen geringen Anteil seltener Cannabinoide [19]. Das genaue Cannabinoidprofil ist allerdings nicht bekannt. Dronabinol des Herstellers Bionorica ethics wird direkt aus Medizinalhanf gewonnen und kann möglicherweise ebenfalls seltene Cannabinoide enthalten [20, 21]. Auch hier wurde das genaue Cannabinoidspektrum bislang nicht untersucht.

Zwischen Phytocannabinoidprofilen von Medizinalcannabis und Straßencannabis zu differenzieren, erscheint zunächst als ein komplexes Unterfangen, da beide als Naturprodukt eine Vielzahl verschiedener (seltener) Cannabinoide enthalten. In einer Studie von Hazekamp und Fishedick wurden bereits einige signifikante Unterschiede beobachtet [22]. Jedoch wurden in der Arbeit nur zwei verschiedene Straßencannabis- und drei verschiedene Medizinalhanfsorten untersucht. Bei Sicherstellungen von Straßencannabis ist die Sorte meist nicht bekannt. Ebenso kann keine vollständige Aussage über Phytocannabinoidprofile der beschlagnahmten Proben getroffen werden, da bei Routineuntersuchungen typischerweise nur THC und CBD quantifiziert werden, und weitere Cannabinoide unerfasst bleiben. Auch bei Medizinalhanfsorten ist das Phytocannabinoidprofil oft nur in Teilen untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, Konzentrationen verschiedener (seltener) Cannabinoide sowohl in diversen Cannabissorten und cannabisbasierten Medikamenten als auch in Serumproben nach Konsum verschiedener Cannabisprodukte zu untersuchen. Der spezielle Fokus liegt hierbei auf der Identifizierung potentieller Marker zur Differenzierung von Cannabismedikamenten und Straßencannabis sowie der Prüfung der Eignung und Anwendbarkeit in der Literatur beschriebener Marker für häufig verordnete Cannabismedikamente. Weiterhin beschreibt die Arbeit zwei hochsensitive Analysemethoden zur simultanen Quantifizierung verschiedener Cannabinoide in Pflanzenextrakten bzw. Serum mittels Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS).

## 2 Gliederung der Dissertation

Eine theoretische Einführung in verschiedene Aspekte zu Cannabis sowie analytische und statistische Methoden wird im nachfolgenden Kapitel 3 gegeben. Hier werden Grundlagen zu Inhaltsstoffen von Cannabis, pharmakokinetische und pharmadynamische Eigenschaften, die Anwendung von Cannabis als Rausch- und Arzneimittel und seine Rolle im Straßenverkehr erläutert. Weiterhin wird ein Überblick über in der Literatur diskutierte Konsummarker zur Unterscheidung von Cannabismedikamenten und Straßencannabis gegeben. Grundlagen zu Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie, Extraktionsverfahren und Datenauswertung via Hauptkomponentenanalyse sind dort ebenfalls beschrieben.

In Kapitel 4 ist der kumulative Teil der Arbeit aufgeführt. Jedem Unterkapitel sind ein Kurzprofil der jeweiligen Teilarbeit und eine Abgrenzung des Eigenanteils an der Veröffentlichung vorangestellt: Kapitel 4.1 beschreibt zunächst die Entwicklung und Validierung einer hochsensitiven LC-MS/MS Methode zur simultanen Quantifizierung 16 verschiedener Phytocannabinoiden und zweier Cannabinoidmetaboliten in Serum sowie die Analyse von Serumproben von Straßencannabiskonsumenten hinsichtlich ihrer Cannabinoidgehalte. Eine LC-MS/MS Analysemethode zur Quantifizierung derselben 16 Phytocannabinoiden in Pflanzenextrakten beschreibt Kapitel 4.2. Hier werden Cannabinoidprofile in Proben verschiedener Straßencannabis- und Medizinalhanfsorten, Sativex® und Dronabinol erhoben und potentielle Marker zur Differenzierung der Stoffproben identifiziert. In Kapitel 4.3 sind schließlich Ergebnisse einer klinischen Forschungsstudie dargestellt, in welcher Blutproben von Patienten unter Therapie mit Medizinalhanf oder cannabisbasierten Medikamenten hinsichtlich ihrer Phytocannabinoidprofile untersucht wurden. Mittels statistischer Verfahren werden diese Profile mit denen der Straßencannabiskonsumenten aus Kapitel 4.1 verglichen. Unterscheidungsmerkmale zwischen den Gruppen werden identifiziert und den in Kapitel 4.2 herausgearbeiteten Markern für Stoffproben sowie den in der Literatur diskutierten Konsummarkern gegenübergestellt. Schließlich werden die Marker auf Fälle aus der forensischen Routineanalytik angewendet, um Aussagen zur Einnahme von Cannabismedikamenten zu beurteilen.

Kapitel 5 umfasst eine Gesamtdiskussion der Studienergebnisse in Hinblick auf die Ausgangsfragestellungen sowie einen Ausblick. Eine Zusammenfassung in Deutsch und Englisch findet sich in Kapitel 6.

## 3 Theoretische Einführung

### 3.1 Die Cannabis Pflanze

#### 3.1.1 Morphologie, Verbreitung und Taxonomie

*Cannabis sativa* L. ist eine einjährige, krautige Pflanze der Gattung Hanf (*Cannabis*), welche, genau wie die Gattung Hopfen (*Humulus*), der Familie der Hanfgewächse (*Cannabaceae*) zugeordnet wird [23]. Cannabis Pflanzen können bis zu 5 m Höhe erreichen und bilden handförmige, gefingerte Blätter mit gesägtem Blattrand aus. Die Anzahl der Teilblätter kann dabei variieren. Die Pflanze hat immer nur einen Haupttrieb und ist zweihäusig (diözisch), d.h. weibliche und männliche Blüten wachsen in der Regel auf verschiedenen Pflanzen. Männliche Blüten sind dabei eher in Rispen, weibliche Blüten eher traubenartig angeordnet. Die für die Pflanze charakteristischen Cannabinoide sind von harziger Beschaffenheit und werden in Drüsenzellen (Trichomen) gebildet und gespeichert [9, 24]. Der Pflanze dienen sie als Schutz vor Fraßfeinden und UV-Licht [25]. Besonders harzreich sind weibliche Blüten und blütenstandsnahe Blätter. Männliche Blüten, Stängel, Blätter, Wurzeln und Samen von Cannabis weisen dagegen geringere Mengen bzw. kaum Cannabinoide auf. Cannabis besitzt eine Hauptwurzel mit mehreren waagrecht abzweigenden Seitenwurzeln. Sie wurzelt bis zu 2 m tief und bevorzugt lockere, stickstoffreiche Böden mit guter Wasser- und Nährstoffversorgung. Die Blüte erfolgt bei abnehmender Tageslänge. Nach Windbestäubung bilden die weiblichen Blüten Achänen, einsamige Schließfrüchte mit harter Hülle, aus. Nach der Samenreife stirbt die Pflanze ab. Durch vegetative Vermehrung in Form von Stecklingen lässt sie sich jedoch über viele Jahre erhalten [9, 24].

Als eine der ältesten Kulturpflanzen der Menschheit wird Cannabis vermutlich bereits seit der Neusteinzeit verwendet [26]. Neben dem Einsatz zu medizinischen und Rauschzwecken werden die Pflanzenstängel zur Gewinnung von Fasern genutzt [24]. Cannabissamen dienen außerdem als Tierfutter, Nahrungsmittel oder zur Ölgewinnung. Es wird vermutet, dass die ursprüngliche Herkunft der Pflanze in Indien oder Sibirien liegt [27], von wo aus sie sich über Asien und Afrika nach Europa und schließlich global ausgebreitet hat [28]. Heute wird Cannabis in fast allen Ländern der Erde kultiviert. Schwerpunkte liegen z.B. in Marokko, Afghanistan, Indien, Albanien oder Mexiko [1].

Die Bezeichnung „*Cannabis sativa*“ (lat., angebauter Hanf) taucht bereits in Aufzeichnungen aus dem 16. Jahrhundert auf, beispielsweise in dem Werk „*De Historia Stirpium comentarii insignes*“ des Botanikers Leonhart Fuchs [29], und wurde 1753 auch von Carl von Linné beschrieben. Aufgrund des sehr unterschiedlichen Erscheinungsbildes und verschiedener Inhaltsstoffmuster in der Pflanze herrscht unter Taxonomen Uneinigkeit darüber, ob

Cannabis als monospezifisch anzusehen ist oder nicht. 1783 wurde beispielsweise von Lamarck die Art *Cannabis indica* mit indischer Herkunft in morphologischer Abgrenzung zu *C. sativa* beschrieben, und Janischevsky schlug 1924 *C. ruderalis* als eine weitere, aus Sibirien stammende Wild-Art vor [30, 31]. Small und Cronquist kamen 1976 zu dem Schluss, dass es sich dabei um verschiedene Subspezies handelt [32]. Hillig und Mahlberg wiederum postulierten 2004 aufgrund von morphologischen und genetischen Untersuchungen die Existenz zweier grundverschiedener Genpools *C. sativa* und *C. indica* [33]. Andere Autoren haben Cannabis aufgrund von Gehalten an Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD) in „Drogenhanf“ (Typ I), einen intermediären Typ (Typ II) und „Faserhanf“ (Typ III) gegliedert [34, 35]: Typ I enthält demnach > 0,3 % THC und < 0,5 % CBD mit einem THC/CBD Verhältnis > 1. Typ II enthält ähnliche Konzentrationen von THC und CBD mit > 0,3 % THC und > 0,5 % CBD. In Typ III dominiert CBD mit Konzentrationen > 0,5 %, während THC in Konzentrationen von < 0,3 % vertreten ist.

In der nicht-taxonomischen Literatur wird Cannabis heutzutage als monospezifisch angesehen. Der Agrarwissenschaftler De Meijer argumentiert hierzu, dass sich Kriterien wie Cannabinoid-Verhältnisse, Herkunft der Pflanze oder Ausprägung verschiedener Allele im Gengut zur taxonomischen Unterscheidung nicht eignen, da sie aufgrund jahrhundertelanger Kultivierung der Selektion durch den Menschen unterworfen seien. Sogar morphologisch sehr ähnliche oder genetisch verwandte Pflanzen könnten unterschiedliche Chemotypen aufweisen. Außerdem seien alle Pflanzen aus der Gattung Cannabis miteinander kreuzbar. In Bezug auf die Differenzierung von Drogen- und Faserhanf müsse man zudem beachten, dass die Einteilung auf Willkür basiere, da der Gehalt an Cannabinoiden nicht zwangsläufig mit den Fasereigenschaften der Pflanze korreliert sei. [3]

### **3.1.2 Inhaltsstoffe von Cannabis**

Das Inhaltsstoffspektrum von Cannabis ist sehr heterogen und kann je nach Genetik und Anbaubedingungen in den einzelnen Pflanzen stark variieren. Bislang wurden 554 verschiedene Komponenten in Cannabis identifiziert, von denen 113 der prominentesten Inhaltsstoffklasse, den Phytocannabinoiden, zugerechnet werden. [36, 37]

#### **Phytocannabinoide**

Phytocannabinoide sind terpenphenolische Verbindungen, sowie deren Derivate, die an Cannabinoid-Rezeptoren binden [38]. Sie sind, mit wenigen Ausnahmen, einzigartig für die Gattung Cannabis. In der Pflanze liegen Phytocannabinoide ursprünglich in ihrer sauren Form vor und werden erst unter Einfluss von Hitze, UV Licht oder Sauerstoff, insbesondere nach der Ernte, zur neutralen Form decarboxyliert. Durch Oxidation entstehen weitere

Abbauprodukte wie beispielsweise Cannabinol (CBN) aus Tetrahydrocannabinol (THC) oder Cannabicyclol (CBL) aus Cannabichromen (CBC) [3].

In der Literatur werden 11 verschiedene chemische Typen von Phytocannabinoiden unterschieden [36]:

- **(-)-Delta-9-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ 9-THC) Typ:**

Der bekannteste Vertreter ist das psychoaktive (-)-Delta-9-*trans*-Tetrahydrocannabinol (THC, Abb. 1), welches 1964 erstmals von Gaoni und Mechoulam isoliert wurde [39]. Es existieren mehrere Nummerierungssysteme für Phytocannabinoide. In dieser Arbeit wird das auf der Dibenzopyran-Struktur basierende System verwendet (siehe Abb. 1), welches auch von der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) anerkannt ist. Cannabinoide dieses Typs weisen zwei Chiralitätszentren auf (Position 6a und 10a). In der Natur kommen laut Literatur für gewöhnlich nur die (-)-*trans*-Isomere vor [40]. Gegenüber (+)-Delta-9-*trans*-Tetrahydrocannabinol ist (-)-Delta-9-*trans*-Tetrahydrocannabinol 10 – 100-mal stärker wirksam [41]. Weitere Vertreter des  $\Delta$ 9-THC-Typs sind die saure Vorstufe von THC, die Delta-9-Tetrahydrocannabinolsäure A (THCAA, Abb. 1), sowie die Propyl-Seitenketten-Analoga Delta-9-Tetrahydrocannabivarin (THCV, Abb. 2) und Tetrahydrocannabivarinensäure (THCVA, Abb. 2).

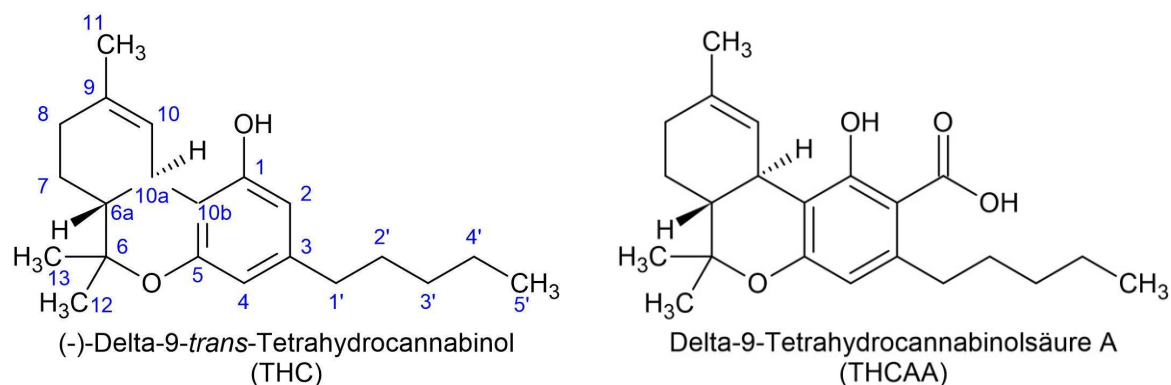


Abbildung 1: Chemische Strukturen von THC und THCAA.

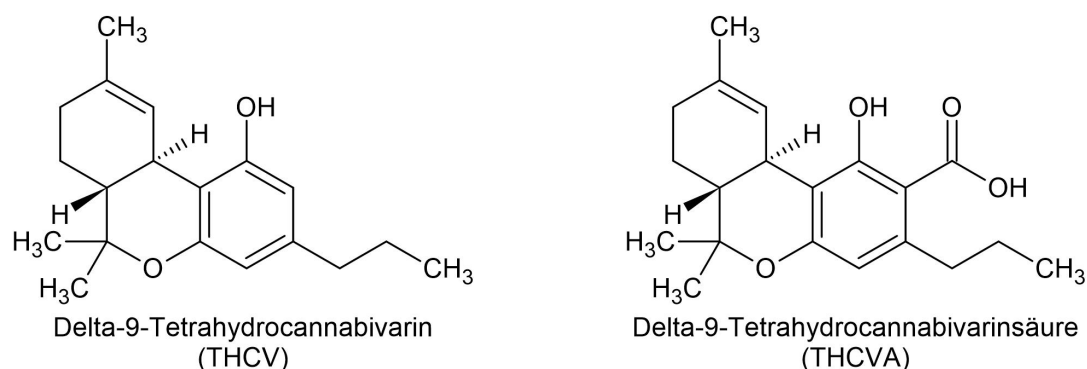


Abbildung 2: Chemische Strukturen von THCV und THCVA.

- **(-)-Delta-8-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC) Typ:**

Cannabinoide dieses Typs weisen eine Doppelbindung an Position C<sub>8</sub> statt an Position C<sub>9</sub> auf. Ein Beispiel ist (-)-Delta-8-*trans*-Tetrahydrocannabinol ( $\Delta^8$ -THC, Abb. 3).

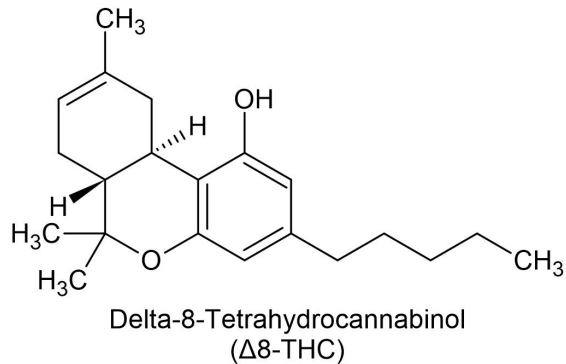


Abbildung 3: Chemische Struktur von  $\Delta^8$ -THC.

- **Cannabidiol (CBD) Typ:**

Bei Cannabinoiden dieses Typs ist die Pyran-Ringstruktur im Vergleich zu Tetrahydrocannabinolen geöffnet. Bekannte Vertreter sind Cannabidiol (CBD, Abb. 4) und Cannabidiolsäure (CBDA, Abb. 4) sowie deren Propyl-Analoga Cannabidivarin (CBDV, Abb. 5) und Cannabidivarinensäure (CBDVA, Abb. 5).

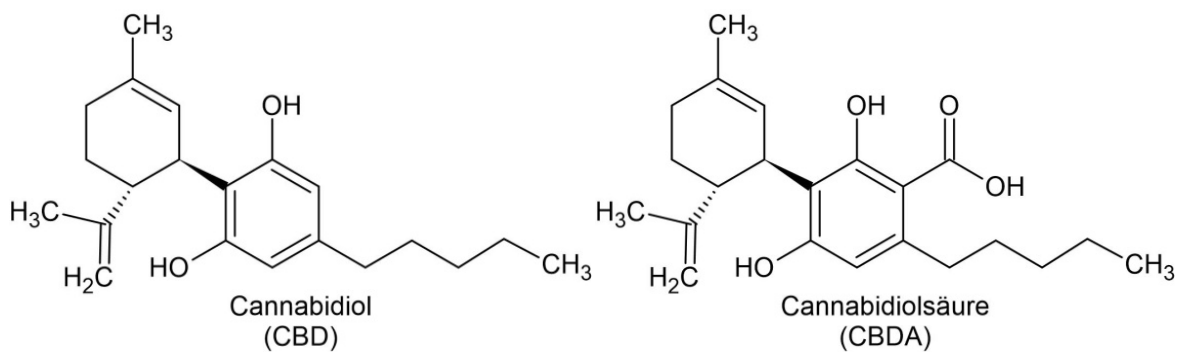


Abbildung 4: Chemische Strukturen von CBD und CBDA.

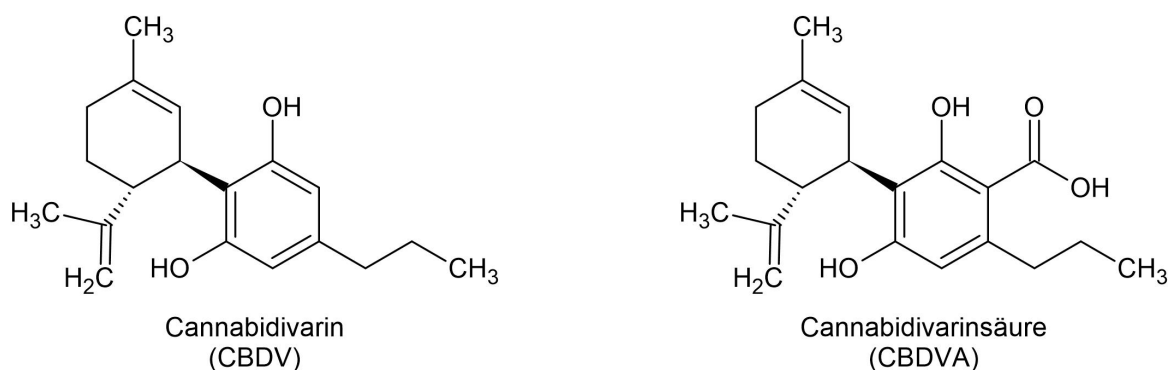


Abbildung 5: Chemische Strukturen von CBDV und CBDVA.

- **Cannabinol (CBN) Typ:**

Cannabinoide dieses Typs entstehen durch Oxidation von Tetrahydrocannabinolen. Bekannte Vertreter sind Cannabinol (CBN, Abb. 6) und dessen saure Vorstufe Cannabinolsäure (CBNA, Abb. 6).

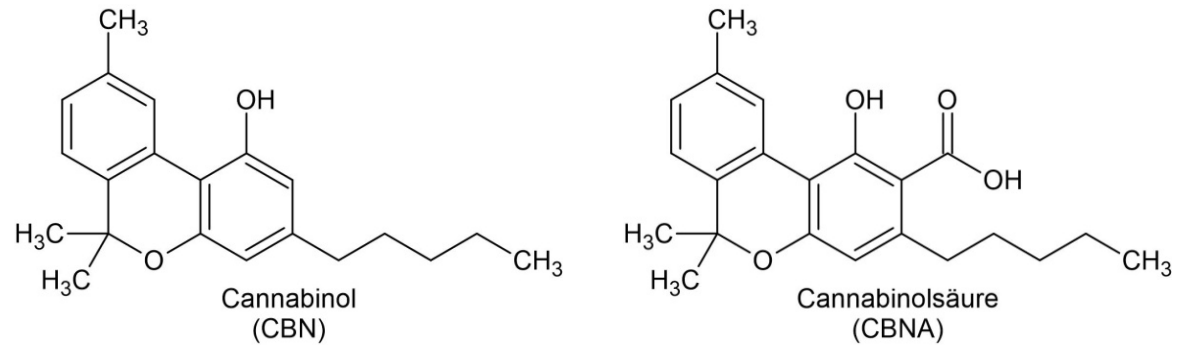


Abbildung 6: Chemische Strukturen von CBN und CBNA.

- **Cannabigerol (CBG) Typ:**

Cannabinoide dieses Typs weisen nur eine Ringstruktur auf. Beispiele sind Cannabigerol (CBG, Abb. 7) und Cannabigerolsäure (CBGA, Abb. 7).

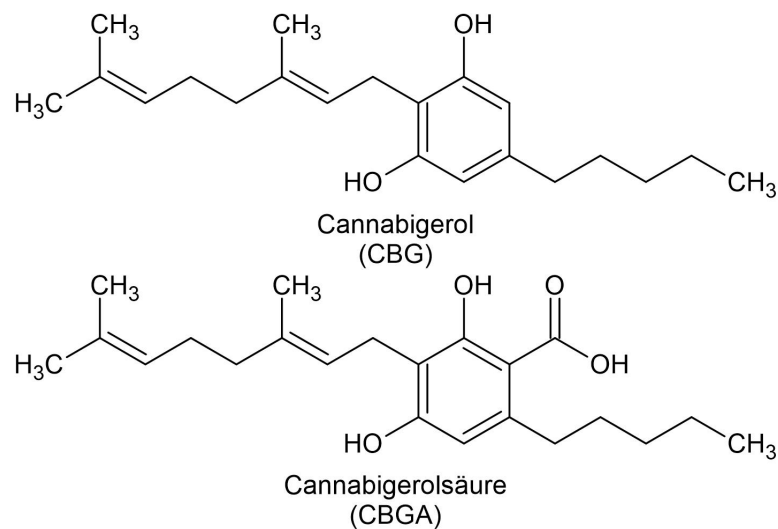


Abbildung 7: Chemische Strukturen von CBG und CBGA.

- **Cannabichromen (CBC) Typ:**

Cannabinoide dieses Typs weisen eine Chromenol- Struktur auf. Bekannte Vertreter sind Cannabichromen (CBC, Abb. 8) und Cannabichromensäure (CBCA, Abb. 8).



Abbildung 8: Chemische Strukturen von CBC und CBCA.

- **Cannabicyclol (CBL) Typ:**

Cannabinoide vom Cannabicyclol Typ entstehen unter Cyclisierung der Cannabichromen-Struktur [42]. Beispiele für diesen Typ sind Cannabicyclol (CBL, Abb. 9) und Cannabicyclolsäure (CBLA, Abb. 9).

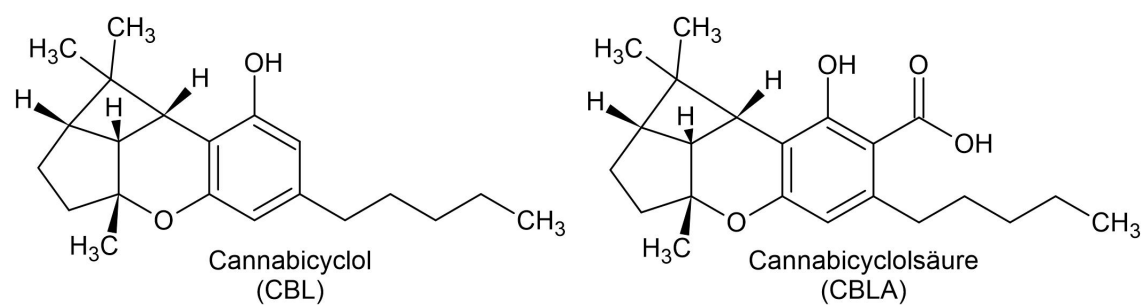


Abbildung 9: Chemische Strukturen von CBL und CBLA.

- **Weitere Cannabinoid-Typen:**

**Cannabinodiol (CBND) Typ** (Abb. 10): Bei diesem Typ handelt es sich um Derivate von Cannabidiol- oder Cannabidivarin-Strukturen mit aromatisiertem Ring.

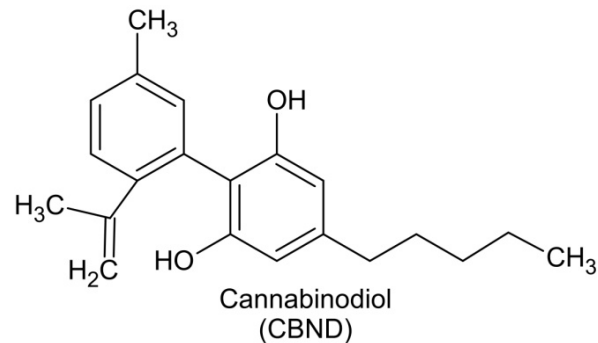


Abbildung 10: Chemische Struktur von Cannabinodiol (CBND).

**Cannabielsoin (CBE) Typ** (Abb. 11): Cannabinoide dieses Typs entstehen durch Photooxidation aus Cannabidiol- oder Cannabidiolsäure-Strukturen unter Ausbildung eines Furanringes mit der Hydroxygruppe an C<sub>1</sub> [43].

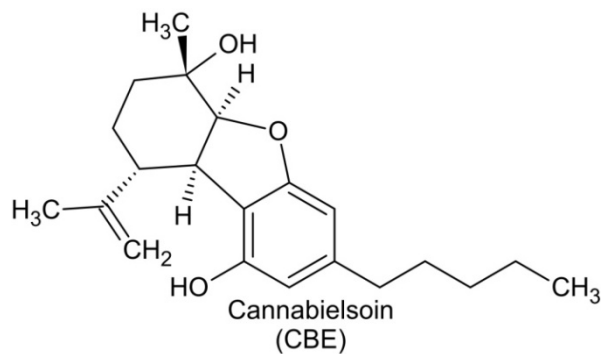


Abbildung 11: Chemische Struktur von Cannabielsoin (CBE).

**Cannabitriol (CBT) Typ** (Abb. 12): Cannabinoide dieses Typs weisen eine oder zwei zusätzliche Hydroxy-Gruppen an Position C<sub>8</sub> oder C<sub>10</sub> auf.

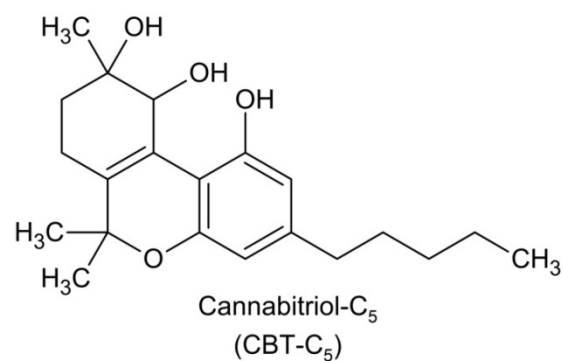


Abbildung 12: Chemische Struktur von Cannabitriol-C<sub>5</sub> (CBT-C<sub>5</sub>).

**Misch-Typ** mit diversen Strukturen

### **Terpene:**

Terpene sind eine weitere wichtige Inhaltsstoffklasse von Cannabis und bestimmen dessen Aroma. In der Literatur wurden bislang über 200 unterschiedliche Terpenverbindungen beschrieben. Häufig vorkommende Verbindungen sind Monoterpene wie Myrcen,  $\alpha$ -Pinen, Limonen und Linalool oder das Sesquiterpen  $\beta$ -Caryophyllen. Es wird vermutet, dass Terpene nicht nur eine eigene pharmakologische Wirkung besitzen, sondern auch die Wirkung der Phytocannabinoide beeinflussen. So soll  $\alpha$ -Pinen beispielsweise als Acetylcholinesterase-Hemmer dem Kurzzeitgedächtnis-Defizit durch THC Intoxikation entgegenwirken. [10]

### **Weitere Inhaltsstoffe:**

Weitere nicht-cannabinoide Inhaltsstoffklassen von Cannabis sind [36, 42]:

- Flavonoide
- Steroide
- Phenanthrene
- Fettsäuren
- Spiroindane
- Stickstoffverbindungen
- Xanthone
- Biphenyle
- Aminosäuren
- Glykoproteine, Proteine und Enzyme
- Zucker
- Kohlenwasserstoffe
- Alkohole, Ketone, Aldehyde und Säuren
- Ester und Laktone
- Non-cannabinoid Phenole
- Pigmente, Vitamine und Spurenelemente

### 3.1.3 Biogenese von Phytocannabinoiden

Die Biogenese von Cannabinoiden mit C<sub>5</sub>-Seitenketten erfolgt aus Cannabigerolsäure (CBGA). Diese wird unter Einwirkung der Cannabigerolsäure-Synthase aus Geranylpyrophosphat und Olivetolsäure gebildet (Abb. 13). Aus CBGA wiederum bilden sich unter Einfluss der Tetrahydrocannabinolsäure-Synthase (THCA-Synthase), Cannabidiolsäure-Synthase (CBDA-Synthase) oder Cannabichromensäure-Synthase (CBCA-Synthase) Tetrahydrocannabinolsäure (THCA), Cannabidiolsäure (CBDA) oder Cannabichromensäure (CBCA) [44]. THCA- und CBDA-Synthase sind dabei stereoselektiv und bilden ausschließlich (-)-THCA bzw (-)-CBDA. Die CBCA-Synthase hingegen bildet ein Gemisch aus (+)- und (-)-Enantiomeren im Verhältnis 5:1, wobei nicht bekannt ist, welches der beiden Enantiomere dominiert [45]. Unter nicht-enzymatischer Decarboxylierung, Isomerisierung oder weiteren Prozessen entstehen aus den sauren Vorstufen weitere Cannabinoide. Durch direkte Decarboxylierung von CBGA entsteht Cannabigerol (CBG) [44].

Die Vorläufersubstanz für Cannabinoide mit einer Propyl- statt Pentylseitenkette ist Cannabigerovarinsäure (CBGVA). Diese wird aus Divarinsäure und Geranylpyrophosphat gebildet. Analog zu CBGA wird aus CBGVA durch die oben beschriebenen Synthesen Tetrahydrocannabivarinsäure (THCVA), Cannabidivarinsäure (CBDVA) oder Cannabichromevarinsäure (CBCVA) gebildet. [44]

Je nach Chemotyp können in der Pflanze beispielsweise THCA oder CBDA dominieren, während andere Cannabinoide wie THCVA nur in geringen Konzentrationen vorkommen. Auch cannabinoidfreie Chemotypen können durch entsprechende Züchtung generiert werden. [3]

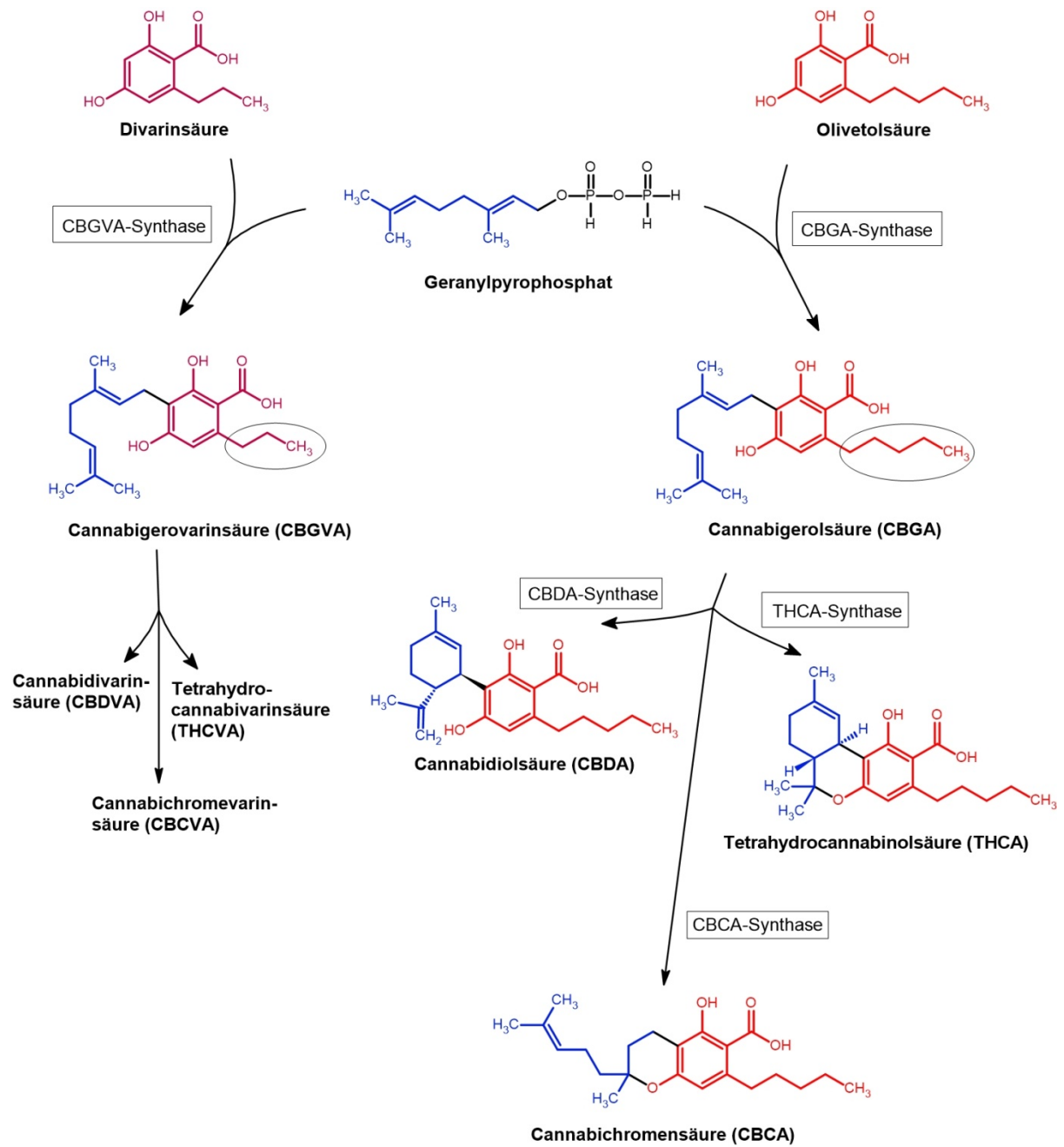


Abbildung 13: Biogenese verschiedener saurer Cannabinoide mit Pentyl- oder Propyl-Seitenkette aus Geranylpyrophosphat und Olivetolsäure bzw. Divarinsäure.

## 3.2 Pharmakokinetik von Cannabinoiden

### 3.2.1 Metabolismus von THC

#### **Absorption:**

Die häufigste Konsumart von Cannabis zu Rauschzwecken ist die inhalative Applikation, zum Beispiel in Form eines Joints. Sie ist gekennzeichnet von schneller Resorption des psychoaktiven Hauptwirkstoffs  $\Delta$ 9-THC ins Blut, raschem Anfluten im Gehirn und, im Vergleich zu oralem Konsum, guter Titrierbarkeit der Dosis [46]. In Studien war  $\Delta$ 9-THC bereits nach dem ersten Inhalationszug im Blut nachweisbar [47] und erreichte nach 3 – 10 Minuten maximale Plasmakonzentrationen, die nur geringfügig kleiner waren als nach intravenöser Applikation [47, 48]. Die Bioverfügbarkeit nach Rauchen wird auf 2 – 56 % im Vergleich zu intravenöser Applikation geschätzt [46]. Diese vergleichsweise große Spanne ergibt sich aus intra- und interindividuellen Unterschieden in Rauchdynamik und Dosisfreisetzung [49–51]: So hängt die aufgenommene Menge von THC stark von Dauer, Anzahl und Tiefe der Inhalationszüge, Verweildauer des Rauchs in der Lunge und Inhalationsvolumen ab [52–54] und variiert selbst bei automatisierter Freisetzung des Wirkstoffs [47]. Auch Erfahrung der konsumierenden Person und Erwartungshaltung bei Konsum scheinen die Bioverfügbarkeit zu beeinflussen [48, 55–57]. Pyrolyse, Verlust über den Seitenstromrauch und Verbleib von Wirkstoff im ungerauchten Ende des Joints mindern die tatsächlich applizierte Dosis von  $\Delta$ 9-THC [40].

Unter oraler Applikation erfolgen Resorption und Anflutung von THC, verglichen mit inhalativer Applikation, langsamer und ungleichmäßiger. THC-Höchstkonzentrationen sind geringer und werden frühestens nach ca. 1 – 2 h erreicht [40]. Auch der Eintritt pharmakodynamischer Effekte ist verzögert [58, 59]. Die orale Bioverfügbarkeit im Vergleich zu intravenöser Gabe wird auf 4 – 20 % geschätzt und unterliegt großen intra- und interindividuellen Schwankungen. Eine niedrige orale Verfügbarkeit im Vergleich zu inhalativer Applikation ist bedingt durch ggf. unvollständige Resorption und einen ausgeprägten First-Pass-Effekt, bei dem THC nach Resorption im Magen-Darm-Trakt zunächst über die Pfortader in die Leber gelangt und dort metabolisiert wird [46].

Weiterhin kann THC rektal, oromukosal, sublingual, transdermal oder intravenös verabreicht werden [40].

#### **Distribution:**

Durch seine hoch lipophilen Eigenschaften verteilt sich THC im Körper in mehreren Phasen. Nach (inhalativem) Konsum flutet es unter rapidem Abfall der Blutkonzentration zunächst schnell in gut durchbluteten Geweben wie Lunge, Herz, Gehirn und Leber an, verteilt sich

dann in schwächer durchblutete Gewebe und akkumuliert schließlich im Fettgewebe [40]. Erste THC Effekte traten in Studien bereits innerhalb weniger Minuten nach Konsum auf und hielten über 3 – 4 h an [60].

Im Blut liegt THC zu ca. 90 % in der Plasmafraktion, also dem zellfreien Anteil des Blutes, vor und ist dort zu 95 – 99 % an Plasma-Proteine, überwiegend Lipoproteine, gebunden. Nur ca. 10 % finden sich in Erythrozyten [46, 61–63]. Daher sind THC-Konzentrationen in Vollblut nur ca. halb so hoch wie Plasmakonzentrationen [46]. Das Verteilungsvolumen wird initial auf 2,5 – 3 Liter und im Steady State auf ca. 236 Liter geschätzt, was die gute Verteilung von THC im Gewebe verdeutlicht [40]. Über längere Zeit ist eine Rückverteilung aus dem Fettgewebedepot möglich, wo Fettsäuren stabile Konjugate mit THC bzw. seinem Metaboliten 11-OH-THC bilden [40, 64, 65].

### **Metabolismus:**

Die Metabolisierung von THC findet unter Beteiligung der Cytochrom P450 (CYP 450) Enzyme CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 hauptsächlich in der Leber, jedoch ebenfalls in anderen Geweben wie Gehirn, Lunge und Dünndarm statt [66, 67]. Hauptmetabolit von THC ist das psychoaktive 11-Hydroxy-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC oder THC-OH, Abb. 14), welches unter weiterer Oxidierung der Hydroxygruppe an Position C<sub>11</sub> in das inaktive 11-Nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH, Abb. 14) umgewandelt und schließlich als THC-COOH-Glucuronid ausgeschieden wird [46].

Weitere Metaboliten sind zum Beispiel 8 $\alpha$ - bzw. 8 $\beta$ -OH-THC [46]. Nach Rauchen betrug die 11-OH-THC Plasmakonzentration in Studien nur etwa 10 % der THC-Konzentration, während nach oralem Konsum ähnliche Konzentrationen von THC und THC-OH nachgewiesen wurden [68, 69]. Die Pharmakokinetiken von Frauen und Männern unterscheiden sich nicht signifikant [68]. Auch bei seltenen und häufigen Cannabiskonsumenten wurden kaum Unterschiede nachgewiesen, was darauf schließen lässt, dass bei Toleranzentwicklung von THC weniger eine pharmakokinetische als vielmehr eine pharmakodynamische Adaption stattfindet [61].

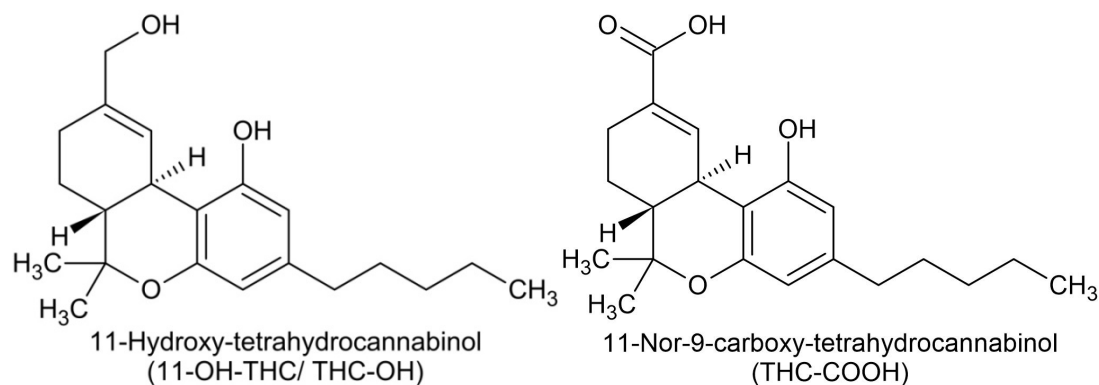


Abbildung 14: Chemische Strukturen von THC-OH und THC-COOH.

Abbildung 15 zeigt beispielhaft den mittleren Plasmakonzentrationsverlauf von THC, THC-OH und THC-COOH nach Rauchen eines Joints mit 33,8 mg THC (entsprechend 3,55 % THC) nach einer Studie von Huesties et al. [47]: THC Höchstkonzentrationen wurden noch vor Rauchende verzeichnet und fielen innerhalb von 20 – 30 Minuten rapide ab, während THC-OH und THC-COOH Höchstkonzentrationen kurz nach Rauchende bzw. nach ca. 110 Minuten auftraten. THC-OH Konzentrationen begannen nach ca. 20 Minuten abzufallen und waren stets geringer als die von THC. THC-COOH Konzentrationen hingegen überstiegen die von THC nach ca. 30 Minuten und bildeten ein nur langsam abflachendes Plateau.

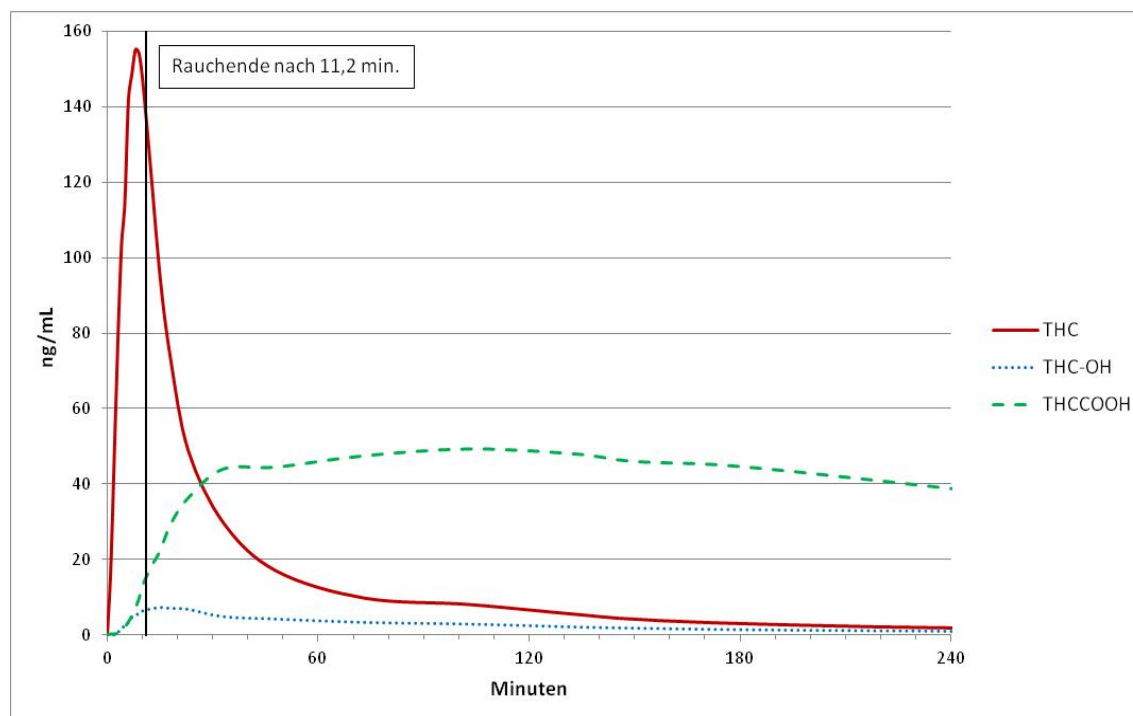


Abbildung 15: Mittlere Plasmaspiegel bei Konsum eines Joints mit 33,8 mg THC (Daten nach einer Studie von Huestis et al. [47]).

### **Elimination:**

Die Elimination von THC bzw. seiner Metaboliten verläuft nonlinear. Rückdiffusion aus dem Fettgewebe sowie Zirkulation im enterohepatischen Kreislauf, bei dem die Stoffe nach Aufnahme aus dem Blutkreislauf bzw. Darm zwischen Gallenblase, Darm und Leber zirkulieren, führen zu langen terminalen Plasmahalbwertszeiten von 25 – 36 h nach Einmalgabe und mehr als 4 Tagen bei chronischem Konsum von THC [40, 64, 68]. Für den Metaboliten THC-COOH wurden noch längere terminale Halbwertszeiten von 6,2 Tagen bzw. 5,2 Tagen nach gelegentlichem bzw. häufigem Konsum ermittelt [62]. THC wird zu 65 – 80 % über den Feces und zu 20 – 35 % über den Urin ausgeschieden. In Urin finden sich dabei eher saure Metaboliten, hauptsächlich THC-COOH-Glucuronid, und in Feces überwiegend THC-OH [61, 68, 70].

### **3.2.2 Metabolismus weiterer Cannabinoide**

Der Metabolismus von CBD wird in der Literatur als ähnlich zu dem von THC beschrieben und ist ebenso individuell unterschiedlich. Dabei wird CBD vorrangig an C<sub>11</sub>, jedoch ebenfalls an der Seitenkette zur Hydroxy- bzw. Carboxyform oxidiert [49, 71]. Es unterliegt, genau wie THC, dem First-Pass-Effekt, wird aber im Gegensatz zu letzterem größtenteils unverändert im Feces ausgeschieden [46]. Die Bioverfügbarkeit von CBD beträgt beim Rauchen im Mittel 31 % verglichen mit intravenöser Gabe [72]. Die Frage, ob CBD den Metabolismus von THC bei gleichzeitiger Gabe beeinträchtigt, wird unterschiedlich beantwortet [46, 73, 74]. In einer Studie wurden bei simultaner sublingualer Verabreichung gleicher Dosen beider Stoffe für CBD niedrigere Plasma-Spitzenkonzentrationen erreicht als für THC [74].

Auch der Metabolismus von CBN ist dem von THC ähnlich. Es wird ebenfalls an C<sub>11</sub> hydroxyliert. Die Metabolisierung erfolgt jedoch aufgrund des aromatischen Ringes langsamer und weniger ausführlich. Die mittlere Bioverfügbarkeit liegt beim Rauchen bei 41 % im Vergleich zu intravenöser Applikation. [46]

Der Metabolismus von THCAA wird in der Literatur ebenfalls als ähnlich zu dem von THC beschrieben [75]: Hauptmetaboliten sind unter anderem 11-OH-THCAA, THCAA-COOH und deren Glucuronide. In einer Studie lag die orale Bioverfügbarkeit von THCAA bei durchschnittlich 41 % im Vergleich zu intravenöser Applikation und damit höher als die von THC. Halbwertszeiten beider Substanzen liegen in ähnlichen Bereichen [75].

## **3.3 Pharmakodynamik von Cannabinoiden**

Als Cannabinoide bezeichnet man Substanzen, die an Cannabinoidrezeptoren binden [38]. Neben den bereits beschriebenen Phytocannabinoiden sowie synthetisch hergestellten Cannabinoiden existieren zudem Endocannabinoiden, die vom Körper selbst produziert werden.

### 3.3.1 Das Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem bezeichnet ein komplexes System im Körper, welches aus verschiedenen Cannabinoid-Rezeptoren, deren endogen produzierten Liganden und den für Endocannabinoid-Synthese und -Abbau zuständigen Enzymen besteht. Das System ist an vielen verschiedenen Regelkreisläufen in Gehirn, Haut, Verdauungstrakt, Leber, kardiovaskulärem System und anderen Bereichen beteiligt und beeinflusst dort vielfältige Prozesse wie Schmerzverarbeitung, Motorik, Nahrungsaufnahme, Entzündungsprozesse, Apoptose, Modulation von Emotionen oder Lernprozesse. [76]

Endocannabinoide sind Derivate der Arachidonsäure. Das erste Endocannabinoid Arachidonylethanolamid, auch als Anandamid bezeichnet (Abb. 16), wurde 1992 isoliert. Weitere Strukturaufklärungen wie die von 2-Arachidonylglycerol (Abb. 16) oder N-Arachidonyldopamin folgten. [76]

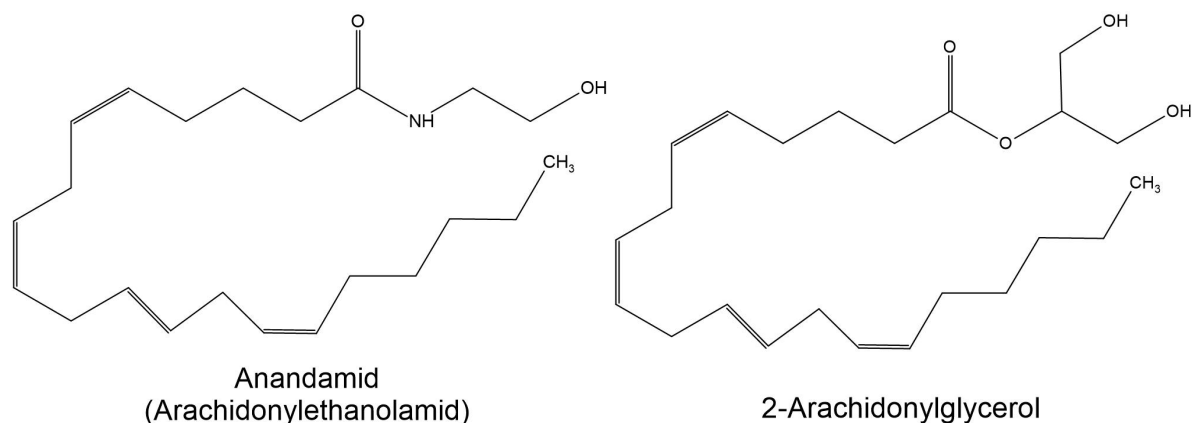


Abbildung 16: Chemische Strukturen der endogenen Cannabinoide Anandamid und 2-Arachidonylglycerol.

Wirkorte der (Endo-) Cannabinoide sind Cannabinoidrezeptoren (CBR). Bisher sind zwei Rezeptoren bekannt: Der CB<sub>1</sub>-Rezeptor ist überwiegend im zentralen Nervensystem exprimiert, während der CB<sub>2</sub>-Rezeptor sich vorwiegend auf Zellen des Immunsystems befindet. Beide Rezeptoren sind G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die bei Aktivierung eine Hemmung der Adenylatcyclase hervorrufen und mitogenaktivierte Proteinkinasen aktivieren. Als weitere Targets (endogener) Cannabinoide werden in der Literatur unter anderem verschiedene nichtselektive Kationenkanäle (Transient Receptor Potential Vailloid, TRPV) oder der Orphan-Rezeptor GPR55 (Rezeptor ohne bekannte Liganden oder physiologische Funktion) beschrieben. [76]

Die Affinität und Wirkung von (endogenen) Cannabinoiden an den Rezeptoren ist unterschiedlich. THC beispielsweise wirkt unter anderem als Partialagonist an CB<sub>1</sub>R und CB<sub>2</sub>R [77]. Neben seiner (toxischen) psychotropen Wirkung, aus der sich beispielsweise

Halluzinationen und Panikattacken ergeben können, besitzt THC unter anderem auch analgetische, krampflösende, appetitanregende und muskelrelaxierende Eigenschaften. CBD dagegen ist zwar psychoaktiv, wirkt jedoch nicht toxisch, sondern vielmehr antikonvulsiv, anxiolytisch, antiemetisch und analgetisch [10]. In Studien zeigte es unter anderem Anzeichen von inversem Agonismus an CB<sub>1</sub>R [78]. Obgleich noch wenig erforscht, besitzen auch seltene, also oft nur in geringen Konzentrationen in der Pflanze vorkommende Cannabinoide pharmakologische Wirkungen. Cannabigerol (CBG), beispielsweise, ein schwacher Partialagonist an CB<sub>1</sub>R und CB<sub>2</sub>R, ist unter anderem antimykotisch, analgetisch und besitzt, in hohen Dosen eingesetzt, zytotoxische Eigenschaften in epithelialen Karzinomen [10].

### **3.3.2 Typische Wirkungen von Cannabis**

Typische Wirkungen von Cannabis werden in der Literatur umfangreich beschrieben [9, 40, 79]. Als Rauschmittel ist es insbesondere beliebt aufgrund seiner psychotropen Wirkung, welche über den CB<sub>1</sub>R vermittelt wird [76]. Es treten Effekte wie Euphorie, Halluzinationen, gesteigerte Kreativität, veränderte Wahrnehmung, Sedation, Entspannung und verändertes Körpergefühl auf [9, 40]. Medizinisch wird Cannabis vor allem aufgrund seiner analgetischen, appetitanregenden, antiemetischen, antikonvulsiven und muskelrelaxierenden Effekte eingesetzt.

Zu den unerwünschten Wirkungen von Cannabis zählen unter anderem Dysphorie, Angst und Panikattacken, Tachykardie, verminderte Speichelproduktion, fragmentiertes Denken, Verwirrung, Übelkeit, gestörte Psychomotorik und eingeschränkte Gedächtnisfunktion [40]. Als dauerhafte Folgen des Konsums werden die Entwicklung einer Abhängigkeit und bei Rauchkonsum die Schädigung von Atemwegen und Lunge beschrieben. Zudem gibt es Hinweise, dass regelmäßiger Cannabiskonsum die Aufmerksamkeit, Denkfähigkeit und Gedächtnisleistung beeinflusst und das Risiko für Schizophrenie, Psychosen, Depressionen oder Angststörungen erhöht. Besonders gefährdet sind demnach junge Konsumenten, also Kinder und Jugendliche, bei denen die neuronale Vernetzung im Gehirn noch nicht abgeschlossen ist [9].

### **3.3.3 Der Entourage-Effekt**

Es existieren zahlreiche Hinweise auf synergistische Effekte („Entourage-Effekte“) zwischen verschiedenen Cannabinoiden oder Terpenen und Cannabinoiden. Beispielsweise antagonisierte CBD in Studien in Anwesenheit von THC den CB<sub>1</sub>-Rezeptor und ist wahrscheinlich in der Lage, unerwünschte Wirkungen von THC wie fragmentiertes Denken, Angst oder Tachykardie abzumildern. [10]

### 3.4 Cannabis als Rauschdroge

Cannabis ist seit Jahrzehnten die am häufigsten konsumierte illegale Droge weltweit, und wachsende Konsumtrends werden verzeichnet. Das United Nations Office on Drugs and Crime (UNDOC) schätzte die Zahl derer, die mindestens einmal Cannabis konsumiert hatten, für das Jahr 2018 auf rund 192 Million, besonders häufig darunter Kinder und junge Erwachsene zwischen 12 und 34 Jahren [1, 2, 80]. Ebenfalls wird über die letzten Jahre europaweit ein steigender Trend für den THC-Gehalt in Cannabis verzeichnet [81]. So verdoppelte sich der durchschnittliche THC-Gehalt laut Freeman et al. von 5 % in 2006 auf mehr als 10 % in 2016. Auch global wurde über die Jahre 1970 bis 2009 ein THC-Konzentrationsanstieg in Cannabiskraut von ca. 0,2 % pro Jahr verzeichnet [82]. Diese Trends sind unter anderem durch Fortschritte in Kultivierung, Züchtung und Extraktion der Pflanze und steigender Nachfrage an unbefruchteten, weiblichen Blüten mit besonders hohen Harzanteilen („Sinsemilla“) zu erklären [80, 83]. Laut dem Drogenbericht der Europäischen Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EMCDDA) ist Cannabisharz heutzutage mit 13 – 24 % THC fast doppelt so potent wie Cannabiskraut (9 – 12 % THC). In 2017 stand mehr als die Hälfte aller registrierten Drogendelikte in der EU in Zusammenhang mit Cannabis [80].

Cannabis nimmt aufgrund seiner Bedeutung als Rausch- und Arzneimittel im Betäubungsmittelgesetz (BTMG) [84] eine Sonderstellung ein. Als Bestandteil der Anlage I ist es nicht verkehrs- und verschreibungsfähig. Anbau, Herstellung, Handel, Ein- und Ausfuhr, Abgabe, Veräußerung, in Verkehr bringen und Erwerb von Cannabis (-produkten) sind damit verboten. Ausgenommen von der Regelung sind Cannabissamen bestimmter in der EU zugelassener Sorten mit  $\leq 0,2$  % THC, wenn der Verkehr ausschließlich gewerblichen oder wissenschaftlichen Zwecken dient. Auch einige Delta-9-Tetrahydrocannabinole sind in Anlage I aufgeführt. Als Bestandteil der Anlage III ist Cannabis verkehrs- und verschreibungsfähig, wenn der Anbau medizinische Zwecke hat und staatlich kontrolliert wird. Delta-9-THC taucht daneben als verkehrsfähiger aber nicht verschreibungsfähiger Ausgangsstoff zur Herstellung cannabisbasierter Medikamente in Anlage II auf. [84]

Gewöhnlicherweise werden bei Cannabis die getrockneten, besonders harzhaltigen Blüten und blütenstandsnahen Blätter (Marihuana) oder das gepresste Harz (Haschisch) sowie teilweise auch Haschischöl, also ein öliger Cannabisextrakt, konsumiert [85]. Die Aufnahme erfolgt hauptsächlich inhalativ durch Rauchen der reinen Substanzen oder als Gemisch mit Tabak, sowie per Vaporisation, bei welcher die Inhaltsstoffe durch einen heißen Luftstrom aus dem Material gelöst werden. Auch eine orale Aufnahme in Form von Gebäck oder Tee ist unter Konsumenten beliebt.

### **3.5 Cannabis als Arzneimittel**

Neben seiner Anwendung als Rauschmittel hat Cannabis eine Jahrtausende alte Historie als Therapeutikum. Erste Aufzeichnungen über den medizinischen Gebrauch der Pflanze werden auf ca. 2700 v. Chr. datiert und stammen aus einem chinesischen Arzneibuch des Kaisers Shen-Nung. Dort wurde Cannabis unter anderem eine lindernde Wirkung bei Obstipation, Malaria und Rheuma zugeschrieben [23]. Auch in vielen anderen Kulturen wie Japan, Tibet oder Ägypten ist die medizinische Verwendung der Pflanze schriftlich dokumentiert [28]. In Europa erlangte Cannabis besonders in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts zunehmende Popularität und wurde zum Beispiel in Form von Tinkturen zur Symptomlinderung und Behandlung von Schmerzen, Krämpfen, Depressionen, Übelkeit oder Schlafstörungen eingesetzt. Schwankende Qualität von Cannabis-Arzneimitteln und die Entwicklung synthetischer, spezifischer wirkender Arzneimittel wie Acetylsalicylsäure oder Barbituraten führten Anfang des 20. Jahrhunderts jedoch dazu, dass Cannabis immer seltener verwendet wurde. Aufgrund seiner Rauschwirkung wurde es schließlich 1961 in der UN-Konvention gegen narkotische Suchtmittel als Betäubungsmittel strenger staatlicher Kontrolle unterstellt und seine Anwendung mit wenigen Ausnahmen verboten [9, 28]. Mit der Entdeckung des Endocannabinoidsystems und der Isolierung verschiedener Cannabinoide, darunter 1964 THC, ist das Interesse an der therapeutischen Verwendung von Cannabis in den letzten Jahrzehnten erneut gestiegen.

#### **3.5.1 Gesicherte Indikationen und weitere Anwendungsgebiete**

In der Vergangenheit haben Studien vor allem das pharmakologische und therapeutische Potential von THC und CBD untersucht. Laut Literatur [86] gelten positive Effekte der Substanzen als gesichert bei:

- chronischen Schmerzen
- Anorexie und Essstörungen
- Spastik bei Multipler Sklerose
- Epilepsie

Weiterhin werden unter anderem neuroprotektive, antiinflammatorische und immunmodulierende, antikanzerogene, anxiolytische und antipsychotische Effekte von Cannabis sowie ein Nutzen bei Glaukomen oder Schlafstörungen diskutiert [87–94]. Allerdings steht die Forschung hier noch am Anfang, und es sind weitere Studien nötig, um diese Effekte wissenschaftlich zu belegen. Auch in Bezug auf die therapeutischen Effekte anderer (seltener) Cannabinoide und deren Synergie untereinander oder in Kombination mit Terpenen besteht weiterer Forschungsbedarf.

### 3.5.2 Rechtslage

Ein bedeutendes Ereignis der jüngeren Geschichte der cannabisbasierten Therapie in Deutschland war die Verabschiedung des Gesetzes zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften (BT-DS 18/8965) in 2017 [95]. Vor der Gesetzesänderung war es schwerkranken und austerapierten Patienten in Ausnahmefällen gestattet, Cannabis in Medizinalqualität in der Apotheke zu erwerben. Die Kosten von ca. 450 – 540 € pro Monat bzw. 15 – 18 € pro Gramm Cannabis waren jedoch nicht durch gesetzliche Krankenkassen erstattungsfähig und mussten privat getragen werden. Anträge der Patienten auf eine Erlaubnis zum Eigenanbau von Cannabis wurden vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) abgelehnt. Nach Klagen betroffener Patienten gegen diese Entscheidung wurde das BfArM im Juli 2014 vom Verwaltungsgericht Köln dazu verurteilt, neu über die Anträge einiger Patienten zu entscheiden, da durch ein Versagen der Erlaubnis die Grundrechte der Patienten verletzt würden [96–98].

Als Konsequenz aus diesem Urteil wurde im Januar 2017 das Gesetz zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften [95] verabschiedet. Das Gesetz besagt, dass nicht-arzneimittelrechtlich zugelassene Cannabisblüten und -extrakte in Medizinalqualität verschreibungsfähig sind und in der Regel durch gesetzliche Krankenkassen erstattet werden müssen. Weiterhin sieht es vor, dass cannabisbasierte Fertigarzneimittel auch bei Verschreibung außerhalb ihrer zugelassenen Indikation (Off-Label-Use) erstattungsfähig sind. Cannabisblüten oder -extrakte sowie die Wirkstoffe Dronabinol (reines (-)-Delta-9-*trans*-Tetrahydrocannabinol) und Nabilon (ein  $\Delta$ 9-THC Analogon) können schwerkranken Versicherten demnach verordnet werden, wenn keine andere geeignete Therapieoption verfügbar ist, und die Therapie mit Cannabis-Arzneimitteln den Krankheitsverlauf oder schwere Symptome positiv beeinflussen könnte [95]. Dabei sind die möglichen Indikationen für eine solche Therapie nicht konkretisiert, sodass es der Einschätzung des jeweiligen behandelnden Arztes obliegt, ob ein Therapieversuch sinnvoll erscheint. Die Betäubungsmittelverschreibungsverordnung sieht eine Höchstmenge von 100 mg getrockneten Medizinalcannabisblüten pro Monat vor [99].

### 3.5.3 Cannabisbasierte Arzneimittel

Folgende cannabisbasierte Arzneimittel stehen aktuell in Deutschland für eine Therapie zur Verfügung:

- **Δ9-THC/ Dronabinol:** Bei Dronabinol handelt es sich um reines (-)-Delta-9-*trans*-Tetrahydrocannabinol (THC). In Deutschland ist es als Rezeptursubstanz verfügbar, die zur Herstellung verschiedener Zubereitungen eingesetzt wird. Dazu gehören:
  - o Dronabinol-Kapseln mit 2,5, 5 oder 10 mg Dronabinol (Neues Rezeptur-Formularium (NRF) 22.7) [100]
  - o Ölige Dronabinol-Tropfen 25 mg/mL (NRF 22.8) [101]
  - o Ölige Cannabisölharz-Lösung 25 mg/mL Dronabinol (NRF 22.11) [102]
  - o Ethanolische Dronabinol-Lösung 10 mg/mL zur Inhalation (NRF 22.16) [103]

Hauptsächlich wird Dronabinol bei Anorexie und Kachexie, z.B. bei AIDS Patienten, bei Übelkeit und Erbrechen infolge von Chemotherapie oder als Muskelrelaxans und Analgetikum bei Multipler Sklerose oder neuropathischem Schmerz eingesetzt [102]. Der Hersteller THC-Pharm gewinnt den Wirkstoff partialsynthetisch, während die Firma Bionorica ethics Dronabinol direkt aus österreichischem Medizinalhanf extrahiert [20, 21]. In den USA ist Dronabinol als Fertigarzneimittel in Form von Marinol® Kapseln oder als Syndros® Lösung zur oralen Einnahme im Handel.

- **Nabiximols (Sativex® Spray):** Sativex® ist ein oromukosal appliziertes Spray. Es enthält ein Gemisch aus zwei auf THC bzw. CBD standardisierten ethanolischen Cannabis Pflanzenextrakten („Tetranabinex®“ und „Nabidiolex®“) im Verhältnis von 1,1 zu 1 [19]. Die zur Herstellung verwendeten Cannabispflanzen stammen aus einem kontrollierten Umfeld und werden vegetativ über Stecklinge vermehrt [104]. Sativex® ist indiziert als Add-on Therapeutikum bei mittelschwerer bis schwerer Spastik durch Multiple Sklerose, wenn andere Therapien nicht angemessen ansprechen [105].
- **Nabilon (Canemes® Kapseln):** Nabilon ist ein synthetisches THC-Analogon. Die Wirkung von 1 mg Nabilon entspricht dabei der Wirkung von 7 – 8 mg THC. Canemes® Kapseln sind zugelassen für die Behandlung von Übelkeit und Erbrechen bei Chemotherapie für Erwachsene, wenn andere antiemetische Therapien nicht adäquat ansprechen. [106]
- **Medizinalcannabisblüten** (Blütenstände weiblicher Pflanzen): Medizinalcannabispflanzen werden in einem kontrollierten Umfeld kultiviert. Während Pflanzen zur Gewinnung von Reinsubstanzen wie Dronabinol häufig aus dem kostengünstigeren Feldanbau stammen, werden Pflanzen zur Gewinnung von Medizinalcannabisblüten gewöhnlicherweise in geschlossenen Räumen oder Gewächshäusern angebaut. Um das Inhaltsstoffspektrum der Pflanzen möglichst

konstant zu halten, sind Wasser- und Nährstoffzufuhr sowie Temperatur- und Lichtverhältnisse dort genau geregelt. Die Vermehrung von Medizinalcannabispflanzen findet meist vegetativ über Kultivierung von Stecklingen einer Mutterpflanze statt, um die Genetik der Pflanze möglichst konstant zu halten [107, 108]. Derzeit sind verschiedene THC- oder CBD-dominante Cannabisblüten mit bis zu 25,7 % THC (Sorte Peace Naturals 24/1) oder bis zu 17 % CBD (Sorte Cannabis Flos 1/17 IMC) verfügbar. Daneben sind Mischvarietäten mit moderaten Konzentrationen an THC und CBD, wie z.B. Cannabis Flos 7/9 IMC mit 7 % THC und 9 % CBD erhältlich. Medizinalcannabisblüten können von Patienten bei einer Apotheke als ganze Blüten oder in Einzeldosen abgeteilt bezogen werden. Die meisten Blüten werden aus Kanada oder den Niederlanden importiert, jedoch mittlerweile auch in Deutschland angebaut [14]. Das Neue Rezeptur-Formularium (NRF) sieht eine Einnahme als Teezubereitung (NRF 22.14., als Einzeldosen verpackt in NRF 22.15. [109, 110]) oder zur Inhalation nach Verdampfung (NRF 22.12., als Einzeldosen in NRF 22.13. [111, 112]) vor.

- **Medizinalcannabisextrakte:** Es handelt sich um ölige Vollspektrum-Extrakte zur oralen Anwendung, die THC und CBD in verschiedenen Verhältnissen sowie weitere Cannabinoide, Terpene und Flavonoide enthalten. Die Extrakte werden in der Regel vorbehandelt, sodass die sauren Cannabinoidvorstufen zu ihren neutralen Formen decarboxylieren. [113]
- **Cannabidiol (CBD):** Reines CBD ist in der Europäischen Union als Fertigarzneimittel Epidyolex® seit 2019 zugelassen. Dabei handelt es sich um eine ethanolische Lösung zum Einnehmen, die 100 mg CBD pro 1 mL Lösung enthält. Epidyolex® ist zugelassen als Adjuvant zusammen mit Clobazam bei Krampfanfällen im Zusammenhang mit verschiedenen Epilepsieformen (Lenox-Gastaut-Syndrom oder Dravet-Syndrom) bei Patienten ab 2 Jahren [114]. Neben dem Fertigarzneimittel ist im NRF eine Rezeptur für ölige Cannabidiol-Lösung zum Einnehmen in der Konzentration von 50, 100, 200 oder 400 mg/mL beschrieben. Als mögliche Indikationen werden Epilepsie, Schwindel, Angstzustände, Erbrechen, Schizophrenie, bestimmte Nervenentzündungen sowie neurodegenerative oder Krebs-Erkrankungen genannt [115].

Die Zahl von Verschreibungen cannabisbasierter Arzneimittel ist in den letzten Jahren stetig gestiegen [11–13]. Für das Jahr 2020 lag sie bei rund 340.000 Verordnungen. Am häufigsten wurden dabei cannabinoidhaltige Stoffe oder Fertigarzneimittel in Zubereitungen (also überwiegend Dronabinol-Rezepturen), Medizinalcannabisblüten und Sativex® verordnet [13].

### 3.6 Cannabis im Straßenverkehr

Kognition, Kurzzeitgedächtnis, psychomotorische Funktionen und Impulskontrolle sind durch die Intoxikation mit THC beeinträchtigt, und es kommt zu einer verminderten Aufmerksamkeits- und Reaktionsfähigkeit [5–7]. Auch wenn bisher keine klaren Dosis-Wirkungsbeziehungen definiert werden konnten, waren die Beeinträchtigungen in Studien stets umso gravierender, je mehr THC konsumiert wurde [116]. Das Unfallrisiko nach engfristigem Konsum ist laut Literatur mindestens verdoppelt [4, 117]. Damit stellt die Teilnahme am Straßenverkehr unter Einfluss von THC ein bedeutendes Sicherheitsrisiko dar und ist, je nach Tatbestand, ordnungswidrig oder eine Straftat.

Das Führen eines Kraftfahrzeugs mit THC Serum Spiegeln ab 1,0 ng/mL ist nach § 24a Absatz 2 des Straßenverkehrsgesetzes (STVG) ordnungswidrig und wird mit einer Geldbuße, Punkten im Fahreignungsregister des Kraftfahrt-Bundesamtes und Fahrverbot geahndet [8, 118]. Dabei ist der Grenzwert von 1,0 ng/mL kein Wert, ab dem per se eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit zu erwarten ist, sondern vielmehr eine analytische Quantifizierungsgrenze, die auf einer Empfehlung der Grenzwertkommission vom 20.11.2002 beruht [119]. Werden zusätzlich zum Nachweis von THC Fahrfehler oder (cannabisbedingte) Ausfallerscheinungen festgestellt, die darauf hinweisen, dass das Fahrzeug nicht sicher geführt wurde, liegt eine Straftat nach § 316 oder § 315c des Strafgesetzbuches (StGB) vor [120, 121]. Je nach Ausmaß der Gefährdung wird die Straftat mit Führerscheinentzug und einer Geldstrafe oder Haftstrafe von bis zu einem Jahr bzw. bis zu 5 Jahren geahndet.

Der bestimmungsgemäße Gebrauch von Arzneimitteln ist von der in Absatz 2 des § 24a StVG beschriebenen Regelung ausgenommen. Eine Teilnahme am Straßenverkehr unter Therapie mit cannabisbasierten Arzneimitteln (inklusive Medizinalcannabis) ist somit nicht ordnungswidrig, solange keine Ausfallerscheinungen vorliegen. Patienten unter Cannabismedikation müssen dazu vor Fahrantritt sorgfältig prüfen, ob sie in der Lage sind, das Fahrzeug sicher zu führen [15].

Trotz dieser Ausnahme ordnen Führerscheinbehörden nach Verkehrskontrollen von Cannabispatienten mit positivem THC-Nachweis teilweise Medizinisch-Psychologische Untersuchungen an, um die generelle Fahreignung zu begutachten. Diese ist nach Punkt 9.2 und 9.3 der Anlage 4 der Fahrerlaubnisverordnung (FeV) [122] bei regelmäßigem (und teilweise auch gelegentlichem) Konsum von Cannabis eigentlich ausgeschlossen. Eine Medizinisch-Psychologische Untersuchung wird herangezogen, um anhand von Kriterien wie Behandlungscompliance, psychophysischer Leistungsfähigkeit, Toleranz und Risiko von zusätzlichem Freizeitkonsum bzw. Cannabis-Missbrauch zu prüfen, ob der Patient dennoch eine generelle Fahreignung aufweist [15]. Eine Herausforderung besteht hierbei darin, die

Einnahme cannabisbasierter Medikamente und (zusätzlichen) Freizeitkonsum von Cannabis zu unterscheiden, da in beiden Fällen THC aufgenommen wird.

### 3.7 Marker für verschiedene Cannabisprodukte – Aktueller Stand der Literatur

In der Literatur existieren bereits einige Vorschläge für (Konsum-) Marker verschiedener Cannabisprodukte:

- **Oraler/ oromukosaler Konsum:** Nadulski et al. und Karschner et al. haben erhöhte Konzentrationen des THC-Metaboliten THC-OH mit THC-OH/THC Quotienten  $> 1$  nach oralem bzw. oromukosalem Konsum von THC im Unterschied zu inhalativem Konsum beobachtet. Dies wird dadurch erklärt, dass THC bei oralem oder oromukosalem Konsum dem First-Pass-Effekt unterliegt und im Vergleich zu inhalativem (Rauch-) Konsum mehr THC-OH gebildet wird. [69, 123]
- **Sativex®:** Als Charakteristikum bzw. Konsummarker für Sativex® wird in der Literatur ein spezifisches CBD/THC Verhältnis beschrieben, da die beiden Stoffe, anders als z.B. in gängigen Straßencannabissorten, in Sativex® im Verhältnis von ca. 1:1 vorliegen [124]. In Studien lagen CBD/THC Verhältnisse nach Sativex®-Konsum in Plasma zwischen 0,6 und 1,1 und in Speichel zwischen 0,8 und 1,3 [74, 125].
- **Straßencannabiskonsum:** In der Literatur wird der Nachweis von Cannabinoiden wie Delta-9-Tetrahydrocannabinolsäure A (THCAA), Tetrahydrocannabivarinsäure (THCVA) oder Tetrahydrocannabivarin (THCV) in biologischen Proben als Marker für den Konsum von illegalen Cannabisprodukten vorgeschlagen, beispielsweise in Abgrenzung zur Einnahme reiner Delta-9-THC basierter Arzneimitteln wie Marinol® [16–18].
- **Medizinalcannabis:** Hinweise darauf, dass sich bestimmte Medizinal- und Straßencannabissorten signifikant unterscheiden könnten, gibt eine Studie von Hazekamp und Fishedick [22]. Dort wurden bei einem Vergleich von Cannabinoid- und Terpenprofilen verschiedener Medizinal- und Straßencannabissorten signifikante Unterschiede zwischen der Medizinalcannabissorte Bedrocan® und anderen Medizinal- und Straßencannabisvarietäten festgestellt. Bedrocan® wies dabei höhere THC-Gehalte und ein anderes Terpenprofil auf als die Vergleichssorten. [22]

### **3.8 Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)**

Cannabinoidprofile von Stoff- und Serumproben wurden in dieser Arbeit durch Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) untersucht. Hierbei handelt es sich um eine hochsensitive Methode, mittels derer Analyten in einem Substanzgemisch aufgetrennt und anhand ihres spezifischen Masse/Ladungsverhältnisses quantifiziert werden können. Das Verfahren ist in zahlreicher Literatur ausführlich beschrieben [126–128]. An dieser Stelle sollen die wichtigsten Zusammenhänge kurz erläutert werden.

Das Trennprinzip der Flüssigchromatographie basiert auf unterschiedlichen molekularen Eigenschaften verschiedener Analyten. Diese werden als Gemisch in einem flüssigen Eluentenstrom (mobile Phase) durch eine stationäre (feste) Phase geleitet, die häufig aus einer Säule mit gepacktem, modifiziertem oder nicht modifiziertem Silikagel besteht und eine hohe Oberfläche aufweist. Die Auftrennung erfolgt dadurch, dass die Analyten eine unterschiedliche Affinität zur stationären Phase aufweisen und von der mobilen Phase entsprechend verschieden schnell weitergeleitet werden. Wenig oder nicht affine Analyten verlassen die stationäre Phase dabei früher als solche, die lange an der stationären Phase haften. Zur Auftrennung der lipophilen Cannabinoide wurde in dieser Arbeit eine stationäre Phase mit modifiziertem Silikagel genutzt, welches an seiner Oberfläche mit apolaren C18-Ketten versehen ist (Reversed-phase chromatography).

Die Detektion und Quantifizierung der einzelnen Analyten im Eluentenstrom erfolgte in dieser Arbeit durch Tandem-Massenspektrometrie. Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren, das die Auftrennung, Identifizierung und Quantifizierung von Analyten anhand ihres Masse-zu-Ladung-Verhältnisses ermöglicht. Ein Massenspektrometer besteht klassischerweise aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor.

In der Ionenquelle wird die mobile Phase nach Passage der Säule zunächst in die Gasphase überführt, und die Analyten werden ionisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu die Elektrosprayionisation (ESI) eingesetzt, bei der der flüssige Eluentenstrom über eine temperierte Kapillare zerstäubt wird, an deren Spitze ein hohes elektrisches Potential angelegt ist. Aus der Zerstäubung entsteht ein feines Aerosol mit geladenen Tröpfchen, die über einen Trägergasstrom, meist Stickstoff, durch verschiedene Fokussierungsvorrichtungen weitergeleitet und verkleinert werden, bis nur noch überwiegend einfach geladene, ionisierte Analyten im Gas vorliegen. Das Ionengemisch wird dann in den Analysator weitergeleitet, welcher die Ionen im Hochvakuum nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis trennt. Beim Verfahren der Tandem-Massenspektrometrie besteht der Analysator

aus mehreren hintereinandergeschalteten Quadrupolen. Ein Quadrupol wiederum besteht aus vier parallelen Stabelektroden, welche zusammen ein elektrisches Feld erzeugen, durch das die Ionen hindurch fliegen. Je nach Schaltung der Elektroden kann das elektrische Feld Ionen auch so beschleunigen, dass nur solche mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis den Quadrupol durchlaufen, während andere abgelenkt werden. Weiterhin kann ein Quadrupol auch als Kollisionszelle fungieren, in dem Ionen durch Kollision mit Stoßgas (meist Stickstoff) fragmentieren. Bei der klassischen Tandem-Massenspektrometrie werden drei Quadrupole hintereinandergeschaltet. Im ersten Quadrupol werden (Precursor-) Ionen mit einer bestimmten Masse selektiert und anschließend im zweiten Quadrupol, der als Kollisionszelle dient, zu Produkt-Ionen fragmentiert. Im dritten Quadrupol erfolgt schließlich die Selektion bestimmter Fragmente anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses (Abb. 17). Da Moleküle je nach Aufbau und Kollisionsenergie mit dem Stoßgas sehr charakteristisch fragmentieren, können sie mit diesem Verfahren sehr spezifisch identifiziert werden. Nach Passage des Analysators werden die Ionen (-fragmente) in einen Detektor weitergeleitet, welcher sie erfasst und in elektrische Signale umwandelt.

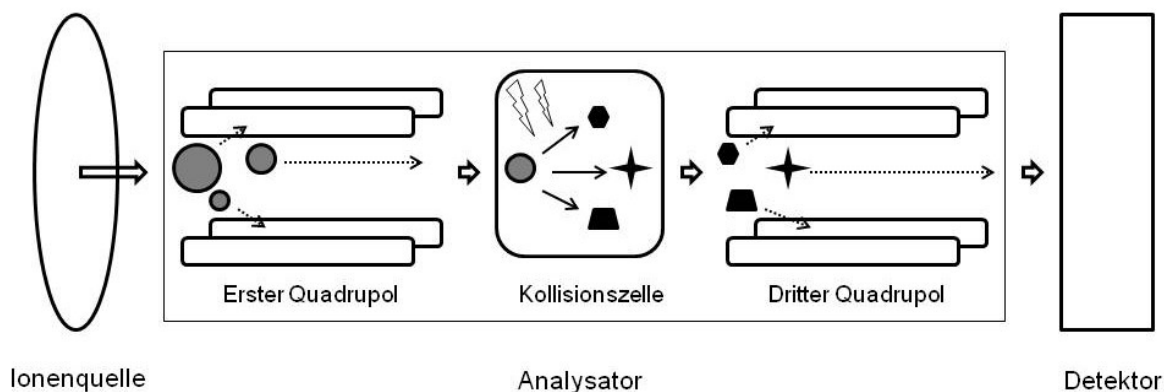


Abbildung 17: Schema eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit Ionenquelle, Analysator und Detektor. Im ersten Quadrupol wird ein (Precursor-) Ion selektiert und in der Kollisionszelle (zweiter Quadrupol) fragmentiert. Im dritten Quadrupol werden bestimmte Fragmente (Produkt-Ionen) selektiert und gelangen in den Detektor.

### **3.9 Extraktion von Cannabinoiden aus Stoff- und Serumproben**

In der Literatur existieren verschiedene Ansätze zur Extraktion von Cannabinoiden aus Pflanzenmaterial [129]. Für das klassische Mazerationsverfahren, bei dem sich die Cannabinoide durch längeren Kontakt des Pflanzenmaterials mit einem Lösemittel aus der Pflanzenmatrix lösen, werden überwiegend alkoholische Lösemittel wie Methanol oder Ethanol sowie eine Mischung aus Methanol und Chloroform im Verhältnis 9:1 vorgeschlagen [129–131]. Die beste Stabilität von neutralen und sauren Cannabinoiden ergab sich in Studien für alkoholische Lösemittel wie Methanol und Ethanol [132, 133]. In der vorliegenden Arbeit wurden Phytocannabinoide mittels Mazeration mit Methanol aus Proben von Medizinalcannabis extrahiert. Analog zur Extraktion von beschlagnahmten Straßencannabisproben durch das Landeskriminalamt Mainz wurde die Extraktion der Medizinalcannabisproben unter Wärme (70 °C) im Ultraschallbad durchgeführt, um die Extraktionsausbeute zu erhöhen.

Für die Extraktion von Phytocannabinoiden und Cannabinoidmetaboliten aus Serummatrix wurde in dieser Arbeit das Verfahren der Festphasenextraktion (Solid-phase extraction, SPE) verwendet. In diesem Verfahren wird die flüssige (Serum-) Probe in eine SPE Kartusche gegeben, welche mit einer festen Phase (Sorbens) gefüllt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde modifiziertes C18-Silikagel als Sorbens verwendet. Ähnlich zur Säulenchromatographie, basiert die SPE darauf, dass die zu isolierenden Analyten an der festen Phase haften, während weitere Bestandteile der Probe durch die Säule laufen [134]. Anschließend werden die Analyten durch ein Lösemittel von der Säule gewaschen, zu welchem sie eine höhere Affinität besitzen, als zur festen Phase. Gegebenenfalls können Waschschriffe zwischengeschaltet werden, um einen reineren Extrakt zu erhalten. Neben der Extraktion von Analyten aus einer flüssigen Matrix bietet das Verfahren der SPE die Möglichkeit, Extrakte aufzukonzentrieren und Störsubstanzen für den weiteren Analyseprozess zu entfernen [134].

### **3.10 Grundlagen der Hauptkomponentenanalyse**

Cannabinoidkonzentrationen von Stoff- und Blutproben wurden in dieser Arbeit mittels Hauptkomponentenanalyse (Principal component analysis, PCA) verglichen. Prinzipien und Anwendung der PCA sind in der Literatur ausführlich beschrieben [135]. An dieser Stelle sollen die Grundzüge des Verfahrens kurz erläutert werden:

Die PCA ist ein mathematisches Instrument zur Dimensionsreduktion und zur Identifizierung von Zusammenhängen und Strukturen in multidimensionalen Datensätzen. Dazu werden aus den ursprünglichen Merkmalen (Variablen) eines Datensatzes neue Variablen, sogenannte

Hauptkomponenten (Principal components, PCs), gebildet. Hierbei handelt es sich um Linearkombinationen (Vektoren) der ursprünglichen Variablen, entlang derer die Varianz zwischen den Objekten des Datensatzes maximal ist. Der Anteil der beschriebenen Varianz nimmt mit zunehmendem Rang der Hauptkomponente (PC) ab, sodass die erste PC den größten Anteil der Varianz beschreibt [136]. Korrelationen zwischen ursprünglichen Variablen und PCs werden als Ladungen (Loadings) in Diagrammen (Loading Plots) beschrieben [137]. Hohe Loadingwerte zeigen dabei an, dass die PC besonders stark von der entsprechenden Originalvariable geprägt ist. Im nächsten Schritt werden für jedes Objekt des Datensatzes die ursprünglichen Merkmalsausprägungen auf die PCs projiziert und so zu Faktorenwerten (Scores) transformiert. Diese Scores können nun in einem Streudiagramm (PCA Scatter Plot) gegen die PCs aufgetragen werden. Ein Biplot visualisiert zusätzlich zu Scores und PCs die ursprünglichen Variablen des Datensatzes als Vektoren durch den Ursprung [136]. Die PCA ermöglicht somit die Darstellung hochdimensionaler Datensätze in einfachen 2- oder 3-dimensionalen Koordinatensystemen.

Ebenso lassen sich mittels PCA Strukturen und Zusammenhänge zwischen den Objekten eines Datensatzes verdeutlichen, die aus Rohdaten durch eine Vielzahl an Variablen möglicherweise schwer ersichtlich sind: Weisen Objekte in Bezug auf eine bestimmte Variable zum Beispiel ähnlich hohe Werte auf, so werden diese Werte auch auf den entsprechenden PCs im PCA Plot abgebildet. Objekte mit ähnlichen Eigenschaften für mehrere Variablen werden im entsprechenden PCA Plot in sogenannten Clustern gehäuft dargestellt. Objekte mit unterschiedlichen Eigenschaften hingegen streuen und werden weiter entfernt voneinander abgebildet.

Ein Beispieldatensatz in Tabelle 1 soll die Funktion und Interpretation der PCA verdeutlichen: Der Datensatz erscheint mit einer Vielzahl an Variablen recht unübersichtlich. Strukturen und Zusammenhänge zwischen den Objekten lassen sich allein auf Basis der Rohdaten nur schwer entnehmen.

Objekt \ Variable	A	B	C	D	E
1	9	8	1	2	3
2	7	9	2	1	3
3	0	7	3	7	7
4	8	1	9	4	2
5	2	8	4	6	8

Tabelle 1: Beispieldatensatz mit mehreren Variablen zur Illustration der Hauptkomponentenanalyse (PCA).

Eine PCA ermöglicht die Darstellung der Daten aus Tabelle 1 in einem übersichtlichen, zweidimensionalen Koordinatensystem. Dazu wurde der Beispieldatensatz mittels der PAST software (Version 4.02) für wissenschaftliche Datenanalyse [138] analysiert. Abb. 18 zeigt den resultierenden Biplot:

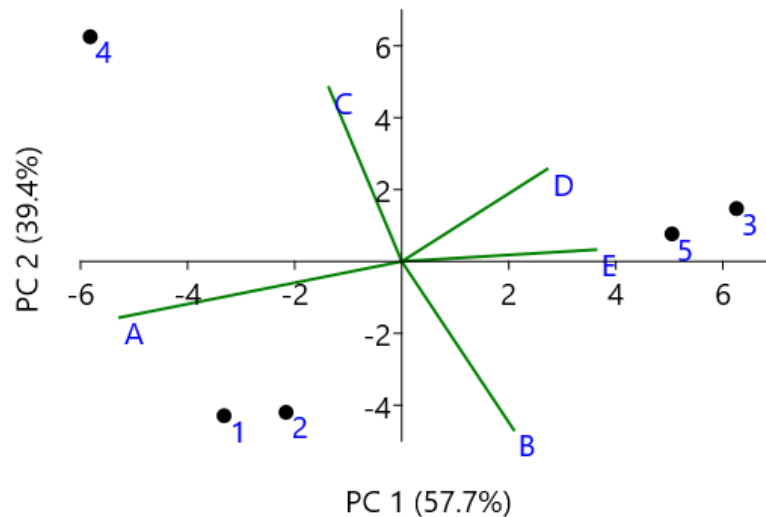


Abbildung 18: Biplot von Hauptkomponente (PC) 1 und PC 2 für die PCA des Beispieldatensatzes aus Tabelle 1. PC 1 und PC 2 bilden zusammen rund 97 % der Gesamtvarianz ab. Die Einflüsse der ursprünglichen Variablen A – E auf die PCs sind als Vektoren dargestellt. Cluster der Objekte 1 und 2 sowie 3 und 5 deuten auf ähnliche Eigenschaften in Bezug auf die hier dargestellten PCs hin.

Objekt 1 und 2 sowie 3 und 5 bilden im Biplot Cluster und weisen somit in Bezug auf PC 1 und PC 2 ähnliche Eigenschaften auf: Objekt 1 und 2 liegen im negativen Bereich der x- und y-Achse. Hier sind vor allem Variable A und B ausgeprägt. Bei Objekt 3 und 5, im positiven Bereich der x-Achse abgebildet, dominieren hingegen Variable B, D und E. Objekt 4 liegt, ähnlich wie Objekt 1 und 2, im negativen Bereich der x-Achse und weist ebenfalls einen hohen Wert für Variable A auf. Im Gegensatz zu allen anderen Objekten besitzt Objekt 4 jedoch einen hohen Wert für Variable C und wird, separiert von den restlichen Datenpunkten, im positiven Wertebereich der y-Achse dargestellt.

Die Einflüsse der ursprünglichen Variablen A – E auf die jeweilige PC werden im Biplot in Abb. 18 als Vektoren durch den Ursprung verdeutlicht: Die x-Achse (PC 1) stellt im negativen Bereich vor allem hohe Ausprägungen von Variable A, und im positiven Bereich hohe Werte für die Variablen B, D und E dar. PC 2 bildet insbesondere hohe Ausprägungen für Variable C im positiven y-Achsenbereich und für Variable B im negativen Bereich ab. Für eine bessere Übersicht sind die Einflüsse der ursprünglichen Variablen in Abb. 19 zusätzlich als

Balken in einem Loading Plot dargestellt. PC 1 und 2 erklären mit insgesamt rund 97 % den Großteil der Varianz im Datensatz. Ähnliche oder unterschiedliche Eigenschaften in Bezug auf diese PCs haben somit eine hohe Aussagekraft für die Gesamtstruktur des Datensatzes.

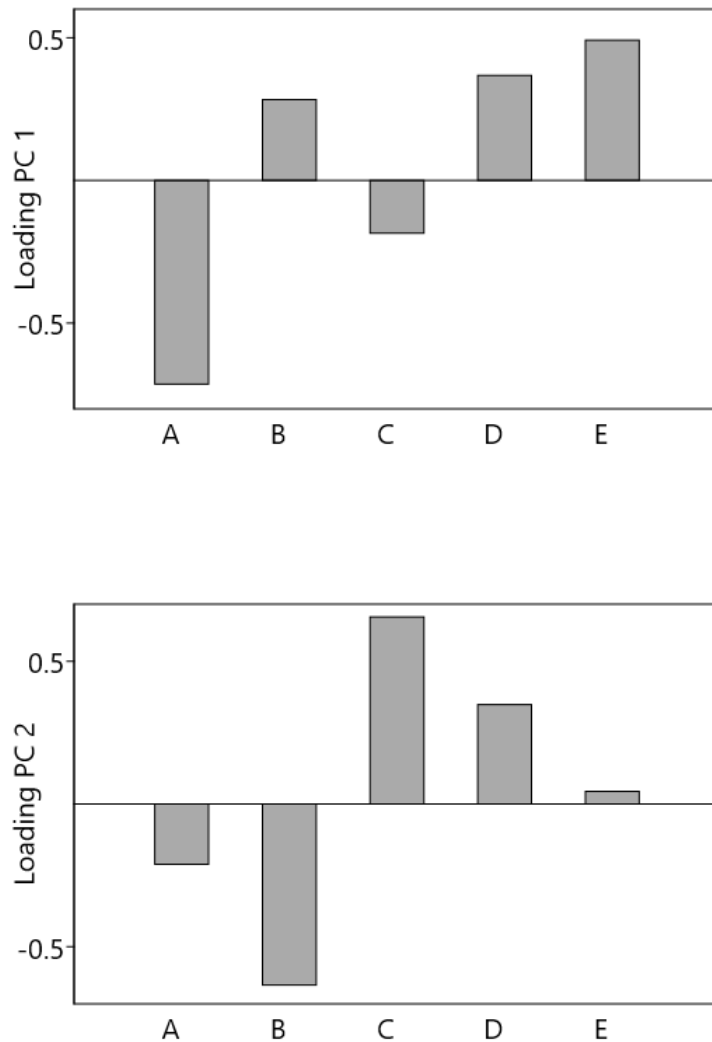


Abbildung 19: Loading Plots von PC 1 und PC 2. Die Balkendiagramme verdeutlichen den Einfluss der ursprünglichen Variablen auf die PCs: Während PC 1 im positiven Bereich vor allem von Variable D und E und im negativen Bereich von A beeinflusst wird, wird PC 2 besonders von Variablen B und C dominiert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Simultane und hochsensible Analytik von 18 verschiedenen Phytocannabinoiden mittels LC-MS/MS

Der Inhalt dieses Kapitels wurde als „Research Article“ veröffentlicht in:

Scheunemann A, Elsner K, Germerott T, Hess C, Röhrich J. Simultaneous quantification of 18 different phytocannabinoids in serum using a highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021;1173:122685. doi:10.1016/j.jchromb.2021.122685.

#### 4.1.1 Kurzprofil der Publikation

In der Arbeit wurde eine spezifische und hoch sensitive LC-MS/MS Analysemethode zur Quantifizierung 16 verschiedener Phytocannabinoide und zweier Cannabinoidmetaboliten in Serum entwickelt und validiert. Die Analyten umfassten  $\Delta$ 9-Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Cannabigerol (CBG), Cannabinol (CBN), Cannabichromen (CBC), Cannabicyclol (CBL), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabidivarin (CBDV) und die sauren Vorstufen Tetrahydrocannabinolsäure A (THCAA), Cannabidiolsäure (CBDA), Cannabigerolsäure (CBGA), Cannabinolsäure (CBNA), Cannabichromensäure (CBCA), Cannabicyclolsäure (CBLA), Tetrahydrocannabivarinensäure (THCVA) und Cannabidivarinensäure (CBDVA), sowie zusätzlich die beiden THC-Metaboliten 11-Hydroxy-tetrahydrocannabinol (THC-OH) und 11-Nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH). Die Methode wurde erfolgreich auf 55 Proben aus forensischen Realfällen aus dem Institut für Rechtsmedizin Mainz angewendet, und zum ersten Mal wurden Serumkonzentrationen von CBNA, CBCA, CBLA und CBDVA untersucht. Die Analysemethode ermöglicht die Erhebung umfassender Serum Cannabinoidprofile, welche für die Beantwortung verschiedener (forensischer) Fragestellungen relevant sind, wie beispielsweise der Identifizierung möglicher Marker zur Unterscheidung von Einnahme cannabisbasierter Medikamente und (Freizeit-) Konsum von Marihuana. Auch in Studien zu pharmakokinetischen und therapeutischen Eigenschaften seltener Cannabinoide kann die Methode angewendet werden.

#### 4.1.2 Abgrenzung des Eigenanteils

Literaturrecherche, Laborarbeiten, Entwicklung und Validierung der Analysemethode sowie die Erhebung und Auswertung der Messdaten wurden von mir durchgeführt. Die Methode zur Festphasenextraktion der Serumproben wurde dabei aus einer Veröffentlichung von Herrn PD Dr. Jörg Röhrich et al. entnommen. Das Konzept der Studie wurde von mir in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Katrin Elsner und Herrn Röhrich erarbeitet. Das Manuskript

wurde vollständig von mir erstellt. Kommentierung und Unterbreitung von Überarbeitungsvorschlägen erfolgten durch die Koautoren. Die Umsetzung der Überarbeitungsvorschläge erfolgte vollständig durch mich. Die Arbeit wurde durch Herrn Röhrich und Frau Elsner betreut.

## 4.1.3 Artikel

Journal of Chromatography B 1173 (2021) 122685



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jchromb](http://www.elsevier.com/locate/jchromb)

## Simultaneous quantification of 18 different phytocannabinoids in serum using a highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method

A. Scheunemann<sup>\*</sup>, K. Elsner, T. Germerott, C. Hess, J. Röhrich

Institute of Legal Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Am Pulverturm 3, 55131 Mainz, Germany

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Serum level  
Method validation  
LC-MS/MS  
Cannabinoids  
Solid phase extraction

## ABSTRACT

The potential therapeutic effects of various phytocannabinoids and the availability of multiple cannabis-based medicines make it desirable to have an analytical method that simultaneously quantifies a wide range of cannabinoids in blood, beyond delta-9-tetrahydrocannabinol and its metabolites. A liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for quantification of 18 phytocannabinoids and cannabinoid metabolites in serum was developed and validated. The method enables simultaneous detection of delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol, cannabigerol, cannabichromene, cannabicyclol, tetrahydrocannabivarin and cannabidivarin and their acidic precursors tetrahydrocannabinolic acid A, cannabidiolic acid, cannabinolic acid, cannabigerolic acid, cannabichromenic acid, cannabicyclic acid, tetrahydrocannabivarinic acid and cannabidivarinic acid as well as the delta-9-tetrahydrocannabinol metabolites 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol. Limits of detection ranged from 0.0004 to 1 ng/mL and limits of quantification ranged from 0.004 to 2 ng/mL. Calibration curves of all analytes were linear over the whole calibration range. Recovery rates of 52 to 86% were obtained for all analytes except for cannabicyclol (49%), 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (46%), cannabichromenic acid (44%) and cannabidivarinic acid (36%). Acceptable bias and precision data were demonstrated for all analytes. The method was successfully applied to 55 forensic serum samples, obtained from the Institute of Legal Medicine Mainz.

## 1. Introduction

*Cannabis sativa L.* has been the most frequently used illicit drug worldwide over the last decades. The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) estimated an annual cannabis use prevalence of 5.4% for Europe in 2017, young adults aged 15–24 representing almost 20% of the main group [1,2]. An uprising trend in the potency of cannabis was observed in the last 10 years, resulting from advances in cultivation, extraction and breeding of the plant. In the EU, more than half of all reported drug crimes in 2017 were linked to cannabis [2,3]. As debates about its legalization are constantly stirred, Cannabis continues

to draw political and public interest.

Just like recreational consumption, therapeutic use of cannabis has a long history reaching far back to the ancient China in 2700 BCE. Over the last few decades, the topic has experienced a renaissance. Many studies have started to explore the pharmacological and therapeutic potential of the plant, such as positive effects on chronic pain, severe spasticity due to multiple sclerosis, anorexia and eating disorders and epilepsy [4,5]. It is not yet fully discovered, which of the 104 currently known phytocannabinoids [6] are responsible for these effects. Besides the well examined and most common components delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD), pharmacological

**Abbreviations:** CBC, cannabichromene; CBCA, cannabichromenic acid; CBD, cannabidiol; CBDA, cannabidiolic acid; CBDV, cannabidivarin; CBDVA, cannabidivarinic acid; CBG, cannabigerol; CBGA, cannabigerolic acid; CBL, cannabicyclol; CBLA, cannabicyclic acid; CBN, cannabinol; CBNA, cannabinolic acid; EMV, electron multiplier voltage; ESI, electrospray ionization; IS, isotopically-labeled internal standard; ISTD, internal standard working solution; LOQ, limit of quantification; LOD, limit of detection; ME, matrix effect; MRM, multiple reaction monitoring; RSD, relative square deviation; S/N, signal-to-noise ratio; SPE, solid phase extraction; THC (or  $\Delta^9$ -THC), delta-9-tetrahydrocannabinol; THCAA, tetrahydrocannabinolic acid A; THC-COOH, 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol; THC-OH, 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol; THCV, tetrahydrocannabivarin; THCVA, tetrahydrocannabivarinic acid; TIC, total ion chromatogram.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [anne.scheunemann@uni-mainz.de](mailto:anne.scheunemann@uni-mainz.de) (A. Scheunemann).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122685>

Received 20 August 2020; Received in revised form 22 February 2021; Accepted 29 March 2021

Available online 1 April 2021

1570-0232/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

effects of minor cannabinoids such as cannabigerol (CBG), tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabitol (CBN) are recognized [7]. However, research is still in its infancy. Many more studies are needed to investigate blood levels of less common phytocannabinoids and to elucidate the full therapeutic potential of the cannabis plant.

Currently, there are several cannabis-based medicines available in Germany, such as Dronabinol ((-)-*trans*- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol), Nabilon (a fully synthetic cannabinoid), Sativex® (a mixture of plant extracts standardized on THC and CBD) and Epidyolex® (CBD). Moreover, medicinal-grade cannabis and cannabis plant extracts can be prescribed in Germany for different therapeutic indications since the amendment to the Narcotic Drugs Act in 2017. Various types are available, exhibiting diverse THC-/CBD-predominant or mixed cannabinoid compositions [8].

Impairment of cognition, such as diminished perception and short-time memory, psychomotor function and impulse control under the intoxication of THC are well described in literature [9–12]. Studies suggest that the risk of being involved in traffic accidents is at least doubled after recent cannabis consumption [13,14]. When participating in road traffic in Germany, THC blood serum levels of  $\geq 1$  ng/mL represent a regulatory offense and can be punished by a fine or suspension of the driver's license. The intake of cannabis or cannabis-based products for medicinal purposes is excluded from this regulation. However, drivers under cannabis medication must assure their ability to conduct a vehicle before departure, and, especially in the beginning of a therapy, the attending physician has a special obligation to provide advice. In some cases, a medical-psychological assessment is decreed in order to evaluate the patient's general fitness to drive. Since there is no distinct dose–effect relation for THC, assessment criteria for road risk include the motive of consumption, psychophysical performance, tolerance and risk of an additional recreational use of cannabis [15]. The latter, however, is difficult to evaluate, since there is little knowledge about consumption markers for recreational use of cannabis or intake of cannabis-based medicine, such as differences in cannabinoid serum levels.

The circumstances described above highlight the usefulness of an analytical method that takes into account not only serum levels of THC and its metabolites 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol (THC-OH) and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), but also less frequently studied phytocannabinoids. Goal of this study was to develop a highly sensitive, time efficient multi target method for THC, cannabidiol (CBD), cannabitol (CBN), cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), cannabicyclol (CBL), tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabidivarin (CBDV) and their acidic precursors tetrahydrocannabinolic acid A (THCAA), cannabidiolic acid (CBDA), cannabinoic acid (CBNA), cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromenic acid (CBCA), cannabicyclic acid (CBLA), tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA) and cannabidivarinic acid (CBDVA) as well as the THC metabolites THC-OH and THC-COOH. The method should enable monitoring of serum concentrations of various cannabinoids in order to investigate their therapeutic levels. Furthermore, differences in cannabinoid serum levels after the intake of cannabis-based products could be explored.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Reference standards for THC-d3, THC-OH, THC-OH-d3, THC-COOH-d9, CBD, CBD-d3, CBDA, CBN-d3, CBNA, CBG, CBGA, CBC, CBCA, CBL, THCV, THCVA, CBDV and CBDVA were purchased from Cerilliant (Round Rock, Texas, USA). Standards for CBG-d9 and CBC-d9 were purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, Michigan, USA) via LGC Standards (Wesel, Germany), the CBN, THC and THC-COOH standards were purchased from LGC Standards, and the standard for THCAA was purchased from THC Pharm (Frankfurt a. M., Germany). All standards had a purity of at least 99.0%, according to the manufacturer's

analysis certificate, except for THC-OH-d3, THCAA, CBC, CBC-d9, CBCA, CBL, THCVA, CBDV and CBDVA, which had a purity of at least 97.7%, THC-d3, which had a purity of 96.7%, and CBG-d9 with a purity of 95.0%. All standards were certified reference material. Standards for THC, THC-d3, THC-OH, THC-OH-d3, THC-COOH, THC-COOH-d9, THCAA, CBD, CBD-d3, CNB, CBG, CBG-d9, CBC, CBC-d9, THCV and CBDV were diluted in methanol. Standards for CBDA, CBNA, CBGA, CBCA, CBL, CBLA, THCVA and CBDVA were diluted in acetonitrile. All standards were stored at  $-20$  °C, except for CBDA, CBNA, CBGA, CBCA, THCV, THCVA, CBDV and CBDVA, which were stored at  $-80$  °C.

All chemicals were purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), except for methanol, which was purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK), and acetonitrile, purchased from AppliChem (Darmstadt, Germany). Chemicals used in LC-MS/MS measurement processes were LC-MS grade. All other chemicals were HPLC grade, except for acetone and dichloromethane, which had a purity of 99.8% and 99.5% respectively.

Blank human serum was obtained from voluntary healthy blood donors via blood donation service. The serum was tested to be drug-free.

### 2.2. Preparation of standard solutions

All undeuterated reference standards except for CBCA were combined in a methanolic stock solution. A separate methanolic stock solution was prepared for CBCA. For serum calibration, blank serum samples were spiked to reach the concentrations listed in Table 1. CBCA was calibrated separately (see results and discussion).

A methanolic internal standard working solution (ISTD) was prepared containing 0.2 ng/ $\mu$ L of THC-COOH-d9 and 0.02 ng/ $\mu$ L of each THC-d3, THC-OH-d3, CBD-d3, CBC-d9, CBN-d3 and CBG-d9. As for some cannabinoids no deuterated analogues were available, they were referred to the following isotopically-labeled internal standards (IS): THC-COOH-d9 was IS for CBCA, CBNA, CBLA, THCAA, CBGA, CBDA and CBDV, CBC-d9 was IS for CBL, CBN-d3 was IS for CBDVA and THCVA, and CBG-d9 was IS for THCV.

### 2.3. Sample preparation

500  $\mu$ L serum, 50  $\mu$ L ISTD and 1.5 mL acetonitrile were mixed in an eppendorf tube with an orbital shaker. After centrifugation at 2028g for 10 min, the supernatant was transferred into a test tube and diluted with 6 mL phosphate buffer (0.1 M, pH 6). Fully-automated solid phase extraction (SPE) was performed using a Gilson Aspec GX 271 Workstation (Gilson International B.V. Germany, Limburg an der Lahn, Germany). The sample mixture was applied to the SPE column (Bond Elut C18 column; 300 mg, 3 mL, Agilent, Santa Clara, California, USA), which had been conditioned with 6 mL methanol and 2 mL water at a flow rate of 1 mL/min previously. The column was flushed with 4 mL water and 4 mL water/methanol (80:20 v/v) and subsequently rinsed with 1 mL 0.1 M acetic acid. After drying the column for 10 min, the cannabinoid compounds were eluted with 3 mL acetone/dichloromethane (50:50 v/v) [16]. The extract was evaporated to dryness at 40 °C, resolved with 200  $\mu$ L ethyl acetate and transferred into glass vials. After evaporation at 30 °C, the samples were reconstituted in 50  $\mu$ L of an acetonitrile/methanol/water mixture (3:3:2). For both evaporation steps, nitrogen was used.

### 2.4. LC-MS/MS analysis

Quantitative analysis was performed via an UHPLC 1290 Infinity (autosampler, binary pump, thermostated column compartment) from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany), coupled with an Agilent Technologies 6490 Triple Quadrupole mass spectrometer.

During method development, a biphenyl column (Raptor Biphenyl 2.7  $\mu$ m 100  $\times$  2.1 mm, Restek, Homburg vor der Höhe, Germany) and a C18 column (ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2.1  $\times$  100

**Table 1**  
Calibration levels 1–8 in serum.

Calibration level	1	2	3	4	5	6	7	8	
THC-COOH	2	4	8	12	16	20	100	200	ng/mL
THC	0.2	0.4	0.8	1.2	1.6	2	10	20	ng/mL
CBD, CBL	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	5	10	ng/mL
THCVA	0.04	0.08	0.16	0.24	0.32	0.4	2	4	ng/mL
THC-OH	0.4	0.8	1.2	1.6	2	10	20	ng/mL	
CBC, THCV	0.2	0.4	0.6	0.8	1	5	10	ng/mL	
CBG	0.08	0.16	0.24	0.32	0.4	2	4	ng/mL	
THCAA, CBGA	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.5	1	ng/mL	
CBN	0.008	0.016	0.024	0.032	0.04	0.2	0.4	ng/mL	
CBDA	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.1	0.2	ng/mL	
CBDV	0.8	1.2	1.6	2	10	20	ng/mL	ng/mL	
CBCA	0.032	0.048	0.064	0.08	0.4	0.8	ng/mL	ng/mL	
CBNA, CBLA	0.016	0.024	0.032	0.04	0.2	0.4	ng/mL	ng/mL	
CBDVA	0.012	0.016	0.02	0.1	0.2	ng/mL	ng/mL	ng/mL	

mm 1.8- $\mu$ , Agilent) were tested for separation of the 18 analytes.

Final chromatography was performed on the C18 column with an UHPLC guard column (ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1  $\times$  5 mm 1.8- $\mu$ , Agilent) at 30 °C with 5.00  $\mu$ L sample injection volume at a flow rate of 0.6 mL/min. Mobile phase A consisted of 5 mM ammonium formate in water, mobile phase B was 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile. The following elution was used for separation of the analytes: 65% mobile phase B for the first 4.5 min, changed to 80% B and increased to 80.9% B at 7.50 min, changed to 100% B till 9.50 min. Subsequently, the column was re-equilibrated with 65% B for 3.5 min. Total run time was 13 min.

Tandem – mass spectrometry was performed using electrospray ionization (ESI) - Agilent Jet Stream technology under positive and negative reaction mode. The analytes were measured with a gas temperature of 250 °C, gas flow of 15 L/min, nebulizer pressure of 20 psi, sheath gas heater temperature of 400 °C, sheath gas flow of 12 L/min, capillary voltage of 4000 V and a nozzle voltage of 1000 V. Measuring time was divided into 6 separate time segments from 0–1.5 min., 1.5–2.75 min., 2.75–4.85 min., 4.85–5.86 min., 5.86–8.7 min. and 8.7–9.5 min. An electron multiplier voltage (EMV) was set for segments 2 (–300 V), 3 ( $\pm$ 300 V), 4 (–400 V) and 5 ( $\pm$ 400 V). Dwell time was 35 ms for segment 2, 50 ms for segment 3, 120 ms for segment 4 and 42 ms

for segment 5. Table 2 shows precursor and product ions, collision energies, polarities, scan segments and retention times for all analytes.

For evaluation of the data, the Agilent Mass Hunter software B 09.00 was used.

### 2.5. Method validation

The method was validated according to current guidelines of the German Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh) [17–20], using the Valistat 2.0 statistics program [21].

The following parameters were validated: selectivity, linearity, intra- and interday precision, bias, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), recovery and matrix effects. All parameters were tested with drug-free serum as blank matrix.

To determine the selectivity of the method, six blank serum samples of different serum batches without addition of the ISTD and two different blank serum samples spiked with ISTD were tested for interferences. Additionally, 50  $\mu$ L of 100 ng/mL methanolic solutions of each undeuterated analyte, spiked with 50  $\mu$ L ISTD, were tested for content of related components: Acidic analytes, for example, could decarboxylate to their neutral equivalents, and isomers, such as THC,

**Table 2**  
LC-MS/MS parameters for analytes in serum.

Compound	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion 1 ( <i>m/z</i> )	Collision energy 1 (eV)	Product ion 2 ( <i>m/z</i> )	Collision energy 2 (eV)	Polarity	Scan segment	Retention time (min)
CBDVA	329.2	217.1	22	151.1	22	Negative	2	1.85
THC-OH-d3	334.3	196.2	26	316.2	10	Positive	2	2.08
THC-OH	331.2	193.1	26	313.2	10	Positive	2	2.09
THC-COOH-d9	352.3	254.3	30	308.3	22	Negative	2	2.09
THC-COOH	343.2	245.2	30	299.2	22	Negative	2	2.14
CBDV	285.2	217.1	18	107	34	Negative	2	2.17
CBDA	357.2	245.2	30	339.2	22	Negative	3	3.15
CBGA	359.2	341.2	18	191.1	40	Negative	3	3.55
CBG-d9	326.3	202.2	10	123	40	Positive	3	3.84
CBG	317.3	193.1	10	123	40	Positive	3	3.91
CBD-d3	318.3	196.1	22	123	40	Positive	3	4.02
CBD	315.2	193.1	22	123	40	Positive	3	4.05
THCV	287.2	123	40	231.1	22	Positive	3	4.07
THCVA	329.2	285.2	22	217.1	30	Negative	4	5.15
CBN-d3	312.2	282.1	40	222.1	52	Negative	4	5.5
CBN	309.2	279.1	40	222.1	52	Negative	4	5.52
CBNA	353.2	309.2	26	279.1	38	Negative	4	5.81
THC-d3	318.3	196.1	22	123	40	Positive	5	6.04
THC	315.2	193.1	22	123	40	Positive	5	6.04
CBL	315.2	235.2	18	165.1	22	Positive	5	6.52
CBC-d9	324.3	202.2	14	268.2	14	Positive	5	6.64
CBC	315.2	193.1	14	259.2	14	Positive	5	6.7
THCAA	357.2	245.2	34	191.1	48	Negative	5	6.72
CBCA	357.2	191.1	48	339.2	26	Negative	5	7.06
CBLA	357.2	191.1	26	313.2	30	Negative	5	7.24

Product ion 1 = target ion, product ion 2 = qualifier ion.

CBD, CBC and CBL, could rearrange or, in case of CBC and CBL, cyclise to each other. These processes could possibly occur during manufacturing or during measurement as a result of thermal stress [22].

External matrix-matched standard calibration with IS, i.e. calibration in matrix with addition of isotopically-labeled internal standards, was used as calibration method. To validate linearity, blank matrix samples were spiked with 50  $\mu\text{L}$  ISTD and 50  $\mu\text{L}$  aliquots of methanolic calibration solutions to reach the concentrations listed in Table 1. The resultant calibration curves were tested for outliers (Grubbs test), linearity (Mandel test) and variance homogeneity (Cochran test). Analytes were calibrated with a 6 point calibration using calibration levels 1–6, except for CBDVA (calibration levels 1–5) and THC-OH, CBN, CBG, CBC and THCV (calibration levels 1–7). An additional high range was calibrated for CBDA, THCAA, CBGA (levels 3–7) and THCVA, CBL, CBD, THC and THC-COOH (levels 4–8).

For determination of intraday precision, interday precision and bias, two samples each of a low and high concentration were measured on 8 different days. For CBL, CBD, CBC, THC, THCAA, CBGA, THCVA, CBG, CBN, CBDA, THC-OH, THC and THC-COOH an additional medium concentration was measured in order to cover the wider calibration range. Following concentrations were measured: 4, 16 and 100 ng/mL (THC-COOH), 0.4, 1.6 and 10 ng/mL (THC and THC-OH), 0.2, 0.8 and 5 ng/mL (CBL, CBD, CBC and THCV), 0.08, 0.32 and 2 ng/mL (THCVA and CBG), 0.02, 0.08 and 0.5 ng/mL (THCAA and CBGA), 0.008, 0.032 and 0.2 ng/mL (CBN), 0.004, 0.016 and 0.1 ng/mL (CBDA), 1.6 and 10 ng/mL (CBDV), 0.064 and 0.4 ng/mL (CBCA), 0.032 and 0.2 ng/mL (CBNA and CBLA) and 0.016 and 0.1 ng/mL (CBDVA). Control samples were prepared independently from separate stock solutions.

Matrix effects and recovery rates were investigated by measuring the same low and high concentrations as for bias and precision data. For both low and high levels, 5 samples each of methanolic solutions, blank matrix samples spiked with methanolic solutions before SPE and blank matrix samples spiked with methanolic solutions after SPE (after drying the samples) were analyzed. For matrix effects, absolute peak areas of methanolic solutions and blank matrix samples, spiked after SPE, were compared. Recovery rates were calculated via comparison of absolute peak areas in blank matrix samples spiked before and after SPE. Matrix effects and recovery rates were calculated both with and without correction by the respective isotopically-labeled internal standard (IS).

To explore limits of detection (LOD), 1:2, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 and 1:125 dilutions of calibration level 1 were analyzed. For LOD, a signal-to-noise ratio (S/N) of at least 3:1 for both qualifier and target ions was required. For determination of the limits of quantification (LOQ), bias and relative standard deviation (RSD) had to be  $\leq 20\%$  after fivefold measuring of a matrix sample spiked with the respective LOQ concentrations.

## 2.6. Application of the method and data analysis

55 forensic serum samples, obtained from the Institute of Legal Medicine Mainz, were prepared and measured as described above. Data analysis was performed using Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) and IBM SPSS® Statistics 23 (International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, New York, USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Method optimization

To achieve optimal separation of the analytes, a biphenyl column and a C18 column were tested. The isomers THC, CBD, CBC and CBL were separated insufficiently using the biphenyl column (Fig. 1a). Good results could be achieved using the C18 column: Figs. 1b and 1c show a total ion chromatogram (TIC) of all analytes and a multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram of THC, CBD, CBC and CBL.

### 3.2. Method validation

#### 3.2.1. Selectivity

No relevant interfering signals were detected from blank serum samples with and without ISTD. Exemplarily, MRM chromatograms of CBN in serum spiked with 0.24 ng/mL CBN and in blank serum were compared in Fig. 2.

#### 3.2.2. Cyclisation of CBCA to CBLA

Most analytes indicated no content of related components when measured separately. THCAA and CBNA exhibited only slight signals of approximately 1% for their equivalents THC and CBN, respectively, and THCVA caused a minor signal of 3.5% for THCV. This could be due to degradation occurring during storage or measurement processes. CBCA, however, was found to cause a signal of almost 10% for its isomer CBLA. Consequently, CBCA was excluded from the calibration solutions and measured separately. It was assumed that CBCA cyclised to CBLA during storage or measurement. Molecular structures of CBCA and CBLA are shown in Fig. 3. Structures were visualized using ACD/ChemSketch 2018.2.5 (Advanced Chemistry Development Inc. (ACD), Toronto, Canada).

#### 3.2.3. Calibration model

The calibration ranges were chosen with regard to LODs and LOQs of most substances, as there was little information on what cannabinoid blood concentrations could be expected. For analytes with low and high calibration curves, low calibration curves were used for calibration levels 1–6. High calibration curves were used for calibration level 7 and, when measured, level 8. Calibration curves were linear within the

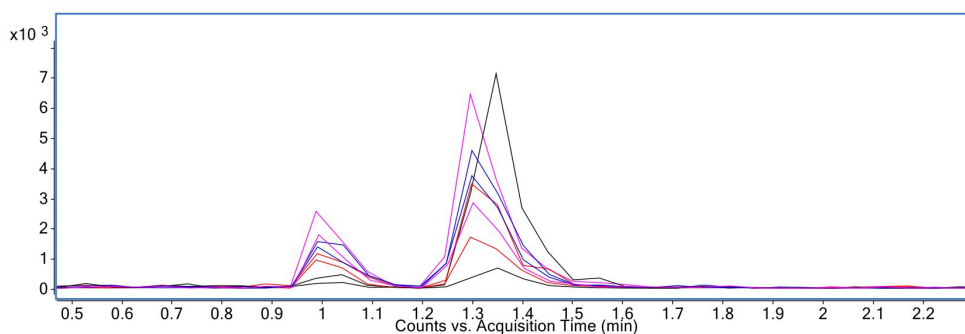
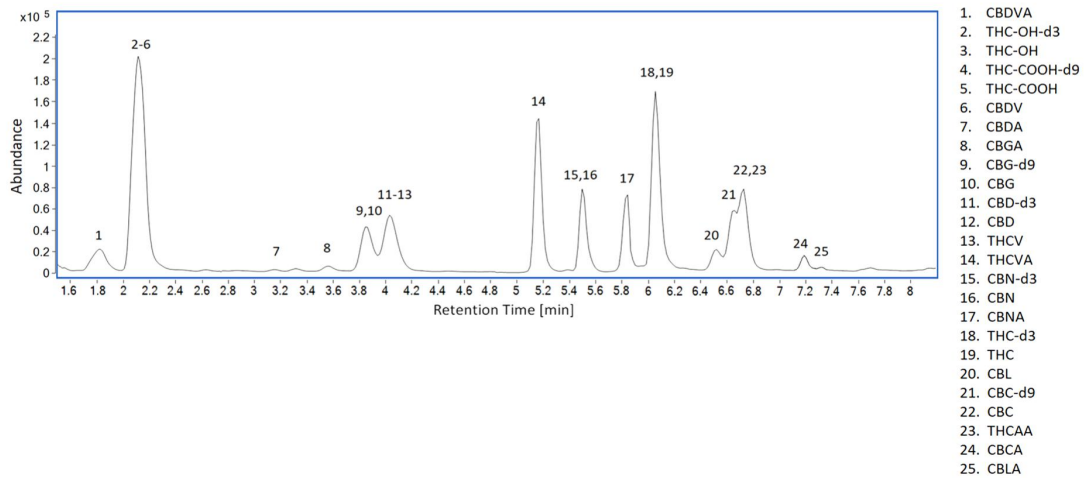
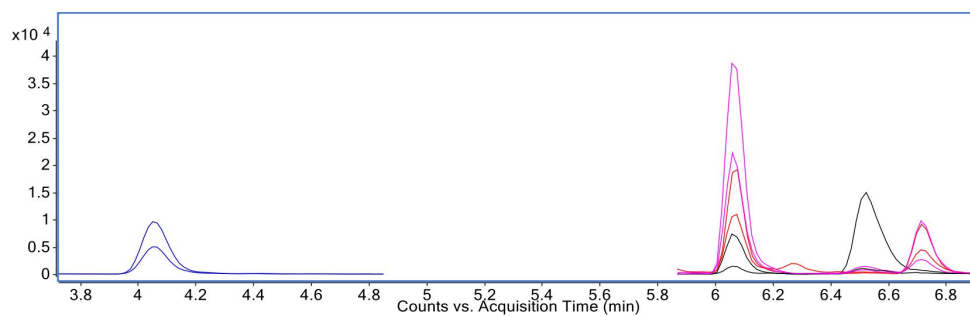


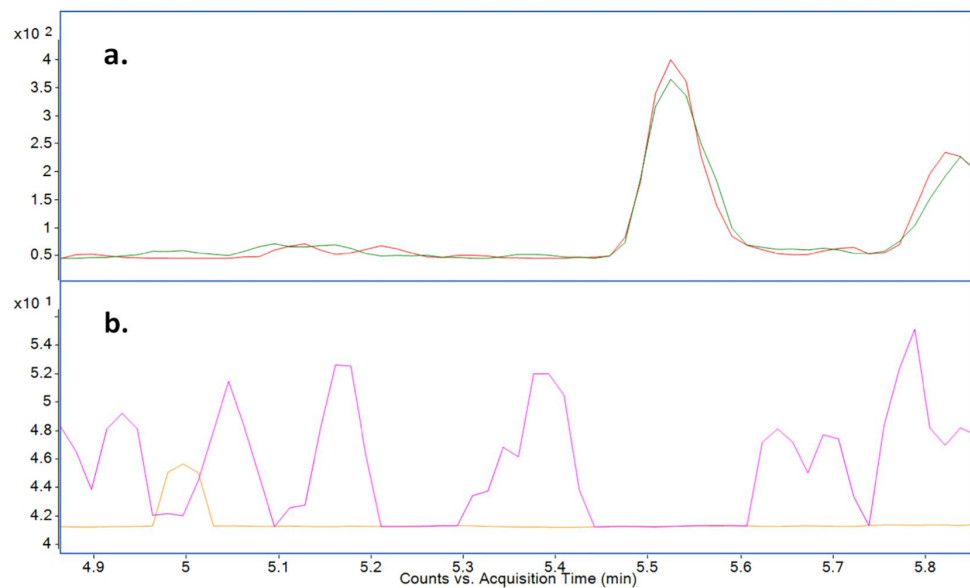
Fig. 1a. MRM chromatogram of 2 ng/mL THC (pink signals), 1 ng/mL CBD (blue signals), 1 ng/mL CBC (red signals) and 1 ng/mL CBL (black signals) in methanol using a biphenyl column. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 1b.** TIC of all analytes in methanol using a C18 column. THC-COOH and THC-COOH-d9 were measured at 200 ng/mL, THC, THC-OH, CBDV, THC-d3, THC-OH-d3, CBD-d3, CBC-d9, CBN-d3 and CBG-d9 at 20 ng/mL, CBD, CBC, CBL and THCV at 10 ng/mL, CBG and THCVA at 4 ng/mL, THCAA and CBGA at 1 ng/mL, CBCA at 0.8 ng/mL, CBN, CBNA and CBLA at 0.4 ng/mL and CBDA and CBDVA at 0.2 ng/mL.



**Fig. 1c.** MRM chromatogram of 1 ng/mL CBD (4.05 min), 2 ng/mL THC (6.04 min), 1 ng/mL CBL (6.52 min) and 1 ng/mL CBC (6.72 min) in methanol using a C18 column.



**Fig. 2.** MRM chromatograms of CBN (5.52 min) in serum spiked with 0.24 ng/mL CBN (a) and in blank serum (b).

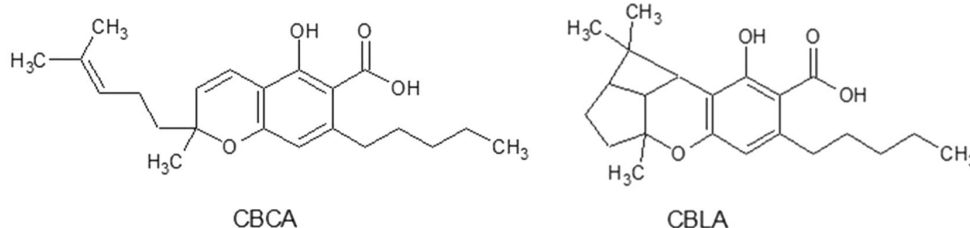


Fig. 3. Molecular structures of CBCA and CBLA.

calibration ranges, and all correlation coefficients were  $\geq 0.997$ . Weighting was necessary for THC-OH, CBN, CBNA, CBG, CBC, CBCA, CBLA, THCV, CBDV ( $1/x^2$  each) and CBDVA ( $1/x$ ) over the whole calibration range. All other analytes required weighting of  $1/x^2$  for high calibration ranges only.

### 3.2.4. Limit of detection and limit of quantification

The S/N was at least 3:1 for both target ion and qualifier ion for all LODs except for CBL, whose LOD was determined by its target ion  $m/z$  315.2  $\rightarrow$  235.2 due to insufficient fragmentation and low signals. RSD was not higher than 17.8% and bias was not greater than 19.8% at LOQ. LODs ranged from 0.0004 ng/mL (THCAA) to 1 ng/mL (THC-COOH). LOQs ranged from 0.004 ng/mL (CBDA) to 2 ng/mL (THC-COOH). LODs and LOQs for all analytes are presented in Table 3.

### 3.2.5. Bias and precision

The method showed an acceptable bias, intraday and interday precision that did not exceed a relative standard deviation of 15%. The bias ranged from  $-4.2$  to  $8.4\%$ , intraday precision ranged from  $1.3$  to  $10.4\%$ , and interday precision ranged from  $4.2$  to  $12.4\%$ . All accuracy data are summarized in Table 3.

### 3.2.6. Recovery and matrix effects

For most analytes, recovery rates without IS correction ranged from 52% (CBLA) to 86% (CBDA and CBN). Only THC-COOH, CBL and CBCA had a recovery rate slightly lower than 50% for one of the tested concentrations. CBDVA showed lower recovery rates for both high and low levels. Through IS correction, recovery rates were considerably increased for all analytes, with 100% for THC (low concentration), THCAA, CBDA, CBN, CBNA, CBG, CBGA, CBCA, CBLA, THCV and CBDV (low and high concentrations). Recovery rates with and without correction by IS are compared in Table 3.

The term matrix effect (ME) describes to which extent coeluting substances alter the ionization of an analyte, either by enhancing or suppressing the signal [23]. According to GTFCh guidelines, MEs of 75% to 125% are regarded as tolerable [20]. For the presented method, most MEs without IS correction varied from 84% (THC-OH and CBC) to 123% (CBNA and THC-OH). However, for some analytes, especially those measured in negative MS/MS mode, ion enhancement with MEs of 138% (CBCA) up to 337% (THCAA) was observed. For CBL (ME 46% and 36%) and THC (ME 67%), on the other hand, ion suppression was detected. For some analytes, relative square deviations (RSD) of MEs were  $>25\%$ . In these cases, the occurrence of high MEs could be due to single blank samples exhibiting exceptionally high ion suppression or enhancement. In general, high MEs can be caused by usage of electrospray ionization (ESI), which is described as especially prone to alteration of ionization efficiency, compared to other ionization methods, such as atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [23–25]. Highly increased signals under negative ionization have been observed previously [26], although a negative ion mode is indicated as ‘more specific and consequently less prone to MEs’ as well [27]. In this study, many analytes, including most acidic cannabinoids, were hardly ionized under positive mode. Thus, negative ionization was chosen for these compounds. Several strategies

were applied to lower MEs: Solid phase extraction (SPE), which was used in the presented study, has been found to remove signal-altering substances more effectively than protein precipitation. However, an accumulation of the analytes of interest via SPE could result in a potential increase of interfering substances as well [25,27]. Protein precipitation was used in addition to SPE, as in earlier experiments, samples still exhibited notable background noise after being cleaned with SPE only, and sometimes, analytes were not evaluable due to interfering peaks. The combination of protein precipitation and SPE, however, lead to sufficiently clean extracts. Isotopically-labeled internal standards (IS), if available, were used to compensate for MEs on their equivalents. In addition to IS, matrix-matched standard calibration with IS was applied. Kang et al. describe the calibration method as similarly effective in adjusting MEs, as standard addition, especially for analytes without corresponding IS, but also as less time-consuming [28]. In Table 3, matrix effects with and without correction by the respective IS are compared. Use of IS could compensate for large variations in matrix effects, and high RSD of over 40% were lowered considerably. Matrix effects were notably compensated for analytes with an analog IS (e.g. CBN). For analytes without analog IS, such as CBL, matrix effects were less compensated for through IS correction. Low amounts of CBL might not be detected when applying the method to authentic serum samples due to ion suppression.

### 3.3. Application of method

To test the method, 55 forensic samples from different cannabis users, obtained from the Institute of Legal Medicine Mainz, were analyzed. Ranges, means and medians of all analytes as well as their frequency in the tested samples are presented in Table 4. Measurement values  $< LOQ$  were substituted with 0. Mean and median were calculated from all samples. Figs. 4–6 show boxplots of serum concentrations of all minor cannabinoids. Boxplots were displayed in full-scale and adjusted-scale for a better view.

As expected, THC and THC-COOH were detected in almost all samples. THCAA, CBN and THCVA were almost ubiquitous as well, with THCAA and THCVA exhibiting the highest serum concentrations among minor cannabinoids (Fig. 4). CBD, CBN, CBG, CBGA, CBC and CBCA (Fig. 5) showed moderate serum concentrations and, except for CBN, moderate incidences of 16% (CBD and CBCA) to 33% (CBC). For CBDA, CBNA, CBL, CBLA and THCV (Fig. 6), low serum concentrations were detected. Incidences were low as well, except for CBNA, which was detected in 22% of all samples. Low concentrations of CBLA and THCV could possibly be caused by conversion of CBCA and THCVA rather than CBLA or THCV being present in the samples. CBDV was absent in all samples, and CBDVA was detected in only one sample at a concentration  $< LOQ$ . As most cannabinoid serum concentrations in authentic samples lay within the calibration range, calibration levels of the method were considered to be suitable.

Some of the results stand in contrast to findings of a study investigating cannabinoid plasma concentrations [29]. Kraemer et al. detected THCAA in 63%, CBN in 24% and CBGA in only 4% of all samples, whereas in our study, THCAA and CBN were quantified in 89% and 86%

**Table 3**  
Method validation data.

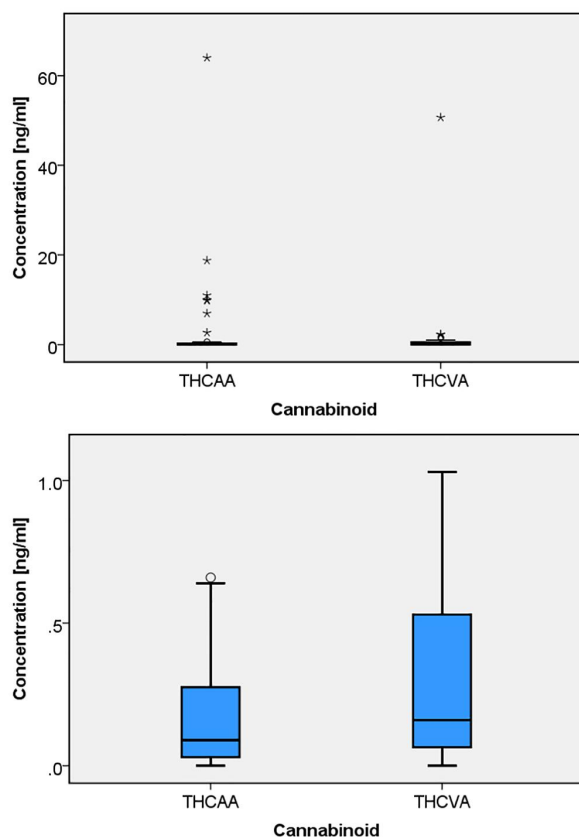
Analyte	LOD [ng/ mL]	LOQ [ng/ mL]	Bias [%]			Intraday precision [%]			Interday precision [%]			Recovery (RSD) [%]		IS corrected recovery (RSD) [%]		Matrix effect (RSD) [%]		IS corrected matrix effect (RSD) [%]	
			low	medium	high	low	medium	high	low	medium	high	low	high	low	high	low	high	low	high
THC	0.04	0.2	5.5	-0.7	-4.5	4.2	5.8	4.6	7.7	9.8	8.3	58 (1.8)	69 (9.8)	96 (7.3)	100 (6.6)	85 (41.6)	67 (25.2)	111 (6.4)	99 (3.5)
THC-OH	0.2	0.4	1.0	-4.2	-0.6	5.1	6.6	3.6	5.9	7.9	11.2	82 (7.2)	77 (25.2)	97 (14.4)	97 (6.9)	123 (9.7)	84 (13.2)	109 (16.3)	89 (8.3)
THC-COOH	1	2	-0.4	6.4	-4.1	5.0	2.9	3.8	6.0	5.3	6.7	59 (13.6)	46 (12.1)	93 (12.8)	97 (4.9)	108 (8.0)	95 (11.4)	102 (10.3)	97 (7.6)
THCAA	0.0004	0.02	0.4	2.1	1.8	9.9	3.3	6.4	9.9	6.9	10.1	80 (10.5)	62 (17.8)	100 (10.3)	100 (23.3)	311 (4.4)	337 (65.1)	294 (5.3)	361 (35.6)
CBD	0.04	0.1	0.7	4.2	-2.5	8.1	2.7	4.5	8.4	5.0	9.1	69 (9.1)	68 (21.4)	74 (27.2)	98 (6.2)	109 (11.9)	93 (20.2)	104 (9.3)	91 (4.9)
CBD-A	0.002	0.004	6.2	1.8	7.0	4.3	5.8	6.1	7.0	8.0	6.2	86 (7.5)	70 (10.6)	100 (25.3)	100 (27.4)	142 (7.2)	150 (7.4)	159 (11.5)	152 (19.5)
CBN	0.001	0.008	4.5	-0.1	1.1	10.2	8.9	4.8	10.2	9.4	7.7	86 (20.7)	80 (19.2)	100 (15.5)	100 (7.9)	289 (18.9)	264 (67.4)	96 (21.0)	87 (9.1)
CBNA	0.004	0.016	0.0	0.5	0.5	3.5	4.5	4.5	12.0	9.0	9.0	72 (16.6)	70 (8.1)	100 (11.0)	100 (26.4)	123 (6.8)	109 (15.4)	120 (6.4)	112 (15.6)
CBG	0.04	0.08	8.4	0.5	1.7	6.1	5.1	4.1	6.5	6.9	5.6	68 (12.6)	66 (20.2)	100 (22.5)	100 (2.8)	136 (15.8)	119 (34.8)	117 (13.7)	110 (17.8)
CBGA	0.008	0.02	6.1	7.5	2.1	8.7	2.2	4.6	11.1	4.9	9.6	79 (4.4)	68 (10.1)	100 (22.2)	100 (26.3)	122 (8.0)	114 (15.7)	117 (4.9)	114 (15.2)
CBC	0.1	0.2	7.5	2.6	4.6	9.3	5.6	4.5	9.3	8.9	7.6	68 (5.6)	67 (20.8)	98 (13.2)	93 (7.8)	98 (16.8)	84 (18.8)	101 (7.0)	99 (12.6)
CBCA	0.008	0.032	2.4	5.0	5.0	5.1	3.2	10.4	7.8	10.5	61 (13.3)	44 (7.5)	100 (22.9)	100 (28.7)	138 (20.2)	165 (22.2)	118 (29.3)	162 (25.2)	
CBL	0.025	0.1	-0.1	-0.4	-2.2	7.7	3.2	5.8	9.7	11.3	8.8	49 (9.7)	57 (21.4)	76 (16.5)	75 (14.0)	46 (59.1)	36 (16.8)	43 (29.2)	42 (11.1)
CBLA	0.002	0.01	4.2	3.0	-3.0	8.7	7.2	7.2	8.7	8.6	55 (5.2)	52 (10.3)	100 (32.4)	100 (10.7)	121 (21.1)	119 (37.1)	119 (16.6)	107 (38.7)	
THCV	0.02	0.2	1.7	2.1	-1.1	7.9	2.8	2.2	12.4	10.0	6.9	78 (6.7)	79 (26.7)	100 (8.3)	100 (7.7)	127 (29.9)	91 (18.5)	92 (8.6)	79 (9.5)
THCVA	0.004	0.04	0.8	4.0	-0.2	5.9	1.3	1.9	8.2	7.8	8.7	58 (8.4)	62 (10.2)	84 (8.9)	81 (20.0)	116 (16.3)	116 (13.0)	101 (15.9)	99 (10.7)
CBDV	0.1	0.8	-2.7	-1.6	-1.6	8.7	5.4	5.4	11.0	7.9	72 (5.6)	75 (13.5)	100 (34.5)	100 (29.7)	164 (11.9)	102 (13.1)	167 (13.3)	105 (15.0)	
CBDVA	0.004	0.012	3.9	-0.2	-0.2	6.5	4.1	4.1	10.0	4.2	38 (6.9)	36 (3.8)	47 (16.4)	45 (11.0)	165 (16.1)	150 (25.3)	148 (15.6)	129 (33.9)	

**Table 4**  
Cannabinoid levels of authentic forensic case serum samples (n = 55).

Cannabinoid	Minimum (ng/mL)	Maximum (ng/mL)	Mean (ng/mL)	Median (ng/mL)	Numbers of findings > LOQ	Incidence
THC	<0.20	55.2	4.3	0.80	54	98%
THC-OH	<0.40	20.5	1.9	0.40	33	60%
THC-COOH	<2.0	201	34	10	51	93%
THCAA	<0.020	64.0	2.5	0.090	49	89%
CBD	<0.10	1.5	<0.10	<0.10	9	16%
CBDA	<0.0040	0.15	0.0057	<0.0040	5	9.1%
CBN	<0.0080	1.9	0.13	0.023	47	86%
CBNA	<0.016	0.18	<0.016	<0.016	12	22%
CBG	<0.080	1.8	0.14	<0.080	13	24%
CBGA	<0.020	2.0	0.11	<0.020	17	31%
CBC	<0.20	5.6	0.39	<0.20	18	33%
CBCA	<0.032	3.1	0.096	<0.032	9	16%
CBL	-	0.19*	-	-	1	1.8%
CBLA	<0.010	0.095	<0.010	<0.010	5	9.1%
THCV	<0.20	0.71	<0.20	<0.20	3	5.5%
THCVA	<0.040	50.7	1.3	0.16	52	95%
CBDV	-	-	-	-	0	0%
CBDVA	-	-	-	-	0	0%

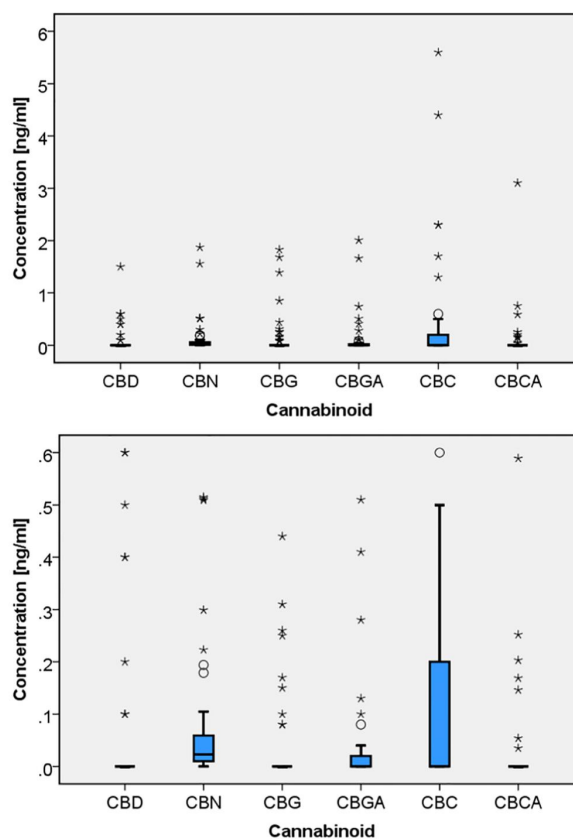
Measurement values < LOQ were substituted with 0. Mean and median were calculated from all samples.

\* Only value detected.



**Fig. 4.** Full-scale and adjusted-scale boxplots of THCAA and THCVA concentrations in forensic serum samples.

respectively, and CBGA was quantified in 31% of the samples. However, our method showed a much higher sensitivity for all analytes, with up to a thousand times lower LODs and LOQs. THCAA, for example, exhibited an LOD and an LOQ of 0.0004 and 0.02 ng/mL, compared to 0.6 and 1.6 ng/mL in the method described by Kraemer et al. According to recent literature [30–32], our study was the first to investigate serum levels of CBNA, CBCA, CBLA and CBDVA.



**Fig. 5.** Full-scale and adjusted-scale boxplots of CBD, CBN, CBG, CBGA, CBC and CBCA concentrations in forensic serum samples.

Only forensic samples were analyzed for the present article in order to demonstrate the application of the method. However, samples from patients treated with cannabis-based medicines were analyzed as well in a separate project (publication in preparation).

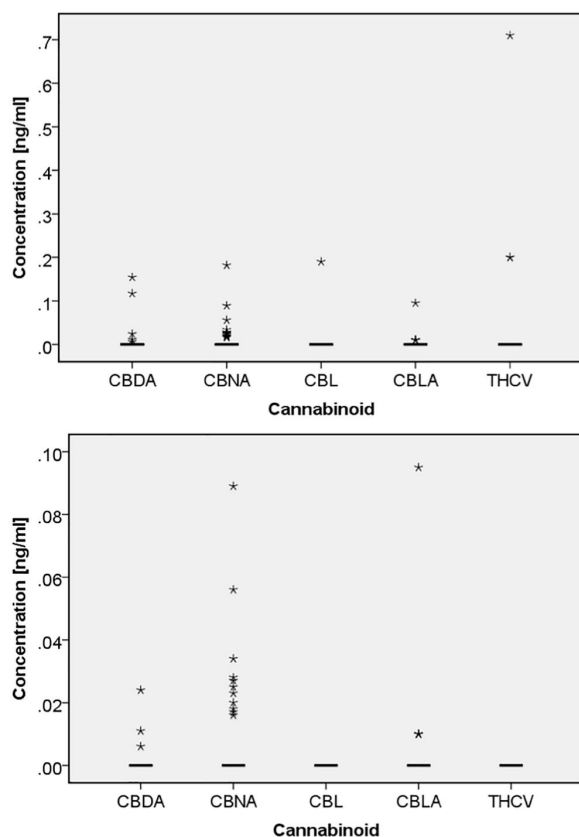


Fig. 6. Full-scale and adjusted-scale boxplots of CBDA, CBNA, CBL, CBLA and THCv concentrations in forensic serum samples.

#### 4. Conclusions

In summary, a specific and highly sensitive LC-MS/MS method for the quantification of 18 phytocannabinoids and cannabinoid metabolites was developed and validated. The method was successfully applied to authentic forensic case serum samples, and concentrations of CBNA, CBLA, CBL and CBDVA were investigated for the first time. The method can be of use when the analysis of multiple cannabinoid serum levels is required in order to answer forensic questions, such as differences in cannabinoid serum concentrations after the intake of cannabis-based medicine and recreational use of marijuana. Additionally, the analysis method may support studies covering pharmacokinetics and therapeutic effects of phytocannabinoids in serum.

#### CRediT authorship contribution statement

A. Scheunemann: Methodology, Validation, Investigation, Writing - original draft, Visualization. K. Elsner: Conceptualization, Funding acquisition, Writing - review & editing. T. Germerott: Supervision, Funding acquisition, Resources. C. Hess: Validation, Writing - review & editing, Visualization. J. Röhrich: Supervision, Conceptualization, Funding acquisition, Writing - review & editing, Visualization.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

This work was supported by the Level 1 Institutional Research Funding of the University Medical Center Mainz.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122685>.

#### References

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime, World drug report 2019, United Nations, Vienna, 2019.
- [2] EMCDDA, European Drug Report. Trends and Developments. 2019, 2019. [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724\\_TDAT19001ENN\\_PDF.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf) (accessed 4 November 2020).
- [3] C. Heß, A. Scheunemann, B. Thomas, M. Kraemer, Bestimmung verschiedener Begleitcannabinoiden in Blutproben von Cannabiskonsumern. Kann die Einschätzung des zeitlichen Abstandes zwischen Konsum und Blutentnahme verbessert werden? *Blutalkohol* 56 (2019) 351–365.
- [4] P. Cremer-Schaeffer, Cannabis: Was man weiß, was man wissen sollte, second., aktualisierte Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 2017.
- [5] EMCDDA, Medical use of cannabis and cannabinoids: Questions and answers for policymaking, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; Publications Office of the European Union, Lisbon, Luxembourg.
- [6] M.A. ElSohly, W. Gul, Constituents of Cannabis Sativa, in: R. Pertwee (Ed.), *Handbook of Cannabis*, Oxford University Press, 2014, pp. 3–22.
- [7] E.B. Russo, Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects, *Br. J. Pharmacol.* 163 (2011) 1344–1364, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>.
- [8] F. Grotenhermen, M. Göttsche, Cannabissorten in Deutschland und ihre Inhaltsstoffe, 2020, <[https://www.cannabis-med.org/nis/data/file/cannabisorten\\_inhaltsstoffe.pdf](https://www.cannabis-med.org/nis/data/file/cannabisorten_inhaltsstoffe.pdf)>, accessed 7 October 2020.
- [9] J.G. Ramaekers, G. Kauert, P. van Ruitenbeek, E.L. Theunissen, E. Schneider, M. R. Moeller, High-potency marijuana impairs executive function and inhibitory motor control, *Neuropsychopharmacology* 31 (10) (2006) 2296–2303, <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301068>.
- [10] J.G. Ramaekers, M.R. Moeller, P. van Ruitenbeek, E.L. Theunissen, E. Schneider, G. Kauert, Cognition and motor control as a function of Delta9-THC concentration in serum and oral fluid: limits of impairment, *Drug Alcohol Depend.* 85 (2006) 114–122, <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2006.03.015>.
- [11] J.G. Ramaekers, G. Kauert, E.L. Theunissen, S.W. Toennes, M.R. Moeller, Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users, *J. Psychopharmacol.* (Oxford) 23 (3) (2009) 266–277, <https://doi.org/10.1177/0269881108092393>.
- [12] R.L. Hartman, M.A. Huestis, Cannabis effects on driving skills, *Clin. Chem.* 59 (2013) 478–492, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194381>.
- [13] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe — findings from the DRUID project, Lisbon, Portugal, 2012.
- [14] H. Gjerde, J. Mørland, Risk for involvement in road traffic crash during acute cannabis intoxication, *Addiction* 111 (8) (2016) 1492–1495, <https://doi.org/10.1111/add.13435>.
- [15] Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin e.V., Fahrignungsbegutachtung bei Cannabismedikation: Handlungsempfehlung der Ständigen Arbeitsgruppe Beurteilungskriterien - StAB - Aktualisierte Fassung August 2018, 2018.
- [16] J. Röhrich, S. Zörnlein, J. Becker, R. Urban, Detection of Delta9-tetrahydrocannabinol and amphetamine-type stimulants in oral fluid using the Rapid Stat point-of-collection drug-testing device, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 155–161, <https://doi.org/10.1093/jat/34.3.155>.
- [17] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2–3) (2007) 216–224, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021>.
- [18] L.D. PAUL, et al., Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, *Toxichem Krimtech* 76 (2009) 142–176.
- [19] L.D. PAUL, et al., Richtlinie der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen Version 02, *Toxichem Krimtech* 85 (2018) 2–6.
- [20] F.T. Peters, et al., Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang B: Anforderungen an die Validierung von Analysemethoden, *Toxichem Krimtech* 76 (2009) 185–208.
- [21] G. Schmitt, M. Herbold, Valistat, ARVECON GmbH, 2011.
- [22] Angie Garcia, Dan Borchardt, Chia-En A. Chang, Michael J. Marsella, Thermal isomerization of cannabinoid analogues, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (46) (2009) 16640–16641, <https://doi.org/10.1021/ja907062v>.
- [23] Paul J. Taylor, Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.* 38 (4) (2005) 328–334, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007>.
- [24] Omnia A. Ismaiel, Matthew S. Halquist, Magda Y. Elmanly, Abdalla Shalaby, H. Thomas Karnes, Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 859 (1) (2007) 84–93, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.09.007>.

- [25] Riet Dams, Marilyn A. Huestis, Willy E. Lambert, Constance M. Murphy, Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid, *J Am Soc Mass Spectrom* 14 (11) (2003) 1290–1294, [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(03\)00574-9](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(03)00574-9).
- [26] H. Stahnke, *Mechanismen und Minimierung von Matrixeffekten in der quantitativen Spurenanalytik mit der Elektrospray-Massenspektrometrie*, Technische Universität Berlin, 2014.
- [27] Helga Trufelli, Pierangela Palma, Giorgio Famigliani, Achille Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (3) (2011) 491–509, <https://doi.org/10.1002/mas.20298>.
- [28] Jinguo Kang, Larry A. Hick, William E. Price, Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (24) (2007) 4065–4072, [https://doi.org/10.1002/\(ISSN\)1097-023110.1002/rcm.v21:2410.1002/rcm.3311](https://doi.org/10.1002/(ISSN)1097-023110.1002/rcm.v21:2410.1002/rcm.3311).
- [29] Michael Kraemer, Burkhard Madea, Cornelius Hess, Detectability of various cannabinoids in plasma samples of cannabis users: Indicators of recent cannabis use? *Drug Test. Anal.* 11 (10) (2019) 1498–1506, <https://doi.org/10.1002/dta.v11.1010.1002/dta.2682>.
- [30] E.L. Karschner, M.J. Swortwood-Gates, M.A. Huestis, Identifying and Quantifying Cannabinoids in Biological Matrices in the Medical and Legal Cannabis Era, *Clin. Chem.* 66 (2020) 888–914, <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa113>.
- [31] Lutfun Nahar, Alev Onder, Satyajit D. Sarker, A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019), *Phytochem. Anal.* 31 (4) (2020) 413–457, <https://doi.org/10.1002/pca.v31.410.1002/pca.2906>.
- [32] W.H. Abd-El Salam, M.A. Alsherbiny, J.Y. Kung, D.W. Pate, R. Löbenberg, LC-MS/MS quantitation of phytocannabinoids and their metabolites in biological matrices, *Talanta* 204 (2019) 846–867, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.053>.

## **4.2 Phytocannabinoidprofile von beschlagnahmtem Cannabis und cannabisbasierten Arzneimitteln – Identifikation potentieller Unterscheidungsmerkmale**

Der Inhalt dieses Kapitels wurde als „Research Article“ veröffentlicht in:

Scheunemann A, Elsner K, Germerott T, Hess C, Zörntlein S, Röhrich J. Extensive phytocannabinoid profiles of seized cannabis and cannabis-based medicines - Identification of potential distinguishing markers. *Forensic Sci Int.* 2021;322:110773. doi:10.1016/j.forsciint.2021.110773.

### **4.2.1 Kurzprofil der Publikation**

In der Arbeit wurde eine LC-MS/MS Analysemethode zur Quantifizierung von 16 verschiedenen Phytocannabinoiden in Cannabis Pflanzenextraktmatrix entwickelt und validiert. Das Analytspektrum umfasste Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Cannabigerol (CBG), Cannabinol (CBN), Cannabichromen (CBC), Cannabicyclol (CBL), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabidivarin (CBDV) sowie deren sauren Vorstufen Tetrahydrocannabinolsäure A (THCAA), Cannabidiolsäure (CBDA), Cannabigerolsäure (CBGA), Cannabinolsäure (CBNA), Cannabichromensäure (CBCA), Cannabicyclolsäure (CBLA), Tetrahydrocannabivarinssäure (THCVA) und Cannabidivarinssäure (CBDVA). Mit dieser Methode wurden Extrakte von beschlagnahmtem Straßencannabis aus dem Landeskriminalamt Mainz, Extrakte verschiedener Medizinalcannabissorten sowie das cannabisbasierte Fertigarzneimittel Sativex® und die Rezeptursubstanz Dronabinol zweier verschiedener Hersteller untersucht. Die resultierenden Phytocannabinoidprofile wurden hinsichtlich potentieller Unterscheidungsmerkmale verglichen. Cannabinoidprofile von Straßen- und Medizinalcannabis wurden mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) verglichen. Sowohl für verschiedene Medizinalcannabissorten als auch Sativex® und Dronabinol wurden potentielle Marker zur Unterscheidung von Straßencannabis identifiziert. Die Marker umfassten beispielsweise erhöhte Konzentrationen von THC und THCV, ein charakteristisches Verhältnis von THC zu CBD unter Anwesenheit von CBC, oder die fast vollständige Abwesenheit seltener Cannabinoide.

### **4.2.2 Abgrenzung des Eigenanteils**

Literaturrecherche, Laborarbeiten, Entwicklung und Validierung der Analysemethode, Aufbereitung und Vermessung der Proben, Auswertung und Interpretation der Messdaten sowie Durchführung und Interpretation der Hauptkomponentenanalyse wurden vollständig von mir durchgeführt. Das Konzept der Studie wurde von mir in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Jörg Röhrich und Frau Dr. Katrin Elsner erstellt. Die Extrakte beschlagnahmter

Straßencannabisproben wurden von Herrn Dr. Siegfried Zörntlein und dem Landeskriminalamt Mainz zur Verfügung gestellt. Das Manuskript wurde von mir erstellt und überarbeitet. Kommentierung und Unterbreitung von Vorschlägen zur Überarbeitung erfolgten durch die Koautoren. Die Arbeit wurde durch Herrn Röhrich und Frau Elsner betreut.

## 4.2.3 Artikel

Forensic Science International 322 (2021) 110773



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/forsciint](http://www.elsevier.com/locate/forsciint)

## Extensive phytocannabinoid profiles of seized cannabis and cannabis-based medicines – Identification of potential distinguishing markers

A. Scheunemann<sup>a,\*</sup>, K. Elsner<sup>a</sup>, T. Germerott<sup>a</sup>, C. Hess<sup>a</sup>, S. Zörntlein<sup>b</sup>, J. Röhrich<sup>a</sup><sup>a</sup> Institute of Legal Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, Am Pulverturm 3, 55131 Mainz, Germany<sup>b</sup> State Office of Criminal Investigation Rhineland-Palatinate, Valenciaplatz 1-7, 55119 Mainz, Germany

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 December 2020

Received in revised form 19 March 2021

Accepted 26 March 2021

Available online 31 March 2021

## Keywords:

Cannabinoids

Cannabis

Dronabinol

Sativex

LC-MS/MS

Principal component analysis

## ABSTRACT

As the frequency of cannabis-based therapy increases, the ability to distinguish intake of cannabis-based medicines from recreational cannabis use becomes desirable. Minor cannabinoids have been suggested to indicate recreational cannabis use in biological matrices but are unreliable when presumably also present in directly plant-derived medicines. Thus, for therapeutics such as medical cannabis, Sativex® and Dronabinol, a more thorough investigation of cannabinoid profiles is required to identify possible distinguishing markers. In this study, 16 phytocannabinoids were quantified in samples of seized and medical cannabis, Sativex® and Dronabinol from two different manufacturers, using a validated LC-MS/MS method. Analytes included delta-9-tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinolic acid A, cannabidiol, cannabidiolic acid, cannabigerol, cannabigerolic acid, cannabinol, cannabinolic acid, cannabichromene, cannabichromenic acid, cannabicyclol, cannabicyclolic acid, tetrahydrocannabivarin, tetrahydrocannabivarinic acid, cannabidivarin and cannabidivarinic acid. Resultant cannabinoid profiles were compared, and markers were suggested. Characteristics of Sativex® included a specific cannabidiol/tetrahydrocannabinol ratio and presence of cannabichromene, while acidic cannabinoids, cannabigerol and cannabinol occurred in only low amounts. As expected, the predominant ingredient in Dronabinol was tetrahydrocannabinol, but minor cannabinoids were quantified as well. Medical marijuana and seized cannabis were compared separately in a principal component analysis. Several medical marijuana varieties were found to significantly differ from seized cannabis, mostly regarding contents of tetrahydrocannabinolic acid A and tetrahydrocannabivarinic acid and cannabidiolic and cannabidivarinic acid respectively.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

With a worldwide prevalence of about 3.8% and a long history of use reaching back to 2700 B.C., *Cannabis sativa* L. has been the most popular illicit drug for several decades [1,2]. The plant exhibits a large spectrum of 545 constituents identified till present [3], the

most famous components being cannabinoids. Commonly known phytocannabinoids include tetrahydrocannabinolic acid A (THCAA), cannabidiolic acid (CBDA), cannabinolic acid (CBNA), cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromenic acid (CBCA), cannabicyclolic acid (CBLA), tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA) and cannabidivarinic acid (CBDVA). Their according neutral forms delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC or THC), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), cannabicyclol (CBL), tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabidivarin (CBDV) are not synthesized by the plant but result from non-enzymatic post-harvest decarboxylation of their acidic analogs under the influence of heat or due to aging. Presence of UV light and oxygen can result in further degradation products (CBN, CBL) [4]. Although cannabis is considered monospecific, domestication and intensive breeding have led to diverse pheno- and chemotypes. Many of them have one predominant cannabinoid such as THCAA or CBDA, while other (minor) cannabinoids such as THCVA occur in lower quantities. However, there are also mixed or cannabinoid-free phenotypes,

**Abbreviations:** CBC, cannabichromene; CBCA, cannabichromenic acid; CBD, cannabidiol; CBDA, cannabidiolic acid; CBDV, cannabidivarin; CBDVA, cannabidivarinic acid; CBG, cannabigerol; CBGA, cannabigerolic acid; CBL, cannabicyclol; CBLA, cannabicyclolic acid; CBN, cannabinol; CBNA, cannabinolic acid; EMV, electron multiplier voltage; ESI, electrospray ionization; IS, isotopically-labeled internal standard; ISTD, internal standard working solution; LOQ, limit of quantification; LOD, limit of detection; PC, principal component; PCA, principal component analysis; S/N, signal-to-noise ratio; THC or  $\Delta^9$ -THC, delta-9-tetrahydrocannabinol; THCAA, tetrahydrocannabinolic acid A; THC-COOH, 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol; THCV, tetrahydrocannabivarin; THCVA, tetrahydrocannabivarinic acid

\* Corresponding author.

E-mail address: [anne.scheunemann@uni-mainz.de](mailto:anne.scheunemann@uni-mainz.de) (A. Scheunemann).<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.110773>

0379-0738/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

which results in a diverse spectrum of phytocannabinoid profiles in *Cannabis sativa* [4].

Apart from their well-researched psychoactive and neurotoxic properties [5,6], therapeutic effects of cannabinoids have also been explored in the recent years. Although research is still in its infancy, positive influences of THC and CBD, for example on spasticity due to multiple sclerosis, chronic pain, anorexia or epilepsy, are well documented [2,7]. Moreover, other therapeutic effects of other (minor) cannabinoids such as CBC, CBG, THCV or CBDV are discussed [8]. Therapy with cannabis-based medicines has increased recently in Germany, with about 150,000 prescriptions in the first half of 2020 [9–11]. Several substances are available, of which some are fully synthetic, while others are based on plant extracts. (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (Dronabinol), mostly prescribed as a 2.5% magistral preparation for oral application, has various indications. A synthetic version of the substance, derived from synthetic CBD, is provided by THC Pharm, while Dronabinol from Bionorica ethics is extracted directly from medical-grade cannabis plants [12,13]. Sativex® is an oromucosal spray approved for severe spasticity due to multiple sclerosis. It contains Nabiximols, an approximately equal mixture of two plant extracts standardized on THC and CBD respectively [14]. Additionally, various THC-/CBD-predominant or mixed varieties of medical-grade marijuana can be prescribed [15].

When participating in road traffic under therapy with cannabis or cannabis-based medicine in Germany, patients must assure their ability to conduct a vehicle before departure. Sometimes, the patient's general fitness to drive is evaluated in a medical-physiological assessment, which, among others, examines risk of additional recreational use of drugs [16]. For valuation of the latter, the ability to detect additional recreational use of cannabis next to medical cannabis or cannabis-based medicine is crucial. In the past, minor cannabinoid markers such as THCVA or THCAA have been suggested for verification [17,18]. While these markers suffice when medicines contain THC exclusively, they are unreliable when therapeutics' cannabinoid profiles are not fully known and might include minor cannabinoids like THCAA or THCVA as well. This applies to the three most frequently prescribed cannabis(extract)-based medicines Sativex®, Dronabinol from Bionorica, and medicinal-grade cannabis [11]. In order to identify distinguishing markers for intake of these medicines apart from recreational cannabis use, a thorough investigation of their respective phytocannabinoid profiles appears crucial.

Differentiating use of medical and street cannabis might seem a complex undertaking, as in both cases the same monospecific plant *Cannabis sativa* L. is applied. However, an earlier study by Hazekamp and Fishedick [19] discovered significant differences between street cannabis strains and one medical variety. Based on these findings, an investigation of additional cannabinoids and cannabis varieties might discover further differences. Cannabinoid profile data of different medical cannabis strains could assist in verifying the identity of (medical) cannabis, for example in case of confiscation. Quantities of minor cannabinoids are also of interest regarding their therapeutic potential.

In this study, extensive profiles including 16 phytocannabinoids were established for 27 samples of seized cannabis, 9 different medical cannabis varieties (Bedrocan®, Bedica®, Bediol®, Bedrolite®, Pedanios 22/1, Red No. 2, Orange No. 1, Green No. 3 and Penelope) as well as Sativex® and 2.5% preparations of Dronabinol from Bionorica ethics and THC Pharm. The latter was included in the study to investigate possible residual cannabinoids other than THC in comparison to Dronabinol from Bionorica. Phytocannabinoid profiles included THC, THCAA, CBD, CBDA, CBN, CBNA, CBG, CBGA, CBC, CBCA, CBL, CBLA, THCV, THCVA, CBDV and CBDVA, which were quantified using a validated LC-MS/MS method. Cannabinoid profiles of all samples were compared as boxplots. Additionally, medical and seized cannabis were compared separately via principal component

analysis (PCA). For this comparison, acidic and neutral forms of a cannabinoid were combined in 'total' cannabinoid concentrations in order to estimate approximate cannabinoid quantities applied when smoking/vaporizing the samples. The data were used to identify possible characteristics of Sativex®, Dronabinol and medical cannabis in contrast to seized cannabis.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Reference standards for THC-d3, THC-COOH-d9, CBD, CBD-d3, CBDA, CBN-d3, CBNA, CBG, CBGA, CBC, CBCA, CBL, THCV, THCVA, CBDV and CBDVA were obtained from Cerilliant (Round Rock, Texas, USA), CBG-d9 and CBC-d9 were purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, Michigan, USA), CBN and THC from LGC Standards, and THCAA from THC Pharm (Frankfurt a. M., Germany). All standards were certified reference material and had a purity of at least 99.0%, except for THCAA, CBC, CBC-d9, CBCA, CBL, THCVA, CBDV and CBDVA (97.7% purity), THC-d3 (96.7% purity), and CBG-d9 (95.0% purity).

Chemicals were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), except for methanol (Fisher Scientific (Loughborough, UK)) and acetonitrile (AppliChem (Darmstadt, Germany)). Chemicals used in LC-MS/MS measurement processes were LC-MS grade; all other chemicals were HPLC grade, except for acetone and dichloromethane, which had a purity of 99.8% and 99.5% respectively.

### 2.2. LC-MS/MS analysis

Quantitative analysis was performed using an UHPLC 1290 Infinity from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) and an Agilent Technologies 6490 Triple Quad. Chromatography was performed using a C18 column (ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2.1 × 100 mm 1.8- $\mu$ , Agilent) at 30 °C with 5.00  $\mu$ L sample injection volume at a flow rate of 0.6 mL/min. Mobile phase A was 5 mM ammonium formate in water, mobile phase B consisted of 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile. Analytes were separated with the following elution: 65% mobile phase B for the first 4.5 min, changed to 80% B and increased to 80.9% B at 7.50 min, changed to 100% B till 9.50 min. The column was re-equilibrated with 65% B for 4.5 min. Total run time was 14 min. Analytes were measured using electrospray ionization (ESI) in positive and negative reaction mode with a gas temperature of 250 °C, gas flow of 15 L/min, nebulizer pressure of 20 psi, sheath gas heater temperature of 400 °C, sheath gas flow of 12 L/min, capillary voltage of 4000 V and a nozzle voltage of 1000 V. Measuring time was divided into 6 separate time segments from 0 to 1.5 min, 1.5–2.75 min, 2.75–4.85 min, 4.85–5.86 min, 5.86–8.2 min and 8.2–9.5 min. An electron multiplier voltage (EMV) was set for segments 2 (–300 V), 3 ( $\pm$ 300 V), 4 (–400 V) and 5 ( $\pm$ 400 V). Dwell time was 35 ms for segment 2, 50 ms for segment 3, 120 ms for segment 4 and 42 ms for segment 5. MS/MS specifications are presented in [supplementary Table S1](#).

A methanolic internal standard working solution (ISTD) was prepared containing 0.004 ng/ $\mu$ L of THC-COOH-d9, 0.1 ng/ $\mu$ L of THC-d3, 0.005 ng/ $\mu$ L CBD-d3, 0.2 ng/ $\mu$ L CBC-d9, 0.001 ng/ $\mu$ L CBN-d3 and 0.01 ng/ $\mu$ L CBG-d9. Analytes without corresponding deuterated analogs were referred to the following isotopically-labeled internal standards (IS): THC-COOH-d9 was IS for CBDV, CBC-d9 was IS for CBGA, CBDVA, CBDA, THCVA, CBNA, CBLA, CBCA and THCAA, CBD-d3 was IS for CBL, and CBG-d9 was IS for THCV. Samples were measured as 50  $\mu$ L aliquots, spiked with 50  $\mu$ L ISTD. Analytes were calibrated in methanol, using calibration levels listed in [supplementary Table S2](#). CBLA was calibrated separately due to rearrangement processes of CBCA to CBLA. Calibration curves for THCAA, CBGA and CBDVA were

weighted with  $1/x$  and curves for CBD, CBDA, CBN, CBNA and CBLA with  $1/x^2$ .

The method was validated according to current standards of the German Society of Toxicological and Forensic Chemistry (GTFCh) [20,21], using the Valistat 2.0 statistics program [22]. Validation parameters included: selectivity, linearity, intra- and interday precision, bias, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). All parameters were tested with methanol as a blank matrix. For LOD, a signal-to-noise ratio (S/N) of at least 3:1, and for LOQ, an S/N of at least 10:1 was required. LOD and LOQ of CBL were determined by its target ion  $m/z$  315.2→235.2 due to insufficient fragmentation and low signals of its qualifier ion. Intraday precision, interday precision and bias were determined for low and high concentrations relative to calibration ranges. Validation data are presented in [supplementary Table S3](#).

### 2.3. Sample collection and preparation

27 extracts of different street cannabis samples, seized from May to December 2017, were obtained from the State Office of Criminal Investigation Rhineland-Palatinate. 100 mg of each ground cannabis sample had been sonicated in 10 mL ethanol at 70 °C for 25 min, and 50 µL aliquots of the resultant extracts had been further diluted with 4.5 mL ethanol each, in order to comply with narcotic control regulations. Seized cannabis extracts were measured undiluted and in further methanolic dilutions of 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 and 1:500.

The medical cannabis varieties Bedrocan®, Bedica®, Bediol® and Bedrolite® were purchased from Bedrocan International B.V. (Veendam, Netherlands). Red No. 2, Orange No. 1, Green No. 3 and Penelope were obtained from Spektrum Cannabis GmbH (St. Leon-Rot, Germany), and Pedanios 22/1 was purchased from Aurora Cannabis Enterprises Inc. (Cremona, Canada) via Pedanios GmbH (Berlin, Germany). All medical cannabis varieties were ordered in March 2018. Approximately 1–1.5 g of each variety were ground with an Ultra-Turrax Tube Drive from IKA® GmbH & CO. KG (Staufen, Germany). For every variety, duplicate samples each of 100 mg ground cannabis were sonicated in 10.0 mL methanol at 70 °C for 25 min. During method development, extractions in ethanol and methanol were tested. No significant differences in resultant cannabinoid concentrations were detected, except for slightly higher CBCA, CBLA and CBNA concentrations in methanol. All medical marijuana extracts were measured as 1:10, 1:100, 1:1000 and 1:10,000 methanolic dilutions.

Sativex®, ordered in January 2020, was obtained from GW Pharmaceuticals (Cambridge, United Kingdom) via Almirall Hermal GmbH (Reinbek, Germany). It was measured in 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000 and 1:100,000 methanolic dilutions.

Dronabinol resin, ordered in January 2020, was obtained from Bionorica ethics GmbH (Neumarkt, Germany) and from THC Pharm GmbH (Frankfurt a. M., Germany). 50 mg of each resin were solved in 2.0 mL ethanol in order to obtain a 2.5% [mg/L] Dronabinol solution. 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10,000 and 1:100,000 methanolic dilutions of the Dronabinol solutions were measured.

### 2.4. Data analysis

Data were analyzed and illustrated using Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) and IBM SPSS® Statistics 23 (International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, New York, USA). Principal component analysis (PCA) was performed using PAST 4.02 software for scientific data analysis (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo, Norway) [23,24]. Data were normalized, using subtraction of their arithmetic means and division by their standard deviations, and plotted in a variance-covariance matrix. The first 2 components (PC 1 and PC 2) were visualized in a biplot. Loading plots of the PCs were

provided as [supplementary data](#). For more information, you are referred to the PAST software manual [25].

### 2.5. Calculation of total cannabinoid concentrations

Total cannabinoid amounts were calculated with the following formula:

$$\text{Total cannabinoid amount} = \text{amount [neutral form]} + \text{amount [acidic form]} \\ * \text{mass correction factor}$$

The mass correction factor comprises differences in the molar mass between acidic and neutral form [26]. For example, the total amount of THC was calculated as  $\text{THC}_{\text{total}} = [\text{THC}] + [\text{THCAA}] * M(\text{THC}) / M(\text{THCAA}) = [\text{THC}] + [\text{THCAA}] * 0.877$ . Following mass correction factors were used: 0.877 (THCA, CBDA, CBCA and CBLA), 0.878 (CBGA), 0.876 (CBNA) and 0.867 (CBDVA and THCVA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Quantitative sample analysis and PCA

Cannabinoid concentrations were expressed as mass fraction (weight per weight). Resultant phytocannabinoid profiles are presented in [Table 1](#). Total cannabinoid concentrations (see [Table 2](#)) were calculated for seized and medical cannabis samples as described above for better comparability and to estimate approximate cannabinoid quantities applied when smoking/vaporizing. Boxplots of acidic and neutral cannabinoid concentrations of all samples are presented in [Figs. 1–8](#). For better comparability, medical cannabis varieties were assigned to 4 different types (see [3.1.2](#)).

Total cannabinoid concentrations were also analyzed via principal component analysis (PCA). PCA is a mathematical tool for data reduction and visualization of patterns (i.e. similarities and differences) in datasets. Multidimensional data are summarized in few, meaningful principal components (PC), which allows the display in a clear 2- or 3-dimensional coordinate system. Data are not discarded but expressed as a vector of the original data. PCs convey variances among the original characteristics, and the higher the described variation within a variable is, the higher is the influence (loading) of this particular variable on the PC (displayed in loading plots). PC scores of the samples along with loadings of the original variables on the PCs (shown as vectors) are visualized in a biplot. Items clustering in similar areas in this plot should exhibit similar properties, while separated items can be expected to differ with regard to the respective vector. For more information, you are referred to the according literature [27–29].

A PCA of total cannabinoid concentrations of all cannabis extract samples was carried out to investigate whether seized and medical samples were separated by their cannabinoid profiles, and whether medical samples with comparable THC and CBD levels clustered together, exhibiting overall similar profiles. [Fig. 9](#) shows the biplot of PC 1 and 2. Corresponding loading plots for PC 1 and 2 are displayed in [supplementary Figures SF1a and b](#).

The data were used to identify possible characteristic features for Sativex®, Dronabinol and medical cannabis in contrast to seized cannabis.

#### 3.1.1. Phytocannabinoid profiles of seized cannabis

$\text{THC}_{\text{total}}$  concentrations ranged from 0.8% to 18.8% in seized cannabis samples s1 – s27.  $\text{CBD}_{\text{total}}$  concentrations were much lower with 0.002–0.65%, except for two samples (s6 and s19) with higher quantities. Concentrations of  $\text{CBG}_{\text{total}}$  and  $\text{CBC}_{\text{total}}$  lay in similar ranges with 0.01–1.71% ( $\text{CBG}_{\text{total}}$ ) and 0.1–2.9% ( $\text{CBC}_{\text{total}}$ ). Ranges of  $\text{CBN}_{\text{total}}$ ,  $\text{CBL}_{\text{total}}$  and  $\text{THCV}_{\text{total}}$  were approximately 10 times lower with 0.007–0.24% ( $\text{CBN}_{\text{total}}$ ), 0.02–0.36% ( $\text{CBL}_{\text{total}}$ ) and 0.004–0.29%

**Table 1**  
Cannabinoid concentrations in seized and medical cannabis extracts, Sativex® and Dronabinol.

Sample	THC [%]	THCAA [%]	CBD [%]	CBDa [%]	CBN [%]	CBNA [%]	CBC [%]	CBCA [%]	CBCB [%]	CBL [%]	CBLA [%]	THCV [%]	THCVA [%]	CBDV [%]	CBDVA [%]
s1	0.2	1.0	0.0002	0.002	0.001	0.008	0.009	0.06	0.005	0.04	0.003	0.01	n.d./ <LOD	0.0001	
s2	2.1	9.9	0.0022	0.025	0.013	0.077	0.083	0.61	0.003	0.03	0.012	0.05	n.d./ <LOD	0.0020	
s3	2.4	16.1	0.0023	0.044	0.018	0.120	0.091	0.60	n.d./ <LOD	0.03	0.015	0.08	n.d./ <LOD	0.0027	
s4	0.8	1.9	0.0014	0.009	0.003	0.022	0.034	0.07	0.002	0.02	0.005	0.01	n.d./ <LOD	0.0011	
s5	0.8	3.0	0.0008	0.007	0.003	0.016	0.008	0.10	0.002	0.05	0.010	0.03	n.d./ <LOD	0.0007	
s6	1.4	4.8	1.0070	3.598	0.010	0.059	0.052	0.30	0.003	0.03	0.007	0.02	0.001479	0.0242	
s7	1.0	8.6	0.0008	0.021	0.004	0.048	0.014	0.14	0.002	0.02	0.003	0.03	n.d./ <LOD	0.0008	
s8	1.9	8.5	0.0016	0.040	0.015	0.078	0.028	0.13	0.002	0.02	0.007	0.05	n.d./ <LOD	0.0014	
s9	3.0	18.0	0.0029	0.055	0.013	0.099	0.235	1.57	0.003	0.03	0.019	0.10	0.000392	0.0034	
s10	1.0	18.1	0.0016	0.048	0.005	0.080	0.110	1.53	0.002	0.03	0.012	0.14	n.d./ <LOD	0.0035	
s11	1.8	17.3	0.0015	0.077	0.006	0.124	0.148	1.78	0.002	0.03	0.012	0.16	n.d./ <LOD	0.0035	
s12	0.7	8.3	0.0005	0.033	0.001	0.036	0.023	0.66	0.002	0.03	0.004	0.05	n.d./ <LOD	0.0012	
s13	0.5	2.3	0.0006	0.008	0.001	0.014	0.013	0.08	0.005	0.03	0.004	0.02	n.d./ <LOD	0.0005	
s14	0.4	1.9	0.0003	0.005	0.001	0.008	0.009	0.08	0.3370	0.02	0.004	0.02	n.d./ <LOD	0.0004	
s15	0.6	3.9	0.0007	0.014	0.009	0.040	0.018	0.07	0.003	0.02	0.004	0.02	n.d./ <LOD	0.0007	
s16	0.9	12.8	0.0007	0.026	0.002	0.074	0.018	0.20	0.002	0.03	0.006	0.08	n.d./ <LOD	0.0021	
s17	0.2	4.0	0.0003	0.012	0.001	0.037	0.006	0.04	0.001	0.02	0.002	0.03	n.d./ <LOD	0.0007	
s18	2.2	16.9	0.0021	0.084	0.033	0.156	0.125	1.23	n.d./ <LOD	0.04	0.018	0.31	n.d./ <LOD	0.0053	
s19	3.1	9.5	0.5280	5.762	0.032	0.118	0.166	0.73	0.006	0.03	0.019	0.07	0.001034	0.0493	
s20	1.1	14.0	0.0221	0.712	0.010	0.093	0.075	0.65	0.002	0.03	0.007	0.08	n.d./ <LOD	0.0168	
s21	1.2	13.9	0.0016	0.055	0.005	0.095	0.118	0.44	n.d./ <LOD	0.03	0.011	0.15	n.d./ <LOD	0.0035	
s22	1.2	13.7	0.0018	0.038	0.010	0.082	0.048	0.19	0.002	0.03	0.008	0.06	n.d./ <LOD	0.0021	
s23	2.7	8.1	0.0315	0.207	0.055	0.216	0.113	0.48	0.008	0.02	0.020	0.05	n.d./ <LOD	0.0067	
s24	2.6	12.5	0.0023	0.028	0.016	0.102	0.139	0.97	0.002	0.03	0.019	0.10	n.d./ <LOD	0.0033	
s25	0.3	1.0	0.0007	0.004	0.002	0.018	0.005	0.02	0.003	0.03	0.003	0.01	n.d./ <LOD	0.0004	
s26	0.4	0.6	0.0005	0.003	0.008	0.018	0.005	0.01	0.001	0.02	0.002	0.002	n.d./ <LOD	0.0002	
s27	2.1	17.8	0.0026	0.029	0.019	0.157	0.113	0.87	0.002	0.04	0.014	0.15	n.d./ <LOD	0.0041	
Bedrocan	1.9	23.4	0.0029	0.075	0.006	0.278	0.116	1.029	0.003	0.05	0.017	0.25	0.0000004	0.0009	
Pedamios 22/1	1.8	25.6	0.0024	0.038	0.005	0.144	0.217	4.133	0.002	0.04	0.017	0.19	0.0000005	0.0010	
Red No. 2	1.8	23.0	0.0023	0.058	0.014	0.267	0.214	3.894	0.003	0.05	0.017	0.27	0.0000004	0.0013	
Bedica	3.0	16.2	0.0071	0.035	0.016	0.027	0.353	1.580	0.003	0.03	0.023	0.10	0.0000046	0.0004	
Orange No. 1	1.7	15.1	0.0022	0.031	0.013	0.204	0.051	1.208	0.002	0.03	0.009	0.09	0.0000002	0.0004	
Bediol	1.6	4.7	1.5253	10.006	0.014	0.057	0.027	0.257	0.001	0.02	0.013	0.03	0.003636	0.0485	
Green No. 3	1.0	7.3	1.1977	13.724	0.011	0.149	0.098	0.711	0.001	0.02	0.003	0.02	0.002002	0.0392	
Penelope	0.9	12.8	0.5894	8.053	0.011	0.218	0.093	0.594	0.001	0.03	0.005	0.05	0.001729	0.0415	
Bedrolite	0.04	0.2	0.8009	6.091	0.001	0.003	0.006	0.037	0.001	0.02	0.001	0.004	0.009103	0.2816	
Sativex	3.3	0.001	2.9491	0.011	0.003	0.00006	0.083	0.0001	0.023	0.0001	0.025	0.000004	0.015530	0.00001	
Dronabinol (THC Pharm)	3.4	n.d./ <LOD	0.0001	n.d./ <LOD	0.002	n.d./ <LOD	n.d./ <LOD	n.d./ <LOD	n.d./ <LOD	n.d./ <LOD	0.00001	n.d./ <LOD	n.d./ <LOD	n.d./ <LOD	
Dronabinol (Bionorica)	3.4	0.0002	0.0003	0.001	0.002	0.000003	0.003	0.001337	n.d./ <LOD	n.d./ <LOD	0.003	0.0000004	0.000003	0.0000003	

n.d./ <LOD = not detected/below limit of detection.

**Table 2**  
Total cannabinoid concentrations in extracts of seized cannabis (s1-s27) and medical cannabis.

Sample	THC <sub>total</sub> [%]	CBD <sub>total</sub> [%]	CBN <sub>total</sub> [%]	CBG <sub>total</sub> [%]	CBC <sub>total</sub> [%]	CBL <sub>total</sub> [%]	THCV <sub>total</sub> [%]	CBDV <sub>total</sub> [%]
s1	1.1	0.002	0.007	0.06	1.0	0.03	0.014	0.0001
s2	10.7	0.024	0.081	0.61	0.7	0.03	0.057	0.0017
s3	16.6	0.041	0.123	0.61	0.9	0.03	0.085	0.0024
s4	2.5	0.009	0.163	0.10	0.1	0.02	0.014	0.0010
s5	3.4	0.007	0.016	0.10	1.3	0.04	0.035	0.0006
s6	5.6	4.163	0.061	0.32	0.8	0.03	0.026	0.0224
s7	8.5	0.019	0.046	0.14	0.6	0.02	0.029	0.0007
s8	9.3	0.036	0.083	0.14	0.7	0.02	0.051	0.0012
s9	18.8	0.051	0.100	1.61	0.8	0.02	0.104	0.0034
s10	16.9	0.043	0.075	1.45	1.2	0.02	0.132	0.0031
s11	17.0	0.069	0.115	1.71	1.7	0.03	0.152	0.0031
s12	8.0	0.030	0.033	0.60	1.2	0.02	0.050	0.0010
s13	2.5	0.007	0.014	0.09	0.8	0.03	0.023	0.0005
s14	2.1	0.005	0.007	0.08	0.7	0.36	0.018	0.0004
s15	3.9	0.013	0.044	0.08	0.6	0.02	0.023	0.0006
s16	12.1	0.023	0.067	0.20	0.9	0.02	0.075	0.0018
s17	3.7	0.011	0.034	0.04	0.7	0.02	0.027	0.0006
s18	17.0	0.076	0.169	1.20	2.9	0.04	0.292	0.0046
s19	11.5	5.581	0.135	0.81	1.0	0.02	0.081	0.0438
s20	13.4	0.647	0.092	0.64	0.8	0.03	0.079	0.0146
s21	13.4	0.050	0.088	0.50	0.9	0.03	0.143	0.0030
s22	13.2	0.035	0.082	0.21	0.9	0.03	0.061	0.0018
s23	9.8	0.213	0.244	0.53	0.4	0.02	0.061	0.0058
s24	13.6	0.027	0.105	0.99	1.3	0.03	0.107	0.0029
s25	1.2	0.004	0.018	0.02	0.6	0.02	0.010	0.0003
s26	0.8	0.003	0.024	0.01	0.4	0.02	0.004	0.0001
s27	17.7	0.028	0.157	0.87	1.4	0.04	0.146	0.0036
Bedrocan	22.4	0.07	0.25	1.02	2.2	0.05	0.23	0.0008
Pedarios 22/1	24.2	0.04	0.132	3.85	1.4	0.03	0.19	0.0009
Red No. 2	22.0	0.05	0.247	3.63	1.8	0.04	0.25	0.0012
Bedica	17.2	0.04	0.040	1.74	1.2	0.02	0.11	0.0004
Orange No. 1	14.9	0.03	0.191	0.23	1.0	0.02	0.09	0.0004
Bediol	5.7	10.30	0.064	0.25	1.8	0.02	0.04	0.0457
Green No. 3	7.4	13.23	0.141	0.72	1.8	0.02	0.02	0.0360
Penelope	12.1	7.65	0.201	0.61	1.8	0.03	0.05	0.0377
Bedrolite	0.2	6.14	0.004	0.04	1.3	0.02	0.005	0.2532

(THCV<sub>total</sub>). The lowest concentrations were quantified for CBDV<sub>total</sub> with 0.0001–0.044%. As expected, concentrations of acidic cannabinoids were much higher than those of the according neutral cannabinoids in most samples. Concentrations of acidic, neutral and total cannabinoids are presented in Tables 1 and 2.

When analyzed via PCA (Fig. 9), seized cannabis samples mostly clustered in the center of the biplot, which means they were characterized by moderate concentrations of CBG<sub>total</sub>, CBC<sub>total</sub>, THC<sub>total</sub>, THCV<sub>total</sub> and CBN<sub>total</sub>. In contrast to THC-rich medical cannabis samples with high scores for PC 1, many seized samples also exhibited slight contents of CBD<sub>total</sub> and CBDV<sub>total</sub> (negative PC 1 scores). CBL<sub>total</sub> appeared to be characteristic for those samples as well. However, overall, concentrations did not differ significantly from those of medical cannabis (Fig. 6) and CBL<sub>total</sub> generally only had a low impact, compared to other variables.

It should be noted that, unlike the rest of the collective, seized cannabis extracts were obtained prediluted. Although CBL and CBDV were not detected in 3 and 24 samples respectively, original plant samples could have contained very low quantities of CBL and CBDV. However, these low amounts were not regarded as crucial for the differentiability between seized cannabis material and other samples.

### 3.1.2. Phytocannabinoid profiles of medical cannabis and possible distinguishing markers

To cover the wide spectrum of medical cannabis varieties available, 9 different cannabis strains were analyzed and assigned to one of the following four different types: Bedrocan®, Pedarios 22/1 and Red No. 2, hereinafter denoted as type 1, showed high THC<sub>total</sub> concentrations of 22.0–24.2%, whereas CBD<sub>total</sub> concentrations were very low with 0.04–0.07%. Orange No. 1 and Bedica®, assigned to

type 2, exhibited moderate THC<sub>total</sub> concentrations of 15.0–17.2% and low CBD<sub>total</sub> contents of 0.03–0.04%. Bediol®, Green No. 3 and Penelope, assigned to type 3, exhibited moderate concentrations of both THC<sub>total</sub> (5.7–12.1%) and CBD<sub>total</sub> (7.7–13.2%). Bedrolite® (type 4) exhibited low contents of THC<sub>total</sub> (0.2%) and moderate amounts of CBD<sub>total</sub> (6.1%). CBN<sub>total</sub> concentrations were similar for cannabis types 1–3, ranging from 0.04% to 0.25%, only Bedrolite® exhibiting lower amounts of 0.004%, probably due to its low THC concentration. Concentrations of CBC<sub>total</sub> (0.99–2.21%) and CLB<sub>total</sub> (0.02–0.05%) were similar among all cannabis types, while occurrences of THCV and CBDV, homologs of THC and CBD with propyl instead of pentyl side chains, showed opposite trends among the varieties. THC-rich types 1 and 2 exhibited the highest THCV<sub>total</sub> concentrations of up to 0.25%, while only 0.005% was quantified in Bedrolite®. The highest CBDV<sub>total</sub> concentration, on the other hand, was detected in the CBD-rich variety Bedrolite® (0.25%), whereas types 1 and 2 showed only low amounts with a maximum of 0.001%. Among the varieties, occurrences of CBG<sub>total</sub> were similar to those of THCV<sub>total</sub>, with high concentrations of up to 3.85% in type 1 and only low contents of maximal 0.72% in type 3 and 4. Total cannabinoid concentrations for all medical cannabis varieties are presented in Table 2. Similar to seized cannabis samples, concentrations of acidic cannabinoids were at least 10 times higher than concentrations of their neutral equivalents in most samples. Concentrations of acidic and neutral cannabinoids are displayed in Table 1.

In the PCA of total cannabinoid concentrations (Fig. 9), samples of the same medical cannabis type were plotted close to each other, reflecting generally similar cannabinoid profiles. Together, PC 1 and PC 2 covered 66.3% of the total variance among the samples, demonstrating a high degree of confidence.

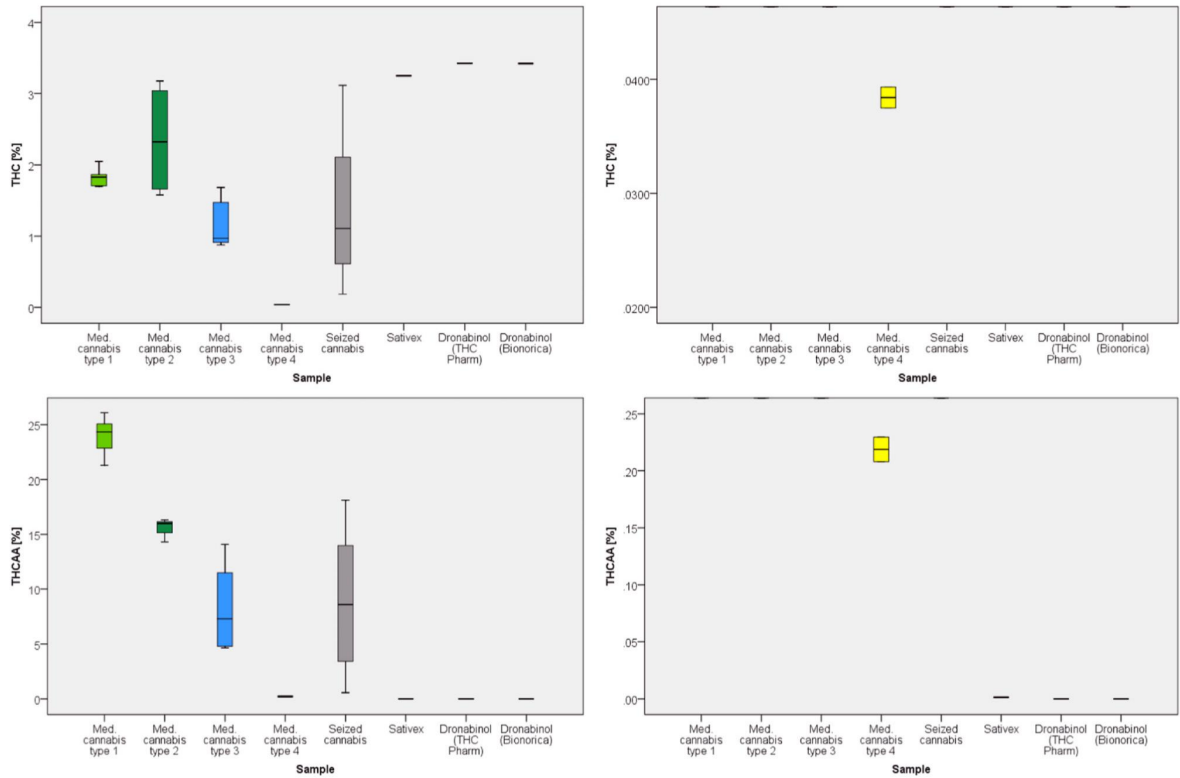


Fig. 1. Boxplots of THC and THCA concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.

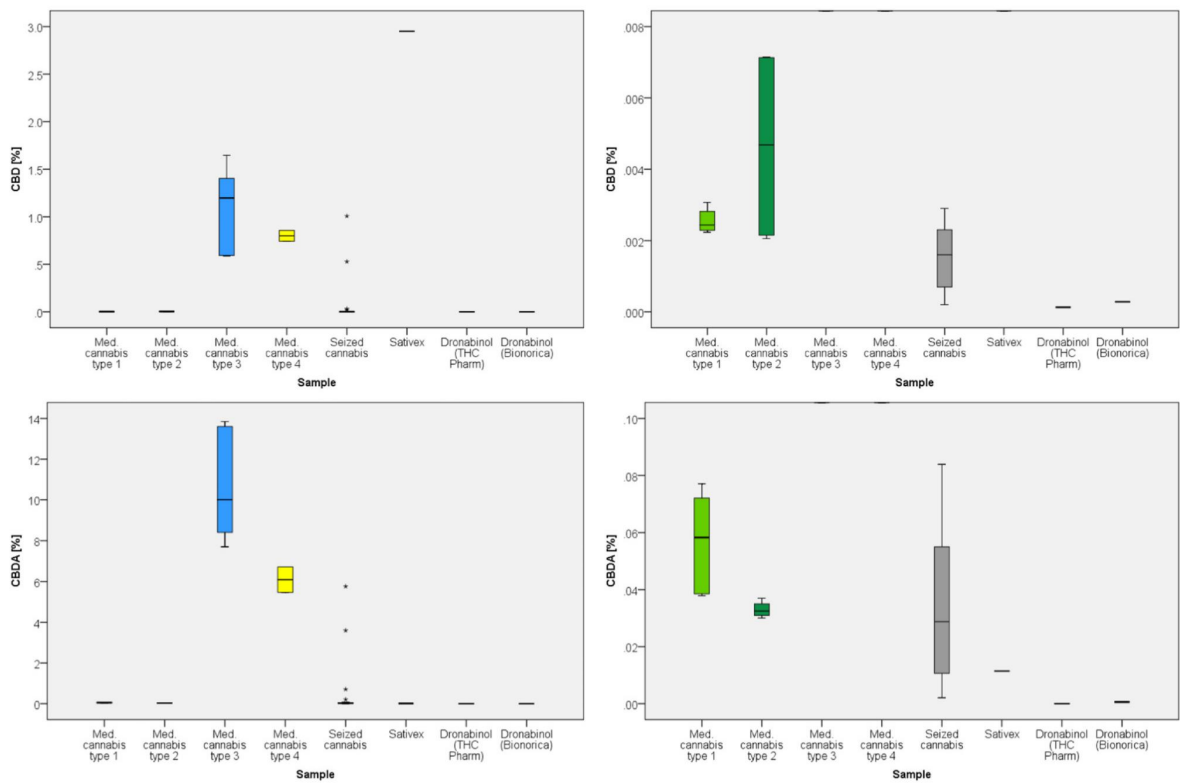


Fig. 2. Boxplots of CBD and CBDA concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.

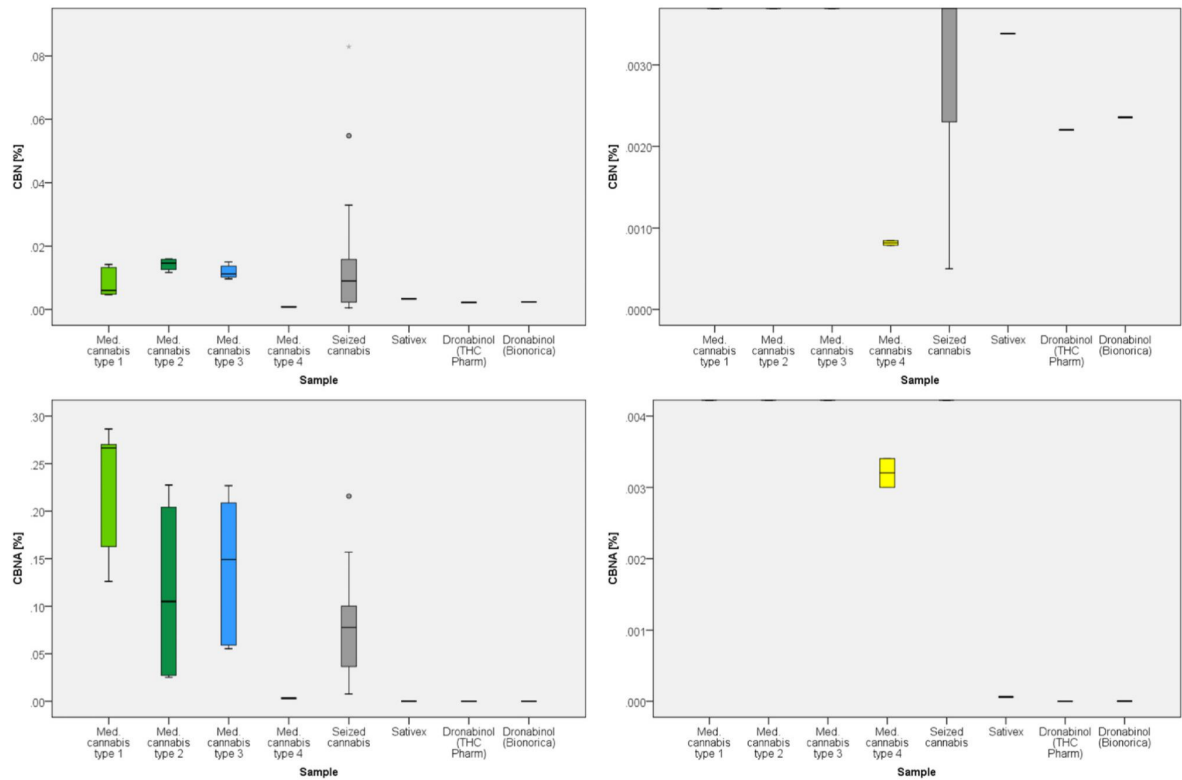


Fig. 3. Boxplots of CBN and CBNA concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.

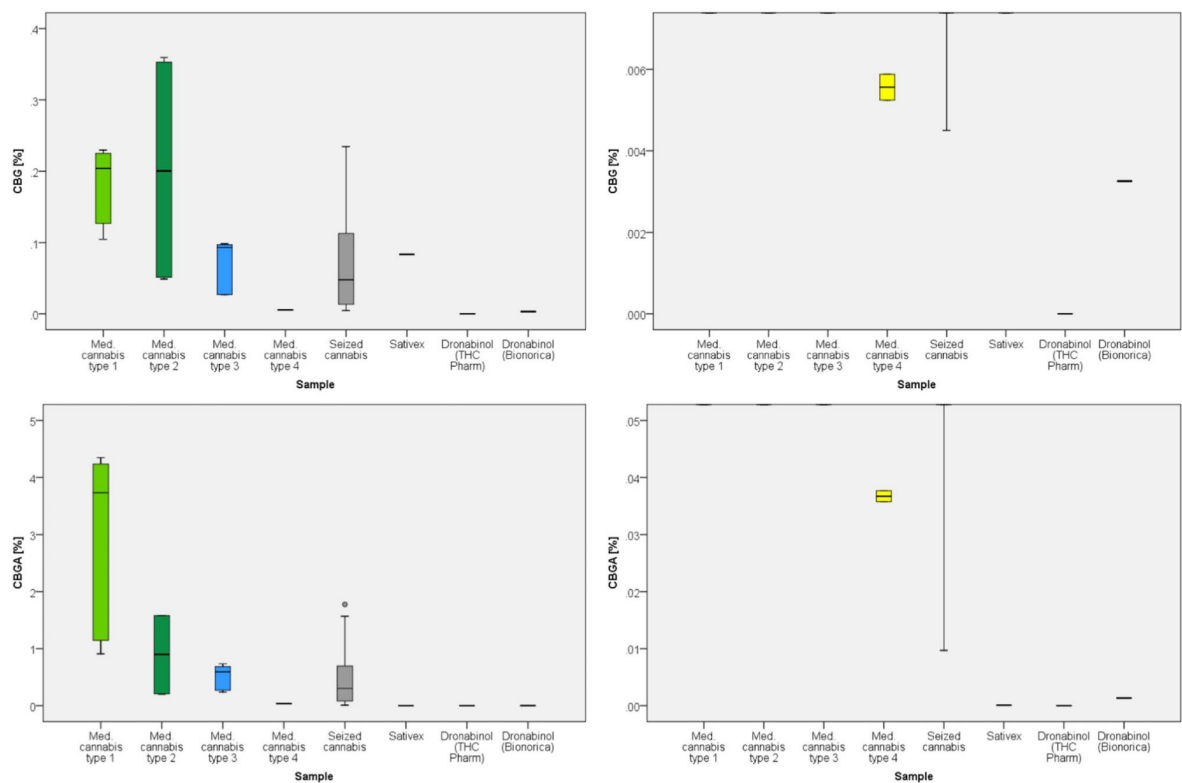


Fig. 4. Boxplots of CBG and CBGA concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.

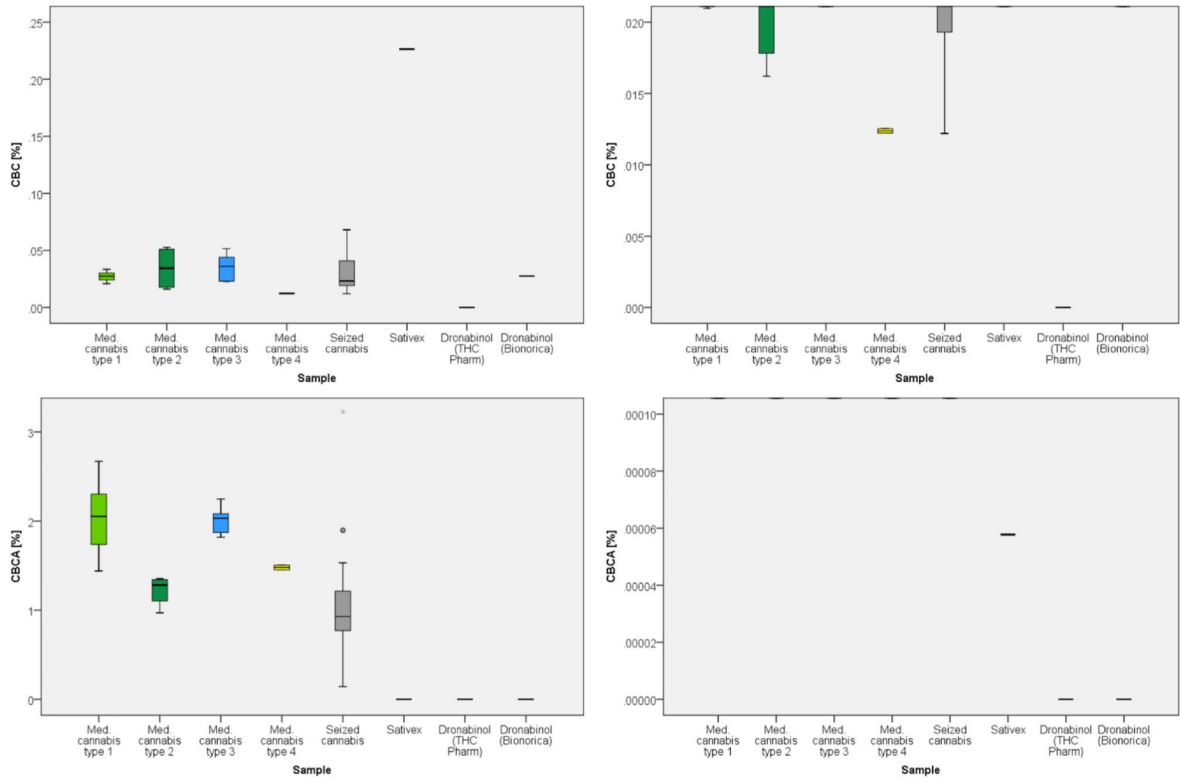


Fig. 5. Boxplots of CBC and CBCA concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.

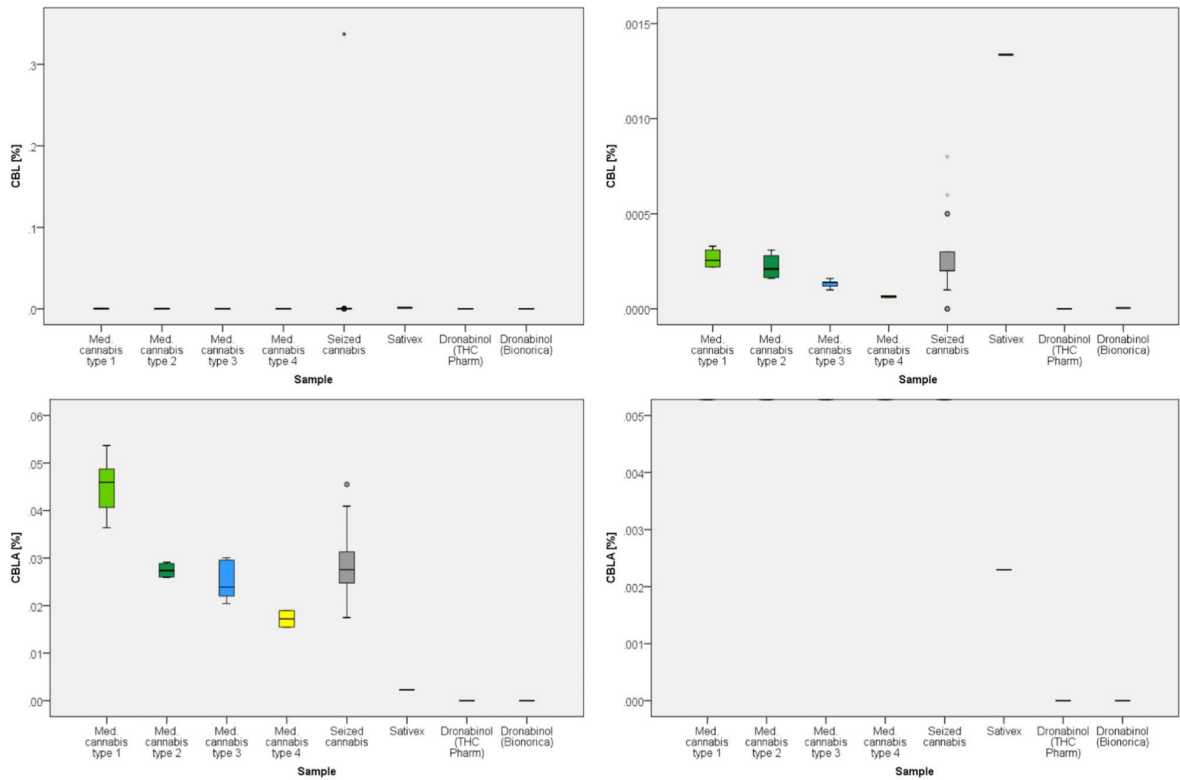


Fig. 6. Boxplots of CBL and CBLA concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.

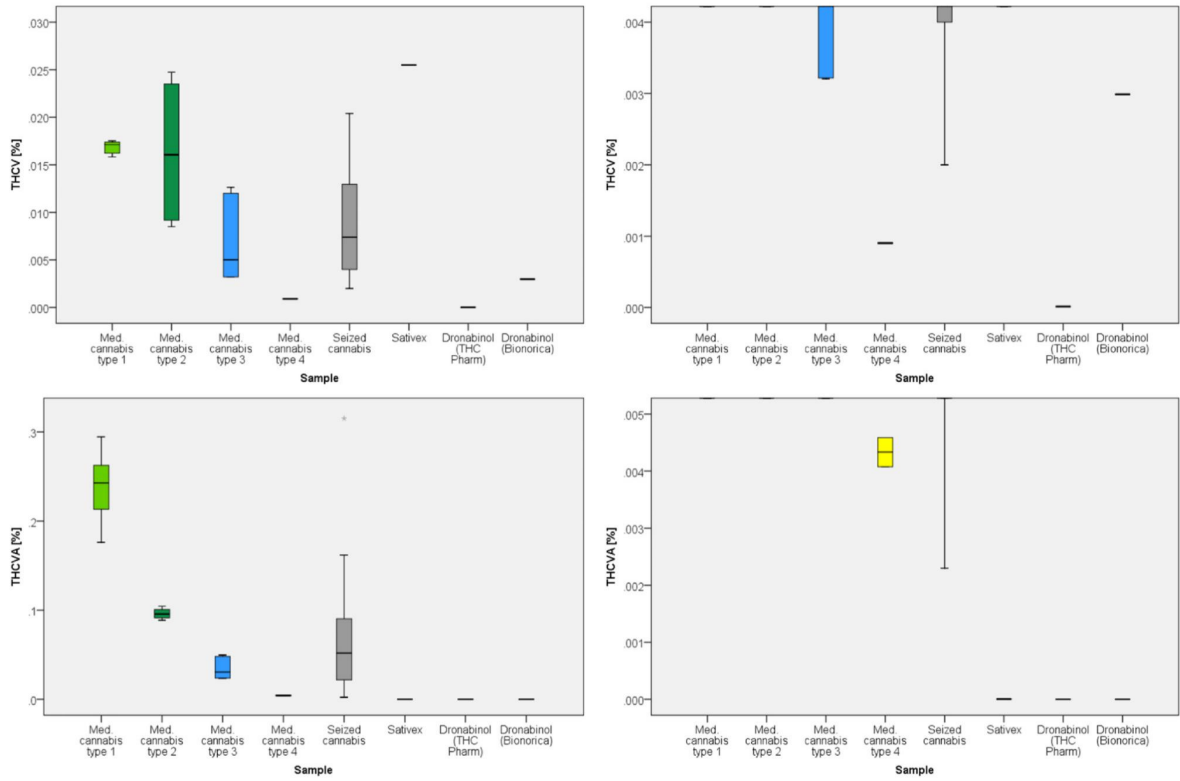


Fig. 7. Boxplots of THCv and THCVa concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.

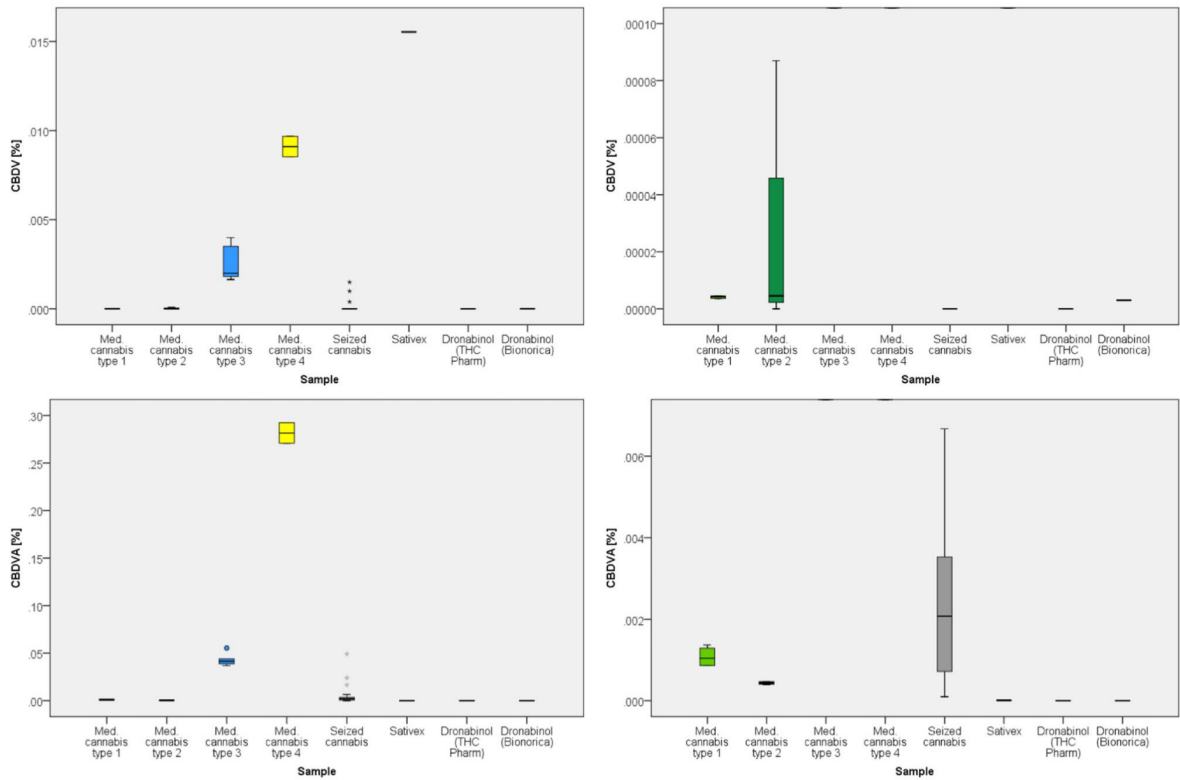
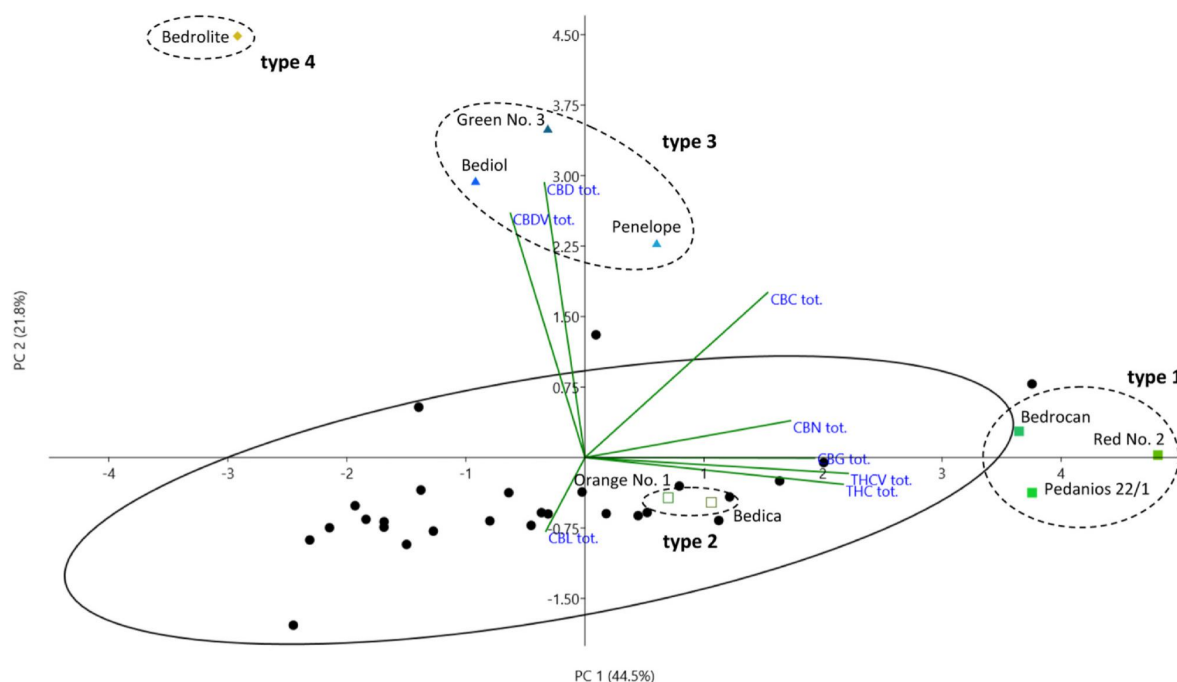


Fig. 8. Boxplots of CBDV and CBDVa concentrations for all samples in full-scale and adjusted-scale.



**Fig. 9.** PCA biplot of medical cannabis (colored squares, triangles and diamond) and seized cannabis samples (black dots) with 95% confidence interval for seized cannabis (solid line). Dashed lines were drawn by the authors to highlight clusters of medical cannabis types only and do not signify confidence intervals or significances. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**3.1.2.1. Medical cannabis type 1.** Samples of medical cannabis type 1 were fully separated from the rest of the collective in Fig. 9 and lay outside the 95% confidence interval of seized cannabis, indicating significantly different cannabinoid profiles. These differences mostly regarded  $\text{THC}_{\text{total}}$  and  $\text{THCV}_{\text{total}}$  contents, due to considerably elevated amounts of THCA and THCVA, as shown in Figs. 1 and 7.  $\text{CBN}_{\text{total}}$  and  $\text{CBG}_{\text{total}}$  contents were also increased but only significantly higher in Red No. 2 and Pedanios 22/1. However, constantly rising potency of street cannabis [30] should be taken into account, as differences detected in this study could become insignificant. Thus, the here presented cannabinoid profiles can rather function as reference points to confirm use or identity of medical cannabis type 1 samples.

**3.1.2.2. Medical cannabis type 2.** Similar to type 1, samples of medical cannabis type 2 were also mostly characterized by  $\text{THC}_{\text{total}}$ ,  $\text{CBN}_{\text{total}}$ ,  $\text{CBG}_{\text{total}}$  and  $\text{THCV}_{\text{total}}$ . However, cannabinoid profiles of this type did not differ significantly from seized cannabis samples in the PCA (Fig. 9).

**3.1.2.3. Medical cannabis type 3.** Samples of medical cannabis type 3 were fully separated from seized cannabis in the PCA (Fig. 9), their most striking and distinguishing feature being a significantly higher concentration of CBDA (Fig. 2), compared to other cannabis samples. CBDV and CBDVA (Fig. 8) contents, although not as high as in Bedrolite®, were also notably elevated. Moreover, CBCA concentrations were significantly higher, compared to seized cannabis samples, except for one outlier. It should be taken into account that seized cannabis samples were extracted in ethanol. Methanolic extracts might exhibit slightly higher concentrations of CBCA. Increasing popularity of CBD-rich cannabis [31] should be considered, as it might exhibit similar CBDA concentrations as medical cannabis of type 3.

**3.1.2.4. Medical cannabis type 4.** Bedrolite® (medical cannabis type 4) was clearly separated from the rest of the cannabis samples and mostly characterized by  $\text{CBD}_{\text{total}}$  and  $\text{CBDV}_{\text{total}}$  (Fig. 9). This variety exhibited significantly higher CBDV and CBDVA concentrations than any other plant extract samples (Fig. 8). CBD and CBDA concentrations were elevated but not as much as in medical cannabis type 3. Contents of other cannabinoids were low.

It should be noted that only one batch of each medical cannabis variety was examined. Although concentrations of THC, CBD and CBN are constantly monitored, THC and CBD levels can fluctuate up to  $\pm 15\%$  in Dutch medicinal cannabis, according to Hazekamp and Fischechick [19], and an average variation (RSD) in cannabinoids of  $\pm 7.6\%$  or  $\pm 5.5\%$  had previously been found for Bedrocan® and Bedica® respectively [32]. However, it is unknown to which extent the fluctuation of cannabinoids affects the discriminability of strains. Pedanios 22/1, for example, was analyzed in June 2018 and in February 2019 [33], and fluctuations of  $\pm 0.8\%$ ,  $\pm 2.4\%$  and  $\pm 22.5\%$  for  $\text{THC}_{\text{total}}$ ,  $\text{CBD}_{\text{total}}$  and  $\text{CBG}_{\text{total}}$  (calculated as described above) were reported. Even with this fluctuation, Pedanios 22/1 would exhibit significantly higher  $\text{THC}_{\text{total}}$  and  $\text{CBG}_{\text{total}}$  concentrations than seized cannabis samples and significantly lower  $\text{CBD}_{\text{total}}$  concentrations than medical cannabis type 3 or 4 in this study. Therefore, further studies are needed to investigate fluctuation of (minor) cannabinoids among different batches and resultant effects on discriminability of medicinal cannabis strains.

Differences in phytocannabinoid profiles might be reflected in biological samples of cannabis users. However, further studies are required to investigate if the identified characteristics can serve as distinguishing markers or points of reference for use of certain medical cannabis strains in biological matrices as well.

### 3.1.3. Phytocannabinoid profile of Sativex® and possible distinguishing markers

As expected, Sativex® mainly exhibited almost equal concentrations for THC and CBD of 3.3% and 3.0% respectively. Among other

(minor) cannabinoids, CBC had the highest concentration with 0.2%. CBG, THCV, CBDV, CBDA, CBN, CBL, CBCA and THCAA were quantified in lower amounts, ranging from 0.001% (THCAA and CBCA) to 0.08% (CBG). The lowest concentrations were detected for CBGA, CBNA, CBLA, CBDVA and THCVA, reaching from 0.000005% (THCVA) to 0.0001% (CBGA). All concentrations are presented in Table 1. Compared to seized cannabis samples, Sativex® exhibited significantly higher concentrations of THC, CBD, CBC, CBL, THCV and CBDV (Figs. 1, 2, 5–8), while quantities of all acidic cannabinoids except for CBDA were lower.

The results should not be adopted as potential distinguishing markers in biological matrices without further considerations. Different application routes as well as decarboxylation of acidic cannabinoids while smoking/vaporizing cannabis need to be taken into account, as  $\text{THC}_{\text{total}}$ ,  $\text{CBC}_{\text{total}}$  and  $\text{THCV}_{\text{total}}$  concentrations of seized samples lay in the same ranges as those of Sativex®. CBD and CBDV concentrations, however, were still higher in Sativex® except for 3 CBD-rich seized cannabis samples (s6, s19 and s20). Low quantities of acidic cannabinoids in Sativex® compared to the plant could also be potentially relevant markers: A study regarding decarboxylation processes of THCAA, CBDA and CBGA by Wang et al. showed that, even at high temperatures of 145 °C, acidic cannabinoids were not fully decarboxylated for several minutes [34] and could thus occur in higher quantities after using cannabis. However, further investigations of other acids such as CBCA or CBDVA and higher temperatures of 180–210 °C, as typically used for vaporizing cannabis [35], are needed for more accurate estimations. An important characteristic of Sativex® is the approximate 1:1 ratio of THC and CBD, which should be mirrored in biological samples of users, as observed in a previous study [36].

In summary, biological samples of Sativex® users could be expected to exhibit elevated concentrations of THC and CBD in a particular ratio and possibly moderate concentrations of CBC. Other cannabinoids such as CBG, CBN and especially acidic compounds should be low-concentrated, if occurring at all. However, further studies with actual biological samples are needed to confirm these findings.

Only one batch of Sativex® was investigated in this study, and further analyses could assist in confirming the presented results for other batches. However, regarding the overall low concentrations of other cannabinoids and the highly regulated production environment of Sativex® [37], a fluctuation should have only little impact on the results of this study.

### 3.1.4. Phytocannabinoid profile of Dronabinol and possible distinguishing markers

THC was the predominant component in both Dronabinol samples with 3.4% (w/w) each, equal to 27 mg/mL. Moreover, CBD, CBN and THCV were quantified in both samples. While concentrations of CBD (0.0001% for THC Pharm and 0.0003% for Bionorica) and CBN (0.002% each) were similar, THCV contents were a hundred times lower in Dronabinol from THC Pharm (0.00001%), compared to Bionorica (0.003%). The latter additionally exhibited contents of CBC, CBG, CBGA and CBDA in concentrations similar to CBD and CBN, ranging from 0.0006% (CBDA) to 0.03% (CBC). Low amounts of THCAA, CBCA, CBDV, CBNA, THCVA and CBDVA were detected as well, reaching from 0.0000003% for CBDVA to 0.00002% for THCAA.

Interestingly, the different manufacturing techniques for Dronabinol were reflected in the respective cannabinoid profiles. Dronabinol from THC Pharm is obtained from fully synthetic cannabidiol without usage of cannabis plants, according to the company, and exhibited only a few minor cannabinoids, which were presumably degradation products or synthesis residues of THC. Dronabinol from Bionorica ethics, on the other hand, is directly extracted from medicinal-grade cannabis plants [12] and contained

marginal amounts of many more different minor cannabinoids. All cannabinoid concentrations of Dronabinol are displayed in Table 1.

Depending on the dose applied, minor cannabinoids might be detected in biological samples of Dronabinol users, although probably in much lower concentrations than after relevant cannabis use. However, further studies should investigate biological samples of Dronabinol and cannabis users to confirm these results.

Although only one batch each of Dronabinol was analyzed, it can be assumed that cannabinoid profiles remain stable in different batches due to standardized manufacturing processes: Both manufacturers carefully monitor THC, CBD and CBN concentrations, and Dronabinol from Bionorica ethics is produced from medicinal-grade cannabis cuttings, which are grown in a regulated environment [38,39]. Variations in the overall very low concentrations of minor cannabinoids should be neglectable.

## 4. Conclusion

16 different phytocannabinoids were quantified in seized and medicinal-grade cannabis, Sativex® and Dronabinol, using a validated LC-MS/MS method. Resultant cannabinoid profiles were compared in order to identify potential markers for the respective substances in plant matrices and possibly in biological samples of users. In accordance with previous findings [31,40], seized cannabis samples exhibited only low contents of CBD. Medicinal-grade cannabis varieties with similar THC and CBD concentrations were found to generally possess similar cannabinoid profiles. When compared via PCA, all medical cannabis varieties except for Bedica® and Orange No. 1 were plotted outside the 95% confidence interval region of seized cannabis in the according biplot, indicating significantly different cannabinoid profiles.

Sativex® and Dronabinol exhibited minor cannabinoids besides CBD and THC or THC respectively. For both, characteristic features were identified. Interestingly, cannabinoid profiles of the Dronabinol samples mirrored the respective manufacturing process, and Dronabinol from Bionorica ethics exhibited more different minor cannabinoids than Dronabinol from THC Pharm.

Markers identified in this study could be verified by analyzing biological samples of patients under cannabis-based therapy. Challenges in the comparison of Sativex® and Dronabinol to recreational cannabis use should be considered, such as the unknown extent of decarboxylation of acidic cannabinoids after smoking/vaporizing, different application routes and varying dosages of cannabis-based medicines and recreational cannabis. Regarding medical cannabis, cannabinoid profiles cannot rule out recreational use of street cannabis instead of medical cannabis use if both strains co-incidentally exhibit similar cannabinoid patterns.

## Acknowledgments

This work was supported by the Level 1 Institutional Research Funding of the University Medical Center Mainz. The authors would like to thank the State Office of Criminal Investigation Rhineland-Palatinate for the kind cooperation and providing the samples.

## CRedit authorship contribution statement

**A. Scheunemann:** Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft and Editing, Visualization. **K. Elsner:** Conceptualization, Funding acquisition, Writing - Review and Editing. **T. Germerott:** Supervision, Funding acquisition, Resources. **C. Hess:** Validation, Writing - Review and Editing, Visualization. **S. Zörntlein:** Resources, Writing - Review and Editing. **J. Röhrich:** Supervision, Conceptualization, Funding acquisition, Writing - Review and Editing, Visualization.

### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.forsciint.2021.110773.

### References

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime, World drug report 2019: 1 - Executive summary. Conclusions and policy implications, 2019, ([https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19\\_Booklet\\_1\\_EXECUTIVE\\_SUMMARY.pdf](https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19_Booklet_1_EXECUTIVE_SUMMARY.pdf)), accessed 23 November 2020.
- [2] P. Cremer-Schaeffer, Cannabis: Was man weiß, was man wissen sollte, 2., aktualisierte Auflage ed., S. Hirzel Verlag, Stuttgart, 2017.
- [3] M.A. ElSohly, W. Gul, Constituents of Cannabis sativa, in: R. Pertwee (Ed.), Handbook of Cannabis, Oxford University Press, 2014, pp. 3–22.
- [4] E. de Meijer, The Chemical Phenotypes (Chemotypes) of Cannabis, in: R. Pertwee (Ed.), Handbook of Cannabis, Oxford University Press, 2014, pp. 89–110.
- [5] R.L. Hartman, M.A. Huestis, Cannabis effects on driving skills, Clin. Chem. 59 (2013) 478–492.
- [6] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe – findings from the DRUID project, 2012, ([https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/743/743DXA12006ENN\\_402402.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/743/743DXA12006ENN_402402.pdf)), accessed 23 November 2020.
- [7] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Medical use of cannabis and cannabinoids: Questions and answers for policymaking, 2018, ([https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/10171/20185584\\_TD0618186ENN\\_PDF.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/10171/20185584_TD0618186ENN_PDF.pdf)), accessed 23 November 2020.
- [8] E.B. Russo, Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects, Br. J. Pharmacol. 163 (2011) 1344–1364.
- [9] H. Gegenfurtner, Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Juni 2018, 2018, ([https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quarterberichte/2018/q2\\_18/Bundesbericht\\_GAmSi\\_201806\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quarterberichte/2018/q2_18/Bundesbericht_GAmSi_201806_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf)), accessed 23 November 2020.
- [10] M. Sahle, Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Juni 2019, ([https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quarterberichte/2019/q2\\_20/Bundesbericht\\_GAmSi\\_201906\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quarterberichte/2019/q2_20/Bundesbericht_GAmSi_201906_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf)), accessed 23 November 2020.
- [11] M. Sahle, Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Juni 2020, ([https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quarterberichte/2020/q2\\_22/Bundesbericht\\_GAmSi\\_202006\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quarterberichte/2020/q2_22/Bundesbericht_GAmSi_202006_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf)), accessed 23 November 2020.
- [12] T. Drenkard, Von der Hanfblüte zum Schmerzmittel, 2015, (<https://www.mittelbayerische.de/region/neumarkt/gemeinden/neumarkt/von-der-hanfbluete-zum-schmerzmittel-22797-art1191365.html>), accessed 23 September 2020.
- [13] Bionorica ethics GmbH, Dronabinol: Informationen zur Herstellung des Rezepturarzneimittels in der Apotheke. Informationen für Fachkreise, 2019, ([https://www.bionorica-ethics.de/Resources/Herstellbroschuere\\_Stand\\_012019.PDF](https://www.bionorica-ethics.de/Resources/Herstellbroschuere_Stand_012019.PDF)), accessed 23 November 2020.
- [14] Almirall Hermal GmbH, Fachinformation Sativex Spray zur Anwendung in der Mundhöhle, 2011, (<https://www.cannabis-med.org/german/sativex.pdf>), accessed 23 November 2020.
- [15] F. Grotenhermen, M. Göttsche, Cannabissorten in Deutschland und ihre Inhaltsstoffe, 2020, ([https://www.cannabis-med.org/nis/data/file/cannabissorten\\_inhaltsstoffe.pdf](https://www.cannabis-med.org/nis/data/file/cannabissorten_inhaltsstoffe.pdf)), accessed 7 October 2020.
- [16] Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin e.V. (DGVM), Fahreignungsbegutachtung bei Cannabismedikation: Handlungsempfehlung der Ständigen Arbeitsgruppe Beurteilungskriterien - StAB - Aktualisierte Fassung August 2018, 2018, ([http://dgv-m-verkehrsmedizin.de/wp-content/uploads/2019/10/Handlungsempfehlung-Cannabismedikation\\_v2\\_Stand-15.08.2018.pdf](http://dgv-m-verkehrsmedizin.de/wp-content/uploads/2019/10/Handlungsempfehlung-Cannabismedikation_v2_Stand-15.08.2018.pdf)), accessed 8 October 2020.
- [17] L. Radünz, F. Westphal, E. Maser, G. Rochholz, THCVA-A - a new additional marker for illegal cannabis consumption, Forensic Sci. Int. 215 (2012) 171–174.
- [18] N. Raikos, H. Schmid, S. Nussbaumer, L. Ambach, S. Lanz, A. Längin, S. König, N. Roth, V. Auwärter, W. Weinmann, Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid A ( $\Delta^9$ -THCA-A) in whole blood and plasma by LC-MS/MS and application in authentic samples from drivers suspected of driving under the influence of cannabis, Forensic Sci. Int. 243 (2014) 130–136.
- [19] A. Hazekamp, J.T. Fishedick, Cannabis - from cultivar to chemovar, Drug Test. Anal. 4 (2012) 660–667.
- [20] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, Forensic Sci. Int. 165 (2007) 216–224.
- [21] W.-R. Bork, S. Stein, N. El-Khadra-Kluth, R. Fritsch, G. Hindorf, A. Jacobsen-Bauer, B. Klein, E. Naujoks, U. Standke, K. Stein, F. Westphal, U. Zerell, Richtlinie zur Qualitätssicherung bei forensisch-chemischen Untersuchungen von Betäubungs- und Arzneimitteln, Toxichem Krimtech 87 (2020) 35–76.
- [22] G. Schmitt, M. Herbold, Valistat, ARVECON GmbH, 2011.
- [23] Ø. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan, PAST (Paleontological statistics), 1999–2020.
- [24] Ø. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan, PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis, Palaeontol. Electron. 4 (2001) 9–17.
- [25] Ø. Hammer, PAST version 4.03 reference manual, 1999–2020, (<https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/downloads/past4manual.pdf>), accessed 29 September 2020.
- [26] Bundesanzeiger, Bekanntmachung zum Deutschen Arzneibuch 2018 - Cannabisblüten. BAnz AT 24.04.2018 B5, 2018, (<https://www.bundesanzeiger.de/pub/publication/6POHRTJUESwGvNh3Uh6/content/6POHRTJUESwGvNh3Uh6/BAnz%20at%2024.04.2018%20B5.pdf?inline>), accessed 23 November 2020.
- [27] Einführung in die multivariate Datenanalyse, in: W. Kessler (Ed.), Multivariate Datenanalyse, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006, pp. 1–20.
- [28] Hauptkomponentenanalyse, in: W. Kessler (Ed.), Multivariate Datenanalyse, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006, pp. 21–88.
- [29] Kalibrieren, Validieren, Vorhersagen, in: W. Kessler (Ed.), Multivariate Datenanalyse, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006, pp. 153–181.
- [30] T.P. Freeman, T. Groshkova, A. Cunningham, R. Sedefov, P. Griffiths, M.T. Lynskey, Increasing potency and price of cannabis in Europe, 2006–16, Addiction 114 (2019) 1015–1023.
- [31] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), European Drug Report 2019: Trends and Developments, 2019, ([https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724\\_TDAT19001ENN\\_PDF.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf)), accessed 23 November 2020.
- [32] J.T. Fishedick, A. Hazekamp, T. Erkelens, Y.H. Choi, R. Verpoorte, Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes, Phytochemistry 71 (2010) 2058–2073.
- [33] B. Jung, Medizinalhanf: Welche Rolle spielt das Terpenprofil?, 2019, (<https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2019/05/23/medizinalhanf-welche-rolle-spielt-das-terpenprofil/chapter:all>), accessed 21 September 2020.
- [34] M. Wang, Y.-H. Wang, B. Avula, M.M. Radwan, A.S. Wanas, J. van Antwerp, J.F. Parcher, M.A. ElSohly, I.A. Khan, Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry, Cannabis Cannabinoid Res. 1 (2016) 262–271.
- [35] A. Hazekamp, G. Pappas, Self-Medication with Cannabis, in: R. Pertwee (Ed.), Handbook of Cannabis, Oxford University Press, 2014, pp. 319–338.
- [36] G.W. Guy, P.J. Robson, A phase I, double blind, three-way crossover study to assess the pharmacokinetic profile of cannabis based medicine extract (CBME) administered sublingually in variant cannabinoid ratios in normal healthy male volunteers (GWPK0215), J. Cannabis Ther. 3 (2004) 121–152.
- [37] D.J. Potter, A review of the cultivation and processing of cannabis (Cannabis sativa L.) for production of prescription medicines in the UK, Drug Test, Analysis 6 (2014) 31–38.
- [38] W. Wagner, Lupenreines Cannabis aus staatlicher österreichischer Produktion, 2018, (<https://www.diepresse.com/5463487/lupenreines-cannabis-aus-staatlicher-osterreichischer-produktion>), accessed 12 October 2020.
- [39] C. Schmergal, Gesundheit Grün ist die Hoffnung - DER SPIEGEL 27/2016, 2016, (<https://www.spiegel.de/spiegel/print/d-145638296.html>), accessed 12 October 2020.
- [40] S. Chandra, M.M. Radwan, C.G. Majumdar, J.C. Church, T.P. Freeman, M.A. ElSohly, New trends in cannabis potency in USA and Europe during the last decade (2008–2017), Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 269 (2019) 5–15.

**Ergänzende Informationen**

Supplementary Table S1: LC-MS/MS specifications

Compound	Precursor ion ( <i>m/z</i> )	Product ion 1 ( <i>m/z</i> )	Collision energy 1 (eV)	Product ion 2 ( <i>m/z</i> )	Collision energy 2 (eV)	Polarity	Retention time (min)
CBDVA	329.2	311.2	18	217.1	22	Negative	1.85
THC-COOH-d9	352.3	308.3	22	254.3	30	Negative	2.08
CBDV	285.2	217.1	18	107	34	Negative	2.17
CBDA	357.2	339.2	22	245.2	30	Negative	3.15
CBGA	359.2	341.2	18	315.2	22	Negative	3.55
CBG-d9	326.3	202.2	10	123	40	Positive	3.84
CBG	317.3	193.1	10	123	40	Positive	3.91
CBD-d3	318.3	196.1	22	123	40	Positive	4.02
CBD	315.2	193.1	22	123	40	Positive	4.05
THCV	287.2	123	40	231.1	22	Positive	4.07
THCVA	329.2	285.2	22	217.1	30	Negative	5.15
CBN-d3	312.2	282.1	40	222.1	52	Negative	5.5
CBN	309.2	279.1	40	222.1	52	Negative	5.52
CBNA	353.2	309.2	26	279.1	38	Negative	5.81
THC-d3	318.3	196.1	22	123	40	Positive	6.04
THC	315.2	193.1	22	123	40	Positive	6.04
CBL	315.2	235.2	18	165.1	22	Positive	6.52
CBC-d9	324.3	202.2	14	268.2	14	Positive	6.64
CBC-d9	322.3	200.2	22	212.2	35	Negative	6.64
CBC	315.2	193.1	14	259.2	14	Positive	6.7
THCAA	357.2	313.2	30	245.2	34	Negative	6.72
CBCA	357.2	313.2	22	191.1	26	Negative	7.06
CBLA	357.2	313.2	26	191.1	26	Negative	7.24

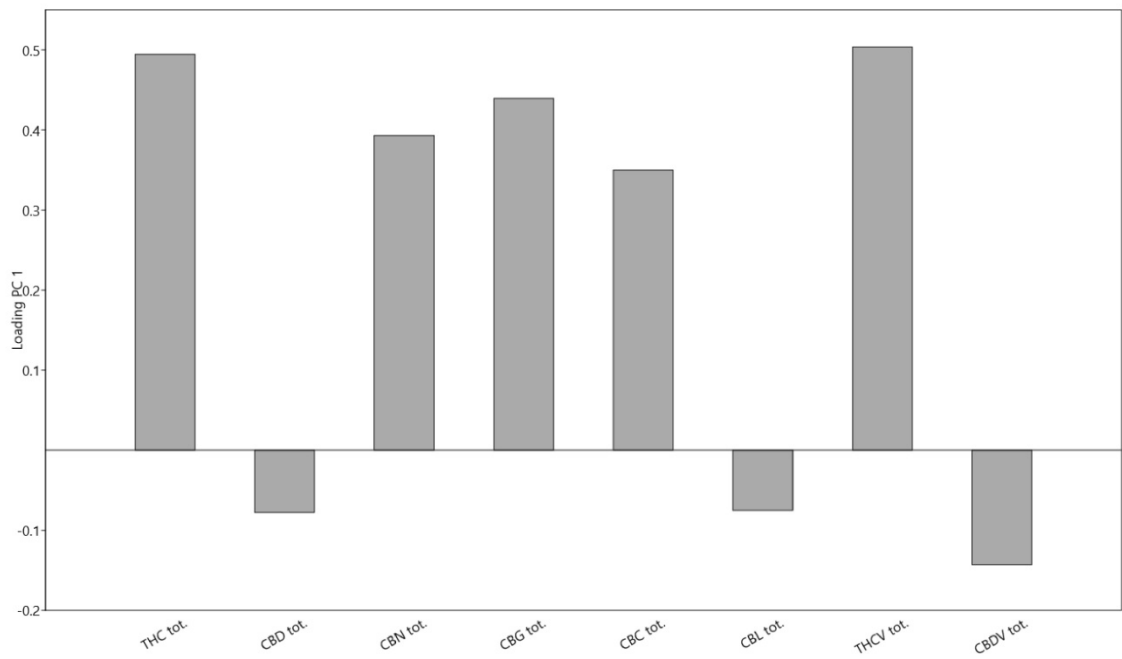
Product ion 1 = target ion, product ion 2 = qualifier ion

Supplementary Table S2: Calibration levels 1-8 in methanol

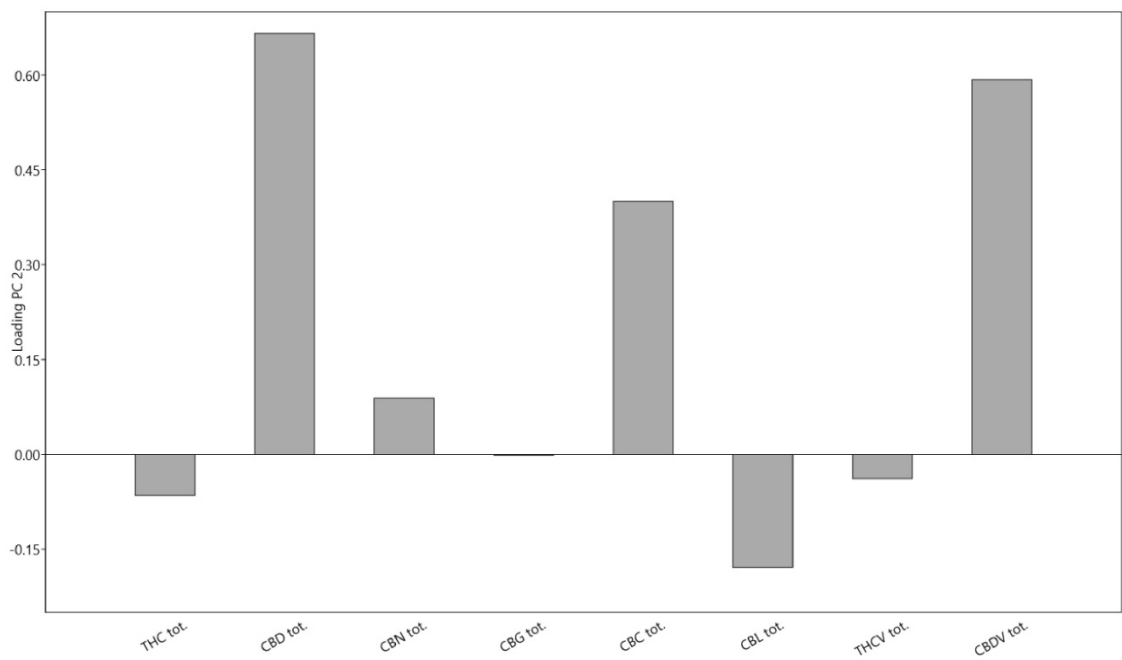
Calibration level	1	2	3	4	5	6	7	8	
CBCA, THC, THCAA	10	25	50	100	200	300	400	500	ng/mL
CBG, CBGA, CBLA, CBNA, THCVA	1	2.5	5	10	20	30	40	50	ng/mL
THCV	0.5	1.25	2.5	5	0	15	20	25	ng/mL
CBDA	0.4	1	2	4	8	12	16	20	ng/mL
CBL	0.2	0.5	1	2	4	6	8	10	ng/mL
CBDVA	0.1	0.25	0.5	1	2	3	4	5	ng/mL
CBDV	1.25	2.5	5	10	15	20	25		ng/mL
CBD	0.5	1	2	4	6	8	10		ng/mL
CBN	0.25	0.5	1	2	3	4	5		ng/mL
CBC	0.5	1	2	3	4	5			ng/mL

Supplementary Table S3: Method validation data

Analyte	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]	Bias [%]		Intraday precision [%]		Interday precision [%]	
			low	high	low	high	low	high
THC	0.014	10	6.1	2.1	2.8	2.4	3.9	2.8
THCAA	0.01	10	5.2	4.3	9.4	3.9	11.9	4.2
CBD	0.2	0.5	5.0	6.0	2.2	3.0	6.8	3.5
CBDA	0.04	0.4	-1.3	-1.2	11.2	6.1	14.4	7.5
CBN	0.25	0.25	2.2	4.3	4.8	4.7	5.5	5.0
CBNA	0.005	1.0	4.4	3.8	7.0	4.8	8.2	5.0
CBG	1.0	1.0	0.5	0.9	3.0	2.5	3.1	3.6
CBGA	0.1	1.0	0.02	-4.2	11.6	4.0	12.9	7.4
CBC	0.5	0.5	5.0	-0.4	10.0	3.2	10.0	4.7
CBCA	0.1	10	11.8	11.1	8.2	6.2	9.7	6.5
CBL	0.2	0.2	7.4	6.1	4.6	2.3	5.3	2.9
CBLA	0.0125	1.0	-3.2	12.8	5.6	4.7	6.4	10.8
THCV	0.25	0.5	-2.1	-1.4	4.7	6.6	4.9	7.0
THCVA	0.005	1.0	11.3	5.3	12.4	4.3	16.1	7.3
CBDV	0.5	1.25	4.2	3.5	4.5	5.4	5.7	5.7
CBDVA	0.02	0.1	-3.3	8.0	14.5	12.1	14.5	13.8



Supplementary Figure SF 1a: Loading plot for PC 1



Supplementary Figure SF 1b: Loading plot for PC 2

## **4.3 Identifizierung potentieller Unterscheidungsmarker für Konsum von cannabisbasierten Arzneimitteln oder Straßencannabis in Serumproben**

Der Inhalt dieses Kapitels wurde als „Research Article“ veröffentlicht in:

Scheunemann A, Elsner K, Germerott T, Groppa S, Hess C, Miederer I, Poplawski A, Röhrich J, Identification of potential distinguishing markers for the use of cannabis-based medicines or street cannabis in serum samples. *Metabolites*. 2021;11:316. doi:10.3390/metabo11050316.

### **4.3.1 Kurzprofil der Publikation**

In einer klinischen Forschungsstudie wurden in verschiedenen Studienzentren in Mainz und Wiesbaden Serumproben von Patienten unter Therapie mit verschiedenen cannabisbasierten Medikamenten oder Medizinalcannabis gesammelt und mittels der in Kapitel 4.1 beschriebenen LC-MS/MS Analysemethode auf 18 verschiedene Phytocannabinoide und Cannabinoidmetaboliten untersucht. Die resultierenden Phytocannabinoidprofile wurden mittels verschiedener statistischer Verfahren mit Serumcannabinoidprofilen von Straßencannabiskonsumenten verglichen. Dabei wurden potentielle Marker für die Einnahme verschiedener cannabisbasierter Medikamente in Abgrenzung zu Konsum von Straßencannabis identifiziert. Diese potentiellen Konsummarker wurden auf verschiedene Serumproben aus forensischen Realfällen angewendet, bei denen der Konsum cannabisbasierter Medikamente eingeräumt wurde.

### **4.3.2 Abgrenzung des Eigenanteils**

Das grundlegende Konzept der Studie wurde von mir in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Jörg Röhrich und Frau Dr. Katrin Elsner entworfen. Literaturrecherche, Ausarbeitung des Versuchsdesigns und Entwurf der Studienfragebögen und -materialien, Erstellung des Studienprotokolls, Beantragung eines positiven Votums durch die Ethikkommissionen Rheinland Pfalz und Hessen sowie Koordination der Studie wurden von mir vorgenommen. Die Blutproben wurden durch verschiedene Studienzentren in Mainz und Wiesbaden zur Verfügung gestellt. Die Akquise der Studienzentren erfolgte größtenteils durch mich. Laborarbeiten, Aufarbeitung und Analyse der Serumproben mittels LC-MS/MS sowie Auswertung, statistische Analyse und Interpretation der Ergebnisse wurden vollständig von mir vorgenommen. Die Auswahl der statistischen Verfahren erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Alicia Poplawski und Frau PD Dr. Isabelle Miederer. Das Manuskript wurde von mir erstellt und überarbeitet. Kommentierung des Manuskripts und

Unterbreitung von Vorschlägen zur Überarbeitung erfolgten durch die Koautoren. Die Arbeit wurde durch Herrn Röhrich und Frau Elsner betreut.

## 4.3.3 Artikel



Article

# Identification of Potential Distinguishing Markers for the Use of Cannabis-Based Medicines or Street Cannabis in Serum Samples

Anne Scheunemann <sup>1,\*</sup>, Katrin Elsner <sup>1</sup>, Tanja Germerott <sup>1</sup>, Sergiu Groppa <sup>2</sup>, Cornelius Hess <sup>1</sup>, Isabelle Miederer <sup>3</sup>, Alicia Poplawski <sup>4</sup> and Jörg Röhrich <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Legal Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany; elsner@uni-mainz.de (K.E.); germerott@uni-mainz.de (T.G.); hess@uni-mainz.de (C.H.); roehrich@uni-mainz.de (J.R.)

<sup>2</sup> Department of Neurology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany; segroppa@uni-mainz.de

<sup>3</sup> Department of Nuclear Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany; Isabelle.Miederer@unimedizin-mainz.de

<sup>4</sup> Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany; alpoplaw@uni-mainz.de

\* Correspondence: anne.scheunemann@uni-mainz.de



**Citation:** Scheunemann, A.; Elsner, K.; Germerott, T.; Groppa, S.; Hess, C.; Miederer, I.; Poplawski, A.; Röhrich, J. Identification of Potential Distinguishing Markers for the Use of Cannabis-Based Medicines or Street Cannabis in Serum Samples. *Metabolites* **2021**, *11*, 316. <https://doi.org/10.3390/metabo11050316>

Academic Editor: Markus R. Meyer

Received: 21 April 2021

Accepted: 7 May 2021

Published: 13 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Increasing prescription numbers of cannabis-based medicines raise the question of whether uptake of these medicines can be distinguished from recreational cannabis use. In this pilot study, serum cannabinoid profiles after use of cannabis-based medicines were investigated, in order to identify potential distinguishing markers. Serum samples after use of Sativex<sup>®</sup>, Dronabinol or medical cannabis were collected and analyzed for 18 different cannabinoids, using a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. Analytes included delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol, cannabigerol, cannabichromene, cannabicyclol, tetrahydrocannabivarin, cannabidivarin, tetrahydrocannabinolic acid A, cannabidiolic acid, cannabinolic acid, cannabigerolic acid, cannabichromenic acid, cannabicyclolic acid, tetrahydrocannabivarinic acid and cannabidivarinic acid. Cannabinoid profiles of study samples were compared to profiles of street cannabis user samples via principal component analysis and Kruskal–Wallis test. Potential distinguishing markers for Dronabinol and Sativex<sup>®</sup> intake were identified, including 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol/delta-9-tetrahydrocannabinol ratios  $\geq 1$  and increased concentrations of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol, cannabidiol or cannabichromene. Larger quantities of minor cannabinoids suggested use of cannabis. Use of medical and street cannabis could not be distinguished, except for use of a cannabidiol-rich strain with higher cannabidiol/delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabichromene/delta-9-tetrahydrocannabinol ratios. Findings of the study were used to classify forensic serum samples with self-reported use of cannabis-based medicines.

**Keywords:** cannabinoids; Sativex; Dronabinol; medical cannabis; serum concentrations; LC-MS/MS; principal component analysis

## 1. Introduction

For decades, *cannabis sativa* L. has been the most popular illicit drug worldwide, with a prevalence of 192 million in 2018 and rising numbers of users [1,2]. Psychoactive and neurotoxic properties of the plant's main cannabinoid delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), such as impairment of cognition, psychomotor function and impulse control, are especially problematic in road traffic [3,4]. In Germany, conducting a motor vehicle with a THC blood serum level above 1 ng/mL leads to a fine and suspension of the driver's license.

Interest in therapeutic use of cannabinoids, not only THC, but also cannabidiol (CBD) or other, minor cannabinoids, has recently increased as well [5,6]. In Germany, cannabis-based medicines, such as Sativex<sup>®</sup> or Dronabinol, as well as medical cannabis, can be prescribed for different indications and are reimbursable by health insurance funds since the amendment to the Narcotic Drugs Act in 2017. Sativex<sup>®</sup> is an oromucosal spray which contains approximately equal amounts of THC and CBD as main ingredients [7]. Dronabinol, mainly prescribed as a 2.5% magistral preparation for oral application, contains mostly THC. Medical cannabis contains a complex mixture of many phytocannabinoids. Several THC-/CBD-predominant or mixed varieties are available [8].

Regarding participation in road traffic under influence of THC, intake of medicines is excluded from legal regulations. Thus, increasing prescription numbers of medical cannabis and cannabis-based medicines, about 150,000 in the first half of 2020 [9,10], raise the question of whether uptake of these medicines can be distinguished from recreational use of street cannabis. Minor cannabinoids such as tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA) or tetrahydrocannabinolic acid A (THCAA) have been suggested as markers for cannabis use [11,12], when cannabis-based medicines contain THC exclusively. However, low quantities of minor cannabinoids were previously observed in material samples of Sativex<sup>®</sup> and Dronabinol [13]. It is not yet known, to which amount those minor cannabinoids are reflected in biological samples of users. Street and medical cannabis both derive from the same monospecific plant *Cannabis sativa* L. [14]. However, past studies observed that material samples of some medical cannabis varieties and street cannabis exhibited characteristic cannabinoid patterns [13,15], suggesting a differentiation in biological samples of users might be possible.

Regarding these findings, the aim of the here-presented multi-centered pilot study was to investigate serum cannabinoid concentrations after use of different cannabis-based medicines or medical cannabis in order to identify potential distinguishing markers from street cannabis use. Serum samples of patients treated with medical cannabis or cannabis-based medicines were collected, along with information about gender, age, body mass index (BMI), dosing regimen of the patients and time between medicine intake and sample collection. Serum samples were analyzed for 18 different cannabinoids, using a validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method [16]. Analytes included THC, CBD, cannabinol (CBN), cannabigerol (CBG), cannabichromene (CBC), cannabicyclol (CBL), tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabidivarin (CBDV) and their acidic precursors tetrahydrocannabinolic acid A (THCAA), cannabidiolic acid (CBDVA), cannabivarinic acid (CBVA), cannabigerolic acid (CBGA), cannabichromenic acid (CBCA), cannabicyclolic acid (CBLA), tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA) and cannabidivarinic acid (CBDVA) as well as the THC metabolites 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol (THC-OH) and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH). Subsequently, cannabinoid profiles of study samples were compared to profiles of street cannabis user samples via principal component analysis (PCA) and Kruskal–Wallis test. Potential distinguishing markers for Sativex<sup>®</sup> and Dronabinol intake were identified and used to classify nine forensic serum samples with self-reported use of cannabis-based medicines.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Demographics and Therapy of Study Population

A total of 23 participants (13 female and 10 male), aged 23 to 78 with body mass indexes (BMIs) ranging from 15 to 55, were included in the study, and 56 serum samples in total were obtained from the collective. Three patients were treated with Sativex<sup>®</sup> ( $n = 9$  samples), two with both Sativex<sup>®</sup> and Bedrocan<sup>®</sup> ( $n = 6$ ), five with one or more types of medical marijuana (Bediol<sup>®</sup>, Bedrocan<sup>®</sup>, Bedrolite<sup>®</sup>, Pedanios 22/1 or Bedrobinol<sup>®</sup>,  $n = 13$ ), one participant reported use of Dr. Nice Rebound CBD capsules ( $n = 1$ ), 10 participants were treated with 2.5% Dronabinol solution according to Neues Rezeptur-Formularium (NRF) 22.8 ( $n = 14$ ) and two participants reported treatment with 2.5% Dronabinol solution NRF 22.8 and additional use of street cannabis ( $n = 6$ ). Daily doses applied ranged from

4 to 39 drops of Dronabinol, 2 to 20 sprays of Sativex<sup>®</sup> and 50 mg to 3 g of medical cannabis. Time between intake of the cannabis-based medicine and collection of the blood sample ranged from 33 min to approximately 5 d 15 h. An overview of demographics and the participants' therapy including approximate doses of THC applied is provided in Supplementary Table S1.

## 2.2. Quantitative Study Sample Analysis

Within the study collective, THC was detected in 48 of 56 samples, ranging from approximately 0.048 (value below limit of quantification (LOQ)) to 49 ng/mL. THC-OH and THC-COOH concentrations ranged from approx. 0.20 to 26 ng/mL and approx. 1.0 to 29 ng/mL. Among minor cannabinoids, THCAA, CBN, CBC and THCVA were detected in most samples with maximum values ranging from 0.97 (CBN) to 9.3 ng/mL (THCAA). Other analytes, such as CBG or THCV, rarely occurred. CBDVA was detected in one sample only, and CBL and CBDV were not detected in any samples. Serum cannabinoid concentrations itemized by substance intake along with time intervals between last substance intake and blood sample collection are presented in Table 1.

### 2.2.1. Sativex<sup>®</sup>

In the sub-collective of Sativex<sup>®</sup> patients, time intervals between last intake and blood draw ranged from 33 min to 18 h 20 min. THC was detected in all samples. Serum concentrations ranged from approx. 0.15 to 4.6 ng/mL, with THC-OH levels of approx. 0.36 to 22 ng/mL and THC-COOH levels of 19 to 170 ng/mL. As expected, CBD occurred in all samples as well, with concentrations ranging from 0.23 to 6.1 ng/mL. Its acidic precursor CBDA was detected in 6 of 9 samples, ranging from approx. 0.0020 to 0.042 ng/mL. Among other minor cannabinoids, CBC exhibited the highest concentrations with approx. 0.11 to 1.1 ng/mL. THCAA, CBN and THCVA were ubiquitous in samples of Sativex<sup>®</sup> patients but exhibited relatively low maximum values of 0.084 ng/mL (THCAA) and 0.044 ng/mL (CBN). THCVA concentrations lay below LOQ in all samples. The results lie in accordance with findings of a previous study regarding the phytocannabinoid profile of Sativex<sup>®</sup> [13], in which, besides THC and CBD, it mainly exhibited CBC (0.2%). Interestingly, despite rather low quantities of other minor cannabinoids in the extract (THCAA 0.001%, CBN 0.003%, THCVA 0.000004%), those cannabinoids were detected in serum samples of users.

### 2.2.2. Sativex<sup>®</sup> and Medical Cannabis

Serum samples of Sativex<sup>®</sup> patients with additional use of medical cannabis (Bedrocan<sup>®</sup>) exhibited similar cannabinoid patterns as those of Sativex<sup>®</sup> patients. Concentrations for THC, THC-OH and THC-COOH ranged from approx. 0.10 to 1.4 ng/mL, 0.63 to 2.4 ng/mL and 2.1 to 56 ng/mL, respectively. THCAA, CBD, CBDA, CBN and CBC occurred in most samples. THCVA was ubiquitous and exhibited higher concentrations than in Sativex<sup>®</sup> patients, with a maximum value 1.8 ng/mL. Time intervals between substance intake and blood sample collection were similar to those in the Sativex<sup>®</sup> subgroup. However, the minimum was approximately three times as high with 1 h 45 min.

Table 1. Cannabinoid serum concentrations of the study collective in [ng/mL].

Sample	Substance Intake	Time between Last Intake and Blood Draw	THC	THC-OH	THC-COOH	THCAA	CBD	CBDA	CBN	CBNA	CBG	CBGA	CBC	CBCA	CBL	CBLA	THCV	THCVA	CBDV	CBDVA
S01-01	Sativex	2 h 25 min	0.34	0.89	26	(0.016)*	0.36	nd	0.0085	nd	nd	nd	(0.14)	rd	nd	nd	nd	(0.023)	nd	nd
S01-02	Sativex	18 h 20 min	0.22	0.62	19	(0.012)	0.25	nd	(0.0032)	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	(0.019)	nd	nd
S01-03	Sativex	7 h 15 min	(0.15)	(0.36)	19	(0.0055)	0.23	nd	(0.0016)	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	(0.021)	nd	nd
S02-01	Sativex	9 h	1.1	1.2	23	0.028	0.75	(0.0020)	0.020	nd	nd	nd	(0.11)	rd	nd	nd	nd	(0.023)	nd	nd
S02-02	Sativex	16 h 15 min	1.3	4.5	54	0.047	1.0	(0.0028)	0.030	nd	nd	nd	0.29	rd	nd	nd	nd	(0.021)	nd	nd
S03-01	Sativex	50 min	0.82	7.3	48	0.056	1.0	0.010	0.024	nd	nd	nd	0.28	rd	nd	nd	nd	(0.015)	nd	nd
S03-02	Sativex	35 min	0.63	6.4	72	0.032	0.77	0.0054	0.016	nd	nd	nd	(0.16)	rd	nd	nd	nd	(0.017)	nd	nd
S03-03	Sativex	1 h 24 min	4.6	12	100	0.084	2.8	0.041	0.044	nd	nd	nd	0.82	(0.030)	nd	nd	nd	(0.019)	nd	nd
S03-04	Sativex	1 h 5 min	4.4	22	170	0.034	6.1	0.042	0.040	(0.0066)	nd	(0.011)	1.1	0.032	rd	nd	nd	(0.024)	nd	nd
S04-01	Sativex+ Bedrocan	10 h 44 min (Sativex)	1.4	0.63	2.1	nd	0.52	0.013	0.017	nd	nd	nd	(0.10)	(0.011)	nd	nd	nd	(0.024)	nd	nd
S05-01	Sativex+ Bedrocan	13 h 35 min (Sativex)	(0.10)	nd	6.8	(0.0062)	nd	nd	(0.0022)	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	(0.034)	nd	nd
S05-02	Sativex+ Bedrocan	2 h 15 min (Sativex)	0.43	1.0	22	(0.017)	0.26	0.0042	(0.0078)	nd	nd	nd	(0.10)	rd	nd	nd	nd	(0.032)	nd	nd
S05-03	Sativex+ Bedrocan	1 h 45 min (Sativex)	0.45	0.88	30	0.040	0.34	0.024	0.012	nd	nd	nd	(0.12)	rd	nd	nd	nd	0.047	nd	nd
S05-04	Sativex+ Bedrocan	3 h 30 min (Sativex)	1.1	2.4	56	0.036	0.64	0.0071	0.020	nd	nd	nd	0.28	(0.015)	nd	nd	nd	1.8	nd	nd
S05-05	Sativex+ Bedrocan	2 h 10 min (Sativex)	0.71	1.4	27	0.040	0.53	(0.0034)	0.010	nd	nd	nd	(0.18)	rd	nd	nd	nd	(0.029)	nd	nd
S06-01	Bediol	3 h 56 min	0.94	0.72	7.2	(0.013)	2.0	0.0054	0.048	nd	nd	nd	0.45	rd	nd	nd	nd	0.18	nd	nd
S07-01	Bedrocan	1 h 10 min	49	22	170	9.3	0.18	0.0088	0.97	0.022	2.4	1.1	4.5	0.58	nd	0.022	0.36	3.2	nd	nd
S07-02	Bedrocan	1 h 30 min	32	17	170	3.7	(0.071)	(0.0031)	0.48	(0.013)	1.5	0.54	3.0	0.21	nd	(0.0096)	0.23	2.7	nd	nd
S07-03	Bedrocan	2 h 30 min	43	26	150	1.9	(0.080)	(0.0035)	0.92	0.030	1.7	0.74	4.2	0.36	nd	0.014	0.25	0.91	nd	nd
S07-04	Bedrocan	1 h 10 min	48	21	180	1.6	(0.045)	0.0053	0.84	0.026	2.1	0.34	4.4	0.12	nd	(0.0071)	(0.17)	1.5	nd	nd
S08-01	Bedrolite- Pedantios 22/1	10 h 10 min	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	(0.013)	nd	nd
S08-02	Bedrolite- Bedrocan	9 h (Bedrolite)	nd	nd	nd	(0.011)	nd	nd	(0.011)	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	(0.017)	nd	nd
S08-03	Bedrolite- Bedrocan	2 h 30 min (Bedrolite)	nd	nd	nd	(0.0094)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	(0.013)	nd	nd
S08-04	Bedrolite- Bedrocan	2 h 30 min (Bedrocan)	(0.084)	nd	nd	(0.0049)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S09-01	Bedrocan	15 h 26 min	0.39	0.42	11	(0.0093)	(0.036)	0.0063	0.018	nd	nd	0.022	nd	rd	nd	nd	nd	0.37	nd	nd
S09-02	Bedrocan	10 h 55 min	0.42	(0.27)	6.4	0.047	nd	(0.0020)	0.012	nd	nd	0.024	nd	rd	nd	nd	nd	0.23	nd	nd
S09-03	Bedrocan	1 d 14 h 30 min	(0.17)	nd	2.2	(0.019)	nd	nd	0.019	nd	nd	nd	nd	rd	nd	nd	nd	0.27	nd	nd
S10-01	Bedrolinol	4 h 50 min	0.20	nd	nd	(0.012)	nd	nd	(0.0036)	nd	nd	nd	0.64	rd	nd	nd	nd	(0.087)	nd	nd
S10-02	Bedrolinol	3 h 20 min	3.7	1.5	14	0.88	(0.087)	nd	0.25	nd	0.090	0.033	0.64	(0.029)	nd	nd	nd	0.21	nd	nd
S10-03	Bedrolinol	1 h 55 min	4.7	2.0	20	1.3	(0.076)	nd	0.18	nd	(0.079)	0.054	0.85	0.055	nd	nd	nd	0.56	nd	nd
S10-04	Bedrolinol	5 d 14 h 40 min	2.1	1.1	8.4	0.45	(0.073)	nd	0.12	nd	(0.046)	(0.011)	0.27	(0.023)	nd	nd	nd	0.28	nd	nd

Table 1. Cont.

Sample	Substance Intake	Time between Last Intake and Blood Draw	THC-OH	THC-COOH	THCAA	CBD	CBDA	CBN	CBNA	CBG	CBGA	CBC	CBCA	CBL	CBLA	THCV	THCVA	CBDV	CBDA
S11-01	Dronabinol+ Street cannabis	6 h 34 min (Dronabinol)	0.84	21	(0.016)	nd	nd	0.027	nd	nd	(0.0082)	(0.15)	nd	nd	(0.0021)	nd	0.29	nd	nd
S11-02	Dronabinol+ Street cannabis	8 h 15 min (Dronabinol)	1.4	21	0.17	nd	0.029	(0.0049)	(0.057)	0.024	(0.18)	(0.013)	nd	nd	nd	nd	2.3	nd	nd
S11-03	Dronabinol+ Street cannabis	approx. 4.5 d (Dronabinol)	0.41	2.5	0.11	nd	0.014	(0.0045)	nd	(0.012)	nd	(0.011)	nd	nd	(0.0024)	nd	0.31	nd	nd
S11-04	Dronabinol+ Street cannabis	12 h 50 min (faint)	1.2	19	0.11	nd	0.032	nd	(0.056)	(0.015)	0.27	(0.010)	nd	nd	(0.0023)	nd	0.40	nd	nd
S12-01	Dronabinol+ Street cannabis	3 h (Dronabinol)	11	5.3	0.66	nd	0.35	nd	0.83	0.14	1.3	(0.025)	nd	nd	nd	nd	0.78	nd	nd
S12-02	Dronabinol+ Street cannabis	2 h 47 min (Dronabinol)	16	12	0.78	(0.044)	nd	0.47	0.020	0.66	0.11	1.2	0.032	nd	nd	nd	1.7	nd	nd
S13-01	Dronabinol	7 h 20 min	0.48	19	23	(0.0005)	nd	nd	nd	(0.0091)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S14-01	Dronabinol	1 h 20 min	0.82	0.93	16	(0.0004)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.18	nd	nd
S15-01	Dronabinol	1 h 40 min	(0.17)	0.53	13	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S15-02	Dronabinol	3 h 20 min	1.0	2.0	29	nd	(0.0024)	nd	nd	(0.0085)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S16-01	Dronabinol	23 h 40 min	(0.15)	(0.20)	2.4	(0.0025)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S16-02	Dronabinol	24 h 30 min	(0.048)	nd	2.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S16-03	Dronabinol	3 h 17 min	0.23	0.65	6.6	(0.017)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S17-01	Dronabinol	6 h 20 min	0.25	(0.27)	6.3	(0.015)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S17-02	Dronabinol	6 h 45 min	(0.067)	0.71	13	(0.017)	nd	(0.0022)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S17-03	Dronabinol	15 h 6 min	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S17-04	Dronabinol	15 h 30 min	nd	nd	(1.0)	(0.0021)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S17-05	Dronabinol	15 h 25 min	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S18-01	Dronabinol	2 h 5 min	(0.12)	nd	(0.0044)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S19-01	Dronabinol	1h	(0.18)	1.0	2.8	0.031	nd	(0.0053)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S19-02	Dronabinol	Missing data	nd	nd	(1.6)	(0.012)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S20-01	Dronabinol	1 to 1.5 h	(0.17)	nd	3.4	nd	nd	(0.0021)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S21-01	Dronabinol	3 h 24 min	0.69	2.7	28	(0.0080)	nd	(0.0046)	(0.0054)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
S22-01	Dronabinol	13 h 54 min	(0.15)	0.46	16	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(0.032)	nd	nd
S23-01	CBD capsules	14 h 15 min	nd	nd	0.10	0.24	0.37	(0.0043)	(0.0062)	nd	0.48	nd	0.18	nd	(0.0041)	nd	0.42	nd	0.018

\* Measured values below limit of quantification (LOQ) are reported as approximate values in parentheses, nd = not detected/ below limit of detection (LOD).

### 2.2.3. Medical Cannabis

Samples of medical cannabis users exhibited the highest THC concentrations with a maximum of 49 ng/mL. THC-OH and THC-COOH levels ranged from approx. 0.27 to 26 ng/mL and 2.2 to 180 ng/mL, respectively. Compared to Sativex<sup>®</sup> users, CBD occurred less frequently and mostly at concentrations <LOQ after use of the THC dominant strains Bedrocan<sup>®</sup> or Bedrobinol<sup>®</sup>. Use of the CBD-rich variety Bediol<sup>®</sup>, however, resulted in a higher serum level of 2.0 ng/mL. Other minor cannabinoids, such as CBNA, CBG and THCV, occurred most frequently in medical cannabis user samples, compared to other subgroups. Additionally, the samples exhibited the highest concentrations for THCAA, CBN and THCVA within the whole collective, with maximum values of 9.3 ng/mL, 0.97 ng/mL and 3.2 ng/mL, respectively. Time intervals between intake of medical cannabis and blood draw varied greatly, ranging from 1 h 10 min to approximately 5 d 15 h.

### 2.2.4. Dronabinol and Street Cannabis

Cannabinoid patterns of participants using Dronabinol and street cannabis were similar to those of medical cannabis users. THC concentrations ranged from 0.41 to 16 ng/mL, with THC-OH and THC-COOH levels of approx. 0.26 to 12 and 3 to 290 ng/mL. THCAA, CBN, CBGA and THCVA were detected in all, and CBG, CBC and CBCA in most samples. CBD and CBDA, however, were almost completely absent in this sub-collective. This is consistent with observed high popularity of THC-rich cannabis strains with very little CBD [1]. Time intervals between substance intake and blood sample collection were also similar to the medical cannabis user subgroup, ranging from 2 h 47 min to approximately 4.5 d.

### 2.2.5. Dronabinol

Samples of Dronabinol users exhibited rather low THC concentrations of approx. 0.048 to 1.0 ng/mL, with THC-OH and THC-COOH levels ranging from approx. 0.20 to 2.7 ng/mL and approx. 1.0 to 29 ng/mL, respectively. As expected, minor cannabinoids were almost completely absent from the samples. In some cases, THCAA, CBN, CBGA and THCVA were detected, but concentrations mostly lay below LOQ. This is consistent with previous findings [13], in which the plant-derived Dronabinol extract exhibited mostly THC and very low concentrations of other minor cannabinoids. Time intervals between intake of Dronabinol and blood draw ranged from 1 h to approximately 24 h.

### 2.2.6. Dr. Nice Rebound CBD Capsules

Although Dr. Nice Rebound CBD capsules contain hemp extract with respectable quantities of THC and CBC, according to the manufacturer [17], no THC, THC metabolites or CBC were detected after intake of the capsules. This can be explained by a rather low dose of only one capsule per day and a long-time interval of more than 14 h between intake and collection of the serum sample (see Supplementary Table S1). Besides CBD (0.24 ng/mL), the serum sample exhibited notable concentrations of many acidic minor cannabinoids, such as CBDA (0.37 ng/mL), CBGA (0.48 ng/mL), CBCA (0.18 ng/mL) or CBDVA (0.018 ng/mL) that were absent in most of the other sub-collectives. The absence in other subgroups can be explained by thermal degradation of acidic cannabinoids due to smoking or vaporizing cannabis, in contrast to oral application in this subgroup.

## 2.3. Comparison to Forensic Serum Samples and Identification of Potential Distinguishing Markers

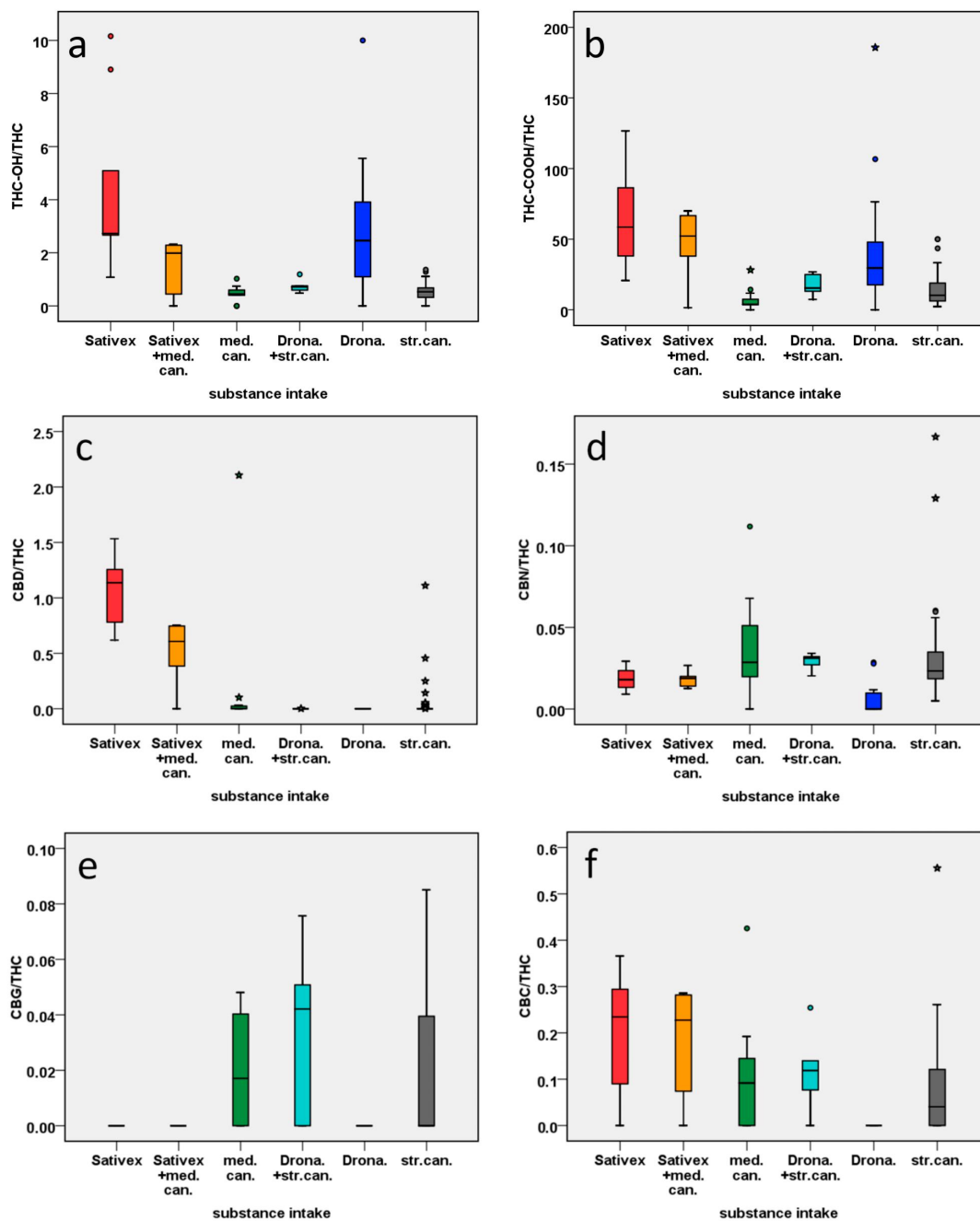
In order to identify potential distinguishing markers for the intake of cannabis-based medicines or use of street cannabis, all study subgroups, except for the CBD capsule group with  $n = 1$ , were compared to 55 forensic serum samples of different street cannabis users, that had been analyzed in a previous study [16]. Serum cannabinoid concentrations of forensic case samples (in the following referred to as street cannabis subgroup) are presented in Supplementary Table S2. For better comparability of different doses of cannabis or cannabis-based medicine applied as well as different time intervals between

application, cannabinoid concentrations were standardized on THC by dividing them by the respective THC concentration of the sample. Resultant cannabinoid ratios of all samples are listed in Supplementary Table S3. For eight samples, no ratios could be calculated, as THC serum concentrations lay below limit of detection (LOD). Those samples were excluded from further analysis. If other cannabinoid concentrations lay below LOD, 0 (zero) was substituted as the respective ratio. CBDV was not detected in any samples and was therefore eliminated from further analyses. Boxplots of selected cannabinoid ratios are presented in Figure 1.

### 2.3.1. Statistical Analysis via Principal Component Analysis and Kruskal–Wallis Test

A principal component analysis (PCA) of all cannabinoid ratios, standardized to z-scores as described above, was carried out. Samples F03 and F21 were identified as outliers, as they were plotted far away from the rest of the collective, distorting the biplot. For this reason, F03 and F21 were excluded. After exclusion, transformation into z-scores and PCA were repeated, and sufficient results were achieved. With a value of 0.650, the Kaiser–Meyer–Olkin measure of sampling adequacy was sufficient for performing a factor analysis [18,19]. Bartlett’s test of sphericity was significant ( $p < 0.001$ ), indicating sufficiently large correlations between items for performing a PCA [19]. The biplot of PC 1 and 2 in Figure 2 shows how different subgroups were separated via PCA. Corresponding loading plots for PC 1 and 2 are displayed in Supplementary Figure S1.

Additionally, an analysis of variance was performed on all subgroups. As data were not normally distributed, when tested via Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk test, comparison was carried out via Kruskal–Wallis test [20]. In view of the pilot character and small sample size of this study, both uncorrected  $p$  values and  $p$  values adjusted via Bonferroni–Holm method were used for interpretation of study results [21]. In addition, differences with uncorrected  $p$  values  $\geq 0.05$  were reported when observed in both PCA comparison and Kruskal–Wallis test. Differences and according effect sizes for selected pairwise comparisons of the subgroups are presented in Table 2.



**Figure 1.** Boxplots of selected cannabinoids illustrate differences among subgroups. In Sativex<sup>®</sup> user samples, standardized THC-OH (a), THC-COOH (b) and CBD (c) concentrations were higher than for medical cannabis (med.can.) or street cannabis (str.can.) users. Dronabinol (Drona.) users also exhibited higher THC-OH and THC-COOH levels but fewer CBN (d) and CBC (f) than cannabis users. Cannabis user samples exhibited notably higher levels of CBG (e), compared to Sativex<sup>®</sup> or Dronabinol users. \* = Extreme outliers with values  $\geq 3$ , \* Interquartile Range (First Quartile–third Quartile).



Table 2. Results of the Kruskal–Wallis test for selected pairwise comparisons.

Pairwise Comparison	THC-OH/THC	THC-COOH/THC	THC-ΔA/THC	CBD/THC	CBDA/THC	CBN/THC	CBNA/THC	CBG/THC	CBGA/THC	CBC/THC	CBCA/THC	CBL/THC	CBLA/THC	THCV/THC	THCVA/THC	CBDA/THC
Sativex vs. Street Cannabis	$\chi^2 = 36.0$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 40.2$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 23.1$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 51.3$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 36.5$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 30.3$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 38.6$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 21.6$ $p = 0.0010$	$\chi^2 = 23.2$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 26.1$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 14.3$ $p = 0.014$	$\chi^2 = 1.76$ $p = 0.88$	$\chi^2 = 14.5$ $p = 0.013$	$\chi^2 = 9.44$ $p = 0.093$	$\chi^2 = 36.8$ $p = 0.000$	$\chi^2 = 0.873$ $p = 0.97$
Sativex vs. Street Cannabis	$z = 4.82$ $p = 0$ (0)	$z = 4.17$ $p = 0$ (0)	$z = -2.79$ $p = 0.0050$ (0.070)	$z = 5.68$ $p = 0$ (0)	$z = 3.49$ $p = 0$ (0)	$z = -1.88$ $p = 0.060$ (0.60)	$z = -3.63$ $p = 0$ (0)	$z = -2.48$ $p = 0.013$ (0.13)	$z = -2.53$ $p = 0.011$ (0.090)	$z = 2.61$ $p = 0.0090$ (0.090)	$z = -2.70$ $p = 0.0070$ (0.084)	$z = -1.83$ $p = 0.067$ (0.64)	$z = -3.22$ $p = 0.0010$ (0.013)	$z = -5.20$ $p = 0$ (0)	$z = -3.05$ $p = 0.0020$ (0.024)	$z = 4.10$ $p = 0$ (0)
Sativex vs. Medical Cannabis	$z = 4.35$ $p = 0$ (0)	$z = 4.95$ $p = 0$ (0)	$z = -1.84$ $p = 0.067$ (0.67)	$z = 3.01$ $p = 0.0030$ (0.027)	$z = 3.01$ $p = 0$ (0)	$z = -1.88$ $p = 0.060$ (0.60)	$z = -2.36$ $p = 0.018$ (0.16)	$z = -2.36$ $p = 0.018$ (0.16)	$z = -2.70$ $p = 0.0070$ (0.084)	$z = 2.61$ $p = 0.0090$ (0.090)	$z = -2.70$ $p = 0.0070$ (0.084)	$z = -1.83$ $p = 0.067$ (0.64)	$z = -3.22$ $p = 0.0010$ (0.013)	$z = -5.20$ $p = 0$ (0)	$z = -3.05$ $p = 0.0020$ (0.024)	$z = 4.10$ $p = 0$ (0)
Sativex vs. Sativex + Medical Cannabis	$z = 1.85$ $p = 0.064$ (0.64)															
Dronabinol vs. Street Cannabis	$z = 3.60$ $p = 0$ (0)	$z = 3.29$ $p = 0.0010$ (0.011)	$z = -4.09$ $p = 0$ (0)	$z = -4.09$ $p = 0$ (0)	$z = 2.90$ $p = 0.0040$ (0.056)	$z = 4.15$ $p = 0$ (0)	$z = -4.32$ $p = 0$ (0)	$z = -2.98$ $p = 0.0030$ (0.042)	$z = -2.62$ $p = 0.0090$ (0.090)	$z = -2.91$ $p = 0.0040$ (0.045)	$z = -3.02$ $p = 0.0030$ (0.045)	$z = -5.20$ $p = 0$ (0)	$z = -3.05$ $p = 0.0020$ (0.024)	$z = -5.20$ $p = 0$ (0)	$z = -3.05$ $p = 0.0020$ (0.024)	$z = 4.10$ $p = 0$ (0)
Dronabinol vs. Medical Cannabis	$z = -3.20$ $p = 0.0010$ (0.012)	$z = -4.23$ $p = 0$ (0)	$z = 2.65$ $p = 0.0080$ (0.10)	$z = 3.05$ $p = 0.0020$ (0.020)	$z = 2.90$ $p = 0.0040$ (0.056)	$z = 4.15$ $p = 0$ (0)	$z = -4.32$ $p = 0$ (0)	$z = -2.98$ $p = 0.0030$ (0.042)	$z = -2.62$ $p = 0.0090$ (0.090)	$z = -2.91$ $p = 0.0040$ (0.045)	$z = -3.02$ $p = 0.0030$ (0.045)	$z = -5.20$ $p = 0$ (0)	$z = -3.05$ $p = 0.0020$ (0.024)	$z = -5.20$ $p = 0$ (0)	$z = -3.05$ $p = 0.0020$ (0.024)	$z = 4.10$ $p = 0$ (0)
Dronabinol vs. Dronabinol + Street Cannabis	$z = 1.96$ $p = 0.050$ (0.58)															
Street Cannabis vs. Medical Cannabis	$z = -2.10$ $p = 0.036$ (0.29)			$z = 2.39$ $p = 0.017$ (0.12)	$z = 2.58$ $p = 0.010$ (0.080)		$z = -3.64$ $p = 0$ (0)									

Significant differences between subgroups were discovered with the Kruskal–Wallis test. For every variable, chi-square ( $\chi^2$ ) and  $p$  values are given. Variables with insignificant  $p$  values  $\geq 0.05$  were shaded grey. For every pairwise comparison,  $z$ -scores, uncorrected  $p$  values and Bonferroni–Holm corrected  $p$  values (in parentheses) are reported. Cells were shaded yellow and red for large effect sizes. Effect sizes were reported for uncorrected  $p$  values  $\geq 0.05$ , when differences were observed in the study as well (marked in lighter shades of yellow and red). The comparison of Sativex® user samples to medical or street cannabis user samples showed especially large differences in THC-OH/THC, THC-COOH/THC and CBD/THC ratios. Samples of Dronabinol users differed greatly from cannabis users regarding almost all minor cannabinoids.

### 2.3.2. Sativex<sup>®</sup> vs. Cannabis or Combination of Sativex<sup>®</sup> and Cannabis

In the PCA biplot presented in Figure 2, Sativex<sup>®</sup> samples were well separated from street cannabis and most medical cannabis user samples, the only exception being medical cannabis sample S06-01 after use of the CBD-rich strain Bediol<sup>®</sup>. PC 1 and PC 2 together covered more than 37% of the total variance among samples, indicating a relatively high degree of confidence. Located in the second quadrant in the biplot, Sativex<sup>®</sup> user samples featured higher ratios of THC-OH/THC, THC-COOH/THC, CBD/THC and CBC/THC than cannabis-related subgroups, while ratios of other minor cannabinoids were rather low. These results are confirmed by boxplot comparisons in Figure 1. Figure 1a shows that THC-OH/THC ratios were >1, which lies in accordance with previous findings [22,23]; Nadulski et al. discovered that, due to an extensive first-pass metabolism, THC-COOH and THC-OH plasma concentrations were elevated after oral use of THC, compared to smoking, and the respective THC-OH/THC ratio was almost always >1 within the first 2 h after consumption. According to Karschner et al., oromucosal use of THC resulted in similar THC-OH/THC ratios as oral use. In comparison to the Sativex<sup>®</sup> subgroup, and in accordance with [23] and [22], standardized THC-COOH and especially THC-OH concentrations of street or medical cannabis users were much lower, and THC-OH/THC ratios were almost always <1. Almost equal quantities of CBD and THC in Sativex<sup>®</sup> were mirrored in serum samples as well, analog to previous findings in plasma and oral fluid [24,25]. CBD/THC ratios ranged from 0.6 to 1.5, as illustrated in Figure 1c. In comparison, ratios were much lower in cannabis user subgroups. The only exception was formed by Sativex<sup>®</sup> users with additional intake of medical cannabis. This could be due to relatively low daily dosages of medical cannabis (see Supplementary Table S1) with hardly any influence on THC serum levels. Proportions of CBD and THC could be more similar to those of Sativex<sup>®</sup> users, if increasingly popular CBD-rich cannabis or additional CBD is consumed [26]. However, inhalatory and oral uptake of THC could still be differentiated via THC-OH/THC ratio. Only low ratios of minor cannabinoids, such as THCAA/THC, THCVA/THC, CBGA/THC or CBCA/THC, observed in Sativex<sup>®</sup> user samples are consistent with previous suggestions of minor cannabinoids as markers [11,12]. Consequently, despite possibly increased THC-OH/THC ratios, oral administration of street cannabis could still be distinguished due to increased levels of minor cannabinoids. Unless a CBD-rich strain is used, CBD/THC ratios should differ from those of Sativex<sup>®</sup> users as well. Observations mentioned above were confirmed by the Kruskal–Wallis test, when comparing Sativex<sup>®</sup> and street or medical cannabis users to each other. Most of the time, differences in ratios of THC-OH, THC-COOH, CBD and other minor cannabinoids were significant and had medium or strong effect sizes. Results of the Kruskal–Wallis test are presented in Table 2.

### 2.3.3. Dronabinol vs. Cannabis or Combination of Dronabinol and Cannabis

Samples of Dronabinol users were separated from users of street or medical cannabis or street cannabis additional to Dronabinol in Figure 2. Mostly located on the negative axis of PC 1 and PC 2, the Dronabinol subgroup was characterized by an almost exclusive presence of THC, THC-OH and THC-COOH and very few other cannabinoids. As illustrated in Figure 1a, THC-OH/THC ratios were >1, mirroring oral intake of THC [22,23] in contrast to ratios mostly <1 after smoking or vaporizing medical or street cannabis. Whereas traces of minor cannabinoids such as THCAA or CBN occurred sporadically in Dronabinol user samples, larger concentrations could indicate an additional use of cannabis, as demonstrated for the Dronabinol user group with additional cannabis use in Figure 2. The findings are undermined by results of the Kruskal–Wallis test presented in Table 2: Significant differences with strong effect sizes were discovered for most analytes, including THC-OH/THC and THC-COOH/THC ratios, as well as minor cannabinoids, such as CBN, CBG or CBC. Differences of the latter are visualized in boxplots in Figure 1d–f.

### 2.3.4. Medical Cannabis vs. Street Cannabis

Medical and street cannabis user samples mostly overlapped in the PCA plot in Figure 2, indicating similar cannabinoid serum patterns. A pairwise comparison via Kruskal–Wallis test (see Table 2) showed differences in THC-COOH/THC, CBD/THC, CBDA/THC and CBNA/THC ratios with medium effect sizes. Greater CBNA/THC and especially THC-COOH/THC ratios in street cannabis users (see Supplementary Table S3) could be explained by greater residual cannabinoid quantities after frequent use for recreational purposes, compared to medical cannabis patients with a fixed dosing regimen. Moreover, ranges for THC-COOH/THC in medical and street cannabis users partially overlapped in Figure 1b. The only striking difference between the subgroups was discovered after use of the CBD-rich strain Bediol<sup>®</sup>: Interestingly, sample S06-01 was well separated from both other medical and street cannabis user samples in the PCA plot. Besides CBD/THC, it also exhibited the highest CBC/THC ratio among cannabis user samples. Samples from a user of the CBD-rich strain Bedrolite<sup>®</sup> were not separated from the rest of the subgroup. However, the dosage regimen was rather low for this participant, and Bedrolite<sup>®</sup> was combined with the THC-rich variety Bedrocan<sup>®</sup>. The results suggest that use of CBD-rich medical cannabis strains might be distinguishable by different serum cannabinoid patterns. This observation lies in accordance with previous findings, in which material samples of medical cannabis strains exhibited characteristic cannabinoid patterns [13,15]. However, further studies with larger case numbers and users of more different medical cannabis strains are required to explore differentiability in serum samples. Moreover, fluctuations in cannabinoid profiles among different medical cannabis batches should be regarded [15,27,28].

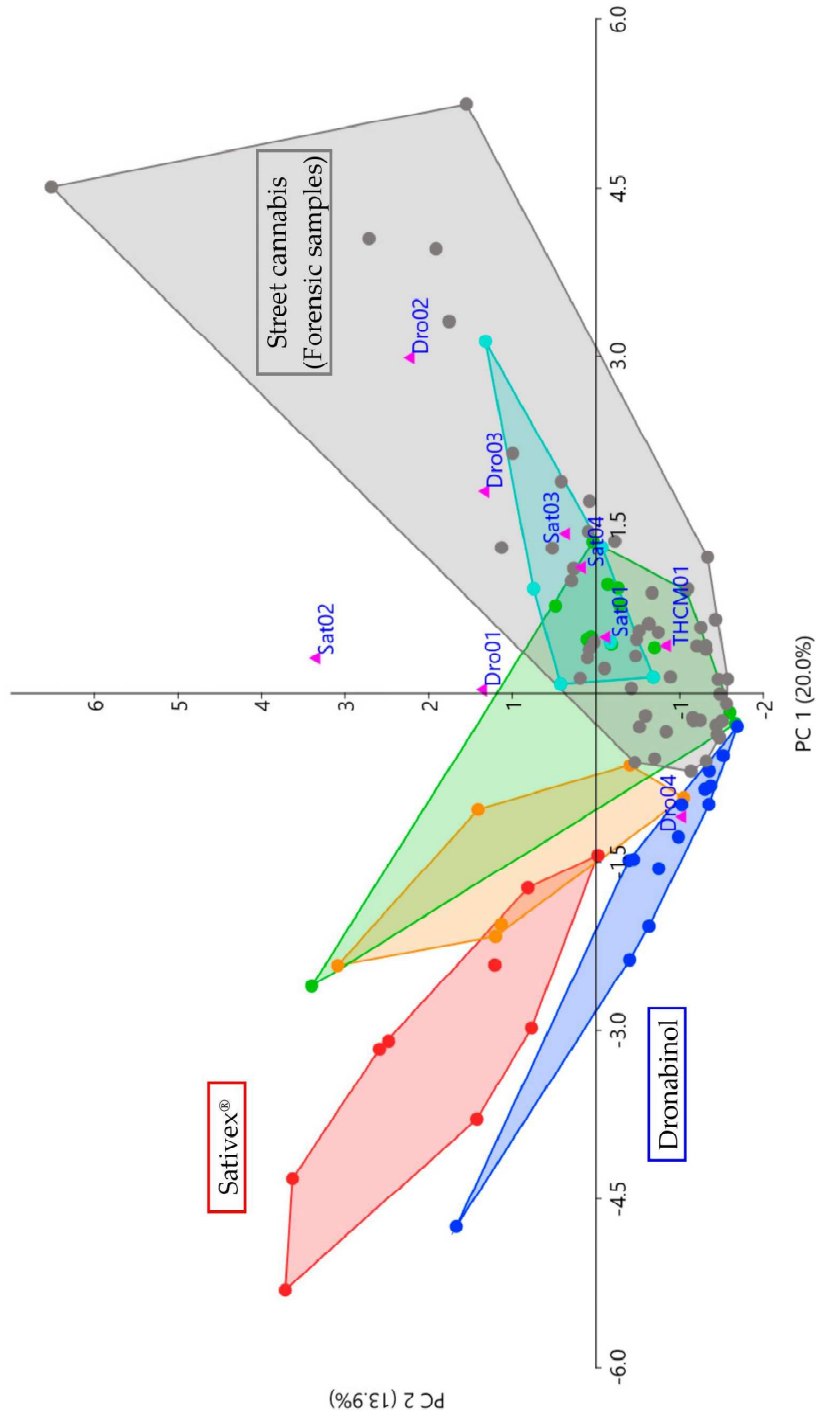
### 2.4. Application to Forensic Case Samples

Results of the presented study were used to analyze nine forensic case serum samples with self-reported intake of Sativex<sup>®</sup> (n = 4, named Sat01 to Sat04), Dronabinol (n = 4, Dro01 to Dro04) and “THC medicine” (n = 1, THCM01). Cannabinoid concentrations of the samples were quantified as described above and are presented in Table 3. Cannabinoid concentrations standardized on THC are given in Supplementary Table S4. Standardized cannabinoid concentrations were analyzed in a PCA along with study and forensic samples (except for F03 and F21) described in 3.2. With a value of 0.606, the Kaiser–Meyer–Olkin measure of sampling adequacy was sufficient for this dataset, and Bartlett’s test of Sphericity was significant ( $p < 0.001$ ) [18,19]. The resultant PCA scatter plot of all samples plotted on PC 1 and PC 2 is presented in Figure 3. Corresponding loading plots of PC 1 and PC 2 are displayed in Supplementary Figure S2.

**Table 3.** Cannabinoid serum concentrations of forensic case serum samples with reported intake of cannabis-based medicines in [ng/mL].

Sample	Substance Intake	THC	THC-OH	THC-COOH	THCAA	CBD	CBDA	CBN	CBNA	CBG	CBGA	CBC	CBCA	CBL	CBLA	THCV	THCVA	CBDV	CBDVA
Sat01	Sativex	2.9	1.3	40	0.14	0.39	0.0043	0.12	nd	0.11	(0.015) *	0.42	nd	nd	nd	(0.048)	0.34	nd	nd
Sat02	Sativex	6.5	3.3	130	1.7	1.5	0.61	0.16	0.022	0.22	0.054	0.84	0.099	nd	nd	(0.026)	0.92	nd	nd
Sat03	Sativex	3.8	2.7	53	1.2	0.16	0.014	0.18	0.018	0.16	0.047	0.46	(0.024)	nd	nd	(0.080)	0.60	nd	nd
Sat04	Sativex	12	4.4	56	0.27	1.4	(0.0022)	2.0	0.050	0.46	0.027	1.8	(0.014)	nd	nd	(0.18)	0.36	nd	nd
Drex01	Dronabinol	0.96	0.4	30	0.050	0.31	nd	0.12	(0.011)	(0.048)	nd	0.36	nd	nd	nd	nd	0.29	nd	nd
Drex02	Dronabinol	1.3	(0.3)	23	0.046	nd	nd	0.053	nd	0.12	nd	0.26	0.16	nd	nd	nd	0.26	nd	nd
Drex03	Dronabinol	5.9	2.4	100	2.6	(0.063)	nd	0.19	0.022	0.35	0.19	1.7	0.039	nd	nd	(0.067)	2.9	nd	nd
Drex04	Dronabinol	(0.19)	(0.3)	8.6	(0.016)	nd	nd	(0.0015)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	(0.031)	nd	nd
THCM01	THC medicine	2.1	0.5	9.8	0.12	(0.086)	nd	0.045	(0.014)	0.078	nd	(0.19)	(0.0091)	nd	nd	nd	0.87	nd	nd

\* Measured values <LOQ are reported as approximate values in parentheses, nd = not detected / <LOD.



**Figure 3.** PCA scatter plot of principal component (PC) 1 and PC 2 shows that forensic samples with reported intake of cannabis-based medicines (pink triangles) are mostly plotted among street cannabis user samples (grey dots). Full color code is given in Figure 2. Loadings of PC 1 and PC 2 are given in supplementary Figure S2. Only one sample with self-reported Dronabinol intake (Dro04) was plotted among samples of Dronabinol users (blue dots), indicating similar serum cannabinoid patterns that could indeed result from Dronabinol use. All samples with self-reported use of Sativex® (Sat01-Sat04) were plotted far from the Sativex® user sub-collective (red dots) but rather among forensic samples, suggesting (additional) use of cannabis or cannabis-based products with notable quantities of minor cannabinoids.

Samples with reported Sativex<sup>®</sup> intake exhibited different cannabinoid patterns than Sativex<sup>®</sup> users from the study: Especially THC-OH/THC and CBD/THC ratios were much lower, ranging from 0.37 to 0.71 and 0.042 to 0.23, compared to ranges of 1.1 to 10 and 0.61 to 1.5 detected in Sativex<sup>®</sup> user study samples. Minor cannabinoids, such as CBG, CBGA or THCV, on the other hand, occurred in higher quantities. As shown in Figure 3, cannabinoid patterns of forensic Sativex<sup>®</sup> user samples were much more similar to medical or street cannabis users, suggesting use of cannabis or other cannabis-based products with notable quantities of minor cannabinoids. THC-OH/THC ratios <1 indicate inhalatory instead of oral application of THC. However, relatively high CBD and CBDA serum concentrations, compared to most street cannabis users, could be compatible with additional use of Sativex<sup>®</sup>.

Forensic samples with self-reported Dronabinol intake mostly exhibited different cannabinoid patterns as well: THC-OH/THC ratios ranged from 0.23 to 0.42 in samples Dro01 to Dro03, compared to 1.1 to 10 in Dronabinol user study samples, indicating THC had been inhaled instead of oral application. Larger quantities of other minor cannabinoids, such as CBG or CBC, suggest the use of cannabis or other cannabis-based products with notable quantities of minor cannabinoids. Accordingly, samples Dro01, Dro02 and Dro03 were plotted among cannabis user samples in Figure 3. Sample Dro04, however, exhibited a THC-OH/THC ratio of almost 1.6 and only low concentrations of other cannabinoids. It was plotted among Dronabinol user study samples, indicating similar serum cannabinoid patterns that could indeed result from Dronabinol intake.

Sample THCM01 after self-reported intake of “THC medicine” featured a THC-OH/THC ratio of 0.24 and low concentrations of minor cannabinoids. It was plotted among cannabis user samples in Figure 3, suggesting inhalative use of cannabis or cannabis-based products.

### 2.5. Limitations

This pilot study suffers from some limitations. The information about intake of the medicines and additional use of cannabis products is based on self-reports by study participants only and, therefore, is of limited reliability. This also accounts for reported time between intake of cannabis-based medicine and blood draw as well as last dose of the medicine. However, measuring and reported data seemed mostly compatible, and cannabinoid patterns were overall consistent within the sub-collectives. For some samples, such as S10-04, relatively high THC concentrations were detected, suggesting that time between last dose and sample collection might have been shorter than reported. A much bigger sample size might be required to investigate possible individual differences in metabolism of cannabinoids. Limited transferability of study results to other individuals should be noted, for example, when BMIs of the subjects or time span between last intake and sample collection lie outside the here investigated ranges. Multiple sample collection from the same individual in this study could potentially distort subgroup results. However, in the PCA plot, multiple samples from one individual did not cluster, compared to single samples of the same subgroup, but were relatively wide-spread. This makes a notable bias for the subgroup due to clustering of samples in one spot less likely. Little is known about metabolism and detection windows of minor cannabinoids, and different time intervals between substance intake and sample collection cannot be ruled out as a cause for different (minor) cannabinoid concentrations among subgroups. However, average time intervals of Sativex<sup>®</sup> and Dronabinol users were shorter than those of medical cannabis users (approx. 6.3 h and 8.5 h compared to 14.4 h). Consequently, only low cannabinoid amounts in the first two subgroups are more likely due to only low concentrations in the medicines themselves. Findings of this pilot study could be confirmed in a controlled study setting with larger case numbers and collection of blank samples from participants before intake of cannabis products.

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Study Participants

Inclusion criteria for the study were a minimum age of 18 years, treatment with a cannabis-based medicine, such as Dronabinol, Sativex<sup>®</sup> or medical marijuana, and capacity of discernment. Exclusion criteria were an age <18 years, severe metabolic disorders that could impair metabolization of the cannabis-based medicine, such as severe liver or kidney dysfunctions, and impaired capacity of discernment. All participants provided written informed consent before being admitted to the study.

#### 3.2. Study Design

In the multi-centered pilot study, a blood sample was collected from the participants, every time they had a medical appointment at one of the study centers involved. For blood sampling, 9 mL S-Monovette<sup>®</sup> neutral blood tubes (Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Germany) were used. Information about gender, age, body height and weight, cannabis-based medicine received, dosage regimen, further intake of cannabis or cannabis-based products in the last seven days and time between last application of the medicine and blood draw was collected in a questionnaire after every sample collection. The study was carried out over a period of approximately 12 months. Following study centers were involved:

Department of Neurology—Movement Disorder and Neurostimulation Outpatient Clinic of the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz

Department of Anesthesiology of the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz

Department of Internal Medicine III of the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz

Pain and Palliative Center Rhine-Main in Wiesbaden

Medical practice Dr. Löwenstein in Mainz

The study was approved by the ethics committees of the State Medical Associations of Rhineland-Palatinate and Hessen (application number 2018-13337).

#### 3.3. Chemicals and Reagents

Reference standards for THC-d3, THC-OH, THC-OH-d3, THC-COOH-d9, CBD, CBD-d3, CBDA, CBN-d3, CBNA, CBG, CBGA, CBC, CBCA, CBL, THCV, THCVA, CBDV and CBDVA were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA), CBG-d9 and CBC-d9 from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA) via LGC Standards (Wesel, Germany), CBN, THC and THC-COOH from LGC Standards and THCAA from THC Pharm (Frankfurt a. M., Germany). All standards were certified reference material and had a purity of at least 99.0%, except for THC-OH-d3, THCAA, CBC, CBC-d9, CBCA, CBL, THCVA, CBDV and CBDVA (97.7%), THC-d3 (96.7%), and CBG-d9 (95.0%). All chemicals were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), except for methanol (from Fisher Scientific (Loughborough, UK)) and acetonitrile (from AppliChem (Darmstadt, Germany)). Chemicals used in LC-MS/MS measurement processes were LC-MS grade. All other chemicals were HPLC grade, except for acetone and dichloromethane, which had a purity of 99.8% and 99.5%, respectively. Blank human serum used for calibration was obtained from voluntary healthy blood donors via blood donation service and was tested to be drug-free.

#### 3.4. Sample Preparation

Serum samples were prepared as described previously [16]. 500  $\mu$ L serum, 50  $\mu$ L ISTD (consisting of 0.2 ng/ $\mu$ L of THC-COOH-d9 and 0.02 ng/ $\mu$ L of each THC-d3, THC-OH-d3, CBD-d3, CBC-d9, CBN-d3 and CBG-d9) and 1.5 mL acetonitrile were mixed. The supernatant was diluted with 6 mL phosphate buffer (0.1 M, pH 6). A fully automated solid phase extraction (SPE) was performed subsequently, using a Gilson Aspec GX 271 Workstation (Gilson International B.V. Germany, Limburg an der Lahn, Germany). After the SPE column (Bond Elut C18 column; 300 mg, 3 mL, Agilent, Santa Clara, CA, USA) was conditioned with 6 mL methanol and 2 mL water at a flow rate of 1 mL/min, the sample

mixture was applied. The column was flushed with 4 mL water and 4 mL water/methanol (80:20 *v/v*) and subsequently rinsed with 1 mL 0.1 M acetic acid. After drying the column for 10 min, the cannabinoid compounds were eluted with 3 mL acetone/dichloromethane (50:50 *v/v*) [29]. The extract was evaporated to dryness at 40 °C and transferred into glass vials with 200 µL ethyl acetate. After evaporation at 30 °C, the samples were reconstituted in 50 µL of an acetonitrile/methanol/water mixture (3:3:2). For both evaporation steps, nitrogen was used.

### 3.5. LC-MS/MS Analysis

Samples were analyzed, using a previously described validated analysis method [16]. Analysis was performed with an UHPLC 1290 Infinity from Agilent Technologies (Waldbronn, Germany) and an Agilent Technologies 6490 Triple Quadrupole mass spectrometer, using a C18 column (ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 2.1 × 100 mm 1.8-µ, Agilent) at 30 °C with 5.00 µL sample injection volume at a flow rate of 0.6 mL/min. Mobile phase A was 5 mM ammonium formate in water, mobile phase B consisted of 0.1% (*v/v*) formic acid in acetonitrile. Analytes were separated using the following elution: 65% mobile phase B for the first 4.5 min, changed to 80% B and increased to 80.9% B at 7.50 min, changed to 100% B till 9.50 min. The column was re-equilibrated with 65% B for 3.5 min. Total run time was 13 min. Analytes were measured using electrospray ionization (ESI) in positive and negative reaction mode with a gas temperature of 250 °C, gas flow of 15 L/min, nebulizer pressure of 20 psi, sheath gas heater temperature of 400 °C, sheath gas flow of 12 L/min, capillary voltage of 4000 V and a nozzle voltage of 1000 V. For evaluation of the data, the Agilent Mass Hunter software B 09.00 was used. Analytes were calibrated in blank human serum.

### 3.6. Data Analysis

Data were analyzed and illustrated in boxplots, using Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) and IBM SPSS® Statistics 23 (International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, NY, USA).

In order to identify cannabinoid patterns and possible distinguishing markers among samples, cannabinoid concentrations were analyzed via principal component analysis (PCA), using SPSS® and PAST software (version 4.02) for scientific data analysis (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo, Norway) [30,31]. PCA is a mathematical tool for dimension reduction and visualization of patterns, i.e., similarities and differences, in high-dimensional datasets: Multidimensional data can be displayed in a clear 2- or 3-dimensional coordinate system, even if the dataset itself comprises much more than two or three variables. Therefore, the original observations are projected onto principal components (PC), which are linear combinations of the original variables, and along which the variation of the data is maximal [32]. Positions of the observations on the PCs are called PC scores and are illustrated in PCA scatter plots. Correlations between original variables and PCs are called loadings and are described in loading plots [33]. In a biplot, PC scores and loadings (shown as vectors) can be visualized simultaneously. When clustering in similar areas, items should exhibit similar properties, while separated items can be expected to differ with regard to the respective vector. Often, datasets with different ranges of variances are standardized before analysis [34]. Otherwise, variables with large variances could dominate the PCs, and potentially important effects of variables with small ranges would not be detected. A common standardization method is to transform data into z-scores. Therefore, for every sample *i*, the difference of a value *x* and the respective arithmetic mean  $\bar{x}$  of a variable *j* is divided by the respective standard deviation *s*. The resultant equation is  $z_{ij} = \frac{(x_{ij} - \bar{x}_j)}{s_j}$  [34]. For more information, you are referred to the according literature [34–36]. In this study, two PCA were carried out: One regarded study and forensic samples of street cannabis users. A second analysis regarded study samples, forensic samples of street cannabis users and forensic samples with self-reported intake of cannabis-based medicines. Suitability of the datasets for PCA were tested via Kaiser-

Meyer-Olkin measure and Barlett's test [18,19]. Respective datasets were normalized to z-scores as described above [34]. Results were plotted in variance-covariance matrices, and the first two PCs were visualized in a biplot or scatter plot, respectively. Loading plots of the PCs were provided as supplementary data. For more information on the software, you are referred to the PAST manual [37].

Additionally, study subgroups were compared via Kruskal–Wallis test. For every pairwise comparison, resultant effect sizes  $r$  were interpreted according to Cohen [38]. Family-wise error rates were controlled via Bonferroni–Holm method [39,40].

#### 4. Conclusions

In this pilot study, 18 different cannabinoids were quantified in serum samples after use of or a combination of Sativex<sup>®</sup>, Dronabinol, different medical cannabis varieties or street cannabis, using a validated LC-MS/MS method. Resultant cannabinoid serum patterns were compared among the subgroups, and potential differentiating markers for use of Sativex<sup>®</sup> or Dronabinol in contrast to cannabis were identified. Markers for Dronabinol or Sativex<sup>®</sup> included THC-OH/THC ratios  $\geq 1$  and increased levels of THC-COOH, CBD or CBC, whereas large quantities of other minor cannabinoids, such as THCAA, CBGA or CBCA, suggested cannabis use. Use of THC-rich medical and street cannabis could not be distinguished. However, one user sample of a CBD-rich medical cannabis variety was separated from other cannabis samples due to higher CBD/THC and CBC/THC levels, suggesting certain strains might be distinguishable. Further studies with larger case numbers and more different medical cannabis varieties could confirm this observation. Results of this study were used to test nine forensic case serum samples with self-reported intake of cannabis-based medicines. One sample exhibited cannabinoid serum patterns matching the self-reported medicine, indicating that Dronabinol could indeed have been used. For all other samples, cannabinoid serum patterns were similar to those of cannabis users, suggesting an (additional) intake of cannabis.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo11050316/s1>, Figure S1: Loading plot of principal component (PC) 1 and PC 2 for PCA of study and forensic samples, Figure S2: Loading plot of principal component (PC) 1 and PC 2 for PCA of study samples, forensic samples of street cannabis users and forensic samples with reported intake of cannabis-based medicines, Table S1: Demographic information on the study collective, Table S2: Cannabinoid concentrations of forensic samples analyzed in a previous study, Table S3: Cannabinoid concentrations of study and forensic samples standardized on THC, Table S4: Cannabinoid serum concentrations of forensic case samples with reported intake of cannabis-based medicines standardized on THC. References [41–43] are cited in the Supplementary Material.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.S., K.E. and J.R.; methodology, A.S.; validation, A.S. and C.H.; formal analysis, A.S., I.M. and A.P.; investigation, A.S.; resources, T.G., S.G.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, K.E., S.G.; C.H., I.M. and J.R.; visualization, A.S., C.H. and J.R.; supervision, T.G. and J.R.; funding acquisition, K.E., T.G. and J.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Level 1 Institutional Research Funding of the University Medical Center Mainz.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committees of the State Medical Associations of Rhineland-Palatinate and Hessen (application number 2018-13337, dates of approval: 25 July 2018 and 23 August 2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in Tables 1–3 and Supplementary Electronic Material.

**Acknowledgments:** The authors would like to express their special gratitude to R. Laufenberg-Feldmann and M. Ferner, V. Fleischer, U. Reinholz, T. Schmitt, J. Spielberger and E. Wagner-Drouet for their kind cooperation and support in study conduction. The authors also thank O. Löwenstein, J. Meier and the staffs of the study centers involved for supply of study samples. The Institute for medical biometry, epidemiology and informatics (IMBEI) is kindly acknowledged for support with statistical analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report 2019*; United Nations: Vienna, Austria, 2019; ISBN 978-92-1-148314-7.
2. United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report 2020*; United Nations: Vienna, Austria, 2020; ISBN 978-92-1-148345-1.
3. Ramaekers, J.G.; Kauert, G.; Theunissen, E.L.; Toennes, S.W.; Moeller, M.R. Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users. *J. Psychopharmacol.* **2009**, *23*, 266–277. [CrossRef] [PubMed]
4. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe—Findings from the DRUID Project*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2012.
5. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *Medical Use of Cannabis and Cannabinoids: Questions and Answers for Policymaking*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2018.
6. Russo, E.B. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 1344–1364. [CrossRef] [PubMed]
7. Almirall Hermal GmbH. Fachinformation Sativex Spray zur Anwendung in der Mundhöhle. Available online: <https://www.cannabis-med.org/german/sativex.pdf> (accessed on 23 November 2020).
8. Cannabis Ärzte. Medizinische Cannabissorten. Available online: <https://www.cannabis-aerzte.de/medizinische-cannabissorten/> (accessed on 18 February 2021).
9. Gegenfurtner, H. Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von Cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Juni. 2018. Available online: [https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartersberichte/2018/q2\\_18/Bundesbericht\\_GAmSi\\_201806\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartersberichte/2018/q2_18/Bundesbericht_GAmSi_201806_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf) (accessed on 23 November 2020).
10. Sahle, M. Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von Cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Juni. 2020. Available online: [https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartersberichte/2020/q2\\_22/Bundesbericht\\_GAmSi\\_202006\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartersberichte/2020/q2_22/Bundesbericht_GAmSi_202006_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf) (accessed on 23 November 2020).
11. Radünz, L.; Westphal, F.; Maser, E.; Rochholz, G. THCVA-A—A new additional marker for illegal cannabis consumption. *Forensic Sci. Int.* **2012**, *215*, 171–174. [CrossRef] [PubMed]
12. Raikos, N.; Schmid, H.; Nussbaumer, S.; Ambach, L.; Lanz, S.; Längin, A.; König, S.; Roth, N.; Auwärter, V.; Weinmann, W. Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid A ( $\Delta^9$ -THCA-A) in whole blood and plasma by LC-MS/MS and application in authentic samples from drivers suspected of driving under the influence of cannabis. *Forensic Sci. Int.* **2014**, *243*, 130–136. [CrossRef] [PubMed]
13. Scheunemann, A.; Elsner, K.; Germerott, T.; Hess, C.; Zörntlein, S.; Röhrich, J. Extensive phytocannabinoid profiles of seized cannabis and cannabis-based medicines—Identification of potential distinguishing markers. *Forensic Sci. Int.* **2021**, *322*, 110773. [CrossRef] [PubMed]
14. Meijer, E.D. The Chemical Phenotypes (Chemotypes) of Cannabis. In *Handbook of Cannabis*; Pertwee, R., Ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2014; pp. 89–110. ISBN 9780199662685.
15. Hazekamp, A.; Fishedick, J.T. Cannabis—From cultivar to chemovar. *Drug Test. Anal.* **2012**, *4*, 660–667. [CrossRef] [PubMed]
16. Scheunemann, A.; Elsner, K.; Germerott, T.; Hess, C.; Röhrich, J. Simultaneous quantification of 18 different phytocannabinoids in serum using a highly sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2021**, *1173*, 122685. [CrossRef] [PubMed]
17. MR NICE SEEDBANK. Dr. Nice Rebound—GMP (x30)—DrNice Website. Available online: <https://drnice.nl/product/dr-nice-rebound-box-set/> (accessed on 18 February 2021).
18. Kaiser, H.F.; Rice, J. Little Jiffy, Mark IV. *Educ. Psychol. Meas.* **1974**, *34*, 111–117. [CrossRef]
19. Cleff, T. *Deskriptive Statistik und Explorative Datenanalyse*; Gabler Verlag: Wiesbaden, Germany, 2015; ISBN 978-3-8349-4747-5.
20. Walther, B. Kruskal-Wallis-Test in SPSS Rechnen. Available online: <https://www.bjoernwalther.com/kruskal-wallis-test-in-spss-rechnen/> (accessed on 1 February 2021).
21. Feise, R.J. Do multiple outcome measures require p-value adjustment? *BMC Med. Res. Methodol.* **2002**, *2*, 8. [CrossRef] [PubMed]
22. Nadulski, T.; Sporkert, F.; Schnelle, M.; Stadelmann, A.M.; Roser, P.; Scheffer, T.; Pragst, F. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *J. Anal. Toxicol.* **2005**, *29*, 782–789. [CrossRef] [PubMed]

23. Karschner, E.L.; Darwin, W.D.; Goodwin, R.S.; Wright, S.; Huestis, M.A. Plasma cannabinoid pharmacokinetics following controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol and oromucosal cannabis extract administration. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 66–75. [CrossRef] [PubMed]
24. Guy, G.W.; Robson, P.J. A Phase I, Double Blind, Three-Way Crossover Study to Assess the Pharmacokinetic Profile of Cannabis Based Medicine Extract (CBME) Administered Sublingually in Variant Cannabinoid Ratios in Normal Healthy Male Volunteers (GWPK0215). *J. Cannabis Ther.* **2004**, *3*, 121–152. [CrossRef]
25. Lee, D.; Karschner, E.L.; Milman, G.; Barnes, A.J.; Goodwin, R.S.; Huestis, M.A. Can oral fluid cannabinoid testing monitor medication compliance and/or cannabis smoking during oral THC and oromucosal Sativex administration? *Drug Alcohol Depend.* **2013**, *130*, 68–76. [CrossRef] [PubMed]
26. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. European Drug Report 2019: Trends and Developments. Available online: [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724\\_TDAT19001ENN\\_PDF.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf) (accessed on 23 November 2020).
27. Fishedick, J.T.; Hazekamp, A.; Erkelens, T.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 2058–2073. [CrossRef] [PubMed]
28. Jung, B. Medizinalhanf: Welche Rolle Spielt das Terpenprofil? Available online: <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/news/artikel/2019/05/23/medizinalhanf-welche-rolle-spielt-das-terpenprofil/chapter:all> (accessed on 21 September 2020).
29. Röhrich, J.; Zörntlein, S.; Becker, J.; Urban, R. Detection of Delta9-tetrahydrocannabinol and amphetamine-type stimulants in oral fluid using the Rapid Stat point-of-collection drug-testing device. *J. Anal. Toxicol.* **2010**, *34*, 155–161. [CrossRef] [PubMed]
30. Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaentol. Electron.* **2001**, *4*, 9–17.
31. Hammer, Ø. et al. (1999–2021). PAST (Paleontological Statistics) [Software]. Available online: <https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/index.html> (accessed on 10 May 2021).
32. Ringné, M. What is principal component analysis? *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 303–304. [CrossRef] [PubMed]
33. Abdi, H.; Williams, L.J. Principal component analysis. *WIREs Comp. Stat.* **2010**, *2*, 433–459. [CrossRef]
34. Kessler, W. Hauptkomponentenanalyse. In *Multivariate Datenanalyse*; Kessler, W., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2006; pp. 21–88. ISBN 9783527610037.
35. Kessler, W. Einführung in die multivariate Datenanalyse. In *Multivariate Datenanalyse*; Kessler, W., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2006; pp. 1–20. ISBN 9783527610037.
36. Kessler, W. Kalibrieren, Validieren, Vorhersagen. In *Multivariate Datenanalyse*; Kessler, W., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2006; pp. 153–181. ISBN 9783527610037.
37. Hammer, Ø. PAST Version 4.03 Reference Manual. Available online: <https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/downloads/past4manual.pdf> (accessed on 29 September 2020).
38. Cohen, J. The Significance of a Product Moment rs. In *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*; Cohen, J., Ed.; Elsevier Science: Burlington, NJ, USA, 2013; pp. 75–107. ISBN 9780121790608.
39. Holm, S. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scand. J. Stat.* **1979**, *6*, 65–70.
40. Hemmerich, W.A. Rechner zur Adjustierung des  $\alpha$ -Niveaus | StatistikGuru.de. Available online: <https://statistikguru.de/rechner/adjustierung-des-alphaniveaus.html> (accessed on 1 February 2021).
41. Latour, A. Medizinische Cannabissorten in Apotheken. Available online: <https://www.leafly.de/cannabissorten-in-apotheken/> (accessed on 25 March 2021).
42. Bedrocan—Beyond Pioneering. Cannabis Products by Bedrocan—For Patients and Medicine Development. Available online: <https://bedrocan.com/products-services/> (accessed on 25 March 2021).
43. Bionorica ethics. Dronabinol—Informationen zur Herstellung des Rezepturarzneimittels in der Apotheke: Information für Fachkreise. Available online: [https://www.bionorica-ethics.de/Resources/Herstellbroschuere\\_Stand\\_012019.PDF](https://www.bionorica-ethics.de/Resources/Herstellbroschuere_Stand_012019.PDF) (accessed on 25 March 2021).



*Supplementary Material*

## **Identification of potential distinguishing markers for the use of cannabis-based medicines or street cannabis in serum samples**

**Anne Scheunemann <sup>1,\*</sup>, Katrin Elsner <sup>1</sup>, Tanja Germerott <sup>1</sup>, Sergiu Groppa <sup>2</sup>, Cornelius Hess <sup>1</sup>, Isabelle Miederer <sup>3</sup>, Alicia Poplawski <sup>4</sup> and Jörg Röhrich <sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Legal Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany

<sup>2</sup> Department of Neurology, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany

<sup>3</sup> Department of Nuclear Medicine, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany

<sup>4</sup> Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 55131 Mainz, Germany

\* Correspondence: [anne.scheunemann@uni-mainz.de](mailto:anne.scheunemann@uni-mainz.de)

Table S1. Demographic information on the study collective

Sample	Gender	Age	BMI*	Substance intake	Application	Dosing regimen per day	Approx. daily dose of THC [mg]**	Last dose before blood draw (respective THC quantity)	Time between last intake and blood draw
S01-01	f*	61	24	Sativex	om*	8 sprays per day	21.6 mg	M.D.*	2h 25min
S01-02	f	62	23	Sativex	om	3 - 0 - 3 sprays**	16.2 mg	3 sprays (8.1 mg THC)	18h 20min
S01-03	f	62	23	Sativex	om	2 - 0 - 3 sprays	13.5 mg	2 sprays (5.4 mg THC)	7h 15min
S02-01	m*	54	28	Sativex	om	12 sprays per day	32.4 mg	M.D.	9h
S02-02	m	54	28	Sativex	om	6 to 8 sprays per day	16.2-21.6 mg	2 sprays (5.4 mg THC)	16h 15min
S03-01	f	55	28	Sativex	om	4 - 0 - 6 sprays	27 mg	4 sprays (10.8 mg THC)	50 min
S03-02	f	56	29	Sativex	om	4 - 0 - 12 sprays	43.2 mg	4 sprays (10.8 mg THC)	33 min
S03-03	f	56	29	Sativex	om	4 - 0 - 6 sprays	27 mg	4 sprays (10.8 mg THC)	1h 24min
S03-04	f	56	29	Sativex	om	8 - 0 - 12 sprays	54 mg	4 sprays (10.8 mg THC)	1h 5min
S04-01	f	51	24	Sativex + Bedrocan	om, M.D.	0 - 0 - 2 to 3 sprays + unknown quantity of Bedrocan	5.4 to 8.1 mg + unknown quantity of THC from Bedrocan	2 to 3 sprays (5.4 to 8.1 mg THC)	10h 44min (Sativex)
S05-01	m	55	37	Sativex + Bedrocan	om, v*	Sativex: 1 - 0 - 2 sprays, Bedrocan: 500 mg at noon	118.1 mg (= 8.1 mg (Sativex) + 110 mg (Bedrocan))	2 sprays (5.4 mg THC)	13h 35min (Sativex)
S05-02	m	55	36	Sativex + Bedrocan	om, v	Sativex: 1 - 0 - 2 sprays, Bedrocan: 100 mg at noon	30.1 mg (= 8.1 mg (Sativex) + 22 mg (Bedrocan))	1 spray (2.7 mg THC)	2h 15min (Sativex)
S05-03	m	55	35	Sativex + Bedrocan	om, v	Sativex: 1 - 0 - 2 sprays, Bedrocan: 100 mg at noon	30.1 mg (= 8.1 mg (Sativex) + 22 mg (Bedrocan))	1 spray (2.7 mg THC)	1h 45min (Sativex)
S05-04	m	55	35	Sativex + Bedrocan	om, v	Sativex: 1 - 0 - 3 sprays, Bedrocan: 100 mg at noon	32.8 mg (= 10.8 mg (Sativex) + 22 mg (Bedrocan))	1 spray (2.7 mg THC)	3h 30min (Sativex)
S05-05	m	55	34	Sativex + Bedrocan	om, v	Sativex: 1 - 0 - 3 sprays, Bedrocan: 100 mg at noon	32.8 mg (= 10.8 mg (Sativex) + 22 mg (Bedrocan))	1 spray (2.7 mg THC)	2h 10min (Sativex)
S06-01	m	27	22	Bediol	v	50 mg - 50 mg - 50 mg	9.45 mg	50 mg (3.15mg THC)	3h 56min

Table S1. Cont.

Sample	Gender	Age	BMI*	Substance intake	Application	Dosing regimen per day	Approx. daily dose of THC [mg]***	Last dose before blood draw (respective THC quantity)	Time between last intake and blood draw
S07-01	m	58	25	Bedrocan	s*, v	3 g (10 doses at 300 mg each)	660 mg	300 mg (66 mg THC)	1h 10min
S07-02	m	58	24	Bedrocan	s, v	2.5 to 3 g (10 doses at 250 to 300 mg each, every 2 to 3 hours)	550 to 660 mg	250 to 300 mg (55 to 66 mg THC)	1h 30min
S07-03	m	58	23	Bedrocan	v	2 to 2.5 g (10 doses at 200 to 250 mg each, every 2 hours)	440 to 550 mg	200 to 250 mg (44 to 55 mg THC)	2h 30min
S07-04	m	59	23	Bedrocan	v	2.5 g (10 doses at 250mg each)	550 mg	250 mg (55 mg THC)	1h 10min
S08-01	f	36	54	Bedrolite + Pedanios 22/1	v	100 mg Bedrolite - 100 mg Bedrolite - 100 mg Pedanios 22/1	23.98 mg (= 1.98 mg (Bedrolite) + 22 mg (Pedanios 22/1))	100mg Pedanios 22/1 (22mg THC)	10h 10min (Pedanios 22/1)
S08-02	f	36	55	Bedrolite + Bedrocan	v	100 mg Bedrolite - 100 mg Bedrolite - 100 mg Bedrocan	23.98 mg (= 1.98 mg (Bedrolite) + 22 mg (Bedrocan))	100mg Bedrolite (0.99 mg THC)	9h (Bedrolite)
S08-03	f	36	54	Bedrolite + Bedrocan	v	70 mg Bedrolite - 70 mg Bedrolite - 70 mg Bedrocan	16.79 mg (= 1.39 mg (Bedrolite) + 15.4 mg (Bedrocan))	70mg Bedrolite (0.69 mg THC)	2h 30min (Bedrolite)
S08-04	f	36	54	Bedrolite + Bedrocan	v	100 mg Bedrocan - 0 - 100 mg Bedrolite (+ 100 mg Bedrocan before bedtime if necessary)	44.99 mg (= 0.99 mg (Bedrolite) + 44 mg (Bedrocan))	100mg Bedrocan (22 mg THC)	2h 30min (Bedrocan)
S09-01	m	56	31	Bedrocan	v	0 - 0 - 50 mg	11 mg	50 mg (11 mg THC)	15h 26min
S09-02	m	57	M.D.	Bedrocan	v	0 - 0 - 50 mg + 50 mg before bedtime	22 mg	50 mg (11 mg THC)	10h 55min
S09-03	m	57	28	Bedrocan	v	50 mg every second day/ if necessary	11 mg	50 mg (11 mg THC)	1d 14h 50min
S10-01	m	49	29	Bedrobinol	s	1 g (divided into 4 to 6 doses)	135 mg	166-250 mg (22.41-33.75 mg THC)	4h 50min
S10-02	m	50	30	Bedrobinol	s	1 g (divided into 4 to 6 doses)	135 mg	166-250 mg (22.41-33.75 mg THC)	3h 20min
S10-03	m	50	30	Bedrobinol	s	6 doses of 200 mg each	162 mg	200 mg (27 mg THC)	1h 55min
S10-04	m	50	30	Bedrobinol	s	4 to 6 doses of 200 mg each	108 to 162 mg	200 mg (27 mg THC)	5d 14h 40min

Table S1. Cont.

Sample	Gender	Age	BMI*	Substance intake	Application	Dosing regimen per day	Approx. daily dose of THC [mg]**	Last dose before blood draw (respective THC quantity)	Time between last intake and blood draw
S11-01	m	23	23	Dronabinol + Street cannabis	o*, s	6 - 6 - 6 drops of Dronabinol + 3-4 joints	15.84 mg (Dronabinol) + unknown quantity of THC (joint)	6 drops (5.28 mg THC)	6h 34min (Dronabinol)
S11-02	m	23	23	Dronabinol + Street cannabis	o, s	6 - 6 - 6 drops of Dronabinol + unknown number of joints	15.84 mg (Dronabinol) + unknown quantity of THC (joint)	6 drops (5.28 mg THC)	8h 19min (Dronabinol)
S11-03	m	23	22	Dronabinol + Street cannabis	o, s	unknown number of joints	M.D.	M.D.	approx. 4.5d (Dronabinol)
S11-04	m	23	21	Dronabinol + Street cannabis	o, s	1 joint - 1 joint - 1 joint; Dronabinol intake discontinued for 11 days	M.D.	1 joint (M.D.)	12h 50min (joint)
S12-01	m	58	24	Dronabinol + Street cannabis	o, s	10 - 10 - 10 drops of Dronabinol + 3 joints	26.4 mg (Dronabinol) + unknown quantity of THC (joint)	10 drops (8.8 mg THC)	3h (Dronabinol)
S12-02	m	58	25	Dronabinol + Street cannabis	o, v	12 - 12 - 15 drops of Dronabinol + unknown quantity of cannabis	34.32 mg (Dronabinol) + unknown quantity of THC (cannabis)	12 drops (10.56 mg THC)	2h 47min (Dronabinol)
S13-01	f	75	29	Dronabinol	o	3 - 0 - 3 drops	5.28 mg	5 drops (4.4 mg THC)	7h 20min
S14-01	f	78	17	Dronabinol	o	2 doses of 2 to 3 drops each	3.52-5.28 mg	2-3 drops (1.76-2.64 mg THC)	1h 20min
S15-01	m	76	23	Dronabinol	o	5 - 0 - 5 drops	8.80 mg	5 drops (4.4 mg THC)	1h 40min
S15-02	m	76	22	Dronabinol	o	2 doses to 6 to 8 drops each	10.56-14.08 mg	6-8 drops (5.28-7.04 mg THC)	3h 20min
S16-01	m	59	31	Dronabinol	o	4 - 0 - 0 drops	3.52 mg	4 drops (3.52 mg THC)	23h 40min
S16-02	m	60	31	Dronabinol	o	6 - 0 - 0 drops	5.28 mg	6 drops (5.28 mg THC)	24h 30min
S16-03	m	60	31	Dronabinol	o	6 - 0 - 0 drops	5.28 mg	6 drops (5.28 mg THC)	3h 17min

Table S1. Cont.

Sample	Gender	Age	BMI*	Substance intake	Application	Dosing regimen per day	Approx. daily dose of THC [mg]**	Last dose before blood draw (respective THC quantity)	Time between last intake and blood draw
S17-01	f	54	24	Dronabinol	o	5 - 0 - 10 drops	13.2 mg	5 drops (4.4 mg THC)	6h 20min
S17-02	f	55	24	Dronabinol	o	3 - 0 - 10 drops	11.44 mg	3 drops (2.64 mg THC)	6h 45min
S17-03	f	55	24	Dronabinol	o	0 - 0 - 5 drops	4.4 mg	5 drops (4.4 mg THC)	15h 6min
S17-04	f	55	24	Dronabinol	o	0 - 0 - 5 drops	4.4 mg	5 drops (4.4 mg THC)	15h 30min
S17-05	f	55	24	Dronabinol	o	0 - 0 - 5 drops	4.4 mg	5 drops (4.4 mg THC)	15h 25min
S18-01	f	64	15	Dronabinol	o	5 - 5 - 5 drops	13.2 mg	5 drops (4.4 mg THC)	2h 5min
S19-01	f	64	20	Dronabinol	o	6 - 6 - 6 drops	15.84 mg	6 drops (5.28 mg THC)	1h
S19-02	f	64	20	Dronabinol	o	'intake discontinued for some days'	M.D.	M.D.	M.D.
S20-01	f	46	24	Dronabinol	o	2 - 0 - 2 drops	3.52 mg	2 drops (1.76 mg THC)	1 to 1,5h
S21-01	f	56	25	Dronabinol	o	5 - 5 - 5 drops	13.2 mg	5 drops (4.4 mg THC)	3h 24min
S22-01	f	55	33	Dronabinol	o	0 - 0 - 4 drops	3.52 mg	4 drops (3.52 mg THC)	13h 54min
S23-01	f	44	23	Dr. Nice CBD capsules	o	0 - 0 - 1 capsule	1.64 mg	1 capsule (1.64 mg)	14h 15min

\* f = female, m = male, BMI = body mass index, om = oromucosal, v = vaporized, s = smoked, o = oral, M.D. = missing data

\*\* 3 doses were applied in the morning, 0 doses at noon/afternoon and 3 doses in the evening

\*\*\* Calculated as follows: 1 spray Sativex  $\cong$  2.7 mg THC [7], Pedanios 22/1  $\cong$  22% THC [41], Bedrocan  $\cong$  22% THC, Bediol  $\cong$  6.3% THC, Bedrolite  $\cong$  0.99% (<1.0%) THC, Bedrobinol  $\cong$  13.5% THC [42], 1 drop of Dronabinol  $\cong$  0.88 mg THC [43], 1 Dr. Nice CBD capsule  $\cong$  1.64 mg THC (Extract in the capsules contains 34.4 mg CBD/g and 1.88 mg THC/g [17]), 1 capsule contains at least 30 mg CBD, which equals approx. 30 mg CBD / 34.4 mg CBD/g extract = 0.87 g \* 1.88 mg THC/g = 1.64 mg THC).

**Table S2.** Cannabinoid concentrations of forensic serum samples analyzed in a previous study [16] in [ng/mL]

Sample	Substance intake	THC	THC-OH	THC-COOH	THCAA	CBD	CBDA	CBNA	CBG	CBGA	CBC	CBCA	CBL	CBLA	THCV	THCVA	CBDV	CBDVA			
F01	Street cannabis	10	2.9	27	180	9.8	10	nd	(0.0028)*	0.22	0.018	0.44	0.51	1.3	0.75	nd	0.010	(0.032)	1.7	nd	nd
F02	Street cannabis	42	14	180	9.8	9.8	0.55	nd	0.85	0.13	4.4	0.20	nd	nd	0.24	1.0	nd	nd	nd	nd	
F03	Street cannabis	0.36	0.44	8.3	0.24	0.40	0.12	0.015	0.034	nd	0.037	0.20	0.035	nd	nd	0.16	nd	(0.0063)	nd	nd	
F04	Street cannabis	1.3	1.0	18	0.27	(0.054)	nd	0.042	(0.0044)	(0.055)	0.022	0.20	nd	nd	nd	0.28	nd	nd	nd	nd	
F05	Street cannabis	4.0	1.5	22	0.26	0.57	0.011	0.52	(0.0092)	0.17	0.031	0.52	(0.018)	nd	nd	(0.048)	0.45	nd	nd	nd	
F06	Street cannabis	1.2	0.76	8.6	0.078	(0.042)	nd	0.044	(0.0061)	(0.040)	(0.013)	0.26	(0.0080)	nd	nd	0.18	nd	nd	nd	nd	
F07	Street cannabis	0.20	nd	10	0.020	nd	nd	(0.0055)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.040	nd	nd	nd	nd	
F08	Street cannabis	2.0	1.0	14	0.28	(0.050)	nd	0.094	(0.0057)	(0.062)	(0.0084)	0.20	(0.014)	nd	nd	0.075	nd	nd	nd	nd	
F09	Street cannabis	0.82	0.78	15	0.056	nd	nd	0.024	(0.0038)	nd	nd	(0.10)	nd	nd	nd	0.070	nd	nd	nd	nd	
F10	Street cannabis	1.2	(0.26)	4.1	0.12	nd	nd	0.031	(0.0082)	(0.048)	nd	nd	nd	nd	nd	0.052	nd	nd	nd	nd	
F11	Street cannabis	3.5	1.1	25	0.66	nd	nd	0.11	(0.015)	0.15	0.024	0.34	(0.015)	nd	nd	0.27	nd	nd	nd	nd	
F12	Street cannabis	1.1	0.81	47	0.15	nd	nd	0.023	(0.0064)	(0.058)	0.023	(0.10)	(0.0099)	nd	nd	0.077	nd	nd	nd	nd	
F13	Street cannabis	0.68	0.40	7.4	0.043	0.17	nd	0.041	(0.0069)	nd	(0.0093)	(0.10)	(0.0094)	nd	nd	0.041	nd	nd	nd	nd	
F14	Street cannabis	0.83	0.77	19	0.068	nd	nd	0.012	(0.011)	nd	(0.0093)	(0.10)	nd	nd	nd	0.063	nd	nd	nd	nd	
F15	Street cannabis	0.60	0.40	2.0	0.028	nd	nd	0.031	(0.0059)	nd	nd	(0.10)	nd	nd	nd	(0.027)	nd	nd	nd	nd	
F16	Street cannabis	0.45	nd	3.0	0.047	nd	nd	0.013	(0.0060)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.047	nd	nd	nd	nd	
F17	Street cannabis	13	17	180	9.9	0.42	0.024	0.30	0.023	0.26	0.41	1.7	0.15	nd	0.010	(0.020)	0.78	nd	nd	nd	
F18	Street cannabis	55	9.3	160	64	0.14	0.0059	1.6	0.18	1.4	1.7	5.6	3.1	0.19	0.011	0.71	51	nd	nd	nd	
F19	Street cannabis	31	21	170	11	0.13	nd	0.51	0.027	1.8	0.74	2.3	0.25	nd	0.010	0.20	2.3	nd	nd	nd	
F20	Street cannabis	26	12	190	19	nd	nd	0.51	0.056	1.7	2.0	2.3	0.59	nd	0.013	(0.15)	1.4	nd	nd	nd	
F21	Street cannabis (0.055)	nd	nd	2.9	0.23	nd	nd	0.010	nd	nd	(0.013)	nd	(0.026)	nd	(0.0022)	nd	1.5	nd	nd	nd	
F22	Street cannabis	3.3	2.0	26	0.47	nd	nd	0.077	(0.015)	0.25	0.083	0.60	0.054	nd	nd	0.21	nd	nd	nd	nd	
F23	Street cannabis	0.31	(0.20)	(1.2)	0.070	nd	nd	0.0085	(0.0056)	nd	(0.011)	nd	(0.012)	nd	nd	(0.033)	nd	nd	nd	nd	
F24	Street cannabis	0.75	(0.35)	11	0.065	nd	nd	0.042	(0.0073)	nd	(0.0092)	(0.10)	nd	nd	nd	0.063	nd	nd	nd	nd	

Table S2. Cont.

Sample	Substance intake	THC	THC-OH	THC-COOH	THCAA	CBD	CBDA	CBN	CBNA	CBG	CBGA	CBC	CBCA	CBL	CBLA	THCV	THCVA	CBDV	CBDVA
F25	Street cannabis	0.24	nd	3.0	0.033	nd	nd	0.0094	0.016	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.042	nd	nd
F26	Street cannabis	3.7	2.7	93	0.27	nd	nd	0.18	0.025	(0.075)	0.034	0.52	(0.025)	(0.071)	(0.0020)	nd	2.2	nd	nd
F27	Street cannabis	3.2	2.8	80	7.0	1.5	0.15	0.097	0.020	(0.066)	0.28	0.51	0.17	nd	(0.0048)	nd	0.79	nd	nd
F28	Street cannabis	0.81	0.46	19	0.64	nd	(0.0022)	0.021	0.028	nd	0.021	nd	(0.021)	nd	nd	nd	0.073	nd	nd
F29	Street cannabis	1.3	1.8	38	0.048	(0.069)	nd	0.062	(0.0051)	nd	(0.014)	(0.10)	nd	nd	nd	nd	(0.033)	nd	nd
F30	Street cannabis	1.7	1.3	51	0.32	nd	nd	0.030	(0.0069)	0.083	(0.011)	0.20	(0.017)	nd	nd	nd	0.088	nd	nd
F31	Street cannabis	0.63	(0.33)	21	(0.0099)	nd	nd	0.0080	(0.0061)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.049	nd	nd
F32	Street cannabis	2.5	1.9	28	2.7	nd	nd	0.042	(0.0083)	0.10	0.10	0.22	(0.026)	nd	nd	nd	0.95	nd	nd
F33	Street cannabis	0.41	nd	3.0	0.18	nd	nd	(0.0053)	(0.0040)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.13	nd	nd
F34	Street cannabis	0.47	(0.27)	3.7	0.026	nd	nd	0.0091	(0.0044)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.81	nd	nd
F35	Street cannabis	2.5	0.78	40	0.090	nd	nd	0.056	nd	(0.040)	nd	(0.11)	nd	nd	nd	nd	0.52	nd	nd
F36	Street cannabis	0.94	0.54	20	0.035	nd	nd	0.026	nd	nd	nd	(0.10)	nd	nd	nd	nd	0.64	nd	nd
F37	Street cannabis	0.34	nd	2.0	(0.0095)	nd	nd	(0.0067)	(0.0041)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.12	nd	nd
F38	Street cannabis	1.6	0.93	32	0.092	nd	nd	0.038	(0.0052)	0.076	nd	(0.10)	nd	nd	nd	(0.021)	0.42	nd	nd
F39	Street cannabis	0.80	0.40	7.7	0.029	nd	nd	0.022	(0.0050)	nd	nd	(0.10)	nd	nd	nd	(0.020)	0.27	nd	nd
F40	Street cannabis	0.28	nd	3.0	(0.0059)	nd	nd	(0.0041)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.16	nd	nd
F41	Street cannabis	0.61	(0.27)	4.4	(0.012)	nd	nd	0.011	(0.0060)	(0.040)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.11	nd	nd
F42	Street cannabis	0.44	0.40	(1.0)	0.029	nd	nd	(0.0027)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.067	nd	nd
F43	Street cannabis	8.6	5.3	200	0.031	0.47	(0.0029)	0.19	(0.0052)	0.31	(0.014)	0.20	(0.0080)	nd	nd	(0.10)	0.65	nd	nd
F44	Street cannabis	0.47	(0.20)	4.6	(0.0013)	nd	nd	0.018	(0.0047)	(0.040)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.16	nd	nd
F45	Street cannabis	0.60	0.40	11	0.16	nd	nd	0.011	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.19	nd	nd
F46	Street cannabis	0.64	0.41	3.0	0.22	nd	nd	0.012	nd	nd	(0.0093)	nd	(0.0090)	nd	nd	nd	0.53	nd	nd
F47	Street cannabis	1.0	(0.30)	3.9	0.021	nd	nd	0.024	(0.0043)	(0.058)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.046	nd	nd
F48	Street cannabis	0.46	(0.25)	3.7	0.031	nd	nd	0.0092	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.11	nd	nd

Table S2. Cont.

Sample	Substance intake	THC	THC-OH	THC-COOH	THCAA	CBD	CBDA	CBN	CBNA	CBG	CBGA	CBC	CBCA	CBL	CBLA	THCV	THCVA	CBDV	CBDVA
F49	Street cannabis	0.89	0.40	7.1	0.027	nd	nd	0.012	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.35	nd	nd
F50	Street cannabis	0.20	nd	(1.0)	0.44	nd	nd	(0.0018)	0.017	nd	nd	nd	(0.012)	nd	nd	nd	0.20	nd	nd
F51	Street cannabis	0.45	nd	5.4	0.028	nd	nd	0.010	(0.0041)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.13	nd	nd
F52	Street cannabis	0.29	(0.20)	2.0	(0.010)	nd	nd	(0.0060)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.049	nd	nd
F53	Street cannabis	0.37	(0.20)	5.5	0.020	nd	nd	0.022	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.076	nd	nd
F54	Street cannabis	0.20	nd	(1.0)	0.13	nd	nd	(0.0013)	nd	nd	(0.0096)	nd	nd	nd	nd	nd	0.045	nd	nd
F55	Street cannabis	0.56	(0.30)	7.5	0.13	nd	nd	0.010	nd	nd	0.020	nd	nd	nd	nd	nd	0.25	nd	nd

\* Measured values <LOQ are reported as approximate values in parentheses, nd = not detected/ below limit of detection

Table S3. Cannabinoid serum concentrations of study and forensic serum samples standardized on THC (Cannabinoid ratios)

Sample	Substance intake	$\frac{THC - OH}{THC}$	$\frac{THC - COOH}{THC}$	$\frac{THCAA}{THC}$	$\frac{CBD}{THC}$	$\frac{CBDA}{THC}$	$\frac{CBN}{THC}$	$\frac{CBNA}{THC}$	$\frac{CBG}{THC}$	$\frac{CBGA}{THC}$	$\frac{CBC}{THC}$	$\frac{CBCA}{THC}$	$\frac{CBL}{THC}$	$\frac{CBLA}{THC}$	$\frac{THCV}{THC}$	$\frac{THCVA}{THC}$	$\frac{CBDVA}{THC}$
S01-01	Sativex	2.62	76.5	0.0471	1.06	0	0.0250	0	0	0	0.412	0	0	0	0	0.0677	0
S01-02	Sativex	2.82	86.4	0.0546	1.14	0	0.0146	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0864	0
S01-03	Sativex	2.40	127	0.0367	1.53	0	0.0107	0	0	0	0	0	0	0	0	0.140	0
S02-01	Sativex	1.09	20.9	0.0255	0.682	0.00182	0.0182	0	0	0	0.100	0	0	0	0	0.0209	0
S02-02	Sativex	3.46	41.5	0.0362	0.770	0.00215	0.0231	0	0	0	0.223	0	0	0	0	0.0162	0
S03-01	Sativex	8.90	58.5	0.0683	1.22	0.0122	0.0293	0	0	0	0.342	0	0	0	0	0.0183	0
S03-02	Sativex	10.2	114	0.0508	1.22	0.00857	0.0254	0	0	0	0.254	0	0	0	0	0.0270	0
S03-03	Sativex	2.61	21.7	0.0183	0.609	0.00891	0.00957	0	0	0	0.178	0.00652	0	0	0	0.00413	0
S03-04	Sativex	5.00	38.6	0.00773	1.39	0.00955	0.00909	0.00150	0	0.00250	0.250	0.00727	0	0	0	0.00546	0
S04-01	Sativex+Bedrocan	0.450	1.50	0	0.371	0.00929	0.0121	0	0	0	0.0714	0.00786	0	0	0	0.0171	0
S05-01	Sativex+Bedrocan	0	68.0	0.0620	0	0	0.0220	0	0	0	0	0	0	0	0	0.340	0
S05-02	Sativex+Bedrocan	2.33	51.2	0.0395	0.605	0.00977	0.0181	0	0	0	0.233	0	0	0	0	0.0744	0
S05-03	Sativex+Bedrocan	1.96	66.7	0.0889	0.756	0.0533	0.0267	0	0	0	0.267	0	0	0	0	0.104	0
S05-04	Sativex+Bedrocan	2.18	50.9	0.0327	0.582	0.00646	0.0182	0	0	0	0.255	0.0136	0	0	0	1.64	0
S05-05	Sativex+Bedrocan	1.97	38.0	0.0563	0.747	0.00479	0.0141	0	0	0	0.254	0	0	0	0	0.0409	0
S06-01	Bediol	0.766	7.66	0.0138	2.13	0.00575	0.0511	0	0	0	0.479	0	0	0	0	0.192	0
S07-01	Bedrocan	0.449	3.47	0.190	0.00367	0.000180	0.0198	0.000449	0.0490	0.0225	0.0918	0.0118	0	0.000449	0.00735	0.0653	0
S07-02	Bedrocan	0.531	5.31	0.116	0.00222	0.0000969	0.0150	0.000406	0.0469	0.0169	0.0938	0.00656	0	0.000300	0.00719	0.0844	0
S07-03	Bedrocan	0.605	3.58	0.0442	0.00186	0.0000814	0.0214	0.000698	0.0395	0.0172	0.0977	0.00837	0	0.000326	0.00581	0.0212	0
S07-04	Bedrocan	0.438	3.75	0.0333	0.000938	0.000110	0.0175	0.000542	0.0438	0.00708	0.0917	0.00250	0	0.000148	0.00354	0.0313	0
S08-01	Bedrolite+Pedantios	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S08-02	Bedrolite+Bedrocan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S08-03	Bedrolite+Bedrocan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S08-04	Bedrolite+Bedrocan	0	0	0.0613	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table S3. Cont.

Sample	Substance intake	$\frac{THC - OH}{THC}$	$\frac{THC - COOH}{THC}$	$\frac{THCAA}{THC}$	$\frac{CBD}{THC}$	$\frac{CBDA}{THC}$	$\frac{CBN}{THC}$	$\frac{CBNA}{THC}$	$\frac{CBG}{THC}$	$\frac{CBGA}{THC}$	$\frac{CBC}{THC}$	$\frac{CBCA}{THC}$	$\frac{CBL}{THC}$	$\frac{CBLA}{THC}$	$\frac{THCV}{THC}$	$\frac{THCVA}{THC}$	$\frac{CBDVA}{THC}$	
S09-01	Bedrocan	1.08	28.2	0.0239	0.0923	0.0162	0.0462	0	0	0.0564	0	0	0	0	0	0	0.949	0
S09-02	Bedrocan	0.643	15.2	0.112	0	0.00476	0.0286	0	0	0.0571	0	0	0	0	0	0	0.548	0
S09-03	Bedrocan	0	12.9	0.112	0	0	0.112	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.59	0
S10-01	Bedrobinol	0	0	0.0600	0	0	0.0180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0435	0
S10-02	Bedrobinol	0.405	3.78	0.238	0.0235	0	0.0676	0	0.0243	0.00892	0.173	0.00784	0	0	0	0	0.0566	0
S10-03	Bedrobinol	0.426	4.26	0.277	0.0162	0	0.0383	0	0.0168	0.0115	0.181	0.0117	0	0	0	0	0.119	0
S10-04	Bedrobinol	0.524	4.00	0.214	0.0348	0	0.0571	0	0.0219	0.00524	0.129	0.0110	0	0	0	0	0.133	0
S11-01	Dronabinol + Street cannabis	1.19	25.0	0.0191	0	0	0.0321	0	0	0.00976	0.179	0	0	0.00250	0	0	0.345	0
S11-02	Dronabinol + Street cannabis	0.714	15.0	0.121	0	0	0.0207	0.00350	0.0407	0.0171	0.129	0.00929	0	0	0	0	1.64	0
S11-03	Dronabinol + Street cannabis	0.634	6.10	0.268	0	0	0.0342	0.0110	0	0.0293	0	0.0268	0	0.00585	0	0	0.756	0
S11-04	Dronabinol + Street cannabis	0.575	15.8	0.0917	0	0	0.0267	0	0.0467	0.0125	0.225	0.00833	0	0.00192	0	0	0.333	0
S12-01	Dronabinol+Street cannabis	0.482	26.4	0.0600	0	0	0.0318	0	0.0755	0.0127	0.118	0.00227	0	0	0	0	0.0709	0
S12-02	Dronabinol+Street cannabis	0.750	13.1	0.0488	0.00275	0	0.0294	0.00125	0.0413	0.00688	0.0750	0.00200	0	0	0	0	0.106	0
S13-01	Dronabinol	3.96	47.9	0.00104	0	0	0	0	0	0.0190	0	0	0	0	0	0	0	0
S14-01	Dronabinol	1.13	19.5	0.000488	0	0	0.00927	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.220	0
S15-01	Dronabinol	3.12	76.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S15-02	Dronabinol	2	29.0	0	0	0	0.00240	0	0	0.00850	0	0	0	0	0	0	0	0

Table S3. Cont.

Sample	Substance intake	$\frac{THC - OH}{THC}$	$\frac{THC - COOH}{THC}$	$\frac{THCAA}{THC}$	$\frac{CBD}{THC}$	$\frac{CBDA}{THC}$	$\frac{CBN}{THC}$	$\frac{CBNA}{THC}$	$\frac{CBG}{THC}$	$\frac{CBGA}{THC}$	$\frac{CBC}{THC}$	$\frac{CBCA}{THC}$	$\frac{CBL}{THC}$	$\frac{CBLA}{THC}$	$\frac{THCV}{THC}$	$\frac{THCVA}{THC}$	$\frac{CBDVA}{THC}$
S16-01	Dronabinol	1.33	16.0	0.0167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S16-02	Dronabinol	0	48.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S16-03	Dronabinol	2.83	28.7	0.0739	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S17-01	Dronabinol	1.08	25.2	0.0600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S17-02	Dronabinol	10.1	186	0.243	0	0	0.0314	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S17-03	Dronabinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S17-04	Dronabinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S17-05	Dronabinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S18-01	Dronabinol	0	0	0.0367	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S19-01	Dronabinol	5.56	15.6	0.172	0	0	0.0294	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S19-02	Dronabinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S20-01	Dronabinol	0	20.0	0	0	0	0.0124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S21-01	Dronabinol	3.91	40.6	0.0116	0	0	0.00667	0.00783	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S22-01	Dronabinol	3.07	107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.213	0
S23-01	CBD capsules	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F01	Street cannabis	0.290	2.70	1.00	0	0.000280	0.0220	0.00180	0.0440	0.0510	0.130	0.0750	0	0.00100	0.00320	0.170	0
F02	Street cannabis	0.333	4.29	0.233	0.0131	0	0.0452	0.00212	0.0202	0.00310	0.105	0.00476	0	0	0.00571	0.0238	0
F03	Street cannabis	1.22	23.1	0.667	1.11	0.333	0.0417	0.0944	0	0.103	0.556	0.0972	0	0	0	0.444	0.0175
F04	Street cannabis	0.769	13.9	0.208	0.0415	0	0.0323	0.00339	0.0423	0.0169	0.154	0	0	0	0	0.215	0
F05	Street cannabis	0.375	5.50	0.0650	0.143	0.00275	0.130	0.00230	0.0425	0.00775	0.130	0.00450	0	0	0.0120	0.113	0
F06	Street cannabis	0.633	7.17	0.0650	0.0350	0	0.0367	0.00509	0.0333	0.0108	0.217	0.00667	0	0	0	0.150	0
F07	Street cannabis	0	50.0	0.100	0	0	0.0275	0	0	0	0	0	0	0	0	0.200	0

Table S3. Cont.

Sample	Substance intake	$\frac{THC - OH}{THC}$	$\frac{THC - COOH}{THC}$	$\frac{THCAA}{THC}$	$\frac{CBD}{THC}$	$\frac{CBDA}{THC}$	$\frac{CBN}{THC}$	$\frac{CBNA}{THC}$	$\frac{CBG}{THC}$	$\frac{CBGA}{THC}$	$\frac{CBC}{THC}$	$\frac{CBCA}{THC}$	$\frac{CBL}{THC}$	$\frac{CBLA}{THC}$	$\frac{THCV}{THC}$	$\frac{THCVA}{THC}$	$\frac{CBDVA}{THC}$	
F08	Street cannabis	0.500	7.00	0.140	0.0250	0	0.0470	0.00285	0.0310	0.00420	0.100	0.00700	0	0	0	0	0.0375	0
F09	Street cannabis	0.951	18.3	0.0683	0	0	0.0293	0.00463	0	0	0.122	0	0	0	0	0	0.0854	0
F10	Street cannabis	0.217	3.42	0.100	0	0	0.0258	0.00683	0.0400	0	0	0	0	0	0	0	0.0433	0
F11	Street cannabis	0.314	7.14	0.189	0	0	0.0314	0.00429	0.0429	0.00686	0.0971	0.00429	0	0	0	0	0.0771	0
F12	Street cannabis	0.736	42.7	0.136	0	0	0.0209	0.00582	0.0527	0.0209	0.0909	0.00900	0	0	0	0	0.0700	0
F13	Street cannabis	0.588	10.9	0.0632	0.250	0	0.0603	0.0102	0	0.0137	0.147	0.0138	0	0	0	0	0.0603	0
F14	Street cannabis	0.928	22.9	0.0819	0	0	0.0145	0.0133	0	0.0112	0.121	0	0	0	0	0	0.0759	0
F15	Street cannabis	0.667	3.33	0.0467	0	0	0.0517	0.00983	0	0	0.167	0	0	0	0	0	0.0450	0
F16	Street cannabis	0	6.67	0.104	0	0	0.0289	0.0133	0	0	0	0	0	0	0	0	0.104	0
F17	Street cannabis	1.31	13.9	0.762	0.0323	0.00185	0.0231	0.00177	0.0200	0.0315	0.131	0.0115	0	0.000769	0.00154	0.0600	0	0
F18	Street cannabis	0.169	2.91	1.16	0.00255	0.000107	0.0291	0.00327	0.0255	0.0309	0.102	0.0564	0.00346	0.000200	0.0129	0.927	0	0
F19	Street cannabis	0.677	5.48	0.355	0.00419	0	0.0165	0.000871	0.0581	0.0239	0.0742	0.00807	0	0.000323	0.00645	0.0742	0	0
F20	Street cannabis	0.462	7.31	0.731	0	0	0.0196	0.00215	0.0654	0.0769	0.0885	0.0227	0	0.000500	0.00577	0.0539	0	0
F21	Street cannabis	0	52.7	4.18	0	0	0.182	0	0	0.236	0	0.473	0	0.0400	0	27.3	0	0
F22	Street cannabis	0.606	7.88	0.142	0	0	0.0233	0.00455	0.0758	0.0252	0.182	0.0164	0	0	0	0.0636	0	0
F23	Street cannabis	0.645	3.87	0.226	0	0	0.0274	0.0181	0	0.0355	0	0.0387	0	0	0	0.107	0	0
F24	Street cannabis	0.467	14.7	0.0867	0	0	0.0560	0.00973	0	0.0123	0.133	0	0	0	0	0.0840	0	0
F25	Street cannabis	0	12.5	0.138	0	0	0.0392	0.00667	0	0	0	0	0	0	0	0.175	0	0
F26	Street cannabis	0.730	25.1	0.0730	0	0	0.0487	0.00676	0.0203	0.00919	0.141	0.00676	0.0192	0.000541	0	0.595	0	0
F27	Street cannabis	0.875	25.0	2.19	0.469	0.0469	0.0303	0.00625	0.0206	0.0875	0.159	0.0531	0	0.00150	0	0.247	0	0
F28	Street cannabis	0.568	23.5	0.790	0	0.00272	0.0259	0.0346	0	0.0259	0	0.0259	0	0	0	0.0901	0	0
F29	Street cannabis	1.39	29.2	0.0369	0.0531	0	0.0477	0.00392	0	0.0108	0.0769	0	0	0	0	0.0254	0	0

Table S3. Cont.

Sample	Substance intake	$\frac{THC - OH}{THC}$	$\frac{THC - COOH}{THC}$	$\frac{THCAA}{THC}$	$\frac{CBD}{THC}$	$\frac{CBDA}{THC}$	$\frac{CBN}{THC}$	$\frac{CBNA}{THC}$	$\frac{CBG}{THC}$	$\frac{CBGA}{THC}$	$\frac{CBC}{THC}$	$\frac{CBCA}{THC}$	$\frac{CBL}{THC}$	$\frac{CBLA}{THC}$	$\frac{THCV}{THC}$	$\frac{THCVA}{THC}$	$\frac{CBDVA}{THC}$
F30	Street cannabis	0.765	30.0	0.188	0	0	0.0177	0.00406	0.0488	0.00647	0.118	0.0100	0	0	0	0.0518	0
F31	Street cannabis	0.524	33.3	0.0157	0	0	0.0127	0.00968	0	0	0	0	0	0	0	0.0778	0
F32	Street cannabis	0.760	11.2	1.08	0	0	0.0168	0.00332	0.0400	0.0400	0.0880	0.0104	0	0	0	0.380	0
F33	Street cannabis	0	7.32	0.439	0	0	0.0129	0.00976	0	0	0	0	0	0	0	0.317	0
F34	Street cannabis	0.575	7.87	0.0553	0	0	0.0194	0.00936	0	0	0	0	0	0	0	1.72	0
F35	Street cannabis	0.312	16.0	0.0360	0	0	0.0224	0	0.0160	0	0.0440	0	0	0	0	0.208	0
F36	Street cannabis	0.575	21.3	0.0372	0	0	0.0277	0	0	0.106	0	0	0	0	0	0.681	0
F37	Street cannabis	0	5.88	0.0279	0	0	0.0197	0.0121	0	0	0	0	0	0	0	0.353	0
F38	Street cannabis	0.581	20.0	0.0575	0	0	0.0238	0.00325	0.0475	0	0.0625	0	0	0	0.0131	0.263	0
F39	Street cannabis	0.500	9.63	0.0363	0	0	0.0275	0.00625	0	0.125	0	0	0	0	0.0250	0.338	0
F40	Street cannabis	0	10.7	0.0211	0	0	0.0146	0	0	0	0	0	0	0	0	0.571	0
F41	Street cannabis	0.443	7.21	0.0197	0	0	0.0180	0.00984	0.0656	0	0	0	0	0	0	0.180	0
F42	Street cannabis	0.909	2.27	0.0659	0	0	0.00614	0	0	0	0	0	0	0	0	0.152	0
F43	Street cannabis	0.616	23.3	0.00361	0.0547	0.000337	0.0221	0.000605	0.0361	0.00163	0.0233	0.000930	0	0	0.0116	0.0756	0
F44	Street cannabis	0.426	9.79	0.00277	0	0	0.0383	0.0100	0.0851	0	0	0	0	0	0	0.340	0
F45	Street cannabis	0.667	18.3	0.267	0	0	0.0183	0	0	0	0	0	0	0	0	0.317	0
F46	Street cannabis	0.641	4.69	0.344	0	0	0.0188	0	0.0145	0	0.0141	0	0	0	0	0.828	0
F47	Street cannabis	0.300	3.90	0.0210	0	0	0.0240	0.00430	0.0580	0	0	0	0	0	0	0.0460	0
F48	Street cannabis	0.544	8.04	0.0674	0	0	0.0200	0	0	0	0	0	0	0	0	0.239	0
F49	Street cannabis	0.449	7.98	0.0303	0	0	0.0135	0	0	0	0	0	0	0	0	0.393	0
F50	Street cannabis	0	5.00	2.20	0	0	0.00900	0.0850	0	0	0.0600	0	0	0	0	1.00	0
F51	Street cannabis	0	12.0	0.0622	0	0	0.0222	0.00911	0	0	0	0	0	0	0	0.289	0
F52	Street cannabis	0.690	6.90	0.0345	0	0	0.0207	0	0	0	0	0	0	0	0	0.169	0

Table S3. Cont.

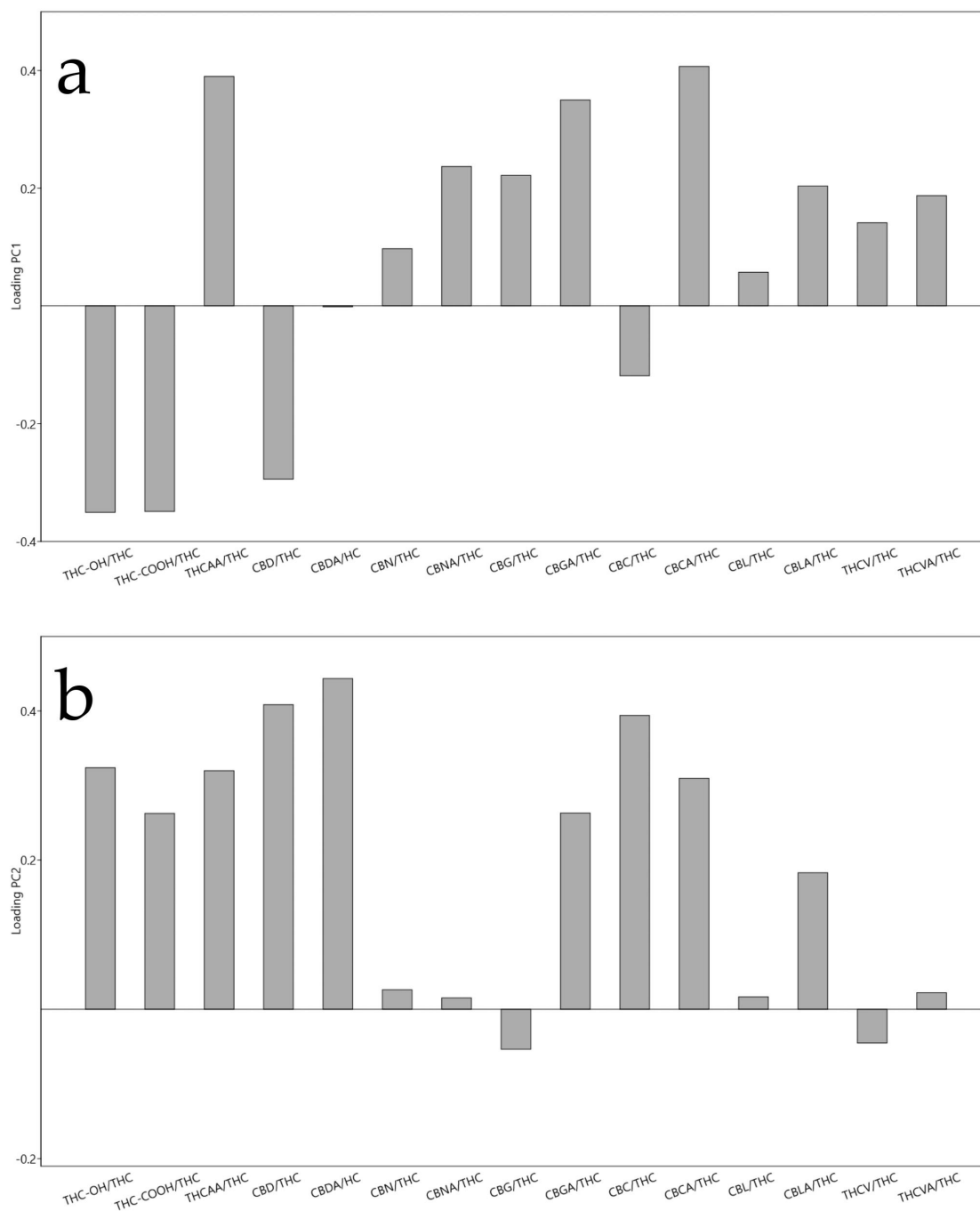
Sample	Substance intake	$\frac{THC - OH}{THC}$	$\frac{THC - COOH}{THC}$	$\frac{THCAA}{THC}$	$\frac{CBD}{THC}$	$\frac{CBDA}{THC}$	$\frac{CBN}{THC}$	$\frac{CBNA}{THC}$	$\frac{CBG}{THC}$	$\frac{CBGA}{THC}$	$\frac{CBC}{THC}$	$\frac{CBCA}{THC}$	$\frac{CBL}{THC}$	$\frac{CBLA}{THC}$	$\frac{THCV}{THC}$	$\frac{THCVA}{THC}$	$\frac{CBDVA}{THC}$	
F53	Street cannabis	0.541	14.9	0.0541	0	0	0.0595	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.205	0
F54	Street cannabis	0	5.00	0.650	0	0	0.00650	0	0	0.0480	0	0	0	0	0	0	0.225	0
F55	Street cannabis	0.536	13.4	0.232	0	0	0.0179	0	0	0.0357	0	0	0	0	0	0	0.446	0

Samples with THC concentrations <LOD were shaded grey. For other cannabinoid concentrations <LOD, 0 was substituted as a ratio.

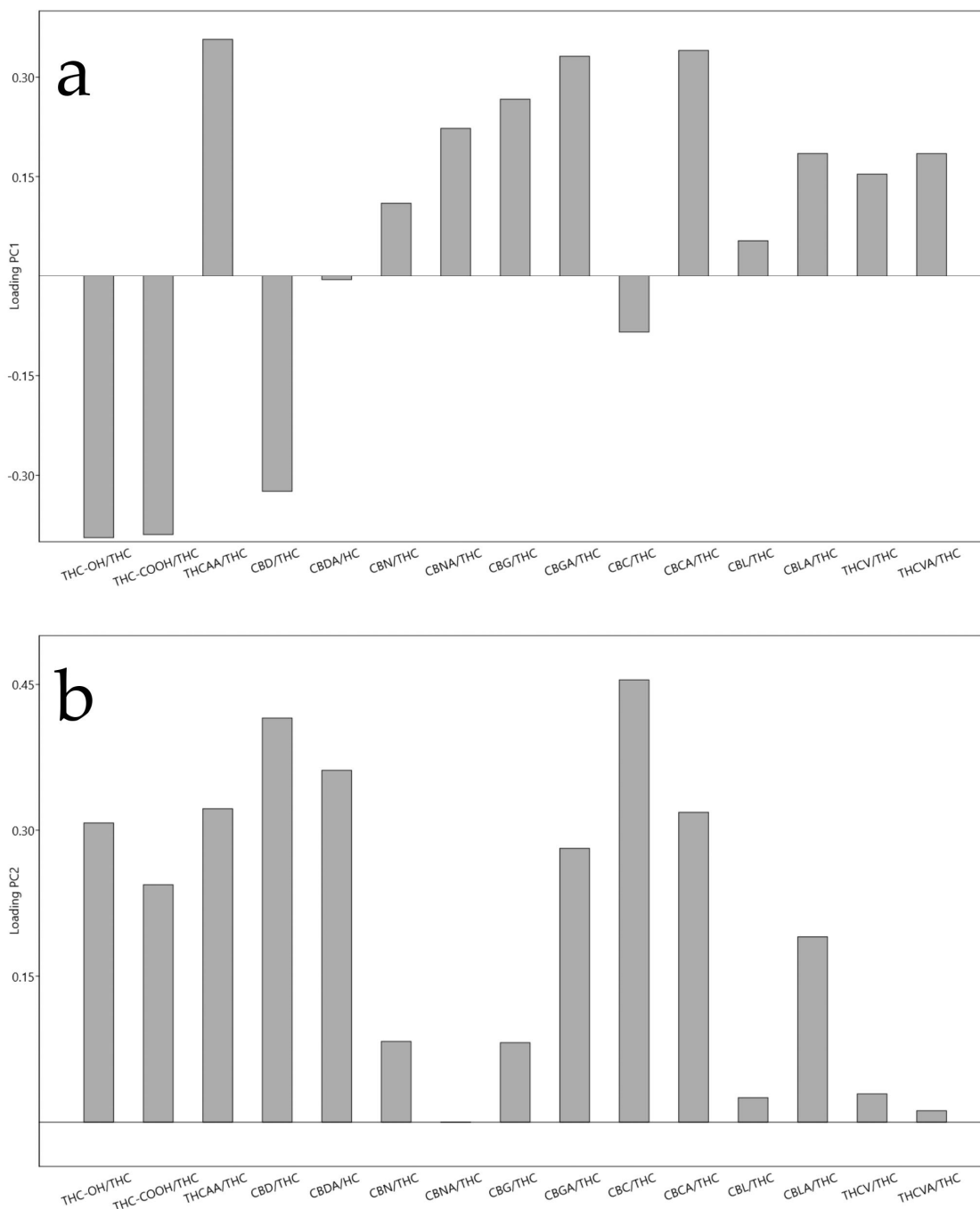
**Table S4.** Cannabinoid serum concentrations of study and forensic serum samples standardized on THC (Cannabinoid ratios)

Sample	Substance intake	$\frac{THC - OH}{THC}$	$\frac{THC - COOH}{THC}$	$\frac{THCAA}{THC}$	$\frac{CBD}{THC}$	$\frac{CBDA}{THC}$	$\frac{CBN}{THC}$	$\frac{CBNA}{THC}$	$\frac{CBG}{THC}$	$\frac{CBGA}{THC}$	$\frac{CBC}{THC}$	$\frac{CBCA}{THC}$	$\frac{CBL}{THC}$	$\frac{CBLA}{THC}$	$\frac{THCV}{THC}$	$\frac{THCVA}{THC}$	$\frac{CBDVA}{THC}$
Sat01	Sativex	0.448	13.8	0.0483	0.135	0.00148	0.0414	0	0.0379	0.00517	0.145	0	0	0	0.0166	0.117	0
Sat02	Sativex	0.508	20.0	0.262	0.231	0.0939	0.0246	0.00339	0.0339	0.00831	0.129	0.0152	0	0	0.00400	0.142	0
Sat03	Sativex	0.711	14.0	0.316	0.0421	0.00368	0.0474	0.00474	0.0421	0.0124	0.121	0.00632	0	0	0.0211	0.158	0
Sat04	Sativex	0.367	4.67	0.0225	0.117	0.000183	0.167	0.00417	0.0383	0.00225	0.150	0.00117	0	0	0.0150	0.0300	0
Dro01	Dronabinol	0.417	31.3	0.0521	0.323	0	0.125	0.0115	0.0500	0	0.375	0	0	0	0	0.302	0
Dro02	Dronabinol	0.231	17.7	0.0354	0	0	0.0408	0	0.0923	0	0.200	0.123	0	0	0	0.200	0
Dro03	Dronabinol	0.407	17.0	0.441	0.0107	0	0.0322	0.00373	0.0593	0.0322	0.288	0.00661	0	0	0.0114	0.492	0
Dro04	Dronabinol	1.58	45.3	0.0842	0	0	0.00790	0	0	0	0	0	0	0	0	0.163	0
THCM01	THC medicine	0.238	4.67	0.0571	0.0410	0	0.0214	0.00667	0.0371	0	0.0905	0.00433	0	0	0	0.414	0

For cannabinoid concentrations <LOD, 0 was substituted as a ratio.



**Figure S1.** Loading plot of principal component (PC) 1 and PC 2 for PCA of study and forensic samples. PC 1 (a) has negative loadings for THC-OH/THC, THC-COOH/THC, CBD/THC and CBC/THC, while especially THCAA/THC, CBGA/THC and CBCA/THC are correlated positively. PC 2 (b) has positive loadings for most variables, except for CBG/THC and THCV/THC.



**Figure S2.** Loading plot of principal component (PC) 1 and PC 2 for PCA of study samples, forensic samples of street cannabis users and forensic samples with reported intake of cannabis-based medicines. Similar to supplementary Figure 1, PC 1 (a) has negative loadings for THC-OH/THC, THC-COOH/THC, CBD/THC and CBC/THC, while most other cannabinoids, especially THCAA/THC, CBGA/THC and CBCA/THC, are correlated positively. PC 2 (b) has positive loadings for almost all variables.

## 5 Gesamtdiskussion und Ausblick

### 5.1 Grundlagen und Analytik von Phytocannabinoiden

Das öffentliche und wissenschaftliche Interesse an der medizinischen Verwendung von Cannabis ist in den letzten Jahren deutlich gestiegen. In Deutschland werden stetig wachsende Verschreibungszahlen cannabisbasierter Medikamente verzeichnet, seit cannabisbasierte Arzneimittel außerhalb ihrer zugelassenen Indikation (Off-Label-Use) sowie Medizinalcannabisblüten und -extrakte durch das Gesetz zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften in 2017 verordnungsfähig wurden [11–13, 95]. Aus der medizinischen Anwendung ergeben sich viele Fragestellungen, die bislang nicht oder nur unzureichend beantwortet wurden. Beispielsweise existieren, abseits von Tetrahydrocannabinol (THC) und Cannabidiol (CBD), nur wenige Daten zu Vorkommen, therapeutischer Wirkung und Pharmakokinetik anderer (seltener) Phytocannabinoide. Aus forensischer und auch medizinischer Sicht stellt sich außerdem die Frage, ob die Einnahme cannabisbasierter Medikamente (inklusive Medizinalcannabis) und (Freizeit-) Konsum von Straßencannabis differenziert werden können.

Um diese Fragestellungen zu untersuchen, sind detaillierte Kenntnisse zum Gehalt von Phytocannabinoiden in cannabisbasierten Arzneimitteln, Straßencannabis und biologischen Proben nach Konsum essentiell. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, umfassende Phytocannabinoidprofile verschiedener Cannabisprodukte und Serumproben nach Konsum dieser Produkte zu erstellen. Im Fokus dieser Arbeit lag die Identifizierung potentieller Marker zur Unterscheidung cannabisbasierter Arzneimittel und Straßencannabis. Weitere Anwendungsbereiche der Forschungsergebnisse werden an entsprechender Stelle ebenfalls diskutiert.

Zur Erstellung detaillierter Phytocannabinoidprofile bedarf es sensitiver Analysemethoden, die ein großes Spektrum an Cannabinoiden abdecken und diese möglichst simultan quantifizieren, um die Analyse effizient zu gestalten. In der vorliegenden Arbeit wurden zu diesem Zweck zwei (hochsensitive) LC-MS/MS Analysemethoden zur Untersuchung von Cannabis Pflanzenextraktmatrix und Serummatrix entwickelt und validiert. Ihr Analytenspektrum umfasst jeweils THC, CBD, Cannabigerol (CBG), Cannabinol (CBN), Cannabichromen (CBC), Cannabicyclol (CBL), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabidivarin (CBDV) und die sauren Vorstufen Tetrahydrocannabinolsäure A (THCAA), Cannabidiolsäure (CBDA), Cannabigerolsäure (CBGA), Cannabinolsäure (CBNA), Cannabichromensäure (CBCA), Cannabicyclolsäure (CBLA), Tetrahydrocannabivarinensäure (THCVA) und Cannabidivarinensäure (CBDVA), sowie für Serum zusätzlich die beiden THC-Metaboliten 11-Hydroxy-tetrahydrocannabinol (THC-OH) und 11-Nor-9-carboxy-

tetrahydrocannabinol (THC-COOH). Mit diesen 16 Phytocannabinoiden und zwei Cannabinoidmetaboliten umfassen die Methoden nach aktuellen Übersichtsarbeiten [139–142] mehr Analyten als die meisten bisher beschriebenen LC-MS/MS Methoden, vor allem in Bezug auf saure Cannabinoide. Zudem wird der Literatur zufolge für Serum erstmals auch die Quantifizierung von CBNA, CBCA, CBLA und CBDVA ermöglicht. Mit Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ab 0,0004 ng/mL und 0,004 ng/mL in Serum und 0,005 ng/mL und 0,1 ng/mL in Pflanzenextrakten sind die Methoden außerdem äußerst sensitiv. Im Vergleich dazu liegen beispielsweise für eine bereits beschriebene Serum Methode mit ähnlichem Analytspektrum die minimalen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen mit 0,2 ng/mL und 0,4 ng/mL erheblich höher [143]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden haben ein breites Anwendungsspektrum und können neben der Untersuchung forensischer Fragestellungen zum Beispiel zur Aufklärung therapeutischer Cannabinoid-Blutspiegel oder im Rahmen einer Qualitätskontrolle von Medizinalcannabis eingesetzt werden.

## **5.2 Phytocannabinoidprofile und Unterscheidungsmarker in cannabisbasierten Arzneimitteln und Straßencannabis**

Kenntnisse über Phytocannabinoidprofile in Straßencannabis und medizinischen Cannabisprodukten sind relevant für die Unterscheidung einzelner Cannabisarten, beispielsweise im Rahmen einer Sicherstellung von unbekanntem Cannabismaterial, und liefern Hinweise auf potentielle Konsummarker in Blutproben. In Anbetracht von unterschiedlichen Wirkungen einzelner Cannabinoide im Körper und Synergieeffekten bei ihrer Kombination (Entourageeffekt), ist die Aufklärung von Gehalten seltener Cannabinoide in Medizinalhanf und cannabisbasierten Medikamenten außerdem ein wichtiges Element bei der Erforschung ihres therapeutischen Potenzials. Kenntnisse hierüber könnten in der Zukunft helfen, das für den Patienten am besten geeignete Cannabismedikament oder die am besten geeignete Medizinalhanfsorte auszuwählen.

Ziel dieser Arbeit war es, eine solche Übersicht über Phytocannabinoidprofile in verschiedenen Produkten zu geben. Dafür wurden in Kapitel 4.2 dieser Arbeit sowohl beschlagnahmte Straßencannabisproben aus dem Landeskriminalamt Mainz als auch verschiedene Medizinalhanfsorten, das cannabisbasierte Arzneimittel Sativex® sowie die Rezeptursubstanz Dronabinol zweier verschiedener Hersteller mit unterschiedlichem Herstellungsverfahren untersucht. Straßencannabis und Medizinalhanf wurden weiterhin gesondert via Hauptkomponentenanalyse verglichen. Angesichts potentiell unterschiedlicher Lagerungsbedingungen vor der Untersuchung, insbesondere bei den Straßencannabisproben, wurden neutrale und saure Form des jeweiligen Cannabinoides für eine bessere Vergleichbarkeit zu Gesamt-Cannabinoidkonzentrationen (im Folgenden

„Cannabinoid<sub>gesamt</sub>“) zusammengefasst. Die Berechnung dazu wird in Kapitel 4.2 ausführlich erläutert. Die wichtigsten Ergebnisse der Analyse sollen hier, im Kontext mit dem aktuellen Forschungsstand, noch einmal diskutiert werden.

### **Straßencannabis**

Wie erwartet, lagen die Cannabinoide in den Extrakten von beschlagnahmten Straßencannabisproben vor allem in ihrer Säureform vor, welche erst durch Umwelteffekte wie beispielsweise Hitze, UV Licht oder Luft zu den neutralen Formen decarboxyliert werden [3]. THC<sub>gesamt</sub>-Konzentrationen reichten im Straßencannabis Kollektiv von 0,8 – 18,8 % und entsprachen mit einem Durchschnitt von 10 % dem aktuellen Trend, nach dem Straßencannabis im Mittel 9 – 12 % THC enthält [80]. Fast alle der 27 untersuchten Extrakte enthielten < 1 % CBD<sub>gesamt</sub>. Lediglich in zwei Proben wurden CBD<sub>gesamt</sub>-Gehalte von 4 – 5 % festgestellt. Auch dies entspricht den aktuellen Beobachtungen, nach denen klassischerweise THC-dominante Cannabissorten mit wenig CBD konsumiert werden, jedoch auch CBD-reiche Sorten aufgrund potentieller positiver Effekte von CBD auf die Gesundheit an Popularität gewinnen [80]. In Bezug auf seltene Cannabinoide waren im Studienkollektiv vor allem CBG (CBG<sub>gesamt</sub> maximal 1,71 %) und CBC (CBC<sub>gesamt</sub> maximal 2,9 %) vertreten, während CBN<sub>gesamt</sub>, THCV<sub>gesamt</sub> und CBL<sub>gesamt</sub>-Konzentrationen stets bei < 1 % lagen. Mit maximal 0,044 % wies CBDV<sub>gesamt</sub> die geringsten Konzentrationen auf. Die Literatur liefert nur wenige Informationen zu Gehalten seltener Cannabinoide, da bei Sicherstellungen häufig nur THC und CBD quantifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen jedoch größtenteils mit den bisher beschriebenen Erkenntnissen in Einklang. So wurden in Studien für CBN und THCV stets Gehalte < 1 % und CBG-Konzentrationen von maximal 1,25 % beschrieben [22, 144–146]. Einzig CBC-Konzentrationen lagen in der Literatur mit durchschnittlichen Werten von 0,18 – 0,28 % niedriger. Jedoch wurden bei besonders harzreichen, weiblichen Blüten (Sinsemilla) mit hohen THC-Gehalten von 11,8 % auch höhere CBC-Konzentrationen von bis zu 1,41 % nachgewiesen [144]. Da die CBC-reichen Proben aus dem Studienkollektiv dieser Arbeit analog dazu auch hohe THC-Konzentrationen von bis zu 18,8 % aufwiesen, könnte es sich hier ebenfalls um Sinsemilla Proben handeln. CBL- und CBDV-Gehalte wurden in der Literatur bisher wenig bis gar nicht untersucht.

### **Medizinalcannabis**

Cannabinoid Zusammensetzungen in Deutschland erhältlicher Medizinalcannabissorten sind sehr heterogen. THC-reiche Sorten weisen THC-Konzentrationen von bis zu 25,7 % bei einem geringen CBD-Anteil < 1 % (Sorte: Peace Naturals 24/1) auf, während CBD-dominante Sorten bis zu 17 % CBD und 1 % THC (Sorte Cannabis Flos 1/17 IMC) enthalten. Weitere Varietäten enthalten moderate Konzentrationen beider Cannabinoide, wie

beispielsweise die Sorte Cannabis Flos 7/9 IMC mit 7 % THC und 9 % CBD [14]. Gehalte seltener neutraler Cannabinoide in Medizinalcannabis sind in der Literatur wenig und nur für einzelne Sorten beschrieben. Konzentrationen lagen in der Regel bei maximal 1 – 2 % [14, 22, 147]. Vereinzelt wurde auch saure Cannabinoide quantifiziert. Für THC-reiche Sorten lag dabei der Anteil von THCAA bei 22 – 25 %, während CBDA und CBGA in geringeren Quantitäten von 0,1 % bzw. 0,5 – 3,2 % präsent waren [14].

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene THC- und CBD-dominante, sowie Mischvarietäten untersucht, um das breite Spektrum an erhältlichen Medizinalhanfsorten zu repräsentieren. Die Einteilung in verschiedene Gruppen hinsichtlich ihres THC- und CBD-Gehaltes ermöglichte eine differenzierte Betrachtung der heterogenen Cannabinoidprofile:

- Gruppe 1 mit den Sorten Bedrocan®, Pedanios 22/1 und Red No. 2 mit  $\text{THC}_{\text{gesamt}}$ -Gehalten von 22,0 – 24,2 % und 0,04 – 0,07 %  $\text{CBD}_{\text{gesamt}}$  repräsentierte sehr THC-reiche Sorten.
- In Gruppe 2 waren mit Bedica® und Orange No. 1 Varietäten mit moderaten Konzentrationen von 17,2 % und 14,9 %  $\text{THC}_{\text{gesamt}}$  und geringen  $\text{CBD}_{\text{gesamt}}$ -Gehalten von 0,04 % und 0,03 % vertreten.
- Bediol®, Green No. 3 und Penelope wurden Gruppe 3 zugewiesen und repräsentierten mit  $\text{THC}_{\text{gesamt}}$ - und  $\text{CBD}_{\text{gesamt}}$ -Konzentrationen von 5,7 – 12,1 % und 7,7 – 13,2 % Mischvarietäten mit moderaten Anteilen beider Cannabinoide.
- Mit Bedrolite® in Gruppe 4 wurde zusätzlich eine CBD-dominante Sorte (6,1 %  $\text{CBD}_{\text{gesamt}}$ ) mit sehr geringem THC-Anteil (0,2 %) untersucht.

Eine wichtige Erkenntnis der Arbeit ist, dass Varietäten mit ähnlichen THC- und CBD-Konzentrationen auch insgesamt ähnliche Phytocannabinoidprofile aufwiesen. Dies konnte in einem Vergleich aller Gruppen via Hauptkomponentenanalyse (PCA) dadurch gezeigt werden, dass die einzelnen Sorten entsprechend ihrer Gruppen clusterten (Vergleich Kapitel 4.2). Die Verteilung seltener Cannabinoide innerhalb dieser Gruppen wurde von der Arbeit ausführlich untersucht. Dabei wurden entgegengesetzte Trends für das Vorkommen von CBDV und THCV, Propyl-Analoga von CBD und THC, festgestellt:  $\text{CBDV}_{\text{gesamt}}$  war mit einer maximalen Konzentration von 0,3 % in Bedrolite® vor allem in CBD-reichen Sorten vertreten.  $\text{THCV}_{\text{gesamt}}$  dominierte mit Maximalkonzentrationen von 0,3 % in Red No. 2 dagegen in THC-reichen Varietäten. Für  $\text{CBG}_{\text{gesamt}}$  und das THC-Oxidationsprodukt  $\text{CBN}_{\text{gesamt}}$  wurde ein ähnlicher Trend festgestellt, wie für THCV. Ihre Gehalte lagen mit maximal 3,9 % und 0,3 % in THC-dominanten Varietäten der Gruppe 1 am höchsten. CBC und CBL dagegen waren mit Gehalten von 1,0 – 2,2 % ( $\text{CBC}_{\text{gesamt}}$ ) und 0,02 – 0,05 % ( $\text{CBL}_{\text{gesamt}}$ ) über alle vier Gruppen hinweg in ähnlichen Konzentrationen vorhanden. Der Anteil saurer Cannabinoide betrug in Medizinalhanf, ähnlich wie bei Straßencannabis, im Verhältnis zur neutralen Form

im Mittel mindestens das Zehnfache. THCAA- und CBDA-Anteile von 23,0 – 25,6 % bzw. 0,03 – 0,08 % sowie CBGA-Konzentrationen von bis zu 4,1 % waren in THC-dominanten Varietäten ähnlich wie in der Literatur beschrieben [14]. Auch die Konzentrationen der meisten neutralen Cannabinoide standen im Einklang mit bisherigen Ergebnissen, sofern die entsprechende Sorte in der Literatur beschrieben war.

Die in der vorliegenden Arbeit erstellten Cannabinoidprofile verschiedener Medizinalhanfsorten sind nicht nur für die Identifizierung potenzieller Unterscheidungsmarker im Vergleich zu Straßencannabis von Nutzen. Auch im Hinblick auf therapeutische Potenziale seltener Cannabinoide sind Erkenntnisse zu deren Konzentrationen in verschiedenen Medizinalcannabisvarietäten von Relevanz. So könnten die Ergebnisse in Zukunft zum Beispiel dabei helfen, die am besten geeignete Medizinalhanfsorte für den jeweiligen Patienten auszuwählen.

### **Sativex®**

Das oromukosal applizierte Fertigarzneimittel Sativex® wird aus auf THC und CBD standardisierten Cannabis Pflanzenextrakten hergestellt und enthält laut Literatur ebenfalls seltene Cannabinoide [19]. Ein genaues Phytocannabinoidprofil wurde jedoch bisher nicht beschrieben. Hier liefert diese Arbeit neue Ergebnisse: Neben den erwarteten, ähnlichen Konzentrationen von THC und CBD (jeweils ca. 3 %) wurde CBC mit einer Konzentration von 0,2 % als weiterer Inhaltsstoff identifiziert. Andere seltene Cannabinoide wurden ebenfalls nachgewiesen, jedoch in deutlich geringeren Konzentrationen von 0,000005 % (THCVA) bis 0,08 % (CBG).

### **Dronabinol**

Dronabinol wird, je nach Hersteller, durch unterschiedliche Methoden gewonnen. Während die Firma THC Pharm die Rezeptursubstanz partialsynthetisch herstellt, gewinnt Bionorica ethics Dronabinol direkt aus Medizinalcannabis [20, 21]. In der vorliegenden Arbeit wurde Dronabinol erstmals auch auf andere seltene Cannabinoide untersucht. Dabei wurden, je nach Herstellungsverfahren, Unterschiede im Cannabinoidprofil festgestellt: Beide Proben enthielten neben THC auch geringe Mengen von CBD, CBN und THCV, wobei es sich im Falle von Dronabinol der Firma THC Pharm wahrscheinlich um Abbauprodukte von THC oder Syntheserückstände handelt. In Dronabinol von Bionorica ethics wurden darüber hinaus jedoch noch weitere Cannabinoide wie THCAA oder CBC in geringen Konzentrationen von bis zu 0,03 % nachgewiesen. Dies ist vermutlich auf das Herstellungsverfahren der Direktextraktion zurückzuführen, bei dem, neben THC, noch weitere Cannabinoide in den Extrakt gelangen.

## **Unterscheidungsmarker für Medizinalcannabis und cannabisbasierte Arzneimittel im Vergleich zu Straßencannabis**

In der Literatur finden sich nur wenige Hinweise auf Marker für Medizinalcannabis oder cannabisbasierte Arzneimittel. Eine Studie von Hazekamp und Fishedick identifizierte bei einem Vergleich der Medizinalhanfsorte Bedrocan® mit den zwei Straßencannabisvarietäten White Widow und Amnesia via Hauptkomponentenanalyse unter anderem THC als mögliches Unterscheidungsmerkmal [22]. Allerdings wurden in der Studie sowohl Cannabinoide als auch Terpene untersucht. Ob Unterscheidungsmöglichkeiten auch durch alleinige Betrachtung von Cannabinoidspektren bestehen, wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Ebenso fehlen Daten zum Vergleich weiterer Medizinalhanfvarietäten und Straßencannabissorten.

Die vorliegende Arbeit liefert hier neue Ergebnisse: So könnten die sehr THC-reichen Medizinalcannabissorten Bedrocan®, Pedaions 22/1 und Red No. 2 durch ihren hohen Gehalt an THCAA und THCVA, und damit höhere  $\text{THC}_{\text{gesamt}}$ - und  $\text{THCV}_{\text{gesamt}}$ -Konzentrationen, unterschieden werden. Allerdings sollte bei dem Vergleich berücksichtigt werden, dass über die Zeit auch für Straßencannabis steigende THC-Gehalte verzeichnet werden [81]. Bei Pedanios 22/1 und Red No. 2 könnten erhöhte  $\text{CBG}_{\text{gesamt}}$ - und  $\text{CBN}_{\text{gesamt}}$ -Konzentrationen ebenfalls als Marker dienen. In CBD-reichen Sorten Bediol®, Green No. 3, Penelope und Bedrolite® wurden vor allem erhöhte Gehalte an CBDA, CBDVA und CBDV als potentielle Unterscheidungsmarker zu (überwiegend THC-reichem) Straßencannabis identifiziert. Dabei wurden in Bedrolite® die höchsten CBDV- und CBDVA-Konzentrationen im gesamten Studienkollektiv nachgewiesen, während bei den ersten drei genannten Sorten CBDA dominierte. Auch CBCA-Konzentrationen lagen hier höher als bei Straßencannabis. Inwieweit CBD-dominanter Medizinalhanf von CBD-reichem Straßencannabis mit nur geringen THC-Gehalten differenzierbar ist, könnte in weiteren Studien untersucht werden. Für die Medizinalhanfsorten Bedica® und Orange No. 1 mit moderaten THC-Gehalten konnten keine Marker identifiziert werden. Sie lagen im PCA Vergleich innerhalb des 95%-Konfidenzintervalls des Straßencannabis Kollektivs. Beim Vergleich von Medizinal- und Straßencannabis sollten auch Fluktuationen in Cannabinoidgehalten über verschiedene Chargen beachtet werden. Da in der vorliegenden Arbeit jeweils nur eine Charge untersucht wurde, fungieren die hier aufgezeigten Cannabinoidprofile vor allem als erste Orientierungspunkte. Fluktuationen in den Profilen können Gegenstand weiterer Studien sein.

Für den Konsum von Sativex® wurden ähnliche THC- und CBD-Konzentrationen als potentielle Marker von dieser Arbeit bestätigt. Außerdem wurden moderate Konzentrationen an CBC, dem neben THC und CBD am häufigsten vorkommenden Cannabinoid, sowie die

Abwesenheit größerer Mengen saurer Cannabinoide ebenfalls als mögliche Charakteristika identifiziert.

Weiterhin liefert die Arbeit die Erkenntnis, dass in Dronabinol außer THC auch Spuren anderer, seltener Cannabinoide enthalten sind. Dies trifft besonders für Dronabinol des Herstellers Bionorica ethics zu. Somit ist nicht auszuschließen, dass biologische Proben nach Einnahme von Dronabinol, je nach Dosis, geringe Konzentrationen weiterer Cannabinoide aufweisen. Dennoch kommt die Arbeit zu dem Schluss, dass diese potentiellen Vorkommen deutlich geringer ausfallen sollten als nach Konsum von Cannabis.

### **5.3 Phytocannabinoidprofile und Konsummarker verschiedener Cannabisprodukte in Serum**

Ebenso wie in Cannabisprodukten selbst, sind Erkenntnisse zu Phytocannabinoidprofilen in biologischen Proben nach Konsum verschiedener Cannabisprodukte in vielerlei Hinsicht relevant. Sie lassen beispielsweise Schlüsse darüber zu, welche Konzentrationen seltener Cannabinoide nach Applikation von Medizinalhanf im Körper erreicht werden, und ob diese im therapeutischen Bereich liegen, sofern zu diesem entsprechende Daten vorliegen. Insbesondere können solche Phytocannabinoidprofile Hinweise dazu liefern, ob sich der Konsum verschiedener Cannabisprodukte, vor allem der von Cannabismedikamenten und Straßencannabis, in biologischen Proben unterscheiden lässt. Eine Beantwortung dieser Fragestellung ist nicht nur von Bedeutung für die Compliancekontrolle bei Patienten unter cannabisbasierter Therapie, sondern auch im Hinblick auf das Verkehrsrecht. Cannabismedikamente sind dort von der Regelung des § 24a des StVG ausgenommen. Eine Teilnahme am Straßenverkehr unter Cannabistherapie ist, im Gegensatz zu Freizeitkonsum von Cannabis, damit nicht ordnungswidrig, sofern der Patient vor Fahrtritt sicherstellt, dass er in der Lage ist, sein Fahrzeug sicher zu führen. Die Möglichkeit, Freizeitkonsum von Straßencannabis von cannabisbasierter Therapie zu unterscheiden, würde Cannabispatienten im Falle einer Verkehrskontrolle entlasten und dabei helfen, Aussagen zur Einnahme von Cannabismedikamenten zu überprüfen.

Vor allem mit Fokus auf potentielle Konsummarker wurden in der vorliegenden Arbeit Phytocannabinoidprofile in Serumproben von Straßencannabis-Konsumenten untersucht. Zusätzlich wurden in einer klinischen Forschungsstudie Serumproben von Patienten unter cannabisbasierter Therapie mit Sativex®, Dronabinol, verschiedenen Medizinalhanfsorten, Dr. Nice CBD Kapseln oder Kombinationen davon hinsichtlich ihrer Phytocannabinoidprofile analysiert. Auch demographische Daten der Patienten, Einnahmeschemata sowie die Zeitabstände zwischen Applikation und Blutentnahme wurden erhoben. Die Cannabinoidprofile wurden anschließend mithilfe statistischer Methoden verglichen, und

potentielle Konsummarker wurden für verschiedene Cannabismedikamente im Vergleich zu Straßencannabis identifiziert. Die Anwendbarkeit der Marker wurde an forensischen Realfällen getestet.

### **Phytocannabinoidprofile**

Detaillierte Phytocannabinoidprofile von Cannabispatienten und Straßencannabis Konsumenten sind in Kapitel 4.3 beschrieben. Die wichtigsten Erkenntnisse sollen an dieser Stelle noch einmal zusammengefasst werden:

- Für verschiedene cannabisbasierte Medikamente wurde gezeigt, dass sich Phytocannabinoidprofile in Stoffproben auch in den entsprechenden Serumproben nach Konsum abbilden.
- Sativex®: Serumproben von Sativex®-Patienten wiesen, neben THC, THC-Metaboliten und CBD, im Einklang mit Sativex®-Stoffproben ebenfalls CBC auf. Weiterhin wurden sehr geringe Konzentrationen von THCAA, CBN und THCVA nachgewiesen.
- Medizinalhanf: Serumproben nach Applikation von THC-reichem Medizinalhanf wiesen, analog zu Stoffproben, neben THC und dessen Metaboliten zahlreiche weitere Cannabinoide auf und zeigten die höchsten THCAA-, CBN- und THCVA-Konzentrationen im gesamten Kollektiv. CBD-Konzentrationen, hingegen, waren erwartungsgemäß sehr niedrig. Im Vergleich dazu konnte gezeigt werden, dass eine Serumprobe nach Applikation einer CBD-reichen Sorte deutlich höhere CBD-Konzentrationen enthielt.
- Dronabinol: Analog zu Stoffproben von Dronabinol wurden in Serumproben von Dronabinol-Patienten vor allem THC und dessen Metaboliten detektiert. Teilweise wurden auch Spuren anderer seltener Cannabinoide wie THCAA, CBN oder THCVA nachgewiesen, jedoch meist unterhalb der Bestimmungsgrenze.
- Straßencannabis: Serumproben von Straßencannabis-Konsumenten wiesen häufig eine Vielzahl seltener Cannabinoide auf, darunter auch saure Cannabinoide, die in anderen Kollektiven in eher geringen Konzentrationen detektiert wurden.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Phytocannabinoidprofile sind nicht nur für die Identifizierung potenzieller Unterscheidungsmarker relevant. Auch liefern sie im Hinblick auf Serumspiegel seltener Cannabinoide im Zusammenhang mit der Zeit zwischen Konsum und Blutentnahme sowie demographischen Daten der Patienten erste Hinweise zu Pharmakokinetiken, die für viele Cannabinoide noch nicht erforscht sind.

Weiterhin ergänzt die Arbeit die relativ spärliche Datenlage zu der Frage, welche THC-Serumspiegel nach Applikation größerer THC Mengen (in der Studie bis zu 66 mg als

Einzel-dosis) erreicht werden. In bisherigen Studien zur Pharmakokinetik von THC wurden dagegen häufig geringere Einzeldosen von ca. 35 mg THC untersucht [5, 47].

### **Potenzielle Konsummarker**

In der Literatur finden sich verschiedene Vorschläge für Konsummarker von Cannabisprodukten:

- Zur Unterscheidung von Straßencannabis-Konsum und Einnahme von Medikamenten, welche nur THC enthalten, wurden THCAA, THCVA und THCV als Marker diskutiert [16–18].
- Als Marker für oralen oder oromukosalen Konsum von THC wurden erhöhte THC-COOH/THC und THC-OH/THC Verhältnisse im Vergleich zu Rauchen beschrieben [69, 125].
- Als Marker für Sativex®-Konsum wurde ein spezifisches CBD/THC Verhältnis zwischen 0,6 und 1,1 nach Applikation beschrieben [74, 124].

Diese Arbeit hat die Anwendbarkeit der beschriebenen Marker auf das Studienkollektiv geprüft und weitere potenzielle Marker identifiziert:

#### **Oraler/Oromukosaler Konsum von THC (Sativex®, Dronabinol) versus Rauchen:**

Charakteristische THC-OH/THC Verhältnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Diese waren im Kollektiv der Sativex®- und Dronabinol-Patienten stets  $> 1$ , sofern THC-Konzentrationen oberhalb der Bestimmungsgrenze lagen. Im Kollektiv der Straßencannabis-Konsumenten, welche THC charakteristischerweise inhalativ aufnehmen, war das THC-OH/THC Verhältnis dagegen fast immer  $< 1$ . Auch erhöhte THC-COOH/THC wurden im Sativex®- und Dronabinol-Kollektiv im Vergleich zum Medizinal- oder Straßencannabis-Kollektiv registriert. Für beide Marker wurde mittels statistischer Analysen (Kruskal-Wallis Test und Berechnung der Effektstärke) ein starker Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt.

**Sativex®:** Charakteristische CBD/THC Verhältnisse wurden von dieser Arbeit ebenfalls bestätigt. So lagen diese Verhältnisse in der Studie zwischen 0,6 und 1,5 im Sativex®-Kollektiv und im Medizinal- und Straßencannabis-Kollektiv, bis auf eine Ausnahme, bei maximal 0,5. Als weiterer potentieller Marker wurde ein erhöhtes CBC/THC Verhältnis bei Konsum von Sativex® identifiziert. Entsprechende Werte in den anderen Subkollektiven lagen meist niedriger. Spuren von THCAA oder THCVA in den Serumproben lassen darauf schließen, dass, je nach Sensitivität der Analysemethode, ein Nachweis dieser Cannabinoide zumindest in geringen Mengen auch bei Sativex®-Konsumenten denkbar ist. THCV wurde nicht detektiert. Seine Anwesenheit sowie die Präsenz anderer seltener Cannabinoide wie CBG, CBNA oder CBGA und generell höhere Konzentrationen seltener

Cannabinoide lassen den Schluss zu, dass (zusätzlich) Cannabis oder ein anderes cannabinoidhaltiges Produkt konsumiert wurde. Damit sind die von ElSohly et al., Raikos et al. und Radünz et al. vorgeschlagenen Marker THCV, THCAA und THCVA für die Differenzierung von Sativex®-Konsum (eingeschränkt) anwendbar.

**Dronabinol:** Diese Arbeit hat gezeigt, dass, abhängig von der Analysemethode, nach Dronabinol-Konsum in Einzelfällen durchaus geringe Konzentrationen einiger seltener Cannabinoide wie THCAA und THCVA in Serumproben nachgewiesen werden können. Größere Mengen sprechen aber eher für einen (zusätzlichen) Konsum von Cannabis oder cannabinoidhaltiger Produkte. THCV wurde, genau wie im Sativex®-Konsumenten Kollektiv, nicht detektiert. Der von ElSohly et al. vorgeschlagene Marker scheint daher als Charakteristikum für Straßencannabis-Konsum geeignet. Selbiges gilt für höhere Konzentrationen von THCVA und THCAA.

**Medizinalcannabis versus Straßencannabis:** Den Konsum von Medizinal- und Straßencannabis anhand von Cannabinoidprofilen in Blutproben der Konsumierenden zu differenzieren, stellt die anspruchsvollste Fragestellung dieser Arbeit dar: Bei Medizinal- und Straßencannabis handelt es sich um Pflanzen derselben Gattung, die, je nach genetischer Verwandtschaft, dieselben Inhaltsstoffe in ähnlichen Konzentrationen aufweisen können. Eindeutige Konsummarker für THC-reiches Medizinal- oder Straßencannabis konnten in dieser Arbeit nicht erfasst werden. Dafür ergeben sich mehrere mögliche Erklärungen: Zum einen könnten die in der Studie konsumierten Medizinal- und Straßencannabissorten tatsächlich sehr eng miteinander verwandt sein und praktisch identische Cannabinoidmuster aufweisen. Ebenso ist denkbar, dass Unterschiede zwischen den Pflanzen bestehen, diese nach Konsum jedoch durch Metabolisierungseffekte kaschiert wurden. Weiterhin könnte die Stichprobengröße der Studie zu gering gewesen sein, um signifikante Unterschiede zwischen THC-reichen Pflanzen zu beobachten. Daneben könnte die alleinige Betrachtung von Cannabinoiden möglicherweise nicht ausreichen, um die (geringen) Unterschiede zwischen den Pflanzen zu erfassen. Wie im folgenden Kapitel 5.4 ausführlicher diskutiert, könnte die Analyse auf andere Stoffgruppen, beispielsweise Terpene, ausgeweitet werden, um ein noch umfassenderes Inhaltsstoffprofil zu erhalten. Der Konsum CBD-reicher Cannabissorten konnte in der Studie anhand des CBD/THC Verhältnisses im Serum erfolgreich vom Konsum THC-reicher Varietäten differenziert werden. Da Straßencannabis in den meisten Fällen hohe THC-Anteile und nur wenig CBD aufweist, bietet dieser Marker zumindest für die Abgrenzung CBD-reicher Medizinalhanfsorten wie Bedrolite® oder Bediol® eine Perspektive.

Alle Marker wurden in der Arbeit durch statistische Analysen der entsprechenden Gruppen als signifikante Unterschiede mit überwiegend hohen Effektstärken bestätigt. In jedem Fall

sollte bei der Anwendung dieser Marker berücksichtigt werden, dass die Anwesenheit bestimmter (seltener) Cannabinoide zwar für den Konsum von Cannabis oder cannabinoidhaltiger Produkte spricht, ihre Abwesenheit den Konsum jedoch nicht ausschließt.

### **Anwendung der Marker auf forensische Realfälle**

In dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit der oben diskutierten Konsummarker auf forensische Realfälle überprüft. Dabei wurden Serumproben von Personen untersucht, die laut eigener Aussage Sativex®, Dronabinol und in einem Fall ein „THC-Medikament“ eingenommen hatten. Die Analyse ihrer Cannabinoidprofile und deren Vergleich mit dem oben beschriebenen Studienkollektiv via PCA ergaben dabei, dass im PCA Plot fast alle Proben eher im Bereich der Straßencannabis-Konsumenten clusterten, was auf einen (zusätzlichen) Konsum cannabinoidreicher Produkte wie Cannabis hindeutet. Die Probe einer Person, welche laut eigener Angabe Dronabinol eingenommen hatte, wurde im Plot jedoch entsprechend der Aussage im Bereich der Studienproben von Dronabinol-Patienten abgebildet und wies ähnliche Merkmale in ihrem Cannabinoidprofil auf. Hier konnte die Aussage bestätigt oder zumindest nicht widerlegt werden.

Insgesamt zeigt diese Arbeit eine relativ simple Methode auf, um Cannabinoidkonzentrationen von Serumproben in ihrer Gesamtheit zu betrachten und auszuwerten. Dazu beschreibt sie typische Profile nach Konsum cannabisbasierter Medikamente oder Straßencannabis, mit denen zu prüfende Proben verglichen werden können. Bei diesem Vergleich muss berücksichtigt werden, dass es sich um ein relativ kleines Vergleichskollektiv handelt, welches individuelle Unterschiede im Metabolismus von Cannabinoiden gegebenenfalls nicht abbildet. Informationen über den Konsum von Cannabisprodukten in der Studie basierten außerdem nur auf eigenen Angaben der Teilnehmer. Dennoch können Aussagen bezüglich eines Dronabinol- oder Sativex®-Konsums durch den Vergleich mit dem Studienkollektiv eingeordnet und ein möglicher (Bei-) Konsum von Cannabis oder cannabinoidreichen Produkten detektiert werden.

## **5.4 Ausblick**

Das Gebiet der Cannabinoidanalyse bietet viel Potenzial für weitere Forschung. So könnte beispielsweise das Analytspektrum der in dieser Arbeit vorgestellten Analysemethoden für Pflanzenextrakt- und Serummatrix durch weitere Cannabinoide und, im Falle von Serumproben, Cannabinoidmetaboliten ergänzt werden, um noch detailliertere Erkenntnisse zu Phytocannabinoidprofilen verschiedener Cannabisprodukte zu erhalten. Auch eine Ausweitung des Analytspektrums auf verschiedene Terpene ist sinnvoll, welche neben Cannabinoiden eine weitere wichtige und therapeutisch wirksame Inhaltsstoffgruppe von

*Cannabis sativa* darstellen [10]. In einigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich verschiedene Cannabisvarietäten in ihren Terpenprofilen unterscheiden [22, 146, 147]. Eine Erweiterung potentieller Cannabiskonsummarker durch Terpene ist also denkbar.

Neben der Identifizierung von Konsummarkern könnten, mithilfe von Cannabinoidanalysen, auch Pharmakokinetiken abseits von THC sowie Synergieeffekte verschiedener Cannabinoide hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirkung untersucht werden.

Aus dem in Kapitel 4.2 präsentierten Forschungsansatz zur Analyse verschiedener Cannabisprodukte ergeben sich ebenfalls weitere Fragen. Insbesondere könnten Schwankungen in Cannabinoidkonzentrationen verschiedener Medizinalcannabis Chargen untersucht werden, um die langfristige Eignung der in dieser Arbeit identifizierten Marker zu beurteilen. Auch die aktuellen Trends für Cannabinoidprofile von Straßencannabis, also eine stetige Zunahme des durchschnittlichen THC-Gehaltes und zunehmende Popularität von CBD-reichen Produkten, sollten beobachtet und bei der Anwendung der Konsummarker mit einbezogen werden. Ebenso ist die Ausweitung der Studie auf weitere Medizinalhanfsorten sinnvoll.

Auch die in Kapitel 4.3 beschriebene Studie zu Cannabinoidprofilen in Serumproben bietet eine vielversprechende Grundlage für weitere Forschung. So könnte die Studie, gegebenenfalls in einem kontrollierten Umfeld, in größerem Umfang und über einen längeren Zeitraum wiederholt werden, um mit einer höheren Fallzahl noch belastbarere Ergebnisse zu generieren. Dabei könnten auch Cannabinoidprofile nach Konsum weiterer Medizinalhanfsorten oder -extrakte erforscht werden. Unter anderem wäre interessant, inwieweit sich CBD/THC Verhältnisse nach Sativex®-Konsum und nach Konsum CBD- und THC-reicher Cannabissorten unterscheiden. Die Untersuchung von anderen Matrices wie beispielsweise Urin oder Haaren ist ebenfalls denkbar.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, umfassende Phytocannabinoidprofile in verschiedenen cannabisbasierten Medikamenten und Straßencannabis sowie in Serumproben nach Konsum solcher Produkte aufzuklären. Aus dem Vergleich dieser Profile wurden potenzielle Unterscheidungsmarker identifiziert.

Dazu wurde im ersten Schritt eine hochsensitive Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) Analysemethode für Pflanzenextraktmatrix und Serummatrix entwickelt und validiert. Die Methode ermöglicht die simultane Quantifizierung der 16 Phytocannabinoide Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), Cannabigerol (CBG), Cannabinol (CBN), Cannabichromen (CBC), Cannabicyclol (CBL), Tetrahydrocannabivarin (THCV), Cannabidivarin (CBDV) und ihrer sauren Vorstufen Tetrahydrocannabinolsäure A (THCAA), Cannabidiolsäure (CBDA), Cannabigerolsäure (CBGA), Cannabinolsäure (CBNA), Cannabichromensäure (CBCA), Cannabicyclolsäure (CBLA), Tetrahydrocannabivarinssäure (THCVA) und Cannabidivarinssäure (CBDVA). Für Serummatrix umfasst die Methode zusätzlich 11-Hydroxy-tetrahydrocannabinol (THC-OH) und 11-Nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH).

Mit der Methode wurden Extrakte von beschlagnahmtem Straßencannabis und verschiedenen THC- bzw. CBD-dominanten Medizinalcannabissorten sowie Sativex® und Dronabinol zweier verschiedener Hersteller untersucht. Aus dem Vergleich der jeweiligen Phytocannabinoidprofile wurden potenzielle Marker wie z.B. erhöhte Konzentrationen von THC und THCV bzw. CBD und CBDV bei bestimmten Medizinalhanfsorten, ein charakteristisches CBD/THC Verhältnis unter Anwesenheit von CBC für Sativex®, sowie die fast vollständige Abwesenheit seltener Cannabinoide für Dronabinol identifiziert.

In einer weiteren Studie wurden Serumproben von Straßencannabis-Konsumenten und Patienten unter cannabisbasierter Therapie hinsichtlich ihrer Cannabinoidprofile analysiert und mit statistischen Methoden verglichen. Die in Stoffproben festgestellten Marker wurden dabei teilweise auch in Serumproben registriert. So wurden nach Konsum von Sativex® neben THC-OH/THC Verhältnissen  $> 1$  auch charakteristische CBD/THC Verhältnisse und erhöhte Vorkommen von CBC im Vergleich zu Straßen- oder Medizinalcannabis-Konsumenten nachgewiesen. Proben nach Dronabinol-Konsum wiesen ebenfalls THC-OH/THC Verhältnisse  $> 1$  auf. Andere (seltene) Cannabinoide waren im Gegensatz zu den Cannabiskollektiven, wenn überhaupt, nur in Spuren vorhanden. Der Konsum THC-reicher Medizinalhanfsorten war in der Studie nicht von Straßencannabis-Konsum zu unterscheiden. Jedoch konnte der Konsum einer CBD-dominanten Medizinalhanfsorte durch erhöhte CBD/THC Verhältnisse differenziert werden. Um die Anwendbarkeit der Marker zu prüfen,

wurden Serumproben aus forensischen Realfällen analysiert und mit den Studienkollektiven verglichen.

## 6 Summary

The aim of this work was to elucidate extensive phytocannabinoid profiles both in cannabis-based medicines and street cannabis as well as serum samples after consumption of these products. Potential differentiating markers were identified from comparison of the respective profiles.

For this purpose, a highly-sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis method was developed for plant extract matrix and serum matrix. The method enables the simultaneous quantification of the 16 phytocannabinoids delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD), cannabigerol (CBG), cannabinol (CBN), cannabichromene (CBC), cannabicyclol (CBL), tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabidivarin (CBDV) and their acidic precursors tetrahydrocannabinolic acid A (THCAA), cannabidiolic acid (CBDA), cannabigerolic acid (CBGA), cannabinolic acid (CBNA), cannabichromenic acid (CBCA), cannabicyclolic acid (CBLA), tetrahydrocannabivarinic acid (THCVA) and cannabidivarinic acid (CBDVA). For serum, 11-hydroxy-tetrahydrocannabinol (THC-OH) and 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH) were quantified as well.

With this method, extracts of seized street cannabis and different THC- or CBD-dominant medical cannabis strains as well as Sativex® and Dronabinol from two different manufacturers were analyzed. From the comparison of the resulting phytocannabinoid profiles, potential distinguishing markers were identified, such as elevated concentrations of THC and THCV or CBD and CBDV respectively for different medical cannabis strains, a characteristic CBD/THC ratio and presence of CBC for Sativex® and the almost exclusive presence of THC for Dronabinol, with traces of other minor cannabinoids only.

In a second study, serum samples of street cannabis users and patients under cannabis-based therapy were analyzed regarding their phytocannabinoid profiles and compared via statistical methods. Some of the markers identified in cannabis products were observed in serum samples after use of these products as well. Besides THC-OH/THC ratios  $> 1$ , serum samples after Sativex® use also exhibited characteristic CBD/THC ratios and increased concentrations of CBC, compared to samples of street- or medical cannabis users. Samples of Dronabinol users exhibited THC-OH/THC ratios  $> 1$  as well. Minor cannabinoids, if detected at all, were found in traces only, in contrast to samples of cannabis users. Use of THC-rich medical cannabis could not be distinguished from street cannabis use in the study. However, use of a CBD-dominant medical cannabis variety could be differentiated by increased CBD/THC ratios. To test applicability of the identified markers, cannabinoid profiles of forensic case serum samples were analyzed and compared to the study collective.

## 7 Literaturverzeichnis

1. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World drug report 2019. Vienna: United Nations; 2019.
2. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World drug report 2020. Vienna: United Nations; 2020.
3. Meijer E de. The Chemical Phenotypes (Chemotypes) of Cannabis. In: Pertwee R, editor. Handbook of Cannabis: Oxford University Press; 2014. p. 89–110. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0005.
4. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). Driving Under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines in Europe — findings from the DRUID project. Lisbon, Portugal; 2012.
5. Ramaekers JG, Kauert G, van Ruitenbeek P, Theunissen EL, Schneider E, Moeller MR. High-potency marijuana impairs executive function and inhibitory motor control. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:2296–303. doi:10.1038/sj.npp.1301068.
6. Ramaekers JG, Moeller MR, van Ruitenbeek P, Theunissen EL, Schneider E, Kauert G. Cognition and motor control as a function of Delta9-THC concentration in serum and oral fluid: limits of impairment. *Drug Alcohol Depend*. 2006;85:114–22. doi:10.1016/j.drugalcdep.2006.03.015.
7. Ramaekers JG, Kauert G, Theunissen EL, Toennes SW, Moeller MR. Neurocognitive performance during acute THC intoxication in heavy and occasional cannabis users. *J Psychopharmacol*. 2009;23:266–77. doi:10.1177/0269881108092393.
8. Straßenverkehrsgesetz: StVG; 03.05.1909; neugefasst durch Bek. v. 5.3.2003; zuletzt geändert durch Art. 4 Abs. 9 G v. 7.5.2021.
9. Cremer-Schaeffer P. Cannabis: Was man weiß, was man wissen sollte. 2nd ed. Stuttgart: S. Hirzel Verlag; 2017.
10. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011;163:1344–64. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x.
11. Rath M. Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Dezember 2018. 2019. [https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartalsberichte/2018/q4\\_19/Bundesbericht\\_GAmSi\\_201812\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartalsberichte/2018/q4_19/Bundesbericht_GAmSi_201812_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf). Accessed 25 May 2021.

12. Sahle M. Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Dezember 2019. 2020. [https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartalsberichte/2019/q4\\_21/Bundesbericht\\_GAmSi\\_201912\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartalsberichte/2019/q4_21/Bundesbericht_GAmSi_201912_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf). Accessed 25 May 2021.
13. Techen F. Sonderbeilage zur GKV-Arzneimittel-Schnellinformation für Deutschland: Bruttoumsätze und Verordnungen von Cannabinoidhaltigen Fertigarzneimitteln und Zubereitungen von Januar bis Dezember 2020. 2021. [https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartalsberichte/2020/q4\\_23/Bundesbericht\\_GAmSi\\_202012\\_konsolidiert\\_Sonderbeilage\\_Cannabis.pdf](https://www.gkv-gamsi.de/media/dokumente/quartalsberichte/2020/q4_23/Bundesbericht_GAmSi_202012_konsolidiert_Sonderbeilage_Cannabis.pdf). Accessed 25 May 2021.
14. Grotenhermen F, Timte P. Cannabissorten in Deutschland und ihre Inhaltsstoffe. 2021. [https://www.cannabis-med.org/nis/data/file/cannabissorten\\_inhaltsstoffe.pdf](https://www.cannabis-med.org/nis/data/file/cannabissorten_inhaltsstoffe.pdf). Accessed 14 May 2021.
15. Deutsche Gesellschaft für Verkehrsmedizin e.V. (DGVM). Fahreignungsbegutachtung bei Cannabismedikation: Handlungsempfehlung der Ständigen Arbeitsgruppe Beurteilungskriterien - StAB - Aktualisierte Fassung August 2018; 2018.
16. Radünz L, Westphal F, Maser E, Rochholz G. THCVA-A - a new additional marker for illegal cannabis consumption. *Forensic Sci Int.* 2012;215:171–4. doi:10.1016/j.forsciint.2011.03.001.
17. Raikos N, Schmid H, Nussbaumer S, Ambach L, Lanz S, Längin A, et al. Determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid A ( $\Delta^9$ -THCA-A) in whole blood and plasma by LC-MS/MS and application in authentic samples from drivers suspected of driving under the influence of cannabis. *Forensic Sci Int.* 2014;243:130–6. doi:10.1016/j.forsciint.2014.07.026.
18. ElSohly MA, deWit H, Wachtel SR, Feng S, Murphy TP. Delta9-tetrahydrocannabivarin as a marker for the ingestion of marijuana versus Marinol: results of a clinical study. *J Anal Toxicol.* 2001;25:565–71. doi:10.1093/jat/25.7.565.
19. Guy GW, Stott CG. The development of Sativex® — a natural cannabis-based medicine. In: Mechoulam R, editor. *Cannabinoids as Therapeutics*. Basel: Birkhäuser Verlag; 2005. p. 231–263. doi:10.1007/3-7643-7358-X\_14.
20. Drenkard T. Von der Hanfblüte zum Schmerzmittel. 13.2.2015. <https://www.mittelbayerische.de/region/neumarkt/gemeinden/neumarkt/von-der-hanfbluete-zum-schmerzmittel-22797-art1191365.html>. Accessed 23 Sep 2020.
21. Bionorica ethics GmbH. Dronabinol: Informationen zur Herstellung des Rezepturarzneimittels in der Apotheke. Januar 2019. [https://www.bionorica-ethics.de/Resources/Herstellbroschuere\\_Stand\\_012019.PDF](https://www.bionorica-ethics.de/Resources/Herstellbroschuere_Stand_012019.PDF). Accessed 23 Nov 2020.

22. Hazekamp A, Fishedick JT. Cannabis - from cultivar to chemovar. *Drug Test. Analysis.* 2012;4:660–7. doi:10.1002/dta.407.
23. Haenel T. Kulturgeschichte und heutige Problematik des Haschisch. *Pharmacopsychiatry.* 1970;3:89–115. doi:10.1055/s-0028-1094266.
24. Novak J. Cannabis sativa und Hunderte von Sorten: gibt es eine "beste" Arzneidroge? *Pharmakon.* 2017;104–8. doi:10.1691/pn.20170010.
25. Stehle F, Degenhardt F, Zirpel B, Kayser O. Heterologe Biosynthese der Tetrahydrocannabigerolsäure. *Pharmakon.* 2017;5:142–7. doi:10.1691/pn.201700016.
26. Hillig KW. Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genet Resour Crop Evol.* 2005;52:161–80. doi:10.1007/s10722-003-4452-y.
27. Zeven A, Zhukovsky PM. Cannabidaceae. In: Zeven A, Zhukovsky PM, editors. *Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity.* Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation; 1975.
28. Fankhauser M. Cannabis in der Medizin - ein Rückblick in die Geschichte. *Pharmakon.* 2017;95–102. doi:10.1691/pn.20170009.
29. SciHi Blog. Leonhart Fuchs and his Famous Herbal Book. 2017. <http://scihi.org/leonhart-fuchs-herbal-book/>. Accessed 9 Jul 2021.
30. Lamarck JB, Poiret JLM. *Encyclopédie méthodique: botanique /Par m. le chevalier de Lamarck.* Paris,Liège: Panckoucke; Plomteux; 1783.
31. Janischevsky DE. Forma konopli na sornykh mestakh v Yugo-vostochnoi Rossii. *Uchenye zapiski.* 1924;2:3–17.
32. Small E, Cronquist A. A PRACTICAL AND NATURAL TAXONOMY FOR CANNABIS. *TAXON.* 1976;25:405–35. doi:10.2307/1220524.
33. Hillig KW, Mahlberg PG. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *Am J Bot.* 2004;91:966–75. doi:10.3732/ajb.91.6.966.
34. Fetterman PS, Keith ES, Waller CW, Guerrero O, Doorenbos NJ, Quimby MW. Mississippi-grown Cannabis sativa L: preliminary observation on chemical definition of phenotype and variations in tetrahydrocannabinol content versus age, sex, and plant part. *J Pharm Sci.* 1971;60:1246–9. doi:10.1002/jps.2600600832.
35. Small E, Beckstead HD. Letter: Cannabinoid phenotypes in Cannabis sativa. *Nature.* 1973;245:147–8. doi:10.1038/245147A0.
36. ElSohly MA, Gul W. Constituents of Cannabis Sativa. In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis: Oxford University Press; 2014.* p. 3–22. doi:10.1093/ACPROF:OSO/9780199662685.003.0001.
37. Ahmed SA, Ross SA, Slade D, Radwan MM, Khan IA, ElSohly MA. Minor oxygenated cannabinoids from high potency Cannabis sativa L. *Phytochemistry.* 2015;117:194–9. doi:10.1016/j.phytochem.2015.04.007.

38. Gertsch J, Pertwee RG, Di Marzo V. Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - do they exist? *Br J Pharmacol.* 2010;160:523–9. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00745.x.
39. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society.* 1964:1646–7.
40. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42:327–60. doi:10.2165/00003088-200342040-00003.
41. Smith DF. Stereopsychopharmacology: Past, present and future. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 1984;8:327–50. doi:10.1016/S0278-5846(84)80020-2.
42. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences.* 2005;78:539–48. doi:10.1016/j.lfs.2005.09.011.
43. Shani A, Mechoulam R. Cannabielsoic acids. *Tetrahedron.* 1974;30:2437–46. doi:10.1016/S0040-4020(01)97114-5.
44. Degenhardt F, Stehle F, Kayser O. The Biosynthesis of Cannabinoids. In: *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*; Elsevier; 2017. p. 13–23. doi:10.1016/B978-0-12-800756-3.00002-8.
45. Taura F, Sirikantaramas S, Shoyama Y, Shoyama Y, Morimoto S. Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: recent studies on biosynthetic enzymes. *Chem Biodivers.* 2007;4:1649–63. doi:10.1002/cbdv.200790145.
46. Huestis MA. Pharmacokinetics and Metabolism of the Plant Cannabinoids,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol. In: Pertwee RG, editor. *Cannabinoids*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005. p. 657–690. doi:10.1007/3-540-26573-2\_23.
47. Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after smoking marijuana. *J Anal Toxicol.* 1992;16:276–82. doi:10.1093/jat/16.5.276.
48. Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther.* 1980;28:409–16. doi:10.1038/clpt.1980.181.
49. Agurell S, Halldin M, Lindgren JE, Ohlsson A, Widman M, Gillespie H, Hollister L. Pharmacokinetics and metabolism of delta 1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man. *Pharmacol Rev.* 1986;38:21–43.
50. Agurell S, Leander K. Stability, transfer and absorption of cannabinoid constituents of cannabis (hashish) during smoking. *Acta Pharm Suec.* 1971;8:391–402.

51. Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlén A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Single dose kinetics of deuterium labelled delta 1-tetrahydrocannabinol in heavy and light cannabis users. *Biomed Mass Spectrom.* 1982;9:6–10. doi:10.1002/bms.1200090103.
52. Azorlosa JL, Heishman SJ, Stitzer ML, Mahaffey JM. Marijuana smoking: effect of varying delta 9-tetrahydrocannabinol content and number of puffs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;261:114–22.
53. Heishman SJ, Stitzer ML, Yingling JE. Effects of tetrahydrocannabinol content on marijuana smoking behavior, subjective reports, and performance. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1989;34:173–9. doi:10.1016/0091-3057(89)90369-9.
54. Perez-Reyes M. Marijuana smoking: factors that influence the bioavailability of tetrahydrocannabinol. *NIDA Res Monogr.* 1990;99:42–62.
55. Lindgren JE, Ohlsson A, Agurell S, Hollister L, Gillespie H. Clinical effects and plasma levels of delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology (Berl).* 1981;74:208–12. doi:10.1007/BF00427095.
56. Perez-Reyes M, Owens SM, Di Guiseppi S. The clinical pharmacology and dynamics of marihuana cigarette smoking. *J Clin Pharmacol.* 1981;21:201S-207S. doi:10.1002/j.1552-4604.1981.tb02596.x.
57. Camí J, Guerra D, Ugena B, Segura J, La Torre R de. Effect of subject expectancy on the THC intoxication and disposition from smoked hashish cigarettes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 1991;40:115–9. doi:10.1016/0091-3057(91)90330-5.
58. Law B, Mason PA, Moffat AC, Gleadle RI, King LJ. Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin. *J Pharm Pharmacol.* 1984;36:289–94. doi:10.1111/j.2042-7158.1984.tb04376.x.
59. Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Plasma levels of delta 9-tetrahydrocannabinol after intravenous, oral, and smoke administration. *NIDA Res Monogr.* 1981;34:250–6.
60. McGilveray IJ. Pharmacokinetics of cannabinoids. *Pain Res Manag.* 2005;10 Suppl A:15A-22A. doi:10.1155/2005/242516.
61. Hunt CA, Jones RT. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;215:35–44.
62. Kelly P, Jones RT. Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users. *J Anal Toxicol.* 1992;16:228–35. doi:10.1093/jat/16.4.228.
63. Widman M, Agurell S, Ehrnebo M, Jones G. Binding of (+)- and (minus)-delta-1-tetrahydrocannabinols and (minus)-7-hydroxy-delta-1-tetrahydrocannabinol to blood cells and plasma proteins in man. *J Pharm Pharmacol.* 1974;26:914–6. doi:10.1111/j.2042-7158.1974.tb09207.x.

64. Johansson E, Norén K, Sjövall J, Halldin MM. Determination of delta 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marijuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 1989;3:35–8. doi:10.1002/bmc.1130030109.
65. Kreuz DS, Axelrod J. Delta-9-tetrahydrocannabinol: localization in body fat. *Science.* 1973;179:391–3. doi:10.1126/science.179.4071.391.
66. Matsunaga T, Iwawaki Y, Watanabe K, Yamamoto I, Kageyama T, Yoshimura H. Metabolism of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol by cytochrome P450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life Sciences.* 1995;56:2089–95. doi:10.1016/0024-3205(95)00193-a.
67. Krishna DR, Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet.* 1994;26:144–60. doi:10.2165/00003088-199426020-00007.
68. Wall ME, Sadler BM, Brine D, Taylor H, Perez-Reyes M. Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women. *Clin Pharmacol Ther.* 1983;34:352–63. doi:10.1038/clpt.1983.179.
69. Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M, Stadelmann AM, Roser P, Scheffter T, Pragst F. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *J Anal Toxicol.* 2005;29:782–9. doi:10.1093/jat/29.8.782.
70. Harvey DJ. Absorption, Distribution, and Biotransformation of the Cannabinoids. In: Nahas GG, Sutin KM, Harvey D, Agurell S, Pace N, Cancro R, editors. *Marijuana and Medicine.* Totowa, NJ: Humana Press; 1999. p. 91–103. doi:10.1007/978-1-59259-710-9\_10.
71. Harvey DJ, Mechoulam R. Metabolites of cannabidiol identified in human urine. *Xenobiotica.* 1990;20:303–20. doi:10.3109/00498259009046849.
72. Ohlsson A, Lindgren JE, Andersson S, Agurell S, Gillespie H, Hollister LE. Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biomed Environ Mass Spectrom.* 1986;13:77–83. doi:10.1002/bms.1200130206.
73. Hunt CA, Jones RT, Hering RI, Bachman J. Evidence that cannabidiol does not significantly alter the pharmacokinetics of tetrahydrocannabinol in man. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics.* 1981;9:245–60. doi:10.1007/bf01059266.
74. Guy GW, Robson PJ. A Phase I, Double Blind, Three-Way Crossover Study to Assess the Pharmacokinetic Profile of Cannabis Based Medicine Extract (CBME) Administered Sublingually in Variant Cannabinoid Ratios in Normal Healthy Male Volunteers (GWPK0215). *Journal of Cannabis Therapeutics.* 2004;3:121–52. doi:10.1300/J175v03n04\_02.

75. Ariane Wohlfarth. Pharmakokinetik und Metabolismus von Delta-9-Tetrahydrocannabinolsäure A im Menschen: (Dissertation, Pharmazie). Freiburg im Breisgau: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau; 2012.
76. Hinz B. Cannabis und Cannabinoide - ein pharmakologisches Update. *Pharmakon*. 2017;5:109–17. doi:10.1691/pn.20170011.
77. Pertwee RG, Cascio MG. Known Pharmacological Actions of Delta-9-Tetrahydrocannabinol and of Four Other Chemical Constituents of Cannabis that Activate Cannabinoid Receptors. In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis*: Oxford University Press; 2014. p. 115–136. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0006.
78. Cascio MG, Pertwee RG. Known Pharmacological Actions of Nine Nonpsychotropic Phytocannabinoids. In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis*: Oxford University Press; 2014. p. 137–156. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0007.
79. Curran HV, Morgan CJ. Desired and Undesired Effects of Cannabis on the Human Mind and Psychological Well-Being. In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis*: Oxford University Press; 2014. p. 647–660. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0036.
80. EMCDDA. European Drug Report. Trends and Developments. 2019. 2019. [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724\\_TDAT19001ENN\\_PDF.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11364/20191724_TDAT19001ENN_PDF.pdf). Accessed 4 Nov 2020.
81. Freeman TP, Groshkova T, Cunningham A, Sedefov R, Griffiths P, Lynskey MT. Increasing potency and price of cannabis in Europe, 2006-16. *Addiction*. 2019;114:1015–23. doi:10.1111/add.14525.
82. Cascini F, Aiello C, Di Tanna G. Increasing delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta$ -9-THC) content in herbal cannabis over time: systematic review and meta-analysis. *Curr Drug Abuse Rev*. 2012;5:32–40. doi:10.2174/1874473711205010032.
83. ElSohly MA, Mehmedic Z, Foster S, Gon C, Chandra S, Church JC. Changes in Cannabis Potency Over the Last 2 Decades (1995-2014): Analysis of Current Data in the United States. *Biol Psychiatry*. 2016;79:613–9. doi:10.1016/j.biopsych.2016.01.004.
84. Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln(Betäubungsmittelgesetz): BtMG; 28.07.1981; neugefasst durch Bek. v. 1.3.1994, zuletzt geändert durch Art. 1 V v. 14.1.2021.
85. Cannabis. 2021. <https://www.drugcom.de/drogenlexikon/buchstabe-c/cannabis/>. Accessed 15 Jul 2021.
86. EMCDDA. Medical use of cannabis and cannabinoids: Questions and answers for policymaking. Lisbon, Luxembourg: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction; Publications Office of the European Union.

87. Musty RE. Cannabinoids and anxiety. In: Mechoulam R, editor. *Cannabinoids as Therapeutics*. Basel: Birkhäuser Verlag; 2005. p. 141–147. doi:10.1007/3-7643-7358-X\_7.
88. Petrocellis L de, Bifulco M, Ligresti A, Di Marzo V. Potential use of cannabimimetics in the treatment of cancer. In: Mechoulam R, editor. *Cannabinoids as Therapeutics*. Basel: Birkhäuser Verlag; 2005. p. 165–181. doi:10.1007/3-7643-7358-X\_9.
89. Fernández-Ruiz J, González S, Romero J, Ramos JA. Cannabinoids in neurodegeneration and neuroprotection. In: Mechoulam R, editor. *Cannabinoids as Therapeutics*. Basel: Birkhäuser Verlag; 2005. p. 79–109. doi:10.1007/3-7643-7358-X\_5.
90. Parolaro D, Zamberletti E, Rubino T. Cannabidiol/Phytocannabinoids: A New Opportunity for Schizophrenia Treatment? In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis*: Oxford University Press; 2014. p. 526–537. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0028.
91. Murillo-Rodríguez E, Aguilar-Turton L, Mijangos-Moreno S, Sarro-Ramírez A, Arias-Carrión Ó. Phytocannabinoids as Novel Therapeutic Agents for Sleep Disorders. In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis*: Oxford University Press; 2014. p. 538–546. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0029.
92. Pacher P, Kunos G. Cardiovascular, Metabolic, Liver, Kidney, and Inflammatory Disorders. In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis*: Oxford University Press; 2014. p. 564–581. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0031.
93. Xu H, Azuara-Blanco A. Phytocannabinoids in Degenerative and Inflammatory Retinal Diseases: Glaucoma, Age-Related Macular Degeneration, Diabetic Retinopathy, and Uveoretinitis. In: Pertwee R, editor. *Handbook of Cannabis*: Oxford University Press; 2014. p. 601–618. doi:10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0033.
94. Russo E. Introduction: Cannabis: From Pariah to Prescription. *Journal of Cannabis Therapeutics*. 2004;3:1–29. doi:10.1300/J175v03n03\_01.
95. Gesetz zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften; 06.03.2017.
96. VG Köln. 7 K 4447/11 08.07.2014.
97. VG Köln. 7 K 4450/11 08.07.2014.
98. VG Köln. 7 K 5217/12 08.07.2014.
99. Verordnung über das Verschreiben, die Abgabe und den Nachweis des Verbleibs von Betäubungsmitteln (Betäubungsmittel-Verschreibungsverordnung ): BtMVV; 20.01.1998; zuletzt geändert durch Art. 2 V v. 2.7.2018.
100. DAC/NRF-Kommission. Dronabinol-Kapseln 2,5 mg/ 5 mg/ 10 mg (NRF 22.7.). In: *Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch*. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.

101. DAC/NRF-Kommission. Ölige Dronabinol-Tropfen 25 mg/mL (NRF 22.8.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
102. DAC/NRF-Kommission. Ölige Cannabisharz-Lösung 25 mg/mL Dronabinol (NRF 22.11.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
103. DAC/NRF-Kommission. Ethanolische Dronabinol-Lösung 10 mg/mL zur Inhalation (NRF 22.16.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
104. Potter DJ. A review of the cultivation and processing of cannabis (*Cannabis sativa* L.) for production of prescription medicines in the UK. *Drug Test. Analysis.* 2014;6:31–8. doi:10.1002/dta.1531.
105. Almirall Hermal GmbH. Fachinformation Sativex Spray zur Anwendung in der Mundhöhle. 2011. <https://www.cannabis-med.org/german/sativex.pdf>. Accessed 23 Nov 2020.
106. AOP Orphan Pharmaceuticals AG. Canemes® Fachinformation. 2019. [https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media\\_all/93524.pdf](https://s3.eu-central-1.amazonaws.com/prod-cerebro-ifap/media_all/93524.pdf). Accessed 14 May 2021.
107. Chandra S, Lata H, ElSohly MA, Walker LA, Potter D. Cannabis cultivation: Methodological issues for obtaining medical-grade product. *Epilepsy Behav.* 2017;70:302–12. doi:10.1016/j.yebeh.2016.11.029.
108. Laginha AM. High-Tech-Anbau von Cannabis. *Deutsche Apotheker Zeitung.* 2018;158:36–43.
109. DAC/NRF-Kommission. Cannabisblüten in Einzeldosen zu 0,25 g / 0,5 g / 0,75 g / 1 g zur Teezubereitung (NRF 22.15.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
110. DAC/NRF-Kommission. Cannabisblüten zur Teezubereitung (NRF 22.14.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
111. DAC/NRF-Kommission. Cannabisblüten in Einzeldosen zur Inhalation nach Verdampfung (NRF 22.13.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
112. DAC/NRF-Kommission. Cannabisblüten zur Inhalation nach Verdampfung (NRF 22.12.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
113. APOTHEKE ADHOC. Blüte oder Extrakt – was sind die Unterschiede? 2020. <https://www.apotheke-adhoc.de/nachrichten/detail/medizinisches-cannabis/bluete-oder->

- extrakt-was-sind-die-unterschiede-cannabidiol-thc-vollspektrum-co//print.html. Accessed 14 May 2021.
114. GW Pharma (International) B.V. Epidyolex 100 mg/ml Lösung zum Einnehmen. 2019. <https://dravet.de/wp-content/uploads/2019/10/Epidyolex-Fachinformation.pdf>. Accessed 14 May 2021.
115. DAC/NRF-Kommission. Ölige Cannabidiol-Lösung 50 mg/mL / 100 mg/ml / 200 mg/mL / 400 mg/ mL (NRF 22.10.). In: Deutscher Arzneimittel-Codex: Ergänzungsbuch zum Arzneibuch. Frankfurt am Main: Govi-Verl. Pharmazeutischer Verl.; 1986.
116. Berghaus G, Sticht G, Grellner W. Meta-analysis of empirical studies concerning the effects of medicines and illegal drugs including pharmacokinetics on safe driving. 2010. [https://www.bast.de/Druid/EN/deliverales-list/downloads/Deliverable\\_1\\_1\\_2\\_B.pdf;jsessionid=CD90BA403A0F366D4348BB51C5AF4540.live21301?\\_\\_blob=publicationFile&v=1](https://www.bast.de/Druid/EN/deliverales-list/downloads/Deliverable_1_1_2_B.pdf;jsessionid=CD90BA403A0F366D4348BB51C5AF4540.live21301?__blob=publicationFile&v=1). Accessed 26 May 2021.
117. Gjerde H, Mørland J. Risk for involvement in road traffic crash during acute cannabis intoxication. *Addiction*. 2016;111:1492–5. doi:10.1111/add.13435.
118. EMCDDA. Cannabis and driving: Questions and answers for policymaking. 2018. [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8805/20181120\\_TD0418132EN\\_N\\_PDFa.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/8805/20181120_TD0418132EN_N_PDFa.pdf). Accessed 26 May 2021.
119. Grenzwertkommission. Beschluss zu §24a (2) StBG vom 20.11.2002. *Toxichem Krimtech*. 2002;69:127.
120. Strafgesetzbuch (StGB) § 315c: StGB; 01.01.1975; neugefasst durch B. v. 13.11.1998, zuletzt geändert durch Artikel 1 G. v. 30.03.2021.
121. Strafgesetzbuch (StGB) § 316: StGB; 26.05.2021/01.01.1975; neugefasst durch B. v. 13.11.1998, zuletzt geändert durch Artikel 1 G. v. 30.03.2021.
122. Verordnung über die Zulassung von Personen zum Straßenverkehr (Fahrerlaubnis-Verordnung): FeV; 13.12.2010; zuletzt geändert durch Artikel 4 des Gesetzes vom 16. April 2021.
123. Karschner EL, Darwin WD, Goodwin RS, Wright S, Huestis MA. Plasma cannabinoid pharmacokinetics following controlled oral delta9-tetrahydrocannabinol and oromucosal cannabis extract administration. *Clin Chem*. 2011;57:66–75. doi:10.1373/clinchem.2010.152439.
124. Molnar A, Fu S. Techniques and technologies for the bioanalysis of Sativex®, metabolites and related compounds. *Bioanalysis*. 2016;8:829–45. doi:10.4155/bio-2015-0021.
125. Lee D, Karschner EL, Milman G, Barnes AJ, Goodwin RS, Huestis MA. Can oral fluid cannabinoid testing monitor medication compliance and/or cannabis smoking during oral

- THC and oromucosal Sativex administration? *Drug Alcohol Depend.* 2013;130:68–76. doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.10.011.
126. Gross JH. *Massenspektrometrie: Ein Lehrbuch.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2013.
127. Kromidas S. *Das HPLC-MS-Buch für Anwender:* Wiley; 2017.
128. Ardrey RE. *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction:* Wiley; 2003.
129. Nahar L, Uddin SJ, Alam MA, Sarker SD. Extraction of naturally occurring cannabinoids: an update. *Phytochem Anal.* 2021;32:228–41. doi:10.1002/pca.2987.
130. Deutsche Arzneibuch-Kommission. Bekanntmachung einer Mitteilung zum Deutschen Arzneibuch: Deutsche Arzneibuch Monographie Cannabis Flos. 20.07.2021. <https://www.bundesanzeiger.de/pub/publication/P0RbvFSZOUeiglwr4Ri/content/P0RbvFSZOUeiglwr4Ri/BAanz%20AT%2021.06.2017%20B6.pdf?inline>. Accessed 20 Jul 2021.
131. ElSohly MA, Chandra S, Lata H, Upton R, Williamson E, Slade D, et al. *American Herbal Pharmacopoeia: Cannabis Inflorescence and Leaf: Standards of Identity, Analysis, and Quality Control.* 2013. [https://american-safe-access.s3.amazonaws.com/documents/AHP\\_Cannabis\\_Monograph\\_Preview.pdf](https://american-safe-access.s3.amazonaws.com/documents/AHP_Cannabis_Monograph_Preview.pdf). Accessed 20 Jul 2021.
132. Parker JM, Borke ML, Block LH, Cochran TG. Decomposition of cannabidiol in chloroform solution. *J Pharm Sci.* 1974;63:970–1. doi:10.1002/jps.2600630646.
133. Smith RN, Vaughan CG. The decomposition of acidic and neutral cannabinoids in organic solvents. *J Pharm Pharmacol.* 1977;29:286–90. doi:10.1111/j.2042-7158.1977.tb11313.x.
134. Berrueta LA, Gallo B, Vicente F. A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia.* 1995;40:474–83. doi:10.1007/BF02269916.
135. Kessler W, editor. *Multivariate Datenanalyse.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006.
136. Kessler W. Hauptkomponentenanalyse. In: Kessler W, editor. *Multivariate Datenanalyse.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2006. p. 21–88. doi:10.1002/9783527610037.ch2.
137. Abdi H, Williams LJ. Principal component analysis. *WIREs Comp Stat.* 2010;2:433–59. doi:10.1002/wics.101.
138. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. *PAST (Paleontological statistics); 1999-2020.*
139. Karschner EL, Swortwood-Gates MJ, Huestis MA. Identifying and Quantifying Cannabinoids in Biological Matrices in the Medical and Legal Cannabis Era. *Clin Chem.* 2020;66:888–914. doi:10.1093/clinchem/hvaa113.

140. Abd-Elsalam WH, Alsherbiny MA, Kung JY, Pate DW, Löbenberg R. LC-MS/MS quantitation of phytocannabinoids and their metabolites in biological matrices. *Talanta*. 2019;204:846–67. doi:10.1016/j.talanta.2019.06.053.
141. Nahar L, Onder A, Sarker SD. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019). *Phytochem Anal*. 2020;31:413–57. doi:10.1002/pca.2906.
142. Brighenti V, Protti M, Anceschi L, Zanardi C, Mercolini L, Pellati F. Emerging challenges in the extraction, analysis and bioanalysis of cannabidiol and related compounds. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;192:113633. doi:10.1016/j.jpba.2020.113633.
143. Kraemer M, Madea B, Hess C. Detectability of various cannabinoids in plasma samples of cannabis users: Indicators of recent cannabis use? *Drug Test. Analysis*. 2019;11:1498–506. doi:10.1002/dta.2682.
144. Potter DJ, Clark P, Brown MB. Potency of delta 9-THC and other cannabinoids in cannabis in England in 2005: implications for psychoactivity and pharmacology. *J Forensic Sci*. 2008;53:90–4. doi:10.1111/j.1556-4029.2007.00603.x.
145. Potter DJ, Hammond K, Tuffnell S, Walker C, Di Forti M. Potency of  $\Delta^9$  - tetrahydrocannabinol and other cannabinoids in cannabis in England in 2016: Implications for public health and pharmacology. *Drug Test. Analysis*. 2018;10:628–35. doi:10.1002/dta.2368.
146. Hazekamp A, Tejkalová K, Papadimitriou S. Cannabis: From Cultivar to Chemovar II—A Metabolomics Approach to Cannabis Classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 2016;1:202–15. doi:10.1089/can.2016.0017.
147. Fishedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*. 2010;71:2058–73. doi:10.1016/j.phytochem.2010.10.001.

## **8 Danksagung**



## **9 Wissenschaftlicher Werdegang**

## **10 Versicherung an Eides statt**

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“ unter Betreuung von PD Dr. Jörg Röhrich angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Irene Krämer

Zweitgutachter: PD Dr. Jörg Röhrich

Hiermit versichere ich gemäß §10 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 24.07.2007:

Ich habe die jetzt als Dissertation vorliegende Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.

Ich habe oder hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. bei einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

---

---