



## DETERMINATION OF TETRAHYDROCANNABINOLS IN SALIVA

Maciej KOCHANOWSKI<sup>1,2</sup>, Maria KAŁA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Krakow

<sup>2</sup> Institute of Forensic Research, Krakow

### Abstract

A modified and validated method for the extraction and simultaneous determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), and detection of 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) in a single saliva sample using negative ion gas chromatography mass spectrometry (GC-MS-NCI) is presented. Internal standardisation was carried out using deuterated analogues of each analyte. THC and 11-OH-THC were derivatised with trifluoroacetic anhydride in chloroform and THCCOOH with pentafluoropropanol in trifluoroacetic anhydride. Quantification was performed using selected ion monitoring mode and the target ions ( $m/z$ ) were 389.3 and 410.3 for 9THC, 387.3 and 408.3 for 11-OH-THC, and 422.3 and 572.3 for THCCOOH derivatives. Validation parameters for THC and THCCOOH were as follows: limit of detection (*LOD*) – 0.25 ng/ml, limit of quantification (*LOQ*) – 0.5 ng/ml and linearity range (*LOL*) – 0.5–20 ng/ml. Mean recovery rates of THC and THCCOOH from saliva ranged from 50% to 80%, respectively. The intra- and inter-day precision (expressed by RSD) did not exceed 24% for THC and 7% for THCCOOH. The elaborated method was used to determine THC and THCCOOH in 20 paired blood and saliva specimens collected from 12 patients following smoking of marijuana. Saliva and blood were collected at admission to hospital and after 24 h of patient hospitalisation. The concentrations of THC and THCCOOH in blood and THC in saliva varied a lot. At admission to hospital, the mean THC concentration in blood was 8.48 ng/ml (range 0.5–26.4 ng/ml), and after 24 h, this value was 2.73 ng/ml (range: 0.5–15.3 ng/ml). The THC concentrations in saliva were 6.96 (range: 0.5–32.5 ng/ml) and 1.64 ng/ml (range: 0.5–10.4 ng/ml) at the respective sampling points. After 24 hours of patient hospitalisation, the concentrations of THC fell to between 50% (of initial values) and a level under the *LOD*. The method was also applied to certification of point of collection immunoassay testing devices.

### Key words

$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol; Alternative materials; Determination; GC-MS-NCI.

*Received 23 November 2005; accepted 30 December 2005*

### 1. Introduction

Currently, one of the main trends in forensic toxicology is to search for new, alternative biological materials suitable for determination of drugs of abuse. This is because collection of the most popular material – blood – is invasive and therefore can only be carried out by professional staff of health care units. Such a way of collection of biological samples cannot be used in roadside testing of drivers suspected to be under the influence of substances acting similarly to al-

cohol. In this setting, saliva or oral fluid, the term recommended by a working group of the Drug Testing Advisory Board in the United States, seems to be the most advantageous biological fluid [7]. Ease of collection under observation is also considered to be a major advantage of oral fluid testing, compared to urine testing (the second material of choice). Issues of substitution, adulteration and dilution are less problematic than currently encountered in the unobserved urine collection procedure.

Oral fluid is a mixture of saliva, gingival crevicular fluid, cellular debris, and other components. Drugs may appear in oral fluid *via* multiple pathways. The predominant modes for entry into oral fluid for most drugs are excretion via saliva from blood and direct deposition in the oral cavity during oral and intranasal administration and by smoking. For marijuana, the primary route of drug entry into oral fluid appears to be direct deposition during use. Marijuana is usually smoked, but it may also be consumed orally, usually mixed with food products. THC residues are sequestered in oral tissue and appear in oral fluid. The mechanism of THC deposition would appear to be direct sequestration of THC in shallow tissues of the oral mucosa during drug use. Transfer of THC to oral fluid from blood is minimal [10]. A study of oral fluid specimens in human subjects by GC-MS following smoking of marijuana cigarettes did not reveal the presence of 11-OH-THC or THCCOOH over a 7-day period following the smoking [4]. Nevertheless, the developed method encompasses the identification and determination of metabolites so that broadest interpretation of results can be possible.

Cannabinoids occur as natural components in *Cannabis sativa* plants. The most important of them is THC – almost all psychoactivity of *Cannabis* is associated with THC content [1, 9]. The chemical structure of THC is shown in Figure 1.

Behavioural effects following *Cannabis* administration on humans would seem to be the main reason why *Cannabis* is the most abused drug in the world. Marijuana smoking gives an immediate effect as a result of efficient and fast delivery from lungs to brain. The concentration of THC declines rapidly in blood after smoking, whereas THCCOOH persists much longer than both THC and 11-OH-THC. Another com-

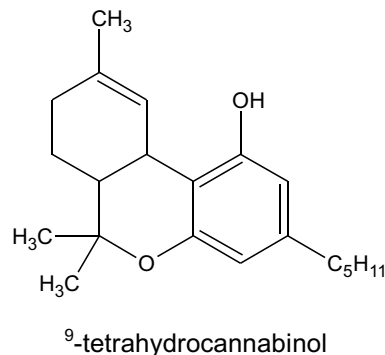


Fig. 1. Chemical structure of THC.

mon route of THC administration is drinking of alcoholic solutions obtained by maceration of the marijuana plant in alcohol solution, e.g. vodka or consumption of foodstuffs (e.g. cakes, jams, fruit jellies or snack bars) containing cannabis extracts or even hashish oil. Following oral administration of THC, its absorption is slower and results in high plasma concentrations of 11-OH-THC due to first pass metabolism [9].

THC is metabolised by hepatic cytochrome P450 enzyme, which leads to the production of active 11-OH-THC. The further pathway of metabolism leads to di- or tri-hydroxy compounds as well as, after oxidation, to the main inactive metabolite, THCCOOH (Figure 2).

The chemical properties of THC influence its distribution in different biological materials. As a consequence of this, THC, 11-OH-THC and THCCOOH are present in measurable concentrations in blood and hair. THC can be determined in saliva [4, 5, 7], and THCCOOH in urine.

Different kinds of biological materials have different characteristic features, which necessitates the use

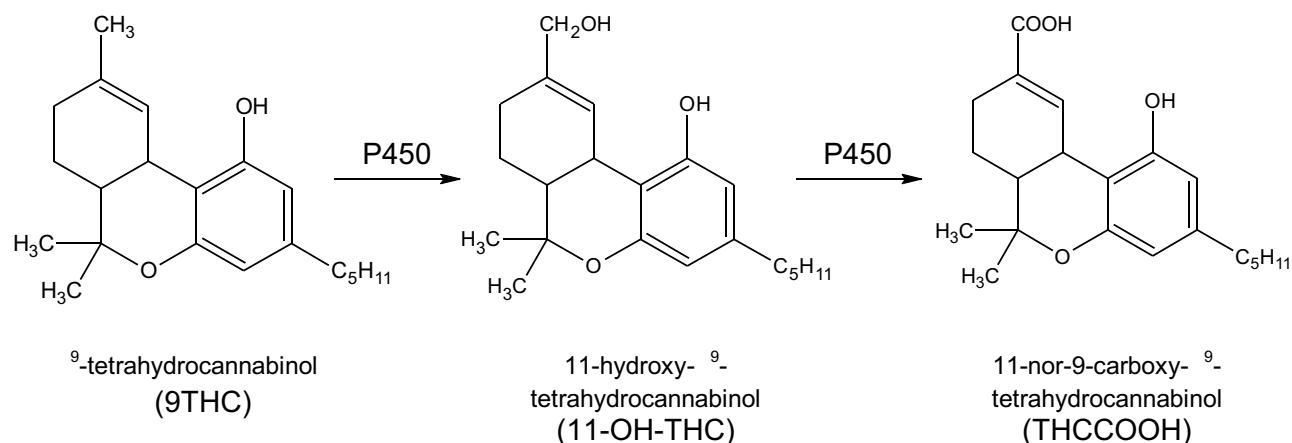


Fig. 2. The most common route of metabolism of THC leading to active 11-OH-THC and further to inactive THCCOOH.

of different methods for detection and determination of THC and its metabolites. For screening, the method used most often is immunoassay, e.g. radioimmunoassay (RIA), enzyme immunoassay (EIA), fluorescence polarisation immunoassay (FPIA) and enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), as well as thin layer chromatography (TLC). Screening is performed mostly on urine and saliva [11], because these materials do not require complicated sample pre-treatment. It is also possible to perform immunoassay initial testing on blood, but only with the precipitation of proteins. Only the use of very sensitive and advanced instrumental methods gives sufficiently reliable and satisfactory results. Such techniques, including the following, are used for confirmatory testing: gas and liquid chromatography (GC, LC) coupled with mass spectrometry or tandem mass spectrometry (MS, MS/MS). These methods require advanced sample pre-treatment, consisting in: protein precipitation, extraction of analytes (performed in LLE and SPE mode) and derivatisation. Use of such procedures enables determination of THC at low ng/ml concentrations [2, 3].

The aim of the study was to develop a sensitive method for determination of THC, as well as its two major metabolites, 11-OH-THC and THCCOOH, in saliva using chromatography-negative ion chemical ionisation-mass spectrometry (GC-MS-NCI). The analytical procedure was developed on the basis of a previously described method [6, 8] for THC and THCCOOH determination in blood and urine.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Standards and internal standards (ISs)

<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (11-OH-THC) and 11-nor-9-carboxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (THCCOOH) and ISs (9THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-THC-D<sub>3</sub> and THCCOOH-D<sub>3</sub>) were purchased as methanolic solutions from Cerilliant (LGC Promochem, Warsaw, Poland). The concentration of the standards and IS was 100 µg/ml, apart from THC, which was 1000 µg/ml.

### 2.2. Chemicals and reagents

Acetonitrile (ACN), acetone, ethyl acetate, n-hexane, water (all HPLC grade) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Derivatising reagents, 99% pentafluoropropanol (PFP) and 99% trifluoroacetic anhydride (TFAA) were obtained from Sigma-Aldrich (Warsaw, Poland). Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), so-

dium hydroxide and hydrochloric acid (analytical grade or higher) were supplied by POCH (Gliwice, Poland). Monobasic potassium phosphate and dibasic potassium phosphate (POCH) were used to produce the 0.5 M phosphate buffer (pH 6.8). All glass vials and tubes were silanised by immersion in a 5% solution of Silon CT, followed by washing in toluene then methanol and oven drying prior to use.

### 2.3. Specimens

Drug-free saliva (control saliva sample) was obtained from known healthy volunteers with no history of drug use. Control specimens were used for development and validation of the method. Standards and ISs (5 ng/ml) were added to the control saliva samples to produce eight-point calibration curves. Control saliva samples were spiked with THC, 11-OH-THC and THCCOOH to concentrations of 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 ng/ml.

Accuracy control of the method was carried out by twice determining the THC in reference material, Medidrug<sup>®</sup> BTM saliva (Medichem, Stuttgart, Germany) with known 9THC concentration of 15.0 ng/ml.

Clinical case samples – 20 blood and 20 saliva specimens – were collected from 12 patients, who had been admitted to the Department of Clinical Toxicology, Collegium Medicum, Jagiellonian University in Krakow due to a drug overdose. Blood and saliva samples were collected at admission to the clinic and after 24 hours of hospitalisation.

Saliva and blood specimens were collected simultaneously. Saliva samples were collected without any stimulation, by spitting into polypropylene collection vials. Blood was sampled into heparinized tubes. After collection, saliva samples were centrifuged and both types of specimens were frozen at -20°C until the time of analysis.

### 2.4. Sample preparation

5 µl of methanolic solution of ISs (THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-THC-D<sub>3</sub> and THCCOOH-D<sub>3</sub>), each at a concentration of 1 ng/µl, and 1 ml of 0.5 M phosphate buffer (pH 6.8) were added to a 1 ml sample of saliva placed in a 20 ml screw-capped glass tube. Then the tube was placed in an ultrasonic bath at room temperature for 10 min followed by incubation in a water bath at 40°C for 5 min. Four millilitres of ACN-acetone (9:1, v/v) mix was added to the sample while vortex mixing. Then the sample was centrifuged, the supernatant was transferred into another glass tube and its volume was reduced to approximately 1.5 ml in

a TurboVap (Zymark) at 40°C under reduced pressure of nitrogen. The analytes were extracted from concentrated supernatant using liquid-liquid extraction (LLE). THC and 11-OH-THC were extracted by 5 ml of hexane-ethyl acetate (7:1, v/v) from an alkaline medium (0.5 ml 2 M NaOH, pH 13) and THCCOOH by 5 ml of hexane-ethyl acetate (7:1, v/v) after acidification of the aqueous layer (1 ml 1 M HCl, pH 3). The analytes in dry residues were derivatised to form THC-trifluoroacetyl (THC-TFA), 11-OH-THC-trifluoro-acetyl and THCCOOH-pentafluoropropano-trifluoroacetyl (THCCOOH-PFP/TFA) derivatives and analysed by the GC-MS-NCI method. To the dry residue containing THC and 11-OH-THC, 100 µl of TFAA and 100 µl of CHCl<sub>3</sub> were added. THCCOOH was derivatised by addition of 50 µl of PFP and 100 µl of TFAA to the dry residue. Derivatisation of the analytes was performed at 60°C for 30 min. The reaction mixtures were cooled to room temperature and the excess of derivatising reagents was evaporated to dryness at 40°C under a stream of nitrogen. The dry residues were reconstituted in 50 µl of ethyl acetate and an aliquot of 2 µl was injected by autosampler into the GC-MS system.

### 2.5. Quantification

Quantification was performed using selected ion monitoring mode (SIM). For THC, THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-THC, 11-OH-THC-D<sub>3</sub> and THCCOOH and THCCOOH-D<sub>3</sub> derivatives, ions (m/z) 389.3 and 410.3; 392.3 and 413.3; 387.3 and 408.3; 390.3 and 411.3; 422.3 and 572.3; 425.3 and 575.3, respectively were monitored. The basis of qualification analysis was the presence of two ions (quantitative and qualifier) for each analyte. An 8-point calibration curve was obtained by setting peak-area ratios (THC/THC-D<sub>3</sub>; m/z 410.3/413.3, 11-OH-THC/11-OH-THC-D<sub>3</sub>; m/z 408.3/411.3 and THCCOOH/THCCOOH-D<sub>3</sub>; m/z 572.3/575.3) calculated for each standard and plotted against ratios of known concentration of the standard and IS.

### 2.6. Validation

All calculations were carried out using the internal standardisation method. Mean recovery rates of THC, 11-OH-THC and THCCOOH from saliva ranged from 50 to 80%. LOD and LOQ were 0.25 ng/ml and 0.5 ng/ml, respectively for THC and THCCOOH, and linearity range (LOL) was 0.5–20 ng/ml for both analytes as well as for 11-OH-THC. The intra- and inter-day precision (expressed by RSD) did not exceed 24% for THC and 7% for THCCOOH. Accuracy was confirmed using Medidrug reference materials, making

up two saliva samples containing a certified concentration of THC at 15 ng/ml. Each sample was analysed in duplicate. The obtained results were satisfactory: 12.0 ± 1.2 ng/ml and 11.8 ± 0.3 ng/ml. Quantification was performed using deuterated internal standards (at a concentration of 5 ng/ml for all three analytes). Unfortunately, validation of the method for 11-OH-THC was not possible. Near the retention time of 11-OH-THC-TFA, a background peak was detected in drug-free saliva samples. That is why only qualitative analysis was possible for this compound.

## 3. Results and discussion

The developed method was applied to determination of THC and THCCOOH concentrations in 20 paired specimens (simultaneous saliva and blood collection) taken from 12 persons who were admitted to the Department of Clinical Toxicology, Collegium Medicum, Jagiellonian University in Krakow due to a drug overdose. Blood and saliva samples were collected at admission to the clinic and after 24 hours of patient hospitalisation.

An example of a positive result of analysis performed by this method is presented in Figure 3.

Determined concentrations of THC and THCCOOH in blood and saliva taken from patients are shown in Figures 4–7. The concentrations of THC and THCCOOH in blood and THC in saliva varied a lot. They were highly dependent upon a number of factors, especially dose of THC smoked, time since exposure and history of drug addiction. At admission to hospital, mean (±SD) THC concentration in blood (Figure 4) was 8.48 ± 7.09 ng/ml (range 0.5–26.4 ng/ml), and after 24 h these values were 2.73 ± 3.02 ng/ml (range: 0.5–15.3 ng/ml). The THC concentrations in saliva (Figure 5) were 6.96 ± 8.88 (range: 0.5–32.5 ng/ml) and 1.64 ± 2.37 ng/ml (range: 0.5–10.4 ng/ml) at the respective sampling points. After 24 hours of patient hospitalisation, the concentrations of THC fell to between 50% (of initial values) and a level under the LOD.

The saliva/blood THC concentration ratio was 0.82 at admission and 0.60 after 24 h of patient hospitalisation.

Our study showed that saliva specimens are useful only when collected shortly after exposure. This is consistent with previously published findings by Huestis et al. [5]. They reported that although THC in oral fluid is not thought to originate from blood, its time course in oral fluid appears to be similar to that in blood. The usefulness of oral fluid testing for THC is

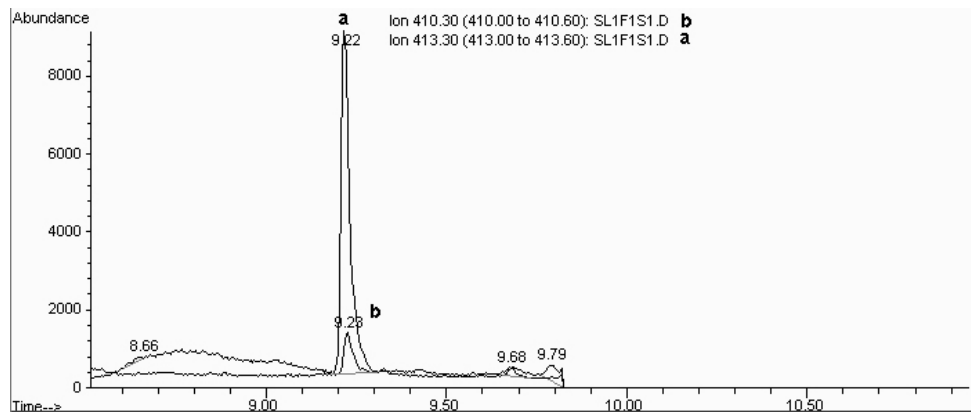


Fig. 3. Chromatogram of a saliva extract containing THC, analysed in SIM mode. THC –  $m/z = 410.3$ , THC- $D_3$  –  $m/z = 413.3$

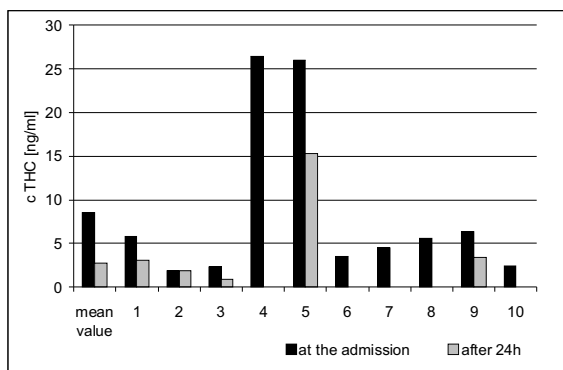


Fig. 4. Concentrations of THC determined in blood collected from 10 patients at admission to hospital and after 24 hours of patient hospitalisation.

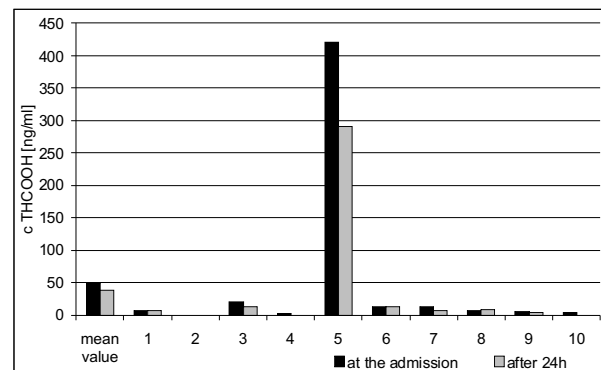


Fig. 6. Concentrations of THCCOOH determined in blood collected from 10 patients at admission to hospital and after 24 hours of patient hospitalisation.

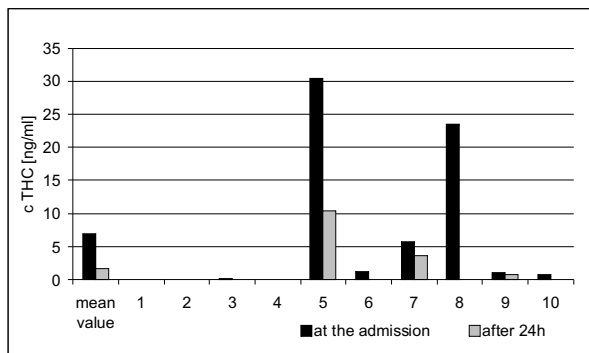


Fig. 5. Concentrations of THC determined in saliva collected from 10 patients at admission to hospital and after 24 hours of patient hospitalisation.

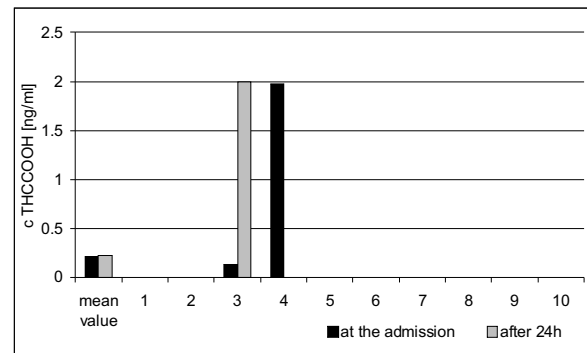


Fig. 7. Concentrations of THCCOOH determined in saliva collected from 10 patients at admission to hospital and after 24 hours of patient hospitalisation.

predicated upon its ability to serve as a diagnostic indicator of recent marijuana use. THC is deposited in the oral cavity and remains for up to 24 h following marijuana smoking. Passive Cannabis exposure studies appear to indicate that positive oral fluid tests for THC can occur shortly after *Cannabis* smoke exposure, but results were negative within 1 h.

THCCOOH was present in 9 out of 10 blood samples, which is a natural effect of THC metabolism. The mean ( $\pm SD$ ) concentration of THCCOOH in blood (Figure 6) at admission to hospital was  $49.24 \pm 74.35$  ng/ml, with a range of 0.5 to 421 ng/ml, and after 24 h,  $38.13 \pm 56.19$  ng/ml with a range of 0.2 to 291 ng/ml). THCCOOH in saliva (Figure 7) was measured in one patient at a very low concentration of 1.97

and 2.0 ng/ml at the respective sampling points. 11-OH-THC was detected in saliva taken from two patients. THCCOOH does not occur in saliva. This is consistent with the report by Huestis et al. [4].

THC saliva concentrations have been reported in a number of studies [10]. Saliva concentrations determined within 1 to 72 h after smoking a marijuana cigarette varied from 0.3 to 216 ng/ml. Concentrations were 6 to 684 ng/ml at 15 min to 1h after smoking. Saliva concentrations were 0.12 to 21.3 ng/ml at 1 to 48 h after oral ingestion of marijuana.

The elaborated method was also applied as a confirmation method for checking sensitivity, specificity and effectiveness of point of collection immunoassay testing devices, which were sent to the Institute of Forensic Research for certification.

Control samples of saliva were prepared with addition of 25 ng/ml of THC and THCCOOH respectively. The concentrations determined by the GC-MS-NCI method were  $24.0 \pm 4.0$  ( $n = 7$ ) for THC and  $26.0 \pm 4.0$  ng/ml ( $n = 4$ ) for THCCOOH.

The presented applications confirm the usefulness of the method for a wide range of purposes.

#### 4. Conclusions

Due to the fact that concentrations of THC in blood and saliva can rapidly decrease after smoking to low nanogram-per-millilitre levels, a sensitive and reliable GC-MS-NCI method was developed that was suitable for quantification of THC, exclusion of THCCOOH and detection of 11-OH-THC in saliva from clinical samples. Using 1 ml of saliva, the *LOD* was 0.25 ng/ml and *LOQ* was 0.5 ng/ml for both analytes, and *LOL* was 0.5–20 ng/ml for THC and THCCOOH as well as 11-OH-THC.

The developed method can be used for determination of THC in saliva samples collected from drivers suspected of driving under the influence of *Cannabis*.

#### References

1. Baselt R. C., Disposition of toxic drugs and chemicals in man, Biomedical Publications, Foster City 2002.
2. ElSohly M. A., Salem M., Cannabinoids analysis: analytical methods for different biological specimens, [in:] Handbook of analytical separations, vol. 2, Bogusz M. J. [ed.], Elsevier Science B.V., New York 2000.
3. Huestis M. A., Cannabis (marijuana) – Effects on human behaviour and performance, *Forensic Science Review* 2002, 14, 16–58.
4. Huestis M. A., Cone E. J., Alternative testing matrices, [in:] Drug of abuse handbook, Karch S. B. [ed.], CRC Press, New York 1998.
5. Huestis M. A., Cone E.J., Relationship of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol concentrations in oral fluid and plasma after controlled administration of smoked *Cannabis*, *Journal of Analytical Toxicology* 2004, 28, 394–399.
6. Kała M., Kochanowski M., The determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (9THC) and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THCCOOH) in blood and urine using Gas Chromatography Negative Ion Chemical Ionisation Mass Spectrometry (GC-MS-NCI), *Chemia Analityczna* 2006 [in press].
7. Kintz P., Samyn N., Use of alternative specimens: drugs of abuse in saliva and doping agents in hair, *Therapeutic Drug Monitoring* 2002, 24, 239–246.
8. Kochanowski M. Kała M., Tetrahydrocannabinols in clinical and forensic toxicology, *Przegląd Lekarski* 2005, 62, 576–580.
9. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Clarke's analysis of drugs and poisons, Pharmaceutical Press, London 2004.
10. Niedbala S. R., Kardos W. K., Fritch F. D., [et al.], Detection of marijuana use by oral fluid and urine analysis following single dose administration of smoked and oral marijuana, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, 25, 289–303.
11. Verstraete A., ROSITA, Roadside testing assessment, Gent University, Gent 2001.

---

#### Corresponding author

Maciej Kochanowski  
Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Ingardena 3  
30-060 Kraków  
e-mail: kochanom@chemia.uj.edu.pl

---

## OZNACZANIE TETRAHYDROKANNABINOLI W ŚLINIE

### 1. Wstęp

Jednym z dominujących obecnie kierunków w toksykologii sądowej jest poszukiwanie nowych alternatywnych materiałów biologicznych, w których możliwe jest wykrywanie i oznaczanie środków odurzających. Dzieje się tak, ponieważ pobieranie najbardziej popularnego materiału – próby krwi – jest inwazyjne, a przez to możliwe do przeprowadzenia jedynie przez wykwalifikowany personel medyczny. Taki sposób pobierania materiału biologicznego do badań nie może być stosowany na miejscu kontroli (najczęściej „przy drodze”) kierowców podejrzanych o prowadzenie pojazdów pod wpływem środków działających podobnie do alkoholu. Do tych celów najlepszym materiałem okazuje się ślina lub płyny z jamy ustnej. Używanie terminu „płyny z jamy ustnej” rekomendowane jest przez amerykańską agencję Drug Testing Advisory Board, zajmującą się rozwojem nauki i technologii związanej z badaniem substancji odurzających [7]. Główną zaletą badania śliny jest łatwość i możliwość obserwacji procesu pobierania w porównaniu z pobieraniem i badaniem moczu – drugim z wyboru materiałem używanym do badania dużych populacji ludzi. Dlatego też kwestie związane z możliwością zamiany, zafalszowania czy rozcieńczania próby, stają się mniej problematyczne w przypadku śliny niż przy pobieraniu próby moczu.

Płyn z jamy ustnej jest mieszaniną śliny, wydzieliny bruzd dziąsłowych, obumarłych komórek nabłonka i innych składników. Środki odurzające przedostają się do śliny różnymi drogami. Główne z nich to przenikanie ksenobiotyku z krwi do śliny oraz bezpośrednie jego osadzanie w jamie ustnej podczas doustnego i donosowego przyjmowania a także w czasie palenia. W przypadku marihuany najistotniejszą drogą przedostawania się substancji aktywnej do śliny jest prawdopodobnie bezpośrednio odkładanie się surowca w jamie ustnej podczas jej przyjmowania. Marihuana jest najczęściej palona, ale może być też przyjmowana doustnie, przeważnie w postaci zmieszanej z produktami spożywczymi. Z resztek marihuany zalegających w jamie ustnej <sup>9</sup>-tetrahydrokannabinol (THC) jest uwalniany do śliny. Głównym mechanizmem odkładania się THC w jamie ustnej okazuje się jego bezpośrednie uwalnianie z powierzchniowych warstw śluzówki jamy ustnej, do których dostał się w czasie pobierania przetworów konopi. Przenikanie THC z krwi do śliny jest minimalne [10]. Badania próbek śliny pobranej po wypaleniu marihuany przeprowadzone metodą GC-MS nie wykazały obecności metabolitów THC: 11-hydroksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu (11-OH-THC) oraz 11-nor-9-karboksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu

(THCCOOH) w czasie do 7 dni od wypalenia [4]. Pomimo tego opracowana metoda obejmuje wykrywanie i oznaczanie metabolitów celem umożliwienia jak najszerszej interpretacji wyników.

Kannabinole występują w roślinach konopi (*Cannabis*) jako ich naturalne składniki. Najważniejszym z nich jest THC, ponieważ praktycznie całe działanie psychoaktywne konopi jest związane z zawartością tego związku [1, 9]. Budowę chemiczną THC przedstawiono na rycinie 1.

Odczucia psychiczne występujące po przyjęciu konopi wydają się główną przyczyną, dla której jest to najczęściej używany środek odurzający na świecie. Dzieje się tak dlatego, że palenie marihuany daje natychmiastowy efekt na skutek szybkiego przenikania substancji aktywnych z płuc do mózgu. Stężenie THC obniża się bardzo szybko we krwi po wypaleniu, natomiast stężenie THCCOOH utrzymuje się dużo dłużej niż THC a nawet 11-OH-THC. Inną częstą drogą przyjmowania THC jest picie alkoholowych nalewek uzyskiwanych przez macerowanie marihuany w alkoholu, np. wódce, a także jedzenie artykułów spożywczych (np. ciastek, dżemów, galaretek owocowych czy przekąsek) zawierających ekstrakty z konopi lub nawet olej haszyszwowy. Po przyjęciu doustnym absorpcja THC jest wolniejsza i skutkuje wysokimi stężeniami 11-OH-THC we krwi wynikającymi z metabolizmu THC w efekcie „pierwszego przejścia” [9].

THC jest metabolizowany przy udziale łańcucha transportu elektronów, w skład którego wchodzi cytochrom P450, co prowadzi do wytworzenia aktywnego 11-OH-THC. Dalsza droga metabolizmu prowadzi do di- i tri-hydroksypochodnych, jak również do powstania głównego nieaktywnego metabolitu THCCOOH w wyniku reakcji utleniania (rycina 2).

Właściwości chemiczne THC wpływają na jego dystrybucję w różnego rodzaju materiałach biologicznych. W konsekwencji tego THC, 11-OH-THC oraz THCCOOH są obecne w mierzalnych stężeniach we krwi i włosach. THC może być wykryty w ślinie [4, 5, 7], a THCCOOH w moczu. Cechy charakterystyczne poszczególnych materiałów biologicznych narzucają zastosowanie zróżnicowanych metod wykrywania i oznaczania THC i jego metabolitów. Do analizy przesiewowej najczęściej używa się metod immunochemicznych, np. radioimmunologicznych (RIA), immunoenzymatycznych (EIA), immunofluorescencji w świetle spolaryzowanym (FPIA) oraz immunoenzymosorpcyjnych (ELISA), jak również chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Jako materiału badawczego do analiz przesiewowych używa się najczęściej moczu i ślin [11], ponieważ zastosowanie tych materiałów nie wymaga skomplikowanego przygotowania

próbek. Jest także możliwe wykonanie takiej analizy z użyciem krwi, ale tylko po uprzednim strąceniu białek. Wyłącznie zastosowanie czułych i instrumentalnych metod analizy daje możliwość uzyskania dostatecznie wiarygodnych i zadawalających wyników. Takie techniki stosowane są do analizy potwierdzającej, a należą do nich przede wszystkim: chromatografia gazowa i cieczowa (GC, LC) sprzężone z spektrometrią mas lub tandemową spektrometrią mas (MS, MS-MS). Metody takie wymagają wieloetapowego przygotowania próbek polegającego na odbiałaniu, ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej (wykonywanej z zastosowaniem ekstrakcji ciecz-ciecz – LLE lub ekstrakcji do fazy stałej – SPE) a także derywatywacji. Wykorzystanie takich procedur pozwala oznaczać THC i jego metabolity w stężeniach rzędu pikogramów [2, 3].

Celem pracy było opracowanie czulej metody oznaczania THC i jego dwóch głównych metabolitów w ślinie z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie monitorowania jonów ujemnych (GC-MS-NCI). Procedura analityczna była opracowana na podstawie wcześniej opisanej metody [6, 8] oznaczania THC i THCCOOH we krwi i w moczu.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Substancje wzorcowe

THC o stężeniu 1000 µg/ml, 11-OH-THC i THCCOOH o stężeniu 100 µg/ml w metanolu oraz standardy wewnętrzne (IS): metanolowe roztwory 9THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-THC-D<sub>3</sub> i THCCOOH-D<sub>3</sub> o stężeniu 100 µg/ml, pochodzący z firmy Cerilliant (LGC Promochem, Warszawa, Polska).

### 2.2. Odczynniki chemiczne

Acetonitryl, aceton, octan etylu, n-heksan, chloroform, woda destylowana (czystości do HPLC) pochodziły z firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Odczynniki do derywatywacji: 97% pentafluoropropanol (PFP) oraz 99% bezwodnik kwasu trifluorooctowego (TFAA) pochodziły z firmy Sigma-Aldrich (Warszawa, Polska). Chloroform (CHCl<sub>3</sub>), wodorotlenek sodu i kwas solny (o czystości analitycznej lub wyższej) pochodziły z firmy POCH (Gliwice, Polska). Wodorofosforan i diwodorofosforan potasu (o czystości do analiz, POCH Gliwice) użyto do sporządzenia 0,5 M buforu fosforanowego o pH 6,8. Szkło używane do analiz silanizowano przez zanurzenie w 5% roztworze Silonu CT, a następnie płukanie w toluenie i metanolu po czym suszenie w suszarce w temperaturze 110 C.

### 2.3. Materiał do opracowania metody

Ślinę wolną od analitów (ślina kontrolna) pobierano od znanych zdrowych ochotników, którzy nie przyjmowali związków będących przedmiotem badań. Próby kontrolne zostały wykorzystane do opracowania i walidacji metody. Do próbek dodawano THC, 11-OH-THC, THCCOOH w stężeniu 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 ng/ml oraz ich deuterowane pochodne: THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-THC-D<sub>3</sub>, THCCOOH-D<sub>3</sub> w stężeniu 5 ng/ml. Uzyskano 8 punktową krzywą kalibracyjną.

Kontrolę dokładności metody przeprowadzono, oznaczając dwukrotnie THC w ślinie odniesienia Medidrug<sup>®</sup> BTM (Medichem, Stuttgart, Niemcy) zawierającej znane stężenie THC – 15 ng/ml w dwóch różnych dniach.

Próbki kliniczne w postaci 20 prób krwi i 20 prób śliny pobrane zostały od 12 pacjentów przyjętych do Kliniki Toksykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z powodu przedawkowania środków odurzających. Próbkę krwi i śliny były pobierane równocześnie w chwili przyjęcia do kliniki i po 24 godzinach hospitalizacji. Ślinę pobierano bez stymulacji przez wydzielanie jej do polipropylenowych fiolek, natomiast krew pobierana była do próbek zawierających heparynę. Po pobraniu próbki śliny były wirowane i oba rodzaje materiału przechowywano w temperaturze –20 C do czasu analizy.

### 2.4. Przygotowanie materiału

1 ml śliny mieszano kolejno z 5 µl mieszaniny standardów wewnętrznych THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-THC-D<sub>3</sub> i THCCOOH-D<sub>3</sub> o zawartości 1 µg/ml każdy oraz 1 ml 0,5 M buforu fosforanowego o pH 6,8 w buteleczce o pojemności 20 ml. Buteleczkę kapslowano, próbkę wytrząsano za pomocą wortexu przez 1 min, po czym umieszczano w łaźni ultradźwiękowej na 10 min, a następnie wstawiono do łaźni wodnej o temperaturze 40 C na 5 minut. Kolejno do buteleczki dodawano kroplami, stale mieszając, 4 ml mieszaniny acetonitrylu z acetonem, zmieszanych w stosunku objętościowym 9:1. Próbkę, po wymieszaniu przez kilka sekund, wirowano przy 4000 obr./min przez 5 minut. Supernatant dekantowano do następnej buteleczki o pojemności 20 ml i zagęszczano do objętości 1,5 ml przy użyciu urządzenia TurboVap (Zymark) w temperaturze 40 C pod zmniejszonym ciśnieniem azotu. Z zateżonego supernatantu analizy ekstrahowano w układzie ciecz-ciecz 5 ml mieszaniny heksan + octan etylu (7:1, v/v). THC i 11-OH-THC ekstrahowano ze środowiska alkalicznego (pH 13, 0,5 ml 2 M NaOH). THCCOOH ekstrahowano po zakwaszeniu fazy wodnej (pH 3, 1 ml 1 M HCl). Anality w odparowanych do sucha ekstraktach poddawano derywatywacji do THC-trifluoroacetylowych (THC-TFA) i 11-OH-THC-trifluoroacetylowych (11-OH-THC-TFA) oraz THCCOOH-pentaflu-



oropropano-trifluoroacetylowych (THCCOOH-PFP/TFA) pochodnych i analizowano z zastosowaniem metody GC-MS-NCI. W tym celu do suchej pozostałości zawierającej THC i 11-OH-THC dodawano 100  $\mu$ l TFAA i 100  $\mu$ l  $\text{CHCl}_3$ , a do pozostałości zawierającej THCCOOH dodawano 50  $\mu$ l PFP i 100  $\mu$ l TFAA. Proces derywatywacji prowadzono przez 30 min w temperaturze 60 C. Po ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej nadmiar odczynnika derywatyzującego odparowano do sucha w temperaturze 40 C w strumieniu azotu. Suche pozostałości rozpuszczano w 50  $\mu$ l octanu etylu i 2  $\mu$ l próbki wstrzykiwano z użyciem automatycznego podajnika próbek.

### 2.5. Analiza ilościowa

Analiza ilościowa była prowadzona w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM). Wybrano następujące jony ujemne o m/z: 389,3 i 410,3 dla THC, 392,3 i 413,3 dla THC-D<sub>3</sub>, 387,3 i 408,3 dla 11-OH-THC, 390,3 i 411,3 dla 11-OH-THC-D<sub>3</sub>, 422,3 i 572,3 dla THCCOOH oraz 425,3 i 575,3 dla THCCOOH-D<sub>3</sub>. Podstawę identyfikacji stanowiła obecność dwóch jonów charakterystycznych (ilościowego oraz pomocniczego). Ośmiopunktową krzywą kalibracyjną wykreślono, wyznaczając stosunki pól powierzchni pików wzorca i wzorca wewnętrznego (THC/THC-D<sub>3</sub>; m/z 410,3/413,3, 11-OH-THC/11-OH-THC-D<sub>3</sub>; m/z 408,3/411,3 i THCCOOH/THCCOOH-D<sub>3</sub>; m/z 572,3/575,3) w funkcji stosunku znanych stężeń wzorca i wzorca wewnętrznego.

### 2.6. Walidacja metody

Wszelkie obliczenia zostały wykonane przy stosowaniu stałej kontroli metody wzorcem wewnętrznym. Średni odzysk THC, 11-OH-THC oraz THCCOOH ze śliny wynosił od 50 do 80%. Granica wykrywalności (*LOD*) i granica oznaczalności (*LOQ*) wynosiły odpowiednio 0,25 ng/ml i 0,5 ng/ml dla THC i THCCOOH, a zakres liniowości (*LOL*) 0,5–20 ng/ml dla THC, THCCOOH oraz 11-OH-THC. Precyzja wyznaczona w seriach wewnątrz i międzygrupowych, wyrażona w RSD, nie przekraczała 24% dla THC i 7% dla THCCOOH. Dokładność metody potwierdzono, używając materiałów odniesienia Medidrug<sup>®</sup>, które stanowiły 2 próbki śliny zawierające THC w stężeniu 15 ng/ml. Do każdej z próbek zastosowano dwukrotnie pełną procedurę analityczną. Oznaczone stężenia mieściły się w podanym przez producenta zakresie i wynosiły odpowiednio: 12,0  $\pm$  1,2 ng/ml oraz 11,8  $\pm$  0,3 ng/ml. Analizę ilościową przeprowadzono z wykorzystaniem wzorców wewnętrznych w postaci deuterowanych pochodnych analitów w stężeniu 5 ng/ml dla każdego związku. Dokonanie pełnej walidacji metody oznaczania 11-OH-THC w ślinie nie było możliwe. W próbkach śliny wolnych od badanych związków wy-

stępował pik pochodzący od matrycy biologicznej w obrębie obszaru elucji 11-OH-THC-TFA. Dlatego też możliwa była tylko jakościowa ocena obecności 11-OH-THC w próbkach śliny.

## 3. Wyniki i ich omówienie

Opracowana metoda została zastosowana do oznaczenia THC i THCCOOH w 20 równocześnie pobieranych próbkach śliny i krwi. Próbki krwi oraz śliny pobrano od 12 pacjentów, którzy zostali przyjęci do Kliniki Toksykologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego z powodu przedawkowania substancji odurzających. Próbki były pobierane w chwili przyjęcia do kliniki i po 24 h hospitalizacji.

Przykład chromatogramu wybranych jonów próbek śliny zawierającej THC przedstawiono na rycinie 3.

Oznaczone opracowaną metodą stężenia THC i THCCOOH w krwi i ślinie pobranej od pacjentów przedstawiono na rysunkach 4–7. Stężenia te zmieniały się w szerokim zakresie. Zróżnicowanie stężeń spowodowane było wieloma czynnikami, a szczególnie zależało od dawki wypalonego THC, czasu jaki upłynął od wypalenia i częstości przyjmowania.

W próbkach krwi pobranych przy przyjęciu do kliniki średnie ( $\pm$  SD) stężenie THC (rycina 4) wynosiło 8,48  $\pm$  7,09 ng/ml (zakres 0,5–26,4 ng/ml), natomiast po 24 h stężenia obniżyły się do wartości 2,73  $\pm$  3,02 ng/ml (zakres: 0,5–15,3 ng/ml). Stężenie THC w ślinie (rycina 5) wynosiło 6,96  $\pm$  8,88 (zakres: 0,5–32,5 ng/ml) oraz 1,64  $\pm$  2,37 ng/ml (zakres: 0,5–10,4 ng/ml) w odpowiednim czasie pobierania próbek. Po upływie 24 godzin od przyjęcia do kliniki stężenia THC obniżyły się o co najmniej 50% w stosunku do wartości początkowej aż do poziomu leżącego poniżej *LOD* zastosowanej metody.

Stosunek stężeń THC we krwi i ślinie w chwili przyjęcia do kliniki wynosił 0,82, a po 24 godzinach hospitalizacji 0,60.

Przeprowadzone badania wykazały, że ślina jest przydatnym materiałem do badań, jeżeli jest pobrana po upływie krótkiego czasu od przyjęcia środka. Jest to zgodne z wynikami badań wcześniej opublikowanymi przez Huestisa i in. [5]. Badacze ci wykazali, że czas pozostawiania THC w ślinie i krwi jest podobny, pomimo powszechnego twierdzenia, że obecność THC w ślinie nie jest wynikiem jego wydzielania z krwi. Przydatność badania śliny na obecność THC polega na tym, że badanie to może służyć, jako wskaźnik diagnostyczny, do orzekania o niedawnym przyjęciu marihuany. THC jest odkładany w jamie ustnej i pozostaje w niej do 24 godzin po przyjęciu marihuany. Z badań dotyczących biernego narażenia na *Cannabis* wynikało, że analiza śliny na obecność THC może skutkować wynikiem pozytywnym w bardzo krótkim czasie od przerwania narażenia na dym

z papierosa zawierającego THC, ale po 1 godzinie od przerwania narażenia wyniki były negatywne.

Obecność THCCOOH stwierdzono w 9 z 10 próbek krwi, co jest naturalnym skutkiem metabolizmu THC. Średnie stężenie ( $\pm$  SD) THCCOOH we krwi (rycina 6) pobranej w chwili przyjęcia do kliniki wynosiło  $49,24 \pm 74,35$  ng/ml (zakres 0,5–421 ng/ml) natomiast po 24 h obniżyło się do wartości  $38,13 \pm 56,19$  ng/ml (zakres 0,2–291 ng/ml).

THCCOOH wykryto w ślinie tylko jednego pacjenta (rycina 7) w bardzo niskich stężeniach wynoszących odpowiednio 1,97 i 2,0 ng/ml w chwili przyjęcia do kliniki i po 24 h. 11-OH-THC został wykryty w ślinie pobranej od 2 pacjentów. Uzyskane wyniki wskazują, że THCCOOH nie występuje w ślinie, co znajduje potwierdzenie w doniesieniach Huestisa i in. [4].

W wielu źródłach przytaczane są wartości wyznaczonych stężeń THC w ślinie [10]. Oznaczone w czasie od 1 h do 72 h od wypalenia papierosa z marihuaną stężenia THC wahały się w zakresie od 0,3 do 216 ng/ml. W czasie od 15 minut do 1 godziny od chwili wypalenia stężenia te wynosiły od 6 do 684 ng/ml, natomiast w czasie od 1 h do 48 h po doustnym przyjęciu produktów konopi stężenia THC w ślinie kształtowały się na poziomie od 0,12 do 21,3 ng/ml.

Opracowana metoda została także zastosowana jako metoda odniesienia w procesie sprawdzania czułości, specyficzności i efektywności testerów immunochemicznych, które przysłano do Instytutu Ekspertyz Sądowych do certyfikacji. W tym celu przygotowano 2 próby kontrolne śliny z dodatkiem odpowiednio THC i THCCOOH w stężeniu 25 ng/ml. Oznaczone metodą GC-MS-NCI stężenia wyniosły  $24,0 \pm 4,0$  ( $n = 7$ ) dla prób zawierających THC oraz  $26,0 \pm 4,0$  ng/ml ( $n = 4$ ) dla THCCOOH.

Przedstawione zastosowania potwierdzają przydatność opracowanej metody do różnych zastosowań.

#### 4. Wnioski

Ze względu na fakt, iż stężenia THC we krwi i w ślinie mogą szybko obniżyć się do poziomów rzędu pojedynczych nanogramów na mililitr w krótkim czasie po wypaleniu przetworów konopi, opracowano czułą i niezawodną metodę GC-MS-NCI oznaczania THC, wykluczenia THCCOOH oraz wykrywania 11-OH-THC w ślinie. Używając próbki śliny o objętości 1 ml, wartości *LOD* i *LOQ* wynosiły odpowiednio 0,25 ng/ml i 0,5 ng/ml dla obu analitów, natomiast zakres liniowości wynosił 0,5–20 ng/ml dla THC, THCCOOH jak i 11-OH-THC.

Opracowana metoda może być z powodzeniem stosowana do oznaczania THC w ślinie pobranej od kierowców podejrzanych o prowadzenie pojazdów pod wpływem *Cannabis*.