



# ANALYSIS OF <sup>9</sup>-THC AND ITS METABOLITES: 11-OH-<sup>9</sup>-THC AND THC-COOH IN BLOOD BY GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY (GC-MS-MS) AND ITS APPLICATION TO MEDICO-LEGAL INVESTIGATIONS

Sebastian ROJEK, Małgorzata KŁYS

*Department of Forensic Medicine, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Krakow, Poland*

## Abstract

Polish legal regulations, especially those concerning road traffic safety mean that forensic toxicologists are required to perform qualitative and quantitative analysis of active ingredients of *Cannabis*, i.e. <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (<sup>9</sup>-THC) and its metabolites in biological specimens. Analytical criteria regarding determination of these compounds in blood are specified in the Decree of the Minister of Health (*Journal of Laws* 2003, no.116, item 1106, and *Journal of Laws* 2004, no. 52, item 524). In this study the authors presented application of their procedure for determination of <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (<sup>9</sup>-THC), as well as its two metabolites, 11-hydroxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (11-OH-<sup>9</sup>-THC) and 11-nor-9-carboxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinolic (THC-COOH) acid, in ante-mortem and *post-mortem* blood specimens by means of gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry in electron impact mode (GC-EI-MS-MS). Method validation was performed according to ISO 17025:2005. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 1 ng/ml for <sup>9</sup>-THC and 11-OH-THC, and 5 ng/ml for THC-COOH. The linearity of the method (LOL) was within the 1–50 ng/ml range for <sup>9</sup>-THC and 11-OH-THC, and 5–100 ng/ml for THC-COOH. Inter-assay and intra-assay precision and relative error values were in the range of 6.8–12.3 and 7.0–15.5%, respectively. The analytes' extraction recoveries were in the range of 68.7–84.1%. The developed method is illustrated by two examples of analyses of blood specimens (collected *ante-mortem* and *post-mortem*) from toxicological practice.

## Key words

Cannabinoids; Biological matrix; Blood; GC-MS-MS.

*Received 12 October 2007; accepted 28 October 2007*

## 1. Introduction

*Cannabis* (hemp) of the drug type, exhibiting cannabinomimetic action, makes up the drug group which is currently most frequently abused all over the world. There are estimates that in the USA over 20 million people use *Cannabis*. The drug scene and drug addiction in Poland reflect those in the West: *Cannabis* products together with amphetamine and its derivatives are the most frequently abused compounds (rec-

reational drugs) [6, 7]. 421 compounds belonging to various chemical groups have been identified in drug-type *Cannabis*, but <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (<sup>9</sup>-THC) is the main psychoactive ingredient [3, 9]. However, from the point of view of toxicological investigations, besides determination of the main constituent of hemp – <sup>9</sup>-THC, quantification of its active and inactive metabolite, i.e. 11-hydroxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (11-OH-<sup>9</sup>-THC) and 11-nor-9-carboxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinolic acid (THC-COOH) in blood is also important.

According to the Penal Code of 1997, 1999 and 2000, it is forbidden to drive a vehicle under the influence of drugs of abuse. The Petty Offences' Code of 1997 and The Road Traffic Law Act ban driving a vehicle in a state after using a substance which acts similarly to alcohol. The active component of *Cannabis*,  $\Delta^9$ -THC, as a substance which influences the psychomotor skills of a driver and causes their impairment, meets the definition of a drug of abuse (narcotic agent) (Art. 178a of the Penal Code; Supreme Court Resolution issued 27 February 2007), as well as the definition of an agent acting similarly to alcohol (Decree of the Minister of Health, *Journal of Laws* 2003, no. 116, item 1106, and *Journal of Laws* 2004, no. 52, item 524). Detection of this agent in a person's blood indicates that the individual was under the influence of this drug at the moment of blood sample collection, and thus he or she could have been under the influence of this substance at the moment of the accident or crime.

The Decree of the Minister of Health sets requirements in respect of the limits of quantification of substances acting similarly to alcohol in biological specimens. This imposes on forensic laboratories the requirement to apply analytical methods that enable determination of at least 5 groups of psychoactive substances at concentration levels described in the Decree. For  $\Delta^9$ -THC in blood this limit is 2 ng/ml.

Although medico-legal statistics do not register deaths due to cannabinoid overdosing, there is a strong need to determine these compounds in *post-mortem* material in fatal cases where the cause of death may be connected with psychoactive drug abuse, including cannabinoids. There are reports in which authors point out the possibilities of medical complications which may occur in cases with high blood levels of these compounds, e.g. serious circulation insufficiency leading to death, most usually of a young individual [1, 2].

Instrumental methods which are used in contemporary analyses of cannabinoids include a broad range of chromatographic methods coupled to mass spectrometry. The most frequently used method is gas chromatography coupled to mass spectrometry equipped with a single quadrupole analyser with electron impact ionisation mode (GC-EI-MS) [4], and also chemical ionisation systems that can be either positive or negative (GC-PCI/NCI-MS) [5, 7]. There is also an application utilising two-dimensional gas chromatography coupled to a single quadrupole analyser with electron impact ionisation mode (GC-GC-EI-MS) [8].

From among the methods applied in the analysis of cannabinoids, gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry is increasingly frequently applied, with a combination of different types of mass

analysers, most frequently the triple quadrupole system (QQQ), or three-dimensional quadrupole ion trap (QIT) [2, 11]. Tandem mass spectrometry is an appropriate solution for cannabinoid analysis in blood and can be successfully applied to reduce biological matrix effects. Determination of cannabinoids is usually preceded by the derivatisation process, which is meant to make an analyte into a volatile derivative, which has better chromatographic properties compared to the parent compound.

The choice of a derivatising agent depends on the ionisation mode. In the case of electron impact and positive chemical ionisation modes the most suitable derivatising agents are: BSTFA with addition of 1% TMCS and MSTFA, converting cannabinoids into trimethylsilyl derivatives, or TBAH/DMSO and TMAH/DMSO with iodomethane, converting cannabinoids into methyl derivatives. In the case of negative chemical ionisation, trifluoroacetic acid anhydrate (TFA) and pentafluoropropionic acid anhydrate (PFPA) mixed with 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-propan-2-ol are more often utilised.

Beside GC-MS, successful application of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) to determination of these compounds is increasingly frequently described in the scientific literature [10].

In the study, the authors presented application of their own procedure, demonstrating the applicability of gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry in electron impact mode (GC-EI-MS-MS) to determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and its metabolites – 11-hydroksy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid in blood in the form of trimethylsilyl derivatives. The developed method was applied to the analyses of two blood samples – *ante-mortem* and *post-mortem* in toxicological expert opinion practice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological specimen

- Blank blood purchased from the Regional Blood-Donor and Blood Treatment Centre, Krakow, was used for development, optimisation and validation of the analytical procedure of determination of  $\Delta^9$ -THC and its metabolites 11-OH- $\Delta^9$ -THC and THC-COOH;
- *ante-mortem* blood collected from a driver, who caused a car accident under the influence of cannabinoids;

- *post-mortem* blood collected from a deceased person who died due to an overdose of amphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA), also taking *Cannabis*.

## 2.2. Standards

(–)- $\delta$ -tetrahydrocannabinol ( $\delta$ -THC), (–)- $\delta$ -tetrahydrocannabinol- $D_3$  ( $\delta$ -THC- $D_3$ ), 11-hydroxy- $\delta$ -tetrahydrocannabinol (11-OH- $\delta$ -THC), 11-hydroxy- $\delta$ -tetrahydrocannabinol- $D_3$  (11-OH- $\delta$ -THC- $D_3$ ), ( $\pm$ )11-nor-9-carboxy- $\delta$ -tetrahydrocannabinolic acid (THC-COOH), ( $\pm$ )11-nor-9-carboxy- $\delta$ -tetrahydrocannabinolic- $D_9$  acid (THC-COOH- $D_9$ ) at 0.1 mg/ml in methanolic solution were purchased from LGC Promochem (Warsaw, Poland).

## 2.3. Main chemicals

Acetone and methanol at analytical grade (POCh, Poland), deionised water LiChrosolv (Merck, Darmstadt, Germany), BSTFA with 1% TMCS (Supelco, Bellefonte, USA).

## 2.4. Other auxiliary materials

Solid phase extraction column (SPE) LiChrolut RP-18 E 500 mg bed (Merck, Darmstadt, Germany), 5 ml silanised glass vials (Supelco, Bellefonte, USA), 24 SPE position vacuum device (Varian, USA), N-EVAP sample evaporator (Organomation Associates Inc., Berlin, USA) were used.

## 2.5. Sample preparation

1 ml blood samples were fortified with deuterated internal standards  $\delta$ -THC- $D_3$ , 11-OH- $\delta$ -THC- $D_3$  and THC-COOH- $D_9$  at 20 ng/ml (20  $\mu$ l in 20  $\mu$ l methanol), and subsequently diluted with deionised water (1:5, v:v). Samples prepared in this way were vortexed, ultrasonicated and centrifuged. 5.5 ml of the supernatant (upper layer) was applied onto an octadecyl column bed conditioned with 1 ml methanol and 1 ml deionised water. Supernatant was allowed to pass through the column bed under gravity. The bed was then rinsed with 1 ml 0.25 M acetic acid water solution, followed by 2 ml deionised water in two portions. Afterwards, the bed was dried (30 minutes) under vacuum. Elution of cannabinoids was performed using 2 ml of acetone. After evaporation under nitrogen at 40°C, the extracts were derivatised. A derivatising mixture of BSTFA + 1%TMCS with pyridine (1:1, v/v)

was made. 20  $\mu$ l of the mixture was added to each vial, vortexed and transferred to silanised glass vials and then capped. The derivatisation process was carried out at 60°C for 15 minutes. 1  $\mu$ l of the derivatised extract was injected manually into the injection port of the GC-MS system.

## 2.6. Chromatographic separation

Chromatographic separation was carried out on a Trace gas chromatograph (ThermoElectron, USA) equipped with a universal non-polar VF-5MS capillary column: 30 m long, inner diameter 0.25 mm and film thickness 25  $\mu$ m (Varian, USA). The carrier gas was helium, purity 6, with a flow rate 1.2 ml/min. The gas chromatograph was equipped with a split/splitless injector, maintained at 280°C. Chromatographic separation was performed in a gradient temperature programme: 120°C maintained at 0.5 min, increased linearly at 30°C/min to 230°C, and then again linearly increased at 15°C/min to 310°C; and maintained at this temperature for 7 minutes. The transfer line temperature was set to 280°C.

## 2.7. Detection

The Polaris Q mass spectrometer (ThermoElectron, USA) was equipped with a quadrupole ion trap analyser. The detector was operated in the electron impact mode. Ion source temperature was 200°C, filament emission current was 10 A, and electron beam energy was 70 eV. The mass detector operated in MS-MS mode. The following m/z transmissions were monitored: 386/371 for  $\delta$ -THC, 389/374 for  $\delta$ -THC- $D_3$ , 371/305+289 for 11-OH- $\delta$ -THC, 374/308+292 for 11-OH- $\delta$ -THC- $D_3$ , 488/473+398 for THC-COOH and 497/479+407 for THC-COOH- $D_9$ . Collision energy for parent ions was 1.5 V for  $\delta$ -THC,  $\delta$ -THC- $D_3$ , THC-COOH, THC-COOH- $D_9$  and 1.75 V for 11-OH-THC and 11-OH-THC- $D_3$ . Ion trap isolation time of the parent ions was 12 ms. Electron multiplier voltage was 1450 V.

## 2.8. Validation

In order to evaluate peaks purity and their selectivity, a negative control (unfortified with analytes and internal standards) was prepared. The influence (interference) of the biological matrix on the elution of cannabinoids and their deuterated derivatives was evaluated. In addition, for verification of the declared concentrations (< 1%) of undeuterated analytes ions, an unextracted methanolic mixture of internal stan-

dards IS was analysed in full scan mode. To evaluate the presence of signals deriving from undeuterated cannabinoids in MS/MS chromatograms, a negative control blood sample fortified with IS was analysed too.

A calibration curve was prepared by analysis of a series of blood samples spiked with 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50 ng/ml of  $^9$ -THC and 11-OH- $^9$ -THC and 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0 ng/ml of THC-COOH, always carried out together with the case blood samples. In addition, a series of validation samples was prepared at levels of 0.2, 0.5, 75.0, 100.0 ng/ml for  $^9$ -THC, 11-OH- $^9$ -THC and levels of 1.0; 2.5; 150.0; 200.0 ng/ml, and then analysed as described in chapter 2.5. Validation samples were used for determining of lower and upper limits of linearity of the developed method.

The limit of detection (*LOD*) was evaluated based on the criterion that it is the lowest concentration giving signal/noise ratio value  $\geq 3$  (calculated from peak area), with peak resolution, shape and relative retention time ( $\pm 2\%$  of real *RT*) maintained. The limit of quantification was based on the definition that it is the lowest concentration level meeting *LOD* criteria and the determined analyte's concentration is less than 20% of the true concentration.

Evaluation of inter and intra-assay precision was performed at three defined concentrations of each target compound, which corresponded to low, medium and high concentrations on the calibration curve. Intra-assay precision and the relative error were determined by analysing one series of 10 replicates at each concentration level. Inter-assay precision and the relative error were evaluated by analysing of five series of 5 replicates at each concentration level of the analytes. For  $^9$ -THC and 11-OH- $^9$ -THC, it was 2, 20 and 40 ng/ml, for THC-COOH it was 10, 20 and 40 ng/ml.

The method recovery percentage was calculated as the ratio of the difference between the mean and true concentration of the analyte to the mean determined concentration, multiplied by 100. Precision was expressed as a percentage relative standard deviation (%*RSD*) and was calculated as the ratio of relative standard deviation to the mean determined concentration of the analyte, multiplied by 100.

Extraction recovery of analytes was evaluated at low, medium and high concentration levels ( $n = 5$ ). The blood samples were fortified with  $^9$ -THC and 11-OH- $^9$ -THC at concentrations of 2, 20 and 40 ng/ml and THC-COOH at 10, 20 and 40 ng/ml as well as the appropriate internal standards. Analysis was performed according to the procedure described in chapter 2.5. Additionally, methanolic solutions of cannabinoids and internal standards at the same concentra-

tions were extracted. Percentage extraction recovery was calculated as the ratio of analyte's signal (peak area) obtained in blood extraction to the signal obtained in extraction of the methanolic standard solution, multiplied by 100.

### 3. Results

#### 3.1. Method validation

Figure 1 shows fragment mass spectra (MS/MS) of the target cannabinoids obtained during the optimisation process of the mass detector.

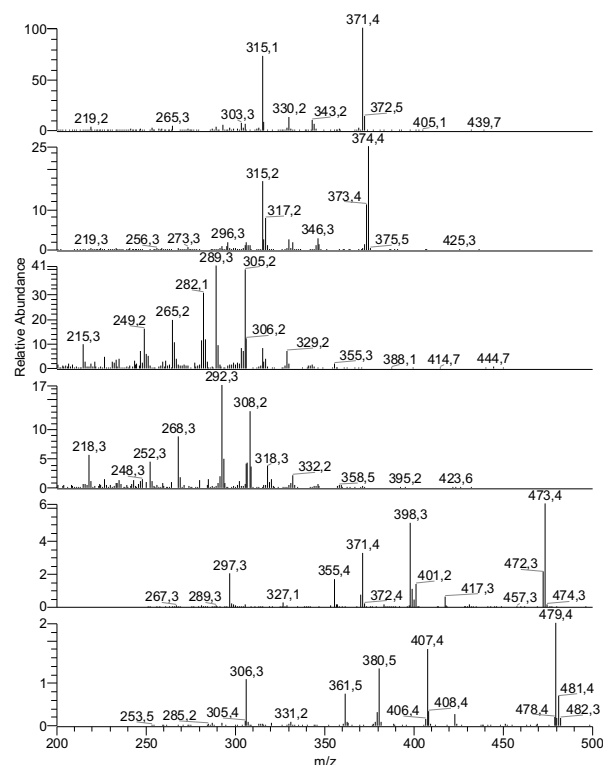


Fig. 1. MS-MS spectra of  $^9$ -THC,  $^9$ -THC-D<sub>3</sub>, 11-OH- $^9$ -THC, 11-OH- $^9$ -THC-D<sub>3</sub>, THC-COOH and THC-COOH-D<sub>9</sub>, respectively.

Full validation of determination of  $^9$ -THC and its two metabolites (11-OH- $^9$ -THC and THC-COOH) in blood by means of GC-EI-MS-MS was performed in accordance with ISO 17025:2005 requirements. Blank blood control samples which were analysed in each series of validation procedure ( $n = 6$ ) were free of compounds which might be eluted in the retention times corresponding to the retention times of  $^9$ -THC, 11-OH-THC and THC-COOH as well as their deuterated IS derivatives. Figures 2a, b and c illustrates MS/MS



TABLE I. <sup>9</sup>-THC, 11-OH-<sup>9</sup>-THC AND THC-COOH<sup>a</sup> CALIBRATION CURVES PARAMETERS

Analyte	LOL [ng/ml]	Equation of linear regression <sup>b</sup>	(r) <sup>c</sup>	LOD <sup>d</sup> and LOQ <sup>e</sup> [ng/ml]
<sup>9</sup> -THC	1.0–50.0	$y = 0.05x + 0.01$	0.999	1.0
11-OH- <sup>9</sup> -THC	1.0–50.0	$y = 0.05x + 0.01$	0.998	1.0
THC-COOH	5.0–100.0	$y = 0.05x + 0.09$	0.998	5.0

<sup>a</sup>)  $N = 5$ , <sup>b</sup>) Mean value, <sup>c</sup>) Coefficient of correlation, <sup>d</sup>) Limit of detection, <sup>e</sup>) Limit of quantification.

TABLE II. RELATIVE ERROR AND PRECISION OF SIMULTANEOUS DETERMINATION OF <sup>9</sup>-THC, 11-OH-<sup>9</sup>-THC AND THC-COOH IN BLOOD BY GC-EI-MS-MS

Analyte (ng/ml)	Inter-assay study ( $n = 10$ )			Intra-assay study ( $n = 34$ )		
	Mean concentration [ng/ml]	Relative error [%]	Precision [%]	Mean concentration [ng/ml]	Relative error [%]	Precision [%]
<sup>9</sup> -THC						
2.0	2.2	10.0	10.6	2.2	10.0	11.3
20	22.1	10.5	9.8	22.8	14.0	10.3
40	43.1	7.7	6.8	42.8	7.0	9.8
11-OH- <sup>9</sup> -THC						
2.0	2.2	10.0	12.3	2.3	15.0	10.7
20	23.1	15.5	9.7	22.9	14.5	9.0
40	43.1	7.7	8.6	44.3	10.7	7.8
THC-COOH						
10	11.1	11.0	11.8	11.4	14.0	11.0
20	22.8	14.0	8.7	21.5	7.5	9.1
40	44.1	10.2	7.9	43.3	8.2	8.5

The developed method gave satisfactory parameters of extraction recovery determined for the three analytes which had values in the 68.7–84.1% range. The results are shown in Table III.

### 3.2. Determination results

The developed method was applied to the analysis of two *ante-mortem* and *post-mortem* blood samples collected from drivers. The determination results are shown in Table IV.

## 4. Discussion

Introduction of legal regulations concerning driving under the influence of psychoactive substances has been accompanied by challenges in the analysis of the

drugs listed in these regulations. This concerns to a great extent the active components of *Cannabis sativa*. The significant influence of *Cannabis* on users' minds is connected to the reduction in psychophysical ability of drivers, inducing behaviour leading to road accidents, rapes, crimes or causing pathological changes.

Therefore, reliable evaluation of the concentration of the active hemp component, <sup>9</sup>-THC and its metabolites in blood is of great importance in toxicological expert opinion. This is linked to the properties of the main component of hemp – <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol. Its presence in the body causes euphoric states, hallucinations, increases sensitivity to music and noise stimuli, changes spatial and time perception of reality, causes motional co-ordination disorder, temporary memory disorder, slows down learning processes, brings about panic, short-term fears, confusion and psychosis. For occasional hemp smokers, 2–3 mg of <sup>9</sup>-THC

is sufficient to cause a nice feeling of euphoria, and one hand-rolled joint can be enough to make as many as 2 to 4 beginner-smokers “high”. A heavily addicted person smokes as many as 5–8 joints a day [3, 9].

TABLE III. EXTRACTION RECOVERY OF THE TARGET COMPOUNDS

Analyte [ng/ml]	Recovery <sup>a</sup> $\pm$ SD [%]
$\Delta^9$ -THC	
2.0	84.1 $\pm$ 12.1
20	74.8 $\pm$ 9.9
40	82.1 $\pm$ 7.9
11-OH- $\Delta^9$ -THC	
2.0	77.1 $\pm$ 13.2
20	76.5 $\pm$ 8.3
40	80.1 $\pm$ 9.8
THC-COOH	
10	69.5 $\pm$ 13.7
20	77.1 $\pm$ 10.3
40	68.7 $\pm$ 7.9

<sup>a</sup>) Extraction recovery evaluated by comparison of results obtained by analyses of extracted and unextracted methanolic samples.

The main metabolic pathway in the biotransformation of  $\Delta^9$ -THC is oxidation of the carbon atom in position 11 to form 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-OH- $\Delta^9$ -THC), which has activity similar to  $\Delta^9$ -THC. 11-OH- $\Delta^9$ -THC is transformed to the inactive metabolite 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinolic acid (THC-COOH), which binds to glucuronic acid to form glucuronide. These compounds i.e. THC-COOH and its glucuronide, are mainly excreted with urine. The oxidation product of carbon at position 8 of  $\Delta^9$ -THC,

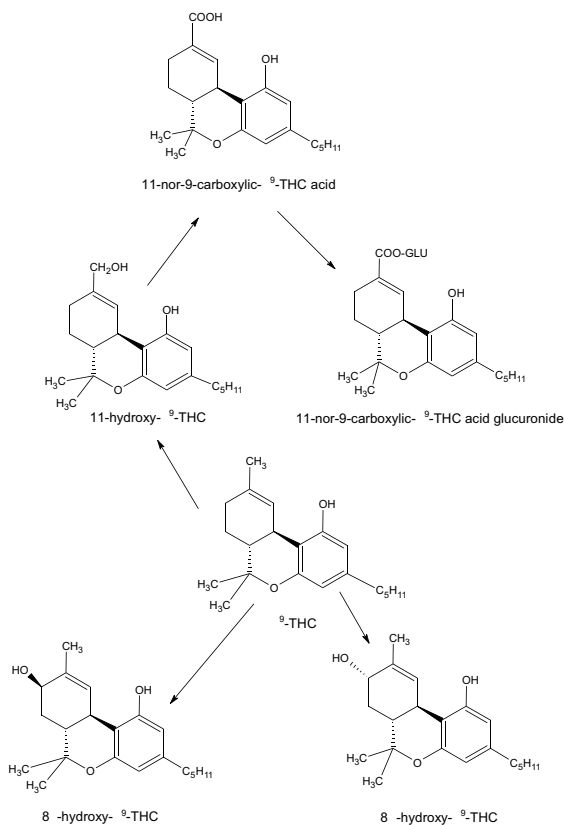


Fig. 3. Main metabolic pathways of  $\Delta^9$ -THC in the body [9].

8-hydroxy- $\Delta^9$ -THC, has only 4% activity compared to the parent compound, while 8-hydroxy- $\Delta^9$ -THC, which differs only in the configuration of the hydroxyl group, is practically inactive (Figure 3).

Smoking marijuana causes a rapid increase in  $\Delta^9$ -THC concentration in plasma, which then decreases and after 2–3 hours this compound is undetectable. At the same time concentration of THC-COOH increases and this compound can be detected within 6 hours after consumption.

TABLE IV. THE RESULTS OF CANNABINOIDS DETERMINATION IN BLOOD COLLECTED ANTE-MORTEM AND POST-MORTEM, PERFORMED BY GC-EI-MS-MS

Case description	$\Delta^9$ -THC	11-OH- $\Delta^9$ -THC		THC-COOH
		Concentration [ng/ml]		
A 30 years old male caused a road accident. Blood alcohol analysis – negative. No information on the profile of drug addiction history.	3.6	1.0	22.2	
A 17 years old male died due to an overdose of amphetamine, MDMA and MDA. Blood alcohol analysis – negative. Drug addiction profile – mixed: amphetamines – Cannabis.	7.8	12.9	104	

The metabolic profile of  $^9$ -THC in blood differs depending on the route of administration. Thus for instance after smoking marijuana joints and intravenous administration of  $^9$ -THC, the concentration of the active metabolite 11-hydroxy- $^9$ -THC is only 10–15% of  $^9$ -THC, whereas after (oral) ingestion – about 50%. The distinctly higher ratio of  $^9$ -THC metabolites concentrations to parent compound in plasma after ingestion compared to that after intravenous injection is due to  $^9$ -THC undergoing the “first pass effect”, which takes place in the liver prior to reaching central circulation. That is why active metabolites of  $^9$ -tetrahydrocannabinol: 11-hydroxy- $^9$ -THC and 8-hydroxy- $^9$ -THC are only to a small extent responsible for the effects which are observed after intravenous and lung route administration of  $^9$ -THC, but may have a significant influence on these effects after oral ingestion [3, 5, 9].

## 5. Summary

The presented analytical procedure for simultaneous determination of  $^9$ -THC and its two metabolites, i.e. 11-OH-THC and THCCOOH, in *ante-mortem* and *post-mortem* blood by means of GC-EI-MS-MS after prior solid phase extraction (SPE), validated in accordance with ISO 17025:2005 guidelines, provides specific and accurate quantification results for cannabinoids in blood in the concentration ranges found in cases of *Cannabis* consumption. This method enables reduction of biological matrix interference, especially that originating from post mortem blood samples, which contain putrefaction products of decay and autolytical processes.

Such an analytical solution makes the method more sensitive and increases the reliability of the results of toxicological analysis. Improving of sensitivity and selectivity as a result of MS-MS application play a great role in the analysis of blood samples collected from drivers for the presence of substances acting similarly to alcohol, which are usually present in blood in low concentrations.

Gas chromatographic methods coupled to mass spectrometry are applied in the analysis of cannabinoids in various body fluids – blood, plasma, serum, saliva or urine. An alternative to GC-MS is liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), which has recently become increasingly popular in the analysis of this group of compounds [10]. Tandem mass spectrometry (MS-MS) has also been used by other scientists [2, 11] and has been recommended for determination of cannabinoids in blood.

The developed analytical method was verified by applying it to two cases that were the subject of toxicological expert reports, the results of which are shown in Table IV. In the first case, a blood specimen collected from a driver about 1 hour after a road accident was found to be positive for  $^9$ -THC and its two metabolites at levels typical for marijuana smokers. This result of the analysis indicates that the driver was under the influence of  $^9$ -THC at the moment of the accident. In the other case,  $^9$ -THC and its two metabolites were detected in a blood sample collected from a dead individual, at a high concentration level. The cause of death was complex overdosing of MDMA and MDA. The high concentration of  $^9$ -THC and its metabolites, especially THC-COOH, may suggest frequent *Cannabis* abuse.

Detection of cannabinoids in blood samples obtained from persons with various types of addictions (opiate, amphetamine and cocaine) is relatively frequent. This is connected with the preferred addiction profile in Europe and America. As transpires from medico-legal toxicological opinion practice and scientific reports in the field [6, 7], cannabinoids are often an accompanying factor in opiates and amphetamines overdoses.

## References

1. Bachs L., Morland H., Acute cardiovascular fatalities following cannabis use, *Forensic Science International* 2001, 124, 200–203.
2. Collins M., Easson J., Hansen G. [et al.], GC-MS-MS confirmation of unusually high  $^9$ -tetrahydrocannabinol levels in two postmortem blood samples, *Journal of Analytical Toxicology* 1997, 21, 538–542.
3. Drummer O. H., The forensic pharmacology of drugs of abuse, Arnold, London 2001.
4. Giroud C., Ménétrey A., Augsburger M. [et al.],  $^9$ -THC, 11-hydroxy- $^9$ -THC and  $^9$ -THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people, *Forensic Science International* 2001, 123, 159–164.
5. Gustafson R. A., Moolchan E. T., Barnes A. [et al.], Validated method for the simultaneous determination of  $^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization, *Journal of Chromatography B* 2003, 798, 145–154.
6. Kłys M., Rojek S., Kulikowska J. [et al.], Usefulness of multi-parameter opiate analysis in hair of drug users for the evaluation of an abuse profile by means of tandem



- LC-APCI-MS-MS, *Journal of Chromatography B* 2007, 854, 299–307.
7. Kochanowski M., Kała M., Tetrahydrocannabinols in clinical and forensic toxicology, *Przegląd Lekarski* 2005, 6, 576–580.
  8. Scurlock R. D., Ohlson G. B., Worthen D. K., The detection of <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol (THCA) in whole blood using two-dimensional gas chromatography and EI-mass spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 30, 262–266.
  9. Szukalski B., Narkotyki. Kompendium wiedzy o środkach uzależniających, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.
  10. Valiveti S., Stinchcomb A. L., Liquid chromatographic-mass spectrometric quantitation of <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol and two metabolites in pharmacokinetic study plasma samples, *Journal of Chromatography B* 2004, 803, 243–248.
  11. Weller J. P., Wolf M., Szidat S., Enhanced selectivity in the determination of <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol and two major metabolites in serum using ion-trap GC-MS-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 2000, 24, 359–364.

---

**Corresponding author**

Sebastian Rojek  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Grzegórzecka 16  
31-531 Kraków  
e-mail: msrojek@cyf-kr.edu.pl

---

# ANALIZA <sup>9</sup>-THC I JEGO METABOLITÓW: 11-OH-<sup>9</sup>-THC I THC-COOH WE KRWI METODĄ CHROMATOGRAFII GAZOWEJ SPRZĘŻONEJ Z TANDEMOWĄ SPEKTROMETRIĄ MAS (GC-MS-MS) DO CELÓW OPINIOWANIA SĄDOWO-LEKARSKIEGO

## 1. Wprowadzenie

Konopie (*Cannabis*) typu narkotykowego o działaniu kannabinomimetycznym to grupa obecnie najpopularniejszych narkotyków na świecie. Szacuje się, że w Stanach Zjednoczonych *Cannabis* używa ponad 20 milionów ludzi. Obraz narkomanii w Polsce na tle narkomanii zachodniej jest bardzo podobny, produkty zawierające kannabinole są – obok amfetaminy i jej pochodnych – najczęściej stosowanymi środkami odurzającymi, tzw. narkotykami rekreacyjnymi [6, 7]. Jakkolwiek w narkotykowym typie *Cannabis* zidentyfikowano 421 substancji z 18 różnych grup chemicznych, to podstawowe znaczenie ma <sup>9</sup>-tetrahydrokannabinol (<sup>9</sup>-THC) – główny aktywny składnik konopi [3, 9]. Z punktu widzenia opinowania toksykologicznego ważne jest jednakże oznaczenie we krwi, obok głównego składnika konopi, <sup>9</sup>-THC, także jego aktywnego i nieaktywnego metabolitu, tj. 11-hydroksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu (11-OH-<sup>9</sup>-THC) oraz kwasu 11-nor-9-karboksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolowego (THC-COOH).

Na mocy kodeksu karnego z 1997, 1999 i 2000 r. zabronione jest prowadzenie pojazdu pod wpływem środka odurzającego. Kodeks wykroczeń z 1997 r. oraz Prawo o ruchu drogowym zakazują prowadzenia pojazdów w stanie po użyciu środka podobnie działającego do alkoholu. Aktywny składnik konopi, <sup>9</sup>-THC, jako substancja oddziałująca na sprawność psychomotoryczną kierowcy i powodująca jej obniżenie, spełnia definicję środka odurzającego (art. 178a k.k.; uchwała Sądu Najwyższego z dnia 27.02.2007), jak i środka działającego podobnie do alkoholu (rozporządzenia Ministra Zdrowia z 2003 i 2004 r. – Dz. U. 2003, nr 116, poz. 1104 i Dz. U. 2004, nr 52, poz. 524). Jego wykrycie we krwi wskazuje, że dana osoba znajdowała się pod jego wpływem w chwili pobrania krwi do badania, a w konsekwencji mogła też być w podobnym stanie w momencie zdarzenia.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia stawia wymogi co do poziomu oznaczalności środków podobnie działających do alkoholu w materiale biologicznym. Narzuca to sądowym laboratoriom badawczym wprowadzenie metod analitycznych pozwalających na oznaczenie co najmniej 5 grup substancji psychoaktywnych na poziomie stężenia określonym w rozporządzeniu. Dla <sup>9</sup>-THC we krwi poziom ten wynosi 2 ng/ml.

Jakkolwiek statystyki medyczno-sądowe nie rejestrują zgonów wskutek przedawkowania kannabinoli, to

istnieje jednak potrzeba oznaczania tych związków w materiale sekcyjnym w razie zgonu, którego przyczyna może być powiązana z zażywaniem narkotyków czy substancji psychoaktywnych, w tym kannabinoli. Istnieją także doniesienia, w których autorzy zwracają uwagę na możliwość wystąpienia powikłań przy wysokich poziomach tych związków we krwi, w tym ciężkiej niewydolności krążeniowej, mogących w rezultacie prowadzić do zgonu najczęściej młodej osoby [1, 2].

Metody instrumentalne stosowane we współczesnej analizie kannabinoli obejmują szerokie spektrum metod chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas. Najczęściej stosowaną metodą jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas, wykorzystująca pojedynczy analizator kwadropolowy z opcją jonizacji elektronowej (GC-EI-MS) [4] czy też z opcją jonizacji chemicznej pozytywnej lub negatywnej (GC-PCI/NCI-MS) [5, 7]. Pojawiła się również aplikacja dotycząca zastosowania dwuwymiarowej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z pojedynczym analizatorem kwadropolowym w opcji jonizacji elektronowej (GC-GC-EI-MS) [8].

Wśród metod stosowanych w analizie kannabinoli coraz częściej wykorzystuje się chromatografię gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas realizowaną poprzez stosowanie różnego rodzaju analizatorów mas, najczęściej układu potrójnych kwadropoli (QQQ) czy trójwymiarowej kwadropolowej pułapki jonowej (QIT) [2, 11]. Tandemowa spektrometria mas jest właściwym rozwiązaniem w przypadku analizy kannabinoli we krwi i z powodzeniem może być zastosowana w procesie wygaszania matrycy biologicznej. Analizę kannabinoli poprzedza zazwyczaj proces derywatyzacyjny mający na celu przeprowadzenie analitu w lotną pochodną wykazującą dużo lepsze właściwości chromatograficzne od macierzystej substancji. Wybór odczynnika derywatyzującego z reguły zdeterminowany jest wyborem jednego z rodzajów jonizacji. Najczęściej stosowanymi odczynnikiemami w przypadku jonizacji elektronowej oraz chemicznej jonizacji pozytywnej są BSTFA z dodatkiem 1%TMCS i MSTFA przeprowadzające kannabinole w trimetylosililowe pochodne lub TBAH/DMSO i TMAH/DMSO wraz z jodometanem, przeprowadzające kannabinole w metylowe pochodne. W przypadku stosowania chemicznej jonizacji negatywnej najczęściej stosowanymi odczynnikiemami są bezwodniki kwasu trifluorooctowego (TFA)

i kwasu pentafluoropropionowego (PFPA) w mieszankach z 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-propan-2-olem.

Obok GC-MS, coraz częściej pojawiają się informacje dotyczące zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS), która z równym powodzeniem może być stosowana do analiz tej grupy związków [10].

W niniejszej pracy autorzy przedstawili procedurę autorską dokumentującą możliwość zastosowania chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas w opcji jonizacji elektronowej (GC-EI-MS-MS) do oznaczania we krwi <sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu i jego metabolitów – 11-hydroksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu oraz kwasu 11-nor-9-karboksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolowego w postaci trimetylosilowych pochodnych. Opracowaną metodę zilustrowano na dwóch przykładach analizy próbek krwi – przyżyciowej i sekcyjnej, pochodzących z opiniodawczej praktyki toksykologicznej.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiła krew:

- kontrolna do opracowania, optymalizacji i walidacji procedury analitycznej oznaczania <sup>9</sup>-THC i jego metabolitów – 11-OH-<sup>9</sup>-THC i THC-COOH;
- przyżyciowa pobrana od kierowcy, który spowodował wypadek, będąc pod wpływem kannabinoli;
- krew sekcyjna pobrana ze zwłok osoby zmarłej wskutek przedawkowania amfetaminy oraz 3,4-metylenodiosymetamfetaminy (MDMA) i 3,4-metylenodiosymetamfetaminy (MDA). Osoba ta zażywała także kannabinole.

### 2.2. Substancje wzorcowe

Użyto następujących substancji wzorcowych: (–)-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinol (<sup>9</sup>-THC), (–)-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinol-D<sub>3</sub> (<sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>), 11-hydroksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinol (11-OH-<sup>9</sup>-THC), 11-hydroksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinol-D<sub>3</sub> (11-OH-<sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>), (±) kwas 11-nor-9-karboksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolowy (THC-COOH), (±) kwas 11-nor-9-karboksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolowy-D<sub>9</sub> (THC-COOH-D<sub>9</sub>) o stężeniu 0,1 mg/ml w metanolu, zakupionych w firmie LGC Promochem (Warszawa).

### 2.3. Podstawowe odczynniki chemiczne

Aceton i metanol czystości cz.d.a. zakupiono w POCh (Gliwice), wodę dejonizowaną w firmie LiChrosolv (Merck), BSTFA z 1% TMCS pochodził z firmy Supelco.

### 2.4. Inne materiały pomocnicze

Do przeprowadzenia badań wykorzystano także kolumnienki do ekstrakcji do fazy stałej (SPE) LiChrolut RP-18 E o masie złoża 500 mg (Merck), fiołki szklane silanizowane o objętości 5 ml (Supelco), komora próżniowa do ekstrakcji do fazy stałej (Varian) oraz ewaporator N-EVAP do odparowywania próbek (Organomation Associates Inc., Stany Zjednoczone).

### 2.5. Przygotowanie próbek krwi

1 ml krwi wzbogacano dodatkiem standardów wewnętrznych w postaci deuterowych pochodnych <sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-<sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub> i THC-COOH-D<sub>9</sub> w stężeniu 20 ng/ml (20 μl w 20 μl metanolu), a następnie krew rozcieńczano wodą dejonizowaną w stosunku 1:5, v:v). Tak przygotowane próbki wortekowano, poddawano działaniu ultradźwięków i odwirowywano. Supernatant w objętości 5,5 ml наносono na zaktywowane złożo oktadecylowe 1 ml metanolu, a następnie 1 ml wody dejonizowanej. Supernatant przepuszczano przez złożo pod działaniem siły grawitacji. Złożo przemywano kolejno 1 ml 0,25 M wodnego roztworu kwasu octowego, a następnie 2 ml wody dejonizowanej w dwóch porcjach. Po zakończeniu tego procesu złożo suszono (30 minut) w pełnej próżni. Elucję kannabinoli prowadzono 2 ml acetonu. Po odparowaniu w strumieniu azotu eluatów w temperaturze 40°C, ekstrakty poddawano derywatywacji. W tym celu sporządzano mieszanekę derywatyżującą BSTFA + 1% TMCS z pirydyną (1:1, v/v). Do każdej fiołki szklanej dodawano po 20 μl mieszanki, wortekowano i przenoszono do silanizowanej buteleczki szklanej, którą kapslowano. Proces derywatywacji prowadzono przez 15 minut w temperaturze 60°C. 1 μl derywatu nastrzykiwano manualnie do iniektora systemu GC-MS.

### 2.6. Rozdział chromatograficzny

Zastosowano chromatograf gazowy Trace (Thermo Electron, Stany Zjednoczone) wyposażony w uniwersalną, niepolarną kolumnę kapilarną VF-5MS o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości filmu 25 μm (Varian, Stany Zjednoczone). Gazem nośnym był hel o czystości 6 przepływający przez kolumnę z szybkością 1,2 ml/min. Chromatograf gazowy wyposażony był w dozownik typu *split/splitless* utrzymywany w temperaturze 280°C. Rozdział chromatograficzny prowadzono w programie gradientu temperatury: 120°C utrzymywano przez 0,5 min, potem następował liniowy wzrost do 230°C z przyrostem temperatury 30°C/min. Następnie temperatura ponownie wzrastała liniowo do 310°C z przyrostem 15°C/min i taka była utrzymywana przez 7 minut. Temperatura linii transferowej wynosiła 280°C.

## 2.7. Detekcja

Zastosowano spektrometr mas Polaris Q (Thermo-Electron, Stany Zjednoczone) wyposażony w analizator mas typu kawdrupolowej pułapki jonowej. Detektor mas pracował w trybie jonizacji elektronowej. Temperatura źródła jonów wynosiła 200°C, prąd emisji katody 10 A, a energia wiązki bombardujących elektronów miała wartość 70 eV. Detektor masowy pracował w opcji MS-MS. Monitorowano następujące transmisje m/z: 386/371 dla <sup>9</sup>-THC, 389/374 dla <sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>, 371/305+289 dla 11-OH-<sup>9</sup>-THC, 374/308 + 292 dla 11-OH-<sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>, 488/473 + 398 dla THC-COOH i 497/479 + 407 dla THC-COOH-D<sub>9</sub>. Energia kolizji dla jonów macierzystych wynosiła 1,5 V dla <sup>9</sup>-THC, <sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>, THC-COOH i THC-COOH-D<sub>9</sub> oraz 1,75 dla 11-OH-THC i 11-OH-THC-D<sub>3</sub>. Czas izolacji jonów macierzystych w pułapce był równy 12 ms. Napięcie powielacza elektronowego wynosiło 1450 V.

## 2.8. Walidacja

Do oceny czystości pików i ich selektywności przygotowano kontrolę negatywną bez dodatku analitów i standardów wewnętrznych kannabinoli. Badano możliwy wpływ matrycy biologicznej na obszary elucji kannabinoli i ich deuterowych pochodnych. Dodatkowo poddano analizie w opcji skanowania pełnego widma masowego nieekstrahowaną metanolową mieszaninę wzorców wewnętrznych dla zweryfikowania deklarowanego w niej stężenia (< 1%) jonów pochodzących od nie-deuterowych analitów. Analizowano również negatywną próbkę krwi z dodatkiem wzorca wewnętrznego celem sprawdzenia, czy jony są obecne.

Krzywą kalibracyjną przygotowano zawsze w serii z badanymi próbkami poprzez analizę serii próbek krwi wzbogaconych odpowiednio 1,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50 ng/ml <sup>9</sup>-THC i 11-OH-<sup>9</sup>-THC oraz 5,0, 10,0, 20,0, 50,0, 100,0 ng/ml THC-COOH. Dodatkowo przygotowano serię próbek walidacyjnych o stężeniu 0,2, 0,5, 75,0, 100,0 ng/ml dla <sup>9</sup>-THC i 11-OH-<sup>9</sup>-THC oraz 1,0; 2,5; 150,0; 200,0 ng/ml, które następnie poddano procedurze jak w rozdziale 2.5. Próbkę walidacyjne służyły do wyznaczenia dolnej i górnej granicy liniowości opracowanej metody analitycznej.

Granice detekcji (*LOD*) metody wyznaczono, opierając się na kryterium, że jest ona najniższym stężeniem, przy którym stosunek sygnału analitu do szumu (wyznaczany z pola powierzchni pików) jest 3 przy zachowanym kształcie i rozdzielczości pików oraz względnym czasie retencji ( $\pm 2\%$  rzeczywistego *RT*). Granicę oznaczalności metody oparto na definicji, że jest to najniższe stężenie, dla którego spełnione są kryteria *LOD*, a oznaczalność analitu nie przekracza wartości  $\pm 20\%$  rzeczywistego stężenia.

Precyzję i dokładność zewnątrz- i wewnątrzgrupową badano dla trzech zdefiniowanych stężeń każdego analitu odpowiadających dolnemu stężeniu na krzywej kalibracyjnej – środkowemu i górnemu. Precyzję i dokładność wewnątrzgrupową badano w jednej serii w dziesięciu powtórzeniach dla każdego zdefiniowanego stężenia. Precyzję i dokładność zewnątrzgrupową wyznaczano w pięciu odrębnych seriach w pięciu powtórzeniach dla zdefiniowanych stężeń analitów. Dla <sup>9</sup>-THC i 11-OH-<sup>9</sup>-THC były to stężenia 2, 20 i 40 ng/ml, dla THC-COOH były to stężenia 10, 20 i 40 ng/ml.

Dokładność metody wyrażono w procentach i kalkulowano jako stosunek pomiędzy średnim a rzeczywistym stężeniem analitu do średniego wyznaczonego stężenia analitu pomnożonego przez 100. Precyzję wyrażano jako procent względnego odchylenia standardowego (%*RSD*) i obliczano jako stosunek wartości względnego odchylenia standardowego do średniego wyznaczonego stężenia analitu pomnożonego przez 100.

Wydajność ekstrakcji analitów była oznaczona dla niskiego, średniego i wysokiego stężenia ( $n = 5$ ). Krew wzbogacono dodatkiem <sup>9</sup>-THC i 11-OH-<sup>9</sup>-THC w stężeniach 2, 20 i 40 ng/ml oraz THC-COOH 10, 20 i 40 ng/ml oraz odpowiednich standardów wewnętrznych. Przeprowadzono procedurę jak w rozdziale 2.5. Dodatkowo przeprowadzono ekstrakcję metanolowych roztworów kannabinoli o identycznym stężeniu wraz ze standardami wewnętrznymi nieosadzonymi w matrycy biologicznej krwi. Bezwzględna wydajność ekstrakcji wyrażoną w procentach kalkulowano jako stosunek sygnału analitu (wyznaczonego z pola powierzchni) uzyskanego z próbki po ekstrakcji krwi do sygnału uzyskanego z próbki po ekstrakcji metanolowego roztworu wzorca pomnożonego przez 100.

## 3. Wyniki

### 3.1. Walidacja metody

Uzyskane w wyniku optymalizacji pracy detektora fragmentowane widma mas (MS-MS) kannabinoli przedstawia rycina 1.

Przeprowadzono pełną procedurę walidacyjną metody oznaczania <sup>9</sup>-THC i jego dwóch metabolitów (11-OH-<sup>9</sup>-THC i THC-COOH) we krwi metodą GC-EI-MS-MS zgodnie z wymogami narzucanymi przez normę europejską ISO 17025:2005. Próbkę krwi kontrolnej analizowane w każdej serii walidacyjnej ( $n = 6$ ) były wolne od korelujących pików odpowiadających <sup>9</sup>-THC, 11-OH-THC i THC-COOH oraz ich odpowiednim deuterowym pochodnym wzorca wewnętrznego. Na rycinach 2a, b i c przedstawiono chromatogramy MS-MS ekstraktów krwi kontrolnej: a) bez dodatku, b) z dodatkiem 20 ng/ml odpowiednio: <sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-<sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>

i THC-COOH-D<sub>9</sub>, c) z dodatkiem 5 ng/ml <sup>9</sup>-THC, 11-OH-<sup>9</sup>-THC i THC-COOH oraz 20 ng/ml <sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub>, 11-OH-<sup>9</sup>-THC-D<sub>3</sub> i THC-COOH-D<sub>9</sub>. Analiza negatywnych próbek krwi w każdej serii walidacyjnej wykazała, że wzorzec wewnętrzny nie zawiera istotnych stężeń kannabinoli mogących generować fałszywie dodatnie wyniki analizy, szczególnie w dolnych zakresach krzywych kalibracyjnych.

Dla analitów wyznaczono następujące zakresy liniowości: LOD/LOQ do 50 ng/ml dla <sup>9</sup>-THC i 11-OH-<sup>9</sup>-THC oraz do 100 ng/ml dla THC-COOH. Charakterystykę krzywych kalibracyjnych przedstawiono w tabeli I. Wyznaczone zakresy liniowości obejmowały zakresy stężeń oznaczane we krwi w przypadkach nadużywania produktów *Cannabis*. Nie obserwowano efektu pamięci w kontroli negatywnej analizowanej po próbkach walidacyjnych z dodatkiem 100 ng/ml <sup>9</sup>-THC i 11-OH-<sup>9</sup>-THC oraz 200 ng/ml THC-COOH.

Dokładność i precyzja zewnątrzgrupowa oznaczeń kannabinoli zawierały się w zakresach odpowiednio 7,7–15,5 oraz 6,8–12,3%. Dokładność i precyzja wewnątrzgrupowa oznaczeń kannabinoli zawierały się w zakresach 7,0–15,0 oraz 7,8–11,3% (tabela II). Uzyskane wartości dokładności i precyzji są wartościami akceptowalnymi w przypadku analizy toksykologicznej materiału biologicznego.

Opracowaną metodę charakteryzowały satysfakcjonujące wartości bezwzględnych wydajności ekstrakcji dla wszystkich trzech analitów. Zawierały się one w zakresie 68,7%–84,1%. Wyniki zebrano w tabeli III.

### 3.2. Wyniki oznaczeń

Opracowaną metodę zastosowano w analizie dwóch próbek krwi – przyżyciowej i sekcyjnej. Wyniki oznaczeń zamieszczono w tabeli IV.

## 4. Dyskusja

Równoległe z wprowadzeniem stosownego ustawodawstwa dotyczącego prowadzenia pojazdów pod wpływem substancji psychoaktywnych pojawiły się problemy związane z analityką narkotyków zamieszczonych na listach aktów prawnych. Dotyczy to w znacznym stopniu aktywnych komponentów konopi siewnych *Cannabis sativa*. Znaczący wpływ na sferę psychiczną użytkowników *Cannabis* wiąże się z negatywnym wpływem na obniżenie sprawności psychofizycznej kierowców z aktywowaniem zachowań prowadzących do wypadków, gwałtów, zbrodni, czy też z możliwością generowania zmian chorobowych.

W związku z tak postawionym zagadnieniem, wiarygodna ocena zawartości aktywnego składnika konopi <sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu i jego metabolitów we krwi ma

szczególne znaczenie dla opiniowania toksykologicznego. U podstaw tego twierdzenia leżą właściwości <sup>9</sup>-THC jako głównego aktywnego składnika konopi. Jego obecność w organizmie wywołuje stan euforii, halucynacje, podwyższa wrażliwość na bodźce muzyczne i hałas, zmienia odbiór przestrzenny i czasowy rzeczywistości, powoduje zaburzenia koordynacji ruchowej, zaburza również krótkotrwałą pamięć, zwalnia procesy uczenia się, powoduje uczucie paniki, wywołuje także krótkotrwałe okresy lęku, zmieszania lub psychozy. U okazjonalnych palaczy do wywołania przyjemnego uczucia euforii wystarczy 2–3 mg <sup>9</sup>-THC, zaś jednym ręką przygotowanym papierosem, tzw. „skrętem”, może wprowadzić się w stan odurzenia nawet od 2 do 4 początkujących palących. Osoba silnie uzależniona wypala do 5–8 „skrętów” w ciągu doby [3, 9].

Głównym szlakiem metabolicznym w biotransformacji <sup>9</sup>-THC jest utlenianie węgla 11 z utworzeniem 11-hydroksy-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu (11-OH-<sup>9</sup>-THC), który wykazuje aktywność zbliżoną do <sup>9</sup>-THC. Ulega on przemianie w nieaktywny metabolit, kwas 11-nor-<sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolowy (THC-COOH), który z kwasem glukuronowym tworzy glukuronian. Związki te, tj. THC-COOH i jego glukuronian, występują w moczu w największych ilościach. Produkt utlenienia <sup>9</sup>-THC przy węglu 8, 8-hydroksy-<sup>9</sup>-THC, wykazuje ok. 4% aktywności związku macierzystego, natomiast 8-hydroksy-<sup>9</sup>-THC, różniący się jedynie konfiguracją grupy hydroksylowej, jest praktycznie pozbawiony aktywności (rycina 3).

Palenie marihuany wywołuje w osoczu szybki wzrost stężenia <sup>9</sup>-THC, który następnie ulega obniżeniu i po 2–3 godzinach staje się niewykrywalny. Jednocześnie wzrasta stężenie THC-COOH, który można wykryć przez około 6 godzin.

Profil metaboliczny <sup>9</sup>-THC we krwi różni się w zależności od drogi przyjęcia związku. I tak np. po paleniu papierosów z marihuany i po dożylnym przyjęciu <sup>9</sup>-THC stężenie aktywnego metabolitu, 11-hydroksy-<sup>9</sup>-THC, stanowi 10–15% stężenia <sup>9</sup>-THC, natomiast po doustnym przyjęciu – około 50%. Wyraźnie wyższy stosunek stężeń metabolitów <sup>9</sup>-THC do związku macierzystego w osoczu po doustnym przyjęciu, niż po dożylnym, jest wynikiem tzw. „efektu pierwszego przejścia”, jakiemu ulega <sup>9</sup>-THC w wątrobie przed dotarciem do krążenia ogólnego. Dlatego aktywne metabolity <sup>9</sup>-tetrahydrokannabinolu: 11-hydroksy-<sup>9</sup>-THC i 8-hydroksy-<sup>9</sup>-THC są w małym stopniu odpowiedzialne za efekty obserwowane po dożylnym i dopłucnym przyjmowaniu <sup>9</sup>-THC, natomiast mogą w sposób znaczący wpływać na te efekty, gdy jest przyjmowany doustnie [3, 5, 9].

## 5. Podsumowanie

Przedstawiona w niniejszej pracy analityczna procedura równoczesnego oznaczania  $^9$ -THC i jego dwóch metabolitów: 11-OH-THC i THCCOOH we krwi przyży- ciowej i sekcyjnej metodą GC-EI-MS-MS po uprzedniej ekstrakcji materiału biologicznego do fazy stałej (SPE), zwalidowana zgodnie z wymogami normy europejskiej ISO 17025:2005, zapewnia specyficzne i dokładne wy- niki oznaczeń kannabinoli we krwi w zakresach stężeń spotykanych w przypadkach używania produktów *Cannabis*. Metoda pozwala na redukcję matrycy biologicznej krwi, zwłaszcza sekcyjnej, obciążonej szczególnie skład- nikami wytworzonymi w procesach gnilno-autolitycz- nych. Takie rozwiązanie analityczne podnosi czułość i selektywność metody i tym samym podnosi wiarygod- ność uzyskanych wyników analizy toksykologicznej.

Podniesienie czułości i selektywności metody po- przez zastosowanie techniki MS-MS ma również istotne znaczenie w przypadku analizy krwi pobranej od uczest- ników ruchu drogowego na obecność środka podobnie działającego do alkoholu, w której analizowane związki często występują na niskim poziomie stężeń.

Metody chromatografii gazowej sprzężonej z spek- trometrią mas są stosowane w analityce kannabinoli w różnych płynach ustrojowych – krwi, osoczu, surowi- cy, ślinie czy moczu. Alternatywą GC-MS jest chromato- grafia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS), która w ostatnim czasie zyskuje na popular- ności przy analizie tej grupy związków [10].

Tandemowa spektrometria mas (MS-MS) była sto- sowana także przez innych autorów [2, 11] i została za- lecona do oznaczeń kannabinoli we krwi.

Weryfikację rekomendowanej w niniejszej pracy me- tody przeprowadzono, opracowując ekspertyzy toksyko- logiczne w dwóch przypadkach, a wyniki których za- mieszczone w tabeli IV. W pierwszym przypadku krew kierowcy pobrano po około jednej godzinie po wypadku i wykazano w niej obecność  $^9$ -THC oraz jego dwóch metabolitów na poziomie typowym dla osób palących marihuanę. Wynik analizy przemawiał za tym, że w chwili wypadku kierowca mógł być pod wpływem  $^9$ -THC, a wynik ten stał się podstawą do orzeczenia o odpowiedzialności karnej kierowcy. W drugim przy- padku  $^9$ -THC i jego dwa metabolity oznaczono we krwi osoby zmarłej na wysokim poziomie stężeń. Przyczyną śmierci było kompleksowe przedawkowanie amfetaminy oraz MDMA i MDA. Wysokie stężenia  $^9$ -THC i meta- bolitów, zwłaszcza THC-COOH, sugerować mogły pro- blem częstego nadużywania produktów *Cannabis*.

Wykrywanie kannabinoli w próbkach krwi pobranej od osób uzależnionych w różnych typach narkomanii (opiatowej, amfetaminowej, kokainowej) jest stosun- kowo częste. Wiąże się to z preferowanym profilem uzależnienia w Europie i Ameryce. Jak wynika z praktyki

toksykologicznego opiniowania sądowo-lekarskiego oraz doniesień na tym polu [6, 7], kannabinole często sta- nowią czynnik towarzyszący w przypadkach przedaw- kowania zarówno opiatów, jak i amfetaminy.