



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

**Maciej Kochanowski**

**Autoreferat**

**Praca doktorska**

***Zastosowanie techniki chromatografii gazowej  
z detekcją mas w oznaczaniu tetrahydrokannabinoli  
dla potrzeb opiniowania sądowego***

Praca wykonana w Instytucie Ekspertyz Sądowych  
im. Prof. dra Jana Sehna w Krakowie  
Zakładzie Toksykologii Sądowej  
pod kierunkiem dr hab. Marii Kały  
w ramach współpracy z Wydziałem Chemii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego

**Kraków 2014**

Toksykologia zajmuje się badaniem trucizn oraz ich wpływem na organizmy żywe. Jako nauka koncentruje się na właściwościach fizycznych i chemicznych substancji toksycznych, ich fizjologicznych i klinicznych efektach działania oraz metodach służących do ich identyfikacji i oceny ilościowej w biologicznych i nie biologicznych materiałach.

Podstawowym celem toksykologii sądowej i klinicznej jest poszukiwanie związku przyczynowego pomiędzy obecnością czynnika toksycznego w ustroju, a wywołanym przez niego określonym efektem biologicznym. Realizacja powyższego celu wymaga od toksykologa analityka doboru odpowiedniego materiału badawczego oraz odpowiednich metod analitycznych. Jednym z najważniejszych zadań leżących w sferze zainteresowania toksykologa sądowego jest analiza substancji uzależniających, których stwierdzana obecność w organizmie człowieka tworzy jeden z elementów opinii sąдово-lekarskiej. Opinia taka zaś stanowi punkt wyjścia w orzeczeniach sądowych (wypadki, przestępstwa), w diagnozach lekarskich osób w celu powiązania choroby z przyjmowaniem substancji psychoaktywnych (potocznie narkotyków) oraz z kontrolą koniecznej abstynencji w leczeniu uzależnień. W opiniach sąдово-lekarskich dotyczących zgonów wykrycie środków odurzających ma związek z orzeczeniem o przyczynie śmierci, mającej powiązanie z historią i sposobem zażywania narkotyków.

Ekspertyza toksykologiczna zmierzająca do identyfikacji i analizy ilościowej ksenobiotyków, jako materiał biologiczny wykorzystuje przede wszystkim płyny ustrojowe – krew i mocz w badaniu przyżyciowym, a także wycinki narządów wewnętrznych w badaniu pośmiertnym. Te materiały zyskały miano klasycznych. Obserwacja kierunków rozwoju toksykologii wskazuje na zainteresowanie także innymi rodzajami materiału biologicznego, takimi jak ślina, włosy, paznokcie, ciało szkliste oka, smółka, które określa się jako materiały alternatywne i obecnie bada się ich przydatność dla celów ekspertyzy toksykologicznej w porównaniu z materiałami klasycznymi. Analiza toksykologiczna materiałów alternatywnych poszerza zakres ekspertyzy, nadając jej charakter kompleksowy, a tym samym zwiększa możliwości opiniodawcze eksperta z zakresu toksykologii sądowej.

Przetwory konopi (marihuana i haszysz) są obecnie najpowszechniej przyjmowanymi środkami odurzającymi na całym świecie. Środki te wzbudzają zainteresowanie w każdej grupie społecznej i zawodowej, są łatwo dostępne na rynku narkotykowym, a prosty sposób ich wprowadzania do organizmu, przez palenie ręcznie sporządzonego papierosa, sprzyja powszechności stosowania. Najbardziej aktywnymi

związkami obecnymi w przetworach konopi są:  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinol (THC), kannabinol (CBN) - wykazujący 10 % aktywności THC, kannabidiol (CBD) – nieposiadający własnej aktywności, ale modulujący działanie THC i CBN. Metabolizm THC polega na hydroksylacji do także aktywnego 11-hydroksy- $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu (11-OH-THC), a następnie oksydacji do kwasu 11-nor-9-karboksy- $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu (THCCOOH). Druga droga to podwójna hydroksylacja prowadząca do powstania 8,11-di-hydroksy- $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu (8,11-di-OH-THC). Zarówno THCCOOH jak i 8,11-di-OH-THC są związkami nieaktywnymi biologicznie i zostają wydalone w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym.

Ze względu na oddziaływanie naturalnych składników produktów konopi na ośrodkowy układ nerwowy (OUN), są one objęte kontrolą prawną, jako środki odurzające (produkty) i substancje psychotropowe (składnik psychoaktywny), zgodnie z ustawą z dnia 24 kwietnia 1997 r. o przeciwdziałaniu narkomanii, z późn. zm. oraz jako środki podobnie działające do alkoholu według ustawy z dnia 20 czerwca 1997 r. – Prawo o ruchu drogowym, z późn. zm., kodeksu karnego, kodeksu wykroczeń i rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia czerwca 2003 r. z późn. zm. Penalizowane jest zatem posiadanie i sprzedaż przetworów konopi, prowadzenie samochodu po ich użyciu, a także dopuszcza się zaostrzenie kary za spowodowanie wypadku pod wpływem THC. Ponadto coraz częściej zachodzi konieczność testowania pracowników (lekarze, piloci), określanych jako grupy szczególnego ryzyka, na obecność środków odurzających, co jest powszechnie prowadzone w krajach Europy Zachodniej i Stanach Zjednoczonych.

Składniki czynne przetworów konopi wywołują różnorodne pozytywne albo negatywne odczucia. Niektóre z nich to ogólne zmniejszenie chęci do działania, niezdolność do pokonywania konfliktów, zamknięcie w sobie, oszołomienie, dezorientacja, halucynacje i lęki z atakami paniki (psychozy), pasywność, apatia, zmęczenie, gonitwa myśli, zaburzenia zdolności koncentracji, uwagi i krytycznego myślenia, zaburzenia poczucia czasu oraz krótkotrwałej pamięci. Działanie THC utrzymuje się dłużej niż występuje jego mierzalne stężenie w płynach ustrojowych. Doznania odczuwane przez palacza trwają przez trudny do określenia czas.

Wszystkie opisane powyżej przesłanki narzucają konieczność rozwoju metod analitycznych umożliwiających oznaczenie środków odurzających w materiale biologicznym zabezpieczonym od osób wykonujących odpowiedzialne czynności, a podejrzanych o przyjęcie lub będących po przyjęciu środków modulujących ich zachowanie i sprawność psychomotoryczną. Zagadnienia dotyczące analityki i interpretacji wyników analizy środków uzależniających są obszernie dyskutowane w piśmiennictwie międzynarodowym, ale badacze stale dążą do uzyskania coraz większej precyzji oznaczeń i coraz pewniejszej interpretacji wyników. Mimo, że nowoczesne techniki analityczne stwarzają ogromne możliwości badawcze to stosowane nieumiejętnie mogą być zawodne. Dlatego też wszelkie badania mające na celu rozwój metod analitycznych stosowanych w ekspertyzie toksykologicznej mają ciągle charakter szczególny.

Autor uznał, że polskie opracowania z tej dziedziny w niewystarczającym stopniu odnoszą się do problemów metodyki badania składników czynnych konopi. W większości są to artykuły dotyczące analizy tych związków w materiale nie biologicznym lub tłumaczenia z piśmiennictwa anglojęzycznego.

Motywy podjęcia pracy stała się potrzeba całościowego ujęcia zagadnienia w celu optymalizacji stosowanych metod.

Podejmując problem analityki substancji psychotropowych ograniczono się do trzech związków – macierzystego THC i jego dwóch metabolitów - aktywnego 11-OH-THC oraz nieaktywnego THCCOOH.

Głównym celem podjętych badań było opracowanie metody oznaczania tych związków. Do wykrywania, identyfikacji i oznaczania tych związków opracowano, zmodyfikowano, scharakteryzowano i zwalidowano metodę GC-MS-NCI wykorzystując techniki łączone - przygotowanie próbki w układzie pośrednim (off-line), z końcową techniką oznaczania.

Ponadto opracowaną metodę zweryfikowano badając jej zgodność ze standardami obowiązującymi w międzynarodowej kontroli jakości badań.

Charakterystykę metody przedstawiono w powiązaniu z jej zastosowaniem do rozwiązania konkretnych problemów analitycznych odnosząc je do czterech rodzajów płynów ustrojowych: klasycznych – krwi, surowicy i moczu oraz alternatywnych – śliny.

Zdaniem autora takie kompleksowe podejście realizuje główny cel niniejszej pracy jakim jest dostarczenie toksykologowi analitykowi właściwego narzędzia do oceny:

- trwałości biologicznie czynnych składników w płynach ustrojowych podczas przechowywania,
- stężeń substancji psychotropowych we krwi i moczu pobranych od kierowców,
- stężeń substancji psychoaktywnych we krwi, moczu i ślinie pobranych od pacjentów,
- przydatności śliny do badania kierowców na obecność THC,
- urządzeń używanych do testowania kierowców na obecność tetrahydrokannabinoli.

Skuteczność zaproponowanej metody w rozwiązywaniu wymienionych problemów analitycznych została przedstawiona na obszernym materiale dowodowym i eksperymentalnym. W pracy został też uwzględniony bardzo ważny aspekt prawny zagadnienia, związany z realizowaniem przepisów ustawy – Prawo o ruchu drogowym.

Metodę zastosowano do oznaczania wymienionych wyżej związków w czterech płynach ustrojowych (krew, surowica, mocz, ślina) pobranych od kierowców, pacjentów szpitala, poradni leczenia uzależnień oraz innych osób przyjmujących te środki. Pozwoliło to na ocenę przydatności konkretnego materiału do badań oraz diagnostyki uzależnień. Ustalenie rodzaju związków występujących w ślinie, krwi i moczu przyczyniło się do właściwej interpretacji wyników badań tych materiałów metodami immunochemicznymi, które pozwalają na wykrywanie całej grupy kannabinoli, a nie konkretnego związku. Jest to szczególnie istotne przy badaniu kierowców w miejscu powzięcia podejrzenia, że prowadzi samochód pod wpływem środka psychoaktywnego. Jednym z możliwych w tej sytuacji materiałów do pobrania jest ślina, a większość przeciwciał stosowanych w analizatorach śliny jest bardziej czuła dla THCCOOH niż dla THC. Przydatność materiału do badań wykazano przez oznaczenie objętych badaniami związków w różnych materiałach pobranych równocześnie. Wyznaczenie stężeń THC i 11-OH-THC w równocześnie pobranych próbach śliny, krwi i/lub moczu w trzech odstępach czasu (0, 4, 12 lub 24 h) może posłużyć do określenia, czy pochodzą one od ostatniego przyjęcia środka odurzającego jakim są przetwory konopi, czy też pozostają w tych materiałach w związku z jego częstym przyjmowaniem, a nawet może stanowić próbę oszacowania przedziału czasu w jakim nastąpiło ostatnie przyjęcie przetworu konopi.

Ze względu na złożoność matryc biologicznych oraz niskie stężenia tetrahydrokannabinoli w tych materiałach metodami z wyboru do ich wykrywania,

identyfikacji i oznaczania są techniki chromatografii gazowej sprzężone ze spektrometrią mas, a przygotowanie próbki następuje przez wieloetapowe oczyszczanie i zateżanie z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE) oraz przekształcanie w pochodne analitów obecnych w próbkach (derywatyzację). Badania prowadzone były z wykorzystaniem chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas z ujemną jonizacją chemiczną (GC-MS-NCI). Przedstawioną w niniejszej pracy metodę rozwijano korzystając z własnych doświadczeń z wcześniej opracowaną i opublikowaną metodą oznaczania THC we krwi z wykorzystaniem GC-MS.

Opracowanie metody rozpoczęto od optymalizacji procesu konwersji chemicznej analitów (derywatyzacji), który jest jednym z ważniejszych etapów procesu przygotowania próby do analizy szczególnie z wykorzystaniem techniki GC-MS. Modyfikacja analitów, czyli przeprowadzanie ich w różne pochodne, zapewnia ich lepszy rozdział chromatograficzny, zróżnicowanie widm masowych, podwyższenie sygnału analitycznego, co prowadzi do obniżenia LOD i LOQ, oraz niejednokrotnie termiczną trwałość analizowanych związków. Najbardziej zadawalająca okazała się procedura przeprowadzenia analitów w lotne pochodne fluorowe węglowodorów. Zastosowanie jednej mieszaniny derywatyzującej dla trzech objętych badaniami związków nie spełniło oczekiwań. Reakcja derywatywacji z fluorowymi pochodnymi kwasów organicznych i bezwodników kwasowych wymaga całkowicie bezwodnego środowiska. W przeciwnym wypadku następuje szereg reakcji konkurencyjnych i tworzenie pochodnych nie zachodzi. Wykorzystano DMF, który ma zdolności do wiązania wilgoci w środowisku reakcji. Nie wykazano jednak przydatności zastosowania tego związku w tym etapie procedury. W badaniach wstępnych stosowano bromek pentafluorobenzylowy w połączeniu z aminą diizopropylodetyloaminą. Taka mieszanina wykorzystywana przez niektórych badaczy nie wymagała stosowania zamkniętych naczyń i wysokiej temperatury. Niestety przeprowadzenie derywatywacji według opublikowanej procedury nie przyniosło spodziewanych rezultatów w postaci zadawalającej intensywności pików pochodzących od pochodnych tetrahydrokannabinoli. Anality - THC, 11-OH-THC i THCCOOH – były przeprowadzane w pochodne za pomocą bezwodnika kwasu trifluorooctowego (TFAA), chloroformu oraz TFAA i pentafluoropropanolu.

Zastosowano metodę SPE, pozwalającą uzyskać wyższą wydajność izolacji analitów z matrycy biologicznej. Rozszerzono zakres stosowalności o izolację 11-OH-THC. Do ekstrakcji analitów wykorzystany był aparat próżniowy do SPE firmy J.T.

Baker i kolumnienki Strata-E C<sub>18</sub> firmy Phenomenex o objętości 3 ml oraz ilości złoża 200 mg. Są to kolumnienki uniwersalne, na których można prowadzić ekstrakcję z szerokiego zakresu pH. Optymalizację izolacji prowadzono w celu opracowania jednej metody ekstrakcji trzech analitów z wszystkich objętych badaniami materiałów biologicznych. Przeprowadzono optymalizację rodzaju i składu eluentów służących do oczyszczania złoża kolumnienki z zanieczyszczeń, a także zbadano wpływ modyfikatorów kwasowo-zasadowych na elucję analitów ze złoża. Do oczyszczania złoża stosowano mieszaniny odczynników o różnej polarności, tj. roztwór etanolu we wodzie, kwas octowy, wodę, wodorowęglan sodu i aceton. Do desorpcji analitów sprawdzono przydatność mieszanin heksanu, octanu etylu z wodnym roztworem amoniaku lub TEA dla frakcji zawierającej THC i 11-OH-THC oraz mieszanin heksanu z octanem etylu i kwasem octowym lub mrówkowym dla frakcji zawierającej THCCOOH. Z eksperymentu wynika, że optymalnym eluentem dla THC i 11-OH-THC okazała się mieszanina heksanu z octanem etylu i TEA 7:1:0,5 (v/v/v). Piki miały największe powierzchnie i symetryczny kształt. Dla THCCOOH najlepszą mieszaniną okazał się heksan z octanem etylu i lodowatym kwasem octowym zmieszane w stosunku objętościowym 7:1:0,05. Zbadano także, jaka objętość eluentu potrzebna jest do całkowitego wymycia zaadsorbowanego analitu ze złoża. Ustalono, że optymalną objętością jest 6 ml dla frakcji zawierającej THC i 11-OH-THC oraz 4,5 ml dla frakcji zawierającej THCCOOH. Wykazano także, że kluczowym elementem dla otrzymania wysokich intensywności sygnałów dla THCCOOH jest przemycie złoża kolumnienki po elucji THC i 11-OH-THC mieszaniną heksanu z octanem etylu, co ułatwiało jego wysuszenie. Przy ustalonej temperaturze (40°C) badano wpływ warunków odparowania eluatów na łaźni wodnej - w strumieniu azotu oraz powietrza – na wydajność procesu przygotowania próbki. Ze względu na utlenianie THC oraz 11-OH-THC nie jest możliwe odparowanie ich w strumieniu powietrza. W przypadku THCCOOH nie zauważono różnic w odparowaniu w atmosferze powietrza i azotu.

Jednym z podstawowych kryteriów opracowywania metody było osiągnięcie jak najniższych LOD analitów, z czym wiąże się czystość ekstraktów. Z drugiej strony mnożenie etapów procedury przygotowania próbki powoduje straty analitu. Aby zbadać przydatność wszystkich etapów procedury, sprawdzono czy ominięcie niektórych z nich wpływa znacząco na końcowe wyniki. Przy konieczności skrócenia czasu analizy możliwe jest ominięcie procesu strącania białek z użyciem mieszaniny acetonitrylu z acetonem dla moczu, śliny oraz surowicy bez zmiany kształtu linii bazowej (poziomu

szumów) pochodzącej od tła. Nie zmienia się także intensywność pików pochodzących od analitów.

THCCOOH jest wydalany z organizmu w postaci sprzężonej z kwasem glukuronowym. Połączenie kwasu glukuronowego z THCCOOH następuje za pomocą wiązań typu estrowego. Wykazano, że połączenia te w czasie przechowywania próby moczu ulegają hydrolizie uwalniając wolny THCCOOH. W przedstawianych badaniach wartości stężeń wolnego THCCOOH zmieniły się z około 1 ng/ml, wyznaczonego tuż po pobraniu próby, do 14,8 ng/ml po trzech miesiącach jej przechowywania. Wyznaczenie zatem małych wartości stężeń wolnego THCCOOH w moczu nie wskazuje na niskie stężenie glukuronidu THCCOOH w tym materiale. W celu potwierdzenia tego stwierdzenia mocz poddawano hydrolizie różnymi metodami, które prowadziły do rozerwania wiązań między resztą kwasu glukuronowego a THCCOOH. Zastosowano hydrolizę enzymatyczną z użyciem glukuronidazy wyosobnionej z *E. Coli*, glukuronidazy wyosobnionej z *Helix Pomatia* oraz glukuronidazy z arylosulfatazą a także hydrolizę alkaliczną w dwóch różnych warunkach (z inkubacją w podwyższonej temperaturze i bez inkubacji). Wykazano, że w próbie moczu zawierającej 14,75 ng/ml wolnego THCCOOH po zastosowaniu optymalnej i najczęściej stosowanej hydrolizy przy użyciu glukuronidazy z arylosulfatazą całkowite jego stężenie osiągnęło wartość 120 ng/ml. Powyższe wyniki narzucają zatem toksykologowi analitykowi konieczność zdefiniowania czy wyznaczał stężenie wolnego, czy całkowitego THCCOOH. Stwierdzenie to można również uogólnić, bo odnosi się do innych związków, które występują w organizmie i wydalają się w postaci metabolitów sprzężonych z kwasem glukuronowym.

Metoda została zwalidowana. Określono główne parametry walidacyjne takie jak LOD i LOQ, LOL, precyzja i dokładność oraz selektywność (w rozumieniu wpływu głównie matrycy biologicznej, czyli czynników pochodzenia endogenego) oraz specyficzność (obejmując czynniki endogenne i egzogenne, czyli substancje najczęściej towarzyszące THC, 11-OH-THC i THCCOOH), a także trwałość analitów podczas przechowywania.

Opierając się na obliczeniach stosunku pola powierzchni sygnału do szumu wyznaczono LOD dla THC, 11-OH-THC i THCCOOH w czterech rodzajach materiału biologicznego. Wartości LOD wynosiły: dla THC 0,25 ng/ml we krwi, w surowicy, moczu i ślinie; dla 11-OH-THC 5 ng/ml we krwi i w surowicy oraz 2 i 2,5 ng/ml odpowiednio w ślinie i moczu. LOD dla THCCOOH wyznaczono na poziomie



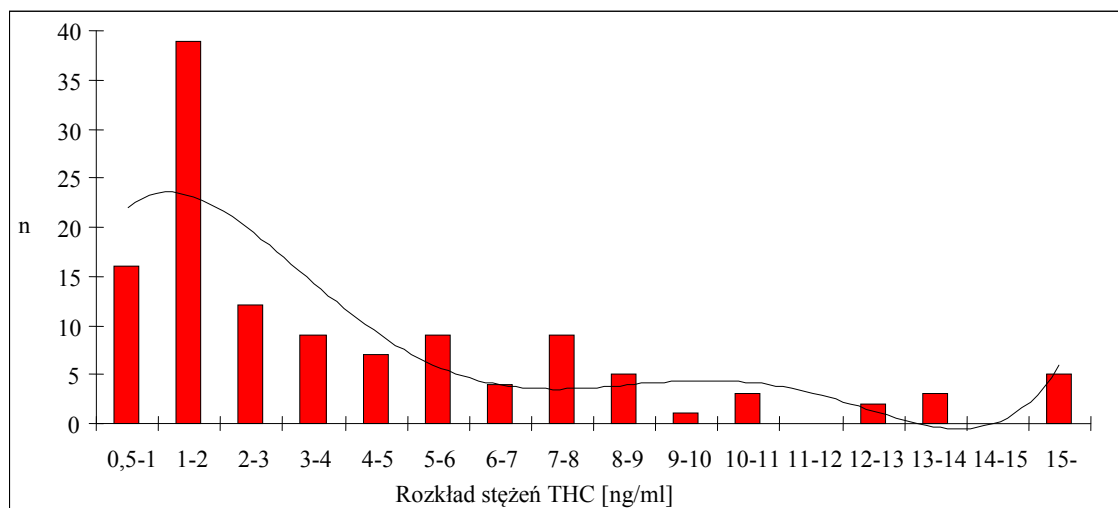
0,25 ng/ml we krwi i w moczu, 2,5 ng/ml w surowicy oraz 0,5 ng/ml w ślinie. Wartości LOQ wynosiły dla THC 0,5 ng/ml we wszystkich czterech materiałach, dla 11-OH-THC 10 ng/ml we krwi i w surowicy oraz 4 i 5 ng/ml odpowiednio dla śliny i moczu. Dla THCCOOH wartości LOQ wyznaczono na poziomie 0,5 ng/ml we krwi i w moczu, 5 ng/ml w surowicy oraz 1 ng/ml w ślinie. LOL obliczony na podstawie krzywych kalibracyjnych mieścił się w zakresie od LOQ do 20 ng/ml dla THC i 11-OH-THC w krwi, ślinie, surowicy i moczu, natomiast od LOQ do 100 ng/ml dla THCCOOH we krwi i od LOQ do 200 ng/ml w moczu. Opracowana metoda pozwala oznaczać THC we krwi do co najmniej 6 h od przyjęcia, po których jego stężenie obniża się do wartości poniżej 2 ng/ml oraz do oznaczania THCCOOH w przypadkach pojedynczego (lub okazjonalnego) oraz chronicznego przyjmowania THC. THCCOOH charakteryzuje się długim biologicznym okresem półtrwania we krwi wynoszącym około 6 dni, co powoduje, że u regularnych palaczy ulega kumulacji w organizmie. Jego stężenia powyżej 40-55 ng/ml krwi świadczą o regularnym przyjmowaniu THC, a stężenia THCCOOH poniżej tego przedziału wskazują na okazjonalne przyjmowanie przetworów konopi. Metoda okazała się zbyt mało selektywna do oznaczania 11-OH-THC, który jest aktywnym metabolitem THC, ale wartość jego stężenia jest najczęściej dwa razy mniejsza niż THC, a przy maksymalnym stężeniu THC i 11-OH-THC, czyli krótko po zakończeniu palenia, nawet 20 razy. Stężenie 11-OH-THC może wskazywać na drogę przyjęcia ponieważ większe stężenia tego związku występują w organizmie po doustnej konsumpcji przetworów konopi.

Potwierdzono dokładności i precyzję metody. Dokładność wyznaczono na podstawie analizy materiałów certyfikowanych oraz materiałów kontrolnych, do których dodawano znane stężenia wzorców substancji objętych badaniami. Wynosiła ona powyżej 95% dla THC i zawierała się w granicach od 94,6 do 119,3% dla THCCOOH. Nie wyznaczano dokładności dla 11-OH-THC. Precyzja wyznaczana na różnych poziomach stężeń nie przekraczała 3,4% dla THC we krwi oraz 5,2% w surowicy, natomiast dla THCCOOH mieściła się poniżej 2,7% dla wszystkich badanych materiałów biologicznych.

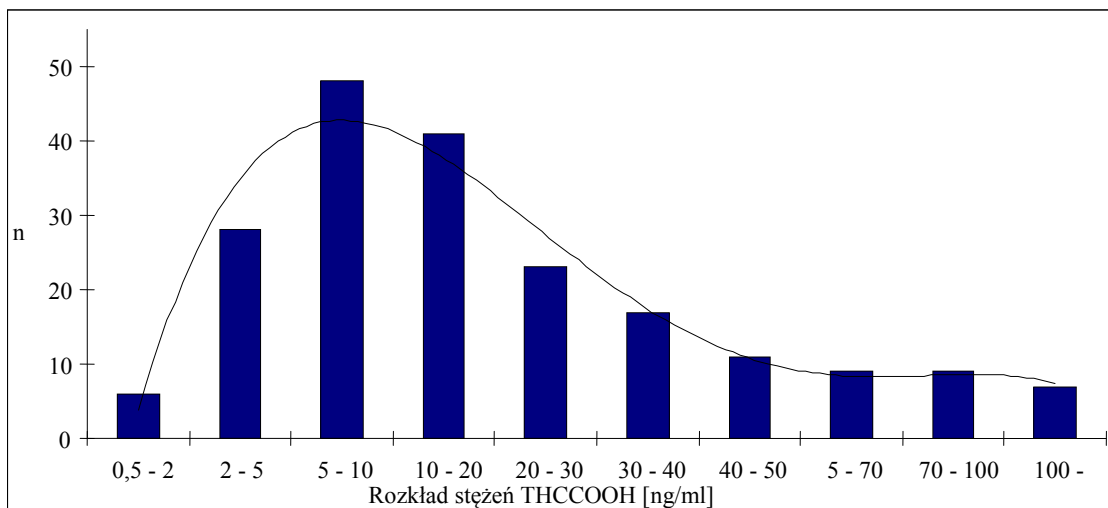
Selektywność i specyficzność została potwierdzona przez analizę prób krwi, surowicy, śliny i moczu wolnych od objętych badaniami związków, czyli materiałów kontrolnych pochodzących od co najmniej pięciu osób. Dalej przez analizę materiałów referencyjnych Medidrug, zawierających obok THC i THCCOOH inne związki (amfetamina, MDMA, MDE, benzoiloeogonina, morfina, kodeina) objęte kontrolą

prawną oraz przez analizę prób krwi kontrolnej, do której dodano mieszaninę 17 środków psychoaktywnych i leków (amfetamina, metamfetamina, metylenodioksymetamfetamina (MDMA), kokaina, kodeina, kokaetylen, benzoilokogonina, morfina, metadon, tramadol, diazepam, nordiazepam, ketamina, kwas  $\gamma$ -hydroksymasłowy (GHB), promazyna, doksepina i difenhydramina), które są najczęściej przyjmowane łącznie z THC, a tym samym współwystępują z THC i THCCOOH w organizmie. Nie stwierdzono interferencji matrycy płynów ustrojowych oraz wyżej wymienionych 17 związków na wyniki oznaczania THC i THCCOOH, a zatem wykazano specyficzność metody.

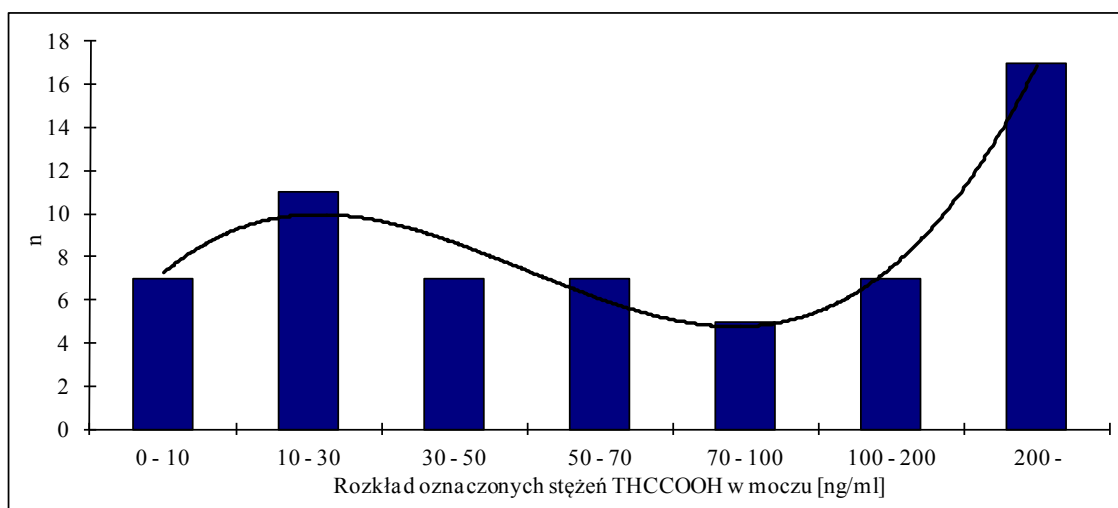
Opracowaną metodę zastosowano do analizy 199 prób krwi i 78 prób moczu pobranych od kierowców. W 75 próbach krwi nie oznaczono THC w stężeniu powyżej LOQ, natomiast we wszystkich próbach wykazano obecność THCCOOH. Wszystkie próby, w których stężenie THC wynosiło powyżej 2 ng/ml, zakwalifikowano jako dodatnie, zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 roku. Oznacza to, że osoba w czasie pobrania materiału miała w organizmie psychoaktywny THC, czyli była pod jego działaniem. Wyniki te zostały wykorzystane do opracowania opinii w sprawach dotyczących prowadzenia samochodu po użyciu środków podobnie działających do alkoholu, czyli wykazania łamania przepisów ustawy – Prawo o ruchu drogowym na potrzeby postępowania sądowego.



Ryc. 1. Rozkład stężeń THC wyznaczonych w próbach krwi pobranych od kierowców (n = 124).



Ryc. 2. Rozkład stężeń THCCOOH wyznaczonych w próbach krwi pobranych od kierowców (n = 199).



Ryc. 3. Rozkład stężeń THCCOOH oznaczonych w próbach moczu pobranych od kierowców (n = 78).

Wyznaczona wartość LOQ na poziomie 0,5 ng/ml dla THC we krwi w opracowanej metodzie pozwala na raportowanie wyniku jako dodatni od co najmniej 1 ng/ml i wprowadzenie takiej granicy analitycznej dla metod stosowanych do oznaczania tego związku w organizmie kierowców jest obecnie postulowane. Słuszność tego postulatu potwierdza rozkład stężeń THC wyznaczonych we krwi kierowców. U co trzeciego kierowcy wyznaczone stężenie THC było w granicach od 1 do 2 ng/ml.

Bardzo istotnym problemem w opiniowaniu dla celów sądowych jest ustalenie czasu ostatniego przyjęcia środka psychoaktywnego jakim jest THC, szczególnie u osób

często używających przetwory konopi. W literaturze [<sup>1,2</sup>] zaproponowano dwa modele matematyczne do szacowania czasu ostatniego przyjęcia THC. W modelu 1 jako główny wskaźnik przyjęto stężenie THC w osoczu, a w modelu 2 stosunek stężeń THCCOOH/THC w tym materiale. Na podstawie szczegółowo zaplanowanego eksperymentu (kontrolowane palenie jednego lub dwóch papierosów marihuany o znanej zawartości THC (2,64% wagowych), standaryzowane: liczba zaciągnięć, przedziały czasu pomiędzy nimi, okres palenia oraz znany czas jaki upłynął od wypalenia do pobrania materiału, a także wyznaczone stężenie THC i THCCOOH w osoczu wykazano, że model 1 był bardziej przydatny do predykcji czasu jaki upłynął od ostatniego palenia marihuany przez okazjonalnie i często palących, ale okazał się mało dokładny u osób doustnie przyjmujących kannabinole. Szacowanie czasu ostatniego przyjęcia kannabinoli, obliczonego przy zastosowaniu modelu 2 i porównanego ze znanym rzeczywistym czasem jaki upłynął od palenia do pobrania materiału, było bardziej zadawalające dla rzadko palących i konsumentów drogą doustną, a mniej dla chronicznych palaczy. Najbardziej dokładne szacowanie czasu uzyskano z kombinacji obu modeli. Dla 717 próbek osocza obliczony czas ostatniego przyjęcia był w 99% zgodny z rzeczywistym przy założonym 95% przedziale ufności. 0,9% obliczonych czasów było przeszacowane, a nie otrzymano wartości niedoszacowanych. W przedstawianych badaniach zastosowano wymienione modele do oszacowania nieznanego czasu przyjęcia kannabinoli przez kierowców, w których krwi wyznaczono stężenia THC i THCCOOH. Jako kryterium predykcji czasu przyjęto zgodność wartości uzyskanych z obu modeli matematycznych. Wykazano zgodność tylko w 12 ze 124, czyli w 10%, przypadków. Obliczone czasy, według obu modeli, zawierały się w granicach od 1h do około 6h (5,78h), przy czym odchylenia standardowe i procentowe współczynniki zmienności były bardzo małe, bo zmieniały się w zakresie odpowiednio: SD - 0 – 0,23 ng/ml i CV - 0 – 4,0%. W czterech przypadkach obliczony czas ostatniego przyjęcia kannabinoli przekraczał 4 h (4,10 – 5,78h), czyli był dłuższy niż przy opracowywaniu modeli matematycznych (4 h). Należy dodać, że u 12 kierowców, u których zdołano wyznaczyć czas ostatniego przyjęcia kannabinoli stężenia THC zmieniały się w granicach od 0,75 do 8,03 ng/ml, a stężenia THCCOOH

---

<sup>1</sup> Huestis M., Barnes A., Smith L., Estimating the time of last cannabis use from plasma  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol concentrations, *Clin. Chem.*, 2005, 51: 2289-2295,

<sup>2</sup> Huestis M.A., Henningfield J.E., Cone E.J.: Blood cannabinoids. II. Models for prediction of time of marijuana exposure from plasma concentrations of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and 1-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THCCOOH), *J. Anal. Toxicol.*, 1992, 16: 283-290

od 18,71 do 32,53 ng/ml. Wyznaczonym krótkim czasem ostatniego przyjęcia kannabinoli (1,11 – 1,88h) towarzyszyły wyższe stężenia THC (3,77 – 8,03 ng/ml) we krwi kierowców. Stężenia THCCOOH (18,71 – 32,53 ng/ml) wyznaczone u tych 12 kierowców wskazują raczej na okazjonalne przyjmowanie przetworów konopi, bo nie przekraczają granicy 40 – 55 ng/ml. Wyższe stężenia THCCOOH (43,77 – 365,5 ng/ml) wyznaczono u 26 (21%) ze 124 kierowców, u których we krwi wykazano obecność zarówno THC jak i THCCOOH. Tę grupę kierowców należałoby zaliczyć do często używających przetwory konopi. Mała liczebność zgodnych wyników nie daje podstaw do rekomendacji wprowadzenia do praktyki eksperckiej szacowania czasu ostatniego przyjęcia kannabinoli wg opublikowanych modeli matematycznych.

Należy nadmienić, na co długo nie zwracano należytej uwagi, że stężenie THC w surowicy (i osoczu) jest większe niż we krwi. Stosunek stężeń THC krew/surowica najczęściej przyjmuje wartość 0,55. Ponieważ podczas przechowywania tego płynu ustrojowego, również w niskiej temperaturze, krwinki czerwone ulegają hemolizie, to po pewnym czasie nie jest możliwe oddzielenie czystej surowicy. Według ogólnościowych rekomendacji właściwym materiałem do badań dla celów sądowych jest krew a nie surowica, co od dawna znajduje odzwierciedlenie w polskich przepisach prawnych, np. rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 2003 r.

W 78 próbach moczu wyznaczone stężenia THCCOOH były w przedziale od 0,7 do 204,1 ng/ml. W żadnej z tych prób nie stwierdzono obecności THC. Nie przeprowadzono hydrolizy moczu zatem wyniki dotyczą stężenia wolnego THCCOOH, a nie całkowitego. W obecnym stanie wiedzy interpretacja wyniku analizy moczu na obecność tetrahydrokannabinoli dla celów sądowych jest bardzo ograniczona. THC wydala się z moczem w postaci THCCOOH, który jest nieaktywny. Ogólnie przyjmuje się, że wykazanie THCCOOH w moczu wskazuje na wprowadzenie do organizmu THC w bliżej nieokreślonym czasie poprzedzającym pobranie próby do badań. Ani obecność tego związku w moczu, ani wartość jego stężenia nie daje podstaw do wnioskowania o przyjętej dawce, czasie konsumpcji a także o oddziaływaniu przyjętego THC na organizm.

Wielu badaczy podejmowało próby wykazania większej przydatności wyników analizy moczu dla celów sądowych. W próbach moczu sporadycznie i chronicznie przyjmujących nie wykazano dotychczas wolnego THC i 11-OH-THC, tak jak w dyskutowanej pracy. Z dostępnego piśmiennictwa wiadomo, że jedynie Manno i wsp.

[<sup>3</sup>] konkludował, iż stężenie THC w moczu powyżej 1,5 ng/ml może sugerować przyjęcie przetworów konopi do 8 h poprzedzających pobranie materiału do badań, a stężenie 11-OH-THC obniża się bardzo szybko. Końcowy jednak wniosek z wyżej cytowanych badań był zgodny z ogólnie przyjętym. W innych badaniach wykazano, że w pierwszych 8 h od jednorazowego wypalenia produktów konopi sprzężony THCCOOH nie występował w moczu, podczas gdy u chronicznych konsumentów glukuronid THCCOOH był obecny. Dlatego też okres wykrywania THCCOOH w moczu zależy nie tylko od przyjętej dawki, ale i częstości przyjmowania THC oraz od zdolności zastosowanej metody do jego oznaczania. W przeciągu 4-6 dni stężenie THCCOOH, zarówno wolnego jak i sprzężonego z kwasem glukuronowym, w próbach moczu chronicznie przyjmujących obniża się do wartości wykrywanych u sporadycznych konsumentów. Opracowaną metodą można oznaczać (LOQ - 0,5 ng/ml) ten związek w moczu. Stężenia THCCOOH poniżej 5 ng/ml we krwi, a tym bardziej w moczu powinny być interpretowane z dużą ostrożnością ponieważ są uznawane za niskie, szczególnie jeżeli dotyczą ustalania obecności środków podobnie działających do alkoholu w organizmie kierowcy.

Powyższe stwierdzenie nie dotyczy przypadków, w których konieczne jest monitorowanie abstynencji. Regularna analiza próbek moczu jest główną metodą kontroli pacjentów objętych programami detoksykacyjnymi, terapią substytucyjną i odwykową. Jeżeli okres między kolejnymi kontrolnymi badaniami jest dłuższy niż 2-3 dni to stężenie THCCOOH może obniżyć się do bardzo małych wartości. Fakt ten jest wykorzystywany przez pacjentów wyżej wymienionych programów i często dochodzi do stałego, lecz dobrze zaplanowanego używania narkotyków. Ponadto, fałszowanie próbek moczu przez dawcę jest w tych przypadkach dużym i często spotykanym problemem. Dlatego wiele czynników wpływa na stężenie i okres wykrywania metabolitu THC w moczu. Czynnikiemami tymi są: rodzaj metody zastosowanej do analizy materiału, wymieniona powyżej częstość przyjmowania przetworów konopi, czas jaki upłynął od przyjęcia do pobrania materiału do badań, budowa ciała, rozcieńczenie i/lub zafałszowanie próby moczu przez dawcę. W odróżnieniu od metod immunochemicznych opracowana metoda, ze względu na swoją specyficzność, eliminuje problem fałszowania próby moczu przez związki egzogenne. Uzyskany

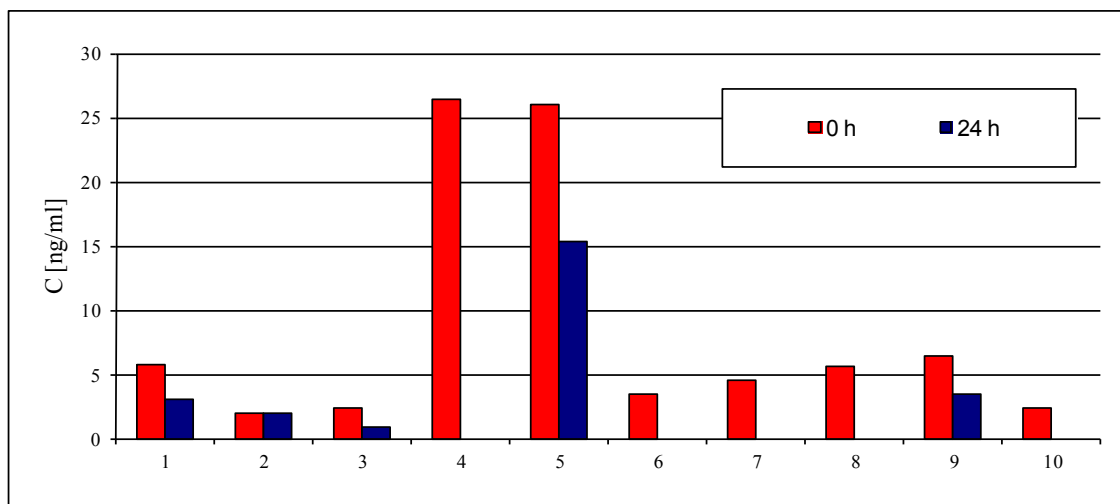
---

<sup>3</sup> Manno J., Manno B., Kemp P., Alford D., Abukhalaf I., Mc Williams E., Hagaman F., Fitzgerald M., Temporal indication of marijuana use can be estimated from plasma and urine concentrations of delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, *J. Anal. Toxicol.*, 2001, 25: 538-549

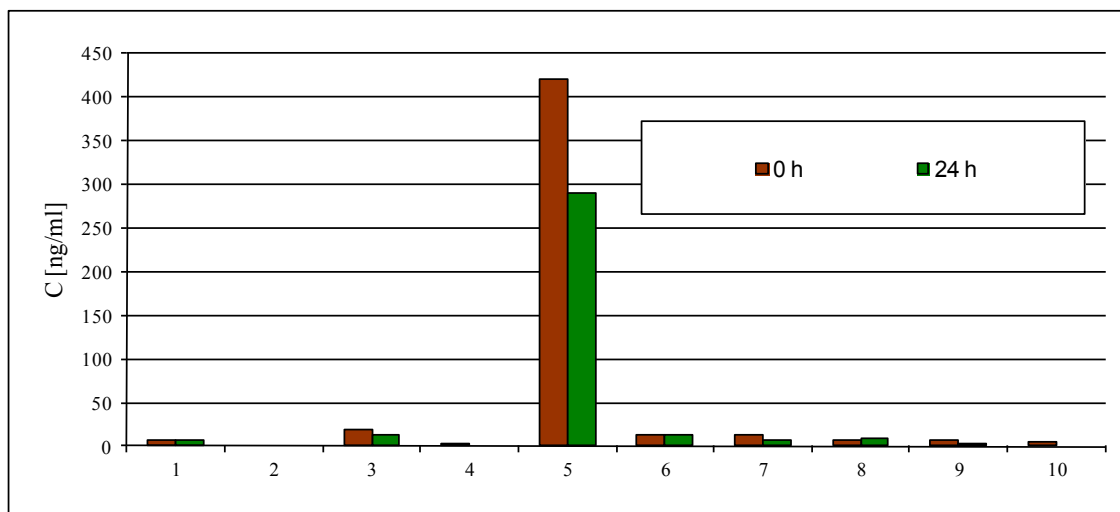
wynik nie daje jednak podstaw do wykluczenia możliwości rozcieńczenia próby moczu. Rozcieńczenie próby moczu rozpoznawane jest przez wyznaczenie stężenia kreatyniny w tym materiale i odniesienie uzyskanej wartości do jej zakresu stężeń normatywnych. Co więcej, Huestis i Cone wykazali w 1998 roku, co do dnia dzisiejszego jest jednym z kryteriów rozróżniania ostatniego przyjęcia przetworów konopi od wydalania pozostałości metabolitów z poprzednich przyjęć, że jeżeli stosunek stężenia THCCOOH do stężenia kreatyniny jest większy o 50% od znormalizowanej wartości 0,5 w próbce moczu pobranej w odstępie 24 godzinnym, to wskazuje na nowe przyjęcie przetworów konopi. Wyznaczanie stężenia kreatyniny w moczu jest praktykowane w przypadkach klinicznych, natomiast nie jest wykonywane w laboratoriach toksykologii sądowej z wielu powodów, których dyskusja wykracza poza zakres niniejszych badań.

Złożonym problemem dla toksykologa sądowego jest ustalenie jak długo przyjęty THC i jego metabolity mogą być wykrywane w płynach ustrojowych. Ramy czasowe pomiędzy przyjęciem środka a pobraniem materiału do badań mają istotne znaczenie w ekspertyzie toksykologicznej zmierzającej do wykluczenia lub potwierdzenia możliwości ekspozycji organizmu na ksenobiotyk oraz w celowości podjęcia badań toksykologicznych. W celu ustalenia jak długo tetrahydrokannabinole można wykryć w płynach ustrojowych oznaczano THC i THCCOOH w tych materiałach pobranych od pacjentów hospitalizowanych w Klinice Toksykologii CM UJ w Krakowie. Na wszystkie badania dotyczące pacjentów uzyskano zgodę Komisji Etyki Collegium Medium Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zaplanowana liczebność w każdej grupie pacjentów była większa, ale rzadko dochodziło do hospitalizacji osoby, która przyjęła jedynie przetwory konopi, a ponadto wyraziła zgodę na udział w badaniu.

W pierwszym eksperymencie oznaczano THC i THCCOOH u 10 osób przyjętych do Kliniki Toksykologii w chwili przyjęcia na oddział oraz po 24 h hospitalizacji w próbach krwi i śliny pobranych równocześnie. U wszystkich 10 pacjentów w chwili przyjęcia na oddział wykryto we krwi THC i THCCOOH w stężeniach powyżej LOQ, co wskazuje, że przyjęli środki odurzające w postaci przetworów konopi. Dla żadnego z tych pacjentów nie zdołano ustalić podczas wywiadu lekarskiego czasu i częstości używania przetworów konopi. Wyznaczone stężenia THCCOOH we krwi tych osób były niskie, co może wskazywać na nieodległe przyjęcie lub sporadyczne przyjmowanie przetworów konopi.



Ryc. 4. Zmiany stężenia THC w krwi 10 pacjentów Kliniki w chwili przyjęcia oraz po upływie 24 h.



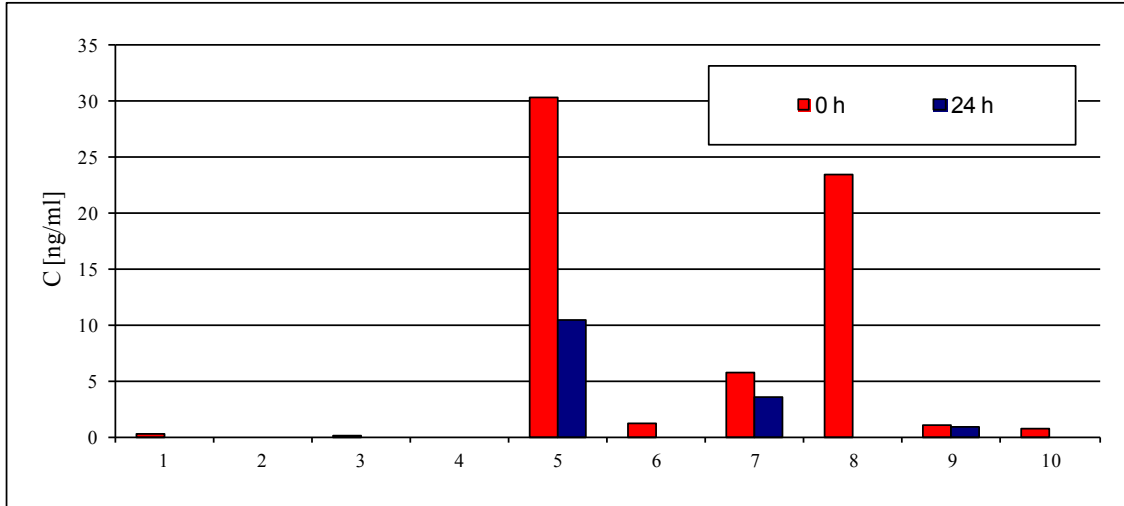
Ryc. 5. Zmiany stężenia THCCOOH w krwi pacjentów Kliniki w chwili przyjęcia oraz po upływie 24 h.

W ślinie wykryto THC u 6 pacjentów natomiast THCCOOH u 2 z nich w stężeniach nieprzekraczających 2 ng/ml. Jest to zgodne z wynikami dotychczas opublikowanymi w dostępnym piśmiennictwie. Moore i wsp. [4] wykazali obecność THCCOOH w płynie z jamy ustnej u często używających marihuanę na poziomie 50-150 pg/ml. Po 24 h hospitalizacji stężenia obu związków we krwi zmalały, czyli THC i THCCOOH uległy wydaleni. Stoi to w zgodności z ogólnie przyjętymi ustaleniami o szybkiej eliminacji THC z organizmu, która prowadzi do

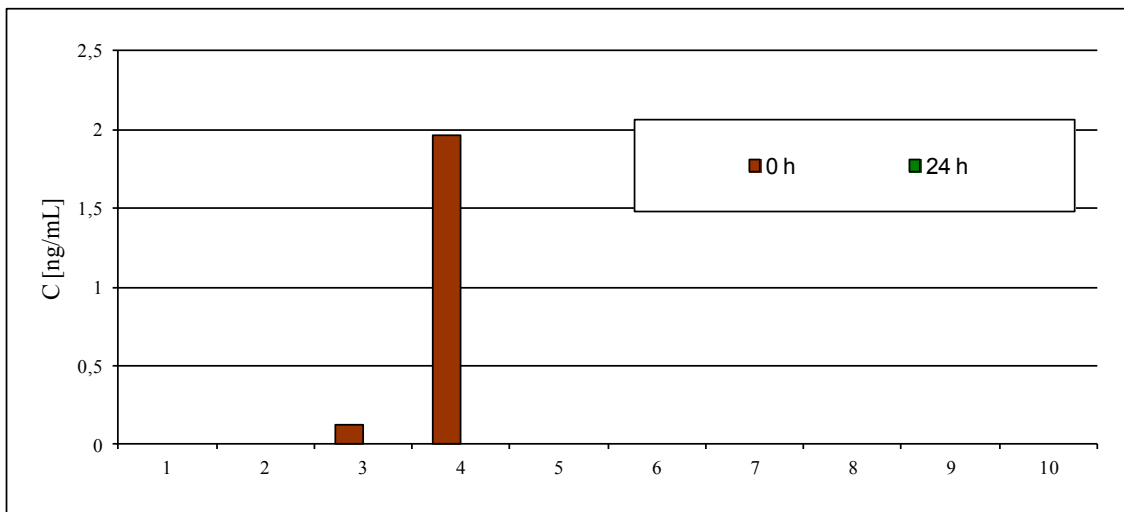
<sup>4</sup> Moore C., Coulter C., Rana S., Vincent M., Soares J., Analytical procedure for the determination marijuana metabolite 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in oral fluid specimens, J. Anal. Toxicol., 2006, vol. 30: 409-418



obniżenia jego stężenia do wartości poniżej 2 ng/ml po upływie 4-6 h od przyjęcia. U żadnego pacjenta nie oszacowano czasu przyjęcia kannabinoli przy zastosowaniu dwóch modeli matematycznych, przyjmując jako kryterium zgodność obliczonych wartości.



Ryc. 6. Zmiany stężenia THC w ślinie 10 pacjentów Kliniki w momencie przyjęcia na oddział oraz po upływie 24 h.



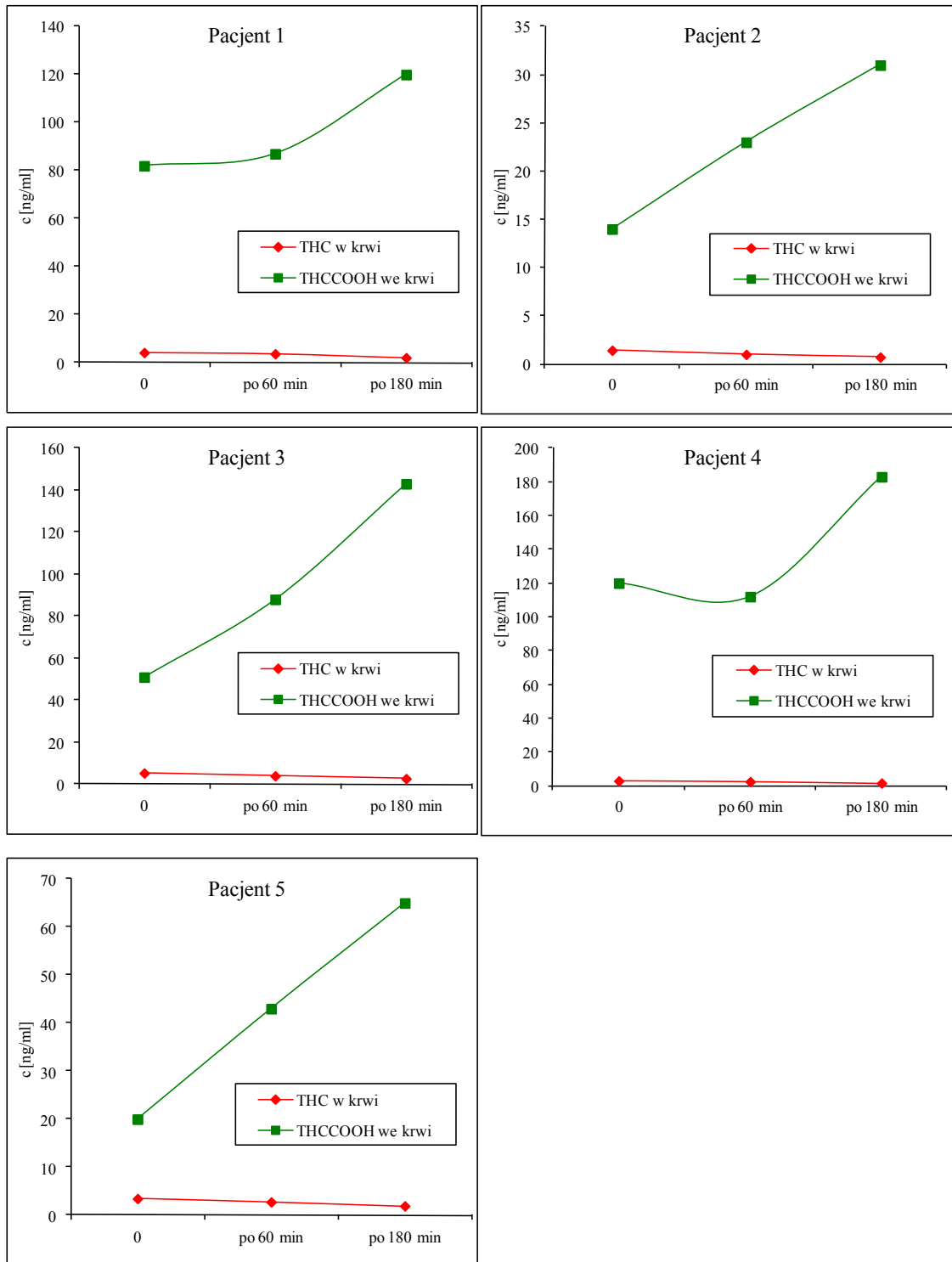
Ryc. 7. Zmiany stężenia THCCOOH w ślinie 10 pacjentów Kliniki w momencie przyjęcia na oddział oraz po upływie 24 h.

Przy zdarzeniach drogowych (wypadek, zderzenie, rutynowa kontrola kierowcy) materiał do badań jest pobierany po upływie jakiegoś czasu od zaistnienia zdarzenia. Opracowanie opinii dla celów sądowych wymaga wypowiedzenia się w jakim stanie był kierowca w chwili zdarzenia, a nie pobierania krwi do badań. Upływ czasu od zdarzenia do pobrania ma szczególne znaczenie dla THC ze względu na jego szybką dystrybucję

już w czasie palenia, krótki biologiczny okres półtrwania wynoszący 1,4 h, a co za tym idzie szybką eliminację z organizmu. Na podstawie wyznaczonych stężeń THC, w zakresie 1,43 - 5,36 ng/ml w próbach krwi 5 pacjentów Kliniki pobranych przy przyjęciu oraz po 1 i 3 h hospitalizacji stwierdzono, że stężenie THC obniżało się średnio o 18,2% jego wartości początkowej w każdej godzinie. W ciągu 3 h wyznaczone w granicach 14-120 ng/ml stężenie THCCOOH wzrastało średnio o 39% wartości początkowej. Średni spadek stężenia THC w czasie 3 h wyznaczony w tych badaniach był wolniejszy od wyznaczonego na podstawie empirycznej krzywej eliminacji THC i przybliżonej (szacowanej) eliminacji z wyznaczonym współczynnikiem 0,6561 na godzinę [<sup>5</sup>]. Zmiany stężenia THC w czasie zostały oszacowane na 35% spadek początkowego stężenia tego związku w każdej godzinie, pod warunkiem, że początkowe stężenie nie zostało wyznaczone wcześniej niż po upływie 1 h od wypalenia.

---

<sup>5</sup> Hargutt V., Krüger H-P., Knoche A., Driving under the influence of alcohol, illicit drugs and medicines. Risk estimations from different methodological approaches, EU Project DRUID, 2011, WP1.3, Deliverable 1.3.1



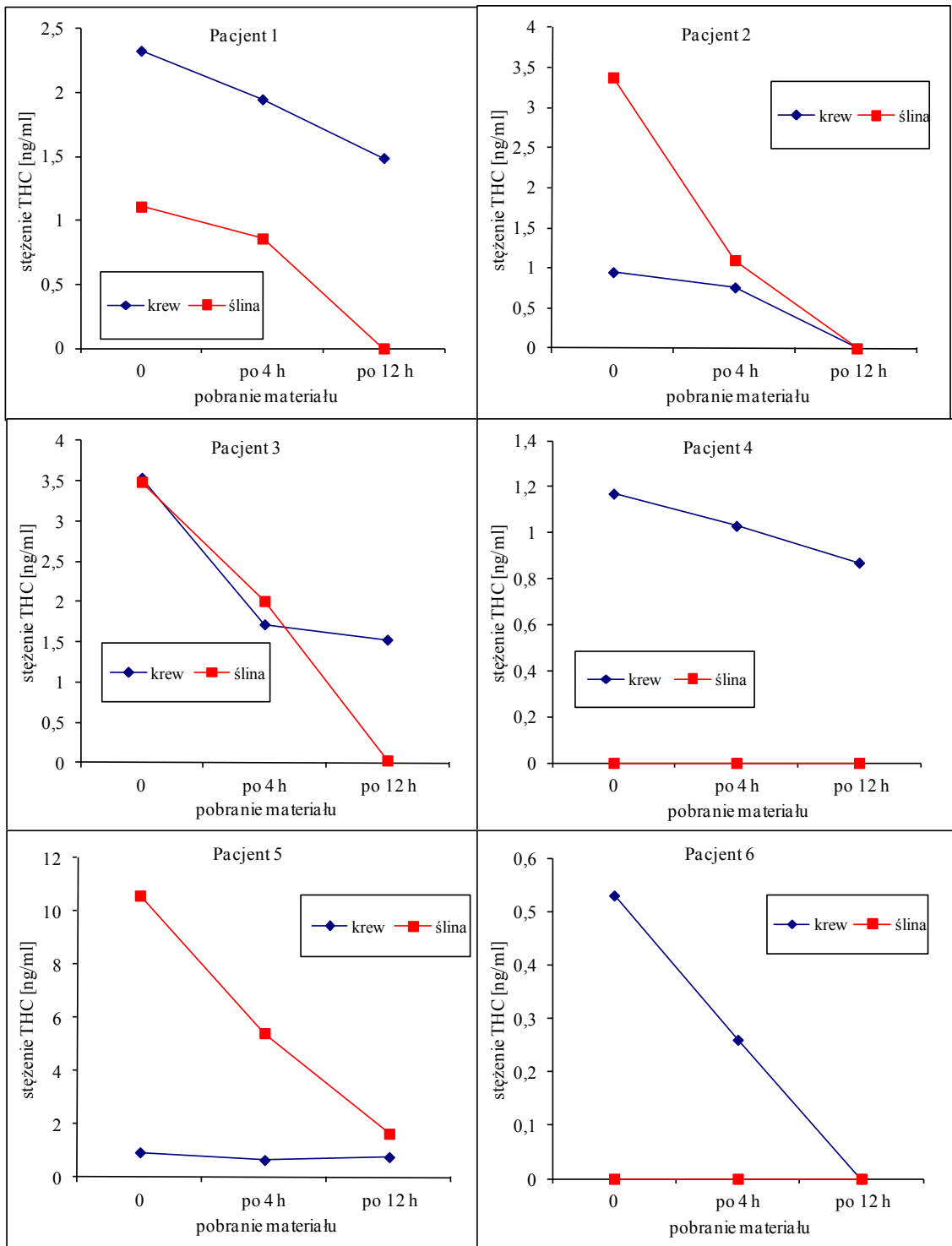
Ryc. 7. Zmiany stężenia THC oraz THCCOOH w krwi pacjentów Kliniki w chwili przyjęcia oraz po upływie 1 i 3 h.

W celu ustalenia rodzaju związków występujących w różnych materiałach oraz oceny zmian stężeń tych związków w funkcji czasu oznaczano THC, 11-OH-THC i THCCOOH w równocześnie pobranych trzech płynach ustrojowych. Próby śliny, krwi i moczu pobrano od 6 pacjentów przy przyjęciu na oddział oraz po 4 i 12 h

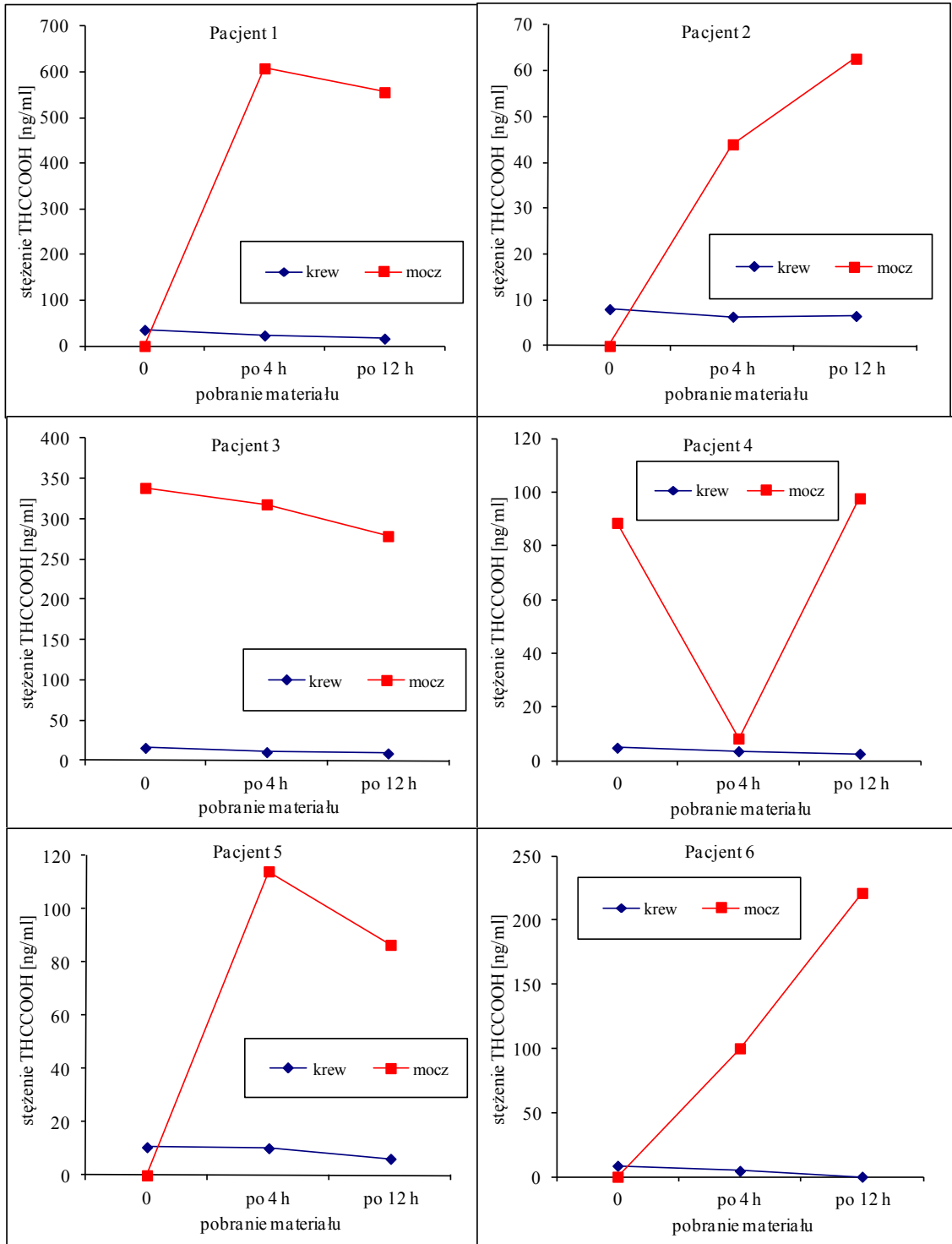
hospitalizacji. Wyznaczone stężenia tych związków były zależne od rodzaju materiału, a ich wartości nie były duże bo mieściły się w granicach od 0,53 do 3,54 ng/ml przy przyjęciu na oddział. Zmiany stężeń w czasie również przebiegały bardzo indywidualnie. U czterech pacjentów wykazano THC we krwi po 12 h. 11-OH-THC we krwi wykazano także u czterech pacjentów tylko w chwili przyjęcia na oddział, a jego stężenia były wyższe od LOD a niższe od LOQ. Dlatego raportowano tylko wynik jakościowy. Uzyskane wyniki potwierdziły brak przydatności opracowanej metody do oznaczania 11-OH-THC. W żadnej próbce śliny nie wykazano obecności 11-THC-OH i THCCOOH. Jest to zgodne z wcześniej wysuniętym stwierdzeniem, że THCCOOH występuje w ślinie w stężeniach rzędu pikogramów. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych odnośnie wykrycia 11-OH-THC w tym materiale, najprawdopodobniej związek ten nie występuje w ślinie. Wyznaczone stężenia THCCOOH w moczu przyjmowały wartości dwu i trzycyfrowe. Wszystkie próby moczu, szczególnie pobrane przy przyjęciu, były poddawane badaniom na obecność THC i dla wszystkich uzyskano wynik ujemny [6].

---

<sup>6</sup> Manno J., Manno B., Kemp P., Alford D., Abukhalaf I., Mc Williams E., Hagaman F., Fitzgerald M., Temporal indication of marijuana use can be estimated from plasma and urine concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid, J. Anal. Toxicol., 2001, 25: 538-549



Ryc. 8. Zmiany stężenia THC we krwi i ślinie pacjentów Kliniki Toksykologii.



Ryc. 9. Zmiany stężenia THCCOOH we krwi i moczu pacjentów Kliniki Toksykologii.

Podsumowując badania różnych płynów ustrojowych można stwierdzić, że krew jest najlepszym materiałem do wnioskowania o oddziaływaniu THC na organizm ludzki. Ślina spełnia kryteria materiału alternatywnego dla krwi w przypadkach konieczności przebadania dużej liczby osób w krótkim czasie. Sposób pobrania śliny jest nieinwazyjny w związku z czym można ją pobrać w każdym miejscu, a ponadto

można kontrolować cały proces pobierania tego materiału. Takie postępowanie nie jest możliwe dla moczu. Badanie śliny pozwala na szybką selekcję osób nieprzyjmujących i przyjmujących przetwory konopi. Dodatni wynik badania śliny metodami immunochemicznymi dla celów sądowych musi być potwierdzony przez analizę krwi. Przyjmuje się, że okres wykrywania THC w ślinie i we krwi jest porównywalny. Stężenia THC w ślinie mogą być wyższe z wielu powodów. Jednym z nich jest zaleganie stałych drobin suszu po wypaleniu ręcznie robionego papierosa. Ponadto ślina charakteryzuje się bardzo zróżnicowaną lepkością, dlatego wnioskowanie o stężeniu THC we krwi po wyznaczeniu jego stężenia w ślinie, korzystając ze współczynnika konwersji, czyli stosunku stężeń ślina/krew, jak to ma miejsce dla krwi i surowicy, powinno być traktowane jako wartość orientacyjna. W celu porównania stężeń THC (i innych substancji psychoaktywnych) we krwi i w ślinie lub szacowania stężenia THC w ślinie z wyznaczonego we krwi obliczono równoważniki stężeń. Według tych badań stężeniu 1 ng/ml THC we krwi odpowiada 27 ng/ml tego związku w ślinie [7].

Opracowaną metodę zastosowano także do oznaczania THCCOOH w ślinie kontrolnej stosowanej do certyfikacji czterech przenośnych urządzeń do analizy śliny na obecność środków podobnie działających do alkoholu. Do prób kontrolnych śliny dodawano THCCOOH w stężeniu 50 ng/ml oraz inne związki, których stężenia, wyrażone w ng/ml, podano w nawiasie. Były to: metylenodioksymetamfetamina (200), benzoiloeogonina (200) i estazolam (20). Mimo związków towarzyszących, wymienionych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 2003 r. z późn. zm., precyzja oznaczeń (mierzona RSD) nie przekraczała 6%.

W badaniach wykazano niestabilność THC w roztworach wzorców w czasie długotrwałego używania i przechowywania. Po roku używania i przechowywania tego samego roztworu wzorcowego THC jego stężenie zmalało o około 50%. Wskazuje to na konieczność częstej kontroli roztworów wzorców i codzienne używanie podstawowych roztworów wzorców z niewielkiej objętości.

Przeprowadzono szereg długotrwałych eksperymentów dotyczących wpływu warunków, zwłaszcza temperatury i czasu przechowywania materiału biologicznego na wyniki oznaczania THC i THCCOOH. Matryca biologiczna jest bardzo złożona, a procesy gnilno-rozkładowe mogą poważnie zaburzyć, a czasem uniemożliwić

---

<sup>7</sup> Verstraete A., Knoche A., Jantos R., Skopp G., Gjerde H., Vindenes V., Morland J., Langel K., Lillsunde P., Per se limits – methods of defining cut-off values for zero tolerance, EU Project DRUID, 2011, WP 1.4, Deliverable 1.4.2,

przeprowadzenie oznaczania, a tym samym wiarygodnej interpretacji wyników analizy toksykologicznej krwi. Dla rozpoznania tego zagadnienia wykonano ekstrakcję zgodną z opracowaną procedurą przygotowania materiału celem uzyskania tła biologicznego obecnego we krwi świeżo pobranej ze stacji krwiodawstwa oraz przechowywanej w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  przez okres od 1 miesiąca do 5 lat. Porównywano przebieg chromatogramów w celu stwierdzenia pojawiania się pików interferujących z THC i THCCOOH, co mogłoby sugerować błędnie dodatnie wyniki. Zaobserwowano wysoką zmienność tła biologicznego, która w przypadku materiału przechowywanego przez 1,5 oraz 5 lat może znacząco wpłynąć na końcowy wynik analizy. Szczególnie w ekstraktach dla THC na chromatogramach pojawiły się piki o czasach retencji bliskich temu związkowi. Wzrosła także wysokość linii bazowej, co oznacza, że ekstrakcji ulegała dużo większa liczba zanieczyszczeń, które powodowały tłumienie sygnału analitycznego.

Podobne próby przeprowadzono dla moczu. W celu przeprowadzenia badań pobrano próby moczu od 5 osób. Próby przechowywane były w zamrażarce (w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ ) przez okres 6 miesięcy. Na początku eksperymentu oraz co 2 miesiące, próby poddawano ekstrakcji i analizie pod kontrolą THCCOOH- $\text{D}_3$  (20 ng/ml), w celu określenia czasów retencji pików pochodzących od tworzącego się i wzrastającego tła. W miarę wydłużania się czasu przechowywania materiału na chromatogramach całkowitego prądu jonowego pojawiały się nowe piki, a pik od IS zmieniał swoją intensywność.

Badano również wpływ temperatury pokojowej na przechowywanie prób krwi zawierających tetrahydrokannabinole w niskich stężeniach. W trzydniowym eksperymencie polegającym na analizie próbek, do których dodano THC, 11-OH-THC oraz THCCOOH w stężeniu 1 ng/ml wykazano, że już w drugim dniu wartość sygnału dla THC i THCCOOH spadła zauważalnie. W trzecim dniu przechowywania wykrycie i oznaczenie było praktycznie niemożliwe. Badania te wskazują, że czas przechowywania materiału do badań powinien być jak najkrótszy. Niska temperatura spowalnia procesy gnilno-rozkładowe, ale ich nie eliminuje całkowicie. Materiał biologiczny po dostarczeniu do laboratorium jest przechowywany w ściśle określonych warunkach. Warunki transportu są poza wszelką kontrolą, dlatego czas przesyłania materiału biologicznego do badań powinien być skrócony do koniecznego minimum, szczególnie dla kannabinoli, które są relatywnie niestabilne. Potwierdzają to wykazane powyżej zmiany matrycy biologicznej, obniżenie się stężenia THC i THCCOOH we



krwi po dwóch dniach przechowywania oraz zmiany stężeń metabolitów sprzężonych w moczu. Na niestabilność kannabinoli podczas przechowywania zwrócili uwagę również inni badacze. Istotne obniżenie stężenia (około 22% wartości początkowej) THCCOOH wykazano w moczu przechowywanym w temperaturze pokojowej przez 10 dni. Mniejsze straty (około 8%) zaobserwowano przy przechowywaniu próbek moczu w temperaturze lodówki (+3°C) przez 4 tygodnie. Znaczące średnie – 8%, 16% i 20% - obniżanie się stężenia THCCOOH występowało również przy zamrożeniu (-20°C) próbek przez odpowiednio 40 dni, 1 rok i 3 lata. Około 5% spadek wartości stężenia początkowego przypisano zmniejszeniu się rozpuszczalności THCCOOH i procesowi absorpcji tego związku, a także THC na ściankach pojemników, w których były przechowywane materiały zawierające oba związki. W innych badaniach obniżanie się stężenia THCCOOH tłumaczono częściowo procesem jego dekarboksylacji, a także działaniu bakterii i grzybów obecnych w moczu. Zakwaszenie próbek moczu do pH 5 podwyższało stabilność kannabinoli w tym materiale. Uwalnianie się THCCOOH z połączeń z kwasem glukuronowym było bardzo zróżnicowane i nie można całkowicie zapobiec tym procesom hydrolizy. Bez względu na to próbki płynów ustrojowych do badań na obecność tetrahydrokannabinoli powinny być przechowywane w stanie zamrożenia, w temperaturze co najmniej -20°C.

Procesy absorpcji na powierzchni szkła laboratoryjnego i utleniania podczas analizy eliminuje się lub znacznie ogranicza przez używanie silanizowanych naczyń i prowadzenie procesów odparowywania ekstrahentów w strumieniu azotu.

Niniejsze badania upoważniają do sformułowania wniosków, które przedstawiono poniżej.

1. Opracowano metodę równoczesnego wykrywania i oznaczania dwóch tetrahydrokannabinoli, tj. aktywnego -  $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu (THC) i nieaktywnego - 11-nor-9-karboksy- $\Delta^9$ -tetrahydro-kannabinolu (THCCOOH) w czterech płynach ustrojowych, czyli we krwi, w moczu, surowicy i ślinie, wykorzystując najnowsze zdobycze współczesnej chemii analitycznej, tj. techniki łączone i sprzężone, czyli przygotowanie próbki przez ekstrakcję do fazy stałej (SPE) połączoną z oznaczaniem techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas w trybie ujemnej jonizacji chemicznej (GC-MS-NCI). Metoda nie jest odpowiednia do oznaczania 11-hydroksy- $\Delta^9$ -tetrahydrokannabinolu (11-OH-THC) w objętych badaniami płynach ustrojowych.

2. Integralną częścią opracowania metody jest jej optymalizacja i walidacja, a więc zgodność ze standardami obowiązującymi w międzynarodowej kontroli jakości badań, co zostało wykazane.
3. Metodę zastosowano do badań próbek krwi i moczu pobranych od kierowców dla celów sądowych, czyli do wykazania łamania przepisów ustawy - Prawo o ruchu drogowym. Metoda okazała się przydatna do wnioskowania o obniżenie progów analitycznych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 2003 roku.
4. U 10 % badanych kierowców (12 z 124) oszacowano czas ostatniego przyjęcia przetworów konopi zgodnie z opublikowanymi modelami matematycznymi. Należy zaznaczyć, że to zagadnienie pozostaje w dalszym ciągu tematem kontrowersyjnym i wymaga dalszych badań.
5. Wyznaczanie stężenia THCCOOH we krwi pozwala na wnioskowanie o częstości przyjmowania przetworów konopi, weryfikację prawdziwości wyznaczonego niskiego stężenia THC oraz wstępnie dodatniego wyniku badania krwi uzyskanego metodami immunochemicznymi.
6. Analiza prób moczu pobranych od 78 kierowców pozwoliła na wykazanie ograniczonej wartości wyniku analizy moczu na obecność tetrahydrokannabinoli dla celów sądowych.
7. W grupie pacjentów hospitalizowanych po przyjęciu przetworów konopi wykazano jakie związki występują w równocześnie pobranych próbach krwi, śliny i moczu.
8. Zmiany stężeń THC i THCCOOH w funkcji czasu w poszczególnych płynach ustrojowych charakteryzowały się dużą zmiennością osobniczą, ale nie dają podstaw do zaniechania przeprowadzenia analizy toksykologicznej na obecność tetrahydrokannabinoli nawet w czasie 24h hospitalizacji osoby podejrzanej o przyjęcie przetworów konopi.
9. U hospitalizowanych pacjentów w okresie trzygodzinnym stężenie THC obniżało się średnio o 18% wartości początkowej, a stężenie THCCOOH wzrastało średnio o 39%.
10. Przemiany jakim ulegają tetrahydrokannabinole podczas przechowywania płynów ustrojowych, interferencje poszczególnych składników i ich mieszanin z matrycą biologiczną, obecność produktów metabolizmu i rozkładu przyjętych produktów i płynów ustrojowych oraz artefakty analityczne stwarzają konieczność właściwego przechowywania próbek do badań oraz potwierdzania

wyników analizy dwiema niezależnymi metodami i/lub identyfikacji dwóch wskaźników przyjęcia przetworów konopi – macierzystego związku (THC) i jego metabolitu, nawet nieaktywnego (THCCOOH).

11. Wdrożenie opracowanej metody do rutynowej praktyki eksperckiej ułatwi interpretację wyników toksykologowi analitykowi, diagnostykę zatruc lekarzowi z zakresu toksykologii, działalność opiniodawczą lekarzowi z zakresu medycyny sądowej i orzeczniczą organowi orzekającemu w sprawach o przyjęcie przetworów konopi i prowadzenie samochodu po ich przyjęciu, a także przy kontroli abstynencji osób osadzonych i pozostających w leczeniu uzależnień.