

# Zur Kinetik des 11-Nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol-glucuronids in Serum und Urin im Menschen

Lisa Dietz, Anna Glaz-Sandberg, Hang Nguyen, Gerd Mikus, Rolf Aderjan

## Zusammenfassung

Das Glucuronid des 11-Nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinols (CTHC-Glu) ist die oft über längere Zeit im Urin ausgeschiedene Cannabis-Markersubstanz. THC-Studien können benötigte Informationen über kinetischen Kenngrößen der CTHC und deren Glucuronid nicht liefern, denn die CTHC-Dosis im Körper bleibt unbekannt. Ein Ziel dieser Studie war es, bisher unbekannte kinetische Parameter des CTHC-Glu zu untersuchen. Dazu wurden 5 mg der Vorläufer-substanz CTHC über 10 Min. in 10 Cannabinoid-freie Probanden intravenös infundiert. Serum und Urin wurden über 96 h entnommen bzw. gesammelt und bei - 20°C bis zur Analyse eingefroren. Die CTHC Konzentration wurde in Serum und Urin vor und nach Hydrolyse mittels GC/MS-SIM (drei Ionen) bestimmt. Die Bildungshalbwertszeit des Glucuronids betrug ca. 15 min. Die Elimination des Glucuronids ist an den Abbau der CTHC gekoppelt. In Serum wie im Urin war sie mit einer Funktion 1. Ordnung zu beschreiben; Halbwertszeit (HWZ) im Serum  $15,0 \pm 6,4$  h; HWZ im Urin:  $16 \pm 5$  h. Insgesamt wurden nur 3 – 11 % der CTHC als CTHC-Glu im Urin ausgeschieden. In 96 h wurden von 5 mg CTHC mehr als 97 % abgebaut [1]. Die relativ geringe renale Ausscheidung des CTHC-Glu unterlag trotz minimierter Variablen großen Schwankungen. Zwischen den individuellen Ausscheidungsraten und den Flächen unter der Kurve der Serumkonzentration (AUC) des CTHC-Glu (als Maß für dessen Bildung) war keine Beziehung festzustellen. Dies weist auf eine bevorzugte fäkale Ausscheidung oder/und weiteren oxidativen Metabolismus hin. Eine Schätzung des Anteils der injizierten Dosis der CTHC, die in ihr Glucuronid umgewandelt worden war, führte im Mittel auf ca. 69 %.

## 1. Einleitung

Das 11-Nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (CTHC) und sein Glucuronid (CTHC-Glu) bilden die Hauptmetabolite des Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC)-Stoffwechsels. THC wird über Cytochrom P450 (speziell CYP 2C9 und CYP2C19) zum 11-Hydroxy-THC und weiter zu CTHC umgewandelt [2-6]. In der zweiten Phase der Metabolisierung wird das CTHC über UGT-Enzyme, wie das Isomer 2B7 [7-9] glucuronidiert. Das CTHC-Glu ist nach THC-Konsum zudem Hauptausscheidungsprodukt im Urin. Mit Hilfe von immunologischen Schnelltests, die unter anderem auf diesen Metaboliten ansprechen, kann so nachträglich ein Cannabiskonsum nachgewiesen werden. Es wurde daher schon in mehreren Studien versucht einen eindeutigen Zusammenhang zwischen THC-Konsum bzw. THC – Konzentrationen im Blut und CTHC-Glu Konzentrationen im Urin darzustellen. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine direkte Konzentrationsbeziehung selbst nach vereinheitlichten Konsumbedingungen nicht eindeutig nachgewiesen werden kann [10-14]. Die Schwankungen in den renalen Ausschei-

dungsprofilen (Dauer und Menge) des CTHC-Glu wurden zum Teil auf Polymorphismen der CYP450 Enzyme oder der UGT Enzyme oder auch auf Unterschiede in der Bioverfügbarkeit des THC<sub>s</sub> zurückgeführt [10, 12].

Dies sind Annahmen, die in der hier gezeigten Studie auf pharmakokinetischer Ebene betrachtet werden sollen. Da das THC als „Precursor“ die Elimination des CTHC-Glu durch seine lang andauernde Eliminationshalbwertszeit maßgeblich beeinflusst, wurde in dieser Studie nur der direkte Vorläufer (CTHC) des CTHC-Glu in die Probanden infundiert. So wurden zum einen die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit des THC<sub>s</sub> ausgeschlossen und zum anderen die CYP 450 Enzyme, die einem möglichen Polymorphismus unterliegen könnten als mögliche Variable eliminiert. So konnte der Fokus auf die „reine“ Kinetik bzw. die Bildung und Elimination des CTHC-Glu gelegt werden. Die Fragestellung war dabei, ob trotz Variablen Minimierung Schwankungen in der Dauer der renalen Ausscheidung des CTHC-Glu und der ausgeschiedenen Menge des CTHC-Glu sichtbar würden.

## 2. Material

CTHC, wurde von der Firma Lipomed GmbH (Arlesheim, Schweiz) bezogen, zur intravenösen Applikation vorbereitet und von der Apotheke des Universitätsklinikums Heidelberg in eine Infusionslösung verbracht. Deuterierte und nicht-deuterierte CTHC Standardlösungen zur quantitativen Analyse wurden von Promochem (Wesel, Deutschland) geliefert. Die Standardlösungen wurden bei -20°C gelagert. CTHC-Glu Standardlösungen und CTHC -Glu - d<sub>3</sub> Standardlösungen waren nicht mehr lieferbar, sodass die CTHC-Glu Konzentration indirekt nach enzymatischer bzw. alkalischer Hydrolyse berechnet wurde. Für die enzymatische Hydrolyse des CTHC -Glu im Serum wurde  $\beta$ -Glucuronidase aus E.coli (Typ IX - A ; Bestellnr.: G 7396, Sigma, Deisenhofen) verwendet.

Zur Derivatisierung des CTHC<sub>s</sub> wurde N-O-bis-(Trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) von der Firma Sigma (Steinheim, Deutschland) verwendet. Die Infusionslösung Lipofundin wurde von der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) geliefert. Der pH-Wert in den Proben wurde mit pH-Fix 0-14 (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) bestimmt. Die Reagenzien Methanol, Essigsäure, Essigsäureethylester, n-Hexan, Kaliumhydroxid, Phosphorsäure, Kaliumhydrogenphosphat und Ammoniumacetat wurden von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und waren von höchster analytischer Reinheit.

### 3. Methoden

Die Durchführung der CTHC – Applikationsstudie (Probensammlung: 96 h) erfolgte in der Abteilung für klinische Pharmakologie und Pharmaepidemiologie des Universitätsklinikums Heidelberg. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Heidelberg genehmigte das Studienvorhaben ohne Einschränkungen oder Änderungen (L-277/2004).

Die 10 drogenfreien Versuchspersonen wurden vor der Studie über deren Ablauf und Inhalt aufgeklärt und unterschrieben eine, die Studie betreffende Einverständniserklärung. Über einen immunologischen Vortest (Protzek, Lörrach, Deutschland) wurden die Urine der Probanden vor Studienbeginn nochmals qualitativ auf Cannabinoide überprüft.

24 h vor Studienbeginn und während der gesamten Studiendauer von 96 h durften keine Medikamente, alkoholischen Getränke, Kaffee, Schwarzer Tee oder Pampelmusen-Saft eingenommen werden. Auch durfte während der gesamten Studienlaufzeit von den Probanden kein Sport getrieben werden. Während der ersten 12 h standen die Probanden unter ständiger ärztlicher Beobachtung. Die restlichen 84 Stunden mussten die Teilnehmer in Abständen von 12 bis 24 h zu den festgelegten Blutabnahme- und Urinabgabe- Zeiten die pharmakologische Station aufsuchen.

Blutproben wurden von allen 10 Probanden unmittelbar vor der Injektion (Leerprobe) und 10 min/ 15 min/ 20 min/ 25 min/ 30 min/ 40 min/ 55 min/ 70 min/ 100 min / 2 h / 3 h / 4 h / 6h / 8h / 10 h / 12 h / 24 h / 48 h / 72 h / 96 h nach Injektion aus der Vene des anderen Armes entnommen und nach Gewinnung des Serums bis zur Analyse bei – 20°C gelagert. .

Die abgegebenen Urine jedes Teilnehmers wurden zu Sammelurinproben für die Zeiträume: 0 – 6 h/ 6 – 12 h/ 12 – 24 h/ 24 – 48 h/ 48 – 72 h/ 72 – 96 h zusammengenommen. Bevor die Sammel-Proben bis zur Analyse bei – 20 °C eingefroren wurden, wurde für jeden Sammelurin das Volumen bestimmt und der pH-Wert gemessen. Sammlung des Urins wurde von den Teilnehmern in Eigenverantwortung durchgeführt.

Die Aufarbeitung der Serum und Urinproben sowie die enzymatische und alkalische Hydrolyse erfolgten nach Methoden von Mauden et al. (2000).

Die gaschromatographische massenspektrometrische (GC/MS) Analyse wurde mit einem Hewlett Packard 5890 II Gaschromatographen und einem Hewlett Packard 5972 Massenspektrometer (Agilent, Waldbronn, Germany) durchgeführt Für die chromatographische Auftrennung wurde eine Silikatsäule (CP Sil 5: 12.5 m x 0.25 mm, Filmdicke: 0.4 µm) von Chrompeck (Middleburg, Niederlande) verwendet.

Um die CTHC-Glu Konzentration indirekt bestimmen zu können wurde die CTHC Konzentration vor und nach enzymatischer bzw. alkalischer Hydrolyse in Serum und Urin analysiert.

Alle Analysen wurden mittels validierter (Valistat 1.0, Arvecon, Wall-dorf) Methoden durchgeführt. Die Quantifizierung über GC/MS erfolgte mittels einer 6-Punkt-Kalibration. Die Nachweisgrenze für CTHC im Serum lag bei 1,0 µg/L. Die Nachweisgrenze für CTHC im Urin lag bei 0,8 µg/L. Die Laborpräzision (interday) und die Wiederholbarkeit (intraday) lagen unterhalb der von Valistat 1.0 empfohlenen Grenzwerte von 15 %. Die Pharmakokinetische Auswertung wurde mit Hilfe von WinNonlin 5.0.1 Software, Modell 19 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA , USA) durchgeführt.

#### 4. Ergebnisse

Die Bildungshalbwertszeit des CTHC – Glu betrug etwa 15 min. Die  $C_{max}$  lag bei  $253,0 \pm 45,6$  µg/L. Im Mittel lag die  $AUC_{CTHC-Glu}$  im Serum bei  $2804,7 \pm 915,4$  h x µg/L. Der Variationskoeffizient der AUC ergab im Mittel 32 %. Die HWZ lag im Mittel bei  $14,9 \pm 6,4$  h (siehe Abb. 1). Sie lag damit im selben Bereich wie die HWZ des freien CTHC ( $17,6 \pm 5,2$  h) (Glaz-Sandberg et al., 2007).

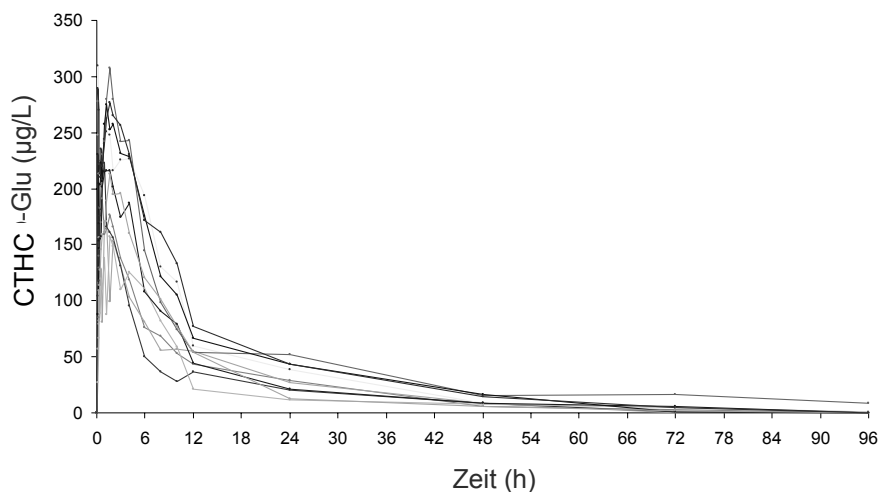


Abb. 1: CTHC – Glu Konzentrationskurven (µg/L) im Serum der 10 Probanden über 96 h.

Der prozentuale Anteil an konjugiertem CTHC schwankte im Urin zwischen 3,0 % und 11,2 % (siehe Abb. 2). Fünf Probanden zeigten einen ähnlichen Anteil an renal ausgeschiedenem, konjugiertem CTHC ( $6,6 \pm 0,5$  %). Zwei der Probanden hatten gegenüber den übrigen Versuchspersonen eine deutlich geringere Ausscheidungsrate an konjugiertem CTHC ( $3,0 \pm 0,04$  % and  $3,6 \pm 0,14$  %) und 3 von 10 Probanden schieden im Verhältnis dazu einen relative großen Anteil

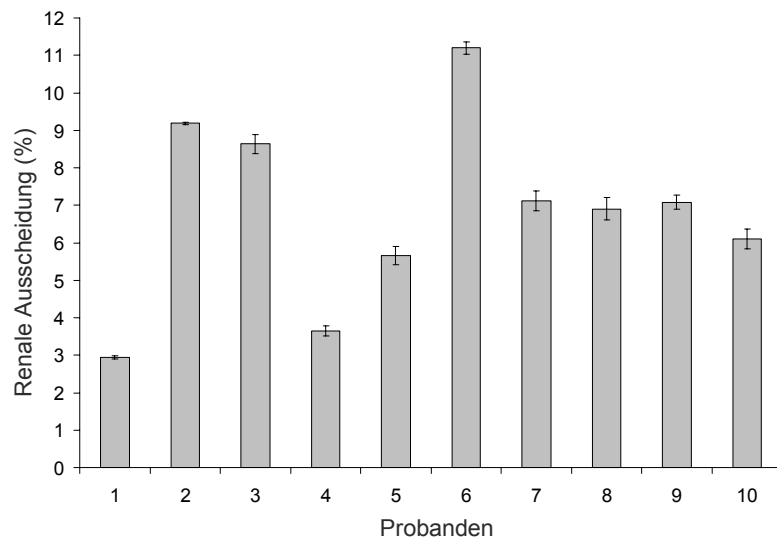


Abb. 2: Individuelle renale Ausscheidung der initialen CTHC Dosis in konjugierter Form (%) nach insgesamt 96 h.

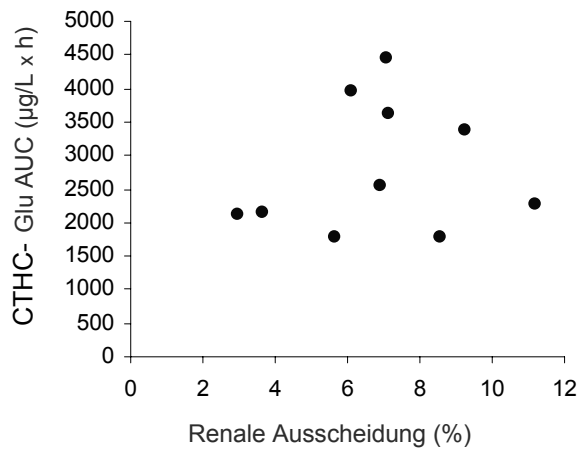


Abb. 3: Individuelle renale Ausscheidung der initialen CTHC Dosis in konjugierter Form (%) nach insgesamt 96 h.

an konjugiertem CTHC über den Urin aus ( $8,6 \pm 0,26$  %;  $9,2 \pm 0,03$  % und  $11,2 \pm 0,17$  %) Die renale HWZ des CTHC-Glu betrug im Mittel  $16,0 \pm 5,0$  h. Sie lag so mit den Halbwertszeiten des CTHC-Glu im Serum im selben Bereich.

Eine Korrelation zwischen den individuellen AUC des CTHC-Glu im Serum und den individuellen, renalen Ausscheidungsrate zeigte sich nicht (siehe Abb. 3).

## 5. Diskussion

Dies ist die erste Studie, die die Bildung und Elimination des CTHC-Glu nur nach iv.-Gabe des direkten Vorläufers CTHC und ohne das Vorhandensein der eigentlichen Muttersubstanz THC untersuchte. So konnte erstmals die Bildungs- und Eliminationseigenschaften des CTHC-Glu für sich betrachtet werden. Die Bildungs-HWZ lag bei etwa 15 min. Es ergaben sich keine signifikant verzögerten Bildungsrate (siehe Abb. 1). Die Fläche unter der Kurve (AUC) repräsentiert die über die Zeit im Serum auftauchende Menge an CTHC-Glu. Die AUC des CTHC-Glu hatte eine sehr geringe Variabilität, sodass auch von einer geringen Variabilität für die insgesamt aus CTHC gebildete Menge an CTHC-Glu ausgegangen werden konnte. Es konnten so auf pharmakokinetischer Ebene keine Hinweise für einen ausgeprägten Polymorphismus der beteiligten UGT-Enzyme gefunden werden.

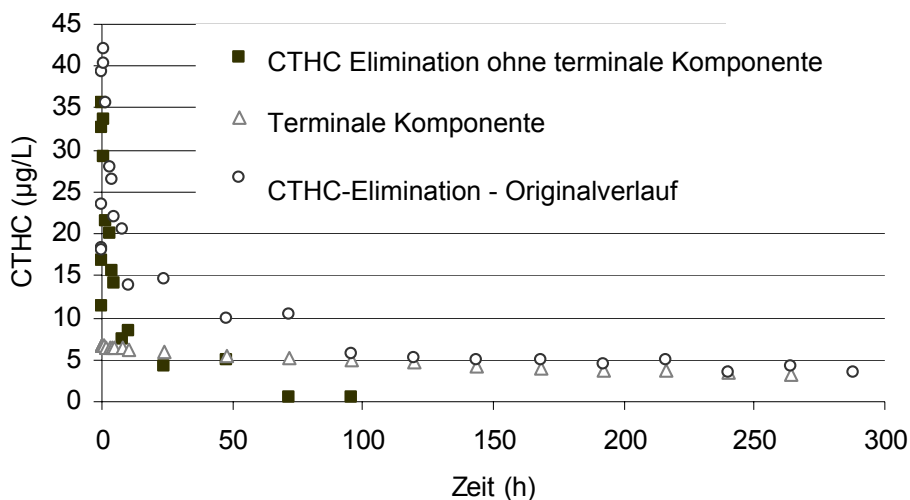


Abb. 4: Serum-Elimination (Offene Kreise) des CTHCs in „frequent users“ nach Kelly und Jones [15]. Nach Abschälung der terminalen Komponente (△) verbleibt die erste Phase (schwarze Quadrate) der CTHC Elimination mit einer Eliminationshalbwertszeit von HWZ 21 Stunden).

Nach THC-Gabe (iv, einmaliger Konsum) wurde von Kelly und Jones im Serum eine Halbwertszeit für die THC-Metabolite von 5,2 Tagen beschrieben [15]. Die HWZen des CTHC-Glu im Serum und im Urin waren in unserer Studie bis zu 7-mal kürzer als diese. Bei Anwesenheit von THC wird das CTHC als auch das

Glucuronid demnach wesentlich länger eliminiert. Dieses Ergebnis unterstützt frühere Annahmen [16], dass die Kinetik der THC-Metabolite durch Rückdiffusionsprozesse des THCs aus tieferen Kompartimenten maßgebend ist. THC wird in tiefere Kompartimente wie das Fettgewebe verteilt und diffundiert daraus nur sehr verzögert in den Blutstrom zurück. Die Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass für die Elimination des CTHCs zwei kinetische Ursachen und Phasen in Betracht kommen. Einerseits raschere metabolische Eliminationsfunktionen in Leber und Niere und andererseits die Elimination des THCs aus den tiefen Kompartimenten mit relativ rascher Biotransformation zu CTHC und seinem Glucuronid. Die langen HWZen der Literatur sind auf dieser biphasischen Grundlage zu diskutieren. Die terminale HWZ des CTHC und seines Glucuronids kann deshalb nur auf relativ geringem Konzentrationsniveau stattfinden. Ein Beleg für diese Annahme ergibt die Analyse der Serumdaten von Kelly und Jones [15] (siehe Abb. 4).

Zudem kann es trotz gleicher Konsumbedingungen (THC-Dosis, Konsumtyp) zu erheblichen Schwankungen in der renalen Eliminationsdauer des CTHC-Glu kommen [10, 11]. In dieser Studie ergaben sich aufgrund der minimierten Variablen keine größeren Schwankungen in der renalen HWZ. Es wäre denkbar, dass in THC-Studien die Schwankungen in der Eliminationsdauer der THC-Metabolite mit der individuellen Verteilungs- bzw. Eliminationsdauer des THCs oder mit Polymorphismen bei den beteiligten CYP Enzymen zusammenhängen.

Zudem kam es in THC-Studien auch zu individuellen Unterschieden in der -als CTHC-Glu- renal ausgeschiedenen Menge [12, 17]. Es war überlegt worden, dass die im Körper gebildete Menge an CTHC-Glu mit der ausgeschiedenen Menge in Beziehung steht. Individuelle Unterschiede in der Bildungsrate des CTHC-Glu könnten damit Schwankungen in den Urindaten auslösen.

In der hier gezeigten Studie kam es ebenfalls zu individuellen Schwankungen in der renalen Ausscheidungsrate des CTHC-Glu. Jedoch zeigte die  $AUC_{\text{CTHC-glu}}$  im Serum keine signifikanten individuellen Schwankungen. Auch konnte keine Korrelation zwischen der renalen CTHC-Glu Ausscheidung und der  $AUC_{\text{CTHC-glu}}$  im Serum festgestellt werden. Demnach scheint die CTHC-Glu -Bildungsrate nicht mit der renalen Ausscheidung des CTHC-Glu in Verbindung zu stehen. Es scheinen für das CTHC-Glu andere Eliminationswege als die renale Ausscheidung zu dominieren. Ein enterohepatischer Kreislauf für das CTHC-Glu oder grundsätzlich eine vermehrte fäkale Elimination wären denkbar.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Glaz-Sandberg, A., et al., *Pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (CTHC) after intravenous administration of CTHC in healthy human subjects*. Clin Pharmacol Ther, 2007. accepted.
2. Bland, T., et al., *CYP2C-catalyzed delta9-tetrahydrocannabinol metabolism: kinetics, pharmacogenetics and interaction with phenytoin*. Biochem Pharmacol, 2005. **70**(7): p. 1096-103.
3. Burstein, S. and D. Kupfer, *Hydroxylation of trans-1-tetrahydrocannabinol by a hepatic microsomal monooxygenase*. Chem Biol Interact, 1971. **3**(4): p. 316.
4. Law, B., et al., *Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin*. J Pharm Pharmacol., 1984. **36**(5): p. 289-294.
5. Siemens, A.J. and H. Kalant, *Metabolism of delta-1-tetrahydrocannabinol by the rat in vivo and in vitro*. Biochem Pharmacol, 1975. **24**(7): p. 755-762.
6. Watanabe, K., et al., *Oxygenation mechanism in conversion of aldehyde to carboxylic acid catalyzed by a cytochrome P - 450 isozyme*. J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 2709-2711.
7. Giroud, C., et al., *Effects of oral cannabis and dronabinol on driving capacity*. Ann Pharm Fr, 2006. **64**(3): p. 161-72.
8. Wall, M.E., et al., *Metabolism, disposition and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women*. Clin Pharmacol Ther, 1983. **34**(3): p. 352-363.
9. Williams, P.L. and A.C. Moffat, *Identification in human urine of delta-9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite*. J Pharm Pharmacol, 1980. **32**(7): p. 445-448.
10. Huestis, M.A. and E.J. Cone, *Urinary excretion half-life of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in humans*. Ther Drug Monit, 1998. **20**(5): p. 570-576.
11. Huestis, M.A., J.M. Mitchell, and E.J. Cone, *Detection times of marijuana metabolites in urine by immunoassay and GC-MS*. J Anal Toxicol, 1995. **19**: p. 443-449.
12. Huestis, M.A., J.M. Mitchell, and E.J. Cone, *Urinary excretion profiles of 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol in humans after single smoked doses of marijuana*. J Anal Toxicol, 1996. **20**(6): p. 441-452.
13. Johansson, E., H.K. Gillespie, and M.M. Halldin, *Human urinary excretion profile after smoking and oral administration of [14C]delta 1-tetrahydrocannabinol*. J Anal Toxicol, 1990. **14**(3): p. 176-80.
14. Moody, D.E., K.M. Monti, and D.J. Crouch, *Analysis of forensic specimens for cannabinoids. II relationship between blood delta-9-tetrahydrocannabinol and blood and urine 11-nor-delta-9-Tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid concentrations*. J Anal Toxicol, 1992. **16**: p. 302-306.
15. Kelly, P. and R.T. Jones, *Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users*. J Anal Toxicol, 1992. **16**(4): p. 228-235.
16. Johansson, E., et al., *Determination of delta-1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marijuana users by gas chromatography-mass spectrometry*. Biomed Chromatogr, 1989. **3**(1): p. 35-38.
17. Gustafson, R.A., et al., *Urinary pharmacokinetics of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol after controlled oral delta-9-tetrahydrocannabinol administration*. J Anal Toxicol, 2004. **28**(3): p. 160-167.



Dipl. Biol. Lisa Dietz  
Institut für Rechtsmedizin  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Voßstr.2  
D-69115 Heidelberg  
E-Mail: lisa.dietz@med.uni-heidelberg.de

Anna Glaz-Sandberg  
Abteilung Innere Medizin VI  
Klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 410  
D- 69120 Heidelberg  
E-Mail: hejpippi@hotmail.com

Hang Nguyen  
Klinikapotheke  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 670  
D-69120 Heidelberg  
E-Mail: hang.nguyen@med.uni-heidelberg.de

Prof. Dr. rer. nat. Rolf Aderjan  
Institut für Rechtsmedizin  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Voßstr.2  
D-69115 Heidelberg  
E-Mail: rolf.aderjan@med.uni-heidelberg.de

Prof. Dr. med. Gerd. Mikus  
Abteilung Innere Medizin VI  
Klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 410  
D- 69120 Heidelberg  
E-Mail: gerd.mikus@med.uni-heidelberg.de