

## **Stabilität von $\Delta^9$ -THC, 11-OH-THC und THC-COOH in tiefgekühlten, forensischen Serumproben**

**Annette Rickert, Tim Gorn, Thomas Daldrup**

Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstraße 5, D-40225 Düsseldorf, Germany

---

### **Abstract**

**Aim:** In order to control the stability of  $\Delta^9$ -THC and its metabolites (11-OH-THC, THC-COOH) 126 forensic serum samples containing fluoride and oxalate were analysed a second time after storage at a temperature of app.  $-20^{\circ}\text{C}$  for 15-32 months (average 19 months) by GC/MS. The concentrations of THC and THC-COOH were above the LOD in all samples in the first analysis.

**Material and Methods:** As internal standard, D<sub>3</sub>-THC, D<sub>3</sub>-11-OH-THC and D<sub>9</sub>-THC-COOH were added to the serum samples. After precipitation with acetonitrile, they were extracted via SPE (C<sub>18</sub>), silylated and analysed a second time by GC/MS using a fully validated method. For THC, the measurement inaccuracy was  $\pm 25\%$ , for 11-OH-THC and THC-COOH  $\pm 20\%$ . LOD/LOQ: THC: 0.3/0.8 ng/ml; 11-OH-THC: 0.3/0.9 ng/ml; THC-COOH: 0.5/1.9 ng/ml.

**Results and Discussion:** THC was considered to be stable in 85 % (107/126 samples), 11-OH-THC in 70 % (88/126) THC-COOH in 90 % (113/126). The samples showed a decrease of 15.2 % concerning THC, of 6.4 % concerning 11-OH-THC, and an average increase of 5.2 % concerning THC-COOH. The observed increase of the THC-COOH concentration is probably due to the cleavage of the THC-COOH glucuronide to THC-COOH.

**Conclusion:** Our results show that storing serum samples at app. minus  $20^{\circ}\text{C}$  is a suitable method to determine THC and its metabolites even after a longer period of time.

### **1. Einleitung**

In der rechtsmedizinischen Praxis kann ein Auftrag zur Bestimmung von Cannabinoiden im Blut erst nach längerer Lagerungszeit erfolgen. Bei der Herausgabe von Analyseergebnissen in der forensischen Toxikologie ist die Stabilität der Zielanalyte in biologischer Matrix von großer Relevanz. Da nur wenige Daten zur Langzeitstabilität von Cannabinoiden im Blut existieren [1-8], wurden zur Überprüfung der Analytstabilität von Cannabinoiden THC, 11-OH-THC und THC-COOH in bereits gemessenen, gelagerten Serumproben erneut untersucht.

### **2. Material und Methoden**

#### **2.1. Serumproben**

Forensische, mit Fluorid und Oxalat stabilisierte Blutproben werden im hiesigen Institut nach dem Eintreffen zentrifugiert und das erhaltene Serum in Glasröhrchen tiefgefroren. 126 der wie beschrieben gelagerten Serumproben wurden nach der Erstanalyse von THC, 11-OH-THC und THC-COOH bei ca.  $-20^{\circ}\text{C}$  15-32 Monate (durchschnittlich 19 Monate) gelagert und mittels GC/MS erneut analysiert. Alle für diesen Versuch reanalysierten Proben wiesen in der Erstbestimmung eine THC-Konzentration von  $>1$  ng/ml und eine THC-COOH-Konzentration von  $>2$  ng/ml auf.

## 2.2. Geräte

Rapid Trace™ SPE: Workstation Fa. Caliper; Fa. Agilent Technologies: Gaschromatograph: 6890N, MSD 5975, Autosampler 7683/7683B; Kapillarsäule HP-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); Trägergas: Helium (5.0), Flussrate 1 ml/min, Injektor 270 °C; Ofen: 180 °C für 0,5 min, Rate 60 °C/min bis 240 °C für 5 min, Rate 60 °C/min bis 280 °C für 3,5 min, Laufzeit 10,7 min; splittless purgetime 2 min; EI Mode 70 eV.

## 2.3. Durchführung

20 µl interner Standard ( $\hat{=}$  3 ng D<sub>3</sub>-THC, 3 ng D<sub>3</sub>-11-OH-THC, 12 ng D<sub>9</sub>-THC-COOH) werden in einem Eppendorfgefäß vorgelegt. Anschließend werden 100 µl Isopropanol, 1 ml Acetonitril, 600 µl Probe und 100 µl HPLC-Wasser zugegeben. Nach dem Zentrifugieren erfolgt nun eine automatische SPE von 1,5 ml Überstand über eine C<sub>18</sub>-Säule (Fa. Varian). Anschließend wird für 30 min bei 90 °C mit Isooctan/ MSTFA (200/10) derivatisiert. Es erfolgt eine Injektion von 1 µl Extrakt und Analyse per GC/MS-SIM. Es wurde ein vollständig validiertes Analysenverfahren verwendet.

Tab. 1. Verwendete Ionen für Target und Qualifier, Kalibrationsbereich, Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Methode.

	Tgt. (m/z)	Q1 (m/z)	Q2 (m/z)	Kalibrationsbereich	LOQ (ng/ml)	LOD (ng/ml)
D <sub>3</sub> -THC	389	306	374			
THC	386	303	371	bis 48 ng/ml	0,8	0,3
D <sub>3</sub> -11-OH-THC	374	375	477			
11-OH-THC	371	372	474	bis 48 ng/ml	0,9	0,3
D <sub>9</sub> -THC-COOH	380	479	497			
THC-COOH	371	473	488	bis 192 ng/ml	1,9	0,5

## 2.4. Erweiterte Messunsicherheit:

Die Berechnung der erweiterten Messunsicherheit der Analyte basiert auf einem Excel-Tool [9], für das die Ringversuchsergebnisse (BTMF) in dem Zeitraum zwischen der Erst- und Zweitanalyse der Serumproben (2007-2010) herangezogen wurden, unter Berücksichtigung der Laborpräzision, des Bias und der Gesamtstandardabweichung des jeweiligen Ringversuchs: THC:  $\pm$  25 %, 11-OH-THC:  $\pm$  20 %, THC-COOH:  $\pm$  20 %.

## 3. Ergebnisse und Diskussion

Von den 126 reanalysierten Proben lagen bei der Zweitmessung 107 Proben bzgl. THC, 88 Proben bzgl. 11-OH-THC und 113 Proben bzgl. THC-COOH innerhalb des Kalibrationsbereichs. Bei diesen Proben trat ein durchschnittlicher THC-Verlust von 15,2 %, bei 11-OH-THC ein Verlust von 6,4 % und bei THC-COOH ein durchschnittlichen Anstieg von 5,2 % auf (s. Abb. 1-3, Tab. 2).

Tab. 2. Anzahl der Proben mit Konzentrationen innerhalb des Kalibrationsbereiches und prozentuale Änderung der Analytkonzentration von der Erstanalyse zur Zweitanalyse.

	THC	11-OH-THC	THC-COOH
<b>Innerhalb des Kalibrationsbereiches (s.Tab.1)</b>	<b>107/126</b>	<b>88/126</b>	<b>113/126</b>
<b>Durchschn. prozentuale Änderung</b>	<b>-15,2</b>	<b>-6,4</b>	<b>5,2</b>

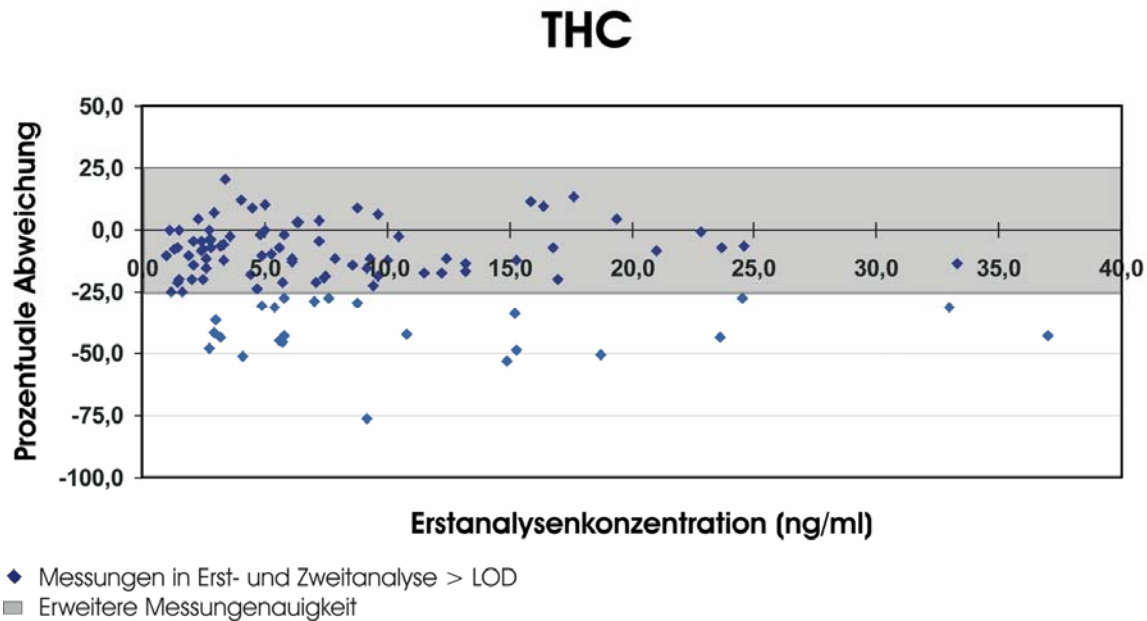


Abb. 1. Prozentuale Abweichungen von THC zu den Konzentrationen der Erstmessung.

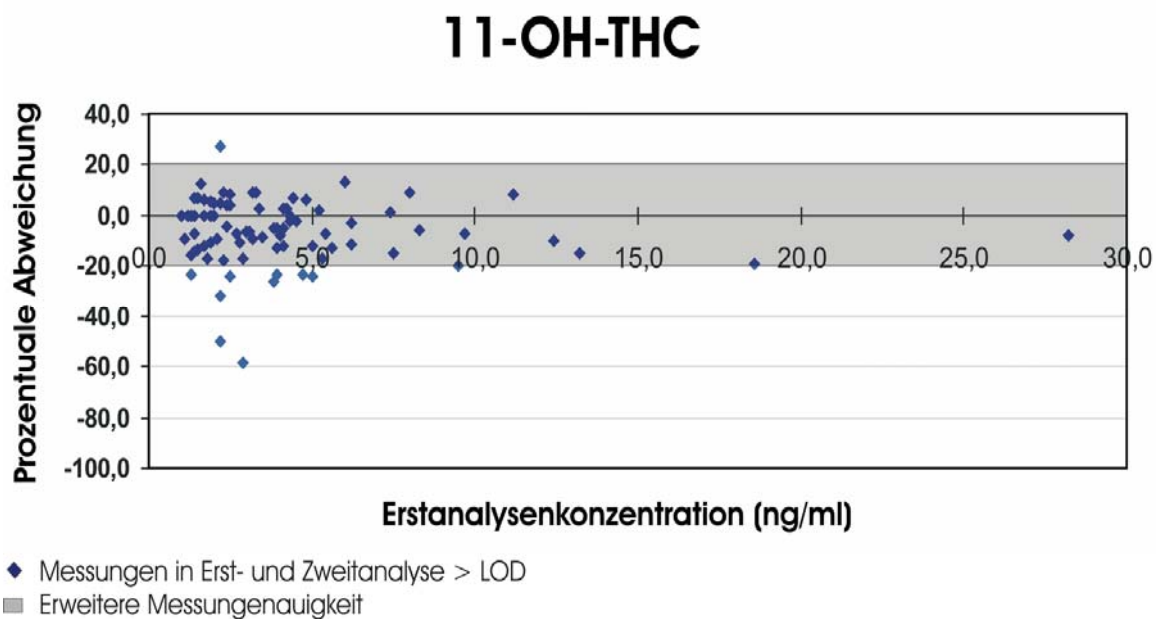
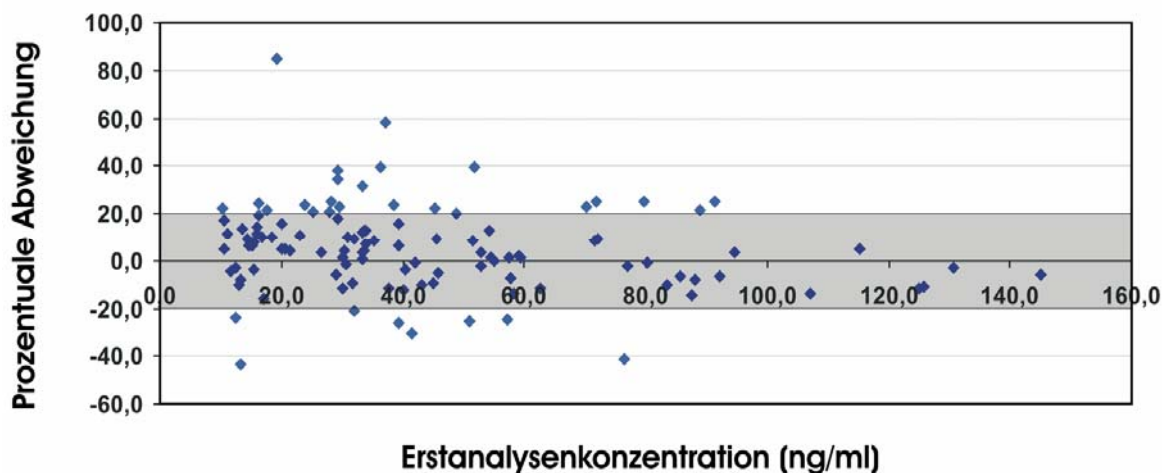


Abb. 2. Prozentuale Abweichungen von 11-OH-THC zu den Konzentrationen der Erstmessung.

## THC-COOH



- ◆ Messungen in Erst- und Zweitanalyse > LOD
- Erweiterte Messungengenauigkeit

Abb. 3. Prozentuale Abweichungen von THC-COOH zu den Konzentrationen der Erstmessung.

Bei 120 Proben lag die Erstkonzentration von THC bei  $\geq 1$  ng/ml. Von diesen wiesen immer noch 88 % nach Lagerung ein Ergebnis von  $\geq 1$  ng/ml auf. Alle Proben, deren 11-OH-THC-Konzentration in der Erstanalyse >LOD waren, konnten auch weiterhin qualitativ ausgewertet werden. Auch in der Zweitbestimmung der untersuchten Proben lag keine THC-COOH-Konzentration unterhalb von 2 ng/ml. Die tatsächliche Ursache der Konzentrationsverluste von THC und 11-OH-THC ist unbekannt. Der festgestellte Anstieg der THC-COOH-Konzentration kann mit der Instabilität des THC-COOH-Glucuronids begründet werden.

Tab. 3. Vergleich der Erst- und Zweitanalyse.

	1. Analyse			2. Analyse		
	THC	11-OH-THC	THC-COOH	THC	11-OH-THC	THC-COOH
<LOD	0	2	0	6	2 <sup>x1</sup>	0
< 1 ng/ml bzw. 2 ng/ml (THC-COOH)	6	24	0	20	38	0
$\geq 1$ ng/ml bzw. 2 ng/ml (THC-COOH)	120	92	126	106	88	126

<sup>x1</sup> Bereits in der Erstbestimmung negativ

Vergleichbare Daten zur Langzeitlagerung von Cannabinoiden sind bisher nur von Roth et al. [4] publiziert worden. Diese Untersuchung ergab in 37, erst bei der Serumgewinnung mit NaF stabilisierten Serumproben aus Polizeikontrollen nach zweijähriger Lagerung einen statistisch signifikanten Konzentrationsverlust für THC von durchschnittlich 19 % und für 11-OH-THC und THC-COOH einen Konzentrationsanstieg von durchschnittlich 9 bzw. 21 %. Diese Ergebnisse stehen in Bezug auf THC in Übereinstimmung mit dem hier festgestellten

Konzentrationsverlust von im Schnitt 15,2 %. Demgegenüber wurde beim 11-OH-THC kein Anstieg, sondern ein Abfall der Konzentration von im Schnitt 6,4 % und bei der THC-COOH nur ein leichter Anstieg von im Schnitt 5,2 % festgestellt. Auch konnte kein Anstieg der 11-OH-THC-Konzentration bei einem gleichzeitigen THC-Konzentrationsabfall beobachtet werden.

#### 4. Schlussfolgerung

Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien sind u.U. durch das unterschiedliche Studiendesign (für die hier verwendeten Blutproben wurde ein Blutentnahmesystem, das Stabilisatoren enthielt, verwendet) und durch die deutlich geringere Probenanzahl bedingt. Bei dem Großteil der Proben konnte eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im Bereich der erweiterten Messunsicherheit erreicht werden, so dass eine zweijährige Lagerung bei ca. minus 20 °C grundsätzlich empfohlen werden kann. Bei den meisten Proben wurden beim THC und 11-OH-THC in der Tendenz eine niedrigere, bei THC-COOH eine höhere Konzentration gegenüber der Erstanalyse erhalten. Dies ist bei der Interpretation von Analysenbefunden zu berücksichtigen.

#### 5. Literatur

- [1] Christophersen, AS. Tetrahydrocannabinol stability in whole blood: Plastic versus glass containers. *J Anal Toxicol* 1986;10:129-131.
- [2] Johnson JR, Jennison TA, Peat MA, Foltz RL. Stability of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-OH-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in blood and plasma. *J Anal Toxicol* 1984;8:202-204.
- [3] McCurdy H, Callahan LS, Williams RD. Studies on the stability and detection of cocaine, benzoylecgonine, and 11-nor-delta-9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in whole blood using Abuscreen radioimmunoassay. *J Forensic Sci* 1989;34:858-870.
- [4] Roth N, Kneisel S, Auwärter V. Stabilität von Cannabinoiden in Serumproben nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen und Lagerung in Glas- bzw. Kunststoffröhrchen. *Toxichem Krimtech* 2011;78(1):36-44.
- [5] Skopp G., Pötsch L. Zur präanalytischen Phase chemisch-toxikologischer Untersuchungen. II.: Stabilität forensisch relevanter Substanzen in Blut-, Plasma- oder Serumproben – Eine Bestandsaufnahme. *Rechtsmed* 2002;12:195-202.
- [6] Skopp G, Pötsch L. Stability of 11-nor-delta 9-carboxy-tetrahydrocannabinol glucuronide in plasma and urine assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002;48:301-306.
- [7] Toennes SW, Kauert GF. Technical Note: Importance of vacutainer selection in forensic toxicological analysis of drugs of abuse. *J Anal Toxicol* 2001;25:339-343.
- [8] Wong AS, Orbanosky MW, Reeve VC, Beede JD. Stability of delta-9-tetrahydrocannabinol in stored blood and serum. *NIDA Res Monogr* 1982;42:119-124.
- [9] Schmitt G, Herbold M, Peters F, Tönnies S für den GTFCh-Arbeitskreis. Qualitätssicherung. Excel-Tool zur Abschätzung der erweiterten Messunsicherheit.

Hinweis: Grundlage der vorgestellten Ergebnisse ist die Bachelor-Arbeit von Tim Gorn. Wir bedanken uns bei dem Verein VEGaS e.V. für die finanzielle Unterstützung.