

Stabilität von Cannabinoiden in Serumproben nach mehreren Einfrier- Auftauzyklen und Lagerung in Glas- bzw. Kunststoffröhrchen

Nadine Roth, Stefan Kneisel, Volker Auwärter

Institut für Rechtsmedizin, Forensische Toxikologie, Albertstraße 9, 79104 Freiburg

Abstract

Hintergrund: Glas ist ein für die Cannabisanalytik häufig verwendetes Material für Abnahme- und Lagersysteme für Blutproben. Es zeichnet sich durch große chemische Beständigkeit gegenüber einer Vielzahl an organischen Lösungsmitteln, Säuren und Laugen sowie hohe Formstabilität und Transparenz aus. Allerdings kommt es nicht selten zu Problemen mit geplatzten Glasröhrchen beim Tieffrieren insbesondere von hämolytischen Seren. Eine Alternative zu Glas stellt die Verwendung von Kunststoffröhrchen dar (z. B. aus Polystyrol). Dabei stellt sich die Frage nach der Analytstabilität von THC, 11-OH-THC (aktiver Metabolit) und THC-COOH (inaktiver Metabolit) in solchen Röhrchen.

Material und Methoden: Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden 2 Jahre tiefgefroren gelagerte, THC-positive Serumproben von Straßenverkehrsteilnehmern über einen Zeitraum von 6 Monaten sowohl in Glas als auch in Polystyrolröhrchen auf Analytstabilität untersucht. Gleichzeitig wurde die Stabilität der Analyte in beiden Materialien nach Durchlaufen mehrerer Einfrier-Auftauzyklen verglichen. Um eine Veränderung der bereits über 2 Jahre gealterten Proben zu überprüfen, wurden zu Beginn der Untersuchung die Cannabinoidkonzentrationen aller Proben nachbestimmt und mit den bei der Erstuntersuchung erhaltenen Ergebnissen verglichen. Alle Proben wurden nach akkreditierten Standardverfahren aufgearbeitet und analysiert (versetzen mit deuterierten Standards, SPE (C₁₈), Derivatisierung mit MSTFA, Quantifizierung mittels GC-MS-SIM).

Ergebnisse: Die Langzeitlagerung über 2 Jahre ergab eine statistisch signifikante Abnahme der THC-Konzentrationen (im Mittel ca. 19%) bei gleichzeitiger Zunahme der 11-OH-THC und THC-COOH-Konzentrationen (11-OH-THC im Mittel ca. 9% und THC-COOH ca. 21%). Nach 6 Monaten und 7 Einfrier-Auftauzyklen konnten sowohl für THC als auch für 11-OH-THC signifikante Konzentrationsverluste von durchschnittlich ca. 15% festgestellt werden. Die THC-COOH-Konzentration hingegen blieb nahezu unbeeinflusst. Der Vergleich nach Lagerung in Glas- bzw. Polystyrolröhrchen ergab während der 6 Monate für keinen der drei Analyte einen signifikanten Unterschied.

Diskussion: Bei Nachuntersuchung von Serumproben nach längerer Lagerung (auch tiefgefroren) muss mit erheblichen Veränderungen der Cannabinoidkonzentrationen gerechnet werden. Ergebnisse von Stabilitätsprüfungen sollten insbesondere bei sehr lipophilen Analyten und Verwendung von Polymermaterial nicht ohne weiteres von einem Aufbewahrungssystem auf ein anderes übertragen werden. Der Ersatz der bisher verwendeten Glasröhrchen durch die hier eingesetzten Polystyrolröhrchen führt nicht zu zusätzlichen Stabilitätsproblemen.

1. Einleitung

Cannabis ist neben Alkohol und Tabak weltweit die am weitesten verbreitete Droge. Laut dem Bericht des nationalen REITOX-Knotenpunkts aus dem Jahre 2010 an die Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EBDD bzw. engl.: EMCDDA) zur Drogensituation 2009/2010 ist Cannabis nach wie vor die mit Abstand am häufigsten konsumierte illegale Droge in Deutschland [1]. Cannabiskonsum kann je nach Dosierung und Setting zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Angstzuständen, Panikgefühl, Halluzinationen, Aufmerksamkeitsstörungen, Herzrasen, Übelkeit und Schwindel führen [2]. Bei Teilnahme am Straßenverkehr nach Cannabiskonsum kann es darüber hinaus zu einer wirkungsbedingten Beeinträchtigung der Fahrsicherheit kommen. Die Durchführung von Serumanalysen auf Cannabinoide stellt daher eine wichtige Aufgabe sowohl in der klinischen als auch in der forensischen Toxikologie dar.

Ebenso wichtig wie eine zügige Probennahme ist die korrekte Handhabung (Umfüllen, Pipetieren, Einfrieren) und Aufbewahrung (z. B. richtige Lagertemperatur, geeignetes Lager-system) der Proben im Labor. In der Literatur wurden bereits diverse Untersuchungen zur Stabilität von THC, 11-OH-THC und THC-COOH in verschiedenen biologischen Matrices, Lagersystemen und bei unterschiedlichen Temperaturen beschrieben [3, 4, 5, 6, 7, 8], wobei sich die Ergebnisse z. T. zumindest auf den ersten Blick zu widersprechen scheinen.

Für die Lagerung und Aufarbeitung von Serumproben, die für die Cannabisanalytik bestimmt sind, wurden in Baden-Württemberg bisher routinemäßig Glasröhrchen verwendet, da diese sich aufgrund ihrer Inertheit für viele analytische Fragestellungen als geeignet erwiesen haben. Nachteile bestehen in der Bruchgefahr (insbesondere beim Einfrieren) und möglichen Oberflächeneffekten (Adsorption). Es konnte beobachtet werden, dass vor allem bei hämolytischen Seren eine hohe Gefahr des Berstens besteht. Kunststoff scheint daher eine mögliche Alternative zu sein.

Am Markt wird eine Vielzahl beschichteter und unveränderter Kunststoffröhrchen angeboten, wobei Angaben zur Inertheit (falls vorhanden) oft nur schwer auf eine bestimmte analytische Fragestellung zu übertragen sind. In diesem Artikel werden die Ergebnisse bei Verwendung von Polystyrol- bzw. Glasröhrchen zur Lagerung von Serumproben in der Cannabisanalytik vorgestellt. Polystyrol zählt zu den Thermoplasten (Kunststoffe mit linearem Molekülaufbau), ist aufgrund seiner amorphen Struktur formstabil, glasklar und weist gegenüber wässrigen Lösungen eine sehr hohe Stabilität auf [9]. Allerdings zeigt Polystyrol nur eine relativ geringe Beständigkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln. Dies sollte in der vorliegenden Anwendung nicht stören, da es sich bei Serum um ein wässriges Medium handelt. Im Vergleich zu Glas ist die Bruchgefahr stark verringert.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien

Folgende methanolische interne Standardsubstanzen wurden verwendet: 100 µg/mL Δ^9 -Tetrahydrocannabinol- D_3 (Δ^9 -THC- D_3) von Cerilliant (Round Rock, USA), 100 µg/mL 11-hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol- D_3 (11-OH-THC- D_3) von LGC Standards (Wesel, Deutschland) und 100 µg/mL 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol- D_3 (Δ^9 -THC-COOH- D_3) von Lipomed (Bad Säckingen, Deutschland). Die methanolischen Referenz-Lösungen für Δ^9 -THC (1 mg/mL), 11-OH-THC (100 µg/mL) und THC-COOH (100 µg/mL) wurden bei Lipomed (Bad Säckingen, Deutschland) gekauft. Die Festphasenextraktions-Kartuschen (Chromabond, C_{18} , 3 mL, 500 mg) sowie das

Derivatisierungsreagenz N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) wurden von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen. Die Kunststoffröhrchen (Rotilabo[®]-Reagenzröhrchen K937.1, Polystyrol, 75 mm x 12,0 mm x 1 mm, 6 mL) wurden von der Fa. Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), die Glasröhrchen zur Lagerung (Glasröhre für Coombs-Test 89.1509, Glas, 75 mm x 11,5 mm, 5 mL) von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und die Glasröhrchen für die Festphasenextraktion (Reagenzgläser Soda, Natron-Kalk-Glas, 100 mm x 12,0 mm x 0,8 - 1 mm) von VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das Natriumfluorid p. a. (NaF) wurde bei Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Die verwendeten Lösungsmittel für die Festphasenextraktion stammten von Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland): Ethylacetat/ACS grade, J. T. Baker (Deventer, Niederlande): Acetonitril/HPLC Far UV-Gradient grade, Methanol/HPLC-Gradient grade und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland): Essigsäure Rotipuran[®] 100 % p.a.

2.2. Serumproben

Für diese Studie wurden über 2 Jahre tiefgekühlt gelagerte, THC-positive Serumproben (THC-Konzentrationen bei der Erstanalyse: 5 - 13,2 ng/mL) aus Polizeikontrollen verwendet (n = 37). Alle Proben wurden direkt nach Laboreingang und Zentrifugation vom Blutkuchen abgetrennt, das Serum mit NaF (ca. 10 mg/mL) versetzt und bis zur Untersuchung bei -18°C gelagert.

2.3. Versuchsdurchführung

Zur Untersuchung der Langzeitstabilität über 2 Jahre wurden sämtliche Serumproben nach 2 Jahren Lagerung bei -18°C reanalysiert. Zur Untersuchung der Analytstabilität in Glas- bzw. Polystyrolröhrchen nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen wurden von 18 der oben genannten 37 Serumproben jeweils zweimal 0,5 mL in ein Kunststoff- bzw. Glasgefäß aliquotiert und tiefgefroren (-18°C) gelagert. In Abb. 1 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt.

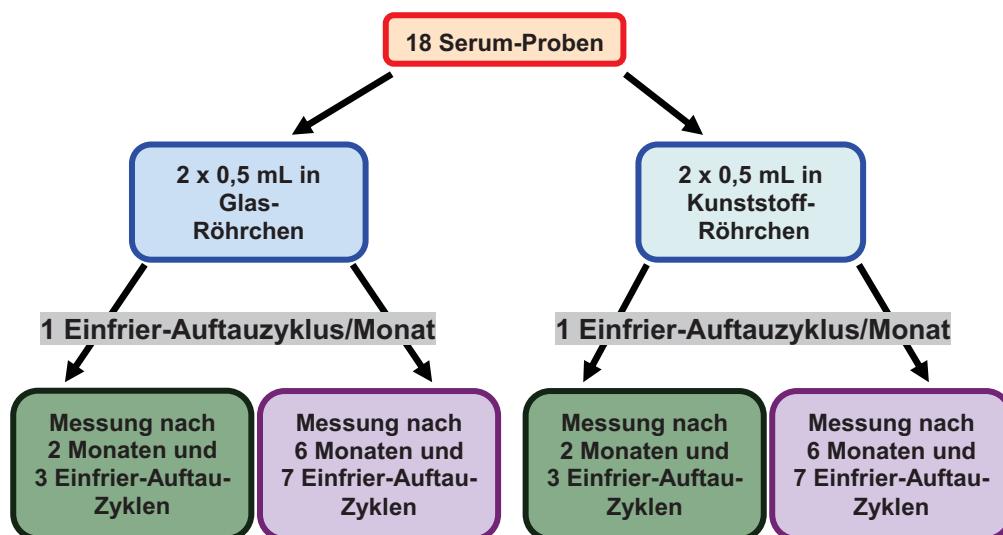


Abb. 1. Versuchsaufbau zur Untersuchung der Analytstabilität.

Alle Proben wurden einmal pro Monat für jeweils eine Stunde aufgetaut und erneut tiefgefroren. Nach 2 Monaten wurden von jeweils einer Glas- und einer Kunststoffprobe die Konzen-

trationen von THC, 11-OH-THC und THC-COOH mittels GC-MS bestimmt. Die beiden verbleibenden Proben wurden nach Ablauf von 6 Monaten nochmals analysiert. Alle Ergebnisse wurden zur Prüfung auf statistische Signifikanz einem Vorzeichentest unterzogen. Zusätzlich wurde die Stabilität unter Einbeziehung der Messpräzision wie folgt ermittelt:

$$d = |c_1 - c_2| < 2 \times \sqrt{2} \times SD = d_k$$

Dabei bezeichnet $d = |c_1 - c_2|$ die Differenz der Messwerte einer Probe an zwei verschiedenen Tagen und $d_k = 2 \times \sqrt{2} \times SD$ die kritische Differenz (Stabilitätsgrenze) unter Einbeziehung der Standardabweichung (SD). Setzt man $SD = 5\%$ (Präzision der verwendeten Methode nach Validierung) erhält man als Stabilitätskriterium:

$$d = |c_1 - c_2| < 2,83 \times 0,05 \times c_{\max} \quad (c_{\max} \text{ ist die größere der beiden Konzentrationen})$$

Bei Überschreitung der Stabilitätsgrenze ($d > d_k$) kann von einer signifikanten Konzentrationsänderung ausgegangen werden [10].

2.4. GC-MS-Analysenmethode

Probenaufarbeitung: 0,5 mL Serum wurde mit 25 μ L methanolischer IS-Lösung (5 ng Δ^9 -THC-D₃, 5 ng 11-OH-THC-D₃ und 25 ng Δ^9 -THC-COOH-D₃) versetzt. Nach Zugabe von 2,5 mL 0,1 M Essigsäure wurde die Lösung homogenisiert. Die Analyte wurden dann unter Verwendung automatischer Festphasenextraktion (SPE, GX -274 ASPECTM der Fa. Gilson) aus der Serumprobe extrahiert. Dazu wurden Chromabond C₁₈-Kartuschen verwendet (Konditionierung mit 2 mL Methanol und 2 mL 0,1 M Essigsäure). Nach dem Beladen der Säulen (Flussrate 1 mL/min) wurde mit 1 mL 0,1 M Essigsäure und 1 mL 70% Acetonitril gewaschen und nach 2 min Trocknung unter Stickstoff mit 1,5 mL 100% Acetonitril (Flussrate 1 mL/min) eluiert. Im Anschluss wurde das Eluat bei 60°C unter Stickstoff abgedampft und der Rückstand mit 25 μ L MSTFA und 25 μ L Ethylacetat für 45 min bei 90°C derivatisiert.

GC-MS-Analyse: Jeweils 1 μ L Probe wurde in ein GC-MS-System der Fa. Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland) injiziert (Gaschromatograph 6890N, MSD 5973N). Für die Auswertung wurde die Software MSD ChemStation D.03.00.611 verwendet. Die Injektion erfolgte splitlos auf eine Kapillarsäule (HP-5MS: 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m) der Fa. Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland). Als Trägergas wurde Helium (1 mL/min) verwendet. GC-Temperaturprogramm: 140°C für 2 min, auf 200°C mit 60°C/min, auf 230°C mit 2,5°C/min und auf 310°C mit 60°C/min (hold 3 min). Die Gesamtlaufzeit betrug 19,3 min. Die Detektion erfolgte massenspektrometrisch nach Elektronenstoßionisation (70 eV) im Selected-Ion-Monitoring-Modus (SIM-Modus). Dabei wurden jeweils drei Ionen pro Substanz erfasst (Quantifier unterstrichen): THC (m/z): 386, 371, 303; 11-OH-THC (m/z): 474, 459, 371; THC-COOH (m/z): 488, 473, 371; D₃-THC (m/z): 389, 374, 306; D₃-11-OH-THC (m/z): 477, 462, 374; D₃-THC-COOH (m/z): 491, 476, 374.

3. Ergebnisse:

3.1. Lagerstabilität über 2 Jahre

Für THC konnte tendenziell ein leichter Konzentrationsabfall bei gleichzeitigem Anstieg der 11-OH-THC-Konzentration festgestellt werden, möglicherweise hervorgerufen durch Oxidation von THC zu 11-OH-THC (Abb. 2). Eine weitere Möglichkeit stellt die Glucuronid-Spaltung des 11-OH-THC-Etherglucuronids dar. Im Mittel konnte ein Abfall der THC-Konzentration um ca. 19% und ein Anstieg der 11-OH-THC-Konzentration um ca. 9% festgestellt werden. Zur Prüfung der Ergebnisse auf statistische Signifikanz wurde ein Vorzeichentest durchgeführt. Dieser ergab für beide Analyte $p < 0,001$. Dies spricht für ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die Auswertung der Stabilität unter Berücksichtigung der Messpräzision ergab im Mittel für THC $d (= 1,4) > d_k (= 1,1)$ und somit ebenfalls eine signifikante Konzentrationsänderung. Für 11-OH-THC hingegen wurde das Stabilitätskriterium nicht überschritten: $d (= 0,4) < d_k (= 0,6)$. Insofern kann die Impräzision der Messung als Ursache für den leichten Anstieg der 11-OH-THC-Konzentration nicht sicher ausgeschlossen werden.

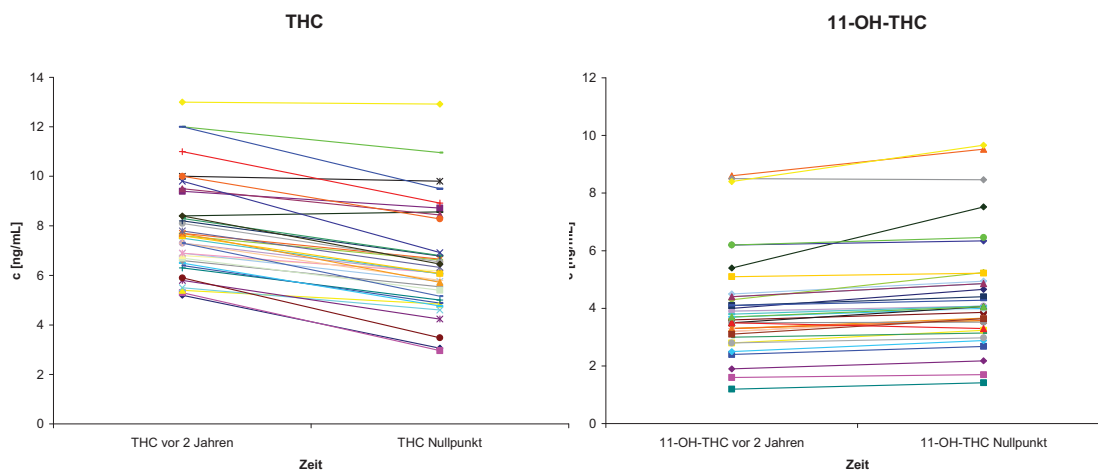


Abb. 2. Untersuchung der Lagerstabilität über 2 Jahre für THC und 11-OH-THC.

Auch für THC-COOH konnte ein statistisch signifikanter Konzentrationsanstieg festgestellt werden (Abb. 3, im Mittel ca. 21%, Vorzeichentest: $p < 0,001$, $d (= 22,6) > d_k (= 11,7)$). Dieser Anstieg liegt vermutlich in der bekannten Instabilität des THC-COOH-Glucuronids begründet, welche zu einem Anstieg der freien THC-COOH-Konzentration führen kann [11]. Zusätzlich könnte auch eine Oxidation von 11-OH-THC zu THC-COOH beitragen.

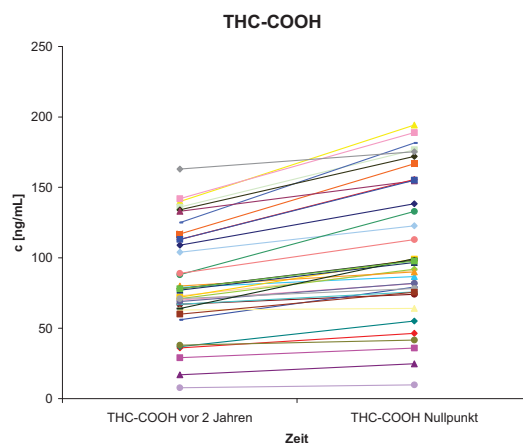


Abb. 3. Untersuchung der Lagerstabilität über 2 Jahre für THC-COOH.

3.2. Analytstabilität nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen

Nach insgesamt 6 Monaten und 7 Einfrier-Auftauzyklen konnte ein signifikanter Konzentrationsverlust für THC in beiden Materialien festgestellt werden (im Mittel um ca. 14%). Ähnlich verhält es sich mit 11-OH-THC. Hier konnte ebenfalls ein signifikanter Verlust von durchschnittlich ca. 15% beobachtet werden (Tab.1). Für THC-COOH konnte keine signifikante Konzentrationsänderung beobachtet werden.

Tab. 1. Konzentrationsänderung nach 6 Monaten Lagerung und 7 Einfrier-Auftauzyklen. $d > d_k$ = signifikantes Ergebnis unter Berücksichtigung der Messpräzision.

Analyt	Konzentrationsänderung Glas (Mittelwert)	Konzentrationsänderung Polystyrol (Mittelwert)
THC	-13% (p = 0,004) *	-15% (p = 0,006) *
11-OH-THC	-16% (p < 0,001) *	-14% (p < 0,001) *
THC-COOH	-6% (p = 0,025)	-3% (p = 0,048)

3.3. Vergleich Lagerung in Glas- bzw. Polystyrolröhrchen

Der Vergleich ergab für keinen der drei Analyte einen signifikanten Konzentrationsunterschied (Tab. 2). Der Konzentrationsverlust war in beiden Materialien annähernd gleich (Tab. 1).

Tab. 2. Konzentrationsunterschiede zwischen Proben gelagert in Glas- bzw. Polystyrolröhrchen nach 2 Monaten Lagerung und 3 Einfrier-Auftauzyklen bzw. nach 6 Monaten Lagerung und 7 Einfrier-Auftauzyklen (berechnet als mittlere Abweichung der Konzentrationsverhältnisse Glas / Polystyrol von 1).

Analyt	Unterschied nach 2 Monaten/ 3 Einfrier-Auftauzyklen	Unterschied nach 6 Monaten/ 7 Einfrier-Auftauzyklen
THC	-2% (p = 0,24)	+2% (p = 0,12)
11-OH-THC	-1% (p = 0,50)	-2% (p = 0,12)
THC-COOH	-2% (p = 0,12)	-3% (p = 0,32)

4. Diskussion

Wie in einem Review-Artikel von Peters [12] angemerkt wurde, können bei Stabilitätsuntersuchungen in vielen Fällen dynamische Prozesse aus Analytabbau und gleichzeitiger Neubildung aus Vorläufersubstanzen ablaufen. Zeigt ein Stabilitätstest keine Konzentrationsänderung, kann nicht automatisch auf Stabilität des Analyten geschlossen werden. Vielmehr kann resultierend aus einer ähnlich hohen Abbau- und Neubildungsrate Stabilität nur vorgetäuscht werden.

Im Gegensatz zu Wong et al. [3], die nach Langzeitlagerung über ca. 6 Monate kein THC mehr nachweisen konnten (aufdotierte Blut- und Serumproben in Glasgefäßen bei 5°C, -5°C und -20°C gelagert), zeigen unsere Untersuchungen lediglich einen Konzentrationsabfall von

durchschnittlich ca. 19% nach 2 Jahren Lagerung bei -18°C . Moody et al. [7] untersuchten ebenfalls die Langzeitstabilität von THC in Plasma (12 Monate Lagerung bei ca. -20°C). Während nach 6 Monaten noch kein signifikanter Konzentrationsverlust festgestellt werden konnte, beobachtete man hier nach ca. 12 Monaten einen Verlust von ca. 15%. Diese Beobachtungen stehen nicht in Widerspruch zu unseren Ergebnissen, da nach einem weiteren Jahr Lagerung und langsam fortschreitendem Analytabbau durchaus ein Verlust von ca. 19% erreicht werden könnte.

Ein mehrmaliges Auftauen von THC-Proben für täglich 4 Stunden und erneutes Tieffrieren über einen Zeitraum von 8 Tagen, führte bei Wong et al. [3] zu keinem signifikanten Analytverlust. Unsere Ergebnisse zeigen allerdings, dass Einfrier-Auftauzyklen den Abbau von THC und auch von 11-OH-THC beschleunigen können. Möglicherweise sind die Differenzen aus den bei Wong et al. relativ schnell aufeinander folgenden Auftau-Einfrierschritten und dem mit 8 Tagen relativ kurz gewählten Untersuchungszeitraum zu erklären.

Ein Vergleich zwischen Lagerung in Glas- und Polystyrolröhrchen wurde bereits 1986 von Christophersen et al. [4] in aufdotiertem Vollblut und in authentischen THC-Proben (ebenfalls Vollblut) über einen Zeitraum von 4 Wochen vorgenommen, nachdem die aufdotierten Proben zunächst vier Tage bei Raumtemperatur gelagert worden waren. Dabei schwankte die THC-Konzentration der authentischen Proben bei Lagerung in Polystyrol zwischen 0 und 87% bezogen auf dieselbe Probe gelagert in Glas. In einigen Proben war selbst der interne Standard nicht mehr detektierbar (dies weist auf eine Veränderung der Probe durch Eintrag von Störsubstanzen hin). Dass in unserer Studie für beide Lagermaterialien annähernd dieselbe Konzentrationsänderung sowohl für THC als auch für beide Metabolite festgestellt werden konnte, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit an einer abweichenden Zusammensetzung des bei der Herstellung der Röhrchen verwendeten Polystyrolmaterials (Weichmacher, Polymerisationsstarter, etc.). Zudem wurde kein Vollblut sondern Serum verwendet.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung:

Die vorliegenden Untersuchungen zur Lagerstabilität (2 Jahre bei -18°C) von THC, 11-OH-THC und THC-COOH zeigen einen dynamischen Prozess der Probenalterung, bei welchem offenbar Auf- und Abbau der einzelnen Analyte ineinandergreifen. Für THC konnte eine durchschnittliche Konzentrationsabnahme im Mittel um ca. 19% bei gleichzeitigem leichtem Konzentrationsanstieg für 11-OH-THC um durchschnittlich ca. 9% festgestellt werden. Hier spielt vermutlich sowohl die Spaltung des 11-OH-THC-Etherglucuronids als auch die Oxidation von THC zu 11-OH-THC eine Rolle. Die THC-COOH-Konzentration stieg ebenfalls an (im Mittel um ca. 21%). Eine Erklärung für diesen Sachverhalt ist vermutlich im Abbau des hydrolyselabilen THC-COOH-Glucuronids zu sehen. Zusätzlich wäre auch eine Oxidation von 11-OH-THC zur THC-Carbonsäure denkbar.

Die Untersuchungen zeigen, dass bei der Interpretation von Ergebnissen einer Nachanalyse erhöhte Aufmerksamkeit geboten ist. Eine Beeinflussung der Messergebnisse durch Ab- oder Umbau der Analyte während der Lagerung kann nicht ausgeschlossen werden und sollte ggf. im Kontext der verwendeten Abnahme- bzw. Lagerungs-Systeme berücksichtigt werden. Für THC können erheblich niedrigere Werte erhalten werden (z. B. kann ein im Sinne des §24a StVG „positives“ Messergebnis in der Nähe des Entscheidungsgrenzwerts bei einer Nachanalyse negativ ausfallen). Eine weitere Folge ist die Beeinflussung der Ergebnisse bei Betrachtung der Modelle I und II nach Huestis [13] zur Abschätzung des Zeitpunktes des letzten Cannabiskonsums. Insbesondere bei Modell II, welches als zweiten Parameter

zusätzlich die THC-COOH-Konzentration berücksichtigt, kann der Abbau von THC bei gleichzeitiger Zunahme von THC-COOH (Spaltung des labilen THC-COOH-Glucuronids) zu einer erheblichen Verfälschung des abgeschätzten letzten Konsumzeitpunkts führen, der ohnehin schon mit einer ausgesprochen hohen Unsicherheit behaftet ist. Auch bei Anwendung des „Cannabis Influence Factor“ (CIF) nach Daldrup [14] zur Bewertung hinsichtlich des Vorliegens einer „absoluten Fahrunsicherheit“ kann es durch Konzentrationsänderungen bei einer Nachanalyse zu erheblichen Verzerrungen kommen (auch der CIF wird ohnehin kontrovers diskutiert).

Die Untersuchung der Analytstabilität nach mehreren Einfrier-Auftauzyklen ergab sowohl für THC als auch für 11-OH-THC eine signifikante Konzentrationsabnahme. Einfrier-Auftauzyklen beschleunigen somit den Abbau der Analyten und sollten daher so weit wie möglich vermieden werden. Ist ein mehrmaliges Einfrieren/Auftauen unumgänglich, sollten die Ergebnisse gegebenenfalls kritisch beurteilt und im Gutachten ein Hinweis auf diesen Sachverhalt gegeben werden. THC-COOH zeigte auch nach mehrmaligem Einfrieren/Auftauen keine signifikante Konzentrationsänderung. Hierfür ist vermutlich ein Gleichgewicht zwischen Abbau von THC-COOH und Neubildung durch Spaltung des THC-COOH-Glucuronids verantwortlich.

Bei Vergleich von Lagerung in Glas- und Polystyrolröhrchen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Materialien festgestellt werden. Eine etwaige Adsorption an die Oberfläche des verwendeten Lagermaterials ist nach dieser Zeitspanne somit für Glas und Polystyrol entweder nicht zu beobachten oder ähnlich stark ausgeprägt. Diese Erkenntnis ermöglicht die Umstellung auf das wesentlich günstigere und weniger berstanfällige Produkt ohne dass es dabei zu Qualitätseinbußen kommt.

Die vorliegenden Untersuchungen und der Vergleich mit bereits publizierten Ergebnissen zur Stabilität von Cannabinoiden bei längerfristiger Lagerung zeigen, dass es wichtig und sinnvoll ist, die selbst im Labor verwendeten Behältersysteme auf ihre Eignung in Bezug auf Analytstabilität zu untersuchen. Die Übertragbarkeit von Ergebnissen solcher Studien muss kritisch geprüft werden, da – wie im Diskussionsteil beschrieben – auch bei Verwendung des gleichen Polymermaterials, in Abhängigkeit von der Gesamtzusammensetzung und Verarbeitung, erhebliche Unterschiede auftreten können.

6. Danksagung

Die Autoren danken Frau Kathrin Riedy für ihre Unterstützung bei der Probenvorbereitung und Frau Gisela Skopp für wertvolle Diskussionsbeiträge.

7. Literatur

- [1] Pfeiffer T, Kipke I, Flöter S, Karachaliou K, Lieb C, Raiser P. Bericht 2010 des nationalen REITOX-Knotenpunkts an die Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht: Drogensituation 2009/2010. IFT Institut für Therapieforchung, Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung, Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen.
- [2] Grotenhermen F. Cannabis und Cannabinoide - Pharmakologie, Toxikologie und Therapeutisches Potential, 2. Aufl. Hans Huber, Bern, 2004.
- [3] 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.
- [4] Christophersen AS. Tetrahydrocannabinol stability in whole blood: plastic versus glass containers. J Anal Toxicol 1986;10:129-131.

- [5] Dugan S, Bogema S, Schwartz RW, Lappas NT. Stability of drugs of abuse in urine samples stored at -20 °C. *J Anal Toxicol* 1994;18:391-396.
- [6] Roth KD, Siegel NA, Johnson RW, Jr., Litauszki L, Salvati L, Jr., Harrington CA, Wray LK. Investigation of the effects of solution composition and container material type on the loss of 11-nor-delta 9-THC-9-carboxylic acid. *J Anal Toxicol* 1996;20:291-300.
- [7] Moody DE, Monti KM, Spanbauer AC. Long-term stability of abused drugs and antiabuse chemotherapeutical agents stored at -20°C. *J Anal Toxicol* 1999;23:535-540.
- [8] Skopp G, Potsch L. An investigation of the stability of free and glucuronidated 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in authentic urine samples. *J Anal Toxicol* 2004;28:35-40.
- [9] Brand GmbH & Co. Kg. Werkstoffe: Allgemeine Eigenschaften. <http://www.brand.de/de/wissen/werkstoffe-kunststoff/eigenschaften/>. abgefragt am 02.11.2010
- [10] Stamm D. A new concept for quality control of clinical laboratory investigations in the light of clinical requirements and based on reference method values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982;20:817-824.
- [11] Toennes SW, Kauert GF. Importance of vacutainer selection in forensic toxicological analysis of drugs of abuse. *J Anal Toxicol* 2001;25:339-343.
- [12] Peters FT. Stability of analytes in biosamples - an important issue in clinical and forensic toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2007;388:1505-1519.
- [13] Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood cannabinoids. II. Models for the prediction of time of marijuana exposure from plasma concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol (THCCOOH). *J Anal Toxicol* 1992;16:283-290.
- [14] Grotenhermen F. Cannabis, Straßenverkehr und Arbeitswelt, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 2002.