

Summary of the PhD Thesis as Thank You for the GTFCh Travel Fund for Presenting at the 2011 SOFT-TIAFT Meeting in San Francisco (CA)

## Pharmakokinetik und Metabolismus von $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA) im Menschen

Ariane Wohlfarth

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

### 1. Einleitung

Cannabis, ein jahrtausendealtes Rausch- und Heilmittel, stellt die forensische Toxikologie noch immer vor ein bis heute nicht zufriedenstellend gelöstes Problem - den sicheren Beweis eines akuten Rauscheffektes anhand von einzelnen Blutbefunden. In zahlreichen Situationen, insbesondere bei Straßenverkehrsdelikten, ist eine gerichtsfeste Aussage über eine Beeinflussung durch Cannabiskonsum jedoch von großem Interesse und auch außerhalb der Forensik besteht Bedarf an einer eindeutigen Interpretation analytischer Befunde, z. B. bei Urinkontrollen im Leistungssport. Der Cannabis-Hauptwirkstoff Tetrahydrocannabinol (THC) und seine zwei Hauptmetabolite (11-Hydroxy-THC und THC-Carbonsäure) sind zwar problemlos nachweisbar, jedoch führt die komplexe Pharmakokinetik von THC dazu, dass die gemessenen Konzentrationen nicht eindeutig mit einem akuten Effekt korreliert werden können [1]. Als Grund hierfür wird vor allem die Akkumulation von THC und seinen Metaboliten in tieferen Kompartimenten angesehen [2]. Einige Modelle, die den Versuch unternehmen, anhand von Serumkonzentrationen (THC und THC-Carbonsäure) auf den Konsumzeitpunkt und damit auf den aktuellen Grad der Beeinflussung zu schließen, wurden bereits entwickelt [3-5]. Doch war bisher keines dieser Modelle valide genug für forensisch sinnvoll verwertbare Aussagen.

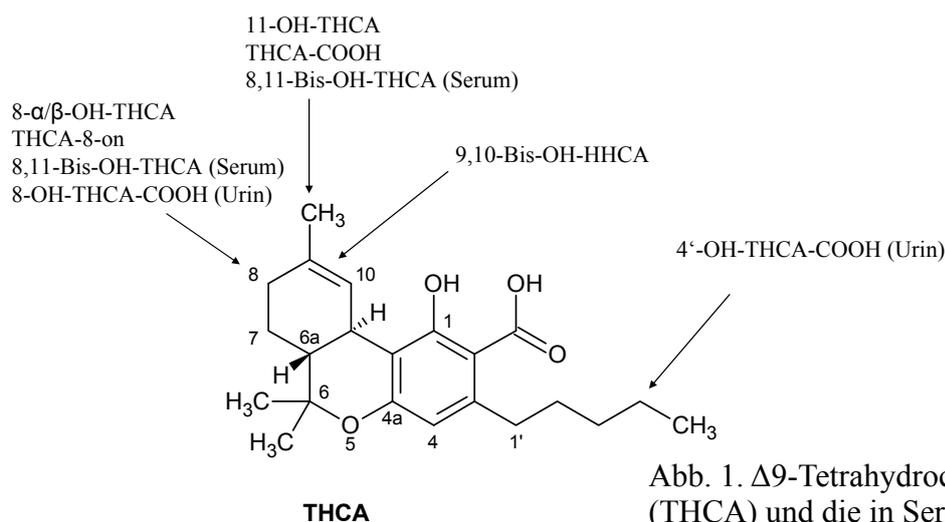


Abb. 1.  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA) und die in Serum bzw. Urin nachgewiesenen Phase-1-Metaboliten.

Aus den Ergebnissen vorangegangener Forschungsprojekte ergab sich die Vermutung, dass Tetrahydrocannabinolsäure A (THCA, Abb. 1), die nicht psychoaktive Vorläufersubstanz von THC in der Cannabispflanze, bei der Lösung dieses Problems behilflich sein könnte. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass THCA eine von THC abweichende Pharmakokinetik

besitzt, die zu einem schnellen Abbau, einer relativ kurzen Nachweisbarkeit und einem damit verkleinerten Zeitfenster für den zurückliegenden Cannabiskonsum führen würde [6]. Über den Umweg, mit Hilfe von THCA den Zeitpunkt des Cannabiskonsums genauer zu ermitteln, ließe sich dann ein akuter Effekt besser abschätzen. Um diese These zu überprüfen, sind umfangreiche Kenntnisse zu Pharmakokinetik und Metabolismus von THCA Voraussetzung. Diese aufzuklären war das Ziel der Doktorarbeit, ihr Kernstück eine Humanstudie mit intravenöser und oraler Applikation von THCA.

## 2. Methoden

Im Vorfeld der Studie waren einige Vorarbeiten erforderlich: Um auf Enzymaktivitäten beruhende Unterschiede in der Pharmakokinetik zu erkennen, wurde zunächst eine Phänotypisierungsmethode für die fünf CYP-Isoenzyme 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 entwickelt. Neben der Auswahl der Testsubstanzen, die als Cocktail verabreicht wurden, der Phänotypisierungsindices und eines Probennahmeschemas umfasste dieser Schritt auch die Entwicklung und Validierung einer effektiven Aufbereitungsmethode und einer empfindlichen Analysenmethode für die Testsubstanzen bzw. deren Metabolite. Die für die Humanstudie benötigte THCA wurde mittels Flash-Chromatographie aus Cannabisrohmaterial isoliert. Mit zwei voneinander unabhängigen Systemen konnte schließlich hochreine THCA (Reinheit > 98,5%) gewonnen werden, die zur Herstellung der Prüfpräparate diente. Als Grundlage für die intravenöse Applikation der lipophilen und thermoinstabilen THCA erwies sich eine parenterale Fettemulsion als geeignet. Letzter Schritt war die Entwicklung einer ESI-LC-MS/MS-Methode zum selektiven und empfindlichen Nachweis von THCA und ihren Metaboliten sowie die Validierung der Quantifizierungsmethode für THCA. Im Fokus standen die Optimierung der Probenaufbereitung mittels Proteinfällung und eine kurze Analysendauer.

Im Rahmen der klinischen Studie erhielten sechzehn Probanden die Testsubstanz THCA zuerst oral in Form einer Kapsel (10 mg) und zwei Wochen später intravenös als Emulsion (5 mg). Blutproben wurden in festgelegten Intervallen bis zu 96 Stunden und Urinproben *ad libitum* abgegeben. Zwischen beiden Studienabschnitten wurden die Probanden phänotypisiert und in der DNA-Abteilung des Instituts zusätzlich genotypisiert. Um herauszufinden, welche Isoenzyme in erster Linie für den THCA-Metabolismus verantwortlich sind, wurden in Kooperation mit dem Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie in Homburg *in vitro* Versuche mit einzelnen Isoenzymen bzw. humanen Lebermikrosomen durchgeführt.

Im Anschluss daran erfolgte eine pharmakokinetische Analyse der THCA-Serumbefunde gemäß den Prinzipien der Kompartiment- und Nicht-Kompartimentanalyse, mit der erstmals grundlegende pharmakokinetische Parameter der THCA (AUC, Clearance, Verteilungsvolumina, Halbwertzeiten sowie Makro- und Mikrokonstanten des Kompartimentmodells) bestimmt werden konnten. Außerdem wurden die am Metabolismus beteiligten Enzyme sowie Haupt- und Nebenmetabolite in Serum und Urin identifiziert. Zum Schluss wurden die aus der Phänotypisierungsstudie ermittelten Phänotypisierungsindices mit einigen der berechneten pharmakokinetischen Parameter korreliert und statistisch untersucht.

## 3. Resultate

Erwartungsgemäß zeigten die Probanden nach intravenöser Bolusgabe sehr ähnliche Konzentrations-Zeit-Kurven von THCA im Serum (Abb. 2). Ausgehend von der Maximalkonzentration 5 min nach der Applikation (dem Zeitpunkt der ersten Blutabnahme) fielen die THCA-Konzentrationen kontinuierlich ab, allerdings sanken sie nur bei drei

Probanden innerhalb des 96-stündigen Beobachtungszeitraums auf einen Wert unterhalb der Nachweisgrenze von 0,1 ng/mL. Bei allen anderen Probanden waren bis zur letzten Probe noch geringe Konzentrationen zwischen Nachweis- und Bestimmungsgrenze (0,1 bis 1,0 ng/mL) festzustellen. Im Urin fanden sich nur minimale THCA-Mengen. Eine Umwandlung *in vivo* von THCA zu THC im Körper fand nicht statt. Die THC-Spuren im Serum, die in den ersten abgenommenen Proben detektiert werden konnten, waren so gering, dass sie problemlos mit der Verunreinigung in der isolierten THCA erklärt werden können.

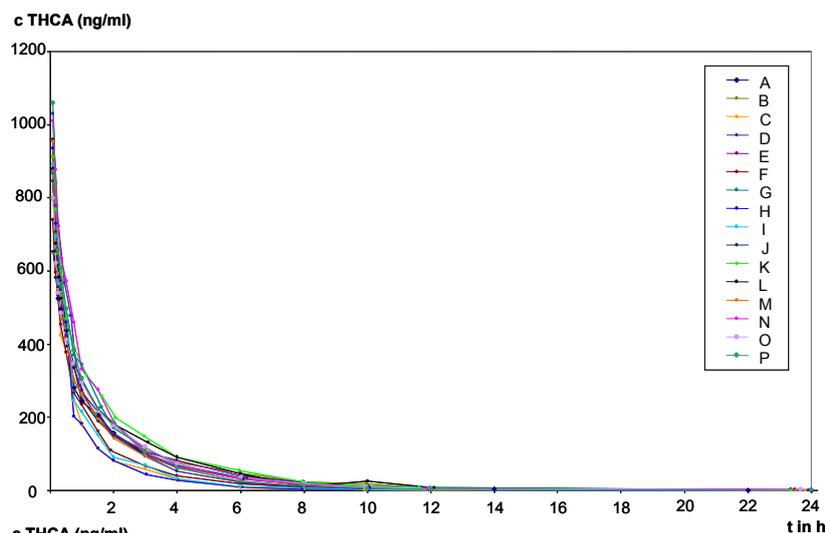


Abb. 2. Konzentrations-Zeit-Kurven für THCA im Serum nach intravenöser Gabe von 5 mg THCA, für eine markantere Darstellung wurde nur der Zeitraum von 0 bis 24 h abgebildet.

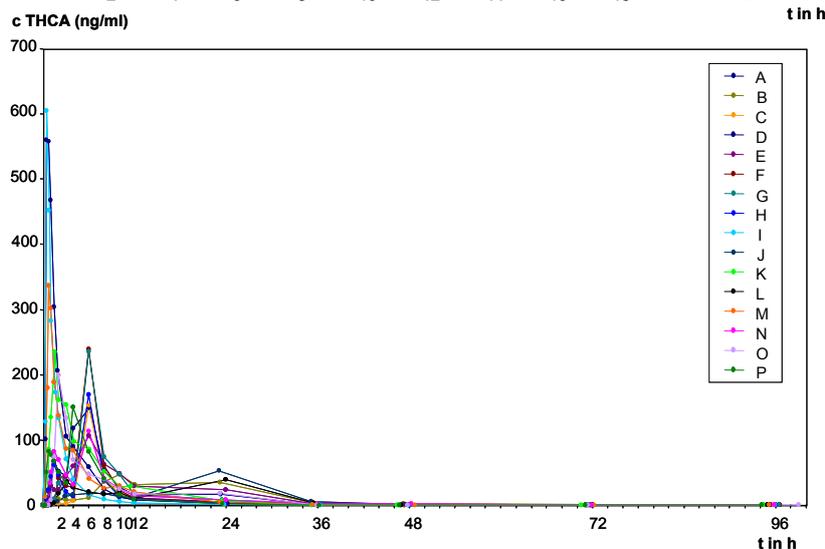


Abb. 3. Konzentrations-Zeit-Kurven für THCA im Serum nach oraler Gabe von 10 mg THCA über den gesamten Beobachtungszeitraum von 0 bis 96 h.

Wie in Abbildung 3 erkennbar ist, war die Resorption der THCA nach oraler Gabe starken Schwankungen unterworfen. Drei Probanden zeigten bereits nach 30 bis 45 min Maximalkonzentrationen, der Großteil nach ungefähr 1,5 bis 6 h und drei Probanden erst nach 10 bzw. 24 h. Die zeitlich nach hinten verschobenen Konzentrationsmaxima deuten auf eine stark verzögerte Freisetzung der THCA aus der Kapsel hin, was an der schlechteren Löslichkeit der Gelatine kapsel bei höheren pH-Werten gelegen haben könnte. Es ist allerdings anzunehmen, dass in der Realität die Aufnahme von THCA nach oraler Applikation ebenfalls variabel sein wird, vermutlich jedoch nicht in diesem Ausmaß.

Die Kompartimentanalyse der Konzentrations-Zeit-Daten im Serum nach intravenöser Applikation ergab, dass die Pharmakokinetik von THCA sehr gut durch ein Drei-Kompartiment-Modell beschrieben werden kann. Es existiert demzufolge ein drittes, tiefes Kompartiment, in dem THCA akkumuliert und schließlich mit einer langen Halbwertszeit eliminiert

wird. Die auf Grundlage der semiquantitativen Werte in der terminalen Eliminationsphase ermittelte Halbwertszeit beträgt ungefähr  $66 \pm 24$  h und ist damit sehr lang. Die meisten pharmakokinetischen Parameter – das scheinbare initiale Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment, die Eliminationshalbwertszeit in der  $\beta$ -Phase, die mittlere Verweilzeit und das Verteilungsvolumen im Steady State – ähneln prinzipiell denen von THC und widerlegen damit die These, dass sich THCA pharmakokinetisch grundlegend anders als THC verhält. Der einzige fundamentale Unterschied zu THC liegt in der Plasmaclearance, die für THCA um Faktor 10 geringer ist. Die niedrigere Plasmaclearance lässt auf eine niedrigere Metabolisierungsaktivität und damit einen geringeren First-Pass-Effekt schließen, der als Ursache der relativ hohen oralen Bioverfügbarkeit von  $\sim 40$  % angesehen werden kann. Die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab. 1. Zusammenfassung der wichtigsten pharmakokinetischen Parameter der Nicht-Kompartimentalanalyse und der Kompartimentalanalyse (AUC = area under the curve,  $c_0$  = fiktive Konzentration zum Zeitpunkt 0,  $V_z$  = Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment, CL = Clearance,  $t_{1/2\alpha}$ ,  $t_{1/2\beta}$ ,  $t_{1/2\gamma}$  = Halbwertszeiten der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phase,  $V_{ss}$  = Verteilungsvolumen im Steady State, MRT = mean residence time); Angabe der Minimal- und Maximalwerte, Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD).

|                                   | Nicht-Kompartimentalanalyse  |            |      |     | Kompartimentalanalyse |      |      |
|-----------------------------------|------------------------------|------------|------|-----|-----------------------|------|------|
|                                   | Einheit                      | Bereich    | MW   | SD  | Bereich               | MW   | SD   |
| <b>AUC</b>                        | $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ | 698 – 1359 | 1107 | 210 | 673 – 1406            | 1100 | 208  |
| <b><math>c_0</math></b>           | $\mu\text{g/L}$              | 715 - 1336 | 1024 | 141 | 691 – 1094            | 944  | 116  |
| <b><math>V_z</math></b>           | L                            | 3,7 – 5,9  | 5,0  | 0,7 | 4,6 – 7,2             | 5,4  | 0,7  |
| <b>CL</b>                         | ml/min                       | 57 - 119   | 75   | 17  | 59 – 124              | 79   | 18   |
| <b><math>t_{1/2\alpha}</math></b> | h                            |            |      |     | 0,18 – 0,52           | 0,31 | 0,09 |
| <b><math>t_{1/2\beta}</math></b>  | h                            | 1,2 – 2,3  | 1,7  | 0,3 | 1,28 – 2,45           | 1,80 | 0,36 |
| <b><math>t_{1/2\gamma}</math></b> | h                            |            |      |     | 24 – 112              | 66   | 24   |
| <b><math>V_{ss}</math></b>        | L                            | 9,2 – 21,0 | 14,3 | 3,9 | 9,5 - 110             | 31,6 | 25,5 |
| <b>MRT</b>                        | h                            | 1,3 – 4,5  | 3,1  | 0,8 | 1,3 – 19,8            | 6,8  | 5,0  |

Es bestätigte sich, dass der Metabolismus von THCA analog zum Metabolismus von THC verläuft, da die Phase-1-Reaktionen an den gleichen Positionen im Molekül stattfinden (Abb. 1) wie bei THC und auch die Glucuronidierung nach demselben Muster wie bei THC erfolgt [7, 8]. Der einzige Unterschied besteht darin, dass THCA selbst bereits an der Carboxylfunktion an Position 2 glucuronidiert werden kann. Hauptmetabolite im Serum sind 11-Hydroxy-THCA, THCA-8-on und THCA-Carbonsäure-Glucuronid (mit einem ausgeprägtem Konzentrationsmaximum kurz nach der Applikation), THCA-Carbonsäure (mit einem flacheren, nach hinten verschobenen Maximum) sowie 9,10-Bis-Hydroxy-Hexahydrocannabinolsäure A (ohne ausgeprägtes Maximum, aber kontinuierlich messbar über einen längeren Zeitraum, z. T. bis zur letzten Probe nach 96 h). Diese Profile wurden zuerst aus den Daten der intravenösen Applikation gewonnen und bestätigten sich prinzipiell für die orale Applikation. Wie zu erwarten war, liegen die Hauptmetabolite im Urin vor allem als Glucuronide vor. Die intensivsten Signale lieferten THCA-Carbonsäure-Glucuronid, 11-Hydroxy-THCA-Glucuronid sowie 8- und 4'-Hydroxy-THCA-Carbonsäure-Glucuronid. Interessanterweise findet sich wie im Serum häufig und oft bis zur letzten abgegebenen Urinprobe unglucuronidierte 9,10-Bis-Hydroxy-Hexahydrocannabinolsäure A.

In den *in vitro* Versuchen stellte sich heraus, dass THCA vor allem von drei CYP 450-Isoenzymen umgesetzt wird. CYP 2C9 katalysiert die Hydroxylierung zum Hauptmetaboliten 11-Hydroxy-THCA sowie zu 8 $\alpha$ -Hydroxy-THCA. Im Inkubat mit CYP 3A4 fanden sich eine Reihe verschiedener Hydroxymetabolite: Das intensivste Signal zeigte 8 $\beta$ -Hydroxy-THCA, kleinere Peaks waren für 11-Hydroxy-THCA, 9,10-Bis-Hydroxy-Hexahydrocannabinolsäure A, 8,x-Bis-Hydroxy-THCA (die Lokalisation der zweiten Hydroxylgruppe ist nicht bekannt) und einen unbekanntem, wahrscheinlich monohydroxylierten Metaboliten zu erkennen. CYP 2C19, das wie CYP 2C9 ebenfalls die Reaktion zu 8 $\alpha$ -Hydroxy-THCA katalysiert, spielte im Vergleich zu den beiden erstgenannten Isoenzymen nur eine untergeordnete Rolle.

Die statistische Analyse von möglichen Korrelationen einzelner Phänotypisierungsindices mit THCA-Clearances konnte einen Einfluss verschiedener Enzymaktivitäten für CYP 3A4 bestätigen (Signifikanzniveau 5 %). Für die anderen Phänotypisierungsindices ergaben sich keine solche Korrelationen. Gründe hierfür sind entweder in der geringen Probandenzahl, die zu klein für Aussagen mit statistischer Signifikanz bei nur geringen Effekten war, oder in der Tatsache, dass die Enzyme ausgleichend „einsprangen“ und Einzeleffekte sich an dem alle Abbauprozesse einschließenden Parameter Clearance nicht mehr erkennen ließen, zu sehen.

#### 4. Schlussfolgerungen

Die Akkumulation der THCA in einem tiefen Kompartiment ist der Hauptgrund dafür, dass THCA allein wahrscheinlich nicht als Kurzzeitmarker für Cannabiskonsum und auch nicht zur Unterscheidung von gelegentlichem und chronischem Konsum geeignet sein wird. Um diese Frage allerdings endgültig zu klären, müsste den Probanden mehrfach und in kurzen Zeitintervallen eine Dosis THCA verabreicht werden. Verlängert sich die Nachweisbarkeitsdauer und akkumulieren die Konzentrationen (wie nach den vorliegenden Ergebnissen zu erwarten wäre), muss man davon ausgehen, dass die gleichen Phänomene und Probleme wie bei THC auftreten, nämlich eine Anreicherung der lipophilen Substanz in tiefen Kompartimenten und eine noch tage- bis wochenlang andauernde Rückverteilung nach Abstinenzbeginn.

Wahrscheinlich wird sich die Suche nach einer Substanz, die als alleiniger Marker für einen kurz zurückliegenden Cannabiskonsum in der Forensischen Toxikologie eingesetzt werden kann, weiterhin schwierig gestalten. Denn es bleibt fragwürdig, ob eine einzelne Substanz jemals diese Markerfunktion zufriedenstellend, präzise und sicher ausfüllen kann – zu verschieden sind die individuellen Konstitutionen, das Konsumverhalten und die Zusammensetzung der Cannabisprodukte.

Neue Chancen könnte eine anders ausgerichtete Strategie bieten: Es gibt mittlerweile mehrere Ansätze verschiedener Forschergruppen, die Cannabisinhaltsstoffe oder -metabolite auf ihre Aussagekraft bezüglich dieser Fragestellung untersucht haben und feststellen konnten, dass einige nur kurz nach dem Konsum nachweisbar sind. Eine hundertprozentige Sicherheit, anhand dieser Substanzen einen korrekten Konsumzeitpunkt zu errechnen, gab es bisher nicht.

Es würde sich jedoch der Versuch lohnen, das Spektrum der gemessenen Cannabinoide in den Proben von verdächtigen Straßenverkehrsteilnehmern, Leistungssportlern oder Straftätern zu erweitern, nachdem in kontrollierten Studien eine erhöhte Aussagesicherheit gezeigt werden konnte. Dann könnte man durch Vergleich mit bekannten Konzentrations-Zeit-Profilen und gemessenen Konzentrationen nicht nur einer Substanz, sondern möglicherweise von zehn, fünfzehn oder zwanzig typischen sekundären Cannabisinhaltsstoffen und nachrangig gebildeten Abbauprodukten erheblich präzisere Aussagen über den Konsumzeitpunkt treffen. In dieses Substanzspektrum könnten Metaboliten der THCA wie THCA-Glucuronid, 8 $\alpha$ - bzw. 8 $\beta$ -Hydroxy-THCA, 8,11-Bis-Hydroxy-THCA sowie 8- bzw. 4'-Hydroxy-THCA-Carbon-

säure-Glucuronid, die sich bei allen Probanden nur kurz nach der Applikation nachweisen ließen, eingeschlossen werden.

## 5. Danksagung

Vielen Dank an die GTFCh für die großzügige und unkomplizierte finanzielle Unterstützung der Reise zum 49. Jahrestreffen der TIAFT in San Francisco 2011!

## 6. Referenzen

- [1] Hollister LE, Gillespie HK, Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S. Do plasma concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol reflect the degree of intoxication? *J Clin Pharmacol* 1981;21:171S-177S.
- [2] Huestis MA. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers* 2007;4:1770-1804.
- [3] Huestis MA, Barnes A, Smith ML. 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.
- [4] Huestis MA, Elsohly M, Nebro W, Barnes A, Gustafson RA, Smith ML. Estimating time of last oral ingestion of cannabis from plasma THC and THCCOOH concentrations. *Ther Drug Monit* 2006;28:540-544.
- [5] Huestis MA, Henningfield JE, Cone EJ. Blood Cannabinoids. I. Absorption of THC and Formation of 11-OH-THC and THCCOOH During and After Smoking Marijuana. *Journal of Analytical Toxicology* 1992;16:276-282.
- [6] Jung J. *delta9-Tetrahydrocannabinolsäure A - ein neuer Cannabis-Konsum-Marker*. Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität, 2009, pp.
- [7] Lambert DME. *Cannabinoids in Nature and Medicine*. Zürich: VHCA, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich und Wiley-VHC, Weinheim, 2009,
- [8] Matsunaga T, Iwawaki Y, Watanabe K, Yamamoto I, Kageyama T, Yoshimura H. Metabolism of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol by cytochrome P450 isozymes purified from hepatic microsomes of monkeys. *Life Sciences* 1995;56:2089-2095.

Die vollständige Dissertation ist online veröffentlicht unter: <http://www.freidok.uni-freiburg.de/volltexte/8504/>.