

Univerzita Karlova v Praze

1. Lékařská fakulta, Ústav soudního lékařství a toxikologie

**Stanovení delta-9-tetrahydrokanabinolu a  
jeho metabolitu  
11-nor-tetrahydrokanabinol-karboxylové  
kyseliny v krevním séru specifickou  
chromatografickou metodou s hmotnostní  
spektrometrií**

*Certifikovaná metodika*

**Marie Balíková, Tomáš Hložek**

**Praha, říjen, 2015**

**Dedikace:**

**Certifikovaná metodika byla zpracována za finanční podpory Ministerstva vnitra České republiky v rámci řešení projektu VG20122015080 „Vytvoření standardů pro zjišťování míry ovlivnění řidičů po užití konopných drog: hodnocení hladin kanabinoidů v krvi s ohledem na dobu užití, psychomotorický výkon, vigilitu a ovlivnění aktivity mozku“.**

**© Balíková M., Hložek T.**

## **OBSAH**

- 1. Cíl a oblast uplatnění certifikované metodiky v praxi**
- 2. Teoretický úvod**
- 3. Popis metodiky**
  - 3.1. Princip zvolené GC/MS metody pro stanovení kanabinoidů v séru
  - 3.2. Přístroje a laboratorní pomůcky
  - 3.3. Chemikálie a spotřební materiál
  - 3.4. Příprava a skladování roztoků referenčních standardů
  - 3.5. Příprava matricových referenčních vzorků kalibračních a kontrolních
  - 3.6. Příprava vzorku séra pro GC/MS analýzu kanabinoidů
  - 3.7. Vlastní GC/MS analýza vzorků
  - 3.8. Identifikace a kvantifikace THC a THCOOH v séru
- 4. Pracovní charakteristika metody – validační parametry**
  - 4.1. Kalibrační rozsah a linearita
  - 4.2. Mez stanovitelnosti (LOQ)
  - 4.3. Přesnost stanovení hladin v séru
  - 4.4. Správnost stanovených hodnot v séru
- 5. Novost metodiky**
- 6. Hygienické a bezpečnostní požadavky**
- 7. Ekonomické aspekty**
- 8. Seznam související literatury**
- 9. Seznam publikací, které předcházely metodice**
- 10. Přílohy 1 až 4**

## 1. Cíl a oblast uplatnění certifikované metodiky v praxi

Dílčím cílem projektu VG20122015080 podporovaného Ministerstvem vnitra České republiky bylo vyvinout, optimalizovat a validovat specifickou toxikologickou metodu vhodnou pro stopovou analýzu psychotropní látky delta-9-tetrahydrokanabinolu (THC) vedle jeho inaktivního metabolitu 11-nor-delta-9-tetrahydrokanabinol-karboxylové kyseliny (THCOOH) v krevním séru, která může být aplikována ve forenzní praxi v souvislosti s kontrolou návykových látek v krvi řidičů při řízení motorových vozidel, popř. i v jiných souvislostech - např. při kontrole výkonu povolání. K tomuto účelu byla zvolena separační metoda plynové chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) jako metoda v současné době pro tyto účely nejpoužívanější, i když stejným účelům může také vyhovovat i jiná specifická metoda, pokud splňuje požadovaná kritéria na její aplikaci, tj. má dostatečnou specifitu pro identifikaci individuálních analytů a dostatečnou citlivost a přesnost pro stanovení jejich koncentrací v krevním vzorku. Takovou alternativní metodou může být např. kapalinová chromatografie v tandemu s hmotnostní detekcí (LC/MS).

Vypracovaná metodika bude zveřejněna a doporučena laboratořím soudní toxikologie k použití při specifickém toxikologickém vyšetření kanabinoidů v krevním vzorku řidiče v návaznosti na „Metodický pokyn pro postup při toxikologickém vyšetření specifikovaných návykových látek v krvi a nebo v moči“ (viz Věstník MZ ČR 9/2012) a v návaznosti na praktickou aplikaci novely zákona o provozu na pozemních komunikacích v ČR 233/2013 Sb. a Nařízení vlády 41/2014 Sb.

## 2. Teoretický úvod

V oblasti abuzu návykových látek patří konopné drogy mezi nejvíce zneužívané ve světě, v Evropě i v ČR. Popularita užívání konopných drog je všeobecně známa a problematické užívání se týká také některých řidičů před i v průběhu jízdy. Dne 17. 8. 2013 nabyla v ČR účinnost novela zákona o provozu na pozemních komunikacích ve znění zákona 233/2013 Sb. odkazující na Nařízení vlády 41/2014 Sb., kde byly specifikovány často zneužívané návykové látky a jejich mezní koncentrační hodnoty v krevním vzorku, při jejichž překročení se řidič považuje za ovlivněného vyjmenovanou návykovou látkou. Pro psychotropní látku delta-9-tetrahydrokanabinol (THC) obsaženou v konopných drogách (marihuana, hašiš) byla na základě odborné shody v toxikologické obci doporučena mez v krevním séru 2 ng/ml jako optimum mezi přílišnou benevolencí a přílišnou přísností a ta byla také převzata do zákonné normy. Zavedení zmíněné právní domněnky má za cíl eliminovat ze silničního provozu řidiče pod vlivem návykové látky, zefektivnit přestupkové řízení a také preventivně zvýšit respekt řidičů k zákazu užívání návykových látek a řízení pod vlivem.

Po konzumaci drogy se THC v organismu oxiduje na svůj přechodný ekvipotentní metabolit 11-hydroxy-tetrahydrokanabinol (OH-THC), který je dále poměrně rychle transformován na hlavní metabolit 11-nor-delta-9-tetrahydrokanabinol-karboxylovou kyselinu (THCOOH), který je inaktivní. Po jednorázové dávce mateřská forma THC z krve během několika mála hodin mizí ve prospěch narůstající koncentrace metabolitu THCOOH. Při chronickém užívání dochází k akumulaci v tukových tkáních a postupnému zpětnému uvolňování do krve, takže lze detekovat zejména THCOOH v krvi i při dlouhodobé abstinenci.

Současné vědecké poznatky o vlivu kanabinoidů na řízení se opírají o studie jak experimentální tak i epidemiologické. Epidemiologická data ukazují, že riziko dopravní nehody se zvětšuje po kouření kanabis a vzrůstá s vyšší krevní koncentrací a s vyšší dávkou psychotropní složky THC. Souběžné užívání kanabis a alkoholu rizika dopravní nehody podstatně zvyšuje. Experimentální data ukazují, že řidiči se sice po dávce THC snaží jet pomaleji, opatrněji, ale hůře udržují pozornost a reagují pomaleji na náhlé kritické situace. U chroniků se vyvíjí tolerance k účinkům THC s částečnou behaviorální

korekcí akutního deficitu, ale přesto i tito řidiči vykazují zhoršení v řešení náhlých složitých dopravních situací a je u nich znám také vývoj psychotických reakcí. Z kinetických zákonitostí plyne, že v době řízení bývá krevní hladina THC u řidiče obvykle podstatně vyšší než hodnota stanovená v později odebraném krevním vzorku, např. s odstupem 1-2 hod. Po jednorázové dávce THC je vrchol euforie CNS zpožděn za vrcholem krevní hladiny THC a fyziologické a behaviorální efekty jsou tedy opožděny a přetrvávají déle, když už THC z krve mizí, a efekty se vrací k normálu během 3-5 hodin. U chronických uživatelů nastávají složité redistribuční děje díky akumulaci kanabinoidů v tukových tkáních, farmakokinetika je komplikovaná a z krevní hladiny nelze usuzovat na dobu poslední dávky. Silní pravidelní kuřáci marihuany si udržují jakousi permanentní krevní hladinu THC a krevní hodnoty inaktivního metabolitu THCOOH bývají u nich podstatně vyšší než u náhodných mírných kuřáků. Nicméně u chroniků i přes vývoj tolerance a snahy o částečnou kompenzaci deficitů je dokumentováno dlouhodobé nepříznivé ovlivnění neurokognitivních funkcí i při několika týdenní abstinenci i když krevní hladina THC nemusí už být dokazatelná.

Novelou zákona o provozu na pozemních komunikacích (233/2013 Sb.) a zavedením mezních hodnot (tzv. cut off hodnot) v krevním séru pro vybrané látky vč. THC dle Nařízení vlády 41/2014 Sb. se zjednodušilo dokazování ovlivnění řidiče návykovou látkou. Aplikace zákonem zavedené právní domněnky do forenzní praxe vyžaduje ovšem splnění základní nutné podmínky – předpokládá se, že je bezpečně prokázána a stanovena koncentrace vybrané návykové látky (např. THC) specifickou a dostatečně citlivou metodou (viz Metodický pokyn pro postup při toxikologickém vyšetření specifikovaných návykových látek v krvi nebo i v moči, Věstník MZČR 9/2012). To logicky vyžaduje specifikaci minimálních požadovaných parametrů validované toxikologické metody, pokud má být tato aplikována ve forenzní praxi na vyšetření návykových látek v krvi řidičů a vyhovovat účelu zákonných norem shora jmenovaných. Zatím chybějící specifikace minimálních požadovaných metodických parametrů pro tyto účely je předmětem této metodiky.

### **3. Popis metodiky**

#### **3.1. Princip zvolené GC/MS metody pro stanovení kanabinoidů v séru**

Při stanovení kanabinoidů v krevním séru řidičů je nutné rozlišovat stanovení psychotropní látky THC vedle majoritního inaktivního metabolitu THCOOH , což zvolená GC/MS metoda umožňuje. Analýza metodou GC/MS je vedena v režimu selektivního monitorování iontů (SIM) , protože obvykle jde o detekci stopové koncentrace THC v krevním vzorku. V metodě jde nejprve o jednoznačný průkaz přítomnosti THC vedle THCOOH na základě porovnání retenčních a spektrálních charakteristik obou analytů ve vzorku a v referenčním vzorku. V druhé fázi jde o stanovení koncentrací metodou vnitřního standardu, tj. odečet koncentrací obou analytů podle aktuální kalibrační závislosti založené na matričních kalibrátorech připravených extrakcí z blankového séra.

#### **3.2. Přístroje a laboratorní pomůcky**

- Laboratorní odstředivka
- Laboratorní sklo, odměrné baňky
- Analytické váhy
- Mikropipety
- Mikrostříkačky typu Hamilton
- Automatické dávkovače kapalin
- pH metr
- Kolonky SPE Bond Elut LRC-Certify (130 mg/10 ml)
- Odsávací vana pro SPE s vývěvou
- Evaporační zařízení
- Digestoř se zdrojem stlačeného vzduchu nebo dusíku
- Termostatovaná ohřevná deska
- Vialky a víčka
- GC-MS přístroj

#### **3.3. Chemikálie a spotřební materiál**

- Analytické referenční standardy THC, THCOOH
- Deuterované vnitřní standardy THC-D3, THCOOH-D3
- Blank sérum

- Methanol p. a.
- N-hexan p. a.
- Ethylacetát p. a.
- 0,1 M octan sodný pH 4
- 0,05 M kyselina fosforečná
- Derivatizační činidlo MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide)

#### **3.4. Příprava a skladování roztoků referenčních standardů**

Z referenčních analytických substancí THC a THCOOH a z jejich deuterovaných analogů se připraví zásobní methanolicke roztoky a jejich ředěním methanolem pracovní roztoky o potřebné koncentraci. Zásobní i pracovní roztoky se skladují zamražené při – 20° C.

#### **3.5. Příprava referenčních matricových vzorků kalibračních a kontrolních**

Referenční vzorky potřebné pro kalibrační a kontrolní účely jsou založeny na vhodné blankové sérové matrici obohacené malými přídávky methanolicke roztoků referenčních standardů THC a THCOOH a jejich deuterovaných analogů tak, aby bylo pokryto koncentrační rozmezí obou analytů v intervalu 0 až 100 ng/ml séra. Referenční matricové vzorky kalibrační i kontrolní se zpracovávají stejným způsobem jako vlastní vzorky sér. Objem referenčního vzorku séra je 1 ml, příravek vnitřního standardu THC-D3 je 50 ng a druhého vnitřního standardu THCOOH-D3 rovněž 50 ng stejně jako u vzorku. Pro účely kalibrace se připraví kalibrátory obohacením validovaného blankového séra pomocí odstupňovaných přídávků pracovních methanolicke roztoků THC a THCOOH tak, aby byla dosažena výsledná koncentrace obou analytů v séru 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/ml. Vedle toho se také připraví kontrolní extrakt blankového séra použitého pro kalibraci, a to bez vnitřních standardů. Při přípravě kalibrátorů se 1 ml blankového séra nejprve smísí s 5 ml 0,1 M octanu sodného, poté se mikrostříkačkou přidá methanolicke směsný vnitřní standard 50 ng THC-D3 a 50ng THCOOH-D3, nakonec se přidají mikrostříkačkou odstupňované podíly roztoků THC a THCOOH, ředěné methanolem tak, aby přidávané objemy roztoků k séru byly v rozmezí 5 až maximálně 50  $\mu$ l. Pro účely kontroly platnosti kalibrace se nezávisle připraví stejným způsobem kontrolní sérové vzorky o koncentraci obou



analytů 10 a 50 ng/ml. Kontrolní sérové vzorky se vždy připravují téhož dne jako vlastní vzorek měřeného séra.

### **3.6. Příprava vzorku séra pro GC/MS analýzu kanabinoidů**

Příprava vzorku byla vyvinuta a optimalizována pro stanovení analytů THC a THCOOH v séru pomocí metody GC-MS v rozsahu očekávaných koncentrací 0 až 100 ng/ml séra. Standardní výchozí objem vzorku séra je 1 ml. Vlastní příprava vzorku má 3 fáze:

- a) 1ml séra se mísí s 5 ml 0,1 M octanu sodného o pH 4,0 a přidávkem směsného methanického roztoku vnitřních standardů 50 ng THC-D3 a 50 ng THCOOH-D3. Následuje promíchání, sonifikace 15 min, odstředění a oddělení supernatantu od případné sedimenty.
- b) Kolonka Bond-Elut Certify se připraví k extrakci analytů postupným promytím 2 ml methanolu a 2 ml 0,05 M kyseliny fosforečné. Poté se velmi pomalu na promytou kolonku aplikuje oddělený supernatant vzorku séra. Následuje vymytí balastních látek pomocí 9 ml 0,05 M kyseliny fosforečné a poté 3 ml směsi 0,05 M kyseliny fosforečné a methanolu v objemovém poměru 4:1. Po promytí je kolonka se zachycenými analyty sušena prosáváním vzduchem pod mírným vakuem 10 minut. Poté je kolonka promyta ještě 0,2 ml n-hexanu a tím jsou analyty připraveny k eluci. Eluce analytů je dosažena postupným vymytím směsí 3 x 1,5 ml n-hexan s ethylacetálem (objemový poměr 4:1) do připravených vialek, kde se jednotlivé podíly eluátu po sobě postupně odpařují. Po dokončení celé eluce se připraví suchý odparek pro následnou silylaci.
- c) Stanovené analyty a jejich vnitřní standardy jsou derivatizovány silylací. K suchému odparku ve vialce se přidá mikrostříkačkou 0,1 ml silylačního činidla MSTFA, vialka se uzavře a reakce probíhá při 80° C 20 min.

### **3.7. Vlastní GC/MS analýza vzorků**

Pro analýzu je použita kapilární plynová chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií se standardní ionizací s nárazem elektronů. Přístroj se před analýzou

nachází ve stabilizovaném stavu ve výchozích podmínkách GC/MS metody pro analýzu kanabinoidů.

Vlastní analýza řady vzorků sér (v počtu max 10) zahrnuje sekvenci nástřiků:

- kontrolní nástřik vhodného rozpouštědla
- derivatizované extrakty vzorků sér
- derivatizované extrakty kontrolních vzorků v pořadí stoupajících koncentrací (0, 10, 50 ng/ml)
- nástřik rozpouštědla
- v případě potřeby recalibraci, tj. nástřik celé řady sérových kalibrátorů

Při větším počtu analyzovaných vzorků sér ( > 10 ) je nutné vkládat kontrolní sérové vzorky mezi vlastní zkoumané vzorky do sekvence nástřiků.

### **3.8. Identifikace a kvantifikace THC a THCOOH v séru**

Analytické parametry GC-MS metody byly optimalizovány co do selektivity separace analytů v biologické matrici a byl použit mód selektivního monitorování iontů (SIM) pro stanovení stopových koncentrací THC a THCOOH v silylované formě v séru či plazmě metodou vnitřního standardu, což jsou deuterované analogy obou analytů. Monitorované ionty pro THC jsou  $m/z$  386, 371, 315, 303, kvantifikační ion je 386. Monitorované ionty pro THCOOH jsou  $m/z$  371, 473, 488, kvantifikační ion je 371, viz příloha 1 – Ukázka GC/MS analýzy kanabinoidů v séru. Separace THC a THCOOH a jejich SIM spektra jako silylderivátů.

Pro confirmaci přítomnosti stanovovaného analytu platí shoda parametrů retenčních i v zastoupení specifických iontů spektra analytu mezi vzorkem a referenčním kontrolním vzorkem. Odchylka v retenci musí být menší než +/- 0,5%. Vzájemné zastoupení specifických iontů mezi vzorkem a referenčním vzorkem je třeba posuzovat při blízkých koncentračních hladinách. V případě, že koncentrace analytů ve vzorku séra přesáhnou rozsah kalibrace, je nutné zkoumaný vzorek séra ředit a izolaci a analýzu kanabinoidů opakovat.

Kalibrace a kvantifikace je založena na poměru ploch kvantifikačních iontů analytu a deuterovaného vnitřního standardu vzhledem ke koncentraci. Kalibrace i kvantifikace je zpracovávána v programu Microsoft Excel, linearity kalibračních závislostí jsou kontrolovány podle regresního koeficientu ( $R^2$ ).

## **4. Pracovní charakteristika metody – validační parametry**

### **4.1. Kalibrační rozsah a linearita**

Zvolenou metodou je kalibrace pro oba analyty THC a THCOOH lineární ve sledovaném rozsahu koncentrací 0 - 100 ng/ml séra s regresním koeficientem těsnějším než 0,999 (příloha 2 – Kalibrační závislost pro THC a THCOOH v séru). Zvolený rozsah koncentrací odpovídá obvyklému výskytu koncentrací obou sledovaných analytů v reálných vzorcích.

### **4.2. Mez stanovitelnosti (LOQ)**

Mez stanovitelnosti (kvantifikace) je nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být kvantitativně stanoveno s definovanou přesností. Může se stanovit jako násobek meze detekce. Pro potřeby stanovení hladiny kanabinoidů v krevním séru s ohledem na zákonná ustanovení je mez stanovitelnosti THC i THCOOH 2 ng/ml séra (příloha 3 – Porovnání chromatogramů pro THC a THCOOH při různých sérových hladinách)

### **4.3. Přesnost stanovení hladin v séru**

Přesnost stanovení sérových hladin kanabinoidů THC a THCOOH lze vyjádřit jako opakovatelnost a charakterizovat ji relativní směrodatnou odchylkou, tj. variačním koeficientem (CV), která se získá opakovanou analýzou několika nezávislých extraktů kontrolního vzorku séra. Pro nízké koncentrační hodnoty 2 - 5 ng/ml je  $CV < 10\%$ , pro koncentrace v rozmezí 10 – 50 ng/ml je  $CV < 5\%$ . Hodnoty opakovatelnosti ( $n = 6$ ), které byly získány pro validované matrice sér jsou uvedeny v tabulce – příloha 4.

### **4.4. Správnost stanovených hodnot v séru**

V současných podmínkách s ohledem na ekonomickou úspornost materiálových nákladů stanovení THC a THCOOH v séru byly k pravidelnému rutinnímu ověřování

správnosti stanovení použity nezávisle připravené kontrolní extrakty sér uměle připravené v laboratoři přidáním standardních substancí k validované blankové matici séra neobsahující kanabinoidy. Správnost byla testována na koncentrační hladině 10 ng/ml a 50 ng/ml a vyjádřena pomocí relativní chyby vzhledem ke zvolené nominální hodnotě. Za zvolených podmínek byla odhadnuta správnost stanovení pro oba analyty na sérové hladině 10 ng/ml v rozmezí 100-106 %, na hladině 50 ng/ml v rozmezí 99 – 100 %. Správnost stanovení je také velmi vhodné periodicky ověřovat účastí v programu externí kontroly kvality. Jako vhodný program pro tyto účely je např. program „BTMF-Drugs in serum“ organizovaný firmou ARVECON GmbH v SRN, certifikovaný podle ISO 9001:2008 a odborně garantovaný Společností pro toxikologickou a forenzní chemii (GTFCH, Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie, [www.gtfch.org](http://www.gtfch.org) nebo [www.arvecon.com](http://www.arvecon.com)). Správnost stanovení v souboru zúčastněných laboratoří je statisticky hodnocena podle Z-score, jako vyhovující je považována hodnota Z-skóre < 2, jako problematické Z-skóre v rozmezí 2 – 3. Výsledky hodnocení jsou dobrou zpětnou vazbou k nápravným opatřením a tedy k zajištění správnosti metody.

## 5. Novost metodiky

Ministerstvo Zdravotnictví ČR na popud České společnosti soudního lékařství a soudní toxikologie ČLS JEP schválilo a ve Věstníku MZ ČR 9/2012 publikovalo „Metodický pokyn pro postup při vyšetřování specifikovaných návykových látek v krvi a/nebo v moči“. Tento metodický pokyn je aplikovatelný také na specifické stanovení kanabinoidů v krevním séru validovanými chromatografickými metodami v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, což mohou být v současnosti různé metody na principu GC/MS nebo LC/MS, které se v detailech provedení mohou lišit.

V návaznosti na pozdější zákonné ustanovení tj. zákon 233/2013 Sb. a Nařízení vlády 41/2014 Sb. je však nutné **přijmout minimální požadovaná metodická kritéria**, kterým musí použité metody pro stanovení sérových hladin vyhovovat, aby se splnil účel zákonných norem. Tato minimální požadovaná kritéria nebyla dosud v těchto zákonných souvislostech nikterak specifikována. Proto byla experimentálně otestována a jsou nově navrhována v této metodice. Správnost a spolehlivost vydávaných laboratorních výsledků hladin návykových látek – tedy i kanabinoidů – v krevním vzorku je vhodné zabezpečit periodickou účastí ve vhodném programu externí kontroly kvality a doložit ji příslušným platným certifikátem laboratoře.

Navrhovaná minimální požadovaná metodická kritéria		
	THC	THCOOH
Mez detekce (LOD)	1 ng/ml	1 ng/ml
Mez kvantifikace (LOQ)	2 ng/ml	2 ng/ml
Přesnost c= 2 - 10 ng/ml	CV < 10 %	CV < 10 %
Přesnost c= 10 - 100ng/ml	CV < 5 %	CV < 5 %

Minimální požadovaná kritéria jsou navrhována jak pro původní psychoaktivní složku THC, která je markrem akutní psychoaktivity, tak i pro hlavní neaktivní metabolit THCOOH, který vedle THC může být markrem chronické konzumace s dopadem na neurokognitivní změny.

## **6. Hygienické a bezpečnostní požadavky**

Metoda nepředstavuje zvýšená specifická rizika pro bezpečnost laboratorních pracovníků a je zapotřebí dodržovat obecně platná bezpečnostní a hygienická pravidla pro práci s biologickým materiálem ve zdravotnických laboratořích.

## **7. Ekonomické aspekty**

Implementace metody zahrnuje periodické ověřování aktuálních pracovních charakteristik vyhovujících požadovaným kritériím. Využívání metody předpokládá dostupnost potřebné instrumentace. Materiálové náklady představují příspěvek na přístrojovou režii dle konkrétního vybavení laboratoře, podíl na nákup analytických referenčních standardů, chemikálií, spotřebního laboratorního materiálu. Provozování metody je úspornější při vyšetření série vzorků sér proti individuálním analýzám.

## 8. Seznam související literatury

Ramaekers JG, Robbe HWJ, O'Hanlon JF: Marijuana, alcohol and actual driving performance. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 15, 2000, str. 551-558.

Ramaekers JG, Moeller MR, van Ruitenbeek P, Theunissen EL, Schneider E, Kauert G: Cognition and motor control as a function of delta-9-THC concentration in serum and oral fluid: Limits of impairment. *Drug and Alcohol Dependence* 85, 2006, str. 114-122.

Hartman RL, Huestis MA: Cannabis effects on driving skills. *Clin. Chem.* 59/3: 2013, str.478-492.

Karschner EL, Schwilke EW, Lowe RL, Darwin WD, Herning RI, Cadet JL, Huestis MA: Implications of plasma delta-9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-THC-, and 11-nor-9-carboxy-THC concentrations in chronic cannabis smokers. *J. Anal. Toxicol.* 33, 2009, str. 469-477.

Kuepper R, van Os J, Roselind L, Wittchen HU, Höffer M, Henquet C: Continued cannabis use and risk of incidence and persistence of psychotic symptoms: 10 year follow-up cohort study. *BMJ* 342, 2011: d738; doi: 10.1136/bmj.d738.

Pope HG Jr., Gruber A, Hudson JI, Huestis MA, Yurgelun-Todd D: Neuropsychological performance in long-term cannabis users. *Arch. Gen. Psychiatry* 58, 2001, 909-915.

Mura P, Kintz P: THC can be detected in brain while absent in blood. *J. Anal. Toxicol.* 29, 2005, str. 842-843.

Grotenhermen F, Leson G, Berghaus G, Drummer OH, Krüger HP, Longo M, Moskowitz H, Perrine B, Ramaekers JG, Smiley A, Tunbridge R: Developing limits for driving under cannabis. *Addiction* 102, 2007, str. 1910-1917.

Khiabani HZ, Bramness JG, Bjorneboe A, Morland J: Relationship between THC concentration in blood and impairment in apprehended drivers. *Traffic Inj. Prev.* 7/2, 2006, str. 111-116.

Jones AW, Holmgren A, Kugelberg FC. Driving under influence of cannabis: a 10-year study of age and gender difference in the concentrations of tetrahydrocannabinol in blood. *Addiction* 103/3, 2008, str. 452-461.

Fabritius M, Favrat B, Chtioui Battistella G aj.: THCOOH concentrations in whole blood: Are they useful in discriminating occasional from heavy smokers? *Drug Testing Analysis* 6, 2014, str. 155 – 163.

Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF: Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marihuana or placebo joint. *J. Anal. Toxicol.* 32, 2008, str. 470-476.

Bergamaschi MM, Karschner EL, Goodwin RS, Scheichweiler KB, aj.: Impact of prolonged cannabinoid excretion in chronic daily cannabis smokers' blood on per se drugged driving laws. *Clin. Chem.* 59/3, 2013, str. 519-523.

Hall W., Degenhardt L: The adverse health effects of chronic cannabis use. *Drug Testing and analysis*, 6, 2014, str. 39-45.

Andrews R, Murphy KG, Paterson S: Cannabinoid concentrations detected in fatal road traffic collision victims compared with a population of other post mortem cases. *Clin. Chem.* 61/10, 2015, str. 1-9.

Hartman RL, Brown TL, Milavetz g, Spurgin A, aj.: Cannabis effects on driving lateral control with and without alcohol. *Drug and Alcohol Dependence (2015)*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.06.015>.

Huestis MA: Cannabis-impaired driving: A public health and safety concern. *Clin. Chem.* 61/10, 2015, str. 1 – 3.



## 9. Seznam publikací, které předcházely metodice

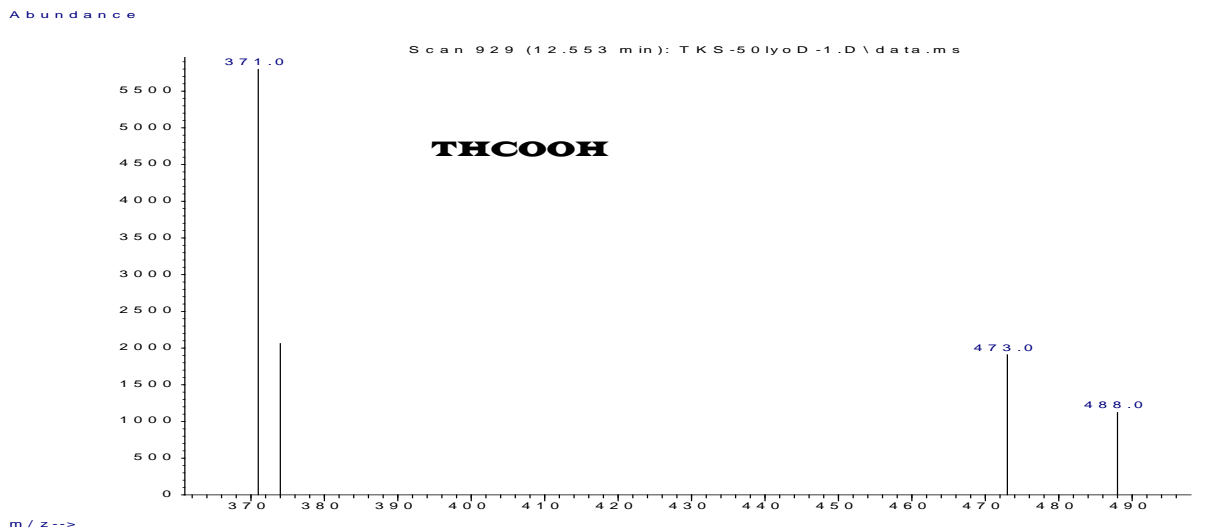
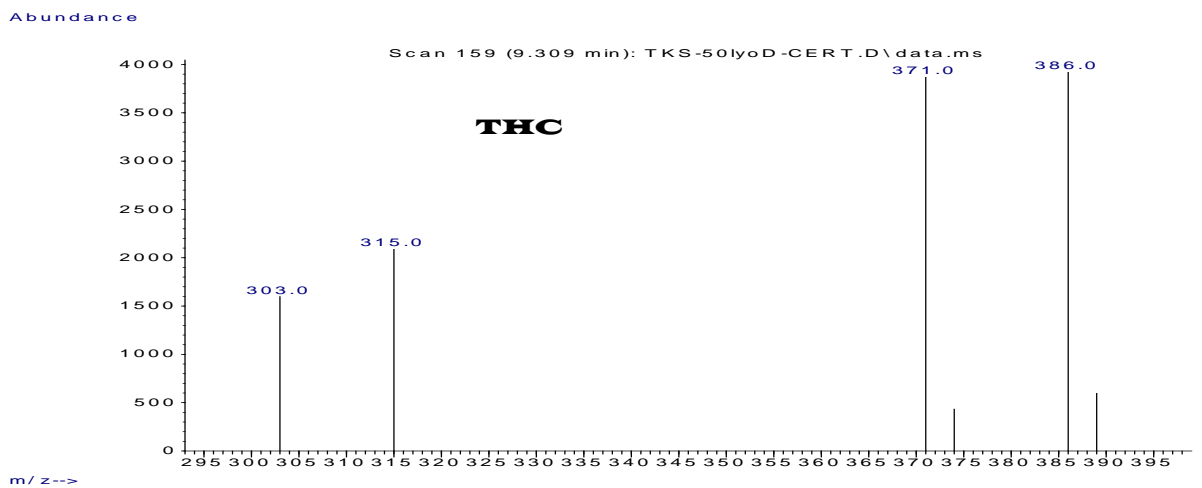
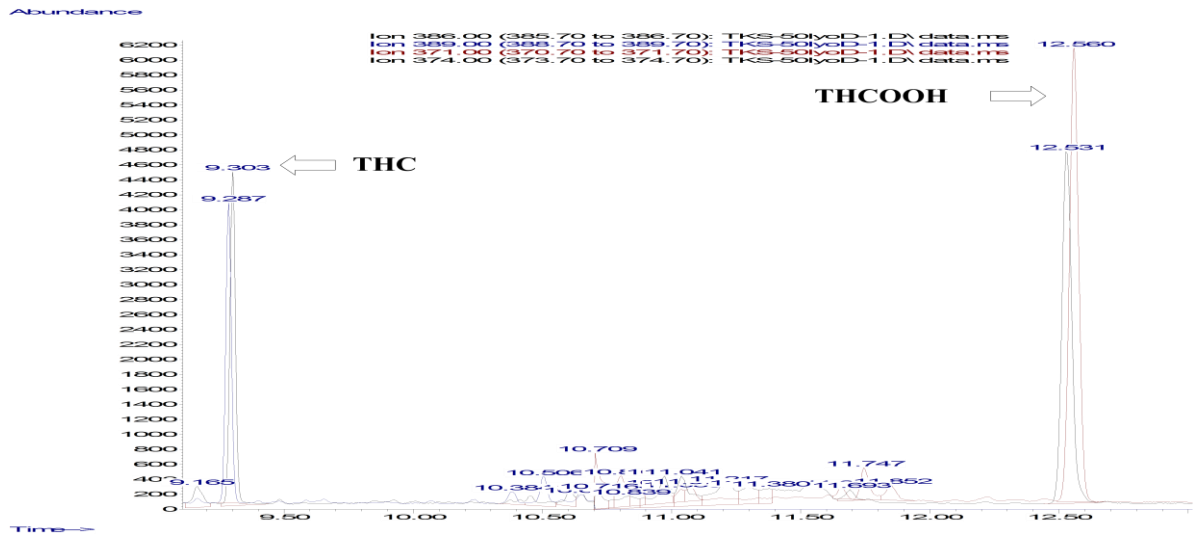
Balíková M, Huestis MA.: Forensic Aspects of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids, Assessment of Traffic Safety. *Adiktologie 3/2008*, str. 219 – 235.

Balíková M, Dvořák M: Toxikologická diagnostika ve vztahu k důkazu ovlivnění řidiče motorového vozidla návykovou látkou – obecné aspekty. *Státní zastupitelství 5/2010*, str. 5 -11.

Balíková M, Hložek T, Páleníček T, Tylš F aj.: Časový profil hladin THC v krevním séru u rekreačních a chronických kuřáků marihuany po akutním užití drogy – implikace pro řízení motorových vozidel. *Soudní lékařství 59/1, 2014*, str. 2 – 6.

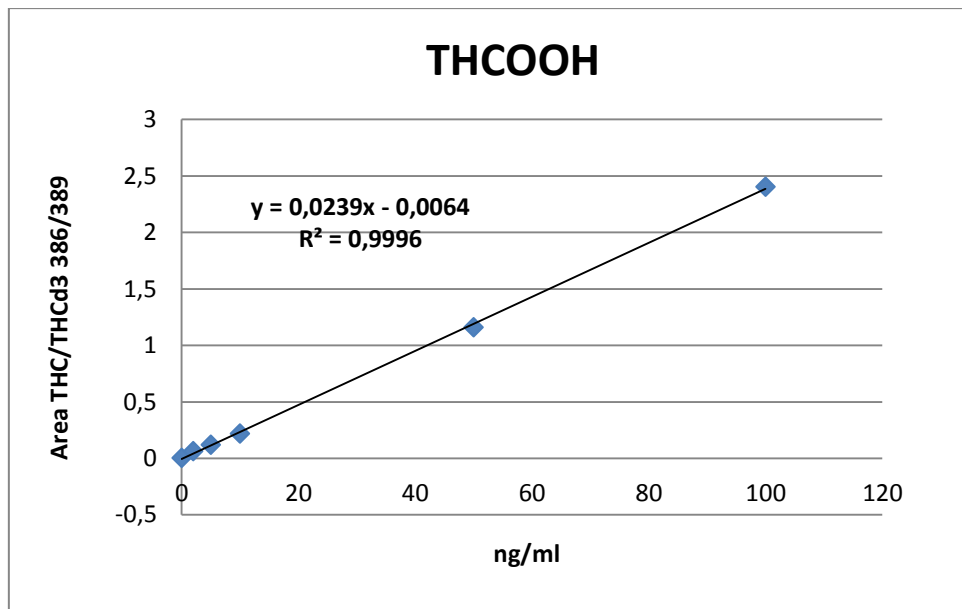
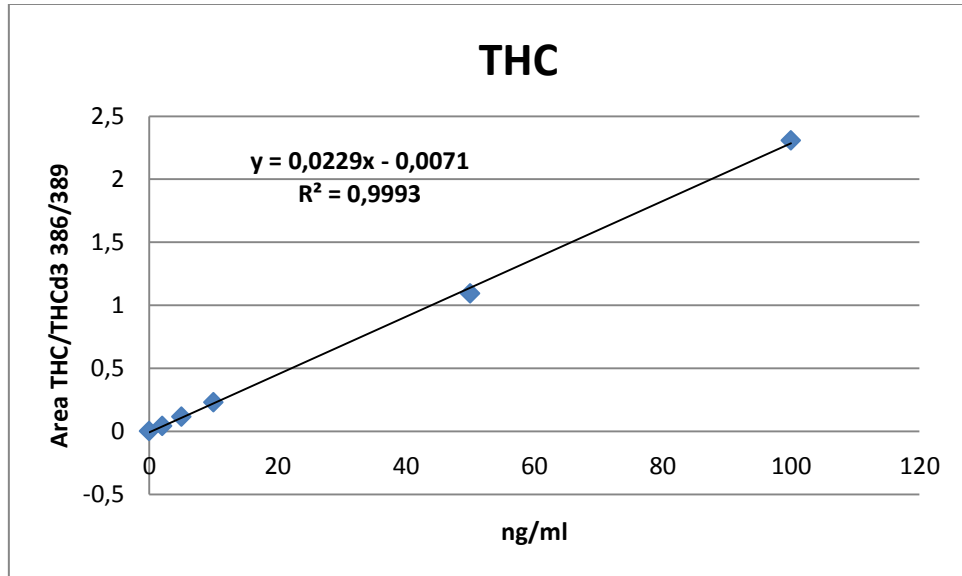
## Příloha 1:

Ukázka GC/MS analýzy kanabinoidů v séru. Separace THC a THCOOH a jejich SIM spektra jako silylderivátů



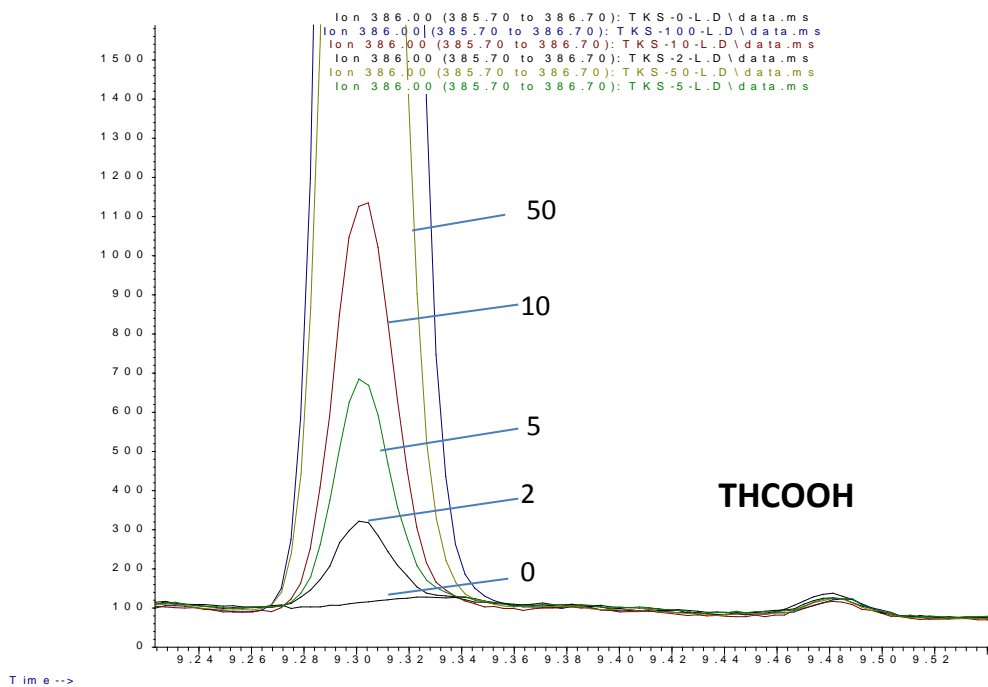
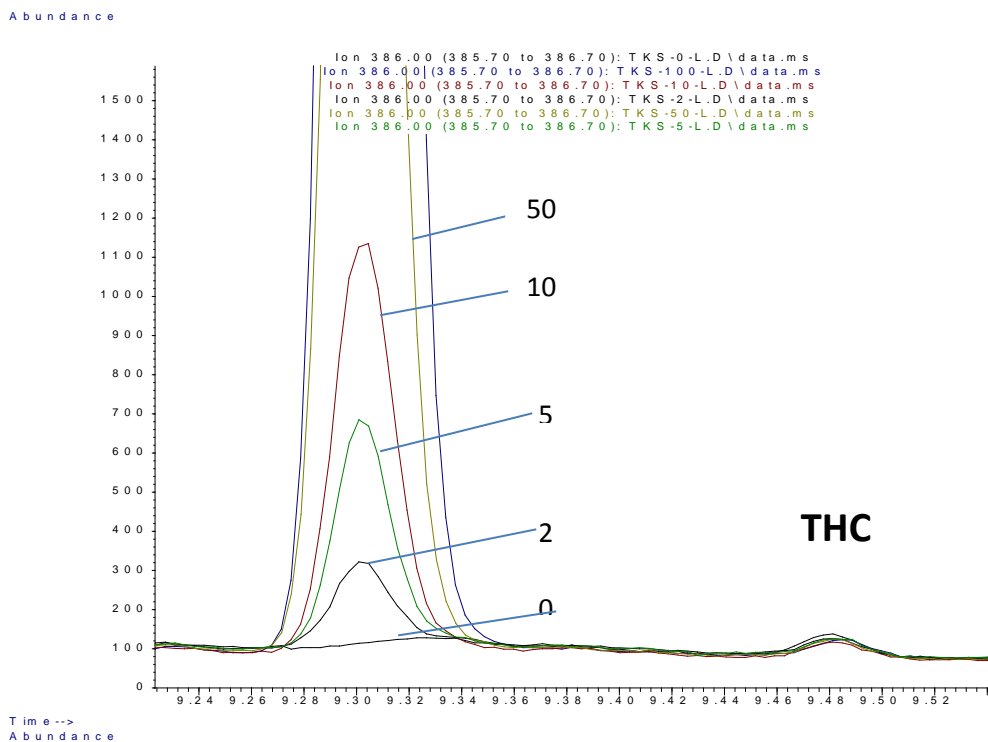
**Příloha 2:**

**Kalibrační závislost pro THC a THCOOH v séru**



### Příloha 3:

## Porovnání chromatogramů pro THC a THCOOH při různých sérových hladinách (ng/ml)



**Příloha 4:****Přesnost stanovení THC a THCOOH v séru (n = 6)**

Sérová hladina	THC CV (%)	THCOOH CV (%)
5 ng/ml	8,9	9,8
10 ng/ml	3,3	2,9
50 ng/ml	2,5	3,2

Nominální hodnota (ng/ml)	THC (ng/ml)	THCOOH (ng/ml)
5	5,0	5,0
	5,2	5,0
	4,4	5,1
	4,8	5,1
	4,3	4,4
	5,4	6,0
mean	4,8	5,1
SD	0,4	0,5
Nominální hodnota (ng/ml)	THC (ng/ml)	THCOOH (ng/ml)
10	10,1	10,2
	11,0	10,1
	10,7	9,7
	10,5	10,4
	10,3	9,6
	11,0	10,1
mean	10,6	10,0
SD	0,4	0,3
Nominální hodnota (ng/ml)	THC (ng/ml)	THCOOH (ng/ml)
50	50,2	48,2
	47,4	48,0
	50,5	50,5
	48,7	51,3
	49,7	50,9
	50,4	51,8
mean	49,5	50,1
SD	1,2	1,6



Pomáhat a chránit

POLICEJNÍ PREZIDIUM ČESKÉ REPUBLIKY

# Osvědčení

## o uznání certifikované metodiky

vydané v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výsledků výzkumných organizací  
a hodnocení výsledků výzkumných programů (platnou pro léta 2013 až 2015)

Název metodiky: **Stanovení delta-9-tetrahydrokanabinolu a jeho metabolitu 11-nor-tetra hydrokanabinol-karboxylové kyseliny v krevním séru specifickou chromatografickou metodou s hmotnostní spektrometrií**

Autor/autorský kolektiv: **Doc. Ing. Marie Balíková, CSc.  
Mgr. Tomáš Hložek**

Žadatel (příjemce podpory): **Národní ústav duševního zdraví**

Projekt / program: **Vytvoření standardů pro zjišťování míry ovlivnění řidičů po užití konopných drog: hodnocení hladiny kanabinoidů v krvi s ohledem na dobu užití, psychomotorický výkon, vigilitu a ovlivnění aktivity mozku  
kód projektu VG 20122015080  
Program bezpečnostního výzkumu České republiky v letech 2010 až 2015**

Schváleno pod č. j.  
PPR-31123-7/ČJ-2015-990530

Evidenční číslo osvědčení: 16/2015

V Praze dne **23 -12- 2015**



*v. z.*  
**brig. gen. Mgr. Bc. Tomáš TUHÝ**  
policejní prezident

*v. z.*  
**Mgr. Zdeněk Laube**  
náměstek policejního prezidenta pro SKPV