



ESTIMATING THE CHANGE IN CONCENTRATION OF THC IN THE BLOOD OF DRIVERS OVER THE TIME BETWEEN STOPPING AND COLLECTION OF BLOOD FOR TESTING

Wojciech LECHOWICZ, Piotr ADAMOWICZ, Dominik BAKALARZ, Dominika GIL, Joanna GIEROŃ, Agnieszka SKULSKA, Bogdan TOKARCZYK

Institute of Forensic Research, Kraków, Poland

Abstract

It is difficult to assess the effect of substances acting similarly to alcohol on the psychomotor efficiency of a driver in cases of substances that are rapidly distributed to organs of the body, quickly metabolized or spontaneously decomposed under the influence of the environment in which they are located. Such process can play a role in situations where it is necessary to interpret the result of a test on a blood sample collected a long time after a driver has been stopped. Among such compounds is Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) – a psychoactive hallucinogenic component of popular cannabis products known as marijuana and hashish.

As transpires from an analysis of data from blood collection protocols and test requests in Poland, the mean period of time between a driver being stopped for a routine roadside control and blood collection was 2 hours and 40 minutes (median: 2 hours 20 min), and in the case of a road incident, this period was exactly 3 hours (median: 2 hours 50 min). Among 60 recorded cases, it was never shorter than 1 hour. For 27 drivers, for whom blood was collected two or three times at 1 hour intervals, it was shown that only for concentrations of THC in whole blood above 2 ng/ml was a significant drop in its concentration observed (over 0.13 ng/ml) in the course of one hour. This conclusion is particularly important when interpreting concentrations of THC within the range of concentrations (1–2.5 ng/ml) proposed by forensic toxicologists as thresholds for penalization for driving a vehicle under the influence of THC in Poland.

Key words

THC; Elimination; Blood; Drivers; Interpretation.

Received 1 August 2017; accepted 20 November 2017

1. Introduction

One of the ways of ensuring road safety is to control the psychomotor efficiency of drivers who have been stopped for routine traffic control purposes by road traffic police. Besides recording the movement of the vehicle (driving style), the driver is also subjected to observation. If there is reasonable suspicion of impaired driver efficiency, then a thorough examination is carried out. Symptoms of the action of substances that strongly stimulate the central nervous system (CNS), such as cocaine or methamphetamine, as well as CNS depressants from the hypnotic/soporific group

of drugs, may be discernible even by persons who have only received basic training. However, substances that influence the perception of stimuli – for example hallucinogens which include Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) – do not always engender clear symptoms indicating that the driver is probably under their influence (Engelhardt, Pufal, Śliwka, 2006). It is particularly difficult to interpret symptoms during direct contact with a police officer when the questioned person is attempting to cover up to avoid liability. A similar phenomenon is observed in persons with blood alcohol levels at concentrations lower than the statutory threshold for a state of insobriety, i.e., 0.5 permille

(Engelhardt, Grzech, Drzewiecki, Śliwka, 2010), when the symptoms of the action of alcohol may be weakly perceptible, but its effects on the body result in an increased risk of causing a dangerous road accident. In such situations, testing blood for the presence of the controlled/prohibited substance, or exhaled air for the presence of alcohol, is of key significance.

There is no doubt that control procedures carried out by police – before blood collection – are time-consuming. These procedures include saliva analysis for substances acting similarly to alcohol, using a so-called drugalyser, a device that does not need to be used in a laboratory (i.e., can be used at the roadside). The behaviour of a driver can significantly prolong such a test. Although manufacturers of these devices claim that the time required to carry out the test is of the order of 10–15 min, it may even extend up to 30 min, which was observed during controls conducted under the DRUID project. For substances characterised by a rapid change in concentration over time, the passage of time is of key significance.

In the above context, THC is a substance that requires special attention. Due to high individual variability, a varying degree of dependence on cannabis products, as well as the specific “ritual” involved in introducing intoxicating substances containing this compound into the organism, retrospective analyses for THC concentration are burdened with large errors. So far such analyses have not been routinely performed. The history of efforts to estimate the time of use/consumption of marijuana on the basis of concentrations of THC, and THC and THCCOOH in blood dates back over a quarter of a century (Huestis, Henningfield, Cone, 1992). There is ongoing research aimed at obtaining a clear indication of the time of last use, especially in cases of chronic cannabis use (Lee et al., 2015).

In contrast to most of the papers available in the literature, which present results of experiments carried out in controlled conditions, the present study uses real data from tests of drivers who were stopped at roadside checks and drivers involved in traffic incidents. Such data seem to better reflect a typical course of events and changes in concentrations of THC in blood over time – as seen in typical cases examined by forensic toxicologists.

In light of the above, it is important to establish the magnitude of changes in concentration of THC (and possibly its metabolite) per unit of time. Determination of such a parameter may be helpful in case of doubt as to whether threshold concentrations of THC were exceeded at the time of stopping.

2. Materials and methods

2.1. Research subjects

Material collection protocols and information contained in decisions to appoint an expert or requests for tests for the presence of substances acting similarly to alcohol, which had been sent to the Institute of Forensic Research in Krakow, were examined for the purpose of estimating the average time that had passed between stopping a driver and collecting blood. The documentation was from the years 2014–2015. We studied 60 of protocols randomly selected relating to both road controls and traffic incidents (e.g., accidents).

The studied group consisted of 27 drivers, from whom material was collected one hour after first blood collection as part of routine activities, except in 5 out of the 27 drivers where blood was collected one hour later as well, i.e., two hours after first blood collection. Blood collection was carried out in accordance with the Dziennik Urzędowy Komendy Głównej Policji (2004), as well as the Order of the Minister of Health of 11 December 2015 on alcohol testing in the organism (Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej, 2015).

The procedure for collecting an additional sample of blood, except mandatory, was implemented in the case of drivers who drove away from the scene of the incident. Since such incidents are very rare, results from 2012–2016 were subjected to analysis, in order to obtain a greater number of data. Two doubtful results – due to a significant increase in the concentration of THC (probably due to error during securing or labelling of blood vials) – were not included. The total number of results encompassing two samples taken at hourly intervals was 30.

Furthermore, for the purposes of examining the studied issue more broadly, the results of analyses of blood collected during routine traffic control of 495 drivers, carried out at Institute of Forensic Research in years 2014–2015, were also used.

2.2. Methods

2.2.1. Screening

Preliminary screening was carried out using the ELISA immunoassay method. A threshold constituting $\frac{1}{2}$ of a reading for a negative control sample – but not exceeding a reading for blood with addition of 5 ng/ml THCCOOH, which constituted a successive control sample – was taken as a positive reading. Arvecon ref-

erence material was used as a control for the determinations.

2.2.2. Extraction

Blood samples of volume 0.5 and 0.2 ml for THC and THCCOOH, respectively, in two repetitions of determinations, were enriched with internal standards of THC-D₃ at 20 ng/ml and THCCOOH-D₃ at 50 ng/ml, respectively. Extraction was carried out by the liquid-liquid method using diisopropyl ether, after prior acidification of the blood to pH 3 with phosphate buffer. After evaporation, the dry residue was subjected to derivatization with a mixture of TFAA and chloroform (1:1) in the case of THC, and a mixture of TFAA and PFPOH (1:1) in the case of THCCOOH. The mixture of derivatized analytes was evaporated and dry residue dissolved in ethyl acetate. The final solution of 2 µl was injected.

2.2.3. Quantitative analysis

Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in negative chemical ionization mode was applied in the research. A Gas Chromatograph Model 5730 with Mass Detector Model 6890 produced by Agilent Technologies was used. SIM mode was applied in determinations, monitoring ions: *m/z* 410.3 in the case of THC; *m/z* 413.3 for THC-D₃; *m/z* 522.3 for THCCOOH and *m/z* 525.3 for THCCOOH-D₃.

2.2.4. Validation parameters of the method

The method turned out to be specific, which was confirmed by analysis of 20 samples that gave a negative result in the preliminary screening method (ELISA), for which the reading did not differ by more than 20% from the reading for the negative control sample. For THC, the limit of detection (LOD) was 0.3 ng/ml, whereas the limit of quantification (LOQ) was 1 ng/ml. The method was linear in the range 1–20 ng/ml. For control concentrations of 1 and 10 ng/ml, a repeatability of 6.2% and 3.2%, a reproducibility of 9.8% and 15.8%, and an accuracy of 10.1% and 3.7%, respectively, were obtained. The mean error of determinations calculated on the basis of 52 results of tests of quality control from inter-laboratory tests, for the range 1–20 ng/ml, was ±16.9%. Since, in the study, we analysed the differences in concentrations of THC in material taken from the same person at short intervals, which was subjected to the same storage and transport conditions both by the commissioning agency and the Institute of Forensic Research Laboratory, the highest value of repeatability (poorest repeatability), i.e. 6.2%, was taken as the measurement error.

3. Results

Analysis of blood collection protocols and information contained in test requests showed that the mean time period between the stopping of a driver

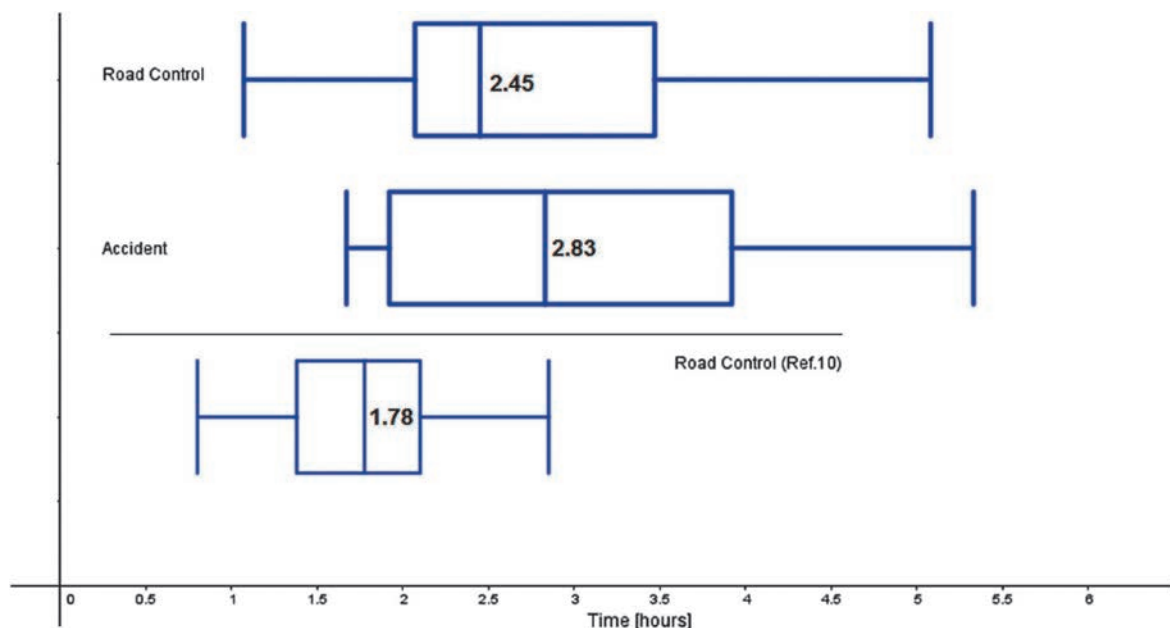


Fig. 1. Box plot presenting distribution of blood time collection in road control and accident cases.

and collection of blood is 2 hours 42 min (median 2 hours 20 min) in Poland. For comparison, this period of time (Lemos, San Nicolas, Volk, Ingle, Williams, 2015) was found to be 1 hour 48 min (median 1 hour 42 min) in research carried out in Washington State. Other sources indicate a range of 0.5–3 hours (Jones, Holmgren, Kugelberg, 2008; Mura et al., 2003). So it is noticeable that in Poland, blood is taken almost an hour later than in the USA (Fig. 1).

Results of blood tests (carried out at Institute of Forensic Research in years 2014–2015) on samples collected from drivers who were stopped for checks in connection with suspicion of driving under the influence of a substance acting similarly to alcohol ($n=495$) gave a distribution of concentrations which is presented in Fig. 2. An analysis of the data for THC indicates

a quantitatively similar breakdown of samples in the range 1–2.5 ng/ml (45%) and above 2.5 ng/ml (55%).

A threshold of 1 ng/ml for THC was adopted on the basis of an Order of the Minister of Health (2014) – the analytical threshold which must be met by laboratories conducting analyses for court purposes was set in this Order. However, a threshold of 2.5 ng/ml – corresponding to a state under the influence of THC – was accepted by Polish forensic toxicologists during the symposium organised by the Institute of Forensic Research in 2012 in Krakow, and was then again discussed during the 30th Conference of Forensic Toxicologists in Augustów in 2013. It should be noted that this threshold has not yet been included in any legal act.

Since the profile of changes in THC concentration over time depends on the degree of dependence of the

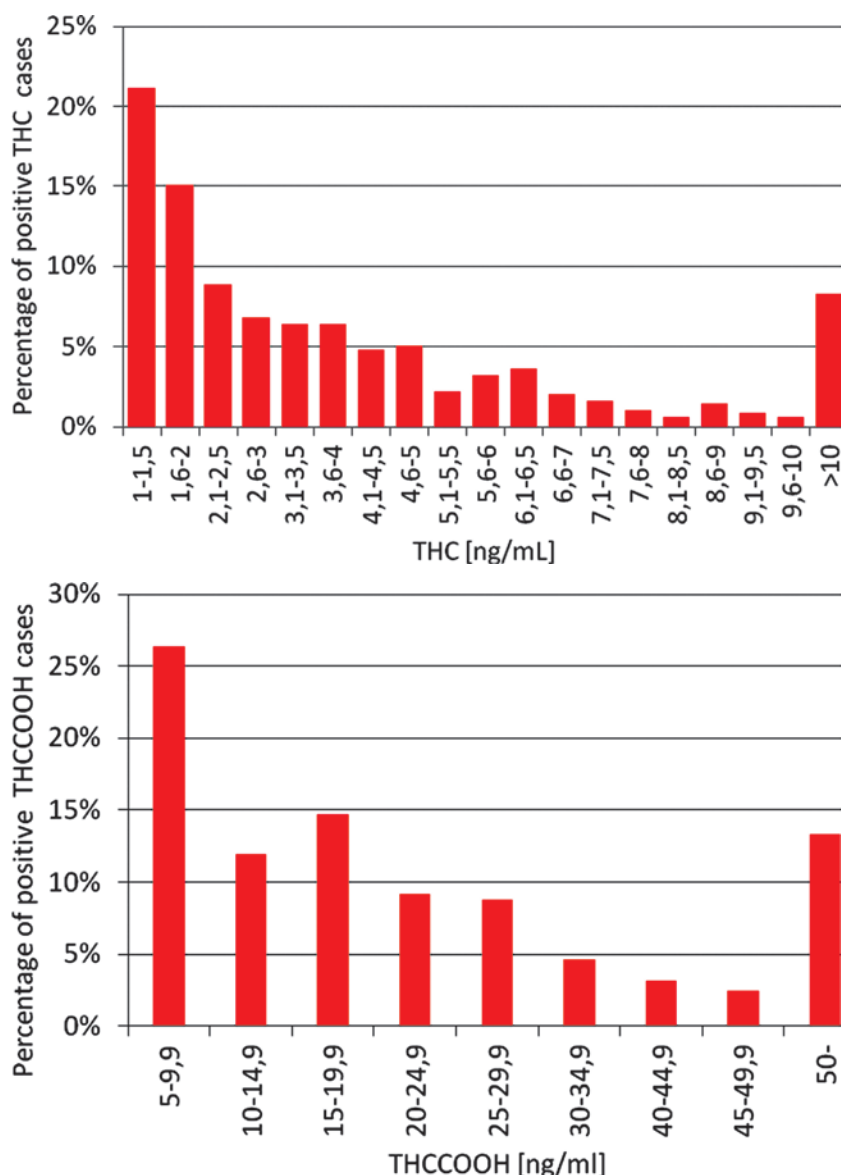


Fig. 2. Presentation of THC (a) and THCCOOH (b) concentration ranges in whole blood taken from drivers stopped for a road control – data from routine traffic control of 495 drivers, carried out at the Institute of Forensic Research in years 2014–2015.

person taking this substance (or, to put it more precisely, the frequency of taking of products containing this compound), it was accepted – in accordance with the statements of most of the drivers – that they were occasional smokers. Most of the subjects admitted that they had smoked marijuana before the check, but said that it had taken place a considerable amount of time before, usually on the previous day or earlier, or that they had smoked a so-called joint only once in their life.

In only 8% of cases (out of the 495 drivers subjected to control 2014–2015) was the concentration of THC in the blood of drivers above 10 ng/ml. Such a concentration occurs in occasional smokers not more than an hour after smoking, and thus when the driver is under the strongest influence of this substance. Concentrations in the range 5–10 ng/ml are usually recorded in cases where smoking has taken place about 1.5 hours earlier. The number of blood samples in this

range was 17%. In turn, THC content in the range 2.6–5 ng/ml, and thus in a range corresponding to cannabis use up to about 2.5 hours prior, was noted in 30% of cases. Up to this prior time of use (2.5 hours), concentrations are recorded that are ascribed a comparable effect to the state under the influence of alcohol at a concentration higher than 0.5 permille. Additionally, it should be borne in mind that in cases where results in the range 2.1–2.5 ng/ml (9%) were obtained, then due to the passage of time between stopping and collection, at the time of the incident the concentration of THC most probably exceeded 2.5 ng/ml. For concentrations in the range 1–2 ng/ml (inclusive), the estimated time of introduction of the prohibited substance into the organism is indicated to be not very long beforehand (2.5–6 hours). However, the long half-life of THC elimination means that in extreme cases, the time of administration may be significantly earlier, and may be as many as 8 or even 12 hours prior to smoking.

Table 1
Results of analyses of whole blood samples taken from 27 drivers

No.	analyte	C ₀ (THC) ng/ml	C ₁ (THC)	C ₂ (THC)	ΔC ₍₀₋₁₎ THC	ΔC ₍₁₋₂₎ THC	ΔC ₍₀₋₁₎ THC (Theor.)	ΔC ₍₁₋₂₎ THC (Theor.)
1	THC	1.62	1.27		0.35		0.08	
	THCCOOH	21.1	19.4		1.67			
2	THC	1.70	1.7		0		0.12	
	THCCOOH	9.20	11.04		-1.84			
3	THC	2.73	2.23	1.72	0.5	0.51	0.17	0.12
	THCCOOH	31.2	30.35	30.48	0.85	-0.13		
4	THC	3.20	2.5		0.7		0.20	
	THCCOOH	10.9	8.96		1.94			
5	THC	0.48	0.46		0.02		0.02	
	THCCOOH	<5	<5		nc.			
6	THC	4.90	3.9		1.00		0.43	
	THCCOOH	20.5	14.1		6.4			
7	THC	0.68	0.5		0.18		0.03	
	THCCOOH	<5	<5		nc.			
8	THC	1.60	1.3	1.5	0.3	-0.2	0.08	0.10
	THCCOOH	13.6	10.9	8.8	2.7	2.1		
9	THC	1.18	1.24		-0.06		0.08	
	THCCOOH	5.68	6.79		-1.11			
10	THC	2.05	1.77		0.28		0.12	
	THCCOOH	23.27	22.35		0.92			
11	THC	1.42	1.59		-0.17		0.11	
	THCCOOH	7.14	9.58		-2.44			

No.	analyte	C ₀ (THC) ng/ml	C ₁ (THC)	C ₂ (THC)	$\Delta C_{(0-1)}$ THC	$\Delta C_{(1-2)}$ THC	$\Delta C_{(0-1)}$ THC (Theor.)	$\Delta C_{(1-2)}$ THC (Theor.)
12*	THC	1.48	1.87		-0.39		nc.	
	THCCOOH	15.4	14.09		1.31			
13	THC	3.19	3.31		-0.12		0.32	
	THCCOOH	65.2	58.6		6.6			
14	THC	2.93	2.66		0.27		0.22	
	THCCOOH	6.70	6.3		0.4			
15	THC	3.40	3.2		0.2		0.30	
	THCCOOH	43.3	43.1		0.2			
16	THC	5.74	5.74		0		0.96	
	THCCOOH	30	27.6		2.4			
17*	THC	2.10	2.9		-0.8		nc.	
	THCCOOH	14.2	13.4		0.8			
18	THC	17.8	11.3		6.5		6.62	
	THCCOOH	30.3	23.2		7.1			
19	THC	3.35	3.19	2.87	0.16	0.32	0.30	0.25
	THCCOOH	16.0	20.2	23.0	-4.2	-2.8		
20	THC	0.60	0.58		0.02		0.03	
	THCCOOH	<5	<5		nc.			
21	THC	1.19	0.96		0.23		0.06	
	THCCOOH	10.8	9.9		0.9			
22	THC	7.76	6.5		1.26		1.30	
	THCCOOH	43.6	33.9		9.7			
23	THC	5.60	5.2	5.07	0.4	0.13	0.77	0.73
	THCCOOH	48.3	46.5	51.79	1.8	-5.29		
24	THC	4.30	3.8		0.5		0.41	
	THCCOOH	9.90	8.2		1.7			
25	THC	2.94	2.74		0.2		0.24	
	THCCOOH	11.8	13.5		-1.7			
26	THC	5.19	5.09	4.36	0.1	0.73	0.74	0.54
	THCCOOH	36.3	33.4	32.9	2.9	0.5		
27	THC	3.11	2.3		0.81		0.18	
	THCCOOH	47.2	44.0		3.2			

nc. – not calculated

* – not included

C₀ – first blood collection, C₁ – second blood collection, C₂ – third blood collection

The above results are much more interesting in the light of collected data concerning changes in concentration of THC in 27 studied persons (Table 1), from whom blood was collected at hourly intervals.

From the obtained results, it can be seen that there is a noticeable drop (exceeding the error of determination) in concentration of THC only for concentra-

tions higher than 2 ng/ml (Fig. 3). The concentration of THC did not drop in the course of an hour only in 2 cases out of 19 (10%). However, comparing the obtained results to the mean results calculated for Model I proposed by Huestis et al. (1992), based only on concentrations of THC, the changes in concentration of this compound in the 27 subjects suggest frequent

– or at least not just one-time – smoking of marijuana. Decreases of this magnitude were also noted by Lee et al. for persons taking cannabis products chronically (Lee et al., 2015).

Table 2 presents concentrations of THC for 5 cases together with changes of these concentrations after two hours. For concentrations determined two hours after first collection, the drop was at least 0.48 ng/ml, with maximum differences due to error of determinations being below 0.2 ng/ml.

Table 2
Drivers whose blood was taken twice, 1 (C_1) and 2 (C_2) hours after first blood collection (C_0)

No.	C_0 (THC)	C_2 (THC)	$\Delta C_{(0-2)}$ THC
8	1.6	1.5	0.10
3	2.73	1.72	1.01
19	3.35	2.87	0.48
26	5.19	4.36	0.83
23	5.60	5.07	0.53

4. Discussion

The presented distribution of THC concentration ranges (Fig. 2) is similar to that obtained by Couper and Peterson (2014) in a study on drivers in the state of Washington. The longer time between stopping and collection – by over an hour – noted in Poland has caused the mean concentration of THC in roadside

controls in Poland to be 3.36 ng/ml, while for Washington it is 8 ng/ml (Rodriguez, 2016). However, it should be added that the increase in use of cannabis products in the United States following the depenalization of their medical forms may also have an influence on this so significant difference – which in turn is attested to by the two-fold difference between average concentrations of THCCOOH, which in Poland is 23.6 ng/ml, and in the state of Washington is 47.9 ng/ml.

Taking into account the above and the time taken by all the control activities before collection of blood, i.e. 1–3 hours, one may conclude that one out of every 4 in the group of drivers subjected to control (2014–2015), smoked marijuana directly before or while driving. This leads to the next conclusion, that effects of their impairments while driving a vehicle may be compared to effects engendered by ethyl alcohol at a concentration of 0.8 permille. This type of comparison is based on conclusions of part of the DRUID project concerning meta-analysis of experimental data (Meta-analysis of empirical studies concerning the effects of medicines and illegal drugs including pharmacokinetics on safe driving, 2011).

Due to time-consuming activities undertaken by the police after stopping a driver, which are conducive to a decrease in THC concentration, it is often not possible to prove that a driver has driven a vehicle in a state corresponding to 0.8 permille of alcohol, even though this has in fact occurred. The long delay before blood collection (for testing) following road accidents may adversely affect calculation of risk of serious injury or death: there may be a tendency to overestimate

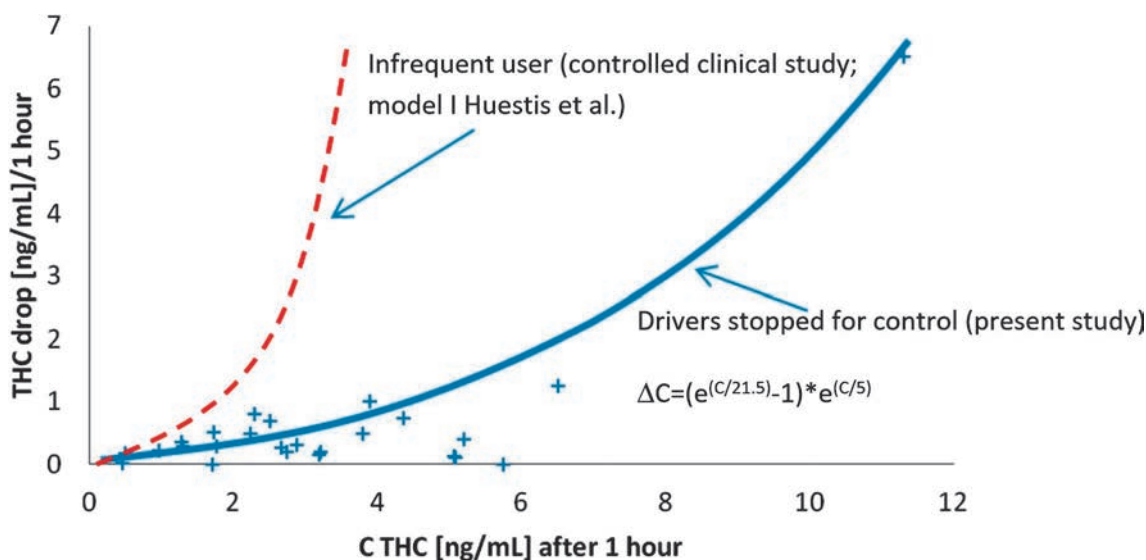


Fig. 3. THC concentration drop after 1 hour relative to concentration value.

the danger (risk) linked with smoking marijuana for lower concentrations of THC.

The sudden drop in concentration of THC in the first few tens of minutes after drug use is caused by distribution to the organs of the body, which contributes to the non-linear first order elimination. The size of the administered dose of marijuana is most closely reflected in the concentration of THC in this period. During the initial tens of minutes the change in concentration reaches several dozen ng/ml, and is very dynamic and hard to control. That is why the range of concentrations of THC between 1 and 10 ng/ml seems significantly more interesting.

For THC concentrations in the range 2–3 ng/ml, drops were in the range 0.2–0.8 ng/ml, whereas in the range 3–5 ng/ml, drops were in the range 0.16–1.00 ng/ml (but in one case, the concentration of THC rose by 0.12 ng/ml).

For the 2 hour interval between first and last collection, i.e. the most realistic scenario, the drop in concentration in five cases (Table 1) ranged from 0.1 ng/ml for concentrations below 2 ng/ml to 0.48–0.83 ng/ml for concentrations above 2 ng/ml.

5. Conclusions

Changes in concentrations of THC in the blood of examined drivers were significantly smaller than analogous ones that have been found for blood samples from occasional or one-time users of cannabis products. Similar results (a slow drop in THC concentration) have been obtained in the case of persons regularly using marijuana or at least not just once. It is noticeable that in their statements, stopped drivers usually stated that they are one-time or occasional users of marijuana.

In most roadside checks, the interval of time between stopping and collection was longer than 2 hours. In such cases, at concentrations of 2 ng/ml or higher, drops of the order of 0.5 ng/ml and higher were recorded, which means that at the moment of stopping the concentration most probably exceeded 2.5 ng/ml. If the blood collection was undertaken relatively quickly, i.e. after about an hour, the drop in concentration would be on average 0.17 ng/ml, but it could also be higher. Thus it cannot be ruled out that at the moment of stopping it was higher than 2.5 ng/ml, but it is also probable that this concentration may not have been exceeded.

In at least 75% of cases, collection of blood from a driver in Poland occurs two or more hours after stopping. During this time, assuming a blood test result

higher than 2.5 ng/ml, there is a drop in concentration of at least 0.5 ng/ml. This means that any possible error of determination does not affect the classification of the given deed (offence).

References

1. Augsburger, M., Donzé, N., Ménétrey, A., Brossard, C., Sporkert, F., Giroud, C., Mangin, P. (2005). Concentration of drugs in blood of suspected impaired drivers. *Forensic Science International*, 153, 11–15.
2. Couper, F. J., Peterson, B. L. (2014). The prevalence of marijuana in suspected impaired driving cases in Washington State. *Journal of Analytical Toxicology*, 38, 569–574.
3. Engelgardt, P., Grzech, W., Drzewiecki, J., Śliwka, K., (2010). Przydatność badań lekarskich wymienionych w „protokole pobrania krwi” dla oceny stopnia upojenia alkoholem. *Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 60, 223–234.
4. Engelgardt, P., Pufal, E., Śliwka, K. (2006). Przydatność obecnie stosowanego wstępnego badania lekarskiego w ocenie kierowców będących pod wpływem środków działających podobnie do alkoholu w materiałach Katedry Medycyny Sądowej CM UMK w Bydgoszczy. *Problems of Forensic Sciences*, 68, 368–377.
5. Huestis, M. A., Henningfield, J. E., Cone, E. J. (1992). 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). *Journal of Analytical Toxicology*, 16, 283–290.
6. Jones, A. W., Holmgren, A., Kugelberg, F. C. (2008). Driving under the influence of cannabis: a 10-year study of age and gender differences in the concentrations of tetrahydrocannabinol in blood. *Addiction*, 103, 452–461.
7. Lee, D., Bergamaschi, M. M., Milman, G., Barnes, A. J., Queiroz, R. H. C., Vandrey, R., Huestis, M. A. (2015). Plasma cannabinoid pharmacokinetics after controlled smoking and ad libitum cannabis smoking in chronic frequent users. *Journal of Analytical Toxicology*, 39, 580–587.
8. Lemos, N. P., San Nicolas, A. C., Volk, J. A., Ingle, E. A., Williams, C. M. (2015). Driving under the influence of marijuana versus driving and dying under the influence of marijuana: A comparison of blood concentrations of delta 9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-delta 9-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy-delta 9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids in arrested drivers versus deceased drivers. *Journal of Analytical Toxicology*, 39, 588–601.

9. Meta-analysis of empirical studies concerning the effects of medicines and illegal drugs including pharmacokinetics on safe driving, 6th Framework Programme, Deliverable 1.1.2b, DRUID: http://www.bast.de/Druid/EN/deliverables-list/downloads/Deliverable_1_1_2_B.html?nn=613800 (accessed 15 March 2017).
10. Mura, P., Kintz, P., Ludes, B., Gaulier, J. M., Marquet, P., Martin-Dupont, S., Vincent, F., Kaddour, A., Goullé, J. P., Nouveau J., Moulsmas M., Tilhet-Coartet, S., Pourrat, O. (2003). Comparison of the prevalence of alcohol, cannabis and other drugs between 900 injured drivers and 900 control subjects: results of a French collaborative study. *Forensic Science International*, 133, 79–85.
11. Rodriguez, D. (2016). *Washington State Marijuana Impact Report*, http://www.riag.wa.gov/documents/NWHIDTA_MarijuanaImpactReportVolume1.pdf (accessed 15 March 2017).
12. Rozporządzenie Ministra Zdrowia, z dnia 16 lipca 2014 r., w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie (2014). *Dziennik Ustaw Rzeczypospolitej Polskiej*, 948.
13. Zarządzenie nr 495 Komendanta Głównego Policji z dnia 25 maja 2004 r. w sprawie sposobu pełnienia służby na drogach przez policjantów (2004). *Dziennik Urzędowy Komendy Głównej Policji*, 9, 185–224.

Corresponding author

Dr Wojciech Lechowicz
Institute of Forensic Research
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: wlechowicz@ies.gov.pl

SZACOWANIE ZMIAN STĘŻENIA THC WE KRWI KIEROWCÓW W CZASIE POMIĘDZY ZATRZYMANIEM A POBRANIEM KRWI DO BADAŃ

1. Wstęp

Jednym ze sposobów zapewnienia bezpieczeństwa w ruchu drogowym jest kontrola sprawności psychomotorycznej kierowców zatrzymywanych w ramach rutynowych czynności kontrolnych, realizowanych przez policjantów wydziałów ruchu drogowego. Poza rejestracją ruchu pojazdu (stylu jazdy) obserwacji poddawany jest również kierowca. Pojawienie się uzasadnionego podejrzenia wystąpienia zaburzeń sprawności kierowcy skutkuje przystąpieniem do szczegółowej kontroli. O ile objawy działania substancji silnie pobudzających ośrodkowy układ nerwowy (OUN), jak kokainy lub metamfetaminy, a także środków hamujących OUN z grup leków nasennych mogą być dostrzegalne nawet przez osoby przeszkolone w podstawowym zakresie, to substancje wpływające na percepcję bodźców, czyli np. halucynogeny, do których zalicza się Δ^9 -tetrahydrokannabinol (THC), nie zawsze wywołują wyraźne objawy pozwalające wskazać, że kierowca prawdopodobnie znajduje się pod ich wpływem (Engelgardt, Pufal, Śliwka, 2006). Zachowanie kierowców jest dla kontrolującego policjanta podczas bezpośrednich kontaktów szczególnie trudne do interpretacji, ponieważ wówczas często starają się oni zmobilizować celem uniknięcia odpowiedzialności. Podobne zjawisko jest obserwowane u osób mających we krwi alkohol etylowy w stężeniach niższych od ustawowego progu stanu nietrzeźwości, czyli 0,5 promila (Engelgardt, Grzech, Drzewiecki, Śliwka, 2010), gdy objawy jego działania mogą być słabo zauważalne, jednak wpływ alkoholu na organizm skutkuje podniesionym ryzykiem spowodowania niebezpiecznego zdarzenia drogowego. W takich sytuacjach kluczowe znaczenie ma badanie krwi na zawartość kontrolowanego/zabronionego środka lub powietrza wydychanego na obecność alkoholu.

Nie ulega wątpliwości, że czynności kontrolne, które są prowadzone przez policję przed pobraniem materiału, wymagają czasu. Do tych czynności należy również zaliczyć analizę śliny w kierunku substancji działających podobnie do alkoholu urządzeniem niewymagającym badania laboratoryjnego, czyli tzw. narkotesterem. Mimo iż producenci tych urządzeń deklarują czas wykonania badania rzędu 10–15 min, to zachowanie kierowcy może go znacząco wydłużyć – nawet do 30 min, co zaobserwowano podczas kontroli prowadzonych w ramach projek-

tu DRUID. Dla środków cechujących się szybką zmianą stężenia w czasie, jego wpływ ma istotne znaczenie.

W powyższym kontekście THC jest środkiem wymagającym szczególnej uwagi. Ze względu na dużą zmienność osobniczą, różny stopień uzależnienia od produktów konopi, jak również swoisty rytuał wprowadzania do organizmu środków odurzających zawierających ten związek, badania retrospektywne stężenia THC obarczone są dużym błędem. Jak dotąd nie są one rutynowo wykonywane. Historia prób szacowania czasu przyjęcia marihuany na podstawie stężeń THC oraz THC i THCCOOH we krwi liczy już ponad ćwierć wieku (Huestis, Henningfield, Cone, 1992). W dalszym ciągu prowadzone są prace mające na celu uzyskanie precyzyjnego wskazania czasu ostatniego przyjęcia, szczególnie w przypadkach chronicznego przyjmowania produktów konopi (Lee i in., 2015).

W przeciwieństwie do większości prac dostępnych w literaturze, które przedstawiają wyniki eksperymentów prowadzonych w warunkach kontrolowanych, w niniejszym opracowaniu wykorzystano rzeczywiste dane z badań kierowców zatrzymanych do kontroli oraz uczestniczących w zdarzeniach drogowych. Wydaje się, że wyniki tych badań w odniesieniu do przedmiotu analiz biegłych z zakresu toksykologii sądowej lepiej obrazują typowy przebieg zdarzeń oraz zmiany stężeń THC we krwi w czasie.

Dlatego też istotne byłoby ustalenie wielkości zmian stężenia THC i ewentualnie jego metabolitu w jednostce czasu. Wyznaczenie takiego parametru może być pomocne w przypadkach powstania wątpliwości, czy progowe stężenie THC było przekroczone w chwili zatrzymania.

2. Materiały i metody

2.1. Obiekty badań

Celem oszacowania przeciętnego czasu, jaki upłynął pomiędzy zatrzymaniem kierowcy a pobraniem krwi, wykorzystano dane znajdujące się w protokołach pobrania materiału oraz informacje zawarte w postanowieniach o powołaniu biegłego lub pismach zlecających wykonanie badań na obecność środków podobnie działających do alkoholu, które były kierowane do Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie. Dokumentacja pochodziła z lat 2014–2015. Badaniami objęto po 30 takich

dokumentów, zarówno dotyczących kontroli, jak i zdarzeń drogowych (np. wypadków).

Badaną grupę stanowiło 27 kierowców, od których w związku z rutynowymi czynnościami pobrano krew w odstępie godzinny, przy czym w 5 przypadkach pobrano krew po kolejnej godzinie, czyli po dwóch godzinach od pierwszego pobrania. Pobrania krwi odbywały się zgodnie z zarządzeniem Komendanta Głównego Policji nr 496 z 25 maja 2004 r. oraz Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11 grudnia 2015 r. w sprawie badań na zawartość alkoholu w organizmie (Dz.U. 2015. 2153).

Procedura pobrania dodatkowej próby krwi była stosowana w przypadku oddalenia się kierowcy z miejsca zdarzenia. Ponieważ zdarzenia takie są bardzo rzadkie, celem uzyskania większej liczby danych analizie poddano wyniki pochodzące z okresu 2012–2016. Dwóch wyników wątpliwych, ze względu na znaczny wzrost stężenia THC (prawdopodobny błąd podczas zabezpieczania lub oznakowania fiolek z krwią), nie uwzględniono. Łączna liczba wyników obejmujących dwie próby pobrane w godzinny odstępie wynosiła 30.

Dla celów opisowych omawianego zagadnienia wykorzystano wyniki badań krwi pobranej podczas kontroli drogowej od 495 kierowców. Badania te były przeprowadzone w IES w latach 2014–2015.

2.2. Metody

2.2.1. Analiza przesiewowa

Wstępna analiza przesiewowa wykonywana była metodą immunoenzymosorpcyjną – ELISA. Jako odczyt dodatni przyjęto próg stanowiący $\frac{1}{2}$ odczytu próbki kontrolnej negatywnej, jednak nieprzekraczający odczytu dla krwi z dodatkiem 5 ng/ml THCCOOH, która stanowiła kolejną próbę kontrolną w analizach. Do kontroli oznaczeń użyto materiału referencyjny firmy Arvecon.

2.2.2. Ekstrakcja

Krew o objętości 0,5 i 0,2 ml, odpowiednio dla THC i THCCOOH, w dwóch powtórzeniach oznaczeń wzbogacano standardami wewnętrznymi THC-D₃ oraz THCCOOH-D₃ o stężeniu odpowiednio 20 ng/ml i 50 ng/ml. Ekstrakcję prowadzono metodą ciecz-ciecz przy użyciu eteru diizopropylowego po wcześniejszym zakwaszeniu krwi do pH 3 buforem fosforanowym. Po odparowaniu suchą pozostałość poddawano modyfikacji chemicznej (derywatyzacji) mieszaniną TFAA i chloroformu (1:1) w przypadku THC oraz mieszaniną TFAA i PFPOH (1:1) w przypadku THCCOOH. Objętość wstrzykiwanego roztworu zderywatyzowanych analitów po odparowaniu rozpuszczonych w octanie etylu wynosiła 2 μ l.

2.2.3. Analiza ilościowa

W badaniach stosowano metodę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) w trybie chemicznej ujemnej jonizacji. Stosowano chromatograf gazowy model 5730 z detektorem mas model 6890 firmy Agilent Technologies. W oznaczeniach wykorzystywano tryb SIM, monitorując jony: m/z 410,3 w przypadku THC; m/z 413,3 dla THC-D₃; m/z 522,3 dla THCCOOH i m/z 525,3 dla THCCOOH-D₃.

2.2.4. Parametry walidacyjne metody

Metoda okazała się specyficzna, co potwierdzono poprzez analizę 20 próbek dających wynik negatywny we wstępnej metodzie przesiewowej (ELISA), dla których odczyt nie różnił się o więcej niż 20% od odczytu dla próbki kontrolnej ujemnej. Dla THC granica detekcji (LOD) wynosiła 0,3 ng/ml, a oznaczalności (LOQ) – 1 ng/ml. Metoda była liniowa w zakresie 1–20 ng/ml. Dla stężeń kontrolnych 1 i 10 ng/ml uzyskano powtarzalność wynoszącą odpowiednio 6,2% oraz 3,2% oraz od-twarzalność 9,8 % i 15,8%, przy dokładności odpowiednio 10,1% oraz 3,7%. Średni błąd oznaczeń obliczony na podstawie 52 wyników testów kontroli jakości z badań międzylaboratoryjnych dla zakresu 1–20 ng/ml wynosił $\pm 16,9\%$. Jako że w badaniach analizowano różnice stężeń THC w pobranym od tej samej osoby w krótkim przedziale czasu materiale, który był przechowywany i transportowany w tych samych warunkach zarówno przez zleceniodawcę, jak i laboratorium IES, za błąd pomiaru przyjęto najwyższą wartość powtarzalności, czyli 6,2%.

3. Wyniki

Z analizy protokołów pobrania krwi oraz informacji zawartych w zleceniach badań wynika, iż średni czas, po którym dochodzi do pobrania krwi od zatrzymania, wynosi 2 godz. 42 min (mediana – 2 godz. 20 min). Dla porównania: ten czas (Lemos, San Nicolas, Volk, Ingle, Williams, 2015) w badaniach przeprowadzonych w stanie Waszyngton wynosił 1 godz. 48 min (mediana – 1 godz. 42 min). Jak więc nietrudno zauważyć, od kierowcy podejrzanego o prowadzenie pojazdu pod wpływem środków podobnie działających do alkoholu w Polsce krew pobierana jest niemal godzinę później niż w USA (rysunek 1). Inne źródła wskazują na przedział 0,5–3 godzin (Jones, Holmgren, Kugelberg 2008; Mura i in., 2003).

Z wyników badań krwi pobranej od kierowców zatrzymanych do kontroli w związku z podejrzeniem prowadzenia pod wpływem alkoholu lub środków podobnie działających do alkoholu (n = 495) uzyskano rozkład stężeń, który przedstawiono na rysunku 2. Analiza danych dla THC wskazuje na zbliżony ilościowo podział

liczby prób w zakresie 1–2,5 ng/ml (45%) oraz powyżej 2,5 ng/ml (55%).

Przyjęcie wartości progowej 1 ng/ml dla THC wynika z rozporządzenia Ministra Zdrowia (2014), gdzie określono próg analityczny, który musi być uwzględniony w metodach stosowanych przez laboratoria wykonujące analizy dla celów sądowych. Natomiast próg 2,5 ng/ml – jako odpowiadający stanowi pod wpływem THC – przyjęty został przez grono polskich toksykologów sądowych podczas sympozjum zorganizowanego przez IES w 2012 roku w Krakowie, a następnie jego wysokość została ponownie poddana dyskusji podczas XXX Konferencji Toksykologów Sądowych w Augustowie w 2013 r. Należy zaznaczyć, że wartość określająca ów próg nie znalazła się dotychczas w żadnym akcie prawnym.

Ponieważ profil zmian stężenia THC w czasie zależy od stopnia uzależnienia osoby przyjmującej ten środek (a ściślej częstości przyjmowania produktów zawierających ten związek), przyjęto, zgodnie z oświadczeniami większości kierowców, że byli oni sporadycznymi palaczami marihuany. Większość badanych oświadczała bowiem, iż przed kontrolą wypalili marihuanę, ale podali, że miało to miejsce w odległym czasie, zwykle poprzedniego dnia lub wcześniej, albo że wypalili jeden raz w życiu tzw. jointa.

Jedynie w 8% przypadków stężenie THC we krwi badanych kierowców było powyżej 10 ng/ml. Stężenie takie występuje u palaczy sporadycznych po nie więcej niż godzinie od wypalenia, a więc gdy kierowca znajduje się pod najsilniejszym działaniem tego środka. Stężenia w zakresie 5–10 ng/ml zwykle rejestrowane są w przypadkach, kiedy do wypalenia doszło około 1,5 godziny wcześniej. Liczba prób krwi w takim zakresie stanowiła 17%. Z kolei zawartość THC w zakresie 2,6–5 ng/ml, a więc w przedziale odpowiadającym przyjęciu środka do około 2,5 godziny wcześniej, zanotowano 30% wyników. Do tego czasu rejestrowane są stężenia, którym przypisuje się oddziaływanie porównywalne do stanu, jaki wywołuje alkohol w stężeniu wyższym niż 0,5 promila. Dodatkowo należy mieć na uwadze, że w przypadkach, gdy otrzymano wyniki w zakresie 2,1–2,5 ng/ml (9%), ze względu na upływ czasu pomiędzy zatrzymaniem a pobraniem najprawdopodobniej w chwili zdarzenia stężenie THC przekraczało 2,5 ng/ml. Dla stężeń równych lub niższych od 2 ng/ml i jednocześnie wyższych lub równych 1 ng/ml (36% przypadków) szacowany czas przyjęcia wskazuje na nieodległe wprowadzenie do organizmu zabronionego środka (2,5–6 godzin). Długi okres półtrwania eliminacji THC powoduje, że w skrajnych przypadkach czas przyjęcia może jednak być znacznie bardziej odległy i wynosić 8 a nawet 12 godzin od wypalenia.

Znacznie bardziej interesująco przedstawiają się powyższe wyniki w świetle zebranych danych dotyczących

zmian stężeń THC u 27 badanych osób (tabela 1), od których pobierano krew w odstępach godzinnych.

Z uzyskanych wyników zauważalny (przekraczający błąd oznaczenia) spadek stężenia THC ma miejsce jedynie dla stężeń wyższych niż 2 ng/ml (rysunek 3). Tylko w 2 przypadkach na 19 (10%) stężenie THC w ciągu godziny nie obniżyło się. Przy czym, porównując uzyskane wyniki do średnich wyliczonych dla modelu I zaproponowanego przez Huestis (1992), bazującego jedynie na stężeniach THC, zmiany stężeń tego związku u badanych 27 osób sugerują częste, a przynajmniej niejednorazowe wypalenie marihuany. Tej wielkości spadki notowane były także przez Lee i współpracowników dla osób chronicznie przyjmujących produkty konopi (Lee i in., 2015).

W tabeli 2 zestawiono stężenia THC dla 5 przypadków wraz ze zmianami tych stężeń po dwóch godzinach. Dla stężeń wyznaczonych po drugiej godzinie od zatrzymania spadek wynosił co najmniej 0,48 ng/ml, przy czym maksymalne różnice wynikające z błędu oznaczenia wynosiły poniżej 0,2 ng/ml.

4. Dyskusja

Zaprezentowany rozkład zakresów stężeń THC (rysunek 2) jest podobny do uzyskanego przez Cooper i Paterson (2015) w badaniach kierowców w stanie Waszyngton. Dłuższy o ponad godzinę czas między zatrzymaniem a pobraniem odnotowywanym w Polsce powoduje, iż średnie stężenie THC w kontrolach drogowych w naszym kraju wynosi 3,36 ng/ml, podczas gdy dla wspomnianego stanu wynosi ono 8 ng/ml (Rodriguez, 2016). Należy jednak dodać, iż na tak znaczną różnicę może mieć wpływ również wzrost używania produktów konopi w Stanach Zjednoczonych po depenalizacji ich medycznych form, o czym z kolei świadczy dwukrotna różnica średnich stężeń THCCOOH wynosząca w Polsce 23,6 ng/ml, a w stanie Waszyngton – 47,9 ng/ml.

Uwzględniając powyższe dane oraz czas, jaki zajmują wszystkie czynności kontrolne przed pobraniem krwi, czyli pomiędzy 1–3 godzin, można dojść do wniosku, że z badanej grupy osób co czwarta paliła marihuanę bezpośrednio przed lub w czasie prowadzenia pojazdu. To prowadzi do kolejnego wniosku, że skutki ich zaburzeń podczas prowadzenia pojazdu można porównać do skutków, które wywołuje alkohol etylowy w stężeniu około 0,8 promila. Tego typu porównanie wynika z wniosków części projektu DRUID dotyczącego metaanalizy danych eksperymentalnych (Meta-analysis of empirical studies concerning the effects of medicines and illegal drugs including pharmacokinetics on safe driving, 2011).

Ze względu na czasochłonne czynności, podejmowane przez policję po zatrzymaniu kierującego, które sprzyjają zmniejszaniu się stężenia THC, często nie można udowodnić kierowcy prowadzenia pojazdu w stanie

odpowiadającym obecności alkoholu we krwi w stężeniu 0,8 promila, mimo iż w rzeczywistości taki przypadek miał miejsce. Odległy czas pobrania krwi do badań w wypadkach drogowych wpływać może niekorzystnie na obliczenia ryzyka doznania ciężkich obrażeń ciała lub poniesienia śmierci, ponieważ może dochodzić do przeszacowania (zawyżenia) niebezpieczeństwa związanego z paleniem marihuany dla niższych stężeń THC.

Gwałtowny spadek stężenia THC w pierwszych kilkudziesięciu minutach od przyjęcia spowodowany jest jego dystrybucją do narządów ciała, który to proces nakłada się na nieliniową eliminację pierwszego rzędu. Wielkość przyjętej dawki marihuany najwyraźniej odzwierciedla się stężeniem THC w tym okresie. W trakcie początkowych kilkudziesięciu minut zmiana stężenia dochodzi do kilkudziesięciu ng/ml, zmiana ta jest bardzo dynamiczna i trudna do kontroli. Dlatego znacznie bardziej interesujący wydaje się przedział stężeń THC pomiędzy 1 a 10 ng/ml.

Dla stężeń THC w zakresie 2–3 ng/ml jego spadki mieściły się w przedziale 0,2–0,8 ng/ml, natomiast w zakresie 3–5 ng/ml – w przedziale 0,16–1,00 ng/ml (przy czym w jednym przypadku stężenie THC wzrosło o 0,12 ng/ml).

Dla dwugodzinnego przedziału czasu pomiędzy zatrzymaniem a pobraniem, czyli najbardziej realnego scenariusza zdarzeń, spadek stężenia dla pięciu przypadków (tabela 1) wynosił od 0,1 dla stężeń poniżej 2 ng/ml do 0,48–0,83 ng/ml dla stężeń powyżej 2 ng/ml.

5. Wnioski

Zmiany stężeń THC we krwi badanych kierowców były znacznie mniejsze niż analogiczne uzyskiwane dla próbek krwi osób sporadycznie lub jednorazowo przyjmujących produkty konopi. Podobne wyniki (powolny spadek stężenia THC) uzyskiwano w przypadku osób regularnie przyjmujących marihuanę lub przynajmniej niejednorazowo. Znamienne jest, iż w swoich zeznaniach zatrzymani kierujący zwykle tłumaczą się jednorazowym lub sporadycznym przyjęciem marihuany.

W większości kontroli drogowych czas pomiędzy zatrzymaniem a pobraniem był dłuższy niż 2 godziny. W takim przypadku przy stężeniach 2 ng/ml lub wyższych rejestrowano spadki stężenia rzędu 0,5 ng/ml i wyższe, co oznacza, iż w chwili zatrzymania stężenie najprawdopodobniej przekraczało 2,5 ng/ml. W przypadku, gdy do pobrania krwi doszło stosunkowo szybko, tzn. po około godzinie, spadek stężeń wynosił średnio 0,17 ng/ml, ale mógł też być wyższy. Tak więc nie można wykluczyć, że w chwili zatrzymania stężenie THC było wyższe niż 2,5 ng/ml, ale jest też prawdopodobne, że mogło ono nie być przekroczone.

Co najmniej w 75% przypadków do pobrania krwi od kierowcy w Polsce dochodzi po dwóch lub więcej godzinach od zatrzymania. W tym czasie, zakładając wynik badania krwi wyższy niż 2,5 ng/ml, dochodzi do spadku stężenia o co najmniej 0,5 ng/ml. Oznacza to, iż ewentualny błąd oznaczenia nie ma wpływu na kwalifikację czynu.

