



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

«ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΠΕΠΑΛΛΑΙΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΠΡΟΣΦΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ»

Ντούπα Παναγούλα-Σταματίνα

Φαρμακοποιός

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Μαρία Στεφανίδου-Λουτσίδου

Καθηγήτρια Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Αθήνα, 2019

**ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ
ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**«ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ ΠΕΠΑΛΛΑΙΩΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΗΣ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΠΡΟΣΦΑΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ»**

Ντούπα Παναγούλα-Σταματίνα

Φαρμακοποιός

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Μαρία Στεφανίδου-Λουτσίδου

Καθηγήτρια Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαρία Στεφανίδου

Καθηγήτρια Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Σωτήριος Αθανασέλης

Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Παπουτσής

Επίκουρος Καθηγητής Δικαστικής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη διεθνή βιβλιογραφία, μόνο σε λιγοστές δημοσιευμένες επιστημονικές εργασίες υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη σταθερότητα των κανναβινοειδών κατά τη φύλαξη των δειγμάτων κάνναβης για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για το λόγο αυτό, σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η εκτίμηση της σταθερότητας κανναβινοειδών στα προϊόντα της κάνναβης κατά την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, απαραίτητη ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση κατάλληλης αναλυτικής μεθοδολογίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των έξι κανναβινοειδών που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας αυτής, Δ⁹-THC, CBD, CBN, THCA, CBDA και CBCA, σε δείγματα κάνναβης, με τη χρήση της τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Τα στάδια της μεθόδου που αναπτύχθηκε περιλαμβάνουν την εκχύλιση των υπό μελέτη κανναβινοειδών από τα δείγματα κάνναβης με τη χρήση μίγματος διαλυτών εξαίνιου: οξικού αιθυλεστέρα (6:4, v/v) και τη βοήθεια υπερήχων, παραγωγοποίησή τους με τη χρήση του αντιδραστηρίου BSTFA με 1% TMCS σε θερμοκρασία 70⁰ C για 30 min και στη συνέχεια ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους στα δείγματα κάνναβης. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κανναβινοειδών χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο η Δ⁹-THC-d₃.

Κατά την επικύρωση της μεθόδου που αναπτύχθηκε, η οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες του FDA, της Ευρωπαϊκής Ένωσης, του ICH και της EURACHEM, οι παράμετροι που ελέγχθηκαν ήταν οι εξής: εκλεκτικότητα, ειδικότητα, γραμμικότητα, κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, ορθότητα εντός την ημέρας και δια των ημερών. Η μέθοδος παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όσον αφορά κυρίως στην ευαισθησία και το δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων, σε σχέση με άλλες ήδη δημοσιευμένες μεθόδους σε επιστημονικές εργασίες που χρησιμοποιούν την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε πεπαλαιωμένα και πρόσφατα δείγματα κάνναβης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των έξι κανναβινοειδών. Τα αποτελέσματα της περιεκτικότητας των κανναβινοειδών που ελήφθησαν στα πρόσφατα δείγματα συγκρίθηκαν με αυτά των πεπαλαιωμένων για την εκτίμηση της σταθερότητας των έξι κανναβινοειδών σε δείγματα κάνναβης κατά την αποθήκευσή

τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Επιπλέον έγινε σύγκριση των αποτελεσμάτων της σταθερότητας των κανναβινοειδών από τη μελέτη αυτή με τα αποτελέσματα άλλων ήδη δημοσιευμένων εργασιών. Τέλος, από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων σταθερότητας της εργασίας αυτής προτάθηκαν νέοι δείκτες για την εκτίμηση της παλαιότητας των δειγμάτων της κάνναβης, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τις περιεκτικότητες, όσο και τους λόγους των συγκεντρώσεων των προσδιορισθέντων κανναβινοειδών στα δείγματα κάνναβης.

Λέξεις-κλειδιά: κανναβινοειδή, σταθερότητα κανναβινοειδών, αέρια χρωματογραφία, φασματομετρία μαζών

SUMMARY

Cannabinoid content of old samples of cannabis products and comparison to fresh cannabis products

According to the scientific literature, only few papers containing data on the stability of cannabinoids during the storage of cannabis for long term periods have been published. Therefore, the aim of this MSc thesis is the study of the stability of cannabinoids in cannabis products after longterm storage. For this purpose, the development, optimization and validation of a suitable GC-MS method for the determination of six cannabinoids that are present in cannabis products, Δ^9 -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA and CBCA, was necessary. The studied cannabinoids were extracted from both recent and old cannabis samples by using a solvent mixture of hexane: ethyl acetate (6: 4, v/v) and sonication, followed by the derivatization of the analytes using BSTFA with 1 % TMCS at 70⁰ C for 30 min. The samples were then injected into the chromatographic system. The determination of studied cannabinoids was performed using Δ^9 -THC-d₃ as internal standard.

During the validation procedure that was performed according to the international guidelines, the following parameters were studied: selectivity, specificity, linearity, limits of detection and quantification, as well as, intra- and inter-day accuracy and precision. The developed method has significant advantages in terms of sensitivity and dynamic range of concentrations, compared to other already relative published methods using the gas chromatography technique.

The developed method was applied to old and recent cannabis samples for the determination of the six studied cannabinoids. The concentrations of the cannabinoid content obtained in the recent samples were compared to those of old ones to assess the stability of six cannabinoids in cannabis samples during their storage for different time periods. In addition, our data regarding the cannabinoid stability were compared to those of other previously published studies. Finally, by using the stability results of this work, new indicators were proposed for the estimation of the age of cannabis samples, taking into account both concentrations and their ratios of specific cannabinoids.

Keywords: cannabinoids, stability of cannabinoids, gas chromatography, mass spectrometry

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής, ΕΚΠΑ, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική». Λόγω του περιορισμένου αριθμού δημοσιευμένων επιστημονικών δημοσιεύσεων σχετικά με τη σταθερότητα των κανναβινοειδών, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η εκτίμηση και η εξαγωγή συμπερασμάτων για τη σταθερότητα των κανναβινοειδών στα προϊόντα της κάνναβης κατά την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής, Καθηγήτρια κ. Χ. Σπηλιοπούλου για την αποδοχή της στο εργαστήριο για την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Μαρία Στεφανίδου-Λουτσίδου για την ανάθεση του θέματος και την ευκαιρία που μου έδωσε αρχικά να ενταχθώ στην ομάδα του Εργαστηρίου Τοξικολογίας, αλλά και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Την ευχαριστώ για την επιστημονική της συμβολή σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της μεταπτυχιακής εργασίας.

Ευχαριστώ, επίσης, τον καθηγητή κ. Σωτήριο Αθανασέλη, για την καθοδήγηση, τις σημαντικές συμβουλές και παρατηρήσεις του κατά τη συγγραφή της εργασίας, καθώς και για την πολύτιμη συμπαράσταση που έχει δείξει προς το άτομο μου.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή κ. Ιωάννη Παπουτσή, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος της διπλωματικής μου εργασίας, για τις γνώσεις που μου μετέδωσε απλόχερα, για τη συνεχή παρακίνησή του και κυρίως για την εμπιστοσύνη και υποστήριξή του.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που αναπτύξαμε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Θα ήταν παράβλεψη να μην αναφερθώ στην πολύτιμη συμβολή της κυρίας Ελένης Μπακούρη, από το Γενικό Χημείο του Κράτους, για την παραχώρηση των πρόσφατων δειγμάτων κάνναβης, καθώς και του εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας του

Τμήματος Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ, για την προσφορά των πρότυπων ουσιών παρακαταθήκης.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς την οικογένεια μου, που βρίσκεται πάντα δίπλα μου, πιστεύει σε εμένα και στηρίζει κάθε μου βήμα, καθώς επίσης και στους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την ενθάρρυνση που μου έχουν προσφέρει κατά τη διάρκεια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Τάνια Ντούπα,

Ιούλιος, 2019

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
SUMMARY.....	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	10
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΝΝΑΒΗ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ.....	19
2.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ.....	19
2.2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ	19
2.3 ΧΗΜΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ	20
2.3.1 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ.....	21
2.3.2 ΦΥΤΙΚΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	23
2.3.3 ΤΕΡΠΕΝΙΑ	26
2.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ.....	26
2.4.2 ΠΕΡΙΟΔΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΝΕΑΡΟΥ ΦΥΤΟΥ (ΣΤΑΔΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΔΕΝΤΡΥΛΛΙΩΝ).....	26
2.4.3 ΒΛΑΣΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	27
2.4.4. ΑΝΘΟΦΟΡΙΑ	27
2.5 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ.....	28
2.5.1. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ.....	28
2.5.2 ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΕΔΑΦΟΥΣ.....	28
2.5.3 ΦΩΤΙΣΜΟΣ.....	28
2.5.4 ΝΕΡΟ	28
2.6 ΥΔΡΟΠΟΝΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	29
2.7 ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ ΚΑΙ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ.....	29
2.7.1 ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ	29
2.7.2 ΞΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	30
2.8 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	30
2.9 ΤΥΠΟΙ ΚΑΝΝΑΒΗΣ	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ.....	35
3.1 ΕΝΔΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΕΣ ΣΥΣΤΗΜΑ - ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	35
3.1.1 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ.....	35
3.1.2 Άλλοι υποδοχείς εκτός του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος	35
3.1.3 ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	36
3.1.4 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΗ	36
3.2 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	37
3.3 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	40
3.3.1 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ Δ ⁹ -ΤΗC	40
3.3.2 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ CBD.....	43

3.3.3 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΗΣ CBN	44
3.3.4. ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΟΥ THCA	44
3.4 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ	45
3.4.1 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΨΥΧΙΚΗ ΥΓΕΙΑ	45
3.4.2 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	46
3.4.3 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	47
3.4.4 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	47
3.4.5 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΟ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	48
3.4.6 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΟΔΗΓΗΣΗΣ	48
3.4.7 ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΧΗ.....	49
3.5 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΚΑΝΝΑΒΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΝΝΑΒΗΣ 55

4.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΗΣ	55
4.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	55
4.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	56
4.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	57

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 67

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΟΤΕΧΝΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ..... 71

5.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	71
5.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	72
5.3 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	72
5.4 ΔΕΙΓΜΑΤΑ	73
5.5 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΑΤΑΘΗΚΗΣ	73
5.6 ΜΙΚΤΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	74
5.9 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΜΙΓΜΑΤΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	77

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ 79

6.1 ΕΣΩΤΕΡΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ.....	79
6.2 ΠΑΡΑΓΩΓΟΠΟΙΗΣΗ	80
6.3 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	84
6.4 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	85
6.5 ΤΕΛΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ	87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΗΣ 89

7.1 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	89
-------------------------	----

7.2 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	89
7.3 ΚΑΤΩΤΑΤΑ ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (LOD) ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ (LOQ).....	90
7.4 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ	90
7.5 ΕΠΑΝΑΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	90
7.6 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ	91
7.7 ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΗΜΕΡΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑ ΤΩΝ ΗΜΕΡΩΝ	92

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΗΣ 93

8.1 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	93
8.2 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ.....	96
8.3 ΚΑΤΩΤΑΤΑ ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ	96
8.4 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ	99
8.5 ΕΠΑΝΑΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	101
8.6 ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ	105
8.7 ΟΡΘΟΤΗΤΑ ΕΝΤΟΣ ΤΗΣ ΗΜΕΡΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑ ΤΩΝ ΗΜΕΡΩΝ	110

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΧΘΕΙΣΑΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΚΑΝΝΑΒΗΣ 117

<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u>	127
-----------------------------	------------

<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	135
----------------------------------	------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ιστορικά στοιχεία για την κάνναβη

Ιστορικά, η Κεντρική και Νοτιοανατολική Ασία αποτελούν τις πρώτες περιοχές προέλευσης και πρωτογενούς εξάπλωσης της κάνναβης. Τα πρώτα στοιχεία χρήσης της κάνναβης αναφέρονται στην Κίνα, όπου φαίνεται ότι ήδη από το 4000 π.Χ., η καλλιέργεια του φυτού αποσκοπούσε τόσο στη χρήση των σπόρων ως τροφή, όσο και στην παραγωγή ινών. Υφάσματα και χαρτί από κάνναβη έχουν βρεθεί σε τάφους κινέζων αυτοκρατόρων και σύμφωνα με έναν κινέζικο μύθο, ο αυτοκράτορας Shen Neng ήταν ένας από τους πρώτους ηγέτες, που χρησιμοποίησε το τσάι της κάνναβης ως θεραπεία για διάφορες ασθένειες, μεταξύ των οποίων ήταν η ουρική αρθρίτιδα, οι ρευματισμοί και η ελονοσία. Στη συνέχεια, η χρήση της κάνναβης εξαπλώθηκε σε ολόκληρη την Ασία, τη Μέση Ανατολή και την Αφρική. Την περίοδο 2000-1400 π.Χ. στην Ινδία η κάνναβη χρησιμοποιήθηκε ευρέως, τόσο ιατρικά, όσο και θρησκευτικά αλλά και για λόγους απόλαυσης. Αναμιγνυόταν συχνά με ειδικά ποτά, τα οποία χρησίμευαν από την απλή απόλαυση, μέχρι και για ιατρικούς σκοπούς. Το πιο δημοφιλές από αυτά τα ειδικά ποτά, ονομαζόταν ‘bhang’ και παρασκευαζόταν από τα άνθη και τα φύλλα της κάνναβης, μαζί με γάλα, μπαχαρικά και ζάχαρη. Σε πολλές περιοχές της Ινδίας, πίστευαν ότι το bhang θεραπεύει τον πυρετό, βοηθάει στην πέψη, και μειώνει το άγχος. Καθώς η χρήση του ποτού αυτού γινόταν ολοένα και πιο διαδεδομένη, πολλοί υποστήριζαν ότι είχε την ικανότητα να προκαλεί ευτυχία στους ανθρώπους και να βελτιώνει την πνευματική ευεξία (Bonini et al., 2018).

Στην Αρχαία Ελλάδα, η Πυθία πριν από κάθε χρησιμοδότηση μασούσε φύλλα δάφνης και ανέβαινε σε έναν τρίποδα. Κατά πολλούς, τα φύλλα αυτά προέρχονταν από διάφορα φυτά, όπως δάφνη, *Datura stramonium*, κάνναβη ή άλλα ψυχότροπα φυτά και κατά τη μάσησή τους, σε συνδυασμό με αναθυμιάσεις που παράγονταν κατά την καύση τους, η Πυθία ερχόταν σε έκσταση και έδινε τους περίφημους χρησμούς της. Σύμφωνα με νεότερες έρευνες, το παραλήρημα της Πυθίας οφειλόταν κυρίως στην εισπνοή αερίων που ανάβλυζαν από το γεωλογικό ρήγμα στο οποίο βρίσκεται το Μαντείο των Δελφών. Από το ρήγμα αυτό διαφεύγουν αέρια, μεθάνιο, αιθένιο και διοξείδιο του άνθρακα, τα οποία μειώνουν τη συγκέντρωση οξυγόνου, οδηγώντας σε υπνωτική κατάσταση, η οποία μπορεί να εξελιχθεί σε έκσταση ή παραλήρημα (Harissis, 2014). Κατά άλλους ερευνητές, οι παραισθήσεις της Πυθίας οφείλονταν

στην έκλυση αιθυλενίου από το γεωλογικό ρήγμα των Δελφών (De Boer & Hale, 2000).

Η κάνναβη και τα προϊόντα της ήταν ήδη γνωστά από τον 5ο αιώνα π.Χ. και υπάρχουν αρκετές ιστορικές μαρτυρίες που το υποστηρίζουν. Στις περιγραφές του Ηροδότου περιγράφεται ο τρόπος με τον οποίο χρησιμοποιούσε την κάνναβη το νομαδικό φύλο των Σκυθών, οι οποίοι ήταν πιθανώς οι πρώτοι χρήστες, ενώ ο Δημόκριτος αναφέρει πως οι αρχαίοι Έλληνες κατανάλωναν κάνναβη μαζί με κρασί και μύρο, για να δημιουργήσουν οράματα. Οι συγγραφείς Λουκίλιος και Πλίνιος περιγράφουν την κατασκευή σχοινιών και υφασμάτων από κάνναβη ενώ σε αρχαιολογικά ευρήματα που έχουν συλλεχθεί από τάφους της Βόρειας Ελλάδας έχει βρεθεί σχοινί κατασκευασμένο από κάνναβη, το οποίο χρονολογείται από το 200 π.Χ. Τέλος, ο Διοσκουρίδης, είχε κατατάξει την κάνναβη στα φυτά που διαθέτουν φαρμακευτικές ιδιότητες, το 70 μ.Χ. (Αράπη και Αποστόλου, 2016).

Κατά το Μεσαίωνα, η κάνναβη ήταν γνωστή σε όλη την Ευρώπη, τόσο ως διατροφικό, θεραπευτικό και ευφορικό φυτό αλλά και ως πρώτη ύλη στην παραγωγή ρούχων. Στην Ελλάδα, η καλλιέργεια κάνναβης έχει ξεκινήσει από τον Μεσαίωνα και συνεχιζόταν και κατά την περίοδο της Τουρκοκρατίας, ωστόσο οι αλλεπάλληλοι πόλεμοι οδήγησαν στον περιορισμό της καλλιέργειας της. Το 1875, ήταν η χρονιά που έγινε η πρώτη οργανωμένη καλλιέργεια κλωστικής κάνναβης, η οποία υπήρξε ιδιαίτερα διαδεδομένη στα χρόνια που ακολούθησαν. Όμως από το 1915 – 1919, ο πόλεμος, ο ναυτικός αποκλεισμός και η ραγδαία αύξηση της τιμής των δημητριακών, έδωσαν τέλος στην συστηματική καλλιέργειά της. Στο τέλος του Α' Παγκοσμίου Πολέμου, η κλωστική κάνναβη αποτελούσε βασική γεωργική καλλιέργεια και εξαγωγίμο προϊόν έως το 1932. Το 1928, υπήρχαν στην Ελλάδα δέκα εργοστάσια, γνωστά ως «κανναβουργεία», τα οποία επεξεργάζονταν την ίνα κυρίως για τη δημιουργία σχοινιών. Το 1936 ήταν η χρονιά που απαγορεύτηκε η καλλιέργεια και η χρήση της κάνναβης στην Ελλάδα με αποτέλεσμα την πτώχευση και το κλείσιμο των ελληνικών κανναβουργείων.

Η χρήση της κάνναβης ως θεραπευτικό μέσο έγινε γνωστή, στο Δυτικό κόσμο, το 1839, από τον Ιρλανδό ιατρό William O'Shaughnessy. Κατά την περίοδο που εργαζόταν ως ιατρός στην Ινδία, άρχισε να μελετά τη χρήση της κάνναβης, τόσο για ψυχαγωγικούς όσο και για θεραπευτικούς σκοπούς. Αφού μελέτησε ενδελεχώς τη χρήση του φυτού στην παραδοσιακή ιατρική, άρχισε να χορηγεί διάφορες μορφές κάνναβης σε ζώα με σκοπό να εκτιμήσει την τοξικότητα της ως φάρμακο. Όταν

διαπίστωσε την ασφάλεια της χρήσης της, άρχισε να χορηγεί αλκοολούχα βάμματα κάνναβης σε ασθενείς που έπασχαν από επιληψία, ρευματισμούς, τέτανο ή χολέρα, με θετικά αποτελέσματα τόσο στη θεραπεία του πόνου όσο και των σπασμών. Η μεγαλύτερη επιτυχία του ήταν στην αντιμετώπιση μυϊκών σπασμών που οφείλονταν σε τέτανο και λύσσα με τη χρήση της ρητίνης κάνναβης. Οι αναλγητικές και αντισπασμωδικές ιδιότητες της κάνναβης επιβεβαιώθηκαν από τις μελέτες και άλλων ιατρών, με αποτέλεσμα να διαδοθεί ταχύτατα η χρήση της κάνναβης σε όλη την Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική (Pisanti and Bifulco, 2017).

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα επόμενα χρόνια, λόγω σημαντικών ιατρικών ανακαλύψεων, όπως για παράδειγμα το εμβόλιο κατά του τετάνου, η ιατρική χρήση της κάνναβης εμφάνισε σταδιακά φθίνουσα πορεία. Επιπλέον, μετά την εισαγωγή των συνθετικών ναρκωτικών, όπως τα βαρβιτουρικά και τα οπιοειδή, στην ιατρική, η χρήση της κάνναβης μειώθηκε (Hand et al., 2016).

Στις αρχές του 1900, η ψυχαγωγική χρήση της κάνναβης στην Αμερική γνώρισε μεγάλη αύξηση λόγω των Μεξικανικών και Αφρικανικών μειονοτήτων, που είχαν μεταναστεύσει στη χώρα. Μέχρι και το 1930, η χρήση της είχε εξαπλωθεί και μεταξύ Αμερικανών, κάτι που οδήγησε τις αρμόδιες αρχές να επιβάλλουν πιο αυστηρή νομοθεσία τόσο για την ψυχαγωγική, όσο και για την ιατρική χρήση του φυτού. Το 1937, επιβλήθηκε ο ομοσπονδιακός νόμος «The Marijuana Tax Act», σύμφωνα με τον οποίο η Κάνναβη αναγνωριζόταν ως χρήσιμο φάρμακο, αλλά επιβάλλονταν αυστηρές κυρώσεις σε γιατρούς, φαρμακοποιούς και γεωργούς που θα συνδέονταν με την συνταγογράφηση, τη διάθεση στο εμπόριο και την παραγωγή της, αντίστοιχα (Hand et al., 2016).

Το νόμο του 1937 ακολούθησε η οριστική απόσυρση της κάνναβης από την Αμερικανική Φαρμακοποιία, λόγω των αξιοσημείωτων ψυχοδραστικών επιπτώσεων της και η εφαρμογή ποινικών κυρώσεων για κατοχή από το 1951 καθώς και η θέσπιση του Νόμου περί Ελεγχόμενων Ουσιών το 1970. Ο νόμος αυτός κατέταξε την μαριχουάνα μαζί με την ηρωίνη και το LSD, στην Κατηγορία I, η οποία περιλαμβάνει ναρκωτικά τα οποία έχουν υψηλή πιθανότητα κατάχρησης και καμία αποδεκτή ιατρική χρήση (Bridgeman and Abazia, 2017).

Εκτός από τον περιορισμό της παράνομης χρήσης της κάνναβης, αυτές οι νομοθετικές πράξεις συνέβαλαν στη δημιουργία περιορισμών στην έρευνα, περιορίζοντας τη διάθεση της κάνναβης για ερευνητικούς σκοπούς (Bridgeman et al., 2017). Ωστόσο, η επιστημονική έρευνα για το φυτό της κάνναβης, δεν σταμάτησε

τελείως. Οι ερευνητές Yehiel Gaoni και Raphael Mechoulam, από το Ινστιτούτο Weizmann του Ισραήλ, ανακάλυψαν, το 1964, τη χημική δομή του κύριου δραστικού συστατικού, της Δ⁹-τετραυδροκανναβινόλης (Δ⁹-THC). Η ίδια ερευνητική ομάδα ήταν αυτή που απομόνωσε και το ενδοκανναβινοειδές ανανδαμίδη, το 1992, και παρήγαγε τη συνθετική Δ⁹-THC, το 1965, όπως και άλλα σημαντικά κανναβινοειδή. Η ανακάλυψη αυτή αναζωπύρωσε το ενδιαφέρον για την έρευνα σχετικά με την κάνναβη. Τη δεκαετία του 1970 διεξήχθησαν κλινικές μελέτες για την αποτελεσματικότητα της συνθετικής Δ⁹-THC, της δροναβινόλης, ως αναλγητικό (Noyes et al., 1975), αντιεμετικό (Sallan et al., 1975), αντικαταθλιπτικό (Noyes et al., 1976), διεγερτικό της όρεξης (Regelson et al., 1976) και για τη θεραπεία του γλαυκώματος (Green et al., 1976), οι οποίες οδήγησαν τελικά στην έγκριση της για τη θεραπεία ναυτίας προκαλούμενης από χημειοθεραπεία, για τον εμετό και για τη διέγερση της όρεξης σε ασθενείς με AIDS, με το εμπορικό όνομα Marinol, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός δράσης της.

Τη δεκαετία του 1990, συνεχίστηκε εντονότερα η φαρμακολογική έρευνα στο πεδίο των κανναβινοειδών που οδήγησε στην ανακάλυψη του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος και των αντίστοιχων υποδοχέων των κανναβινοειδών. Η ανακάλυψη των ενδοκανναβινοειδών, της ανανδαμίδης και της 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλης, καθώς και ο λεπτομερής χαρακτηρισμός του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος ανανέωσαν το επιστημονικό ενδιαφέρον σχετικά με την κάνναβη, οδηγώντας στη δημοσίευση χιλιάδων επιστημονικών άρθρων, τα οποία επισήμαιναν τις πιθανές φαρμακευτικές χρήσεις του φυτού (Pisanti and Bifulco, 2017).

Το 1996, η Καλιφόρνια έγινε η πρώτη πολιτεία που επέτρεψε τη νόμιμη χρήση του φυτού της κάνναβης για θεραπευτικούς σκοπούς υπό την επίβλεψη ιατρού, με την εφαρμογή του νόμου περί «παρηγορητικής θεραπείας». Πλέον, 33 πολιτείες των ΗΠΑ έχουν νομιμοποιήσει την ιατρική χρήση της κάνναβης, υπό την επίβλεψη ιατρού, 14 πολιτείες έχουν θεσπίσει ειδικούς νόμους που καθορίζουν την περιεκτικότητα των σκευασμάτων σε Δ⁹-THC, επιτρέποντας και τη χρήση σκευασμάτων που έχουν ως δραστική ουσία την κανναβιδιόλη, το κύριο μη ψυχότροπο συστατικό της κάνναβης, ενώ σε 10 πολιτείες είναι νόμιμη και η ψυχαγωγική χρήση της (Bridgeman and Abazia, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Φαρμακογνωσία της κάνναβης

2.1 Ταξινόμηση των φυτών της κάνναβης

Το φυτό της κάνναβης ανήκει στην οικογένεια Cannabaceae (Πίνακας 1). Μεταξύ των βοτανολόγων υπάρχει διαφωνία σχετικά με την ακριβή ταξινόμηση του φυτού της κάνναβης, λόγω του μεγάλου αριθμού ποικιλιών από τον οποίο χαρακτηρίζεται. Στο γένος αυτό ταξινομούνται, πλέον, τρία διακριτά είδη, η *C. sativa*, η *C. indica* και η *C. ruderalis*, τα οποία πολύ συχνά θεωρούνται ως υποείδη της *C. Sativa* ή ως ποικιλίες του ίδιου είδους (Williamson et al., 2004). Τα δύο είδη *C. Sativa* και *C. indica* διαφέρουν τόσο στη μορφολογία του φυτού αλλά κυρίως των φύλλων τους. Τα φυτά *C. sativa* είναι πιο ψηλά, αραιά διακλαδισμένα και τα φύλλα τους είναι πιο μικρά και λεπτά συγκριτικά με τα φυτά *C. indica*. Τα φυτά *C. sativa* συνήθως έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC και χαμηλότερη σε CBD από τα φυτά *C. indica*. Τα φυτά *C. ruderalis* είναι πολύ μικρότερα από τα άλλα δύο είδη, τα φύλλα τους είναι πιο λεπτά και έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC (Thomas and ElSohly, 2015).

Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση του φυτού της κάνναβης

Βασίλειο	Φυτά (Plantae)
Συνομοταξία	Αγγειόσπερμα (Magnoliophyta)
Ομοταξία	Δικοτυλήδονα (Magnoliopsida)
Τάξη	Κνιδώδη (Urticales)
Οικογένεια	Κανναβοειδή (Cannabaceae)
Γένος	Κάνναβη (Cannabis)

2.2 Ανατομία του φυτού

Η *Cannabis sativa* L. είναι ένα δίοικο φυτό (δύο οίκοι), δηλαδή έχει τα αρσενικά και τα θηλυκά άνθη σε διαφορετικά φυτά. Είναι ποώδες φυτό, αυτοφυές κυρίως στην Κεντρική και Δυτική Ασία. Μοιάζει με ευθυτενή θάμνο, αναπτύσσεται σε υγρό έδαφος σε όλες τις κλιματολογικές συνθήκες και φτάνει σε ύψος 1,5-7 μέτρων, ανάλογα με την ποικιλία του φυτού και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο κορμός του είναι όρθιος, ισχυρός, με πυκνές διακλαδώσεις. Τα φύλλα της κάνναβης έχουν ένα πολύ χαρακτηριστικό σχήμα, το οποίο διευκολύνει την αναγνώριση του

φυτού ακόμα και από ελάχιστα εξοικειωμένα άτομα. Είναι παλαμοειδή, με πριονωτό περίγραμμα. Ο αριθμός των φύλλων αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του φυτού και φτάνει μέχρι και 13 φύλλα. Τα φύλλα έχουν πολύ σημαντικές λειτουργίες στο φυτό, καθώς είναι υπεύθυνα μεταξύ άλλων, για την φωτοσύνθεση και την διαπνοή. Στην κάνναβη, υπάρχουν 2 τύποι λουλουδιών, τα αρσενικά άνθη, τα οποία είναι διακλαδισμένα και έχουν στήμονες, όπου βρίσκεται η γύρη που χρησιμοποιείται για την γονιμοποίηση των θηλυκών λουλουδιών και τα θηλυκά άνθη, τα οποία έχουν μόνο ύπερο. Κύριο χαρακτηριστικό των θηλυκών ανθέων αποτελούν οι αδενώδεις τρίχες, οι οποίες είναι οι μικροσκοπικοί αδένες που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή της ρητίνης των λουλουδιών. Βρίσκονται κυρίως στα βράκτια φύλλα των ανθέων, αλλά εντοπίζονται επίσης, σε μικρότερο βαθμό, στα φύλλα και τους μίσχους. Στην κάνναβη, τα άνθη και οι σπόροι που χρησιμοποιούνται, είναι τα άνθη των θηλυκών φυτών. Το άνθος είναι το αναπαραγωγικό όργανο του φυτού, το οποίο γονιμοποιείται μέσω επικονίασης από τον άνεμο (Αράπη και Αποστόλου, 2016). Διάφορα παράγωγα του φυτού κάνναβης είναι διαθέσιμα στην παράνομη αγορά. Η μαριχουάνα είναι τα αποξηραμένα τριμμένα φύλλα του φυτού της κάνναβης. Συνήθως έχει χρώμα πράσινο, καφέ ή γκριζό. Το χασίς είναι η σκουρόχρωμη και αποξηραμένη ρητίνη που βγαίνει από τις αδενώδεις τρίχες των ανθέων και των ακροτελεύτιων ταξιανθιών του φυτού της κάνναβης, αφού προηγουμένως συμπιεστεί υπό θερμότητα σε μορφή πλακούντα, ράβδου ή σφαίρας. Το χασισέλαιο είναι το κολλώδες και παχύρρευστο υλικό που παράγεται από την συμπύκνωση των εκχυλισμάτων που έχουν προκύψει μετά από εκχύλιση των διαφόρων τμημάτων του φυτού με οργανικό διαλύτη (Κουτσελίνης, 2002).

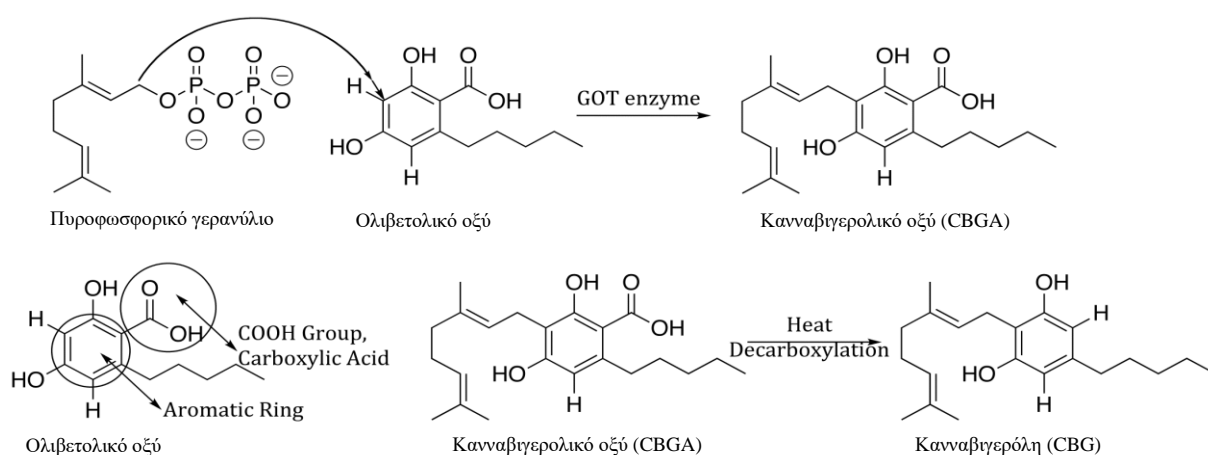
2.3 Χημικά συστατικά της κάνναβης

Το φυτό της κάνναβης περιέχει πάνω από 500 χημικές ενώσεις, εκ των οποίων έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 100 κανναβινοειδή. Τις τελευταίες δεκαετίες, υπάρχει σύγχυση σχετικά με την ερμηνεία του όρου «κανναβινοειδές». Ενώ αρχικά είχε χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή μιας κατηγορίας χημικών ενώσεων, με παρόμοια χημική δομή, που είχαν απομονωθεί από το φυτό της κάνναβης, στη συνέχεια συσχετίστηκε με τη βιολογική δράση του κύριου ψυχοδραστικού συστατικού της κάνναβης, της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ⁹-THC), χάνοντας με αυτόν τον τρόπο τη δομική σημασία του. Με τον συγκεκριμένο όρο, επομένως, άρχισαν να

περιγράφονται ενώσεις που είχαν χημική συγγένεια με τους υποδοχείς κανναβινοειδών CB₁ και CB₂, ανεξάρτητα από τη χημική δομή και τη βιοσύνθεση τους. Ωστόσο, από τα γνωστά κανναβινοειδή, μόνο η Δ⁹-THC, το ισομερές της Δ⁸-THC, και, σε χαμηλότερο βαθμό, η CBN προσδέονται στους υποδοχείς αυτούς με ικανοποιητική συγγένεια. Τα ενδογενώς παραγόμενα ανάλογα της Δ⁹-THC, που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς αυτούς, χαρακτηρίζονται ως «ενδοκανναβινοειδή», ενώ τα κανναβινοειδή που έχουν απομονωθεί από το φυτό χαρακτηρίζονται ως «φυτικά κανναβινοειδή», υποδηλώνοντας με αυτόν τον τρόπο τη φυτική τους προέλευση. Τέλος, υπάρχουν επίσης κανναβινοειδή που παρασκευάζονται συνθετικά μέσω χημικών αντιδράσεων στα εργαστήρια, γνωστά ως «συνθετικά κανναβινοειδή» (Hanus et al., 2016).

2.3.1 Βιοσύνθεση φυτικών κανναβινοειδών

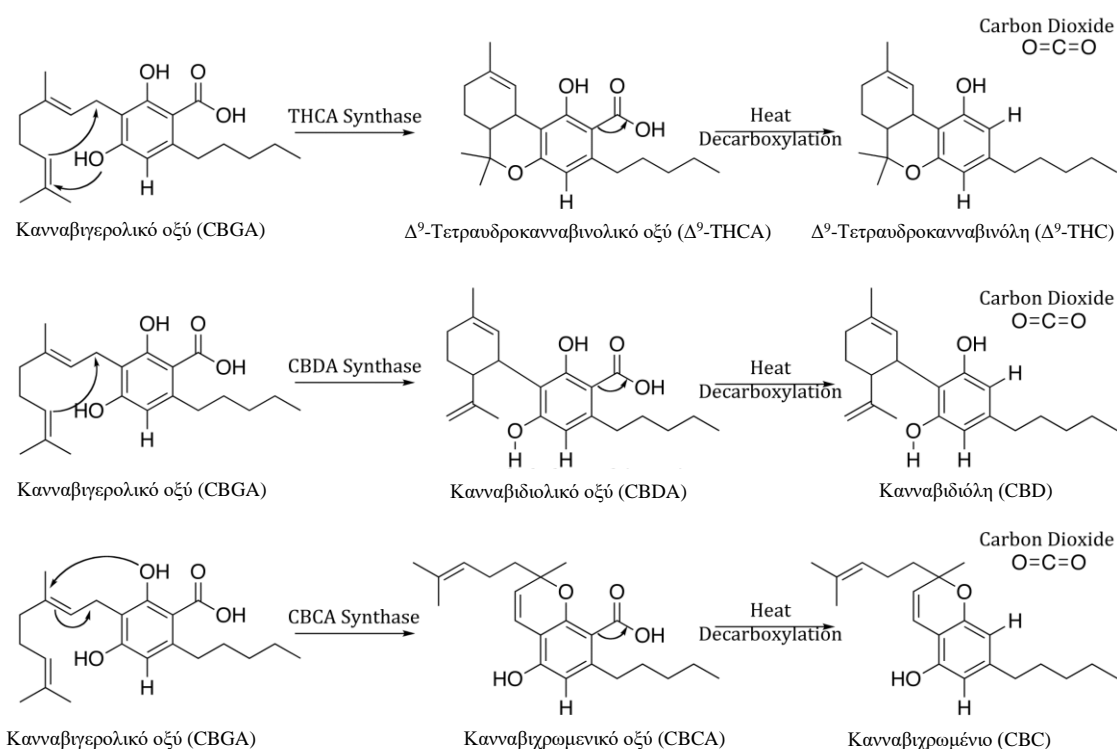
Τα φυτικά κανναβινοειδή είναι τερπενοφαινολικές ενώσεις, που σχετίζονται χημικά με τα τερπένια. Συντίθενται στις αδενώδεις τρίχες που υπάρχουν σε αφθονία στα βράκτια φύλλα των θηλυκών ανθέων. Το πρώτο βήμα στη βιοσύνθεσή τους είναι η συμπύκνωση του πυροφωσφορικού γερανυλίου και του ολιβετολικού οξέος, με τη βοήθεια ενός ενζύμου που ονομάζεται συνθετάση του κανναβιγερολικού οξέος (Cannabigerolic acid synthase, CBGAS), προς το σχηματισμό του κανναβιγερολικού οξέος (CBGA) (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Βιοσύνθεση κανναβιγερολικού οξέος και κανναβιγερόλης.

Το CBGA θεωρείται ο κύριος πρόδρομος όλων των κανναβινοειδών, καθώς από αυτό και με διαφορετική κυκλοποίηση της αλλυλικής αλυσίδας σχηματίζονται οι

όξινες μορφές των κύριων αλκαλοειδών της κάνναβης. Έτσι, το CBGA κυκλοποιείται προς τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA), κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και κανναβιχρωμενικό οξύ (CBCA), με τη μεσολάβηση των ενζύμων που είναι γνωστά ως συνθετάση του τετραϋδροκανναβινολικού οξέος (THCAS), συνθετάση του κανναβιδιολικού οξέος (CBGAS) και συνθετάση του κανναβιχρωμενικού οξέος (CBCAS) αντίστοιχα (Σχήμα 2). Στη συνέχεια, τα παραπάνω οξέα αποκαρβοξυλιώνονται, χωρίς τη μεσολάβηση κάποιου ενζύμου, και προκύπτουν τα αντίστοιχα ουδέτερα αλκαλοειδή, Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη (Δ^9 -THC), κανναβιδιόλη (CBD) και κανναβιχρωμένιο (CBC), ενώ από την αποκαρβοξυλίωση του κανναβιγερολικού οξέος προκύπτει η κανναβιγερόλη (CBG). Η αποκαρβοξυλίωση αυτή προκύπτει κατά την αποθήκευση αλλά και υπό την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών, επομένως και κατά το κάπνισμα της κάνναβης (Flores-Sanchez and Verpoorte, 2008).



Σχήμα 2. Κυκλοποίηση του CBGA προς τα THCA, CBDA, CBCA και η μετατροπή τους σε Δ^9 -THC, CBD, CBC.

Ο σχηματισμός των προτυλικών αναλόγων, τετραϋδροκανναβιβαρινικού οξέος (THCVA), κανναβιδιβαρινικού οξέος (CBDVA) και κανναβιχρωμεβαρινικού οξέος (CBCVA), βασίζεται σε ένα ανάλογο βιοσυνθετικό μονοπάτι, χρησιμοποιώντας ως πρόδρομη ουσία το διβαρινολικό οξύ αντί του ολιβετολικού οξέος.

2.3.2 Φυτικά κανναβινοειδή

Τα πιο γνωστά φυτικά κανναβινοειδή που υπάρχουν στο φυτό της κάνναβης είναι τα εξής:

- ♦ Δ^9 -THC (Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη)
- ♦ THCA (τετραϋδροκανναβινολικό οξύ)
- ♦ CBD (κανναβιδιόλη)
- ♦ CBDA (κανναβιδιολικό οξύ)
- ♦ CBN (κανναβινόλη)
- ♦ CBG (κανναβιγερόλη)
- ♦ CBC (κανναβιχρωμένιο)
- ♦ CBL (κανναβικυκλόλη)
- ♦ THCV (τετραϋδροκανναβιβαρίνη)
- ♦ CBDV (κανναβιδιβαρίνη)
- ♦ CBV (κανναβιβαρόλη)
- ♦ CBCV (κανναβιχρωμεβαρίνη)
- ♦ CBGV (κανναβιγεροβαρίνη)
- ♦ CBGM (μονομεθυλεστέρας της κανναβιγερόλης)

Τα φυτικά κανναβινοειδή που έχουν μελετηθεί περισσότερο, λόγω της αφθονίας τους στο φυτό αλλά και λόγω των φαρμακολογικών τους ιδιοτήτων είναι η Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη, η κανναβιδιόλη, η κανναβινόλη, η κανναβιγερόλη, το κανναβιχρωμένιο, το τετραϋδροκανναβινολικό οξύ, το κανναβιδιολικό οξύ, το κανναβιχρωμενικό οξύ και η κανναβικυκλόλη.

Η Δ^9 -Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ^9 -THC) απομονώθηκε το 1964 από τους Raphael Mechoulam και Yechiel Gaoni στο Ινστιτούτο Weizmann του Ισραήλ. Πιστεύεται ότι ο κύριος ρόλος της στο φυτό είναι η προστασία του από παθογόνους οργανισμούς, την υπεριώδη ακτινοβολία και το περιβαλλοντικό στρες. (Pate et al., 1983). Η Δ^9 -THC είναι οπτικώς ενεργή ουσία, υπάρχει σε 4 στερεοϊσομερή, αλλά μόνο το (-) -trans υπάρχει στη φύση. Ένα άλλο ισομερές της Δ^9 -THC, η Δ^8 -THC υπάρχει στο φυτό, αλλά σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Δεν περιέχει άτομο αζώτου και δεν έχει αλκαλικές ιδιότητες. Περιέχει 21 άτομα άνθρακα και είναι αδιάλυτη στο νερό και πολύ διαλυτή σε μη πολικούς διαλύτες. Η Δ^9 -THC είναι η υπεύθυνη ουσία για τις ψευδαισθησιογόνες ιδιότητες της κάνναβης. Τα διάφορα παράγωγα της κάνναβης διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC. Η μαριχουάνα περιέχει

περίπου 0,2 έως 5% Δ⁹-THC, το χασίς 5-12% και το χασισέλαιο 20-60% Δ⁹-THC (Κουτσελίνης 2002, Morales et al., 2017).

Η **Κανναβιδιόλη (CBD)** είναι το κύριο μη ψυχοτρόπο συστατικό της κάνναβης. Είναι αδιάλυτη στο νερό, αλλά διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες όπως το πεντάνιο. Κάτω από όξινες συνθήκες, η κανναβιδιόλη κυκλοποιείται και μετατρέπεται σε Δ⁹-THC, κάτι το οποίο συμβαίνει και κατά το κάπνισμα (Nahler et al., 2017). Η κανναβιδιόλη έχει την ιδιότητα να μειώνει τις δυσμενείς επιδράσεις της κάνναβης, όπως το άγχος, η ταχυκαρδία, η πείνα.

Η **Κανναβινόλη (CBN)** ήταν το πρώτο κανναβινοειδές που απομονώθηκε από το φυτό. Αποτελεί προϊόν οξειδωτικής διάσπασης της Δ⁹-THC κατά την αποθήκευση του φυτού για μεγάλο χρονικό διάστημα, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιείται ως δείκτης παλαιότητας του φυτού. Δεν έχει ενεργά κέντρα άρα και στερεοϊσομερή. Είναι αδιάλυτη στο νερό αλλά διαλυτή σε οργανικούς πολικούς διαλύτες, όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα κανναβινοειδή, η κανναβινόλη δεν προέρχεται από την κανναβιγερόλη ή το κανναβιγερολικό οξύ, αλλά αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης του τετραϋδροκανναβινολικού οξέος (THCA). Η έκθεση του φυτού της κάνναβης στον αέρα ή σε υπεριώδη ακτινοβολία για μεγάλο χρονικό διάστημα, οδηγεί στη μετατροπή του THCA σε CBNA και τον τελικό σχηματισμό της CBN, μέσω αποκαρβοξυλίωσης του CBNA. Η κανναβινόλη δεν βρίσκεται στη λίστα «Ελεγχόμενων Ουσιών» (ElSohly, 2017).

Η **Κανναβιγερόλη (CBG)** είναι ένα μη ψυχοδραστικό κανναβινοειδές και αποτελεί την πρόδρομη ένωση όλων των κανναβινοειδών, καθώς προέρχεται από το CBGA, το οποίο είναι απαραίτητο για την παραγωγή των υπολοίπων κανναβινοειδών. Ανιχνεύεται σε πολύ μικρές ποσότητες στο φυτό, καθώς κατά την ωρίμανση του φυτού μετατρέπεται στον μεγαλύτερο βαθμό σε άλλα κανναβινοειδή, κυρίως Δ⁹-THC και CBD, με την τελική συγκέντρωση της κανναβιγερόλης να είναι κάτω από 1%. (Aizpurua-Olaizola et al., 2016). Το **Κανναβιχρωμένιο (CBC)** είναι ένα μη ψυχοδραστικό κανναβινοειδές που υπάρχει στο φυτό της κάνναβης, με δομή παρόμοια των άλλων κανναβινοειδών, όπως η Δ⁹-THC, THCV, CBD, CBN. Το κανναβιχρωμένιο υπάρχει υπό τη μορφή δύο στερεοϊσομερών και είναι το μόνο κανναβινοειδές που φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως. Είναι σταθερό και έχει βρεθεί σε πεπαλαιωμένα δείγματα κάνναβης (Hanuš et al., 2016).

Το **Τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA)** αποτελείται από δύο στερεοϊσομερή, το THCA-A και THCA-B, στα οποία η καρβοξυλική ομάδα

βρίσκεται στη θέση 1 και 3 αντίστοιχα. Στο παρελθόν είχε θεωρηθεί ότι το THCA σχηματίζεται στο φυτό μέσω κυκλοποίησης του κανναβιδιολικού οξέος (CBDA), αλλά περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι σχηματίζεται από κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) με τη βοήθεια της συνθετάσης του THCA. Το κύριο προϊόν της αντίδρασης αυτής είναι το THCA-A ενώ το THCA-B συντίθεται σε πολύ μικρότερη ποσότητα. Το THCA είναι η πρόδρομη ουσία της Δ⁹-THC. Συντίθεται στις αδενώδεις τρίχες του φυτού, ανιχνεύεται σε ποικίλες συγκεντρώσεις σε φρέσκα παρασκευάσματα και μετατρέπεται σταδιακά σε Δ⁹-THC μέσω αποκαρβοξυλίωσης κάτω από την υπεριώδη ακτινοβολία, την παρατεταμένη αποθήκευση ή τη θέρμανση (Moreno-Sanz, 2016). Σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, σε θερμοκρασία άνω των 110⁰ C το THCA μετατρέπεται σχεδόν πλήρως σε Δ⁹-THC (Wang et al., 2016), ενώ σύμφωνα με άλλους, η αποκαρβοξυλίωση του οξέος σε Δ⁹-THC είναι ατελής στο κάπνισμα, αλλά και στις υψηλές θερμοκρασίες που αναπτύσσονται στον αέριο χρωματογράφο, με το περίπου 70% του THCA να μετατρέπεται σε Δ⁹-THC (Dussy et al., 2005).

Το **Κανναβιδιολικό οξύ (CBDA)** είναι η πρόδρομη ουσία της CBD, η οποία σχηματίζεται μέσω της αποκαρβοξυλίωσής της, και αποτελεί το κύριο κανναβινοειδές της κλωστικής κάνναβης (Takeda et al., 2012).

Το **Κανναβιχρωμενικό οξύ (CBCA)** είναι ένα μη ψυχοδραστικό κανναβινοειδές, το οποίο μετατρέπεται, μέσω αποκαρβοξυλίωσης, σε κανναβιχρωμένιο (CBC) κατά την πάροδο του χρόνου αλλά και μέσω της θέρμανσης. Το CBCA υπάρχει σε αφθονία στα τροπικά στελέχη του φυτού της κάνναβης, ωστόσο υπάρχει και σε άλλα είδη αλλά όχι σε υψηλά επίπεδα. Πιστεύεται πως αρχίζει να παράγεται στα πρώιμα στάδια της ζωής του φυτού, και πιθανώς πριν την παραγωγή της Δ⁹-THC. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί στελέχη του φυτού που διαθέτουν υψηλότερα επίπεδα CBCA από τα φυσιολογικά, με σκοπό την ιατρική του χρήση, μιας και μελέτες δείχνουν ότι εμφανίζει ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες (Morimoto et al., 1998).

Η **Κανναβικυκλόλη (CBL)** είναι ένα μη ψυχοδραστικό συστατικό της κάνναβης και αποτελεί προϊόν αποικοδόμησης της CBN. Το CBC επίσης μετατρέπεται σε κανναβικυκλόλη μετά από την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας (ElSohly, 2017).

2.3.3 Τερπένια

Τα φυτικά κανναβινοειδή μπορεί να αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα συστατικών της κάνναβης, ωστόσο το φυτό περιέχει και μεγάλο αριθμό τερπενίων. Τα τερπένια είναι οργανικές ενώσεις που συναντώνται σε μια μεγάλη ποικιλία φυτών και συμβάλλουν στην γεύση τους, στο άρωμά τους και στο χρώμα τους.

Όπως και τα κανναβινοειδή, τα τερπένια συντίθενται στις αδενώδεις τρίχες του φυτού και ο κύριος ρόλος τους είναι η προστασία του φυτού από τα ζώα και τους επικονιαστές. Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 100 διαφορετικά είδη στο φυτό της κάνναβης και κάθε ποικιλία μπορεί να περιέχει διαφορετική σύσταση τερπενίων, τα οποία προσδίδουν τις χαρακτηριστικές οσμές κάθε ποικιλίας.

Τα τερπένια είναι μη ψυχοδραστικές ενώσεις και το καθένα εμφανίζει διαφορετικές φαρμακολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Ορισμένα έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιβακτηριακές δράσεις, άλλα προκαλούν χαλάρωση, ενώ άλλα πνευματική εγρήγορση. Μερικά από τα πιο γνωστά τερπένια της κάνναβης είναι το μυρσένιο, το καρυοφυλλένιο, το λιμονένιο, η λιναλοόλη, το καρυοφυλλένιο, το άλφα- και βήτα- πινένιο κ.ά.

Μπορεί η ποικιλία αρωμάτων που προσφέρουν τα τερπένια στο φυτό της κάνναβης να είναι εντυπωσιακή, όμως το γεγονός που τους προσδίδει σημαντική αξία είναι η ιδιότητά τους να αλληλεπιδρούν συνεργιστικά με άλλα συστατικά της κάνναβης, κυρίως με τα κανναβινοειδή. Αυτή η αλληλεπίδραση περιγράφεται με τον όρο «συνεργιστική επίδραση» ή «entourage effect» και αφορά τον τρόπο με τον οποίο διαφορετικές ουσίες στην κάνναβη αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για να δώσουν ένα αποτέλεσμα το οποίο είναι “μεγαλύτερο από το άθροισμα των αποτελεσμάτων των επιμέρους τμημάτων του”. Ωστόσο, ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης τους δεν είναι πλήρως γνωστός και χρειάζεται να γίνει περισσότερη έρευνα, ώστε να γίνει πιο κατανοητό πώς ασκούν τις συνεργιστικές τους δράσεις αυτές οι χημικές ουσίες.

2.4 Κύκλος ζωής του φυτού

2.4.2 Περίοδος ανάπτυξης του νεαρού φυτού (Στάδιο ανάπτυξης δεντρολλίων)

Το στάδιο αυτό διαρκεί από 1 έως 4 εβδομάδες και είναι η περίοδος στην οποία το φυτό είναι αρκετά ευάλωτο στην ανάπτυξη μούχλας και ασθeneιών. Απαιτούνται μέτρια επίπεδα υγρασίας στην ατμόσφαιρα, μέτρια έως υψηλή ένταση φωτός και επαρκή, αλλά όχι υπερβολική, υγρασία του εδάφους (Green, 2001).

2.4.3 Βλαστικό στάδιο ανάπτυξης

Το στάδιο αυτό διαρκεί 1-2 μήνες. Το φυτό χρειάζεται σημαντική ποσότητα φωτός και θρεπτικών ουσιών, ώστε να σχηματίσει τα φύλλα, τα στελέχη και το ριζικό του σύστημα. Σε αυτό το στάδιο αποκαλύπτεται και το φύλο του φυτού, το οποίο διαχωρίζεται με βάση τη μορφολογία των φύλλων του. Τα αρσενικά φυτά συνήθως αποκόπτονται και καταστρέφονται, έτσι ώστε τα θηλυκά να μην γονιμοποιηθούν και με τον τρόπο αυτό προκύπτουν τα άνθη "sin semilla", δηλαδή χωρίς σπόρους. Κατά το στάδιο αυτό, το φυτό πρέπει να εκτίθεται σε φως για μια περίοδο 18-24 ωρών, για τη γρηγορότερη ανάπτυξή του. Πολλοί υποστηρίζουν ότι εκτός από την έκθεση σε φως πρέπει να υπάρχει και μια περίοδος στην οποία τα φυτά θα βρίσκονται σε σκοτάδι. Χρησιμοποιούνται επιπλέον λιπάσματα υψηλής περιεκτικότητας σε άζωτο και κάλιο (Green, 2001).

2.4.4. Ανθοφορία

Για να επιτευχθεί η ανθοφορία του φυτού, απαιτείται εναλλαγή φωτός και σκότους, κάτι που επιτυγχάνεται με την έκθεση του φυτού σε φως για 12 ώρες και στη συνέχεια με την έκθεση του φυτού για 12 ώρες στο σκοτάδι, κ.ο.κ. Με τον τρόπο αυτό, το φυτό αναπτύσσεται εξαιρετικά γρήγορα και το μέγεθός του να διπλασιάζεται. Σε αυτό το στάδιο παράγονται περισσότερα κλαδιά και κόμβοι, καθώς προετοιμάζεται για την ανθοφορία. Είναι το τελικό στάδιο στην ανάπτυξη του φυτού. Η φάση της ανθοφορίας διαρκεί από 6 έως 22 εβδομάδες. Το φύλο αποκαλύπτεται με σαφήνεια, καθώς τα αρσενικά φυτά παράγουν μικρά λουλούδια που μοιάζουν με σφαίρες και εμφανίζονται πάντα ανά ομάδες, ενώ τα θηλυκά φυτά είναι εύκολα αναγνωρίσιμα λόγω των αδενωδών τριχών. Αυτές οι αδενώδεις τρίχες αποτελούν τους σχηματισμούς στους οποίους γίνεται η σύνθεση των κυριότερων συστατικών του φυτού, των κανναβινοειδών. Τα περισσότερα φυτά αρχίζουν να ανθίζουν όταν η περίοδος φωτισμού μειωθεί και είναι τουλάχιστον 10 ώρες ημερησίως στο σκοτάδι (Green, 2001).

2.5 Συνθήκες καλλιέργειας του φυτού

2.5.1. Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της περιεκτικότητας του φυτού σε κανναβινοειδή. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη της κάνναβης είναι 24-30⁰ C, ενώ σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30⁰ C και μικρότερες των 15⁰ C, έχει παρατηρηθεί μείωση της περιεκτικότητας στο κύριο δραστικό συστατικό της φυτού, τη Δ⁹-THC (Green, 2001).

2.5.2 Ποιότητα εδάφους

Η ισορροπία των στοιχείων του εδάφους φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή κανναβινοειδών. Για να αναπτυχθεί το φυτό απαιτούνται επαρκείς συγκεντρώσεις καλίου, φωσφόρου και αζώτου, τα οποία παρέχονται από οργανικά ή ανόργανα λιπάσματα. Τα στοιχεία αυτά εκτός από την περιεκτικότητα του φυτού σε Δ⁹-THC, επηρεάζουν επίσης και την περιεκτικότητα σε CBD, Δ⁸-THC και CBN, αν και οι τελευταίες δύο ενώσεις θεωρούνται πλέον προϊόντα αποδόμησης της Δ⁹-THC. Επιπλέον, η ύπαρξη άλλων στοιχείων, όπως Mg, Fe και Ca ευνοεί την καλλιέργεια του φυτού (Pate, 1994)

2.5.3 Φωτισμός

Ο φωτισμός μπορεί να είναι είτε φυσικός, είτε τεχνητός. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη αναλογία είναι 18 ώρες φωτισμού και 6 ώρες σκότους. Ο φωτισμός ευνοεί τη βλάστηση, ενώ το σκοτάδι ευνοεί την ανθοφορία του φυτού. Το φυτό πρέπει να εκτίθεται τουλάχιστον σε 12 ώρες συνεχόμενου φωτισμού με σκοπό να αναπτυχθούν τα άνθη και να παραχθεί Δ⁹-THC. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι όταν το φυτό βρίσκεται υπό συνεχή φωτισμό, χωρίς περίοδο σκότους το φυτό παρουσιάζει μειωμένη ανάπτυξη (Chandra et al., 2008).

2.5.4 Νερό

Η συχνότητα και η ποσότητα του ποτίσματος καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το φως, η ηλικία, το μέγεθος και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και η ικανότητα του καλλιεργητικού μέσου να συγκρατεί το νερό. Η παροχή υπερβολικής ποσότητας νερού μπορεί να καταστρέψει τα φυτά κάνναβης εάν το μέσο καλλιέργειας υπερκορεστεί. Αυτό οφείλεται κυρίως στο ότι το

οξυγόνο δεν μπορεί να εισέλθει στο ριζικό σύστημα. Τα αναερόβια βακτήρια συσσωρεύονται εξαιτίας της αυξημένης υγρασίας και αρχίζουν να τρέφονται με τις ρίζες των φυτών, με τα ευεργετικά (αερόβια) βακτήρια, καθώς και με τα θρεπτικά συστατικά και το λίπασμα. Όταν χρησιμοποιείται το έδαφος ως μέσο ανάπτυξης, το έδαφος πρέπει να αφήνεται να στεγνώσει επαρκώς πριν από την επανύδρευσή του (Green, 2001).

2.6 Υδροπονικές καλλιέργειες

Εκτός από την εξωτερική καλλιέργεια, η κάνναβη μπορεί να καλλιεργηθεί και σε εσωτερικούς χώρους, είτε χρησιμοποιώντας το έδαφος ως μέσο ανάπτυξης είτε όχι, και υπό την επίδραση τεχνητού φωτισμού. Η εσωτερική καλλιέργεια της κάνναβης είναι πιο περίπλοκη και δαπανηρή σε σχέση με την εξωτερική καλλιέργεια, ωστόσο επιτρέπει στους καλλιεργητές τον πλήρη έλεγχο του περιβάλλοντος στο οποίο αναπτύσσονται τα φυτά. Τα τελευταία χρόνια προτιμώνται οι υδροπονικές καλλιέργειες, στις οποίες τα φυτά αναπτύσσονται σε ένα αδρανές υπόστρωμα ή απευθείας μέσα σε νερό, με τη χρήση υπεριώδους φωτός. Καθώς αυξάνουν σημαντικά την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και δημιουργούν το βέλτιστο περιβάλλον για την ανάπτυξη των φυτών, οι υδροπονικές καλλιέργειες οδηγούν στη δημιουργία προϊόντων με αυξημένη περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC (EMCDDA, 2004). Το πιο γνωστό προϊόν της υδροπονικής καλλιέργειας είναι η ποικιλία “skunk”, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC, περίπου 15%, και πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε CBD (Freeman and Winstock, 2015), ενώ συνήθως εμφανίζει έντονο πράσινο χρώμα και έντονη οσμή.

2.7 Συγκομιδή και κατεργασία του φυτού

2.7.1 Συγκομιδή

Ανάλογα με το σκοπό της καλλιέργειας της κάνναβης, ο προσδιορισμός της κατάλληλης περιόδου για συγκομιδή παίζει καθοριστικό ρόλο. Για παράδειγμα, οι σπόροι συλλέγονται μόλις αναπτυχθούν πλήρως και συχνά αφού τα άνθη που τους συνοδεύουν αρχίσουν να μαραίνονται. Η κλωστική κάνναβη για παραγωγή ινών συλλέγεται πριν την ανθοφορία του φυτού. Η συγκομιδή των φυτών που προορίζεται για παράνομη χρήση γίνεται την κατάλληλη περίοδο, όταν έχει επιτευχθεί η μέγιστη

περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC. Η περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC αυξάνεται με την ηλικία των φυτών και φτάνει στα υψηλότερα επίπεδα κατά τη φάση εκβλάστησης, στη συνέχεια μένει σταθερή για περίπου μία έως δύο εβδομάδες, ακολουθούμενη από μια μείωση με την έναρξη της γήρανσης του φυτού. Τα ώριμα άνθη συλλέγονται πρώτα. Η ωρίμανση ορίζεται ως το σημείο, στο οποίο η παραγωγή της Δ^9 -THC και άλλων κανναβινοειδών φτάνει τα μέγιστα επίπεδα και πριν αρχίσει η αποικοδόμησή τους. Μια τυπική ένδειξη ωριμότητας αποτελεί το χρώμα των αδενωδών τριχών. Κατά την παρατήρησή τους κάτω από μικροσκόπιο, φαίνονται τελείως διάφανες όταν δεν έχουν αναπτυχθεί πλήρως, γίνονται άσπρες/θολές όταν εμφανίζουν τα μέγιστα επίπεδα κανναβινοειδών, ενώ όταν το περιεχόμενο των κανναβινοειδών αρχίζει να μειώνεται, το χρώμα τους μετατρέπεται σε πιο σκούρο. Η συγκομιδή πριν οι περισσότερες τρίχες μετατραπούν σε θολές μπορεί να μειώσει την ισχύ και το χρόνο δράσης του τελικού προϊόντος, ενώ αν η συγκομιδή γίνει πολύ αργά, δηλαδή μεγάλο μέρος των τριχών έχει γίνει καφέ, οδηγεί σε μειωμένη περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC, λόγω αποικοδόμησής της σε CBN (Elsohly et al., 2017).

2.7.2 Ξήρανση και αποθήκευση

Τα φυτά της κάνναβης ξηραίνονται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό χώρο και η βέλτιστη θερμοκρασία έχει υπολογιστεί μεταξύ 16° και 21° C. Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαρκέσει από μερικές μέρες έως δύο εβδομάδες, ανάλογα με το μέγεθος και την πυκνότητα των ανθέων και τη σχετική υγρασία της ατμόσφαιρας. Η υγρασία πρέπει να είναι μεταξύ 45% και 55%. Υψηλότερο ποσοστό υγρασίας ευνοεί την παραγωγή μούχλας και περονόσπορου, ενώ χαμηλότερο ποσοστό οδηγεί στην ταχεία ξήρανση του φυτού, με αποτέλεσμα να γίνεται πιο ξηρό το τελικό προϊόν. Η σταθερή θερμοκρασία οδηγεί και στη σταθερότητα των κανναβινοειδών. Μόλις το φυτό ξηραθεί σε ποσοστό τουλάχιστον 60%, σφραγίζεται αεροστεγώς σε βάζα, με σκοπό την ωρίμανσή του. Η διαδικασία της ωρίμανσης διαρκεί τουλάχιστον 30 ημέρες και το τελικό προϊόν έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC, άρα μεγαλύτερη ισχύ (Green, 2001).

2.8 Σταθερότητα των κανναβινοειδών κατά την αποθήκευση

Ένα σημαντικό ζήτημα κατά την αποθήκευση της κάνναβης είναι η σταθερότητα των κανναβινοειδών. Η αποικοδόμηση της Δ^9 -THC είναι αμελητέα

κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, ειδικά όταν το υλικό είναι καλά αποξηραμένο και σφραγισμένο. Ωστόσο, εξακολουθεί να είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στο οξυγόνο και το υπεριώδες φως και κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου έχει παρατηρηθεί ότι αποικοδομείται αργά μέσω οξείδωσης σε CBN και Δ⁸-THC (Elsohly et al., 2017).

Σε μία μελέτη που έχει γίνει, εξετάστηκε η σταθερότητα των κύριων κανναβινοειδών, Δ⁹-THC, CBD, CBN και THCA κατά την αποθήκευση του φυτού σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες, στους -18⁰ C, 4⁰ C, 22⁰ C, 37⁰ C, και στους 50⁰ C. Κατά την αποθήκευση των δειγμάτων στους -18⁰ C και στους 4⁰ C, η περιεκτικότητα των κανναβινοειδών παρέμεινε σχετικά σταθερή, χωρίς σημαντική μείωση. Στους 22⁰ C, παρατηρήθηκε ότι μετά από 2 χρόνια η ποσότητα της Δ⁹-THC και του THCA μειώθηκε κατά 10% και 30% αντίστοιχα, ενώ η περιεκτικότητα σε CBD και CBN παρέμεινε σταθερή. Στους 37⁰ C, η Δ⁹-THC μειώθηκε κατά 15% τον πρώτο χρόνο αποθήκευσης ενώ στη συνέχεια παρατηρήθηκε απότομη μείωσή της. Αντίστοιχα, το THCA εμφάνισε σταδιακή μείωση τον πρώτο χρόνο και πιο απότομη μείωση στη συνέχεια ενώ παράλληλα αυξήθηκε η συγκέντρωση της CBN. Κατά την αποθήκευση στους 50⁰ C, παρατηρήθηκε πλήρης αποικοδόμηση των Δ⁹-THC και THCA κατά τις πρώτες 30 εβδομάδες αποθήκευσης. Η CBN αρχικά αυξήθηκε ωστόσο μετά από ένα χρόνο αποθήκευσης, η συγκέντρωσή της εμφάνισε μείωση, πιθανώς λόγω καταστροφής της από την υψηλή θερμοκρασία. Η συγκέντρωση της CBD δεν παρουσίασε αλλαγή (Turner et al., 1973).

Σε άλλη μελέτη, αξιολογήθηκε η περιεκτικότητα μαριχουάνας και αποξηραμένων φυτών σε 4 διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης, σε σχέση με τη θερμοκρασία και την έκθεση στο φως. Παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην περιεκτικότητα των δειγμάτων σε Δ⁹-THC και CBN κατά την αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου, τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι, ενώ σχεδόν το 100% της Δ⁹-THC αποικοδομήθηκε μετά από 4 χρόνια. Η θερμοκρασία αποθήκευσης των δειγμάτων είχε διαφορετική επίδραση στη μετατροπή της Δ⁹-THC σε CBN απ' ό,τι η έκθεση στο φως. Η θερμοκρασία φάνηκε να επηρεάζει μόνο την ταχύτητα μετατροπής, ενώ το φως επηρέαζε τόσο την ταχύτητα όσο και τη στοιχειομετρία της αντίδρασης. Η περιεκτικότητα σε CBD φάνηκε να είναι ανεξάρτητη από τις συνθήκες αποθήκευσης. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε Δ⁹-THC και CBN κατά την αποθήκευσή τους στους -20⁰ C παρέμεινε σταθερή (Zamengo et al., 2019).

Αποξηραμένα δείγματα μαριχουάνας αποθηκεύτηκαν σε μια άλλη μελέτη σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε ανάλυση ετησίως για 4 χρόνια. Το ποσοστό απώλειας της Δ⁹-THC ήταν ανάλογο του χρόνου αποθήκευσης. Η συγκέντρωση της Δ⁹-THC στο φυτικό υλικό μειώθηκε περίπου κατά 17% στον πρώτο χρόνο αποθήκευσης, 27% μετά από δύο χρόνια, 35% μετά από 3 χρόνια και 41% μετά από 4 χρόνια (Ross and ElSohly, 1997).

Η σταθερότητα των κανναβινοειδών κατά την αποθήκευση της ρητίνης της κάνναβης (πλάκες χασίς) επηρεάζεται τόσο από το φως, στο οποίο εκτίθεται, όσο και από τη θερμοκρασία αποθήκευσης. Σε μελέτη που έγινε (Lindholst, 2010) μελετήθηκε η μακροπρόθεσμη σταθερότητα τεσσάρων κανναβινοειδών, των Δ⁹-THC, CBN, CBD και CBG σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης. Παρατηρήθηκε ότι η συνολική ποσότητα της Δ⁹-THC μειώνεται σταδιακά κατά την αποθήκευση τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι, ενώ το φως φαίνεται να επιταχύνει την αποικοδόμηση αυτή. Σε θερμοκρασία δωματίου, η εκθετική μείωση στο THCA συμπίπτει με παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της Δ⁹-THC. Αυτό δείχνει ότι η αποκαρβοξυλίωση είναι η κύρια αντίδραση με την οποία αποικοδομείται το THCA προς Δ⁹-THC. Για το λόγο αυτό εμφανίζεται μια αρχική αύξηση στη συγκέντρωση της Δ⁹-THC, η οποία στη συνέχεια ακολουθείται από μείωση, κάτι το οποίο έχουν αναφέρει και άλλες μελέτες (Taschwer and Schmid, 2015). Η CBN φαίνεται να αυξάνεται εκθετικά και στις δύο περιπτώσεις αποθήκευσης. Όσον αφορά στη CBD και CBG εμφανίστηκε μόνο μικρή μείωση στη συγκέντρωσή τους στην περίπτωση που η αποθήκευση γινόταν στο φως.

Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε αντίστοιχη μελέτη (Fairbairn et al., 1976), σύμφωνα με την οποία η επίδραση του φωτός κατά την αποθήκευση του χασίς είναι μεγαλύτερη από την επίδραση της έκθεσης στον αέρα. Αυτό πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι, όταν έχει ακολουθηθεί προσεκτική διαδικασία ξήρανσης του φυτού, οι αδενώδεις τρίχες, οι οποίες περιέχουν τα κανναβινοειδή, παρέχουν πλήρη προστασία της ρητίνης της κάνναβης από την επίδραση του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα τα κανναβινοειδή να μην έρχονται σε επαφή με τον αέρα. Παρατηρήθηκε επίσης ότι κατά την αποθήκευση του πλήρως κονιοποιημένου χασίς, όπου οι περισσότεροι αδένες είναι κατεστραμμένοι, λόγω της έντονης διαδικασίας κονιορτοποίησης, σημειώθηκε μεγαλύτερη απώλεια κανναβινοειδών σε σχέση με το μερικώς κονιοποιημένο χασίς. Ωστόσο, στις πλάκες χασίς, οι οποίες έχουν υποστεί έντονη μηχανική καταπόνηση και άρα οι αδενώδεις τρίχες ήταν κατεστραμμένες,

σημειώθηκε εντονότερη αποικοδόμηση των κανναβινοειδών, σε σχέση με το κονιορτοποιημένο χασίς (Fairbairn et al., 1976).

Κατά την αποθήκευση εκχυλισμάτων ρητίνης κάνναβης στο φως και σε θερμοκρασία δωματίου, η αποικοδόμηση τόσο της Δ^9 -THC όσο και του THCA αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τις πλάκες χασίς, ενώ η Δ^9 -THC φάνηκε να αποικοδομείται ταχύτερα στα εκχυλίσματα, πιθανώς λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας της στο φως όταν το υλικό βρίσκεται σε εκχυλισμένη μορφή σε σύγκριση με τις πλάκες χασίς. Όταν τα εκχυλίσματα αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι δεν φάνηκε να εμφανίζεται αποικοδόμηση της Δ^9 -THC, αλλά ήταν σταθερή για σχεδόν 2 χρόνια, σε σύγκριση με την αποθήκευση χασίς σε παρόμοιες συνθήκες, όπου φάνηκε να καταστρέφεται περίπου η μισή ποσότητα (Lindholst, 2010).

Σε μια μελέτη που αξιολογήθηκε η σταθερότητα των τριών κυριών κανναβινοειδών σε χασισέλαια, σημειώθηκε μια σταθερή αποικοδόμηση της Δ^9 -THC καθ' όλη την περίοδο αποθήκευσης, η οποία ήταν εντονότερη στα δείγματα που ήταν εκτεθειμένα στο φως και στους 22°C , απ' ό,τι στα δείγματα που είχαν αποθηκευτεί στο σκοτάδι και στους 4°C , με αποτέλεσμα και η περιεκτικότητα σε CBN να αυξάνεται περισσότερο στην πρώτη περίπτωση, λόγω της μετατροπής της Δ^9 -THC σε CBN. Η CBD δεν ήταν σταθερή κατά την αποθήκευση, καθώς εμφάνισε μείωση, ειδικά στα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στο φως και στους 22°C (Trofin et al., 2012).

Από τα αποτελέσματα των διάφορων μελετών φαίνεται ότι οι βέλτιστες συνθήκες για μακροχρόνια αποθήκευση της κάνναβης είναι η χαμηλή θερμοκρασία και η απουσία φωτός, καθώς τα κανναβινοειδή και ιδιαίτερα η Δ^9 -THC είναι πολύ ευαίσθητα στην παρουσία φωτός και στην υψηλή θερμοκρασίας.

2.9 Τύποι κάνναβης

Το φυτό της κάνναβης μπορεί να διαχωριστεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους: τον τύπο I (φαρμακευτική κάνναβη), με περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC > 0,5%, CBD < 0,5% και Δ^9 -THC/CBD > 1,

τον τύπο II (ενδιάμεσος τύπος), όπου η CBD είναι το κύριο κανναβινοειδές, με Δ^9 -THC/CBD ~ 1, και

τον τύπο III (κλωστική ή βιομηχανική), με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις Δ⁹-THC και Δ⁹-THC/CBD<1. Η κλωστική κάνναβη περιέχει άλλα κανναβινοειδή ως κύρια συστατικά όπως η CBD ή η CBG.

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το άρθρο 1 του νόμου 4523/2018 επιτρέπεται η παραγωγή κάνναβης του είδους Cannabis Sativa L. περιεκτικότητας σε Δ⁹-THC άνω του 0,2% για την παραγωγή τελικών προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης με αποκλειστικό σκοπό είτε την προμήθεια του κρατικού μονοπωλίου και την διάθεσή τους για ιατρικούς σκοπούς, είτε την εξαγωγή τους.

Η καλλιέργεια και επεξεργασία της φαρμακευτικής κάνναβης υπόκεινται σε όρους και προϋποθέσεις που αναφέρονται στο νόμο 51483/700/Φ.15, ΦΕΚ 1692, 15/5/2018.

Παρόλο που θεωρείται ότι περιβαλλοντικοί λόγοι παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της συγκέντρωσης των κανναβινοειδών στο φυτό, ο λόγος Δ⁹-THC/CBD καθορίζεται κυρίως από γενετικούς παράγοντες (De Meijer et al., 2003).

Κατά άλλους, ο διαχωρισμός της κάνναβης σε τύπους γίνεται λαμβάνοντας υπόψιν και τη σταδιακή μετατροπή της Δ⁹-THC σε CBN με την πάροδο του χρόνου, επομένως υπολογίζεται με βάση το λόγο $\frac{THC+CBN}{CBD}$. Εάν ο λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος του 1, το φυτό θεωρείται ότι ανήκει στο ναρκωτικό τύπο, ενώ αν είναι μικρότερος του 1, τότε ανήκει στον κλωστικό τύπο (Stefanidou et al., 1998)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Φαρμακολογία & τοξικολογία της κάνναβης

3.1 Ενδοκανναβινοειδές σύστημα - Υποδοχείς κανναβινοειδών

Οι υποδοχείς ενδογενών κανναβινοειδών ταυτοποιήθηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1990, με την κλωνοποίηση των γονιδίων δύο διαφορετικών ειδών υποδοχέων, των CB₁ και CB₂ υποδοχέων. Οι υποδοχείς των κανναβινοειδών ενεργοποιούνται από τρία είδη προσδετών: τα ενδοκανναβινοειδή, τα φυτικά κανναβινοειδή, και τα συνθετικά κανναβινοειδή, τα οποία προσδένονται αναστρέψιμα και στερεοειδικά στους υποδοχείς. Και τα δύο είδη υποδοχέων ανήκουν στην υπερικογένεια των συνδεδεμένων με G πρωτεΐνες υποδοχέων (GPCR) (Grotenhermen, 2003)

3.1.1 Κατανομή υποδοχέων

Οι CB₁ υποδοχείς βρίσκονται σε αφθονία στον εγκέφαλο. Δεν παρουσιάζουν ομοιογενή κατανομή, καθώς είναι πυκνότεροι στον ιππόκαμπο, στην παρεγκεφαλίδα, στον υποθάλαμο, στη μέλαινα ουσία και στις ραχιαίες ρίζες του νωτιαίου μυελού. Η κατανομή αυτή ερμηνεύει την επίδραση των κανναβινοειδών στη μνήμη, στην απώλεια συντονισμού, στον πόνο και στον έλεγχο της όρεξης και της θερμοκρασίας του σώματος, επιδράσεις που σχετίζονται με τη χρήση της κάνναβης (Breivogel et al., 1998).

Οι CB₂ υποδοχείς εντοπίζονται στο λεμφικό σύστημα, δηλαδή στο σπλήνα, τις αμυγδαλές, το θύμο αδέν, καθώς και λεμφοκύτταρα και μονοκύτταρα της κυκλοφορίας. Σε σημαντικά μικρότερο βαθμό εντοπίζονται σε περιφερικούς ιστούς, όπως το καρδιαγγειακό και αναπαραγωγικό σύστημα, το λιπώδη ιστό και το γαστρεντερικό σωλήνα (Howlett et al., 2002). Η εντόπιση των CB₂ υποδοχέων σε κύτταρα ανοσοποιητικού υποδηλώνει ότι η ανοσοκατασταλτική δράση των κανναβινοειδών πιθανότατα ασκείται μέσω αυτών των υποδοχέων (Demuth and Molleman, 2006).

3.1.2 Άλλοι υποδοχείς εκτός του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος

Τα τελευταία χρόνια, έρευνες έχουν δείξει ότι η δράση των κανναβινοειδών δεν περιορίζεται μόνο στους CB₁ και CB₂ υποδοχείς, αλλά αυτά αλληλεπιδρούν και με άλλους υποδοχείς εκτός του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος. Σε αυτούς τους

υποδοχείς συμπεριλαμβάνονται οι υποδοχείς οπιοειδών, υποδοχείς σεροτονίνης, οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς των πολλαπλασιαστών των υπεροξεισωμάτων (PPARs), οι υποδοχείς γλυκίνης (GlyR), και η οικογένεια υποδοχέων TRP (Morales et al., 2017).

3.1.3 Ενδογενή κανναβινοειδή

Η ανακάλυψη των υποδοχέων των κανναβινοειδών οδήγησε γρήγορα και στην ανακάλυψη των ενδογενών διαμεσολαβητών, οι οποίοι ονομάστηκαν «ενδοκανναβινοειδή». Η πρώτη ουσία που απομονώθηκε ήταν η ανανδαμίδα και έπειτα η 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλη (2-AG), οι οποίες είναι παράγωγα του αραχιδονικού οξέος. Τα πιο γνωστά ενδοκανναβινοειδή είναι η ανανδαμίδα, η 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλη (2-AG) και η παλμιτοϋλαιθανολαμίδα (PEA).

Η ανανδαμίδα προκαλεί τα ίδια αποτελέσματα με την Δ^9 -THC, αλλά είναι λιγότερο ισχυρός αγωνιστής, με σημαντικά βραχύτερο χρόνο ημιζωής. Δρα ως μερικός αγωνιστής στους CB₁ και CB₂ υποδοχείς, αλλά έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τους CB₁ υποδοχείς. Αντίθετα, η 2-AG είναι πλήρης αγωνιστής και για τους δύο τύπους υποδοχέων, αλλά έχει μικρότερη συγγένεια από την ανανδαμίδα. Η PEA πιστεύεται ότι πιθανώς προσδένεται σε κάποιον υποδοχέα τύπου CB₂, ο οποίος ακόμα δεν έχει αναγνωριστεί (Howlett et al., 2002; Kumar et al., 2001).

Πλέον, ως υποψήφια ενδοκανναβινοειδή έχουν χαρακτηριστεί και άλλα ενδογενή μόρια, όπως η νολαδίνη, η N-αραχιδονυλτοπαμίνη, η βιροδαμίνη, χωρίς να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ακριβής φυσιολογικός ρόλος που διαδραματίζουν τα μόρια αυτά, ενώ οι φαρμακολογικές τους ιδιότητες μοιάζουν με αυτές των συνθετικών ναρκωτικών (Fisar, 2010).

3.1.4 Συνθετικά κανναβινοειδή

Η εμφάνιση των συνθετικών κανναβινοειδών έγινε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1970, όταν οι ερευνητές εξέταζαν για πρώτη φορά το ενδοκανναβινοειδές σύστημα, στην προσπάθειά τους να αναπτύξουν νέες θεραπείες για τον καρκίνο. Από το 2000 και μετά, τα συνθετικά κανναβινοειδή άρχισαν να κυκλοφορούν με αυξανόμενο ρυθμό στην παράνομη αγορά ναρκωτικών. Τα περισσότερα συνθετικά κανναβινοειδή παράγονται στην Κίνα και πωλούνται είτε μέσω διαδικτύου είτε μέσω άλλων δικτύων λιανικής (Mills et al., 2015). Συνήθως

αναμειγνύονται με βότανα ή ψεκάζονται σε αυτά και συσκευάζονται ως «νόμιμα διεγερτικά» τα οποία στη συνέχεια καπνίζονται σε αυτοσχέδια τσιγάρα ή πίπα, όπως η κάνναβη. Κυκλοφορούν επίσης ως δισκία, κάψουλες, σκόνες (Seely et al., 2013), ή ως υγρά σκευάσματα για χρήση μέσω ηλεκτρονικού τσιγάρου (Castellanos and Gralnik, 2015). Αυτές οι ουσίες είναι ιδιαιτέρως λιπόφιλες και είναι πλήρεις αγωνιστές των CB₁ και CB₂ υποδοχέων. Η συγγένειά τους γι' αυτούς τους υποδοχείς είναι πολύ ισχυρότερη από αυτή της Δ⁹-THC, εμφανίζοντας έτσι εντονότερα ψυχοδραστικά αποτελέσματα (Fantegrossi et al., 2014). Μερικά από τα συνθετικά κανναβινοειδή που κυκλοφορούν στην Ευρώπη είναι τα JWH-018, JWH-073, JWH-398, JWH-250, HU-210 και CP-47,497 (Vardakou et al., 2010).

3.2 Φαρμακολογία των κανναβινοειδών

Η Δ⁹-Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁹-THC) είναι η κύρια ουσία που ευθύνεται για τις φαρμακολογικές ιδιότητες, αλλά και για τις ψυχοδραστικές επιπτώσεις της χρήσης μαριχουάνας. Είναι μερικός αγωνιστής των CB₁ υποδοχέων και ανάλογο της αιθανολαμίδης του αραχιδονικού οξέος-στους CB₂ υποδοχείς. Ως μερικός αγωνιστής, παρουσιάζει μεικτή δράση αγωνιστή-ανταγωνιστή, ανάλογα με το κύτταρο, την έκφραση των υποδοχέων και την παρουσία ενδοκανναβινοειδών ή άλλων αγωνιστών (Bolognini et al., 2012). Εμφανίζει ψυχοδραστικές, αναλγητικές και αντισπασμωδικές ιδιότητες (Russo, 2011). Επιπλέον, έχει βρογχοδιασταλτικές, νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, ενώ έρευνες έχουν δείξει ότι εμφανίζει 20 φορές μεγαλύτερη αντιφλεγμονώδη δράση από την ασπιρίνη και διπλάσια από την υδροκορτιζόνη (Evans, 1991). Ο μηχανισμός δράσης της δεν περιορίζεται μόνο μέσω αλληλεπίδρασης με τους CB₁ και CB₂, αλλά και μέσω μηχανισμών ανεξάρτητων από τους CB υποδοχείς. Σε μικρές δόσεις μπορεί να ενεργοποιήσει τους πυρηνικούς υποδοχείς PPAR γ (Vara et al., 2012), GPR18 (McHugh et al., 2014), GPR55 (Ryberg et al., 2007). Αντίθετα, έχει δράση ανταγωνιστή στους 5-HT_{3A} υποδοχείς και τους διαύλους ιόντων TRPM8 (Barann et al., 2002).

Η Κανναβιδιόλη (CBD) αλληλεπιδρά με διάφορους μοριακούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων των CB υποδοχέων, παρόλα αυτά ο μηχανισμός δράσης της δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Ορισμένες ερευνητικές ομάδες έχουν αναφέρει την έλλειψη συγγένειας για τους υποδοχείς κανναβινοειδών CB₁ και CB₂ (McPartland et al., 2007), ωστόσο, in vitro μελέτες αποκάλυψαν ότι η CBD εμφανίζει ασθενή δράση

ανταγωνιστή στους CB₁ και CB₂ (Pertwee et al., 2002). Παρουσία Δ⁹-THC έχει την ικανότητα να ανταγωνίζεται τον CB₁ υποδοχέα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Thomas et al., 2007), ενώ έχει περιγραφεί και ως αγωνιστής του 5-HT₁ υποδοχέα (Russo et al., 2005). Τόσο στον υποδοχέα GPR55 (Ryberg et al., 2007), όσο και στον πιθανό υποδοχέα κανναβινοειδών GPR18, δρα ως ανταγωνιστής (McHugh et al., 2012). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι παρουσιάζει αντισπασμωδικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές και αντιψυχωσικές ιδιότητες (de Lago and Fernandez-Ruiz, 2007). Αυτές οι νευροπροστατευτικές ιδιότητές της, επιβεβαιώνουν τη χρήση της σε κλινικές μελέτες που αφορούν την επιληψία, τη σκλήρυνση κατά πλάκας, τη διπολική διαταραχή, τη σχιζοφρένεια, τις φλεγμονές και τον καρκίνο, χωρίς να έχει αποδειχθεί επιστημονικά η αποτελεσματικότητά της. Η κανναβιδιόλη περιέχεται σε συγκεκριμένη αναλογία με τη Δ⁹-THC σε σκευάσματα φαρμακευτικής κάνναβης, αλλά και στο φαρμακευτικό σκεύασμα Sativex[®]. Πρόσφατα, η CBD απέδειξε τις αντιφλεγμονώδεις και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες σε κλινική μελέτη φάσης II για τη Νόσο Μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (GVHD), για τη μη απόρριψη του μοσχεύματος. (Yeshurun et al., 2015)

Η **Κανναβινόλη (CBN)** δρα ως μερικός αγωνιστής των CB₁ υποδοχέων, αλλά έχει υψηλότερη συγγένεια με τους CB₂ υποδοχείς (Rhee et al., 1997). Παρουσία της Δ⁹-THC εμφανίζει ενισχυμένη ναρκωτική δράση (Musty et al., 1976). Είναι ισχυρός αγωνιστής των TRPA1 και ανταγωνιστής των διαύλων TRPM8 (De Petrocellis et al., 2011). Η κανναβινόλη παρουσιάζει ηρεμιστική, αντισπασμωδική δράση και έχει επιδείξει σημαντικές αντιμικροβιακές δράσεις (Appendino et al., 2008)

Η **Κανναβιγερόλη (CBG)** πιθανώς διεγείρει πλήθος υποδοχέων που σχετίζονται με τον πόνο και τη φλεγμονή και δρα ως μερικός αγωνιστής στους CB₁ και CB₂ υποδοχείς (Gauson et al., 2007). Έχει χαμηλή συγγένεια με τους υποδοχείς κανναβινοειδών CB₁ και CB₂ (Pertwee et al., 2008), αλλά επηρεάζει το ενδοκανναβινοειδές σύστημα εξαιτίας της ικανότητάς του να αναστέλλει την πρόσληψη της ανανδαμίδης (De Petrocellis et al., 2011). In vitro μελέτες έχουν επιδείξει τη δράση της ως ισχυρού α2-αδρενεργικού αγωνιστή και ως ανταγωνιστή των 5-HT_{1a} υποδοχέων, εκδηλώνοντας αντικαταθλιπτικές ιδιότητες (Cascio et al., 2010). Παλαιότερες έρευνες έχουν δείξει ότι αναστέλλει την πρόσληψη του GABA, με αποτέλεσμα τη μείωση του άγχους και τη μυοχαλαρωτική δράση (Banerjee et al., 1975). Η κανναβιγερόλη παρουσιάζει αξιόλογες αντικαρκινικές ιδιότητες στα βασικά ερευνητικά μοντέλα, έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό κυτταροτοξικό σε υψηλές

δόσεις σε επιθηλιακό καρκίνωμα και είναι ένα από τα πιο αποτελεσματικά κανναβινοειδή στον καρκίνο του μαστού (Baek et al., 1998, Ligresti et al., 2006).

Το **Κανναβιχρωμένιο (CBC)** δεν εμφανίζει σημαντική συγγένεια για τους υποδοχείς κανναβινοειδών CB₁ και CB₂, αλλά είναι αγωνιστής των TRPA1 και λιγότερο ισχυρός αγωνιστής των TRPV3 και TRPV4 (Turner et al., 2017; Douglas et al., 2017). Σε μελέτες σε ποντίκια, το CBC έδειξε να έχει αποτελέσματα στην ανακούφιση από τον πόνο, ενισχύοντας τις αναλγητικές ιδιότητες της Δ⁹-THC (Cascio and Pertwee, 2014). και εμφανίζει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση στο οίδημα, μέσω ανεξάρτητων από τους CB υποδοχείς μηχανισμών (DeLong et al., 2010).

Η **Τετραϋδροκανναβιβαρίνη (THCV)** σε μικρές δόσεις δρα ως ανταγωνιστής των CB₁ υποδοχέων, χωρίς να εμφανίζει ψυχοδραστικές ιδιότητες (Thomas et al., 2005). Σε μεγαλύτερες δόσεις, μετατρέπεται σε αγωνιστής CB₁ υποδοχέων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ευφορικής δράσης (Pertwee, 2008). Ανταγωνιζόμενη τους CB₁ υποδοχείς, μπορεί να καταστείλει την όρεξη, και έχει παρατηρηθεί ότι μειώνει το σωματικό λίπος και τις συγκεντρώσεις της λεπτίνης ορού, σε παχύσαρκους ποντικούς. (Cawthorne et al., 2007). Δρα ως μερικός αγωνιστής CB₂ όπως καταδεικνύεται σε διαφορετικές *in vitro* και *in vivo* μελέτες (Bolognini et al., 2010). Η THCV αποτελεί μια νέα πιθανή θεραπεία κατά της δυσανεξίας στη γλυκόζη που σχετίζεται με την παχυσαρκία, χωρίς να δρα ως CB₁ ανάστροφος αγωνιστής/ανταγωνιστής (Wargent et al., 2013). Επίσης, η GW Pharmaceuticals μελετά τη χρήση THCV, υπό μορφή φυτικού εκχυλίσματος, για τη θεραπεία διαβήτη τύπου 2, σε συνδυασμό με μετφορμίνη.

Το **Τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA)**, παρόλο που δεν παρουσιάζει ψυχοτρόπο δράση, δεν είναι φαρμακολογικά ανενεργό. Πολυάριθμες μελέτες υποστηρίζουν την ανοσορρυθμιστική, αντιφλεγμονώδη και αντινεοπλασματική δράση του THCA. Η δράση του στους υποδοχείς CB₁ και CB₂ είναι ακόμα υπό διερεύνηση, αν και πιστεύεται ότι προκαλεί ενεργοποίηση του CB₁. Επιπλέον, το THCA αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης C, σε αντίθεση με την Δ⁹-THC υποδηλώνοντας ότι οι δύο αυτές ουσίες εκτελούν τις ανοσορρυθμιστικές τους δράσεις μέσω διαφορετικών μεταβολικών μονοπατιών (Moreno-Sanz, 2016).

Το **Κανναβιδιολικό οξύ (CBDA)** *in vitro* αναστέλλει τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων σε καρκίνο του μαστού, μέσω εκλεκτικής αναστολής του ενζύμου COX-2. Το ένζυμο αυτό συμμετέχει στις φλεγμονώδεις διαδικασίες και

πιστεύεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο μέχρι και στο 40% των μεταστατικών καρκίνων μαστού. Ως αναστολέας της COX-2, εμφανίζει και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, ωστόσο δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμα μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητά της στον πόνο και τη φλεγμονή. Όπως και η κανναβιδιόλη, έτσι και το κανναβιδιολικό οξύ δρα στον 5-HT_{1A} υποδοχέα, με μεγαλύτερη συγγένεια απ' ό,τι η CBD, αλλά δεν έχει δράση στους CB₁ υποδοχείς (Bolognini et al., 2013; McPartland et al., 2015).

3.3 Φαρμακοκινητική κανναβινοειδών

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες των κανναβινοειδών ποικίλλουν, καθώς επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως η οδός χορήγησης, η φαρμακοτεχνική μορφή, ο χρόνος έκθεσης και η συγκέντρωση της χορηγούμενης δόσης. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν γίνει μέχρι σήμερα αφορούν τις Δ⁹-THC και CBD, καθώς αυτές εμφανίζουν το κύριο ενδιαφέρον λόγω της λήψης ή χορήγησής τους για ευφοριστικούς ή ιατρικούς σκοπούς, ενώ δεν έχουν γίνει ακόμη φαρμακοκινητικές μελέτες για τα υπόλοιπα κανναβινοειδή που αποτελούν αντικείμενο αυτής της εργασίας.

3.3.1 Φαρμακοκινητική της Δ⁹-THC

Απορρόφηση

Το κάπνισμα, η κύρια οδός λήψης της κάνναβης, οδηγεί σε άμεση μεταφορά της ουσίας από τους πνεύμονες στην κυκλοφορία και στη συνέχεια στον εγκέφαλο. Οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται στο πλάσμα είναι ελάχιστα χαμηλότερες σε σχέση με την ενδοφλέβια χορήγηση και φτάνουν στα μέγιστα επίπεδα 3 έως 10 λεπτά μετά το κάπνισμα (Grotenhermen, 2003). Τα ποσοστά βιοδιαθεσιμότητας που έχουν αναφερθεί ποικίλλουν από 10-35% (Grotenhermen, 2003; Ohlsson et al., 1986). Σε από του στόματος χορήγηση, η απορρόφησή της είναι αργή και τα μέγιστα επίπεδα που επιτυγχάνονται στο πλάσμα χαμηλότερα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα εμφανίζονται 60-120 λεπτά μετά τη λήψη (Eichler et al., 2012; Gonçalves et al., 2019; Ohlsson et al., 1980)

Ένας εναλλακτικός τρόπος χορήγησης είναι μέσω του στοματικού βλεννογόνου, ο οποίος χρησιμοποιείται κυρίως για ιατρικούς σκοπούς. Η

απορρόφηση πραγματοποιείται άμεσα από το στοματικό βλεννογόνο, φτάνοντας σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την από του στόματος χορήγηση (Lucas et al., 2018).

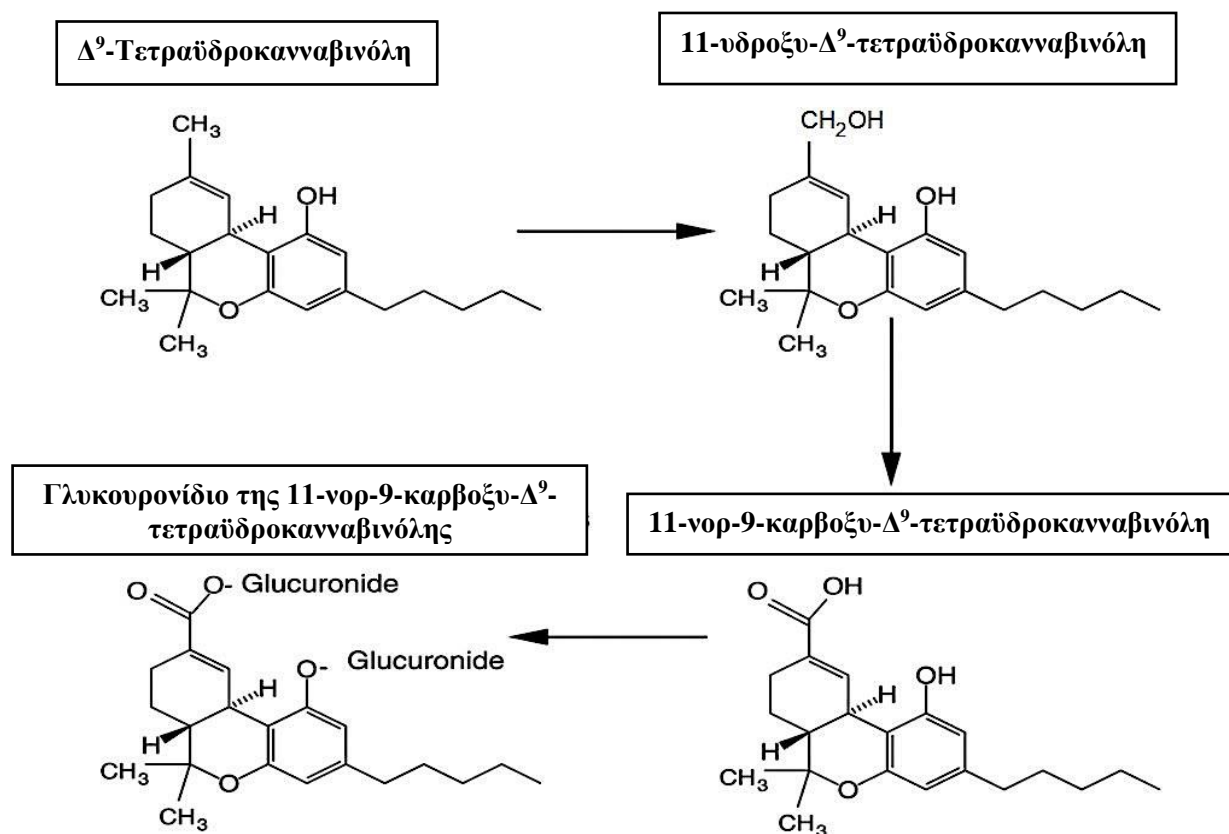
Κατανομή

Η Δ⁹-THC στην κυκλοφορία βρίσκεται περίπου κατά 90% στο πλάσμα, ενώ το υπόλοιπο 10% στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Το 95-99% της Δ⁹-THC στο πλάσμα συνδέεται με πρωτεΐνες πλάσματος, κυρίως λιποπρωτεΐνες και λιγότερο αλβουμίνη. Οι συγκεντρώσεις της Δ⁹-THC μειώνονται ταχέως, τόσο λόγω της ταχείας κατανομής της στους ιστούς, όσο και λόγω του ηπατικού μεταβολισμού. Η Δ⁹-THC είναι ιδιαίτερα λιπόφιλη και αρχικά κατανέμεται σε ιστούς με πλούσια αιμάτωση, όπως οι πνεύμονες, η καρδιά, ο εγκέφαλος και το ήπαρ. Ο όγκος κατανομής είναι 3.4 l/kg. Όταν χορηγείται ενδοφλεβίως, έχει παρατηρηθεί ότι μόνο το 1% της χορηγούμενης ποσότητας Δ⁹-THC, ανιχνεύεται στον εγκέφαλο κατά τη στιγμή της μέγιστης ψυχοδραστικότητας. Ο μεταβολίτης 11-υδροξυ-Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (11-OH-THC) φαίνεται να διαχέεται γρηγορότερα και να ανιχνεύεται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τη μητρική ουσία, πιθανώς λόγω της ασθενέστερης του δέσμευσης με πρωτεΐνες του πλάσματος. (Grotenhermen, 2003). Σε ιστούς που αιματώνονται λιγότερο, όπως ο λιπώδης ιστός, η Δ⁹-THC συσσωρεύεται αργά και μένει εκεί για μεγάλες χρονικές περιόδους (Harvey, 2001; Grotenhermen, 2003). Η Δ⁹-THC διαπερνά ταχέως τον πλακούντα, ενώ οι συγκεντρώσεις που επιτυγχάνονται στο αίμα και στους ιστούς του εμβρύου είναι χαμηλότερες από αυτές στο μητρικό πλάσμα και τους ιστούς της μητέρας. Οι μεταβολίτες 11-OH-THC και 11-νορ-9-καρβοξυ-Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (THC-COOH) διασχίζουν τον πλακούντα σε πολύ μικρότερο βαθμό, ενώ δεν έχει ανιχνευτεί THC-COOH στο πλάσμα του εμβρύου. Η Δ⁹-THC επίσης συγκεντρώνεται στο μητρικό γάλα λόγω της υψηλής λιποφιλικότητάς της (Huestis, 2007).

Βιομετατροπή

Η βιομετατροπή της Δ⁹-THC λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ, μέσω μικροσωματικής υδροξυλίωσης και οξειδωσης που καταλύεται από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 (CYP). Τα κύρια ισόένζυμα του κυτοχρώματος που καταλύουν τις αντιδράσεις υδροξυλίωσης είναι τα CYP2C9 και CYP3A4. Το πρώτο στάδιο βιομετατροπής είναι η υδροξυλίωση στη θέση 11 προς σχηματισμό του δραστικού μεταβολίτη 11-OH-THC, ο οποίος είναι εξίσου δραστικός με την Δ⁹-THC ενώ

διεισδύει σε μεγαλύτερο βαθμό στον εγκέφαλο (Σχήμα 3). (Grotenhermen, 2003). Παρόλο που η υδροξυλίωση στη θέση 11 είναι η πιο συχνή, υδροξυλίωση συμβαίνει και στη θέση 8, οδηγώντας στο σχηματισμό άλλων μεταβολιτών, των 8^α- και 8^β- OH-THC, οι οποίοι είναι επίσης δραστικοί (Harvey and Brown, 1991; Watanabe et al., 2007).



Σχήμα 3. Αντιδράσεις βιομετατροπής της Δ⁹-THC

Με περαιτέρω οξείδωση του 11-OH-THC, σχηματίζεται ένας δευτερογενής μεταβολίτης, η 11-νορ-9-καρβοξυ-Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (11-COOH-THC ή THC-COOH), η οποία δεν εμφανίζει ψυχοδραστικές ιδιότητες, και μεταβολίζεται περαιτέρω, μέσω αντιδράσεων φάσης II και σύζευξής της με γλυκουρονικό οξύ (Grotenhermen, 2003).

Απέκκριση

Πάνω από το 65% της Δ⁹-THC απεκκρίνεται ως μεταβολίτες μέσω των κοπράνων, το 20% μέσω των ούρων, ενώ περίπου το 5% αναλλοίωτο από τα κόπρανα. Πολλοί όξινοι μεταβολίτες βρίσκονται στα ούρα, οι περισσότεροι από τους οποίους, κατά τη φάση II της βιομετατροπής, έχουν συζευχθεί με γλυκουρονικό οξύ,

με σκοπό την αύξηση της υδατοδιαλυτότητάς τους και τη προαγωγή της απέκκρισής τους. Ο κύριος μεταβολίτης THC-COOH είναι συζευγμένος με γλυκουρονικό οξύ και απεκκρίνεται με τα ούρα, ενώ σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις απεκκρίνεται και ελεύθερο. Το 11-OH-THC απεκκρίνεται κυρίως μέσω των κοπράνων (Huestis, 2007). Ο χρόνος ημιζωής της Δ⁹-THC στο πλάσμα είναι δύσκολο να υπολογιστεί, καθώς η ισορροπία μεταξύ πλάσματος/λιπώδους ιστού επιτυγχάνεται πολύ αργά, οδηγώντας σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα, που είναι δύσκολο να αναλυθούν. Οι χρόνοι ημιζωής για τους μεταβολίτες της Δ⁹-THC έχουν υπολογιστεί ότι είναι μεγαλύτεροι από αυτόν του μητρικού μορίου (Grotenhermen, 2003). Η Δ⁹-THC μπορεί να ανιχνευτεί στα βιολογικά υλικά ακόμη και μια εβδομάδα μετά τη χρήση στους περιστασιακούς χρήστες και μέχρι ένα μήνα στους χρόνιους χρήστες.

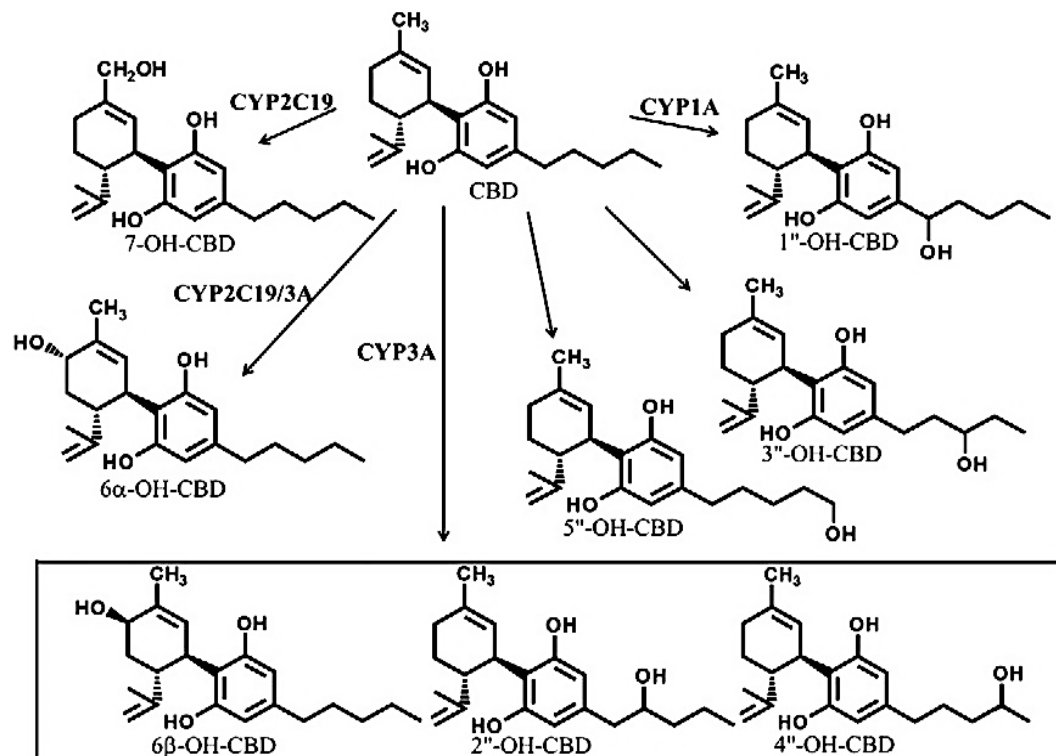
3.3.2 Φαρμακοκινητική της CBD

Λόγω της χαμηλής υδατοδιαλυτότητας η απορρόφηση της CBD από το γαστρεντερικό είναι ελάχιστη, με αποτέλεσμα η φαρμακοκινητική της να ποικίλλει. Το ποσοστό της βιοδιαθεσιμότητας έχει υπολογιστεί ότι είναι περίπου 6%, λόγω του εκτενούς μεταβολισμού πρώτης δόσης (Hawksworth and McArdle, 2004).

Η CBD κατανέμεται ταχέως στους ιστούς και εμφανίζει μεγάλο όγκο κατανομής, περίπου 32 l/kg και συσσωρεύεται στο λιπώδη ιστό λόγω της υψηλής λιποφιλικότητάς της (Fasinu et al., 2016).

Βιομετατρέπεται εκτενώς στο ήπαρ. Η κύρια αντίδραση βιομετατροπής είναι μια αντίδραση υδροξυλίωσης προς σχηματισμό του 7-OH-CBD μεταβολίτη, ενώ σχηματίζονται και άλλοι δευτερεύοντες υδροξυμεταβολίτες (Σχήμα 4) (Hawksworth and McArdle, 2004). Σε μελέτες που έχουν γίνει, έχουν αναγνωριστεί περίπου 40 μεταβολίτες από τη φάση I. Η σύζευξη της CBD με γλυκουρονικό οξύ στο φαινολικό οξυγόνο αποτελεί την κύρια αντίδραση βιομετατροπής φάσης II.

Η CBD και οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται μέσω των ούρων ή των κοπράνων είτε αναλλοίωτες είτε υπό τη μορφή γλυκουρονιδίων (Harvey and Mechoulam, 1990).



Σχήμα 4. Αντιδράσεις βιομετατροπής της CBD.

3.3.3 Φαρμακοκινητική της CBN

Η βιομετατροπή της CBN περιλαμβάνει την υδροξυλίωση στον άνθρακα 11 που οδηγεί στον κύριο μεταβολίτη. Οι κύριοι μεταβολίτες είναι η 11- υδροξυ-CBN και 8-υδροξυ- CBN. Επειδή η CBN έχει στο μόριο της έναν επιπλέον αρωματικό δακτύλιο, βιομετατρέπεται πολύ λιγότερο και πολύ πιο αργά σε σχέση με την Δ⁹-THC (Huestis, 2005). Η απέκκρισή της είναι σχετικά αργή, ενώ αποβάλλεται κατά 35% μέσω των κοπράνων και μόνο το 8% αποβάλλεται από τα ούρα (Grotenhermen, 2014)

3.3.4. Φαρμακοκινητική του THCA

Το THCA υφίσταται παρόμοια βιομετατροπή με την Δ⁹-THC, με αποτέλεσμα το σχηματισμό 11-OH-THCA και 11-nor-9-carboxy-THCA (Huestis, 2005). Κατά το κάπνισμα, το THCA αποκαρβοξυλιώνεται, λόγω της υψηλής θερμοκρασίας, και μετατρέπεται σε Δ⁹-THC. Η μετατροπή αυτή όμως δεν είναι πλήρης καθότι το THCA ανιχνεύεται σε δείγματα ούρων και αίματος (Jung et al., 2007).

3.4 Τοξικότητα της κάνναβης

Η κάνναβη είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη εξαρτησιογόνος ουσία. Χρησιμοποιείται είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλα ναρκωτικά από τους περισσότερους χρήστες ναρκωτικών. Το χασίς χρησιμοποιείται από τους τοξικομανείς με διάφορους τρόπους. Η πιο συχνή χρήση γίνεται με το κάπνισμα σε αυτοσχέδια τσιγάρα ή ναργιλέ ή με άλλες αυτοσχέδιες συσκευές που κατασκευάζονται από κανάτια, κουμπαραδες ή ποτήρια και είναι γνωστά ως «τσίκες». Μπορεί να γίνει χρήση με τη μάσηση των φύλλων της κάνναβης ή λαμβάνεται εσωτερικώς με τη μορφή διαφόρων σκευασμάτων.

Η κάνναβη επηρεάζει κυρίως το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η τοξική της δράση εκδηλώνεται συνήθως με την εμφάνιση ψευδαισθήσεων και παραισθήσεων. Οι εκδηλώσεις αυτές εμφανίζονται αμέσως μετά το κάπνισμα, ενώ φτάνουν στο μέγιστο αποτέλεσμα περίπου 20 λεπτά αργότερα και διαρκούν μέχρι 3 ώρες. Η χασισική μέθη εκδηλώνεται με το χαρακτήρα ονειρικού παραληρήματος, κατά το οποίο επικρατεί κυρίως το αίσθημα ευφορίας αλλά συχνά και το αίσθημα πανικού. Η ένταση των συμπτωμάτων εξαρτάται τόσο από τη δόση και το είδος του προϊόντος που λαμβάνεται, όσο και από την εμπειρία των περιστασιακών και των μακροχρόνιων χρηστών (Κουτσελίνης, 2002).

Σε μακροχρόνια χρήση, η κάνναβη έχει αρνητικές επιδράσεις στην υγεία των χρηστών, όπως επιπτώσεις στην ψυχική υγεία, το καρδιαγγειακό και αναπνευστικό σύστημα, το ανοσοποιητικό κ.ά. (Grotenhermen, 2004)

3.4.1 Επιπτώσεις στην ψυχική υγεία

Όταν η Δ^9 -THC εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και φθάνει στον εγκέφαλο, δεσμεύεται στους υποδοχείς κανναβινοειδών, με αποτέλεσμα να μεταβάλλονται τα επίπεδα διαφόρων νευροδιαβιβαστών, ιδιαίτερα της ντοπαμίνης και της νορεπινεφρίνης, οι οποίοι σχετίζονται στενά με τις επιδράσεις της χρήσης της κάνναβης, όπως η ευφορία και το άγχος. Άλλες επιδράσεις που έχουν σημειωθεί περιλαμβάνουν πτώση της συνείδησης, αίσθημα ευεξίας, χαλάρωση ή μείωση στρες, αυξημένη λίμπιντο και δημιουργικότητα (Osborne and Fogel, 2009). Πολλά από τα αποτελέσματα της χρήσης της κάνναβης είναι υποκειμενικά, όπως οι μεταβολές στην αντίληψη του χρόνου, καθώς ορισμένοι χρήστες αναφέρουν ότι ο χρόνος περνάει πολύ γρήγορα. Σε υψηλότερες δόσεις, τα αποτελέσματα μπορεί να περιλαμβάνουν

αλλοίωση στην εικόνα του σώματος, οπτικοακουστικές ψευδαισθήσεις, και αταξία (Crippa et al., 2011) αλλά και άλλες σοβαρότερες ψυχιατρικές εκδηλώσεις συμπεριλαμβανομένου της κατάθλιψης, του άγχους, της ψύχωσης, της διπολικής διαταραχής και της σχιζοφρένειας (Reece, 2009; Volkow et al., 2014)

Το άγχος είναι η πιο συχνά αναφερόμενη παρενέργεια του καπνίσματος κάνναβης. Περίπου το 20 με 30% των χρηστών παρουσιάζουν έντονο άγχος ή/και κρίσεις πανικού μετά το κάπνισμα ή κατά την εμφάνιση του συνδρόμου στέρησης (Lev-Ran et al., 2014; Crippa et al., 2009). Οι εκδηλώσεις αυτές πιθανώς οφείλονται στη δράση της Δ⁹-THC, η οποία, παρόλο που σε μικρές δόσεις έχει αγχολυτικές ιδιότητες, σε μεγαλύτερες μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση αγχώδους διαταραχής.

Όσον αφορά στη διπολική διαταραχή, πιστεύεται ότι μπορεί να πυροδοτηθεί η εμφάνιση μανιοκαταθλιπτικών επεισοδίων σε άτομα που είχαν προηγουμένως διαγνωστεί με διπολική διαταραχή, ωστόσο η χρήση της κάνναβης δεν φαίνεται να αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση διπολικής διαταραχής (Gibbs et al., 2015).

Επιπλέον, έχει υποστηριχθεί ότι τόσο η οξεία λήψη μεγάλης ποσότητας κάνναβης όσο και η χρόνια χρήση μπορούν να προκαλέσουν προσωρινή ψύχωση (Borgelt et al., 2013; Grotenhermen, 2007), η οποία είναι αναστρέψιμη, αλλά και εμφάνιση σχιζοφρένειας σε άτομα με γενετική προδιάθεση, αντίστοιχα (Suarez-Pinilla et al., 2014; Ferretjans et al., 2012). Αυτές οι επιδράσεις φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενες. Έτσι η βαριά χρήση αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης, ενώ η χρήση κατά την εφηβεία σχετίζεται με την πρόωμη έναρξη σχιζοφρενικών επεισοδίων (Large et al., 2011; James et al., 2013).

3.4.2 Επιπτώσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα

Σε χαμηλές δόσεις η κάνναβη επηρεάζει το συμπαθητικό σύστημα, προκαλώντας ταχυκαρδία, ωστόσο σε υψηλότερες δόσεις, διεγείρεται το παρασυμπαθητικό σύστημα, προκαλώντας βραδυκαρδία και υπόταση (Sánchez Artiles et al., 2019). Η χρήση της κάνναβης έχει συσχετιστεί με σοβαρές καρδιαγγειακές επιδράσεις. Αυξάνει τον καρδιακό ρυθμό, την αρτηριακή πίεση, την καρδιακή παροχή, μειώνει την περιφερική αγγειακή αντίσταση και σε υψηλότερες δόσεις προκαλεί ορθοστατική υπόταση (NASEM, 2017).

Η κάνναβη έχει, επίσης, ενοχοποιηθεί για την πρόκληση πρόωρων κοιλιακών συστολών και άλλων αναστρέψιμων μεταβολών στο ΗΚΓ, που επηρεάζουν τα κύματα P και T και το διάστημα ST (Sánchez Artiles et al., 2019). Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί πολλά περιστατικά εμφράγματος του μυοκαρδίου σε νέους υγιείς χρήστες μαριχουάνας. Από μελέτη που πραγματοποιήθηκε, βρέθηκε ότι ο κίνδυνος για έμφραγμα του μυοκαρδίου αυξάνεται περίπου κατά 5 φορές μετά τη χρήση μαριχουάνας (Mittleman et al., 2001).

Η χρήση της κάνναβης έχει επίσης συνδεθεί με την ανάπτυξη κολπικής μαρμαρυγής ειδικά σε νεαρούς ασθενείς χωρίς παράγοντες κινδύνου (Singla et al., 2012). Άλλες αναφορές συνδέουν τη χρήση της μαριχουάνας με την ανάπτυξη της κοιλιακής μαρμαρυγής λόγω υπερβολικής απελευθέρωσης κατεχολαμινών (Baranchuk et al., 2008)

3.4.3 Επιπτώσεις στο αναπνευστικό σύστημα

Το κάπνισμα είναι η κύρια οδός λήψης της κάνναβης, λόγω της αυξημένης απορρόφησης των κανναβινοειδών από τους πνεύμονες και της άμεση κατανομής τους στο ΚΝΣ. Η βραχυπρόθεσμη χρήση κάνναβης οδηγεί σε βρογχοδιαστολή, καθώς η Δ⁹-THC εμφανίζει βρογχοδιασταλτικές ιδιότητες και μειωμένη αντίσταση αεραγωγών. Ωστόσο, σε μακροχρόνια χρήση προκαλείται βλάβη της αναπνευστικής λειτουργίας, αυξάνεται η φλεγμονή και οι αντιστάσεις των αεραγωγών και καταστρέφονται οι πνεύμονες (Repp and Raich, 2014; Reece, 2009)

Χρόνιοι χρήστες κάνναβης εμφανίζουν συμπτώματα βρογχίτιδας και εμφυσήματος, βήχα, αυξημένη παραγωγή πτυέλων, και συριγμούς. Ωστόσο, αυτά πιθανώς οφείλονται και στην ερεθιστική δράση του καπνού στους αεραγωγούς και όχι τόσο στην επίδραση των κανναβινοειδών (Bloom et al., 1987, Tashkin et al., 1990).

3.4.4 Επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα

Σε in vitro πειράματα ή σε πειράματα σε ζωικά μοντέλα, έχει παρατηρηθεί ότι η Δ⁹-THC, λόγω της δράσης της κυρίως στους CB₂, υποδοχείς, αναστέλλει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και τροποποιεί την παραγωγή κυτταροκινών, οδηγώντας στην επικράτηση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, όπως η IL-10 και τη μείωση ανοσοδιεγερτικών κυτταροκινών όπως οι IL-2, IL-12, και IFN-γ.

Επιδημιολογικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η κάνναβη έχει παρόμοιες ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες και στους ανθρώπους. Ωστόσο, μέχρι στιγμής τα αποτελέσματα των επιδημιολογικών μελετών δεν είναι ξεκάθαρα σχετικά με την επίδραση της κάνναβης στο ανοσοποιητικό σύστημα και είναι απαραίτητο να γίνουν περισσότερες μελέτες για να διευκρινιστεί εάν η μαριχουάνα συνδέεται πραγματικά με αυτούς τους κινδύνους (Newell et al., 1985, Caiaffa et al., 1994).

3.4.5 Επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα

Η χρήση της κάνναβης φαίνεται να αναστέλλει την έκκριση των γοναδοτροπινών από την υπόφυση, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι αναπαραγωγικές λειτουργίες. Στους άνδρες έχει παρατηρηθεί μείωση τόσο στον αριθμό όσο και στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων, με πιθανό κίνδυνο υπογονιμότητας (Ashton, 1999).

3.4.6 Επίδραση στην ικανότητα της οδήγησης

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η χρήση κάνναβης μεταβάλλει αρνητικά τη συμπεριφορά ενός ατόμου επιδεινώνοντας τη γνωστική, αισθητηριακή και κινητική λειτουργία του, ικανότητες που είναι απαραίτητες για την οδήγηση. Η επίδραση της κάνναβης στην όραση σχετίζεται με την απώλεια του φωτοαντανακλαστικού, της ικανότητας δηλαδή να ρυθμίζεται η ποσότητα του φωτός που μπαίνει στον οφθαλμό, με αποτέλεσμα την αδυναμία του να προσαρμόζεται σε συνθήκες εναλλασσόμενου φωτός. Λόγω της βλάβης της βραχυπρόθεσμης μνήμης και της εξασθένησης της μάθησης μετά τη χρήση της μαριχουάνας, παρατηρείται αδυναμία εστίασης και επιλεκτικής προσοχής. Επιπλέον, μεταβάλλεται η αντίληψη του χρήστη σχετικά με το πέρασμα του χρόνου, ο οποίος φαίνεται να περνά πιο γρήγορα σε σχέση με τον πραγματικό, με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η αντίληψη της ταχύτητας και της απόστασης (ElSohly, 2017).

Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι οι χρήστες αντιλαμβάνονται την επίδραση της κάνναβης στην ικανότητα της οδήγησης και δεν υπερεκτιμούν τις ικανότητές τους, κάτι που συμβαίνει στην περίπτωση κατανάλωσης αλκοόλ. Ως αποτέλεσμα αυτού, έχει παρατηρηθεί ότι οδηγοί υπό την επήρεια κάνναβης οδηγούν πιο αργά, δεν επιχειρούν επικίνδυνες προσπεράσεις και τηρούν τις αποστάσεις ασφαλείας. Τα εργαστηριακά ευρήματα, ωστόσο, δείχνουν σαφώς ότι η οξεία χρήση

κάνναβης επηρεάζει την προσοχή, την παρακολούθηση και τις ψυχοκινητικές δεξιότητες που απαιτούνται στην οδήγηση. Παρόλα αυτά, επιδημιολογικές και πειραματικές μελέτες παρέχουν συμπεράσματα που είναι ετερογενή και όχι αρκετά ισχυρά για να αποδείξουν ότι η χρήση κάνναβης αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την πρόκληση ατυχήματος (WHO, 2018).

3.4.7 Εξάρτηση και Ανοχή

Μετά από παρατεταμένη χρήση κάνναβης, έχει παρατηρηθεί ανοχή στην επίδραση των κανναβινοειδών (Romero et al., 1997). Η ανοχή αυτή οφείλεται κυρίως σε φαρμακοδυναμικές μεταβολές στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα, πιθανώς με μείωση των υποδοχέων ή/και απευαισθητοποίησή τους (Di Marzo et al., 2000). Η ανοχή εμφανίζεται στις περισσότερες από της επιδράσεις της Δ^9 -THC, συμπεριλαμβανομένου της αναλγητικής και αντισπασμωδικής δράσης. Ο καρδιακός ρυθμός επανέρχεται στο φυσιολογικό (Grotenhermen, 2004).

Η μακροχρόνια λήψη της κάνναβης δεν σχετίζεται με σωματική εξάρτηση, όπως συμβαίνει με τη χρήση άλλων ναρκωτικών ουσιών. Ωστόσο, η απότομη διακοπή της έχει παρατηρηθεί ότι συνοδεύεται από συμπτώματα συνδρόμου στέρησης. Οι χρήστες αναφέρουν συμπτώματα, όπως ευερεθιστότητα, αϋπνία, ανορεξία, άγχος και κατάθλιψη. Τα συμπτώματα στέρησης είναι συνήθως ήπια και ο κίνδυνος σωματικής και ψυχικής εξάρτησης είναι χαμηλός σε σύγκριση με αυτών των οπιούχων, του καπνίσματος, του αλκοόλ και των βενζοδιαζεπινών (Grotenhermen, 2004).

Ήδη από τη δεκαετία του 1970, διάφοροι ερευνητές ενοχοποιούσαν τη χρήση της κάνναβης ως «πύλη εισόδου» σε άλλες εξαρτησιογόνες ουσίες. Η υπόθεση αυτή υποστηριζόταν από το γεγονός ότι ελάχιστοι κάνουν χρήση ουσιών, όπως η ηρωΐνη και η κοκαΐνη, αν δεν έχουν χρησιμοποιήσει προηγουμένως άλλες ουσίες, όπως είναι το αλκοόλ, ο καπνός ή η κάνναβη (Vanyukov et al., 2012). Ενώ έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση, οι προγνωστικοί παράγοντες εξέλιξης από τη χρήση της κάνναβης σε άλλα παράνομες εξαρτησιογόνες ουσίες παραμένουν ασαφείς (Secades-Villa et al., 2015).

3.5 Θεραπευτικές χρήσεις της κάνναβης και των κανναβινοειδών

Πολυάριθμες προκλινικές και κλινικές μελέτες σχετικά με τη χρησιμότητα της κάνναβης στη θεραπευτική έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Τα δεδομένα όμως

σχετικά με την αποτελεσματικότητα των κανναβινοειδών είναι περιορισμένα. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα κανναβινοειδή χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματική θεραπεία στην ήδη ακολουθούμενη φαρμακευτική αγωγή, αλλά και σε περιπτώσεις όπου η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων με την κλασική προτεινόμενη θεραπεία είναι ανεπιτυχής. Τα κανναβινοειδή έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως ως αντιεμετικά, ως διεγερτικά της όρεξης, για τον νευροπαθητικό πόνο και τη σπαστικότητα στην πολλαπλή σκλήρυνση, στο χρόνιο μη καρκινικό πόνο, ως παρηγορητική θεραπεία στον καρκίνο, στην παιδική επιληψία, αλλά και σε άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες, στην άνοια, στη νόσο Huntington, Parkinson και στη Νόσο Κινητικού Νευρώνα. Επιπλέον έχουν χρησιμοποιηθεί και σε διαταραχές του συναισθήματος, στην κατάθλιψη, σε διαταραχές ύπνου, και στη διαταραχή μετατραυματικού στρες.

Ως αντιεμετικά: Κλινικές μελέτες σύγκριναν τις αντιεμετικές ιδιότητες της THC με αυτές του εικονικού φαρμάκου ή με άλλα αντιεμετικά φάρμακα που χορηγούνται στους ασθενείς με ναυτία και έμετο που σχετίζονται με χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Smith et al., 2015; Tramer et al., 2001; Whiting et al., 2015). Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η Δ⁹-THC και άλλα κανναβινοειδή, που είναι αγωνιστές κανναβινεργικών υποδοχέων, ήταν πιο αποτελεσματικά από το εικονικό φάρμακο ή είχαν παρόμοια αποτελεσματικότητα με τα αντιεμετικά φάρμακα με τα οποία συγκρίνονταν.

Σύμφωνα με άλλες όμως ανασκοπήσεις, οι αποδείξεις για την αποτελεσματικότητα των κανναβινοειδών ως αντιεμετικά χαρακτηρίστηκαν σχετικά αδύναμες (Smith et al., 2015). Ωστόσο, οι Εθνικές Ακαδημίες Επιστημών, Μηχανικής και Ιατρικής των Η.Π.Α. (NASEM) διαπίστωσαν πως υπήρχαν αρκετά «αποδεικτικά στοιχεία» για την αποτελεσματικότητα των από του στόματος χορηγούμενων κανναβινοειδών στην αντιμετώπιση της ναυτίας και του εμέτου που προκαλούνται από τη χημειοθεραπεία (NASEM, 2017).

Οι περισσότερες κλινικές δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί σύγκριναν την αποτελεσματικότητα της THC και των άλλων κανναβινοειδών με παλαιότερα κυρίως φάρμακα όπως η προχλωπεραζίνη, όμως τα νεότερα αντιεμετικά φάρμακα παρέχουν πολύ καλύτερο έλεγχο της ναυτίας και του εμέτου από την προχλωπεραζίνη (Smith et al., 2015; Navari, 2009). Μόνο λίγες κλινικές μελέτες έχουν συγκρίνει τις αντιεμετικές δράσεις των κανναβινοειδών με αυτές των νεότερων φαρμάκων που λαμβάνουν καρκινοπαθείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με τα τρέχοντα σχήματα χημειοθεραπείας (NASEM, 2017; Navari, 2009).

Ως διεγερτικά της όρεξης: Το φαρμακευτικό σκεύασμα Marinol έχει εγκριθεί στις ΗΠΑ από το 1999 ως διεγερτικό την όρεξης σε ασθενείς με AIDS. Η έγκριση αυτή είχε βασιστεί σε πολύ λίγες και μικρές κλινικές μελέτες (Beal et al., 1995; Lutge et al., 2013; Tramer et al., 2001). Μετέπειτα συστηματικές ανασκοπήσεις κατέληξαν όμως στο συμπέρασμα ότι οι έρευνες αυτές παρείχαν αδύναμα στοιχεία σχετικά με τη χρήση της Δ⁹-THC ως ορεξιογόνο. Πλέον, πολλοί λίγοι ασθενείς με AIDS αναπτύσσουν ανορεξία που σχετίζεται με την ασθένεια, λόγω της ισχυρής αντιρετροϊκής θεραπείας, επομένως δεν υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την χρήση ορεξιογόνων (Lutge et al., 2013; NASEM, 2017; Whiting et al., 2015).

Για το νευροπαθητικό πόνο και τη σπαστικότητα στην πολλαπλή σκλήρυνση: Κλινικές δοκιμές έχουν αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα των κανναβινοειδών στη θεραπεία του μυϊκού σπασμού και του νευροπαθητικού πόνου σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση. Το προϊόν που έχει δοκιμαστεί περισσότερο είναι το Sativex, ένα τυποποιημένο εκχύλισμα κάνναβης με περίπου ίσες ποσότητες THC και CBD που χορηγείται ως στοματικό σπρέι. Σε τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές, μερικοί ασθενείς που έλαβαν το Sativex, εκτός από το φάρμακο που έπαιρναν για τη νόσο τους, ανέφεραν μείωση της σπαστικότητας από τους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε εικονικό φάρμακο (Collin et al., 2010; Novotna et al., 2011; Wade et al., 2004). Ωστόσο, οι βαθμολογίες των κλινικών δοκιμών για τη μυϊκή σπαστικότητα των ασθενών έδειξαν μόνο οριακές μειώσεις (Koppel et al., 2014; NASEM, 2017; Whiting et al., 2015; Zajicek et al., 2003). Η επισκόπηση του NASEM κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα κανναβινοειδή ήταν «πιθανώς αποτελεσματικά» στη μείωση της μυϊκής σπαστικότητας, αλλά περιέγραψε τα κλινικά τους αποτελέσματα ως «μέτρια» (NASEM, 2017).

Για το χρόνιο μη καρκινικό πόνο: Ένας από τους κύριους λόγους λήψης της κάνναβης από ασθενείς για ιατρικούς σκοπούς αποτελεί η αντιμετώπιση του χρόνιου πόνου, μη καρκινικής αιτιολογίας, όπως ο νευροπαθητικός πόνος και σε αρθρίτιδα. Σε πέντε τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες εξετάστηκαν 178 ασθενείς με διάφορους τύπους νευροπαθητικού πόνου, οι οποίοι έλαβαν εισπνεόμενη ατμιστική κάνναβη για 2 εβδομάδες. Διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς που έλαβαν κάνναβη ήταν τρεις φορές πιο πιθανό να αναφέρουν μείωση κατά 30% στην ένταση του πόνου από εκείνους στους οποίους χορηγήθηκε εικονικό φάρμακο (Andreae et al., 2015). Σε μια επισκόπηση αξιολογήθηκαν μελέτες που σύγκριναν την αποτελεσματικότητα των κανναβινοειδών με εκείνη του εικονικού φαρμάκου για τη μείωση του χρόνιου

νευροπαθητικού πόνου (Mucke et al., 2018a). Συμπεριέλαβε 16 μελέτες με 1750 συμμετέχοντες που λάμβαναν κανναβινοειδή (Sativex ή THC και τα ανάλογα της) ή ένα εικονικό φάρμακο για 2-26 εβδομάδες. Διαπίστωσαν ότι κατά τη θεραπεία με κανναβινοειδή αυξήθηκε το ποσοστό των ασθενών που ανέφεραν μείωση του πόνου κατά 50% σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο από 17% σε 21%. Σε μια άλλη ανασκόπηση ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών και παρατηρητικών μελετών συμπεριέλαβαν 91 δημοσιεύσεις στις οποίες συμμετείχαν 9958 άτομα. Οι μελέτες περιελάμβαναν ασθενείς με νευροπαθητικό πόνο, με σκλήρυνση κατά πλάκας ή άλλες παθήσεις, όπως ινομυαλγία, ρευματοειδή αρθρίτιδα και άλλους τύπους χρόνιου μη καρκινικού πόνου. Το ποσοστό των ασθενών με χρόνια μη καρκινικό πόνο που πέτυχαν 30% μείωση στην ένταση του πόνου, κατά μέσο όρο στις τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες, ήταν 29% για τους ασθενείς που έλαβαν κανναβινοειδή, σε σύγκριση με 26% για αυτούς που έλαβαν εικονικό φάρμακο. Η διαφορά αυτή βρέθηκε ότι ήταν στατιστικά σημαντική (Stockings, 2018a).

Ως παρηγορητική θεραπεία στον καρκίνο: Έχει υποστηριχθεί η ιατρική χρήση της κάνναβης και κανναβινοειδών για τη διαχείριση πλήθους συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο σε τελικό στάδιο, όπως για τον έλεγχο του πόνου, τη διέγερση της όρεξης, τη μείωση του άγχους και τη βελτίωση του ύπνου. Σε μια συστηματική όμως ανασκόπηση και μετα-ανάλυση της αποτελεσματικότητας, της ανεκτικότητας και της ασφάλειας των κανναβινοειδών στην παρηγορητική ιατρική, συγκρίθηκαν εννέα μελέτες με 1561 συμμετέχοντες. Δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές στατιστικά διαφορές μεταξύ των κανναβινοειδών και του εικονικού φαρμάκου στην αύξηση της όρεξης, τη βελτίωση της ναυτίας ή του εμέτου, του πόνου ή του ύπνου σε ασθενείς με καρκίνο τελικού σταδίου. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν θεωρούνται αδύναμα, καθώς έχουν προέλθει από μόνο λίγες κλινικές μελέτες και λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων, ένας περιορισμός που μειώνει την πιθανότητα να βρεθούν σημαντικές διαφορές που να λειτουργούν υπέρ των κανναβινοειδών (Mucke et al., 2018b).

Για την παιδική επιληψία: Υπάρχουν αναφορές ότι σε παιδιά με φαρμακοανθεκτική επιληψία τα έλαια πλούσια σε CBD μειώνουν τη συχνότητα και τη σοβαρότητα των επιληπτικών κρίσεων (Devinsky et al., 2016; Hussain et al., 2015; Press et al., 2015). Αυτές οι αναφορές έχουν υποστηριχθεί και επιβεβαιωθεί από διάφορες ελεγχόμενες κλινικές μελέτες (Devinsky et al., 2016; Devinsky et al., 2017; Dos Santos et al., 2014; Friedman and Devinsky, 2015). Μια πρόσφατη συστηματική

ανασκόπηση των κλινικών δοκιμών διαπίστωσε ότι η προσθήκη της CBD στη συμβατική αντιεπιληπτική φαρμακευτική αγωγή μείωσε σημαντικά την συχνότητα των επιληπτικών κρίσεων σε παιδιά με σύνδρομο Dravet και σύνδρομο Lennox-Gastaut (Stockings et al., 2018b)

Άλλες χρήσεις: Η χρήση της κάνναβης και κανναβινοειδών έχει υποστηριχθεί τόσο από γιατρούς όσο και από ασθενείς για τη θεραπεία και άλλων ιατρικών καταστάσεων όπως σε διαταραχές άγχους, διαταραχές μετατραυματικού στρες, καταθλιπτικές διαταραχές, διαταραχές ύπνου, χρόνιους πόνους που δεν περιλαμβάνονται στις μέχρι σήμερα κλινικές δοκιμές, νευροεκφυλιστικές διαταραχές, και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου όπως η νόσος του Crohn. Για τη μεγάλη πλειοψηφία αυτών των ιατρικών διαταραχών, δεν υπάρχουν ενδείξεις αποτελεσματικότητας από ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές ή υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία από μελέτες που χρησιμοποίησαν μικρά δείγματα ασθενών, ελέγχονταν ανεπαρκώς ή δεν σύγκριναν κάνναβη ή κανναβινοειδή με εικονικό ή δραστικό φάρμακο (NASEM, 2017; Whiting et al., 2015). Αν και οι επαγγελματίες υγείας που αντιμετωπίζουν αυτές τις καταστάσεις ενδέχεται να είναι απρόθυμοι να χρησιμοποιούν κανναβινοειδή εκτός κλινικών δοκιμών, ελλείψει τέτοιων ενδείξεων, οι ασθενείς χρησιμοποιούν την κάνναβη και τα κανναβινοειδή για τη θεραπεία αυτών των συμπτωμάτων οπότε είναι σε θέση να το κάνουν (Martin et al., 2018).

Μέχρι σήμερα, η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration) έχει δώσει έγκριση μόνο σε 4 σκευάσματα κανναβινοειδών. Η δροναβινόλη, η συνθετική THC, υπάρχει ως δραστικό συστατικό στα σκευάσματα Marinol και Syndros, με τη μορφή μαλακής κάψουλας ή πόσιμου διαλύματος, αντίστοιχα, και έχει πάρει έγκριση τόσο για τη διέγερση της όρεξης σε ασθενείς με AIDS, όσο και για την αντιμετώπιση της ναυτίας και των εμέτων που οφείλονται σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Η ναμπιλόνη, ένα συνθετικό ανάλογο της THC, έχει επίσης εγκριθεί για την αντιμετώπιση της επαγόμενης από χημειοθεραπευτικά φάρμακα ναυτίας. Το Sativex είναι ένα τυποποιημένο εκχύλισμα κάνναβης, το οποίο περιέχει περίπου ίσες ποσότητες THC και CBD, χορηγείται ως στοματικό σπρέι για την αντιμετώπιση της μυϊκής σπαστικότητας σε ασθενείς με Πολλαπλή Σκλήρυνση. Τέλος, η κανναβιδιόλη, έχει πάρει έγκριση και κυκλοφορεί με το εμπορικό όνομα Epidiolex®, για τη θεραπεία κρίσεων που σχετίζονται με τα σύνδρομα Lennox-Gastaut and Dravet σε ασθενείς άνω των 2 ετών.

Στην Ελλάδα έχει εγκριθεί από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων το ιδιοσκεύασμα Sativex, το οποίο πρόκειται να κυκλοφορήσει με ένδειξη για την Πολλαπλή Σκλήρυνση, το νευροπαθητικό πόνο και τη σπαστικότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Ταυτοποίηση δειγμάτων κάνναβης και προσδιορισμός των κανναβινοειδών στα φυτά και στα προϊόντα κάνναβης

4.1 Ταυτοποίηση δειγμάτων κάνναβης

Η ταυτοποίηση των φυτών της κάνναβης γίνεται με τη χρήση μικροσκοπικών ή χημικών δοκιμασιών. Στη μικροσκοπική δοκιμασία παρατηρούνται οι κυστολιθικές τρίχες και αδενώδεις τρίχες με πολυκυττάρια κεφαλή και με μίσχο. Στη βάση των κυστολιθικών τριχών εναποτίθεται ανθρακικό ασβέστιο, το οποίο με την προσθήκη διαλύματος υδροχλωρικού οξέος οδηγεί στην απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα, αντίδραση που παρατηρείται στο μικροσκόπιο υπό τη μορφή φυσαλίδων. Στις χημικές δοκιμασίες, χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο Duquenois, το οποίο παρασκευάζεται διαλύοντας 5 σταγόνες ακεταλδεΰδης και 0,4 g βανιλίνης σε 20 ml αιθανόλης 95%. Στις δοκιμασίες αυτές, 20-30 mg από το δείγμα τοποθετείται σε ένα γυάλινο φιαλίδιο με 10 σταγόνες από το ειδικό αντιδραστήριο και μετά από ανακίνηση προστίθενται 10 σταγόνες πυκνού υδροχλωρικού οξέος και παρατηρείται αλλαγή του χρώματος σε βιολετί. Ακολουθεί η προσθήκη χλωροφορμίου. Αν το δείγμα πρόκειται για φυτό κάνναβης, το βιολετί χρώμα μεταφέρεται στην οργανική στοιβάδα (Watanabe et al., 2016).

4.2 Δείγματα ανάλυσης

Για τον προσδιορισμό των διαφόρων κανναβινοειδών έχει χρησιμοποιηθεί πληθώρα μεθοδολογιών που έχουν δημοσιευτεί στην διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των κανναβινοειδών έχει πραγματοποιηθεί σε διάφορα είδη δειγμάτων, όπως σε διαφορετικά μέρη του φυτού της κάνναβης (Cardenia et al., 2018; Bruci et al., 2012; Aizpurua-Olaizola et al., 2014), σε κατεργασμένη (Gambaro et al., 2002; Ameer et al., 2003) και ακατέργαστη κάνναβη (Stefanidou et al., 1998; Casiraghi et al., 2017; Mudge et al., 2017), σε εκχυλίσματα κάνναβης που χρησιμοποιούνται για ιατρική χρήση (Citty et al., 2016) αλλά και στα πλέον δημοφιλή εμπορικά προϊόντα που προέρχονται από την κάνναβη, όπως έλαια και τσάι κάνναβης (Pacifici et al., 2017; Ciolino et al., 2018a,b), συμπληρώματα διατροφής (Ciolino et al., 2018a,b), αλλά και διατροφικά προϊόντα

όπως μύρες, παστίλιες, λικέρ (Pelegriani et al., 2004; Lachenmeier et al., 2004), κ.ά. Σε λίγες μόνο μελέτες η δραστική ουσία της κάνναβης, η Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη, είναι η μόνη ουσία που προσδιορίζεται (Hewavitharana et al., 2005; Ross et al., 2000; Stefanidou et al., 1998; Ameer et al., 2013). Στις περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές, και κυρίως τις προηγούμενες δεκαετίες, γίνεται προσδιορισμός των τριών σημαντικότερων συστατικών που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό της φαρμακευτικής από τη βιομηχανική κάνναβη, δηλαδή της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης, της κανναβιδιόλης και της κανναβινόλης (Bruci et al., 2012; Casiraghi et al., 2017; Ilias et al., 2005; Omar et al., 2013; Pellegrini et al., 2004; Stefanidou et al., 2000; Gambaro et al., 2002; Lachenmeier et al., 2004; De Oliveira et al., 2008). Πλέον τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες επιστημονικές μελέτες περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό και άλλων κανναβινοειδών όπως της κανναβιγερόλης και του κανναβιχρωμένου αλλά και των αντίστοιχων οξέων όλων των κανναβινοειδών της κάνναβης που αποτελούν πρόδρομες ουσίες των κανναβινοειδών αυτών, λόγω της ραγδαίας αύξησης της χρήσης τους στην παρασκευή διαφόρων προϊόντων (Cardenia et al., 2018; Ciolino et al., 2018a,b; Ibrahim et al., 2017; Leghissa A. 2016; Aizpurua-Olaizola et al., 2014; Citty et al., 2016; Mudge et al., 2017; Wang et al., 2017; Pacifici et al., 2017). Οι συνήθειες χρωματογραφικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η Αέρια Χρωματογραφία (gas chromatography, GC) και η Υγρή Χρωματογραφία (liquid chromatography, LC), συζευγμένες με διάφορα είδη ανιχνευτών, όπως ο ανιχνευτής μαζών (MS).

4.3 Μέθοδοι εκχύλισης των κανναβινοειδών

Η απομόνωση των κανναβινοειδών από τα υπό μελέτη δείγματα προηγείται της χρωματογραφικής ανάλυσης. Οι τεχνικές εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί και περιγραφεί είναι κυρίως η εκχύλιση με τη χρήση διαφόρων οργανικών διαλυτών, όπως

- το εξάνιο (Stefanidou et al., 1998; Hewavitharana et al., 2005)
- η μεθανόλη (Gambaro et al., 2002; Casiraghi et al., 2017)
- η αιθανόλη (Ciolino et al., 2018)
- το ακετονιτρίλιο (Ciolino et al., 2018)

ή μίγματα οργανικών διαλυτών, όπως

- μεθανόλη: χλωροφόρμιο κυρίως σε αναλογία 9:1 (v/v) (De Backer et al., 2009; Pacifici et al., 2017; Stolker et al., 2004) ή και σε άλλες αναλογίες (Ross et al., 2000),
- εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 6:4 (v/v) (Bruci et al., 2012) αλλά και 9:1 (v/v) (Ross et al., 2000)
- εξάνιο: ισοπροπανόλη (9:1, v/v) (Pellegrini et al., 2004)
- ακετονιτρίλιο: μεθανόλη (8:2, v/v) (Wang et al., 2017; Ibrahim et al., 2017).

Εκτός από την εκχύλιση με τη χρήση διαλυτών, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι τρόποι εκχύλισης, όπως είναι η εκχύλιση με τη χρήση υπερήχων (Omar et al., 2013) ή υπερκρίσιμα υγρά (Omar et al., 2013; Aizpurua-Olaizola et al., 2014). Η χρήση υπερήχων έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τα ποσοστά ανάκτησης της εκχύλισης. Στην υπερκρίσιμη εκχύλιση, ως διαλύτης χρησιμοποιείται ένα ρευστό, συνήθως CO₂, σε υπερκρίσιμη κατάσταση δηλαδή σε πίεση και θερμοκρασία πάνω από τις κρίσιμες τιμές. Σε ορισμένες διεθνείς επιστημονικές δημοσιεύσεις, έχει χρησιμοποιηθεί η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Headspace- solid phase micro-extraction SPME) (Pias et al., 2005, Lachenmeier et al., 2004) μέσω ανάλυσης της υπερκείμενης φάσης, μια τεχνική που βασίζεται στην πτητικότητα των συστατικών που αναλύονται χωρίς τη χρήση διαλυτών. Με την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών, οι προς προσδιορισμό ουσίες απομονώνονται μεταφερόμενες στην αέρια φάση και στη συνέχεια αναλύονται διοχετευόμενες σε αέριο χρωματογράφο συνδυασμένο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, GC-FID).

4.4 Αναλυτικές χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών

Το στάδιο της εκχύλισης και απομόνωσης των κανναβινοειδών ακολουθεί η εξάτμιση του διαλύτη ή του συστήματος διαλυτών εκχύλισης και η παραλαβή των αναλυτών με κάποιον άλλο συνήθως οργανικό διαλύτη. Ο διαλύτης παραλαβής και έγχυσης στο αναλυτικό όργανο επιλέγεται βάσει της διαλυτότητας των υπό εξέταση αναλυτών σε αυτόν και ποικίλει ανάλογα με την αναλυτική τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τους. Οι σημαντικότερες αναλυτικές χρωματογραφικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών είναι η Αέρια Χρωματογραφία και η Υγρή Χρωματογραφία.

Ο προσδιορισμός των κανναβινοειδών με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο στην κατεργασία του δείγματος πριν την ανάλυση, αυτό της παραγωγοποίησης, με σκοπό την υποκατάσταση των πλευρικών λειτουργικών ομάδων των αναλυτών αυτών, και κυρίως της υδροξυλομάδας και της καρβοξυλομάδας. Το στάδιο αυτό είναι απαραίτητο στην περίπτωση των κανναβινοειδών για δύο λόγους. Κατ' αρχήν για την βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των αναλυτών που διαθέτουν λειτουργικές ομάδες και κυρίως καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες, καθώς επίσης και την αύξηση της πτητικότητας των ουσιών αυτών κάτι που οδηγεί σε αισθητά αυξημένη ευαισθησία των μεθόδων. Επιπροσθέτως, η παραγωγοποίηση είναι σημαντική διότι, καθώς στο σημείο έγχυσης του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες που αποσκοπούν στη μετατροπή του δείγματος σε αέρια φάση, έχει αποδειχθεί ότι πραγματοποιείται αποκαρβοξυλίωση των οξέων που είναι παρόντα στο φυτό, όπως τα THCA, CBDA, CBCA, CBGA κλπ. προς τα αντίστοιχα κανναβινοειδή, Δ⁹-THC, CBD, CBC, CBG. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε αρκετές μελέτες να έχει πραγματοποιηθεί λανθασμένη ποσοτικοποίηση των συγκεκριμένων αναλυτών, καθώς μετριέται το συνολικό ποσοστό των ουσιών που αποτελείται από την αποκαρβοξυλιωμένη ουσία και το αντίστοιχο οξύ (Bruci et al., 2012; Hewavitharana et al., 2005; Ross 2000, Stefanidou et al., 1998; Stefanidou et al., 1998; Gambaro et al., 2002). Για το λόγο αυτό η παραγωγοποίηση κρίνεται απαραίτητη για την αύξηση της σταθερότητας των αναλυτών και κυρίως των οξέων για τον προσδιορισμό με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας.

Για το στάδιο της παραγωγοποίησης των κανναβινοειδών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα αντιδραστήρια παραγωγοποίησης, όπως N,O-δισ (τριμεθυλοσιλυλ)-τριφθοροακεταμίδιο (N,O-bis (trimethylsilyl) -trifluoroacetamide, BSTFA) (Casiraghi et al., 2017; Ciolino et al., 2018a; Ibrahim et al., 2017) ή N-μεθυλ-N-(τριμεθυλοσιλυλ) τριφθοροακεταμίδιο (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, MSTFA) (Lachenmeier et al., 2004; Leghissa, 2016) από μόνα τους ή σε συνδυασμό αυτών με το τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (trimethylchlorosilane, TMCS) (Cardenia et al., 2018; Pellegrini et al., 2004; Leghissa, 2016). Αυτή η διαδικασία αποτελεί το κύριο μειονέκτημα της ανάλυσης με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας, ωστόσο οδηγεί σε μεγαλύτερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα και στην ταυτόχρονη ανίχνευση περισσότερων ενώσεων. Το στάδιο της παραγωγοποίησης παραλείπεται στην υγρή χρωματογραφία, καθώς δεν

αναπτύσσονται οι υψηλές θερμοκρασίες που καταστρέφουν τα οξέα αυτά, με αποτέλεσμα τον άμεσο προσδιορισμό τους.

Οι χρωματογραφικές στήλες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην αέρια χρωματογραφία είναι κυρίως στήλες όπου η στατική φάση έχει ως υλικό πλήρωσης 5% φαινυλ-μεθυλ-πολυσιλοξάνιο. Τέτοιες στήλες είναι κυρίως η HP-5MS (Bruci et al., 2012, Pias et al., 2005, Omar et al., 2013) αλλά και άλλες στήλες όπως οι στήλες Rxi-5MS (Ciolino et al., 2018a), Rtx-5MS (Cardenia et al., 2018), DB-5MS (Casiraghi et al., 2017) και HP5 (De Oliveira et al., 2008; Stefanidou et al., 1998; Stefanidou et al., 2000). Επίσης έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως και οι χρωματογραφικές στήλες στις οποίες η στατική φάση είναι 100% διμεθυλ-πολυσιλοξάνιο, όπως οι στήλες DB-1MS (Ibrahim et al., 2017; Mehmedic et al., 2010) και οι DB-1 (Hewavitharana et al., 2005; Ross et al., 2000). Στην υγρή χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί πλήθος διαφορετικών χρωματογραφικών στηλών, κυρίως στήλες C18.

Στην αέρια χρωματογραφία πάντοτε την κινητή φάση την αποτέλεσε ως φέρον αέριο το ήλιο, ενώ οι κινητές φάσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί στην υγρή χρωματογραφία αποτελούνται από διάφορα συστήματα διαλυτών, όπως μυρμηκικό οξύ σε νερό (Aizpurua-Olaizola et al., 2014), μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο (Citty et al., 2016), μυρμηκικό οξύ σε μεθανόλη (Aizpurua-Olaizola et al., 2014), μυρμηκικό αμμώνιο σε μεθανόλη και νερό (De Backer et al., 2009), μυρμηκικό αμμώνιο σε ακετονιτρίλιο (Mudge et al., 2017), μυρμηκικό οξύ και οξικό αμμώνιο σε μεθανόλη (Stolker et al., 2004), ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε ακετονιτρίλιο (Gambaro et al., 2002) κλπ. σε διάφορες αναλογίες.

Για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών ο αέριος χρωματογράφος συνδυάζεται με διάφορα είδη ανιχνευτών, κυρίως με φασματόμετρο μαζών (mass spectrometer, MS) (Cardenia et al., 2018; Bruci et al., 2012; Ciolino et al., 2018a; Pias et al., 2005; Omar et al., 2013; Pellegrini et al., 2004; Ross et al., 2000, Stefanidou et al., 1998) που συνήθως λειτουργεί με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron impact, EI). Ωστόσο, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι ανιχνευτές, όπως ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (FID) (Casiraghi et al., 2017; Hewavitharana et al., 2005; Gambaro et al., 2002; De Oliveira et al., 2008). Στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας, ο υγρός χρωματογράφος είναι συνδεδεμένος με διάφορους ανιχνευτές όπως φασματογράφο μαζών (MS) (Wang et al., 2017), συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS) (Pacifici et al., 2017; Stolker et al., 2004; Meng et

al., 2018; Aizpurua-Olaizola et al., 2014), ανιχνευτή υπεριώδους (ultraviolet, UV) (Ameur et al., 2013; Gambaro et al., 2002; Citty et al., 2016), συστοιχίας φωτοδιόδων (diode array, DAD) (Ameur et al., 2013; Mudge et al., 2017; De Backer et al., 2009) καθώς και προηγμένα συστήματα όπως αναλυτές μαζών τριπλού τετραπόλου - προσδιορισμού χρόνου πτήσης (quadruple time of flight, QTOF) (Aizpurua-Olaizola et al., 2014).

Οι δημοσιευμένες αναπτυχθείσες αναλυτικές μεθοδολογίες στη διεθνή επιστημονική βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών σε φυτά και άλλα προϊόντα κάνναβης με τη χρήση των τεχνικών της αέριας και υγρής χρωματογραφίας συνοψίζονται στους Πίνακες 2 και 3.

Πίνακας 2. Συνοπτική περιγραφή των δημοσιευμένων μεθόδων για τον προσδιορισμό κανναβινοειδών με τη χρήση GC

Βιβλιογραφία	Προσδιοριζόμενες ουσίες	Υλικό	Μέθοδος Εκχύλισης	Αντιδραστήριο Παραγωγολογίας	Στήλη	Ανιχνευτής	LOD/LOQ	Γραμμικότητα	Περιεκτικότητα
Cardenia et al., 2018	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, Δ ⁸ -THC, THCA, CBDA, CBGA, THCV,	Ακατέργαστη κάνναβη	MeOH/CHCl ₃ 9:1(v/v)	MET- TMS	Restek RTX 5 (10 m x 0.1 mm x 0.1 μm film thickness)	MS	LOQ(μg/ml) Δ ⁹ -THC:18.40 CBD: 6.63 CBN: 12.50 CBC: 8.91 CBG: 12.30 Δ ⁸ -THC:8.82 THCA:23.50 CBDA:23.2 CBGA:25.5 THCV:12.00	0.25 ng/mL- 25 mg/ml	CBD: 1.56g/100g CBDA: 5.19g/100g CBGA: 0.83g/100g
				MSTFA-TMCS					
Bruci et al., 2012	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	Διάφορα μέρη φυτού	Εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (60:40, v/v)	-	HP-5MS (30 m, 0.25 mm i.d, 0.25 μm film thickness)	MS	LOD: 0.005% (w/w)	0.01-20.0% (percentage of weight of dry plant material)	Δ ⁹ -THC: 0.081-12.13% CBD: 0.51-2.94% CBN: 0.02-1.12%
Casiraghi et al., 2017	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	Κατεργασμένη κάνναβη	MeOH	BSTFA	GC/MS Rxi@-5 ms (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)	MS, FID	LOQ: 0.10%	0.10 – 4 % (w/w)	Δ ⁹ -THC: 14.49% CBD: 1.45% CBN: 0.66% THCA: 4.11% CBDA: 2.01%
					GC/FID DB-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness)		LOD: 0.03%		
Ciolino et al., 2018a	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, Δ ⁸ -THC, THCA, CBDA, CBGA, CBDV, THCV	Εμπορικά προϊόντα κάνναβης	100% EtOH	BSTFA	Restek Rxi-35Sil (30m x 0.25 mm i.d x 0.25 μm film thickness)	MS	LOD: 1.0 μg/g	-	Δ ⁹ -THC: <0.4% CBD: <0.5% CBN: <0.2% THCA: <0.09% CBDA: <0.3%
			95% EtOH						
			83-91% Ακετονιτρίλιο						
Ilias et al., 2005	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	Ακατέργαστη κάνναβη	HS-SPME	-	HP-5MS (30m x 0.25 mm i.d x 0.25 μm film thickness)	MS	LOD: 1μg/g	-	-
Omar et al., 2013	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	Ακατέργαστη κάνναβη	Focused Ultrasound Extraction	-	HP-5MS (30 m × 0.25 mm x 0.25 μm film thickness)	MS	-	1-30 μg/ml	Δ ⁹ -THC: 4.5-324 mg/g CBD: 1-13 mg/g

			Supercritical Fluid Extraction						CBN: 1-13 mg/g
Pellegrini et al., 2005	Δ^9 -THC, CBD, CBN	Διατροφικά προϊόντα κάνναβης	Εξάνιο / ισοπροπανόλη (9:1 v/v)	MSTFA+ 2%TMCS	HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d x 0.25 μ m film thickness)	MS	LOQ: Δ^9 -THC: 1ng/ml ή ng/g CBD: 2 ng/ml ή ng/g CBN: 1 ng/ml ή ng/g	(ng/ml για τα υγρά δείγματα ή ng/g για τα στερεά δείγματα) Δ^9 -THC: 1–50 CBD: 2–50 CBN: 1–50	Δ^9 -THC: 5.7-350% CBD: 3.7-91.9% CBN: 2.4-159%
Hewavitharana et al., 2005	Δ^9 -THC	Φύλλα φυτού	Εξάνιο	-	DB-1 (20m x 0.2 μ m i.d. x 0.33 μ m film thickness)	MS FID	LOD: 0.2 ppm	0.2-40 ppm	0.02-0.6%
Ross et al., 2000	Δ^9 -THC	Σπόροι κάνναβης	1.CHCl ₃ /MeOH (99:1 v/v)	-	DB-1 (15m length x 0.25mm i.d. x 0.25 μ m film thickness)	MS	LOQ 0.1 μ g/ml	0.1-400 μ g/ml	Drug type: 35.6-124 μ g/g fiber type: 0-12 μ g/g
			MeOH Εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας (9:1 v/v)						
Stefanidou et al., 1998	Δ^9 -THC, CBD, CBN	Ακατέργαστη κάνναβη	Εξάνιο	-	HP-5 (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 μ m film thickness)	MS	-	-	Δ^9 -THC: 0.24-4.41% CBD: 0.005-5.98% CBN: 0.04-1.61%
Stefanidou et al., 2000	Δ^9 -THC	Ακατέργαστη κάνναβη	Εξάνιο	-	HP-5 (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness)	MS	-	-	Δ^9 -THC: 0.08-4.41%
Gambaro et al., 2002	Δ^9 -THC, CBD, CBN	Κατεργασμένη κάνναβη	MeOH	-	HP-5 (15 m x 0.32 mm i.d., 0.25 μ m film thickness)	FID	-	Δ^9 -THC: 0.05-0.5 mg/ml CBD: 0.05-0.5 mg/ml CBN: 0.02-0.2 mg/ml	LOQ (mg/ml) Δ^9 -THC: 0.034 CBD: 0.041 CBN: 0.02
Lachenmeier et al., 2004	Δ^9 -THC, CBD, CBN	Διατροφικά προϊόντα κάνναβης	HS-SPME	MSTFA	HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness)	MS	LOQ (mg/kg) Δ^9 -THC: 0.08-0.3 CBD: 0.32-0.35 CBN:0.07-0.43	0.1 - 4 mg/kg	Δ^9 -THC: 1.36-15.53 CBD: 0.11-62.59 CBN: 1.36-4.19
			Εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας						
Ibrahim et al., 2017	Δ^9 -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, THCA, CBDA, CBGA,	Διάφορα μέρη φυτού	ACN: MeOH (8:2 v/v)	BSTFA	DB-1MS 0.25 mm x 15 m (0.25 μ m film thickness)	FID	LOQ (μ g/ml) Δ^9 -THC: 0.43 CBD: 0.35	0.5-100 μ g/ml για τα 9 κανναβινοειδή	(%w/w) Δ^9 -THC: 0.018-0.660 CBD: 0.07-1.86

	THCV, Δ^8 -THC						CBN: 0.41 CBC: 0.46 CBG: 0.47 THCA: 0.56 CBDA: 0.43 CBGA: 0.34 THCV: 0.38 Δ^8 -THC: 0.43	CBGA: 1-100 $\mu\text{g/ml}$	CBN: 0.0005-0.0015 CBC: 0.01-0.14 CBG: 0.001-0.07 THCA: 0.02-750 CBDA: 0.57-2.75 CBGA: 0.012-0.056 Δ^8 -THC: 0.007-0.03
Leghissa Thesis 2016	Δ^9 -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, THCA, THCV, Δ^8 -THC,	Φυτό	-	BSTFA+1% TMCS	Restek Rxi-5ms (20 m x 0.18 mm i.d. x 0.18 μm df)	MS	LOD(ppm) Δ^9 -THC-BSTFA: 0.85 CBD: 0.01 CBN: 0.01 CBC: 0.01 CBG: 0.009 THCA-BSTFA: 3.8 THCA-MSTFA: 6 THCV: 0.02 Δ^8 -THC: 0.02 CBN: 0.01	(ppm) Δ^9 -THC-BSTFA: 5-320 CBD: 0.5-10 CBN: 0.5-10 CBC: 0.5-10 CBG: 1-20 THCA-BSTFA: 10-400 THCA-MSTFA: 10-320 THCV: 0.5-10 Δ^8 -THC: 0.5-10	-
				MSTFA					
Mehmedic et al., 2010	Δ^9 -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, THCV	Φυτό	MeOH:CHCl ₃ (9:1 v/v)	-	DB-1MS (15m x 0.25 mm x 0.25 μm film thickness)	FID	-	-	Δ^9 -THC: 0.2-31.3 CBD: 0.1-4.9 CBN: 0.0-7.7 CBC: 0.1-1.1 CBG: 0.0-1.2 THCV: 0.0-0.7
De Oliveira et al., 2008	Δ^9 -THC, CBD, CBN	Κατεργασμένη και ακατέργαστη κάνναβη	MeOH:CHCl ₃ (9:1 v/v)	-	HP-5 (30m x 0.32mm i.d., 0.25 μm film thickness)	FID	LOD: 0.03%	-	Δ^9 -THC: 0.10-5.51% CBD: <1.71% CBN: 0.12-1.91%

Πίνακας 3. Συνοπτική περιγραφή των δημοσιευμένων μεθόδων για τον προσδιορισμό κανναβινοειδών με τη χρήση LC

Βιβλιογραφία	Ουσίες	Υλικό	Μέθοδος εκχύλισης	Στήλη	Κινητή φάση	Ανιχνευτής	LOD/LOQ	Γραμμικότητα	Περιεκτικότητα
Aizpurua-Olaizola et al., 2014	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, CBG, THCA, THCv	Φυτό	Supercritical Fluid Extraction	Kinetex C18 (2.6 μm, 150 mm × 3 mm i.d.) with a guard column (0.5 μm depth filter × 0.1 mm)	Διαλύτης Α: Milli Q H ₂ O με 0.1% μυρμηκικό οξύ,	MS/MS	<u>LOD(ng/ml)</u> Δ ⁹ -THC:0.05 CBD: 0.2 CBN:0.05 CBG:0.02 THCA:0.2 THCV:0.05	Δ ⁹ -THC: 0.5- 5 μg/mL THCA: 2–50 μg/mL	Δ ⁹ -THC: 1.1-25 mg/g CBD: 0.67-14μg/g CBN: 2.4-470g/g CBG: 0.018-1.17mg/g THCA: 30-119mg/g THCV: 3.6-310μg/g
					Διαλύτης Β: MeOH με 0.1% μυρμηκικό οξύ	QTOF			
De Backer et al., 2009	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, CBG, THCA, CBDA, CBGA	Φυτό	MeOH: CHCl ₃ (9:1 v/v)	Waters XTerra® MS C18 (5 μm, 250 mm × 2.1 mm i.d.), protected by a Waters XTerra® MS C18 guard column (5μm, 10mm×2.1mm i.d.)	MeOH / H ₂ O με 50 mM of μυρμηκικό αμμώνιο	DAD	<u>LOQ (%)</u> Δ ⁹ -THC: 0.05 CBD: 0.075 CBN: 0.05 CBG: 0.15 THCA: 0.05 CBDA: 0.05 CBGA: 0.05	-	Δ ⁹ -THC: 0.1-4.05 % CBD: <0.1 % CBN: 0.06-0.033 % CBG: 0.16-0.28 % THCA: 0.09-22.92 % CBDA: <2.37 % CBGA: 0.10-2.58%
Citty et al., 2016	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA	Εκχυλίσματα φαρμακευτικής κάνναβης	olive oil and ethyl alcohol extracts	Poroshell 120 SB-C18, 2.1×100mm, 2.7μm	Διαλύτης Α: 0.1% μυρμηκικό οξύ σε H ₂ O	UV	-	0.50-50.0 ng	-
			Supercritical Fluid Extraction		Διαλύτης Β: 0.1% μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο(ACN)				
Gambaro et al., 2002	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	Κατεργασμένη κάνναβη	MeOH	Reversed phase (Lichrocart. C18 125-4mm,5μm) connected with a guard column (100RP18,5μm)	Ακετονιτρίλιο / ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 5.0, 65:35 (v/v)	UV	<u>LOQ (mg/ml)</u> Δ ⁹ -THC:0.044 CBD:0.014 CBN:0.018	Δ ⁹ -THC: 0.05–0.50 mg/ml CBD: 0.05–0.50 mg/ml CBN: 0.02-0.20 mg/ml	-
Mudge et al., 2017	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, THCA, CBDA, THCv	Ακατέργαστη κάνναβη	MeOH	Kinetex® C18, 1.7 μm, 100 × 3.0 mm i.d. column	Διαλύτης Α: 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο, pH 3,6	DAD	<u>LOQ (μg/ml)</u> Δ ⁹ -THC: 1 CBD: 1 CBN: 0.5 CBC: 0.5 CBG: 0.5 THCA: 5	(μg/ml) Δ ⁹ -THC: 1-50 CBD: 1-50 CBN: 0.5-25 CBC: 0.5-25 CBG: 0.5-25 THCA: 5-250	Δ ⁹ -THC: 0.03-3.31% (w/w) CBD: 0.22-1.43% (w/w) CBN: 0.02-0.15% (w/w) THCA: 0.11-14.9% (w/w) CBDA: 0.04-8.14% (w/w) CBG: 0.02-0.24% (w/w)
			MeOH: CHCl ₃ (9:1 v/v)		Διαλύτης Β: ακετονιτρίλιο				

							CBDA: 5 THCV: 0.5	CBDA: 5-250 THCV: 0.5-25	
Meng et al., 2018	Δ ⁹ -THC, CBD, THCA, CBDA	Διατροφικά προϊόντα κάνναβης	MeOH με 0.005% μυρμηκικό οξύ και 5% H ₂ O	C18 (4.6 x 100 mm, 3.5 μm particle size) with guard column	H ₂ O (0.1% μυρμηκικό οξύ): ακετονιτρίλιο (0.1% μυρμηκικό οξύ) (1:9 v/v)	MS/MS	LOQ: 0.195ng/ml για όλες τις ουσίες	0.195–50.0 ng/mL για όλες τις ουσίες	Δ ⁹ -THC: <337μg/g CBD: <8410μg/g THCA:<4.97μg/g CBDA:<51.80μg/g
Wang et al., 2017	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, THCA, CBDA, CBGA, THCV, Δ ⁸ -THC	Φυτό	ACN: MeOH (8:2 v/v)	Cortec UPLC C18 (100 mm × 2.1 mm I. D., 1.6 μm)	Διαλύτης A: 0.05% μυρμηκικό οξύ	MS	LOQ(μg/ml) Δ ⁹ -THC, CBC THCA, Δ ⁸ -THC: 0.5	(μg/ml) Δ ⁹ -THC, CBC THCA, Δ ⁸ -THC: 1-100	Δ ⁹ -THC: 0.33-11% CBD: 0.11-4% CBN: 0.017-7.3% THCA: 0.053-82% CBDA: 0.015-11% CBG: 0.013-0.6% CBGA: 0.018-1.4% THCV: 0.021-0.23% Δ ⁸ -THC: <0.11 CBC: 0.021-0.52%
					Διαλύτης B: ακετονιτρίλιο με 0.05% μυρμηκικό οξύ		CBD, CBN, CBG, CBDA, CBGA, THCV: 0.5	CBD, CBN, CBG, CBDA, CBGA, THCV: 0.5-100	
Pacifici et al., 2017	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, CBC, CBG, THCA, CBDA	Τσάι κάνναβης, έλαιο κάνναβης	MeOH: CHCl ₃ (9:1 v/v)	Acquity UPLC HSS C18 (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm)	Διαλύτης A: 0.1% μυρμηκικό οξύ σε H ₂ O	MS/MS	LOQ: 0.001 mg/mL	0.001-0.1 mg/ml	-
					Διαλύτης B: ακετονιτρίλιο				
Stolker et al., 2004	CBD, CBDA, CBN, Δ ⁹ -THC, THCA	Φυτό	MeOH: CHCl ₃ (9:1 v/v)	C18 LC, Hypersil BDS, 150 mm × 2.1 mm, 3 μm particles	Διαλύτης A: 10 mM οξικό αμμώνιο και 0.2% μυρμηκικό οξύ (v/v) σε MeOH	MS/MS	LOQ (g/kg) Δ ⁹ -THC: 0.28 CBD:0.1 CBN:0.03 THCA: 9.9 CBDA:0.03	-	Δ ⁹ -THC: 1.4-3.1g/kg CBN: 0.01-0.02g/kg THCA: 118-130g/kg CBDA: 0.3-0.4g/kg
					Διαλύτης B: 10mM οξικό αμμώνιο και 0.2% μυρμηκικό οξύ (v/v) σε H ₂ O				
Ameur et al., 2013	Δ ⁹ -THC	Κατεργασμένη κάνναβη	Cloud point extraction	BDS C18 (250×4.6 mm, particle size 5 μm)	CH ₃ CN: H ₂ O (83:17 v/v)	UV (DAD)	LOD: 0.04 μg/ml	0.05–200 μg/mL	-

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός της μεταπτυχιακής εργασίας

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών ήταν η εκτίμηση της σταθερότητας κανναβινοειδών στα προϊόντα της κάνναβης κατά την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για το σκοπό αυτό, απαραίτητη ήταν η ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση κατάλληλης αναλυτικής μεθοδολογίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των έξι κανναβινοειδών που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας σε δείγματα κάνναβης.

Στο Εγκληματολογικό Μουσείο του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας φυλάσσεται ένας μεγάλος αριθμός πεπαλαιωμένων δειγμάτων κάνναβης που χρονολογούνται από το 1918. Διατυπώθηκε το ερώτημα εάν τα δείγματα αυτά περιέχουν ακόμη ανιχνεύσιμη ποσότητα κανναβινοειδών. Το ερώτημα αυτό έγινε προσπάθεια να απαντηθεί, σε συνδυασμό και με τις λιγοστές δημοσιευμένες στη διεθνή βιβλιογραφία επιστημονικές εργασίες σχετικά με τη σταθερότητα των κανναβινοειδών κατά τη φύλαξή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αρχικά, κρίθηκε απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των έξι πιο σημαντικών κανναβινοειδών, της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης, της κανναβιδιόλης, της κανναβινόλης, του τετραϋδροκανναβινολικού οξέος, του κανναβιδιολικού οξέος και του κανναβιχρωμενικού οξέος. Στη συνέχεια, η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε στα πεπαλαιωμένα δείγματα κάνναβης, με τη χρήση της αναλυτικής τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS), η οποία αποτελεί μια αξιόπιστη και ευαίσθητη τεχνική. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με εκείνα που ελήφθησαν μετά την ανάλυση νεοτέρων δειγμάτων κάνναβης, τα οποία παραχωρήθηκαν από το Γενικό Χημείο του Κράτους.

Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μετά την ανάλυση των πεπαλαιωμένων και προσφάτων δειγμάτων στο πλαίσιο της μελέτης αυτής, συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα αντίστοιχων ήδη δημοσιευμένων μελετών. Απώτερος σκοπός ήταν η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη σταθερότητα των υπό μελέτη κανναβινοειδών με την πάροδο του χρόνου.

Επιπλέον στόχος της μελέτης αυτής ήταν να διερευνηθεί και να επιχειρήσει να προτείνει νέους αξιόπιστους δείκτες για την εκτίμηση της παλαιότητας των

δειγμάτων της κάνναβης, λαμβάνοντας υπόψιν τις περιεκτικότητες αλλά και τους λόγους των συγκεντρώσεων των προσδιορισθέντων κανναβινοειδών.

Κεφάλαιο 5. Οργανολογικός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός

5.1 Οργανολογικός εξοπλισμός

Για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των έξι κανναβινοειδών που αποτελούν αντικείμενο της παρούσης εργασίας (Δ^9 -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA, CBCA) σε πεπαλαιωμένα και νέα δείγματα προϊόντων κάνναβης έγινε χρήση αέριας χρωματογραφίας σε σύζευξη με τετραπολικό φασματόμετρο μαζών. Ο αέριος χρωματογράφος διαχωρίζει τις υπό ανάλυση ενώσεις με βάση τον χρόνο συγκράτησης στη χρωματογραφική στήλη. Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται είναι, το θερμαινόμενο σημείο εισαγωγής δείγματος, η τριχοειδής στήλη. Στο σημείο εισαγωγής του δείγματος αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες επιτρέπουν τη άμεση μετατροπή του δείγματος σε αέρια φάση. Η τριχοειδής στήλη βρίσκεται σε εσωτερικό θάλαμο του οργάνου (φούρνος) υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία. Μέσω υπολογιστή και με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας του θαλάμου ώστε να επιτυγχάνεται μέγιστη απόκριση στο όργανο αλλά και βέλτιστος διαχωρισμός των ουσιών του δείγματος σε μία ένωση. Η στατική φάση της στήλης αποτελείται συνήθως από πολυ(διμεθυλοσιλοξυ) πολυ-1,4-δις(διμεθυλοσιλοξυ)φαινυλο-σιλοξάνιο, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το αδρανές αέριο ήλιο, το οποίο μεταφέρει τους αναλύτες από το σημείο έγχυσης, μέσα στη στήλη και τέλος στον ανιχνευτή. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιείται αναλυτής μαζών, όπου γίνεται καταγραφή των θραυσμάτων (m/z), στα οποία διασπώνται οι ουσίες στην πηγή ιονισμού, μέσω πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI, electron impact ionization).

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη περιλαμβάνει τα παρακάτω:

1. Αέριο χρωματογράφο Agilent Technologies 6890N Network GC System
2. Φασματόμετρο μαζών Agilent Technologies 5975 inert XL Mass Selective Detector
3. Τετραπολικό αναλυτή μαζών
4. Αυτόματο δειγματολήπτη Agilent Technologies 7683B injector
5. Αντλία κενού Edwards
6. Χρωματογραφική στήλη DB-5MS, 30 m x 0.25 mm 0.25 μ m

7. Λογισμικό πρόγραμμα Chem Station

5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι ο παρακάτω:

1. Ατομικός αναδευτήρας περιδίνησης (Chiltren, Labinco)
2. Σύστημα εξάτμισης συνδεδεμένο με άζωτο (Reacti-Vap, PIERCE)
3. Φυγόκεντρος Heraus Labofuge 400R (ALRESA)
4. Αναλυτικός ζυγός (RAWWAG)
5. Συσκευή υπερήχων (J.P. Selecta)
6. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (5-50 μ L) (Thermo)
7. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (20-200 μ L) (Gilson)
8. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (100-1000 μ L) (Gilson)
9. Ρύγχη πιπετών (2-200 μ L)
10. Ρύγχη πιπετών (200-1000 μ L)
11. Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης
12. Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
13. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
14. Ογκομετρικοί κύλινδροι
15. Vials, 32 mm x 11.6 mm, 2 mL
16. Σιλιανοποιημένα glass inserts με επίπεδη βάση, 400 μ L

5.3 Διαλύτες και αντιδραστήρια

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα παρακάτω:

1. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC (Merck)
2. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC (Merck)
3. Εξάνιο καθαρότητας HPLC (Merck)
4. Οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας HPLC (Merck)
5. Ισοπροπανόλη καθαρότητας HPLC (Merck)
6. Χλωροφόρμιο καθαρότητας HPLC (Merck)
7. BSTFA (N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) με 1% TMCS (trimethylchlorosilane) (Sigma-Aldrich)

5.4 Δείγματα

Τα δείγματα κάνναβης που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε, ήταν πεπαλαιωμένα και νεότερα προϊόντα κάνναβης, κυρίως μαριχουάνα, αλλά και χασίς, σπόροι και φύλλα από δενδρύλλια κάνναβης. Τα πεπαλαιωμένα δείγματα προέρχονταν από το Μουσείο Εγκληματολογίας του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, ενώ τα νεότερα δείγματα διατέθηκαν από το Χημείο του Κράτους και αφορούσαν κατασχέσεις των αστυνομικών αρχών τα τελευταία 5 χρόνια. Τα δείγματα χρονολογούνται από το 1918 έως το 2019. Για τον έλεγχο της ειδικότητας και της εκλεκτικότητας κατά την επικύρωση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν επίσης τυφλά δείγματα καπνού διαφορετικής προέλευσης.

5.5 Πρότυπες ουσίες αναφοράς και διαλύματα παρακαταθήκης

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας χρησιμοποιήθηκαν υπό μορφή διαλυμάτων ή σκόνης, οι παρακάτω ουσίες ως αναλύτες αλλά και τα παρακάτω εσωτερικά πρότυπα:

1. Δ⁹-THC: διάλυμα 1.0 mg/ml σε μεθανόλη 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
2. CBD: 1 mg (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
3. CBN: 1 mg (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
4. THCA: διάλυμα 1.0 mg/mL σε ακετονιτρίλιο, (Προσφορά του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
5. CBDA: διάλυμα 1.0 mg/mL σε ακετονιτρίλιο, (Προσφορά του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
6. CBCA: διάλυμα 1.0 mg/mL σε ακετονιτρίλιο, (Προσφορά του Εργαστηρίου Φαρμακογνωσίας, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ)
7. Δ⁹-THC-d₃: 100 μg/ml σε μεθανόλη, 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
8. 11-nor-COOH-Δ⁹-THC-d₃: διάλυμα 1.0 mg/mL σε μεθανόλη (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)

Οι πρότυπες ουσίες αναφοράς και τα πρότυπα διαλύματα των ουσιών αναφοράς και του εσωτερικού προτύπου φυλάσσονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας ή του φορέα από όπου προμηθεύτηκαν και μέχρι την ημερομηνία λήξης που

αναφερόταν στο πιστοποιητικό τους. Για τα υπό μελέτη κανναβινοειδή που ήταν σε στερεή μορφή (CBD, CBN) παρασκευάστηκαν πυκνά πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης των ουσιών συγκέντρωσης 1.00 mg/mL σε μεθανόλη, διαλύοντας όλη την ποσότητα της κάθε ουσίας σε 1 mL μεθανόλη. Όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4⁰ C και έφεραν ετικέτες με την αναγραφή των στοιχείων τους και την ημερομηνία παρασκευής τους.

5.6 Μικτά διαλύματα εργασίας για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου

Κατά το στάδιο της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού, για τη διενέργεια των απαραίτητων δοκιμασιών για τον προσδιορισμό των βέλτιστων χρωματογραφικών συνθηκών της αναλυτικής τεχνικής, της βέλτιστης εκχύλισης αλλά και για την επικύρωση της μεθόδου παρασκευάστηκαν μικτά διαλύματα εργασίας σε ακετονιτρίλιο των έξι κανναβινοειδών, Δ⁹-THC, CBD, CBN, THCA, CBDA και CBCA σε διάφορες συγκεντρώσεις.

1. Το διάλυμα εργασίας Α συγκέντρωσης 20.0 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 20 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης της κάθε ουσίας συγκέντρωσης 1.0 mg/mL και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
2. Το διάλυμα εργασίας Β συγκέντρωσης 10.0 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 500 μL από το διάλυμα Α και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
3. Το διάλυμα εργασίας Γ συγκέντρωσης 4.0 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 200 μL από το διάλυμα Α και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
4. Το διάλυμα εργασίας Δ συγκέντρωσης 1.0 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 50 μL από το διάλυμα Α και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
5. Το διάλυμα εργασίας Ε συγκέντρωσης 0.4 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 400 μL από το διάλυμα Δ και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
6. Το διάλυμα εργασίας ΣΤ συγκέντρωσης 0.2 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 200 μL από το διάλυμα Δ και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.

7. Το διάλυμα εργασίας Z συγκέντρωσης 0.1 µg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 100 µL από το διάλυμα Δ και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
8. Το διάλυμα εργασίας Η συγκέντρωσης 0.04 µg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 400 µL από το διάλυμα Z και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
9. Το διάλυμα εργασίας Θ συγκέντρωσης 0.01 µg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 100 µL από το διάλυμα Z και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο, διάλυμα εργασίας Δ⁹-THC-d₃ συγκέντρωσης 1 µg/mL, το οποίο παρασκευάστηκε με την παραλαβή 10 µL από το διάλυμα παρακαταθήκης της Δ⁹-THC-d₃ συγκέντρωσης 100 µg/mL και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.

Τα διαλύματα εργασίας Α-Θ χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των αντίστοιχων πρότυπων δειγμάτων βαθμονόμησης (calibration samples, cal), λαμβάνοντας 50 µL από το καθένα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Παρασκευή πρότυπων δειγμάτων βαθμονόμησης

Διάλυμα εργασίας	Αναλύτης	Συγκέντρωση πρότυπου δείγματος βαθμονόμησης (ng/50µL)	Κωδικός δείγματος βαθμονόμησης	Συγκέντρωση πρότυπου δείγματος βαθμονόμησης (µg/mg φυτού)
Θ	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	0,5	Cal 1	0,005
				Η
Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	2	Cal 3	0,02	
Z	THCA, CBDA, CBCA		5	Cal 3
	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	5	Cal 4	
ΣΤ	THCA, CBDA, CBCA	10		Cal 4
	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	10	Cal 5	
E	THCA, CBDA, CBCA	20		Cal 5
	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	20	0,2	

Δ	THCA, CBDA, CBCA	50	Cal 6	0,5
	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	50		0,5
Γ	THCA, CBDA, CBCA	200	Cal 7	2
	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	200		2
Β	THCA, CBDA, CBCA	500	Cal 8	5
	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	500		5
Α	THCA, CBDA, CBCA	1000	Cal 9	10
	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	1000		10

Για την παρασκευή των πρότυπων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (quality control, QC) χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μικτά διαλύματα εργασίας από εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα βαθμονόμησης.

1. Το διάλυμα Α' συγκέντρωσης 16 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 16 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης της κάθε ουσίας συγκέντρωσης 1.0 mg/mL και αραιώση με ακετονιτρίλιο μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
2. Το διάλυμα Β' συγκέντρωσης 1,2 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 75 μL από το διάλυμα Α' και προσθήκη ακετονιτρίλιου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
3. Το διάλυμα Γ' συγκέντρωσης 0,12 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 100 μL από το διάλυμα Β' και προσθήκη ακετονιτρίλιου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
4. Το διάλυμα Δ' συγκέντρωσης 0,03 μg/mL παρασκευάστηκε με την παραλαβή 25 μL από το διάλυμα Β' και προσθήκη ακετονιτρίλιου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.

Η παρασκευή των προτύπων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας γινόταν με την παραλαβή 50 μL από τα διαλύματα εργασίας Α', Β', Γ', Δ' και οι συγκεντρώσεις φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5. Παρασκευή πρότυπων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας

Διαλύματα εργασίας για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας	Αναλύτης	Συγκέντρωση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (ng/50μL)	Κωδικός δείγματος ελέγχου ποιότητας	Συγκέντρωση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (μg/mg φυτού)
Δ'	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	1,5	QC ₁	0,015
Γ'	THCA, CBDA, CBCA	6		0,06
Β'	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA, CBCA	100	QC ₂	1
Α'	Δ ⁹ -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA, CBCA	800	QC ₃	8

Κατά το στάδιο της επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού των κανναβινοειδών που μελετήθηκαν, ελέγχθηκε η ειδικότητα της μεθόδου και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εργασίας μίγματος ουσιών, που μπορούσαν εν δυνάμει να συνυπάρχουν ως ρυπαντές με τις υπό μελέτη ουσίες στο δείγμα. Το διάλυμα αυτό περιείχε τις ουσίες διαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, λοραζεπάμη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, σετραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, MDA, MBDB, MDEA, κεταμίνη, βουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και ECME (μεθυλεστέρας της εκγονίνης) σε συγκέντρωση 10.0 μg/mL σε μεθανόλη. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε με την λήψη 10μL από τα δείγματα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1 mg/mL για την κάθε ουσία και με την προσθήκη μεθανόλης μέχρι όγκου 1 mL.

5.9 Διαλύτες και μίγματα διαλυτών εκχύλισης

Οι διαλύτες και τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για το στάδιο της βελτιστοποίησης της εκχύλισης της υπό ανάπτυξης μεθόδου προσδιορισμού των 6 κανναβινοειδών, φαίνονται παρακάτω:

- Εξάνιο
- Εξάνιο: Ισοπροπανόλη (9:1, v/v)
- Εξάνιο: Οξικός αιθυλεστέρας (6:4, v/v)

- Μεθανόλη: Χλωροφόρμιο (9:1, v/v)
- Μεθανόλη
- Ακετονιτρίλιο

Τα μίγματα των διαλυτών εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμασίες της εκχύλισης, παρασκευάζονταν την ημέρα της εκχύλισης και σε ποσότητες τέτοιες ώστε να επαρκούν για όλες τις δοκιμασίες εκχύλισης. Επειδή οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό ήταν τοξικοί, η παρασκευή των μιγμάτων γινόταν εντός απαγωγού.

Κεφάλαιο 6. Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου για τον προσδιορισμό των 6 κανναβινοειδών, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση των παραμέτρων της μεθόδου ώστε να ληφθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα που αξιολογήθηκαν με βάση τη μέγιστη απόκριση του ανιχνευτή. Η τεχνική βελτιστοποίησης που ακολουθήθηκε ήταν μονοπαραμετρική, δηλαδή έλαβε χώρα με διαδοχική μεταβολή μίας παραμέτρου τη φορά, και διατήρηση των υπολοίπων παραμέτρων, σταθερών (single-factor-at-a-time sequential optimization).

6.1 Εσωτερικό πρότυπο

Στην διαδικασία ανάπτυξης και βελτιστοποίησης μίας μεθόδου προσδιορισμού μίας ή περισσότερων ουσιών, περιλαμβάνεται και η επιλογή του καταλληλότερου εσωτερικού προτύπου για την πορεία της ανάλυσης. Το εσωτερικό πρότυπο είναι μία ουσία η οποία προστίθεται στο δείγμα μαζί με τους αναλύτες προκειμένου να διορθωθούν οι διακυμάνσεις που μπορεί να προκύψουν στα διάφορα στάδια της ανάλυσης των δειγμάτων. Το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να έχει τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τους αναλύτες, την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά με αυτούς καθώς και να διαχωρίζεται ικανοποιητικά από τις άλλες ουσίες στο χρωματογράφημα ώστε να μην παρατηρείται συνέκλουση καθώς επίσης παρόμοια συμπεριφορά με τους αναλύτες και κατά το στάδιο προκατεργασίας των δειγμάτων. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών, δοκιμάστηκαν ως εσωτερικά πρότυπα η δευτεριωμένη Δ^9 -THC (Δ^9 -THC-d₃) και το δευτεριωμένο οξύ 11-nor-COOH- Δ^9 -THC (11-nor-COOH- Δ^9 -THC-d₃). Γενικά, τα δευτεριωμένα παράγωγα των αναλυτών αποτελούν εσωτερικά πρότυπα επιλογής των μεθόδων προσδιορισμού των αντίστοιχων ουσιών, αφού διαφέρουν μόνο ως προς το μοριακό βάρος με την υπό προσδιορισμό ουσία και παρουσιάζουν την ίδια χημική συμπεριφορά με αυτή, διευκολύνοντας τη χρωματογραφική τους ανάλυση. Το 11-nor-COOH- Δ^9 -THC-d₃ απορρίφθηκε ως εσωτερικό πρότυπο καθώς η παραγωγοποίηση του μορίου της συχνά ήταν ατελής και ακολουθούσε διαφορετική συμπεριφορά από τους άλλους αναλύτες. Αντίθετα, η Δ^9 -THC-d₃, εμφάνισε ίδια χημική συμπεριφορά με την Δ^9 -THC και ακολουθούσε ικανοποιητικά και τις υπόλοιπες προσδιοριζόμενες ουσίες, ενώ η παραγωγοποίησή της ήταν πλήρης. Ως εκ

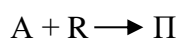
τούτου ως εσωτερικό πρότυπο για τη συνέχιση της μελέτης επιλέχθηκε η Δ^9 -THC- d_3 με την προσθήκη σε κάθε δείγμα 50 μ L από διάλυμα συγκέντρωσης 1 μ g/mL.

6.2 Παραγωγοποίηση

Αρχικά, κατά το στάδιο βελτιστοποίησης της μεθόδου, συγκεκριμένος όγκος (5 μ L) από τα πρότυπα διαλύματα της κάθε ουσίας (συγκέντρωσης 1 μ g/mL) ενέθηκε στον αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών, προκειμένου να καταγραφούν τα φάσματα μαζών των υπό εξέταση 6 ουσιών. Τα φάσματα αυτά ελήφθησαν με την τεχνική της πλήρους σάρωσης ιόντων (SCAN) στην περιοχή μαζών 50 m/z – 500 m/z . Από την επεξεργασία των φασμάτων πλήρους σάρωσης ελήφθησαν οι χρόνοι ανίχνευσης καθώς και τα σημαντικότερα θραύσματα για την κάθε ουσία. Για τα κανναβινοειδή τα οποία στο μόριο τους δεν διαθέτουν καρβοξύλιο, όπως η Δ^9 -THC, η CBD και η CBN, η χρωματογραφική ανάλυση παρουσίαζε ικανοποιητική ευαισθησία. Τα μελετούμενα κανναβινοειδή όμως που περιέχουν ως λειτουργική ομάδα μια καρβοξυλομάδα, τα THCA, CBDA και CBCA, δεν ήταν ανιχνεύσιμα, και λόγω της καρβοξυλομάδας που οδηγεί σε κακή χρωματογραφική συμπεριφορά, αλλά και διότι στο σημείο εισαγωγής του δείγματος αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες οδηγούν στην μερική αποκαρβοξυλίωση των οξέων προς τα αντίστοιχα μη καρβοξυλιωμένα παράγωγα. Ως εκ τούτου αντί των οξέων, THCA, CBDA και CBCA, ανιχνεύθηκαν οι αντίστοιχες ουδέτερες μορφές Δ^9 -THC, CBD και CBC αντίστοιχα.

Για το λόγο αυτό, για την ανάλυση των υπό εξέταση ενώσεων που δεν μπορούν να αναλυθούν στη μορφή οξέος που βρίσκονται, για τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς όλων των αναλυτών που διαθέτουν λειτουργικές ομάδες και κυρίως αυτών που διαθέτουν καρβοξυλομάδες, καθώς επίσης και την αύξηση της πτητικότητας των ουσιών αυτών κάτι που οδηγεί σε αισθητά αυξημένη ευαισθησία των μεθόδων, κρίθηκε απαραίτητο να προηγηθεί το στάδιο της παραγωγοποίησης, προκειμένου να βελτιωθεί η χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών.

Κατά την αντίδραση παραγωγοποίησης ο αναλύτης (A) και το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης (R) αντιδρούν προς σχηματισμό ενός προϊόντος (Π), με καλύτερη χρωματογραφική συμπεριφορά από το αρχικό.

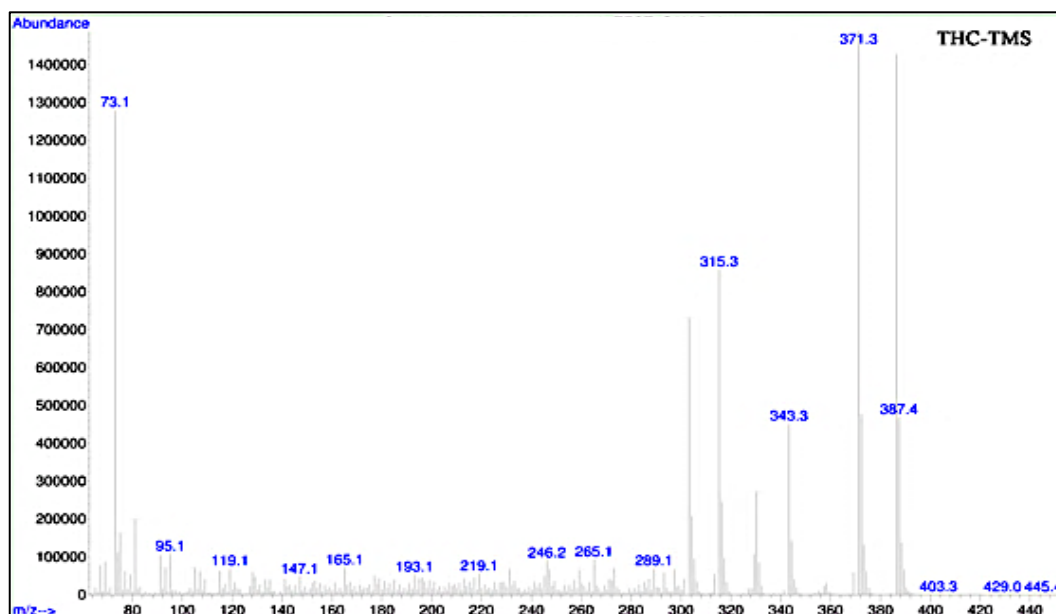


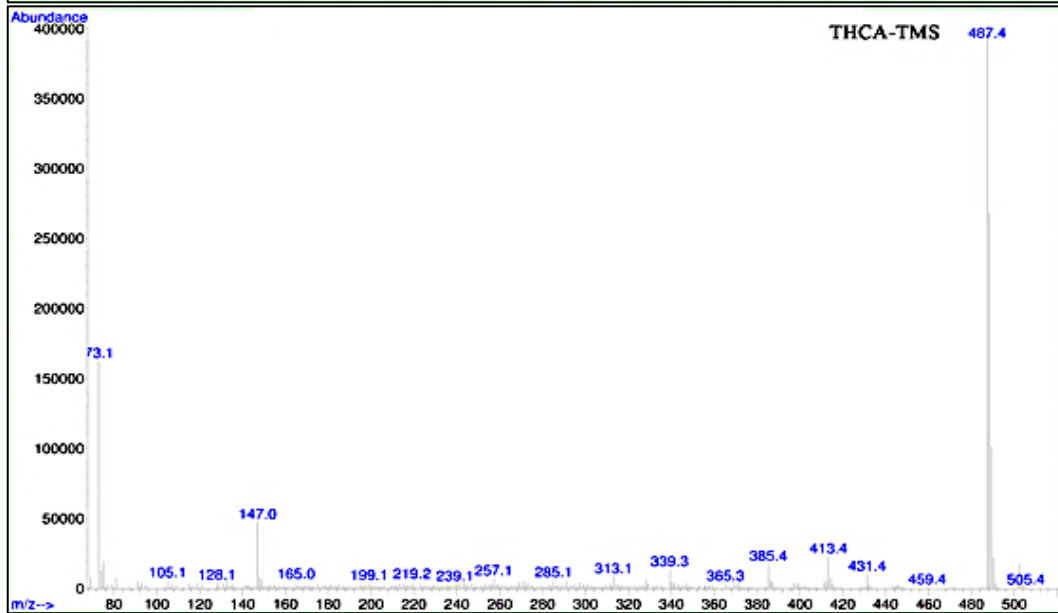
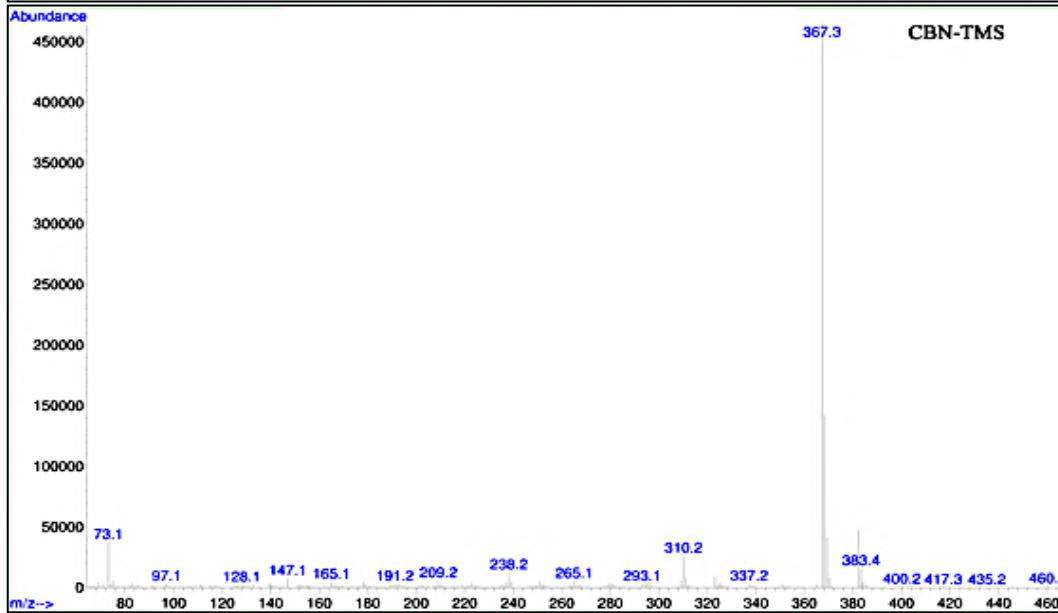
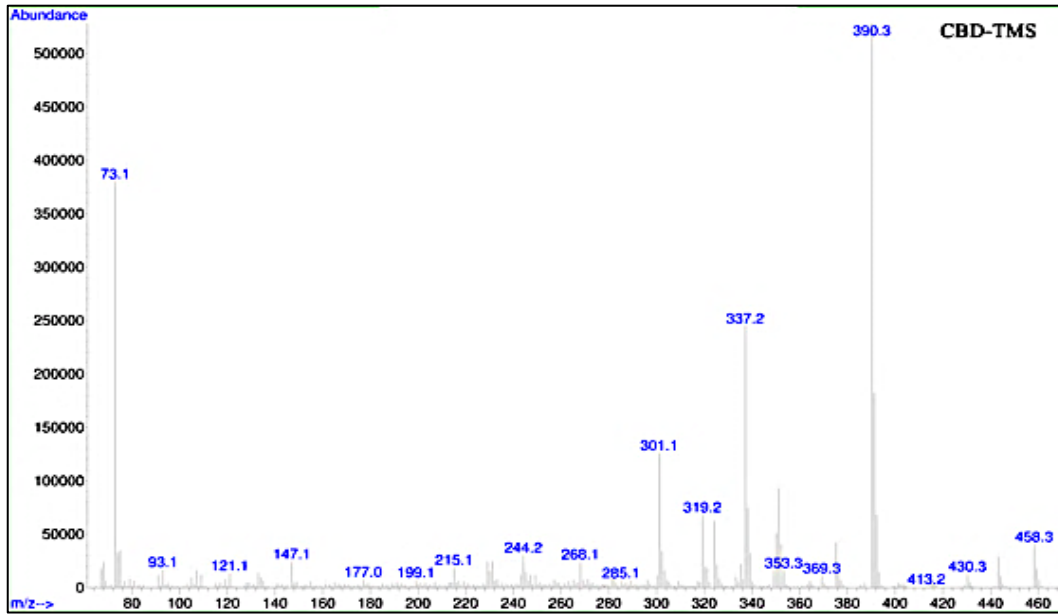
Η παραγωγοποίηση προκαλεί αλλαγές στη δομή και στο μοριακό βάρος της ουσίας και ως εκ τούτου αλλαγή στη θραυσματοποίησή της στο GC/MS.

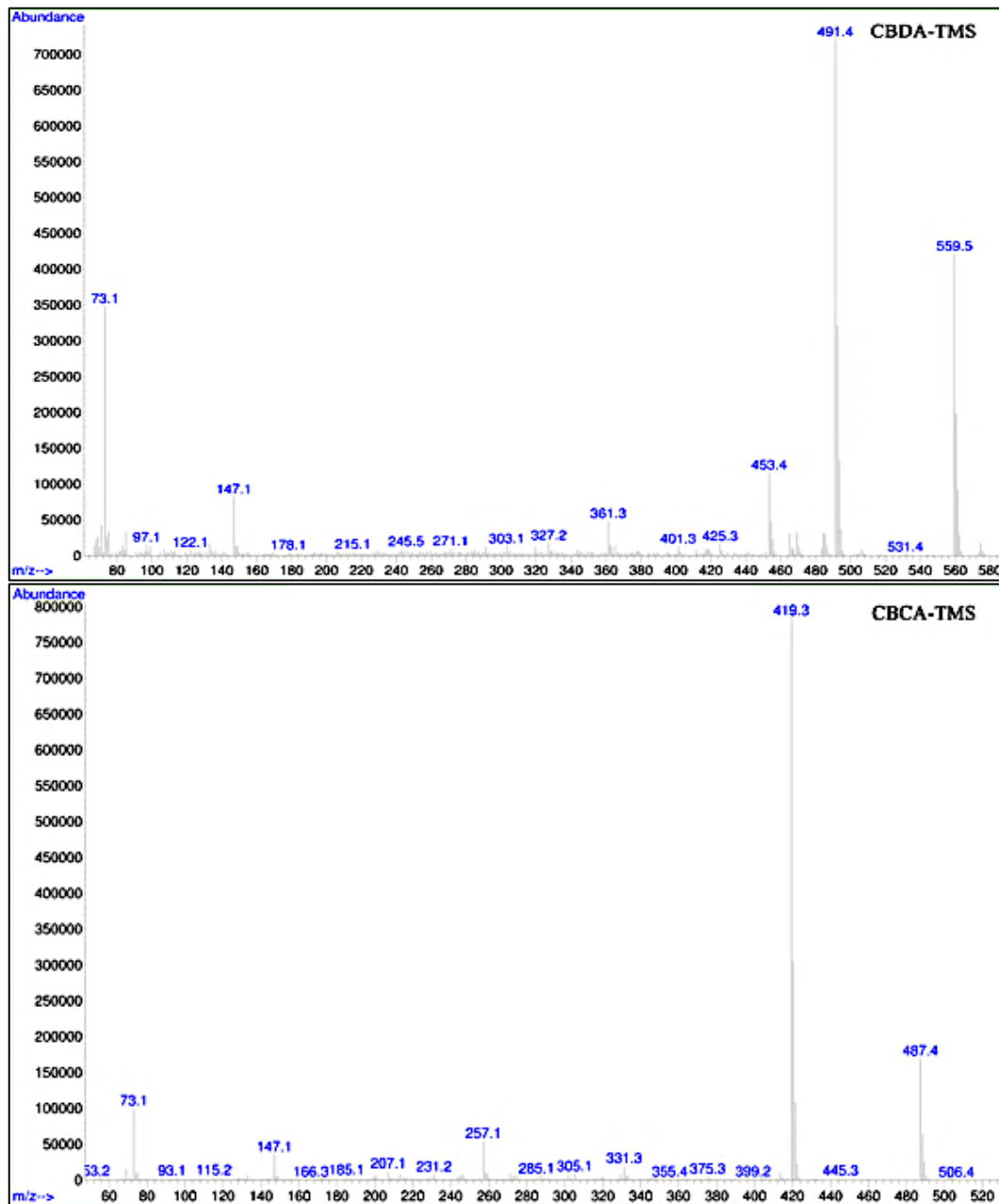
Η παραγωγοποίηση στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης το BSTFA με 1% TMCS και αρχικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη:

1. Παραλαβή 5 μL από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης (1 mg/mL) της κάθε ουσίας.
2. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνησης (vortex) για 15 sec.
3. Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα N_2 .
4. Παραγωγοποίηση με προσθήκη 50 μL ακετονιτριλίου και 50 μL αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης BSTFA με 1% TMCS.
5. Μεταφορά σε αμμόλουτρο σε θερμοκρασία 70°C για χρόνο 30 min.
6. Στη συνέχεια παραμονή για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να γίνει ψύξη και συμπύκνωση του διαλύματος.
7. Μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
8. Τοποθέτηση στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1 μL στο φασματοόμετρο μαζών.

Στη συνέχεια, αφού οι πρότυπες ουσίες παραγωγοποιήθηκαν και ενέθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα με τη μέθοδο πλήρους σάρωσης, ελήφθησαν τα φάσματα μαζών των παραγωγοποιημένων πλέον ουσιών. Τα φάσματα των 6 κανναβινοειδών δίνονται στο Σχήμα 5.







Σχήμα 5. Φάσματα μαζών των παραγωγοποιημένων υπό μελέτη κανναβινοειδών

Από αυτά ελήφθησαν τα τρία σημαντικότερα θραύσματα για την κάθε ουσία, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία της μεθόδου παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (SIM), η οποία και χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Επιλεγμένα θραύσματα (m/z) των αναλυτών καθώς και οι χρόνοι ανάλυσης τους.

Αναλύτης	Θραύσμα ποσοτικοποίησης	Υπόλοιπα θραύσματα	Χρόνος ανάλυσης (R _t , min)
CBD	390	337, 301	7,854
Δ⁹-THC	371	386, 303	8,450
CBN	367	382, 310	8,820
CBDA	491	559, 453	8,913
THCA	487	502, 413	9,604
CBCA	419	257, 502	9,639
THC-d₃	374	389, 306	8,44

6.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Οι χρωματογραφικές συνθήκες που επηρεάζουν την ανάλυση των ουσιών με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας είναι η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης, η ροή του φέροντος αερίου και κυρίως το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης ρυθμίζεται από το λογισμικό στον υπολογιστή και ελέγχει παραμέτρους όπως η αρχική θερμοκρασία, η ενδιάμεση και η τελική θερμοκρασία καθώς και ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας της στήλης.

Μετά τη δοκιμή διαφόρων θερμοκρασιακών προγραμμάτων, για τον καλύτερο διαχωρισμό των υπό μελέτη ουσιών, καθώς και για τη μείωση του χρόνου ανάλυσης, επιλέχθηκαν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, οι οποίες και παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη κανναβινοειδών.

Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	280 °C
Αρχική θερμοκρασία στήλης	120 °C (παραμονή 0 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας	20 °C /min
Τελική θερμοκρασία στήλης	300 °C (παραμονή 4 min)
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	1.0 mL/min
Θερμοκρασία ανιχνευτή	280 °C
Θερμοκρασία πηγής ιονισμού	230 °C

6.4 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης

Το πρώτο στάδιο στην πορεία ανάλυσης των κανναβινοειδών περιλάμβανε την εκχύλισή τους από το φυτό της κάνναβης. Για το σκοπό αυτό στη διεθνή βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση πολλών οργανικών διαλυτών ή μίγματα αυτών, όπως αναφέρεται στους Πίνακες 1 και 2.

Για την επιλογή του βέλτιστου συστήματος διαλυτών, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες εκχύλισης φύλλων κάνναβης με τη χρησιμοποίηση διαφορετικών διαλυτών ή μιγμάτων διαλυτών εκχύλισης, προκειμένου να προσδιοριστεί ο διαλύτης εκείνος ή το σύστημα διαλυτών που δίνει τις βέλτιστες τιμές ανάκτησης για τις ουσίες. Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση, οι διαλύτες και τα μίγματα διαλυτών που δοκιμάστηκαν είναι τα εξής:

1. εξάνιο
2. εξάνιο : ισοπροπανόλη (9:1 v/v)
3. εξάνιο : οξικός αιθυλεστέρας (6:4 v/v)
4. μεθανόλη:χλωροφόρμιο (9:1 v/v)
5. μεθανόλη
6. ακετονιτρίλιο

Κάθε διαλύτης ή σύστημα διαλυτών δοκιμάστηκε εις τριπλούν σε δείγματα των ίδιων φύλλων κάνναβης και τα στάδια εκχύλισης που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

1. Κονιοποίηση φύλλων κάνναβης σε ποσότητα ώστε να επαρκεί για το σύνολο των 18 δειγμάτων.
2. Ζύγιση 10 mg ανά δείγμα και τοποθέτηση του δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Προσθήκη 5 mL διαλύτη ή μίγματος διαλυτών και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνησης για 1 min.
4. Εφαρμογή λουτρού υπερήχων (ultrasonic bath) για 30 min.
5. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.
6. Παραλαβή 50 μ L από την υπερκείμενη στοιβάδα και μεταφορά του σε εσυρρισμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
7. Προσθήκη 50 μ L εσωτερικού προτύπου.
8. Εξάτμιση υπό ρεύμα N_2 μέχρι ξηρού και στην συνέχεια παραμονή για 5 min υπό ρεύμα N_2 στους $40^{\circ}C$.

9. Παραγωγοποίηση με προσθήκη 50 μL ακετονιτρίλιου και 50 μL BSTFA με 1% TMCS στους 70 $^{\circ}\text{C}$ για 30 min.
10. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min προκειμένου να γίνει ψύξη και συμπύκνωση των δειγμάτων.
11. Μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια (vials) που περιέχουν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
12. Τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση 1 μL στο χρωματογραφικό σύστημα
13. Λήψη χρωματογραφήματων και αξιολόγηση αποτελεσμάτων.

Από τα χρωματογραφήματα υπολογίστηκε ο λόγος της επιφάνειας της κορυφής του κάθε αναλύτη προς την επιφάνεια κορυφής του εσωτερικού προτύπου ($AUC_{\text{analyte}}/AUC_{\text{I.S.}}$) και έγινε σύγκριση των λόγων αυτών ανάμεσα στους διάφορους διαλύτες και τα μίγματα διαλυτών. Για την κάθε ουσία, ο μεγαλύτερος λόγος, που συνεπάγεται ότι στην περίπτωση αυτή ο διαλύτης ή το μίγμα διαλυτών εκχυλίζει τη μεγαλύτερη ποσότητα ουσίας, θεωρήθηκε ως 1 και στη συνέχεια υπολογίστηκε αναλογικά το ποσοστό της κάθε ουσίας συγκριτικά με το βέλτιστο που εκχυλίζεται από τους άλλους διαλύτες (Πίνακας 8).

Τα δείγματα εντός του διαλύτη εκχύλισής τους αποθηκεύτηκαν επίσης στους 4 $^{\circ}$ C, με σκοπό την ανάλυσή τους μετά από 24 ώρες. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μετά τις 24 ώρες εκχύλισης δεν διέφεραν ιδιαίτερα από τα αποτελέσματα της πρώτης μέρας ανάλυσης, επομένως δεν κρίθηκε απαραίτητη η αύξηση του χρόνου εκχύλισης.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα δοκιμασίας εκχύλισης με τη χρήση διαφόρων διαλυτών και μιγμάτων διαλυτών

Διαλύτες/Μίγματα διαλυτών	Δ^9 -THC	CBD	CBN	THCA	CBDA	CBCA
Εξάνιο	0,97	0,89	0,83	0,67	0,58	0,55
Εξάνιο:Ισοπροπανόλη	0,87	0,84	0,86	0,86	0,84	0,82
Εξάνιο:Οξικός αιθυλεστέρας	1	1	1	1	1	1
Μεθανόλη:Χλωροφόρμιο	0,89	0,87	0,87	0,93	0,97	0,94
Μεθανόλη	0,77	0,75	0,77	0,84	0,88	0,83
Ακετονιτρίλιο	0,83	0,88	0,86	0,65	0,84	0,63

Η επιλογή του βέλτιστου διαλύτη ή μίγματος διαλυτών έγινε με βάση το μεγαλύτερο ποσοστό ανάκτησης των συστατικών από το δείγμα κάνναβης.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα συμπεραίνονται τα εξής:

- Η χρήση της μεθανόλης ως διαλύτη απορρίφθηκε καθώς οδηγούσε σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό ανάκτησης των συστατικών CBD, Δ⁹-THC και CBN σε σχέση με τα άλλα συστήματα διαλυτών που εξετάστηκαν.
- Το μίγμα εξάνιο: ισοπροπανόλη και το ακετονιτρίλιο έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα αλλά χαμηλότερα σε σχέση με άλλους διαλύτες.
- Το εξάνιο εκχύλιζε σε καλό ποσοστό τις Δ⁹-THC, CBD και CBN αλλά σε χαμηλό ποσοστό τα οξέα THCA, CBDA και CBCA.
- Το μίγμα μεθανόλης: χλωροφορμίου εκχύλιζε σε καλό ποσοστό και τα οξέα αλλά λόγω τόσο της τοξικής δράσης του χλωροφορμίου, όσο και του γεγονότος ότι έδινε χαμηλότερο ποσοστό ανάκτησης σε σχέση με το μίγμα εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας, δεν χρησιμοποιήθηκε.
- Το μίγμα εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης για το σύνολο των 6 κανναβινοειδών, επομένως ήταν αυτό που επιλέχθηκε ως σύστημα εκχύλισης για τα επόμενα πειράματα.

6.5 Τελική μέθοδος για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών

Η τελική μέθοδος προσδιορισμού των κανναβινοειδών σε δείγματα κάνναβης που αναπτύχθηκε περιλάμβανε:

1. Ζύγιση 10 mg δείγματος κάνναβης και τοποθέτηση σε απλό δοκιμαστικό σωλήνα.
2. Προσθήκη 5 mL του μίγματος διαλυτών Εξάνιο: Οξικός αιθυλεστέρας, 6:4 v/v και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνησης για 1 min.
3. Παραμονή σε λουτρό υπερήχων για 30 min.
4. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.
5. Παραλαβή 50 μL από το υπερκείμενο του εκχυλισμένου δείγματος και μεταφορά σε εσφυρισμένο δοκιμαστικό σωλήνα.
6. Προσθήκη 50 μL εσωτερικού προτύπου Δ⁹-THC-d₃ συγκέντρωσης 1 μg/mL και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνησης για 1 min.
7. Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα αζώτου στους 40⁰ C.

8. Παραγωγοποίηση με την προσθήκη 50 μL ακετονιτριλίου και 50 μL BSTFA με 1% TMCS στους 70⁰ C για 30 min.
9. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει ψύξη και συμπύκνωση του δείγματος για 15 min.
10. Μεταφορά σε φιαλίδια που περιείχαν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts).
11. Τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση όγκου 1 μL στο χρωματογραφικό σύστημα GC-MS.

Κεφάλαιο 7. Πρωτόκολλο επικύρωσης της μεθόδου για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών σε δείγματα προϊόντων κάνναβης

Η επικύρωση (validation) των μεθόδων προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών σε δείγματα κάνναβης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Food and Drug Administration) [FDA, 2001], της Ευρωπαϊκής Ένωσης [Ευρωπαϊκή Οδηγία, 2002], του ICH (International Conference on Harmonization) [ICH, 2005] και της EURACHEM [Eurachem, 2014]. Το πρωτόκολλο επικύρωσης περιλάμβανε τη μελέτη της εκλεκτικότητας (selectivity), της ειδικότητας (specificity) και της γραμμικότητας (linearity), τον προσδιορισμό των κατώτατων ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ), τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας (intraday precision) και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (interday precision), καθώς και της ορθότητας εντός της ημέρας (intraday accuracy) και δια των ημερών (interday accuracy).

7.1 Εκλεκτικότητα

Η μελέτη της εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι διαφορετικών δειγμάτων καπνού και τον έλεγχο των χρωματογραφημάτων, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από άλλα συστατικά στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων.

7.2 Ειδικότητα

Η μελέτη της ειδικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι δειγμάτων καπνού τα οποία είχαν εμβολιαστεί με 50 μL από μίγμα διαλύματος εργασίας 31 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από τις ουσίες αυτές στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων. Το εν λόγω διάλυμα εργασίας περιείχε εξαρτησιογόνες ουσίες και φάρμακα του κεντρικού νευρικού συστήματος που μπορεί να συνυπάρχουν ως ρυπαντές στα υπό εξέταση δείγματα. Οι ουσίες που περιέχονταν στο διάλυμα ήταν οι παρακάτω: διαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, λοραζεπάμη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, σεφτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαζίνη, μιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, MDA, MBDB, MDEA, κεταμίνη, βουπρενορφίνη,

μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και ECME.

7.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως κατώτατο όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης θεωρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη που είχε απόκριση μεγαλύτερη από το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος τουλάχιστον κατά τρεις (LOD, S/N > 3:1) και δέκα φορές (LOQ, S/N > 10:1), αντίστοιχα.

7.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων βαθμονόμησης σε 5 διαφορετικές ημέρες. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης που επελέγησαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Τα δείγματα βαθμονόμησης ήταν 9 για τις Δ⁹-THC, CBD και CBN και 8 για τις THCA, CBDA και CBCA. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και με συντελεστή βαρύτητας $1/x^2$, και ήταν της μορφής $y=ax+b$ όπου το x αντιστοιχεί στην τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού, ενώ το y αντιστοιχεί στο λόγο της απόκρισης (εμβαδό κορυφής) του αναλύτη προς την απόκριση του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου. Στο πλαίσιο της μελέτης της γραμμικότητας της μεθόδου υπολογίστηκε το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης (R^2) για κάθε εξίσωση παλινδρόμησης για το σύνολο των ημερών και έπρεπε να ισχύει ότι $R^2 \geq 0.98$.

7.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Τα δείγματα βαθμονόμησης κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν εφαρμόζοντας την αναπτυχθείσα μέθοδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπό μελέτη κανναβινοειδών σε δείγματα προϊόντων κάνναβης και χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των αντίστοιχων διαγραμμάτων βαθμονόμησης. Στη συνέχεια, έγιναν επαναποσοτικοποιήσεις των βαθμονομητών με την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων για την κάθε ημέρα και υπολογίστηκε το σχετικό σφάλμα (% Er) των τιμών αυτών, σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\%E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

όπου x είναι η τιμή της συγκέντρωσης που υπολογίστηκε κατά την επαναποσοτικοποίηση και μ η αντίστοιχη αναμενόμενη συγκέντρωση. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, τα αποδεκτά όρια αποκλίσεων από τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις έπρεπε να ήταν έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα και έως $\pm 20\%$ για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης.

7.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα (εντός της ημέρας, intraday precision) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (δια των ημερών, interday precision) ελέγχθησαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC). Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα χαμηλό, το QC₁ (συγκέντρωσης τριπλάσιας του πρώτου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης), ένα μεσαίο, το QC₂ (συγκέντρωσης περίπου στο μέσο του δυναμικού εύρους του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) και ένα υψηλό, το QC₃ (συγκέντρωσης ίσης με το 80% της συγκέντρωσης του τελευταίου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC) που επιλέχθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 5. Αναλύθηκαν έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σε κάθε μία από τις πέντε ημέρες ανάλυσης (συνολικά 30 δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο) σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας και στη συνέχεια υπολογίζονταν η μέση τιμή της συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα αποτελούν μέτρο του τυχαίου σφάλματος των μεθόδων και εκτιμήθηκαν από το ποσοστό % της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 5 διαφορετικές ημέρες, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο.

$$\% RSD = \frac{SD}{x} * 100$$

όπου \bar{x} η μέση τιμή των συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας και SD είναι η τυπική απόκλισή τους.

Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές της % RSD, που εκφράζουν την επαναληψιμότητα και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων έως $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας.

Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, που εκφράζει τη μεταξύ των ημερών επαναληψιμότητα των μεθόδων, εκτιμήθηκε και από το % ποσοστό της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης, που ελήφθησαν σε 5 διαφορετικές ημέρες ανάλυσης.

7.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας της κάθε ημέρας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης και υπολογιζόταν η μέση τιμή των μετρήσεων για τα έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης. Η ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών, αποτελεί μέτρο του συστηματικού σφάλματος μίας μεθόδου και εκτιμήθηκε από το % σχετικό σφάλμα (% Er), που υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\%E_r = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100$$

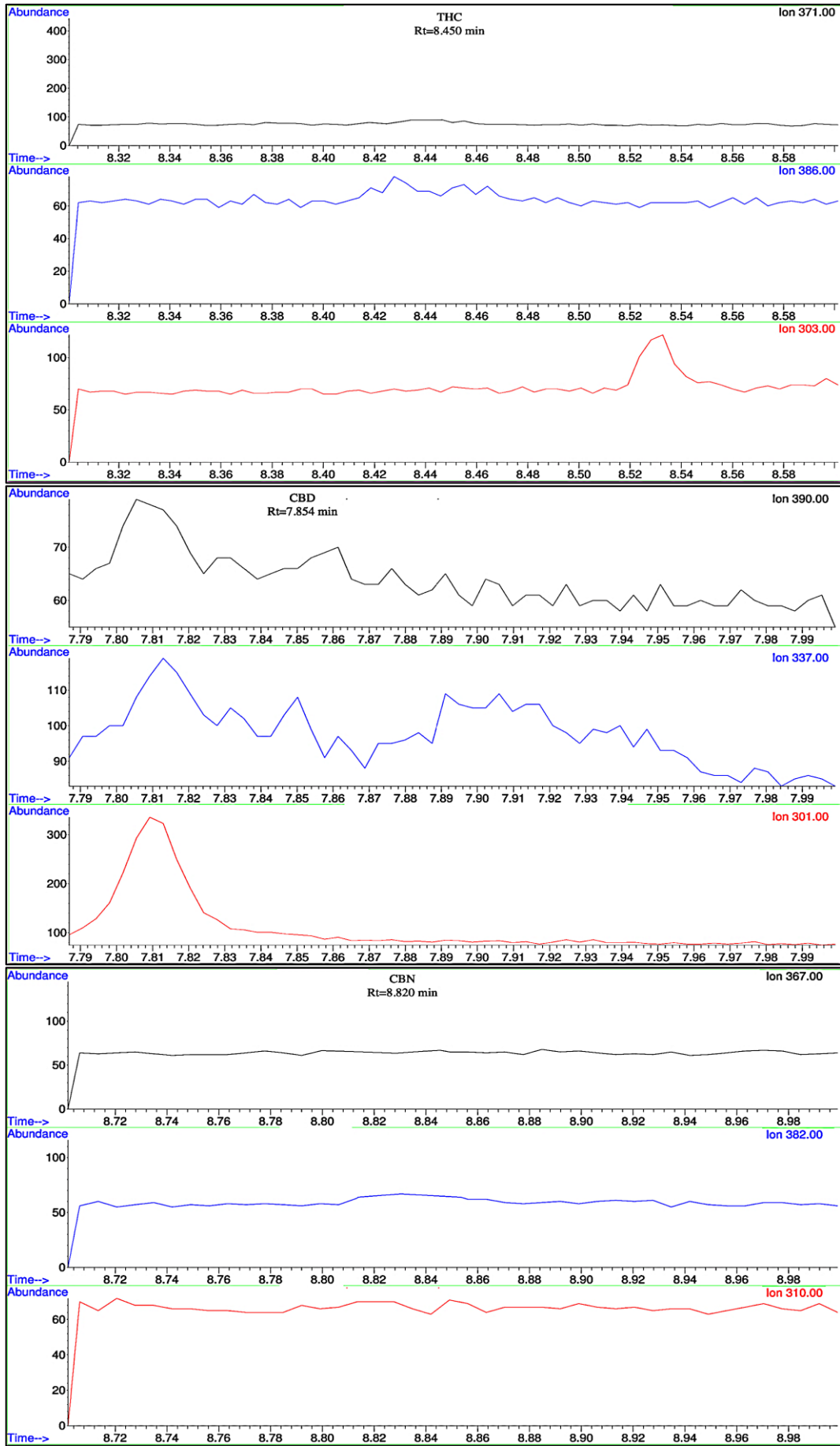
για δείγματα ελέγχου ποιότητας που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και στο σύνολο των ημερών, αντίστοιχα. Το % Er δείχνει πόσο απέχει η τιμή (x) των μετρήσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, από την ονομαστική (θεωρητική) τιμή (μ), δηλαδή την συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο εμβολιασμένο δείγμα ελέγχου ποιότητας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA, οι τιμές του % Er, που εκφράζουν την ορθότητα της μεθόδου, έπρεπε να βρίσκονται εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ για όλα τα επίπεδα ελέγχου ποιότητας.

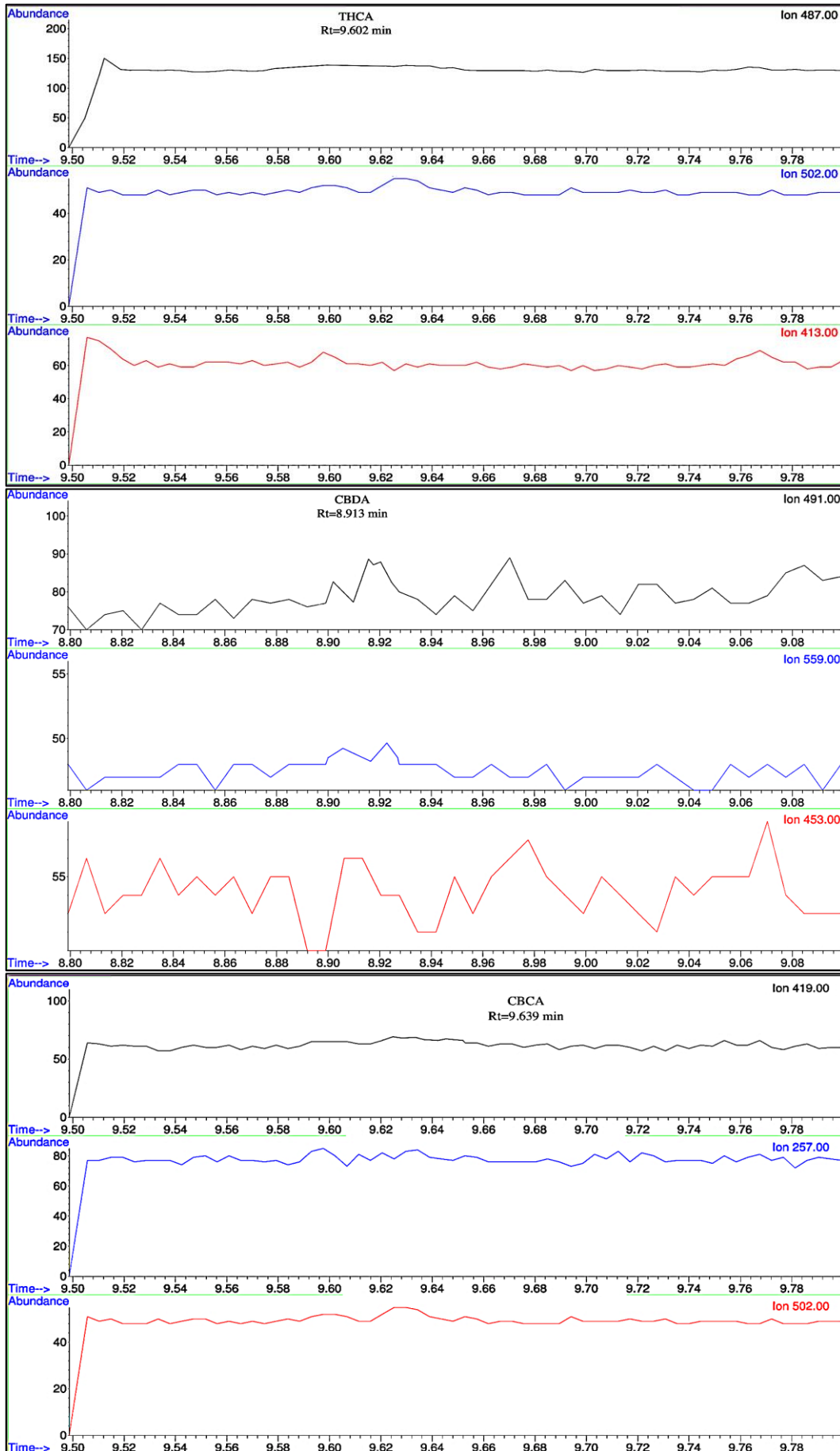
Κεφάλαιο 8. Αποτελέσματα επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των κανναβινοειδών σε δείγματα προϊόντων κάνναβης

Η μέθοδος η οποία αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε στο πλαίσιο αυτής της διπλωματικής εργασίας, περιελάμβανε απομόνωση της Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλης, της κανναβιδιόλης, της κανναβινόλης, του κανναβιδιολικού οξέος, του τετραϋδροκανναβιολικού οξέος και του κανναβιχρωμενικού οξέος από δείγματα κάνναβης και ανάλυσή τους με χρήση αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα κάνναβης εκχυλίστηκαν με μίγμα διαλυτών εξανίου: οξικού αιθυλεστέρα (6:4 v/v), παραγωγοποιήθηκαν με τη χρήση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης BSTFA με 1% TMCS, στους 70⁰ C για 30 min και τέλος εγχύθηκαν σε σύστημα του αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με αναλυτή φασματομέτρο μαζών και αναλύθηκαν σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring/SIM). Η αναπτυχθείσα μέθοδος και οι επί μέρους δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στο αντίστοιχο κεφάλαιο. Τα αποτελέσματα της επικύρωσης παρουσιάζονται αναλυτικότερα στις επόμενες παραγράφους.

8.1 Εκλεκτικότητα

Έξι διαφορετικά δείγματα καπνού του εμπορίου κατεργάστηκαν όπως έχει περιγραφεί στο αντίστοιχο κεφάλαιο της μεθόδου προσδιορισμού των μελετούμενων κανναβινοειδών (Παράγραφος 6.5) χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τα ληφθέντα χρωματογραφήματα, δεν παρατηρήθηκε κάποια παρεμπόδιση από κάποια από τα συστατικά του καπνού στους χρόνους ανάσχεσης των 6 αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου. Στο Σχήμα 6, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των αναλυτών που ελήφθησαν από τα τυφλά δείγματα καπνού.





Σχήμα 6. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση δείγματος καπνού για την μελέτη της εκλεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη κανναβινοειδών.

8.2 Ειδικότητα

Για την μελέτη της ειδικότητας, αναλύθηκαν 6 δείγματα καπνού όπως στην μελέτη εκλεκτικότητας τα οποία όμως εμβολιάστηκαν με 50 μL από μίγμα μικτού διαλύματος εργασίας 31 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ το οποίο προστέθηκε στα 50 μL του μίγματος εκχύλισης εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας (6:4 v/v) προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από τις ουσίες αυτές στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων. Το διάλυμα των ουσιών περιείχε διαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, λοραζεπάμη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, σετραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, MDA, MBDB, MDEA, κεταμίνη, βουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και ECME, ουσίες που ενδέχεται να συνυπάρχουν στα δείγματα της κάνναβης, ως ρυπαντές.

Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα τα οποία ελήφθησαν καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε από τις παραπάνω ουσίες στους χρόνους ανάλυσης των υπό μελέτη ουσιών και του εσωτερικού τους προτύπου.

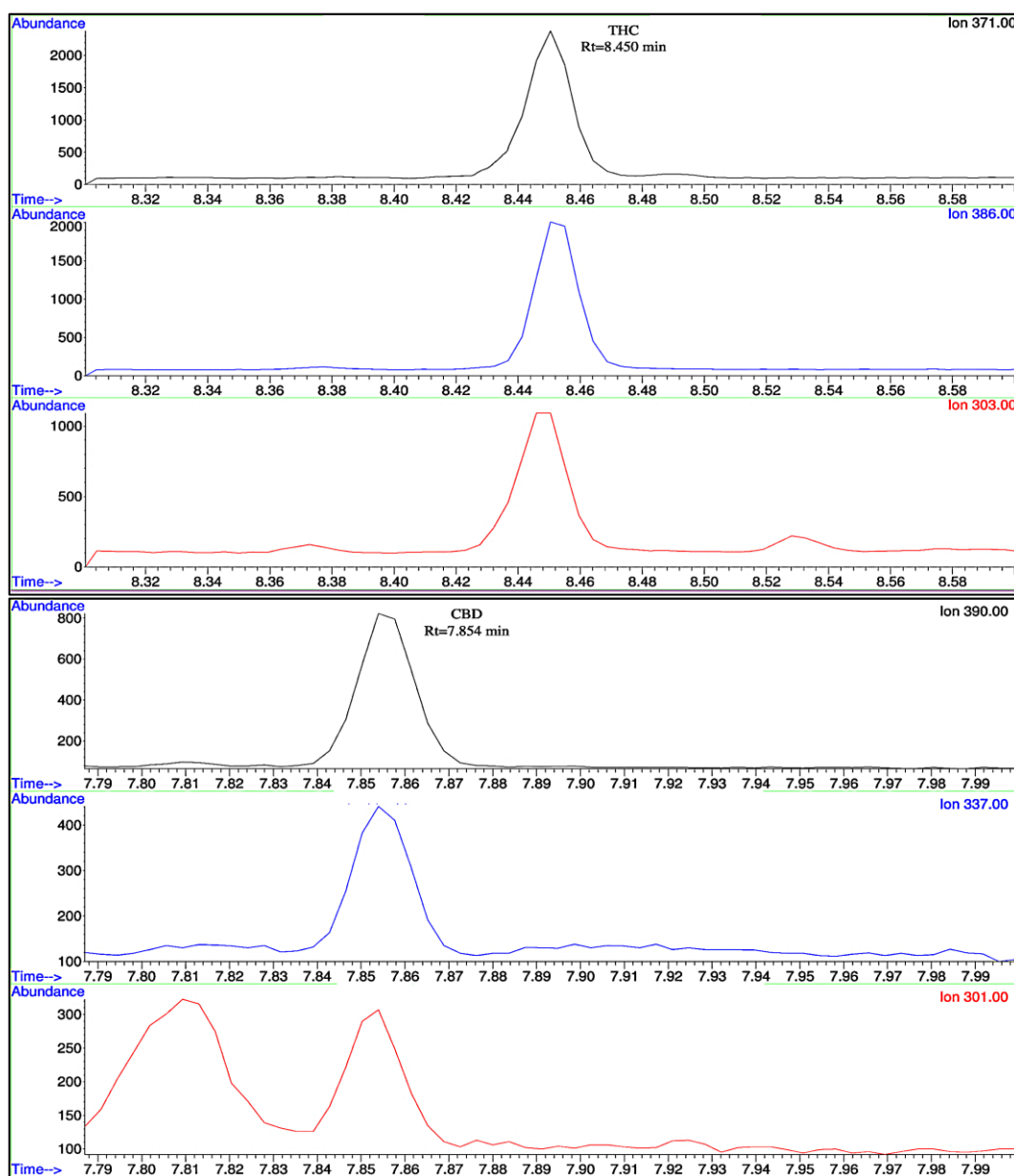
8.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

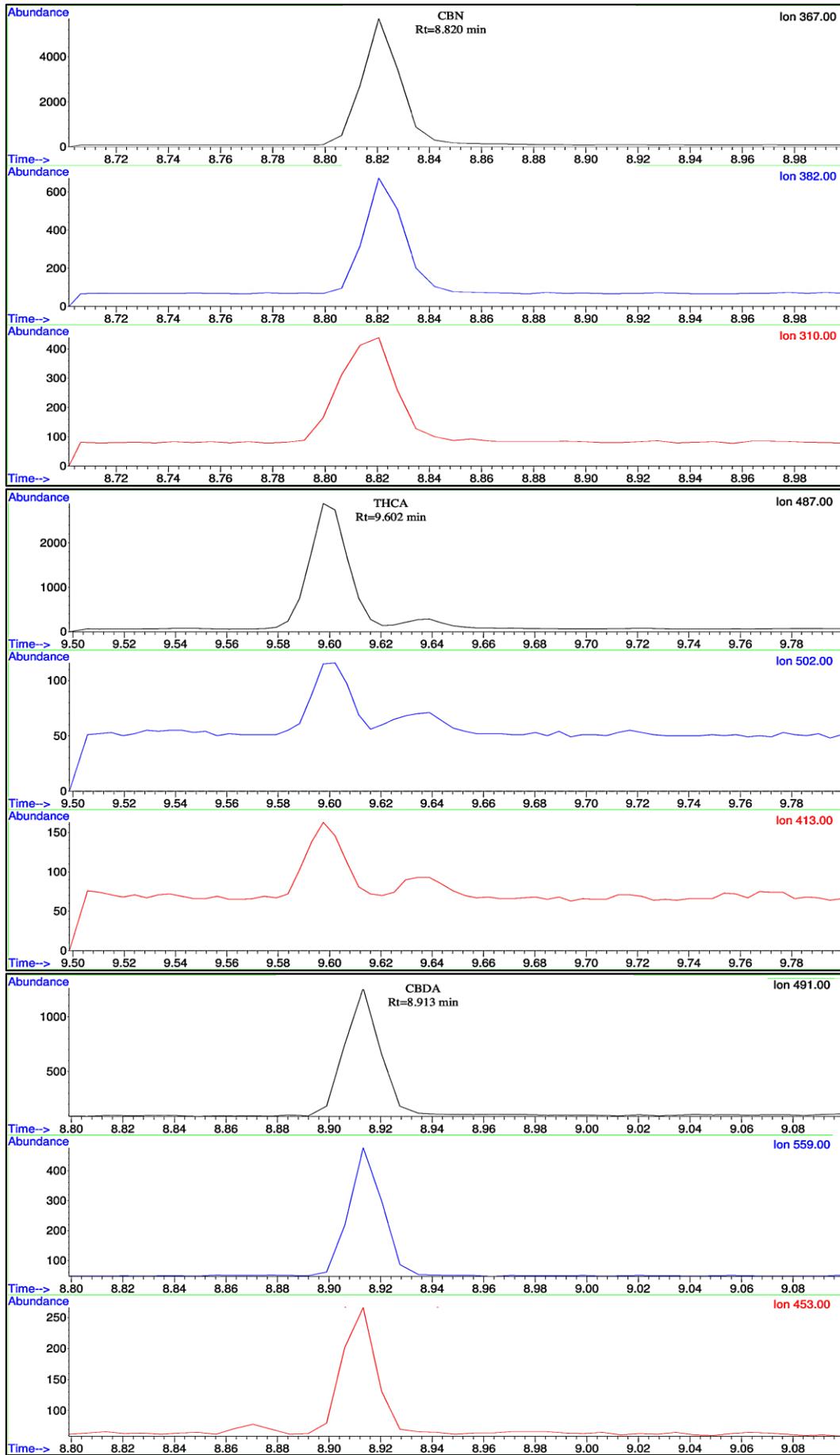
Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα κατώτατα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) για την κάθε ουσία της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των 6 υπό μελέτη κανναβινοειδών προσδιορίστηκαν με βάση το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος στο χρόνο της ανάλυσης, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 ($S/N > 3:1$) και τουλάχιστον 10 ($S/N > 10:1$) αντίστοιχα. Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν μίγματα διαλυμάτων των 6 υπό μελέτη αναλυτών με συνεχείς αραιώσεις των διαλυμάτων μέχρι τον καθορισμό των τιμών LOD και LOQ για την κάθε ουσία. Οι προσδιορισθείσες τιμές των LOD και LOQ των υπό εξέταση ουσιών συνοψίζονται στον Πίνακα 9.

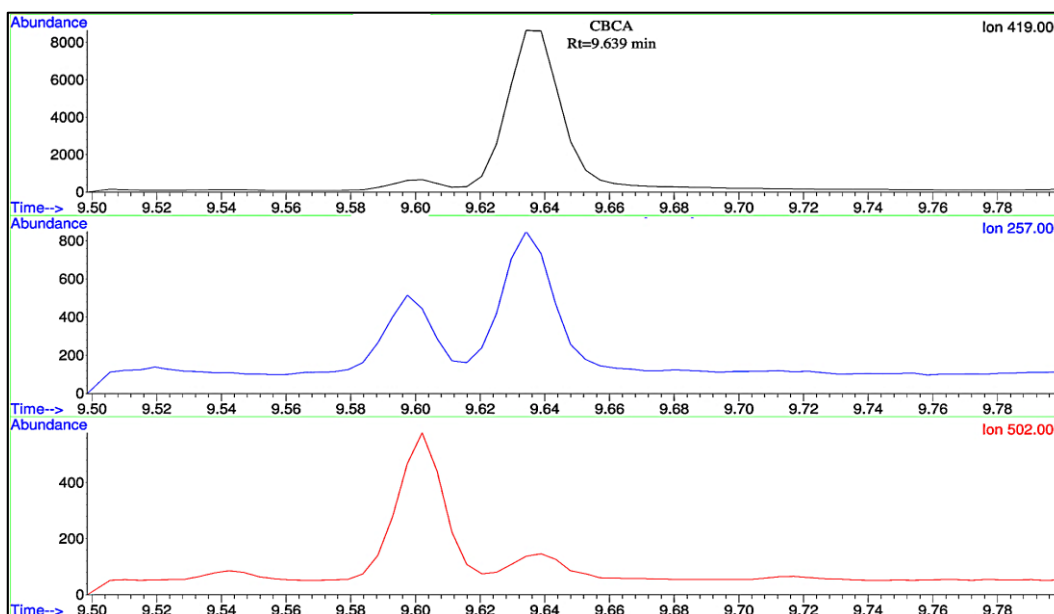
Πίνακας 9. Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορισμού των 6 κανναβινοειδών

Αναλύτης	LOD (μg/mg φυτού)	LOQ (μg/mg φυτού)
	(S/N > 3:1)	(S/N > 10:1)
Δ ⁹ -THC	0.0015	0.005
CBD	0.0015	0.005
CBN	0.0015	0.005
CBDA	0.006	0.02
THCA	0.006	0.02
CBCA	0.006	0.02

Χαρακτηριστικά αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα στο επίπεδο LOQ των 6 αναλυτών που ελήφθησαν με τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος, παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.







Σχήμα 7. Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των υπό μελέτη κανναβινοειδών στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης της κάθε ουσίας.

8.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των 6 υπό μελέτη κανναβινοειδών πραγματοποιήθηκε σε 5 διαφορετικές μέρες με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 9 σημείων για τις Δ⁹-THC, CBD, CBN και 8 σημείων για τα THCA, CBDA, CBCA που παρουσίαζαν γραμμική συσχέτιση. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τα σημεία της καμπύλης καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους αναφέρονται στον Πίνακα 4. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες ήταν της μορφής $y=a \cdot x + b$, όπου:

y, ο λόγος της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη προς επιφάνεια κορυφής του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου ($AUC_{\text{analyte}}/AUC_{\text{I.S.}}$),

x, η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη, εκφρασμένος σε $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού.

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις 5 μέρες, η μέση εξίσωση παλινδρόμησης, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων των καμπυλών για την κάθε ουσία παρουσιάζονται στους Πίνακες 10-15. Η % RSD αποτέλεσε κριτήριο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση στο εύρος συγκεντρώσεων 0,005–10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού για τη Δ⁹-THC, τη CBD και τη CBN, και στο εύρος συγκεντρώσεων 0,02-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού για το CBDA, το THCA και το CBCA.

Το τετράγωνο του μέσου συντελεστή συσχέτισης, R^2 , ήταν εντός αποδεκτών ορίων και για τις 6 ουσίες, σε όλες τις σειρές ανάλυσης ($R^2 \geq 0.990$).

Πίνακας 10. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 5 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη Δ^9 -THC, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	R^2
1 ^η	$y = 0,179 \cdot x + 0,00139$	0,999
2 ^η	$y = 0,184 \cdot x + 0,00207$	0,998
3 ^η	$y = 0,181 \cdot x + 0,00116$	0,994
4 ^η	$y = 0,176 \cdot x + 0,00029$	0,997
5 ^η	$y = 0,179 \cdot x + 0,00335$	0,995
Μέση εξίσωση	$y = 0,1794 (\pm 0,0029) \cdot x + 0,0017 (\pm 0,0010)$	
% RSD κλίσεων	1,63%	

Πίνακας 11. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 5 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη CBD, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	R^2
1 ^η	$y = 3,118 \cdot x - 0,00049$	0,997
2 ^η	$y = 3,159 \cdot x + 0,00030$	0,996
3 ^η	$y = 3,036 \cdot x - 0,00287$	0,992
4 ^η	$y = 2,882 \cdot x - 0,01172$	0,991
5 ^η	$y = 2,914 \cdot x + 0,00051$	0,992
Μέση εξίσωση	$y = 3,0218 (\pm 0,1219) \cdot x - 0,0008 (\pm 0,0014)$	
% RSD κλίσεων	4,03%	

Πίνακας 12. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 5 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για τη CBN, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	R^2
1 ^η	$y = 1,162 \cdot x + 0,0534$	0,996
2 ^η	$y = 1,214 \cdot x + 0,0308$	0,992
3 ^η	$y = 1,233 \cdot x + 0,0119$	0,992
4 ^η	$y = 1,296 \cdot x + 0,0273$	0,991
5 ^η	$y = 1,202 \cdot x + 0,0419$	0,995
Μέση εξίσωση	$y = 1,241 (\pm 0,059) \cdot x + 0,033 (\pm 0,016)$	
% RSD κλίσεων	4,73%	

Πίνακας 13. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 5 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για το THCA, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	R^2
1 ^η	$y = 0,07965 \cdot x + 0,00407$	0,996
2 ^η	$y = 0,07800 \cdot x + 0,00173$	0,994
3 ^η	$y = 0,08524 \cdot x + 0,00281$	0,990
4 ^η	$y = 0,08556 \cdot x + 0,00123$	0,996

5 ^η	$y = 0,08738 \cdot x - 0,00049$	0,995
Μέση εξίσωση	$y = 0,0832 (\pm 0,0041) \cdot x + 0,0019 (\pm 0,0017)$	
% RSD κλίσεων	4,92%	

Πίνακας 14. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 5 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για το CBDA, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	R ²
1 ^η	$y = 0,1505 \cdot x - 0,01006$	0,990
2 ^η	$y = 0,1482 \cdot x + 0,00137$	0,994
3 ^η	$y = 0,1528 \cdot x - 0,01657$	0,993
4 ^η	$y = 0,1522 \cdot x - 0,00675$	0,990
5 ^η	$y = 0,1453 \cdot x - 0,00359$	0,991
Μέση εξίσωση	$y = 0,1498 (\pm 0,0031) \cdot x - 0,0071 (\pm 0,0068)$	
% RSD κλίσεων	2,06%	

Πίνακας 15. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 5 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για το CBCA, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων.

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	R ²
1 ^η	$y = 0,03906 \cdot x + 0,00391$	0,992
2 ^η	$y = 0,0438 \cdot x + 0,00406$	0,991
3 ^η	$y = 0,04283 \cdot x + 0,00174$	0,992
4 ^η	$y = 0,04074 \cdot x + 0,00061$	0,992
5 ^η	$y = 0,04206 \cdot x + 0,00012$	0,990
Μέση εξίσωση	$y = 0,0417 (\pm 0,0019) \cdot x + 0,0021 (\pm 0,0018)$	
% RSD κλίσεων	4,44%	

8.5 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στους Πίνακες 16-21. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -13,6% και 12% για όλους τους αναλύτες, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και για το σύνολο των ημερών. Οι τιμές αυτές ήταν όλες εντός των αποδεκτών ορίων $\pm 15\%$ ($\pm 20\%$ για το LOQ).

Πίνακας 16. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη Δ⁹-THC

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7	Cal8	Cal9
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mg)	0,005	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	2	5	10
1η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0049	0,0192	0,0476	0,0991	0,1799	0,4953	1,9052	5,3711	9,7044
	Er (%)	-2,00	-4,00	-4,80	-0,90	-10,05	-0,94	-4,74	7,42	-2,96
2η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0051	0,02	0,0537	0,1031	0,1869	0,4893	1,9005	4,7264	9,8152
	Er (%)	2,00	0,00	7,40	3,10	-6,55	-2,14	-4,98	-5,47	-1,85
3η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0047	0,0205	0,0498	0,1027	0,2168	0,5369	2,0825	4,5528	10,4296
	Er (%)	-6,80	2,50	-0,40	2,70	8,40	7,38	4,13	-8,94	4,30
4η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0052	0,0199	0,0526	0,1067	0,2101	0,5269	1,8991	4,7169	10,7451
	Er (%)	4,00	-0,50	5,20	6,70	5,05	5,38	-5,05	-5,66	7,45
5η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0053	0,0192	0,0516	0,0961	0,2145	0,5288	2,1149	4,6959	10,3596
	Er (%)	6,00	-4,00	3,20	-3,90	7,25	5,76	5,75	-6,08	3,60

Πίνακας 17. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη CBD

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7	Cal8	Cal9
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mg)	0,005	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	2	5	10
1η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0049	0,0202	0,0546	0,1047	0,1822	0,5082	1,956	5,0592	9,1057
	Er (%)	-2,00	1,00	9,20	4,70	-8,90	1,64	-2,20	1,18	-8,94
2η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,005	0,0203	0,0472	0,1092	0,1865	0,5052	1,9542	4,5119	9,7358
	Er (%)	0,00	1,50	-5,60	9,20	-6,75	1,04	-2,29	-9,76	-2,64
3η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,00481	0,0204	0,0511	0,0883	0,2186	0,4499	2,098	4,6598	10,0673
	Er (%)	-3,80	2,00	2,20	-11,70	9,30	-10,02	4,90	-6,80	0,67
4η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0051	0,019	0,0489	0,0965	0,207	0,4786	1,8527	4,7931	10,7428
	Er (%)	2,00	-5,00	-2,20	-3,50	3,50	-4,28	-7,37	-4,14	7,43
5η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0054	0,0194	0,0494	0,1089	0,2125	0,4834	1,8221	4,6684	10,6653
	Er (%)	8,00	-3,00	-1,20	8,90	6,25	-3,32	-8,90	-6,63	6,65

Πίνακας 18. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη CBN

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7	Cal8	Cal9
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mg)	0,005	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	2	5	10
1η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0053	0,019	0,0482	0,1093	0,193	0,522	2,1577	5,1718	8,8382
	Er (%)	6,00	-5,00	-3,60	9,30	-3,50	4,40	7,89	3,44	-11,62
2η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0056	0,0189	0,0459	0,1009	0,1866	0,5146	2,0951	4,5424	9,1441
	Er (%)	12,00	-5,50	-8,20	0,90	-6,70	2,92	4,76	-9,15	-8,56
3η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,00432	0,0218	0,053	0,1069	0,2024	0,5507	1,9523	4,545	10,4485
	Er (%)	-13,60	9,00	6,00	6,90	1,20	10,14	-2,39	-9,10	4,48
4η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0052	0,0192	0,0555	0,1062	0,2113	0,5164	1,9882	5,0692	10,606
	Er (%)	4,00	-4,00	11,00	6,20	5,65	3,28	-0,59	1,38	6,06
5η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0052	0,0204	0,0484	0,0913	0,2155	0,4987	2,1747	4,9199	9,6271
	Er (%)	4,00	2,00	-3,20	-8,70	7,75	-0,26	8,74	-1,60	-3,73

Πίνακας 19. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για το THCA

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7	Cal8
	Αναμενόμενη συγκέντρωση (μg/mg)	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	2	5	10
1η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0221	0,0486	0,0892	0,2185	0,4902	2,1568	5,4962	9,887
	Er (%)	10,50	-2,80	-10,80	9,25	-1,96	7,84	9,92	-1,13
2η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0202	0,0487	0,0882	0,2201	0,4828	2,0792	5,4905	10,5482
	Er (%)	1,00	-2,60	-11,80	10,05	-3,44	3,96	9,81	5,48
3η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0212	0,0476	0,1085	0,1883	0,5501	1,9054	5,4284	10,6561
	Er (%)	6,00	-4,80	8,50	-5,85	10,02	-4,73	8,57	6,56
4η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0194	0,0522	0,1087	0,1868	0,5405	2,0327	4,9795	10,8838
	Er (%)	-3,00	4,40	8,70	-6,60	8,10	1,64	-0,41	8,84
5η	Ευρεθείσα συγκέντρωση (μg/mg)	0,0205	0,0548	0,0941	0,205	0,4982	2,1847	5,3808	10,9352

	Er (%)	2,50	9,60	-5,90	2,50	-0,36	9,23	7,62	9,35
--	---------------	------	------	-------	------	-------	------	------	------

Πίνακας 20. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για το CBDA

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7	Cal8
		Αναμενόμενη συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	2	5
1η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,0212	0,0543	0,0985	0,2188	0,5018	2,1524	5,2809	10,686
	Er (%)	6,00	8,60	-1,50	9,40	0,36	7,62	5,62	6,86
2η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,0211	0,0558	0,1061	0,1863	0,4926	2,1336	5,0085	9,981
	Er (%)	5,50	11,60	6,10	-6,85	-1,48	6,68	0,17	-0,19
3η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,0192	0,0492	0,1071	0,1879	0,5355	1,9548	4,5102	9,937
	Er (%)	-4,00	-1,60	7,10	-6,05	7,10	-2,26	-9,80	-0,63
4η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,0216	0,0472	0,1045	0,203	0,5487	2,0639	4,8736	10,3493
	Er (%)	8,00	-5,60	4,50	1,50	9,74	3,19	-2,53	3,49
5η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,0216	0,0451	0,0899	0,2191	0,4713	2,159	5,1675	10,498
	Er (%)	8,00	-9,80	-10,10	9,55	-5,74	7,95	3,35	4,98

Πίνακας 21. Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για το CBCA

Ημέρα	Δείγματα βαθμονόμησης	Cal1	Cal2	Cal3	Cal4	Cal5	Cal6	Cal7	Cal8
		Αναμενόμενη συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,02	0,05	0,1	0,2	0,5	2	5
1η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,022	0,0536	0,0972	0,179	0,4672	2,1325	5,1098	9,3694
	Er (%)	10,00	7,20	-2,80	-10,50	-6,56	6,62	2,20	-6,31
2η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,0183	0,0533	0,1008	0,2198	0,4742	1,8706	5,4001	10,4017
	Er (%)	-8,50	6,60	0,80	9,90	-5,16	-6,47	8,00	4,02
3η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,021	0,0469	0,0999	0,1991	0,4968	1,9573	4,915	11,052
	Er (%)	5,00	-6,20	-0,10	-0,45	-0,64	-2,14	-1,70	10,52
4η	Ευρεθείσα συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	0,0192	0,0511	0,0944	0,1945	0,4854	2,2	5,1531	11,1201
	Er (%)	-4,00	2,20	-5,60	-2,75	-2,92	10,00	3,06	11,20
5η	Ευρεθείσα	0,0195	0,0494	0,1088	0,2025	0,5157	2,0144	5,3781	10,1973

	συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mg}$)								
	Er (%)	-2,50	-1,20	8,80	1,25	3,14	0,72	7,56	1,97

8.6 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού των 6 υπό μελέτη ουσιών εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, με τον υπολογισμό του % της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 5 διαφορετικές ημέρες.

Για τη Δ^9 -THC, την CBD και την CBN στα επίπεδα:

- 0,015 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (QC₁, χαμηλό επίπεδο)
- 1,00 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (QC₂, μεσαίο επίπεδο)
- 8,00 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (QC₃, υψηλό επίπεδο)

Για το THCA, το CBDA και το CBCA στα επίπεδα:

- 0,06 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (QC₁, χαμηλό επίπεδο)
- 1,00 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (QC₂, μεσαίο επίπεδο)
- 8,00 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (QC₃, υψηλό επίπεδο)

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου για τις 5 ημέρες και στα 3 επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 22-27. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η επαναληψιμότητα της μεθόδου για τις 6 ουσίες ήταν:

- για τη Δ^9 -THC: από 1,62% έως 6,60% για το σύνολο των QC
- για τη CBD: από 3,37% έως 8,29% για το σύνολο των QC
- για τη CBN: από 2,59% έως 6,48% για το σύνολο των QC
- για το THCA: από 3,85% έως 8,39% για το σύνολο των QC
- για το CBDA: από 3,85% έως 8,96% για το σύνολο των QC
- για το CBCA: από 3,18% έως 8,61% για το σύνολο των QC

Οι τιμές της επαναληψιμότητας ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ($\pm 15\%$) για όλες τις ουσίες.

Τα αποτελέσματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται

στους Πίνακες 28-33. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα για τις 6 ουσίες ήταν:

- για τη Δ^9 -THC: 4,44% για το QC₁, 4,56% για το QC₂ και 3,24% για το QC₃
- για τη CBD: 5,60% για το QC₁, 5,55% για το QC₂ και 5,14% για το QC₃
- για τη CBN: 5,35% για το QC₁, 4,53% για το QC₂ και -4,82% για το QC₃
- για το THCA: 6,94% για το QC₁, 7,40% για το QC₂ και 4,96% για το QC₃
- για το CBDA: 5,94% για το QC₁, 7,18% για το QC₂ και 5,22% για το QC₃
- για το CBCA: 5,92% για το QC₁, 6,16% για το QC₂ και 5,70% για το QC₃

Οι τιμές της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγικότητας ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ($\pm 15\%$) για όλες τις ουσίες.

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα επίσης εκτιμήθηκε από την % RSD των κλίσεων των διαγραμμάτων βαθμονόμησης της κάθε ουσίας που ήταν $\leq 5\%$ για όλες τις ουσίες και συγκεκριμένα ήταν:

- 1,63% για τη Δ^9 -THC
- 4,03% για τη CBD
- 4,73% για τη CBN
- 4,92% για το THCA
- 2,06% για το CBDA και
- 4,44% για το CBCA.

Πίνακας 22. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την Δ⁹-THC.

Ημέρα	QC ₁ (0,015 µg/mg)			QC ₂ (1,00 µg/mg)			QC ₃ (8,00 µg/mg)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)
1 ⁿ	0,0152±0,0007	4,60	1,56	1,015±0,046	4,53	0,14	8,07±0,27	3,31	0,83
2 ⁿ	0,0149±0,0006	4,24	-0,78	0,994±0,038	3,81	-1,78	8,08±0,30	3,71	0,95
3 ⁿ	0,0149±0,0004	3,23	-0,67	1,009±0,047	4,70	0,30	8,00±0,13	1,62	0,03
4 ⁿ	0,0155±0,0009	5,58	3,56	1,021±0,039	3,77	1,44	8,14±0,27	3,29	1,73
5 ⁿ	0,0150±0,0006	4,19	0,56	1,017±0,067	6,60	0,46	8,17±0,36	4,39	2,11

Πίνακας 23. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη CBD.

Ημέρα	QC ₁ (0,015 µg/mg)			QC ₂ (1,00 µg/mg)			QC ₃ (8,00 µg/mg)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)
1 ⁿ	0,0154±0,0010	6,62	2,67	1,008±0,035	3,45	1,21	7,65±0,32	4,19	-4,36
2 ⁿ	0,0149±0,00087	5,78	-0,11	0,990±0,033	3,37	-0,36	7,79±0,32	4,14	-2,62
3 ⁿ	0,0145±0,00088	6,06	-3,22	0,967±0,080	8,29	-3,11	8,41±0,40	4,73	5,07
4 ⁿ	0,0153±0,00073	4,73	2,11	0,997±0,057	5,74	-0,62	7,92±0,30	3,79	-1,04
5 ⁿ	0,0152±0,00067	4,42	1,22	0,986±0,066	6,67	-0,01	7,85±0,33	4,24	-1,85

Πίνακας 24. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για τη CBN.

Ημέρα	QC ₁ (0,015 µg/mg)			QC ₂ (1,00 µg/mg)			QC ₃ (8,00 µg/mg)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)
1 ⁿ	0,0138±0,00067	4,81	-7,67	1,052±0,034	3,19	5,60	7,56±0,38	5,05	-5,49
2 ⁿ	0,0148±0,00073	4,93	-1,22	1,042±0,045	4,28	3,07	7,50±0,28	3,75	-6,20
3 ⁿ	0,015±0,00039	2,59	-0,22	1,044±0,059	5,67	3,88	7,80±0,44	5,68	-2,53
4 ⁿ	0,0148±0,00094	6,33	-1,11	1,039±0,040	3,82	3,32	7,60±0,27	3,49	-4,98
5 ⁿ	0,01465±0,0008	5,23	-2,33	1,033±0,067	6,48	2,56	7,61±0,35	4,64	-4,89

Πίνακας 25. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για το THCA.

Ημέρα	QC ₁ (0,06 µg/mg)			QC ₂ (1,00 µg/mg)			QC ₃ (8,00 µg/mg)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)
1 ⁿ	0,0630±0,0050	7,86	5,31	1,02±1,00	8,39	1,91	8,49±0,39	4,63	6,14
2 ⁿ	0,0640±0,0040	5,82	6,44	0,959±0,058	5,91	-1,08	8,32±0,55	6,64	4,01
3 ⁿ	0,0610±0,0050	7,95	2,06	0,999±0,077	7,72	1,30	8,30±0,47	5,64	3,80
4 ⁿ	0,0610±0,0050	7,48	1,72	1,003±0,076	7,53	2,03	8,29±0,34	4,10	3,65
5 ⁿ	0,0620±0,0040	6,81	3,11	1,063±0,070	6,62	5,34	8,11±0,31	3,85	1,32

Πίνακας 26. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για το CBDA.

Ημέρα	QC ₁ (0,06 µg/mg)			QC ₂ (1,00 µg/mg)			QC ₃ (8,00 µg/mg)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)
1 ⁿ	0,0620±0,0028	4,61	2,61	0,981±0,085	8,64	-0,12	8,30±0,54	6,49	3,77
2 ⁿ	0,0620±0,0037	6,00	3,11	0,976±0,065	6,69	-0,85	8,49±0,42	4,96	6,15
3 ⁿ	0,0604±0,0024	3,99	0,67	0,975±0,078	8,04	-3,13	8,29±0,40	4,84	3,66
4 ⁿ	0,0610±0,0055	8,96	1,58	1,020±0,063	6,24	1,84	8,19±0,49	6,04	2,33
5 ⁿ	0,0610±0,0042	6,83	1,56	1,050±0,053	5,05	4,41	8,09±3,85	3,85	1,08

Πίνακας 27. Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για το CBCA.

Ημέρα	QC ₁ (0,06 µg/mg)			QC ₂ (1,00 µg/mg)			QC ₃ (8,00 µg/mg)		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός ημέρας (%E _r)
1 ⁿ	0,0636±0,0027	4,18	6,00	1,067±0,049	4,59	6,07	8,42±0,46	5,49	5,26
2 ⁿ	0,0622±0,0031	4,96	3,58	0,999±0,078	7,79	-1,96	7,83±0,68	8,61	-2,11
3 ⁿ	0,0582±0,0035	5,95	-2,94	1,046±0,065	6,19	3,88	8,12±0,43	5,28	1,49
4 ⁿ	0,0614±0,0035	5,64	2,25	1,035±0,064	6,19	2,14	8,27±0,32	3,92	3,40
5 ⁿ	0,0610±0,0041	6,79	1,86	1,030±0,063	6,07	2,52	8,14±0,26	3,18	1,71

8.7 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, με υπολογισμό των % σχετικών σφαλμάτων (%E_f) των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας στις 5 μέρες.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας εντός της ημέρας για τη Δ⁹-THC, τη CBD, τη CBN, το CBDA, το THCA και το CBCA τις 5 μέρες ανάλυσης στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 22-27. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ορθότητα εντός της ημέρας για τις 6 ουσίες ήταν:

- για τη Δ⁹-THC: από -1,78% έως 3,56% και για τα τρία QC
- για τη CBD: από -4,36% έως 5,07% και για τα τρία QC
- για τη CBN: από -7,67% έως 5,60% και για τα τρία QC
- για το THCA: από -1,08% έως 6,44% και για τα τρία QC
- για το CBDA: από -3,13% έως 6,15% και για τα τρία QC
- για το CBCA: από -2,94% έως 6,07% και για τα τρία QC

Τα αποτελέσματα της ορθότητας δια των ημερών για τους 6 αναλύτες, τις 5 μέρες ανάλυσης στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 28-33. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ορθότητα δια των ημερών για τις 6 ουσίες ήταν:

- για τη Δ⁹-THC: 0,84% για το QC₁, 1,12% για το QC₂ και 1,13% για το QC₃
- για τη CBD: 0,53% για το QC₁, -1,02% για το QC₂ και -0,96% για το QC₃
- για τη CBN: -2,51% για το QC₁, 4,17% για το QC₂ και -4,82% για το QC₃
- για το THCA: 3,73% για το QC₁, 0,72% για το QC₂ και 3,78% για το QC₃
- για το CBDA: 1,91% για το QC₁, -0,03% για το QC₂ και 3,40% για το QC₃
- για το CBCA: 2,15% για το QC₁, 3,54% για το QC₂ και 1,97% για το QC₃

Οι τιμές για την ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών βρέθηκαν να είναι εντός των αποδεκτών ορίων ($\pm 15\%$).

Πίνακας 28. Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για τη Δ⁹-THC

Ημέρα	QC1 (0,015 µg/mg)			QC2 (1,00 µg/mg)			QC3 (8,00 µg/mg)		
		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)
1η	A	0,0149	-0,67	A	1,0812	8,12	A	8,5944	7,43
	B	0,0148	-1,33	B	0,9986	-0,14	B	7,9517	-0,60
	C	0,0152	1,33	C	0,9723	-2,77	C	7,9979	-0,03
	D	0,0152	1,33	D	1,0618	6,18	D	8,0628	0,78
	E	0,0147	-2,00	E	1,0011	0,11	E	7,8688	-1,64
	F	0,0166	10,67	F	0,9734	-2,66	F	7,9244	-0,94
2η	A	0,0144	-4,00	A	1,0530	5,30	A	7,9222	-0,97
	B	0,0149	-0,67	B	0,9789	-2,11	B	8,0178	0,22
	C	0,0156	4,00	C	0,9600	-4,00	C	7,8421	-1,97
	D	0,0144	-4,00	D	1,0287	2,87	D	8,6692	8,36
	E	0,0157	4,67	E	0,9784	-2,16	E	7,9554	-0,56
	F	0,0143	-4,67	F	0,9649	-3,51	F	8,0504	0,63
3η	A	0,0150	0,00	A	1,0419	4,19	A	8,0898	1,12
	B	0,0143	-4,67	B	1,0118	1,18	B	7,7512	-3,11
	C	0,0146	-2,67	C	1,0282	2,82	C	8,0756	0,95
	D	0,0155	3,33	D	0,9439	-5,61	D	8,0452	0,56
	E	0,0146	-2,67	E	0,9631	-3,69	E	7,9754	-0,31
	F	0,0154	2,67	F	1,0678	6,78	F	8,0780	0,98
4η	A	0,0163	8,67	A	1,0538	5,38	A	8,2517	3,15
	B	0,0148	-1,33	B	0,9991	-0,09	B	7,7736	-2,83
	C	0,0164	9,33	C	0,9558	-4,42	C	7,9534	-0,58
	D	0,0158	5,33	D	1,0532	5,32	D	8,5562	6,95
	E	0,0142	-5,33	E	1,0450	4,50	E	8,1098	1,37
	F	0,0157	4,67	F	1,0191	1,91	F	8,1850	2,31
5η	A	0,0153	2,00	A	1,0781	7,81	A	8,4216	5,27
	B	0,0155	3,33	B	0,9092	-9,08	B	7,4791	-6,51
	C	0,0139	-7,33	C	1,0333	3,33	C	8,2133	2,67
	D	0,0153	2,00	D	1,0480	4,80	D	8,4821	6,03
	E	0,0156	4,00	E	1,0705	7,05	E	8,1785	2,23
	F	0,0149	-0,67	F	0,9618	-3,82	F	8,2364	2,96
	Μέση τιμή	0,01513	0,84	Μέση τιμή	1,011	1,12	Μέση τιμή	8,09	1,13
	SD	0,00067		SD	0,046		SD	0,26	
	RSD	4,44		RSD	4,56		RSD	3,24	

Πίνακας 29. Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για τη CBD

Ημέρα	QC1 (0,015 µg/mg)			QC2 (1,00 µg/mg)			QC3 (8,00 µg/mg)		
		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)
1η	A	0,0154	2,67	A	0,9862	-1,38	A	8,2450	3,06
	B	0,0167	11,33	B	0,9817	-1,83	B	7,4528	-6,84
	C	0,0143	-4,67	C	1,0138	1,38	C	7,5774	-5,28
	D	0,0151	0,67	D	1,0703	7,03	D	7,7664	-2,92
	E	0,0165	10,00	E	0,9781	-2,19	E	7,3681	-7,90
	F	0,0144	-4,00	F	1,0166	1,66	F	7,4981	-6,27
2η	A	0,0147	-2,00	A	0,9690	-3,10	A	7,7044	-3,70
	B	0,0164	9,33	B	0,9615	-3,85	B	7,7011	-3,74
	C	0,0143	-4,67	C	1,0028	0,28	C	7,4838	-6,45
	D	0,0148	-1,33	D	1,0450	4,50	D	8,4209	5,26
	E	0,0156	4,00	E	0,9624	-3,76	E	7,6776	-4,03
	F	0,0141	-6,00	F	1,0102	1,02	F	7,7534	-3,08
3η	A	0,0141	-6,00	A	0,9542	-4,58	A	7,7599	-3,00
	B	0,0140	-6,67	B	0,8784	-12,16	B	8,8301	10,38
	C	0,0159	6,00	C	0,9823	-1,77	C	8,5880	7,35
	D	0,0144	-4,00	D	1,0820	8,20	D	8,0941	1,18
	E	0,0135	-10,00	E	0,8799	-12,01	E	8,5517	6,90
	F	0,0152	1,33	F	1,0219	2,19	F	8,6122	7,65
4η	A	0,0152	1,33	A	1,0145	1,45	A	8,0696	0,87
	B	0,0145	-3,33	B	0,9463	-5,37	B	7,9674	-0,41
	C	0,0160	6,67	C	0,9831	-1,69	C	7,6159	-4,80
	D	0,0153	2,00	D	1,0982	9,82	D	8,3736	4,67
	E	0,0146	-2,67	E	0,9415	-5,85	E	7,9128	-1,09
	F	0,0163	8,67	F	1,0000	0,00	F	7,5638	-5,45
5η	A	0,0152	1,33	A	0,9135	-8,65	A	8,2220	2,78
	B	0,0155	3,33	B	1,0554	5,54	B	7,8620	-1,72
	C	0,0160	6,67	C	0,9993	-0,07	C	7,4491	-6,89
	D	0,0140	-6,67	D	0,9008	-9,92	D	8,2110	2,64
	E	0,0154	2,67	E	1,0495	4,95	E	7,8673	-1,66
	F	0,0150	0,00	F	0,9944	-0,56	F	7,4982	-6,27
	Μέση τιμή	0,01508	0,53	Μέση τιμή	0,990	-1,02	Μέση τιμή	7,92	-0,96
	SD	0,00084		SD	0,055		SD	0,41	
	RSD	5,60		RSD	5,55		RSD	5,14	

Πίνακας 30. Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για τη CBN

Ημέρα	QC1 (0,015 µg/mg)			QC2 (1,00 µg/mg)			QC3 (8,00 µg/mg)		
		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)
1η	A	0,0136	-9,33	A	1,0319	3,19	A	8,1265	1,58
	B	0,0151	0,67	B	1,0765	7,65	B	7,1800	-10,25
	C	0,0137	-8,67	C	0,9965	-0,35	C	7,7071	-3,66
	D	0,0140	-6,67	D	1,0488	4,88	D	7,6746	-4,07
	E	0,0135	-10,00	E	1,0733	7,33	E	7,0842	-11,45
	F	0,0132	-12,00	F	1,0851	8,51	F	7,5904	-5,12
2η	A	0,0139	-7,33	A	1,0954	9,54	A	7,2905	-8,87
	B	0,0155	3,33	B	1,0231	2,31	B	7,4838	-6,45
	C	0,0148	-1,33	C	0,9738	-2,62	C	7,2493	-9,38
	D	0,0140	-6,67	D	1,0845	8,45	D	8,0214	0,27
	E	0,0156	4,00	E	1,0260	2,60	E	7,3976	-7,53
	F	0,0151	0,67	F	1,0460	4,60	F	7,5808	-5,24
3η	A	0,0150	0,00	A	1,0673	6,73	A	7,2610	-9,24
	B	0,0146	-2,67	B	1,1126	11,26	B	8,2262	2,83
	C	0,0145	-3,33	C	1,0579	5,79	C	7,9382	-0,77
	D	0,0155	3,33	D	0,9721	-2,79	D	7,2499	-9,38
	E	0,0149	-0,67	E	0,9698	-3,02	E	8,2218	2,77
	F	0,0153	2,00	F	1,0814	8,14	F	7,8892	-1,39
4η	A	0,0146	-2,67	A	1,0684	6,84	A	7,6918	-3,85
	B	0,0137	-8,67	B	0,9917	-0,83	B	7,4898	-6,38
	C	0,0154	2,67	C	1,0809	8,09	C	7,5622	-5,47
	D	0,0145	-3,33	D	1,0313	3,13	D	8,0842	1,05
	E	0,0144	-4,00	E	1,0685	6,85	E	7,3272	-8,41
	F	0,0164	9,33	F	0,9935	-0,65	F	7,4528	-6,84
5η	A	0,0142	-5,33	A	1,0672	6,72	A	7,9914	-0,11
	B	0,0144	-4,00	B	0,9934	-0,66	B	7,3328	-8,34
	C	0,0161	7,33	C	0,9137	-8,63	C	7,3366	-8,29
	D	0,0149	-0,67	D	1,0849	8,49	D	8,1239	1,55
	E	0,0142	-5,33	E	1,0555	5,55	E	7,4180	-7,27
	F	0,0141	-6,00	F	1,0803	8,03	F	7,4503	-6,87
	Μέση τιμή	0,01462	-2,51	Μέση τιμή	1,042	4,17	Μέση τιμή	7,61	-4,82
	SD	0,00078		SD	0,047		SD	0,34	
	RSD	5,35		RSD	4,53		RSD	4,48	

Πίνακας 31. Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για το THCA

Ημέρα	QC1 (0,06 µg/mg)			QC2 (1,00 µg/mg)			QC3 (8,00 µg/mg)		
		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)
1η	A	0,059	-1,50	A	0,890	-11,00	A	8,554	6,92
	B	0,068	13,17	B	1,075	7,51	B	8,677	8,46
	C	0,062	3,33	C	0,999	-0,07	C	8,206	2,58
	D	0,065	8,17	D	0,910	-9,00	D	7,845	-1,94
	E	0,056	-6,17	E	1,095	9,45	E	8,876	10,94
	F	0,069	14,83	F	1,017	1,68	F	8,788	9,85
2η	A	0,066	9,67	A	0,897	-10,30	A	8,825	10,31
	B	0,066	10,00	B	1,046	4,57	B	7,855	-1,81
	C	0,065	8,67	C	0,959	-4,14	C	8,712	8,91
	D	0,057	-5,67	D	0,945	-5,55	D	8,774	9,68
	E	0,063	5,50	E	1,039	3,85	E	7,487	-6,41
	F	0,066	10,50	F	0,959	-4,14	F	8,272	3,40
3η	A	0,063	4,50	A	0,930	-6,98	A	7,567	-5,41
	B	0,065	8,50	B	1,101	10,10	B	8,703	8,79
	C	0,055	-8,17	C	0,954	-4,62	C	7,917	-1,04
	D	0,067	11,17	D	0,919	-8,11	D	8,485	6,06
	E	0,062	3,83	E	1,016	1,56	E	8,758	9,47
	F	0,056	-7,50	F	1,076	7,56	F	8,394	4,93
4η	A	0,066	9,50	A	0,914	-8,58	A	8,423	5,29
	B	0,056	-6,00	B	1,052	5,17	B	7,782	-2,73
	C	0,061	2,17	C	1,068	6,75	C	8,472	5,91
	D	0,065	8,67	D	0,910	-9,00	D	8,765	9,57
	E	0,055	-8,83	E	1,077	7,65	E	8,205	2,56
	F	0,063	4,83	F	0,996	-0,42	F	8,105	1,31
5η	A	0,067	11,67	A	1,111	11,10	A	8,106	1,32
	B	0,056	-6,67	B	1,109	10,94	B	8,269	3,36
	C	0,064	5,83	C	0,923	-7,68	C	7,655	-4,31
	D	0,064	7,33	D	1,079	7,89	D	7,967	-0,42
	E	0,058	-4,00	E	1,085	8,47	E	8,590	7,38
	F	0,063	4,50	F	1,071	7,08	F	8,049	0,62
	Μέση τιμή	0,0622	3,73	Μέση τιμή	1,007	0,72	Μέση τιμή	8,30	3,78
	SD	0,0043		SD	0,075		SD	0,41	
	RSD	6,94		RSD	7,40		RSD	4,96	

Πίνακας 32. Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για το CBDA

Ημέρα	QC1 (0,06 µg/mg)			QC2 (1,00 µg/mg)			QC3 (8,00 µg/mg)		
		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)
1η	A	0,0633	5,50	A	0,8903	-10,97	A	8,444	5,55
	B	0,0615	2,50	B	1,0557	5,57	B	7,796	-2,56
	C	0,0603	0,50	C	0,9965	-0,35	C	8,550	6,87
	D	0,0654	9,00	D	0,8623	-13,77	D	7,482	-6,47
	E	0,0570	-5,00	E	1,0608	6,08	E	8,721	9,02
	F	0,0619	3,17	F	1,0186	1,86	F	8,817	10,22
2η	A	0,0655	9,17	A	0,8966	-10,34	A	8,621	7,76
	B	0,0636	6,00	B	1,0429	4,29	B	8,736	9,20
	C	0,0567	-5,50	C	0,9797	-2,03	C	8,560	7,00
	D	0,0658	9,67	D	0,9046	-9,54	D	8,503	6,29
	E	0,0608	1,33	E	1,0495	4,95	E	7,672	-4,10
	F	0,0588	-2,00	F	0,9806	-1,94	F	8,861	10,76
3η	A	0,0630	5,00	A	1,0049	0,49	A	7,901	-1,24
	B	0,0576	-4,00	B	1,0686	6,86	B	8,773	9,67
	C	0,0600	0,00	C	0,8910	-10,90	C	8,314	3,93
	D	0,0634	5,67	D	0,9142	-8,58	D	7,775	-2,81
	E	0,0603	0,50	E	1,0559	5,59	E	8,311	3,88
	F	0,0581	-3,17	F	0,9140	-8,60	F	8,683	8,54
4η	A	0,0651	8,50	A	1,0019	0,19	A	8,540	6,76
	B	0,0546	-9,00	B	1,0583	5,83	B	7,435	-7,06
	C	0,0659	9,83	C	1,0693	6,93	C	7,798	-2,53
	D	0,0589	-1,83	D	0,9026	-9,74	D	8,769	9,61
	E	0,0550	-8,33	E	1,0623	6,23	E	8,389	4,86
	F	0,0662	10,33	F	0,9995	-0,05	F	8,185	2,32
5η	A	0,0571	-4,83	A	1,0909	9,09	A	8,020	0,25
	B	0,0602	0,33	B	0,9996	-0,04	B	8,648	8,11
	C	0,0671	11,83	C	0,9917	-0,83	C	7,980	-0,25
	D	0,0569	-5,17	D	1,1110	11,10	D	7,698	-3,78
	E	0,0595	-0,83	E	1,0953	9,53	E	8,124	1,55
	F	0,0648	8,00	F	1,0231	2,31	F	8,049	0,62
	Μέση τιμή	0,0611	1,91	Μέση τιμή	1,000	-0,03	Μέση τιμή	8,27	3,40
	SD	0,0036		SD	0,072		SD	0,43	
	RSD	5,94		RSD	7,18		RSD	5,22	

Πίνακας 33. Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για το CBCA

Ημέρα	QC1 (0,06 µg/mg)			QC2 (1,00 µg/mg)			QC3 (8,00 µg/mg)		
		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)		Ευρεθείσα Συγκέντρωση (µg/mg)	Er (%)
1η	A	0,0645	7,50	A	1,1008	10,08	A	8,8293	10,37
	B	0,0628	4,67	B	1,0667	6,67	B	8,4343	5,43
	C	0,0664	10,67	C	0,9764	-2,36	C	8,3530	4,41
	D	0,0623	3,83	D	1,0943	9,43	D	7,5492	-5,64
	E	0,0594	-1,00	E	1,0568	5,68	E	8,7247	9,06
	F	0,0662	10,33	F	1,1093	10,93	F	8,6363	7,95
2η	A	0,0627	4,50	A	1,0937	9,37	A	7,7342	-3,32
	B	0,0579	-3,50	B	0,9258	-7,42	B	7,1448	-10,69
	C	0,0652	8,67	C	1,0227	2,27	C	8,7499	9,37
	D	0,0588	-2,00	D	1,0827	8,27	D	8,4973	6,22
	E	0,0647	7,83	E	0,9230	-7,70	E	7,1249	-10,94
	F	0,0636	6,00	F	0,9479	-5,21	F	7,7374	-3,28
3η	A	0,0557	-7,17	A	1,0797	7,97	A	7,8955	-1,31
	B	0,0649	8,17	B	0,9187	-8,13	B	8,2621	3,28
	C	0,0584	-2,67	C	1,0675	6,75	C	8,1032	1,29
	D	0,0554	-7,67	D	1,0957	9,57	D	7,4556	-6,81
	E	0,0574	-4,33	E	1,0403	4,03	E	8,7438	9,30
	F	0,0576	-4,00	F	1,0718	7,18	F	8,2556	3,19
4η	A	0,0658	9,67	A	1,1022	10,22	A	8,1563	1,95
	B	0,0567	-5,50	B	0,9479	-5,21	B	7,6673	-4,16
	C	0,0599	-0,17	C	1,0347	3,47	C	8,4344	5,43
	D	0,0635	5,83	D	1,0789	7,89	D	8,5582	6,98
	E	0,0587	-2,17	E	1,0781	7,81	E	8,3991	4,99
	F	0,0635	5,83	F	0,9672	-3,28	F	8,4166	5,21
5η	A	0,0658	9,67	A	1,0530	5,30	A	8,0032	0,04
	B	0,0571	-4,83	B	1,0844	8,44	B	8,3430	4,29
	C	0,0595	-0,83	C	0,9386	-6,14	C	7,7134	-3,58
	D	0,0630	5,00	D	0,9701	-2,99	D	8,3890	4,86
	E	0,0561	-6,50	E	1,0395	3,95	E	8,2998	3,75
	F	0,0652	8,67	F	1,0932	9,32	F	8,0706	0,88
	Μέση τιμή	0,0613	2,15	Μέση τιμή	1,035	3,54	Μέση τιμή	8,16	1,95
	SD	0,0036		SD	0,064		SD	0,46	
	RSD	5,92		RSD	6,16		RSD	5,70	

Κεφάλαιο 9. Εφαρμογές της αναπτυχθείσας μεθόδου σε δείγματα προϊόντων κάνναβης

Η μέθοδος προσδιορισμού των κανναβινοειδών που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε, εφαρμόστηκε στη συνέχεια τόσο σε πεπαλαιωμένα, όσο και σε πρόσφατα δείγματα κάνναβης, με σκοπό την εκτίμηση της σταθερότητας των υπό μελέτη κανναβινοειδών κατά την αποθήκευση των δειγμάτων κάνναβης για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Συνολικά αναλύθηκαν 80 δείγματα κάνναβης, τα οποία χρονολογούνται μεταξύ 1918 και 2019. Τα πεπαλαιωμένα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονται από το Εγκληματολογικό Μουσείο του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας, εκ των οποίων αρκετά είχαν αποσταλεί στο Εργαστήριο από τα Ηνωμένα Έθνη ως δείγματα αναφοράς κατά τη δεκαετία του 1970, ενώ τα πρόσφατα δείγματα παραχωρήθηκαν από το Γενικό Χημείο του Κράτους και αφορούσαν κατασχέσεις των αστυνομικών αρχών της τελευταίας πενταετίας. Από τα 80 δείγματα που αναλύθηκαν, τα 58 αφορούσαν δείγματα ακατέργαστης κάνναβης (μαριχουάνα), τα 13 δείγματα χασίς, τα 6 σπόρους και τα 3 δείγματα φύλλων από δενδρύλλια.



Σχήμα 8. Πεπαλαιωμένα δείγματα κάνναβης. Α) χασίς Β) μαριχουάνα Γ) σπόροι Δ) φύλλα δενδρυλλίων

Οι συγκεντρώσεις των έξι κανναβινοειδών που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης αυτής στα δείγματα που αναλύθηκαν υπολογίστηκαν με τη βοήθεια των αντίστοιχων καμπυλών βαθμονόμησης και παρουσιάζονται στον Πίνακα 34.

Λόγω του μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων ακατέργαστης κάνναβης (μαριχουάνας), αυτά ταξινομήθηκαν, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα, είτε ανά έτη είτε

ανά δεκαετίες, σε 6 ομάδες που αντιστοιχούσαν σε ομάδες διαφορετικών χρονικών περιόδων, και συγκεκριμένα σε δείγματα:

- του 2019 (δείγματα 1-11, δείγματα των τελευταίων 3 μηνών),
- του 2018 (δείγματα 17-21),
- του 2017 (δείγματα 23,24),
- της δεκαετίας του '90 (δείγματα 31-47),
- του '80 (δείγματα 50-56) και
- του '70 (δείγματα 57-64).

Πίνακας 34. Αποτελέσματα των συγκεντρώσεων των 6 κανναβινοειδών σε πεπαλαιωμένα και πρόσφατα δείγματα κάνναβης.

	Είδος δείγματος	Χρονολογία κατάσχεσης	Συγκέντρωση Δ ⁹ -THC (μg/mg)	Συγκέντρωση CBD (μg/mg)	Συγκέντρωση CBN (μg/mg)	Συγκέντρωση THCA (μg/mg)	Συγκέντρωση CBDA (μg/mg)	Συγκέντρωση CBCA (μg/mg)
1	Μαριχουάνα	Μάιος '19	16,37	0,054	6,51	341,08	0,412	11,41
2	Μαριχουάνα	Μάιος '19	47,57	0,657	4,20	149,50	0,625	16,07
3	Μαριχουάνα	Μάιος '19	40,13	21,52	9,87	171,08	12,47	13,36
4	Μαριχουάνα	Μάιος '19	31,43	0,139	11,62	149,80	0,320	11,75
5	Μαριχουάνα	Μάιος '19	65,15	0,314	19,17	112,52	0,425	18,84
6	Μαριχουάνα	Μάιος '19	97,96	0,181	8,09	29,97	0,244	22,38
7	Μαριχουάνα	Μάιος '19	65,84	56,89	6,87	8,62	33,09	12,50
8	Μαριχουάνα	Μάιος '19	21,72	0,196	5,69	384,48	0,938	10,12
9	Μαριχουάνα	Απρίλιος '19	35,95	0,104	11,98	63,96	0,165	6,79
10	Μαριχουάνα	Μάρτιος '19	30,46	0,302	2,76	293,69	0,772	38,12
11	Μαριχουάνα	Μάρτιος '19	63,39	0,089	3,02	367,61	0,399	21,04
12	Μαριχουάνα	Φεβρουάριος '19	5,89	0,170	1,05	642,33	0,653	48,11
13	Μαριχουάνα	Φεβρουάριος '19	29,72	77,14	7,37	1,68	20,04	11,29
14	Μαριχουάνα	Ιανουάριος '19	17,76	0,113	9,05	218,10	0,367	9,98
15	Χασίς	Ιανουάριος '19	23,77	35,42	6,51	116,56	89,91	41,42
16	Φύλλα δενδρυλλίων	Ιανουάριος '19	22,10	0,043	1,04	35,71	0,062	56,05
17	Μαριχουάνα	Ιούλιος '18	47,53	18,85	13,39	46,89	10,70	10,08

18	Μαριχουάνα	Ιούλιος '18	29,49	0,815	9,33	129,96	1,34	6,20
19	Μαριχουάνα	Ιούλιος '18	35,33	0,315	17,39	162,27	0,753	13,91
20	Μαριχουάνα	Ιούνιος '18	36,05	0,111	19,42	42,36	0,177	8,69
21	Μαριχουάνα	Μάιος '18	28,96	0,983	28,45	187,19	0,879	12,43
22	Χασίς	Δεκέμβριος '18	34,00	2,78	15,22	166,45	0,442	9,584
23	Μαριχουάνα	2017	12,06	17,39	9,15	196,58	23,63	12,57
24	Μαριχουάνα	2017	14,06	17,32	29,50	129,07	3,04	10,58
25	Μαριχουάνα	2016	4,37	0,364	8,20	56,26	0,793	5,59
26	Μαριχουάνα	2011	0,352	0,132	16,15	1,62	0,272	7,44
27	Μαριχουάνα	2002	0,872	2,98	7,73	0,915	2,10	2,90
28	Χασίς	2002	0,147	1,82	21,93	2,80	3,49	7,83
29	Μαριχουάνα	2001	0,112	0,471	10,95	1,27	0,26	5,76
30	Μαριχουάνα	2001	0,084	0,615	7,98	1,51	0,866	3,69
31	Μαριχουάνα	'90	0,076	15,78	14,53	0,545	11,58	1,63
32	Μαριχουάνα	'90	0,140	0,774	11,27	3,79	0,534	2,06
33	Μαριχουάνα	'90	0,058	22,35	9,54	0,350	21,76	4,29
34	Μαριχουάνα	'90	0,429	0,133	24,24	0,230	0,081	0,244
35	Μαριχουάνα	'90	0,129	0,058	12,67	4,48	0,167	13,36
36	Μαριχουάνα	'90	0,138	0,033	10,53	2,84	0,140	1,51
37	Μαριχουάνα	'90	0,099	0,036	8,76	2,55	0,078	1,92

38	Μαριχουάνα	´90	0,619	0,172	17,31	24,56	0,332	2,31
39	Μαριχουάνα	´90	0,101	0,026	6,84	0,793	0,055	1,27
40	Μαριχουάνα	´90	0,350	0,101	22,07	12,46	0,229	7,94
41	Μαριχουάνα	´90	0,617	0,264	12,25	3,88	0,325	9,59
42	Μαριχουάνα	´90	0,657	0,146	15,65	12,94	0,487	4,28
43	Μαριχουάνα	´90	0,205	0,051	16,52	6,88	0,179	5,57
44	Μαριχουάνα	´90	0,115	0,144	13,48	2,55	0,186	8,62
45	Μαριχουάνα	´90	0,367	0,088	6,46	9,14	0,212	3,39
46	Μαριχουάνα	´90	1,242	0,413	26,15	21,42	0,711	13,86
47	Μαριχουάνα	´90	0,845	0,013	3,62	3,41	0,043	1,46
48	Φύλλα δενδρυλλίων	´90	0,036	0,061	2,97	1,25	0,172	2,26
49	Φύλλα δενδρυλλίων	´90	0,064	0,274	2,60	4,42	0,424	1,34
50	Μαριχουάνα	´80	0,037	6,67	1,59	0,345	3,70	0,46
51	Μαριχουάνα	´80	0,072	0,546	2,89	3,40	1,40	1,47
52	Μαριχουάνα	´80	0,113	0,424	7,41	1,10	0,403	2,70
53	Μαριχουάνα	´80	0,180	0,256	6,08	1,59	0,273	1,85
54	Μαριχουάνα	´80	0,146	0,045	8,63	2,40	0,099	4,65
55	Μαριχουάνα	´80	0,043	6,63	6,30	0,293	3,82	2,33
56	Μαριχουάνα	´80	0,134	4,04	13,09	1,48	1,07	6,14
57	Μαριχουάνα (Ισπανία, UN)	´70	0,111	0,062	9,68	1,27	0,142	6,58

58	Μαριχουάνα (Ν. Αφρική, UN)	'70	0,414	0,042	24,06	1,51	0,140	22,06
59	Μαριχουάνα (Βραζιλία, UN)	'70	0,062	0,015	12,71	0,290	0,051	2,36
60	Μαριχουάνα (Ινδία, UN)	'70	0,027	0,027	7,60	0,072	0,065	1,84
61	Μαριχουάνα	'70	0,012	0,060	4,09	0,067	0,213	0,507
62	Μαριχουάνα	'70	0,051	0,640	2,88	0,749	0,543	0,763
63	Μαριχουάνα	'70	0,011	0,054	3,31	0,086	0,246	0,651
64	Μαριχουάνα	'70	0,022	0,070	3,87	0,106	0,245	0,416
65	Χασίς (Γερμανία, UN)	'70	0,066	1,91	11,60	15,98	4,06	4,21
66	Χασίς (Βουλγαρία, UN)	'70	0,057	3,83	16,29	2,71	7,32	6,07
67	Χασίς (Γερμανία, UN)	'70	0,062	1,35	11,32	15,66	3,31	3,58
68	Χασίς (Νορβηγία, UN)	'70	0,075	1,15	27,73	0,274	6,48	10,43
69	Σπόροι (Ταϊλάνδη, UN)	'70	<LOD	0,005	0,106	0,035	0,016	0,042
70	Σπόροι (Τουρκία, UN)	'70	0,009	0,022	0,157	0,167	0,080	0,074
71	Σπόροι (Ν. Αφρική, UN)	'70	0,015	0,011	2,24	0,013	0,014	0,097
72	Σπόροι (Νεπάλ, UN)	'70	<LOD	0,008	0,132	0,025	0,033	<LOD
73	Σπόροι	'70	<LOD	0,016	0,274	0,037	0,098	0,085
74	Σπόροι	'70	<LOD	0,005	0,093	0,036	0,014	0,074

75	Χασίς	΄60	0,060	2,70	8,19	2,97	21,95	8,20
76	Χασίς	΄60	0,011	0,36	7,96	0,100	2,00	0,789
77	Χασίς	1924	0,041	2,59	14,28	0,159	8,51	2,41
78	Χασίς	1918	0,048	1,25	9,02	0,642	6,51	2,95
79	Χασίς	1918	0,027	0,981	8,02	0,521	6,61	3,44
80	Χασίς	1918	0,022	0,770	8,80	0,355	7,27	2,81

Τα δείγματα του τριμήνου Μάρτιος-Μάιος του 2019 θεωρήθηκαν πρόσφατα δείγματα, ενώ οι υπόλοιπες πέντε ομάδες αφορούσαν τα πεπαλαιωμένα δείγματα. Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των συγκεντρώσεων των έξι κανναβινοειδών στις πέντε κατηγορίες πεπαλαιωμένων δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις τους στα πρόσφατα δείγματα για να εκτιμηθεί η σταθερότητα των κανναβινοειδών αυτών στα πεπαλαιωμένα δείγματα σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Η % διαφορά στην περιεκτικότητα των έξι κανναβινοειδών στα πεπαλαιωμένα δείγματα στις πέντε διαφορετικές χρονικά ομάδες σε σχέση με τα πρόσφατα δείγματα παρουσιάζεται στον Πίνακα 35.

Πίνακας 35. Η % διαφορά των συγκεντρώσεων των κανναβινοειδών στα πεπαλαιωμένα δείγματα διαφορετικών περιόδων σε σχέση με πρόσφατα δείγματα μαριχουάνας

Αναλύτης	2018	2017	'90	'80	'70
Δ⁹-THC	-24%	-72%	-99.2%	-99.8%	-99.9%
CBN	+71.5%	+122%	-30% *	-66% *	**
THCA	-45%	**	-96%	-99%	-99.7%
CBDA	-35%	**	-56%	-69%	-96%
CBCA	-40%	**	-70%	-83%	-90%

*Σε σύγκριση με τα δείγματα του 2017

**Μεγάλες διακυμάνσεις

Όπως φαίνεται και στους Πίνακες 34 και 35 η περιεκτικότητα των δειγμάτων μαριχουάνας σε Δ⁹-THC παρουσιάστηκε σημαντικά μειωμένη ακόμη και στα δείγματα ηλικίας ενός και δύο ετών, δηλαδή στα δείγματα του 2018 και 2017. Μετά το 2017 η πτώση στην περιεκτικότητα των δειγμάτων σε Δ⁹-THC ήταν μεγάλη. Στα δείγματα των δεκαετιών '90, '80 και '70 η μείωση αυτή πλησίαζε σχεδόν το 100% σε σύγκριση με τα νεότερα δείγματα, ωστόσο σε όλα υπήρχε υπολογίσιμη ποσότητα Δ⁹-THC. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα Δ⁹-THC σε δείγμα μαριχουάνας βρέθηκε σε πρόσφατο δείγμα (97,96 μg/mg φυτού) ενώ η μικρότερη βρέθηκε σε δείγμα της δεκαετίας του '70 (0,011 μg/mg φυτού).

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων μαριχουάνας σε CBD εμφάνιζε μεγάλες διακυμάνσεις (από 0,013 μέχρι 77,144 μg/mg φυτού). Τα περισσότερα δείγματα περιείχαν χαμηλή συγκέντρωση της CBD (< 1 μg/mg φυτού), ωστόσο τόσο στα διαφορετικών περιόδων πεπαλαιωμένα όσο και στα πρόσφατα δείγματα, υπήρχαν

δείγματα με πολύ υψηλή συγκέντρωση CBD. Για το λόγο αυτό, δεν ήταν εφικτό να γίνει εκτίμηση της σταθερότητας της CBD, καθώς το στατιστικό σφάλμα που προέκυπτε ήταν υψηλό.

Όσον αφορά στην περιεκτικότητα σε CBN στα δείγματα μαριχουάνας, αρχικά παρατηρήθηκε αύξηση στα δείγματα του 2018 και 2017 σε σχέση με τα δείγματα του 2019. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην οξειδωτική διάσπαση της Δ^9 -THC σε CBN κατά την αποθήκευση. Ωστόσο, στα δείγματα των παλαιότερων δεκαετιών, παρατηρήθηκε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε CBN σε σύγκριση με τα δείγματα του 2017, υποδηλώνοντας την καταστροφή και της CBN με την πάροδο του χρόνου.

Η περιεκτικότητα των δειγμάτων μαριχουάνας στα οξέα THCA, CBDA και CBCA μειωνόταν με την πάροδο του χρόνου, υποδηλώνοντας την καταστροφή τους. Το CBDA παρουσίασε το μικρότερο ποσοστό μείωσης, στα πρώτα χρόνια και δεκαετίες, σε σύγκριση με τα άλλα δύο, υποδηλώνοντας έτσι ότι είναι το πιο σταθερό από τα τρία οξέα. Τα δείγματα του 2017 παρουσίαζαν μεγάλες διαφορές στην περιεκτικότητά τους στα τρία οξέα, επομένως δεν μπορούσε να γίνει εκτίμηση της σταθερότητας τους λόγω σημαντικού στατιστικού σφάλματος.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα προϊόντα χασίς έχουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC από τα δείγματα της μαριχουάνας. Ωστόσο, τα δείγματα χασίς που αναλύθηκαν δεν εμφάνιζαν σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητά τους σε Δ^9 -THC από τα δείγματα μαριχουάνας. Επίσης η πτώση στην περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC ήταν αντίστοιχη με αυτή στα δείγματα μαριχουάνας. Στην περίπτωση των τριών οξέων όμως, THCA, CBDA και CBCA, η σταθερότητα τους στα δείγματα χασίς ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με τα δείγματα μαριχουάνας.

Τα 4 από τα 6 δείγματα των σπόρων (69,72,73,74) δεν περιείχαν ανιχνεύσιμη ποσότητα Δ^9 -THC, ενώ τα άλλα δύο (70,71) περιείχαν πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC, αλλά και στα άλλα κανναβινοειδή. Τα φύλλα από δενδρύλλια της δεκαετίας του '90 (48,49) περιείχαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC, από τα δείγματα μαριχουάνας και χασίς.

Σε μερικά από τα δείγματα της δεκαετίας του '70 ήταν γνωστή η χώρα προέλευσης των δειγμάτων. Όσον αφορά τα δείγματα χασίς, αυτά παρουσίαζαν παρόμοια περιεκτικότητα σε Δ^9 -THC, ανεξαρτήτως προέλευσης. Από τα δείγματα μαριχουάνας από διάφορες χώρες της δεκαετίας '70 παρατηρήθηκε ότι μεγαλύτερη περιεκτικότητα είχε το δείγμα προέλευσης Νότιας Αφρικής (58), ακολουθούμενο από

το δείγμα Ισπανίας (57), ενώ τη μικρότερη περιεκτικότητα είχε το δείγμα Ινδικής προέλευσης (60).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο προσδιορισμός της ηλικίας των δειγμάτων της κάνναβης που αφορούν δικαστικές υποθέσεις έχει ιδιαίτερη σημασία για τον εντοπισμό της προέλευσής τους και για την παλαιότητά τους. Στο δικαστήριο συχνά γίνεται αναφορά στην περιεκτικότητα των δειγμάτων κάνναβης στα τρία δραστικά συστατικά, της Δ⁹-THC, της CBD και της CBN, τα οποία χρησιμοποιούνται για ιατροδικαστικούς σκοπούς, όπως για την εκτίμηση των τοξικολογικών ιδιοτήτων ενός κατασχεθέντος δείγματος ή για τον προσδιορισμό των ψυχοδραστικών συστατικών του ή για το στάδιο ωρίμανσης του φυτού και τη σχετική δραστηριότητα των συστατικών του. Μέχρι πρότινος, η παλαιότητα των δειγμάτων κάνναβης προσδιοριζόταν μόνο από την περιεκτικότητά τους σε CBN, η οποία αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, λόγω της οξείδωσης της Δ⁹-THC, γεγονός που οδηγούσε σε εσφαλμένα αποτελέσματα αφού η παραγόμενη CBN προέρχεται όχι μόνο από την οξείδωση της Δ⁹-THC, αλλά και από την οξείδωση του THCA σε CBNA, το οποίο με τη σειρά του μετατρέπεται σε CBN.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του ρόλου που διαδραματίζει ο χρόνος στην αποθήκευση των δειγμάτων κάνναβης. Αυτό αποτυπώνεται στη μελέτη της σταθερότητας έξι σημαντικών κανναβινοειδών σε δείγματα κάνναβης, κατά την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διάστημα, με σκοπό τον προσδιορισμό της παλαιότητάς τους. Λίγα στοιχεία είναι δημοσιευμένα στην επιστημονική βιβλιογραφία σχετικά με τη σταθερότητα των κανναβινοειδών και κυρίως αφορούν δεδομένα μικρά χρονικά διαστήματα, συνήθως έως πέντε έτη. Για να επιτευχθεί ο στόχος αυτός ήταν αναγκαία η ανάπτυξη κατάλληλης μεθοδολογίας για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των κανναβινοειδών σε δείγματα κάνναβης και στη συνέχεια η εφαρμογή της σε πρόσφατα και πεπαλαιωμένα δείγματα κάνναβης.

Στο πλαίσιο της διπλωματικής αυτής εργασίας που εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών έγινε ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση κατάλληλης μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των έξι κανναβινοειδών, Δ⁹-THC, CBD, CBN, THCA, CBDA και CBCA, με τη χρήση της τεχνικής GC-MS, που αποτελεί μία από τις κύριες αναλυτικές τεχνικές σε κάθε τοξικολογικό εργαστήριο παγκοσμίως.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει αρχικά την απομόνωση των υπό μελέτη κανναβινοειδών μέσω της εκχύλισής τους από τα δείγματα κάνναβης με τη χρήση μίγματος διαλυτών εξανίου: οξικού αιθυλεστέρα (6:4, v/v). Η εκχύλιση αυτή γινόταν στους υπερήχους, για 30 min, για αύξηση της ανάκτησης των κανναβινοειδών από τα δείγματα κάνναβης. Μετά την απομόνωση των ουσιών γινόταν παραγωγοποίησή τους με τη χρήση του αντιδραστηρίου BSTFA με 1% TMCS σε θερμοκρασία 70⁰ C για 30 min, με σκοπό την ανάλυση των υπό εξέταση ενώσεων που δεν μπορούν να αναλυθούν στη μορφή οξέος που βρίσκονται, τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς όλων των αναλυτών που διαθέτουν λειτουργικές ομάδες και κυρίως αυτών που διαθέτουν καρβοξυλομάδες, καθώς επίσης και την αύξηση της πτητικότητας των ουσιών αυτών, και τέλος ένεση στο χρωματογραφικό σύστημα GC-MS.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο πλαίσιο της διπλωματικής αυτής εργασίας χαρακτηρίζεται από:

- τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των έξι κανναβινοειδών (Δ^9 -THC, CBD, CBN, THCA, CBDA και CBCA) σε δείγματα κάνναβης
- την εύκολη και αναπαραγώγιμη διαδικασία εκχύλισης των κανναβινοειδών από τα δείγματα κάνναβης
- την κοινή μέθοδο παραγωγοποίησης και για τους 6 αναλύτες παρόλο που διαθέτουν διαφορετικές λειτουργικές ομάδες
- την επικύρωση της μεθόδου σύμφωνα με διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες
- τα χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και συνεπώς υψηλή ευαισθησία (Το LOQ ήταν 0,005 $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού για τις Δ^9 -THC, CBD και CBN και 0,02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού για τα THCA, CBDA και CBCA)
- το μεγάλο δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων που καλύπτει τόσο τα χαμηλά επίπεδα των κανναβινοειδών στα πεπαλαιωμένα δείγματα όσο και τα υψηλότερα επίπεδα των πιο πρόσφατων δειγμάτων (εύρος συγκεντρώσεων 0,005-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού για τις Δ^9 -THC, CBD και CBN και 0,02-10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ φυτού για τα THCA, CBDA και CBCA)
- την υψηλή γραμμικότητα ($R^2 \geq 0.99$) και για τα έξι κανναβινοειδή στο σύνολο των πέντε διαφορετικών καμπυλών αναφοράς για τις πέντε διαφορετικές μέρες ανάλυσης
- στοιχεία για τη μελέτη ειδικότητας ως προς πιθανούς ρυπαντές

- την υψηλή επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα
- την υψηλή ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Σε σχέση με άλλες δημοσιευμένες εργασίες που χρησιμοποιούν την αέρια χρωματογραφία για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών σε δείγματα προϊόντων κάνναβης η αναπτυχθείσα μέθοδος πλεονεκτεί καθότι:

- περιλαμβάνει το στάδιο της παραγωγοποίησης, διασφαλίζοντας τόσο την ανίχνευση των κανναβινολικών οξέων που μελετώνται, όσο και την αποφυγή εσφαλμένων αποτελεσμάτων λόγω της αποκαρβοξυλίωσης τους στο σημείο εισαγωγής δείγματος στον αέριο χρωματογράφο και της μετατροπής τους στις αντίστοιχες ουδέτερες ενώσεις. Το στάδιο αυτό παραλείπεται σε πληθώρα μεθόδων, κυρίως παλαιότερων, που χρησιμοποιούν την τεχνική GC-MS (Omar et al., 2013; Bruci et al., 2012; Gambaro et al., 2002) οδηγώντας σε εσφαλμένα αποτελέσματα όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των κανναβινοειδών στα δείγματα κάνναβης,
- προσδιορίζει ταυτόχρονα έξι διαφορετικά κανναβινοειδή, εν αντιθέσει με τις περισσότερες άλλες δημοσιευμένες μεθόδους που προσδιορίζουν κυρίως είτε μόνο το κύριο δραστικό συστατικό της κάνναβης, τη Δ^9 -THC (Ross et al., 2000; Hewavitharana et al., 2005; Stefanidou 1998) είτε τα τρία κυριότερα συστατικά της, τη Δ^9 -THC, τη CBD και τη CBN (Casiraghi et al., 2017; Ilias et al., 2005; Bruci et al., 2012)
- έχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης ή/και ποσοτικοποίησης συγκριτικά με άλλες μεθόδους [Ibrahim et al., 2017; Gambaro et al., 2002], άρα και υψηλότερη ευαισθησία
- παρουσιάζει μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων σε σύγκριση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους
- είναι πλήρως επικυρωμένη κάτι το οποίο δε συμβαίνει με όλες τις αντίστοιχες μεθόδους σε σχετικές (κυρίως παλαιότερες) δημοσιευμένες εργασίες (De Oliveira et al., 2008; Mehmedic et al., 2010).

Η αναπτυχθείσα μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε τοξικολογικά και εγκληματολογικά εργαστήρια για τον προσδιορισμό της χημικής σύνθεσης των δειγμάτων και της περιεκτικότητας σε κανναβινοειδή των διαφόρων κατασχεθέντων προϊόντων κάνναβης για τον προσδιορισμό του τύπου ή της γεωγραφικής προέλευσης της κάνναβης (Stefanidou et al., 2000), αλλά και σε μελλοντικές επιστημονικές

εργασίες που αφορούν στη μελέτη σταθερότητας των κανναβινοειδών σε δείγματα κάνναβης.

Η μέθοδος προσδιορισμού των κανναβινοειδών που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στη συνέχεια τόσο σε πεπαλαιωμένα όσο και σε πρόσφατα δείγματα, με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό των κανναβινοειδών (Πίνακας 34) και την εκτίμηση της σταθερότητας αυτών στα δείγματα κάνναβης, κατά την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα μαριχουάνας ταξινομήθηκαν σε ομάδες διαφορετικών χρονικών περιόδων και υπολογίστηκε η % διαφορά στην περιεκτικότητα των κανναβινοειδών στις ομάδες αυτές, σε σύγκριση με τα πρόσφατα δείγματα του 2019, όπως φαίνεται στον Πίνακα 35. Τα αποτελέσματα σταθερότητας που ελήφθησαν από την ανάλυση των δειγμάτων συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα άλλων δημοσιευμένων εργασιών.

Σε μια μελέτη των Zamengo et al., ελέγχθηκε η επίδραση του χρόνου και διαφόρων συνθηκών αποθήκευσης στην περιεκτικότητα των κύριων κανναβινοειδών Δ⁹-THC, CBD και CBN για 4 χρόνια. Η μείωση της περιεκτικότητας της Δ⁹-THC στα δείγματα που αναλύθηκαν ήταν ίδια μετά τον πρώτο χρόνο αποθήκευσης, ενώ στο δεύτερο χρόνο ήταν μικρότερη (50%) σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης (72%). Η πλήρης αποικοδόμηση της Δ⁹-THC μετά από 4 χρόνια, που αναφέρεται στην εργασία αυτή, δεν επιβεβαιώθηκε στη δική μας μελέτη, καθότι όλα τα δείγματα μαριχουάνας, ακόμη και πολλών δεκαετιών, είχαν ανιχνεύσιμη ποσότητα Δ⁹-THC. Όσον αφορά τη CBN, οι συγγραφείς δηλώνουν ότι παρουσιάζει παρόμοια αύξηση της συγκέντρωσης στα δύο πρώτα έτη αποθήκευσης, λόγω όμως του μικρότερου χρονικού διαστήματος αποθήκευσης των δειγμάτων, δεν παρατηρήθηκε η μείωση, άρα και καταστροφή της CBN, με την πάροδο των χρόνων, όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης. Τέλος, η CBD παρατηρήθηκε σταθερή κατά την αποθήκευση (Zamengo et al., 2019). Ωστόσο, στη δική μας μελέτη, λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων σε CBD που παρουσίαζαν τα δείγματα που μελετήθηκαν, δεν ήταν εφικτό να εξαχθεί συμπέρασμα σχετικά με τη σταθερότητά της.

Σε άλλη αντίστοιχη μελέτη (Lindholst C., 2010) μελετήθηκε η σταθερότητα τεσσάρων κανναβινοειδών, των Δ⁹-THC, CBN, CBD και CBG σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης. Παρατηρήθηκε εκθετική μείωση στην περιεκτικότητα σε THCA, που συμπίπτει με παρόμοια αύξηση στα επίπεδα της Δ⁹-THC, κατά τον πρώτο χρόνο αποθήκευσης. Για το λόγο αυτό, εμφανίζεται μετά τον πρώτο χρόνο μια αρχική

αύξηση στη συγκέντρωση της Δ^9 -THC. Στη δική μας μελέτη τέτοια αύξηση στην περιεκτικότητα της Δ^9 -THC δεν παρατηρήθηκε. Από την άλλη, ο μικρότερος ρυθμός καταστροφής της Δ^9 -THC σε σχέση με το THCA, όπως αναφέρουν οι συγγραφείς, επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης. Η CBN φαίνεται να αυξάνεται εκθετικά, όπως και στη δική μας μελέτη, ενώ όσον αφορά στη CBD, εμφανίστηκε μόνο μικρή μείωση στη συγκέντρωσή της, υποδηλώνοντας ότι είναι σχετικά σταθερή κατά την αποθήκευση.

Τέλος, στη σχετικά πρόσφατη βιβλιογραφία, υπάρχει η τάση καθορισμού και χρήσης συγκεκριμένων δεικτών για την εκτίμηση της ηλικίας των δειγμάτων με τον υπολογισμό των λόγων των συγκεντρώσεων συγκεκριμένων κανναβινοειδών. Έτσι, σε μια δημοσιευμένη εργασία των Taschwer et al., όπου έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των συγκεντρώσεων των Δ^9 -THC και THCA, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ο λόγος των συγκεντρώσεων $THC/THCA$ για τον διαχωρισμό φρέσκων δειγμάτων από τα δείγματα ενός έτους και άνω. Η εργασία υποστηρίζει ότι ο λόγος αυτός είναι μικρότερος του 0,2 στα φρέσκα δείγματα, ενώ στα δείγματα ενός έτους και άνω είναι μεγαλύτερος του 0,4 (Taschwer et al., 2015). Οι δείκτες αυτοί δεν επιβεβαιώθηκαν από την ανάλυση των δειγμάτων μας, καθώς, τόσο σε δείγματα του 2019 ο λόγος αυτός ήταν πάνω από 0,4, όσο και σε παλαιότερα δείγματα ο λόγος αυτός ήταν κάτω του 0,1.

Σε αντίστοιχη μελέτη των Ross και ElSohly, προτάθηκε ως δείκτης εκτίμησης της παλαιότητας των δειγμάτων κάνναβης ο λόγος CBN/THC . Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη, η ανάλυση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των κανναβινοειδών έγιναν με τη χρήση GC-MS παραλείποντας το στάδιο της παραγωγοποίησης, οδηγώντας στην εσφαλμένη εκτίμηση της συγκέντρωσης της Δ^9 -THC, καθώς μέρος αυτής οφειλόταν στην αποκαρβοξυλίωση του αντίστοιχου οξέος στο σημείο εισαγωγής δείγματος. Ως εκ τούτου, και οι τιμές που αναφέρονται ως δείκτες είναι εσφαλμένες (Ross and ElSohly, 1997).

Στηριζόμενοι στην παραπάνω εργασία, επιχειρήθηκε ο καθορισμός τιμών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως τέτοιοι δείκτες. Για το λόγο αυτό, υπολογίστηκε τόσο ο λόγος CBN/THC όσο και ο λόγος $CBN/THC + THCA$. Από τα αποτελέσματα για τους δύο προτεινόμενους δείκτες, όπως φαίνονται από τον Πίνακα 35 (χωρίς τα δείγματα σπόρων στα οποία η Δ^9 -THC < LOD), βρέθηκε ότι:

- Όταν $CBN/THC < 2,10$, τότε το δείγμα κάνναβης είναι της τελευταίας τριετίας, ενώ όταν $CBN/THC > 2,10$, είναι παλαιότερο.
- Όταν $CBN/THC + THCA < 0,25$, τότε το δείγμα κάνναβης είναι της τελευταίας τριετίας, ενώ όταν $CBN/THC + THCA > 0,25$, είναι παλαιότερο.

Πίνακας 36. Τιμές προτεινόμενων δεικτών για την εκτίμηση της παλαιότητας των δειγμάτων κάνναβης

	Χρονολογία κατάσχεσης	CBN/THC	$CBN/THC + THCA$
1	Μάιος '19	0,3977	0,0182
2	Μάιος '19	0,0883	0,0213
3	Μάιος '19	0,2460	0,0467
4	Μάιος '19	0,3697	0,0641
5	Μάιος '19	0,2942	0,1079
6	Μάιος '19	0,0826	0,0632
7	Μάιος '19	0,1043	0,0923
8	Μάιος '19	0,2620	0,0140
9	Απρίλιος '19	0,3332	0,1199
10	Μάρτιος '19	0,0906	0,0085
11	Μάρτιος '19	0,0476	0,0070
12	Φεβρουάριος '19	0,1783	0,0016
13	Φεβρουάριος '19	0,2480	0,2347
14	Ιανουάριος '19	0,5096	0,0384
15	Ιανουάριος '19	0,2739	0,0464
16	Ιανουάριος '19	0,0471	0,0180
17	2018	0,2817	0,1418
18	2018	0,3164	0,0585
19	2018	0,4922	0,0880
20	2018	0,5387	0,2477
21	2018	0,9824	0,1316
22	2018	0,4476	0,0759
23	2017	0,7587	0,0439
24	2017	2,0982	0,2061
25	2016	1,8764	0,1352
26	2011	45,8807	8,1897
27	2002	8,8647	4,3257
28	2002	149,1837	7,4415
29	2001	97,7679	7,9233
30	2001	95,0000	5,0063
31	'90	191,1842	23,3977

32	'90	80,5000	2,8677
33	'90	164,4828	23,3824
34	'90	56,5035	36,7830
35	'90	98,2171	2,7490
36	'90	76,3043	3,5359
37	'90	88,4848	3,3069
38	'90	27,9645	0,6875
39	'90	67,7228	7,6510
40	'90	63,0571	1,7229
41	'90	19,8541	2,7240
42	'90	23,8204	1,1510
43	'90	80,5854	2,3317
44	'90	117,2174	5,0582
45	'90	17,6022	0,6795
46	'90	21,0548	1,1539
47	'90	4,2840	0,8508
48	'90	82,5000	2,3095
49	'90	40,6250	0,5798
50	'80	42,9730	4,1623
51	'80	40,1389	0,8324
52	'80	65,5752	6,1088
53	'80	33,7778	3,4350
54	'80	59,1096	3,3896
55	'80	146,5116	18,7500
56	'80	97,6866	8,1103
57	'70	87,2072	7,0094
58	'70	58,1159	12,5052
59	'70	205,0000	36,1080
60	'70	281,4815	76,7677
61	'70	340,8333	51,7722
62	'70	56,4706	3,6000
63	'70	300,9091	34,1237
64	'70	175,9091	30,2344
65	'70	175,7576	0,7229
66	'70	285,7895	5,8872
67	'70	182,5806	0,7200
68	'70	369,7333	79,4556
70	'70	17,4444	0,8920
71	'70	149,3333	80,0000
75	'60	136,5000	2,7030
76	'60	723,6364	71,7117
77	1924	348,2927	71,4000
78	1918	187,9167	13,0725

79	1918	297,0370	14,6350
80	1918	400,0000	23,3422

Η εκτίμηση της σταθερότητας των υπό μελέτη κανναβινοειδών στη μελέτη αυτή έγινε λαμβάνοντας υπόψιν περιορισμούς, οι οποίοι δεν ήταν εύκολο να προσπεραστούν στο πλαίσιο της διπλωματικής αυτής εργασίας. Οι περιορισμοί αυτοί ήταν οι ακόλουθοι:

- Έγινε ανάλυση διαφορετικών φυτών σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, και όχι ανάλυση των ίδιων δειγμάτων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους.
- Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν ήταν γνωστός ο χρόνος συγκομιδής των δειγμάτων αλλά ο χρόνος κατάσχεσής τους, επομένως η ηλικία του φυτού μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από αυτήν που έχει δηλωθεί.
- Η σταθερότητα των κανναβινοειδών στα δείγματα χασίς δεν κατέστη εφικτό να εκτιμηθεί λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που ήταν διαθέσιμα.
- Στην πλειοψηφία των δειγμάτων δεν είναι γνωστή ούτε η προέλευση, ούτε η φάση ανάπτυξης του φυτού κατά την οποία έγινε η συγκομιδή του.

Η συνέχιση της μελέτης αυτής με την:

- α) ανάλυση των κανναβινοειδών και στα ίδια δείγματα κάνναβης τα οποία θα φυλάσσονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα και
- β) ενσωμάτωση και άλλων σημαντικών κανναβινοειδών, όπως κανναβιγερόλη, κανναβιχρωμένιο κ.ά., στα ήδη υπάρχοντα της μελέτης αυτής θα οδηγήσει σε πιο ασφαλή και ολοκληρωμένα συμπεράσματα όσον αφορά τη σταθερότητα των κανναβινοειδών στα δείγματα κάνναβης για μεγάλα χρονικά διαστήματα και πιθανότατα στον καθορισμό και άλλων σημαντικών δεικτών εκτίμησης της παλαιότητας των δειγμάτων κάνναβης.

Η θέσπιση προγνωστικών μοντέλων για ιατροδικαστικούς σκοπούς βασίζεται στην αρχική συγκέντρωση της Δ^9 -THC σε ένα δείγμα κάνναβης και στον επαναπροσδιορισμό της Δ^9 -THC σε τακτά χρονικά διαστήματα κατά την αποθήκευση δειγμάτων με σκοπό τον καθορισμό της πιθανής ηλικίας του δείγματος κάνναβης.

Τέλος, η γνώση που αποτυπώθηκε από τη μελέτη αυτή σχετικά με τη σταθερότητα των κανναβινοειδών οδηγεί στη λήψη μέτρων για την ασφαλή αποθήκευση των δειγμάτων, το σωστό χειρισμό τους και την ερμηνεία των αναλυτικών αποτελεσμάτων, βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο στο έργο των ιατροδικαστικών επιστημών.

Βιβλιογραφία

- Αράπη Ειρήνη και Αποστόλου Αικατερίνη, Πτυχιακή εργασία «Οι θεραπευτικές ιδιότητες της κάνναβης στους καρκινοπαθείς», 2016
- Γρίβας Κ., (2001) «Κάνναβη, Μαριχουάνα, Χασίς», Εκδόσεις Α. Λιβάνη.
- Κουτσελίνης Α., (2002) «Εξαρτησιογόνες ουσίες», Εκδόσεις Παριζιάνου.
- Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., & Usobiaga, A. (2014). Identification and quantification of cannabinoids in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(29), 7549–7560.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydaner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Usobiaga, A. (2016). Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 79(2), 324–331.
- Ameer, S., Haddou, B., Derriche, Z., Canselier, J. P., & Gourdon, C. (2013). Cloud point extraction of Δ^9 -tetrahydrocannabinol from cannabis resin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), 3117–3123.
- Andreae, M. H., Carter, G. M., Shaparin, N., Suslov, K., Ellis, R. J., Ware, M. A., et al. (2015), 'Inhaled cannabis for chronic neuropathic pain: a meta-analysis of individual patient data', *Journal of Pain* 16, pp. 1221-1232.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., et al. (2008). Antibacterial cannabinoids from cannabis sativa: A structure–activity study. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1427–1430.
- Ashton, C.H. Adverse effects of cannabis and cannabinoids. *Br. J. Anaesth.* 1999, 83, 637–649.
- Baek, S., Kim, Y. O., Kwag, J. S., Choi, K. E., Jung, W. Y., & Han, D. S. (1998). Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 21(3), 353–356.
- Banerjee, S. P., Snyder, S. H., & Mechoulam, R. (1975). Cannabinoids: Influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 194(1), 74–81.
- Baranchuk, A., Johri, A. M., Simpson, C. S., Methot, M., & Redfearn, D. P. (2008). Ventricular fibrillation triggered by marijuana use in a patient with

ischemic cardiomyopathy: A case report. *Cases Journal*, 1, 373.
<https://doi.org/10.1186/1757-1626-1-373>

- Baranchuk, A., Johri, A. M., Simpson, C. S., Methot, M., Redfearn, D. P. (2008). Ventricular fibrillation triggered by marijuana use in a patient with ischemic cardiomyopathy: A case report. *Cases Journal*, 1, 373.
- Barann M, Molderings G, Brüss M, Bönisch H, Urban BW, Göthert M. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT_{3A} receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol*. 2002; 137:589.
- Beal, J. E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J. O., Bellman, P., Yangco, B., et al. (1995), 'Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS', *Journal of Pain and Symptom Management* 10, pp. 89-97.
- Bloom, J. W., Kaltenborn, W. T., Paoletti, P., Camilli, A., and Lebowitz, M. D. (1987) Respiratory effects of non-tobacco cigarettes. *Br. Med. J. Clin. Res. Ed.* 295(6612), 1516–1518.
- Bolognini D, Cascio MG, Parolaro D, Pertwee RG. AM630 behaves as a protean ligand at the human cannabinoid CB2 receptor. *Br J Pharmacol*. 2012; 165:2561.
- Bolognini D, Costa B, Maione S, Comelli F, Marini P, Di Marzo V, Parolaro D, Ross RA, Gauson LA, Cascio MG, Pertwee RG. The plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabivarin can decrease signs of inflammation and inflammatory pain in mice. *Br J Pharmacol*. 2010; 160:677.
- Bolognini, D., Rock, E. M., Cluny, N. L., Cascio, M. G., Limebeer, C. L., Duncan, M., et al. (2013). Cannabidiolic acid prevents vomiting in *Suncus murinus* and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT_{1A} receptor activation. *British Journal of Pharmacology*, 168(6), 1456–1470.
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., & Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 300–315.
- Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacother* 2013;33:195-209.
- Breivogel, C. S., & Childers, S. R. (1998). The Functional Neuroanatomy of Brain Cannabinoid Receptors. *Neurobiology of Disease*, 5(6), 417–431.

- Bridgeman, M. B., & Abazia, D. T. (2017). Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 42(3), 180–188.
- Bruci, Z., Papoutsis, I., Athanaselis, S., Nikolaou, P., Pazari, E., Spiliopoulou, C., & Vyshka, G. (2012). First systematic evaluation of the potency of Cannabis sativa plants grown in Albania. *Forensic Science International*, 222(1–3), 40–46.
- Caiaffa, W.T., Vlahov, D., Graham, N. M., et al. (1994) Drug smoking, Pneumocystis carinii pneumonia, and immunosuppression increase risk of bacterial pneumonia in human immunodeficiency virus-seropositive injection drug users. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150, 1493–1498.
- Cardenia, V., Gallina Toschi, T., Scappini, S., Rubino, R. C., & Rodriguez-Estrada, M. T. (2018). Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1283–1292.
- Cascio, M. G., & Pertwee, R. G. (2014). Known pharmacological actions of nine non-psychoactive phytocannabinoids. In R. G. Pertwee (Ed.), *Handbook of cannabis* (pp. 137–156). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Cascio, M. G., Gauson, L. A., Stevenson, L. A., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2010). Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent α_2 -adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT_{1A} receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 159(1), 129–141.
- Casiraghi, A., Roda, G., Casagni, E., Cristina, C., Musazzi, U., Franzè, S., Rocco, P., Giuliani, C., Fico, G., Minghetti, P. & Gambaro, V. (2017). Extraction Method and Analysis of Cannabinoids in Cannabis Olive Oil Preparations. *Planta medica*. 84. 10.1055/s-0043-123074.
- Castellanos, D., & Gralnik, L. M. (2016). Synthetic cannabinoids 2015: An update for pediatricians in clinical practice. *World journal of clinical pediatrics*, 5(1), 16–24.
- Cawthorne, M. A., Wargent, E., Zaibi, M., Stott, C., & Wright, S. (2007). The CB₁ antagonist, delta-9-tetrahydrocannabivarin (THCV) has anti-obesity activity in dietary-induced obese (DIO) mice. In Presented at the 17th annual

symposium on the cannabinoids, Saint-Sauveur, Quebec (p. 141). Canada: International Cannabinoid Research Society.

- Chandra S, Lata H, Khan IA, ElSohly MA (2008) Photosynthetic response of *C. sativa* L. to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO₂ conditions. *Physiol Mol Biol Plants* 14:299
- Christian Lindholm (2010): Long term stability of cannabis resin and cannabis extracts, *Australian Journal of Forensic Sciences*, 42:3, 181-190
- Ciolino, L. A., Ranieri, T. L., & Taylor, A. M. (2018a). Commercial cannabis consumer products part 1: GC–MS qualitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Science International*, 289, 429–437.
- Ciolino, L. A., Ranieri, T. L., & Taylor, A. M. (2018b). Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids. *Forensic Science International*, 289, 438–447.
- Citti, C., Ciccarella, G., Braghiroli, D., Parenti, C., Vandelli, M., Cannazza, G. (2016). Medicinal Cannabis: principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 128.
- Collin, C., Ehler, E., Waberzinek, G., Alsindi, Z., Davies, P. and Powell, K., et al. (2010), ‘A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group study of Sativex, in subjects with symptoms of spasticity due to multiple sclerosis’, *Neurological Research* 32, pp. 451-459.
- Crippa JA, Zuardi AW, Martin-Santos R, et al. Cannabis and anxiety: a critical review of the evidence. *Hum Psychopharmacol* 2009;24:515-523.
- Crippa JAS, Derenusson GN, Ferrari TB, et al. Neural basis of anxiolytic effects of cannabidiol (CBD) in generalized social anxiety disorder: a preliminary report. *J Psychopharmacol* 2011;25: 121-130.
- De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., Verstraete, A., Hubert, P. & Charlier, C. (2009). Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 877. 4115-24.

- De Boer, J. Z., & Hale, J. R. (2000). The geological origins of the oracle at Delphi, Greece. *Geological Society, London, Special Publications*, 171(1), 399–412.
- De Lago, E., & Fernandez-Ruiz, J. (2007). Cannabinoids and neuroprotection in motor-related disorders. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 6(6), 377–387]
- De Meijer, E.P.M., van der Kamp, H.J., & van Eeuwijk, F.A. (1992). Characterisation of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica*, 62(3), 187–200.
- De Meijer E.P.M, Bagatta M, Carboni A, Crucitti P, Moliterni VMC, Ranalli P, Mandolino G (2003) The inheritance of chemical phenotype in *C. sativa* L. *Genetics* 163:335.
- De Oliveira, G. L., Voloch, M. H., Sztulman, G. B., Neto, O. N., & Yonamine, M. (2008). Cannabinoid contents in cannabis products seized in São Paulo, Brazil, 2006-2007. *Forensic Toxicology*, 26(1), 31–35.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allar M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol*. 2011; 163:1479.
- DeLong, G. T., Wolf, C. E., Poklis, A., & Lichtman, A. H. (2010). Pharmacological evaluation of the natural constituent of Cannabis sativa, cannabichromene and its modulation by $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence*, 112(1–2), 126–133
- Demuth, D. G., & Molleman, A. (2006). Cannabinoid signalling. *Life Sciences*, 78, 549–563.
- Devinsky, O., Cross, J. H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., et al. (2017), ‘Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome’, *New England Journal of Medicine* 376, pp. 2011- 2020.
- Devinsky, O., Marsh, E., Friedman, D., Thiele, E., Laux, L., Sullivan, J., et al. (2016), ‘Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial’, *Lancet Neurology* 15, pp. 270-278.
- Di Marzo V, Berrendero F, Bisogno T, Gonzalez S, Cavaliere P, Romero J, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents

in the striatum of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *J Neurochem* 2000; 74: 1627–35.

- Dos Santos, R. G., Hallak, J. E., Leite, J. P., Zuardi, A. W. and Crippa, J. A. (2014), 'Phytocannabinoids and epilepsy', *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 40, pp. 135-143.
- Dussy, F. E., Hamberg, C., Luginbuhl, M., Schwerzmann, T., & Briellmann, T. A. (2005). Isolation of Delta-9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Delta9-THC in cannabis products. *Forensic Science International*, 149(1), 3–10.
- Eichler, M.; Spinedi, L.; Unfer-Grauwiler, S.; Bodmer, M.; Surber, C.; Luedi, M.; Drewe, J. Heat Exposure of Cannabis sativa Extracts Affects the Pharmacokinetic and Metabolic Profile in Healthy Male Subjects. *Planta Med.* 2012, 78, 686–69128
- ElSohly, M. (2007). *Marijuana and the Cannabinoids*. 1st ed. [ebook] New Jersey: Humana Press.
- Elsohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). *Phytochemistry of Cannabis sativa L.*
- EMCDDA (2004), *An overview of cannabis potency in Europe*, Insights series 6, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Evans, F. J. (1991). Cannabinoids: The separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Medica*, 57(7), S60–S67.
- Fantegrossi, W. E., Moran, J. H., Radominska-Pandya, A., & Prather, P. L. (2014). Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ^9 -THC: mechanism underlying greater toxicity?. *Life sciences*, 97(1), 45–54.
- Fasinu, P.S., et al., Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. *Pharmacotherapy*, 2016. 36(7): p. 781-96.
- Ferretjans R, Moreira FA, Teixeira AL, Salgado JV. The endocannabinoid system and its role in schizophrenia: a systematic review of the literature. *Rev Bras Psiquiatr* 2012;34:163-193
- Fisar, Z. (2010). Phytocannabinoids and Endocannabinoids. *Current Drug Abuse Reviewse*, 2(1), 51–75.
- Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R (2008) PKS activities and biosynthesis of cannabinoids and flavonoids in *C. sativa L.* plants. *Plant Cell Physiol* 49:1767.

- Freeman, T. P., & Winstock, A. R. (2015). Examining the profile of high-potency cannabis and its association with severity of cannabis dependence. *Psychological medicine*, 45(15), 3181–3189.
- Friedman, D. and Devinsky, O. (2015), ‘Cannabinoids in the treatment of epilepsy’, *New England Journal of Medicine* 373, pp. 1048-1058.
- Harissis, H. V. (2014). A Bittersweet Story: The True Nature of the Laurel of the Oracle of Delphi. *Perspectives in Biology and Medicine* 57(3), 351-360. Johns Hopkins University Press.
- Gambaro, V., Dell’Acqua, L., Farè, F., Froidi, R., Saligari, E., & Tassoni, G. (2002). Determination of primary active constituents in Cannabis preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection. *Analytica Chimica Acta*, 468(2), 245–254.
- Gauson, L. A., Stevenson, L. A., Thomas, A., Baillie, G. L., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabigerol behaves as a partial agonist at both CB₁ and CB₂ receptors. In Presented at the 17th annual symposium on the cannabinoids, Saint-Sauveur, Quebec (p. 206). Canada: International Cannabinoid Research Society
- Guy, G., Whittle, B.A., Robson, P. (2008). The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids. *Le Pharmacien Hospitalier*. 43. 56-57.
- Gibbs M, Winsper C, Marwaha S, Gilbert E, Broome M, Singh SP. Cannabis use and mania symptoms: a systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 2015;171:39-47.
- Gonçalves, J., Rosado, T., Soares, S., Simão, A., Caramelo, D., Luís, Â., Duarte, A. (2019). Cannabis and Its Secondary Metabolites: Their Use as Therapeutic Drugs, Toxicological Aspects, and Analytical Determination. *Medicines*, Vol. 6, p. 31.
- Green, K., Kim, K., and Bowman, K. (1976) Ocular effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in the therapeutic potential of marijuana (Cohen, S. and Stillman, R., eds.), Plenum Medical Book, New York, pp. 49–62
- Greg Green (2001). *The Cannabis Grow Bible* (4th ed.).
- Grotenhermen, F. (2003), Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.*, 42, 327–360

- Grotenhermen, F. (2004). Pharmacology of Cannabinoids. *Neuroendocrinol Lett* 2004, 25, 14–23.
- Grotenhermen F. (2007) The toxicology of cannabis and cannabis prohibition. *Chem Biodivers.* 4:1744-1769
- Grotenhermen, F. (2014). Clinical Pharmacokinetics of Cannabinoids *Clinical Pharmacokinetics of Cannabinoids*, 2–51.
- Hand, A. cannabinoid pharmacokinetics, Blake, A., Kerrigan, P., Samuel, P., & Friedberg, J. (2016). History of medical cannabis. *J Pain Manage*, 9(4), 387–394.
- Hanuš, L.O., Meyer, S.M., Muñoz, E., Taglialatela-Scafati, O., & Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: A unified critical inventory. In *Natural Product Reports* (Vol. 33).
- Harvey DJ, Brown NK. Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior.* 1991;40(3):533-40.
- Harvey DJ, Mechoulam R. Metabolites of cannabidiol identified in human urine. *Xenobiotica.* 1990;20:303–320
- Hawksworth, G. and K. McArdle, *Metabolism and pharmacokinetics of cannabinoids. The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids.* Pharmaceutical Press, London, 2004: p. 205-228.
- Hewavitharana, A. K., Golding, G., Tempny, G., King, G., & Holling, N. (2005). Quantitative GC-MS analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in fiber hemp varieties. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(4), 258–261.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Pertwee, R.G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 161-202.
- Huestis, M. A. (2005). Pharmacokinetics and Metabolism of the Plant Cannabinoids, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol. 657–690.
- Huestis M. A. (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry & biodiversity*, 4(8), 1770–1804.
- Hussain, S. A., Zhou, R., Jacobson, C., Weng, J., Cheng, E., Lay, J., et al. (2015), ‘Perceived efficacy of cannabidiol-enriched cannabis extracts for

treatment of pediatric epilepsy: a potential role for infantile spasms and Lennox-Gastaut syndrome', *Epilepsy and Behavior* 47, pp. 138-141.

- Ibrahim, E., Gul, W., Gul, S., Stamper, Br., Hadad, G., Abdel Salam, RA., Ibrahim, A., Ahmed, S., Chandra, S., Lata, H., Radwan, M. & Elsohly, M. (2017). Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of *Cannabis sativa* Using GC-FID. *Planta Medica*. 84.
- Ilias, Y., Rudaz, S., Mathieu, P., Christen, P., & Veuthey, J. L. (2005). Extraction and analysis of different Cannabis samples by headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 28(17), 2293–2300.
- J. W. Fairbairn, J. A. Liebmann and M. G. Rowan (1976). The stability of cannabis and its preparations on storage. *J. Pharm. Pharmac.*, 28, 1–7.
- James A, James C, Thwaites T. The brain effects of cannabis in healthy adolescents and in adolescents with schizophrenia: a systematic review. *Psychiatry Res* 2013;214:181-189.
- Jung, Julia; Kempf, Juergen; Mahler, Hellmut; Weinmann, Wolfgang (March 2007). "Detection of Delta9-tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS". *Journal of Mass Spectrometry*. 42 (3): 354–360.
- Koppel, B. S., Brust, J. C., Fife, T., Bronstein, J., Youssof, S., Gronseth, G. and Gloss, D. (2014), 'Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology', *Neurology* 82, pp. 1556-1563.
- Kumar, R.N., Chambers, W.A., & Pertwee, R.G. (2001). Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia*, 56(11), 1059–1068.
- Lachenmeier, D. W., Kroener, L., Musshoff, F., & Madea, B. (2004). Determination of cannabinoids in hemp food products by use of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(1), 183–189.
- Large, M., S. Sharma, M.T. Compton, T. Slade, and O. Nielssen, Cannabis use and earlier onset of psychosis: a systematic meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*, 2011. 68(6): p. 555-61.

- Lev-Ran S, Roerecke M, Le Foll B, George TP, McKenzie K, Rehm J. The association between cannabis use and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Psychol Med* 2014;44:797-810
- Ligresti, A., Moriello, A. S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., et al. (2006). Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(3), 1375–1387.
- Lucas, C.J.; Galettis, P.; Schneider, J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2018, 84, 2477–2482.
- Lutge, E., Gray, A. and Siegfried, N. (2013), ‘The medical use of cannabis for reducing morbidity and mortality in patients with HIV/AIDS’, *Cochrane Database of Systematic Reviews* 4, CD005175.
- Martin, J. H., Bonomo, Y. and Reynolds, A. D. B. (2018), ‘Compassion and evidence in prescribing cannabinoids: a perspective from the Royal Australasian College of Physicians’, *Medical Journal of Australia* 208, pp. 107-109.
- McHugh D, Page J, Dunn E, Bradshaw HB. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells. *Br J Pharmacol.* 2012; 165:2414.
- McHugh D, Roskowski D, Xie S, Bradshaw HB. Δ^9 -THC and N-arachidonyl glycine regulate BV-2 microglial morphology and cytokine release plasticity: Implications for signaling at GPR18. *Front Pharmacol.* 2014; 4:1.
- McPartland JM, Glass M, Pertwee RG. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *Br J Pharmacol.* 2007; 152:583.
- McPartland, J. M., Duncan, M., Di Marzo, V., & Pertwee, R. G. (2015). Are cannabidiol and Delta(9)-tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *British Journal of Pharmacology*, 172(3), 737–753.
- Mehmedic, Z., Chandra, S., Slade, D., Denham, H., Foster, S., Patel, A. S., ElSohly, M. A. (2010). Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *Journal of Forensic Sciences*, 55(5), 1209–1217.

- Meng, Q., Buchanan, B., Zuccolo, J., Poulin, M. M., Gabriele, J., & Baranowski, D. C. (2018). A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products. *PLoS ONE*, 13(5), 1–16.
- Mills, Brooke & Yepes, Andres & Nugent, Kenneth. (2015). Synthetic Cannabinoids. *The American Journal of the Medical Sciences*. 350.
- Mittleman, M. A., Lewis, R. A., Maclure, M., Sherwood, J. B., & Muller, J. E. (2001). Triggering myocardial infarction by marijuana. *Circulation*, 103, 2805–2809.
- Morales, P., Hurst, D. P., & Reggio, P. H. (2017). Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Progress in the chemistry of organic natural products*, 103, 103–131.
- Moreno-Sanz, G. (2016). Can you pass the acid test? Critical review and novel therapeutic perspectives of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 124–130.
- Morimoto, S., Komatsu, K., Taura, F., & Shoyama, Y. (1998). Purification and characterization of cannabichromenic acid synthase from *Cannabis sativa*. *Phytochemistry*, 49(6), 1525–1529.
- Mucke, M., Phillips, T., Radbruch, L., Petzke, F. and Hauser, W. (2018a), ‘Cannabis-based medicines for chronic neuropathic pain in adults’, *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3, CD012182.
- Mucke, M., Weier, M., Carter, C., Copeland, J., Degenhardt, L., Cuhls, H., et al. (2018b), ‘Systematic review and meta-analysis of cannabinoids in palliative medicine’, *Journal of Cachexia, Sarcopenia, and Muscle* 9, pp. 220-234.
- Mudge, E. M., Murch, S. J., & Brown, P. N. (2017). Leaner and greener analysis of cannabinoids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(12), 3153–3163. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3>
- Musty RE, Karniol IG, Shirikawa I, Takahashi RN, Knobel E (1976). Interactions of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabiniol in man. In: Braude MC, Szara S (eds). *The Pharmacology of Marijuana*, Vol. 2. Raven Press: New York, pp. 559–563

- Nahler, G., Grotenhermen, F., Zuardi, A. W., & Crippa, J. (2017). A Conversion of Oral Cannabidiol to Delta9-Tetrahydrocannabinol Seems Not to Occur in Humans. *Cannabis and cannabinoid research*, 2(1), 81–86.
- NASEM (2017), *The health effects of cannabis and cannabinoids: the current state of evidence and recommendations for research*, National Academies Press for the National Academies of Sciences Engineering and Medicine, Washington, DC.
- Navari, R.M.(2009), ‘Pharmacological management of chemotherapy-induced nausea and vomiting: focus on recent developments’, *Drugs* 69, pp. 515-533.
- Newell, G.R., Mansell, P.W., Wilson, M.B., Lynch, H.K., Spitz, M.R., and Hersh, E.M.(1985) Risk factor analysis among men referred for possible acquired immune deficiency syndrome. *Prev. Med.* 14, 81–91
- Novotna, A., Mares, J., Ratcliffe, S., Novakova, I., Vachova, M., Zapletalova, O., et al. (2011), ‘A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols (Sativex), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis’, *European Journal of Neurology* 18, pp. 1122-1131
- Noyes, R. Jr., Brunk, S. F., Baram, D. A., and Canter, A. (1975) Analgesic effect of delta-9-tetrahydrocannabinol. *J. Clin. Pharmacol.* 15, 139–143.
- Noyes, R. Jr., Brunks, S. F., Avery, D. H., and Canter, A. (1976) Psychologic effects of oral delta-9-tetrahydrocannabinol in advanced cancer patients. *Comp. Psychiatry* 17, 641–646
- Ohlsson A, Lindgren JE, Wahlen A, Agurell S, Hollister LE, Gillespie HK. Plasma delta-9 tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.* 1980;28(3):409-16
- Ohlsson, A.; Lindgren, J.E.; Andersson, S.; Agurell, S.; Gillespie, H.; Hollister, L.E. Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1986, 13, 77–83.
- Omar, J., Olivares, M., Alzaga, M., & Etxebarria, N. (2013). Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *Journal of Separation Science*, 36(8), 1397–1404.

- Osborne GB, Fogel C (2009). "Understanding the motivations for recreational marijuana use among adult Canadians". *Substance Use & Misuse*. 43 (3–4): 539–72, discussion 573–9, 585–7.
- Pacifici, R., Marchei, E., Salvatore, F., Guandalini, L., Busardò, F. P., & Pichini, S. (2017). Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(10), 1555–1563.
- Pate W., David. (1994). Chemical ecology of Cannabis. *J Int Hemp Assoc*. 1.
- Pate W., David. (1983). "Possible role of ultraviolet radiation in evolution of Cannabis chemotypes". *Economic Botany*. 37 (4): 396–405.
- Pellegrini, M., Marchei, E., Pacifici, R., & Pichini, S. (2005). A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(5), 939–946.
- Pertwee RG, Ross RA, Craib SJ, Thomas A. (–)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol*. 2002; 456:99.
- Pertwee, R.G. (2008). The diverse CB₁ and CB₂ receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9- tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199–215.
- Pisanti, S., & Bifulco, M. (2017). Modern History of Medical Cannabis: From Widespread Use to Prohibitionism and Back. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(3), 195–198.
- Press, C. A., Knupp, K. G. and Chapman, K. E. (2015), ‘Parental reporting of response to oral cannabis extracts for treatment of refractory epilepsy’, *Epilepsy and Behavior* 45, pp. 49-52.
- Rang and Dale, «Φαρμακολογία», 7^η έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.
- Reece AS. Chronic toxicology of cannabis. *J Clin Toxicol* 2009;47:517-524
- Regelson, W., Bulter, J. R., Schulz, J., et al. (1976) Δ⁹-Tetrahydrocannabinol as an effective antidepressant and appetite-stimulating agent in advanced

cancer patients, in *The Pharmacology of Marijuana* (Braude, M. C. and Szara, S., eds.), Raven Press, New York, pp. 763–776.

- Repp K, Raich A. Marijuana and health: a comprehensive review of 20 years of research. Washington County Oregon: Department of Health and Human Services; 2014.
- Rhee MH, Vogel Z, Barg J, Bayewitch M, Levy R, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R. Cannabinol derivatives: binding to cannabinoid receptors and inhibition of adenylylcyclase. *J Med Chem.* 1997; 40:3228.
- Romero J, Garcia-Palomero E, Castro JG, Garcia-Gil L, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. Effects of chronic exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 46:100–8.
- Ross, S. A., Mehmedic, Z., Murphy, T. P., & ElSohly, M. A. (2000). GC-MS analysis of the total Δ^9 -THC content of both drug- and fiber-type cannabis seeds. *Journal of Analytical Toxicology*, 24(8), 715–717.
- Ross, S.A., & ElSohly, M.A. (1997). CBN and D^9 -THC concentration ratio as an indicator of the age of stored marijuana samples.
- Russo E. B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British journal of pharmacology*, 163(7), 1344–1364.
- Russo, E. B., Burnett, A., Hall, B., & Parker, K. K. (2005). Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1A} receptors. *Neurochemical Research*, 30(8), 1037–1043.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson N-O, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 2007; 152:1092.
- Sallan, S. E., Zinberg, N. E., and Frei, E., 3rd (1975) Antiemetic effect of delta-9- tetrahydrocannabinol in patients receiving cancer chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 293, 795–797.
- Sánchez Artiles, A. E., Awan, A., Karl, M., & Santini, A. (2019). Cardiovascular effects of cannabis (marijuana): A timely update. *Phytotherapy Research*.

- Secades-Villa, R., Garcia-Rodriguez, O., Jin, C.J., Wang, S., and Blanco, C. (2015). Probability and predictors of the cannabis gateway effect: A national study. *Journal of Drug Policy* 26(2): 135– 142.
- Seely A., Kathryn, L Patton, Amy, L Moran, Cindy, L Womack, M., Prather, P., Fantegrossi, W., Radominska-Pandya, A., W Endres, G., B Channell, K., Smith, N., McCain, K., James, L. & H M., Jeffery. (2013). Forensic investigation of K2, Spice, and “bath salt” commercial preparations: A three-year study of new designer drug products containing synthetic cannabinoid, stimulant, and hallucinogenic compounds. *Forensic science international*. 233. 416-22.
- Singla, S., Sachdeva, R., & Mehta, J. L. (2012). Cannabinoids and atherosclerotic coronary heart disease. *Clinical Cardiology* Cardiology, 35, 329–335.
- Smith, L. A., Azariah, F., Lavender, V. T., Stoner, N. S. and Bettioli, S. (2015), ‘Cannabinoids for nausea and vomiting in adults with cancer receiving chemotherapy’, *Cochrane Database of Systematic Reviews* 11, CD009464.
- Stefanidou, M., Dona, A., Athanaselis, S., Papoutsis, I., & Koutselinis, A. (1998). The cannabinoid content of marijuana samples seized in Greece and its forensic application. *Forensic Science International*, 95(2), 153–162. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00083-8)
- Stefanidou, M., Athanaselis, S., Alevisopoulos, G., Papoutsis, J., Koutselinis, A. (2000). Delta9-Tetrahydrocannabinol Content in Cannabis Plants of Greek Origin. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 48. 743-5. [10.1248/cpb.48.743](https://doi.org/10.1248/cpb.48.743).
- Stockings, E., Campbell, G., Hall, W. D., Nielsen, S., Zagic, D., Rahman, R., et al. (2018a), ‘Cannabis and cannabinoids for the treatment of people with chronic non-cancer pain conditions: a systematic review and meta-analysis of controlled and observational studies’, *Pain* 159, pp. 1932-1954.
- Stockings, E., Zagic, D., Campbell, G., Weier, M., Hall, W. D., Nielsen, S., et al. (2018b), ‘Evidence for cannabis and cannabinoids for epilepsy: a systematic review of controlled and observational evidence’, *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 89, pp. 741-753.
- Stolker, A. A. M., Van Schoonhoven, J., De Vries, A. J., Bobeldijk-Pastorova, I., Vaes, W. H. J., & Van Den Berg, R. (2004). Determination of cannabinoids

in cannabis products using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1058(1–2), 143–151.

- Suarez-Pinilla P, Lopez-Gil J, Crespo-Facorro B. Immune system: a possible nexus between cannabinoids and psychosis. *Brain Behav Immun* 2014;40:269-282.
- Takeda, S., Okajima, S., Miyoshi, H., Yoshida, K., Okamoto, Y., Okada, T., Aramaki, H. (2012). Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicology letters*, 214(3), 314–319.
- Taschwer, M., & Schmid MG. (2015). Determination of the relative percentage distribution of THCA and Δ^9 -THC in herbal cannabis seized in Austria – Impact of different storage temperatures on stability. *Forensic Science International Volume 254*, Pages 167-171.
- Tashkin, D.P., Fligiel, S., Wu, T.C., et al. (1990) Effects of habitual use of marijuana and /or cocaine on the lung. *NIDA Res. Monogr.* 99, 63–87.
- Leghissa, A., (2016). Method development for qualification and quantification of cannabinoids of cannabinoids and terpenes in extracts by gas chromatography-mass spectrometry. The University of Texas at Arlington
- Thomas A, Stevenson LA, Wease KN, Price MR, Baillie G, Ross RA, Pertwee RG. Evidence that the plant cannabinoid Delta9-tetrahydrocannabivarin is a cannabinoid CB₁ and CB₂ receptor antagonist. *Br J Pharmacol.* 2005; 146:917.
- Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB₁ and CB₂ receptor agonists in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 150(5), 613–623.
- Thomas, B. & ElSohly, M.A.. (2015). *The Analytical Chemistry of Cannabis: Quality Assessment, Assurance, and Regulation of Medicinal Marijuana and Cannabinoid Preparations.*
- Tramer, M. R., Carroll, D., Campbell, F. A., Reynolds, D. J. M., Moore, R. A. and McQuay, H. J. (2001), ‘Cannabinoids for control of chemotherapy induced nausea and vomiting: quantitative systematic review’, *British Medical Journal* 323, pp. 16-21.

- Trofin, I. G., Vaireanu, D., & Laurentiu, F. (2012). Long - term Storage and Cannabis Oil Stability. *Revista de Chimie -Bucharest*, 63(3 (March 2012)), 293–297.
- Turner, C. E., Hadley, K. W., Fetterman, P. S., Doorenbos, N. J., Quimby, M. W., & Waller, C. O. Y. (1973). Constituents of Cannabis sativa L. IV: Stability of Cannabinoids in Stored Plant Material. *62(10)*, 1601–1605.
- Turner, E. S., Williams, C., Iversen, L., Whalley, B. (2017). *Molecular Pharmacology of Phytocannabinoids*.
- Douglas K., A, Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J. (2017). *Phytocannabinoids: Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa*.
- Vanyukov, M. M., Tarter, R. E., Kirillova, G. P., Kirisci, L., Reynolds, M. D., Kreek, M. J., Ridenour, T. A. (2012). Common liability to addiction and "gateway hypothesis": theoretical, empirical and evolutionary perspective. *Drug and alcohol dependence*, 123 Suppl 1(Suppl 1), S3–S17.
- Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Diaz-Laviada I. Involvement of PPAR γ in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*. 2013; 4:e618.
- Vardakou, I., Pistos, C., & Spiliopoulou, C. (2010). Spice drugs as a new trend: Mode of action, identification and legislation. *Toxicology Letters*, 197(3), 157–162.
- Volkow ND, Baler RD, Compton WM, Weiss SR. Adverse health effects of marijuana use. *N Engl J Med* 2014;370:2219-2227.
- Wade, D. T., Makela, P., Robson, P., House, H. and Bateman, C. (2004), ‘Do cannabis-based medicinal extracts have general or specific effects on symptoms in multiple sclerosis? A double-blind, randomized, placebo-controlled study on 160 patients’, *Multiple Sclerosis* 10, pp. 434-441.
- Wang, M., Wang, Y. H., Avula, B., Radwan, M. M., Wanas, A. S., van Antwerp, J., Khan, I. A. (2016). Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. *Cannabis and cannabinoid research*, 1(1), 262–271.
- Wang, Y.H. & Avula, B. & Elsohly, M. & Radwan, M. & Wang, M. & Wanas, A. & Mehmedic, Z. & Khan, If. (2017). Quantitative Determination of

Δ^9 -THC, CBG, CBD, Their Acid Precursors and Five Other Neutral Cannabinoids by UHPLC-UV-MS. *Planta Medica*. 84.

- Wargent, E T; Zaibi, M S; Silvestri, C; Hislop, D C; Stocker, C J; Stott, C G; Guy, G W; Duncan, M; Di Marzo, V; Cawthorne, M A (2013). "The cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCV) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity". *Nutrition & Diabetes*. 3 (5): e68
- Watanabe K, Yamaori S, Funahashi T, Kimura T, Yamamoto I. Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinol by human hepatic microsomes. *Life Sciences*. 2007;80(15):1415-9.
- Watanabe, K., Honda, G., Miyagi, T., Kanai, M., Usami, N., Yamaori, S., Yamamoto, I. (2016). The Duquenois reaction revisited: mass spectrometric estimation of chromophore structures derived from major phytocannabinoids. *Forensic Toxicology*, 35(1), 185–189. doi:10.1007/s11419-016-0337-6
- Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., et al. (2015), 'Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis', *JAMA* 313, pp. 2456-2473.
- Whiting, P. F., Wolff, R. F., Deshpande, S., Di Nisio, M., Duffy, S., Hernandez, A. V., et al. (2015), 'Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis', *JAMA* 313, pp. 2456-2473.
- WHO Expert Committee on Drug Dependence. (2018). Cannabis and Cannabis Resin. Section 4: Therapeutic use. World Health Organization Technical Report Series, 179.
- Williamson M., E. (2004). *The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids*. Edited by G. W. Guy, B. A. Whittle and P. J. Robson. Pharmaceutical Press: London, 2004. Pages: 448. ISBN: 0-85369-517-2. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 19.
- Yeshurun, M., Shpilberg, O., Herscovici, C., Shargian, L., Dreyer, J., Peck, A., et al. (2015). Cannabidiol for the prevention of graft-versus-host-disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation: Results of a phase II study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 21(10), 1770–1775
- Zajicek, J., Fox, P., Sanders, H., Wright, D., Vickery, J., Nunn, A. and Thompson, A. (2003), 'Cannabinoids for treatment of spasticity and other

symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial', *Lancet* 362, pp. 1517-1526.

- Zamengo L, Bettin C, Badocco D, Di Marco V, Miolo G, Frison G (2019), The role of time and storage conditions on the composition of hashish and marijuana samples: a four-year study, *Forensic Science International*, *Forensic Science International*. 298.