Analitički postupci u kontroli kakvoće preparata s medicinskom marihuanom

Čolak, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:574530

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Marija Čolak

Analitički postupci u kontroli kakvoće preparata s medicinskom marihuanom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Mirandi Sertić na stručnom vodstvu, velikoj pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Sadržaj

1. Uvod....1
1.1. Porijeklo i medicinski značaj *Cannabis sativa*-e....2
1.2. Kemijski sastav i učinak medicinske marihuane....3
1.2.1. Fitokanabinoidi....4
1.2.2. Terpeni....7
1.2.3. Fenolne sastavnice....8
1.3. Potreba za analitičkim ispitivanjem....9
2. Obrazloženje teme....12
3. Materijali i metode....14
4. Rezultati i rasprava....16
4.1. Ispitivanje sadržaja....17
4.1.1. Plinska kromatografija....18
4.1.2. Tekućinska kromatografija....19
4.2. Određivanje profila terpena....21
4.3. Analiza pesticida....23
4.4. Ostatna otapala....26
4.5. Teški metali....28
4.6. Sadržaj vlage i stalna masa....30
5. Zaključak....32
6. Literatura....34
7. Sažetak/Summary....37
7.1. Sažetak....38
7.2. Summary....39
Temeljna dokumentacijska kartica/Basic documentation card

1. Uvod

1.1. Porijeklo i medicinski značaj *Cannabis sativa*-e

C*annabis sativa* L. je jednogodišnja dvodomna biljka koja pripada porodici Cannabaceae. U upotrebi je od davnih vremena, kao medicinska biljka, ritualna biljka ili psihoaktivna droga, za tekstil, te kao hrana (Fischedick i sur., 2010).

Za forenzičke i zakonske svrhe, postoje dva morfološka tipa marihuane koja se najčešće raspoznaju, medicinski i vlaknasti tip. Glavna razlika između njih je u sadržaju Δ^9-tetrahidrokanabinola (THC). Visoki sadržaj THC-a klasificira se kao medicinski tip, dok se onaj sa niskim sadržajem THC-a (maksimalno 0,2-0,3%) klasificira kao vlaknasti tip (Hazekamp, Fischedick, 2012). Kemotaksonomska evaluacija marihuane dovela je do prepoznavanja 3 kemotipa, sa visokim udjelom Δ^9-THC, sa visokim udjelom kanabidiola (CBD), te sa podjednakim udjelom oba kanabinoida (Fischedick i sur., 2010).

Marihuana se uzgaja u skoro svim zemljama svijeta i najraširenija je nezakonita droga. Najveći uzgajivači, koji čine čak 25% ukupne proizvodnje, su zemlje Afrike, Maroko, Južna Afrika, Lesotho, Swaziland, Nigeria i dr. Sjeverna i Južna Amerika su svaka odgovorne za 23% svjetske proizvodnje. Uz to što je njezina proizvodnja najraširenija, ona se i najviše koristi. U mnogim zemljama, korištenje marihuane se značajno povećalo tijekom 1990-ih i 2000-ih, ali od tada je potrošnja ostala na istoj razini ili se smanjuje. Zemlje u Zapadnoj i Srednjoj Europi javljaju smanjenje broja korisnika, dok se u zemljama Istočne Europe broj korisnika povećava. Procjenjuje se da između 125 i 203 milijuna ljudi - između 2,8% i 4,5% svjetske populacije u dobi 15-64 godine koristi marihuanu u jednoj godini (UNODC, 2012). Unatoč zloupotrebi, istraživanja kemijskog sastava i farmakoloških učinaka biljke dokazala su ljekovita svojstva biljke. Kemijska analiza marihuane u 1940-ima i 1960-ima dovela su do otkrića jedinstvene skupine sekundarnih metabolita terpena poznatih kao kanabinoidi, od kojih se trans-(-)-Δ^9-tetrahidrokanabinol (Δ^9-THC) pokazao kao najvažnija psihoaktivna molekula (Fischedick i sur., 2010).

Marihuana se koristi u 3 oblika: biljna marihuana, koju čine osušeni listovi i cvatni pupovi, poznata kao i 'kanabis', 'ganja', ili 'trava'; zatim smola marihuane, izlučevine biljke, poznate i pod nazivima 'hašiš' ili 'karaš'; te ulje marihuane, mikstura dobivena destilacijom ili ekstrakcijom aktivnih tvari iz biljke (UNODC, 2012).

Najčešće se koristi biljna marihuana i to pušenjem kako bi se izbjegao prvi prolaz kroz jetru do kojega dolazi oralnom primjenom Δ^9-THC kao i da bi se postigao brzi učinak, jer do maksimalne koncentracije u krvnoj plazmi dolazi u manje od 10 minuta, a kod oralne primjene potrebno je 60-120 minuta. Do različite bioraspoloživosti THC-a kod pušača marihuane može doći zbog neiskustva te samog načina pušenja, duljine inhalacije, učestalosti udaha te ostalih parametara. THC je topljiv u mastima te se zbog toga pohranjuje u adipoznom tkivu nakon ponavljane upotrebe, sa sporim otpuštanjem u krvotok (Gonzalez, 2007).

Povećan medicinski interes za ove supstance doveo je do razvoja različitih lijekova baziranih na kanabinoidima kao što je Δ^9-THC preparat Marinol® (Solvay Pharmaceuticals, Belgium), sintetski analog Δ^9-THC Nabilon® (Valeant Pharmaceuticals International, USA) te Sativex® (GW Pharmaceuticals, UK), oralni sprej koji sadržava Δ^9-THC i CBD u omjeru 1:1 (Fischedick i sur., 2010).

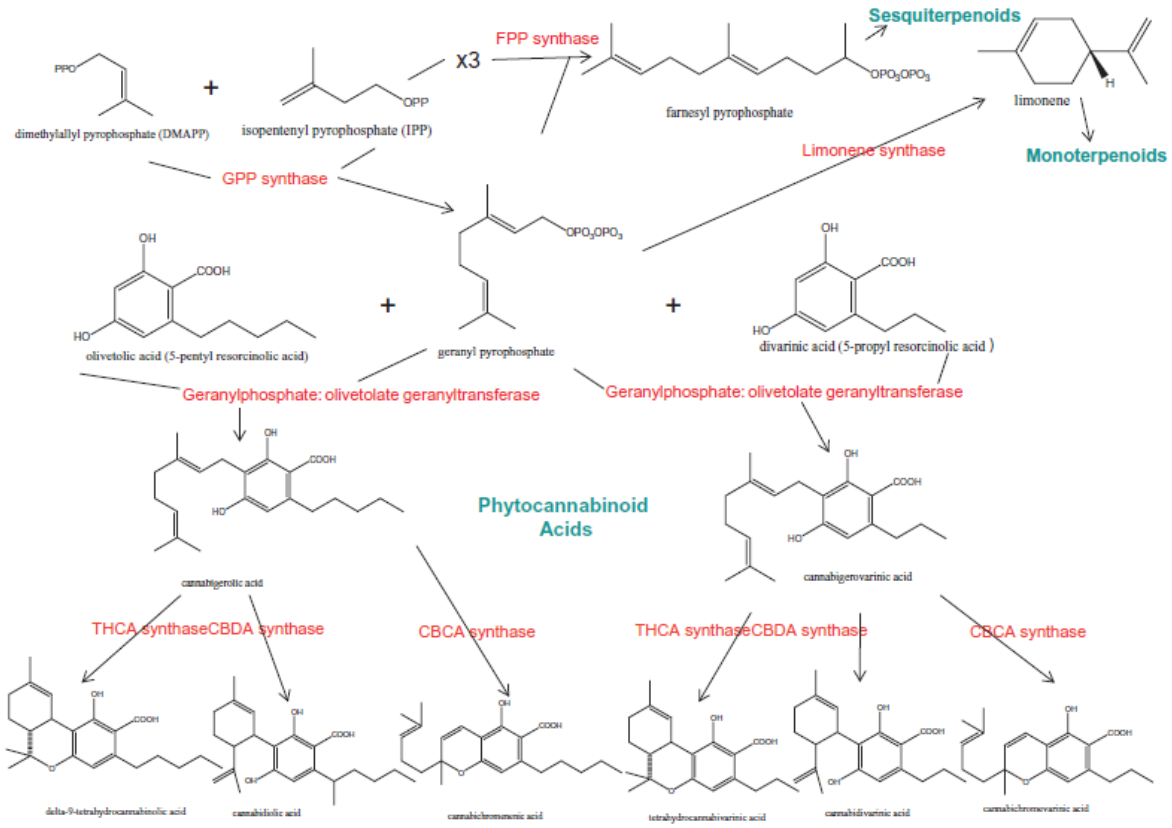
Medicinska marihuana kao biljni lijek predstavlja ozbiljan izazov modernoj medicini koja funkcionira na način 'jedna aktivna tvar, jedan cilj', zbog čega se javlja pitanje kako određene aktivne tvari pronađene u marihuani dovode do određenih učinaka, te koji tipovi marihuane bi trebali biti dostupni pacijentima (Hazekamp, Fischedick, 2012).

1.2. Kemijski sastav i učinak medicinske marihuane

Brojne molekule nastaju u marihuani sekundarnim metabolizmom i uključuju kanabinoide, terpene te fenolne sastavnice. Iako su farmakološka svojstva kanabinoida najviše proučavana i najpoznatije su sastavnice biljke, i ostale molekule su pokazala značajne učinke na ljudsko zdravlje. Istraživanje učinaka i korištenja produkata marihuane ograničeno je iz raznih razloga, a ponajviše zbog nelegalnog uzgoja (zbog psihoaktivnosti i mogućnosti izazivanja ovisnosti), varijabilnosti aktivnih komponenti i niskog sadržaja nekih od njih u biljci. U zadnje vrijeme povećana pozornost se posvećuje ne-THC aktivnim molekulama, koje mogu djelovati sinergistički i doprinijeti farmakološkom učinku i popratnim učincima medicinske marihuane (Russo, 2011).

Ukupno je izolirano više od 525 različitih kemijskih molekula iz biljke (Marioti i sur., 2015).

Fitokanabinoidi i terpeni su sintetizirani u marihuani, u sekretornim stanicama unutar trihoma. Nastaju iz prekursora geranil difosfata (GPP) i poliketidne oliveolne kiseline čiji je produkt kanabigerolna kiselina (CBGA). Daljnjom sintezom iz CBGA nastaju tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA), kanabidiolna kiselina (CBDA) te kanabikromenska kiselina (CBCA). Drugim putem iz GPP-a mogu nastati limonen i ostali monoterpeni u sekretornim stanicama plastida ili reakcijom sa izopentenil pirofosfatom u citoplazmi daje farnezil pirofosfat, prekursor seskviterpena, kao što je prikazano na Slici 1 (Russo 2011).



Slika 1. Biosinteza kanabinoida i terpena (Russo, 2011).

1.2.1. Fitokanabinoidi

Fitokanabinoidi predstavljaju skupinu od C21 ili C22 terpenofenolnih komponenti, prvenstveno sintetiziranih u marihuani. Otprilike 109 fitokanabinoida je identificirano i imaju razjašnjene strukture (Marioti i sur., 2015).

Kanabinoidi nastaju procesom biosinteze u biljnim tkivima kao kiseli oblici koji se razgrađuju u svoje neutralne oblike utjecajem topline, svjetlosti i čuvanjem (Fischedick i sur., 2010). Najčešće pronađeni razgradni oblik u ostarjeloj biljci marihuane je kanabinol, nastao oksidacijom THC-a pod utjecajem svjetla i topline. THC može izomerizacijom prijeći i u Δ^8-THC koji je jako rijedak. Kako bi se odredio "ukupni THC" koncentracije razgradnih produkata moraju biti pridodani sadržaju THCA i THC. U svježem biljnom materijalu, većina kanabinoida je u obliku svojih kiselih prekursora i koncentrirani su u smolastom sekretu koji stvaraju glandularni trihomi raširenи na površini biljke, pogotovo cvatovima ženskih biljki (Marioti i sur., 2015).

Najvažniji fitokanabinoidi su Δ^9-tetrahidrokanabinol (Δ^9-THC), tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA), kanabidiol (CBD), kanabidiolna kiselina (CBDA), kanabigerol (CBG), kanabigerolna kiselina (CBGA), kanabinol (CBN), kanabikromen (CBC) te tetrahidrokanabivarin (THCV) (Marioti i sur., 2015).

Od otkrića THC-a do otkrića receptora za koje se specifično veže prošlo je otprilike 25 godina. Otkriveni receptori identificirani su kao kanabinoidni receptori CB1 i CB2. CB1 receptor uglavnom se nalazi u mozgu, substantia nigra pars reticulata, globus pallidus, cerebellum i hippocampus, dok je CB2 prisutan u imunološkom i hematopoetskom sustavu (Gonzalez, 2007).

Većina bioloških svojstava povezanih uz kanabinoide oslanja se na njihovu interakciju sa endokanabinoidnim sustavom u čovjeku. Endokanabinoidni sustav uključuje 2 receptora CB1 i CB2, kao i endogene ligande, anandamine i 2-arahidonilglicerol. Smatra se da endokanabinoidi moduliraju ili imaju regulirajuću ulogu u raznim fiziološkim procesima kao što su apetit, osjetljivost na bol, raspoloženje, pamćenje, upale, inzulinska osjetljivost te metabolizam masti i energije. Dekarboksilirani oblik THCA, THC je parcijalni agonist i CB1 i CB2 receptora, ali ima viši afinitet za CB1 receptor, za koji se pretpostavlja da posreduje u psihoaktivnom djelovanju. Osim što su CB1 receptori najbrojniji u mozgu, nalaze se i u imunološkim stanicama te u gastrointestinalnim, reproduktivnim, adrenalnim, srčanim, plućnim i mokraćnim tkivima, gdje svojim prisustvom omogućavaju djelovanje kanabinoida. Za CB2 receptore se smatra da imaju imunomodulatorni efekt i reguliraju citokinsku aktivnost. THC djelovanjem i na druge molekularne strukture, osim CB1 i CB2 receptora, iskazuje svoje protuupalno, antikancerogeno, analgetsko, neuro-antioksidativno i

antispazmolitičko svojstvo. Međutim, THC je dovođen u vezu s velikim brojem štetnih djelovanja, uključujući anksioznost, kolinergički deficit te imunosupresiju.

Kanabidiolna kiselina je prevladavajući fitokanabinoid u vlaknastom tipu marihuane i drugi u medicinskom kemotipu. CBD (dekarboksilirana CBDA) predstavlja veliki spektar farmakoloških svojstava koji je dugo godina zanemarivan u usporedbi sa THC-om. CBD je ujedno i važna prateća sastavnica THC-a jer može smanjiti njegove štetne učinke i time povećati sigurnost primjene ekstrakata biljke. U *in vitro* i životinjskim studijama pokazalo se da CBD posjeduje, između ostaloga, antianksiozna, antiartritisna, antipsihotička, protuupalna, imunomodulatorna svojstva te je djelotvoran i protiv mučnina. CBD je obećavajući kanabinoid jer pokazuje i potencijal za korištenje u pretkliničkim modelima bolesti središnjeg živčanog sustava kao što su epilepsija, neurodegenerativne bolesti, šizofrenija, multipla skleroza, poremećaji pozornosti te središnja regulacija ponašanja pri hranjenju. Ujedno pokazuje i jaka antifungalna i antibakterijska svojstva i snažno djelovanje na meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (engl. *Methicilin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA).

Treći po učestalosti fitokanabinoid je kanabikromen (CBC). On pokazuje protuupalna, sedativna, analgetska, antibakterijska i antifungalna svojstva. Ujedno je i snažni inhibitor anandamina, endogenog liganda CB receptora.

Kanabinol (CBN) je produkt razgradnje THC-a i najčešće se pronalazi u ostarjeloj biljci. CBN pokazuje dvostruko niži afinitet prema CB1 receptorima i trostruko veći afinitet prema CB2 receptorima, u usporedbi sa THC-om. Prema tome jače djeluje na stanice imunološkog sustava nego na središnji živčani sustav.

U pojedinim zemljama, trenutno dopušteno liječenje terapeuticima na bazi marihuane ograničeno je na specijalne slučajeve, npr. ukočenost povezanu sa multipla sklerozom kod odraslih, za liječenje mučnine, odnosno povraćanja kod pacijenata na antikancirogenoj terapiji, za poboljšanje apetita kod HIV-pozitivnih pacijenata. CBG pokazuje terapeutsko djelovanje na kolitis kod miševa, te zbog toga postoji mogućnost korištenja ovog kanabinoida kod pacijenata oboljelih od crijevnih bolesti.

Kao što je prethodno spomenuto, rekreacijsko i medicinsko korištenje marihuane kao i THC-a, i ostalih sintetičkih kanabinoida često su povezivani sa raznim nuspojavama. Nedavna istraživanja govore kako je utjecaj kratkoročne i dugoročne upotrebe sličan onome kod pušača cigareta i direktno je povezan sa razinom THC-a ili sintetičkih analoga.

Učinci kratkotrajne primjene uključuju smanjeno pamćenje, slabljenje kognitivne funkcije, narušenu motornu koordinaciju i psihoze. Dugotrajna primjena THC-a dovođena je u vezu s povećanim rizikom razvoja ovisnosti, slabljenjem kognitivnih funkcija, promijenjenim razvojem mozga ako je prva primjena bila u ranoj adolescenciji, te povećanim rizikom od kroničnih psihoza uključujući šizofreniju (Andre i sur., 2016).

1.2.2. Terpeni

Terpeni tvore najveću skupinu biljnih molekula, a više od 100 ih je identificirano u marihuani. Oni su odgovorni za miris i okus različitih tipova biljke. Dijele se u različite skupine ovisno o broju ponavljajućih 5C jedinica (izoprenskih jedinica), pa tako imamo monoterpene sa 10 atoma ugljika, seskviterpene sa 15 atoma ugljika te triterpene sa 30 C atoma. Količina i distribucija terpena u biljci ovisi o mnogim čimbenicima kao što su uvjeti okoliša i starost biljke (Brenneisen, 2007). Mono i seskviterpeni su dokazani u cvjetovima, korijenu i listu marihuane sa dlakama sekretornih žljezda kao glavnom mjestu nastanka. Monoterpeni uglavnom dominiraju u profilu terpena i uključuju D-limonen, β-mircene, α- i β-pinen, terpinolen i linalool. Seskviterpeni, β-kariofilen i α-humulen pogotovo, često se pojavljuju u velikim količinama u ekstraktima marihuane. Triterpeni, kao što su friedelin i epifriedelanol, su također dokazani u korijenu, β-amirin u vlaknima, a u ulju sjemenki cikloartenol, β-amirin i damaradienol. Svi najučestaliji terpeni pronađeni u marihuani (uključujući mircen, α-pinen, β-kariofilen) mogu se naći posvuda u biljnom svijetu. Iz tog razloga tim sastavnicama nije pridavan poseban značaj dok se nije pokazalo da sadržaj terpenoida u marihuani može pomoći u određivanju podrijetla, ali i samog medicinskog učinka, te se zbog toga javlja potreba određivanja potpunijeg sadržaja marihuane uključujući i prisutne terpene, te ostale kanabinoide, a ne samo THC (Hazekamp, Fischedick, 2012).

Terpeni, zajedno sa kanabinoidima, su uspješno korišteni kao markeri vrsta marihuane, jer se obje skupine spojeva smatraju najvažnijim fiziološki aktivnim sekundarnim metabolitima. Pri rastu u standardiziranim uvjetima pronađena je značajna pozitivna korelacija između količine terpena i kanabinoida. To se može objasniti činjenicom da se mono- i seskviterpeni sintetiziraju u glandularnim trihomima kao i kanabinoidi.

Terpeni su lipofilne komponente koje lako prolaze kroz membrane, pogotovo krvno-moždanu barijeru. Imaju široki raspon farmakoloških učinaka. Biološka aktivnost D-limonena, koji se često nalazi u esencijalnim uljima *Citrus*-a, dobro su proučena, a između ostalih pokazuje antikancerogeno, anksiolitičko i imunostimulirajuće djelovanje kod čovjeka. β-mircen, terpen koji se nalazi i u hmelju, prepoznat je kao snažni protuupalni, analgetski i anksiolitički čimbenik. α-pinen je inhibitor acetilkolinesteraze, te samim time pomaže pamćenju, što bi moglo poništiti negativni učinak THC-a. Linalool, često pronađen u *Lavandula angustifolia*, posjeduje slična svojstva pripisivana ostalim monoterpenima, kao što su analgetsko, antianksiozno, protuupalno i antikonvulzivno djelovanje.

β-kariofilen, poznata sastavnica crnog papra i Copaiba balzama, posjeduje snažna protuupalna i citoprotektivna djelovanja na želudac. Selektivno se veže za CB2 receptore i zbog toga bi mogao biti smatran i fitokanabinoidom. Pentaciklički triterpeni kao što su β-amirin i cikloartenol pokazalo se posjeduju antibakterijska, antifungalna, protuupalna i antikancerogena svojstva. Ovi terpeni doprinose farmakološkim svojstvima brojnih ljekovitih biljki.

1.2.3. Fenolne sastavnice

Fenolne sastavnice, poznate i kao fenilpropanoidi, jedna su od najšire rasprostranjenih skupina sekundarnih metabolita kod biljaka. One predstavljaju više od 10000 različitih struktura, uključujući fenolne kiseline, kao što je benzojeva kiselina, flavonoide, kao što je flavonol, te lignane. U biljci marihuane, oko 20 flavonoida je identificirano, a uglavnom pripadaju skupinama flavona i flavonola. Oni uključuju O-glikozidne aglikone apigenina, luteolina, kempferola i kvercetina, kao i kanflavina A i B, koji su metilirani izoprenoidni flavoni jedinstveni za marihuanu. Od fenolnih amida i lignanamida najraširenij su kanabisin D (pronađen u listovima biljke), u hidrofilnom ekstraktu sjemenki pronađeni su siringaserinol i medioresionol. Međutim sjemenke marihuane sadrže oko 20 puta manju ukupnu količinu lignana od lanenih sjemenki, koje su dobro poznati izvor lignana.

U biljkama, fenolne komponente djeluje kao antioksidansi pod određenim fiziološkim uvjetima te tako štite biljku od oksidativnog stresa. Kod čovjeka, pokazala se korelacija između povećanog unosa biljaka bogatih fenolnih sastavnica i smanjene pojave kroničnih

bolesti kao što su karcinomi, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, ali ovi zdravstveni učinci ne moraju nužno biti objašnjeni samo prisustvom fenolnih sastavnica, jer one dolaze u malim količinama u biljkama. Flavoni i flavonoli pronađeni u ekstraktu marihuane pokazali su širok spektar bioloških učinaka sličnih onima kod terpena i kanabinoida. Djeluju protuupalno, antikancerogeno te neuroprotektivno. Specifični kanflavini A i B snažne su protuupalne komponente koje inhibiraju prostaglandin E2 i 5-lipooksigenazu (Andre i sur., 2015).

Iako istraživanja pokazuju da u marihuani postoje i druge vrste metabolita koje mogu biti od kliničkog značaja, zasada se fokus zadržao na kanabinoidima i terpenima, stoga se javlja zahtjev za ekonomičnom, kvalitetnom i validiranom metodom za određivanje ovih analita i njihovu kvantifikaciju (Giese i sur., 2015).

1.3. Potreba za analitičkim ispitivanjem

Obzirom da postoji nekoliko biljki jako sličnih morfoloških svojstava kao i *Cannabis sativa*, npr. *Hibiscus cannabinus, Acer palmatum, Urtica cannabina, Dizygotheca elegantissima, Potentilla recta* i *Datisca cannabina*, ponekada dolazi do kontaminacije marihuane. Međutim, ove biljke se mogu razlikovati od marihuane pregledom njihovih makroskopskih i mikroskopskih karakteristika. Češće se kao prirodni onečišćivači, javljaju produkti razgradnje, mikroorganizmi te teški metali. Do kontaminacije dolazi tijekom uzgoja i skladištenja.

Kada govorimo o umjetnim onečišćivačima, najčešće su to pojačivači rasta i pesticidi koji se koriste za vrijeme uzgoja i čuvanja, te predstavljaju rizik i za uzgajivača kao i za krajnjeg korisnika. Postoje izvješća o korištenju zabranjenih supstanci kao što je daminozid čijom razgradnjom nastaje iznimno toksični spoj hidrazin. Takvi slučajevi najčešće za sobom povlače i tvari koje se dodaju kako bi se povećala težina proizvoda, kao što su sitni dijelovi stakla ili dodavanje psihoaktivnih supstanci kao što je duhan ili kalamus, te ostali spojevi sa kolinergičkim učinkom, kako bi se povećao učinak marihuane niske kvalitete ili kako bi se prekrili negativni učinci (AHP, 2013).

U Nizozemskoj se dokazalo da se za naizgled povećanje kvalitete koristila kreda i pijesak, a u Ujedinjenom Kraljevstvu se za istu svrhu koristilo sitne kuglice stakla, sličnog

promjera kao i trihomi u marihuani. U Njemačkoj se uličnoj marihuani namjerno dodavalo olovo kako bi se povećala težina. Olovo se apsorbira inhalacijom i dovelo je do trovanja u barem 29 korisnika.

Još jedan problem koji se javlja je da se snaga ulične marihuane povećala tijekom godina. U SAD-u, u zaplijenjenoj marihuani poslanoj na analizu, 1980-ih količina THC-a prosječno je bila 1,15%, dok je u 1997.godini prosjek iznosio 4,47%, a 2002. godine 5,11% (Gonzalez, 2007).

Kako tržište medicinske i rekreacijske marihuane neprestano raste, analitičko testiranje će osigurati da korisnici dobivaju točno označene proizvode, koji nisu kontaminirani. Samim time i uzgajivačima marihuane korisna je analiza kako bi znali da li zadovoljavaju propisane zakone ili da bi dobili certificirani proizvod koji jamči njegovu kvalitetu.

Marihuana koja se koristi u medicinske svrhe trebala bi biti bez stranih tvari koliko je to moguće. Medicinski materijal trebao bi biti bez plijesni i bakterija koje su patogene, količina teških metala do razina koje su dopuštene i propisane jer se često nalaze u tlima na kojima se biljka uzgaja, te bez pesticida i fungicida koji mogu predstavljati zdravstvenu opasnost za korisnika. Mikrobiološki standardi trebaju odgovarati standardima određenima u Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*, EP) za ne-sterilne farmaceutske preparate koji se koriste inhalacijom (EP, 2008). Boja bi trebala biti konstantna u uzorku i ne bi smjelo biti sive ili crne koje su indikatori gljivične infekcije.

Za korisnike medicinske marihuane, idealni odnos između ukupnog THC-a, Δ^9-THC-a i/ili CBD-a nije u potpunosti određen, jer različiti zdravstveni problemi zahtijevaju različite omjere. Upravo zbog toga javlja se potreba za ispitivanjem sadržaja, identificiranjem i kvantificiranjem kanabinoida. U većini laboratorija za analizu se koristi plinska kromatografija spregnuta s masenim spektrometrom (GC-MS) ili plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID). Obzirom da se kod plinske kromatografije (engl. *Gas chromatography*, GC) koristi zagrijavanje na visokim temperaturama, THCA koji je prisutan u uzetom uzorku prelazi u THC i dobivena vrijednost daje količinu "ukupnog THC-a". Neki laboratoriji koriste tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. *High performance Liquid Chromatography*, HPLC) za kvantificiranje sadržaja, obzirom da kod nje nema potrebe za zagrijavanjem uzorka, a ispitivanje pruža točnije rezultate stvarnih količina kiselih i

neutralnih oblika prisutnih u uzorku. Ispitivanje sadržaja je potrebno kako bi korisnici točno znali koju količinu određenih kanabinoida uzimaju.

Primarna aktivna tvar marihuane je THC, ali kao što je prije opisano, pokazalo se da i ostali kanabinoidi te terpeni zajedno imaju sinergistički učinak te se u posljednje vrijeme sve više obavljaju i analize terpena, pretežno sa plinskom kromatografijom.

Pesticidi se koriste u komercijalnom uzgoju kako bi se uništili insekti. Sami po sebi, pesticidi su karcinogeni i mutageni spojevi i mogu uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme korisnicima marihuane, posebno onima koji su imunokompromitirani, što je kod korisnika medicinske marihuane čest slučaj. Obzirom na to, te na činjenicu da ne postoji zakonska regulacija korištenja pesticida, oni uopće ne bi smjeli biti korišteni za medicinski marihuanu. Velik broj pesticida je prisutan na tržištu i teško je provesti ispitivanje za sve, ali za one najčešće koji se koriste kod uzgoja duhana, te se zbog sličnosti uzgoja i konzumacije pretpostavlja da se koriste i na marihuani, testiranja se provede sa GC-MS, te u nekim slučajevima tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti spregnute s masenim spektrometrom (HPLC-MS). Ispituje se prisutnost organofosfata, karbamata, piretroida te avermektina.

Otapala koja ostanu nakon procesa ekstrakcije kanabinoida i terpena iz biljke, nisu sigurna za zdravlje čovjeka i važno je provjeriti njihovo odsustvo kako bi bili sigurni da imamo kvalitetan, siguran proizvod bez kemikalija. Analiza se obavlja GC/MS-om uz headspace jedinicu, te omogućava brzu identifikaciju i kvantifikaciju veoma niskih koncentracija otapala.

Analiza teških metala, koji u proizvod mogu doći iz zemlje na kojoj je marihuana uzgajana ili namjernim dodavanjem od strane čovjeka, potrebna je zbog njihove toksičnosti i najčešće obuhvaća olovo, živu, kadmij te arsen. Postoji nekoliko načina određivanja tragova metala kao što su atomska emisijska spektroskopija (engl. *Atomic Emission Spectroscopy*, AES), atomska apsorpcijska spektroskopija (engl. *Atomic Absorption Spectroscopy*, AAS), te masena spektroskopija sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS). Količina teških metala mora biti ispod granica propisanih Europskom farmakopejom.

2. Obrazloženje teme

Primjena medicinske marihuane je u neprestanom porastu, stoga je analitičko testiranje nužno kako bi korisnici dobili točno označene i kvalitetne proizvode. Osim korisnicima, i uzgajivačima je marihuane korisna analiza kako bi znali da li zadovoljavaju propisane zakone ili da bi dobili certificirani proizvod koji jamči njegovu kvalitetu.

Marihuana koja se koristi u medicinske svrhe mora biti bez stranih tvari, koliko je to moguće. Medicinski materijal trebao bi biti bez plijesni i bakterija koje su patogene, količina teških metala do razina koje su dopuštene i propisane jer se često nalaze u tlima na kojima se biljka uzgaja, te bez pesticida i fungicida koji mogu predstavljati zdravstvenu opasnost za korisnika. Također je važno osigurati da otapala koja ostanu nakon procesa ekstrakcije kanabinoida i terpena iz biljke, a nisu sigurna za zdravlje čovjeka, budu uklonjena iz krajnjeg proizvoda. Mikrobiološki standardi trebaju odgovarati standardima određenima u Europskoj farmakopeji (engl. *European Pharmacopoeia*, EP) za ne-sterilne farmaceutske preparate koji se koriste inhalacijom (EP, 2008). Boja bi trebala biti konstantna u uzorku i ne bi smjelo biti sive ili crne koje su indikatori gljivične infekcije.

Osim mogućih onečišćenja koji bi narušili kvalitetu proizvoda, optimalan odnos između THC-a, Δ^9-THC-a i/ili CBD-a ovisi o zdravstvenom problemu za koju bi se medicinska marihuana primjenjivala. Iz tog je razloga ključno ispitivanje sadržaja, identificiranje i kvantificiranje pojedinih kanabinoida.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada dati pregled analitičkih postupaka koji se koriste u kontroli kakvoće preparata s medicinskom marihuanom.

3. Materijali i metode

Prilikom pisanja ovog diplomskog rada pretražena je literatura iz PubMed baze podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), te relevantni znanstveni radovi iz javno dostupnih znanstvenih časopisa.

Također su korištene Američka biljna farmakopeja, Europska farmakopeja, te monografija razvijena od strane Nizozemskog ureda za medicinski kanabis.

Kao izvor informacija korištene i su mrežne stranice:

http://www.restek.com

http://www.perkinelmer.com

http://www.ecs.umass.edu

http://www.triqsystems.com

http://www.moisturemeters.com

http://www.mmlabtesting.com

http://www.growyourlab.com

http://www.steephilllab.com

http://www.shimadzu.com

4. Rezultati i rasprava

4.1. Ispitivanje sadržaja

Kao što je prethodno napisano, više od 500 različitih sekundarnih metabolita identificirano je u marihuani. Kanabinoidi predstavljaju najviše proučavanu skupinu. Precizno određivanje koncentracije kanabinoida u uzorku najvažniji je dio ispitivanja medicinske marihuane. Najvažniji kanabinoid je THC, no uz njega i ostali kanabinoidi imaju važnu ulogu u ukupnom učinku marihuane na korisnika, što je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Farmakološka svojstva pojedinih kanabinoida (Kuzdzal i suradnici, 2014).

	Antibiotik	Antifungalni	Proutupalni	Analgetik	Anksiolitik	Antioksidans	Antispazmolitik	Antiemetik	Sedativ	Psihostimulans
Kanabigerolna kiselina (CBGA)	✓									
Kanabigerol (CBG)	✓	✓	✓	✓						
Kanabikromen (CBC)	✓	✓	✓	✓						
Kanabidiolna kiselina (CBDA)	✓									
Kanabidiol (CBD)			✓	✓	✓	✓	✓			
Δ-9-THC			✓	✓		✓		✓		✓
Δ-9-THCV				✓						✓
Kanabinol (CBN)	✓		✓						✓	

Zbog složenog sastava marihuane, metode separacije, kao što su plinska ili tekućinska kromatografija, često spregnute s masenim spektrometrom, neophodne su za dobivanje profila, te osjetljivu, specifičnu, kvalitativnu i/ili kvantitativnu analizu sastavnica marihuane i ovdje donosimo pregled najvažnijih metoda.

4.1.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija ne detektira THCA i CBDA, već njihove neutralne oblike THC i CBD, nakon procesa dekarboksilacije do kojega dolazi zagrijavanjem i iskazujemo ih kao "ukupni THC" odnosno "ukupni CBD". No ovaj prelazak može biti nepotpun ovisno o temperaturi i injektoru. Zagrijavanje uzorka prije analize daje točnije rezultate. Uzorak ekstrakta može se staviti u "heating block" na 150 °C u otvorenoj staklenoj vijali. Nakon što otapalo ispari, dekarboksilacija se završi kroz 5 minuta, međutim preporuča se validacija ovoga koraka u svakom laboratoriju.

Kako ukupni THC predstavlja maksimalnu jačinu marihuane koja se inače puši, većina zakona uzima ukupni THC kao relevantni parametar. Međutim, ukoliko se traži sadržaj obiju tvari, potrebno je prethodno provesti derivatizaciju. Derivatizacija zahtjeva dodatno vrijeme te poskupljuje metodu.

Plinska kromatografija spregnuta sa plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *Gas Chromatography - Flame-ionisation detector*, GC-FID) je preferirana metoda za brzu i jednostavnu analizu u rutinskoj identifikaciji i kvantifikaciji koncentracija kanabinoida, no za pozitivnu identifikaciju svakog kanabinoida koristi se GC-MS. Prednost GC-MS-a je ujedno i to što se može koristiti za analizu terpena i pesticida.

Za analizu se koristi ekstrakt marihuane dobiven ekstrakcijom sa organskim otapalima kako bi se otopili uljni ostatci na površini biljnog materijala. Najčešće korištena otapala su metanol, izopropanol, etil acetat i drugi. Supernatant ekstrakta se injektira u plinski kromatograf za separaciju i detektira se FID-om ili MS-om.

Nekoliko vrsta analitičkih kolona može se koristiti za separaciju kanabinoida, no najčešće se koriste kolone malog promjera, sa tankom nepolarnom stacionarnom fazom. Nepolarne kolone kao što je 100% dimetilsiloksan ili 5% difenil 95% dimetilsiloksan, nisu

dovoljno polarne kako bi provele razdvajanje kanabidiola od kanabikromena, te se zbog toga najčešće koriste kolone sa 35% difenila i 65% dimetilsiloksan. Kolona je dovoljno polarna za razdvajanje važnih kanabinoida, a može podnijeti dovoljno visoke temperature kako bi svi kanabinoidi eluirali. Kod GC-MS kao plin nosač koristi se helij i analiza traje oko 30 minuta dok kod GC-FID kao plin nosač koristi se dušik, a analiza traje 9 minuta (Ruppel i sur., 2015).

Prema Američkoj biljnoj farmakopeji (engl. *American Herbal Pharmacopeia*, AHP) za kvantifikaciju kanabinoida koristi se GC-FID.

4.1.2. Tekućinska kromatografija

AHP za određivanje i kvantifikaciju velikih kanabinoida kao što su THCA, Δ-THC, CBDA, CBGA, CBG i CBN propisuje tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (Tablica 2). Metoda je validirana za selektivnost, linearnost, točnost i preciznost prema smjernicama američke Agencije za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA). Sa određenim modifikacijama u načinu pripreme uzorka, ova ista metoda može biti korištena za analizu ekstrakta i koncentrata marihuane.

Kod analize HPLC-om moguće je istovremeno određivanje kiselih i neutralnih oblika kanabinoida. Preferira se korištenje kromatografije obrnutih faza uz gradijent otapala. Za detekciju se može koristiti detekcija ultraljubičastim svjetlom (engl. *Ultraviolet detector*, UV), detektor s diodnim nizom (engl. *Diode-array detector*, DAD) i MS.

Prema dokumentu Ureda Ujedinjenih naroda za drogu i kriminal (engl. *United Nations Office On Drugs and Crime*, UNODC) za analizu "ukupnog THC-a" validirana je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti spregnute s detektorom s diodnim nizom (HPLC-DAD). Analizira se ekstrakt biljne marihuane dobiven ekstrakcijom sa smjesom metanol/kloroform uz kasniju dekarboksilaciju. Validacija je provedena na cijelom procesu od pripreme uzorka do HPLC analize, a sa odgovarajućim promjenama može biti korištena i na ostalim proizvodima marihuane.

Tablica 2. Analiza uzorka marihuane HPLC/DAD metodom (UNODC, 2009).

Tip kolone:	250x4 mm RP-8 (5 μm); predkolona 4x4 mm RP-8 (5 μm)
Temperatura kolone:	30°C
Mobilna faza:	Acetonitril:voda (8:2 v/v), izokratno, vrijeme zaustavljanja 8 min
Tok:	1mL/min
Metoda detektiranja:	Detektor s fotodiodnim nizom (PDA)[a], 220 nm i 240 nm
Volumen injektiranja:	10 μL
Redoslijed eluiranja:	CBD, CBN, THC, THCA (ukoliko se dekarboksilacija ne provodi ili nije potpuna)

[a]PDA= Detektor s fotodiodnim nizom (engl. *Photodiode array, PDA*)

Vezana tehnika tekućinske kromatografije spregnuta s masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS) može se koristiti za identifikaciju kanabinoida, nakon njihove kvantitativne izolacije superkritičnom fluidnom ekstrakcijom. Moguće je identificirati i kvantificirati 7 glavnih kanabinoida: THCA, THC, CBD, THCV, CBG te CBN. Fluidna ekstrakcija pri superkritičnim uvjetima (engl. *Supercritical fluid extraction*, SFE) je prikladna metoda za ekstrakciju, što se može pripisati sigurnoj upotrebi ugljikova dioksida kao glavnog otapala te etanola kao dodatnog otapala. Štoviše, njome se osigurava stabilnost termolabilnih i na svjetlost osjetljivih molekula i lako se prenosi na industrijske veličine. Kvantifikacija se provodi sa vanjskim standardima, odnosno, standardima koji sadrže ispitivane kanabinoide u koncentracijama od 0,5-1000 ng/mL u metanolu (MeOH) i analiziraju se u istim uvjetima kao i uzorci. Kao mobilna faza u postupku kromatografije najboljom se pokazala mješavina vode sa 0,1% mravljom kiselinom (A) i MeOH sa 0,1% mravljom kiselinom (B), uz protok brzine 0,25 mL/min, injektirani volumen od 10 μL, temperatura kolone na 30 °C (Aizpurua-Olaizola i sur., 2014).

U 2009. godini, De Backer sa suradnicima razvija metodu za kvantifikaciju glavnih kanabinoida (THC, THCA, CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN) u neioniziranom i kiselom obliku, te kvalitativno određivanje Δ^8-THC. Za detekciju je korišten DAD kojim se cijeli spektri snimaju u rasponu od 200-400nm (De Backer i sur., 2009). Kvantifikacija svih analita odvija se pri valnoj duljini 214 nm (Giese i sur., 2015).

Prema monografiji koju je razvio Nizozemski ured za medicinski kanabis (engl. *Office for Medicinal Cannabis*, OMC), odgovoran za proizvodnju marihuane za medicinske i znanstvene svrhe, kao metoda identifikacije, uz mikroskopsku identifikaciju, navodi se

tankoslojna kromatografija (engl. *Thin-layer chromatography*, TLC). Njezina provedba zahtjeva referentne standarde ekstrakata mogućih korištenih sorti. Za detekciju se koristi UV detektor (OMC, 2014).

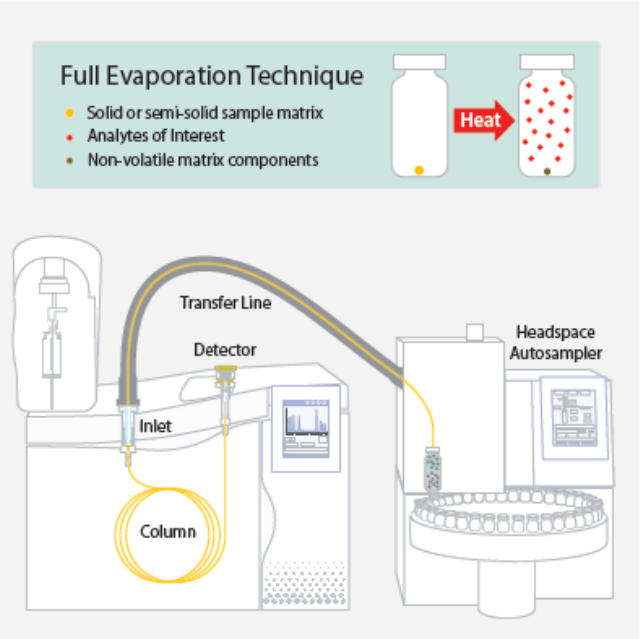
TLC je ujedno jedna od metoda izbora prema UNODC-u. TLC omogućava kvalitativnu i polu-kvantitativnu analizu marihuane, korištenjem različitih stacionarnih faza i sustava otapala, te metoda detekcije (UNODC, 2009).

4.2. Određivanje profila terpena

Terpeni nastaju u trihomima, kao i THC, te daju marihuani njezin karakterističnu okus i miris. Obzirom da su oni hlapljivi, nezasićeni ugljikovodici, njihova analiza se obavlja korištenjem plinske kromatografije.

Terpeni od primarnog interesa su α-pinen, β-mircen, α -humulen i β -kariofilen. Točno određivanje ovih analita i ostalih terpena koji su zanimljivi, ponajviše ovisi o njihovu razdvajanju od ometajućih sastavnica koje mogu onemogućiti kvantifikaciju. Obzirom da mnogi terpeni imaju sličnu molekularnu masu, masena spektrometrija nije u mogućnosti razlikovati terpene od interesa, od ometajućih terpena. Jedini način za preciznu identifikaciju i kvantifikaciju terpena je osigurati da se terpeni od interesa kromatografski odvoje od ometajućih sastavnica. Plinska kromatografija omogućava analizu terpena sa odgovarajućom razlučivosti u vremenu od 35 minuta. Veliko linearno područje plameno-ionizacijskog detektora omogućava određivanje različitih koncentracija terpena (0,01-1,5%) sa jednim injektiranjem (Giese i sur., 2015).

Za analizu biljnog materijala marihuane, preporuča se zamrzavanje uzoraka prije mljevenja ili da se mljevenje obavlja pod tekućim dušikom, jer održavanje uzoraka hladnima sprječava gubitak hlapljivijih terpena, kao što je α-pinen. Kod analize para iznad otopine (engl. *Headspace*) koristi se temperatura od 140°C kako bi se osiguralo hlapljenje svih terpena i terpenoida iz uzorka. Ova temperatura je odabrana jer je dovoljna i za otapanje uzoraka koncentrata marihuane. Vrijeme inkubacije od 30 min koristi se kako bi se osiguralo uspostavljanje ravnoteže tijekom inkubacije, koja je potrebna za dobivanje reproducibilnih, kvantitativnih rezultata (Ringdon i sur., 2014). Slika 2. prikazuje osnovni princip FET (engl. *Full Evaporation Technique*, FET) Headspace injektiranja sparenog sa GC-FID analizom.



Slika 2. FET Headspace uređaj sparen sa GC-FID (Ringdon i sur., 2014).

Za headspace instrumente, smanjenje ulaznog volumena povećava efikasnost smanjenjem širenja vrpca tijekom ulaska uzorka. Bolja efikasnost poboljšava razdvajanje pikova, što je neophodno da bi ova analiza bila uspješna. Za kvantifikaciju se koriste standardi analizirani pod istim uvjetima kao i uzorak kako bi se uklonile moguće greške tijekom hlapljenja, te se analiti kvantificiraju obzirom na njihov relativni faktor odgovora u usporedbi sa standardom, čime se normaliziraju vrijednosti između uzorka i standarda, osiguravajući točnu kvantifikaciju svih terpena.

Headspace uzorkovanje općenito je jednostavno za provesti i ne zahtjeva posebnu ekstrakciju. Dok druge postojeće metode mogu ukloniti kanabinoide iz uzorka, ostavljajući samo terpene, one zahtijevaju više vremena, te povećani rad sa uzorkom može rezultirati gubitkom nekih hlapljivijih terpena. Mljevenje uzoraka pod suhim ledom je dodatna mjera koja se može poduzeti kako bi se taj gubitak minimizirao, jer se reducira toplina koja se stvara tijekom procesa mljevenja (Ringdon i sur., 2014).

Moguća je i GC/MS analiza sa headspace uzorkovanjem, uz knjižnicu spektara Nacionalnog instituta standarda i tehnologije (engl. *National Institute of Standards and Technology*, NIST), što omogućuje identifikaciju preko 3000 terpena (www.growyourlab.com).

4.3. Analiza pesticida

Do danas, ne postoje odobreni pesticidi ili određene granice za korištenje na usjevima marihuane, te su time svi korišteni pesticidi ilegalni (Tablica 3). Iako se broj država u Sjedinjenim Američkim Državama u kojima je dopušteno korištenje medicinske marihuane povećava, još uvijek nedostaju jasni zakoni i regulative za određivanje kvalitete i sigurnosti biljnog materijala za korištenje. U Los Angelesu je provedena analiza na trima uzorcima dobivenima zakonskim putem dostupnim i pacijentima. U jednom uzorku pronađena je 1600 puta, a u drugom 85 puta veća razina od dopuštenih bifentrina, kontaktnog i digestivnog insekticida iz grupe piretroida. Nedostatak kontrole kvalitete rezultira izloženošću pacijenata marihuani sa toksičnim razinama pesticida, što može izazvati dodatne zdravstvene probleme kod i ovako imunokompromitiranih pacijenata. Izlaganje organofosfatnim pesticidima inhalacijom dovodi do brze pojave toksičnih simptoma, a najčešći uzrok smrti je zatajenje dišnog sustava. Dodatno, tijekom zagrijavanja dolazi do pirolize spojeva što može rezultirati pojavom toksičnih produkata pesticida, pojavom produkata biljke koji reagiraju sa pesticidima ili produktima pirolize pesticida stvarajući još toksičnije spojeve (Sullivan i sur., 2013).

Tablica 3. Najčešće korišteni pesticidi u uzgoju marihuane (AHP, 2009).

Pesticid	**Upotreba**	**Analitička metoda**
Abamektin (Avermektini B1a i B1b)	**Insekticid/Akaricid**	**LC-FLD[a]; LC-MS/MS**
Acekvinocil	**Insekticid/Akaricid**	**LC-MS/MS**
Bifenazate	**Akaricid**	**LC; LC/MS/MS**
Bifentrin	**Insekticid**	**GC-ECD[b]; GC-MS/MS**
Klormekvat klorid (sintetički piretroid)	**Regulator rasta**	**LC-MS/MS**
Ciflutrin (sintetički piretroid)	**Insekticid**	**LC (WHO 2004); GC-MS/MS**
Daminozid (Alar)	**Regulator rasta**	**UV Spektroskopija; LC-MS/MS**
Etoksazol	**Akaricid**	**GC-MS(/MS)**
Fenoksikarb	**Insekticid**	**LC/UV; LC-MS/MS**
Imazalil	**Fungicid**	**GC-ECD[b]; LC-MS/MS**

Imidakoprid	**Insekticid**	**LC-MS/MS**
Miklobutanil	**Fungicid**	**GC-ECD[b]; GC-NPD[c]; GC-MS/MS; LC-MS/MS**
Pakobutrazol	**Regulator rasta Fungicid**	**LC-MS/MS**
Piretrini	**Insekticid**	**GC-ECD[b]**
Spinosad	**Insekticid**	**LC-MS/MS; imunološka ispitivanja**
Spiromesifen	**Insekticid**	**GC-MS; LC-MS/MS**
Spirotetramat	**Insekticid**	**LC/LC-MS/MS**
Trifloksistrobin	**Fungicid**	**GC-NPD; GC-MS/MS; LC-MS/MS**

[a]FLD = fluorescencijski detektor (engl. *Fluorescence Detector*, FLD); [b]ECD=detektor hvatanja elektrona (engl. *Electron Capture Detector*, ECD); [c]NPD=dušik fosfor detektor (engl. *Nitrogen Phosphorus Detector*; NPD)

Danas u uzgoju marihuane, najčešće metode analize organofosfata, organoklorida, karbamata i etilendiamintetraoctene kiseline su imunološka ispitivanja, kao što je imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA), kod koje je problem što ne može ciljati određene spojeve ili potvrditi analizu. Obzirom da su imunološka ispitivanja cjenovno dostupna većini laboratorija često se koriste kod analize marihuane, ali postoji i veliki rizik ne-detektiranja ostataka pesticida (AHP, 2009).

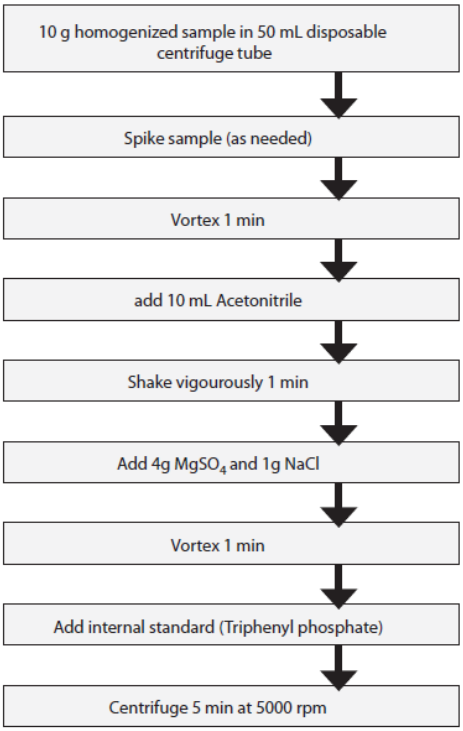
Monografija *Cannabis flos* prema OMC-u, za analizu pesticida upućuje na Europsku farmakopeju, prema kojoj se za analizu i kvantifikaciju pesticida koristi plinska kromatografija uz karbofenotion kao unutrašnji standard.

Svaka analitička metoda za ostatke pesticida mora biti u mogućnosti izolirati, odvojiti, identificirati i kvantificirati veliki broj sastavnica u malim koncentracijama. Uz to moraju pokazivati selektivnost i osjetljivost. Razine pesticida vremenom opadaju, nakon upotrebe u uzgoju, dijelom zbog fotooksidacije, isparivanja te biološke razgradnje, pa su ostaci na sakupljenom proizvodu često u dijelovima na milijun (engl. *part-per-million*, ppm) ili čak dijelovima na milijardu (engl. *part-per-billion*, ppb). Što je niža koncentracija pesticida, to bolja mora biti ekstrakcija pesticida kako bi se pouzdano identificirali i kvantificirali ostaci. Odvajanje pesticida od ostalih dijelova biljke je izuzetno zahtjevno. Pesticidi mogu biti kiseli, lužnati ili neutralni. Mogu imati širok raspon polarnosti i svojstava topljivosti. Mnogi su osjetljivi na toplinu i za neke se zna da se vežu na površine tijekom izolacije. Kako aktivni

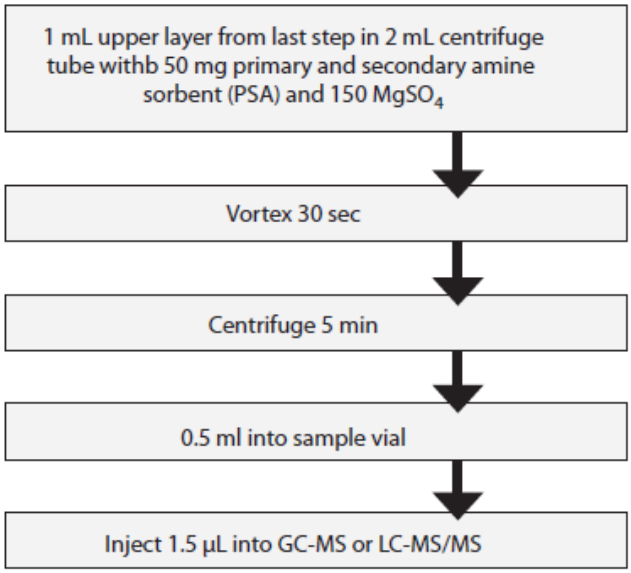
kanabinoidi nastaju uglavnom u trihomima na površinama listova i cvjetova, koje su izuzetno smolaste, a mnogi pesticidi su hidrofobni te adheriraju ili se otapaju u tim smolastim strukturama, njihova izolacija predstavlja veliki izazov.

Veliki napredak u pripremi uzorka za analizu pesticida bio je korištenje organskih otapala za ekstrakciju neosušenih uzoraka u prisutnosti soli, kako bi se pomoglo razdvajanje vodene i organske faze. Modificiranjem ove metode nastala je QuEChERS metoda (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) za pripremu uzorka. Metoda ima dva dijela; ekstrakcija uzorka i disperzivna ekstrakcija čvrte faze (engl. *Solid phase extraction*, SPE) (Slika 3 i 4). Tijekom ekstrakcije acetonitril (ACN) se dodaje homogeniziranom, mljevenom uzorku u jednokratnoj epruveti za centrifugiranje, a kako bi se izbjegli gubici hlapljivih pesticida, mljevenje se često provodi u ekstrakcijskoj cijevi sa dodanim suhim ledom.

Dobiveni uzorak može se analizirati različitim metodama, ali u komercijalnim analitičkim laboratorijima kromatografski sustavi (GC i HPLC) se najčešće koriste za razdvajanje, detektiranje te identificiranje sastavnica uzorka.



Slika 3. Primjer ekstrakcije korištenjem Bond Elut Kit za QuEChERS pripremu uzorka (Daley i sur., 2013).



Slika 4. SPE čišćenje za QuEChERS pripremu uzorka (Daley i sur., 2013).

Smetnje do kojih dolazi istovremenim izlaskom više sastavnica u GC-MS i LC-MS rješava se dodatkom dodatnog masenog spektrometra (tandem masena spektrometrija, MS/MS). Problem kod ovakve analize je da je potrebno prethodno znanje vremena zadržavanja i kemijskih struktura analita za programiranje tandemske masene spektrometrije. Pouzdanost rezultata dobivenih kombinacijom masenog spektrometra sa efikasnim kromatografskim metodama čini GC-MS, te pogotovo HPLC-MS metodama izbora za analizu različitih pesticida (Daley i sur., 2013). Iako je GC-MS/MS jeftiniji izbor, zabilježene su studije koje pokazuju da se preciznost i osjetljivost koju ova analiza zahtjeva ipak lakše dobiva korištenjem HPLC-MS/MS, pogotovo ukoliko je broj ispitivanih analita velik (Adler i suradnici, 2006).

U posljednje vrijeme za detekciju se koristi i analizator vremena leta (engl. *Time Of Flight*, TOF), no ova metoda ima lošiju preciznost kod niskih koncentracija analita, pa se u radu još uvijek preferiraju MS/MS sustavi (Daley i sur., 2013).

4.4. Ostatna otapala

Obzirom da za regulaciju količine ostatnih otapala nisu određeni specifični limiti, najčešće se slijede smjernice Međunarodne konferencije o usklađivanju (engl. *International Council for Harmonization*, ICH) za biljne preparate. Prema ICH smjernicama otapala se

kategoriziraju u 3 kategorije. Kategorija 1 uključuje poznate karcinogene, toksične supstance i otapala štetna za okoliš kao što su benzen, ugljik tetraklorid, 1,2-dikloretan, 1,1-dikloreten, 1,1,1-trikloretan. Oni se moraju izbjegavati u procesu proizvodnje biljnih i farmaceutskih proizvoda. Kategorije 2 i 3 se razlikuju obzirom na njihovu toksičnost. Kategoriju 2 čine otapala koja pokazuju reverzibilnu toksičnost, koja nije štetna za čovjeka ukoliko je količina otapala ispod razine propisane farmakopejom. To su: acetonitril, klorobenzen, kloroform, cikloheksan, 1,2-dikloreten, diklormetan, 1,2-dimetoksietan, N,N-dimetilacetamid, N,N-dimetilformamid, 1,4-dioksan, 2-etoksietanol i dr. Kategorija 3 su manje toksična otapala i sa niskom štetnošću za ljudsko zdravlje. Ona ne uključuje nijedno otapalo poznato kao štetno za čovjeka u razinama normalno prihvaćenima u farmakopeji, ali ne postoje dugotrajne studije toksičnosti ili karcinogenosti. Količina otapala od 50 mg/dan smatra se prihvatljivom za čovjeka.

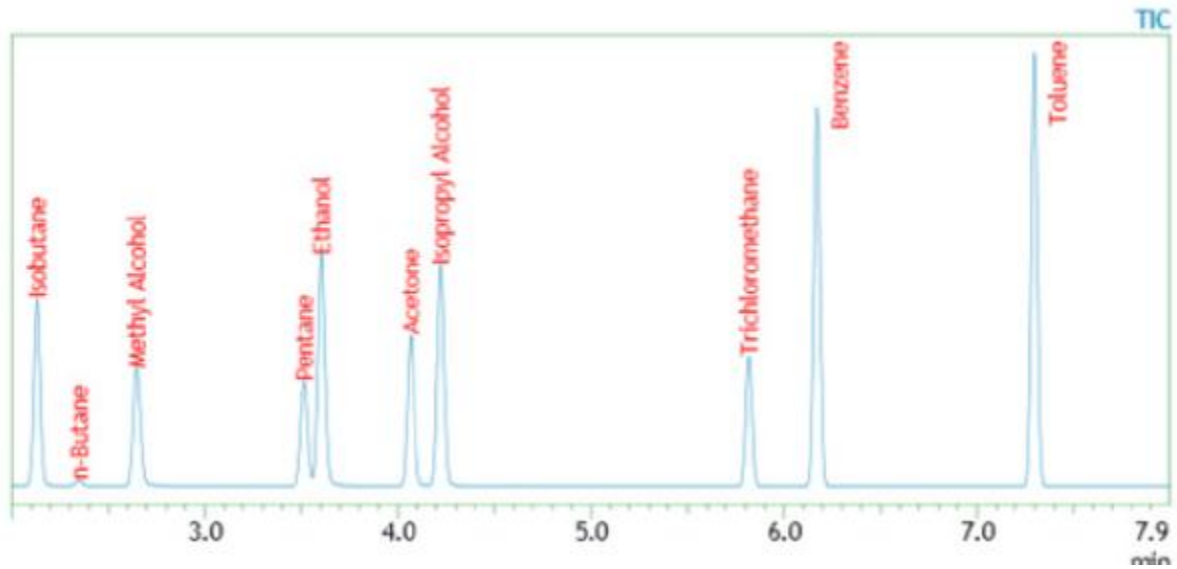
Ekstrahirani koncentrati marihuane dalje se formuliraju u ulje, vosak, maslac ili druge oblike. Za sam proces dobivanja ekstrakata iz sirovog biljnog materijala obično su potrebne velike količine otapala kako bi se povećala efikasnost ekstrakcije i kako bi se postigla viša razina čistoće. Nakon što je proces ekstrakcije završen, potrebno je ukloniti otapala. Gotovo je nemoguće ukloniti ukupnu količinu otapala, pa se otapala često nalaze u dobivenim ekstraktima.

Ekstrakcija se odvija sa različitim otapalima kao što su ugljikov dioksid, butan, propan, etanol, izopropanol, aceton i drugi. Zbog sigurnosti, otapala moraju biti uklonjena iz konačnog proizvoda prije konzumacije.

Među mnogim faktorima koji utječu na uklanjanje otapala je brzina kojom će otapala difundirati na površinu uzorka i ispariti. Viskoznost uzorka i veličina molekula su jako bitni čimbenici. Kod viskoznijih uzoraka, molekule otapala teže dolaze na površinu. Male molekule kao što su butan i propan brzo difundiraju, zbog čega se oni najčešće odabiru kao otapala (http://steephilllab.com).

Ostatna otapala se analiziraju metodom headspace sa plinskom kromatografijom te plameno ionizacijskim detektorom (HS-GC-FID) ili masenim spektrometrom (HS-GC-MS). Headspace je metoda kod koje zagrijavanjem uzorka, otapala prelaze u plinovitu fazu. Para iznad uzorka uvodi se u plinski kromatograf koji razdvaja sastavnice. Prednost ove tehnike je da djeluje kao filter, jer u kromatograf ulaze samo jako isparljive sastavnice kao što su otapala. Maseni spektrometar je metoda detekcije koja omogućava nedvojbenu identifikaciju

otapala, kao i njegovu kvantifikaciju u uzorku. Prednost korištenja masenog spektrometra je mogućnost detekcije i ostalih isparljivih kemikalija prisutnih u uzorku, ukoliko su korištena manje čista otapala koja mogu imati prisutne neočitavane ostatke. Ujedno to je iznimno osjetljiva metoda za većinu otapala (www.mmlabtesting.com).



Slika 5.Headspace-GC/MS analiza standarda otapala (www.growyourlab.com).

Tijekom analize kako bi se identificiralo otapalo u uzorku, potrebno je koristiti poznate standarde.

Kod analize ostatnih otapala GC-MS metodom, važno je znati da ukoliko uzorak koji se analizira sadrži i kanabinoidne kiseline, uzorak se ne smije predugo zagrijavati (20-30 minuta), jer dužim zagrijavanjem dolazi do dekarboksilacije kiselina i oslobađanja ugljikova dioksida koji ometa identifikaciju ostatnih otapala. Ostatna otapala se identificiraju uspoređujući maseni uzorak sa onima iz NIST knjižnice, prikazanima na slici 5. (Raber i sur., 2015).

4.5. Teški metali

Onečišćenje marihuane teškim metalima može biti zabrinjavajuće obzirom da su to elementi koji se metabolički ne razgrađuju u organizmu, već se akumuliraju u tijelu uzrokujući različite zdravstvene probleme među kojima su i neurološki poremećaji. Teški

metali u prirodu dolaze erupcijom vulkana i erozijom, ali također i kao nusprodukti industrijalizacije. Metali kao što su živa, kadmij i krom su široko raširenи u okolišu, te su zagađivači voda i poljoprivrednih površina. Marihuana hiperakumulira metale iz zagađenih tla, a ujedno se koristila za ekstrakciju kadmija i bakra iz tla.

Prema OMC-u, ispitivanje teških metala provodi se na 5 grama mljevenog materijala korištenjem atomske emisijske spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*, ICP-AES), te atomske apsorpcijske spektroskopije (engl. *Atomic absorption spectroscopy*, AAS).

Olovo: max. 20.0 ppm (ICP-AES)

Kadmij: max.0.5 ppm (ICP-AES)

Živa: max. 0.5 ppm (AAS)

Arsen: Indikativan (ICP-AES)

Nikal: Indikativan (ICP-AES)

Cink: Indikativan (ICP-AES)

Američka udruga za biljne proizvode (engl. *The American Herbal Products Association*, AHPA) predložila je sljedeće razine kao maksimalne kvantitativne limite za biljne proizvode koji se konzumiraju oralno:

Olovo: 6.0 μg/dan

Kadmij: 4.1 μg/dan

Živa: 2.0 μg/dan

Arsen: 10.0 μg/dan

Metodama koje se najčešće koriste, AAS, AES te ICP-MS, zajedničko je što su visoko osjetljive, u nekim slučajevima omogućuju mjerenje u dijelovima na bilijun (engl. *part-per-trillion*, ppt) vrijednostima, međutim one su i skupe. Nova metoda koja ujedno i smanjuje cijenu i brzinu analiza je fluorescencija X-zraka (engl. *X-ray fluorescence*, XRF). Prednost ove metode je i neovisnost o jako obrađenim uzorcima, te u nekim slučajevima prenosivost (Daley i sur., 2013).

4.6. Sadržaj vlage i stalna masa

Pravilno sušenje biljnog materijala sprečava pojavu grinja i insekata. Međutim, najveće prijetnje kod čuvanja marihuane su gljivice i bakterije. Vrste *Aspergillus, Rhizopus* i *Penicillium,* predstavljaju najveću gljivičnu opasnost uskladištenoj marihuani. Ove gljivice rastu u uvjetima s malo kisika i ograničenom vlagom. Indijski forenzički znanstvenik Dr. Mohinder Singh Dahiya je 1977. godine sa kolegama istraživao tla koja nastanjuju gljivice. Istraživali su učinak kanabinoida na 18 vrsti gljivica i pokazalo se da CBD i THC inhibiraju rast svih vrsta osim *Aspergillus niger* i *Penicillium chrysogenum.*

Vlažna marihuana pohranjena u hermetičkim posudama lako biva uništena djelovanjem *Clostridium* bakterije, koja je ujedno i razlog zašto je kontrola vlage toliko važna. Mnoge bakterije mogu rasti na vlažnoj marihuani, a neke od njih su štetne za čovjeka. Istraživanjima se pokazalo da bakterije koje su često pronađene u zaplijenjenim cigaretama marihuane, a ujedno uzrokuju i ozbiljne zdravstvene probleme su: *Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumonia, Streptococcus,* te *Salmonella muenchen.*

Tijekom procesa sušenja važno je da biljka ostane neoštećena, jer gljivice dobiju uporište na oštećenom dijelu biljke. Da bi se spriječio rast plijesni i bakterija nužna je kontrola sadržaja vlage. Biljke marihuane sadrže 80% vode. Savršeno osušeni biljni materijal imati će sadržaj vlage 10-12%, jer gljivice ne mogu rasti ispod 15%, a ukoliko je sadržaj vlage manji od 10%, materijal postaje prelomljiv i raspada se.

Marihuana se kao i duhan prodaje na masu, te zbog toga uzgajivači često dopuštaju proizvodu da ponovno apsorbira vodu kako bi dobio na masi (www.triqsystems.com).

Točno i precizno određivanje sadržaja vlage omogućava točno i precizno određivanje sadržaja aktivnih tvari. Prema EP-i, sadržaj vlage određuje se Karl-Fischer titracijom. Karl-Fischer titracija je titracijska metoda u analitičkoj kemiji koja koristi volumetrijsku ili kulometrijsku titraciju kako bi se odredili tragovi vode u uzorku. Zasniva se na kvantitativnoj reakciji vode sa jodom i sumpor dioksidom u nevodenoj sredini, uz odgovarajuću bazu koja mora imati dovoljan puferski kapacitet. Kao baza se prije koristio piridin, ali je kasnije zamijenjen aminima.

Princip reakcije:

1) $CH_3OH + SO_2 + RN \leftrightarrow [RNH]SO_3CH_3$

2) $H_2O + I_2 + [RNH]SO_3CH_3 + 2RN \leftrightarrow [RNH]SO_4CH_3 + 2[RNH]I$

R=baza

Brzina reakcije ovisi o bazi koja se koristi u prvoj reakcija, dok je druga reakcija, oksido-redukcijska reakcija.

Kod volumetrijske titrakcije titrant se dodaje iz birete direktno u uzorak, dok se kod kulometrijske titrant generira elektrokemijskim putem.

Za određivanje vlage mogu se koristiti i vlagomjeri, odnosno analizatori vlage. Postoje dvije vrste, jedna mjeri električki otpor vlakana biljke, koji se smanjuje što je količina vlage u biljci veća. Druga vrsta mjeri dielektrička svojstva biljke i za mjerenje je potreban samo površinski kontakt sa biljkom (www.moisturemeters.com).

Odvagom do stalne mase dobiva se uzorak sa niskom razinom vlage, što je posebno važno za gravimetrijske metode. Općenito, uzorak se suši na temperaturi 103-110 °C sat vremena, nakon čega se suši do sobne temperature u desikatoru. Zatim se važe i ponovno suši oko 30 minuta. Uzorak se zatim po drugi put hladi i važe. Ovaj postupak se ponavlja dok razlika između uzastopnih vaganja bude manja od 0,3 mg (http://www.ecs.umass.edu).

5. Zaključak

U listopadu 2015. godine promijenjen je Pravilnik kojim se regulira stavljanje u promet pripravaka na bazi indijske konoplje, te je u svojim smjernicama Povjerenstvo za analizu i preporuke primjene indijske konoplje i kanabinoida u medicinske svrhe preporučilo korištenje ljekovitih biljnih pripravaka na bazi indijske konoplje oboljelima od malignih bolesti, AIDS-a, multiple skleroze i dječjeg epileptičnog sindroma. Obzirom da monografija *Cannabis flos* u Europskoj farmakopeji još uvijek nije službeno objavljena, u ovom radu je napravljen pregled analiza koje je potrebno obaviti, kako bi pacijentu bio zajamčen kvalitetan i certificiran proizvod.

Kako se radi o biljnom preparatu, analitički postupci koje je potrebno provesti slični su kao i za većinu ostalih biljnih droga. To su: ispitivanje sadržaja, analiza pesticida, ostatnih otapala i teških metala, te određivanje vlage i odvaga do stalne mase. Kod medicinske marihuane važno je i određivanje profila terpena, obzirom na njihov sinergistički učinak sa fitokanabinoidima.

Iako se o medicinskoj marihuani i njezinim učincima već dugo vremena vode brojne debate, sada kada je legalizirana i prisutna na tržištu, ipak ostaje još mnogo nepoznanica, počevši od doziranja doza za pojedinog pacijenta, te samog vremenskog trajanja terapije, što zahtijeva pozorno praćenje i analizu ishoda primjene medicinske marihuane.

6. Literatura

1. A closer look at Cannabis testing, 2014., http://www.shimadzu.com, pristupljeno 30.03. 2016.
2. A preliminary FET Headspace GC-FID method for comprehensive terpene profiling in Cannabis, 2014., http://www.restek.com, pristupljeno 30. 04. 2016.
3. Aizpurua-Olaizola O, Omar J, Olivares M, Etxebarria N. Identification and quantification of cannbinodis in Cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 2-13.
4. American Herbal Pharmacopeia, Cannabis Inflorescence and Leaf. 2013.
5. Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. Cannabis sativa: The Plant of the thousand and one molecules. *Front Plant Sci*, 2016, 7, 2-14.
6. Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constitutens. U: Marijuana and the Cannabinoids Forensic Science and Medicine. ElSohly MA, urednik, New Jersey, Humana Press, 2007, str. 17-49.
7. Cannabis Analysis: Potency testing identification and Quantification of THC and CBD by GC/FID and GC/MS, 2015., http://www.perkinelmer.com, pristupljeno 20. 04. 2016.
8. Daley P, Lampach D, Sguerra S. Testing Cannabis for contaminants. BOTEC Analysis Corporation. 2013, str. 17-30.
9. De Backer B, Debrus B, Lebrun P, Theunis L, Dubois N, Decock L, Verstraet A, Huvert P, Charlier C. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J Chromatogr B*, 2009, 877, 4115-4124.
10. European Pharmacopeia 6. izdanje (2008) Strasbourg, Council of Europe.
11. Fischedick JT, Hazekamp A, Verpoorte R. Metabolic fingerprinting of Cannabis sativa L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 2010, 71, 2058-2073.
12. Giese MW, Lewis MA, Giese L, Smith KM. Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in Cannabis. *J AOAC Int*, 2015, 98, 1503-1521.
13. Gomez-Ruiz M, Hernandez M, Miguel R, Ramos JA. An overview on the biochemistry of the Cannabinoid system. *Mol Neurobiol*, 2007, 36, 3-11.
14. Gonzalez R. Acute and Non-acute effects of Cannabis on Brain Functioning and Neuropsychological Performance. *Neuropsychol Rev*, 2007, 17, 347-361.
15. Gravimetric methods, 2015., http://www.ecs.umass.edu, pristupljeno 12. 05. 2016.

16. Hazekamp A, Fischedick JT. Cannabis - from cultivar to chemovar. *Drug Test Anal*, 2012, 2-7.
17. Legal Cannabis Drying Techniques That'll Instantly Improve Your Product, 2015., http://www.triqsystems.com, pristupljeno 12. 05. 2016.
18. Marioti K, Marcelo MCA, Ortiz RS, Borille BT, Reis M, Fett MS, Ferrao MF, Limberger RP. Seized Cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography-mass spectrometry and chemometric analysis. *Sci Justice*, 2016, 56, 35-41.
19. Moisture meter technology, 2015., http://www.moisturemeters.com, pristupljeno 12. 05. 2016.
20. Office of Medicinal Cannabis. Analytical Monograph Cannabis Flos. 2014.
21. Raber JC, Elzinga S, Kaplan C. Understanding dabs: contamination concerns of cannabis concentrates and cannabinoid transfer during the act of dabbing. *J Toxicol Sci*, 2015, 6, 797-803.
22. Residual solvents, 2015., http://www.mmlabtesting.com, pristupljeno 12. 05. 2016.
23. Russo EB. Taming THC: potential Cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*, 2011, 163, 1344-1364.
24. Shimadzu Cannabis testing solutions, 2015, http://www.growyourlab.com, pristupljeno 12. 05. 2016.
25. Sullivan N, Elzinga S, Raber J C. Determination of pesticide residues in Cannabis smoke. *J Toxicol*. 2013, 1-5.
26. United Nations Office on Drugs and Crime. Cannabis: A short review, 2012, 2-7.
27. United Nations Office on Drugs and Crime. Recommended methods for the identification and analysis of Cannabis and Cannabis Products. 2009, 41-43.
28. What is residual solvent analysis?, 2014, http://www.steephilllab.com, pristupljeno 12. 05. 2016.
29. Williamson EM, Evans FJ. Cannabinoids in clinical practice. *Drugs*, 2000, 60, 1303-1314.

7. Sažetak/Summary

7.1. Sažetak

Medicinska je marihuana od listopada 2015. godine legalizirana na tržištu Republike Hrvatske. Obzirom da se najčešće primjenjuje kod već imunokompromitiranih bolesnika, mora biti bez stranih tvari, plijesni i bakterija koje su patogene, te sa razinom teških metala do onih dopuštenih i propisanih Američkom biljnom farmakopejom i dokumentima Ujedinjenih naroda. Važno je osigurati da se uklone otapala zaostala nakon procesa ekstrakcije, te da se kvalitativno i kvantitativno odrede kanabinoidi i terpeni.

U ovom radu je napravljen pregled relevantne znanstvene literature o analitičkim postupcima u kontroli kakvoće preparata s medicinskom marihuanom. Kako medicinska marihuana nije dugo vremena prisutna na tržištu u Hrvatskoj, kao ni u Europi, u ovom radu su opisani potrebni analitički postupci za dobivanje kvalitetnog proizvoda koji odgovara potrebama pacijenta. Opisane su analitičke metode koje je moguće koristiti za ispitivanje sadržaja, određivanje profila terpena, analizu pesticida, ostatnih otapala i teških metala, te određivanje sadržaja vlage i odvaga do stalne mase, kao i sama važnost provođenja analize preparata s medicinskom marihuanom.

7.2. Summary

Medicinal marijuana has been legalized on the Croatian market in October 2015. Since it is usually applied to already immunocompromised patients, it must be free from foreign matter, mold and bacteria that are pathogenic, and the level of heavy metals must abide those permitted and prescribed by the American herbal pharmacopoeia and documents of the United Nations. It is important to ensure that residual solvent is removed after the extraction process, and to qualitatively and quantitatively determine the cannabinoids and terpenes.

This thesis is an overview of the relevant scientific literature on the analytical procedures to control the quality of products of medical marijuana. As medical marijuana has not been on the market in Croatia, as well as in Europe, for a long time, this paper describes the analytical procedures necessary to obtain a quality product that meets the needs of the patient. It describes the analytical methods that can be used to test the contents, the determination of the profile of terpenes, analysis of pesticides, residual solvents and heavy metals, and the determination of moisture content and weighs up to constant weight, as well as the importance of conducting analysis of the preparation with medical marijuana.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Analitički postupci u kontroli kakvoće preparata s medicinskom marihuanom

Marija Čolak

SAŽETAK

Medicinska je marihuana od listopada 2015. godine legalizirana na tržištu Republike Hrvatske. Obzirom da se najčešće primjenjuje kod već imunokompromitiranih bolesnika, mora biti bez stranih tvari, plijesni i bakterija koje su patogene, te sa razinom teških metala do onih dopuštenih i propisanih Američkom biljnom farmakopejom i dokumentima Ujedinjenih naroda. Važno je osigurati da se uklone otapala zaostala nakon procesa ekstrakcije, te da se kvalitativno i kvantitativno odrede kanabinoidi i terpeni.

U ovom radu je napravljen pregled relevantne znanstvene literature o analitičkim postupcima u kontroli kakvoće preparata s medicinskom marihuanom. Kako medicinska marihuana nije dugo vremena prisutna na tržištu u Hrvatskoj, kao ni u Europi, u ovom radu su opisani potrebni analitički postupci za dobivanje kvalitetnog proizvoda koji odgovara potrebama pacijenta. Opisane su analitičke metode koje je moguće koristiti za ispitivanje sadržaja, određivanje profila terpena, analizu pesticida, ostatnih otapala i teških metala, te određivanje sadržaja vlage i odvaga do stalne mase, kao i sama važnost provođenja analize preparata s medicinskom marihuanom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 39 stranica, 5 grafičkih prikaza, 3 tablice i 29 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: medicinska marihuana, teški metali, određivanje terpena, kanabinoidi, stalna masa, sadržaj vlage, analiza pesticida

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *docent, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Dr. sc. Ana Mornar Turk, *izvanredni profesor, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Dr. sc. Petra Turčić, docent, *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.*

Rad prihvaćen: lipanj 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Drug Control and Analytics
A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Analytical procedures to control the quality of products with medical marijuana

Marija Čolak

SUMMARY

Medicinal marijuana has been legalized on the Croatian market in October 2015. Since it is usually applied to already immunocompromised patients, it must be free from foreign matter, mold and bacteria that are pathogenic, and the level of heavy metals must abide those permitted and prescribed by the American herbal pharmacopoeia and documents of the United Nations. It is important to ensure that residual solvent is removed after the extraction process, and to qualitatively and quantitatively determine the cannabinoids and terpenes.

This thesis is an overview of the relevant scientific literature on the analytical procedures to control the quality of products of medical marijuana. As medical marijuana has not been on the market in Croatia, as well as in Europe, for a long time, this paper describes the analytical procedures necessary to obtain a quality product that meets the needs of the patient. It describes the analytical methods that can be used to test the contents, the determination of the profile of terpenes, analysis of pesticides, residual solvents and heavy metals, and the determination of moisture content and weighs up to constant weight, as well as the importance of conducting analysis of the preparation with medical marijuana.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 39 pages, 5 figures, 3 tables and 29 references. Original is in Croatian language.

Keywords: medical marijuana, heavy metals, determination of terpenes, cannabinoids, constant weight, moisture content, analysis of pesticides

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D**. *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D**. *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

Ana Mornar Turk, Ph.D. *Associate Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

Petra Turčić, Ph.D. *Assistant Professor, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb.*

The thesis accepted: June 2016.