



UNIERSYTET GDAŃSKI
WYDZIAŁ CHEMII

Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Ćwiczenia laboratoryjne - teoria

Kannabinoidy

ANALIZA CHEMICZNA W KRYMINALISTYCE
FIZYKOCHEMICZNE METODY BADAŃ W KRYMINALISTYCE

Gdańsk, 2008

I. Występowanie i budowa kannabinoidów

Specjaliści ONZ szacowali, że na 200 mln ludzi stosujących narkotyki w 1998 roku 14 mln zażywało kokainę, 8 mln heroinę i aż 140 mln marihuanę, która ustępuje pierwszeństwa tylko alkoholowi i papierosom.

Marihuana, haszysz i olej haszyszowy produkowane są z konopi.

Konopie siewne (*Cannabis sativa*) jest to gatunek jednorocznej rośliny zielnej z rodziny konopiowatych (Cannabaceae Endl.) występujący w górach Ałtaj, Tien-Szan, na Zakaukaziu i w Afganistanie. Jest to roślina dwupienna – kwiaty żeńskie zebrane są po dwa w kątach małych liści w kłosy pozorne; kwiaty męskie zebrane są w wiechy w kątach łuskowatych liści. Osiąga wysokość nawet ponad 3 m.

Konopie włókniste (*Cannabis sativa* var. *vulgaris*) jako roślina uprawna rozpowszechniona jest w różnych częściach świata i wykorzystywana jest do produkcji włókna (sznurek, liny), oleju konopnego oraz na paszę dla zwierząt (części zielne). Konopie włókniste zawierają małe ilości związków psychotropowych (do 0,2%).

Podgatunek indyjski (*Cannabis sativa* subsp. *indica*), tzw. typ narkotyczny, zawierający znaczne ilości związków psychotropowych wykorzystywany jest do produkcji marihuany, haszyszu i oleju haszyszowego.

Marihuana to odpowiednio uformowane kwitnące i owocujące wierzchołki oraz liście narkotycznej odmiany konopi. Wyróżnia się marihuanę tzw. Sinsemila (bez nasion) o wysokiej zawartości substancji psychoaktywnych, wytwarzaną w Ameryce Południowej i Północnej. Są to żeńskie, nie zapylone, a więc nie wytwarzające nasion, osobniki konopi (*Cannabis indica* L.).

Haszysz, czyli żywica konopi wydzielana przez kwitnące i owocujące wierzchołki rośliny. Żywicę zbiera się trzema sposobami: młócenie i oddzielanie części roślinnych, pozostały produkt formuje się w płyty (Kraje Śródziemnomorskie), zbieranie ręczne przez rozcieranie wierzchołków roślin w rękach i zeskrobywanie przyklejonej do rąk żywicy, zanurzanie w gorącej wodzie pozbawionych łodyg części roślin a następnie po ostudzeniu zebranie żywicy w postaci stałej masy z powierzchni wody (subkontynent indyjski).

Są dwa sposoby używania haszyszu: palenie w fajce i dodawanie do żywności.

Olej haszyszowy to ciekły ekstrakt materiału roślinnego lub żywicy otrzymany za pomocą rozpuszczalników organicznych (alkohol, benzyna, eter naftowy). W roztworze olej haszyszowy przyjmuje barwę zieloną lub brązową, w zależności od rodzaju rozpuszczalnika i stopnia dojrzałości roślin. Olej zielony pochodzi najczęściej z części zielnych, a brązowy z haszyszu. Olej jest “wygodny” dla przemytników, w szczelnie zamkniętych butelkach nie

jest wyczuwany przez psy. “Wygodne” używanie oleju haszyszwego polega też na paleniu zwykłych papierosów tytoniowych z dodatkiem 2-3 kropli oleju.

Substancje psychotropowe występujące w konopiach noszą nazwę kannabinoidów.

Kannabinoidy jest to grupa ok. 60 związków chemicznych o 21 atomach węgla, naturalnie występujących wyłącznie w konopiach.

Terminem kannabinoidy określa się też syntetyczne analogi strukturalne naturalnych składników *Cannabis* oraz ich metabolity powstające w żywych organizmach. Najważniejszym psychoaktywnym składnikiem kannabinoidów jest substancja o wzorze (6aR,10aR)-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimetylo-3-pentylo-6H-dibenzo[*b,d*]piran-1-ol powszechnie zwana (-) Δ^9 -**tetrahydrokannabinolem lub w skrócie Δ^9 -THC albo THC** (numerację atomów w cząsteczce oparto na strukturze dibenzopiranu, niektórzy autorzy posługują się strukturą monoterpenoidu, rys. 1 i 2). Jego przeciętna zawartość w produktach z konopi spotykanych na nielegalnym rynku wynosi:

produkty roślinne (marihuana) – 0,5 -5%

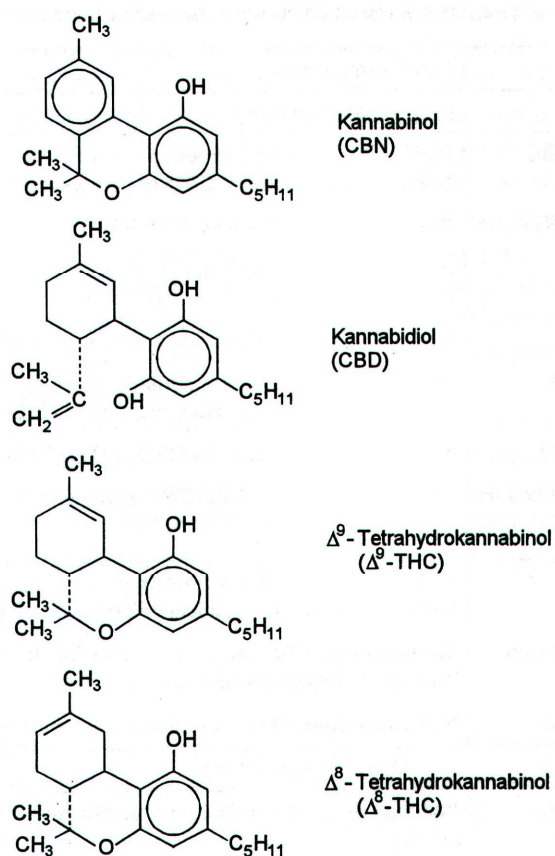
żywica (haszysz) – 2-10%

olej haszyszwowy – 10-30%

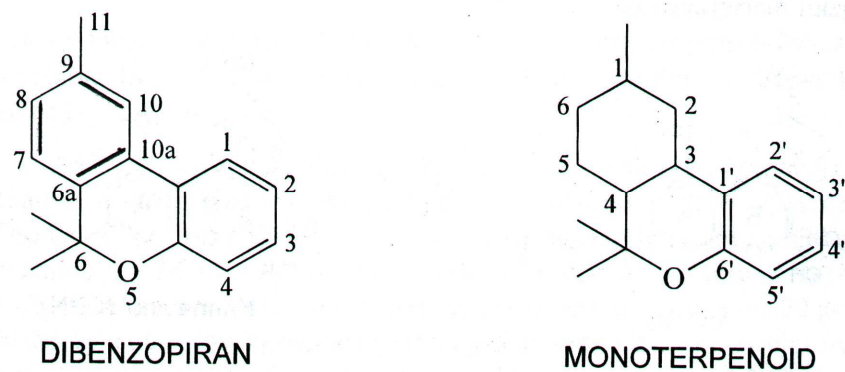
i zależy od właściwości genetycznych rośliny, warunków wegetacji, sposobu zbierania, wieku rośliny, rodzaju gleby i klimatu. Można dobrać odpowiednie warunki uprawy w celu podniesienia zawartości kannabinoidów, ostatnio w Holandii wyhodowano roślinę, która miała 20% THC w częściach zielnych.

W kannabis występuje złożona mieszanina kannabinoidów, z których najważniejsze poza Δ^9 -THC to: kannabinol (CBN), kannabidiol (CBD), kannabichromen (CBC), Δ^8 -THC, kannabigerol (CBG), kannabiwarin (CBV), kannabicyklol (CBL) oraz, niewystępujące w oleju haszyszwym, kwasy kannabinolowe, takie jak: kwas kannabinolowy (CBNA), kwas kannabidiolowy (CBDA), kwas kannabichromenowy (CBCA), kwas kannabigerolowy (CBGA), kwas tetrahydrokannabiwarynowy (THVA), kwas tetrahydrokannabinolowy (kwas 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowy, THCA, THCCOOH, 9-karboksy-THC).

Na rys. 1 przedstawiono struktury chemiczne najważniejszych kannabinoidów. Numerację atomów w cząsteczce oparto na strukturze dibenzopiranu (rys. 2)



Rys. 1. Struktury chemiczne najważniejszych kannabinoidów.



Rys. 2. Struktura chemiczna dibenzopirany i monoterpenu.

II. Działanie kannabinoidów na organizm człowieka

Zażywanie produktów kannabis powoduje stan odurzenia. Występują zaburzenia percepcji różnych części ciała, zaburzenia poczucia czasu i przestrzeni, depersonalizację, wzmożoną wrażliwość na dźwięki, synestezje, skłonność do ulegania sugestiom, poczucie wyrazistego

myślenia. Może również występować niepokój i reakcje paranoidalne. Po ustąpieniu objawów odurzenia marihuana wywołuje raczej uspokojenie niż niepokój. Nie powoduje rozszerzenia źrenic, wzrostu ciśnienia krwi, osłabienia odruchów i podwyższenia ciepłoty ciała, powoduje natomiast tachykardię. Niewielkie dawki stosowane przez krótki czas u osób zdrowych nie wywołują zwykle widocznych zakłóceń pracy serca, jednak cierpiącym na chorobę wieńcową zwiększają prawdopodobieństwo zawału i nagłej śmierci.

U osób przyjmujących duże dawki przez długi czas może pojawić się tolerancja, mogą też pojawić się kilkudniowe objawy odstawienne, takie jak: niepokój, drgawki i dreszcze, bezsenność.

Najczęściej narkomani palą papierosy lub fajki z liśćmi lub żywicą kannabis, znacznie rzadziej preparaty kannabis przyjmowane są doustnie lub dożylnie. Aktywne składniki docierają łatwo i szybko przez drogi oddechowe do krwiobiegu, a z krwią do mózgu, narażając w pierwszej kolejności układ oddechowy i krążenia.

Dym marihuany działa szkodliwie na cały układ oddechowy. Długotrwałe palenie zwiększa ilość wydzieliny z nosa, powoduje zgrubienie błony śluzowej w zatokach, nawracające stany zapalne nosa i gardła, uporczywy kaszel, przewlekłe zapalenie oskrzeli, rozedmę płuc, astmatyczny oddech oraz najgroźniejszą - metaplastję nabłonka, czyli przemianę komórek macierzystych na odmienne czynnościowo i morfologicznie.

Marihuana podczas palenia daje od 50 do 100% więcej wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych niż tytoń, w tym benzopirenu i benzoantracenu – silnych kancerogenów.

Kannabinoidy działają na narządy związane z reprodukcją – jądra, jajniki, łożysko. U kobiet występuje zaburzenie cyklu miesięcznego, co uniemożliwia implantację zapłodnionego jaja w macicy. Zwiększa się poziom testosteronu, powodując nadmierne owłosienie. Przyjmowanie marihuany w okresie dojrzewania powoduje zmniejszenie produkcji estrogenów, co prowadzi do niedorozwoju układu rozrodczego.

Δ^9 -THC ma właściwości silnie lipofilne, jest zatrzymywany przez lipidy gruczołów piersiowych i trafia do mleka. Kannabinoidy łatwo przechodzą przez łożysko, a że wątroba płodu nie potrafi ich metabolizować, odkładają się w jego tkankach. Powoduje to szereg wad rozwojowych płodu, szczególnie w ośrodkowym układzie nerwowym.

U mężczyzn palących przez długi czas marihuanę występuje wysoki procent przypadków impotencji, znaczne obniżenie liczby i ruchliwości plemników, a także częstsze występowanie postaci nieprawidłowych.

Kannabis działając na układ immunologiczny, modyfikując działanie jego komórek, utrudnia rozpoznawanie swoistych substancji obcych przez co tłumia i zwalniają

odpowiedź układu immunologicznego.

III. Parametry farmakokinetyczne i toksykokinetyczne Δ^9 -tetrahydrokannabinolu

Poza znajomością sposobu działania substancji psychoaktywnych na organizm ważna jest, z punktu widzenia diagnostyki, właściwego sposobu leczenia a także w postępowaniu dowodowym, znajomość ich parametrów farmakokinetycznych i toksykokinetycznych.

Znajomość tych parametrów ma szczególne znaczenie w przypadku narkotyków, gdy dochodzi do zatrucia ostrego bądź częściej zatrucia w stanie stacjonarnym. Parametry toksykokinetyczne pozwalają przewidzieć zachowanie i szybkość wydalania narkotyku, czasu jego działania, a to pozwala ocenić skutki przebywania narkotyku w organizmie i ustalić sposób leczenia.

Farmakokinetyka Δ^9 -tetrahydrokannabinolu:

$T_{1/2}$ po jednorazowej dawce: 2 -28 godz.

$T_{1/2}$ po długotrwałym zażywaniu: 50 -60 godz.

Wiązanie z białkami: 97-99%

Objętość dystrybucji: 10 L/kg

Dawki: minimalna "efektywna": 5 mg, toksyczna: 0,035 mg/kg.

Stężenie we krwi terapeutyczne: < 0,19 mg/l, toksyczne: brak, śmiertelne: brak.

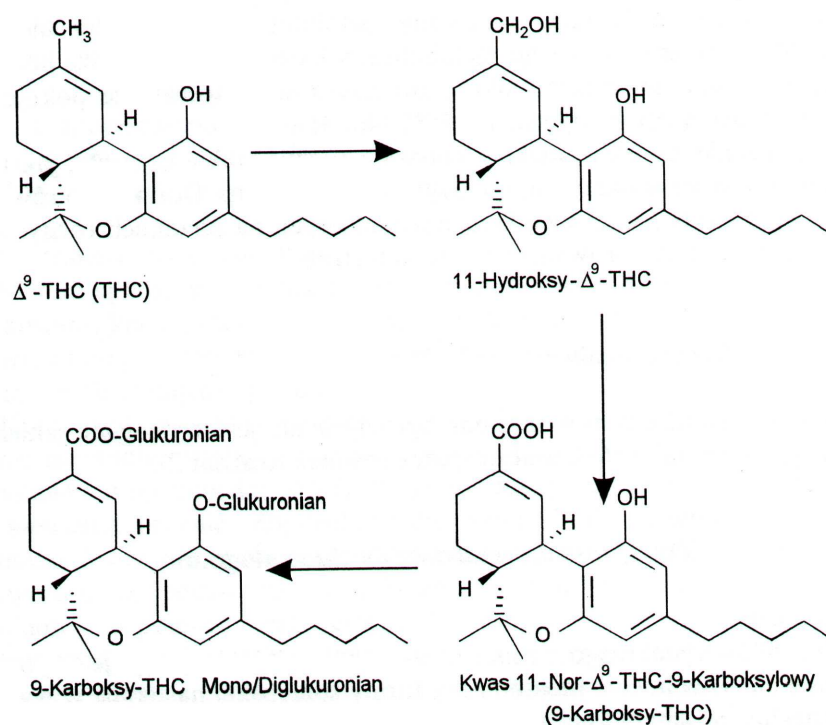
Interakcje – Δ^9 -Tetrahydrokannabinol zwiększa metabolizm barbituranów, antypiryny, etanolu. Równoczesne podanie marihuany i kokainy przyspiesza akcję serca i podwyższa ciśnienie krwi.

Absorpcja – wchłania się przez przewód pokarmowy (słabo) i oddechowy (dobrze). Dostępność biologiczna Δ^9 -THC po przyjęciu doustnym 5-20%, przy paleniu 18-50%.

Metabolizm – szybko wchłania się z powietrzem wdychanym, przechodzi przez łożysko i dostaje się do mleka matki. Pierwsze objawy występują po upływie 15-30 min i trwają do 4 godz. Δ^9 -THC jest metabolizowany w wątrobie, choć przy paleniu kannabis procesy metaboliczne zaczynają się już w płucach. Wydala się z moczem (15-20%). Z kałem wydala się 30-35%. Metabolity są wykrywane w moczu do 8 dni, a po spożyciu pojedynczej dawki u osób uzależnionych do 4 tygodni.

Przemiany Δ^9 -THC polegają na utlenianiu, dekarboksylacji i sprzęganiu z kwasem glukuronowym (rys. 2). Utlenianie węgla 11 prowadzi do utworzenia 11-hydrokso- Δ^9 -tetrahydrokannabinolu, który wykazuje aktywność biologiczną zbliżoną do Δ^9 -THC. 11-hydrokso- Δ^9 -THC ulega przemianie do nieaktywnego 9-karbokso-THC, który z kwasem glukuronowym tworzy mono- i di-glukuroniany, które są bardziej hydrofilne niż Δ^9 -THC i możliwe do usuwania przez nerki. Kwas i jego glukuroniany występują w moczu w największych ilościach i obecność ich w moczu jest najpewniejszym dowodem stosowania preparatów kannabis.

Usuwanie Δ^9 -THC z krwi odbywa się szybko w wyniku metabolizmu i wychwytywania przez tkanki, po 2-3 godzinach badanie osocza nie wykaze obecności Δ^9 -THC, przez 6 godzin można natomiast wykryć 9-karbokso- Δ^9 -THC.



Rys. 3 . Metabolizm Δ^9 -THC w organizmie człowieka.

Powolne usuwanie poprzez mocz, trwające kilka dni, jest prawdopodobnie wynikiem udziału kannabinoidów w krążeniu jelitowo-wątrobowym, gromadzeniu się ich w tkance tłuszczowej oraz nerkowej reabsorpcji (wchłaniania zwrotnego) metabolitów. Powolna eliminacja sprawia, że przy wielokrotnym przyjmowaniu kannabinoidów następuje ich kumulacja – co powoduje występowanie objawów toksycznych.

Szkodliwe działanie preparatów kannabis jest niezaprzeczalne, a stosowanie ich przez

długi czas prowadzi do:

- zwiększenia ryzyka przewlekłego zapalenia oskrzeli,
- zwiększonego ryzyka nowotworów dróg oddechowych,
- rozwinięcia się uzależnienia,
- zwiększonego ryzyka urodzenia dziecka z niedorozwojem,
- zwiększonego ryzyka wystąpienia zespołów paranoidalnych,
- zwiększonego ryzyka wypadków drogowych.

Zagrożenia te są wynikiem szerokiego zakresu oddziaływań kannabinoidów – od poziomu molekularnego do myślenia i osobowości.

IV. Próby leczniczego zastosowania kannabinoidów

Kannabinoidy wykazują działanie wielokierunkowe na organizm ludzki. Stosowane bez istotnej potrzeby wywołują uzależnienie i wyniszczenie organizmu ale w określonych sytuacjach, pod ścisłą kontrolą lekarską mogą być cennymi lekami.

W organizmie człowieka występuje układ endokannabinoidowy odpowiedzialny za współdziałanie różnych szlaków przekazywania sygnałów w komórce. Składa się on m.in. z receptorów kannabinoidowych CB₁ (występujących głównie w mózgu) i CB₂ (występujących głównie w tkankach obwodowych) i endokannabinoidów. Działanie farmakologiczne i psychotropowe kannabinoidów polega na uaktywnieniu receptorów neuronowych: CB₁ i CB₂.

Układ endokannabinoidowy jest związany z procesami fizjologicznymi, takimi jak: lęk, niepokój, sen, ból, emocje, koordynacja ruchowa, zapamiętywanie, napięcie mięśniowe, uczucie głodu i sytości, płodność, odporność komórkowa i humoralna, termoregulacja, metabolizm tłuszczów i węglowodanów. Poznawanie receptorowego mechanizmu działania oraz zasad funkcjonowania układu endokannabinoidowego stwarza naukowe podstawy otrzymywania syntetycznych analogów kannabinoidów i wykorzystania ich w leczeniu wielu chorób. Działanie przeciwwymiotne Δ^9 -THC wykorzystuje się w chemoterapii nowotworowej; wpływ na łaknienie - w leczeniu chorych na chorobę Alzheimera; działanie na układ pokarmowy – w różnych chorobach tego układu, w tym otyłości. Istnieje również perspektywa wykorzystania kannabinoidów w leczeniu nowotworów piersi i prostaty, choroby Parkinsona i innych. W tabeli 1 przedstawiono próby leczniczych zastosowań kannabinoidów.

Tabela 1. Przykłady leczniczych zastosowań kannabinoidów.

<i>Schorzenie</i>	<i>Objawy</i>	<i>Proponowane leczenie</i>
Stwardnienie rozsiane	Spastyczność	Δ^9 -THC i CBD* podjęzykowo
	Ból	
	Zaburzenia funkcji pęcherza	
Choroba Parkinsona	Dystonia	Nabilon*
	Dyskineza	
Stan pooperacyjny	Ból	Lewonantradol* domięśniowo
Uraz rdzenia kręgowego	Ból	Δ^9 -THC, CBD podjęzykowo
Zespół wyniszczenia w przebiegu AIDS	Brak apetytu	Dronabinol*
	Nudności, wymioty	
Choroba nowotworowa	Ból	Δ^9 -THC, CBD
	Nudności, wymioty	Nabilon
Jaskra	Wysokie ciśnienie w gałce ocznej	Δ^9 -THC - krople
Zwiotczenie dolnego zwieracza przełyku	Zarzucanie wsteczne treści żołądkowej	Δ^9 -THC
		Antagoniści receptorów
Zapalenie otrzewnej	Porażenna niedrożność jelita	Rimonabant*
Uszkodzenie unerwienia ścian jelita		
Uraz rdzenia		

*) CBD - kannabidiol

Dronabinol – syntetyczny Δ^9 -THC

Nabilon - syntetyczna pochodna Δ^9 -THC, analog strukturalny

Rimonabant – wybiórczy antagonist receptoru CB1

Lewonantradol - syntetyczna pochodna Δ^9 -THC, analog strukturalny

V. Oznaczanie kannabinoidów w materiale roślinnym i biologicznym

Zgodnie z wymogami Ustawy o Przeciwdziałaniu Narkomanii 29 lipca 2005 roku z nowelizacjami wprowadzonymi w 2006 r. właściwe postępowanie administracyjno-karne oraz orzekanie o przestępczej działalności wymaga odpowiednich badań fizykochemicznych zabezpieczonego materiału dowodowego.

Orzekanie dotyczy właściwej kwalifikacji i rozróżnienia surowca pochodzącego z

krajowego ziela konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.), tzw. odmiany włóknistej (zawierającej Δ^9 -THC i 9-karboksy-THC łącznie do 0,2 % w przeliczeniu na suchą masę) od odmiany ziela konopi innych niż włókniste (zawierającej powyżej 0,2% sumy Δ^9 -THC i 9-karboksy-THC). Według polskiego ustawodawstwa za produkt narkotykowy uznawane jest ziele *Cannabis* zawierające powyżej 0,2% Δ^9 -THC i THCA łącznie oraz żywica i inne produkty konopi niezależnie od zawartości Δ^9 -THC i THCA.

Do zadań laboratoriów toksykologicznych należy również wykrycie w materiale biologicznym substancji podlegających kontroli. Wynik dodatni czyli potwierdzenie używania narkotyków może spowodować zaskarżenie i skazanie osoby, od której pobrano próbkę. Badanie materiału biologicznego na obecność narkotyków służy również diagnostyce, leczeniu i rehabilitacji (ustalenie przyczyn intoksykacji, kontrola abstynencji od narkotyku). Badanie próbek biologicznych polega na oznaczaniu kannabinoidów w moczu (łatwo uzyskać w sposób nieinwazyjny), we krwi i rzadziej w ślinie lub włosach osób nadużywających narkotyków. Zwykle analiza sprowadza się do wykrycia i oznaczenia ilościowego Δ^9 -tetrahydrokannabinolu (Δ^9 -THC) oraz kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowego (9-karboksy-THC), jako głównego metabolitu Δ^9 -THC, który wykrywany jest we krwi i w moczu. Obecność Δ^9 -THC we krwi oznacza zażywanie narkotyku nie dalej jak 2-3 godziny temu a obecność 9-karboksy-THC – nie dalej jak 6 godzin. W moczu metabolit utrzymuje się ponad miesiąc, tak że jednorazowe stwierdzenie obecności 9-karboksy-THC w moczu oznacza jedynie, że osoba której mocz badano stosowała marihuanę przed kilku godzinami, dniami lub tygodniami. Wykonywanie analiz w ciągu kilku kolejnych tygodni da odpowiedź, czy mamy do czynienia z jednorazowym lub chronicznym palaczem. U okazjonalnego palacza kolejne badania będą ujemne, u osób które przestały palić wyniki będą dodatnie, ale stężenie będzie wyraźnie maleć natomiast nie ulegną większej zmianie stężenia kannabinoidów u osób ciągle palących.

Należy jeszcze dodać, że bierne i niezamierzone wdychanie dymu z marihuany może niekiedy również dać pozytywny wynik badania moczu, zwłaszcza, gdy próg czułości stosowanej metody jest niski. W takim przypadku ustalenie przyjętej dawki jest raczej niemożliwe.

Interpretacja wyników analiz musi być dokładna i ostrożna. Na stężenie narkotyków w moczu ma wpływ wiele czynników ale bardzo ważnym jest ilość wypitych płynów, która może nawet 10-krotnie zmienić stężenie w ciągu kilku godzin.

Wskaźnikiem wczesnego wykrywania marihuany może być 8 β ,11-dihydrokso- Δ^9 -THC , który można wykryć w moczu już kilka godzin po jej zażyciu.

Przy wszystkich zastrzeżeniach i ograniczeniach właściwa interpretacja wyników

analizy toksykologicznej umożliwia ustalenie dawki, źródła pochodzenia wykazanego środka, szacowanie rozmiarów produkcji i uprawy.

Wartość dowodowa wyniku analizy toksykologicznej zależy od stosowanej metody i od rodzaju materiału dostarczonego do badań. Niezależnie od stosowanych metod i technik analitycznych wartość dowodowa zależy również od właściwego pobierania próbek, transportu i przechowywania do momentu zakończenia badań (tzw. „łańcucha kontroli”) i ścisłego przestrzegania wszystkich zaleceń dotyczących postępowania z pobranym materiałem. Jest to niezwykle istotne, gdyż wyniki analiz mogą mieć poważne konsekwencje prawne dla osób badanych.

Zawsze zaleca się stosować dwuetapową procedurę – wstępną (**skrining**), metodami immunologicznymi lub za pomocą barwnych reakcji (zwanymi kropkowymi) a następnie potwierdzenie wyników dodatnich metodami konfirmacyjnymi, które powinny być równie czułe jak skringowe ale bardziej specyficzne. Wymogi te spełniają techniki chromatograficzne (gazowa lub cieczowa), najlepiej sprzężone ze spektrometrią mas (GC/MS lub LC/MS). Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) może być stosowana w metodzie skringowej i konfirmacyjnej, ale wynik badania nie może być dowodem w postępowaniu sądowym. W oparciu o wyniki analizy skringowej odpowiednie służby mogą zatrzymać podejrzanych, zlecić badania w laboratorium toksykologicznym oraz otrzymać pozwolenie na rewizję. Wyniki analiz skringowych mogą być też dowodem we wstępnych przesłuchaniach.

Laboratorium toksykologiczne wykonuje analizy na podstawie zlecenia zawierającego dane identyfikacyjne dawcy, osoby nadzorującej pobranie i kuriera, numer próbki, datę i godzinę pobrania oraz cechy próbki w chwili pobrania. Formularz może też zawierać dodatkowe informacje o próbce, rodzaju narkotyku i powinien być podpisany przez osobę upoważnioną i opatrzony oficjalną pieczęcią.

Właściwe oznakowanie badanego materiału biologicznego musi zawierać następujące informacje:

- Nazwisko i imię
- Numer identyfikacyjny
- Data i czas pobrania
- Miejsce pobrania
- Nazwisko osoby nadzorującej pobranie
- Narkotyk poddawany badaniu
- Numer próbki.

Pojemniki powinny być starannie zamknięte i opieczętowane. Oznakowanie musi być na pojemniku a nie na zamknięciu, aby zapobiec przypadkowej lub umyślnej zamianie próbek

lub/i oznakowań. Dawca lub osoba zainteresowana musi być świadkiem stosowania środków zabezpieczających próbę ale nie może w nim uczestniczyć.

Wyniki analiz mają charakter poufny. Wszelkie informacje dotyczące dawcy i wyników muszą być przechowywane w zamkniętym miejscu, a raporty mogą być udostępniane tylko upoważnionym osobom.

Badany podejrzany materiał może być silnie działający lub zawierający truciznę, dlatego należy szczególną uwagę zwrócić na bezpieczeństwo w czasie wykonywania analiz. Oprócz przestrzegania ogólnych zasad pracy w laboratorium należy bezwzględnie:

- unikać próbowania lub wąchania materiału;
- nie dotykać rękami twarzy, szczególnie ust i nosa, podczas wykonywania próby;
- zachować szczególną czystość;
- zapisywać pobieranie materiału do badań oraz wyniki analiz do specjalnych formularzy.

V.1. Szybkie wykrywanie kannabinoidów

V.1.1. Zasady ogólne wykrywania kannabinoidów w produktach roślinnych

Materiał do badań może mieć różne stężenie substancji aktywnej, próbka może być rozcieńczona nieaktywnymi substancjami, substancje rozcieńczające mogą maskować przebieg reakcji charakterystycznej, wreszcie materiał do badań może być mieszaniną kilku narkotyków – wszystko to może być przyczyną niejednoznacznych wyników testów.

Aby zwiększyć niezawodność testów należy przestrzegać następujących zasad:

- Jeśli ilość materiału do badań jest mała, zbyt mała aby wykonać badanie w warunkach polowych, **całą próbkę** należy wysłać do laboratorium.
- Badania sproszkowanego materiału rozpoczyna się od możliwie najmniejszej ilości, po czym, jeśli to konieczne, zwiększa się ilość analizowanej substancji.
- Z próbek stałych lub żywicznych materiałów pobiera się odrobinę, rozdrabnia do postaci proszku i proszek poddaje badaniu.
- W przypadku kapsułek przeprowadza się badanie substancji z jednej kapsułki.
- Materiał roślinny przed badaniem rozdrabnia się w młynku.
- W przypadku badania papierosów pobiera się materiał tylko z jednego papierosa.
- Gdy badanie materiału roślinnego za pomocą odpowiedniego testu dało wynik ujemny, a istnieje podejrzenie, że może on zawierać inne substancje, to cała dostępna ilość materiału powinna być przesłana do laboratorium celem wykonania dokładnej analizy.

Barwne testy na obecność narkotyków mogą być wykonywane w probówkach, na bibule ale najczęściej w specjalnej płytce porcelanowej z wgłębieniami. Po wykonaniu badania płytka musi być starannie umyta wodą i rozpuszczalnikiem organicznym (aceton, metanol).

Dla zwiększenia specyficzności oznaczenia najczęściej wykonuje się dla każdej substancji lub grupy substancji przynajmniej 2 testy.

Różne związki należące do jednej grupy chemicznej mogą dawać identyczny lub podobny wynik. Przy interpretacji wyników należy pamiętać o tym, że:

- Jedynie barwa podana w opisie testu może być uznana za wynik dodatni, który oznacza możliwą obecność poszukiwanej substancji;
- We wszystkich przypadkach, kiedy otrzymuje się wynik dodatni lub wątpliwy należy przesłać materiał do dalszej analizy do laboratorium;
- W przypadku wyniku ujemnego lub wątpliwego należy wykonać drugie badanie przy użyciu innego testu i dopiero wynik ujemny uznać za brak poszukiwanej substancji. Jeśli jednak istnieją jakiejkolwiek wątpliwości należy materiał wysłać do laboratorium.

V.1.2. Zasady ogólne wykrywania kannabinoidów w próbkach biologicznych

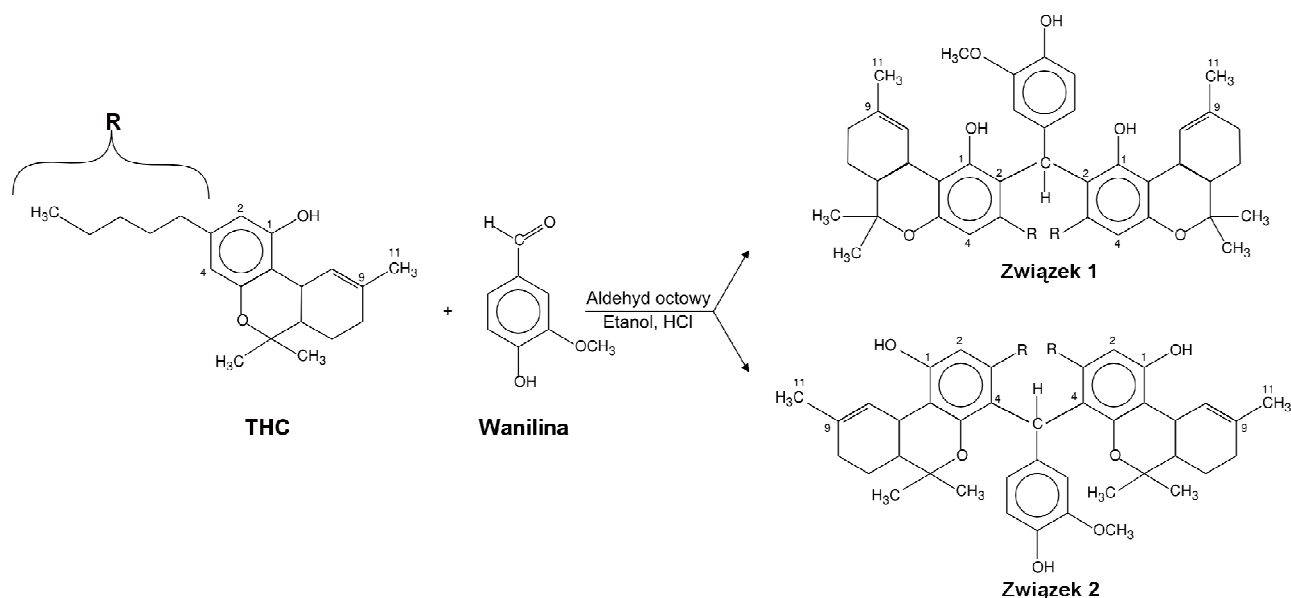
Przy pobieraniu próbek biologicznych należy unikać pojemników plastikowych i gumowych korków, kannabinole jako związki niepolarne łatwo ulegają adsorpcji na powierzchni gumy i plastiku.

Próbki moczu pobiera się w dwóch porcjach (po ok. 30 ml), mierzy temperaturę w ciągu 4 min oraz mierzy pH świeżej próbki. Jedna próbka powinna być użyta do analizy, druga przechowywana w stanie zamrożonym na wypadek konieczności powtórzenia analizy. Analizę świeżej próbki należy wykonać w ciągu 1-2 dni, zamrożona nie ulega zmianie przez kilka miesięcy.

V.I.3 Szybkie testy wykrywania kannabis (konopi) w materiale roślinnym

Test 1. Próba z Fast Blue B Salt (chlorek di-o-anizydnotetrazoliny)

Podstawą oznaczenia jest reakcja podstawienia elektrofilowego THC z chlorkiem di-o-anizydnotetrazoliny, zachodząca w środowisku alkalicznym, której produkt jest barwy purpurowo-czerwonej. Reakcja zachodzi wg schematu przedstawionego na rys.4.



Rys. 5. Reakcja THC z waniliną w obecności aldehydu octowego w środowisku kwaśnym.

Produkt reakcji ekstrahuje się chloroformem lub dichlorometanem. Fioletowe zabarwienie ekstraktu może świadczyć o obecności kannabis.

V.1.4. Analiza jakościowa Δ^9 -THC za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC)

Materiał dowodowy (fajki, lufki, papierosy, ziele konopi i in.) ekstrahuje się n-heksanem lub cykloheksanem albo mieszaniną n-heksanu (cykloheksanu) z niewielkim dodatkiem octanu etylu (np. 9:1, 7:1). Ekstrakty odparowuje się do sucha i sporządza się ok. 1% roztwory. Ekstrakt nanosi się na płytki TLC pokryte aktywowanym żelem krzemionkowym G lub żelem krzemionkowym zawierającym domieszkę substancji fluoryzującej w świetle UV przy 254 nm. Chromatogramy rozwija się w mieszaninie n-heksan : eter dietylowy (4 : 1) lub chloroform : metanol (19 :1), suszy i wizualizuje plamki w świetle lampy UV przy długości fali 254 nm a następnie przy użyciu 1% roztworu wodnego soli Fast Blue B.

W tabeli 2 przedstawiono wyniki analizy TLC niektórych kannabinoidów w układzie rozwijającym chloroform : metanol (19 :1,v:v).

Tab. 2. Wartości R_f dla niektórych kannabinoidów w układzie rozwijającym chloroform : metanol (19 : 1) oraz kolory plamek uzyskane po wizualizacji solą Fast Blue B.

<i>Kannabinoid</i>	<i>Wartość R_f</i>	<i>Kolor plamki</i>
Δ^9 -THC	0,65	czerwony
Δ^8 -THC	0,65	brązowy
CBD	0,64	pomarańczowobrązowy
CBN	0,62	czerwonobrązowy
CBG	0,61	purpurowy
CBC	0,58	czerwony
THCA	0,39	czerwony
CBDA	0,37	czerwony
CBGA	0,31	purpurowy
CBCA	0,25	purpurowy

V.1.5.Szybkie wykrywanie kannabinoidów w materiale biologicznym

Testy immunologiczne

Wstępny skrining kannabinoidów w moczu polega na testach immunologicznych, które wykonuje się zgodnie z przepisem producenta. Do wykonania tych testów nie jest wymagane jakiejkolwiek przygotowanie moczu.

Testy immunologiczne przystosowane są do wykrywania 9-karboksy-THC. Niska specyficzność przeciwciał używanych w tych testach sprawia, że są one czułe (w różnym stopniu, w zależności od producenta) również na inne kannabinoidy, głównie 11-hidroksy-THC i w mniejszym stopniu na THC i CBN.

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Ponad 80% 9-karboksy-THC występuje w moczu w postaci glukuronianu. Przygotowanie próbki do analiz chromatograficznych polega na hydrolizie (chemicznej lub enzymatycznej) glukuronianu w celu uzyskania wolnego kwasu.

Hydroliza chemiczna alkaliczna polega na ogrzewaniu 10 ml moczu z 2 ml 10 M wodorotlenku potasu w temperaturze 50° C przez 20 minut, wstrząsając od czasu do czasu. Oziębioną zhydrolizowaną próbkę zakwasza się 2M kwasem chlorowodorowym lub 2 M kwasem siarkowym do pH 2 i ekstrahuje się mieszaniną cykloheksanu i octanu etylu (7:1) w czasie 10 minut przez wytrząsanie. Ekstrakt sący się przez niewielką ilość

bezwodnego siarczanu sodu, przemywa sącdek 5 ml rozpuszczalnika i odparowuje przesącz do sucha w temperaturze pokojowej w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszcza się w 0,2 ml metanolu lub mieszaniny acetonitrylu i metanolu(3:1) i analizuje metodami chromatograficznymi.

Stosuje się płytki TLC pokryte aktywowanym żelem krzemionkowym G lub żelem krzemionkowym zawierającym domieszkę substancji fluoryzującej w świetle UV przy 254 nm; grubość warstwy adsorbentu 0,25 mm; optymalna długość drogi układu rozwijającego 10 cm.

Na płytkę nanosi się 25-50 µl ekstraktu oraz wzorcowy roztwór 9-karboksy-THC i rozwija w jednym z następujących układów:

- a) octan etylu : metanol : stężony roztwór amoniaku : woda (12 : 5 : 1 : 0,5),
- b) chloroform : metanol : stężony roztwór amoniaku (70 : 30 : 2).

Wizualizacja chromatogramów

Przed wywołaniem plam płytki suszy się w temperaturze 120° C przez 5-10 minut w suszarce lub w strumieniu ciepłego powietrza. aby usunąć ślady amoniaku i innych zasad przeszkadzających w osiągnięciu właściwej barwy plam. Płytki spryskuje się świeżo przygotowanym 0,1% wodnym roztworem soli Fast Blue B, następnie wstawia na chwilę do naczynia z parami amoniaku lub dietyloaminy. Płytkę suszy się w strumieniu gorącego powietrza. Pojawiają się różowe lub różowoczerwone plamy 9-karboksy-THC. Zamiast toksycznego Fast Blue B (potencjalny karcinogen) można użyć świeżo przygotowany, mniej toksyczny, roztwór Fast Blue BB w 0,1M NaOH (0,75 mg/10ml) i wysuszyć płytki dla uzyskania stabilnej barwy.

R_f 9-karboksy-THC w układzie rozwijającym "a" wynosi 0,35-0,40, a w układzie "b" - od 0,25 do 0,38. Wartość R_f 9-karboksy-THC zależy od użytych materiałów i warunków w laboratorium (wilgotność, temperatura, przeciągi).

V.2. Metody konfirmacyjne kannabinoidów w materiale roślinnym

V.2.1. Oznaczanie Δ⁹-THC metodą chromatografii gazowej(GC) lub połączonej chromatografii gazowej ze spektrometrią mas(GC/MS)

Badany surowiec (od 0,1 do 1 g części zielnych, od 0,05 do 0,5 g haszyszu lub od 0,005 do 0,1g oleju haszyszowego) ekstrahuje się dwukrotnie, intensywnie mieszając lub w łaźni ultradźwiękowej jednym z następujących rozpuszczalników: n-heksanem, cykloheksanem, acetonem, toluenem, chloroformem lub mieszaniną metanolu z niepolarnymi

rozpuszczalnikami albo mieszaniną niepolarnego rozpuszczalnika z małym dodatkiem octanu etylu. Jako wzorce wewnętrzne w analizie ilościowej (dodawane do rozpuszczalnika ekstrahującego) stosuje się n-tetradekan, n-dokozan lub inne węglowodory, poza tym często stosuje się androst-4-en-3,17-dion, ftalan dibenzylowy, ftalan di-n-oktylowy lub cholestan. Niewielką część ekstraktu odparowuje się do sucha w strumieniu azotu, rozpuszcza w określonej ilości rozpuszczalnika, następnie analizuje metodą chromatografii gazowej. Istnieje duże prawdopodobieństwo nakładania się pików innych substancji na sygnał Δ^9 -THC, poza tym wysoka temperatura rozdziału chromatograficznego może powodować dekarboksylację 9-karboksy-THC (do Δ^9 -THC) i innych kwasów kannaboidowych, dlatego korzystniej jest przeprowadzić składniki ekstraktu w siliłowe pochodne za pomocą N,O-bis(trimetylosililo)acetamidu (BSA) lub N,O-bis-trimetylosililotrifluoroacetamidu (BSTFA), z ewentualnym 1% dodatkiem trimetylochlorosilanu (TMCS). Do dokładnie wysuszonego ekstraktu dodaje się mieszaniny siliłującej i reakcję siliłowania przeprowadza się w zamkniętym naczynku w czasie ok. 0,5 godziny w temperaturze 80° C. Mieszaninę reakcyjną po ochłodzeniu analizuje się metodą chromatografii gazowej z detektorem FID (GC/FID) lub połączonymi technikami chromatografii gazowej z detekcją spektrometrem mas (GC/MS).

Jeśli jednak nie ma potrzeby oznaczać poszczególnych kannabinoidów w materiale dowodowym a materiał roślinny należy tylko zakwalifikować do konopi włóknistych lub innych niż włókniste (zgodnie z wymogami Ustawy o Przeciwdziałaniu Narkomanii 29 lipca 2005 roku z nowelizacjami wprowadzonymi w 2006 r.) można oznaczać sumę zawartości Δ^9 -THC i 9-karboksy-THC w jednej analizie chromatograficznej bez konieczności przeprowadzania analitów w pochodne siliłowe. W dozowniku chromatografu gazowego, w temperaturze 250° C, znajdujący się w próbce 9-karboksy-THC ulega dekarboksylacji do Δ^9 -THC. Sygnał Δ^9 -THC na chromatogramie gazowym odpowiada więc sumie zawartości Δ^9 -THC znajdującego się w próbce oraz Δ^9 -THC powstałego z 9-karboksy-THC obecnego w próbce.

Warunki analizy GC i GC/MS(dla próbek natywnych i w postaci siliłowych pochodnych):

- kolumna kapilarna pokryta fazą ciekłą DB-1 (niepolarna) lub RTX 5 (średniopolarna),
- temperatura dozownika i detektora 250, 290° C odpowiednio, dozownika i linii transferowej w przypadku GC/MS 270 - 280° C oraz źródła jonów 230° C,
- temperatura kolumny 100° C (1-3 min), narost temp. 6 do 10° C/min do 280° C, 30 min izotermicznie 280° C.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy GC niektórych kannabinoidów przy użyciu kolumny DB-1 i HP-50.

Tab. 3. Względne czasy retencji (względem THC) niektórych kannabinoidów na chromatogramie gazowym przy użyciu kolumny DB-1(niepolarnej) i HP-50 (średniopolarnej).

Kannabinoid	Typ kolumny GC	
	DB-1	HP-50
	Względny czas retencji (względem THC) $r_{x/THC}$	
THV	0,885	0,902
CBL	0,922	0,907
CBD	0,942	0,935
THC-C4	0,942	0,948
CBC	0,956	0,924
Δ^8 -THC	0,988	0,981
Δ^9 -THC	1	1
CBG	1,026	1,012
CBN	1,033	1,046

W tabeli 4 przedstawiono wyniki analiz GC/MS/EI niektórych natywnych kannabinoidów.

Tab. 4. Najintensywniejsze jony fragmentacyjne (od 25%) na widmie mas EI niektórych kannabinoidów.

Kannabinoid	<i>m/z jonu molekularnego (intensywność względna)</i>	<i>m/z jonów fragmentacyjnych (intensywność względna)</i>
Δ^9 -THC	314(75%)	299(100%), 231(50%), 243(37%), 258(25%)
Δ^8 -THC	314(100%)	232(90%), 259(62%), 272(37%)
CBD	314(10%)	231(100%)
CBN	310(5%)	295(100%)
CBG	316(25%)	193(100%), 231(45%)
CBC	314(5%)	231(100%)
THV	286(75%)	271(100%), 243(70%), 203(50%)

Na widmie mas EI sililowej pochodnej Δ^9 -THC intensywnym jonem będzie m/z 386 (M^+) i m/z 371 ($M-15$); na widmie mas EI sililowej pochodnej Δ^9 -karboksy-THC intensywnymi jonami będą m/z 488 (M^+), m/z 473 ($M-15$) i m/z 371($M-117$).

V.2.2. Oznaczanie Δ^9 -THC metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Ekstrakcję przeprowadza się jak w punkcie V.2.1. Odparowany ekstrakt rozpuszcza się w metanolu lub metanolu z chloroformem (9:1). Jako wzorców wewnętrznych używa się najczęściej ftalanów (detekcja UV).

Izokratyczne warunki analizy HPLC:

(metoda 1)

- kolumna RP C-18, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m;
- faza ruchoma 0,02 N H₂SO₄ - 20% i metanol 80%;
- przepływ fazy ruchomej 2,0 ml/min;
- detektor spektrofotometryczny UV, 220 lub 254 nm;

lub (metoda 2)

- kolumna RP C-8, 150 mm x 4,6 mm, 3 μ m;
- faza ruchoma : metanol (85%), woda (14,2%), kwas octowy (0,8%);
- przepływ fazy ruchomej 1,5 ml/min;
- detektor spektrofotometryczny UV, 230 nm.

Tab. 5. Przykładowe wyniki rozdziału HPLC ekstraktu roślinnego konopi (wartości zależą od warunków laboratorium i parametrów użytych materiałów).

Składnik ekstraktu	Metoda 1 Czas retencji[min]	Metoda 2 Czas retencji[min]
CBV	--	4,0
CBD	2,5	4,1
CBG	2,5	4,1
THV	--	4,6
CBDA	3,5	4,6
CBGA	5,0	5,5
CBN	5,0	5,7
THC	6,0	6,4
THVA	--	7,7
CBC	8,0	7,7
CBNA	12,0	--
THCA	14,0	11,4
CBCA	17,0	12,7
Wz.wewn.	19,0	17,6

Gradientowe warunki rozdziału:

- kolumna RP C-8, 250 mm x 4,6 mm, 10µm;
- faza ruchoma A – acetonitryl, faza ruchoma B – woda;
- gradient: od 25% A i 75% B do 85% A i 15% B w czasie 36 min, narost liniowy;
- przepływ fazy ruchomej 2 ml/min;
- detektor spektrofotometryczny UV, 254 nm;
- lub
- kolumna RP C-18, 150 mm x 4,6 mm, 3µm lub RP C-18, 250 mm x 4,6 mm, 5µm;
- faza ruchoma A – metanol, faza ruchoma B – 0,02 N H₂SO₄;
- gradient: od 80% A i 20% B do 90% A i 10% B w czasie 20 min, narost liniowy;
- przepływ fazy ruchomej 1,5 ml/min;
- detektor spektrofotometryczny UV, 230 nm.

Tab.6. Przykładowe wyniki rozdziału HPLC ekstraktu konopi w warunkach gradientowych (wartości zależą od warunków laboratorium i parametrów użytych materiałów).

Składnik	Czas retencji[min]
CBV	7,4
CBD	7,8
CBG	8,3
THV	8,6
CBDA	9,4
CBGA	11,8
CBN	12,0
THC	13,7
THVA	15,6
CBC	16,9
THCA	21,5
CBCA	23,1

V.2.3. Metody confirmacyjne kannabinoidów w materiale biologicznym

Metody confirmacyjne kannabinoidów w próbkach biologicznych sprowadzają się do oznaczania metabolitów Δ^9 -THC, głównie kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowego (9-karboksy-THC). Kannabinoidy z moczu izoluje się metodą hydrolizy i ekstrakcji opisaną w punkcie V.3.2. Do moczu, przed hydrolizą należy dodać wzorca wewnętrznego. Dla

celów chromatografii gazowej jako wzorzec wewnętrzny można stosować kannabinol (CBN), oksyfenobutazon lub ketoprofen. Do połączonych technik chromatografii gazowej i spektrometrii mas najlepsze są deuterowane analogi 9-karboksy-THC lub wzorce nieizotopowe, np. kwas meklofenamowy. Do wysokosprawnej chromatografii cieczowej nadaje się kannabinol (CBN) i p-hydroksybenzoetan n-oktylu.

Oznaczanie kwasu 11-nor-9-karboksy- Δ^9 -tetrahydrokannabinolowego (9-karboksy-THC) metodą chromatografii gazowej i połączonej chromatografii gazowej ze spektrometrią mas.

Ekstrakt moczu odparowuje się do sucha w strumieniu azotu i przeprowadza się reakcję silylowania za pomocą N,O-bis(trimetylosililo)acetamidu (BSA) lub N,O-bis-trimetylosililotrifluoroacetamidu (BSTFA), z ewentualnym 1% dodatkiem trimetylochlorosilanu (TMCS). Do dokładnie wysuszonego ekstraktu dodaje się mieszaniny silylującej i reakcję silylowania przeprowadza się w zamkniętym naczynku w czasie ok. 0,5 godziny w temperaturze 80° C. Mieszaninę reakcyjną po ochłodzeniu analizuje się metodą chromatografii gazowej z detektorem FID (GC/FID) lub połączonymi technikami chromatografii gazowej z detekcją spektrometrem mas (GC/MS).

9-karboksy-THC można również oznaczać jako dimetylową pochodną. Reakcję przeprowadza się za pomocą wodorotlenku tetrametyloamonowego (TMAH). TMAH i dimetylosulfoksyd dodaje się do wysuszonego ekstraktu moczu, po 2 min dodaje jodek metylu a po dalszych 10 min 0,1 M HCl i ekstrahuje za pomocą izooktanu. Warstwę izooktanową oddziela się i odparowuje w strumieniu azotu.

Warunki analizy GC i GC/MS:

- kolumna pokryta fazą ciekłą niepolarną lub średniopolarą (RTX -1, RTX-5 lub odpowiedniki);
- detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), temperatura 290° C;
- dozownik 250 - 290° C;
- temperatura kolumny - izotermicznie 240° C, w gradiencie od 150 do 270° C przy naroście od 5 do 25° C/min;
- jonizacja EI lub CI.

Tab. 7. Główne jony na widmach mas EI pochodnych 9-karboksy-THC.

<i>Związek</i>	<i>Jon molekularny</i>	<i>Główne jony fragmentacyjne</i>
Dimetylowa pochodna	372	357, 313
9-karboksy-THC-di TMS	488	473, 371

Oznaczanie 9-karboksy-THC metodą chromatografii cieczowej

Szybką metodą, pozwalającą wykryć 9-karboksy-THC o stężeniu rzędu nanogramów na mililitr bez uprzedniej derywatyzacji moczu jest wysokosprawna chromatografia cieczowa na kolumnach z odwróconą fazą i detektorem spektrofotometrycznym UV lub elektrochemicznym (ECD). Do oznaczania ilości najczęściej stosuje się metodę wzorca wewnętrznego, a jako wzorce stosuje się np. kannabinol lub p-hydroksybenzoesan n-oktylu.

Przykładowe warunki analizy HPLC:

- kolumna RP C-8, 250 mmx 4,6 mm, 5µm;
- faza ruchoma mieszanina acetonitrylu i 50 mM kwasu fosforowego (65 : 35);
- przepływ fazy ruchomej 1,5 ml/min;
- detektor spektrofotometryczny UV, 211 nm,
lub
- kolumna RP C-8, 250 mmx 4,6 mm, 5µm;
- faza ruchoma mieszanina acetonitrylu, metanolu i 0,02N H₂SO₄ (35 : 15 : 50);
- przepływ fazy ruchomej 1,1 ml/min;
- detektor elektrochemiczny ECD, 110 mV (Ag/AgCl)(elektroda pracująca z węgla szklatego).

VI. Literatura:

1. Szukalski B., Narkotyki. Kompendium wiedzy o środkach uzależniających, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.
2. Szukalski B., Metody analizy środków uzależniających, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.
3. Hazekamp A., Cannabis; extracting the medicine, Praca doktorska, Proefschrift Universiteit Leiden, The Netherlands, 1976.
4. Wachowiak R., Strach B., Analiza składników aktywnych materiału dowodowego zabezpieczonego w przypadkach narkomanii, z udziałem amfetamin i przetworów konopi, Arch. Med. Sąd. Krym., 2006, LVI, 251-257.
5. Rojek S., Kłys M., Ścisłowski M., Test kontroli oznaczania środków uzależniających we włosach jako miernik jakości analizy toksykologicznej, Arch. Med. Sąd. Krym., 2005, LV, 195-205.
6. Recommended Methods for Testing Cannabis. Manual for Use by National Narcotics Laboratories. ST/NAR/11, United Nations, 1987.
7. Panas M., Parametry farmakokinetyczne i toksykokinetyczne niektórych środków uzależniających, Przegląd Lekarski 2001/58/4.
8. Drzewoski J., Śliwińska A., Rymonabant – nadzieją w leczeniu otyłości i cukrzycy typu 2, Diabetologia Doświadczalna i Kliniczna, 2007, tom 7, nr 2.
9. Arch Pharm, 321, 249, 1988.