

asp. dr Maciej Rymanowski

specjalista w Laboratorium Kryminalistycznym Komendy Wojewódzkiej Policji w Rzeszowie, biegły z zakresu badań chemicznych

m.rymanowski@podkarpacka.policja.gov.pl

Konopie, przegląd zagadnień związanych z oznaczaniem sumarycznej zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) oraz kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A)

Streszczenie

Badania konopi, ze względu na rozpowszechnienie tego narkotyku na nielegalnym rynku, są jednymi z najczęstszych badań wykonywanych przez laboratoria kryminalistyczne. Pomimo tego, w kwestii tej wciąż istnieje szereg kontrowersyjnych problemów analitycznych, które wśród osób zajmujących się tą problematyką wywołują niejednokrotnie żywą dyskusję.

Praca stanowi przegląd zagadnień związanych z konopiami oraz problemami analitycznymi związanymi z prowadzeniem oznaczeń sumarycznej zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) oraz kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) w próbkach ziela konopi. Oznaczenia te są obecnie najczęściej przeprowadzane metodą chromatografii gazowej lub w mniejszym stopniu metodą chromatografii cieczowej. W przypadku metody chromatografii gazowej, zawartość sumaryczna oznaczana jest jako suma delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) pierwotnie obecnego w próbce oraz delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) powstającego w procesie dekarboksylacji kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A). W metodzie chromatografii cieczowej oba związki mogą być oznaczane w ich naturalnej postaci. Obie metody posiadają szereg zalet i wad związanych z aspektami, które wymagają szczególnej uwagi przy prowadzeniu oznaczeń. Jednym z celów pracy było ich wskazanie i pośrednio przeprowadzenie charakterystyki porównawczej obu metod oznaczeń.

Niniejszy artykuł stanowi przegląd doniesień literaturowych z ostatnich kilku lat ze szczególnym uwzględnieniem zagadnień związanych z poruszonym tematem publikowanych przez policyjnych ekspertów badań narkotyków w czasopiśmie „Problemy Kryminalistyki”. W pierwszej części pracy dokonano przeglądu zagadnień związanych konopiami i ich produktami, kannabinoidami, podgatunkami konopi, wykorzystaniem konopi, działaniem konopi na organizm człowieka, regulacjami prawnymi dotyczącymi konopi, metodami instrumentalnymi wykorzystywanymi do oznaczeń Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A. W dalszej części pracy omówione zostały wybrane czynniki wpływające na wynik oznaczeń takie jak: pobieranie próbek; trwałość kannabinoidów w konopiach; wiek roślin; ekstrakcja; wilgotność próbek; derywatyzacja; trwałość roztworów wzorcowych; dekarboksylacja kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A); warunki rozdziału chromatograficznego; uwarunkowania sprzętowe.

W związku z wymaganiami systemu zarządzania jakością narzucającym potrzebę akredytacji procedur badawczych mam nadzieję, że praca ta będzie stanowiła pomoc dla chemików analityków zajmujących się problemami oznaczeń próbek ziela konopi i zwróci ich uwagę jakie czynniki należy uwzględniać przy sporządzaniu budżetu i szacowaniu całkowitej niepewności pomiarów.

Słowa kluczowe konopie, Δ -9-THC, Δ -9-THCA-A, Δ -8-THC, chromatografia gazowa (GC-FID, GC-MS), chromatografia cieczowa (HPLC)

Wprowadzenie

Cannabis sativa L. to nazwa gatunkowa konopi siewnych, która oznacza roślinę należącą do rodziny Cannabaceae – konopiowate, rząd Urticales – pokrzywowce. W obrębie tego gatunku występują różno-

rodne odmiany konopi uprawiane bądź dziko rosnące w różnych obszarach klimatycznych. Najpopularniejszą na rynku narkotycznym jest odmiana indyjska *Cannabis sativa*, *varietas indica* [1].

W ciągu wieków zastosowanie konopi zmieniało się. Najpierw wykorzystywano je w obrzędach religijnych,

następnie w medycynie i włókiennictwie, a w ostatnich kilkudziesięciu latach stały się najpopularniejszym i najbardziej rozpowszechnionym na świecie środkiem odurzającym. Historia zażywania konopi sięga kilku tysięcy lat i miała swój początek w Azji. Pierwsze wzmianki o konopiach znajdują się w pismach chińskich i indyjskich, są one zawarte w wedyjskich hymnach oraz religijnych pieśniach indyjskich pochodzących z początków I tysiąclecia p.n.e. Stawiały one potęgę soma, cudownej rośliny bogów wprawiającej w ekstazę i dającej moc. Inne historyczne wzmianki o użyciu konopi do celów narkotycznych można znaleźć w pracach greckiego historyka Herodota z V wieku p.n.e. Opisuje on zwyczaj koczowniczych plemion żyjących na stepach Rosji. Budowały one specjalne namioty wykorzystywane jako sauny oraz miejsca do palenia konopi. Z Chin i Indii zażywanie konopi przeniosło się do Persji, Asyrii i na cały Bliski Wschód, skąd Arabowie wprowadzający islam na podbijanych terytoriach, zwłaszcza północnej Afryki, wprowadzali również zwyczaj zażywania konopi (islam zabrania picia alkoholu, ale nie zabrania wprost zażywania narkotyków). Z Afryki zwyczaj ten został przeniesiony do Europy [1, 2].

Do spopularyzowania w Polsce konopi jako środka halucynogennego na przełomie XIX i XX wieku przyczyniło się z pewnością traktowanie ich jako skutecznego, łatwo dostępnego środka leczniczego w lecznictwie oficjalnym. Używano go jako środka uspokajającego, nasennego, zastępującego działanie morfiny. Nalewki i wyciągi z konopi były lekami roślinnymi dostępnymi w aptekach. Farmakopea Polska II z 1937 roku (oraz 1946 roku) podaje jeszcze w spisie leków Herba Cannabis indicae. W Farmakopei Polskiej III „lek” ten już nie figuruje. Należy sądzić, że powodem stało się spopularyzowanie w Europie halucynogennych właściwości konopi, alarmujące doniesienia o popycie na ten narkotyk i przypadki nadużywania przygotowywanych z niego „leków” w celach niemedycznych. Sądzone, że wycofanie Herba Cannabis z lecznictwa zapobiegnie zagrożeniu, jakie stwarzają jego halucynogenne właściwości. Niestety tak się nie stało. Obecnie narkotyki uzyskiwane z konopi należą do najbardziej popularnych na świecie i mają najszerszy zasięg stosowania. Znane są one pod różnymi nazwami. Najbardziej rozpowszechnione to marihuana, dagge, kif, ganja, związane najczęściej z rejonem uprawy. Nielegalne uprawy konopi przeznaczonych do wyrobu produktów narkotycznych praktycznie wymykają się spod kontroli [1].

Konopie indyjskie są najpowszechniejszym dostępnym nielegalnym narkotykiem w Europie. Pochodzą zarówno z importu, jak i z produkcji krajowej. W większości krajów używanie konopi indyjskich wzrosło w latach 90. XX w. i na początku XXI w., chociaż nadal istnieją istotne różnice między poszczególnymi krajami. Konopie indyjskie można uprawiać w bardzo rozmaitych środowiskach; w wielu częściach świata

to roślina dziko rosnąca. Szacuje się, że jest uprawiana na obszarze 172 krajów i terytoriów (United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC, 2009). Informacje te oznaczają, że opracowanie dokładnych danych szacunkowych na temat światowej produkcji konopi indyjskich jest trudne. UNODC (2009) szacuje globalną produkcję marihuany w 2008 roku na 13 300–66 100 ton. Według ostrożnych szacunków około 75,5 mln Europejczyków przynajmniej jeden raz użyło konopi indyjskich (wskaźnik przynajmniej jednokrotnego użycia), czyli średnio więcej niż co piąta osoba w przedziale wiekowym od 15 do 64 lat [3].

Konopie i ich produkty

Konopie to roślina zielna, roczna, o prostych, wzniesionych pędach, głęboko ukorzeniona, dochodząca do 3 m wysokości. Liście konopi są ciemnozielone, mają kształt dłoniasty, są wielosieczne, grubożąbkowane, z obu stron szorstkie, z wolnymi, nitkowatymi przylistkami [1].

Konopie są roślinami dwupiennymi, tzn. występują rośliny mające kwiatostany wyłącznie męskie oraz rośliny mające kwiatostany wyłącznie żeńskie. Do celów narkotycznych mają zastosowanie rośliny tylko żeńskie, o znacznie większej zawartości substancji czynnych, czyli związków o charakterze fenolowym, tzw. kannabinoidów całkowicie swoistych dla rodzaju Cannabis [1, 4–5]. Znane są także postacie jednopienne tej rośliny. W tym przypadku na tym samym okazie rośliny znajdują się zarówno kwiaty męskie, jak i żeńskie. Okazy męskie roślin dwupienych zwane płaskoniami różnią się wyraźnie od okazów żeńskich zawiązujących owoce. Wierzchołek okazów męskich zakończony jest wiechą niepozornych zielonożółtych kwiatów pręcikowych, tądysa jest skąpo ulistniona, liście mają barwę jaśniejszą i zapach mniej intensywny niż liście okazów żeńskich. Męskie kwiatostany i liście również zawierają kannabinoidy, ale zawartość ich nie dorównuje zawartości kannabinoidów w kwiatostanach i liściach żeńskich i z reguły jest znikoma [1].

Okazy żeńskie są okazalsze od osobników męskich, rozłożyste, obficie ulistnione z wielokwiatowymi jasnozielonymi kwiatostanami. Roślina wydziela intensywny, charakterystyczny, aromatyczny zapach. Materiałem siewnym konopi są owoce – orzeszki jednonasienne kształtu okrągłojajowatego, lekko spłaszczone. Okrywa owocowa jest gładka, nieco lśniąca. Owoce niektórych odmian konopi, w praktyce zwane nasionami, różnią się między sobą wielkością, zabarwieniem, wzorzystością powierzchni. Często dostarczony do badań materiał siewny konopi zawiera ziarna o różnym stopniu dojrzałości. Owoce (nasiona) niedojrzałe są małe, kuliste, koloru zielonego lub szarzielonego. Dojrzałe zmieniają zabarwienie przeważnie na jasnobrunatne lub brunatne. Wygląd ten nie jest jednak podstawą do rozróżnienia poszczegól-

nych odmian. Niekiedy jest to możliwe po prześledzeniu całego cyklu wegetacyjnego rośliny i oznaczeniu w niej ciał biologicznie czynnych. W nasionach, łodygach i włóknach nie ma kannabinoidów lub są obecne tylko znikome ich ilości. W polskim i międzynarodowym ustawodawstwie nie są one wymienione jako środki narkotyczne.

Szczytowe części kwitnących lub owocujących konopi wydzielają żywicę zawierającą substancje działające psychoaktywnie i halucynogennie. Do produktów konopi należą marihuana, haszysz i olej haszyszowy [1].

Marihuana

Jest produktem narkotycznym otrzymywanym z konopi, niewymagającym prawie żadnej obróbki. Są to wysuszone, a następnie rozdrobnione liście i kwiatostany górnych pędów różnych odmian konopi. Marihuana występuje najczęściej w postaci krajanki lub drobno sproszkowanych fragmentów roślinnych. W celu zmniejszenia objętości masy roślinnej ugniata się ją i prasuje. Służy do palenia w skrętach, papierosach, fajkach, często w mieszaniu z tytoniem (tzw. jointy), niekiedy do przygotowania wodno-alkoholowych wywarów [1]. Odmianą marihuany o wysokiej zawartości substancji psychoaktywnych jest tzw. sinsemilla (hiszp. „bez nasion”), czyli żeńskie, niezapylone, a więc niewytwarzające nasion okazy rośliny *Cannabis sativa* [5].

Haszysz

Jest żywicą z ziela *Cannabis*. Żwicę tę wytwarza roślina w okresie dojrzewania – kwitnienia i owocowania. Ochrania ona wierzchołki kwiatowe przed wysychaniem. Roślina wydziela ją szczególnie obficie w suchym, gorącym klimacie, dlatego haszysz produkowany jest głównie w dwóch regionach świata: w krajach południowej i wschodniej części Morza Śródziemnego oraz na subkontynencie indyjskim. Handlowa postać haszyszu to najczęściej sprasowane płytki, tabliczki, brytki lub walce różniące się twardością, odcieniem barwy i połyskiem. Haszysz najczęściej pali się w fajce lub dodaje do żywności [1, 5].

Olej haszyszowy

Olej haszyszowy jest to ciekły ekstrakt materiału roślinnego lub żywicy otrzymany za pomocą rozpuszczalników organicznych, takich jak alkohol, benzyna czy eter naftowy. Ekstrakcję prowadzi się wielostopniowo. Po odparowaniu rozpuszczalników pozostaje oleisto-smołowata lepka ciecz o charakterystycznym zapachu, czarnobrunatnym zabarwieniu, zielonkawo połyskującym, nierozpuszczalna w wodzie. Rozcieńczony rozpuszczalnikami organicznymi olej przyjmuje barwę zieloną lub brązową, zależnie od dojrzałości materiału roślinnego i charakteru rozpuszczalnika. Postać płynna lepiej nadaje się do przemytu, gdyż w szczelnie zamkniętych butelkach jest trudna do

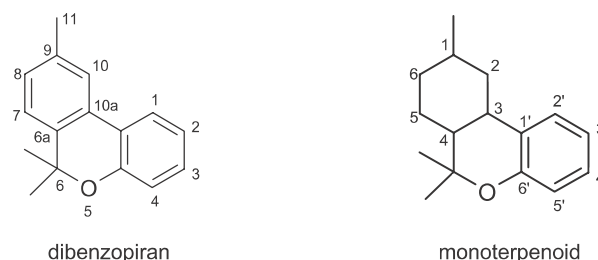
wykrycia przez tresowane psy. Olej haszyszowy dodawany jest do papierosów tytoniowych lub papierosów z marihuaną. Dwie–trzy krople oleju wsącza się zwykle w tytoń papierosów i w ten sposób „legalnie” używa narkotyk [1, 5].

Tak jak nie ma dwóch osób o identycznych liniach papilarnych, tak nie ma również dwóch próbek produktów *Cannabis* o identycznym wyglądzie, właściwościach i składzie, gdyż otrzymuje się je z różnego materiału roślinnego, przerabia różnymi metodami, wzbogaca i zagęszcza przy użyciu różnych technik oraz w różny sposób przygotowuje do przemytu [5].

Kannabinoidy

W narkotykowym typie *Cannabis* zidentyfikowano 421 substancji należących do 18 różnych grup chemicznych. Wśród nich jest ponad 50 węglowodorów, w tym silne kancerogenne – benzopiren i benzoantracen, 103 terpeny, których większość wywołuje silnie drażniące działanie na drogi oddechowe, 12 kwasów tłuszczowych, 11 steroidów, 20 związków heterocyklicznych zawierających azot oraz ponad 60 kannabinoidów – związków o 21 atomach węgla występujących wyłącznie w konopiach.

Do przedstawienia budowy chemicznej kannabinoidów stosuje się dwa sposoby numeracji atomów w cząsteczce, z których jeden opiera się na strukturze dibenzopiranu, a drugi monoterpenoidu (ryc. 1).



Ryc. 1. Numeracja atomów w cząsteczkach dibenzopiranu i monoterpenoidu [5].

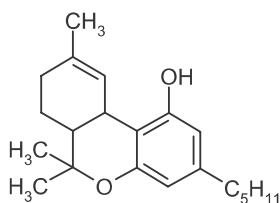
Termin kannabinoidy obejmuje również syntetyczne analogi strukturalne naturalnych składników kannabis oraz ich metabolity powstające w żywych organizmach.

Nowoczesne badania nad kannabinoidami rozpoczęły się w roku 1964, kiedy w laboratorium Mechoulama rozszyfrowano strukturę delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC), głównego psychoaktywnego składnika *Cannabis*. Aktywność farmakologiczna Δ -9-THC jest stereoselektywna: izomer lewoskrętny działa (zależnie od użytego testu) 6–100 razy silniej niż prawoskrętny. Z czasem poznano strukturę innych składników konopi (nazywanych często „klasycznymi kannabinoidami”), z których na uwagę zasługują:

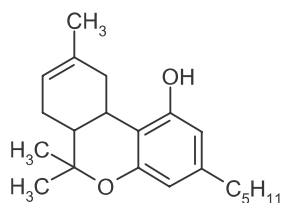
- delta-8-tetrahydrokannabinol (Δ -8-THC);
- kannabinol (CBN);
- kannabidiol (CBD);

- kwas tetrahydrokannabinolowy (Δ -9-THCA-A);
- kwas tetrahydrokannabinolowy (Δ -9-THCA-B);
- kwas kannabinolowy (CBNA);
- kannabinochromen (CBC) (ryc. 2).

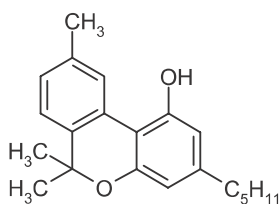
Zawartość Δ -9-THC w materiale roślinnym zależy od genetycznych właściwości rośliny, warunków jej wegetacji, sposobu zbierania, wieku rośliny, rodzaju gleby i klimatu. Dobierając odpowiednie warunki, można doprowadzić do wzrostu zawartości psychoaktywnego składnika – np. marihuana produkowana w latach 1979–1982 zawierała ok. 3% Δ -9-THC, podczas gdy uprawiana obecnie – 6–10%. Ostatnio w Holandii wyhodowano odmianę konopi, nazwaną Netherweed, o zawartości 20% Δ -9-THC [5].



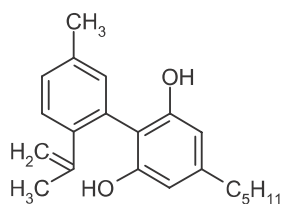
delta-9-tetrahydrokannabinol
(Δ -9-THC)



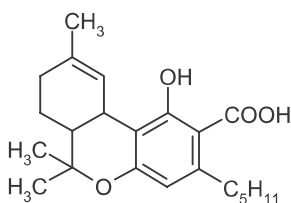
delta-8-tetrahydrokannabinol
(Δ -8-THC)



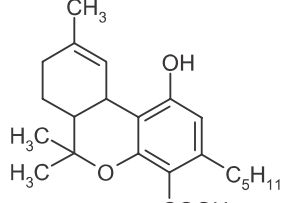
kannabinol (CBN)



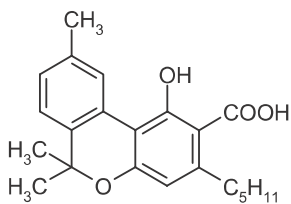
kannabidiol (CBD)



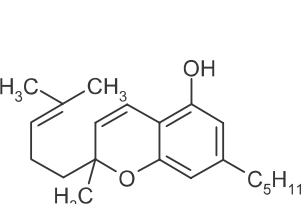
kwas
 Δ -9-tetrahydrokannabinolowy
(Δ -9-THCA-A)



kwas
 Δ -9-tetrahydrokannabinolowy
(Δ -9-THCA-B)



kwas kannabinolowy
(CBNA)



kannabinochromen
(CBC)

Ryc. 2. Wzory najważniejszych klasycznych kannabinoidów [1, 6].

W poszczególnych częściach rośliny występują znaczne różnice zawartości Δ -9-THC. W wyniku przeprowadzonych badań w łodygach nie stwierdza się jego obecności. Natomiast liście wiechy zawierają ok. 1%, kwiatostan ok. 3%, a żywica ok. 5% Δ -9-tetrahydrokannabinolu [7]. Przeciętna zawartość Δ -9-THC w produktach kannabis wynosi: produkty roślinne (marihuana) 0,5–5%, żywica (haszysz) 2–10%, olej haszyszowy 10–30%. Są to jednak wartości orientacyjne, gdyż w różnych próbkach tych produktów zawartość Δ -9-THC może wykraczać poza podane wartości [5].

Delta-9-tetrahydrokannabinol (Δ -9-THC) występuje najczęściej z kannabinolem (CBN) i kannabidiolem (CBD) oraz delta-8-tetrahydrokannabinolem (Δ -8-THC) [8]. Zarówno CBD, jak i CBN są związkami o działaniu euforycznym, zaś Δ -8-THC działa podobnie jak Δ -9-THC, lecz słabiej [4]. Najważniejszym prekursorem Δ -9-THC w roślinach konopi jest kwas Δ -9-tetrahydrokannabinolowy (Δ -9-THCA-A), który rozkłada się do Δ -9-THC w podwyższonej temperaturze. Ma to miejsce zarówno w trakcie palenia produktów konopi, jak i w toku ich analizy metodami chromatografii gazowej w porcie nastrzykowym, gdzie panuje wysoka temperatura. Innymi kannabinoidami występującymi w konopiach są: kwas kannabinolowy (CBNA), kwas kannabidiolowy (CBDA), kannabichromen (CBC), kannabigerol (CBG), kwas kannabinogrolowy (CBGA), kannabiwarina (CBV) i tetrahydrokannabiwarina (THV) [8].

Podgatunki konopi

Przyjmuje się, że konopie należą do jednego rodzaju i gatunku konopi siewnych *Cannabis sativa*, które dzielą się na trzy podgatunki: konopie dzikie, konopie narkotyczne oraz konopie zwyczajne.

Konopie dzikie

Konopie te charakteryzują się grubą okrywą owoców i łatwością osypywania się nasion. Rośliny te należą do stosunkowo niskich. Nasiona ich są drobne, ciemno zabarwione o bardzo wzorzystej mozaice. Zawartość włókna jest niska, natomiast zawartość Δ -9-THC sięga nieraz 0,5%, a nawet 1%. Rośliny te można spotkać w Azji (Indie, Iran, Afganistan, Chiny). W Europie występują w Polsce, Czechach, Słowacji i krajach Półwyspu Bałkańskiego.

Konopie narkotyczne

Są to konopie dwupienne, typowo odurzające. Rośliny mają silnie rozgałęzioną łodygę o gęstym i obfitym ulistnieniu. Odcinki liściowe są małe, intensywnie zielone. Konopie narkotyczne mają mało włókna. Substancje odurzające otrzymuje się z okazów żeńskich. Listki wiechy główca pokryte są gruczołami włoskowatymi wydzielającymi intensywny zapach kannabinolowy oraz lepką substancję zwaną żywicą. Konopie te należą do typu południowego. Występują w Indiach

i wszystkich krajach sąsiednich. W Polsce nie dojrzewają, mogą jednak być krzyżowane ze wszystkimi rosnącymi u nas typami konopi.

Konopie zwyczajne

Konopie te wyróżniają się ogromnym bogactwem form. Wśród nich występują konopie południowe, północne oraz konopie pośrednie.

Konopie pośrednie – do tej grupy należą m.in. konopie polskie oraz środkoworosyjskie. Najczęściej wysokość łodygi wynosi od 125 cm do 200 cm, często dochodzi nawet do 250 cm i więcej. Liść jest większy niż u konopi północnych. W środkowej części składa się z 7 odcinków. Nasiona są jasne, bez mozaiki.

Konopie południowe – do tej grupy zalicza się konopie francuskie, hiszpańskie, jugosłowiańskie, włoskie, tureckie. Najczęściej wysokość łodygi wynosi od 250 cm do 400 cm. Liście są duże, szerokie, składają się z 9–11 odcinków. Nasiona są duże, barwy szarej lub ciemnoszarej, z wyraźnie zaznaczoną mozaiką. W Polsce konopie te w zasadzie nie dojrzewają.

Wobec łatwości tworzenia się krzyżówek wszystkie występujące typy i formy konopi mogą się ze sobą krzyżować.

Biorąc pod uwagę zawartość delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) oraz kannabidiolu (CBD), wydzielono trzy najważniejsze chemotypy konopi. Podziałowi temu sprzyja fakt, że każda pojedyncza roślina należy do określonego typu chemicznego w ciągu całego swojego cyklu rozwojowego.

I chemotyp

- Typ narkotyczny – wybitnie odurzający
- Δ -9-THC > 2%, CBD = 0%

Występuje w klimacie gorącym. Do tej grupy zaliczamy konopie indyjskie, meksykańskie, południowoafrykańskie.

II chemotyp

- Typ pośredni – również odurzający
- Δ -9-THC > 0,5% (średnio od 0,3% do 0,9%), CBD > 0,5%

Są to wszystkie konopie uprawiane w klimacie ciepłym, śródziemnomorskim.

III chemotyp

- Konopie włókniste
- Δ -9-THC < 0,3%, CBD > 0,5%

Do tej grupy należą konopie uprawiane w strefie umiarkowanej.

Wysokie stężenie CBD, przy sprzyjających warunkach uprawy, może spowodować, iż u rośliny typu włóknistego zostanie przekroczona bezpieczna granica dla Δ -9-THC. Zdarza się to przy prowadzeniu kilkuletnich odsiewów w warunkach sztucznych (szklarniowych, przy odpowiednio stworzonych warunkach agrotechnicznych). Wówczas stężenie Δ -9-THC może przekroczyć granicę 0,2% i roślina taka, mimo że jej

profil nie odbiega zasadniczo od typu włóknistego ze względu na zawartość Δ -9-THC zostanie zakwalifikowana do typu narkotycznego. W związku z tym dąży się do wyhodowania konopi całkowicie bezpiecznych, o bardzo niskiej zawartości Δ -9-THC. Badania takie były prowadzone, a osiągnięte wyniki pozwoliły wyróżnić IV chemotyp konopi.

IV chemotyp

- Δ -9-THC ok. 0,001%, CBD ok. 0,2%

W literaturze można spotkać inny współczynnik umożliwiający rozróżnianie typu włóknistego od typu narkotycznego konopi, tzw. kryterium proporcji kannabinoidów:

$$PC = \frac{CBN \% + \Delta\text{-}9\text{-THC} \%}{CBD \%}$$

Jeżeli PC < 1, to konopie zalicza się do typu włóknistego. Jeżeli PC > 1, mamy do czynienia z konopiami typu narkotycznego.

Kryterium to wprowadzono, biorąc za podstawę cykl przemian kannabinoidów, jaki zachodzi w roślinie. Jak wiadomo, w młodych okazach występuje wysokie stężenie CBD, natomiast zawartość Δ -9-THC jest niewielka. Dopiero w okresie dojrzewania konopi dochodzi do uaktywnienia się procesu biosyntezy kannabinoidów, co wiąże się ze wzrostem zawartości Δ -9-THC w roślinie. Dłuższe przechowywanie i suszenie roślin powoduje rozkład Δ -9-THC do CBN, w wyniku którego następuje spadek stężenia Δ -9-THC [7].

Wykorzystanie konopi

Przemysłowym przeznaczeniem konopi jest produkcja włókna przędzalniczego i włókna powroźnego z tzw. słomy konopnej otrzymywanej z łodyg rośliny oraz oleju z nasion. Włókna konopne przerabiane są głównie w postaci włókien technicznych i służą do wyrobu mało szlachetnych, grubych przędz przeznaczonych do produkcji worków, lin, powrozów. Część włókien przerabia przemysł papierniczy. Tradycyjnymi rejonami koncentracji upraw konopi w Polsce są: rejon lubelski, jarosławski, kielecko-krakowski [1].

Jako ciekawostkę można podać, że w Szwajcarii i Włoszech ziele konopi jest wykorzystywane jako dodatek do przygotowywania produktów żywnościowych, takich jak olej, mąka, herbata, lemoniada, piwo czy likier, natomiast olejki eteryczne uzyskiwane metodą destylacji z parą wodną są wykorzystywane do produkcji kosmetyków [9–10].

Narkotyczny typ konopi znalazł zastosowanie, nazywane niekiedy eufemistycznie „rekreacyjnym”, polegające na wywoływaniu euforycznego samopoczucia, któremu jednak towarzyszą objawy toksyczne i groźba uzależnienia. Ocena roli tej odmiany konopi była przedmiotem sporów już w czasach starożytnych: dla jednych roślina ta wyznaczała drogę do Hadesu, dla innych prowadziła do raju [5].

Obecnie nielegalne uprawy konopi prowadzone na wielką skalę znajdują się przede wszystkim w: Ameryce Północnej i Południowej, na Karaibach, w Afryce i południowo-wschodniej Azji, w takich państwach jak: Afganistan, Kolumbia, Irak, Jamajka, Liban, Meksyk, Maroko, Pakistan, Turcja. Także w Europie można spotkać uprawy konopi, jednak ze względu na nieprzyjające warunki klimatyczne uzyskiwane tu rośliny charakteryzują się niższą zawartością kannabinoidów. Wyjątkiem są specjalne uprawy hydroponiczne spotykane np. w Holandii, gdzie stosując odpowiedni dobór roślin i zapewniając im specjalne warunki uprawy otrzymuje się rośliny dorównujące jakością tym pochodzącym z innych regionów świata, a nawet przewyższające je pod tym względem [2–3].

Działanie konopi na organizm człowieka

Preparaty Cannabis wykazują nie tylko działanie odurzające, lecz także trujące. Najczęstsze objawy toksyczności biologicznej to napady lęku, zaburzenia snu, brak kontroli nad czynnościami fizjologicznymi. Już po tygodniowym zażywaniu Cannabis wystąpić mogą symptomy psychicznego uzależnienia. Występują one najczęściej u ludzi o słabym układzie psychicznym i nerwowym. Nałogowi palacze marihuany i haszyszów twierdzą, że przy pierwszym zetknięciu z tymi narkotykami przekonani byli o ich nieszkodliwości.

Wchłanianie Δ -9-THC przy różnych drogach podania przebiega odmiennie. W celu wywołania euforii stosuje się głównie palenie papierosów z marihuany, a więc wprowadza związek aktywny przez drogi oddechowe. Znacznie rzadziej przyjmuje się preparaty cannabis doustnie. Δ -9-THC bywa również podawany w postaci iniekcji, jednak z uwagi na złą rozpuszczalność w wodzie przygotowanie roztworów iniekcyjnych jest kłopotliwe.

Podczas palenia następuje rozkład części Δ -9-THC i do płuc palacza dostaje się tylko 20–70% aktywnego związku występującego w marihuanie. Jego zawartość w dymie zależy od sposobu palenia: zwiększa się wówczas, gdy palacz wciąga dym rzadziej, np. raz na minutę i zatrzymuje go w płucach dłużej, np. przez 5 sekund, mniejsza natomiast (ok. 20%), gdy zaciąga się dymem częściej (więcej związku ulega wówczas termicznej destrukcji).

Obecność Δ -9-THC w organizmie wywołuje stan euforii, halucynacje, podwyższa wrażliwość na bodźce muzyczne i hałas, zmienia odbiór przestrzenny i czasowy rzeczywistości, powoduje zaburzenia koordynacji ruchowej, zaburza również krótkotrwałą pamięć, zwalnia procesy uczenia się, powoduje uczucie paniki, wywołuje także krótkotrwałe okresy lęku, zmieszania lub psychozy. U okazjonalnych palaczy do wywołania przyjemnego uczucia euforii wystarczy 2–3 mg Δ -9-THC, zaś jednym ręcznie przygotowanym papierosem tzw. skrętem, może wprowadzić się w stan odurzenia

nawet od 2 do 4 początkujących palących. Osoba silnie uzależniona wypala do 5–8 „skrętów” w ciągu doby [11].

Szkodliwość używania cannabis, zwłaszcza długotrwałego, jest znaczna. Do najważniejszych zagrożeń należą: zwiększenie ryzyka przewlekłego zapalenia oskrzeli, zwiększone ryzyko nowotworów górnych dróg oddechowych, rozwinięcie się uzależnienia, zwiększone ryzyko urodzenia dziecka z niedowagą (gdy stosowano cannabis podczas ciąży), zwiększone ryzyko wystąpienia zespołów paranoidalnych; zwiększone ryzyko wypadków drogowych.

Świadomość społeczna zagrożeń związanych z używaniem cannabis jest dużo mniejsza niż w przypadku alkoholu i tytoniu, ponieważ problematyce tej poświęca się znacznie mniej badań oraz działań profilaktycznych i informacyjnych. Głównym argumentem przeciwko legalizacji sprzedaży produktów cannabis jest to, że ich niekontrolowane, wielokrotne przyjmowanie wywołuje wysoce szkodliwy toksyczny wpływ na układ oddechowy, sercowo-naczyniowy, rozrodczy, odpornościowy, a także na płód i mózg. Oddziaływania te mają bardzo szeroki zakres – od poziomu molekularnego, stanowiącego fundament ludzkiego życia, do jego najdoskonalszych przejawów – myślenia i osobowości.

Podejmowane są również próby leczniczego wykorzystywania kannabinoidów (Δ -9-THC, CBD) w takich schorzeniach jak: stwardnienie rozsiane, choroba Parkinsona, stany pooperacyjne, urazy rdzenia kręgowego, zespół wyniszczenia w przebiegu AIDS, choroba nowotworowa, jaskra, zwiotczenie dolnego zwieracza przełyku, zapalenie otrzewnej, uszkodzenie unerwienia ścian jelita [5].

Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii a konopie

Zgodnie z zapisami obowiązującej obecnie ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii z 29 lipca 2005 roku (Dz.U. Nr 179, poz. 1485) uprawa konopi jest zabroniona z wyjątkiem uprawy konopi włóknistych, która może się odbywać po uzyskaniu odpowiednich zezwoleń.

Fakt pojawienia się na rynku narkotykowym konopi modyfikowanych genetycznie zawierających niewielkie ilości Δ -9-THC (poniżej 0,20%), a mających zawartość kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A, kwas delta-9-THC-2-karboksylowy), wpłynął na podjęcie kroków legislacyjnych w celu nowelizacji Ustawy z dnia 29 lipca 2005 roku o przeciwdziałaniu narkomanii, która weszła w życie w dniu 1 lutego 2007 roku. Zmiana dotyczyła zmiany definicji konopi włóknistych, która otrzymała brzmienie: „rośliny z gatunku konopie siewne (*Cannabis sativa* L.), w których suma zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu oraz kwasu tetrahydrokannabinolowego (kwas delta-9-THC-2-karboksylowy) w kwiatowych lub owocujących wierzchoł-

kach roślin, z których nie usunięto żywicy, wynosi poniżej 0,20% w przeliczeniu na suchą masę”. Poprzednia wersja tej ustawy definiowała konopie włókniste jako rośliny, w których tylko zawartość Δ -9-THC determinowała czy dana próbka ziela konopi stanowić będzie w świetle ustawy środek odurzający [8].

Zgodnie z wymogami znowelizowanej ustawy 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 Δ -9-THCA-A 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 Δ -9-THCA-A). Według polskiego ustawodawstwa za produkt narkotykowy uznawane jest ziele *Cannabis* zawierające powyżej 0,2% Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A łącznie oraz żywica i inne produkty konopi niezależnie od zawartości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A [12]. Ziele i żywica konopi oraz wyciągi, nalewki farmaceutyczne, a także wszystkie inne wyciągi z konopi zostały zaliczone do grupy I-N i IV-N środków odurzających, natomiast najaktywniejszy składnik preparatów *kannabis* – delta-9-tetrahydrokannabinol (Δ -9-THC) – do grupy II-P substancji psychotropowych [5].

Metody instrumentalne wykorzystywane do oznaczeń Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A w próbkach konopi

Większość opisywanych w literaturze metod oznaczania zawartości Δ -9-THC w produktach konopi bazuje na chromatografii gazowej i jej zastosowaniu w analizie produktów konopi dla celów sądowych. Procedury te zazwyczaj wyznaczają stężenie tzw. całkowitego Δ -9-THC, na które składają się naturalna zawartość Δ -9-THC oraz dodatkowo Δ -9-THC, tworzący się w wyniku dekarboksylacji Δ -9-THCA-A w wysokiej temperaturze iniektora chromatografu gazowego. Analityczne rozróżnienie Δ -9-THC od jego prekursora jest możliwe przy zastosowaniu metody GC po uprzedniej derywatacji analitów [8].

Metody instrumentalne stosowane we współczesnej analizie kannabinoidów obejmują również szerokie spektrum metod chromatograficznych sprzężonych ze spektrometrią mas. Najczęściej stosowaną metodą jest chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas wykorzystująca pojedynczy analizator kwadropolowy z opcją jonizacji elektronowej (GC-EI-MS) czy też z opcją jonizacji chemicznej pozytywnej lub negatywnej (GC-PCI/NCI-MS). Pojawiła się również aplikacja dotycząca zastosowania dwuwymiarowej chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z pojedynczym analizatorem kwadropolowym w opcji jonizacji elektronowej (GC-GC-EI-MS).

Wśród metod stosowanych w analizie kannabinoidów coraz częściej wykorzystuje się chromatografię gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas realizowaną poprzez stosowanie różnego rodzaju analizatorów mas, najczęściej układu potrójnych kwadropol (QQQ) czy trójwymiarowej kwadropolowej pułapki jonowej (QIT).

Obok GC-MS, coraz częściej pojawiają się informacje dotyczące zastosowania chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LC-MS), która z równym powodzeniem może być stosowana do analiz tej grupy związków [11].

Czynniki wpływające na wynik oznaczeń

Pobieranie próbek

Większość wykorzystywanych w laboratoriach kryminalistycznych instrumentalnych metod badań narkotyków wymaga niewielkich ilości próbki, dlatego też jest niezwykle istotne, by analizowana próbka była reprezentatywna dla całego materiału, z którego została pobrana. Z uwagi na znaczny koszt materiałów, odczynników chemicznych i oszczędność czasu, laboratoria kryminalistyczne powinny, o ile jest to możliwe, wykorzystywać sprawdzone i uznane metody próbkowania i, co za tym idzie, ograniczać liczbę analiz ilościowych potrzebnych do przeprowadzenia.

Zarówno w przypadku pobierania próbek roślin konopi pochodzących z upraw polowych, jak i tych prowadzonych w pomieszczeniach zamkniętych, dla każdego poletka, dla którego wizualnie stwierdzono, że zawierają ten sam rodzaj roślin, pobiera się losowo, z wyjątkiem roślin rosnących na skraju poletka, 30 owocujących lub kwitnących wierzchołkowych części roślin o długości ok. 20 cm. Pobrane rośliny należy przechowywać w papierowych opakowaniach. Przed poddaniem badaniom laboratoryjnym zabezpieczony materiał powinien być wysuszony. Jeśli musi być on przechowywany, to powinien być zabezpieczony w zaciemnionych i chłodnych pomieszczeniach.

W przypadku zabezpieczenia dużej ilości ziela konopi lub jego produktów przy wyborze liczby obiektów pobieranych do badań należy mieć na względzie wskazówki pobierania reprezentatywnych próbek narkotyków podawane przez Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości (United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC) [13]. Zgodnie ze wskazówkami UNODC metody próbkowania dzielą się na metody arbitralne (uznaniowe), które często sprawdzają się w praktyce, mimo że nie są one oparte na żadnych statystycznych podstawach. Główną wadą tych metod stanowi stosunkowo duża liczba obiektów, które należy pobrać do badań w przypadku zabezpieczenia znacznej ilości materiału dowodowego. Spośród metod arbitralnych Program ONZ do spraw kontroli spożycia narkotyków (United Nations Drug Control Programme – UNDCP) rekomenduje metodę pierwiastka kwadratowego, w której sposób

wybierania liczby obiektów do badań (n) z populacji o liczebności (N) jest następujący:

$$\text{dla } N < x \quad n = N$$

$$x \leq N \leq y \quad n = z$$

$$N > y \quad n = \sqrt{N}$$

$$\text{dla } x = 10, y = 100, z = 10$$

Drugą grupę stanowią metody mające umocowanie statystyczne, do których należą:

- metoda hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa;
- metoda oparta na rozkładzie dwumianowym;
- metoda wykorzystująca podejście Bayesowskie [14].

W metodzie hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa zakłada się, że z całkowitej liczby N obiektów populacji, dla założonego poziomu istotności α , prawdopodobieństwo, że co najmniej k 100% obiektów daje ten sam wynik, co w losowo pobranych do badań n obiektach wynosi $(1 - \alpha)100\%$. W praktyce laboratoryjnej najczęściej można się spotkać z przyjmowaniem wartości α i k odpowiednio na poziomie 0,05 i 09 [14]. Oznacza to, że z 95% prawdopodobieństwem, w co najmniej 90% opakowań znajduje się taka sama substancja co w n losowo wybranych próbkach poddanych badaniom. Jeżeli nie uzyskano negatywnych wyników, porzeczanie się na n próbkach. W przypadku, gdy jeden lub dwa wyniki nie są pozytywne, należy z pozostałej części populacji pobrać dodatkowe próbki do badań [15].

Metoda oparta na rozkładzie dwumianowym jest prostsza w użyciu niż metoda hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa, jednak może ona być wykorzystywana jedynie w specjalnych przypadkach. Metoda ta zakłada, że zanim pobrany zostanie kolejny obiekt, poprzedni pobrany i przebadany obiekt powraca do populacji. Taki sposób próbkowania nie jest standardowo wykorzystywany w przypadku pobierania próbek narkotyków, jednakże w przypadku dużej liczebności materiału dowodowego (co najmniej 50 obiektów) oraz gdy próbki są stosunkowo małe, rozkład hipergeometryczny może być przybliżony mniej złożonym rozkładem dwumianowym. W przypadku metody opartej na rozkładzie dwumianowym należy pamiętać, że jest ona jedynie przybliżeniem, zaś liczba n obiektów pobieranych do badań będzie nieznacznie zawyżona. Tylko w przypadku bardzo licznego materiału dowodowego (niekiedy rzędu kilku tysięcy) liczby obiektów pobieranych do badań obliczone z wykorzystaniem rozkładów hipergeometrycznego i dwumianowego będą sobie dokładnie równe.

W metodzie wykorzystującej podejście Bayesa przyjmuje się założenie wstępne, że liczba obiektów, jakie należy poddać badaniom, jest znana i ustalona. Liczba ta jest wykorzystywana do obliczenia określonych stopni prawdopodobieństwa dotyczącego nieznanego materiału dowodowego, która w tym przypadku jest zmienną. Metoda wykorzystująca podejście Bayesa pozwala na uwzględnienie wiedzy

pobierającego próbki na temat materiału dowodowego. Liczba obiektów materiału dowodowego nie jest dokładnie znana, jednak istnieją istotne przesłanki co do rodzaju tego materiału. Przykładowo, gdy wszystkie rośliny młodej plantacji konopi wyglądają tak samo, prawdopodobnie wszystkie są konopiami. Z drugiej strony, możliwa jest także sytuacja, w której brak jest jakichkolwiek informacji odnośnie do ilości i rodzaju narkotyków stanowiących materiał dowodowy. Uwzględnienie tego typu a priori informacji przekłada się na otrzymanie różnych modeli matematycznych wykorzystywanych do oszacowania liczby n obiektów pobieranych do badań.

Metodę opartą na podejściu Bayesa zaleca się wykorzystywać w przypadku materiału dowodowego zawierającego ponad 50 obiektów i w przypadku ich małych rozmiarów. Obliczana w ten sposób liczba obiektów badań jest, podobnie jak dla metody wykorzystującej rozkład dwumianowy, zawyżona, jednakże w tym przypadku nie stanowi to aż tak dużego problemu. Podobnie jak dla pozostałych metod statystycznych do przeprowadzenia obliczeń należy przyjąć dopuszczalną liczbę wyników negatywnych, a jeżeli przyjęte założenia nie zostały spełnione, należy zmodyfikować liczbę obiektów pobieranych do badań. Najczęściej występuje sytuacja, w której nie przyjmuje się możliwości wystąpienia wyników negatywnych. Rozkładem prawdopodobieństwa, który przyjmuje się przy zastosowaniu podejścia Bayesa, jest rozkład β . W rozkładzie tym należy a priori przyjąć wartości dwóch parametrów a i b .

W przypadku gdy nie ma żadnych informacji, co zawiera badany materiał w postaci np. tabletek, istnieje możliwość przyjęcia obu współczynników równych i mających wartość 1. Inną możliwością jest przyjęcie obu wartości współczynników równych 0,5, jeśli istnieje przesłanka a priori, że albo wszystkie tabletki zawierają narkotyk, albo żadna z nich nie zawiera narkotyku. Przyjęcie wartości $b = 1$ i $a = 3$ (lub większej) oznacza, że istnieje wstępna przesłanka, oparta na wizualnym oglądzie obiektów, że prawdopodobnie wszystkie zawierają narkotyk, tak jak ma to miejsce w przypadku plantacji złożonej z młodych roślin konopi.

Dla zadanych parametrów obliczenia liczby obiektów n pobieranych do badań przy zastosowaniu metody hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa, metody opartej na rozkładzie dwumianowym oraz metody wykorzystującej podejście Bayesowskie można dokonać z wykorzystaniem makra programu Excel dostępnego na stronie ENFSI. (www.enfsi.eu) [14].

W przypadku analizy jakościowej materiału wykazującego charakterystyczne cechy konopi preferowane jest stosowanie metody próbkowania wykorzystującej podejście Bayesa w stosunku do metody hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa [13]. Niemniej występują liczne problemy związane

z praktycznym wykorzystaniem tej pierwszej metody, które są związane przede wszystkim z brakiem ścisłych wytycznych dotyczących sposobu dobierania parametrów a i b. Kluczową sprawą jest w tym przypadku konieczność rozróżnienia rzeczywistego doświadczenia pobierającego materiał do badań od jego subiektywnych przeświadczeń. Z tego względu metody hipergeometrycznego rozkładu prawdopodobieństwa i rozkładu dwumianowego wydają się lepsze do zrozumienia oraz wyjaśnienia i, choć w przypadku dużej ilości materiału dowodowego wymagają pobrania i przebadania większej liczby obiektów, to jednak odpowiednią rekompensatę stanowi niewielka możliwość zakwestionowania ich w sądzie [14].

Jeśli sporządza się próbkę średnią, traktowaną jako mieszanina złożona z poszczególnych próbek, czynność ta musi być przeprowadzona w taki sposób, aby skład przygotowanej próbki odzwierciedlał całkowity skład mieszaniny. Próbka taka z definicji daje wartość średnią przy braku informacji dotyczącej poszczególnych obiektów. Główny problem napotykaný przy takim sposobie próbkowania jest związany z brakiem odpowiedniej homogeniczności materiału [14].

Przy pobieraniu próbek konopi należy również mieć na uwadze następujące wskazówki:

- jeśli zabezpieczone jest jedno opakowanie luźnego sypkiego materiału ziela konopi – postępujemy jak w przypadku wydzielania próbki laboratoryjnej z próbki ogólnej;
- jeśli do badań dostarczono materiał sprasowany w postaci bryły – materiał należy pobierać z co najmniej dwóch miejsc bryły i przełamać bryłę dla upewnienia się co do jednolitej zawartości wnętrza;
- jeśli do badań dostarczono większą liczbę opakowań – poddajemy całość oględzinom, aby stwierdzić, czy wszystkie opakowania zawierają taki sam materiał; jeśli jedno lub więcej opakowań różni się od pozostałych – wydzielamy je do odrębnych badań;
- jeśli zabezpieczone są całe rośliny – do analizy ilościowej Δ -9-THC będą brane jedynie wierzchołki roślin;
- wierzchołki roślin stanowiące próbkę ogólną z jednego poletka traktujemy jako jedno opakowanie luźnego, sypkiego materiału ziela konopi – postępujemy jak w przypadku wydzielania próbki laboratoryjnej z próbki ogólnej; musimy zastosować jedną z technik zmniejszania próbki ogólnej; przy ostatecznym pobieraniu próbki laboratoryjnej, przed jej homogenizacją do badań postępujemy podobnie jak w przypadku materiału zbrylonego – wybieramy do badań reprezentacje większych i mniejszych agregatów (kwiatostanów lub ich fragmentów) w proporcjach, w jakich znajdują się w próbce; należy też zwrócić uwagę na proces segregacji (samosortowania się);
- do badań pobieramy ilość wystarczającą do powtórzenia badań i pozostawienie do badań rozjemczych [16].

Pośród wszystkich opisanych metod pobierania próbek nie można jednoznacznie wskazać metody optymalnej. Dzieje się tak dlatego, że wiele istotnych czynników rzutuje na wynik badań. Do czynników tych należą: rodzaj narkotyków, ilość skonfiskowanego materiału, cel badań, doświadczenie chemika i sądu oraz czynniki ekonomiczne. Dla określonej sytuacji wybór metody próbkowania powinien w głównej mierze spełniać wymagania prokuratur i sądów, które z kolei powinny uwzględniać koszty badań i czynniki związane z pracą danego laboratorium [14].

Trwałość kannabinoidów w konopiach

Po pobraniu i wysuszeniu roślin konopi proces degradacji głównych kannabinoidów zostaje zatrzymany. Niemniej w tym stanie Δ -9-THC jest wciąż podatny na wpływ tlenu z powietrza, podwyższonej temperatury i światła ultrafioletowego (UV), które to czynniki powodują utlenianie Δ -9-THC do CBN. Δ -9-THC może również ulegać izomeryzacji do Δ -8-THC, co zostało dobrze udokumentowane w pracach Mechoulama (1970, 1973) oraz Razdana (1973). W związku z tym wskazane jest przechowywanie zebranych roślin konopi w suchych i zaciemnionych pomieszczeniach [13, 17–18].

Z badań przeprowadzonych w Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie (IES) wynika, że susz konopi przechowywany w papierowych opakowaniach, w temperaturze pokojowej przez rok, zmienia znacznie swój skład chemiczny. W tym czasie w suchym surowcu roślinnym zmniejsza się zawartość Δ -9-THC i kannabinochromenu (CBCh), a zwiększa się stężenie kanabidiolu (CBD). Stosunek stężeń CBD/CBN również ulega zmianie. Obniżenie zawartości Δ -9-THC w próbkach konopi i haszyszu podczas przechowywania potwierdzają dane z piśmiennictwa. Różni autorzy obserwowali ponadto wzrost stężenia CBN i względną stałość stężenia CBD, wzrost stężenia CBN i względną stałość stosunku CBD/ Δ -9-THC w okresie rocznym, a następnie powolny spadek stężenia CBD, przy czym rozkład Δ -9-THC zasadniczo kończył się po upływie roku. Dynamika zmian zawartości kannabinoidów służy do określania świeżości materiału roślinnego [16].

Wiek roślin

Ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii z 29 lipca 2005 roku (Dz.U. Nr 179, poz. 1485) w art. 4 pkt 5 definiuje konopie włókniste jako „rośliny z gatunku konopie siewne (*Cannabis sativa* L.), w których suma zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu oraz kwasu tetrahydrokannabinolowego (kwasu delta-9-THC-2-karboksylowego) w kwiatowych lub owocujących wierzchołkach roślin, z których nie usunięto żywicy, nie przekracza 0,20% w przeliczeniu na suchą masę”. Ta sama ustawa w art. 4 pkt. 37 definiuje ziele konopi jako „kwiatowe lub owocujące wierzchołki konopi, z których nie usunięto żywicy, a w przypadku roślin

w stadium przed zawiązaniem wiechy – liście i łodygi konopi”. W wykazie środków odurzających stanowiącym Załącznik 1 do przedmiotowej ustawy „KONOPI ZIELE innych niż włókniste oraz wyciągi, nalewki farmaceutyczne, a także wszystkie inne wyciągi z konopi innych niż włókniste” są zaklasyfikowane jako środki odurzające grupy I-N i IV-N.

Analiza powyższych zapisów ustawy pozwala stwierdzić, że nie są one ze sobą spójne, jeśli wziąć pod uwagę definicje konopi (włóknistych) oraz ziela konopi. Skoro bowiem w definicji ziela konopi odniesiono się do roślin przed zawiązaniem wiechy, wydaje się logiczne, iż to samo odniesienie powinno być zastosowane przy definiowaniu konopi włóknistych.

Powyższe nieprecyzyjne zapisy ustawy rodzą problemy w przypadku opiniowania dotyczącego młodych lub bardzo młodych roślin konopi. W przypadku nadesłania do badań roślin przed zawiązaniem wiechy ściśle trzymanie się zapisów ustawy pozwala stwierdzić, czy nadesłany materiał stanowi ziele konopi, jednakże nie pozwala zaklasyfikować ich do odpowiedniej grupy (konopie włókniste lub inne niż włókniste), gdyż definicja konopi (włóknistych) nie uwzględnia takiego materiału.

Wnioski te były już formułowane w przeszłości w pracach Ankusa i Sokołowskiej-Jabłońskiej, zdaniem których w przypadku stwierdzenia niskiej zawartości Δ -9-THC w młodych niedojrzałych roślinach nie można wypowiedzieć się jednoznacznie co do odmiany uprawianych konopi. Wyniki badań roślin niedojrzałych jako niemiernodajne należy odrzucić z uwagi na niezgodność materiału dowodowego z definicją ustawową [19].

Problemy związane z opiniowaniem w przypadku młodych roślin konopi nie są związane jedynie z zapisami polskiego prawodawstwa. Podobna sytuacja ma miejsce również w innych krajach. Zgodnie z oficjalnym protokołem Unii Europejskiej dotyczącym oznaczania sumarycznej zawartości Δ -9-THC oraz Δ -9-THCA-A w postaci Δ -9-THC w różnych odmianach konopi metodą chromatografii gazowej do oznaczeń powinny być pobierane rośliny w fazie kwitnienia [20–21].

W przypadku nadesłania do badań młodych roślin wskazane byłoby ich hodowanie do czasu aż osiągną dojrzałość, gdyż wynik oznaczania zawartości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A może nie pozwolić na przeprowadzenie ich klasyfikacji do typu włóknistego lub innego niż włókniste. Postępowanie takie jest jednak bardzo czasochłonne i kosztowne. Jak pokazują natomiast wcześniejsze badania chemotyp konopi pozostaje stały i niezależny od fazy wzrostu oraz płci rośliny, mimo że ilości poszczególnych kannabinoidów ulegają zmianom. W typie narkotycznym Δ -9-THC, a w typie włóknistym CBD zaczynają dominować bardzo wcześnie, bo już w okresie pierwszego miesiąca życia roślin. Dzięki temu już w tym okresie wzrostu możliwe jest określanie chemotypu konopi.

Broséus i współautorzy zaproponowali interesującą metodę dyskryminacji na podstawie badania związków zawartych w liściach młodych roślin metodą chromatografii gazowej z detekcją masową z wykorzystaniem metody wektorów nośnych (Support Vector Machines – SVM) do obróbki uzyskiwanych danych analitycznych. Autorzy przebadali 11 odmian konopi włóknistych dopuszczonych do uprawy przez Szwajcarskie Ministerstwo Rolnictwa (Swiss Federal Office for Agriculture) oraz 13 odmian konopi narkotycznych. Sadzonki były hodowane przez 28 dni, po czym obrywano z nich liście, które suszono w temperaturze pokojowej i homogenizowano. Trzy próbki z każdej odmiany (po 100 mg każda) były ekstrahowane 5 ml heksanu zawierającymi skwalan jako wzorzec wewnętrzny, w ilości 35 mg skwalanu na 100 ml heksanu. Następnie otrzymane ekstrakty poddawano działaniu płuczki ultradźwiękowej przez 15 min, po czym były one wytrząsane na rotatorze przez godzinę i filtrowane. Zastosowano chromatograf Agilent 7890A ze spektrometrem masowym Agilent 5975C, kolumną HP-5 ms długości 30 m, średnicy 0,25 mm oraz filmem o grubości 0,25 μ m. Temperaturę początkową 100°C zwiększano do 260°C z szybkością 10°C/min, a następnie utrzymywano przez 10 min. Objętość nastrzyku 2 μ l, split 1: 20, temperatura dozownika 280°C, temperatura linii transferowej 250°C, temperatura źródła jonów 230°C, temperatura quadrapola 150°C. Chromatogramy rejestrowano w trybie pełnego skanowania w zakresie 30–450 m/z.

Wymienieni wyżej autorzy początkowo wybrali do badań piętnaście różnych związków chemicznych występujących w liściach siewek konopi, spośród których wyselekcjonowali osiem mających największą moc dyskryminacyjną: gwajol, γ -eudesmol, bulnesol, α -bisabolol, THV, CBD, THC, CBN, pozwalającą na rozróżnienie roślin konopi włóknistych od narkotycznych. W odniesieniu do całości badanej grupy roślin wskaźnik fałszywie pozytywnych wskazań wyniósł poniżej 2%. Ponadto w przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że dyskryminacja pomiędzy typem narkotycznym i włóknistym z wykorzystaniem stosunku ilościowego ([THC] + [CBN])/[CBD] rekomendowanego przez UNODC (The United Nations Office on Drugs and Crime) doprowadziła do błędnej klasyfikacji 0,6% roślin typu włóknistego oraz 7,5% roślin typu narkotycznego [20]. Względne stosunki ilościowe Δ -9-THC, CBN i CBD były także wykorzystywane w badaniach dojrzałych roślin konopi przeprowadzonych w Grecji. W badaniach tych wskaźnik błędnej klasyfikacji w zależności od wykorzystywanego indeksu obliczeniowego dochodził nawet do 20% [22].

Ekstrakcja

Metody oznaczania Δ -9-THC, Δ -9-THCA-A jak również innych kannabinoidów wymagają stosowania ekstrakcji, która powinna charakteryzować się wyso-

kim stopniem odzysku oraz właściwą selektywnością i powtarzalnością. Przygotowanie próbki jest niezwykle ważne, gdyż powinno wpływać na zwiększenie czułości i redukcję interferencji pochodzących od matrycy próbki. W literaturze można znaleźć dane dotyczące różnych układów ekstrakcyjnych stosowanych w tym procesie z wykorzystaniem takich rozpuszczalników, jak: metanol, etanol, benzen, eter naftowy [6], cykloheksan [23], n-heksan [6, 22, 24], aceton, toluen [4], chloroform [25–26], chlorek metylenu [26], octan etylu [27], a także mieszanin rozpuszczalników takich jak metanol:chloroform (9:1) [6, 13, 17, 26, 28], n-heksan:octan etylu (9:1) [6], metanol:dichlorometan (9:1) [9], mieszanina heksan:izopropanol (9:1) [10] i inne.

Na uwagę zasługuje fakt, iż zastosowanie niepolarnych rozpuszczalników takich jak n-heksan czy eter naftowy umożliwia przeprowadzenie ilościowej ekstrakcji jedynie neutralnych form kannabinoidów, podczas gdy zastosowanie innych rozpuszczalników i ich mieszanin umożliwia również przeprowadzenie ilościowej ekstrakcji kwasowych form kannabinoidów [13].

Próbki ziela konopi zawierające jedynie kwiaty i liście, które będą poddawane ekstrakcji powinny zostać sproszkowane. Wskazane jest przeprowadzenie tej czynności za pomocą specjalnego młynka o dużej prędkości obrotowej, np. 100 rps, oraz przesianie otrzymanego w ten sposób materiału przez sito o średnicy otworów 1 mm. Przesiewanie zwiększa homogeniczność próbki; można je pominąć, jeśli laboratorium wykaze, że homogeniczność próbek przygotowanych w inny sposób mieści się w zakresie dopuszczalnej tolerancji [13].

Stosowane metody przygotowania próbki wykorzystują wytrząsanie, wytrząsanie z wykorzystaniem płuczki ultradźwiękowej oraz ekstrakcję w aparacie Soksleta [23].

W celu przeprowadzenia badań ilościowych stosuje się często metodę wzorca wewnętrznego. Niektóre związki wykorzystywane w tym celu to 5 α -cholestan [6], dokozan [6, 27], tetrakozan [6, 22], oktakoan [25], nonadekan [29], mCPP [8], Δ -8-THC [10], prazepam [17].

Istotny wpływ na dokładność oznaczeń ma efektywność ekstrakcji. Czynnikiem ten jest szczególnie istotny w przypadku próbek ziela o zbliżonej do ustawowej sumarycznej zawartości Δ -9-THC i THCA-A. Badania dotyczące wpływu efektywności ekstrakcji na wynik oznaczeń zawartości Δ -9-THC przeprowadzili Ankus i Sokołowska-Jabłońska [4]. Oznaczenia przeprowadzone były metodą chromatografii cieczowej na aparacie firmy Waters z detektorem UV typu 486, pompą typu 515 HPLC, autosamplerem typu 717 plus oraz komputerem wykorzystującym oprogramowanie Millennium. W badaniach zastosowano elucję izokratyczną, kolumnę MN Nucleosil 100–5 C18 5 μ m, 4,6 x 250 mm; fazę ruchomą stanowiącą układ ace-

tonitryl:woda:stężony H₃PO₄ (70:30:0,01), temperatura kolumny wynosiła 30°C, przepływ eluenta 1,5 ml/min, długość fali detekcji: 230 nm, objętość nastrzyku 10 μ l. Próbki przygotowywano w następujący sposób: 100 mg próbki ziela ekstrahowano 6 ml mieszaniny metanol:chloroform (9:1) przez 30 min z użyciem wytrząsarki lub przez 15 min z użyciem płuczki ultradźwiękowej. W badaniach stwierdzono, że obie metody mogą być używane zamiennie. W celu sprawdzenia efektywności ekstrakcji w zadanych warunkach, po pobraniu do oznaczania próbki cieczy po I ekstrakcji pozostały ekstrakt usunięto, dodano kolejną taką samą porcję mieszaniny ekstrakcyjnej, a następnie powtórzono całą procedurę ekstrakcji. W ten sposób przygotowano 3 kolejne ekstrakty pochodzące z tej samej próbki. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że dla zastosowanego układu ekstrakcyjnego pojedyncza ekstrakcja jest niewystarczająca do całkowitego oznaczenia Δ -9-THC w próbce ziela. Po pierwszej ekstrakcji w ziele pozostało ok. 8% do 12% pierwotnej zawartości Δ -9-THC. Ilość ta jest istotna przy badaniach ziela o niskiej zawartości Δ -9-THC zbliżonej do ustawowej wartości granicznej. Nieuwzględnienie zawartości Δ -9-THC pozostałej w ziele po pierwszej ekstrakcji może obniżyć rzeczywistą zawartość Δ -9-THC poniżej ustawowej wartości progowej [4]. Jest bardzo prawdopodobne, że sytuacja podobna do tej jaka ma miejsce z przypadkiem Δ -9-THC występuje w przypadku ekstrakcji Δ -9-THCA-A.

Ankus i Sokołowska-Jabłońska zbadali również, jak wpływa przechowywanie ekstraktów na stałość stężeń Δ -9-THC. W tym celu ze świeżo wykonanego ekstraktu pobierano próbkę, w której natychmiast oznaczono zawartość Δ -9-THC, a pozostały ekstrakt pozostawiano szczelnie zamknięty w zaciemnionym miejscu w temperaturze pokojowej na 12 dni. Po tym okresie ekstrakt ponownie badano na zawartość Δ -9-THC. Procedurę tę powtarzano codziennie do 16. dnia od wykonania ekstraktu. Na podstawie otrzymanych danych stwierdzono, że zawartość Δ -9-THC w ekstrakcie z czasem zwiększa się, a zawartość kwasów kannabinolowych maleje. Można wnioskować, że pewna część kwasów przechodzi w Δ -9-THC. Zmiany te nie są liniowe, jednak tendencja ma charakter stały [4].

Wilgotność próbek

Zgodnie z zapisami ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii z 29 lipca 2005 roku (Dz.U. Nr 179, poz. 1485) wynik ilościowego oznaczania sumarycznej zawartości Δ -9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) oraz kwasu Δ -9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) w ziele konopi powinien odnosić się do suchej masy ziela. Z uwagi na możliwość zabezpieczenia do badań świeżego bądź znacznie zawilgoconego surowca roślinnego, ważne jest zwrócenie uwagi na pierwszy etap przygotowania próbek, tj. sposób i czas ich suszenia. Istotna jest odpowiedź na pytanie: czy i w jakich

przypadkach należy uwzględnić poprawkę dotyczącą zawartości wody przy oznaczeniach ilościowych powietrznie suchych naważek próbek konopi przygotowywanych w rutynowy sposób [30].

Termin „sucha masa materiału roślinnego”, jakim są konopie, nie jest wyjaśniony w ustawie. Ponieważ konopie siewne są uprawiane i mają znaczenie gospodarcze jako roślina włóknista, oleista i rolnicza, to można w tym przypadku odnieść się do definicji tego terminu w odpowiednich normach. Obowiązującymi normami w zakresie analiz chemiczno-rolniczych próbek materiału roślinnego z upraw polowych i doświadczeń produkcyjnych, które określają pobieranie i oznaczanie suchej masy, są polskie normy: PN-88/R04012 „Analiza chemiczno-rolnicza roślin – pobieranie próbek” oraz PN-88/R04013 „Analiza chemiczno-rolnicza roślin – oznaczanie powietrznie suchej i suchej masy”. Norma PN-88/R04013 definiuje termin „sucha masa” jako „materiał roślinny doprowadzony do stanu powietrznie suchego, rozdrobniony, przesiany przez sito o boku oczka kwadratowego 1 mm, odpowiednio wymieszany, a następnie wysuszony w suszarce elektrycznej w temperaturze $105 \pm 2^\circ\text{C}$, przez co najmniej 3 h, do uzyskania stałej masy”. W podręcznikach do botaniki stwierdza się ogólnie, że suchą masę roślinną otrzymuje się po pozabawieniu tkanek wody zdolnej do wyparowania w temperaturze 105°C . Innymi słowy sucha masa jest różnicą pomiędzy masą odważki próbki, a masą zawartej wody w tej odważce. Próbkę powietrznie suchą definiuje norma PN-88/R04012. Jest to „próbka materiału roślinnego, wysuszona do stanu powietrznie suchego w sposób naturalny lub sztuczny w temperaturze nie przekraczającej 80°C ”. Taka próbka zawiera jeszcze pewną ilość wody [30].

Materiał roślinny dostarczony do badań może mieć różny stopień wilgotności; mogą to być nawet świeże rośliny. W praktyce bada się rośliny powietrznie suche, które w warunkach pokojowych zostały wysuszone do suchej masy. Tak wysuszone rośliny rozdrabnia się, a następnie wykonuje poszczególne operacje określone w procedurach do wybranej metody analitycznej: wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) lub chromatografii gazowej (GC) [30].

Standardowo dostarczony materiał roślinny wysuszony przy zapewnieniu cyrkulacji powietrza w temperaturze pokojowej przez 2–3 dni do stałej masy zawiera ciągle pewną ilość wody i w niektórych przypadkach może to mieć wpływ na końcowy wynik. Należy zaznaczyć, że w przypadku hodowli roślin konopi odmian typowo narkotycznych sumaryczna zawartość delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) oraz kwasu Δ -9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) znacznie przekracza ustawowy próg i waha się od kilku do nawet kilkunastu procent. Natomiast przy badaniu konopi z upraw krajowych, które mają na ogół gorszą jakość i mniejszą zawartość kannabinoidów niż rośliny rosnące w bardziej sprzyjających

klimatycznie regionach świata, może się zdarzyć, że napotkamy rośliny o zawartości zbliżonej do wartości granicznej określonej w obowiązującej ustawie o przeciwdziałaniu narkomanii. Dlatego w badaniach ilościowych należy zwrócić uwagę na prawidłowe określenie suchej masy zabezpieczonych konopi.

Nieuwzględnienie pewnej ilości wody w wysuszonych powietrznie próbkach może prowadzić, w skrajnych przypadkach, do nieuzasadnionego zaniżania sumarycznej zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) oraz kwasu Δ -9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) poniżej ustawowej granicy 0,20% wagowego. Przy wilgotności materiału roślinnego 5% niekorygowanie tego faktu powoduje, że wynik oznaczenia dla wartości bliskiej ustawowej granicy jest zaniżany o ok. 0,01%. W konsekwencji dla próbek o rzeczywistej zawartości 0,21% wagowego w stosunku do suchej masy ziela konopi oraz wilgotności próbek powyżej 5%, nie uwzględniając odpowiedniej poprawki, uzyskamy wynik poniżej progu 0,20%. Prowadzić to może do zaklasyfikowania konopi niewłóknistych jako włóknistych.

Zawartość wody w świeżych roślinach konopi suszonych przez kilka dni w temperaturze pokojowej lub suszonych w temperaturze 70°C do momentu aż liście staną się kruche wynosi przeciętnie 8–13% wagowych [13]. Suszenie przez dobę w temperaturze 35°C zapewnia uzyskanie próbki, której sucha masa jest zbliżona do 95% [30].

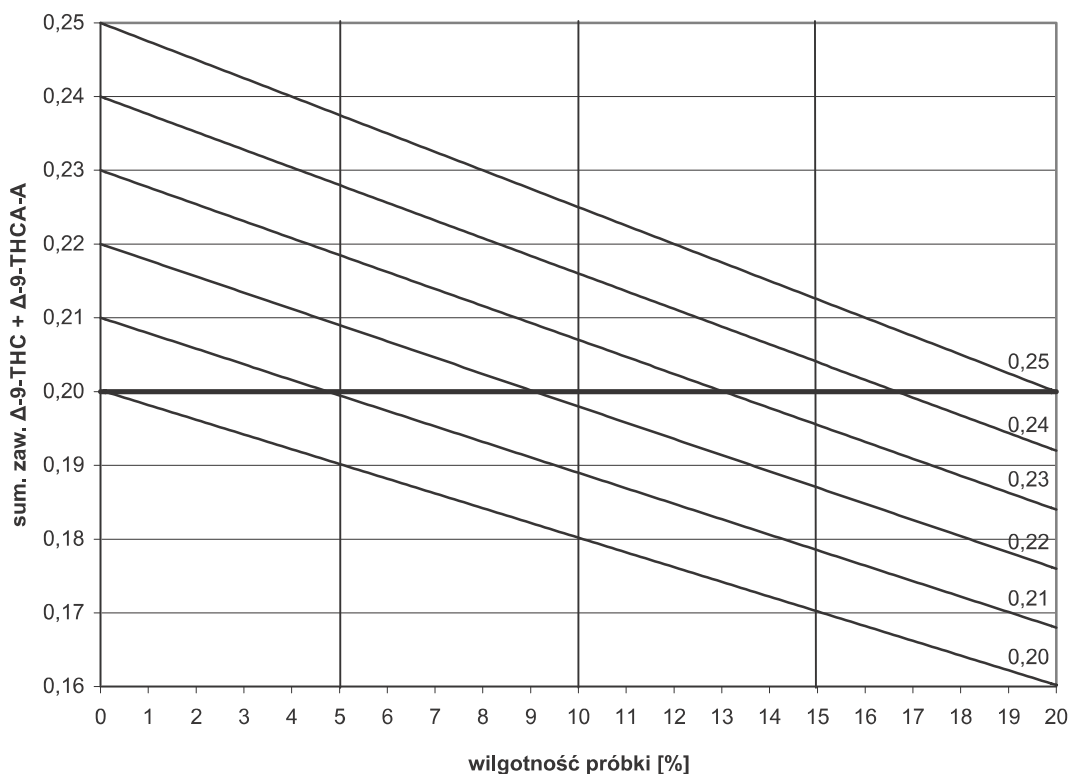
Na podstawie prostego związku pomiędzy sumaryczną zawartością Δ -9-THC i 9-THCA-A (z) oznaczoną w próbce o procentowej wilgotności (w) a sumaryczną zawartością Δ -9-THC i 9-THCA-A w odniesieniu do suchej masy (x)

$$z = \frac{(100 - w)}{100} x$$

możliwe jest sporządzenie diagramu obrazującego wpływ zawartości wody na wyniki oznaczeń sumarycznej zawartości Δ -9-THC i 9-THCA-A w próbkach, w których rzeczywista sumaryczna zawartość Δ -9-THC i 9-THCA-A wynosi odpowiednio 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25%.

W przypadku próbki suszonej przez dobę w temperaturze 35°C , której sucha masa stanowi 95% próbki, gdy otrzymany wynik ma wartość poniżej 0,19%, rzeczywista sumaryczna zawartość Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A nie przekracza wartości ustawowej, a zabezpieczony materiał roślinny to konopie włókniste według ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii. Natomiast przy wynikach równych lub wyższych od 0,20% nie ma wątpliwości, że rzeczywista sumaryczna zawartość Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A jest powyżej ustawowej granicy i nie są to konopie włókniste [30].

W przypadku gdy nadesłane do badań rośliny są suszone przez co najmniej kilka dni w temperaturze pokojowej bez wykorzystywania dodatkowych urządzeń oraz gdy przyjmie się pewien bufor bezpieczeństwa



Ryc. 3. Wpływ zawartości wody na wyniki oznaczeń sumarycznej zawartości Δ -9-THC i 9-THCA-A w próbkach, w których rzeczywista sumaryczna zawartość Δ -9-THC i 9-THCA-A wynosi odpowiednio 0,20; 0,21; 0,22; 0,23; 0,24; 0,25 [30].

stwa określający, że maksymalna zawartość wody w próbkach roślin poddawanych badaniom wynosi 15%, analogiczna wartość graniczna, poniżej której możliwe jest stwierdzenie, że nadesłany do badań materiał stanowią konopie włókniste wynosi 0,17%. Wartość bezpieczna, powyżej której możliwe jest stwierdzenie, że nadesłany do badań materiał stanowi konopie inne niż włókniste wynosi w tym przypadku 0,24%.

Derywatyzacja

Wprowadzenie ekstraktu konopi do dozownika chromatografu gazowego skutkuje dekarboksylacją zachodzącą w porcie nastrzykowym i w konsekwencji jedynie zdekarboksylowane, tj. neutralne formy kannabinoidów mogą być bezpośrednio oznaczane metodą chromatografii gazowej. W celu oznaczenia form kwasowych takich jak Δ -9-THCA-A konieczne jest przeprowadzenie derywatyzacji. Jednakże z uwagi na to, że często celem analiz jest oznaczenie jedynie form neutralnych, istnieje duża liczba doniesień literaturowych dotyczących oznaczeń z wykorzystaniem metod bez przeprowadzania derywatyzacji. Należy przy tym również zaznaczyć, że bardzo trudno jest osiągnąć całkowity stopień derywatyzacji wymagany do przeprowadzania badań ilościowych [6].

Najbardziej powszechne procedury derywatyzacji wykorzystują trimetylosililację z wykorzystaniem różnego rodzaju odczynników wprowadzających grupę

trimetylosililową takich jak: trimetylosilany, trimetylosililaminy, TMS-estry i TMS-amidy takie jak: N,O-bis(trimetylosililo)acetamid (BSA); N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid (BSTFA); N-metyl-N-(trimetylosililo)trifluoroacetamid (MSTFA) i N-metylo-N-(tertbutylo-dimetylosilylo)-trifluoroacetamid (MTBSTFA). Wykorzystywane są również trimetylochlorosilosan (TMCS), trimetylosililimidazol (TMSI), trimetylojedosilan (TMIS) lub octan potasu. Najczęstszymi mieszaninami odczynników derywatyzujących są mieszaniny BSTFA z 1% TMCS lub BSA w środowisku acetonitrylu. Inne metody derywatyzacji obejmują alkilację z takimi reagentami jak np. wodorotlenek tetrabutylamoniowy [4, 6]. Derywatyzacja związków chemicznych o dużej polarności zmniejsza ich polarność, zwiększa lotność i stabilność termiczną. Dobierając odpowiedni odczynnik silylujący, należy brać pod uwagę łatwość przeprowadzenia reakcji derywatyzacji, tworzące się produkty uboczne i cenę odczynników [24].

Trwałość roztworów wzorcowych

Przy prowadzeniu oznaczeń ilościowych w próbkach ziela konopi należy brać pod uwagę trwałość roztworów wzorcowych wykorzystywanych do sporządzania odpowiednich krzywych kalibracyjnych. Badania dotyczące trwałości roztworów wzorcowych Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A prowadzili Zoller i współautorzy [9]. Stwierdzono w nich, że podstawowy roztwór wzorcowy Δ -9-THC w metanolu przechowywany

w temperaturze -20°C jest stabilny przez rok. Rozcieńczony metanolowy roztwór Δ -9-THC wykorzystywany do kalibracji, przechowywany w temperaturze $+5^{\circ}\text{C}$ jest stabilny co najmniej miesiąc, a przechowywany w temperaturze pokojowej w ciemności (np. wewnątrz komory autosamplera) jest stabilny co najmniej przez 5 dni. Delta-9-tetrahydrokannabinol (Δ -9-THC) jest niestabilny w środowisku silnie kwaśnym. W metanolowym roztworze Δ -9-THC o stężeniu $4,6\text{ }\mu\text{g/ml}$ zmieszany w stosunku objętościowym 1:1 z 1,4 M wodnym roztworem kwasu solnego i utrzymywany w temperaturze pokojowej (23°C), już po 5 godzinach stwierdzono rozkład 25% Δ -9-THC. Natomiast bardziej stabilny jest Δ -9-THC w roztworze zasadowym. Po 22 godzinach nie zaobserwowano rozkładu Δ -9-THC w roztworze zawierającym Δ -9-THC o stężeniu $3,1\text{ }\mu\text{g/ml}$ w środowisku $0,62\text{ M}$ metanolowego roztworu wodorotlenku potasu utrzymywany w temperaturze 45°C . W metanolowym roztworze Δ -9-THC o stężeniu $2,6\text{ }\mu\text{g/ml}$ zmieszany w stosunku objętościowym 1:1 z 1,24 M wodnym roztworem wodorotlenku sodowego i utrzymywany w temperaturze 45°C , po 21 godzinach stwierdzono rozkład 9% Δ -9-THC.

W porównaniu z roztworem wzorcowym delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ -9-THC) roztwór wzorcowy kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) charakteryzuje się mniejszą trwałością. Metanolowy roztwór podstawowy tego związku przechowywany w temperaturze -20°C jest stabilny przez co najmniej 3 miesiące. Okres trwałości rozcieńczonego roztworu Δ -9-THCA-A przechowywanego w temperaturze $+5^{\circ}\text{C}$ wynosi dwa tygodnie, natomiast ten sam roztwór przechowywany w temperaturze pokojowej jest trwały przez około 4 dni – rozkład 5% Δ -9-THCA-A następował w okresie 12 dni. W metanolowym roztworze Δ -9-THCA-A o stężeniu $1,0\text{ }\mu\text{g/ml}$ zmieszany w stosunku objętościowym 1:1 z 1,4 M wodnym roztworem kwasu solnego i utrzymywany w temperaturze pokojowej (23°C) po 4 godzinach stwierdzono rozkład 36% Δ -9-THCA-A. W środowisku zasadowym THCA-A ($0,6\text{ }\mu\text{g/ml}$) był bardziej stabilny niż w środowisku kwaśnym, ale mniej stabilny niż w środowisku obojętnym. W roztworze zawierającym Δ -9-THCA-A w środowisku $0,62\text{ M}$ metanolowego roztworu wodorotlenku potasu w temperaturze 45°C zaobserwowano rozkład Δ -9-THCA-A na poziomie 34% po okresie 24 godzin. W roztworze zawierającym Δ -9-THCA-A w metanolu zmieszany w stosunku objętościowym 1:1 z 1,24 M wodnym roztworem wodorotlenku potasu w temperaturze 45°C zaobserwowano rozkład Δ -9-THCA-A na poziomie 34% po okresie 17 godzin [9].

Biorąc pod uwagę postać, w jakiej występują materiały odniesienia, optymalna sytuacja ma miejsce, gdy substancję wzorcową stanowi łatwo dostępna, tania, czysta, substancja krystaliczna o dużej trwałości. Niestety w większości przypadków wzorce Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A występują w postaci roztworów w metanolu

lub etanolu [25]. Natomiast wzorzec Δ -9-THCA-A jest bardziej stabilny w roztworze etanolem niż w postaci krystalicznej [31].

W Niemczech laboratoria przeprowadzające oznaczenia zawartości Δ -9-THC w próbkach ziela konopi już od wielu lat zamiast Δ -9-THC do kalibracji wykorzystują kannabinol (CBN). CBN jest dostępny jako substancja krystaliczna o dużej trwałości oraz wysokiej czystości, którą można łatwo zweryfikować z wykorzystaniem między innymi badań temperatury topnienia. W zorganizowanej w 1997 roku serii badań biegłości, w których udział wzięło ponad 30 europejskich laboratoriów kryminalistycznych, najgorsze wyniki otrzymano właśnie w przypadku oznaczeń Δ -9-THC. Wyniki te charakteryzowały się względnym odchyleniem standardowym na poziomie 29%, podczas gdy w przypadku oznaczeń kokainy i amfetaminy odpowiednie względne odchylenia standardowe były na poziomie 5 i 8%. Otrzymany w badaniach wysoki poziom błędów może być w pewnym stopniu związany również z problemami związanymi z ewentualnym rozkładem Δ -9-THC. Wykorzystanie CBN i/lub CBD jako roztworu wzorcowego w oznaczeniach Δ -9-THC jest możliwe w przypadku oznaczeń przeprowadzanych metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo jonizacyjnym (GC-FID). Warto podkreślić, że rozwiązanie takie jest zalecane przez Biuro Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości (United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC) [13, 25].

Dekarboksylacja kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A)

Oznaczanie kwaśnych form kannabinoidów, do których należy kwas Δ -9-tetrahydrokannabinolowy (Δ -9-THCA-A), wymaga specjalnej uwagi ze względu na zachodzący w podwyższonej temperaturze proces ich dekarboksylacji do odpowiednich form neutralnych. Należy również brać pod uwagę, że ogrzewanie próbek w wysokiej temperaturze na przykład 200°C przez 30 minut powoduje ubytek neutralnych form kannabinoidów poprzez ich odparowanie, nawet jeśli próbki ogrzewane są w szczelnie zamkniętych naczyniach w atmosferze azotu. W roku 1990 Veress i współautorzy badali proces dekarboksylacji kwasów kannabinoidowych zachodzący w otwartych naczyniach laboratoryjnych z zastosowaniem różnych rozpuszczalników chemicznych takich jak: n-heksan, glikol etylenowy, glikol dietylenowy, n-oktanol, ftalan dioktylu, dimetylosulfotlenek. Praca ta dotyczyła określenia wpływu zastosowanej temperatury i czasu ogrzewania próbek oraz rodzaju powierzchni naczynia, na której zachodzi proces dekarboksylacji na jej wydajność. W badaniach uwzględniono takie powierzchnie, jak powierzchnia szklana czy też powierzchnie różnego rodzaju sorbentów. Z przeprowadzonych analiz wyciągnięta została następująca konkluzja: optymalne

warunki dekarboksylacji kwasów kannabinoidowych, w obecności lub nieobecności organicznych rozpuszczalników, zawsze wymagają temperatury, przy której neutralne formy kannabinoidów odparowują. Konsekwencją tego stanu rzeczy jest brak możliwości doprowadzenia konwersji kwasów kannabinoidowych do odpowiadających im ilości neutralnych kannabinoidów poprzez proste ogrzewanie próbki w otwartym reaktorze. Ponadto stwierdzono, że najlepsze warunki dla dekarboksylacji polegają na ogrzewaniu próbki w zamkniętym reaktorze w temperaturze 200°C przez 2 min [6].

Badania kontroli jakości oznaczeń sumarycznej zawartości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A zorganizowane przez Europejską Sieć Nauk Sądowych (ENFSI) oraz Szwajcarskie Towarzystwo Medycyny Sądowej (SGRM/SSML) wykazały, że zapewnienie uzyskiwania zadowalających wyników oznaczeń przez różne laboratoria kryminalistyczne badające próbki konopi w dalszym ciągu wymaga dużego nakładu pracy. Szereg problemów związanych z przeprowadzaniem tych oznaczeń był związany z brakiem odpowiedniego wzorca Δ -9-THCA-A, który dopiero od kilku lat jest dostępny na rynku. W związku z tym laboratoria wykorzystujące do oznaczeń metodę wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przed przeprowadzeniem odpowiednich analiz zmuszone były do przeprowadzenia konwersji Δ -9-THCA-A do Δ -9-THC przez wcześniejsze ogrzewanie próbek w kontrolowanych warunkach [27].

Przeprowadzenie bardziej szczegółowych badań dotyczących procesu konwersji Δ -9-THCA-A do Δ -9-THC stało się możliwe dopiero po opracowaniu przez Dussy'ego i współautorów metody wyodrębniania Δ -9-THCA-A z ziela konopi pozwalającej na otrzymanie miligramowych ilości tego związku. Czystość uzyskanego Δ -9-THCA-A, która została zbadana metodą $^1\text{H-NMR}$, wynosiła około 96%. Główne zanieczyszczenie stanowił kwas kannabinolowy (CBNA) będący utlenioną formą Δ -9-THCA-A. Przeprowadzone przez ww. autorów badania dotyczyły nie tylko zachodzącego w różnych warunkach analitycznych procesu dekarboksylacji Δ -9-THCA-A do Δ -9-THC, ale obejmowały również dekarboksylację zachodzącą podczas symulowanego procesu palenia zienia konopi. Dysponowanie odpowiednią ilością Δ -9-THCA-A pozwoliło na określenie parametrów wpływających na proces dekarboksylacji w linerze detektora chromatografu gazowego (GC) i porównanie ich z dekarboksylacją zachodzącą w szklanym naczyniu. W obu przypadkach stopień dekarboksylacji określano na podstawie badań przeprowadzanych metodami wysoko sprawnej chromatografii cieczowej z detektorem fotodiodowym (HPLC-DAD) i chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID). Po zoptymalizowaniu procedur analitycznych zawartość Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A badano w suchym, świeżym materiale w postaci roślin i kwiatostanów konopi oraz

haszyszu. Liście i kwiaty były mieszane razem, homogenizowane i poddawane analizom. Grube łodygi odrzucano. Badaniom zostały także poddane papierosy z dodatkiem Δ -9-THC i Δ -9-THCA. Badania papierosów miały na celu określenie ilości Δ -9-THC pozostającego po przeprowadzeniu procesu palenia [27].

Analizy metodą chromatografii gazowej przeprowadzano w wykorzystaniu chromatografu Carlo Erba GC8000Top z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) wyposażonym w autosampler CTC Combi PAL. Zastosowano kolumnę kapilarną DB-5MS firmy J&W Scientific długości 15 m, średnicy 0,25 mm i grubości filmu 0,25 μm . Szybkości przepływu helu, wodoru i powietrza wynosiły odpowiednio: 0,76 ml/min, 40 ml/min, 300 ml/min. W celu zwiększenia czułości dodatkowo stosowano azot o szybkości przepływu 30 ml/min jako tzw. make-up gaz. Stosunek podziału strumienia split wynosił 50:1. Zastosowano następujący program temperaturowy: temperatura początkowa 120°C utrzymywana przez 2 min, następnie narost temperatury z szybkością 20°C/min do temperatury 300°C utrzymywanej przez 3 min [27].

Analizy metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej przeprowadzano z wykorzystaniem chromatografu firmy Thermo Finnigan z pompą umożliwiającą mieszanie czterech składników fazy ruchomej (P4000), detektorem fotodiodowym UV6000LP i autosamplem AS3000. Zastosowano kolumnę Allure C-18 firmy Restek o długości 150 mm, średnicy 3,2 mm i grubości ziarna 5 μm . Detektor pracował przy długości fali $\lambda = 228 \text{ nm}$. Zastosowano elucję gradientową ze zmieniającym się liniowo gradientem: (A) bufor w postaci 0,05 mM kwasu octowego (pH 4,75), (B) acetonitryl, (C) metanol. Skład początkowy fazy ruchomej: (A) 13%, (B) 22% (C) 65% utrzymywany był przez 2 min, po czym zwiększano ilość składnika (B) do 35%, zmniejszając jednocześnie udział składnika (A) [27].

W celu sprawdzenia wydajności procesu dekarboksylacji roztwór zawierający 500 μg Δ -9-THCA-A umieszczano w naczyniu gazowym, rozpuszczalnik odparowywano delikatnym strumieniem azotu, naczynie zamykano i umieszczano w piecu chromatografu gazowego ogrzewanego w ustalonej temperaturze przez 15 min. Następnie otrzymane produkty reakcji były rozpuszczane w 500 μl metanolu i analizowane metodą HPLC. Na zamieszczonym w pracy [27] rysunku zbiorczym zawierającym chromatogramy produktów dekarboksylacji uzyskiwanych dla temperatur 120, 140, 160, 180°C, począwszy od temperatury 140°C, na poszczególnych chromatogramach pojawiają się dwa dodatkowe piki pochodzące do kannabinolu i dihydrokannabinolu. Obecność tych pików wskazuje wyraźnie, że proces dekarboksylacji nie zachodzi w sposób ilościowy.

Po przeprowadzeniu badań wstępnych z wykorzystaniem naczynia ogrzewanego w piecu chromatografu Dussy i współaut. przeprowadzili badania z wykorzystaniem próbek konopi. Przygotowanie

próbek do badań polegało na pobraniu 50 do 100 mg produktów konopi (wysuszone świeże rośliny, kwiatostany lub haszysz), które były ekstrahowane za pomocą 2 ml octanu etylu zawierającego 1 mg/ml dokozanu ($C_{22}H_{46}$) jako wzorzec wewnętrzny. Otrzymane ekstrakty poddawano działaniu płuczki ultradźwiękowej przez okres 15 min. Następnie 10 μ l ekstraktu rozcieńczano z dodatkiem 390 μ l octanu etylu i poddawano analizie metodą GC. W przypadku badań metodą HPLC do 10 μ l ekstraktu dodawano 990 μ l metanolu i badano z wykorzystaniem metody wzorca zewnętrznego.

W kolejnym etapie przeprowadzona została optymalizacja oznaczeń sumarycznej zawartości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A w postaci Δ -9-THC metodą chromatografii gazowej z uwzględnieniem rodzaju użytego linera w dozowniku oraz temperatury dozownika. Sprawdzane zostały trzy typy linera:

- liner prosty;
- liner prosty zawierający zbitek silanizowanej waty szklanej;
- liner typu cup-splitter.

Biorąc pod uwagę powtarzalność i stopień konwersji, najkorzystniejsze efekty uzyskano dla linera z silanizowaną watą szklaną. Liner prosty wykazywał się brakiem powtarzalności, podczas gdy liner typu cup-splitter miał nieznacznie niższy stopień konwersji. Ilość waty miała jedynie zanedbywany wpływ na stopień konwersji. Istotne natomiast było, aby była ona ściśnięta, a nie luźno włożona. Maksymalny stopień konwersji wynoszący 67% był osiągany w temperaturze 220°C, dla której uzyskiwano niemierzalną ilość kannabinolu powstającego na skutek dalszego utleniania Δ -9-THC. Wartość ta odpowiada wynikom uzyskiwanym przez Lehmana i Brenneisena.

W kolejnym etapie badań przedstawionych w pracy [27] badano wpływ temperatury konwersji Δ -9-THCA-A dokonywanej bezpośrednio przed analizą wykonywaną metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na wyniki oznaczeń. Autorzy nie podają jednak, w jaki sposób przeprowadzano ogrzewanie, a zwłaszcza, czy było ono przeprowadzane w naczyniach zamkniętych, czy otwartych. Jak wynika z analizy otrzymanych wyników, krzywa konwersji ma maksimum, które przypada na temperaturę 150°C, dla której stopień konwersji wynosi ok. 70%. W wyższej temperaturze Δ -9-THC jest utleniany do kannabinolu. Co ciekawe, suma Δ -9-THC, Δ -9-THCA-A i kannabinolu nie osiąga 100%, co wskazuje na możliwość tworzenia się form polimerycznych. Niezwykle istotny jest to, że przypadku zmiany czasu ekspozycji na działanie temperatury należy ponownie przeprowadzić badania, tak aby znaleźć maksimum konwersji dla nowego czasu ekspozycji. Uzyskany maksymalny stopień konwersji odpowiada wynikom, jakie uzyskane zostały metodą chromatografii gazowej (GC) przy wyborze optymalnego rodzaju linera i zastosowaniu optymalnej temperatury dozownika.

Dla zoptymalizowanych warunków analizy Dussy i współautorzy badali rośliny pochodzące z upraw zamkniętych, kwiatostany oraz haszysz. Po przeprowadzeniu ekstrakcji za pomocą octanu etylu próbki analizowane były metodą GC i HPLC bez przeprowadzania wcześniejszej dekarboksylacji. Zgodnie z oczekiwaniami, w wypadku wszystkich próbek suma zawartości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A zmierzona metodą HPLC była wyższa niż sumaryczna zawartość Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A w postaci Δ -9-THC otrzymana z wykorzystaniem metody GC. Oczekiwana zawartość Δ -9-THC, która powinna zostać otrzymana metodą GC w przypadku całkowitego stopnia dekarboksylacji, była obliczana na podstawie wyników metody HPLC z założeniem, że stopień konwersji wynosi 70% – analizy były przeprowadzane w zoptymalizowanych warunkach, dla których stopień ten został wyznaczony z wykorzystaniem wzorca Δ -9-THCA-A. Korelacja pomiędzy obliczoną i zmierzoną zawartością Δ -9-THC była bardzo dobra w przypadku roślin konopi, gorsza w przypadku kwiatostanów i niezadowolająca w przypadku haszyszu. Wydaje się, że w przypadku wyższych zawartości Δ -9-THCA-A reakcja dekarboksylacji jest preferowana w porównaniu z innymi reakcjami i w ten sposób mierzone są wyższe niż przewidywane zawartości Δ -9-THC. W zastosowanych przez autorów warunkach maksymalny stopień konwersji Δ -9-THCA-A do Δ -9-THC wyniósł 70%. Laboratoria wykorzystujące metodę HPLC do oznaczania w próbce całkowitej zawartości Δ -9-THC traktowanej jako suma oznaczanych osobno zawartości Δ -9-THCA-A i Δ -9-THC najczęściej otrzymują wyższe wyniki niż w przypadku, gdy przeprowadzany jest wcześniejszy proces dekarboksylacji, tak jak ma to miejsce w przypadku metody GC. Rekomendowane jest, aby laboratoria oznaczające sumaryczną zawartość Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A wyznaczyły osiągany w zastosowanych przez nie warunkach stopień konwersji. Każda całkowita zawartość Δ -9-THC oznaczana po przeprowadzeniu procesu dekarboksylacji jest raczej minimalną zawartością niż wartością dokładną [27].

W ślad za badaniami przeprowadzonymi przez Dussy'ego i współautorów poszli Stanaszek i Zuba [8], którzy opracowali i przeprowadzili walidację oraz porównali ze sobą wyniki oznaczania sumarycznej zawartości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A w próbkach ziela konopi otrzymane metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz chromatografii gazowej z detekcją masową (GC-MS).

Sposób przygotowania próbek do badań, który zastosowali Stanaszek i Zuba, polegał na pobraniu 0,5 g wysuszonych próbek ziela i przeprowadzeniu ekstrakcji 5 ml metanolu przez okres 16 godzin. W przypadku metody HPLC zastosowano kolumnę RP-18e Chromolith o długości 100 mm i średnicy ziarna 5 μ m, którą termostatowano w temperaturze 40°C. Analizy prowadzono metodą elucji izokratycznej. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina wody

z dodatkiem 100 μ l kwasu fosforowego na litr (pH = 3) oraz acetonitryl (70:30). Otrzymany ekstrakt był odwirowywany, rozcieńczany 20-krotnie i analizowany metodą HPLC z detektorem fotodiodowym na aparacie HPLC Elite LaChrom L-2000 System (VWR Merck-Hitachi). Przepływ fazy ruchomej wynosił 1 ml/min. Objętość nastrzyku wynosiła 20 μ l. Analiza ilościowa była przeprowadzana przy λ = 210 nm dla Δ -9-THC i λ = 220 nm dla Δ -9-THCA-A. Krzywe kalibracyjne dla Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A były sporządzane w zakresie 0,05% (2,5 μ g/ml) do 2,0% (100 μ g/ml). W przypadku metody GC-MS ekstrakt był rozcieńczany 20-krotnie metanolem po uprzednim dodaniu 10 μ l standardu wewnętrznego mCPP (1000 μ g/ml). Analizy były przeprowadzane na aparacie HP6890 z detektorem masowym (Agilent 5973 Network Quadrupole MSD), dozownik typu split/splitless, którego temperatura wynosiła 250°C. Rozdział składników był przeprowadzany na kolumnie HP-5MS o długości 30 m, średnicy 0,25 mm i grubości filmu 0,25 μ m. Nastrzyki o objętości 1 μ l przeprowadzano w trybie splitless. Gaz nośny stanowił hel, którego szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Zastosowano następujący program temperatury: temperatura początkowa 75°C utrzymywana przez 1 min, następnie narost temperatury z szybkością 25°C/min do temperatury 275°C utrzymywanej przez 9 min. Detektor pracował w zakresie 40–600 m/z. Analiza ilościowa była oparta na intensywności sygnału dla m/z = 299 (Δ -9-THC) i m/z = 154 (wzorec wewnętrzny – mCPP). Krzywa kalibracyjna była sporządzana w zakresie od 0,1% do 0,8%.

W celu porównania metody wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z metodą chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC-MS) oraz ich przydatności w oznaczaniu głównych psychoaktywnych składników konopi Zuba i Stanaszek przeprowadzili, stosując opracowane i zwalidowane wcześniej procedury, równoległe analizy 64 rzeczywistych próbek marihuany. Wyniki oznaczeń Δ -9-THC i Δ -9-THCA uzyskane metodą HPLC zsumowano i porównano z wynikami otrzymanymi metodą GC-MS, badając, jaka zachodzi między nimi korelacja. Stężenia Δ -9-THC wyznaczone metodą GC-MS mieściły się w zakresie 1,6–19,6% (średnia 7,4%) w suchej masie ziela. Stężenia Δ -9-THC wyznaczone metodą HPLC mieściły się w zakresie 0,1–9,6% (średnia 1,0%) w suchej masie ziela. Stężenia Δ -9-THCA-A wyznaczone metodą HPLC mieściły się w zakresie 0,7–13,7% (średnia 7,4%) w suchej masie ziela. Całkowita zawartość Δ -9-THC (suma Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A) wyznaczona metodą HPLC mieściła się w zakresie 0,8–23,0% (średnia 8,4%) w suchej masie ziela.

Porównanie wyników oznaczania zawartości Δ -9-THC w próbkach rzeczywistych uzyskanych obiema metodami wykazało dobrą korelację między nimi (r = 0,93), co wskazuje, że można je stosować do oznaczania całkowitego stężenia tego związku w ziele i innych produktach konopi, np. haszyszu. Równanie

prostej przechodzącej przez punkt (0,0), $y = 0,8581x$ wskazuje, że stężenia otrzymane metodą GC-MS mają średnio wartość ok. 86% wartości stężeń otrzymanych metodą HPLC. Tym samym Zuba i Stanaszek potwierdzili wcześniejsze wnioski dotyczące procesu dekarboksylacji zawarte w pracy Dussy'ego. Zaniżone wartości stężeń Δ -9-THC wyznaczone metodą GC-MS w porównaniu z całkowitym stężeniem Δ -9-THC mogą być związane z niecałkowitym termicznym procesem dekarboksylacji Δ -9-THCA-A do Δ -9-THC. Wynika z tego, że jedynym sposobem dokładnego wyznaczenia całkowitego stężenia Δ -9-THC jest oznaczenie dwóch składników oddzielnie, a następnie ich zsumowanie. Wyznaczenie całkowitej zawartości Δ -9-THC metodami chromatografii gazowej po dekarboksylacji pozwala uzyskać co najwyżej minimalną zawartość Δ -9-THC, a nie dokładne stężenie całkowitego Δ -9-THC. Natomiast wyznaczenie całkowitej zawartości Δ -9-THC stanowi bardzo dokładną miarę określenia potencjalnych psychoaktywnych właściwości badanej próbki ziela konopi lub jego produktów.

Wyniki badań otrzymane przez Dussy'ego i współautorów znalazły swoje odzwierciedlenie w instrukcji Biura Narodów Zjednoczonych ds. Narkotyków i Przestępczości dotyczącej metod analiz konopi i ich produktów [13]. W przypadku oznaczania całkowitej ilości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A w postaci Δ -9-THC rekomendowane jest przeprowadzenie procesu dekarboksylacji przed analizą przez ogrzewanie otrzymanych ekstraktów w otwartych naczyniach w temperaturze 150°C. Po odparowaniu rozpuszczalnika dekarboksylacja zachodzi w przeciągu kilku minut. Niemniej jest zalecane, aby każde laboratorium przeprowadziło walidację tego procesu w warunkach, jakimi dysponuje. Jeśli dekarboksylacja przeprowadzana jest w trakcie analiz, zaobserwowano, że w przypadku niektórych układów chromatograficznych całkowita dekarboksylacja może zachodzić w czasie nastrzyku, podczas gdy w innych, pomimo zastosowania tej samej temperatury, zachodzi ona z gorszą wydajnością. Wysoka temperatura nastrzyku może powodować rozkład Δ -9-THC w linerze dozownika. Z tego powodu wykorzystywany układ chromatograficzny oraz warunki analizy muszą zostać zwalidowane tak, aby zapewniły osiągnięcie całkowitego stopnia dekarboksylacji, nie powodując przy tym rozkładu Δ -9-THC [13].

Wyniki otrzymane przez Dussy'ego i współautorów dla zastosowanych przez nich warunków analitycznych wskazują, że stopień dekarboksylacji kwasu delta-9-tetrahydro-kannabinolowego (Δ -9-THCA-A) zależy od jego stężenia w badanych próbkach konopi. Przy zachowaniu takich samych warunków przygotowania próbki większa zawartość Δ -9-THCA-A w próbce odpowiada większej zawartości tego związku w ekstrakcie, co z kolei przekłada się na większą ilość (Δ -9-THCA-A) dozowanego na kolumnę analityczną. Wydajność dekarboksylacji jest wyższa dla próbek, w których stwierdzano wyższą zawartość Δ -9-THCA-A, czyli pró-

bek, które w nastrzyku zawierały wyższą zawartość Δ -9-THCA-A. W badaniach nad optymalizacją procesu dekarboksylacji autorzy stwierdzili, że maksymalny osiągnięty przez nich stopień konwersji wyniósł 70%. Nie podają oni jednak dla jakiego stężenia czy zawartości przeprowadzany był proces optymalizacji i czy obejmował on badania na jednym, czy wielu poziomach stężeń. Uzyskany przez nich zróżnicowany stopień dekarboksylacji otrzymany dla badanych próbek liczony jako stosunek stężenia Δ -9-THC wyznaczonego metodą GC do sumarycznego stężenia Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A wyznaczonego metodą HPLC, obejmujący zakres od 73 do 90% pozwala przypuszczać, że optymalizacja przeprowadzona została dla jednego poziomu stężenia, gdyż najprawdopodobniej przyjęto założenie wstępne, że stopień dekarboksylacji jest niezależny od stężenia Δ -9-THCA-A. Niestety dopiero wyniki uzyskane w etapie późniejszym pozwoliły stwierdzić, że założenie to nie było słuszne.

Stanaszek i Zuba stwierdzili, że średni stopień konwersji obliczony na podstawie wyników badań 64 próbek rzeczywistych wyniósł 86%. Wydawać by się mogło, że wynik, ten stoi w sprzeczności z wynikiem otrzymanym przez Dussy'ego i współautorów wyznaczonym w badaniach z wykorzystaniem roztworu wzorcowego Δ -9-THCA-A, który to wynik wynosi zaledwie 70%. W rzeczywistości wyniki te są ze sobą jak najbardziej spójne. Należy wziąć pod uwagę różne warunki analityczne, jakie zostały zastosowane przez autorów, a zwłaszcza warunki prowadzenia nastrzyków. Dussy i współautorzy przeprowadzali badania, stosując nastrzyk w trybie split i przyjmując stosunek podziału strumienia 50:1, podczas gdy Stanaszek i Zuba dokonywali nastrzyków w trybie splitless. Dodatkowo należy wziąć pod uwagę różne sposoby przygotowywania próbek do badań. W rezultacie w nastrzykach dokonywanych przez Stanaszka i Zubę najprawdopodobniej znajdowały się stosunkowo duże zawartości Δ -9-THCA-A, dla których stopień konwersji był wysoki. Średni stopień konwersji wyznaczony przez Stanaszka i Zubę (86%) odpowiada wynikom, jakie osiągnęli Dussy i współautorzy w odniesieniu do próbek haszyszu. W przypadku tego typu próbek, które zawierają duże ilości Δ -9-THCA-A, ilość tego związku nastrzykiwana na kolumnę chromatograficzną jest znaczna nawet wówczas, gdy zastosuje się split 50:1. Należy podkreślić, iż Zuba i Stanaszek przeprowadzili walidację opracowanej przez siebie procedury analitycznej z wykorzystaniem metody GC-MS i stwierdzili, że dla zastosowanego przez nich sposobu przygotowania próbki i przyjętych warunków analitycznych krzywa kalibracyjna dla Δ -9-THC jest liniowa w zakresie 0,1–0,8%, co wskazuje, że w zakresie tym proces dekarboksylacji jest niezależny od zawartości Δ -9-THCA-A w próbce.

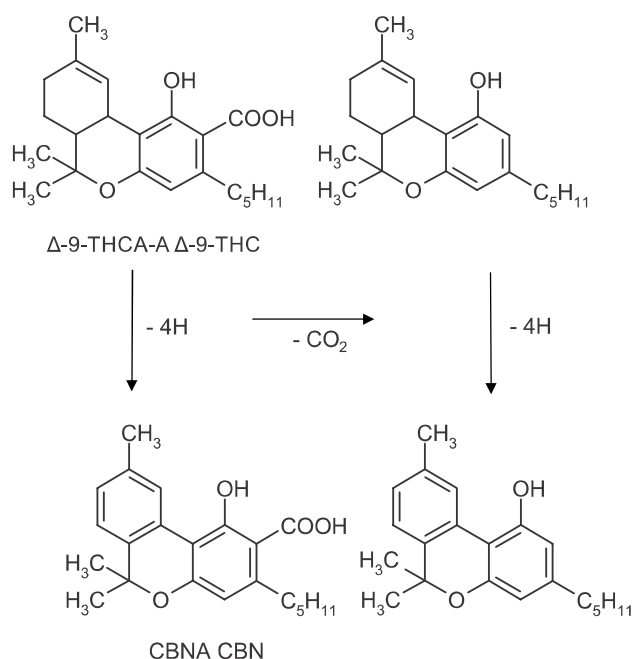
Po szczegółowej analizie prac Dussy'ego i współautorów oraz Stanaszka i Zuby pewne zastrzeżenia na tle innych pozycji literaturowych [9, 17] oraz skrom-

nych doświadczeń własnych autora niniejszej pracy budzi brak jakichkolwiek wzmianek dotyczących rozdziału Δ -9-THC od Δ -8-THC uzyskiwanego metodą chromatografii cieczowej (HPLC). Brak tych informacji jest tu szczególnie zastanawiający w związku z tym, że stosowano dość krótkie kolumny analityczne, na których osiągnięcie zadowalającego stopnia rozdzielności tych dwóch substancji jest trudne.

Na istniejącą zależność dekarboksylacji kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) od stężenia tego związku wskazują również pośrednio wyniki uzyskane przez Ankusa i Sokołowską-Jabłońską w badaniach nad trwałością ekstraktu próbek ziela konopi. W badaniach tych stwierdzono, że zawartość Δ -9-THC w ekstrakcie z czasem zwiększa się, a zawartość kwasów kannabinolowych maleje. Z czego można wnioskować, że pewna część kwasów przechodzi w Δ -9-THC. Zmiany te nie są liniowe, jednak tendencja ma charakter stały [4]. Schemat przemian kwasu Δ -9-THCA-A, jaki przedstawiony został w pracy Ankusa i Sokołowskiej-Jabłońskiej z podaniem wzorów poszczególnych związków przedstawiono na Ryc. 4.

Warunki rozdzielności chromatograficznej

Istotną rolę wpływającą na uzyskiwanie dokładnego wyniku oznaczeń całkowitej zawartości Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A w próbkach ziela konopi lub ich produktów odgrywają warunki rozdzielności chromatograficznej. W przypadku metody chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) lub chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC-MS) na odpowiednich chromatogramach Δ -9-THCA-A nie



Ryc. 4. Schemat przemian kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) [4].

jest rejestrowany, gdyż związek ten ulega dekarboksylacji do Δ -9-THC. W związku z tym, wskazane jest sprawdzenie, czy dla zastosowanych warunków rozdzielania chromatograficznego, pik pochodzący od Δ -9-THC nie nakłada się z pikami pochodzącymi od innych kannabinoidów. Sprawdzenie to należy przeprowadzić z wykorzystaniem kontrolnej mieszaniny roztworów wzorcowych tych związków. Ze względu na duży stopień podobieństwa strukturalnego poszczególnych kannabinoidów charakteryzują się często bardzo zbliżonymi do siebie czasami retencji. Należy także pamiętać, że Δ -9-THC oraz Δ -8-THC mają bardzo podobne do siebie widma masowe różniące się jedynie względną intensywnością sygnału dla poszczególnych jonów, przy czym intensywności te zależą również od rodzaju i wieku wykorzystywanego detektora masowego.

Badania dotyczące rozdzielania poszczególnych kannabinoidów zawartych w próbkach ziela konopi przeprowadzili Stambouli i współautorzy [29]. Zostały one przeprowadzone metodą GC-MS na chromatografie Varian CP-3800 sprzężonym ze spektrometrem masowym Saturn 2200 z pułapką jonową. Chromatograf był wyposażony w autosampler CTC Analytics CombiPAL i dozownik PTV 1079. Rozdział składników przeprowadzono na kolumnie HP-5 o długości 25 m, średnicy 0,2 mm oraz grubości filmu 0,11 μ m. Jako gaz nośny był wykorzystywany hel. Zastosowano następujący program temperaturowy: temperatura początkowa 60°C utrzymywana przez 2 min, następnie narost z szybkością 15°C/min do temperatury 280°C utrzymywanej przez 5 min. Zastosowano tryb nastroju splitless w temperaturze dozownika 270°C. Analizy przeprowadzono w zakresie m/z = 35–500. Temperatura pułapki jonowej wynosiła 180°C, a temperatura linii transferowej 280°C. Na zarejestrowanym chromatogramie Δ -8-THC był eluowany bezpośrednio przed kannabidiolem (CBD). W dalszej kolejności na chromatogramie pojawiały się piki od Δ -9-THC (zarejestrowano piki od obu izomerów geometrycznych cis i trans Δ -9-THC) oraz kannabinolu (CBN). Przy czym ilość Δ -8-THC dla przebadanej próbki była stosunkowo niewielka w porównaniu z ilością Δ -9-THC, CBN i CBD.

W przypadku badań prowadzonych metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej istotny problem może stanowić niski stopień rozdzielania i częściowe zachodzenie na siebie pików chromatograficznych pochodzących do Δ -9-THC i Δ -8-THC. Powoduje to, że w celu wyznaczenia powierzchni pików Δ -9-THC wykorzystywanej do obliczeń ilościowych, istnieje konieczność manualnego rozdzielania pików z wykorzystaniem pionowych linii (*vertical drop line*) umiejscowionych w najniższym punkcie doliny powstającej pomiędzy pikami (*valley point*). Problemy te zostały poruszone przez Zoller i współautorów [9]. Przeprowadzone przez nich badania dotyczyły oznaczania zawartości Δ -9-THC oraz Δ -9-THCA-A w ziele konopi oraz żywności zawierającej jako dodatek produkty

ziela konopi. Do przeprowadzenia analiz zastosowano chromatograf LC-10A Shimadzu składający się z układu pomp LC-10AD, autosamplera SIL10, detektora UV-Vis SPD-10AV, detektora fluorescencyjnego RF-10A, degazera Gastorr (Omnilab, Mettmenstetten, Szwajcaria), modułu sterującego CBM-10A oraz stacji roboczej CLASS-LC10. Rozdział chromatograficzny był przeprowadzany na kolumnie Nucleosil 120-3 C18 o długości 125 mm i średnicy 2 mm (Machery-Nagel, Oensingen, Szwajcaria) przy przepływie 0,2 ml/min, termostатовanej w temperaturze 26°C. Objętość nastroju wynosiła 10 μ l. Rozpuszczalnik A stanowił acetonitryl, rozpuszczalnik B stanowiła woda z dodatkiem 8,6 g 85% kwasu fosforowego na litr roztworu. Zastosowano następujący gradient liniowy: 0 min, 55% A i 45% B; 25 min, 80% A i 20% B, następnie przemywanie kolumny – 26 min 90% A i 10% B; 30 min, 90% A i 10% B; 31 min, 55% A i 45% B, kondycjonowanie kolumny 31–40 min. Δ -9-THC był oznaczany przy długości fali λ = 210, a Δ -9-THCA-A dla długości fali λ = 272 nm. Ponadto przeprowadzono również oznaczenia z wykorzystaniem detektora fluorescencyjnego. Po zhomogenizowaniu próbki ziela o masie 2 g był ekstrahowane 60 ml mieszaniny metanol-dichlorometan (9:1) i poddawane działaniu płuczki ultradźwiękowej przez okres 15 min. Do analizy 1 ml roztworu rozcieńczano metanolem do objętości 10 ml. W analizowanym układzie Δ -9-THC był wymywany przed Δ -8-THC, a zastosowane warunki rozdzielania umożliwiły osiągnięcie rozdzielczości tych związków na poziomie 1. Autorzy zaobserwowali, że skrócenie gradientu oraz praca w warunkach izokratycznych powodowała pogorszenie rozdzielczości i problemy z nakładającymi się pikami. W przypadku oznaczeń prowadzonych metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej sugerowane jest przeprowadzenie wstępnej optymalizacji rozdzielania Δ -9-THC i Δ -8-THC oraz praca w warunkach elucji gradientowej.

W oznaczeniach prowadzonych metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej, problemy związane z osiągnięciem zadowalającego rozdzielania chromatograficznego mogą występować również w wypadku kwasu Δ -9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A). Ponadto dodatkowy problem stanowi również identyfikacja związków eluowanych w czasie retencji zbliżonym do czasu retencji Δ -9-THCA-A. Instrukcja Wydziału do Spraw Narkotyków Organizacji Narodów Zjednoczonych z 1987 roku [28] rekomendowała zastosowanie następującej metody oznaczania Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A w próbkach konopi. Sugerowano wykorzystanie: kolumny C-18 o długości 250 mm i średnicy wewnętrznej 4,6 mm, fazy ruchomej składającej się z 0,02 N roztworu H_2SO_4 i metanolu (20:80), pracę przy przepływie 2,0 ml/min, objętość nastroju 10 μ l, długość fali detekcji (λ) wynoszącą 220 nm lub 254 nm oraz wykorzystanie wzorca wewnętrznego ftalanu di-n-oktylu. Instrukcja ta podaje, że dla dobranych w ten sposób warunków rozdzielania dla czasu

retencji zbliżonego do czasu retencji kwasu Δ -9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) powinno się uzyskać następującą kolejność wymywania kannabinoidów: kannabinochromen (CBC), kwas kannabinolowy (CBNA), kwas Δ -9-tetrahydrokannabinolowy (Δ -9-THCA-A). Jednakże identyfikacja poszczególnych związków jest trudna. Może o tym świadczyć fakt, że w badaniach przeprowadzonych przez Ankusa i Sokołowską-Jabłońską [4] pik pojawiający się w obszarze, w którym wymywany jest Δ -9-THCA-A, został określony ogólnie jako pasmo pochodzące od kwasów kannabinolowych. W badaniach tych zastosowano następujące warunki rozdzielania chromatograficznego: kolumna Nucleosil 1005 C-18 o długości 250 mm, średnicy wewnętrznej 4,6 mm i grubości ziarna wypełnienia 5 μ m, faza ruchoma: acetonitryl:woda:stężony H_3PO_4 (70:30:0,01), temperatura kolumny 30°C, przepływ eluenta: 1,5 ml/min, objętość nastrzyku 10 μ l, długość fali detekcji $\lambda = 230$ nm. Bardzo interesujące są wyniki otrzymane przez Lehmana i Brenneisena (1995) przytoczone w [23]. Do identyfikacji i oznaczeń ilościowych zarówno form neutralnych, jak i form kwaśnych kannabinoidów wykorzystano metodą chromatografii cieczowej z detektorem w postaci matrycy diodowej (HPLC-DAD). W badaniach zastosowano metodę elucji gradientowej. Piki pochodzące od poszczególnych związków identyfikowano z wykorzystaniem roztworów wzorcowych oraz odpowiednich widm kannabinoidów w zakresie nadfioletu (UV). Wykorzystano kolumnę C-18 o długości 200 mm i średnicy wewnętrznej 2,0 mm wraz z odpowiadającą jej prekolumną o długości 20 mm i średnicy ziarna wypełnienia wynoszącej 3 μ m. Na podstawie analizy chromatogramów zamieszczonych w pracy [23] otrzymanych dla trzech podstawowych chemotypów konopi – narkotycznego, mieszanego i włóknistego łatwo zauważyć, że każdy chemotyp charakteryzuje się inną względną zawartością poszczególnych form kannabinoidów eluowanych w czasie retencji zbliżonym do czasu retencji Δ -9-THCA-A. Analizę tę częściowo utrudnia stosunkowo wysokie tło, jakie otrzymano na zarejestrowanych chromatogramach. Mimo to w typie narkotycznym oraz typie włóknistym bezpośrednio przed pikiem od Δ -9-THCA-A pojawia się niewielki pik, który przez autorów nie został zidentyfikowany. Pik ten występuje również w typie mieszanym. Przypuszczalnie pochodzi on od kwasu kannabinolowego (CBNA), na co wskazuje fakt, że związek ten stanowi zanieczyszczenie kwasu (Δ -9-tetrahydrokannabinolowego (Δ -9-THCA-A) ekstrahowanego z ziela konopi i oczyszczanego metodą chromatografii preparatywnej [27]. Ponadto w przypadku chemotypu mieszanego pik pochodzący od Δ -9-THCA-A częściowo nakłada się z pikiem pochodzącym od kannabinochromenu (CBC), który wymywany był przed Δ -9-THCA-A. Kwas (Δ -9-tetrahydrokannabinolowy (Δ -9-THCA-B) był eluowany dla niskich wartości czasu retencji. Jeśli wziąć pod uwagę opisane powyżej problemy związane

z zapewnieniem warunków rozdzielania chromatograficznego umożliwiających otrzymanie czystego piku od Δ -9-THCA-A, wyodrębnionego od pików pochodzących od innych kannabinoidów, zastanawiający wydaje się brak informacji dotyczących otrzymywanych wyników rozdzielania Δ -9-THCA-A w pracach [8,27], zwłaszcza przy uwzględnieniu tego, że autorzy ci mieli do dyspozycji detektory z postaci matrycy diod (DAD) umożliwiające rejestrację chromatogramów dla wielu długości fali jednocześnie.

Dokładne wyznaczenie stężenia Δ -9-THC i Δ -9-THCA-A wymaga zapewnienia optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego, których znalezienie jest procesem żmudnym i często długotrwałym. Jednakże realizacja tego zadania umożliwia oznaczanie pierwotnej zawartości kannabinoidów, które analizowane są bezpośrednio bez konieczności przeprowadzania procesu dekarboksylacji Δ -9-THCA-A. W tym kontekście za niezwykle wartościową należy uznać pracę de Backera i współautorów [17]. Przeprowadzone przez nich badania dotyczyły optymalizacji rozdzielania mieszaniny roztworów wzorcowych składników Δ -9-THC, Δ -8-THC, Δ -9-THCA-A, CBD, CBDA, CBG, CBGA oraz CBN. Zastosowano następujący sposób przygotowania próbek. próbki roślinne po suszeniu przez 24 godziny w temperaturze 35°C, przy zapewnieniu odpowiedniej wentylacji, były homogenizowane poprzez zmielenie. Ze zmielonego materiału sporządzano 200 mg naważki, które ekstrahowano 20 ml mieszaniny metanol/chloroform (9:1), a następnie poddawano wytrząsaniu na rotatorze przez okres 30 min. Otrzymane ekstrakty odfiltrowano i rozcieńczano, a następnie 100 μ l tak przygotowanego ekstraktu odparowywano pod strumieniem azotu i rozpuszczano w 100 μ l mieszaniny woda/metanol (5/5). Analizy przeprowadzano z dodatkiem przepłukania (100 mg/l) jako wzorca wewnętrznego. Badania przeprowadzano na chromatografie Hewlett-Packard (Agilent Technologies, Boblingen, Niemcy), w skład którego wchodziła czterokanałowa pompa G1322A, degazer G1322A serii 1200, autosampler G1313A serii 1100 oraz detektor fotodiodowy Waters 2996 z oprogramowaniem Empower Pro 2.0. Analizy przeprowadzono w zakresie długości fali (λ) 200–400 nm. Rozdział chromatograficzny przeprowadzano na kolumnie Waters XTerra MS C18 o długości 250 mm, średnicy wewnętrznej 2,1 mm i grubości ziarna wypełnienia 5 μ m z odpowiadającą jej prekolumną o długości 10 mm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanol-woda zawierająca 50 mM mrówczanu amonu (pH 5,19). Początkowy skład fazy ruchomej stanowiło 68% metanolu, którego zawartość była stopniowo zwiększana do 90,5% w ciągu 25 min oraz 95% w ciągu kolejnej minuty. Warunki te były utrzymywane przez 3 min, po czym skład fazy ruchomej zmieniał się w czasie 1 min do uzyskania warunków początkowych, w których to warunkach kolumna była kondycjonowana przez 6 min. Całkowity czas ana-

liza wynosił 36 min, przy przepływie fazy ruchomej 0,3 ml/min. Kolumnę termostatowano w temperaturze 30°C. Objętość nastrzyku wynosiła 30 µl. Autorzy przeprowadzili optymalizację warunków oznaczania i walidację opracowanej procedury z wykorzystaniem metody wyznaczania błędu całkowitego (Total Error Approach). Optymalizacja uwzględniała trzy czynniki: procentową zawartość metanolu w początkowym etapie gradientu, pH wodnego składnika fazy ruchomej i czas trwania gradientu potrzebny na osiągnięcie 95% zawartości metanolu w fazie ruchomej. We wnioskach z przeprowadzonych badań stwierdzono, że selektywność rozdzielania kannabinoidów może być modyfikowana poprzez zmianę pH eluenta. Wpływ ten jest szczególnie istotny w przypadku kwaśnych form kannabinoidów. Przez odpowiednią zmianę pH eluenta oraz zmianę szybkości gradientu, dzięki wykorzystaniu metod optymalizacyjnych możliwe było rozdzielenie wszystkich badanych form kannabinoidów. Piki chromatograficzne zachodziły na siebie częściowo jedynie w przypadku obecności 10% CBD i CBG. Opracowana procedura pozwoliła również na uzyskanie całkowitego rozdzielania Δ -9-THC od Δ -8-THC [17]. Wyniki otrzymane przez de Backera i współautorów uznano za obiecujące do tego stopnia, że w maju 2011 roku zdecydowano się na zakup wykorzystywanej przez nich kolumny chromatograficznej w celu jej sprawdzenia i zaadaptowania na potrzeby oznaczeń prowadzonych w Pracowni Fizykochemii Laboratorium Kryminalistycznego Komendy Wojewódzkiej Policji w Rzeszowie.

Uwarunkowania sprzętowe

Prowadzenie oznaczeń z wykorzystaniem nowoczesnego sprzętu ma duży wpływ na jakość uzyskiwanych wyników analitycznych. Wpływ ten jest wyjątkowo wyraźnie zauważalny w odniesieniu do chromatografii cieczowej. Istotne korzyści wynikają w tym przypadku ze stosowania detektora w postaci szeregu diod (DAD), który jest szczególnie przydatny w przypadku słabego rozdzielania otrzymywanych pików chromatograficznych. Wykorzystanie tego detektora umożliwia identyfikację substancji na podstawie widm UV-Vis oraz sprawdzenie, czy nie w pełni rozdzielone piki odpowiadają dwóm różnym związkom chemicznym, czy też jest to wynik przeładowania kolumny chromatograficznej. Nowy kierunek w rozwoju chromatografii cieczowej stanowi obecnie metoda ultrasprawnego chromatografii cieczowej (UPLC), która w badaniach coraz częściej zastępuje metodę wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). W metodzie wysoko sprawnej chromatografii cieczowej wybór średnicy ziarna wypełnienia jest z konieczności wynikiem kompromisu. Im średnica ta jest mniejsza, tym większe ciśnienia wstępne związane z przepływem fazy ruchomej występują w określonym układzie. Ze względu na stosunkowo niskie limity ciśnień robo-

czych w tradycyjnych chromatografach HPLC nie ma możliwości wykorzystywania wypełnień kolumn chromatograficznych o średnicy ziarna 2,1 lub 1,0 mm, które są obecnie powszechnie stosowane w UPLC. Zastosowanie układu UPLC umożliwia nawet dziewięciokrotne skrócenie czasu analizy w porównaniu z tradycyjnym układem z wypełnieniem o średnicy 5 µm oraz trzykrotne w porównaniu z układem o wypełnieniu o średnicy ziaren 3 µm. W przypadku zastosowania tego układu obserwuje się również odpowiednio dziewięciokrotne i trzykrotne zwiększenie ciśnienia wstecznego. Kolumny przystosowane do metody UPLC mają mniejszą średnicę ziarna wypełnienia, mniejsza jest również ich długość i średnica wewnętrzna. Zastosowanie metody UPLC niesie szereg korzyści, do których należą przede wszystkim: zwiększenie szybkości, czułości i rozdzielczości prowadzonych analiz. Skrócenie czasu analizy skutkuje zmniejszeniem zużycia odczynników. Lepsza zdolność rozdzielcza wykorzystywanych kolumn powoduje również oszczędność czasu, jaki trzeba przeznaczyć na optymalizację warunków oznaczania oraz walidację opracowywanych metod analitycznych [32, 33].

Bibliografia

1. Grabowska R., Sokołowska-Jabłońska Z.: Cannabis i jego produkty, „Problemy Kryminalistyki” 1996, nr 214.
2. Krawczyk W.: Trendy w światowej produkcji i obrocie narkotykami, „Problemy Kryminalistyki” 2006, nr 254.
3. Stan Problemu Narkotykowego w Europie – Sprawozdanie Roczne 2010, Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii, www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_120104_PL_EMCCDDA_AR2010_PL.pdf 20.03.2012 r.
4. Anus G., Sokołowska-Jabłońska Z.: Oznaczanie zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu w ziele konopi w policyjnych laboratoriach kryminalistycznych w aspekcie ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii, cz. I, „Problemy Kryminalistyki” 2001, nr 233.
5. Szukalski B.: Kannabinoidy, [w:] Kompendium wiedzy o środkach uzależniających, Wydawnictwo Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.
6. Raharjo T.J., Verpoorte R.: Methods for the Analysis of Cannabinoids in Biological Materials: a Review, „Phytochemical Analysis” 2004, nr 15.
7. Jądrzak R., Biskupski M.: Zastosowanie wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w analizie kannabinoli, „Problemy Kryminalistyki” 1999, nr 224.
8. Stanaszek R., Zuba D.: A comparison of developed and validated chromatographic methods (HPLC, GC-MS) for determination of delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A) in hemp, „Problems of Forensic Sciences” 2007, nr LXXI.
9. Zoller O., Rhyn P., Zimmerli B.: High-performance liquid chromatographic determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, „Journal of Chromatography A” 2000, nr 872.

10. Pellegrini M., Marchei E., Pacifici R., Pichini S.: A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp products by gas chromatography-mass spectrometry, „Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis” 2005, nr 36.
11. Rojek S., Kłys M.: Analysis of Δ^9 -THC and its metabolites: 11-OH- Δ^9 -THC and THC-COOH in blood by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS-MS) and its application to medico-legal investigations, „Problems of Forensic Sciences” 2007, LXX.
12. Kannabinoidy – Ćwiczenia laboratoryjne – teoria, Pracownia Studencka Katedry Analizy Środowiska, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego Wydział Chemii, Gdańsk 2008.
13. Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products – manual for use by national narcotics laboratories, United Nations, New York 2009, www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook.pdf, 20.03.2012 r.
14. Guidelines for representative drug sampling; Drug Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and UNODC, 2009, www.unodc.org/documents/scientific/Drug_Sampling.pdf, 20.03.2012 r.
15. Krawczyk W., Kała M., Gruza E., Błachut D., Tomaszewski W., Perkowska I., Sokołowska-Jabłońska Z., Lechowicz W.: Badania narkotyków, cz. 2, „Problemy Kryminalistyki” 2003, nr 242.
16. Krawczyk W., Kała M., Gruza E., Błachut D., Tomaszewski W., Perkowska I., Sokołowska-Jabłońska Z., Lechowicz W.: Badania narkotyków, cz. 2, „Problemy Kryminalistyki” 2004, nr 243.
17. de Backer B., Debrus B., Lebrun P., Theunis L., Dubois N., Decock L., Verstraete A., Hubert 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, „Journal of Chromatography B” 2009, nr 877.
18. Hazekamp A.: Cannabis, Extracting the medicine, PhD thesis, Wydawnictwo Uniwersytetu w Leiden, Leiden 2007.
19. Ankus G., Sokołowska-Jabłońska Z.: Oznaczanie zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu w ziele konopi w policyjnych laboratoriach kryminalistycznych w aspekcie ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii, cz. 2, „Problemy Kryminalistyki” 2001, nr 234.
20. Brouséus J., Anglada F., Esseiva P.: The differentiation of fibre- and drug type Cannabis seedlings by gas chromatography/mass spectrometry and chemometric tools, „Forensic Science International” 2010, nr 200.
21. Official Journal of the European Communities of 21 February 2002 (L 51/21), Commission Regulation (EC) No. 327/2002, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:051:0014:0022:EN:PDF>, 20.03.2012 r.
22. Stefanidou M., Dona A., Athanasielis S., Papautsis I., Koutselinis A.: The cannabinoids content of marijuana samples seized in Greece and its forensic application, „Forensic Science International” 1998, nr 95.
23. Smith F., Siegel J.A.: Handbook of forensic drug analysis, Wydawnictwo Elsevier, 2005.
24. Pilarska I.: Ilościowe oznaczanie delta-9-tetrahydrokannabinolu w konopiach metodą chromatografii gazowej, „Problemy Kryminalistyki” 2006, nr 236.
25. Poortman-van der Meer A.J., Huizer H.: A contribution to the improvement of accuracy in the quantitation of THC, „Forensic Science International” 1999, nr 101.
26. Lewis R., Ward S., Johnson R., Thorburn D. Burns: Distribution of the principal cannabinoids within bars of compressed cannabis resin, „Analytica Chimica Acta” 2005, nr 538.
27. Dussy F.E., Hamberg C., Lubinbühl M., Schwerzmann T., Brielmann T.: Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in cannabis products, „Forensic Science International” 2005, nr 149.
28. Recommended methods for testing cannabis – manual for use by national narcotics laboratories, United Nations, New York 1987.
29. Stambouli H., El Bouri A., Bellimam M.A., Bouayoun T., el Karni N.: Cultivation of Cannabis sativa L. in northern Morocco, „Bulletin on Narcotics” 2007, nr LVII.
30. Wojtkielewicz W., Frankowski A., Matus A., Dubis E.N.: Wpływ wilgotności próbek ziele konopi na wyniki oznaczeń delta-9-tetrahydrokannabinolu w aspekcie ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii, „Problemy Kryminalistyki” 2003, nr 242.
31. Informacja własna uzyskana z firmy LGC Standards.
32. Nováková L., Matysová L., Solich P.: Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, „Talanta” 2006, nr 68.
33. Ultra Performance LC™ by design, Waters Corporation, 2004, USA, 720000880EN LL&LW-UL, www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=1529244, 20.03.2012 r.