



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΗΣ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
(Δ.Π.Μ.Σ.) «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

**«Προσδιορισμός κανναβινοειδών σε ολικό αίμα με υγρή χρωματογραφία
υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μαζών σε σειρά (UHPLC-
MS/MS)»**

ΜΑΡΙΟΣ ΚΟΝΤΟΓΙΩΡΓΗΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Βασιλική Μπούμπα

Καθηγήτρια Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασιλική Μπούμπα

Καθηγήτρια Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αμβρόσιος Ορφανίδης

Επίκουρος Καθηγητής Τοξικολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ελένη Μπαϊρακτάρη

Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

Στη μνήμη του παππού μου, Δημήτρη

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	Σελ. 5
Abstract.....	Σελ. 6
Ευχαριστίες.....	Σελ. 7
Κατάλογος Εικόνων.....	Σελ. 8
Κατάλογος Πινάκων.....	Σελ. 9

A. Θεωρητικό μέρος

1. Δικαστική Τοξικολογία.....	Σελ. 10
2. Ιστορικά στοιχεία.....	Σελ. 11-12
3. Κανναβινοειδή.....	Σελ. 13-16
4. Φαρμακοκινητική των κανναβινοειδών.....	Σελ. 16-21
i) Απορρόφηση.....	Σελ. 16-18
ii) Διανομή.....	Σελ. 18-19
iii) Μεταβολισμός.....	Σελ. 19-20
iv) Απέκκριση.....	Σελ. 21
5. Ενδοκανναβινοειδές σύστημα.....	Σελ. 21-24
6. Τεχνικές διαχωρισμού.....	Σελ. 24-31
i) Χρωματογραφία.....	Σελ. 24-25
ii) Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC.....	Σελ. 25-27
iii) Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά... Σελ. 27-28	
iv) Φασματομετρία μάζας με τριπλό τετράπολο.....	Σελ. 28-31
v) Υπερύψηλης απόδοσης υγρή χρωματογραφία.....	Σελ. 31
7. Αίμα και συστατικά του αίματος (ολικό αίμα, πλάσμα και ορός).....	Σελ. 31-32
8. Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE).....	Σελ. 33-34

B. Πειραματικό μέρος

1. Χημικά αντιδραστήρια.....	Σελ. 35
2. Οργανολογία.....	Σελ. 35
3. Συσκευές.....	Σελ. 35
4. Υγρή χρωματογραφία.....	Σελ. 36
5. Συνθήκες MS/MS.....	Σελ. 36-40
6. Σκοπός της διπλωματικής εργασίας.....	Σελ. 40
7. Δοκιμές.....	Σελ. 41
8. Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων αίματος με εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE).....	Σελ. 41
9. Παρασκευή λευκών (blank) διαλυμάτων.....	Σελ. 41
10. Προετοιμασία των προτύπων βαθμονόμησης.....	Σελ. 41
11. Επικύρωση της μεθόδου.....	Σελ. 42
12. Ευαισθησία (Sensitivity).....	Σελ. 42
13. Επίδραση του υποστρώματος (Matrix effect).....	Σελ. 42-43
14. Επιμόλυνσης εκ μεταφοράς (Carryover effect).....	Σελ. 43
15. Γραμμικότητα (Linearity).....	Σελ. 43
16. Ακρίβεια (Accuracy).....	Σελ. 43-44

17. Πιστότητα μεθόδου (Precision).....	Σελ. 44
18. Σταθερότητα (Stability).....	Σελ. 44
19. Ανάκτηση (Recovery).....	Σελ. 45
20. Εκλεκτικότητα (Selectivity).....	Σελ. 45

Γ. Αποτελέσματα

1. Δοκιμές.....	Σελ. 46
2. Ευαισθησία (Sensitivity).....	Σελ. 46
3. Επίδραση του υποστρώματος (Matrix effect).....	Σελ. 46
4. Επιμόλυνσης εκ μεταφοράς (Carryover effect).....	Σελ. 47
5. Γραμμικότητα (Linearity).....	Σελ. 47
6. Ακρίβεια (Accuracy).....	Σελ. 47
7. Πιστότητα μεθόδου (Precision).....	Σελ. 48
8. Σταθερότητα (Stability).....	Σελ. 48
9. Ανάκτηση (Recovery).....	Σελ. 49
10. Εκλεκτικότητα (Selectivity).....	Σελ. 49

Δ. Συμπεράσματα-συζήτηση.....	Σελ. 49-50
-------------------------------	------------

Ε. Βιβλιογραφία.....	Σελ. 51-61
----------------------	------------

Περίληψη

Η κάνναβη είναι ένα φυτό που από αρχαιοτάτων χρόνων αξιοποιήθηκε για τη ψυχοτρόπο δράση της και για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες. Στη σημερινή εποχή, τα μέτρα απαγόρευσης κατά της κάνναβης έχουν πλέον χαλαρώσει προκειμένου να διερευνηθούν εκτενέστερα οι πιθανές φαρμακευτικές ιδιότητές της, αλλά με επακόλουθο κίνδυνο την κατάχρηση της ψυχοτρόπου δράσης της, η οποία συχνά αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στο να προκύψουν ατυχήματα ή και παραβατικές συμπεριφορές. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαίο να αναπτυχθεί και να βελτιστοποιηθεί μια ευαίσθητη και εκλεκτική μέθοδος προσδιορισμού κανναβινοειδών. Τα κανναβινοειδή που μελετήθηκαν ήταν η Δ^9 -Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ^9 -THC), η Δ^8 -Τετραϋδροκανναβινόλη (Δ^8 -THC), η Κανναβιδιόλη (CBD), η Κανναβινόλη (CBN), το Τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA-A) και η 11 νορ καρβοξύ Δ^9 Τετραϋδροκανναβινόλη (THC COOH). Για τον προσδιορισμό τους, χρησιμοποιήθηκε ολικό αίμα, ένα από τα πλέον διαδεδομένα βιολογικά δείγματα, το οποίο προκατεργάστηκε με κατάλληλο πρωτόκολλο εκχύλισης υγρού-υγρού (liquid-liquid extraction). Το προϊόν της εκχύλισης αναλύθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μαζών σε σειρά (UHPLC-MS/MS). Η επικύρωση της μεθόδου ολοκληρώθηκε με βάση τις οδηγίες της Αμερικανικής Ακαδημίας Δικαστικής Τοξικολογίας (AAFS- Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019). Το επιθυμητό αποτέλεσμα, το οποίο και επιτεύχθηκε ήταν η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση των κύριων κανναβινοειδών (Δ^9 -THC και CBD) και του κύριου μεταβολίτη της Δ^9 -THC (THC COOH) σε συγκεντρώσεις κάτω από 0,5 ng/mL και των υπόλοιπων κανναβινοειδών σε συγκεντρώσεις κάτω του 1 ng/mL στα πλαίσια των οδηγιών της Αμερικανικής Ακαδημίας Δικαστικής Τοξικολογίας.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κάνναβη, κανναβινοειδή, ολικό αίμα, εκχύλιση υγρού-υγρού, υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μαζών σε σειρά (UHPLC-MS/MS).

Abstract

Cannabis is a plant that has been exploited since ancient times for its psychotropic action and for its medicinal properties. In today's era, the prohibition measures against Cannabis have now been relaxed to investigate more extensively its possible medicinal properties, but with the consequent risk of abuse of its psychotropic action, which is often a decisive factor in the occurrence of accidents or delinquent behaviours. For this reason, it was deemed necessary to develop and optimize a sensitive and selective method that identifies cannabinoids. The cannabinoids studied were D⁹-Tetrahydrocannabinol (D⁹-THC), D⁸-Tetrahydrocannabinol (D⁸-THC), Cannabidiol (CBD), Cannabinol (CBN), Tetrahydrocannabinolic Acid (THCA-A) and 11 nor carboxy D⁹ Tetrahydrocannabinol (THC COOH). For their determination, whole blood, one of the most common biological samples, was used, which was pre-treated with an appropriate liquid-liquid extraction protocol. The product of extraction was analysed with an ultra-high pressure liquid chromatography system coupled with mass spectrometry in series (UHPLC-MS/MS). The validation of the method was completed based on the guidelines of the American Academy of Forensic Toxicology (AAFS- Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019). The desired result, which was achieved, was the detection and quantification of the main cannabinoids (D⁹-THC and CBD) and the main metabolite of D⁹-THC (THC COOH) at concentrations below 0.5 ng/mL and the remaining cannabinoids at concentrations below 1 ng/mL within the guidelines of the American Academy of Forensic Toxicology.

KEY WORDS: Cannabis, cannabinoids, liquid-liquid extraction, ultra-high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry in series (UHPLC-MS/MS)

Ευχαριστίες

Το πειραματικό σκέλος της παρούσας διπλωματικής εργασίας διεξήχθη στο εργαστήριο Ιατροδικαστικής-Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Έχοντας πλέον ολοκληρώσει το πειραματικό σκέλος και τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας θεωρώ ιδιαίτερα σημαντικό να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που μου συμπαραστάθηκαν και συνέβαλαν στην ομαλή πορεία μου κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του μεταπτυχιακού μου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Βασιλική Μπούμπα για την ευκαιρία που μου πρόσφερε στο να γίνω μέλος του εργαστηρίου, να διευρύνω του ορίζοντές μου σε ένα τόσο ενδιαφέρον επιστημονικό πεδίο, καθώς και για όλη την καθοδήγηση και στήριξη που μου πρόσφερε. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κύριο Αμβρόσιο Ορφανίδη για την πολύτιμη βοήθειά του, την άριστη συνεργασία και τον επαγγελματισμό που έδειξε στο εργαστήριο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κυρία Ελένη Μπαϊρακτάρη για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή και το ενδιαφέρον που έδειξε για το θέμα που πραγματευόμουν και τους διοργανωτές του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω και το προσωπικό του εργαστηρίου, τον κύριο Βασίλη Παπαχαρίση και την κυρία Φωτεινή Αλβανοπούλου, για τη συνολική τους βοήθεια και υποστήριξη κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο και τη δημιουργία ενός υγιούς εργαστηριακού περιβάλλοντος. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τη διδάκτορα του εργαστηρίου, την κυρία Δήμητρα Φλώρου για τη βοήθεια, τις εξηγήσεις και την επίλυση των αποριών που είχα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για όλη τη στήριξη που μου παρείχαν και την υπομονή τους και φυσικά τη δυνατότητα που μου έδωσαν στο να ανοίξω νέους ακαδημαϊκούς και επαγγελματικούς ορίζοντες και να επιτύχω έναν ακόμη στόχο.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Τα κυριότερα νομικά γεγονότα αναφορικά με την Κάνναβη από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα μέχρι τις αρχές του 21^{ου} αιώνα. (Σελίδα 12)

Εικόνα 2: Κατηγορίες των ναρκωτικών ουσιών σύμφωνα με Ενιαία Σύμβαση για τα Ναρκωτικά το 1961. (Σελίδα 12)

Εικόνα 3: Η κάνναβη η ήμερη και οι διαφορές ανάμεσα στα κύρια είδη της κάνναβης (Σελίδα 13)

Εικόνα 4: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των κανναβινοειδών στην Κάνναβη την ήμερη και εικόνες της Κάνναβης της ήμερης και των αδενικών τριχωμάτων της. (Σελίδα 15)

Εικόνα 5: Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια της Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης (THC), της κανναβινόλης (CBN), της κανναβιδιόλης (CBD) και της κανναβιγερόλης (CBG) (Σελίδα 16)

Εικόνα 6: Το κύριο μεταβολικό μονοπάτι της Δ^9 -THC. (Σελίδα 20)

Εικόνα 7: Το μονοπάτι βιομετατροπής της CBD από τα ένζυμα CYP και UGT. (Σελίδα 20)

Εικόνα 8: Η αρχή της χρωματογραφίας. (Σελίδα 25)

Εικόνα 9: Διάγραμμα ροής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). (Σελίδα 26)

Εικόνα 10: Σχηματισμός ιόντων κατά τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI). (Σελίδα 29)

Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα ενός τριπλού τετράπολου φασματομέτρου μάζας. (Σελίδα 30)

Εικόνα 12: Απεικόνιση ενός τετράπολου (Σελίδα 31)

Εικόνα 13: Τα βασικά βήματα στην εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) (Σελίδα 33)

Εικόνα 14: Απεικόνιση των παραμέτρων του τριπλού τετράπολου (Σελίδα 38)

Εικόνα 15: Διάγραμμα φασματοσκοπίας μαζών για τα ιόντα-προϊόντα της THC COOH σε θετικό ιονισμό. (Σελίδα 39)

Εικόνα 16: Διάγραμμα φασματοσκοπίας μαζών για τα ιόντα-προϊόντα της THC COOH σε αρνητικό ιονισμό. (Σελίδα 39)

Εικόνα 17: Χρωματογράφημα πρότυπου μεθανολικού διαλύματος (συγκέντρωσης 100 ng/mL) των υπό μελέτη ουσιών και του εσωτερικού προτύπου. (Σελίδα 40)

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: : Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE). (Σελίδα 34)

Πίνακας 2: Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι προμηθευτές. (Σελίδα 35)

Πίνακας 3: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ουσιών από ολικό αίμα, 7,5 λεπτών (Σελίδα 36)

Πίνακας 4: Μητρικά και θυγατρικά ιόντα, χρόνοι συγκράτησης και παράμετροι MS των υπό μελέτη αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου. (Σελίδα 37)

Πίνακας 5: Τα LODs και LOQs για όλα τα υπό μελέτη κανναβινοειδή. (Σελίδα 46)

Πίνακας 6: Τα ποσοστά σε % ανάκτησης του λόγου των δειγμάτων αίματος προς των μεθανολικών δειγμάτων σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλό, μεσαίο και υψηλό). (Σελίδα 46)

Πίνακας 7: Οι εξισώσεις των ευθειών και οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2) για καθένα από τα υπό ανάλυση κανναβινοειδή (Σελίδα 47)

Πίνακας 8: Τα ποσοστά ανάκτησης (%R) για κάθε υπό μελέτη κανναβινοειδές. (Σελίδα 47)

Πίνακας 9: Επαναληψιμότητα εντός της ημέρας (intraday). (Σελίδα 48)

Πίνακας 10: Αναπαραγωγιμότητα αποτελεσμάτων σε διάστημα 5 ημερών (interday). (Σελίδα 48)

Πίνακας 11: Αποτελέσματα σταθερότητας των ενώσεων για 48 ώρες στους 5°C. (Σελίδα 48)

Πίνακας 12: Τα ποσοστά της ανάκτησης (%R) για τις υπό μελέτη ενώσεις. (Σελίδα 49)

A. Θεωρητικό μέρος

1. Δικαστική Τοξικολογία

Η δικαστική τοξικολογία αποτελεί ένα παρακλάδι της εγκληματολογικής επιστήμης και συνίσταται από τη συστηματική συλλογή και ερμηνεία πειστηρίων με σκοπό την επίλυση εγκλημάτων. Ειδικότερα, η δικαστική τοξικολογία είναι μια διεπιστημονική επιστήμη που συνδυάζει τις αρχές της τοξικολογίας, της αναλυτικής χημείας, της κλινικής χημείας, της φαρμακολογίας και της ανατομικής παθολογίας με γνώμονα τη διερεύνηση των αιτιών των θανάσιμων και μη-θανάσιμων δηλητηριάσεων που συνιστούν ένα έγκλημα. Από την πρώτη αναλυτική μέθοδο που αναπτύχθηκε το 1832, η αναλυτική τοξικολογία έχει εξελιχθεί δραστικά προκειμένου να ανταποκριθεί στις νέες προκλήσεις. Η ανάπτυξη μεθόδων διαχωρισμού, όπως η χρωματογραφία, αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα για την αναλυτική εγκληματολογία χάρη στην πολυχρηστικότητά τους.

Στη δικαστική τοξικολογία διενεργούνται μελέτες σε βιολογικά δείγματα πριν και μετά θάνατον. Οι προθανάτιες τοξικολογικές αναλύσεις αφορούν τον αναλυτικό προσδιορισμό ναρκωτικών και δηλητηρίων σε βιολογικές μήτρες (αίμα, ούρα, υαλοειδές υγρό κ.α.) που λαμβάνονται από ζωντανούς ανθρώπους, οι οποίοι ενεργά ή παθητικά, από πρόθεσή ή χωρίς πρόθεση έχουν εκτεθεί στις εν λόγω ουσίες. Οι μεταθανάτιες αναλύσεις δε αξιοποιούνται με σκοπό να αποδείξουν αν μια ναρκωτική ουσία ή ένα δηλητήριο αποτελεί ή δεν αποτελεί αιτία θανάτου. Και στις δύο περιπτώσεις πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα μεταβολικά μονοπάτια των ουσιών που έχουν ληφθεί και οι μετά-θάνατον αλλαγές, κατά την πραγματοποίηση μιας τοξικολογικής ανάλυσης.

Η προκατεργασία του δείγματος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναλυτική χημεία, ιδιαίτερα όταν διερευνώνται πολύπλοκες μήτρες, όπως βιολογικά δείγματα. Οι πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές προκατεργασίας είναι η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Μια καινοτόμα τεχνική προκατεργασίας στη δικαστική τοξικολογία είναι η QuEChERS, (σύμπτυξη των αρχικών: Qu, για τη λέξη «γρήγορος», E για «εύκολος», Ch για «φθηνός» E για «αποτελεσματικός» R για «ανθεκτικός» και S για «ασφαλής» και συνίσταται από διαλύτες, αντιδραστήρια και άλατα για την προκατεργασία μήτρας που περιέχει τις προς μελέτη ουσίες καθώς και ουσίες παρεμβολής.

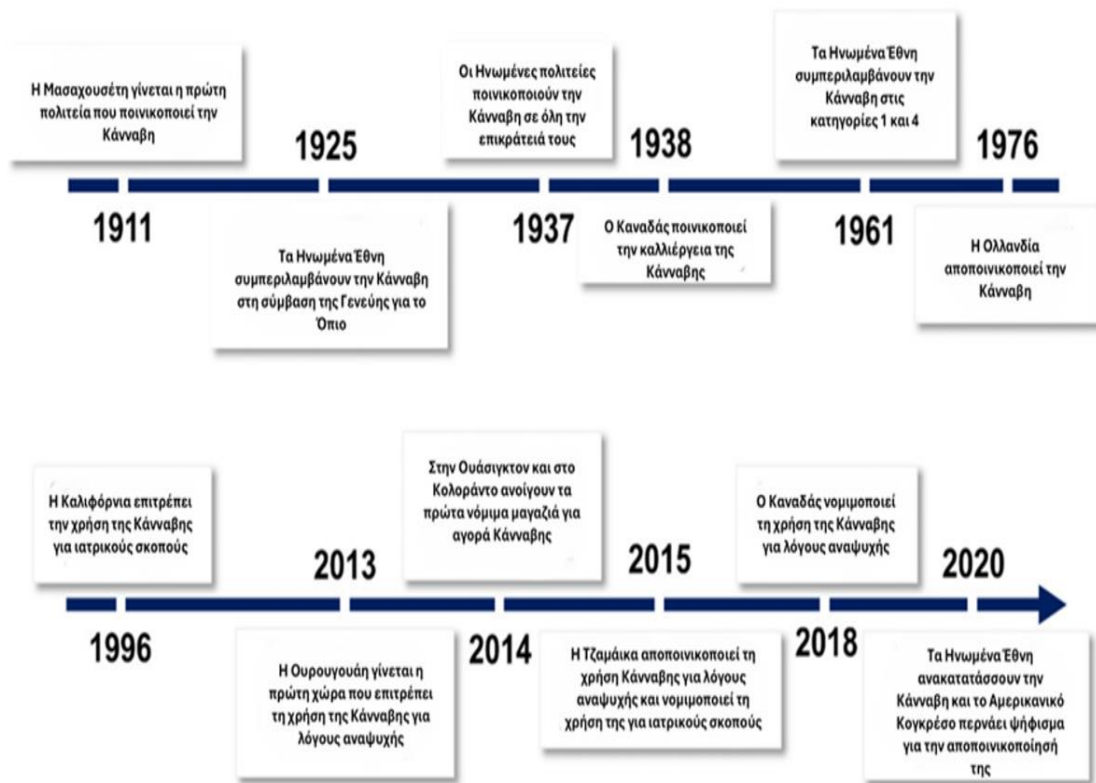
Η πιο συναφής τάξη αναλυτών-στόχων στη δικαστική τοξικολογία είναι τα συνταγογραφημένα φάρμακα, τα ναρκωτικά κατάχρησης, νέες ψυχοδραστικές ουσίες και βιοδείκτες για το αλκοόλ. Ιδιαίτερη προσοχή έχει πέσει στα κατασταλτικά του νευρικού συστήματος, όπως το GHB (γ-Υδροξυβουτυρικό οξύ), στις βενζοδιαζεπίνες και στα Z-φάρμακα. Οι τεχνικές UHPLC- ή HPLC-MS/MS έχουν αποδειχθεί ότι είναι οι πλέον κατάλληλες για την ανίχνευσή τους. Πρόσφατες βελτιώσεις στη φασματομετρία μάζας έχουν οδηγήσει σε καλύτερο επίπεδο ανίχνευσης και γρηγορότερη ανάλυση, χάρη στα πλεονεκτήματα νέων τεχνολογιών, όπως η υψηλής ανάλυσης φασματομετρία μάζας, (HRMS), επιτυγχάνοντας έτσι ακριβείς μετρήσεις μάζας. [1]

2. Ιστορικά στοιχεία

Οι πρώτες ενδείξεις για τη χρήση και την καλλιέργεια της Κάνναβης προέρχονται από την Κίνα κατά το 4000 π.Χ. με τα ευρήματα να επιδεικνύουν ότι το φυτό της Κάνναβης χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή χαρτιού, κλωστών και σχοινιών ενώ έχει αξιοποιηθεί και ως φαγητό και ως φάρμακο [2]. Κατά τον 19^ο αιώνα, λόγω της αποικιοκρατίας σε Ασία και Αφρική, η Κάνναβη επανήλθε στο προσκήνιο από διάφορους ερευνητές, όπως τον Ιρλανδό ιατρό William B. O'Shaughnessy που πρότεινε την ινδική Κάνναβη (μια διαφορετική παραλλαγή του φυτού) για τη θεραπεία του τέτανου και άλλων επιληπτικών κρίσεων και τον Γάλλο ιατρό Jean-Jacques Moreau de Tours που χρησιμοποίησε σκευάσματα της Κάνναβης για την καταπολέμηση ψυχικών ασθενειών [3].

Ωστόσο, στις αρχές του 20^{ου} αιώνα στη διεθνή κοινότητα επικράτησε ένα κλίμα υπέρ της ποινικοποίησης της Κάνναβης, εξαιτίας των ψυχοτρόπων επιδράσεών της και της εκτεταμένης κατάχρησής της ως ναρκωτική ουσία. Αποκορύφωμα αποτέλεσε η 2^η διεθνή σύμβαση για το όπιο που υπογράφηκε στη Χάγη το 1925, η οποία μολονότι δεν επέβαλε απόλυτη απαγόρευση στη χρήση και την εμπορευματοποίηση της Κάνναβης αποτέλεσε σημείο αναφοράς για τον τρόπο που διάφορες χώρες ρύθμιζαν τη νομοθεσία τους σχετικά με την αντιμετώπιση της Κάνναβης. Ως επακόλουθο παράδειγμα, στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής θεσπίστηκε το 1937 νόμος που απαγόρευε τη χρήση της Κάνναβης σε όλες τις πολιτείες της επικράτειάς της. Η παγκόσμια απαγόρευση της Κάνναβης παγιώθηκε το 1961, όταν η Ενιαία Σύμβαση για τα Ναρκωτικά αξιολόγησε την Κάνναβη ως ουσία εξαιρετικά εθιστική, πιθανή στην κατάχρηση και περιορισμένης θεραπευτικής αξίας κατατάσσοντάς την στις κατηγορίες 4 και 1 απαγορεύοντας έτσι οποιαδήποτε χρήση και εμπορευματοποίησή της συμπεριλαμβανομένης της χρήσης της για θεραπευτικούς σκοπούς.

Τις επόμενες δεκαετίες, καλύτερη κατανόηση της χημείας του φυτού της Κάνναβης οδήγησε σε σταδιακή χαλάρωση ή και άρση των μέτρων και των απαγορεύσεων που θεσπίστηκαν σχετικά με την Κάνναβη. Η Ουρουγουάη αποτέλεσε την πρώτη χώρα που νομιμοποίησε τη χρήση της Κάνναβης για ιατρικούς λόγους και για αναψυχή το 2013. Επί του παρόντος η Κάνναβη και τα προϊόντα της παραμένουν υπό περιορισμό στις περισσότερες χώρες, παρόλα αυτά ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας συνέστησε την πιθανή χρήση της Κάνναβης για ιατρικούς σκοπούς. Ως επακόλουθο, το Δεκέμβριο του 2020 η επιτροπή για τα ναρκωτικά των Ηνωμένων Εθνών ανακατέταξε την Κάνναβη αφαιρώντας την από την κατηγορία 4 και κατατάσσοντάς την αποκλειστικά στην κατηγορία 1 θέτοντας έτσι τη βάση για την αναθεώρηση της νομοθεσίας αναφορικά με την χρήση της Κάνναβης. (Εικόνα 1) (Εικόνα 2) [4]



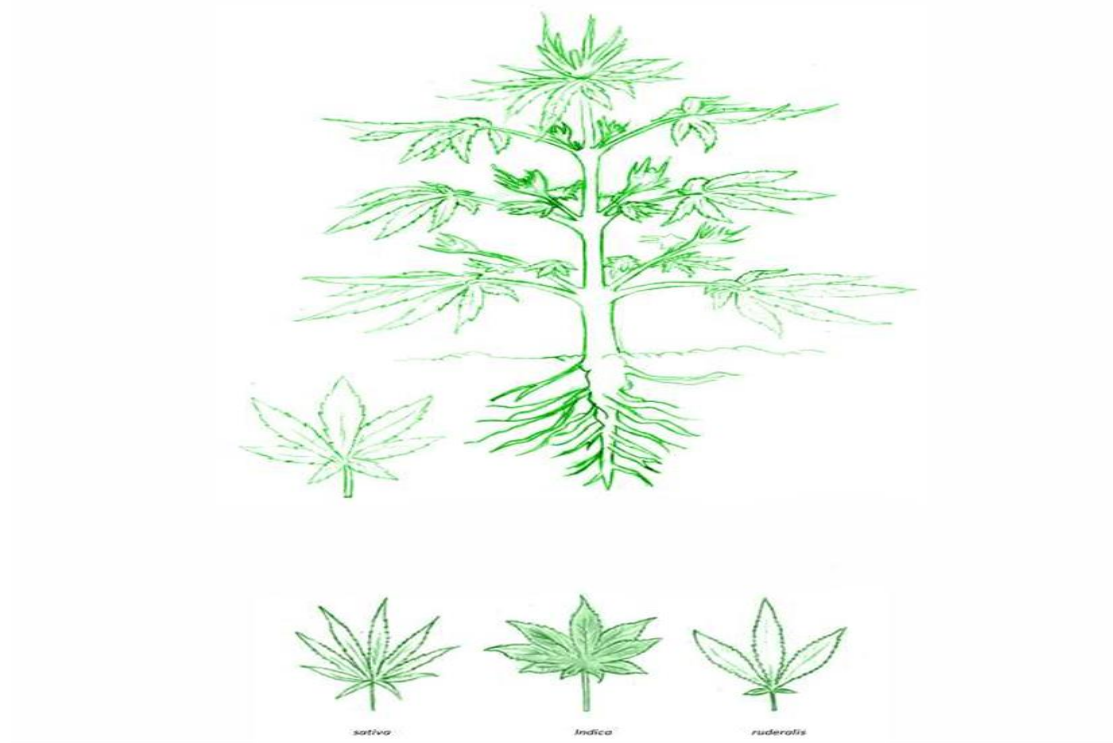
Εικόνα 1: Τα κυριότερα νομικά γεγονότα αναφορικά με την Κάνναβη από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα μέχρι τις αρχές του 21^{ου} αιώνα.[4]



Εικόνα 2: Κατηγορίες των ναρκωτικών ουσιών σύμφωνα με Ενιαία Σύμβαση για τα Ναρκωτικά το 1961.[4]

3. Κανναβινοειδή

Η Κάνναβη ανήκει στο γένος των αγγειόσπερμων της οικογένειας Cannabinaceae και κατηγοριοποιείται ως ένα ετήσιο ποώδες φυτό, τα φύλλα του οποίου είναι λεπτά, μυτερά και οδοντωτά. Υπάρχουν τρία στελέχη της Κάνναβης, η ήμερη (*sativa*), η ινδική (*indica*) και η *ruderalis* (Εικόνα 3). Η Κάνναβη μπορεί να είναι γένους θηλυκού, αρσενικού ενώ πιο σπάνια συναντάται και ως ερμαφρόδιτη [5].



Εικόνα 3: Η Κάνναβη η ήμερη και οι διαφορές ανάμεσα στα κύρια είδη της Κάνναβης [5]

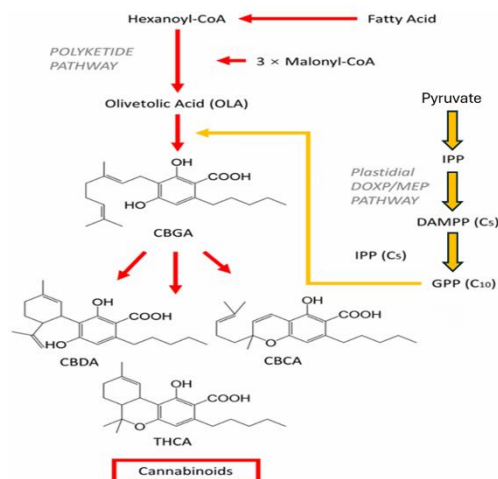
Η Κάνναβη η ήμερη (*Cannabis sativa*), ευρέως γνωστή ως μαριχουάνα, είναι ένα μονοετές, δίοικο, ποώδες φυτό της οικογένειας Cannabinaceae [6]. Αποτελεί ένα φυτό με περίπλοκη χημική σύσταση καθώς περιέχει περισσότερες από 480 ενώσεις που αντιστοιχούν σε πρωτογενείς μεταβολίτες (αμινοξέα, λιπαρά οξέα και στεροειδή), διάφορες τάξεις δευτερογενών μεταβολιτών συμπεριλαμβανομένων των κανναβινοειδών, των φλαβονοειδών και των τερπενοειδών, ενώ έχουν εντοπιστεί και 545 ενώσεις που δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί [7], [8].

Τα κύρια συστατικά των διαφορετικών ειδών της οικογένειας του φυτού της κάνναβης είναι η ψυχοτρόπος ουσία Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη (THC) και η μη ψυχοτρόπος ουσία κανναβιδιόλη (CBD). Στις αρχές τις δεκαετίας το '60 ο Mechoulam και οι συνεργάτες του απομόνωσαν τα κύρια συστατικά της κάνναβης και αποσαφήνισαν τις δομές τους [9]. Σήμερα, περισσότερα από 100 μόρια, δομικά όμοια με τη Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη και την κανναβιδιόλη, έχουν ταυτοποιηθεί και συνιστούν την ομάδα ενώσεων γνωστή ως κανναβινοειδή. Στα κανναβινοειδή υπάγονται (Α) τα φυτοκανναβινοειδή (PCs), τα οποία υπάρχουν φυσικά στα

διαφορετικά είδη των φυτών της κάνναβης, (B) τα ενδοκανναβινοειδή (ECs), ενδογενείς ενώσεις που παράγονται από τους ζωντανούς οργανισμούς και (Γ) τα συνθετικά κανναβινοειδή, ουσίες μιμητικές των κανναβινοειδών που παράγονται εργαστηριακά [10].

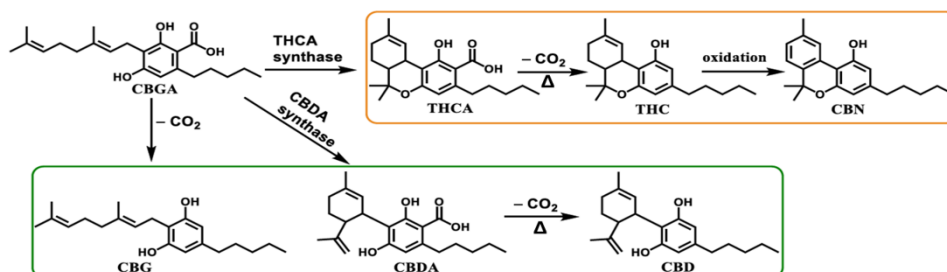
Ως φυτοκανναβινοειδή (ή κοινώς κανναβινοειδή) ορίζονται τα μεροτερπενοειδή με έναν πυρήνα ρεσορκινυλίου που τυπικά συνδέεται με μια παρα- τοποθετημένη πλευρική αλυσίδα ισοπρενυλίου, αλκυλίου ή αραλκυλίου. Η πλευρική αλυσίδα αλκυλίου τυπικά περιέχει έναν περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα, όπου τα ορκινοειδή περιέχουν έναν άνθρακα, τα βαρινοειδή τρία και τα ελαιοτοειδή πέντε. Τα κανναβινοειδή με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα στην πλευρική αλυσίδα είναι γνωστά αλλά σπάνια. Ο όρος κανναβινοειδές αναφέρεται γενικά σε μόρια με χαρακτηριστική χημική δομή. Ωστόσο, ο όρος μπορεί επίσης να αναφέρεται σε φαρμακολογικούς συνδέτες ανθρώπινων ενδοκανναβινοειδών υποδοχέων [11].

Στο φυτό της κάνναβης τα κανναβινοειδή παράγονται και αποθηκεύονται στα εκκριτικά κύτταρα των αδενικών τριχωμάτων που εντοπίζονται στα εναέρια μέρη του φυτού της κάνναβης και είναι ιδιαιτέρως πυκνά στις κορυφές των θηλυκών, δίχως σπόρους, φυτών [12]. Το βιοσυνθετικό τους μονοπάτι (Εικόνα 2) ξεκινά με την παραγωγή δύο πρόδρομων ενώσεών τους, του ελαιολικού οξέος (OLA) και του πυροφωσφορικού γερανυλγερανυλεστέρα (GPP), τα οποία αποτελούν προϊόντα των μονοπατιών των πολυκετιδίων και του DOXP/MEP, αντίστοιχα [13], [14], [15], [16]. Το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) σχηματίζεται μέσω συμπύκνωσης του ελαιολικού οξέος με τον πυροφωσφορικό γερανυλγερανυλεστέρα και μετασχηματίζεται περαιτέρω σε κανναβιδιολικό οξύ (CBDA), Δ⁹-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (Δ9-THCA) και κανναβιχρωμενικό οξύ (CBCA), από τα ένζυμα συνθάση του CBDA [17], συνθάση του Δ9-THCA [18] και τη συνθάση του CBCA [19], αντίστοιχα. Αν ο πυροφωσφορικός γερανυλγερανυλεστέρας (GPP) συμπυκνωθεί με διβαρινικό οξύ, αντί με ελαιολικό οξύ (OLA), τότε παράγεται κανναβιγεροβαρινικό οξύ (CBGVA), το οποίο μπορεί να μετασχηματιστεί σε κανναβιδιβαρινικό οξύ (CBDVA), τετραϋδροκανναβιβαρινικό οξύ (THCVA) και κανναβιχρωμοβαρινικό οξύ (CBCVA), ακολουθώντας παρόμοια βιοσυνθετικά μονοπάτια [7].



Εικόνα 4: Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των κανναβινοειδών στην Κάνναβη την ήμερη (Αριστερά). Εικόνες της Κάνναβης της ήμερης και των αδενικών τριχωμάτων της (Δεξιά). [8], [12]

Οι ουσίες Δ^9 -τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (Δ^9 -THCA) και κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) αποκαρβοξυλιώνονται παρουσία φωτός και υψηλών θερμοκρασιών για να παράξουν τις ενώσεις Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλη (THC ή Δ^9 -THC) και την κανναβιδιόλη (CBD), αντίστοιχα (Εικόνα 5) [20], [21]. Η Δ^8 -τετραϋδροκανναβινόλη (Δ^8 -THC) υπάρχει σε πολύ μικρές ποσότητες στο φυτό της Κάνναβης και δύναται να προκύψει με δύο τρόπους: Πρώτον, να συντεθεί από την κανναβιδιόλη παρουσία ισχυρού οξέος και υψηλής θερμοκρασίας και δεύτερον να προκύψει με ισομερείωση της Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης έπειτα από μεγάλα χρονικά διαστήματα σε αυξημένες θερμοκρασίες στις οποίες ευνοείται ο σχηματισμός της. Η κανναβινόλη (CBN) παράγεται από σταδιακή αποικοδόμηση της Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης, μέσω οξείδωσης, επίσης έπειτα από μεγάλα χρονικά διαστήματα [22], [23]. Τέλος, η κανναβιγερόλη (CBG) παράγεται μέσω αποκαρβοξυλίωσης του κανναβιχρωμενικού οξέος (CBCA) [24]



Εικόνα 5: Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια της Δ⁹- τετραϋδροκανναβινόλης (THC), της κανναβινόλης (CBN), της κανναβιδιόλης (CBD) και της κανναβιγερόλης (CBG) [24]

4. Φαρμακοκινητική των κανναβινοειδών

i. Απορρόφηση

Τα προϊόντα της Κάνναβης, συνήθως, προσλαμβάνονται από τον οργανισμό μέσω της εισπνοής (κάπνισμα τσιγάρου Κάνναβης) ή μέσω της στοματικής κοιλότητας (ως κάψουλες δροναβινόλης, βρώσιμα προϊόντα της Κάνναβης, συνταγογραφημένα φάρμακα ή υγρά). Έχουν μελετηθεί και άλλοι τρόποι χορήγησης για θεραπευτικούς σκοπούς, όπως για παράδειγμα η ορθική οδός (χρήση υπόθετων), διαδερμικά και υπογλώσσια. Άλλες μέθοδοι συμπεριλαμβάνουν τη χρήση σταγόνων για τα μάτια με σκοπό τη μείωση της ενδοφθάλμιας πίεσης και αερολυμάτων ή ατμοποιητών για την αποφυγή των κινδύνων που σχετίζονται με το κάπνισμα. [25]. Ως γενικός κανόνας, η κατανάλωση της κάνναβης μέσω της αναπνευστικής οδού οδηγεί σε υψηλότερα επίπεδα κανναβινοειδών, γρηγορότερη επίδραση και μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα [26].

Οι ενώσεις, Δ⁹-THC, CBD, CBN και αρκετοί από τους κύριους μεταβολίτες τους, συμπεριλαμβανομένου της 11- υδρόξυ- Δ⁹- τετραϋδροκανναβινόλης (11-OH-THC), της 11-νορ-9-καρβόξυ- Δ⁹- τετραϋδροκανναβινόλης (THC-COOH), το 11-νορ-9-καρβόξυ- Δ⁹- τετραϋδροκανναβινολικό γλυκορουνίδιο (THC- COOH-Gluc), την 7-υδρόξυ-κανναβιδιόλη (7-OH-CBD) και την 7-κάρβοξυ-κανναβιδιόλη (CBD-COOH), είναι τα κανναβινοειδή των οποίων η φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική εικόνα έχει μελετηθεί καλύτερα [27].]. Μετά την εισπνοή (για παράδειγμα μετά το κάπνισμα) η απορρόφηση των κανναβινοειδών Δ⁹-THC, CBD και CBN είναι ταχεία, με τη μέγιστη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα (C_{max}) να επιτυγχάνεται σε διάστημα 1,2-30 λεπτών μετά τη χρήση [28] . Μια έρευνα κατέδειξε ότι η συγκέντρωση των κανναβινοειδών THC, 11-OH-THC, THCCOOH και THC-COOH-γλυκουρονίδιο στους χρόνιους χρήστες ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη των περιστασιακών χρηστών, καθώς επίσης και ότι η παρουσία των κανναβινοειδών CBD,CBN και THC-COOH-γλυκουρονίδιο είναι ένδειξη πρόσφατης χρήσης, αλλά η απουσία τους δεν αποκλείει αυτό το ενδεχόμενο [29]. Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι η

βιοδιαθεσιμότητα της Δ^9 -THC σε χρόνιους χρήστες κυμαινόταν στο διάστημα 32-27% σε αντιπαράβολή με το διάστημα 10-14% για τους περιστασιακούς χρήστες και ποικίλει ανάλογα με το βάθος της εισπνοής, τη διάρκεια της ρουφηξιάς και του κρατήματος της αναπνοής [30]. Το ποσοστό της παρατηρούμενης βιοδιαθεσιμότητας της Δ^9 -THC προκύπτει με δεδομένο ότι το 30% της Δ^9 -THC καταστρέφεται μέσω της διεργασίας της πυρόλυσης και έως το 50% συμπαρασύρεται και χάνεται από τον παράπλευρο/μη εισπνεόμενο καπνό [31].

Με την από στόματος χορήγηση, η απορρόφηση των κανναβινοειδών γίνεται αργά και με ασυνέπεια, με αποτέλεσμα οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα να προκύπτουν συνήθως σε διάστημα από 1 έως 2 ωρών [25] από τη χορήγηση και σε ορισμένες περιπτώσεις σε διάστημα 4 έως 6 ωρών [32]. Λόγω της αυξημένης της αστάθειας σε όξινα διαλύματα ($t_{1/2}$ = 1 ώρα σε pH=1.0 (σε θερμοκρασία 55 °C) η Δ^9 -THC αναμένεται ότι αποικοδομείται σε σημαντικό βαθμό από τα υγρά του στομάχου και μετέπειτα στο έντερο [33]. Πληροφορίες σχετικά με την από στόματος χορήγηση της Δ^9 -THC αποκτήθηκαν κυρίως σε μελέτες με τη δροναβινόλη (ή δροναμπινόλη). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από μονές από στόματος χορηγήσεις σημασμένων με ^{14}C δόσεων η Δ^9 -THC φάνηκε ότι απορροφάται σχεδόν εξολοκλήρου (90% έως 95%). Να σημειωθεί όμως, ότι τα δεδομένα αυτά συμπεριέλαβαν και την Δ^9 -THC και τα προϊόντα που προκύπτουν από την αποικοδόμησή της [34]. Οι συγκεντρώσεις των κανναβινοειδών στην κυκλοφορία του αίματος εξαρτώνται από παράγοντες όπως η δόση και το μέσο χορήγησης. Οι Perez-Reyes et al. περιέγραψαν την αποτελεσματικότητα 5 διαφορετικών μέσων για την από στόματος χορήγηση με κάψουλες ζελατίνης [35]. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι το γλυκοχολικό και το σησαμέλαιο βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα της Δ^9 -THC, η οποία ωστόσο έδειξε σημαντική μεταβλητότητα ως προς τις κορυφές των συγκεντρώσεων και το βαθμό απορρόφησης, ακόμα και μεταξύ των ίδιων μέσων χορήγησης του ναρκωτικού. Στη μελέτη των Wall et al. η βιοδιαθεσιμότητα που αναφέρθηκε ήταν στο 10 με 20% [36]. Σε αυτή τη μελέτη στους συμμετέχοντες χορηγήθηκαν 15mg (για τις γυναίκες) και 20mg (για τους άντρες) Δ^9 -THC διαλυμένης σε σησαμέλαιο κλεισμένου μέσα σε κάψουλες ζελατίνης. Οι συγκεντρώσεις της Δ^9 -THC στο πλάσμα κορυφώθηκαν σε διάστημα 4 έως 6 ωρών από τη χορήγηση. Ένα ποσοστό της Δ^9 -THC ραδιοσημάνθηκε με τους ερευνητές ωστόσο να αδυνατούσαν να διαχωρίσουν τη σημασμένη Δ^9 -THC από τους σημασμένους της μεταβολίτες, με αποτέλεσμα η οι συγκεντρώσεις της Δ^9 -THC τελικώς να υπερεκτιμηθούν. Η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα της Δ^9 -THC, έπειτα από την από στόματος χορήγηση των βρώσιμων προϊόντων Κάνναβης εξηγείται από το φαινόμενο πρώτης διέλευσης (ή αλλιώς τον προσυστημικό μεταβολισμό), σύμφωνα με τον οποίο μεγάλη ποσότητα της Δ^9 -THC αρχικά μεταβολίζεται στο συκώτι προτού εισαχθεί στην κυκλοφορία του αίματος και κατ' επέκταση στα σημεία έκφρασης της ψυχοτρόπου δράσης της. Η κατάποση μπισκότου σοκολάτας που περιέχει 20mg Δ^9 -THC [37] και η χορήγηση 10mg δροναβινόλης [25] είχαν ως αποτέλεσμα πολύ χαμηλή συστηματική βιοδιαθεσιμότητα σε ποσοστό $6 \pm 3\%$ (με εύρος 4-12%) [37] και

7±3% (με εύρος 2-14%) [25], αντίστοιχα, με υψηλή μεταβλητότητα ανάλογα με το εκάστοτε άτομο.

Μια μελέτη που διεξήχθη σε λαγούς με Δ⁹-THC περιεχόμενη σε ελαφρύ ορυκτέλαιο προσδιόρισε μια μεταβλητή συστηματική βιοδιαθεσιμότητα της τάξεως των 6–40% με οφθαλμική χορήγηση [38]. Σε αυτή τη μελέτη, οι συγκεντρώσεις της Δ⁹-THC στο πλάσμα κορυφώθηκαν σε διάστημα 1 ώρας και παρέμειναν υψηλές για αρκετές ώρες.

Με την ορθική χορήγηση, η συστηματική βιοδιαθεσιμότητα διέφερε ανάλογα με τα σκευάσματα των υπόθετων. Ανάμεσα στα σκευάσματα που περιείχαν πολικούς εστέρες της Δ⁹-THC σε διάφορες βάσεις υπόθετων, η ημιηλεκτρική THC στο Witepsol H15 έδειξε τη μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα όταν χρησιμοποιήθηκε σε μαϊμούδες και υπολογίστηκε στο 13.5% [39]. Σε μια μικρή κλινική μελέτη η ορθική βιοδιαθεσιμότητα του παραπάνω σκευάσματος βρέθηκε να είναι διπλάσια από την αντίστοιχη από στόματος χορήγηση [40].

ii. Διανομή

Η διανομή της Δ⁹-THC ξεκινά αμέσως μετά την απορρόφηση και με πολύ γρήγορο ρυθμό. Η δέσμευση με πρωτεΐνες του πλάσματος της Δ⁹-THC και των μεταβολιτών της υπολογίζεται περίπου στο 97% [41], [42]. Η Δ⁹-THC προσδένεται κυρίως στις χαμηλή πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL), με περίπου έως 10% της συνολικής ποσότητας να εντοπίζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια [43], ενώ ο μεταβολίτης της η 11-υδροξυ- THC δεσμεύεται πιο ισχυρά με αποτέλεσμα περίπου το 1% να εντοπίζεται στο ελεύθερο κλάσμα [44].

Λόγω της υψηλής λιπιδικής της διαλυτότητας, η Δ⁹-THC έχει υψηλό φαινομενικό όγκο διανομής που είναι περίπου ίσος με 10 L/kg [45]. Επιπρόσθετα, μελέτες που διεξήχθησαν σε ζώα έδειξαν ότι η Δ⁹-THC δεσμεύεται στους λιπώδεις ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου [46], ωστόσο σημαντικά λιγότερο από το 1% της αρχικής χορηγούμενης δόσης φτάνει στον εγκέφαλο [47]. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στην καρδιά και στον λιπώδη ιστό με τα επίπεδα να αγγίζουν δεκαπλάσιες ή χιλιαπλάσιες ποσότητες δεσμευμένης Δ⁹-THC, αντίστοιχα, συγκριτικά με τις ποσότητες που εντοπίζονται στο πλάσμα [45]. Η Δ⁹-THC διασχίζει εύκολα τον αιμοεγκεφαλικό φραγμό και η μικρή καθυστέρηση στη συσχέτιση των κορυφών των συγκεντρώσεων στο πλάσμα και των ψυχοτρόπων επιδράσεων εικάζεται ότι αντανακλά αυτή τη διανομή [48]. Σε μελέτες που διεξήχθησαν σε ζώα φάνηκε ότι ενώ η άμεση διανομή είναι υψηλή στο σκώτι, σε 72 ώρες από τη χορήγηση και μακροπρόθεσμα η σπλήνα και ο λιπώδης ιστός ήταν τα κύρια μέρη αποθήκευσης και δέσμευσης της Δ⁹-THC [49].

Έχουν υπάρξει ανησυχίες σχετικά με τις συνέπειες που δύνανται να προκληθούν από την παρατεταμένη διαμονή της Δ⁹-THC στο λιπώδη ιστό. Ωστόσο, επί του παρόντος δεν υπάρχουν στοιχεία που να καταδεικνύουν ότι τα υπολείμματα της Δ⁹-THC παραμένουν στον εγκέφαλο και ακόμη ότι η απελευθέρωσή τους από τους χώρους αποθήκευσης στην κυκλοφορία του αίματος είναι αρκετά αργή ούτως ώστε η ποσότητα που τελικά φτάνει να δύναται να προκαλέσει αλλαγές στην ψυχολογική

κατάσταση. Παρόλα αυτά, παρατεταμένη και συχνή χρήση προϊόντων που περιέχουν Δ⁹-THC οδηγεί σε σταδιακή συσσώρευση του εν λόγω κανναβινοειδούς [50].

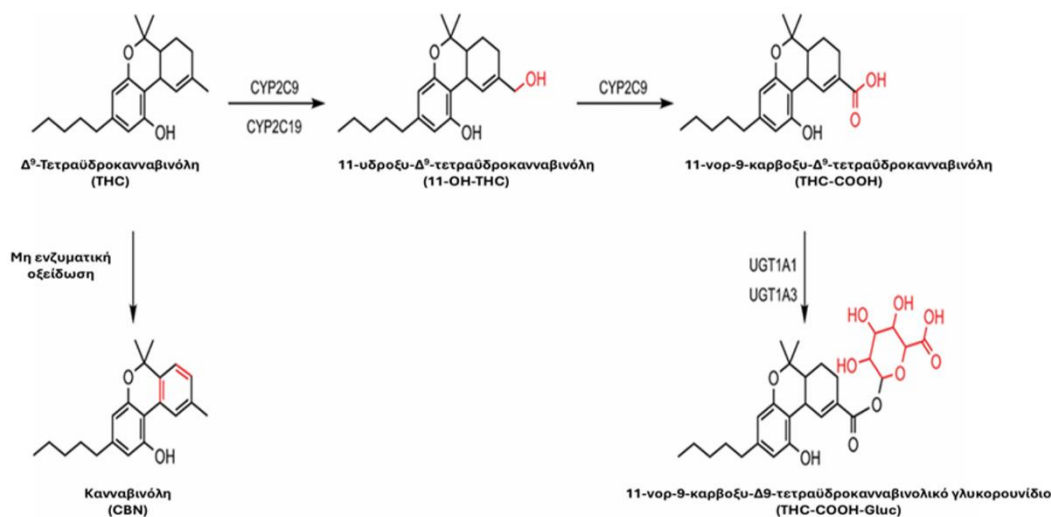
iii. Μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός των κανναβινοειδών διενεργείται κυρίως μέσω μηχανισμών στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στον εγκέφαλο, στο λεπτό έντερο και στους πνεύμονες [25], [51]. Τα δύο κύρια κανναβινοειδή, η Δ⁹-THC και η CBD, υποβάλλονται σε υδροξυλίωση ή οξείδωση από το κυτόχρωμα P450 (η αλλιώς τα CYP450 ένζυμα), ακολουθούμενα από γλυκουρονιδίωση μέσω των ενζύμων UDP-γλυκουρονοσυλτρανσφεράση (UGT) και απέκκριση μέσω ούρων, χολής ή κοπράνων (εικόνες 7 και 8). Μετά την κατανάλωση, η THC υδροξυλιώνεται μέσω των ενζύμων CYPs 2C9 και 2C19 προς το ενεργό μεταβολίτη 11-OH-THC [52], [53], [54] (Εικόνα 6).

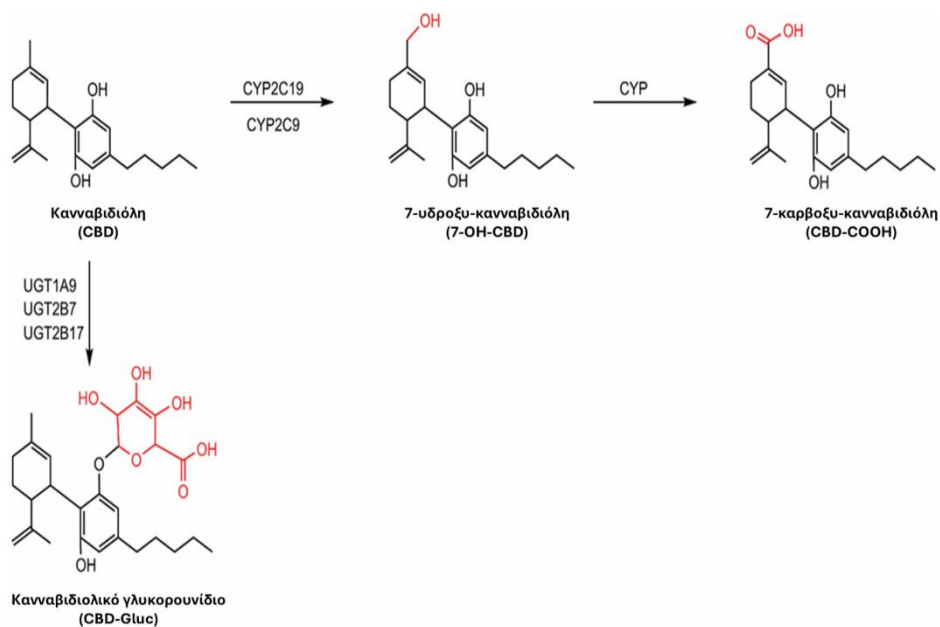
Περαιτέρω υδροξυλίωση της 11-OH-THC από τα ένζυμα CYP2C9 έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του ανενεργού μεταβολίτη THC-COOH, ο οποίος δεν αλληλεπιδρά με τον CB1 υποδοχέα [55], αλλά είναι ένας χρήσιμος βιοδείκτης που υποδηλώνει την πρόσφατη χρήση κάνναβης [56], [57]. Ο σχηματισμός της THC-COOH από την 11-OH-THC μπορεί να μεσολαβήσει από την αλκοολική αφυδρογονάση ή την οξυγενάση της αλδεϋδης [58]. Οι μεταβολίτες 11-OH-THC και THC-COOH υποβάλλονται επίσης στη φάση 2 του μεταβολισμού από τα ένζυμα UGT [59], με την THC-COOH να μεταβολίζεται μέσω των ενζύμων UGTs 1A1 και A3 προς παραγωγή THC-COOH-Gluc, του κύριου μεταβολίτη της THC στα ούρα [55], [59] και του γλυκουρονιδιωμένου 11-OH-THC παραγόμενου από τα UGTs 1A9 και 1A10 [59].

Η κανναβινόλη (CBN), ένα κανναβινοειδές που προκύπτει από τη μη ενζυματική οξείδωση της THC, εντοπίζεται συνήθως στα προϊόντα της κάνναβης έπειτα από παρατεταμένη αποθήκευσή τους και ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες. Λόγω του γεγονότος ότι η CBN έχει ένα επιπλέον αρωματικό δακτύλιο, μεταβολίζεται σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με την THC [52], [55], [60]. Μετά την από στόματος κατανάλωση, η CBN μεταβολίζεται κυρίως προς τον κύριο ενεργό μεταβολίτη της, την 11- υδροξυ – CBN και ένα δευτερεύων μεταβολίτη της, την 8- υδροξυ-CBN μέσω υδροξυλίωσης καταλυόμενης από τα ένζυμα CYPs 2C9 και 3A4, αντίστοιχα [52]. Η CBN, μπορεί ακόμη να υποβληθεί σε απευθείας γλυκουρονιδίωση από τα ηπατικά και τα εξωηπατικά ένζυμα, όπως τα UGTs 1A9, 1A7, 1A8, και 1A10 [59].

Η CBD ακολουθεί το ίδιο μεταβολικό μονοπάτι με την THC και υποβάλλεται κυρίως σε ηπατικό μεταβολισμό από τα ένζυμα CYP και UGT (εικόνα 7). Η CBD μεταβολίζεται μέσω των ενζύμων CYPs 2C19, και 2C9 προς έναν ενεργό μεταβολίτη της, την 7-OH-CBD, η οποία μεταβολίζεται περαιτέρω προς τον ανενεργό μεταβολίτη της, την CBD-COOH [55], [61]. Όπως, η CBN έτσι και η CBD μπορεί ακόμη να υποβληθεί σε απευθείας γλυκουρονιδίωση μέσω των ενζύμων UGTs 1A9, 2B7 και 2B17 [59].



Εικόνα 6: Το κύριο μεταβολικό μονοπάτι της Δ^9 -THC. Συντομογραφίες: CYP: Κυτόχρωμα P450, UGT: UDP-γλυκορουνοσυλτρανσφεράση.



Εικόνα 7: Το μονοπάτι βιομετατροπής της CBD από τα ένζυμα CYP και UGT. Τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό της 7-OH-CBD είναι επί του παρόντος άγνωστα. Συντομογραφίες: CYP: Κυτόχρωμα P450, UGT: UDP-γλυκορουνοσυλτρανσφεράση.

iv. Απέκκριση

Η THC απεκκρίνεται κυρίως μέσω των κοπράνων (περίπου το 65%) και τα ούρα (20%) [62]. Τα ούρα περιέχουν κυρίως όξινους μεταβολίτες, όπως την THC-COOH [63]. Αντίθετα, οι μεταβολίτες που εντοπίζονται στα κόπρανα είναι ουδέτεροι ή όξινοι, με την 11-OH-THC (21%) και την THC-COOH (28%) να είναι οι πιο κοινοί συγκριτικά με τους υπόλοιπους μεταβολίτες [56], [64]. Η THC είναι μια ιδιαίτερα λιποδιαλυτή ένωση και υποβάλλεται σε μεγάλο βαθμό σε σωληναριακή επαναρρόφηση στους νεφρούς, με τελικό αποτέλεσμα να εντοπίζονται χαμηλά επίπεδα της THC στα ούρα [25]. Οι τρόποι κατανάλωσης της κάνναβης δεν φαίνεται να έχουν επίδραση στην απέκκριση δεδομένου ότι η THC και οι μεταβολίτες της απεκκρίνονται μέσω κοπράνων και ούρων, έπειτα από την από στόματος κατανάλωση καθώς και μέσω της εισπνοής.

Υπάρχει μια μεταβλητότητα στις εκτιμώμενες μετρήσεις των χρόνων ημιζωής των THC και CBD σε διαφορετικές μελέτες [27], [65]. Βάση ενός μοντέλου πληθυσμιακής φαρμακοκινητικής ανάλυσης, η THC έδειξε να έχει μικρό αρχικό χρόνο ημιζωής (περίπου 6 λεπτά) ακολουθούμενη από έναν τελικό χρόνο ημιζωής των 22 ωρών [66], [67]. Στους συχνούς χρήστες εκτιμώνται μεγαλύτεροι χρόνοι ημιζωής (>24 ώρες), πιθανότατα λόγω της αργής αναδιανομής από το λιπώδη ιστό [66], [68], [69]. Ο χρόνος ημιζωής για την απέκκριση μέσω ούρων της THC-COOH για τους περιστασιακούς χρήστες είναι 1,3 ημέρες, ενώ για τους συχνούς χρήστες είναι 5-13 ημέρες [30], [70]. Η μέση κάθαρση του πλάσματος βρέθηκε να είναι υψηλότερη στους άντρες (14.9 ± 3.7 L/hour) σε σύγκριση με τις γυναίκες (11.8 ± 3.0 L/hour), υποδηλώνοντας μια πιθανή διαφορά σε σχέση με το φύλο στην κάθαρση της THC από τον οργανισμό [71].

Εν αντιθέσει με την THC η πλειονότητα της ποσότητας της CBD βρέθηκε ότι αποβάλλεται αναλλοίωτη μέσω των κοπράνων (33%) και ως αναλλοίωτη ή γλυκορουνιδωμένη μέσω των ούρων [72], [73]. Η CBD βρέθηκε να έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής, μεταξύ 18 έως 32 ωρών μετά το κάπνισμα [65], [74], [75]. Χρόνια χορήγηση μέσω στόματος της CBD επιδεικνύει χρόνο ημιζωής 2 έως 5 ημερών [76].

5. Ενδοκανναβινοειδές σύστημα

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (ECS) αντιπροσωπεύει ένα περίπλοκο δίκτυο σηματοδότησης αποτελούμενο από τα ενδοκανναβινοειδή (ενδογενείς ενώσεις προερχόμενες από μακριές αλυσίδες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων), τους υποδοχείς των κανναβινοειδών (CB υποδοχείς, σημεία πρόσδεσης των ενδοκανναβινοειδών) και ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση και την αποικοδόμηση των ενδοκανναβινοειδών. Όλα αυτά τα συστατικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση διαφόρων παθοφυσιολογικών διεργασιών στο σώμα [77], [78]. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα προσδιορίστηκε αρχικά ως ένα δίκτυο νευρώνων μέσω του οποίου η ουσία με την ψυχοτρόπο δράση, η Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ⁹-THC), επιδρά στις φυσιολογικές διεργασίες και στη συμπεριφορά. Το 1988 οι Devane et al. ήταν οι πρώτοι που προσδιόρισαν και χαρακτήρισαν φαρμακολογικά τον υποδοχέα των κανναβινοειδών 1 (CB1 υποδοχέας) στον εγκέφαλο του αρουραίου [79]. Για την

καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της ψυχοτρόπου δράσης της Κάνναβης, οι Matsuda et al. ανέφεραν την κλωνοποίηση και έκφραση του συμπληρωματικού DNA που κωδικοποιεί έναν υποδοχέα συζευγμένο με πρωτεΐνη G (GPCR) που ανταποκρίνεται στα ενεργά συστατικά που βρίσκονται στην Κάνναβη μέσα στον εγκέφαλο των αρουραίων [80]. Αυτή η ανακάλυψη συνοδεύτηκε γρήγορα από τον προσδιορισμό του υποδοχέα των κανναβινοειδών 2 (CB2 υποδοχέας), το 1993, ο οποίος σε αντίθεση με τον υποδοχέα των κανναβινοειδών 1 εντοπίζονταν στη σπλήνα του αρουραίου [81]. Πρόσφατα ευρήματα υποδεικνύουν ότι ο υποδοχέας των κανναβινοειδών 1 εκφράζεται σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος (CNS) [82] και εντοπίζεται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στον προμετωπιαίο φλοιό (PFC), στα βασικά γάγγλια, στον ιππόκαμπο και στην παρεγκεφαλίτιδα. Σε μέτριες έως χαμηλές συγκεντρώσεις εντοπίζεται στο περιυδραγωγικό γκρι, στην αμυγδαλή, στον επικλινή πυρήνα (NAc) και στο θάλαμο. Εντός αυτών των περιοχών, δύο κύριοι νευρωνικοί υποπληθυσμοί εκφράζουν τους υποδοχείς των κανναβινοειδών 1: Οι GABAergic ενδιάμεσοι νευρώνες, οι οποίοι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα των υποδοχέων των κανναβινοειδών 1 και των γλουταμινεργικών νευρώνες, οι οποίοι παρουσιάζουν σχετικά μικρά επίπεδα αυτού του υποδοχέα [83], [84]. Επιπλέον, οι υποδοχείς των κανναβινοειδών 1 εντοπίζονται στον υπομέλανα τόπο και στο ραχιαίο πυρήνα της ραφής, τα οποία αποτελούν τις κύριες πηγές νοραδρεναλίνης και σεροτονίνης στον εγκέφαλο [85], [86]. Οι υποδοχείς αυτοί μπορούν ακόμη να βρεθούν σε μη νευρικά κύτταρα μέσα στον εγκέφαλο, όπως τα ολιγοδενδροκύτταρα, τα μικρογλοία και τα αστροκύτταρα [87], [88], [89]. Ο υποδοχέας των κανναβινοειδών 1 εκφράζεται και σε διάφορους άλλους ιστούς, όπως του συκωτιού, του αναπαραγωγικού συστήματος, του γαστρεντερικού σωλήνα, του σκελετικού μυ, του καρδιαγγειακού, του αγγειακού και του λιπώδη [90], [91], [92]. Ο υποδοχέας των κανναβινοειδών 2 προσδιορίστηκε αρχικώς ως ένας υποδοχέας του περιφερικού νευρικού συστήματος που σχετίζεται κυρίως με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και πλέον είναι γνωστό ότι εκφράζεται σε όλο το κεντρικό νευρικό σύστημα. Σε έναν υγιή εγκέφαλο, ο υποδοχέας των κανναβινοειδών 2 εντοπίζεται σε μικρές ποσότητες στα μικρογλοία και στα αστροκύτταρα. Ωστόσο, σε παθολογικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένων εγκεφαλικών βλαβών, εγκεφαλικού και νευροεκφυλιστικών ασθενειών, η έκφραση του υποδοχέα των κανναβινοειδών 2 ρυθμίζεται ανοδικά [93], [94]. Πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι ο υποδοχέας των κανναβινοειδών 2 υπάρχει και στον ιππόκαμπο, το ραβδωτό σώμα και το θάλαμο [95], [96], [97], καθώς επίσης και στο σώμα των ντοπαμινεργικών νευρώνων στην κοιλιακή καλυπτρική περιοχή (VTA) [98].

Ο επιτυχημένος προσδιορισμός και η κλωνοποίηση του υποδοχέα των κανναβινοειδών 1 διευκόλυνε την ανακάλυψη του πρώτου του ενδογενή αγωνιστή, της ανανδαμίδης (N-αραχιδονυλαιθανολαμίνη, AEA), το 1992 [99]. Μετέπειτα, η ικανότητα της ανανδαμίδης να μιμείται πλήρως την ψυχοτρόπο δράση της Δ^9 -τετραϋδροκανναβινόλης, οδήγησε στην ανακάλυψη και τον προσδιορισμό ενός άλλου σημαντικού ενδογενούς κανναβινοειδούς, της 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλης (2-AG) [100], [101]. Από φαρμακολογικής σκοπιάς, η ανανδαμίδα χαρακτηρίζεται ως ένας υψηλής συγγένειας μερικός αγωνιστής στους υποδοχείς των κανναβινοειδών 1, ενώ παρουσιάζει μικρή δραστηριότητα στους υποδοχείς των κανναβινοειδών 2. Αντίθετα,

η 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλη χαρακτηρίζεται ως ένας πλήρης αγωνιστής και στους δύο υποδοχείς των κανναβινοειδών παρουσιάζοντας μέτρια ή χαμηλή συγγένεια [89], [102], [103]. Αυτή η διακριτή φαρμακολογική εικόνα της ανανδαμίδης και της 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλης τονίζει τον ιδιαίτερο ρόλο που διαδραματίζουν στο ενδοκανναβινοειδές σύστημα και υποδηλώνει ότι τα παραπάνω συστατικά συνδέονται με διάφορες παθοφυσιολογικές διεργασίες. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες η ανανδαμίδα και η 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλη μπορούν να ασκήσουν το βιολογικό τους ρόλο ενεργοποιώντας επιπλέον υποδοχείς, όπως τον GPR55 (υποδοχέας συζευγμένος με G πρωτεΐνη) [89], τα κανάλια παροδικού δυναμικού υποδοχέα (TRP) (συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα βανιλοειδούς, TRPV1) [104] και τους ενεργοποιημένους υποδοχείς των πολλαπλασιαστών των υπεροξειδωσώματων (PPARs), ιδιαίτερα τους PPARα και PPARγ [105].

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα χαρακτηρίζεται από την σύνθεση των κύριων ενώσεων έπειτα από απόκριση σε κατάλληλο νευρικό σήμα. Αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου κατά τη διάρκεια παρατεταμένης νευρικής διέγερσης, οδηγούν στη de novo σύνθεση των μορίων των κύριων ενδοκανναβινοειδών, καθώς δεν αποθηκεύονται σε κυστίδια [106], [107], [108]. Όταν παραχθούν, η ανανδαμίδα και η 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλη απελευθερώνονται από τους αποπολωμένους προσυναπτικούς νευρώνες και λειτουργούν ως ανάδρομοι αγγελιαφόροι, ενεργοποιώντας του υποδοχείς των κανναβινοειδών 1 στα προσυναπτικά τερματικά [109]. Αυτή η ενεργοποίηση ρυθμίζει τη διαβίβαση του σήματος μεταξύ των συνάψεων οδηγώντας σε μια βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη μείωση της αποτελεσματικότητας της συναπτικής διαβίβασης, ανάλογα με τις συνθήκες [110]. Η επίδραση στη σηματοδότηση των ενδοκανναβινοειδών μπορεί να είναι είτε διεγερτική είτε ανασταλτική, γεγονός που εξαρτάται από την καταστολή των GABAergic ή των γλουταμινεργικών προσυναπτικών εισόδων.

Τα κύρια συνθετικά μονοπάτια για την ανανδαμίδα και τη 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλη ξεκινούν, και για τα δύο, από τη μεμβράνη φωσφολιπιδίων μέσω της ενεργοποίησης δύο ενζύμων εξαρτώμενων από το ασβέστιο, τη N-ακετυλοτρανσφεράση και τη φωσφολιπάση Cβ για το σχηματισμό N-ακυλοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (NAPE) και διακυλογλυκερόλη (DAG), αντίστοιχα. Αυτές οι πρόδρομες ενώσεις υδρολύονται στη συνέχεια μέσω του μηχανισμού δράσης της NAPE-ειδικής φωσφολιπάσης D (NAPE-PLD) και της λιπάσης της διακυλογλυκερόλης (DAGL) α ή β, οδηγώντας στο σχηματισμό της ανανδαμίδης και της 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλης ως τελικά προϊόντα. Μολονότι αυτά τα μονοπάτια είναι τα πλέον μελετημένα, έχουν προσδιοριστεί και άλλα βιοσυνθετικά μονοπάτια και για τα δύο μόρια. Για παράδειγμα, η ανανδαμίδα μπορεί να συντεθεί μέσω NAPE-ανεξάρτητων μονοπατιών που εμπλέκουν άλλα ένζυμα, όπως τη φωσφολιπάση C και η σύνθεση της 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλης δύναται να συμπεριλάβει τουλάχιστον 8 διαφορετικά ένζυμα σε συγκεκριμένες συνθήκες [111], [112], οπότε και αντανάκλαται η ευελιξία και η πολυπλοκότητα της βιοσύνθεσης των ενδοκανναβινοειδών.

Τα ενδοκανναβινοειδή αποικοδομούνται μέσω μονοπατιών υδρόλυσης ή/και οξείδωσης [108]. Η ανανδαμίδα υδρολύεται κυρίως από την αμιδική υδρολάση των λιπαρών οξέων (FAAH) σε ελεύθερο αραχιδονικό οξύ και αιθανολαμίνη, ενώ η 2-αραχιδοנוϋλογλυκερόλη υδρολύεται κυρίως από την λιπάσης των

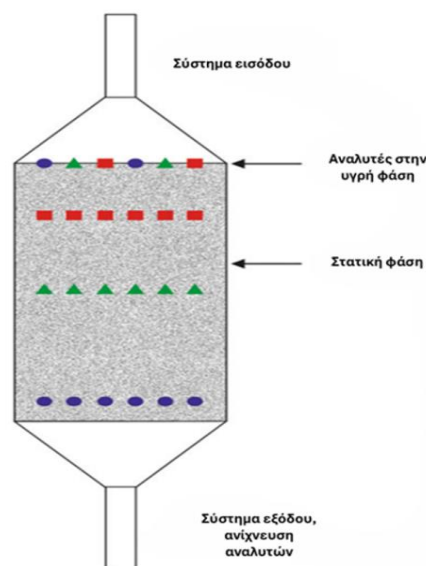
μονοακυλογλυκερολών (MAGL) σε αραχιδονικό οξύ και γλυκερόλη, μολονότι και άλλα ένζυμα δύναται να συμμετέχουν σε αυτή τη διεργασία [108], [112], [113]. Η αποικοδόμηση μέσω οξείδωσης και για τα δύο ενδοκανναβινοειδή μπορεί να συμπεριλαμβάνει ένζυμα, όπως κυκλοοξυγενάση 2 και διάφορες λιποξυγενάσες [114].

6. Τεχνικές διαχωρισμού

i. Χρωματογραφία

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται εδώ και πολύ καιρό. Στην αρχαία Ελλάδα, ο Αριστοτέλης χρησιμοποιούσε οξείδιο του αργιλίου (αλουμίνα) για τον καθαρισμό του θαλασσινού νερού. Το 1859, ο Γερμανός επιστήμονας F. Runge διεξήγαγε πειράματα, τα οποία αποτέλεσαν πρόδρομα της χρωματογραφίας χάρτου. Το 1901, ο Ρώσος βοτανολόγος M. Tswett αρχικά περιέγραψε τη μέθοδο με σκοπό τον διαχωρισμό των χρωστικών των φυτών, όπως τη χλωροφύλλη και το καροτένιο [115].

Η βάση των χρωματογραφίας είναι η χημική ή/και φυσική αλληλεπίδραση των αναλυτών που υπάρχουν στο δείγμα στην κινητή φάση με τα σωματίδια μιας στατικής φάσης με τελικό αποτέλεσμα τον προσωρινό διαχωρισμό των αναλυτών (εικόνα 7). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια του αναλυτή με τη στατική φάση τόσο μεγαλύτερη είναι η χρονική καθυστέρηση κατά τη χρωματογραφία. Οι αναλυτές που έχουν διαχωριστεί από το δείγμα ανιχνεύονται κατά την έξοδο από τη χρωματογραφική στήλη με κατάλληλο ανιχνευτή, ο οποίος μετρά την ποσότητά τους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα χρωματογράφημα, όπου η ένταση του σήματος φαίνεται ως η τεταγμένη και ο χρόνος κατακράτησης των ουσιών ως η τετμημένη. Ο χρόνος κατακράτησης είναι χαρακτηριστικός για κάθε ουσία, ενώ το ύψος της κορυφής/σήματος ή η περιοχή κάτω από αυτήν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των αναλυτών [116].

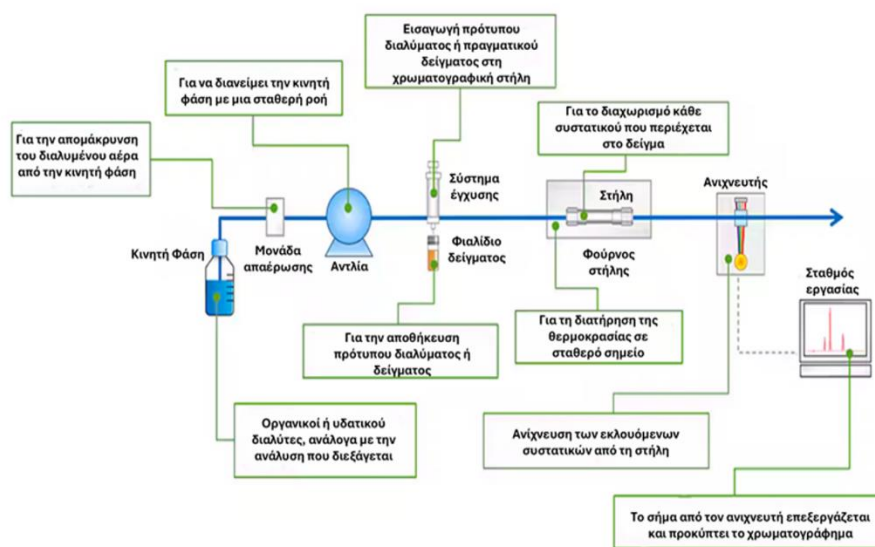


Εικόνα 8: Η αρχή της χρωματογραφίας. Το δείγμα με τους αναλυτές εισάγεται στη χρωματογραφική στήλη και οι αναλυτές στην κινητή φάση αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση, οπότε και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τους από το δείγμα. Με την έξοδό τους από τη στήλη οι αναλυτές ανιχνεύονται από διάφορα συστήματα [116]

ii. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης HPLC

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), παλαιότερα γνωστή ως υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, είναι μια τεχνική υγρής χρωματογραφίας και μια ιδιαίτερα βελτιωμένη εκδοχή της χρωματογραφίας στήλης. Σε αντίθεση με την κλασσική χρωματογραφία, ο διαλύτης δεν αφήνεται να διέλθει από τη στήλη από τη βαρύτητα και μόνο, αλλά υποβάλλεται σε εξαναγκαστική διέλευση διά μέσω της στήλης υπό υψηλή πίεση (έως 400 ατμόσφαιρες).

Η οργανολογία στην οποία λαμβάνει χώρα όλη η διεργασία περιλαμβάνει το δοχείο του διαλύτη (που περιέχει την κινητή φάση), μια μονάδα απαερωτή, την αντλία, το σύστημα έγχυσης, τη στήλη (η οποία βρίσκεται σε ένα φούρνο για την κατάλληλη ρύθμιση της θερμοκρασίας), τον ανιχνευτή και ένα σύστημα επεξεργασίας του σήματος που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή (λ.χ. έναν υπολογιστή) (Εικόνα 8) [116]



Εικόνα 9: Διάγραμμα ροής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) [117]

Ως τεχνική, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει ορισμένα πλεονεκτήματα συγκριτικά με την παραδοσιακή χρωματογραφία. Πρώτον, ο χρόνος διεξαγωγής της ανάλυσης είναι μικρότερος. Δεύτερον, είναι εφικτό να αξιοποιηθούν μικρότερα σωματίδια ως στατική φάση στη στήλη και αυτό δίνει μεγαλύτερο εύρος περιοχής για την αλληλεπίδραση μεταξύ των αναλυτών και της στατικής φάσης. Ως συνέπεια, επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών σε δείγματα με πολύπλοκη σύσταση, οπότε η επαναληψιμότητα είναι μεγαλύτερη και το όριο ανίχνευσης των αναλυτών είναι χαμηλότερο.

Ανάλογα με την αλληλεπίδραση μεταξύ των σωματιδίων της στατικής φάσης και των αναλυτών στην υγρή φάση διακρίνονται τέσσερα είδη υγρής χρωματογραφίας: Η χρωματογραφία αποκλεισμού, η χρωματογραφία ιόντων, η χρωματογραφία προσρόφησης και η χρωματογραφία των οπτικών ισομερών.

Η χρωματογραφία προσρόφησης είναι η πλέον ευρέως διαδεδομένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας. Διακρίνεται, ανάλογα με τη στατική φάση, σε κανονικής φάσης και σε αντίστροφης φάσης. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η στατική φάση αποτελείται από μη τροποποιημένη πυριτική γέλη (Silica gel) και πιο σπάνια από Al_2O_3 . Λόγω του πολικού χαρακτήρα της στατικής φάσης, η κινητή φάση αποτελείται από μη πολικά συστατικά, όπως το εξάνιο. Η χρωματογραφία κανονικής φάσης χρησιμοποιείται σε περίπου 5-10% των συνολικών εξετάσεων ρουτίνας.

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, η στατική φάση είναι περισσότερο μη πολική (υδρόφοβη) συγκριτικά με την κινητή φάση. Οι πιο πολικοί αναλύτες του εκάστοτε δείγματος εκλούνται πρώτοι λόγω της ασθενέστερης αλληλεπίδρασής τους με τα συστατικά της στατικής φάσης, ενώ οι πιο υδρόφοβοι αναλύτες εκλούνται σε μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης λόγω του ότι οι αναλύτες αλληλεπιδρούν ισχυρότερα με τη στατική φάση.

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας στη χρωματογραφία είναι η θερμοκρασία. Ο λόγος είναι ότι επηρεάζει το βαθμό αλληλεπίδρασης μεταξύ της κινητής και τη στατικής φάσης καθώς και το ιξώδες της υγρής φάσης. Για να υπάρχουν λοιπόν επαναλήψιμα και σταθερά αποτελέσματα είναι σημαντικό η θερμοκρασία σε κάθε μέτρηση να διατηρείται σε σταθερά επίπεδα [118].

Η σύσταση της υγρής φάσης μπορεί να είναι είτε σταθερή είτε να μεταβάλλεται. Στην πρώτη περίπτωση καλείται ισοκρατική έκλουση (isocratic elution) και στη δεύτερη διαβαθμισμένη έκλουση (gradient elution). Οι διαβαθμίσεις μπορεί να είναι γραμμικές, κοίλες, κυρτές ή να γίνονται σε βήματα. Τα συστατικά της υγρής φάσης μπορεί να είναι δύο ή και περισσότερα.

Ο σωστός ρυθμός ροής της κινητής φάσης εξαρτάται από παράγοντες όπως την εσωτερική διάμετρο της στήλης. Σε υψηλούς ρυθμούς ροής η αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών της στατικής φάσης και των αναλυτών του δείγματος είναι ανεπαρκής. Γι' αυτό το λόγο προτείνεται να επιλέγεται μια σταθερή ταχύτητα, η οποία προκύπτει από ένα γραμμικός μοτίβο ροής, για περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητή η παραγωγή αποτελεσμάτων με χρήση στηλών διαφορετικών εσωτερικών διαμέτρων.

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), οι αναλύτες μπορούν να ανιχνευτούν με διαφορετικούς τύπους ανιχνευτών. Οι ανιχνευτές αυτοί κατηγοριοποιούνται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αξιοποιεί ορισμένα χαρακτηριστικά της ολικής ροής έκλουσης, όπως την πυκνότητα, το δείκτη διάθλασης και τη χωρητικότητα. Η δεύτερη κατηγορία αξιοποιεί ορισμένα χαρακτηριστικά των διαλυμένων αναλυτών στο δείγμα, όπως την απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), το φθορισμό και την οξειδοαναγωγή. Η επιλογή των ανιχνευτών εξαρτάται από τη φύση του εκάστοτε αναλύτη που εξετάζεται, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις επιλέγονται πολλαπλά συστήματα ανιχνευτών. Οι πιο συνήθεις τύποι ανιχνευτών αξιοποιούν τις αρχές της φασματοσκοπίας υπεριώδους-ορατού (UV/Vis), της φασματοσκοπία υπέρυθρης ακτινοβολίας με μετασχηματισμό Fourier ((FT)-IR), του φθορισμού, της ηλεκτροχημείας, της αγωγιμότητας, των ανιχνευτών δείκτη διάθλασης, των ανιχνευτών σκέδασης του φωτός με εξάτμιση και ανιχνευτών ιόντων φασματομετρίας μάζας [116].

iii. Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική που μετρά φορτισμένα, σε αέρια φάσης μόρια σε μια κλίμακα μάζα προς φορτίο (m/z ratio) [119], [120], [121]. Η τεχνική αυτή υπάρχει εδώ και έναν αιώνα, αλλά εξαιτίας της πολυπλοκότητάς της και των δύσκολων τεχνικών ιονισμού που απαιτούσε κατέληξε να χρησιμοποιείται σε περιορισμένη κλίμακα. Οι τεχνικές ιονισμού οδηγούσαν σε θραυσματοποίηση των υπό μελέτη συστατικών και απαιτούσαν να βρίσκονται σε αέρια φάση περιόριζαν την ανάλυση σε ασταθείς και θερμικά σταθερές χημικές ενώσεις [120], [121], [122].

Μετά τη βελτιστοποίηση των ήπιων τεχνικών ιονισμού τη δεκαετία του '80, όταν και επιτεύχθηκε η διατήρηση της ακεραιότητας των μορίων κατά τον ιονισμό [123],

[124], [125], η φασματομετρία μάζας αξιοποιήθηκε για την ανάλυση βιοχημικών ενώσεων, εκ των οποίων πολλές ήταν θερμοευαίσθητες και σταθερές [120], [123], [124]. Αυτές οι εξελίξεις επέτρεψαν ακόμη το συνδυασμό της φασματομετρίας μάζας με την υγρή χρωματογραφία (LC-MS) αποδίδοντας έτσι μια τεχνική που προσέφερε μεγάλη αναλυτική ακρίβεια και εκλεκτικότητα [126].

Επιπρόσθετες εξελίξεις στα τέλη του 20^{ου} αιώνα οδήγησαν στην ανάπτυξη της φασματομετρίας μαζών σε σειρά (tandem ms), η οποία συνδυάζει δύο ή και περισσότερα συστήματα φασματομετρίας μαζών [127]. Η τεχνική αυτή προσέφερε αυξημένη εκλεκτικότητα συγκριτικά με τις κοινές αναλυτικές τεχνικές, όπως την απλή φασματομετρία μάζας, τη φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και την υγρή χρωματογραφία [122], [128], [129]. Η αυξημένη εκλεκτικότητα επιτυγχάνεται χάρη στην επιλογή ενός συγκεκριμένου πρόδρομου ιόντος που κατά την πρώτη φασματομετρία μάζας, το οποίο εν συνεχεία μεταβαίνει σε κελί σύγκρουσης (collision cell) και θραυσματοποιείται περαιτέρω σε ιόντα, τα οποία ανιχνεύονται στη δεύτερη φασματομετρία μάζας [130], [131].

Η υγρή χρωματογραφία τριπλής τετραπολικής φασματομετρίας μάζας (lc-ms/ms) είναι η πλέον διαδεδομένη τεχνική που αξιοποιεί συζευγμένη φασματομετρία μάζας σε σειρά που εφαρμόζεται επί του παρόντος σε εργαστήρια. Η τεχνική αυτή εμφανίζει ορισμένα πλεονεκτήματα όπως βελτιωμένη ακρίβεια και εκλεκτικότητα, μειωμένο κόστος και δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων με περίπλοκη σύσταση [126].

Η τεχνική της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών σε σειρά δεν περιορίζεται μονάχα σε τετράπολα, αλλά συμπεριλαμβάνει και παγίδες ιόντων (ion trap) και αναλυτές «χρόνου πτήσης» (TOF: Time Of Flight) [121], [126], [132]. Η παγίδα ιόντων κρατά τα ιόντα σε μια συγκεκριμένη περιοχή με εφαρμογή μαγνητικού, ηλεκτροστατικού και/ή RF ηλεκτρικού πεδίου. Έπειτα από ένα δεδομένο χρονικό διάστημα, τα ιόντα απελευθερώνονται εκλεκτικά προς τον ανιχνευτή. Αυτό μπορεί να παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δομή του υπό μελέτη μορίου καθώς και αγνώστων ουσιών συμβάλλοντας έτσι στην ταυτοποίησή τους με βάση σύγκρισης με δεδομένα από βιβλιοθήκες φασματοσκοπικών δεδομένων. Οι ανιχνευτές TOF βασίζονται στο χρόνο που απαιτείται από τα ιόντα να περάσουν από το σωλήνα με τα μικρότερα ιόντα να κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα συγκριτικά με τα μεγαλύτερα ιόντα οδηγώντας έτσι σε μεγαλύτερη ακρίβεια στο προσδιορισμό της μάζας. Και οι παγίδες ιόντων και τα συστήματα TOF έχουν χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές που απαιτούν την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων, την αλληλούχιση πρωτεϊνών και για εξέταση ενός ευρύ φάσματος φαρμάκων [121], [122], [126].

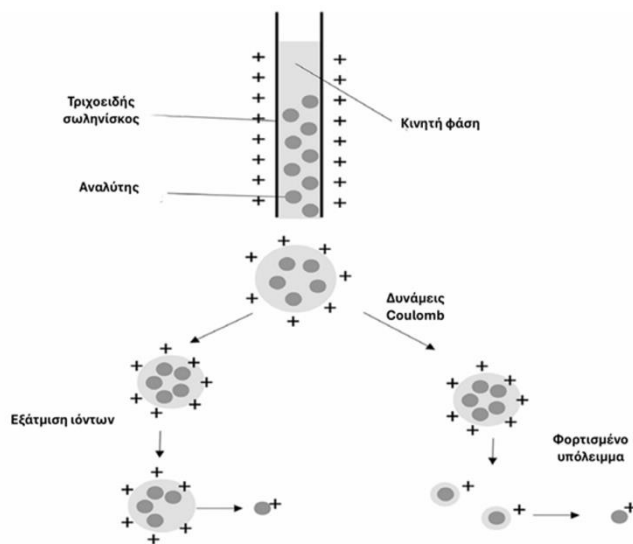
iv. Φασματομετρία μάζας με τριπλό τετράπολο

Όπως προαναφέρθηκε, χάρη στην τεχνική της υγρής χρωματογραφίας επιτυγχάνεται διαχωρισμός των υπό μελέτη αναλυτών του δείγματος με αλληλεπίδραση μεταξύ των συστατικών μιας στατικής φάσης και των αναλυτών που περιέχονται σε μια κινητή φάση. Στα συστήματα που αξιοποιούν τεχνικές σύζευξης υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών σε σειρά η κινητή φάση που εξέρχεται από την υγρή χρωματογραφία εισέρχεται στην πηγή ιόντων του φασματομέτρου μάζας μέσω ενός

τριχοειδούς σωλήνα και όπου τα συστατικά της κινητής φάσης ιονίζονται. Ο ιονισμός είναι ένα απαραίτητο βήμα στην τεχνική, διότι μόνο τα φορτισμένα σωματίδια ανιχνεύονται από φασματόμετρο μάζας. Οι τεχνικές ιονισμού που δύνανται να εφαρμοστούν συμπεριλαμβάνουν τον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), το φωτοϊονισμό σε ατμοσφαιρική πίεση (APPI) και τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI) [126].

Ο ESI πρωτοανακαλύφθηκε τη δεκαετία του '80 και πλέον είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική ιονισμού που εφαρμόζεται στο εργαστηριακό περιβάλλον με δεδομένο ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ένα μεγάλο εύρος μικρών και μεγάλων μορίων λόγω του ότι μπορεί να δημιουργήσει πολλαπλά φορτία [124], [133], [134].

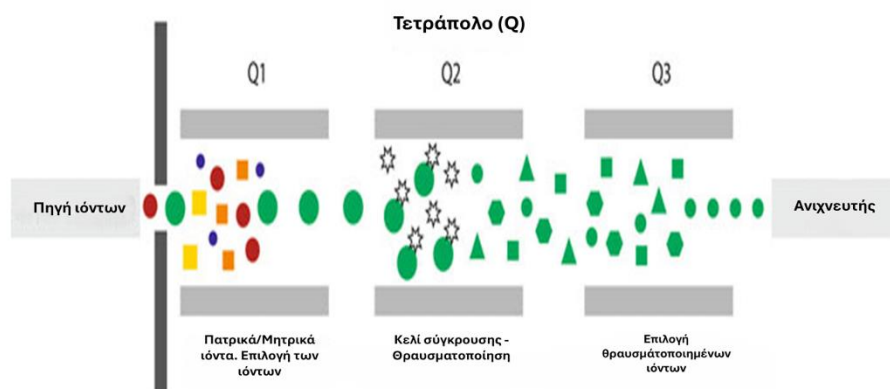
Η τεχνική του ESI εφαρμόζεται σε 3 κύρια βήματα. Αρχικά, εφαρμόζεται τάση στον τριχοειδή σωλήνα ενώ η κινητή φάση διέρχεται μέσα από το θάλαμο πηγής ιόντων, έτσι οι δυνάμεις Coulomb που εφαρμόζονται πάνω στο φορτισμένο δείγμα προκαλούν τη διασπορά τους ως ένα λεπτό ψεκασμό φορτισμένων σταγονιδίων. Στο δεύτερο βήμα, εφαρμόζεται θερμότητα και αέριο προκειμένου ο διαλύτης να εξατμιστεί γρήγορα με αποτέλεσμα τη σμίκρυνση και την αύξηση της πυκνότητας της φόρτισης στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Τέλος, παράγονται αέριας φάσης φορτισμένα ιόντα από υψηλά φορτισμένα σταγονίδια. Ο ακριβής μηχανισμός παραγωγής των ιόντων στο τελικό στάδιο του ESI δεν είναι απόλυτα κατανοητός, αλλά πιστεύεται ότι συμβαίνει είτε με ένα μοντέλο εξάτμισης ιόντων, είτε με μοντέλο φορτισμένου υπολείμματος. (Εικόνα 9) [119], [124], [125], [126], [133], [134], [135].



Εικόνα 10: Σχηματισμός ιόντων κατά τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Στην αριστερή πλευρά φαίνεται το μοντέλο εξάτμισης των ιόντων και στη δεξιά το μοντέλο φορτισμένου υπολείμματος [126].

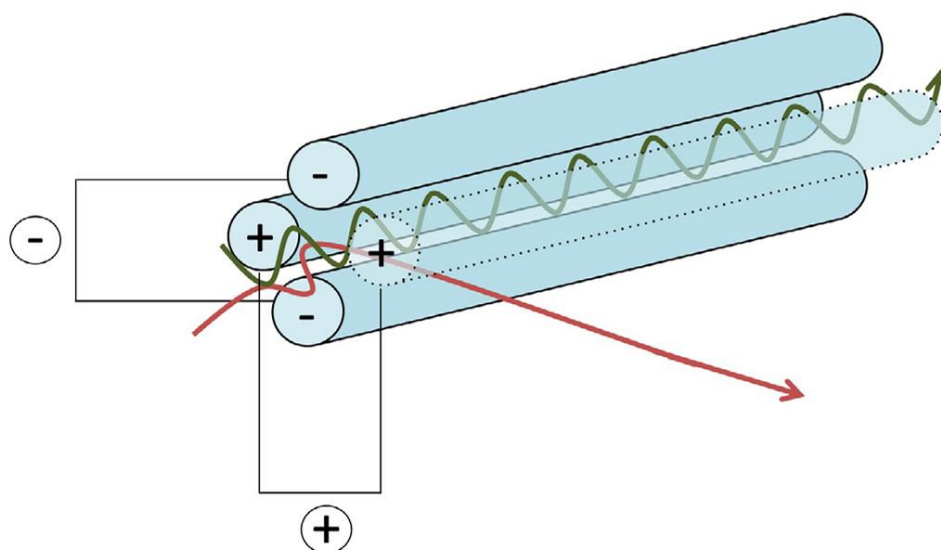
Τα ιόντα που παράγονται στην πηγή και εισέρχονται στο φασματόμετρο μάζας με πίεση υπό κενό, σταδιακά συγκεντρώνονται και επιταχύνονται μέσω μιας περιοχής μετάβασης στο πρώτο τετράπολο, Q1. Ακέραια, μοριακού βάρους ιόντα, τα

πρόδρομα ιόντα, επιλέγονται και μεταφέρονται στο κελί σύγκρουσης ή αλλιώς στο δεύτερο τετράπολο Q2, όπου συγκρούονται με υψηλής ενέργειας αέρια και θραυσματοποιούνται. Αυτά τα θραύσματα ή αλλιώς τα ιόντα-προϊόντα περνάνε από το τρίτο τετράπολο Q3 και στέλνονται εκλεκτικά στον ανιχνευτή (Εικόνα 10) [119], [136], [137], [138]



Εικόνα 11: Σχηματικό διάγραμμα ενός τριπλού τετράπολου φασματομέτρου μάζας. Ο ιονισμός των ουσιών πραγματοποιείται με τεχνικές όπως τον ιονισμό με ηλεκτροψεκάσμο (ESI) ή το χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής φάσης (APCI). Η πρώτη επιλογή λαμβάνει χώρα στο πρώτο τετράπολο. Μόνο μόρια με συγκεκριμένη αναλογία μάζα προς φορτίο διέρχονται από το πρώτο τετράπολο. Η θραυσματοποίηση λαμβάνει χώρα στο κελί σύγκρουσης στο δεύτερο τετράπολο (τα αστέρια συμβολίζουν αέρια όπως το αργό ή το άζωτο που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αυτό το στάδιο). Τα θραυσματοποιημένα ιόντα επιλέγονται στο τρίτο τετράπολο σύμφωνα με την αναλογία μάζας προς φορτίο. Τέλος λαμβάνει χώρα ανίχνευση του σήματος από τον ανιχνευτή [116].

Τα ιόντα μεταβαίνουν μέσα από τα τετράπολα μέσω ενός διαλύματος διαβαθμισμένης σύστασης υπό κενό και τα ιόντα ταλαντεύονται μέσα στα τετράπολα με εφαρμογή RF και DC τάσεων σε αντιδιαμετρικά ζεύγη ράβδων (Εικόνα 11). Τα μόρια που δεν έχουν μια σταθερή τροχιά μέσα σε αυτά τα ζεύγη τάσεων αποβάλλονται από τα τετράπολα. Το σήμα που λαμβάνεται από τον ανιχνευτή του προϊόντος-ιόντος που επιλέγεται από το Q3 παράγεται από ένα συγκεκριμένο πρόδρομο ιόν που λαμβάνεται από το Q1 αναφέρεται κοινώς ως μετάβαση μάζας και το πείραμα ως παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM) ή παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (MRM). Τα πιο σύγχρονα φασματομέτρα μάζας μπορούν να σκανάρουν και να ανιχνεύσουν πολλαπλές μεταβάσεις μάζας, άρα πολλοί αναλύτες μπορούν να ανιχνευτούν σε μια και μόνο δοκιμή [126].



Εικόνα 12: Απεικόνιση ενός τετράπολου. Μόνο τα ιόντα που ταλαντεύονται μεταξύ των ράβδων και έχουν μια σταθερή τροχιά με καθορισμένες τάσεις RF και DC διέρχονται μέσω του τετράπολου (πράσινο μονοπάτι). Τα ιόντα με ασταθείς τροχιές αποβάλλονται από το τετράπολο (κόκκινο μονοπάτι) [126]

ν. Υπερύψηλης απόδοσης υγρή χρωματογραφία

Η υπερύψηλης απόδοσης υγρή χρωματογραφία (UPLC ή UHPLC) είναι μια καινοτόμα τεχνική της υγρής χρωματογραφίας. Η βασική διαφορά συγκριτικά με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), είναι ότι οι στήλες της περιέχουν σωματίδια διάμετρο 3-5μm ενώ τα συστήματα της UPLC έχουν αναβαθμιστεί με στήλες που περιέχουν σωματίδια με διάμετρο μικρότερη των 2μm γεγονός που οδηγεί σε βελτιωμένη ταχύτητα, ανάλυση, ευκρίνεια και ακρίβεια. Ακόμη, ο ρυθμός ροής που χρησιμοποιείται στην HPLC είναι συνήθως 3 ml/min συγκριτικά με την UPLC που είναι συνήθως 0,6 ml/min. Τέλος, τα όργανα που αξιοποιούν την τεχνική UPLC είναι σχεδιασμένα να λειτουργούν κάτω από υψηλή πίεση (μέχρι 1000 bar) συγκριτικά με την HPLC που φτάνει μέχρι τα 300 έως τα 400 bar. Εκτός από τις παραπάνω διαφορές δεν υφίσταται κάποια ουσιαστική διαφορά μεταξύ των βασικών αρχών λειτουργίας τους με εξαίρεση το γεγονός ότι η πίεση που δημιουργείται ή παράγεται στο όργανο καθιστά την UPLC πιο αποδοτική τεχνολογία. Ωστόσο, η τεχνική της UPLC από μόνη της δεν είναι τόσο αποδοτική όσο σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών σε σειρά, καθώς βελτιώνεται η μοριακή ανάλυση με τη χρήση μιας διαβάθμισης μάζα προς φορτίο (m/z) [139].

7. Αίμα και συστατικά του αίματος (ολικό αίμα, πλάσμα και ορός)

Το αίμα είναι ένα εξειδικευμένο κολλοειδές μίγμα και ένας υγρός συνδετικός ιστός που διευκολύνει την κυκλοφορία θρεπτικών ουσιών, οξυγόνου και ορμονών σε διαφορετικά σημεία του σώματος. Αποτελείται κυρίως από τα έμμορφα συστατικά

του αίματος, τα RBCs (ερυθροκύτταρα), τα WBCs (λευκοκύτταρα), τα αιμοπετάλια (θρομβοκύτταρα), και το πλάσμα, καθώς επίσης και από πρωτεΐνες και άλλες υδατοδιαλυτές ουσίες. Είναι ελαφρώς αλκαλικό με εύρος pH από 7.35 έως 7.45 και πιο ιξώδες από το νερό. Όπως τα περισσότερα υγρά έτσι και το αίμα δεν έχει σχήμα, παρά προσαρμόζεται ανάλογα με τον περιβάλλον χώρο που βρίσκεται. Οι σταγόνες αίματος τείνουν να έχουν κυκλικό σχήμα, αφού κάθε υγρό έχει την τάση να ελαττώνει την επιφανειακή του τάση κατά όσο το δυνατόν περισσότερο [140].

Στη δικαστική τοξικολογία το αίμα αναφέρεται συχνά και ως «ολικό αίμα» και συναντάται συνήθως σε υγρή μορφή, στην οποία τα κύτταρα του αίματος (ερυθρά και λευκά), τα αιμοπετάλια, κυτταρικά υπολείμματα και άλλα μόρια εντοπίζονται στο πλάσμα και η ποσότητά του αναλογεί στο περίπου 8% του μέσου ανθρώπινου σωματικού βάρους με το μέσο ενήλικα να έχει όγκο αίματος που αντιστοιχεί σε περίπου 5 λίτρα. Η αναλογία των συστατικών του αίματος είναι περίπου 45% ολικό αίμα, 54% πλάσμα και περισσότερο από 1% λευκοκύτταρα/αιμοπετάλια [141].

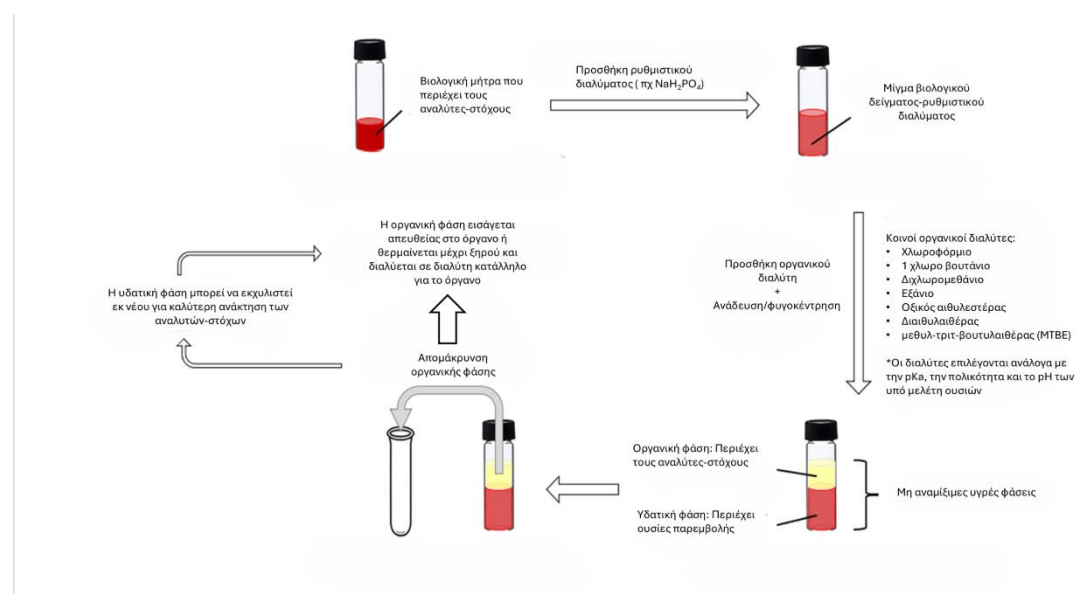
Το κόκκινο χρώμα το αίματος αποδίδεται στο σίδηρο που περιέχεται στην αιμογλοβίνη[140] με την ένταση του χρώματος να ποικίλει ανάλογα με την αλληλεπίδραση των ομάδων αίμης με άλλα συστατικά καθώς και από το επίπεδο οξυγόνωσης του αίματος (για παράδειγμα, το αποοξυγονωμένο αίμα έχει σκούρο κόκκινο χρώμα). Το χρώμα του αίματος μπορεί επίσης να είναι ενδεικτικό για την ύπαρξη τοξικών ουσιών[141], [142], για παράδειγμα λόγω του σχηματισμού της καρβοξυαιμοσφαιρίνης, έπειτα από έκθεση σε μονοξείδιο του άνθρακα, το αίμα μπορεί να παρουσιάσει ένα έντονο κόκκινο χρώμα. Ακόμη, η δηλητηρίαση από κυάνιο μπορεί να οδηγήσει σε ένα χαρακτηριστικό κόκκινο κερασί χρώμα, αφού παραμένει οξυγονωμένο[143]. Ο εντοπισμός και η ποσοτικοποίηση των ναρκωτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους εξαρτάται από παράγοντες όπως το χρόνο ημιζωής, τον τρόπο που χορηγήθηκαν, τη συχνότητα χρήσης (συχνή ή περιστασιακή), τη φαρμακογονιδιοματική κ.α.

Το ολικό αίμα, το πλάσμα και ο ορός αποτελούν συχνά βιολογικά δείγματα στα οποία διεξάγονται μελέτες και αναλύσεις στη δικαστική τοξικολογία. Κατά τη συλλογή και την αποθήκευση του ολικού αίματος απομονώνονται όλα τα συστατικά του αίματος συμπεριλαμβανομένου του πλάσματος και του ορού (Basu and Kullkarni 2014, Mathew and Varacallo 2020). Το πλάσμα έχει ελαφρώς κιτρινωπό χρώμα και είναι το μέρος του αίματος όπου συγκεντρώνονται τα κύτταρα του αίματος, εκτός και αν απομακρυνθούν με κατάλληλη κατεργασία. Ο ορός δε είναι το υγρό συστατικό του αίματος που προκύπτει έπειτα από φυγοκέντρηση, αφού πρώτα το αίμα αφηθεί για να δημιουργηθεί θρόμβος. Παράγοντες που δύνανται να επηρεάσουν την ανάλυση των παραπάνω βιολογικών δειγμάτων και κατά συνέπεια την ερμηνεία των τελικών αποτελεσμάτων είναι πρώτον, το μέρος του σώματος από όπου λαμβάνεται το αίμα (αρτηρία, ή καρδιά) και δεύτερον η χρήση ή όχι συντηρητικών του αίματος και αντιπηκτικών ουσιών, όπως το οξαλικό κάλιο, το φθοριούχο νάτριο και το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (ή EDTA).[141]

8. Εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)

Όπως προαναφέρθηκε, το αίμα αποτελεί ένα περίπλοκο βιολογικό δείγμα πράγμα που σημαίνει ότι περιέχει και ουσίες οι οποίες δύνανται να επηρεάσουν την ανάλυση των ζητούμενων αναλυτών. Για το σκοπό αυτό, πριν από την ανάλυση του βιολογικού δείγματος είναι απαραίτητο να ακολουθηθεί μια διαδικασία προκατεργασίας προκειμένου να απομακρυνθούν παρεμβολές από τη μήτρα του δείγματος, να προσυγκεντρωθούν οι αναλύτες-στόχοι και να ελαττωθούν ανεπιθύμητες επιδράσεις από τη μήτρα του δείγματος προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία του προσδιορισμού των αναλυτών-στόχων[144] .

Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική προκατεργασίας δείγματος είναι η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE). Πρόκειται για μια τεχνική που αξιοποιείται για το διαχωρισμό αναλυτών από παρεμβολές της βιολογικής μήτρας μέσω διαχωρισμού μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών (μια οργανική και μια υδατική φάση). Υπό ιδανικές συνθήκες, οι αναλύτες θα μεταφερθούν προς την οργανική φάση. Η βασική διεργασία που ακολουθείται είναι ως εξής (Εικόνα 8): Μέρος του βιολογικού δείγματος που αντιπροσωπεύει την υδατική φάση (πχ ολικό αίμα) και περιέχει τους αναλύτες-στόχους, αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα γνωστού pH (ή ένα ισχυρά όξινο ή βασικό διάλυμα που τροποποιεί το pH), το οποίο διατηρεί τους αναλύτες-στόχους σε μια μη ιονισμένη (μη φορτισμένη) κατάσταση. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται ένας οργανικός διαλύτης ή ένα μίγμα οργανικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, ο διαιθυλαιθέρας, μεθυλ-τρίτ-βουτυλαιθέρας (MTBE) ή ο οξικός αιθυλεστέρας και το τελικό μίγμα αναδεύεται έντονα και φυγοκεντρείται (συνήθως για περίπου 10 λεπτά). Τα συστατικά της βιολογικής μήτρας κατανέμονται μεταξύ της υδατικής και της οργανικής φάσης και διαμερισματοποιούνται κατά προτίμηση στην οργανική φάση, όταν οι αναλύτες είναι μη ιονισμένοι (μη φορτισμένοι) και επιδεικνύουν διαλυτότητα στην οργανική φάση. Η οργανική φάση απομονώνεται και εξατμίζεται μέχρι ξηρού και προτού εισαχθεί στο κατάλληλο μηχάνημα για ανάλυση γίνεται ανασύσταση με κατάλληλο διαλύτη (την κινητή φάση)[145].



Εικόνα 13: Τα βασικά βήματα στην εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) [141]

Η τεχνική της εκχύλισης υγρού-υγρού είναι μια από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων που εφαρμόζεται στην εκχύλιση των κανναβινοειδών. Οι κυριότεροι λόγοι που εφαρμόζεται η εν λόγω τεχνική έγκεινται στην εν γένει απλότητά της, καθώς δεν απαιτεί περίπλοκη αναλυτική οργανολογία για να πραγματοποιηθεί. Ακόμη, παρέχει καλή επαναληψιμότητα και υψηλή ανάκτηση για τα περισσότερα κανναβινοειδή. Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματά της διαθέτει και μειονεκτήματα αφού υπάρχει η πιθανότητα να δημιουργηθεί γαλάκτωμα μεταξύ των υδατικών φάσεων ή να χαθεί αναλύτης, η αυτοματοποίηση καθίσταται συχνά δύσκολη και απαιτούνται μεγάλοι όγκοι δείγματος και οργανικών διαλυτών. Επιπρόσθετα, έχει υψηλό κόστος, είναι χρονοβόρα και συχνά απαιτεί αντιδραστήρια εν δυνάμει επικίνδυνα για το περιβάλλον και τους ανθρώπους που εκτίθενται σε αυτά. (Πίνακας 1)[2]

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Απλή	Απαιτεί μεγάλη ποσότητα οργανικών διαλυτών και δείγματος
Πιο ευέλικτη από τα αυτοματοποιημένα συστήματα	Δημιουργία γαλακτωμάτων
Υψηλή ανάκτηση	Χρονοβόρα
Επαναληψιμότητα	Έκθεση σε επικίνδυνους διαλύτες
	Υψηλό κόστος

Πίνακας 1: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE)

Β. Πειραματικό μέρος

1. Χημικά αντιδραστήρια

Πρότυπο διάλυμα Δ ⁹ -THC	Lipomed
Πρότυπο διάλυμα Δ ⁸ -THC	LGC
Πρότυπο διάλυμα CBN	LGC
Πρότυπο διάλυμα CBD	LGC
Πρότυπο διάλυμα THCA-A	LGC
Πρότυπο διάλυμα THC COOH	Lipomed
Ethyl acetate	Fisher Scientific UK
Hexane	Fisher Scientific UK
MTBE (99,5%)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany)
H ₂ O UHPLC GRADE	CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy)
MeOH UHPLC GRADE	CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy)
Ρυθμιστικό διάλυμα NaH ₂ PO ₄	Merck (Germany)
Clozapine-d ₄	LGC GmbH (Luckenwalde, Germany)
Acetonitrile	CARLO ERBA Reagents GmbH (Cornaredo, Italy)

Πίνακας 2: Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι προμηθευτές

2. Οργανολογία

Για την διεξαγωγή του πειράματος και την ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υπέρ Υψηλής Απόδοσης, Dionex UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States), συζευγμένο με διαδοχική Φασματομετρία Μαζών Q-Trap 5500 ±TM mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany) με λογισμικό ANALYST & OS.

3. Συσκευές

- VELP ZX4 Advanced IR Vortex Mixer
- Cole-Parmer® BH-200 Series Stuart Dry Block Heater (Σύστημα εξάτμισης συνδεδεμένο με άζωτο, Cole-Palmer-Linde Gas Greece)
- Αναλυτική στήλη Thermo Scientific Accucore C18 (50 x 30 mm), Particle size 2,6μm
- Μηχανική πιπέτα μεταβλητού όγκου (Gilson PIPETMAN P100, 10-100 μL, Metal Ejector)
- Nichiryo Autoclavable Nichipet EX II, 100-1000μL
- Ρύγχη πιπετών (DF200ST, DIAMOND TIPACK, 20-200μL, SARSTEDT AG&CO. KG, 1000μL
- Βελόνες εξάτμισης 127mm, Cole Palmer
- Φιαλίδια HPLC, Sun-SriTM, 0,25ml
- Φιαλίδια Eppendorf χωρητικότητας 2ml
- Φυγόκεντρος IKA G-L

4. Υγρή χρωματογραφία

Η ανάλυση διεξήχθη σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας Dionex UHPLC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) που αποτελούνταν από έναν απαερωτή, μια δυαδική αντλία, έναν αυτόματο δειγματολήπτη και έναν κλίβανο στήλης. Το σύστημα ήταν συζευγμένο με φασματομέτρο μάζας Q-Trap 5500±™ (Sciex, Darmstadt, Γερμανία), σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM), εξοπλισμένο με μια πηγή Turbo V ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) που λειτουργεί σε θετικό ή αρνητικό ιονισμό. Ο διαχωρισμός των ιόντων πραγματοποιήθηκε σε στήλη τύπου Accupore C18 (50 mm x 3 mm, με το μέγεθος σωματιδίων να είναι 2,6 μm) η οποία προφυλασσόταν από προστήλη με φίλτρο διαστάσεων 2,1 mm x 0,2 μm (Thermo Scientific, Waltham, MA, ΗΠΑ). Ο ρυθμός ροής (flow rate) διατηρήθηκε στα 0,5 mL/λεπτό ενώ η στήλη θερμοστατούνταν στους 30°C. Οι κινητές φάσεις αποτελούνταν από H₂O βαθμού καθαρότητας UHPLC-MS (διαλύτης έκλουσης A) και ακετονιτρίλιο (AcCN) βαθμού UHPLC-MS (διαλύτης έκλουσης B) με αρχική αναλογία 88-12%. Ο χρόνος ανάλυσης διήρκεσε 7,5 λεπτά με τη σύσταση των φάσεων να φαίνονται στον Πίνακα 3. Εντός του αυτόματου δειγματολήπτη η θερμοκρασία ήταν 5°C. Το ξέπλυμα της βελόνας του εγχυτήρα γινόταν με 200 μL 20% μεθανόλης πριν και μετά από κάθε ένεση ενώ ο όγκος του δείγματος που εγχύθηκε σε κάθε ανάλυση ήταν 5 μL.

Στην στατική φάση, η αντίστροφης φάσης στήλη Thermo Fischer Scientific πληρωνόταν με οκταδέκυλο πυρήτιο (ODS)-Si-C18. Το μέγεθος των πόρων ανερχόταν στα 80Å, ενώ το μέγεθος των διερχόμενων μορίων στα 2,6μm. Η διάμετρος της αναλυτικής στήλης, αντιστοιχούσε στα 3mm ενώ μήκος της στα 50mm.

Χρόνος (min)	% Αναλογία B
0,1	12
2,5	40
4,5	100
6	100
6,1	12
7,5	12

Πίνακας 3: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ουσιών από ολικό αίμα, 7,5 λεπτών

5. Συνθήκες MS/MS

Το φασματομέτρο μάζας που χρησιμοποιήθηκε Q-Trap 5500™ mass spectrometer (Sciex, Darmstadt, Germany) περιελάμβανε πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) που λειτουργούσε σε θετικό ιονισμό για τη Δ⁹-THC, τη Δ⁸-THC, τη CBN, τη CBD, τη THCA-A και την Clozapine-D4 και σε αρνητικό ιονισμό για το THC COOH. Οι εφαρμοζόμενες συνθήκες εισόδου ESI ήταν οι εξής:

- Αέριο 1, άζωτο (55 psi)
- Αέριο 2, άζωτο (55 psi)

- Τάση ψεκασμού ιόντων 5500 V, (θετικός ή αρνητικός ιονισμός)
- Θερμοκρασία πηγής ιόντων: 550°C.

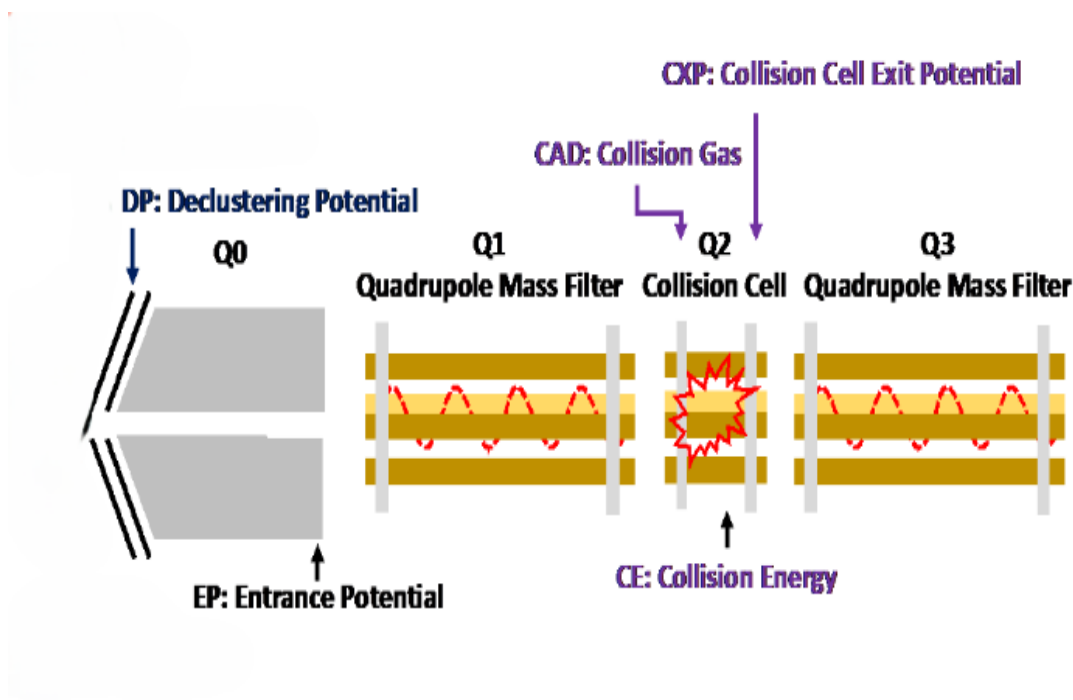
Η βελτιστοποίηση των χρόνων παραμονής και όλων των άλλων ρυθμίσεων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον προγραμματισμένο αλγόριθμο MRM που είναι ενσωματωμένος στην έκδοση λογισμικού Sciex Analyst® έκδοση 1.7.1 (Sciex, Darmstadt, Γερμανία), στον τρόπο αυτόματης ποσοτικής βελτιστοποίησης. Το λογισμικό SciexOS 1.6 1 (Sciex, Darmstadt, Γερμανία) εφαρμόστηκε για την επεξεργασία δεδομένων.

Αναλύτης	Χρόνος συγκράτησης (min)	Μητρικό ιόν (Da)	Θυγατρικό ιόν (Da)	DP (volts)	EP (volts)	CE (volts)	CXP (volts)	Ιονισμός
THC-COOH 1	4,80	343	299,1	-130	-10	-30	-41	-
THC-COOH 2	4,80	343	245,2	-130	-10	-40	-31	-
THC-COOH 3	4,80	343	191,3	-130	-10	-42	-17	-
d8-THC 1	5,51	315	135,2	131	10	27	20	+
d8-THC 2	5,51	315	235,2	131	10	27	16	+
d8-THC 3	5,51	315	181,2	131	10	27	12	+
Cannabinol 1	5,29	311	223,1	1	10	29	22	+
Cannabinol 2	5,29	311	293,1	1	10	23	24	+
Cannabinol 3	5,29	311	208,1	1	10	41	14	+
Cannabidiol 1	5,08	315	193,1	1	10	31	12	+
Cannabidiol 2	5,08	315	123,1	1	10	41	14	+
Cannabidiol 3	5,08	315	259	1	10	25	16	+
THCA-A 1	5,52	359	341,1	111	10	23	20	+
THCA-A 2	5,52	359	219,1	111	10	41	26	+
THCA-A 3	5,52	359	285,1	111	10	37	16	+
d9-THC 1	5,40	315	193,2	96	10	31	12	+
d9-THC 2	5,40	315	123,1	96	10	45	14	+
d9-THC 3	5,40	315	259,2	96	10	29	16	+
Clozapine- d4 1	3,00	331	272	1	10	33	26	+
Clozapine- d4 2	3,00	331	192,1	1	10	59	12	+
Clozapine- d4 3	3,00	331	273	1	10	33	18	+

Πίνακας 4: Μητρικά και θυγατρικά ιόντα, χρόνοι συγκράτησης και παράμετροι MS των υπό μελέτη αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου

Στον παραπάνω πίνακα, η μάζα Q1 αντιστοιχεί στο μητρικό ιόν που εισέρχεται στο πρώτο τετράπολο Q1, ενώ η μάζα Q3 αντιστοιχεί στη μάζα των θυγατρικών ιόντων που διέρχονται από το τρίτο τετράπολο Q3 και προκύπτουν από θραυσματοποίηση του μητρικού ιόντος. Ο χρόνος συγκράτησης (retention time) αντιπροσωπεύει το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος για ανάλυση και της έκλουσής του από τη χρωματογραφική στήλη [146] και είναι χαρακτηριστικός για την κάθε ουσία. Οι υπόλοιπες παράμετροι είναι οι εξής:

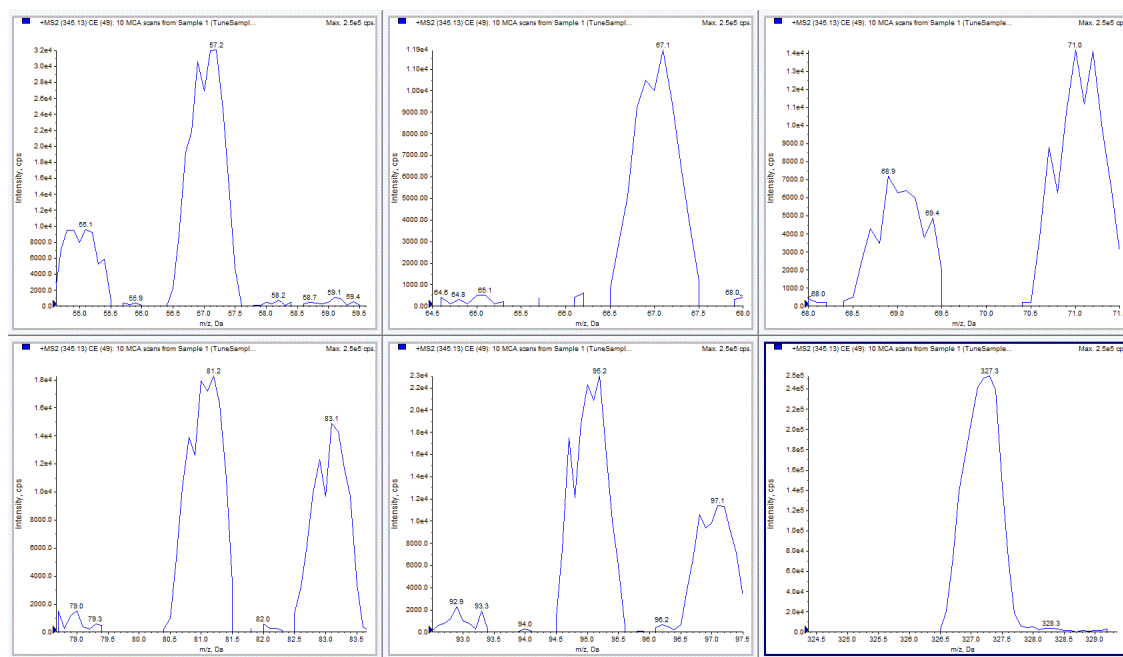
- Δυναμικό αποομαδοποίησης (DP, Declustering potential): Αντιστοιχεί στο δυναμικό που εφαρμόζεται κατά την είσοδο των μορίων στο Q0 προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η παρουσία του διαλύτη. Τα ιόντα επιταχύνονται χάρη στο δυναμικό αυτό ούτως ώστε να αποκτήσουν αρκετή ενέργεια για να διώξουν τυχόν μόρια διαλύτη που έχουν προσκολληθεί επάνω τους. Ωστόσο, ένα υψηλό δυναμικό μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση των ιόντων.
- Δυναμικό εισόδου (EP, Entrance potential): Είναι η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται προκειμένου να εστιάσει τα ιόντα στο Q1.
- Ενέργεια σύγκρουσης (CE, collision energy): Είναι η διαφορά δυναμικού μεταξύ του Q0 και του Q2 (κελί σύγκρουσης). Τα πρόδρομα ιόντα λαμβάνουν ενέργεια και επιταχύνονται μέσα στο κελί σύγκρουσης, όπου συγκρούονται με μόρια σε αέρια φάση (CAD gas, αέριο σύγκρουσης - βοηθάει στη θραυσματοποίηση των πρόδρομων ιόντων σε ιόντα-προϊόντα) προς σχηματισμό θραυσματοποιημένων ιόντων. Όσο μεγαλύτερη είναι η ενέργεια σύγκρουσης, τόσο πιο συχνά πραγματοποιείται θραυσματοποίηση.
- Δυναμικό εξόδου από το κελί σύγκρουσης (CXP, Collision cell exit potential): Το δυναμικό αυτό εστιάζει, επιταχύνει και μεταφέρει τα ιόντα από το Q2 στο Q3 [147] (Εικόνα 14).

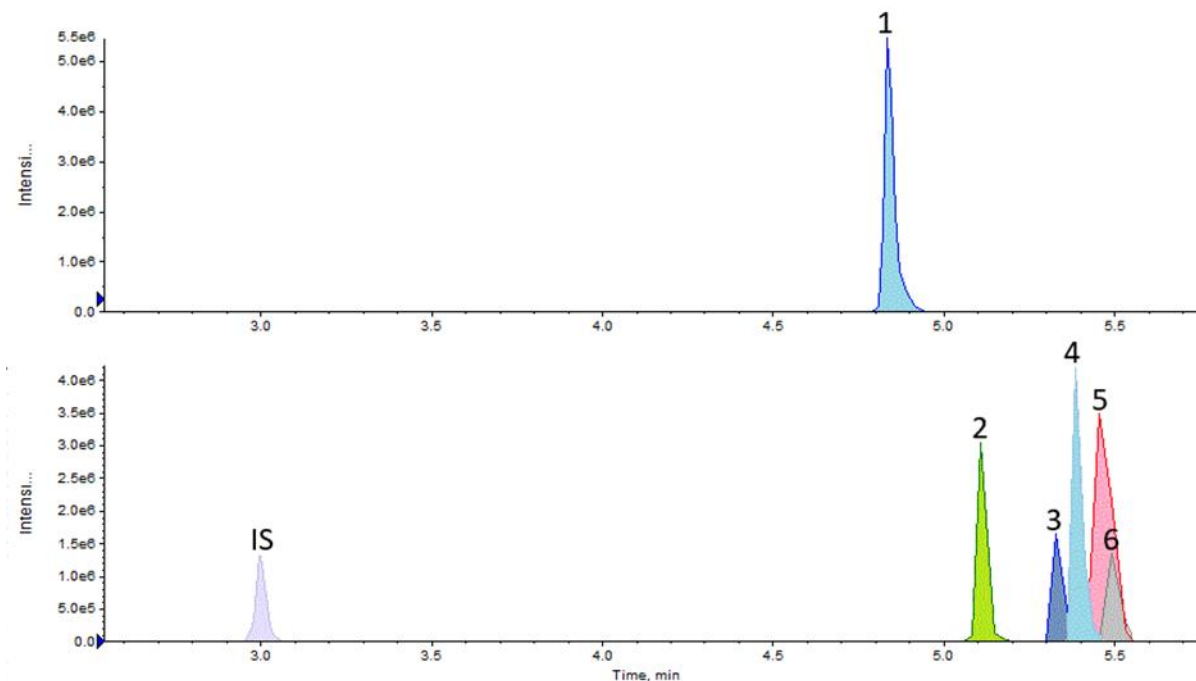


Εικόνα 14: Απεικόνιση των παραμέτρων του τριπλού τετράπολου [147]

Να σημειωθεί ότι το THC COOH μελετήθηκε τόσο με αρνητικό όσο και με θετικό ιονισμό. Με τον αρνητικό ιονισμό επιτεύχθηκε καλύτερη φασματοσκοπική απόκριση, δίνοντας υψηλότερο και πιο σταθερό σήμα (Εικόνα 18, 19). Για όλα τα

υπόλοιπα κανναβινοειδή καλύτερα αποτελέσματα απέδωσε ο θετικός ιονισμός. Εν συνεχεία επιλέχθηκαν τρία ιόντα με τη μεγαλύτερη ένταση. Χρωματογράφημα με τις υπό μελέτη ουσίες παρατίθεται στην Εικόνα 17.





Εικόνα 17: Χρωματογράφημα πρότυπου μεθανολικού διαλύματος (συγκέντρωσης 100 ng/mL) των υπό μελέτη ουσιών και του εσωτερικού προτύπου (IS: Clozapine-d4, 1:THC COOH, 2:CBD, 3:CBN, 4:Δ⁹-THC, 5: Δ⁸-THC και 6:THCA-A.

Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Ο σκοπός της διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μιας μεθόδου προσδιορισμού 6 κανναβινοειδών (Δ⁹-τετραϋδροκανναβινόλη, Δ⁸-τετραϋδροκανναβινόλη, κανναβιδιόλη, κανναβινόλη, τετραϋδροκανναβινολικό οξύ και 11-νορ-καρβοξυ-Δ⁹ τετραϋδροκανναβινόλη) σε ολικό αίμα με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μαζών σε σειρά (UHPLC-MS/MS), έπειτα από προκατεργασία με εκχύλιση υγρού-υγρού. Για το σκοπό αυτό αξιοποιήθηκαν δεδομένα από την πιο πρόσφατη βιβλιογραφία. Το αίμα που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις προήλθε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων από ζώντες δότες. Η επικύρωση της μεθόδου έγινε με βάση τις οδηγίες της Αμερικανικής Ακαδημίας Δικαστικής Τοξικολογίας (AAFS- Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019).

Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης

1. Δοκιμές

Από την ανασκόπηση της πιο πρόσφατης βιβλιογραφίας, επιλέχθηκαν 3 πιθανοί διαλύτες (Το εξάνιο, το MTBE και ο αιθανικός αιθυλεστέρας). Οι διαλύτες αυτοί δοκιμάστηκαν σε μια σειρά πειραμάτων αρχικά ξεχωριστά και έπειτα, αφότου αποκλείστηκε το εξάνιο, οι εναπομείναντες διαλύτες δοκιμάστηκαν σε αναλογία 1:1, 1:2 και 2:1 ποσότητας 800μL και 1mL. Ακόμη, δοκιμάστηκε αρχικώς ποσότητα ολικού δείγματος 200 μL και εν συνεχεία η ποσότητα αυξήθηκε στα 300 μL. Τέλος, έγιναν δοκιμές με ή χωρίς ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 (Ρύθμιση του pH στο 4,5).

2. Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων αίματος με εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE)

Σε πλαστικό φιαλίδιο Eppendorf χωρητικότητας 2 mL γίνεται ανάμειξη 300 μL δείγματος αίματος με 1 mL διαλύτη MTBE:Ethyl acetate (σε αναλογία 1:1), 20 μL Clozapine-d4 50 ng/mL (Internal Standard) και 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος NaH_2PO_4 για τη ρύθμιση του pH στο 4,5. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με vortex για 10 λεπτά και φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές (rpm). Έπειτα, η υπερκείμενη φάση παραλαμβάνεται και τοποθετείται σε καθαρά πλαστικά φιαλίδια και εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και στους 40 °C. Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 50 μL διαλύματος ανασύστασης H_2O -Acetonitrile (88-12%, v/v), αναδεύεται ήπια σε vortex για 1 λεπτό και τοποθετείται σε φιαλίδια HPLC, τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται στον αυτόματο δειγματολήπτη για την ανάλυσή τους από το σύστημα.

3. Παρασκευή λευκών (blank) διαλυμάτων

Η παρασκευή των λευκών (τυφλών) δειγμάτων έγινε με λήψη ολικού αίματος από άτομα-δότες τα οποία ήταν αρνητικό ως προς την ύπαρξη των υπό μελέτη κανναβινοειδών. Η επιβεβαίωση έγινε στα πλαίσια των αναλύσεων ρουτίνας που λαμβάνουν χώρα στο εργαστήριο με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας-συζευγμένη με φαρματοσκοπία μαζών (GC-MS).

Προετοιμασία των προτύπων βαθμονόμησης

Μεμονωμένα διαλύματα των 6 ενώσεων ενδιαφέροντος παρασκευάστηκαν με διάλυση των στερεών πρότυπων ουσιών σε μεθανόλη για να ληφθούν τελικές συγκεντρώσεις 1 mg / mL. Τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20 ° C. Τα πρότυπα διαλύματα για τις καμπύλες βαθμονόμησης και τον ποιοτικό έλεγχο παρασκευάστηκαν με περαιτέρω αραιώση των αρχικών πυκνών με μεθανόλη σε συγκεντρώσεις 100 μg/mL, 10 μg/mL, 1 μg/mL και 0.1 μg/mL. Όλα τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20 ° C. Τα πρότυπα βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν με επιμόλυνση μεταθανάτιου αίματος ελεύθερου ουσιών σε 9 επίπεδα συγκέντρωσης (0,5 – 1 – 2,5 – 5 – 10 – 25 – 50 – 75 – 100 ng/mL). Για την ευκολότερη επιμόλυνση των λευκών δειγμάτων, τα διαλύματα εργασίας (working solutions) περιείχαν μείγμα των ενώσεων αυτών.

Επικύρωση της μεθόδου

Η επικύρωση της μεθόδου είναι μια διεργασία κατά την οποία πραγματοποιούνται μια σειρά πειραμάτων προκειμένου να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητα και η αξιοπιστία της αναλυτικής μεθόδου ή μιας τροποποιημένης εκδοχής μιας ήδη επικαιροποιημένης μεθόδου. Ο σκοπός της επικύρωσης είναι πρώτον να παρέχει αντικειμενικές αποδείξεις που να καταδεικνύουν ότι η μέθοδος είναι αποδοτική για την προβλεπόμενη χρήση και δεύτερον να προσδιορίζει τους περιορισμούς της μεθόδου σε φυσιολογικές συνθήκες λειτουργίας [148]. Στην παρούσα μέθοδο έγινε πλήρης επικύρωση και το πρωτόκολλο περιελάμβανε την μελέτη της ευαισθησίας με τον προσδιορισμό των κατώτερων σημείων ανίχνευσης (LOD, Limit of Detection) και ποσοτικοποίησης (LOQ, Limit of Quantification), την επίδραση του υποστρώματος στο δείγμα (Matrix effect), την επιμόλυνση εκ μεταφοράς (Carryover effect), την γραμμικότητα (linearity), την πιστότητα με την μελέτη της επαναληψιμότητας εντός της ημέρας (intraday accuracy) και της αναπαραγωγιμότητας δια των ημερών (interday accuracy), καθώς επίσης την σταθερότητα (Stability), την ακρίβεια (Accuracy), την ανάκτηση (Recovery) ή την αποτελεσματικότητα εκχύλισης (Extraction Efficiency) και την εκλεκτικότητα (Selectivity).

Ευαισθησία (Sensitivity)

Ως ευαισθησία ορίζεται η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί τις υπό μελέτη ουσίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η ποσοτικοποίηση προσδιορίζεται με τον υπολογισμό του κατώτερου σημείου ποσοτικοποίησης (LOQ, limit of Quantification), ενώ η ανίχνευση προσδιορίζεται με τον υπολογισμό του κατώτερου σημείου ανίχνευσης (LOD, Limit of Detection). Ο προσδιορισμός των παραπάνω ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το θόρυβο (το σήμα υποβάθρου) σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Στην παρούσα μέθοδο τα LODs και LOQs υπολογίστηκαν με βάση τον λόγο σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 ($S/N=3$) και 10 ($S/N=10$), αντίστοιχα.

Επίδραση του υποστρώματος (Matrix effect)

Επίδραση του υποστρώματος ορίζεται ως οποιαδήποτε αλλαγή στο σήμα του υπό μελέτη αναλύτη, όταν εμπεριέχεται σε μια μήτρα (π.χ. ολικό αίμα, ούρα κ.α.) σε σχέση με το σήμα που εμφανίζεται όταν εμπεριέχεται σε καθαρό διαλύτη (π.χ. MeOH). Η αιτία που οφείλεται αυτό το φαινόμενο είναι η συνέκλυση συστατικών της μήτρας κατά την προκατεργασία του δείγματος. Ως αποτέλεσμα το σήμα δύναται να ενισχύεται ή να καταστέλλεται με επακόλουθο σφάλμα στον ποσοτικό προσδιορισμό του αναλύτη στο δείγμα.

Προκειμένου να καθοριστεί εάν οι ενδογενείς ουσίες που υπάρχουν στο υπόστρωμα (ολικό αίμα) θα μπορούσαν να επηρεάσουν το σήμα των υπό μελέτη μορίων κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, υπολογίστηκε η επίδραση του υποστρώματος. Αυτό πραγματοποιήθηκε από τον λόγο του σήματος των ενώσεων από επιμολυσμένο

εκχύλισμα λευκού δείγματος αίματος προς το σήμα των ενώσεων μεθανολικού δείγματος της ίδιας ακριβώς συγκέντρωσης. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (3,30 και 70 ng/mL).

Επιμόλυνσης εκ μεταφοράς (Carryover effect)

Η επιμόλυνση εκ μεταφοράς περιγράφει την εμφάνιση σήματος ενός αναλύτη σε δείγματα απαλλαγμένα από τον εν λόγω αναλύτη που αναλύονται αμέσως μετά από ένα δείγμα που είναι θετικό στον αναλύτη αυτό. Το φαινόμενο αυτό, το οποίο επί της ουσίας περιγράφει τη μεταφορά ουσίας από ένα δείγμα σε ένα άλλο, οδηγεί σε ανακριβή αποτελέσματα αφού προκαλεί σφάλματα κατά την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση. Για να διευκρινιστεί η επίδραση της επιμόλυνσης εκ μεταφοράς, τυφλά δείγματα αναλύονται αμέσως μετά από δείγματα αναφοράς ή δείγματα υψηλής συγκέντρωσης.

Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα (linearity) είναι ένα μαθηματικό μοντέλο που δείχνει τη σχέση μεταξύ της ποσότητας των υπό ανάλυση ουσιών και της αντίστοιχης απόκρισης από το όργανο που τις αναλύει (εν προκειμένω η απόκριση είναι η ένταση του σήματος των υπό ανάλυση ουσιών). Για τον υπολογισμό της γραμμικότητας, παρασκευάστηκαν 9 επιμολυσμένα δείγματα βαθμονόμησης μείγματος κανναβινοειδών (Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBN, CBD, THCA-A, THCCOOH) με εύρος συγκέντρωσης από 0,5 ng/mL έως 100 ng/mL (0,5 – 1 -2,5 – 5 – 10 – 25 -50 – 75 - 100 ng/mL) και κάθε δείγμα αναλύθηκε 3 φορές. Αποτέλεσμα, όλων των παραπάνω μετρήσεων ήταν η κατασκευή καμπύλης αναφοράς για κάθε κανναβινοειδές στο εύρος συγκέντρωσης 0,5-100 ng/mL. Η αξιολόγηση έγινε με στατιστικές μεθόδους, υπολογίζοντας την εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων ($y=ax+b$) και τον συντελεστή προσδιορισμού (Coefficient of Determination, R^2).

Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια αποτελεί μια παράμετρο που προσδιορίζει πόσο κοντά είναι μια μετρούμενη ποσότητα στην πραγματική τιμή. Για τον προσδιορισμό της ακρίβειας επιλέχθηκαν 3 επίπεδα συγκεντρώσεων μίγματος κανναβινοειδών. Μια χαμηλή συγκέντρωση (LQC=3ng/mL), μια μεσαία συγκέντρωση (MQC=30ng/mL) και μια υψηλή συγκέντρωση (HQC=70ng/mL). Από αυτές τις μετρήσεις υπολογίστηκε η ανάκτηση (Recovery, R%), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Ανάκτηση, R\%} = \frac{[\text{Αναλύτης}]_{\text{ανιχνεύτηκε}}}{[\text{Αναλύτης}]_{\text{εμβολιάστηκε}}} \times 100$$

Όπου, $[\text{Αναλύτης}]_{\text{ανιχνεύτηκε}}$ είναι η συγκέντρωση του αναλύτη που ανιχνεύτηκε τελικώς έπειτα από την προκατεργασία και την ανάλυση από το όργανο και $[\text{Αναλύτης}]_{\text{εμβολιάστηκε}}$ είναι η πραγματική συγκέντρωση του δείγματος (ή αλλιώς η

συγκέντρωση εμβολιασμού). Για να θεωρηθεί μια μέθοδος ακριβής, η ανάκτηση, R% δεν έπρεπε να διέφερε περισσότερο από το 20% για κάθε περίπτωση.

Πιστότητα μεθόδου (Precision)

Η πιστότητα (ή επαναληψιμότητα) αποτελεί μια παράμετρο που εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων μιας μεθόδου. Για τον προσδιορισμό της διενεργούνται πειράματα από τα οποία αξιολογείται η εντός της ημέρας επαναληψιμότητα (intraday precision) και η μεταξύ των ημερών αναπαραγωγιμότητα (interday precision). Μέτρο της πιστότητας αποτελεί η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (%RSD), η οποία υπολογίζεται για εντός της ημέρας ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης (standard deviation) ενός συνόλου δειγμάτων, καθορισμένης συγκέντρωσης για μια συγκεκριμένη ουσία προς το μέσο όρο της περιοχής του σήματος επί το 100, ενώ η μεταξύ των ημερών υπολογίζεται ως ο λόγος της τυπικής απόκλισης όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν για ένα καθορισμένο διάστημα, καθορισμένης συγκέντρωσης για μια συγκεκριμένη ουσία προς το μέσο όρο της περιοχής σήματος επί το 100. Σε κάθε περίπτωση η εκατοστιαία τυπική απόκλιση δεν έπρεπε να διαφέρει περισσότερο από το 15% για κάθε περίπτωση.

Στο παρόν πείραμα, η μελέτη της πιστότητας διενεργήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, χαμηλό (3ng/mL), μεσαίο (30ng/mL) και υψηλό (70ng/mL). Για την αξιολόγηση της πιστότητας εντός της ημέρας και μεταξύ των ημερών πραγματοποιήθηκαν 10 επαναλήψεις στο εκάστοτε επίπεδο συγκέντρωσης σε διάστημα 1 ημέρας και 5 ημερών αντίστοιχα.

Σταθερότητα (Stability)

Η σταθερότητα αποτελεί μια σημαντική παράμετρο, διότι αποτελεί ένα μέτρο αξιολόγησης της αλλοίωσης του δείγματος κάτω υπό ορισμένες συνθήκες ή έπειτα από τη μεσολάβηση ενός χρονικού διαστήματος.

Στο παρόν πείραμα, η μελέτη της σταθερότητας διενεργήθηκε σε ολικό αίμα σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης, χαμηλό (3ng/mL), μεσαίο (30ng/mL) και υψηλό (70ng/mL). Μελετήθηκε η σταθερότητα έπειτα από παραμονή των δειγμάτων στον αυτόματο δειγματολήπτη των δειγμάτων σε θερμοκρασία (5°C) για διάστημα 48 ωρών. Ως αποδεκτό εύρος απόκλισης θεωρήθηκε το $\pm 20\%$ της αποδεκτής ακρίβειας της μεθόδου της κάθε συγκέντρωσης του προσφάτως εμβολιασμένου δείγματος.

Ανάκτηση (Recovery)

Η ανάκτηση αποτελεί μια παράμετρο που δείχνει την ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίστηκε και αναλύθηκε τελικώς από το όργανο σε σχέση με την ποσότητα εμβολιασμού του στο βιολογικό δείγμα.

Στο παρόν πείραμα, η μελέτη της ανάκτησης έγινε σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης, χαμηλό (3ng/mL), μεσαίο (30ng/mL) και υψηλό (70ng/mL). Παρασκευάστηκαν συνολικά 6 δείγματα, τα 3 δείγματα υποβλήθηκαν σε προκατεργασία σύμφωνα με το πρωτόκολλο προκατεργασίας και τα άλλα 3 εμβολιάστηκαν με μίγμα κανναβινοειδών μετά την διαδικασία της εκχύλισης. Από την ανάλυση των παραπάνω δειγμάτων λήφθηκε ο μέσος όρος των σημάτων για τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το μίγμα κανναβινοειδών αρχικά και για τα δείγματα που εμβολιάστηκαν με το μίγμα κανναβινοειδών μετά την εκχύλιση. Η ανάκτηση υπολογίζεται ως ο λόγος του μέσου όρου του σήματος ενός συγκεκριμένου κανναβινοειδούς, δείγματος καθορισμένης συγκέντρωσης που εμβολιάστηκε πριν την εκχύλιση προς τον αντίστοιχο μέσο όρο δείγματος που εμβολιάστηκε μετά την εκχύλιση επί το 100, όπως φαίνεται στην παρακάτω εξίσωση:

$$Recovery, R\% = \frac{\text{Μέσος όρος σήματος κορυφής}_{prior\ extraction}}{\text{Μέσος όρος σήματος κορυφής}_{post\ extraction}}$$

Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Η εκλεκτικότητα αποτελεί την ικανότητα μιας μεθόδου να ανιχνεύει και να διαφοροποιεί μια αναλυόμενη ουσία από τις υπόλοιπες υπό ανάλυση ουσίες ή ακόμα και άλλων συναφών ουσιών που δύνανται να υπάρχουν στο δείγμα. Για τη μελέτη της εκλεκτικότητας αναλύθηκαν δείγματα ολικού αίματος χωρίς την προσθήκη εσωτερικού προτύπου προκειμένου να αποδειχτεί η απουσία κοινών παρεμβολών από το υπόστρωμα.

Γ. Αποτελέσματα

1. Δοκιμές

Τα αποτελέσματα των αρχικών δοκιμών έδειξαν ότι το εξάνιο ανίχνευε τις υπό μελέτη ενώσεις σε πολύ μικρή ένταση σήματος συγκριτικά με το MTBE και τον αιθανικό αιθυλεστέρα, οπότε αποκλείστηκε από περαιτέρω δοκιμές. Το MTBE και ο αιθανικός αιθυλεστέρας δοκιμάστηκαν σε αναλογία 1:1, 1:2 και 2:1 σε ποσότητα 800μL και 1mL. Τα καλύτερα αποτελέσματα απέδωσε η αναλογία διαλυτών 1:1 σε ποσότητα 1 mL. Ακόμη δοκιμάστηκε ποσότητα δείγματος 200 μL και 300 μL με τα καλύτερα αποτελέσματα να επιτυγχάνονται σε ποσότητα 300 μL δείγματος. Τέλος, η προσθήκη 200μL ρυθμιστικού διαλύματος NaH_2PO_4 με ρύθμιση του pH στο 4,5 έδωσε καλύτερα αποτελέσματα απ' ότι απουσία ρυθμιστικού διαλύματος.

2. Ανιχνευσιμότητα (Detectability)

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ), παρασκευάστηκε δείγμα συγκέντρωσης κανναβινοειδών 1ng/mL και βάση του λόγου σήματος προς θόρυβο να είναι ίσος με 3 (S/N=3) και 10 (S/N=10), αντίστοιχα υπολογίστηκαν τα LOD και LOQ για όλα τα υπό μελέτη κανναβινοειδή, τα αποτελέσματα των οποίων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ουσίες	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
THCCOOH	0,1	0,2
D8 THC	0,3	0,9
CBN	0,2	0,6
CBD	0,1	0,3
THCA A	0,2	0,7
D9 THC	0,1	0,3

Πίνακας 5: Τα LODs και LOQs για όλα τα υπό μελέτη κανναβινοειδή.

3. Επίδραση του υποστρώματος (Matrix effect)

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υπόστρωμα δεν επηρεάζει σημαντικά την ένταση του σήματος. Η διαφοροποίηση λόγω της παρουσίας του υποστρώματος βρέθηκε να είναι μικρότερη της τάξης των 17% σε δείγματα ελέγχου χαμηλής, μέσης και υψηλής συγκέντρωσης.

Ουσίες	3ng/mL	30ng/mL	70ng/mL
THCCOOH	95	84	91
D8 THC	92	86	93
CBN	83	85	97
CBD	98	88	96
THCA A	91	85	95
D9 THC	97	87	96

Πίνακας 6: Τα ποσοστά σε % ανάκτησης του λόγου των δειγμάτων αίματος προς των μεθανολικών δειγμάτων σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης (χαμηλό, μεσαίο και υψηλό).

4. Επιμόλυνσης εκ μεταφοράς (Carryover effect)

Στο παρόν πείραμα για την εξέταση του φαινομένου αυτού επιλέχθηκαν δείγματα στην υψηλότερη συγκέντρωση μίγματος κανναβινοειδών που χρησιμοποιήθηκε (100 ng/mL), τα οποία αναλύθηκαν εις τριπλούν και αμέσως μετά αναλύθηκαν τυφλά (blank) δείγματα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το φαινόμενο της επιμόλυνσης εκ μεταφοράς δεν επηρέαζε το σήμα των υπό ανάλυση δειγμάτων,

5. Γραμμικότητα (Linearity)

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν σε 9 διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, όπως περιγράφεται παραπάνω, ενώ η ανάλυση τους έγινε εις τριπλούν. Οι γραμμές παλινδρόμησης αξιολογήθηκαν με βάση τις αναλογίες των εμβαδών των κορυφών κάθε μίας από τις 6 ενώσεις με εκείνες του εσωτερικού προτύπου. Η μέθοδος έδειξε δυναμική γραμμική περιοχή από 0,5 έως 100 ng/mL με γραμμικότητα που εκφράζεται από τον συντελεστή παλινδρόμησης (R^2) και το ύψος του να ανέρχεται πάνω από 0.9945.

Ουσίες	Καμπύλη	R^2
THCCOOH	$Y=2843,4x-5328,8$	0,9945
D8 THC	$Y=857,13x-732,92$	0,9982
CBN	$Y=991,76x-343,97$	0,9968
CBD	$Y=1278,2x-1316,8$	0,9977
THCA A	$Y=1627,6x+3470,1$	0,9970
D9 THC	$Y=2368,4x-1331,7$	0,9978

Πίνακας 7: Οι εξισώσεις των ευθειών και οι συντελεστές προσδιορισμού (R^2) για καθένα από τα υπό ανάλυση κανναβινοειδή

6. Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια υπολογίστηκε από την καμπύλη βαθμονόμησης σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις χαμηλή (3ng/mL), μεσαία (30ng/mL) και υψηλή (70ng/mL) εκφραζόμενη ως ποσοστό της αναλογίας της ευρεθείσας συγκέντρωσης προς τη θεωρητική τιμή. Τα αποτελέσματα να φαίνονται συγκεντρωτικά για κάθε ουσία στον παρακάτω πίνακα:

Ουσίες	3ng/mL	30ng/mL	70ng/mL
THCCOOH	91	99	107
D8 THC	106	82	84
CBN	81	83	114
CBD	96	80	98
THCA A	81	83	82
D9 THC	85	88	81

Πίνακας 8: Τα ποσοστά ανάκτησης (%R) για κάθε υπό μελέτη κανναβινοειδές.

7. Πιστότητα μεθόδου (Precision)

Η πιστότητα (ή η επαναληψιμότητα) των αποτελεσμάτων υπολογίστηκε σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης, χαμηλή (3ng/mL), μεσαία (30ng/mL) και υψηλή (70ng/mL). Κάθε δείγμα συγκέντρωσης αναλύθηκε κατ' επανάληψη 10 φορές σε διάστημα 5 ημερών, με τα αποτελέσματα να φαίνονται συγκεντρωτικά στους παρακάτω πίνακες:

Ουσίες	3ng/mL	30ng/mL	70ng/mL
THCCOOH	9	13	7
D8 THC	4	11	13
CBN	6	7	10
CBD	6	13	9
THCA A	13	8	11
D9 THC	8	12	5

Πίνακας 9: Επαναληψιμότητα εντός της ημέρας (intraday).

Ουσίες	3ng/mL	30ng/mL	70ng/mL
THCCOOH	6	4	5
D8 THC	9	6	8
CBN	7	6	8
CBD	9	5	8
THCA A	7	5	7
D9 THC	11	6	8

Πίνακας 10: Αναπαραγωγιμότητα αποτελεσμάτων σε διάστημα 5 ημερών (interday).

8. Σταθερότητα (Stability)

Η μελέτη της σταθερότητας των ουσιών σε ολικό αίμα έγινε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης χαμηλή (3ng/mL), μεσαία (30ng/mL) και υψηλή (70ng/mL). Τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία (5°C) για 48 ώρες στον αυτόματο δειγματολήπτη. Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα ποσοστά των αναλυτών που απέμειναν συγκριτικά με την ημέρα παρασκευής και ανάλυσης τους.

Ουσίες	3ng/mL	30ng/mL	70ng/mL
THCCOOH	88	85	92
D8 THC	92	95	87
CBN	85	91	89
CBD	91	92	87
THCA A	90	83	85
D9 THC	93	92	90

Πίνακας 11: Αποτελέσματα σταθερότητας των ενώσεων για 48 ώρες στους 5°C..

9. Ανάκτηση (Recovery)

Η μελέτη της ανάκτησης έγινε σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης, χαμηλό (3ng/mL), μεσαίο (30ng/mL) και υψηλό (70ng/mL) σε δείγματα που εμβολιάστηκαν με μίγμα κανναβινοειδών πριν την εκχύλιση και σε δείγματα που εμβολιάστηκαν μετά την εκχύλιση. Από των λόγο των παραπάνω σημάτων υπολογίστηκε η % ανάκτηση (%R), με τα αποτελέσματα να φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Ουσίες	3ng/mL	30ng/mL	70ng/mL
THCCOOH	105	80	117
D8 THC	118	89	110
CBN	108	82	112
CBD	109	87	109
THCA A	113	83	115
D9 THC	113	82	106

Πίνακας 12: Τα ποσοστά της ανάκτησης (%R) τις υπό μελέτη ενώσεις.

10. Εκλεκτικότητα (Selectivity)

Μετά το πέρας των αναλύσεων βρέθηκε ότι η μέθοδος είναι εκλεκτική. Επιπλέον, δεν ανιχνεύθηκαν ψευδώς θετικές παρεμβολές από ενώσεις συν-έκλυσης, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εκτελούνται ως μέρος της μεθόδου

Δ. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Δεδομένης της δημοφιλίας της κάνναβης ως προς την ψυχοτρόπο δράση της, και επιπλέον, λόγω της χαλάρωσης των μέτρων απαγόρευσής της και του επακόλουθου κινδύνου κατάχρησης κρίθηκε αναγκαίο να επικαιροποιηθεί μια αξιόπιστη μέθοδος ικανή να προσδιορίσει 6 χαρακτηριστικά κανναβινοειδή.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε ανιχνεύει όλα τα υπό μελέτη κανναβινοειδή σε χαμηλές συγκεντρώσεις με τα LOD να κυμαίνονται από 0,1 έως 0,3 ng/mL και τα LOQ να είναι κάτω από 0,5 ng/mL για τα κύρια κανναβινοειδή (Δ^9 -THC και CBD) και τον κύριο μεταβολίτη της Δ^9 -THC (THC COOH), ενώ για όλα τα υπόλοιπα κανναβινοειδή ήταν κάτω από 1 ng/mL. Από τις καμπύλες γραμμικότητας βρέθηκε ότι οι συντελεστές προσδιορισμού, R^2 κυμαίνονταν από 0,9945 έως 0,9982. Ακόμη, διαπιστώθηκε ότι η % ανάκτηση που υπολογίστηκε από την επίδραση του υποστρώματος, την ακρίβεια και την ανάκτηση δεν υπερέβαινε το $\pm 20\%$. Η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας και διά των ημερών δεν διέφερε περισσότερο από το $\pm 15\%$, όπως επίσης και οι τιμές της σταθερότητας, οι οποίες ήταν όλες πλην μιας εντός του $\pm 15\%$. Τέλος, αποδείχτηκε ότι η μέθοδος ήταν εκλεκτική για όλες τις υπό μελέτη ουσίες και ότι δεν εμφανίζονταν το φαινόμενο της επιμόλυνσης εκ μεταφοράς.

Συμπερασματικά, αναπτύχθηκε μια μέθοδος η οποία ικανοποιεί όλα τα βιοαναλυτικά κριτήρια επικύρωσης προσφέροντας αξιόπιστα αποτελέσματα προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πρόσφατη κατάχρηση των συγκεκριμένων αυτών ουσιών.

E. Βιβλιογραφία

- [1] D. Berardinelli, A. Tini, E. Montanari, P. Berretta, and A. Di Trana, “Chapter 27 - Liquid chromatography in forensic toxicology,” in *Liquid Chromatography (Third Edition)*, vol. 2, S. Fanali, B. Chankvetadze, P. R. Haddad, C. F. Poole, and M.-L. Riekkola, Eds., Elsevier, 2023, pp. 913–941. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99969-4.00010-3>.
- [2] I. G. C. Oliveira, C. F. Grecco, I. D. de Souza, and M. E. C. Queiroz, “Current chromatographic methods to determine cannabinoids in biological samples: A review of the state-of-the art on sample preparation techniques,” Dec. 01, 2024, *Elsevier B.V.* doi: [10.1016/j.greeac.2024.100161](https://doi.org/10.1016/j.greeac.2024.100161).
- [3] *The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2017. doi: [10.17226/24625](https://doi.org/10.17226/24625).
- [4] D. C. Simiyu, J. H. Jang, and O. R. Lee, “Understanding Cannabis sativa L.: Current Status of Propagation, Use, Legalization, and Haploid-Inducer-Mediated Genetic Engineering,” May 01, 2022, *MDPI*. doi: [10.3390/plants11091236](https://doi.org/10.3390/plants11091236).
- [5] A. A. F. de Souza *et al.*, “Medicinal uses of Cannabis sp.,” *Research, Society and Development*, vol. 10, no. 7, p. e58010716930, Jun. 2021, doi: [10.33448/rsd-v10i7.16930](https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16930).
- [6] G. Santos-Sánchez *et al.*, “Hempseed (Cannabis sativa) protein hydrolysates: A valuable source of bioactive peptides with pleiotropic health-promoting effects,” Sep. 01, 2022, *Elsevier Ltd.* doi: [10.1016/j.tifs.2022.06.005](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.005).
- [7] I. J. Flores-Sanchez and R. Verpoorte, “Secondary metabolism in cannabis,” in *Phytochemistry Reviews*, Oct. 2008, pp. 615–639. doi: [10.1007/s11101-008-9094-4](https://doi.org/10.1007/s11101-008-9094-4).
- [8] D. Jin, K. Dai, Z. Xie, and J. Chen, “Secondary Metabolites Profiled in Cannabis Inflorescences, Leaves, Stem Barks, and Roots for Medicinal Purposes,” *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, Dec. 2020, doi: [10.1038/s41598-020-60172-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-60172-6).
- [9] R. G. Pertwee, “Cannabinoid pharmacology: The first 66 years,” Jan. 2006. doi: [10.1038/sj.bjp.0706406](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706406).
- [10] A. L. G. de Brito Siqueira *et al.*, “Phytocannabinoids: Pharmacological effects, biomedical applications, and worldwide prospection,” Nov. 01, 2023, *National Taiwan University*. doi: [10.1016/j.jtcme.2023.08.006](https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2023.08.006).
- [11] T. Gülck and B. L. Møller, “Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis,” Oct. 01, 2020, *Elsevier Ltd.* doi: [10.1016/j.tplants.2020.05.005](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005).
- [12] E. B. Russo, “Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects LINKED ARTICLES,” *Br J Pharmacol*, vol. 163, pp. 1344–1364, 2011, doi: [10.1111/bph.2011.163.issue-7](https://doi.org/10.1111/bph.2011.163.issue-7).
- [13] W. N. Hunter, “The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis,” Jul. 27, 2007. doi: [10.1074/jbc.R700005200](https://doi.org/10.1074/jbc.R700005200).
- [14] M. Fellermeier, W. Eisenreich, A. Bacher, and M. H. Zenk, “Biosynthesis of cannabinoids: Incorporation experiments with ¹³C-labeled glucoses,” *Eur J Biochem*, vol. 268, no. 6, pp. 1596–1604, 2001, doi: [10.1046/j.1432-1327.2001.02030.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02030.x).

- [15] S. J. Gagne, J. M. Stout, E. Liu, Z. Boubakir, S. M. Clark, and J. E. Page, "Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, no. 31, pp. 12811–12816, Jul. 2012, doi: 10.1073/pnas.1200330109.
- [16] J. M. Stout, Z. Boubakir, S. J. Ambrose, R. W. Purves, and J. E. Page, "The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes," *Plant Journal*, vol. 71, no. 3, pp. 353–365, Aug. 2012, doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.04949.x.
- [17] F. Taura, S. Morimoto, and Y. Shoyama, "Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 29, pp. 17411–17416, 1996, doi: 10.1074/jbc.271.29.17411.
- [18] F. Taura Satoshi Morimoto, Y. Shoyama, and J. Raphael Mechoulam, "First Direct Evidence for the Mechanism of A'-Tetrahydrocannabinolic Acid Biosynthesis," 1995. [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [19] S. Morimoto, K. Komatsu, F. Taura, and Y. Shoyama, "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CANNABICHROMENIC ACID SYNTHASE FROM CANNABIS SATIVA."
- [20] M. Wang *et al.*, "Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry," *Cannabis Cannabinoid Res*, vol. 1, no. 1, pp. 262–271, Jan. 2016, doi: 10.1089/can.2016.0020.
- [21] L. O. Hanuš, S. M. Meyer, E. Muñoz, O. Tagliatela-Scafati, and G. Appendino, "Phytocannabinoids: A unified critical inventory," Dec. 01, 2016, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/c6np00074f.
- [22] A. Hazekamp, J. T. Fishedick, L. Díez, A. Lubbe, and R. L. Ruhaak, "3.24 Chemistry of Cannabis."
- [23] E. C. Leas, A. L. Nobles, Y. Shi, and E. Hendrickson, "Public interest in Δ^8 -Tetrahydrocannabinol (Δ^8 -THC) increased in US states that restricted Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) use," *International Journal of Drug Policy*, vol. 101, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.drugpo.2021.103557.
- [24] S. Huang *et al.*, "Semiquantitative Screening of THC Analogues by Silica Gel TLC with an Ag(I) Retention Zone and Chromogenic Smartphone Detection," *Anal Chem*, vol. 94, no. 40, pp. 13710–13718, Oct. 2022, doi: 10.1021/acs.analchem.2c01627.
- [25] F. Grotenhermen, "Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids."
- [26] K. Bardhi, S. Coates, C. J. W. Watson, and P. Lazarus, "Cannabinoids and drug metabolizing enzymes: potential for drug-drug interactions and implications for drug safety and efficacy," 2022, *Taylor and Francis Ltd*. doi: 10.1080/17512433.2022.2148655.
- [27] M. A. Huestis, "Human cannabinoid pharmacokinetics," 2007. doi: 10.1002/cbdv.200790152.

- [28] E. J. Cox *et al.*, “A marijuana-drug interaction primer: Precipitants, pharmacology, and pharmacokinetics,” Sep. 01, 2019, *Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.001.
- [29] N. A. Desrosiers, S. K. Himes, K. B. Scheidweiler, M. Concheiro-Guisan, D. A. Gorelick, and M. A. Huestis, “Phase i and ii cannabinoid disposition in blood and plasma of occasional and frequent smokers following controlled smoked cannabis,” *Clin Chem*, vol. 60, no. 4, pp. 631–643, 2014, doi: 10.1373/clinchem.2013.216507.
- [30] P. Sharma, P. Murthy, and M. M. S. Bharath, “Birth Order and Sibling Gender Ratio of a Clinical Sample Chemistry, Metabolism, and Toxicology of Cannabis: Clinical Implications,” 2012.
- [31] M. Perez-Reyes, “Marijuana smoking: factors that influence the bioavailability of tetrahydrocannabinol,” *NIDA Res Monogr*, vol. 99, no. 1046–9516, pp. 42–62, 1990.
- [32] B. Law, P. A. Mason, A. C. Moffat, R. I. Gleadle, and L. J. King, “Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 36, no. 5, pp. 289–294, 1984, doi: 10.1111/j.2042-7158.1984.tb04376.x.
- [33] E. R. Garrett and C. A. Hunt, “Physicochemical properties, solubility, and protein binding of Δ^9 -tetrahydrocannabinol,” *J Pharm Sci*, vol. 63, no. 7, pp. 1056–1064, 1974, doi: 10.1002/jps.2600630705.
- [34] I. J. McGilveray, “Pharmacokinetics of cannabinoids,” 2005, *Hindawi Limited*. doi: 10.1155/2005/242516.
- [35] E. W. Schwilke *et al.*, “ Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC,” *Clin Chem*, vol. 55, no. 12, pp. 2180–2189, Dec. 2009, doi: 10.1373/clinchem.2008.122119.
- [36] M. E. Wall, B. M. Sadler, D. Brine, H. Taylor, and M. Perez-Reyes, “Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women.”
- [37] A. Ohlsson, J. -E Lindgren, A. Wahlen, S. Agurell, L. E. Hollister, and H. K. Gillespie, “Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking,” *Clin Pharmacol Ther*, vol. 28, no. 3, pp. 409–416, 1980, doi: 10.1038/clpt.1980.181.
- [38] C. N. Chiang, G. Barnett, and D. Brine, “Systemic absorption of Δ^9 -tetrahydrocannabinol after ophthalmic administration to the rabbit,” *J Pharm Sci*, vol. 72, no. 2, pp. 136–138, 1983, doi: 10.1002/jps.2600720210.
- [39] M. A. Elsohly *et al.*, “Rectal Bioavailability of A-9-Tetrahydrocannabinol from the Hemisuccinate Ester in Monkeys.”
- [40] B. Brunet *et al.*, “Validation of Large White Pig as an animal model for the study of cannabinoids metabolism: Application to the study of THC distribution in tissues,” *Forensic Sci Int*, vol. 161, no. 2–3, pp. 169–174, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.forsciint.2006.04.018.
- [41] E. R. Garrett and C. A. Hunt, “Pharmacokinetics of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Dogs,” *J Pharm Sci*, vol. 66, no. 3, pp. 395–407, Mar. 1977, doi: 10.1002/JPS.2600660322.

- [42] M. Widman, S. Agurell, M. Ehrnebo, and G. Jones, "Binding of (+)- and (-)- Δ^1 -tetrahydrocannabinols and (-)-7-hydroxy- Δ^1 -tetrahydrocannabinol to blood cells and plasma proteins in man," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 26, no. 11, pp. 914–916, 1974, doi: 10.1111/j.2042-7158.1974.tb09207.x.
- [43] M. Wahlqvist, I. M. Nilsson, F. Sandberg, S. Agurell~, and B. Granstrand, "BINDING OF Δ^1 -TETRAHYDROCANNABINOL TO HUMAN PLASMA PROTEINS*," Pergamon Press, 1970.
- [44] M. WIDMAN, I. M. NILSSON, J. L. G. NILSSON, S. AGURELL, H. BORG, and B. GRANSTRAND, "Plasma protein binding of 7-hydroxy- Δ -tetrahydrocannabinol: an active Δ -tetrahydrocannabinol metabolite," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 25, no. 6, pp. 453–457, 1973, doi: 10.1111/j.2042-7158.1973.tb09132.x.
- [45] I. J. McGilveray, "Pharmacokinetics of cannabinoids," 2005, *Hindawi Limited*. doi: 10.1155/2005/242516.
- [46] D. J. Harvey, "Biotransformation of the Cannabinoids."
- [47] G. NAHAS, C. LEGER, B. TOCQUE, and H. HOELLINGER, "The Kinetics of Cannabinoid Distribution and Storage With Special Reference to the Brain and Testis," *The Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 21, no. S1, Aug. 1981, doi: 10.1002/j.1552-4604.1981.tb02597.x.
- [48] A. Ohlsson, J. -E Lindgren, A. Wahlen, S. Agurell, L. E. Hollister, and H. K. Gillespie, "Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking," *Clin Pharmacol Ther*, vol. 28, no. 3, pp. 409–416, 1980, doi: 10.1038/clpt.1980.181.
- [49] G. G. Nahas, H. C. Frick, J. K. Lattimer, C. Latour, and D. Harvey, "Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa," 2002. doi: 10.1002/hup.369.
- [50] D. J. Harvey, "Biotransformation of the Cannabinoids."
- [51] S. Chayasirisobhon, "Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis," 2021, *The Permanente Federation LLC*. doi: 10.7812/TPP/19.200.
- [52] K. Watanabe, S. Yamaori, T. Funahashi, T. Kimura, and I. Yamamoto, "Cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of tetrahydrocannabinols and cannabinol by human hepatic microsomes," *Life Sci*, vol. 80, no. 15, pp. 1415–1419, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.lfs.2006.12.032.
- [53] T. M. Bland, R. L. Haining, T. S. Tracy, and P. S. Callery, "CYP2C-catalyzed delta(9)-tetrahydrocannabinol metabolism: Kinetics, pharmacogenetics and interaction with phenytoin," *Biochem Pharmacol*, vol. 70, no. 7, pp. 1096–1103, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.bcp.2005.07.007.
- [54] T. Matsunaga, Y. Lwawaki, K. Watanabe', K. Yamamoto, T. Kageyama', and H. Yoshimura, "0024-3205(95)00193-x METABOLISM OF Δ^1 -TETRAHYDROCANNABINOL BY CYTOCHROME P450 ISOZYMES PURIFIED FROM HEPATIC MICROSOMES OF MONKEYS," 1995.
- [55] K. Bardhi, S. Coates, C. J. W. Watson, and P. Lazarus, "Cannabinoids and drug metabolizing enzymes: potential for drug-drug interactions and implications for drug

- safety and efficacy,” 2022, *Taylor and Francis Ltd.* doi: 10.1080/17512433.2022.2148655.
- [56] M. A. Huestis and E. J. Cone, “Differentiating New Marijuana Use From Residual Drug Excretion in Occasional Marijuana Users*,” 1998.
 - [57] S. B. Grauwiler, J. Drewe, and A. Scholer, “Sensitivity and Specificity of Urinary Cannabinoid Detection With Two Immunoassays After Controlled Oral Administration of Cannabinoids to Humans.” [Online]. Available: <http://journals.lww.com/drug-monitoring>
 - [58] A. Gasse, M. Vennemann, H. Köhler, and J. Schürenkamp, “Toxicogenetic analysis of Δ^9 -THC-metabolizing enzymes,” *Int J Legal Med*, vol. 134, no. 6, pp. 2095–2103, Nov. 2020, doi: 10.1007/s00414-020-02380-3.
 - [59] A. Mazur *et al.*, “Characterization of human hepatic and extrahepatic UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in the metabolism of classic cannabinoids,” *Drug Metabolism and Disposition*, vol. 37, no. 7, pp. 1496–1504, Jul. 2009, doi: 10.1124/dmd.109.026898.
 - [60] K. Starke and F. I. Br, “Editor-in-Chief.”
 - [61] R. Jiang, S. Yamaori, Y. Okamoto, I. Yamamoto, and K. Watanabe, “Cannabidiol is a potent inhibitor of the catalytic activity of cytochrome P450 2C19,” *Drug Metab Pharmacokinet*, vol. 28, no. 4, pp. 332–338, Aug. 2013, doi: 10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-129.
 - [62] M. E. Wall, B. M. Sadler, D. Brine, H. Taylor, and M. Perez-Reyes, “Metabolism, disposition, and kinetics of delta-9-tetrahydrocannabinol in men and women,” *Clin Pharmacol Ther*, vol. 34, no. 3, pp. 352–363, 1983, doi: 10.1038/clpt.1983.179.
 - [63] P. L. WILLIAMS and A. C. MOFFAT, “Identification in human urine of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 32, no. 1, pp. 445–448, 1980, doi: 10.1111/j.2042-7158.1980.tb12966.x.
 - [64] M. Vandevenne, H. Vandebussche, and A. Verstraete, “Detection time of drugs of abuse in urine,” *Acta Clin Belg*, vol. 55, no. 6, pp. 323–333, 2000, doi: 10.1080/17843286.2000.11754319.
 - [65] S. A. Millar, N. L. Stone, A. S. Yates, and S. E. O’Sullivan, “A systematic review on the pharmacokinetics of cannabidiol in humans,” Nov. 26, 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fphar.2018.01365.
 - [66] C. J. Lucas, P. Galettis, and J. Schneider, “The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids,” Nov. 01, 2018, *Blackwell Publishing Ltd.* doi: 10.1111/bcp.13710.
 - [67] J. A. A. C. Heuberger *et al.*, “Population Pharmacokinetic Model of THC Integrates Oral, Intravenous, and Pulmonary Dosing and Characterizes Short- and Long-term Pharmacokinetics,” *Clin Pharmacokinet*, vol. 54, no. 2, pp. 209–219, Feb. 2015, doi: 10.1007/s40262-014-0195-5.
 - [68] S. W. Toennes, “Comparison of Cannabinoid Pharmacokinetic Properties in Occasio.”

- [69] E. Johansson, M. M. Halldin, S. Agurell, L. E. Hollister, and H. K. Gillespie, "Terminal elimination plasma half-life of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) in heavy users of marijuana," 1989.
- [70] A. Smith-Kielland, B. Skuterud, and L. Mørland, "Urinary Excretion of 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Cannabinoids in Frequent and Infrequent Drug Users*," 1999.
- [71] "karschner2009".
- [72] L. Taylor, J. Crockett, B. Tayo, and G. Morrison, "A Phase 1, Open-Label, Parallel-Group, Single-Dose Trial of the Pharmacokinetics and Safety of Cannabidiol (CBD) in Subjects With Mild to Severe Hepatic Impairment," *J Clin Pharmacol*, vol. 59, no. 8, pp. 1110–1119, Aug. 2019, doi: 10.1002/jcph.1412.
- [73] I. Ujváry and L. Hanuš, "Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy," Jan. 01, 2016, *Mary Ann Liebert Inc*. doi: 10.1089/can.2015.0012.
- [74] A. Ohlsson, J. -E Lindgren, S. Andersson, S. Agurell, H. Gillespie, and L. E. Hollister, "Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration," *Biol Mass Spectrom*, vol. 13, no. 2, pp. 77–83, 1986, doi: 10.1002/bms.1200130206.
- [75] D. Perkins *et al.*, "A Phase 1, Randomised, Placebo-Controlled, Dose Escalation Study to Investigate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Cannabidiol in Fed Healthy Volunteers," *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, vol. 45, no. 5, pp. 575–586, Oct. 2020, doi: 10.1007/s13318-020-00624-6.
- [76] P. Consroe, K. Kennedy, K. Schram, K. Kennedy, and K. SCHRAM Assay, "Assay of Plasma Cannabidiol by Capillary Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectroscopy Following High-Dose Repeated Daily Oral Administration in Humans."
- [77] *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, vol. 160. in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 160. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. doi: 10.1007/978-3-540-77604-8.
- [78] I. Matias and V. Di Marzo, "Endocannabinoids and the control of energy balance," Jan. 2007. doi: 10.1016/j.tem.2006.11.006.
- [79] W. A. Devane, F. A. Dysarz, M. R. Johnson, L. S. Melvin, and A. C. Howlett, "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.," *Mol Pharmacol*, vol. 34, no. 5, pp. 605–613, Nov. 1988, doi: 10.1016/S0026-895X(25)09876-1.
- [80] L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, and T. I. Bonner, "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA," 1990.
- [81] "LETTERS TO NATURE," 1993.
- [82] S. Zou and U. Kumar, "Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system," Mar. 13, 2018, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms19030833.

- [83] A. L. B. Terzian, V. Micale, and C. T. Wotjak, "Cannabinoid receptor type 1 receptors on GABAergic vs. glutamatergic neurons differentially gate sex-dependent social interest in mice," *European Journal of Neuroscience*, vol. 40, no. 1, pp. 2293–2298, 2014, doi: 10.1111/ejn.12561.
- [84] G. Marsicano and B. Lutz, "Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain," *European Journal of Neuroscience*, vol. 11, no. 12, pp. 4213–4225, Dec. 1999, doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00847.x.
- [85] M. Häring, G. Marsicano, B. Lutz, and K. Monory, "Identification of the cannabinoid receptor type 1 in serotonergic cells of raphe nuclei in mice," *Neuroscience*, vol. 146, no. 3, pp. 1212–1219, May 2007, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.02.021.
- [86] V. C. Oropenza, K. Mackie, and E. J. Van Bockstaele, "Cannabinoid receptors are localized to noradrenergic axon terminals in the rat frontal cortex," *Brain Res*, vol. 1127, no. 1, pp. 36–44, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.brainres.2006.09.110.
- [87] K. Mackie, "Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization," in *Life Sciences*, Aug. 2005, pp. 1667–1673. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.011.
- [88] A. Busquets-Garcia, J. Bains, and G. Marsicano, "CB 1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity," Jan. 01, 2018, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/npp.2017.206.
- [89] M. Friuli, B. Eramo, C. Sepe, M. Kiani, P. Casolini, and A. R. Zuenka, "The endocannabinoid and paracannabinoid systems in natural reward processes: possible pharmacological targets?," *Physiol Behav*, vol. 296, Jul. 2025, doi: 10.1016/j.physbeh.2025.114929.
- [90] D. Cota *et al.*, "The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, no. 3, pp. 423–431, 2003, doi: 10.1172/JCI17725.
- [91] C. J. Hillard, "Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol," 2000.
- [92] D. Parolaro, "PRESENCE AND FUNCTIONAL REGULATION OF CANNABINOID RECEPTORS IN IMMUNE CELLS," 1999.
- [93] Q. Xin, F. Xu, D. H. Taylor, J. fu Zhao, and J. Wu, "The impact of cannabinoid type 2 receptors (CB2Rs) in neuroprotection against neurological disorders," Dec. 01, 2020, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41401-020-00530-2.
- [94] X. Yu, Y. Jia, and Y. Dong, "Research progress on the cannabinoid type-2 receptor and Parkinson's disease," 2023, *Frontiers Media SA*. doi: 10.3389/fnagi.2023.1298166.
- [95] Y. Li and J. Kim, "Neuronal expression of CB2 cannabinoid receptor mRNAs in the mouse hippocampus," *Neuroscience*, vol. 311, pp. 253–267, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.10.041.
- [96] E. S. Onaivi *et al.*, "Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, Blackwell Publishing Inc., 2006, pp. 514–536. doi: 10.1196/annals.1369.052.

- [97] A. V. Stempel *et al.*, “Cannabinoid Type 2 Receptors Mediate a Cell Type-Specific Plasticity in the Hippocampus,” *Neuron*, vol. 90, no. 4, pp. 795–809, May 2016, doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.034.
- [98] H. Y. Zhang *et al.*, “Expression of functional cannabinoid CB2 receptor in VTA dopamine neurons in rats,” *Addiction Biology*, vol. 22, no. 3, pp. 752–765, May 2017, doi: 10.1111/adb.12367.
- [99] “devane1992”.
- [100] “1-s2.0-S0006291X85724370-main”.
- [101] R. : El Mechoulam *et al.*, “IDENTIFICATION OF AN ENDOGENOUS 2-MONOGLYCERIDE, PRESENT IN CANINE GUT, THAT BINDS TO CANNABINOID RECEPTORS,” 1995.
- [102] V. Di Marzo and L. De Petrocellis, “Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand?,” Dec. 05, 2012, *Royal Society*. doi: 10.1098/rstb.2011.0382.
- [103] R. G. Pertwee Editor, “Handbook of Experimental Pharmacology 231.” [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/164>
- [104] S. F. Lisboa and F. S. Guimarães, “Differential role of CB1 and TRPV1 receptors on anandamide modulation of defensive responses induced by nitric oxide in the dorsolateral periaqueductal gray,” *Neuropharmacology*, vol. 62, no. 8, pp. 2455–2462, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.02.008.
- [105] S. E. O’Sullivan, “An update on PPAR activation by cannabinoids,” Jun. 01, 2016, *John Wiley and Sons Inc*. doi: 10.1111/bph.13497.
- [106] P. E. Castillo, T. J. Younts, A. E. Chávez, and Y. Hashimoto-dani, “Endocannabinoid Signaling and Synaptic Function,” Oct. 04, 2012. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.020.
- [107] I. Katona and T. F. Freund, “Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease,” Sep. 2008. doi: 10.1038/nm.f.1869.
- [108] M. Kano, T. Ohno-Shosaku, Y. Hashimoto-dani, M. Uchigashima, and M. Watanabe, “Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission,” Jan. 2009. doi: 10.1152/physrev.00019.2008.
- [109] B. E. Alger and J. Kim, “Supply and demand for endocannabinoids,” Jun. 2011. doi: 10.1016/j.tins.2011.03.003.
- [110] B. Lutz, G. Marsicano, R. Maldonado, and C. J. Hillard, “The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress,” Dec. 01, 2015, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrn4036.
- [111] J. Liu *et al.*, “A biosynthetic pathway for anandamide,” 2006. [Online]. Available: <https://www.pnas.org>
- [112] N. Murataeva, A. Straiker, and K. Mackie, “Themed Section: Cannabinoids 2013 REVIEW Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS LINKED ARTICLES,” 2013, doi: 10.1111/bph.2014.171.issue-6.
- [113] J. L. Blankman, G. M. Simon, and B. F. Cravatt, “A Comprehensive Profile of Brain Enzymes that Hydrolyze the Endocannabinoid 2-Arachidonoylglycerol,” *Chem Biol*, vol. 14, no. 12, pp. 1347–1356, Dec. 2007, doi: 10.1016/j.chembiol.2007.11.006.

- [114] C. A. Rouzer and L. J. Marnett, “Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: Cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways,” Oct. 12, 2011. doi: 10.1021/cr2002799.
- [115] H. C. Furr, “Functions and Actions of Retinoids and Carotenoids: Building on the Vision of James Allen Olson Analysis of Retinoids and Carotenoids: Problems Resolved and Unsolved 1,” 2004.
- [116] J. Durner and D. C. Watts, “Principles of Analytical Chemistry for Toxicology,” in *Regulatory Toxicology: Volumes 1-2, Second Edition*, vol. 1, Springer International Publishing, 2021, pp. 455–498. doi: 10.1007/978-3-030-57499-4_91.
- [117] “What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ? : SHIMADZU (Shimadzu Corporation).” Accessed: May 14, 2025. [Online]. Available: https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html
- [118] V. R. Meyer, “Practical High-Performance Liquid Chromatography: Fifth Edition,” *Practical High-Performance Liquid Chromatography: Fifth Edition*, pp. 1–402, Apr. 2010, doi: 10.1002/9780470688427.
- [119] Ho, “Figure 1. Mechanism of electrospray ionisation,” 2003.
- [120] “Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry - Chhabil Dass - Βιβλία Google.” Accessed: May 18, 2025. [Online]. Available: https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=CYx9wzBzllsC&oi=fnd&pg=PR7&dq=7%5D+C.+Dass,+Basics+of+mass+spectrometry,+in:+Fundamentals+of+Contemporary+Mass++Spectrometry,+John+Wiley+%26+Sons,+Inc,+Hoboken,+New+Jersey,+2007,+pp.+3%E2%80%9314&ots=fmUVzQUgW7&sig=Ng4PegNrEG4NfP_6uAr4BeU8J-A&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [121] J. Greaves and J. Roboz, “Mass Spectrometry for the Novice.”
- [122] J. H. Gross, “Mass Spectrometry.”
- [123] C. Shackleton, “Clinical steroid mass spectrometry: A 45-year history culminating in HPLC-MS/MS becoming an essential tool for patient diagnosis,” Aug. 2010. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.017.
- [124] M. Wilm, “Principles of electrospray ionization,” Jul. 2011. doi: 10.1074/mcp.M111.009407.
- [125] L. Konermann, E. Ahadi, A. D. Rodriguez, and S. Vahidi, “Unraveling the mechanism of electrospray ionization,” *Anal Chem*, vol. 85, no. 1, pp. 2–9, Jan. 2013, doi: 10.1021/ac302789c.
- [126] J. G. van der Gugten, “Tandem mass spectrometry in the clinical laboratory: A tutorial overview,” Jan. 01, 2020, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.clinms.2019.09.002.
- [127] “Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry - Chhabil Dass - Βιβλία Google.” Accessed: May 18, 2025. [Online]. Available: https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=CYx9wzBzllsC&oi=fnd&pg=PR7&dq=C.+Dass,+Tandem+Mass+Spectrometry,+in:+Fundamentals+of+Contemporary+Mass++Spectrometry,+John+Wiley+%26+Sons,+Inc,+Hoboken,+New+Jersey,+2007,+pp.+119+150,+https://doi.org/10.1002/9780470118498.ch4&ots=fmUVzQVLve&sig=ht5n8zne59O500gIfk106MDiI7c&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

- [128] R. B. Van Breemen and E. M. Martinez, "Best Practice in Mass Spectrometry for LC-MS," in *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations*, Wiley, 2013, pp. 205–216. doi: 10.1002/9781118671276.ch16.
- [129] K. S. Y. Leung and B. M. W. Fong, "LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: Has its time come?," Apr. 01, 2014, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s00216-013-7542-5.
- [130] A. Westman-Brinkmalm and G. Brinkmalm, "Tandem Mass Spectrometry," in *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., 2008, pp. 89–103. doi: 10.1002/9780470395813.ch3.
- [131] . Ju-Seop Kang, *Principles and Applications of LC-MS*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- [132] "CBR_30_19".
- [133] J. D. Physik, C. Meng, M. Mann, and J. Fenn, "Atoms, Molecules and Clusters Of protons or proteins ' A beam's a beam for a ' that." (O.S. Burns), " 1988.
- [134] "Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation ... - Βιβλία Google." Accessed: May 18, 2025. [Online]. Available: [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=A0ccqBiov78C&oi=fnd&pg=PA3&dq=+P.+Kearle,+U.H.+Verkerk,+On+the+Mechanism+of+Electrospray+Ionization+Mass++Spectrometry+\(ESIMS\),+in:+R.B.+Cole+\(Ed.\),+Electrospray+and+MALDI+Mass++Spectrometry:+Fundamentals,+Instrumentation,+Practicalities,+and+Biological++Applications,+second+ed.,+J+Wiley+and+Sons,+2010,+pp.+3%E2%80%93348,+https://doi.org/++10.1002/9780470588901.ch1.&ots=5hSjA8J_6g&sig=_AMwLohPwwpGN37e1w03Wl0Mlnw&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=A0ccqBiov78C&oi=fnd&pg=PA3&dq=+P.+Kearle,+U.H.+Verkerk,+On+the+Mechanism+of+Electrospray+Ionization+Mass++Spectrometry+(ESIMS),+in:+R.B.+Cole+(Ed.),+Electrospray+and+MALDI+Mass++Spectrometry:+Fundamentals,+Instrumentation,+Practicalities,+and+Biological++Applications,+second+ed.,+J+Wiley+and+Sons,+2010,+pp.+3%E2%80%93348,+https://doi.org/++10.1002/9780470588901.ch1.&ots=5hSjA8J_6g&sig=_AMwLohPwwpGN37e1w03Wl0Mlnw&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [135] "Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation ... - Βιβλία Google." Accessed: May 18, 2025. [Online]. Available: [https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=A0ccqBiov78C&oi=fnd&pg=PA49&dq=%5D+N.B.+Cech,+C.G.+Enkef,+Selectivity+in+Electrospray+Ionization+Mass+Spe ctrometry,++in:+R.B.+Cole+\(Ed.\),+Electrospray+and+MALDI+Mass+Spectrometry:+Fundamentals,++Instrumentation,+Practicalities,+and+Biological+Applications,+sec ond+ed.,+John++Wiley+%26+Sons,+Inc.,+2010,+pp.+49%E2%80%93373.&ots=5hSjA8J06h&sig=QrGvQHU4XVrwGoQ-FP2UrBAv3jU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.gr/books?hl=el&lr=&id=A0ccqBiov78C&oi=fnd&pg=PA49&dq=%5D+N.B.+Cech,+C.G.+Enkef,+Selectivity+in+Electrospray+Ionization+Mass+Spe ctrometry,++in:+R.B.+Cole+(Ed.),+Electrospray+and+MALDI+Mass+Spectrometry:+Fundamentals,++Instrumentation,+Practicalities,+and+Biological+Applications,+sec ond+ed.,+John++Wiley+%26+Sons,+Inc.,+2010,+pp.+49%E2%80%93373.&ots=5hSjA8J06h&sig=QrGvQHU4XVrwGoQ-FP2UrBAv3jU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- [136] R. E. March, "Quadrupole ion traps," *Mass Spectrom Rev*, vol. 28, no. 6, pp. 961–989, Nov. 2009, doi: 10.1002/mas.20250.
- [137] J. Durner and D. C. Watts, "Principles of Analytical Chemistry for Toxicology," in *Regulatory Toxicology: Volumes 1-2, Second Edition*, vol. 1, Springer International Publishing, 2021, pp. 455–498. doi: 10.1007/978-3-030-57499-4_91.
- [138] "cbr_32_1_005".
- [139] S. Amir Ashraf, S. Nazir, M. Adnan, and Z. Rashid Azaz Ahmad Azad, "UPLC-MS: An Emerging Novel Technology and Its Application in Food Safety," in *Analytical Chemistry - Advancement, Perspectives and Applications*, IntechOpen, 2021. doi: 10.5772/intechopen.92455.

- [140] A. Kumar Pandey, J. Singh, and A. Kumar, "Significance of Blood and its Identification: A Perspective in Forensic Investigation," 2020. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/357573630>
- [141] S. Jones, C. McGowan, S. Boyle, Y. Ke, C. H. M. Chan, and H. Hwang, "An overview of sample preparation in forensic toxicology," *WIREs Forensic Science*, vol. 4, no. 2, Mar. 2022, doi: 10.1002/wfs2.1436.
- [142] C. S. Hirsch *et al.*, "Carboxyhemoglobin Concentrations in Flash Fire Victims Report of Six Simultaneous Fire Fatalities without Elevated Carboxyhemoglobin Downloaded from," 2016. [Online]. Available: <http://ajcp.oxfordjournals.org/>
- [143] N. Panigrahi *et al.*, "Cyanide toxicity!! Colour of blood says it all," *Indian Journal of Critical Care Medicine*, vol. 23, no. 3, pp. 155–156, Mar. 2019, doi: 10.5005/jp-journals-10071-23141.
- [144] N. Manousi and V. Samanidou, "Green sample preparation of alternative biosamples in forensic toxicology," *Sustain Chem Pharm*, vol. 20, May 2021, doi: 10.1016/j.scp.2021.100388.
- [145] D. A. Wells, "Sample preparation for mass spectrometry applications," in *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry: Small Molecules, Peptides, and Pathogens*, Elsevier, 2018, pp. 67–91. doi: 10.1016/B978-0-12-816063-3.00003-7.
- [146] "High Performance Liquid Chromatography - Chemistry LibreTexts." Accessed: May 26, 2025. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography)
- [147] "Learn with Lin about LC–MS bioanalysis: part III tune the triple quadrupole system - Bioanalysis Zone." Accessed: May 24, 2025. [Online]. Available: https://www.bioanalysis-zone.com/learn-with-lin-about-lc-ms-bioanalysis-part-iii-tune-the-triple-quadrupole-system_covance/
- [148] "Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology," *J Anal Toxicol*, vol. 37, no. 7, pp. 452–474, Sep. 2013, doi: 10.1093/jat/bkt054.