



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ «ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ-  
ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ,  
Δ<sup>9</sup>-ΤΕΤΡΑΪΔΡΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΟΞΙΝΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ  
ΤΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ  
ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ**

**Χατζηδούκα Βασιλική - Ζωή**

**Φαρμακοποιός**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Αθήνα 2021**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ, Δ<sup>9</sup>-ΤΕΤΡΑΪΔΡΟΚΑΝΝΑΒΙΝΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΟΥ  
ΟΞΙΝΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗ ΤΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ  
ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΚΑΝΝΑΒΙΔΙΟΛΗΣ**

**ΧΑΤΖΗΔΟΥΚΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ – ΖΩΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

I. Παπουτσής, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

I. Παπουτσής, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ

E. Παντερή, Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ

I. Ντότσικας, Αναπληρωτής Καθηγητής, ΕΚΠΑ



## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α., «Φαρμακευτική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας». Ο τίτλος της εργασίας είναι «Προσδιορισμός κανναβιδιόλης, Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης και του όξινου μεταβολίτη της σε βιολογικά υλικά ασθενών που λαμβάνουν προϊόντα κανναβιδιόλης».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής, Καθηγήτρια κα. Χαρά Σπηλιοπούλου η οποία με δέχτηκε στο χώρο του εργαστηρίου για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Ιωάννη Παπουτσή για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθειά του και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια διενέργειας των πειραμάτων καθώς και κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Η εκπόνηση αυτής της διπλωματικής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την επικούρηση του καθηγητή μου ο οποίος μού έδειξε τις αρχές λειτουργίας βάσει των οποίων λειτουργεί ένα τοξικολογικό εργαστήριο και με βοήθησε να ενσωματωθώ στο χώρο.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, κα. Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής Σχολής Αθηνών και τον κ. Ιωάννη Ντότσικα, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας της Φαρμακευτικής Σχολής Αθηνών για την προσεκτική ανάγνωση και αξιολόγηση της διπλωματικής εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Σωτήρη Αθανασέλη για την αμέριστη συμβολή του καθ' όλη την πορεία της μελέτης αυτής, την Καθηγήτρια κα. Μαρία Στεφανίδου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Αρτεμησία Ντονά.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τάνια Ντούπα για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Προς όλα τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής Τοξικολογίας, εκφράζω τις ευχαριστίες μου για την αρμονική συνεργασία σε όλα τα επίπεδα όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης, θερμές ευχαριστίες σε όλα τα άτομα που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη ως εθελόντες, από τους οποίους λήσθησαν τα δείγματα, καθώς επίσης και σε όσους συνέβαλλαν στη δειγματοληψία, και κυρίως στην κα. Μήλιου και τον κ. Αθανασέλη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και τους φίλους μου για την ψυχολογική και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

# Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη .....	9
Abstract .....	11
Κατάλογος συντομογραφιών .....	13
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	15
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή στην κάνναβη .....</b>	<b>17</b>
1.1 Ιστορικά στοιχεία.....	17
1.2 Βοτανικά στοιχεία .....	17
1.3 Χημικά συστατικά κάνναβης.....	19
1.3.1 Φυτοκανναβινοειδή .....	19
1.3.2 Τερπενοειδή .....	24
1.4 Βιοσύνθεση φυτοκανναβινοειδών .....	25
1.5 Φαινότυποι κάνναβης .....	27
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Φαρμακολογία κανναβιδιόλης και άλλων φυτοκανναβινοειδών .....</b>	<b>29</b>
2.1 Ενδοκανναβινοειδές σύστημα .....	29
2.1.1 Υποδοχείς κανναβινοειδών.....	29
2.1.2 Υποδοχείς εκτός ενδοκανναβινοειδούς συστήματος.....	30
2.1.3 Ενδοκανναβινοειδή.....	30
2.1.4 Συνθετικά κανναβινοειδή .....	31
2.2 Μηχανισμός δράσης κανναβιδιόλης και λοιπών κανναβινοειδών .....	32
2.3 Φαρμακοκινητική κανναβιδιόλης.....	34
2.3.1 Απορρόφηση.....	34
2.3.2 Κατανομή.....	35
2.3.3 Βιομετατροπή .....	35
2.3.4 Απέκκριση.....	37
2.4 Φαρμακοκινητική $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης.....	37
2.4.1 Απορρόφηση.....	37
2.4.2 Κατανομή.....	38
2.4.3 Βιομετατροπή .....	38
2.4.4 Απέκκριση.....	40
2.5 Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις κανναβιδιόλης .....	40
2.6 Θεραπευτική χρήση κανναβιδιόλης .....	41
2.6.1 Επιληψία .....	41

2.6.2 Κατάθλιψη και άγχος.....	42
2.6.3 Ψυχώσεις.....	42
2.6.4 Νόσος Parkinson.....	42
2.6.5 Νόσος Alzheimer.....	43
2.6.6 Καρκίνος.....	43
2.6.7 Πόνος και ναυτία / έμετος.....	45
2.6.8 Άλλες χρήσεις.....	45
2.7 Τοξικότητα κανναβιδιόλης και Δ <sup>9</sup> -τετραϋδροκανναβινόλης.....	46
2.8 Προϊόντα κανναβιδιόλης.....	47
2.8.1 Epidiolex.....	47
2.8.2 Sativex.....	48
2.8.3 Άλλα προϊόντα κανναβιδιόλης.....	49
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων προσδιορισμού των κανναβινοειδών στα βιολογικά υλικά.....</b>	<b>51</b>
3.1 Βιολογικά δείγματα.....	51
3.2 Μέθοδοι εκχύλισης.....	51
3.3 Αναλυτικές τεχνικές.....	53
3.3.1 Αεριοχρωματογραφία (GC).....	53
3.3.2 Υγροχρωματογραφία (LC).....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Δικαστικά ζητήματα λόγω χρήσης προϊόντων κανναβιδιόλης.....</b>	<b>67</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>71</b>
<b>Σκοπός.....</b>	<b>73</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Οργανολογικός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός.....</b>	<b>75</b>
5.1 Οργανολογικός εξοπλισμός.....	75
5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	76
5.3 Διαλύτες και αντιδραστήρια.....	77
5.4 Στήλες εκχύλισης.....	77
5.5 Βιολογικό υπόστρωμα.....	78
5.6 Πρότυπες ουσίες αναφοράς, διαλύματα παρακαταθήκης.....	78
5.7 Μικτά διαλύματα εργασίας.....	79
5.8 Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων και αντιδραστηρίων.....	82
5.9 Μίγματα διαλυτών.....	82
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου προσδιορισμού των κανναβινοειδών στο πλάσμα.....</b>	<b>85</b>
6.1 Εσωτερικό πρότυπο.....	85

6.2 Παραγωγοποίηση.....	86
6.3 Χρωματογραφικές συνθήκες .....	89
6.4 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης.....	90
6.5 Τελική αναπτυχθείσα μέθοδος .....	94
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Πρωτόκολλο επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου .....</b>	<b>97</b>
7.1 Εκλεκτικότητα .....	97
7.2 Ειδικότητα .....	97
7.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	98
7.4 Γραμμικότητα .....	98
7.5 Ανάκτηση .....	98
7.6 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης .....	99
7.7 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα .....	99
7.8 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών .....	100
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Αποτελέσματα επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου .....</b>	<b>103</b>
8.1 Εκλεκτικότητα .....	103
8.2 Ειδικότητα .....	106
8.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ).....	107
8.4 Γραμμικότητα .....	110
8.5 Ανάκτηση .....	112
8.6 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης .....	112
8.7 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα .....	114
8.8 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών .....	121
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Μέθοδος προσδιορισμού των κανναβινοειδών στα ούρα.....</b>	<b>123</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Προσδιορισμός των κανναβινοειδών σε δείγματα ατόμων που λάμβαναν σκεύασμα κανναβιδιόλης .....</b>	<b>129</b>
<b>Συζήτηση.....</b>	<b>135</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>	<b>143</b>





## Περίληψη

Η κάνναβη αποτελεί το πιο συχνό παράνομο ναρκωτικό που χρησιμοποιείται και εμπορεύεται παγκοσμίως. Το βασικό συστατικό της κάνναβης στο οποίο οφείλονται οι ψυχοδραστικές ιδιότητες της είναι η  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^9$ -THC), ενώ πολύ σημαντική ένωση του φυτού αποτελεί επίσης η κανναβιδιόλη (CBD). Η CBD δεν έχει ψυχότροπες δράσεις, ενώ παρουσιάζει ευεργετική δράση σε διάφορες διαταραχές του ΚΝΣ. Γι' αυτό το λόγο, τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αύξηση στην χρήση προϊόντων κανναβιδιόλης για την ανακούφιση του πόνου, τη βελτίωση του ύπνου και τη μείωση του άγχους, ενώ έχουν ήδη εγκριθεί δύο σκευάσματα για τη διαχείριση επιληπτικών κρίσεων και των συμπτωμάτων της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Αν και οι συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC που βρίσκονται στα προϊόντα αυτά είναι χαμηλές, είναι γνωστό πως η  $\Delta^9$ -THC και κυρίως οι μεταβολίτες της συσσωρεύονται στον οργανισμό. Η  $\Delta^9$ -THC βιομετατρέπεται στον ανθρώπινο οργανισμό κυρίως στον ανενεργό μεταβολίτη της, την 11-νορ-9-καρβοξυ- $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη (11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC), και η ανίχνευση της  $\Delta^9$ -THC και του μεταβολίτη της στα βιολογικά υλικά αποτελεί δείκτη χρήσης κάνναβης κατά τη διερεύνηση υποθέσεων δικαστικού ενδιαφέροντος. Εγείρεται, το ερώτημα αν η λήψη σκευασμάτων κανναβιδιόλης από ασθενείς μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την ανίχνευση αυτών των ουσιών στα βιολογικά τους υλικά και συνεπώς την παρερμηνεία των αποτελεσμάτων των τοξικολογικών αναλύσεων, δεδομένου μάλιστα της μηδενικής ανοχής του ελληνικού νόμου ως προς τη χρήση παράνομης κάνναβης αλλά και την οδήγηση υπό την επήρεια καννάβης.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της CBD και η διερεύνηση ανίχνευσης της  $\Delta^9$ -THC και του μεταβολίτη της, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στο πλάσμα και στα ούρα ατόμων που λαμβάνουν προϊόντα κανναβιδιόλης. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε αναλυτική μέθοδος με τη χρήση της τεχνικής της αέριοχρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) και μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε σε βιολογικά υλικά ασθενών που λαμβάνουν προϊόντα κανναβιδιόλης. Η κατεργασία των δειγμάτων πλάσματος περιελάμβανε, αρχικά, καταβύθιση των πρωτεϊνών του πλάσματος με ακετονιτρίλιο, στη συνέχεια, απομόνωση των υπό μελέτη ουσιών από το πλάσμα μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας στήλες Bond Elut LRC Certify II και τέλος, παραγωγοποίηση με BSTFA με 1% TMCS. Κατά την επικύρωση της παραπάνω μεθόδου, η οποία έλαβε χώρα σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες ελέγχθηκαν τα παρακάτω χαρακτηριστικά ποιότητας της μεθόδου: εκλεκτικότητα, ειδικότητα, γραμμικότητα, κατώτατα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, επαναληψιμότητα, ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, ορθότητα εντός και διά των ημερών και ανάκτηση.

Στη συνέχεια, η μέθοδος δοκιμάστηκε και επαληθεύτηκε για τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών και στα ούρα.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά βιολογικά δείγματα ατόμων που έλαβαν προϊόν κανναβιδιόλης. Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας προκύπτει το συμπέρασμα πως μπορεί να υπάρξει παρερμηνεία στην αξιολόγηση των θετικών αποτελεσμάτων μιας τοξικολογικής εξέτασης για το 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στο πλάσμα και τα ούρα, καθώς και για την  $\Delta^9$ -THC στο αίμα μετά τη λήψη σκευασμάτων κανναβιδιόλης. Η  $\Delta^9$ -THC είναι πιθανό να βρεθεί αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι ο μεταβολίτης της  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, ανιχνεύεται και στα ούρα και στο πλάσμα των ατόμων που έλαβαν μέρος στην μελέτη εγείρουν ερωτήματα και προβληματισμούς δικαστικής φύσεως ως προς την ερμηνεία των απαντήσεων των τοξικολογικών εξετάσεων και αυτό διότι τόσο η  $\Delta^9$ -THC όσο και ο μεταβολίτης της αποτελούν δείκτες της παράνομης χρήσης κάνναβης. Για το λόγο αυτό υπάρχει έντονη ανάγκη αναζήτησης νέων δεικτών στα βιολογικά υλικά που αναλύονται στο πλαίσιο διερεύνησης υποθέσεων δικαστικού και κλινικού ενδιαφέροντος για τον διαχωρισμό των ασθενών που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα κανναβιδιόλης από τους χρήστες παράνομης.

**Λέξεις κλειδιά:** κανναβιδιόλη,  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, πλάσμα, ούρα, αεριοχρωματογραφία, φασματομετρία μαζών

## Abstract

Cannabis is the most common illicit drug used and marketed worldwide. The main constituent of cannabis is  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), which is responsible for the psychoactive properties of cannabis, while a very important compound of the plant is also cannabidiol (CBD). CBD has no psychotropic effects, while it has a beneficial effect on various CNS disorders. For this reason, in recent years, there has been an increase in the consumption of cannabidiol products for pain relief, improvement of sleep and stress reduction, while two CBD formulations have already been approved for the management of seizures and symptoms of multiple sclerosis. Although the concentrations of  $\Delta^9$ -THC found in these products are low, it is well known that  $\Delta^9$ -THC and mainly its metabolites accumulate in the body.  $\Delta^9$ -THC is biotransformed in the human body mainly to its inactive metabolite, 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC), and the detection of  $\Delta^9$ -THC and its metabolite in biological materials is an indicator of cannabis use during the investigation of forensic and clinical cases. A question arises whether the intake of cannabidiol by patients can result in the detection of  $\Delta^9$ -THC and 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC in their biological samples leading to the misinterpretation of the results of toxicological analysis, taking into consideration the zero tolerance of Greek law regarding the use of illegal cannabis and driving under the influence of cannabis.

The aim of this study was the determination of CBD and the detection of  $\Delta^9$ -THC and its metabolite, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC in the plasma and urine of individuals who receive cannabidiol products. For this reason, an analytical method for their determination was developed and validated using the technique of gas chromatography in combination with mass spectrometry (GC-MS). In addition, the method was applied to the biological samples of patients who receive cannabidiol products. The process of plasma samples first involved precipitation of plasma proteins using acetonitrile, then isolation of the substances from the plasma by solid phase extraction using Bond Elut LRC Certify II columns and finally derivatization with BSTFA with 1% TMCS. During the validation of the method, which was performed according to the international guidelines, the following quality characteristics of the method were tested: selectivity, specificity, linearity, limits of detection and quantification, intra- and inter-day accuracy and precision and finally recovery. The method was then tested and verified for the determination of the substances in the urine.

The developed method was applied to real biological samples of individuals receiving cannabidiol product. The results showed that there may be misinterpretation in the evaluation

of positive results of a toxicological analysis for 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC in plasma and urine, as well as for  $\Delta^9$ -THC in plasma after receiving cannabidiol products.  $\Delta^9$ -THC is likely to be found in plasma although in low concentrations. This fact, combined with the fact that the metabolite of  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, is detected in both urine and plasma of the subjects of this study, raises questions and concerns of a judicial nature regarding the interpretation of the results of a toxicological analysis, as both  $\Delta^9$ -THC and its metabolite are indicators of cannabis use. For this reason it is essential to look for new markers in biological materials that are analyzed during the toxicological investigation of cases of forensic and clinical interest in order to distinguish patients receiving a cannabidiol product from illegal users of cannabis.

Keywords: cannabidiol,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, plasma, gas chromatography, mass spectrometry

## Κατάλογος συντομογραφιών

2-AG	2-arachidonoylglycerol
AEA	Anandamide
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
AUC	Area under the curve
BSTFA	Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CB1/ CB2	Cannabinoid receptor 1/ Cannabinoid receptor 2
CBC	Cannabichromene
CBCA	Cannabichromenic acid
CBCAS	Cannabichromenic acid synthase
CBCVA	Cannabichromevarinic acid
CBD	Cannabidiol
CBDA	Cannabidiolic acid
CBDV	Cannabidivarin
CBDVA	Cannabidivarinic acid
CBE	Cannabielsoin
CBG	Cannabigerol
CBGA	Cannabigerolic acid
CBGAS	Cannabigerolic acid synthase
CBGVA	Cannabigerovarinic acid
CBL	Cannabicyclol
CBN	Cannabinol
CBNA	Cannabinolic acid
CBND	Cannabinodiol
CBT	Cannabitriol
CBV	Cannabivarin
CBVD	Cannabinodivarin
CI	Chemical ionization
Cmax	Maximum concentration
ECS	Endocannabinoid system
EI	Electron ionization
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray ionization

FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame ionization detector
GC	Gas chromatography
GOT	Geranyl diphosphate:olivetolate geranyltransferase
GPCR	G protein-coupled receptors
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	High-performance liquid chromatography
ICH	International Council for Harmonisation
IS	Internal standard
LC	Liquid chromatography
LLE	Liquid-liquid extraction
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MS	Mass spectrometry
MSTFA	N-Trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide
NCI	Negative chemical ionization
PCI	Positive chemical ionization
PFPP	Pentafluorophenylpropyl
PPARs	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
QC	Quality control samples
SIM	Single Ion Monitoring
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase micro-extraction
TFAA	Trifluoroacetic anhydride
THC	Tetrahydrocannabinol
THCA	Tetrahydrocannabinolic acid
THCAS	Tetrahydrocannabinolic acid synthase
THCV	Tetrahydrocannabivarin
THCVA	Tetrahydrocannabivarinic acid
TMCS	Trimethylchlorosilane
Tmax	Time of maximum concentration
TRP	Transient receptor potential
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
UHPLC	Ultra-high-performance liquid chromatography

# **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή στην κάνναβη

## 1.1 Ιστορικά στοιχεία

Η κάνναβη είναι ένα ποώδες ετήσιο φυτό γνωστό από την αρχαιότητα. Ως περιοχές προέλευσης και πρωτογενούς εξάπλωσης έχουν προταθεί η Κεντρική και η Νοτιοανατολική Ασία. Ωστόσο, έχουν υπάρξει αναφορές της και σε αρχαία κείμενα άλλων λαών, όπως των Ινδών, Ελλήνων, Ρωμαίων, Αιγύπτιων, Αράβων. Η καλλιέργειά της είχε σκοπό την παραγωγή ινών, χαρτιού, τροφής και φαρμάκων. Επίσης, η κάνναβη είχε χρησιμοποιηθεί σε θρησκευτικές τελετές, καθώς και για ψυχαγωγικούς λόγους. Η πρώτη καταγραφή της ιατρικής χρήσης της κάνναβης προήλθε από τον αυτοκράτορα Chen Nung, περίπου 5.000 χρόνια πριν στην Κεντρική Ασία, για τη θεραπεία της ελονοσίας, των ρευματοπαθειών και της κόπωσης. Με την πάροδο των χρόνων, πολλοί ερευνητές μελέτησαν το φυτό και τις πιθανές φαρμακολογικές του ιδιότητες, με την Αγγλική ιατρική του 19<sup>ο</sup> αιώνα να προτείνει την κάνναβη ως ένα αναλγητικό, αντιφλεγμονώδη, αντιεμετικό και αντισπασμωδικό παράγοντα. Παρόλα αυτά, τον 20<sup>ο</sup> αιώνα απαγορεύτηκε η παραγωγή, κατοχή και χρήση της λόγω της ψυχοτρόπου δράσης της (Bonini et al., 2018). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), η κάνναβη αποτελεί το πιο συχνό παράνομο ναρκωτικό που καλλιεργείται, εμπορεύεται και καταχράται παγκοσμίως. Το 1996, η Καλιφόρνια γίνεται η πρώτη πολιτεία της Αμερικής που νομιμοποίησε τη χρήση της κάνναβης για θεραπευτικούς λόγους υπό την επίβλεψη γιατρού, ενώ ακολούθησαν άλλες πολιτείες των Η.Π.Α. και Ευρωπαϊκές χώρες. Ωστόσο, σε πολλές χώρες παραμένει, έως σήμερα, παράνομη και η νομιμοποίησή της για την ασφαλή ιατρική της χρήση αποτελεί μείζον θέμα (Bridgeman and Abazia, 2017).

## 1.2 Βοτανικά στοιχεία

Το φυτό της κάνναβης (*Cannabis*) ανήκει στην οικογένεια *Cannabaceae*. Η συστηματική τους ταξινόμηση παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**. Σύμφωνα με τους ταξινομιστές, υπάρχουν τρία είδη του γένους *Cannabis*: η *Cannabis sativa*, η *Cannabis indica* και η *Cannabis ruderalis*. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές διαφωνούν με την παραπάνω ταξινόμηση προσδίδοντας στο γένος *Cannabis* δύο κύρια είδη: την *C sativa* και την *C. indica*. Παρά τις προαναφερθείσες διαφορές, όμως, η κάνναβη αντιμετωπίζεται συνήθως ως ένα μοναδικό διαφορετικό είδος, την *Cannabis sativa* Linnaeus, με τα *C. sativa*, *C. indica* και *C. ruderalis* να θεωρούνται ποικιλίες της (var. *sativa*, var. *indica* και var. *ruderalis*, αντίστοιχα).

Οι διαφορές των ειδών αυτών έγκεινται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους και την περιεκτικότητα των ψυχοδραστικών ουσιών σε αυτά. Τα φυτά της *C. indica* είναι κοντά με πλατιά σκούρα πράσινα φύλλα και έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κανναβιδιόλη, ενώ τα φυτά της *C. sativa* είναι ψηλότερα με λεπτά ανοιχτά πράσινα φύλλα και μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη. Τα φυτά *C. sativa* και *C. indica* παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον, ενώ το φυτό *C. ruderalis* καλλιεργείται σπάνια για το περιεχόμενο της σε δραστικές ουσίες, καθώς έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε  $\Delta^9$ -THC.

**Πίνακας 1:** Συστηματική ταξινόμηση της κάνναβης

Βασίλειο:	Φυτά ( <i>Plantae</i> )
Συνομοταξία:	Αγγειόσπερμα ( <i>Magnoliophyta</i> )
Ομοταξία:	Δικοτυλήδονα ( <i>Magnoliopsida</i> )
Τάξη:	Κνιδώδη ( <i>Urticales</i> )
Οικογένεια:	Κανναβινοειδή ( <i>Cannabaceae</i> )
Γένος:	Κάνναβις ( <i>Cannabis</i> )

Η κάνναβη είναι συνήθως δίοικο φυτό, δηλαδή τα αρσενικά και θηλυκά άνθη αναπτύσσονται σε ξεχωριστά φυτά. Το φύλο προσδιορίζεται από τα ετερομορφικά χρωμοσώματα, ετερογαμετικά XY για τα αρσενικά και ομογαμετικά XX για τα θηλυκά. Μορφολογικά ο σεξουαλικός διμορφισμός του φυτού γίνεται εμφανής σε προχωρημένο στάδιο κατά την ανάπτυξη του φυτού, μετά την ανθοφορία. Τα θηλυκά φυτά προτιμώνται για την παραγωγή φυτικών κανναβινοειδών, γιατί παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με τα αρσενικά. Ο σεξουαλικός φαινότυπος του φυτού σε σπάνιες περιπτώσεις παρουσιάζει ευελιξία, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ερμαφρόδιτων ανθών ή αμφιφυλόφιλων ταξιανθιών, δηλαδή ένα μονόικο φαινότυπο.

Το φυτό μπορεί να καλλιεργηθεί τόσο σε εσωτερικές όσο και σε εξωτερικές συνθήκες. Οι εξωτερικές καλλιέργειες διαρκούν κυρίως από το Μάρτιο-Απρίλιο έως Νοέμβριο-Δεκέμβριο, ενώ τα φυτά λόγω των διαφοροποιήσεων του καιρού και των συνθηκών αποθήκευσης διαφέρουν ως προς την περιεκτικότητά τους σε φυτοκανναβινοειδών και είναι δύσκολο να διατηρήσουν ένα σταθερό χημικό προφίλ. Αντίθετα, οι εσωτερικές καλλιέργειες γίνονται υπό ελεγχόμενες συνθήκες και πλήρη παρακολούθηση του κύκλου ζωής του φυτού, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα διαχείρισης της περιεκτικότητας στα συστατικά. Αυτό είναι πολύ σημαντικό στις περιπτώσεις καλλιέργειας του φυτού με σκοπό τη φαρμακευτική χρήση όπου επιθυμείται συγκεκριμένο χημικό προφίλ. Οι ποσότητες των φυτοκανναβινοειδών στο φυτό εξαρτώνται από τις συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας, την ακτινοβολία, τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους και την επίδραση παρασίτων. Σημαντικές παράμετροι για την

επίτευξη των επιθυμητών περιεκτικοτήτων σε φυτοκανναβινοειδή είναι και ο χρόνος συγκομιδής και ο τρόπος αποθήκευσης του φυτού. Οι συγκεντρώσεις των ουσιών ποικίλουν ανάμεσα στις ηλικίες, στα διάφορα μέρη του φυτού ακόμα και κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η αποθήκευση της κάνναβης πρέπει να ακολουθεί συγκεκριμένους κανόνες, καθώς είναι ευαίσθητη στο οξυγόνο, την υπεριώδη ακτινοβολία και στη θερμοκρασία. Πολλά από τα φυτοκανναβινοειδή εμφανίζουν αστάθεια, με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε διάφορες οδούς αποικοδόμησης (Bonini et al., 2018; ElSohly et al., 2017; Thomas and ElSohly, 2016).

### 1.3 Χημικά συστατικά κάνναβης

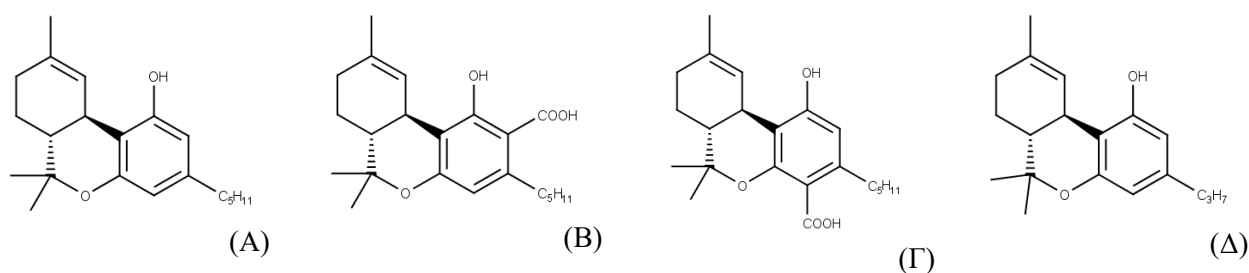
Το φυτό της κάνναβης περιέχει περισσότερες από 500 χημικές ουσίες διαφόρων κατηγοριών, ενώ περισσότερες από 120 ανήκουν στην κατηγορία των φυτοκανναβινοειδών, η οποία αποτελεί την κύρια βιοδραστική ομάδα ουσιών στο φυτό. Στο φυτό εντοπίζονται επίσης τερπενοειδή, που παρουσιάζουν, όπως και τα φυτοκανναβινοειδή, μεγάλο ενδιαφέρον, φλαβονοειδή, υδρογονάνθρακες, αζωτούχες ενώσεις, υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα και άλλες ενώσεις (Brenneisen, 2007; ElSohly et al., 2017).

#### 1.3.1 Φυτοκανναβινοειδή

Ο όρος φυτοκανναβινοειδή αναφέρεται στις ουσίες που έχουν απομονωθεί από το φυτό *Cannabis sativa* και αποτελούνται από έναν τερπενοφαινολικό σκελετό με 21 άτομα άνθρακα (C<sub>21</sub>). Ονομάστηκαν φυτοκανναβινοειδή προκειμένου να γίνεται ξεκάθαρος ο διαχωρισμός αυτών από τα ενδοκανναβινοειδή (ενδογενείς προσδέτες των υποδοχέων του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος) και τα συνθετικά κανναβινοειδή που κυκλοφορούν παράνομα στην αγορά. Συνολικά έχουν αναγνωρισθεί 120 φυτοκανναβινοειδή, τα οποία ταξινομούνται στους εξής τύπους: (-)- $\Delta^9$ -trans-τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^9$ -THC), (-)- $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^8$ -THC), κανναβιδιόλη (CBD), κανναβινοδιόλη (CBND), κανναβινόλη (CBN), κανναβιτριόλη (CBT), κανναβιγερόλη (CBG), κανναβιχρωμένιο (CBC), κανναβιελσοϊνή (CBE), κανναβικυκλόνη (CBL) και διάφοροι άλλοι τύποι (Brenneisen, 2007; ElSohly et al., 2017). Τα φυτοκανναβινοειδή συσσωρεύονται κυρίως στις αδενικές τρίχες των φύλλων και είναι υπεύθυνα για την άμυνα και την αλληλεπίδραση με τα φυτοφάγα και τα παράσιτα (Frag and Kayser, 2017).

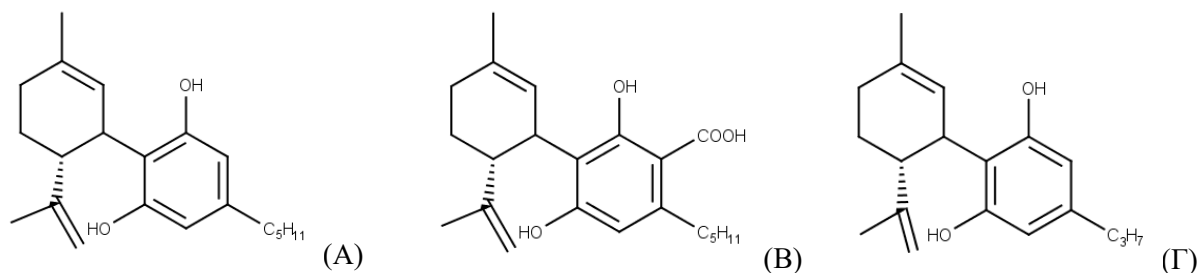
**Τύπος  $\Delta^9$ -trans-τετραϋδροκανναβινόλης ( $\Delta^9$ -THC):** Η  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^9$ -THC) (Σχήμα 1) απομονώθηκε πρώτη φορά από τους Gaoni και Mechoulam το 1964 μ.Χ. και είναι η περισσότερο μελετημένη ένωση του φυτού. Η  $\Delta^9$ -THC είναι ασταθής ως καθαρή ένωση, ένα άμορφο κόμμι που εύκολα γίνεται καφέ, ενώ η ακατέργαστη μορφή είναι

πιο σταθερή και μπορεί να αποθηκευτεί στο ψυγείο σε διάλυμα μεθανόλης. Κύρια πρόδρομη ένωση της Δ<sup>9</sup>-THC αποτελεί το Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ A (Δ<sup>9</sup>-THCA-A) (Σχήμα 1), ενώ το Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ B (Δ<sup>9</sup>-THCA-B) (Σχήμα 1) εντοπίζεται σε μικρότερο ποσοστό. Τα δύο οξέα διαφέρουν ως προς τη φυσική τους κατάσταση αλλά και τη σταθερότητα τους. Το Δ<sup>9</sup>-THCA-A αποκαρβοξυλιώνεται στους 90°C, ενώ το Δ<sup>9</sup>-THCA-B είναι σταθερό σ' αυτή τη θερμοκρασία. Αποτελεί τη βασική ένωση του φυτού και εμφανίζει σημαντική ψυχοτρόπο δράση, σε αντίθεση με τα πρόδρομα οξέα τα οποία δεν έχουν ψυχοδραστικές ιδιότητες. Αυτή η ένωση ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τις φαρμακολογικές και κυρίως τις ψυχοδραστικές ιδιότητες της κάνναβης. Άξια αναφοράς ένωση αυτού του τύπου αποτελεί και η Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβιβαρίνη (Δ<sup>9</sup>-THCV), η οποία είναι ένα προπυλικό ανάλογο της Δ<sup>9</sup>-THC (Σχήμα 1). Παρά τη μικρή δομική διαφορά με την Δ<sup>9</sup>-THC, παρέχει ένα διαφορετικό φαρμακολογικό προφίλ σε ορισμένους μοριακούς στόχους (Brenneisen, 2007; Hanuš et al., 2016; Morales et al., 2017; Russo and Marcu, 2017). Στη μαριχουάνα περιέχεται 1 - 5% Δ<sup>9</sup>-THC, στο χασίς 6 - 10% και στο χασισέλαιο 30 - 60% (Nahas and Latour, 1992).



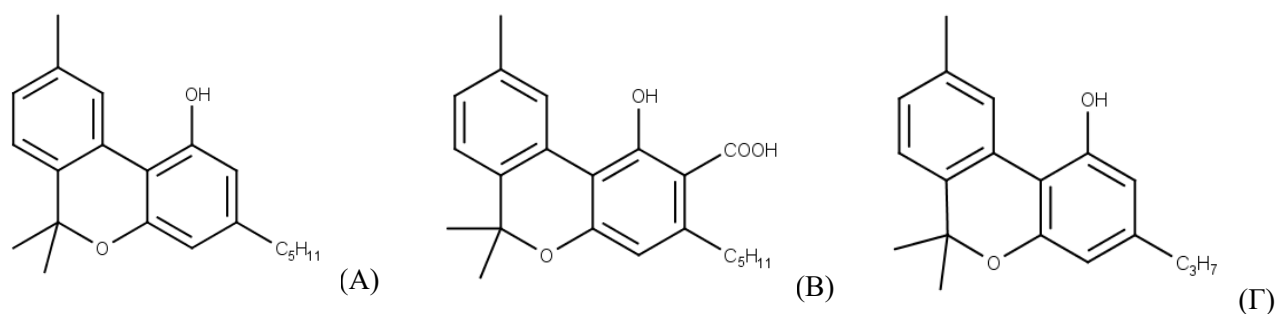
**Σχήμα 1:** Χημική δομή των Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC) (A), Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ A (Δ<sup>9</sup>-THCA-A) (B), Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινολικό οξύ B (Δ<sup>9</sup>-THCA-B) (Γ), Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβιβαρίνη (Δ<sup>9</sup>-THCV) (Δ)

**Τύπος κανναβιδιόλης (CBD):** Η κανναβιδιόλη (CBD) (Σχήμα 2) αποτελεί το κύριο μη ψυχοτρόπο φυτικό κανναβινοειδές της κάνναβης και απομονώθηκε το 1940 μ.Χ. Ωστόσο, το 1963 μ.Χ. οι Mechoulam και Shvo ήταν οι πρώτοι που προσδιόρισαν τη σωστή δομή της CBD. Πρόδρομο οξύ της CBD είναι το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) (Σχήμα 2) το οποίο ανακαλύφθηκε το 1955, ενώ αποτελεί το πρώτο κανναβινοειδικό οξύ που προσδιορίστηκε. Οι δύο αυτές ενώσεις βρίσκονται σε αφθονία στη μη ψυχοτρόπο κλωστική κάνναβη (Brenneisen, 2007). Κάτω από όξινες συνθήκες, η CBD κυκλοποιείται και μετατρέπεται σε Δ<sup>9</sup>-THC. Η CBD έχει μελετηθεί εντόνως λόγω των πολλών φαρμακευτικών και βιολογικών ιδιοτήτων που έχει αποδειχθεί πως έχει (Hanus et al., 2016). Σημαντική ένωση αυτού του τύπου είναι επίσης η κανναβιδιβαρίνη (CBDV) (Σχήμα 2), προπυλικό ανάλογο της CBD χωρίς ψυχοτρόπο δράση (Morales et al., 2017).



**Σχήμα 2:** Χημική δομή των κανναβιδιόλη (CBD) (Α), κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) (Β), κανναβιδιβαρίνη (CBDV) (Γ)

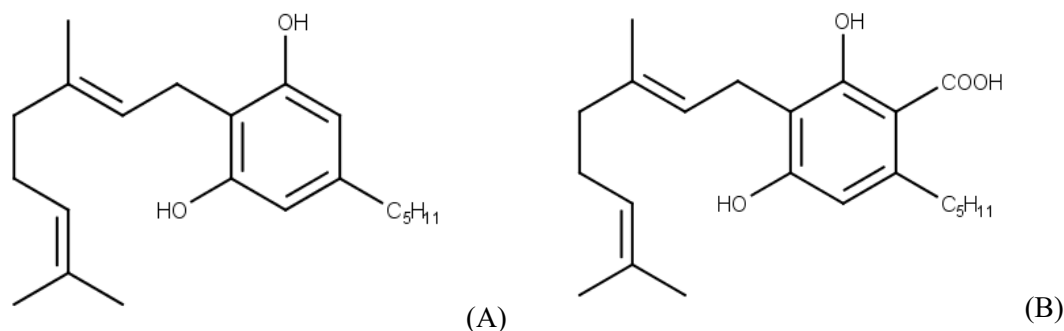
**Τύπος κανναβινόλης (CBN):** Η κανναβινόλη (CBN) (**Σχήμα 3**) είναι το πρώτο φυτικό κανναβινοειδές που απομονώθηκε από το φυτό το 1896. Είναι μη ενζυματικό προϊόν οξείδωσης της Δ<sup>9</sup>-THC, ενώ έχει ανιχνευθεί σε δείγματα που έχουν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, ειδικά σε υψηλές θερμοκρασίες. Η CBN μπορεί να σχηματιστεί και μετά από θερμική αποκαρβοξυλίωση του αντίστοιχου οξέος (κανναβινολικό οξύ – CBNA) (**Σχήμα 3**), το οποίο είναι παρόν στο φυτό. Η συγκέντρωση της CBN σε προϊόντα κάνναβης (μαριχουάνα, χασίς, χασισέλαιο) αυξάνεται κατά την αποθήκευσή τους, ενώ η συγκέντρωση της Δ<sup>9</sup>-THC μειώνεται με διαφορετικό ρυθμό. Η CBN έχει ασθενή συγγένεια με τους υποδοχείς CB<sub>1</sub> και CB<sub>2</sub>, μόνο το 10% της συγγένειας της Δ<sup>9</sup>-THC, και έχει ασθενείς ψυχοδραστικές ιδιότητες. Σ' αυτόν τον τύπο ανήκει και η κανναβιβαρίνη (CBV), προπυλικό ανάλογο της CBN και προϊόν οξείδωσης της Δ<sup>9</sup>-THCV (**Σχήμα 3**). Δεν είναι ψυχοτρόπος ένωση, βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο φυτό, ενώ δεν υπάρχουν ακόμη στοιχεία για τη φαρμακολογία της (ElSohly and Slade, 2005; Hanuš et al., 2016; Morales et al., 2017; Russo and Marcu, 2017).



**Σχήμα 3:** Χημική δομή των κανναβινόλη (CBN) (Α), κανναβινολικό οξύ (CBNA) (Β), κανναβιβαρίνη (CBV) (Γ)

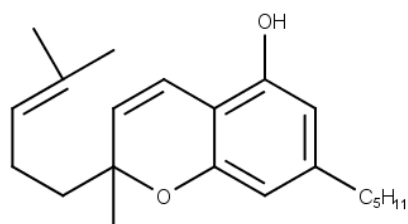
**Τύπος κανναβιγερόλης (CBG):** Η κανναβιγερόλη (CBG) (**Σχήμα 4**) είναι ένα φυτοκανναβινοειδές μικρής σημασίας και η πρόδρομη της ένωση, το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) (**Σχήμα 4**) αποδείχθηκε ότι είναι το πρώτο βιογενές κανναβινοειδές που σχηματίζεται στο φυτό, καθώς αποτελεί την πρόδρομη ένωση όλων των κανναβινοειδών.

Ανιχνεύεται σε μικρές ποσότητες στο φυτό, καθώς κατά τον κύκλο ζωής του φυτού μετατρέπεται στα άλλα φυτοκανναβινοειδή (Brenneisen, 2007; Russo, 2016). Δεν εμφανίζει ψυχοτρόπο δράση, έχει όμως αντιβακτηριακή και αντιπολλαπλασιαστική δράση (Izzo et al., 2009).



**Σχήμα 4:** Χημική δομή των κανναβιγερόλη (CBG) (A), κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) (B)

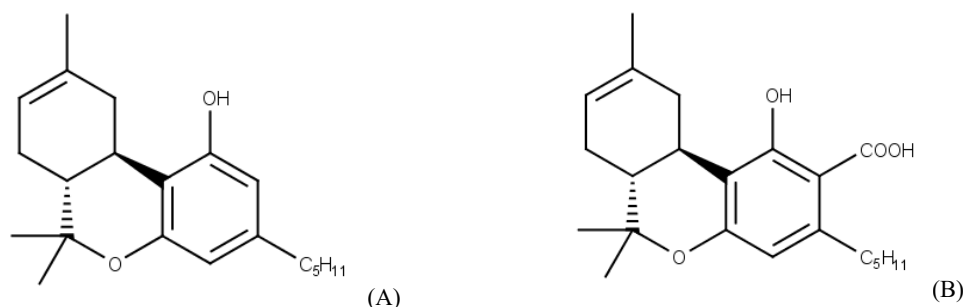
**Τύπος κανναβιχρωμενίου (CBC):** Κύριος εκπρόσωπος του τύπου είναι το κανναβιχρωμένιο (CBC) (Σχήμα 5). Το CBC είναι ένα από τα πιο σταθερά φυτοκανναβινοειδή, καθώς έχει ανιχνευθεί σε δείγματα κάνναβης πολλών χρόνων. Το φυσικό CBC είναι ρακεμικό μείγμα, δεν εμφανίζει ψυχοτρόπο δράση, ενώ έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Η συγκέντρωση του CBC είναι υψηλότερη κατά το βλαστικό στάδιο σε σχέση με το αναπαραγωγικό. Η παρουσία του CBC φαίνεται πως σχετίζεται με την  $\Delta^9$ -THC λόγω χημικής σχέσης της οξειδάσης που εμπλέκεται στην παραγωγή CBC και  $\Delta^9$ -THC από την CBG. Αποτελεί το μόνο κύριο φυτοκανναβινοειδές που φθορίζει κάτω από το υπεριώδες φως (Hanus et al., 2016).



**Σχήμα 5:** Χημική δομή του κανναβιχρωμενίου (CBC)

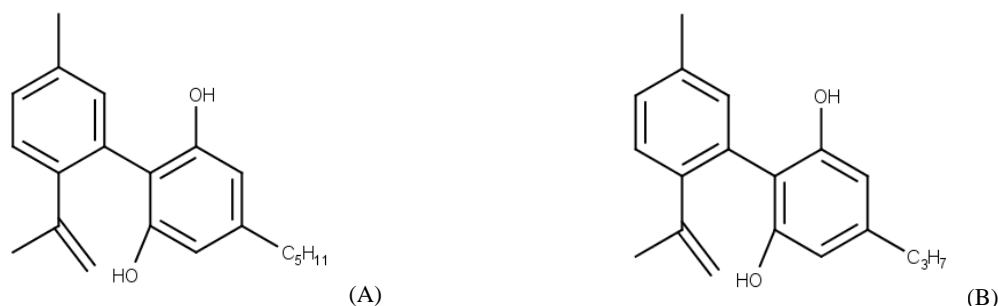
**Τύπος  $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβινόλης ( $\Delta^8$ -THC):** Η  $\Delta^8$ -THC (Σχήμα 6) είναι ένα σταθερότερο ισομερές της  $\Delta^9$ -THC, καθώς ο διπλός δεσμός στη θέση 8 είναι θερμοδυναμικά σταθερότερος από το διπλό δεσμό στη θέση 9. Η  $\Delta^8$ -THC παράγεται από το πρόδρομο οξύ

της, το  $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβιολικό οξύ ( $\Delta^8$ -THCA), ενώ είναι 20% λιγότερο δραστική από τη  $\Delta^9$ -THC (Brenneisen, 2007).



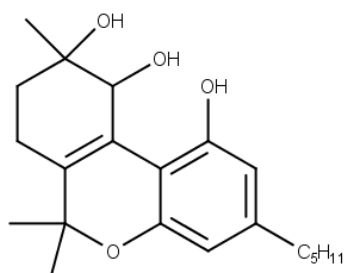
**Σχήμα 6:** Χημική δομή των  $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^8$ -THC) (A),  $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβιολικό οξύ ( $\Delta^8$ -THCA) (B)

**Τύπος κανναβινοδιόλης (CBND):** Αυτός ο τύπος φυτοκανναβινοειδών περιλαμβάνει αρωματικά παράγωγα, καθώς και προϊόντα οξείδωσης της κανναβιδιόλης. Έχουν αναγνωριστεί δύο ουσίες αυτού του τύπου φυτοκανναβινοειδών, η κανναβινοδιόλη (CBND) και η κανναβινοδιβαρίνη (CBVD) (**Σχήμα 7**) (Brenneisen, 2007; ElSohly et al., 2017).



**Σχήμα 7:** Χημική δομή των κανναβινοδιόλη (CBND) (A), κανναβινοδιβαρίνη (CBVD) (B)

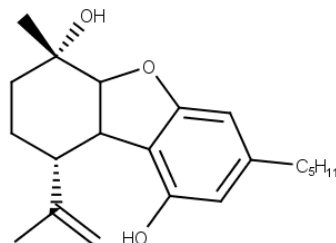
**Τύπος κανναβιτριόλης (CBT):** Η κανναβιτριόλη (CBT) (**Σχήμα 8**) αναφέρθηκε το 1966 από τους Obata and Ishikawa. Έχουν απομονωθεί εννιά φυτοκανναβινοειδή αυτού του τύπου. Η φαρμακολογική τους δράση παραμένει άγνωστη (ElSohly and Slade, 2005).



**Σχήμα 8:** Χημική δομή της κανναβιτριόλης (CBT)

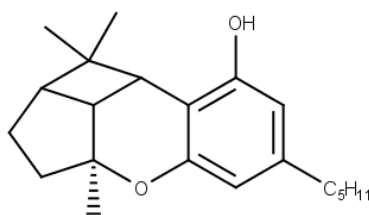


**Τύπος κανναβιελσοΐνης (CBE):** Η κανναβιελσοΐνη (CBE) (**Σχήμα 9**) είναι ένα σημαντικό πυρολυτικό προϊόν της κανναβιδιόλης, γι' αυτό είναι παρόν στον καπνό κατά το κάπνισμα της κάνναβης. Επίσης, είναι μεταβολίτης της CBD στα τρωκτικά. Παρόλ' αυτά ελάχιστα είναι γνωστά για την βιοδραστικότητά της (Hanuš et al., 2016).



**Σχήμα 9:** Χημική δομή της κανναβιελσοΐνης (CBE)

**Τύπος κανναβικυκλόλης (CBL):** Είναι ρακεμικό μίγμα φυτοκανναβινοειδών και φαίνεται πως σχηματίζεται από το κανναβιχρωμένιο κατά την αποθήκευση του φυτού, υπό την παρουσία του φωτός. Ωστόσο είναι άγνωστες ακόμη οι βιολογικές της δράσεις. Η χημική δομή της CBL παρουσιάζεται στο **Σχήμα 10** (Hanuš et al., 2016).



**Σχήμα 10:** Χημική δομή της κανναβικυκλόλης (CBL)

### 1.3.2 Τερπενοειδή

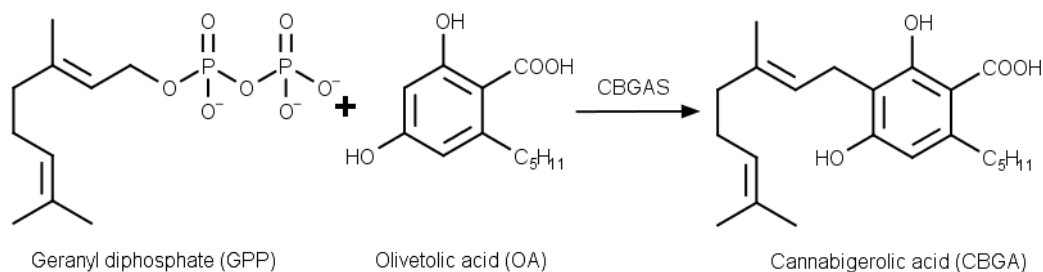
Τα τερπενοειδή είναι οργανικές ενώσεις που εντοπίζονται ευρέως στο φυτό της κάνναβης. Υπάρχουν περίπου 140 διαφορετικά τερπενοειδή, ανάμεσα τους μονοτερπενοειδή, σεσκιτερπενοειδή, διτερπενοειδή και τριτερπενοειδή. Όπως και τα φυτοκανναβινοειδή, συντίθεται στις αδενικές τρίχες των θηλυκών ταξιανθιών, με τη συγκέντρωσή τους σε αυτά να φτάνει μέχρι και το 10%, ενώ στα λουλούδια μόλις το 1%. Αυτή η κατηγορία των οργανικών ενώσεων ευθύνεται για το χαρακτηριστικό άρωμα και γεύση της κάνναβης, ενώ συμβάλλει επίσης και στην προστασία του φυτού από ζώα και τους επικονιαστές. Η περιεκτικότητα και η κατανομή των τερπενοειδών στο φυτό εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως το φαινότυπο του φυτού, το φύλο, την ηλικία του φυτού, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις διαδικασίες για την παραγωγή του αιθέριου ελαίου. Παραδείγματα τερπενοειδών που εντοπίζονται στην κάνναβη είναι το D-λιμονένιο, το β-

μυρκένιο, το α- και β-πινένιο, η λιναλοόλη, το β-καρυοφυλλένιο, το τερπινολένιο και άλλα (Andre et al., 2016; Brenneisen, 2007; Russo and Marcu, 2017).

Τα τερπενοειδή είναι βιολογικά δραστικά μόρια με ποικίλες φαρμακολογικές ιδιότητες και γι' αυτό εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Είναι λιπόφιλες ενώσεις και μπορούν να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ενώ στερούνται ψυχοδραστικών ιδιοτήτων, πολλά εμφανίζουν αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, ηρεμιστικές αλλά και διεγερτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η σημαντικότητα των τερπενίων στο φυτό της κάνναβης οφείλεται στην ιδιότητά τους να δρουν συνεργιστικά με άλλα συστατικά της κάνναβης και ιδίως τα φυτοκανναβινοειδή, το επονομαζόμενο «φαινόμενο δυναμοποίησης» ή «entourage effect». Πιθανές πτυχές αυτής της αλληλεπίδρασης περιλαμβάνουν τη θεραπεία της κατάθλιψης, του άγχους, του εθισμού, τον καρκίνο και των λοιμώξεων. Ωστόσο ο μοριακός μηχανισμός της αλληλεπίδρασης δεν έχει εξηγηθεί και απαιτείται περισσότερη έρευνα για την κατανόηση αυτού του φαινομένου (Booth and Bohlmann, 2019).

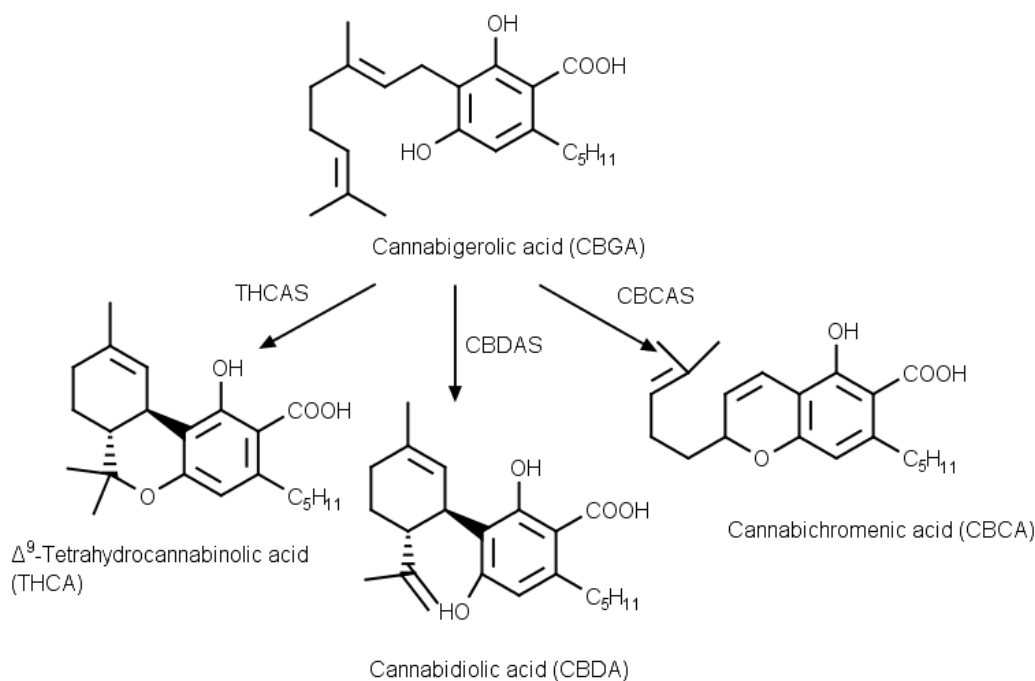
#### 1.4 Βιοσύνθεση φυτοκανναβινοειδών

Το πρώτο βήμα στη βιοσυνθετική οδό των φυτοκανναβινοειδών είναι η συμπύκνωση του ολιβετολικού οξέος, που σχηματίζεται μέσω της βιοσυνθετικής οδού πολυκετίδης, με το πυροφωσφορικό γερανύλιο υπό την επίδραση του ενζύμου συνθετάση του κανναβιγερολικού οξέος (Cannabigerolic acid synthase, CBGAS) ή γερανυλοπυροφωσφορική:ολιβετολική γερανυλοτρανσφεράση (geranyl diphosphate:olivetolate geranyltransferase, GOT) οδηγώντας στο σχηματισμό του κανναβιγερολικού οξέος (CBGA) (Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Σχηματισμός του κανναβιγερολικού οξέος (CBGA)

Το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA) θεωρείται το κύριο πρόδρομο μόριο για τη βιοσύνθεση των λοιπών φυτοκανναβινοειδών. Έτσι, αυτό κυκλοποιείται με τη βοήθεια των ενζύμων συνθετάση του  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινολικού οξέος (THCAS), συνθετάση του κανναβιδιολικού οξέος (CBDAS) και συνθετάση του κανναβιχρωμενικού οξέος (CBCAS) προς σχηματισμό του  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινολικού οξέος ( $\Delta^9$ -THCA), του κανναβιδιολικού οξέος (CBDA) και του κανναβιχρωμενικού οξέος (CBCA), αντίστοιχα (Σχήμα 12). Οι ουδέτερες ουσίες  $\Delta^9$ -THC, CBD και CBC σχηματίζονται έπειτα από μη ενζυμική αποκαρβοξυλίωση των παραπάνω ενώσεων, κατά την αποθήκευση, που συμβαίνει λόγω θερμότητας ή ηλιακού φωτός, ενώ από την αποκαρβοξυλίωση του CBGA σχηματίζεται η CBG.



**Σχήμα 12:** Σχηματισμός των πρόδρομων οξέων:  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA), κανναβιδιολικό οξύ (CBDA), κανναβιχρωμενικό οξύ (CBCA)

Εκτός από τα  $C_5$ -φυτοκανναβινοειδή, δηλαδή αυτά που έχουν μια πλευρική αλυσίδα *n*-πεντυλίου ( $-C_5H_{11}$ ), υπάρχουν και  $C_3$ -φυτοκανναβινοειδή που έχουν ως πλευρική αλυσίδα μια *n*-προπυλομάδα και συντίθενται μέσω άλλης οδού. Το πυροφωσφορικό γερανύλιο συμπυκνώνεται με το διβαρινικό οξύ, αντί του ολιβετολικού οξέος, προς σχηματισμό του κανναβιγεροβαρινικού οξέος (CBGVA). Το CBGVA είναι η κύρια πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση του κανναβιδιβαρινικού οξέος (CBDVA), του κανναβιχρωμεβαρινικού οξέος (CBCVA) και του τετραϋδροκανναβιβαρινικού οξέος (THCVA) (Degenhardt et al., 2017).

## 1.5 Φαινότυποι κάνναβης

Το φυτό της κάνναβης μπορεί να χωριστεί σε τρεις φαινοτύπους, στη φαρμακευτική κάνναβη, τον ενδιάμεσο τύπο και την κλωστική ή βιομηχανική κάνναβη. Στη φαρμακευτική κάνναβη η περιεκτικότητα σε  $\Delta^9$ -THC είναι μεγαλύτερη από 0,5% και η περιεκτικότητα σε CBD μικρότερη από 0,5%, με αποτέλεσμα η αναλογία  $\Delta^9$ -THC/CBD να είναι πολύ μεγαλύτερη του 1 ( $\Delta^9$ -THC/CBD  $\gg$  1). Στον ενδιάμεσο τύπο η CBD είναι το κύριο φυτοκανναβινοειδές, ενώ η  $\Delta^9$ -THC βρίσκεται ίσες ή μικρότερες συγκεντρώσεις, με την αναλογία  $\Delta^9$ -THC/CBD να είναι περίπου ίση με το 1 ( $\Delta^9$ -THC/CBD  $\sim$  1). Τέλος, στην κλωστική κάνναβη η  $\Delta^9$ -THC βρίσκεται σε ιδιαίτερα χαμηλή περιεκτικότητα. Περιέχει ως κύρια συστατικά μη ψυχοδραστικά φυτοκανναβινοειδή, όπως κανναβιδιόλη και κανναβιγερόλη. Έτσι, η αναλογία  $\Delta^9$ -THC/CBD είναι πολύ μικρότερη του 1 ( $\Delta^9$ -THC/CBD  $\ll$  1) (ElSohly et al., 2017).

Οι λόγοι  $\Delta^9$ -THC/CBD ελέγχονται γενετικά, παρόλο που οι περιεκτικότητες των φυτοκανναβινοειδών επηρεάζονται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σύμφωνα με άλλους ερευνητές, ο διαχωρισμός των φαινοτύπων βασίζεται στο λόγο  $\frac{[\text{THC}] + [\text{CBN}]}{[\text{CBD}]}$ . Αν ο λόγος είναι μεγαλύτερος του 1, τα φυτά ταξινομούνται στον φαινότυπο I (φαρμακευτική κάνναβη), ενώ αν είναι μικρότερος του 1 σε φαινότυπο III (κλωστική) (Stefanidou et al., 1998). Έχει αναφερθεί, επίσης, ότι το φυτό μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με την ηλικία στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης. Αυτή η ταξινόμηση ωστόσο δεν μπορεί να καθορίσει το περιεχόμενο των φυτοκανναβινοειδών σε κάθε χημειότυπο (Frag and Kayser, 2017).



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Φαρμακολογία κανναβιδιόλης και άλλων φυτοκανναβινοειδών**

### **2.1 Ενδοκανναβινοειδές σύστημα**

Τα φυτοκανναβινοειδή, οι ουσίες που περιέχονται στην κάνναβη, αλληλεπιδρούν με το ενδοκανναβινοειδές σύστημα του ανθρώπου. Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (endocannabinoid system - ECS) είναι ένα σημαντικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού, το οποίο αποτελείται από ένα κατανεμημένο δίκτυο υποδοχέων, μορίων σηματοδότησης και ενζύμων βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης. Συμμετέχει σε μερικές από τις κύριες και βασικές λειτουργίες του ανθρώπινου σώματος, ενώ έχει αποδειχθεί πως παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (Iannotti et al., 2016).

#### **2.1.1 Υποδοχείς κανναβινοειδών**

Η ανακάλυψη του ECS ξεκίνησε με την ανακάλυψη θέσεων υψηλής συγγένειας για την  $\Delta^9$ -THC στον εγκέφαλο με τη βοήθεια ενός συνθετικού ραδιοεπισημασμένου αναλόγου της  $\Delta^9$ -THC. Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, η θέση αυτή αναγνωρίστηκε ως υποδοχέας κανναβινοειδών 1 (cannabinoid receptor 1 - CB1), ενώ αργότερα ταυτοποιήθηκε με ομόλογη κλωνοποίηση ο υποδοχέας κανναβινοειδών 2 (cannabinoid receptor 2 - CB2). Και οι δύο υποδοχείς ανήκουν στην οικογένεια των συζευγμένων με G - πρωτεΐνες υποδοχέων (G protein-coupled receptors - GPCR). Οι υποδοχείς του ενδοκανναβινοειδούς συστήματος ενεργοποιούνται από τρεις ομάδες προσδετών, τα φυτοκανναβινοειδή, τα ενδοκανναβινοειδή και τα συνθετικά κανναβινοειδή.

Ο CB1 εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και βρίσκεται σε αφθονία στον εγκέφαλο. Τα υψηλότερα επίπεδα του υποδοχέα εντοπίζονται στα βασικά γάγγλια, την παρεγκεφαλίδα και τον ιππόκαμπο. Αυτές οι περιοχές του εγκεφάλου είναι υπεύθυνες για την κίνηση, τη μάθηση και τη μνήμη. Σε μικρότερο ποσοστό βρίσκεται, επίσης, στο νωτιαίο μυελό, τον εγκεφαλικό φλοιό, τον υποθάλαμο και την αμυγδαλή. Ακόμη, είναι παρών και σε περιφερειακούς ιστούς, όπως στο ήπαρ, λιπώδη ιστό, καρδιά και άλλους.

Ο CB2 εκφράζεται κυρίως σε ιστούς και όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το σπλήνα, τις αμυγδαλές, τον θύμο αδένα και άλλους λεμφοειδείς ιστούς. Στο ΚΝΣ εντοπίζεται σε μικρότερη συγκέντρωση απ' ότι στην περιφέρεια, ενώ βρίσκεται και σε

κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες των κανναβινοειδών (Lu and Potter, 2017).

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες έχουν προτείνει την ύπαρξη επιπλέον υποδοχέων κανναβινοειδών, όπως για παράδειγμα ο ορφανός υποδοχέας GPR55 που έχει χαρακτηριστεί ως πιθανός υποδοχέας κανναβινοειδών λόγω της ικανότητάς του να αλληλεπιδρά με φυτικά, ενδογενή και συνθετικά κανναβινοειδή (Ryberg et al., 2007), αλλά και ο υποδοχέας GPR18 (McHugh et al., 2012).

### **2.1.2 Υποδοχείς εκτός ενδοκανναβινοειδούς συστήματος**

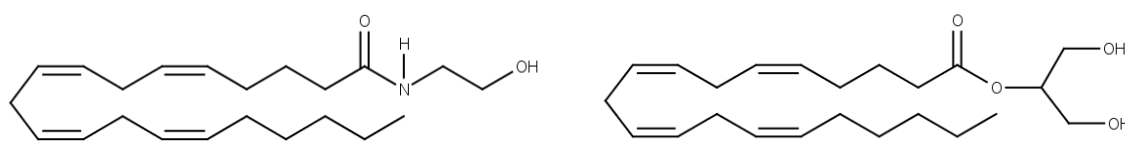
Η αυξημένη έρευνα των τελευταίων ετών γύρω από τα κανναβινοειδή και τις δράσεις τους οδήγησε στην ανακάλυψη ότι τα κανναβινοειδή αλληλεπιδρούν και με άλλους υποδοχείς του ανθρώπινου οργανισμού, πέρα από τους CB1 και CB2. Σ' αυτούς περιλαμβάνονται οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται από παράγοντες που επάγουν τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors – PPARs), η ενεργοποίηση των οποίων συνδέεται με τις νευροπροστατευτικές και κυτταροστατικές, αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των κανναβινοειδών. Επίσης, επιδρούν στους υποδοχείς σεροτονίνης, στους μ- και δ- υποδοχείς οπιοειδών, τον υποδοχέα αδενοσίνης A1A και στον α2 - αδρενεργικό υποδοχέα. Τέλος, αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς γλυκίνης (GlyR), οι οποίοι εμπλέκονται στη δράση των κανναβινοειδών κατά του φλεγμονώδους και νευροπαθητικού πόνου και με τους διαύλους μεταβατικού δυναμικού του υποδοχέα (Transient receptor potential channels - TRP channels) (Morales et al., 2017).

### **2.1.3 Ενδοκανναβινοειδή**

Η κλωνοποίηση των υποδοχέων CB1 και CB2 οδήγησε στην ανακάλυψη των ενδογενών διαμεσολαβητών που προσδένονται στους υποδοχείς, καθώς είχε παρατηρηθεί ότι στον οργανισμό συντίθενται και απελευθερώνονται μόρια προερχόμενα από λιπίδια που προσδένονται στους δύο υποδοχείς CB1 και CB2 και παράγουν παρόμοια φαρμακολογικά αποτελέσματα με αυτά της Δ<sup>9</sup>-THC. Τα μόρια αυτά ονομάστηκαν ενδοκανναβινοειδή. Αρχικά, το 1992 απομονώθηκε η N-αραχιδονοϋλοαιθανολαμίνη ή ανανδαμίδη (N-arachidonylethanolamine or anandamide - AEA) και ακολούθησε απομόνωση της 2-αραχιδονοϋλογλυκερόλης (2-arachidonoylglycerol - 2-AG) (**Σχήμα 13**). Και τα δύο μόρια προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ, δεν αποθηκεύονται σε κυστίδια αλλά μάλλον συντίθενται όπου και όποτε αυτό απαιτείται και δρουν κυρίως προσυναπτικά. (Mechoulam

and Parker, 2013) Η 2-AG είναι ένας ισχυρός αγωνιστής των CB1 και CB2 υποδοχέων, ενώ η AEA είναι μερικός αγωνιστής και στους δύο υποδοχείς (Lu and Potter, 2017).

Επιπλέον ενδογενή μόρια που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς των κανναβινοειδών και μπορούν να χαρακτηριστούν ως ενδοκανναβινοειδή είναι ο αιθέρας νολαδίνης, η βιροδαμίνη (O - αραχιδοנוύλοαιθανολαμίνη), η N - αραχιδοנוύλοντοπαμίνη (N - arachidonoyldopamine – NADA), η N – ολεούλοαιθανολαμίνη (N - oleoylethanolamine - OEA) και η N - παλμιτοϋλοαιθανολαμίδη (N - palmitoyloethanolamine – PEA) (Iannotti et al., 2016).



N-arachidonoyl ethanolamine / anandamide (AEA)

2-arachidonoyl glycerol (2-AG)

**Σχήμα 13:** Δομές των σημαντικότερων ενδοκανναβινοειδών

### 2.1.4 Συνθετικά κανναβινοειδή

Τα συνθετικά κανναβινοειδή εμφανίστηκαν τη δεκαετία του 1970 όταν οι ερευνητές μελετούσαν το ενδοκανναβινοειδές σύστημα στην προσπάθειά τους να αναπτύξουν νέες θεραπείες για τον καρκινικό πόνο. Περίπου το 2000 μ.Χ., τα συνθετικά κανναβινοειδή εμφανίστηκαν στην παράνομη αγορά ναρκωτικών και έκτοτε σημείωσαν αυξημένη κίνηση. Τα περισσότερα συνθετικά κανναβινοειδή παράγονται από χημικές εταιρίες στην Ασία Αυτά τα προϊόντα κυκλοφορούν ως μίγματα βοτάνων καθώς επίσης και ως δισκία, κάψουλες ή σκόνες. Συχνά καπνίζονται ενώ τελευταία κυκλοφορούν υγρά σκευάσματα για χρήση μέσω ηλεκτρονικού τσιγάρου. Πρόκειται για ιδιαίτερα λιπόφιλα μόρια και είναι πλήρεις αγωνιστές στους CB1 και CB2 υποδοχείς. Η συγγένεια δέσμευσης με τους υποδοχείς είναι πολύ ισχυρότερη από αυτή της Δ<sup>9</sup>-THC, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν εντονότερες ψυχοδραστικές ιδιότητες. Τα αποτελέσματα της δράσης τους εξαρτώνται από τον τρόπο και τη δόση χορήγησης (Lafaye et al., 2017).

Τα συνθετικά κανναβινοειδή χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα κλασσικά που είναι δομικά συγγενή με την Δ<sup>9</sup>-THC και τα μη κλασσικά τα οποία δεν έχουν δομική συγγένεια με την Δ<sup>9</sup>-THC. Παραδείγματα κλασσικών συνθετικών κανναβινοειδών είναι HU-210, JWH-133, nabilone και dronabinol. Σκευάσματα με δραστικές ουσίες τα nabilone και dronabinol έχουν εγκριθεί από την Αμερικάνικη Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and



Drug Administration – FDA, με τις εμπορικές ονομασίες Cesamet® για το nabilone και Marinol® and Syndros® για το dronabinol και κυκλοφορούν με συγκεκριμένες ενδείξεις. Το nabilone χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση της ναυτίας και του εμέτου λόγω χημειοθεραπείας και ως αναλγητικό για τον νευροπαθητικό πόνο, ενώ το Dronabinol για την ανορεξία σε ασθενείς με AIDS και, όπως το nabilone, για τη ναυτία και την έμεση που σχετίζονται με τη χημειοθεραπεία. Στα μη κλασσικά συνθετικά κανναβινοειδή ανήκουν τα CP 47,497, WIN 55,212-2, JWH-015 κ.α. (Howlett, 2002).

## 2.2 Μηχανισμός δράσης κανναβιδιόλης και λοιπών κανναβινοειδών

Η **κανναβιδιόλη (CBD)** (IUPAC ονομασία: 2-[(1R,6R)-6-ισοπροπενυλο-3-μεθυλοκυκλοεξ-2-εν-1-υλο]-5-πεντυλοβενζενο-1,3-διόλη) έχει πολύ χαμηλή συγγένεια με τους υποδοχείς CB1 και CB2 (Thomas et al., 2007a) και δεν εμφανίζει ψυχοτρόπο δράση, ενώ έχει διαπιστωθεί πως μπορεί να συμπεριφερθεί ως μη αρνητικός αλλοστερικός τροποποιητής του CB1 υποδοχέα. (Laprairie et al., 2015). Παρουσία Δ<sup>9</sup>-THC μπορεί να ανταγωνιστεί τη δράση της, με αποτέλεσμα τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών της Δ<sup>9</sup>-THC (Freeman et al., 2019). Η CBD είναι επίσης αγωνιστής του υποδοχέα σεροτονίνης 5-HT<sub>1A</sub> (Russo et al., 2005) και του υποδοχέα βανιλλοειδών τύπου 1 (transient receptor potential vanilloid 1 - TRPV1) που πιθανώς εξηγεί την αντιφλεγμονώδη και νευροπροστατευτική δράση της CBD. Ακόμα, αναστέλλει την επαναπρόσληψη και την ενζυματική αποικοδόμηση του ενδογενούς κανναβινοειδούς ανανδαμίδη, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της (Bisogno et al., 2001). Η CBD μπορεί να ενισχύσει τη σηματοδότηση του υποδοχέα της αδενοσίνης, αναστέλλοντας την αδρανοποίηση της αδενοσίνης, που έχει ως πιθανό αποτέλεσμα τις αναλγητικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της CBD (Carrier et al., 2006). Επιπλέον, έχει νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές δράσεις ισχυρότερες από την τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ (Hampson et al., 1998), αντιεπιληπτικές (Jones et al., 2010), κυτταροτοξικές και αντικαρκινικές ((Ligresti et al., 2006), αντιβακτηριακές ιδιότητες (Appendino et al., 2008) και δράση κατά της ναυτίας (Parker et al., 2002). Η CBD δρα ανταγωνιστικά στον υποδοχέα GPR55 (Ryberg et al., 2007) και τον GPR18 (McHugh et al., 2010).

Η **Δ<sup>9</sup>-τετραυδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC)** (IUPAC ονομασία: (-)-(6aR,10aR)-6,6,9-τριμεθυλο-3-πεντυλο-6a,7,8,10a-τετραϋδρο-6H-βενζο[*c*]χρωμεν-1-όλη) είναι η κύρια ουσία που ευθύνεται για τις φαρμακολογικές δράσεις της κάνναβης και ιδίως για τις ψυχοδραστικές της ιδιότητες. Η Δ<sup>9</sup>-THC είναι μερικός αγωνιστής των CB1 και CB2 υποδοχέων και μέσω αυτής της δράσης εμφανίζει ψυχότροπες, αναλγητικές, μυοχαλαρωτικές και αντισπασμωδικές

ιδιότητες (Russo, 2011). Επίσης, έχει βρογχοδιασταλτικές ((Williams et al., 1976), νευροπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Hampson et al., 1998). Η Δ<sup>9</sup>-THC εμφανίζει 20 φορές ισχυρότερη αντιφλεγμονώδη δράση σε σύγκριση με την ασπιρίνη και 2 φορές ισχυρότερη σε σύγκριση με την υδροκορτιζόνη (Evans, 1991). Ενεργοποιεί, ακόμα, τον υποδοχέα GPR18 (McHugh et al., 2012), τον GPR55 (Ryberg et al., 2007) και τους πυρηνικούς PPAR $\gamma$  υποδοχείς (Vara et al., 2013) και δρα ανταγωνιστικά στον 5-HT<sub>3A</sub> υποδοχέα (Barann et al., 2002).

Η **κανναβινόλη (CBN)** έχει χαμηλή συγγένεια με τους CB1 και CB2 υποδοχείς (Rhee et al., 1997) και είναι αγωνιστής του TRPV2 υποδοχέα με πιθανή δράση στη θεραπεία των εγκαυμάτων (Qin et al., 2008). Επίσης, έχει αντισπασμωδική (Turner et al., 1980), αντιβακτηριακή (Appendino et al., 2008) και αντιφλεγμονώδη δράση (Evans, 1991), ενώ μπορεί να εμφανίσει εντονότερη κατασταλτική δράση σε συνδυασμό με την Δ<sup>9</sup>-THC (Karniol et al., 1975)

Η **κανναβιγερόλη (CBG)** έχει μερική αγωνιστική δράση στους CB1 και CB2 υποδοχείς (Navarro et al., 2018). Παλιότερες μελέτες έδειξαν πως αναστέλλει την πρόσληψη του GABA, εκδηλώνοντας μυοχαλαρωτική δράση (Banerjee et al., 1975). Επίσης, έχει εμφανίσει σημαντικές αντικαρκινικές (Baek et al., 1998; Ligresti et al., 2006), αντικαταθλιπτικές και αναλγητικές ιδιότητες (Cascio et al., 2010), ενώ είναι ένας ισχυρός αναστολέας πρόσληψης AEA (De Petrocellis et al., 2011).

Το **κανναβιχρωμένιο (CBC)** δεν έχει χημική συγγένεια με τους CB1 και CB2 υποδοχείς, αλλά αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς TRP και είναι ισχυρός αναστολέας της πρόσληψης AEA (De Petrocellis et al., 2011). Σε ποντίκια έχει δείξει πως μπορεί να ενισχύσει τις αναλγητικές ιδιότητες της Δ<sup>9</sup>-THC (Cascio and Pertwee, 2014), ενώ εμφανίζει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (DeLong et al., 2010).

Η Δ<sup>9</sup>-**τετραϋδροκανναβιβαρίνη (Δ<sup>9</sup>-THCV)** συμπεριφέρεται ως ανταγωνιστής του CB1 υποδοχέα σε χαμηλές δόσεις και ως αγωνιστής σε υψηλές, ενώ στο υποδοχέα CB2 ως μερικός αγωνιστής (Pertwee, 2008). Προκαλεί απώλεια βάρους, μείωση του σωματικού λίπους και των συγκεντρώσεων λεπτίνης του ορού σε παχύσαρκα ποντίκια (Cawthore et al., 2007).

Το **τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA)** δεν εμφανίζει ψυχοτρόπο δράση, ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει πως παρουσιάζει ένα αξιοσημείωτο φαρμακολογικό προφίλ. Χαρακτηρίζεται από αντιφλεγμονώδεις, ανοσορρυθμιστικές, νευροπροστατευτικές και

αντινεοπλασματικές ιδιότητες. Η αλληλεπίδρασή του με τους υποδοχείς CB1 και CB2 δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, αν και μελέτες έχουν δείξει πως προκαλεί ενεργοποίηση των CB1 υποδοχέων. Επίσης, αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφολιπάσης C, εκδηλώνοντας έτσι την ανοσορρυθμιστική του δράση (Moreno-Sanz, 2016).

Το **κανναβιδιολικό οξύ (CBDA)** δεν έχει δράση στον CB1 υποδοχέα αλλά αλληλεπιδρά με τον 5-HT<sub>1A</sub> υποδοχέα με μεγαλύτερη ισχύ σε σχέση με τη CBD (Bolognini et al., 2013).

## 2.3 Φαρμακοκινητική κανναβιδιόλης (CBD)

Αν και η φαρμακοκινητική της CBD έχει μελετηθεί αρκετά με την διεξαγωγή διαφόρων ερευνών, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τη δραστηριότητα των μεταβολιτών της.

### 2.3.1 Απορρόφηση

Όταν χορηγείται από το στόμα υπό μορφή χαπιών ή σε κάψουλες, λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα της, η CBD απορροφάται αργά. Η μέγιστη συγκέντρωση που επιτυγχάνεται στο πλάσμα είναι δόσοεξαρτώμενη και παρατηρείται μετά από 1-4 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι μετά από χορήγηση 10 mg CBD, η μέση μέγιστη συγκέντρωση ( $C_{max}$ ) στο πλάσμα ήταν 2,47 ng/mL, ενώ μετά από δόση 5,4 mg η μέση  $C_{max}$  ήταν 0,93 ng/mL (Millar et al., 2018). Η CBD έχει περιορισμένη βιοδιαθεσιμότητα (< 6%), λόγω της χαμηλής γαστρεντερικής απορρόφησης και του εκτεταμένου μεταβολισμού πρώτης διόδου στο ήπαρ (Morano et al., 2020). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η απορρόφηση της αυξάνεται κατά 4-5 φορές όταν προσλαμβάνεται μαζί με γεύμα πλούσιο σε λιπαρά (Taylor et al., 2018). Η χορήγησή της από το στοματικό βλεννογόνο ή υπογλωσσίως οδηγεί σε πιο ελεγχόμενη απορρόφηση, ωστόσο παρόμοια με αυτή που επιτυγχάνεται μετά από την από του στόματος χορήγηση (Fasinu et al., 2016). Στις περιπτώσεις αυτές η μέση  $C_{max}$  που παρατηρείται μετά από χορήγηση 10 ή 20 mg CBD κυμαίνεται από 2,5 έως 3,3 ng/mL (Millar et al., 2018).

Μετά από εισπνοή, οι μέγιστες συγκεντρώσεις στο πλάσμα επιτυγχάνονται γρήγορα, εντός 5-10 λεπτών, ενώ η μέση βιοδιαθεσιμότητα της εισπνεόμενης CBD βρέθηκε να είναι περίπου 31% (Fasinu et al., 2016). Μετά από λήψη μέσω εισπνοής 19,2 mg CBD, παρατηρήθηκε ότι η  $C_{max}$  ήταν 110 ng/mL, ενώ μετά από δόση 2 mg ήταν 2 ng/mL. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της CBD στο πλάσμα παρατηρούνται εντός λίγων λεπτών μετά από ενδοφλέβια χορήγηση (Millar et al., 2018).

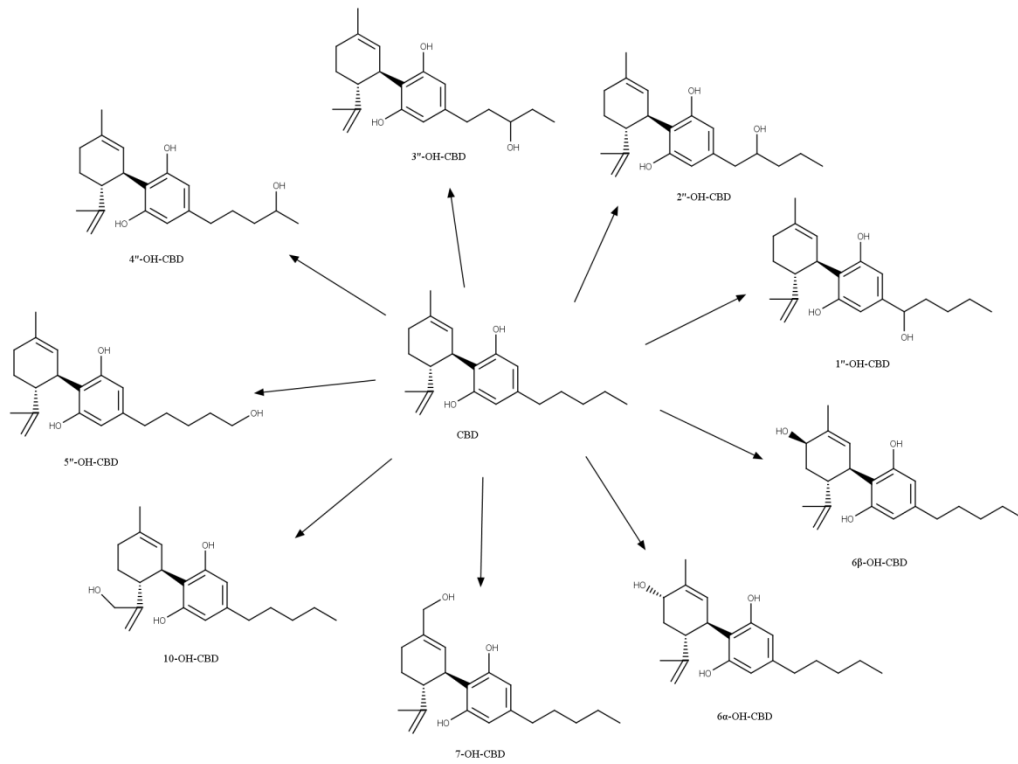
Στην περίπτωση διαδερμικής απορρόφησης αποφεύγεται ο μεταβολισμός πρώτης διόδου, αλλά εξαιτίας της υδρόφοβης φύσης της CBD περιορίζεται η διάχυση στο υδατικό στρώμα του δέρματος με αποτέλεσμα την ανάγκη ενίσχυσης της διείσδυσης μέσω δέρματος για την επίτευξη ικανοποιητικής απορρόφησης από το δέρμα (Lodzki et al., 2003; Paudel et al., 2010). Ωστόσο, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η διαπερατότητα της CBD είναι 10 φορές υψηλότερη από αυτή της Δ<sup>9</sup>-THC και της Δ<sup>8</sup>-THC (Stinchcomb et al., 2004).

### 2.3.2 Κατανομή

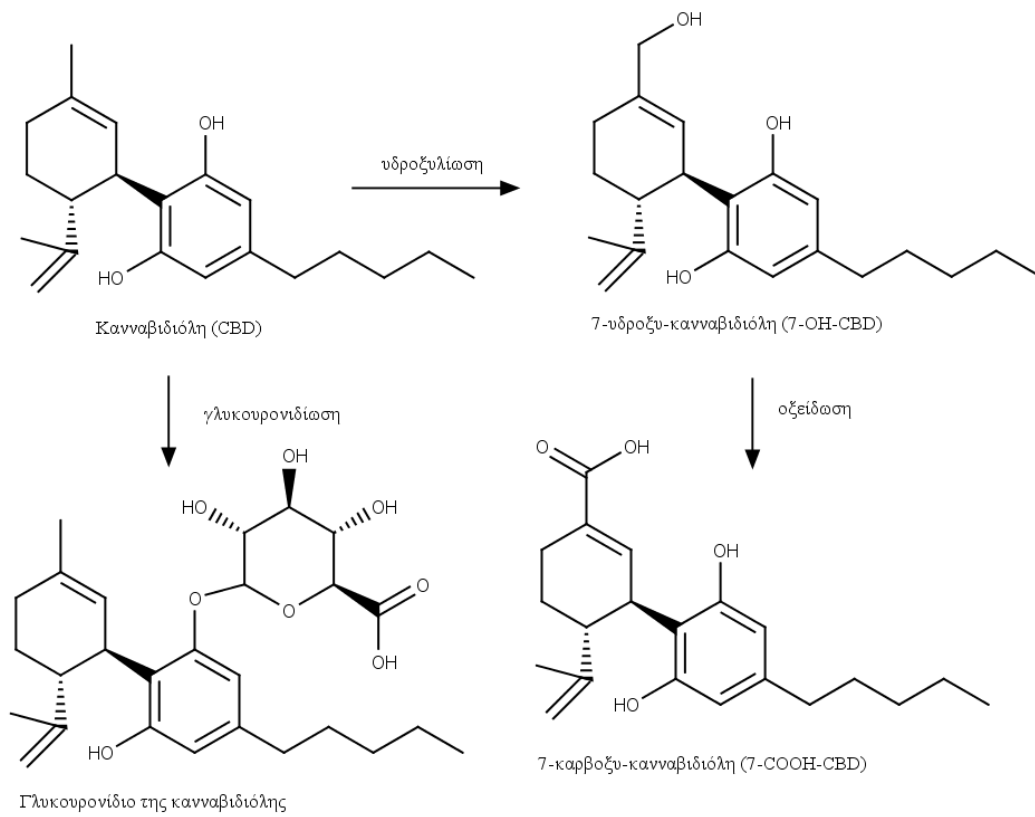
Η CBD έχει μεγάλο όγκο κατανομής, περίπου 32 L/kg, λόγω της εκτεταμένης και ταχείας κατανομής στους ιστούς. Λόγω της λιποφιλικότητάς της συσσωρεύεται στο λιπώδη ιστό (Fasinu et al., 2016). Η CBD συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, κατά 94-99%, και περίπου το 10% συνδέεται με τα ερυθρά αιμοσφαίρια, αφήνοντας ένα μικρό ποσοστό ελεύθερο που ασκεί τη φαρμακολογική δράση (Landmark and Brandl, 2020).

### 2.3.3 Βιομετατροπή

Η CBD βιομετατρέπεται κυρίως στο ήπαρ μέσω των ισοενζύμων CYP2C19 και CYP3A4, καθώς και μέσω των ισοενζύμων CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 and CYP2D6 (Lucas et al., 2018). Η CBD υφίσταται υδροξυλίωση σε πολλές θέσεις του μορίου της (**Σχήμα 14**) και περαιτέρω οξειδώσεις με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός πολύπλοκου μεταβολικού μοντέλου που αποτελείται συνολικά από περίπου 100 μεταβολίτες (Ujváry and Hanuš, 2016; Zendulka et al., 2016). Κυρίως βιομετατρέπεται μέσω του ισοενζύμου CYP2C19 προς τον ενεργό μεταβολίτη 7-υδροξυ-κανναβιδιόλη (7-OH-CBD) και, στη συνέχεια, έπειτα από οξείδωση, μέσω του ισοενζύμου CYP3A4 στον ανενεργό μεταβολίτη 7-καρβοξυ-κανναβιδιόλη (7-COOH-CBD) (**Σχήμα 15**). Η σύζευξη στο φαινολικό υδροξύλιο της CBD με το γλυκουρονικό οξύ με τη βοήθεια των ισομορφών της UDP-γλυκουρονοσυλτρασφοράσης (UGTs) είναι η κύρια αντίδραση βιομετατροπής της φάσης II. Γλυκουρονιδίωση υφίστανται και οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες της CBD. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τις φαρμακολογικές ιδιότητες των μεταβολιτών της CBD (Landmark and Brandl, 2020; Lucas et al., 2018; Ujváry and Hanuš, 2016).



**Σχήμα 14:** Υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες της κανναβιδιόλης



**Σχήμα 15:** Κύρια μεταβολική οδός της κανναβιδιόλης

### 2.3.4 Απέκκριση

Η CBD απεκκρίνεται στα ούρα σε ποσοστό 16% εντός 72 ωρών κυρίως αμετάβλητη και, σε μικρότερο βαθμό, υπό τη μορφή γλυκουρονιδίων. Κυρίως, όμως, απεκκρίνεται μέσω των κοπράνων (33%) ως επί το πλείστον στην ελεύθερη μορφή της (Ujváry and Hanuš, 2016). Η CBD έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής ανεξαρτήτου της οδού χορήγησης. Ο μέσος χρόνος ημιζωής μετά από ενδοφλέβια χορήγηση είναι 24 ώρες και μετά από εισπνοή 31 ώρες. Επίσης, μετά από χρόνια επαναλαμβανόμενη ημερήσια από του στόματος χορήγηση ο χρόνος ημιζωής κυμαίνεται από 2 έως 5 ημέρες, μετά από εφάπαξ από του στόματος χορήγηση ήταν μεταξύ 1 και 2 ώρες, ενώ έπειτα από απορρόφηση μέσω του στοματικού βλεννογόνου βρέθηκε μεταξύ 1,4 και 10,9 ώρες (Millar et al., 2018).

## 2.4 Φαρμακοκινητική $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης ( $\Delta^9$ -THC)

### 2.4.1 Απορρόφηση

Ο τρόπος χορήγησης μιας ουσίας και η φαρμακοτεχνική μορφή της είναι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό απορρόφησης μιας ουσίας. Στην περίπτωση της  $\Delta^9$ -THC κύρια οδός λήψης αποτελεί το κάπνισμα. Μέσω της εισπνοής η  $\Delta^9$ -THC φτάνει άμεσα στους πνεύμονες και μετέπειτα μεταφέρεται στον εγκέφαλο, όπου ασκεί την κύρια δράση της (Huestis, 2007). Μετά από εισπνοή, η  $\Delta^9$ -THC ανιχνεύεται στο πλάσμα μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα, ενώ οι μέγιστες συγκεντρώσεις της σ' αυτό παρατηρούνται 3-10 λεπτά μετά τη λήψη. Η βιοδιαθεσιμότητα της ποικίλλει από παράγοντες όπως το βάθος και η διάρκεια της εισπνοής και κυμαίνεται μεταξύ 10-35 % (Grotenhermen, 2003). Η  $C_{max}$  βρέθηκε 84,3 ng/mL μετά από λήψη 16 mg  $\Delta^9$ -THC μέσω εισπνοής και 162,2 ng/mL μετά τη λήψη της υψηλότερης δόσης των 34 mg (Ohlsson et al., 1980).

Μετά από του στόματος χορήγηση, η απορρόφησή της είναι αργή και ασταθής, με αποτέλεσμα η μέγιστη συγκέντρωση στο πλάσμα να παρατηρείται συνήθως έπειτα από 1-2 ώρες, ενώ υπάρχουν μελέτες στις οποίες η μέγιστη συγκέντρωση παρατηρήθηκε ακόμη και μετά από 4 ή 6 ώρες. Μετά από χορήγηση 20 mg  $\Delta^9$ -THC η  $C_{max}$  που παρατηρήθηκε κυμάνθηκε από 4,4 έως 11 ng/mL. Η  $\Delta^9$ -THC αποικοδομείται στο όξινο περιβάλλον του στομάχου αλλά και στο έντερο (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007). Επίσης, οι μέγιστες συγκεντρώσεις που παρατηρούνται είναι χαμηλότερες σε σχέση με τη χορήγηση μέσω εισπνοής ή ενδοφλεβίως (Newmeyer et al., 2016; Ohlsson et al., 1980). Η βιοδιαθεσιμότητα της  $\Delta^9$ -THC είναι χαμηλή μετά από την από του στόματος χορήγηση, γεγονός που οφείλεται στην χαμηλή απορρόφηση, στην αποικοδόμηση στο στομάχι και στον μεταβολισμό πρώτης

διόδου στο ήπαρ (Huestis, 2007). Εναλλακτικά, και κυρίως για ιατρικούς σκοπούς γίνεται η χορήγησή της μέσω του στοματικού βλεννογόνου όπου αποφεύγεται ή μειώνεται ο μεταβολισμός πρώτης διόδου με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με την από του στόματος χορήγηση, αλλά μικρότερες σε σχέση με αυτές που εμφανίζονται κατά την εισπνοή της  $\Delta^9$ -THC (Lucas et al., 2018).

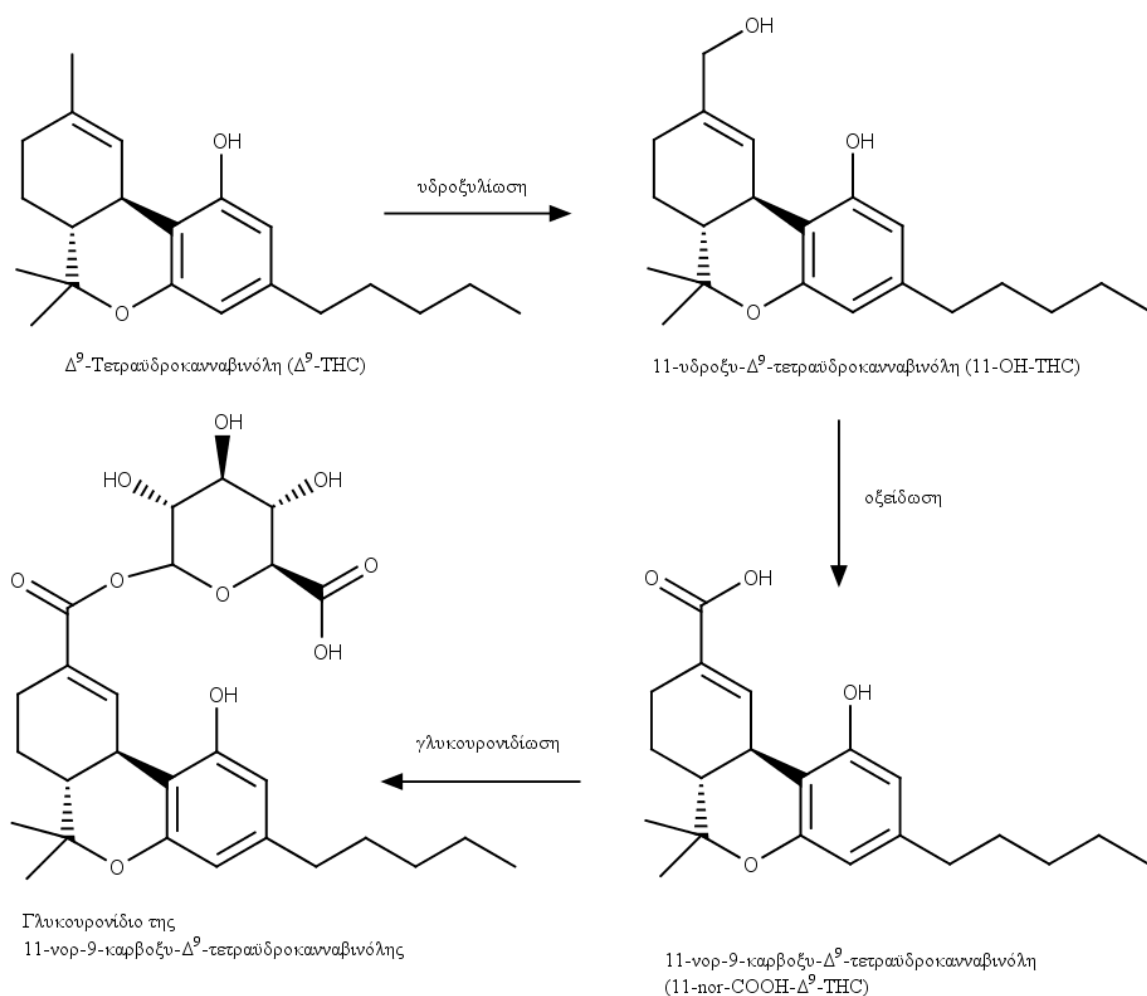
#### 2.4.2 Κατανομή

Η  $\Delta^9$ -THC που κυκλοφορεί στο αίμα κατανέμεται περίπου κατά 90% στο πλάσμα και κατά 10% στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Έχει μεγάλο όγκο κατανομής 10 L/kg και δεσμεύεται κατά 95-99% με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως τις λιποπρωτεΐνες. Η  $\Delta^9$ -THC είναι λιπόφιλη ουσία και αρχικά κατανέμεται στον πνεύμονα, την καρδιά, τον εγκέφαλο και το ήπαρ, στα οποία διαχέεται εύκολα. Σε παρατεταμένη λήψη της ουσίας, η  $\Delta^9$ -THC συσσωρεύεται στο λιπώδη ιστό, όπου παραμένει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο σχηματισμό συζευγμάτων λιπαρών οξέων με την  $\Delta^9$ -THC και τον υδροξυλιωμένο μεταβολίτη της 11-υδροξυ-THC, με αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας των ενώσεων στο λίπος. Η  $\Delta^9$ -THC διέρχεται ταχέως τον πλακούντα, προκαλώντας ανησυχίες για την τοξικότητά της στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο του εμβρύου, ωστόσο, οι συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC στο αίμα του εμβρύου βρέθηκαν χαμηλότερες από τις συγκεντρώσεις στο μητρικό αίμα. Οι μεταβολίτες 11-υδροξυ-THC και 11-nor-9-καρβοξυ-THC διαπερνούν τον πλακούντα σε μικρότερο βαθμό (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007).

#### 2.4.3 Βιομετατροπή

Η βιομετατροπή της  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης είναι κυρίως ηπατική και γίνεται μέσω των ισοενζύμων CYP2C9, CYP2C19 και CYP3A4 του κυτοχρώματος CYP 450. Λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις υδροξυλίωσης και οξειδωσης και έχουν εντοπιστεί σχεδόν 100 μεταβολίτες της  $\Delta^9$ -THC. Η κύρια μεταβολική οδός της  $\Delta^9$ -THC συνοψίζεται στο σχήμα 16. Αρχικά, η θέση 11 του μορίου υδροξυλιώνεται και σχηματίζεται ο μεταβολίτης 11-υδροξυ- $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη (11-OH-THC), ο οποίος έχει ψυχοδραστικές ιδιότητες και διαπερνά τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό γρηγορότερα συγκριτικά με τη  $\Delta^9$ -THC. Στη συνέχεια, η 11-OH-THC οξειδώνεται προς σχηματισμό της ανενεργής 11-nor-9-καρβοξυ-τετραϋδροκανναβινόλης (11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC ή THC-COOH), η οποία έπειτα υποβάλλεται σε γλυκουρονίδωση οδηγώντας στη δημιουργία του 11-nor-9-καρβόξυ-THC γλυκουρονιδίου. Με γλυκουρονικό οξύ μπορεί να συζευχθεί, επίσης, και το φαινολικό υδροξύλιο. Το 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC και το αντίστοιχο γλυκουρονίδιο αποτελούν τα κύρια

τελικά προϊόντα βιομετατροπής της  $\Delta^9$ -THC (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007). Υδροξυλίωση συμβαίνει, σε μικρότερο βαθμό, και στη θέση 8 της  $\Delta^9$ -THC, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό των  $8^a$ -OH-THC και τον  $8^b$ -OH-THC (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007; Lucas et al., 2018). Επίσης, μπορεί να συμβεί διυδροξυλίωση με το σχηματισμό της  $8^b,11$ -δι-OH-THC, η οποία απεκκρίνεται στα ούρα και μπορεί να αποτελέσει πιθανό δείκτη χρήσης κάνναβης (Gasse et al., 2018; Huestis, 2007). Βιομετατροπή της  $\Delta^9$ -THC συμβαίνει, επίσης, και σε άλλους ιστούς, εκτός του ήπατος, σε μικρότερο βαθμό, όπως το λεπτό έντερο και ο εγκέφαλος, καθώς και στους πνεύμονες (Huestis, 2007; Lucas et al., 2018).



**Σχήμα 16:** Κύρια μεταβολική οδός της  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης



#### 2.4.4 Απέκκριση

Η  $\Delta^9$ -THC απεκκρίνεται εντός λίγων ημερών ή εβδομάδων κυρίως μέσω των υδροξυλιωμένων και καρβοξυλιωμένων μεταβολιτών της. Η απέκκριση γίνεται κατά 65% μέσω των κοπράνων, περίπου 20% μέσω των ούρων, ενώ αναλλοίωτο αποβάλλεται ποσοστό μικρότερο του 5%. Στα ούρα ανιχνεύονται πολλοί όξινοι μεταβολίτες, το 80% περίπου των οποίων είχε υποστεί αντιδράσεις βιομετατροπής Φάσης II και σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ, αυξάνοντας έτσι την διαλυτότητά τους και κατ' επέκταση την απέκκρισή τους. Στα κόπρανα, οι όξινοι και ουδέτεροι μεταβολίτες της  $\Delta^9$ -THC βρίσκονται στη μη συζευγμένη μορφή τους. Στα ούρα κυριαρχεί το γλυκουρονίδιο του 11-*nor*-COOH- $\Delta^9$ -THC, ενώ στα κόπρανα η 11-OH-THC (Grotenhermen, 2003; Huestis, 2007; Huestis and Smith, 2007). Ο πραγματικός χρόνος ημιζωής της  $\Delta^9$ -THC στο πλάσμα είναι δύσκολο να υπολογιστεί λόγω της αργής εξισορρόπησης πλάσματος/λιπώδους ιστού, με αποτέλεσμα την ύπαρξη χαμηλών συγκεντρώσεων στο πλάσμα, που δυσκολεύουν την ανάλυση. Οι χρόνοι ημιζωής για τους μεταβολίτες της  $\Delta^9$ -THC έχουν βρεθεί ότι είναι μεγαλύτεροι από αυτόν του μητρικού μορίου. Σε μια μελέτη ο μέσος χρόνος ημιζωής του  $\Delta^9$ -THC ήταν 19 ώρες, ενώ των μεταβολιτών της 53 ώρες (Grotenhermen, 2003). Επίσης, έχουν αναφερθεί χρόνοι ημιζωής της  $\Delta^9$ -THC 117 και 93 λεπτά και του 11-*nor*-COOH- $\Delta^9$ -THC 5,2 και 6,2 ημέρες σε συχνούς και σπάνιους χρήστες (Lee et al., 2013).

#### 2.5 Φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις κανναβιδιόλης

Αρκετές κλινικές μελέτες έχουν διεξαχθεί σχετικά με την ικανότητα της CBD να αλληλεπιδρά με άλλα φάρμακα. Η CBD έχει αποδειχθεί πως είναι ισχυρός αναστολέας ισοενζύμων του κυτοχρώματος CYP 450, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη βιομετατροπή φαρμάκων που αποτελούν υποστρώματα των ισοενζύμων αυτών (Lucas et al., 2018). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η συγχορήγηση CBD και κλοβαζάμης. Η κλοβαζάμη βιομετατρέπεται επίσης από τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP2C19. Έτσι, η παράλληλη λήψη των δύο φαρμάκων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της κλοβαζάμης και του ενεργού μεταβολίτη της, N-δεσμεθυλοκλοβαζάμη, στο πλάσμα (Geffrey et al., 2015). Η βιομετατροπή της CBD μπορεί να επηρεαστεί, από την άλλη, από κάποια αντιεπιληπτικά φάρμακα, που μπορεί να είναι επαγωγείς των ενζύμων αυτών, όπως η φαινυτοΐνη και η καρβαμαζεπίνη ή αναστολείς, όπως η φελβαμάτη και το βαλπροϊκό οξύ (Landmark and Brandl, 2020). Μελέτη, ακόμα, έδειξε πως το αντιβιοτικό ριφαμπικίνη, ένας επαγωγέας του ισοενζύμου CYP3A4, μείωσε τη μέγιστη συγκέντρωση της CBD στο πλάσμα, ενώ το

αντιμυκητιασικό φάρμακο κετοконаζόλη, ένας αναστολέας του ίδιου ισοενζύμου, διπλασίασε σχεδόν τη μέγιστη συγκέντρωση της CBD στο πλάσμα (Stott et al., 2013).

## 2.6 Θεραπευτική χρήση κανναβιδιόλης

Η CBD εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι η κανναβιδιόλη έχει ευεργετική δράση σε διάφορες διαταραχές του ΚΝΣ, όπως την επιληψία, τη νόσο Alzheimer, τη νόσο Parkinson, τη σκλήρυνση κατά πλάκας και άλλες.

### 2.6.1 Επιληψία

Η κυριότερη θεραπευτική χρήση της κανναβιδιόλης αφορά στην αντιμετώπιση της επιληψίας. Η επιληψία ανήκει στις νευροαναπτυξιακές διαταραχές και είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων καθώς και νευρολογικών, γνωστικών, ψυχολογικών και κοινωνικών μεταβολών (Bozzi et al., 2012). Μελέτες έχουν δείξει ότι η CBD εμφανίζει αντισπασμωδικές ιδιότητες και μπορεί να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης επιληπτικών κρίσεων σε ασθενείς με φαρμακοανθεκτικές μορφές επιληπτικών συνδρόμων, όπως το σύνδρομο Lennox-Gastaut (LS) και το σύνδρομο Dravet (DS). Αυτά τα σύνδρομα παρατηρούνται συνήθως σε παιδιά και μπορούν να βλάψουν τη λειτουργία του εγκεφάλου επηρεάζοντας δυσμενώς την ποιότητα ζωής τους, γι' αυτό είναι επιτακτική η ανάγκη ανακάλυψης νέων φαρμάκων. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης της CBD στη θεραπεία της επιληψίας δεν είναι πλήρως κατανοητός, πληθώρα μελετών έχει δείξει ότι με τη χρήση ελαιών κανναβιδιόλης ή την προσθήκη αυτής στη φαρμακευτική αγωγή που ήδη ακολουθείται, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη συχνότητα και τη σοβαρότητα επιληπτικών κρίσεων (Devinsky et al., 2016; Hussain et al., 2015; Press et al., 2015). Έχουν διεξαχθεί, επίσης, πολλές πειραματικές μελέτες για τις επιδράσεις της CBD κατά των επιληπτικών κρίσεων σε ζωικά μοντέλα, με την πλειοψηφία αυτών να παρουσιάζει σταθερά αποτελέσματα ως προς την αντισπασμωδική δράση της CBD, με τη μέση θεραπευτική δόση (ED<sub>50</sub>) CBD να κυμαίνεται από 10 έως 40 mg / kg (Reddy, 2017). Μελέτες που έγιναν σε ασθενείς με ανθεκτική επιληψία έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθώς παρατηρήθηκε μείωση των κρίσεων χωρίς την εμφάνιση πολύ σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών ή ψυχωσικών συμπτωμάτων και βελτίωση της ποιότητας της ζωής των ασθενών, ενώ η CBD ήταν καλώς ανεκτή και σε δόσεις μεγαλύτερες των 600 mg (Devinsky et al., 2016, 2017; Reddy, 2017).

### 2.6.2 Κατάθλιψη και άγχος

Η κατάθλιψη είναι μια διαταραχή της διάθεσης που χαρακτηρίζεται από μόνιμα και συνεχή ψυχοσωματικά συμπτώματα. Οι αντικαταθλιπτικές ιδιότητες της CBD πιθανόν να οφείλονται στη δράση της στους υποδοχείς 5-HT<sub>1A</sub>. Μελέτη έχει δείξει ότι η οξεία χορήγηση CBD σε υψηλές δόσεις (200 mg/kg) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αντικαταθλιπτικής δράσης σε ζωικά μοντέλα (El-Alfy et al., 2010). Επίσης, διάφορες μελέτες έδειξαν πως η χρήση CBD έχει θετική επίδραση σε αγχώδεις διαταραχές, συγκεκριμένα στη γενικευμένη διαταραχή άγχους, στην κοινωνική αγχώδη διαταραχή και στο σύνδρομο μετατραυματικού στρες (Skelley et al., 2020). Ασθενείς που έλαβαν CBD σε δόσεις από 25 mg έως 175 mg παρουσίασαν βελτίωση στο άγχος και σε μικρότερο βαθμό στον ύπνο (Shannon, 2019). Επίσης, η CBD σε δόση 300 mg έδειξε ικανοποιητική μείωση του άγχους που εμφανίζεται σε άτομα κατά τη δημόσια ομιλία (Linares et al., 2019; Zuardi et al., 1993, 2017). Σε όλες τις μελέτες η CBD ήταν καλώς ανεκτή με συχνότερες ανεπιθύμητες ενέργειες την εμφάνιση κόπωσης και καταστολής.

### 2.6.3 Ψυχώσεις

Η CBD χαρακτηρίζεται από απουσία ψυχοτρόπων δράσεων, ενώ μελέτες έχουν δείξει πως μπορεί να αποτρέψει ορισμένες από τις επιδράσεις που προκαλεί η Δ<sup>9</sup>-THC, γεγονός που ενισχύει την άποψη πως η CBD μπορεί να εμφανίζει αντιψυχωσική δραστηριότητα (Freeman et al., 2019). Πράγματι, σε μελέτη που διεξήχθη σε ασθενείς με σχιζοφρένεια, η ημερήσια λήψη 1000 mg CBD οδήγησε στη μείωση των θετικών ψυχωσικών συμπτωμάτων και τη βελτίωση των γνωστικών λειτουργιών. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρθηκαν ήταν ήπιας σοβαρότητας (McGuire et al., 2018). Σε κλινική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε σύγκριση της χρήσης CBD και του αντιψυχωσικού φαρμάκου αμισουλπρίδη στη σχιζοφρένεια, έδειξε πως η CBD σε ημερήσιες δόσεις από 200 mg έως 800 mg ήταν εξίσου ασφαλής και αποτελεσματική με την αμισουλπρίδη, με την CBD να εμφανίζει καλύτερο προφίλ ανεπιθύμητων ενεργειών. Η θεραπεία με CBD συνοδεύτηκε με αύξηση των επιπέδων της ανανδαμίδης στον ορό, η οποία σχετίζεται με τη βελτίωση της κλινικής εικόνας των ασθενών (Leweke et al., 2012).

### 2.6.4 Νόσος Parkinson

Η νόσος Parkinson είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή, που χαρακτηρίζεται στην πρώτη φάση κυρίως από κινητικές δυσλειτουργίες όπως βραδυκινησία, τρόμο, ακαμψία και δυσχέρεια στη βάδιση, ενώ στην τελική φάση μπορεί να εμφανιστούν

ψυχιατρικές διαταραχές, όπως κατάθλιψη. Σε *in vivo* μελέτες η CBD έχει δείξει νευροπροστατευτική δράση αυξάνοντας τα επίπεδα mRNA του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδική δισμουτάση Cu/Zn και αποτρέποντας τη μείωση της ντοπαμίνης (García-Agencibia et al., 2007). Σε κλινική μελέτη η χορήγηση CBD με αρχική ημερήσια δόση 150 mg μείωσε τα ψυχωσικά συμπτώματα της νόσου (Zuardi et al., 2009). Σε άλλες κλινικές μελέτες η χορήγηση CBD με ημερήσιες δόσεις 75 mg ή 300 mg βελτίωσε την ποιότητα ζωής των πασχόντων και μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης των συμβάντων που σχετίζονται με τη διαταραχή συμπεριφοράς κατά τον ύπνο REM, ωστόσο, η CBD δεν έδειξε βελτίωση στα κινητικά συμπτώματα (Chagas et al., 2014a, 2014b).

### 2.6.5 Νόσος Alzheimer

Η νόσος Alzheimer είναι μια προοδευτική, χρόνια νευροεκφυλιστική ασθένεια, μια μορφή άνοιας, που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση πλακών β-αμυλοειδούς (Aβ) και νευροϊνιδιακών πλεγμάτων tau (NTFs) στον εγκέφαλο. Αν και η αιτιολογία της νόσου συνδέεται με πληθώρα μηχανισμών, η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες φαίνεται να παίζουν καθοριστικό ρόλο (Candore et al., 2010). Έτσι, οι αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες της CBD, την καθιστούν ένα σημαντικό εργαλείο στη θεραπεία παθολογιών σχετιζόμενων με τη νόσο Alzheimer (Pisanti et al., 2017). *In vitro* μελέτη έδειξε πως η CBD μπορεί να αναστείλει την υπερφωσφορυλίωση της tau (Esposito et al., 2006a). Ακόμα, *in vitro* και *in vivo* μελέτες απέδειξαν πως η CBD σε δόσεις 2,5 και 10 mg/kg μπορεί να εξασθενίσει τις νευροεκφυλιστικές και νευροφλεγμονώδεις δράσεις που προκαλούνται από το β-αμυλοειδές περιορίζοντας την έκφραση της συνθάσης νιτρικού οξειδίου iNOS και της ιντερλευκίνης 1β (IL-1β) (Esposito et al., 2006b, 2007), ενώ σε δόση 20 mg/kg μπορεί να περιορίσει την μικρογλοιακή ενεργοποίηση (Martín-Moreno et al., 2011).

### 2.6.6 Καρκίνος

*In vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η CBD έχει επίδραση έναντι καρκινικών κυτταρικών σειρών και εμφανίζει αντιπολλαπλασιαστικές, κυτταροτοξικές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη, την μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων, προκαλεί απόπτωση αυτών και επιδρά στην αγγειογένεση (McAllister et al., 2011; Pisanti et al., 2017; Shrivastava et al., 2011; Soroceanu et al., 2013; Vaccani et al., 2005). Έχει αποδειχθεί πως έχει επιδράσεις στο γλοιοβλάστωμα, τον καρκίνο του πνεύμονα, του μαστού, του παχέος

εντέρου, του προστάτη, τη λευχαιμία, και στο μελάνωμα (Kovalchuk and Kovalchuk, 2020; Massi et al., 2013; Pisanti et al., 2017).

Μελέτη έδειξε ότι η CBD αναστέλλει ισχυρά και επιλεκτικά την ανάπτυξη κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού με IC<sub>50</sub> περίπου 6μM (Ligresti et al., 2006). Επίσης, έχει αποδειχθεί πως μειώνει την έκφραση του γονιδίου Id-1 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού, γονίδιο που σχετίζεται με τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων, με αποτέλεσμα να μειώνεται η επιθετικότητα του όγκου (McAllister et al., 2011). Επίσης, η CBD αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προκαλεί απόπτωση εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση τόσο των θετικών όσο και των αρνητικών στον υποδοχέα οιστρογόνων καρκινικών κυττάρων του ανθρώπινου μαστού, ενώ έχει μικρή επίδραση σε μη καρκινικά κύτταρα μαστού. Ακόμη, αναφέρεται πως η CBD προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω αυτοφαγίας σε καρκινικά κύτταρα του μαστού προκαλούμενη από διέγερση του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου καθώς και απόπτωση των καρκινικών κυττάρων αναστέλλοντας τη σηματοδότηση του Akt / στόχου της ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mTOR) και ενισχύοντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species - ROS) (Shrivastava et al., 2011).

Η CBD έχει επίδραση στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, τον πιο επιθετικό πρωτογενή όγκο του ΚΝΣ. *In vitro* μελέτες έδειξαν πως η CBD είναι αποτελεσματική στην αναστολή του πολλαπλασιασμού κυττάρων του ανθρώπινου γλοιώματος, μέσω επαγωγής απόπτωσης, και της μετανάστευσης αυτών. Ως πιθανός μηχανισμός δράσης προτείνεται η παραγωγή ROS και άρα η πρόκληση οξειδωτικού στρες, η εξάντληση της ενδοκυτταρικής γλουταθειόνης, η απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και η ενεργοποίηση των κασπασών -8, -9, -3 (Massi et al., 2004, 2006; Vaccani et al., 2005). Επίσης, αποδείχθηκε πως η CBD μπορεί να ενισχύσει τη δράση της Δ<sup>9</sup>-THC έναντι του γλοιοβλαστώματος (Marcu et al., 2010).

Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως η CBD προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα μέσω της αύξησης της κυκλοοξυγενάσης 2 (COX-2) και του PPAR-γ (Ramer et al., 2013). Η CBD μειώνει τη διεισδυτικότητα και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα μέσω ενίσχυσης της έκφρασης του ιστικού αναστολέα μεταλλοπρωτεϊνάσης 1 (TIMP-1), του ενδοκυτταρικού μορίου προσκόλλησης 1 (ICAM-1) καθώς και στη μείωση έκφρασης και απελευθέρωσης του αναστολέα ενεργοποιητή παλσμυνογόνου 1 (PAI-1) (Ramer et al., 2010a, 2010b, 2012)

Η CBD μειώνει την εντερική φλεγμονή, η οποία σχετίζεται άμεσα με την έναρξη του καρκίνου του παχέος εντέρου και ασκεί χημειοπροστατευτική δράση σε δύο κυτταρικές

σειρές του καρκινώματος του παχέος εντέρου λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της (Aviello et al., 2012; Borrelli et al., 2009). Σε *in vivo* μελέτες η CBD παρουσίασε σημαντική χημειοπροστατευτική δράση σε δόση 1 mg/kg μειώνοντας σημαντικά το σχηματισμό παρεκκλίνουσων κρυπτικών εστιών, πολύποδων και όγκων (Aviello et al., 2012) και μείωσε τις μεταστάσεις στο ήπαρ ανταγωνίζοντας τον GPR55 υποδοχέα που εμπλέκεται στην μετανάστευση των κυττάρων (Kargl et al., 2016).

Σε *in vivo* μελέτη συγκρίθηκε η χορήγηση CBD και του αντικαρκινικού φαρμάκου σισπλατίνη για τη θεραπεία του κακοήθους μελανώματος και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η CBD παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τη σισπλατίνη, δηλαδή οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη του μελανώματος, καλύτερη ποιότητα ζωής και αυξημένο χρόνο επιβίωσης (Simmerman et al., 2019). Επίσης, προκαλεί απόπτωση σε καρκινικές κυτταρικές σειρές μυελώδους λευχαιμίας και λεμφώματος, καθώς και σε προστατικά καρκινικά κύτταρα (Kovalchuk and Kovalchuk, 2020; Massi et al., 2013).

## **2.6.7 Πόνος και ναυτία / έμετος**

Οι μελέτες που αξιολογούν την χορήγηση μόνο της κανναβιδιόλης για την ανακούφιση του πόνου είναι λιγιστές. Σε *in vivo* μελέτη που πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της CBD στον νευροπαθητικό και τον φλεγμονώδη πόνο, η ημερήσια από του στόματος χορήγηση CBD (2,5 – 20 mg / kg στην περίπτωση του νευροπαθητικού πόνου και 20 mg / kg στην περίπτωση του φλεγμονώδους) μείωσε την υπεραλγησία σε μηχανικά και θερμικά ερεθίσματα (Costa et al., 2007). Προκλινικές μελέτες, επίσης, έχουν δείξει ότι η CBD σε δόση 5 mg/kg καταστέλλει τη ναυτία και τον έμετο, ενώ ως πιθανός μηχανισμός δράσης προτείνεται η αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς 5-HT<sub>1A</sub> και 5-HT<sub>3</sub> (Parker et al., 2002, 2011; Rock et al., 2012). Ωστόσο, δεν υπάρχουν κλινικές μελέτες που να αξιολογούν την επίδραση της CBD στον πόνο, τον έμετο και τη ναυτία. Οι κλινικές μελέτες επικεντρώνονται στην επίδραση του συνδυασμού Δ<sup>9</sup>-THC / CBD στην καταπολέμηση των παραπάνω καταστάσεων, ο οποίος έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα σε διάφορων ειδών πόνους, όπως ο καρκινικός και ο νευροπαθητικός (Rabgay et al., 2020) και στην διαχείριση της προκαλούμενης από χημειοθεραπεία ναυτίας και εμέτου (Duran et al., 2010).

## **2.5.8 Άλλες χρήσεις**

Υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για τη χρήση της CBD, ως μονοθεραπεία ή συμπληρωματική θεραπεία, για τα βασικά συμπτώματα και συννοσηρότητες του αυτισμού. Ο αυτισμός είναι μια νευροαναπτυξιακή διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μειωμένη

κοινωνική αλληλεπίδραση και επικοινωνία, καθώς και από περιορισμένα και επαναλαμβανόμενα πρότυπα συμπεριφοράς. Ωστόσο οι υπάρχουσες μελέτες δείχνουν αποτελέσματα μόνο σε κάποιες συννοσηρότητες της ασθένειας (Poleg et al., 2019).

Εξετάζεται η χρήση της CBD στην ασθένεια Huntington, που είναι μια κληρονομική νευροεκφυλιστική διαταραχή που προκαλεί ανεξέλεγκτες κινήσεις, γνωστική δυσλειτουργία και συναισθηματικά προβλήματα. Συνδυασμός Δ<sup>9</sup>-THC:CBD 1:1 φαίνεται πως επιδρά θετικά ως προς την υπερκινητικότητα σε πειραματικά μοντέλα, λόγω των αντιφλεγμονωδών και νευροπροστατευτικών δράσεων των ουσιών. Ο ίδιος συνδυασμός έχει δείξει θετικές επιδράσεις στη φλεγμονή και την σπαστικότητα στη σκλήρυνση κατά πλάκας, με αποτέλεσμα την έγκριση κυκλοφορίας σκευάσματος με αυτή την ένδειξη. Κλινικές δοκιμές χορήγησης μόνο με CBD για την αντιμετώπιση της σκλήρυνσης κατά πλάκας δεν έχουν πραγματοποιηθεί, ωστόσο σε *in vivo* μελέτες έχουν αποδειχθεί οι αντιφλεγμονώδεις και νευροπροστατευτικές ιδιότητες της που σχετίζονται με την ασθένεια της πολλαπλής σκλήρυνσης (Pisanti et al., 2017).

Πολυάριθμες *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει πως η CBD μπορεί να έχει δράση στην ακμή, σε λοιμώξεις, σε διαβητικές επιπλοκές και καρδιαγγειακές παθήσεις. Επίσης, φαίνεται πως έχει επίδραση στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη νόσο Crohn και σε φλεγμονώδεις παθήσεις (Pisanti et al., 2017; Russo, 2011).

## 2.7 Τοξικότητα κανναβιδιόλης και Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης

Στη βιβλιογραφία, έχει αναφερθεί ένα μεγάλο εύρος των από του στόματος δόσεων κανναβιδιόλης, το οποίο κυμαίνεται στα 100-800mg/ημέρα. Η τοξικότητά της βρέθηκε σχετικά χαμηλή, αν και δεν υπάρχουν πλήρη στοιχεία, ενώ φαίνεται πως η CBD δεν σχετίζεται με ενδεχόμενο κατάχρησης (WHO, 2018a). Σε κλινικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί, η CBD ήταν καλώς ανεκτή με την εμφάνιση ήπιων ή μέτριων ανεπιθύμητων ενεργειών και την απουσία ψυχοτρόπου δράσης. Έχουν παρατηρηθεί καταστολή, υπνηλία, σπασμοί, κόπωση, λήθαργος και αδιαθεσία. Επίσης, σε κλινικές δοκιμές παρατηρήθηκε αύξηση της ηπατικής λειτουργίας και σημαντική αύξηση στις τρανσαμινάσες. Στην εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών από το ήπαρ πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η συγχορήγηση με φάρμακα που υφίστανται ηπατική βιομετατροπή. Επιπλέον, η θεραπεία με CBD μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερικές διαταραχές, όπως διάρροια, έμετο καθώς και απώλεια όρεξης. Τέλος, σε μελέτες έχουν εμφανιστεί λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού, πνευμονία, πυρεξία (Huestis et al., 2019).

Αντίθετα, η Δ<sup>9</sup>-THC είναι υπεύθυνη για πληθώρα ανεπιθύμητων ενεργειών. Οι αρνητικές επιδράσεις της Δ<sup>9</sup>-THC στον ανθρώπινο οργανισμό ευθύνονται ως επί το πλείστον για τις ανεπιθύμητες επιπτώσεις χρήσης κάνναβης. Κύριος τρόπος λήψης κάνναβης αποτελεί το κάπνισμα, όπου οι τοξικές εκδηλώσεις της εμφανίζονται αμέσως μετά το κάπνισμα, φτάνουν στο μέγιστο αποτέλεσμα μέσα σε 20 λεπτά και εξαφανίζονται μετά από 3 ώρες. Στις βραχυπρόθεσμες ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνονται βήχας, γαστρεντερικές διαταραχές, ταχυκαρδία, υπόταση, ξηροστομία, ευφορία, καθώς και μειωμένη προσοχή και συντονισμός κινήσεων, συμπτώματα που μπορεί να επηρεάσουν την οδήγηση. Ακόμη, η Δ<sup>9</sup>-THC αναστέλλει την πρόσφατη μνήμη και τη νοητική δραστηριότητα, αυξάνει την όρεξη και προκαλεί παραισθήσεις και ψευδαισθήσεις. Σε υψηλές δόσεις μπορεί να εμφανιστεί ψύχωση και παράνοια. Χρόνια χρήση κάνναβης έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση νευροψυχιατρικών συμπτωμάτων, όπως άγχος, κατάθλιψη, ακόμη και αύξηση του κινδύνου ανάπτυξης σχιζοφρένειας. Η χασισική μέθη εκδηλώνεται με το χαρακτήρα του ονειρικού παραληρήματος, όπου κυριαρχεί το αίσθημα ευφορίας, και σπανιότερα της αντίδρασης πανικού. Επίσης, χρόνιοι χρήστες διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης χρόνιας βρογχίτιδας, ενώ μπορεί να αυξηθεί ελαφρώς ο κίνδυνος εμφράγματος του μυοκαρδίου (Levinsohn and Hill, 2020; Κουτσελίνης, 2004). Η τοξικότητα της Δ<sup>9</sup>-THC είναι χαμηλή, με τη θανατηφόρο δόση σε άνθρωπο βάρους 70 kg να έχει υπολογιστεί περίπου στα 4 g, ενώ δεν εμφανίζει μεταλλαξιογόνο και καρκινογόνο δράση (WHO, 2018b). Η Δ<sup>9</sup>-THC αναπτύσσει ανοχή, αλλά δεν εμφανίζεται εξάρτηση, ενώ τα συμπτώματα συνδρόμου στέρησης φαίνεται πως είναι ήπια (Grotenhermen, 2004).

## **2.8 Προϊόντα κανναβιδιόλης**

### **2.8.1 Epidiolex®**

Τον Ιούνιο του 2018 εγκρίθηκε από την Αμερικάνικη Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (U.S. Food and Drug Administration - FDA) το πόσιμο διάλυμα Epidiolex για τη θεραπεία κρίσεων που σχετίζονται με δύο σπάνιες και σοβαρές μορφές επιληψίες, το σύνδρομο Lennox-Gastaut και το σύνδρομο Dravet, σε ασθενείς ηλικίας 2 ετών και άνω. Το ενεργό συστατικό του Epidiolex είναι η κανναβιδιόλη και είναι το πρώτο φάρμακο που έχει εγκριθεί από το FDA και περιέχει καθαρή ουσία προερχόμενη από το φυτό της κάνναβης. Το Epidiolex αποτελεί, επίσης, το πρώτο εγκεκριμένο από τον FDA φάρμακο για τη θεραπεία ασθενών με σύνδρομο Dravet. Το Epidiolex τοποθετείται στο πίνακα V του νόμου περί ελεγχόμενων ουσιών (ουσίες με σχετικά χαμηλό κίνδυνο κατάχρησης) (FDA, 2018). Το Σεπτέμβριο του 2019, ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicines Agency –



EMA) επέτρεψε την κυκλοφορία της CBD με την εμπορική ονομασία Epidyolex για την αντιμετώπιση των παραπάνω επιληπτικών συνδρόμων, ως επικουρική θεραπεία σε συνδυασμό με την κλοβαζάμη. Ο EMA το χαρακτήρισε «ορφανό φάρμακο», δηλαδή φάρμακο που χρησιμοποιείται σε σπάνιες ασθένειες (EMA, 2019).

Ως ανεπιθύμητες ενέργειες έχουν αναφερθεί υπνηλία, διάρροια, απώλεια όρεξης, έμετος, κόπωση, λήθαργος, λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού που φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενες. Η σοβαρότητα των εκδηλώσεων χαρακτηρίστηκε ήπια ή μέτρια. Η δόση κυμαίνεται από 5mg/kg έως και 20 mg/kg ημερησίως (Sekar and Pack, 2019).

### **2.8.2 Sativex®**

Τον Ιούνιο του 2010 εγκρίθηκε στο Ηνωμένο Βασίλειο η χρήση του Sativex® για τη βελτίωση των συμπτωμάτων μέτριας έως σοβαρής σπαστικότητας λόγω σκλήρυνσης κατά πλάκας σε ενήλικες ασθενείς που δεν έχουν ανταποκριθεί σε άλλα φάρμακα. Σταδιακά, κι άλλες χώρες της Ευρώπης και ο Καναδάς έχουν προχωρήσει στην έγκριση της κυκλοφορίας του Sativex. Ανάμεσα τους και η Ελλάδα, όπου έχει εγκριθεί από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων (ΕΟΦ) το Sativex, με ένδειξη την σκλήρυνση κατά πλάκας, το νευροπαθητικό πόνο και τη σπαστικότητα.

Η σκλήρυνση κατά πλάκας είναι μια χρόνια αυτοάνοση ασθένεια του ΚΝΣ που προκαλεί μόνιμη αναπηρία, ιδίως σε νέους ενήλικες. Το Sativex αποτελεί ένα τυποποιημένο εκχύλισμα κάνναβης, που κυκλοφορεί υπό τη μορφή στοματικού εκνεφώματος και περιέχει Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη και κανναβιδιόλη σε αναλογία 1:1 (2,7 mg Δ<sup>9</sup>-THC και 2,5 mg CBD / 0,1 mL). Η θεραπεία με Sativex αρχίζει με ένα ψεκασμό την ημέρα και μπορεί να αυξηθεί μέχρι και 12 ψεκασμούς την ημέρα, ανάλογα με την ανταπόκριση του ασθενούς. Εκτός από τον έλεγχο της σπαστικότητας, μελέτες έχουν δείξει ότι βοηθάει, επίσης, στη μείωση του πόνου που σχετίζεται με τη σκλήρυνση κατά πλάκας (Giacoppo et al., 2017), καθώς και στη διαχείριση του χρόνιου νευροπαθητικού πόνου, ωστόσο απαιτούνται περισσότερες και πιο ακριβείς μελέτες για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων (Überall, 2020).

Η χρήση του Sativex μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες που διαφέρουν από άτομο σε άτομο. Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται και συνήθως εμφανίζονται τις τέσσερις πρώτες εβδομάδες είναι ζάλη, κόπωση, άγχος, κατάθλιψη, δυσκοιλιότητα ή διάρροια, ναυτία, ίλιγγος, κεφαλαλγία, ξηροστομία, υπνηλία και λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος. Η σοβαρότητα των παραπάνω ενεργειών περιγράφεται

συχνότερα ως ήπια ή μέτρια. Σπανιότερα μπορεί να εμφανιστούν αλλεργικές αντιδράσεις, ψύχωση, ευφορία, πανικός, παράνοια, παραισθήσεις, αυτοκτονικός ιδεασμός, αλλαγές στη μνήμη και μείωση των γνωστικών λειτουργιών. Αυτά τα φαινόμενα εξαφανίζονται με μείωση της δόσης ή διακοπή της χορήγησης του φαρμάκου. Επίσης, σε περίπτωση διακοπής της θεραπείας με Sativex δεν παρατηρείται σύνδρομο στέρησης. Η συγχορήγηση της CBD με την  $\Delta^9$ -THC έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών που προκαλούνται από την  $\Delta^9$ -THC (Giacoppo et al., 2017).

### 2.8.3 Άλλα προϊόντα κανναβιδιόλης

Εκτός από τα εγκεκριμένα φαρμακευτικά σκευάσματα κανναβιδιόλης, σήμερα είναι διαθέσιμα σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες και στις Η.Π.Α. προϊόντα που περιέχουν μόνο CBD ή κυρίως CBD και  $\Delta^9$ -THC σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Τα προϊόντα με CBD που κυκλοφορούν στην αγορά είναι συμπληρώματα διατροφής, υγρά για ηλεκτρονικά τσιγάρα, καλλυντικά, ακόμα και ζωικές τροφές και φάρμακα. Επίσης, γαληνικά “έλαια CBD” (CBD oils) παρασκευάζονται από φαρμακοποιούς που ακολουθούν ιατρικές συνταγές σε χώρες της Ευρώπης με ενδείξεις τον χρόνιο πόνο, την παιδική επιληψία, την πολλαπλή σκλήρυνση και άλλα (Specchio et al., 2020).

Η CBD δεν περιλαμβάνεται στον πίνακα ελεγχόμενων ουσιών της Ευρωπαϊκής Ένωσης με αποτέλεσμα πολλές εταιρίες να παράγουν προϊόντα με CBD, χωρίς να απαιτούνται αναλυτικοί έλεγχοι και χωρίς την ύπαρξη νομικής προστασίας σχετικά με τη σύνθεση και την ποιότητα και βασικού κανονιστικού πλαισίου. Στις Η.Π.Α. η CBD ανήκει στον πίνακα I του νόμου περί ελεγχόμενων ουσιών (ουσίες με υψηλό κίνδυνο κατάχρησης και χωρίς αποδεκτή ιατρική χρήση) (Specchio et al., 2020).

Η CBD προέρχεται κυρίως από ποικιλίες κλωστικής κάνναβης, ενώ δεν απαιτείται ιατρική συνταγή για την αγορά προϊόντων CBD. Ωστόσο, συνίσταται οι ασθενείς που επρόκειτο να χρησιμοποιήσουν ένα τέτοιο προϊόν να συμβουλευτούν τον γιατρό τους. Αυτά τα προϊόντα μπορούν να διατεθούν σε φαρμακεία, ειδικά καταστήματα και μέσω διαδικτύου. Το σχήμα θεραπεία διαφέρει ανάμεσα στους ανθρώπους και προτείνεται η έναρξη της θεραπείας με μια μικρή δόση χαμηλής περιεκτικότητας και σταδιακή αύξηση της δόσης με ταυτόχρονη παρατήρηση των αντιδράσεων του οργανισμού. Επίσης, συνίσταται η λήψη μικρότερων δόσεων κατά τη διάρκεια της ημέρας (πρωί, μεσημέρι, απόγευμα, βράδυ) (Καπαρουδάκης, 2018).

Τα προϊόντα κανναβιδιόλης χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανακούφιση του πόνου, τη βελτίωση του ύπνου και τη μείωση του άγχους. Η χρήση και οι πωλήσεις αυτών των προϊόντων σημειώνουν άνοδο τα τελευταία χρόνια. Ωστόσο πολλές εταιρίες πωλούν προϊόντα CBD με ενδείξεις όπως τη νόσο Parkinson, τη νόσο Alzheimer, τη διαταραχή ελλειμματικής προσοχής-υπερκινητικότητα (ΔΕΠΥ), το χρόνιο πόνο και το άγχος για τις οποίες δεν υπάρχουν ακόμα επαρκείς κλινικές μελέτες για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χρήσης CBD (Rubin, 2019).

Τα πιο συχνά κυκλοφορούντα προϊόντα κανναβιδιόλης στην αγορά είναι τα βάμματα και τα έλαια CBD. Λαμβάνονται σε σταγόνες πάνω ή κάτω από τη γλώσσα με τη βοήθεια σταγονόμετρου. Η περιεκτικότητα CBD μπορεί να ποικίλλει από 250 mg έως 1000 mg ή και παραπάνω σε κάθε μπουκάλι. Επίσης, υπάρχουν στην αγορά κάψουλες που περιέχουν 10-25 mg CBD και αποτελούν ευκολότερο τρόπο λήψης CBD σε σχέση με τα έλαια. Στην περίπτωση λήψης CBD μέσω ατμιστών ή ηλεκτρονικών τσιγάρων τα αποτελέσματα ενδέχεται να μην είναι τόσο μακροχρόνια σε σύγκριση με άλλες μεθόδους χορήγησης, όπως τα έλαια και οι κάψουλες, ωστόσο ορισμένοι καταναλωτές έχουν αναφέρει άμεση εμφάνιση των θετικών επιδράσεων της (Ministry of Hemp, 2020). Τέλος, είναι δυνατή η λήψη CBD μέσω σπρέι, όπου η περιεκτικότητα κυμαίνεται από 1 έως 3 mg, και μέσω υπόθετων, μέθοδος που επιλέγεται σε περίπτωση αδυναμίας λήψης από του στόματος (Καπαρουδάκης, 2018).

Επιπλέον, η CBD αποτελεί συστατικό σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος όπως κρέμες και αλοιφές, υποστηρίζοντας πως έχει αντιφλεγμονώδεις, ενυδατικές, αναλγητικές και αντιρυτιδικές ιδιότητες. Επίσης, μερικοί ισχυρίζονται πως έχει οφέλη στη γήρανση, την ακμή, το έκζεμα, τη ψωρίαση και τον κνησμό. Ωστόσο, υπάρχουν κυρίως προκλινικά δεδομένα που επιβεβαιώνουν αυτές τις ιδιότητες ενώ οι κλινικές δοκιμές είναι ελάχιστες, με αποτέλεσμα να απαιτείται περισσότερη διερεύνηση και κλινικές μελέτες για την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της χρήσης της CBD στις δερματικές παθήσεις (Jhawa et al., 2019).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων προσδιορισμού των κανναβινοειδών στα βιολογικά υλικά**

Η ολοένα και αυξανόμενη χρήση προϊόντων κανναβιδιόλης, αλλά και η παράνομη χρήση κάνναβης έχουν οδηγήσει στην ανάγκη ανάπτυξης διαφόρων μεθόδων για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών στα βιολογικά υλικά. Στην επιστημονική βιβλιογραφία έχει δημοσιευτεί πληθώρα μεθόδων ανάλυσης κανναβιδιόλης και  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης, καθώς επίσης και των μεταβολιτών αυτής, 11-υδροξυ- $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη (11-OH-THC) και 11-νορ-9-καρβοξυ-τετραϋδροκανναβινόλη (11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC).

### **3.1 Βιολογικά δείγματα**

Τα πιο συχνά αναλυόμενα βιολογικά δείγματα για την ανίχνευση κανναβινοειδών είναι το αίμα (ολικό αίμα, ορός ή/και πλάσμα) (Gasse et al., 2016; Jamey et al., 2008; Jamwal et al., 2017; Schwoppe et al., 2011) και τα ούρα (Aizpurua-Olaizola et al., 2017; Andersson et al., 2016; Grauwiler et al., 2007; Montesano et al., 2014; Teixeira et al., 2007). Εκτός από τα κλασικά αυτά βιολογικά δείγματα ο προσδιορισμός τους έχει γίνει και σε άλλα εναλλακτικά βιολογικά υλικά όπως οι τρίχες όπου οι ουσίες μπορούν να ανιχνευθούν ακόμη και μετά από μήνες έως και χρόνια (Dulaurent et al., 2014; Emídio et al., 2010; Heinel et al., 2016; Nadulski and Pragst, 2007). Ακόμη, αναλύσεις για την ανίχνευση κανναβινοειδών έχουν πραγματοποιηθεί σε σιέλο και άλλα υλικά (Desrosiers et al., 2015; Milman et al., 2010; Teixeira et al., 2007).

### **3.2 Μέθοδοι εκχύλισης**

Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης είναι κρίσιμο στάδιο στην ανάλυση των ουσιών σε βιολογικά δείγματα, καθώς θα πρέπει να είναι απλή και αναπαραγώγιμη διαδικασία και ταυτόχρονα να έχει υψηλή ανάκτηση και να είναι εκλεκτική. Επίσης, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μειώνεται όσο είναι δυνατό η επίδραση του μητρικού υλικού. Για την αποφυγή λανθασμένων ποσοτικοποιήσεων που οφείλονται σε διαφορές ανάμεσα στα δείγματα γίνεται χρήση εσωτερικού προτύπου. Στις αναλύσεις κανναβινοειδών ως εσωτερικά πρότυπα χρησιμοποιούνται δευτεριωμένα ανάλογα των αναλυόμενων ουσιών. Πρώτο και σημαντικό βήμα αποτελεί η αποπρωτεΐνωση του δείγματος. Αυτή επιτυγχάνεται κυρίως με κατεργασία του δείγματος με ακετονιτρίλιο (Andersson et al., 2016; Jagerdeo et al., 2009; Jamey et al., 2008). Επίσης, σε ορισμένες μελέτες γίνεται υδρόλυση του δείγματος, κυρίως

των ούρων, με β-γλυκουρονιδάση για την απογλυκουρονιδοποίηση των ουσιών (Abraham et al., 2007; Desrosiers et al., 2015; Gustafson et al., 2003; Montesano et al., 2014) και κατάλληλη ρύθμιση pH (Andrews and Paterson, 2012; Jagerdeo et al., 2009; Nadulski et al., 2005).

Ως μέθοδοι εκχύλισης στον προσδιορισμό κανναβινοειδών χρησιμοποιούνται κυρίως η υγρή-υγρή εκχύλιση (liquid-liquid extraction – LLE) και η εκχύλιση στερεής φάσης (solid phase extraction – SPE). Η LLE είναι μια διαδικασία που απαιτεί μεγαλύτερες ποσότητες διαλυτών εκχύλισης και επιτυγχάνεται συνήθως μικρότερος καθαρισμός του βιολογικού υλικού, κάτι που καθιστά πιο δύσκολη την ποσοτικοποίηση των ουσιών όταν βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα. Η SPE εμφανίζει υψηλή αναπαραγωγιμότητα, εύκολη αυτοματοποίηση και απαιτεί μειωμένη ποσότητα διαλυτών σε σύγκριση με τη LLE. Στην LLE ως διαλύτες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 9:1 (v/v) (Andrenyak et al., 2017; Dulaurent et al., 2014; Heidl et al., 2016; Thomas et al., 2007b) και σε αναλογία 5:1 (v/v) (Andrews and Paterson, 2012) και διαιθυλαιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 50:50 (v/v) (Grauwiler et al., 2007). Ωστόσο, κυρίως, έχει χρησιμοποιηθεί και περιγραφεί η SPE ως μέθοδος εκχύλισης. Έχουν αναφερθεί στήλες πηκτής πυριτίας (Aizpurua-Olaizola et al., 2017; Nadulski et al., 2005) και πολυμερικές (Karschner et al., 2010; Teixeira et al., 2007), ενώ η έκλυση πραγματοποιείται με μίγματα διαλυτών, όπως εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογίες 1:1 (v/v) (Aizpurua-Olaizola et al., 2017) και 8:2 (v/v) (Abraham et al., 2007; Gustafson et al., 2003; Jamey et al., 2008; Teixeira et al., 2007), οξικός αιθυλεστέρας/ισοπροπανόλη σε αναλογία 85:15 (v/v) (House et al., 2017), διχλωρομεθάνιο/ισοπροπανόλη/NH<sub>4</sub>OH σε αναλογία 78:20:2 (v/v/v) (Desrosiers et al., 2015), μεθανόλη/ακετονιτρίλιο σε αναλογία 9:1 (Moorthy et al., 2019), εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/οξικό οξύ σε αναλογία 49:49:2 (Karschner et al., 2010), 88:10:2 (Castro et al., 2018). Ακόμη, ως διαλύτες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί ακετονιτρίλιο (Nadulski et al., 2005) και ακετόνη (Gasse et al., 2016). Επίσης, σε ορισμένες μελέτες έχουν περιγραφεί δύο στάδια εκχύλισης, μία για τα ουδέτερα κανναβινοειδή (CBD, Δ<sup>9</sup>-THC) και μία για τον όξινο μεταβολίτη (11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC), με διαλύτες εκχύλισης εξάνιο/ακετόνη /οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 60:30:20 (v/v/v) (Milman et al., 2010), εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/NH<sub>4</sub>OH σε αναλογία 93:5:2 (v/v/v) (Huang et al., 2001) για τις ουδέτερες ενώσεις και εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/AcOH σε αναλογία 75:25:2,5 (v/v/v) (Milman et al., 2010). εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας σε αναλογία 70:30 (v/v) (Huang et al., 2001) για τις όξινες.

Επιπλέον, έχει αναφερθεί σε κάποιες μελέτες η χρήση εκχύλισης με ακροφύσιο μιας χρήσης (Disposable pipette extraction) (Andersson et al., 2016; Scheidweiler et al., 2016) και μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Headspace - solid phase micro-extraction SPME) στην ανάλυση τριχών (Emídio et al., 2010; Nadulski and Pragst, 2007). Ακόμα, υπάρχει αναφορά παραγωγοποίησης με dabsyl chloride (Lacroix and Saussereau, 2012).

### 3.3 Αναλυτικές τεχνικές

Μετά την εκχύλιση του δείγματος ακολουθεί ο προσδιορισμός των ουσιών με τη χρήση κάποιας αναλυτικής τεχνικής. Για την ανίχνευση κανναβινοειδών σε βιολογικά υλικά χρησιμοποιούνται κυρίως η Αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography – GC) και η Υγροχρωματογραφία (Liquid Chromatography – LC).

#### 3.3.1 Αεριοχρωματογραφία (GC)

Η αεριοχρωματογραφία είναι μία από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών στα βιολογικά δείγματα. Παραδείγματα προσδιορισμού κανναβινοειδών στα βιολογικά υλικά με την τεχνική αυτή παρατίθενται στον **Πίνακα 2**.

Η διαδικασία ανάλυσης με GC περιλαμβάνει εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας στο δείγμα κατά την έγχυσή του στον αέριο χρωματογράφο, προκειμένου αυτό να μετατραπεί σε αέρια μορφή. Η θέρμανση, όμως, οδηγεί σε αποκαρβοξυλίωση των οξέων με αποτέλεσμα την λανθασμένη ποσοτικοποίηση των ουσιών. Γι' αυτό το λόγο, απαιτείται η προσθήκη ενός επιπλέον σταδίου πριν την ανάλυση, η παραγωγοποίηση του δείγματος για την υποκατάσταση των λειτουργικών ομάδων των ουσιών, δηλαδή της υδροξυλομάδας και της καρβοξυλομάδας. Η παραγωγοποίηση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό πιο σταθερών και πτητικών ενώσεων και την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Κυρίως, έχει περιγραφεί η χρήση N,O-δισ (τριμεθυλοσιλυλ)τριφθοροακεταμιδίου (N,O-bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide – BSTFA) μαζί με τριμεθυλοχλωροσιλάνιο (trimethylchlorosilane – TMCS) (Abraham et al., 2007; Heinl et al., 2016; Karschner et al., 2010; Lowe et al., 2007; Milman et al., 2010) και N-μεθυλ-N-(τριμεθυλοσιλυλ)τριφθοροακεταμιδίου (N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, MSTFA) (Andrenyak et al., 2017; Andrews and Paterson, 2012; Gasse et al., 2016). Επίσης, υπάρχουν αναφορές χρήσης τριφθοροοξικού ανυδρίτη (trifluoroacetic anhydride – TFAA) μαζί με εξαφθοροισοπροπανάλη (hexafluoro-2-propanol – HFIP) (Huang et al., 2001; Milman et al., 2010; Thomas et al., 2007b).

Η κινητή φάση αποτελείται από το φέρον αέριο που είναι το ήλιο, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί χρωματογραφικές στήλες με διάφορες στατικές φάσεις. Έχουν περιγραφθεί στατικές φάσεις με (5%-φαινυλο)-μεθυλοπολυσιλοξάνιο, όπως η HP 5 MS (Gustafson et al., 2003; Nadulski et al., 2005), η OPTIMA 5 MS (Gasse et al., 2016), η DB-5MS (Thomas et al., 2007b), η VF-5ms (Emídio et al., 2010), (50%-φαινυλο)-μεθυλοπολυσιλοξάνιο, όπως η ZB-50 (Milman et al., 2010), (35%-φαινυλο)-μεθυλοπολυσιλοξάνιο, όπως η DB-35 MS (Abraham et al., 2007), 100% διμεθυλοπολυσιλοξάνιο, όπως η DB-1ms (Andrenyak et al., 2017; Huang et al., 2001). Σε κάποιες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί δύο διαστάσεων GC (2D-GC) που προσφέρει αποτελεσματικότερο διαχωρισμό (Andrews and Paterson, 2012; Karschner et al., 2010; Lowe et al., 2007; Milman et al., 2010).

Για την ανίχνευση των ουσιών έχουν χρησιμοποιηθεί φασματομετρία μαζών (MS) (Heinl et al., 2016; Nadulski and Pragst, 2007) ή συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS) (Andrenyak et al., 2017; Castro et al., 2018; Emídio et al., 2010; Thomas et al., 2007b). Ως πηγές ιονισμού έχουν αναφερθεί πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI) (Abraham et al., 2007; Andrews and Paterson, 2012; Gasse et al., 2016; Lowe et al., 2007; Nadulski et al., 2005), χημικός ιονισμός (CI) τόσο θετικός (PCI) (Gustafson et al., 2003) και όσο και αρνητικός (NCI) (Huang et al., 2001; Milman et al., 2010). Επιπλέον, έχει αναφερθεί και η χρήση του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (flame ionization detector - FID) (Karschner et al., 2010; Lowe et al., 2007).

### 3.3.2 Υγροχρωματογραφία (LC)

Η υγροχρωματογραφία αποτελεί μια τεχνική που χρησιμοποιείται πλέον ευρέως καθότι εμφανίζει βελτιωμένη ευαισθησία και μειωμένο χρόνο προκατεργασίας του δείγματος. Έχουν περιγραφεί αναλύσεις με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) (Aizpurua-Olaizola et al., 2017) καθώς και υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography – UPLC) (House et al., 2017; Jamey et al., 2008; Jamwal et al., 2017). Παραδείγματα προσδιορισμού κανναβινοειδών στα βιολογικά υλικά με την τεχνική αυτή παρατίθενται στον **Πίνακα 3**.

Σε αντίθεση με την GC, στην LC δεν παρατηρείται αποσύνθεση των αναλυόμενων ουσιών επιτρέποντας την άμεση ανάλυση των δειγμάτων μετά την εκχύλιση με αποτέλεσμα το στάδιο παραγωγοποίησης να παραλείπεται. Στην πλειοψηφία των αναλύσεων έχουν χρησιμοποιηθεί ως κινητή φάση διάφορα συστήματα διαλυτών και έχει ακολουθηθεί βαθμιδωτή έκλυση. Παραδείγματα μιγμάτων διαλυτών είναι μυρμηκικό οξύ σε νερό (Jagerdeo et al., 2009), μυρμηκικό οξύ σε μεθανόλη (Aizpurua-Olaizola et al., 2017; Jamwal

et al., 2017), μυρμηκικό οξύ σε ακετονιτρίλιο (Hubbard et al., 2020; Jagerdeo et al., 2009), οξικό αμμώνιο σε νερό (Schwope et al., 2011), μεθανόλη/ακετονιτρίλιο (Schwope et al., 2011), οξικό αμμώνιο σε ακετονιτρίλιο (Maralikova and Weinmann, 2004), μυρμηκικό αμμώνιο σε ακετονιτρίλιο (Grauwiler et al., 2007). Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί ακετονιτρίλιο με 0.1% μυρμηκικό οξύ σε αναλογία 70:30 (v/v) (Teixeira et al., 2007). Ως στατικές φάσεις χρησιμοποιούνται διάφορες στήλες, με την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη την C<sub>18</sub> (Montesano et al., 2014; Scheidweiler et al., 2016). Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης στατική φάση πενταφθοροφαινυλοπροπυλίου (pentafluorophenylpropyl – PFPP) (Desrosiers et al., 2015) και διφαινυλίου (Schwope et al., 2011).

Ως ανιχνευτές χρησιμοποιούνται, όπως και στην GC, φασματομετρία μαζών (MS) (Teixeira et al., 2007) αλλά ως επί το πλείστον συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS) (Ferreirós et al., 2013; Jamey et al., 2008). Ο ιονισμός των ουσιών πραγματοποιείται με ηλεκτροψεκασμό (ESI) (Andersson et al., 2016; Hubbard et al., 2020; Moorthy et al., 2019; Scheidweiler et al., 2016; Schwope et al., 2011) και με χημικό ιονισμό σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) (Aizpurua-Olaizola et al., 2017; Dulaurent et al., 2014; Grauwiler et al., 2007).



**Πίνακας 2:** Συνοπτική περιγραφή αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού κανναβινοειδών με τη χρήση GC

Προσδιοριζόμενες ουσίες	Δείγμα	Εσωτερικό Πρότυπο	Μέθοδος εκχύλισης	Παραγωγοποίηση	Στήλη	Ανιχνευτής	LOD/LOQ	Γραμμικότητα	Βιβλιογραφία
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Πλάσμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> , 11-OH-THC-d <sub>3</sub> , THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (pH 4,0)  2) <u>SPE</u> Στήλη: Chromabond C <sub>18</sub> ec Columns (3 mL/200mg ) Διαλύτης εκχύλισης: ACN	BSTFA με 1% TMCS	HP 5 MS (95% dimethylsiloxan, 5% diphenylsiloxan, 30 m x 0,25 mm x 0,25 Ιm)	MS (EI)	<u>LOD:</u> 0,15-0,29 ng/mL  <u>LOQ:</u> 0,51-0,95 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC, CBD 0,25-10,0 ng/mL  THC-COOH 0,25-50,0 ng/mL	(Nadulski et al., 2005)
CBD Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Πλάσμα	CBD-d <sub>3</sub> , Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> , 11-OH-THC-d <sub>3</sub> , THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) ACN 2) <u>SPE</u> Στήλη: Styre Screen polymeric columns (10 mL/60 mg) Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/ΑcOH 49:49:2 v/v	BSTFA με 1% TMCS	2D-GC 1) primary ZB-50 capillary column (30 m×0,25 mm×0,25 μm film thickness) 2) secondary DB-1ms capillary column (15 m×0,25 mm×0,25 μm film thickness)	FID MS	<u>LOD:</u> CBD, Δ <sup>9</sup> -THC 0,25 ng/mL THC-COOH, 11-OH-THC 0,125 ng/mL <u>LOQ:</u> CBD, Δ <sup>9</sup> -THC, THC-COOH 0,25 ng/mL 11-OH-THC 0,125 ng/mL	CBD, Δ <sup>9</sup> -THC 0,25–25 ng/mL 11-OH-THC 0,125–25 ng/mL THC-COOH 0,25–50 ng/mL	(Karschner et al., 2010)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Πλάσμα Ορός	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub>	1) 0,15 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 6,0) 2) ACN 3) <u>SPE</u> 1. Στήλη: Chromabond Drug II Columns (AXS) Διαλύτης εκχύλισης: ακετόνη (Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC), ακετόνη (με 0,05 M AcOH) (THC-COOH) 2. Στήλη: Chromabond C18 ec Columns Διαλύτης εκχύλισης: ακετόνη	MSTFA	OPTIMA 5 MS Accent capillary column (95 % dimethylpolysiloxan e, 5 % diphenylpolysiloxan e, 30 m× 0,25 mm i.d.× 0,25 μm)	MS (EI)	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC < 0,25 ng/mL THC-COOH 2,0 ng/mL (πλάσμα), 1,6 ng/mL (ορός) <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC < 0,35 ng/mL THC-COOH 3,0 ng/MI (πλάσμα), 3,3 ng/mL (ορός)	Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,5–10 ng/mL THC-COOH 4–100 ng/mL	(Gasse et al., 2016)
CBD Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Πλάσμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) ACN 2) <u>LLE</u> Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1 v/v	MSTFA	DB-1MS column (30 M, 0,25mm i.d, 0,1 μm film thickness)	MS/MS (EI)	<u>LLOQ:</u> CBD 0,25 ng/mL Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,1 ng/mL THC-COOH	CBD 0,25–100 ng/mL Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,1–100 ng/mL THC-COOH	(Andrenyak et al., 2017)

							0,5 ng/mL	0,5–500 ng/mL	
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Ούρα	THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub>	1) 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6,8) + β-γλυκουρονιδάση 2) AcOH, ACN, 2 N ρυθμιστικό διάλυμα CH <sub>3</sub> COONa (pH 4,0) 3) <u>SPE</u> Στήλη: Clean Screen ZSTHC020 Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 80:20 v/v	BSTFA με 1% TMCS	DB-35MS capillary column (15-m × 0,32-mm i.d., 0,25-μm film thickness)	MS (EI)	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 1,0 ng/mL 11-OH-THC, THC-COOH 2,5 ng/mL  <u>LOQ:</u> 2,5 ng/mL	2,5 - 300 ng/mL	(Abraham et al., 2007)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Πλάσμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6,8) + β-γλυκουρονιδάση 2) ACN 3) 2 N ρυθμιστικό διάλυμα CH <sub>3</sub> COONa (pH 4,0) 4) <u>SPE</u> Στήλη: Clean Screen ZSDAU020 Διαλύτες εκχύλισης: 1. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : ισοπροπανόλη: NH <sub>4</sub> OH 80:20:2 v/v/v 2. εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας 80:20 v/v	BSTFA με 1% TMCS	HP-5MS column (30m × 0,25mm i.d., 0,25μm film thickness)	MS (PCI)	<u>LOD/LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,5 ng/mL THC-COOH 1,0 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,5–50 ng/mL  THC-COOH 1,0–100 ng/mL	(Gustafson et al., 2003)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Ολικό αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) Διάλυμα PBS 2) <u>SPE</u> Στήλη: OASIS HLB columns Διαλύτης εκχύλισης: 1. οξικός αιθυλεστέρας 2. εξάνιο: οξικός αιθυλεστέρας: AcOH 88:10:2 v/v/v	BSTFA με 1% TMCS	J&W Capillary Column (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,25 film thickness)	MS/MS	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 0,31 ng/mL 11-OH-THC 0,29 ng/mL THC-COOH 0,33 ng/mL	1–100 ng/mL	(Castro et al., 2018)
CBD Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) 1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 4,0) 2) <u>LLE</u> Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 5:1 v/v (×2)	MSTFA	2D-GC 1) primary column HP-5MS (30m×0,25 mm i.d., 0,25 mm d.f.) 2) secondary column DB-17MS (15m×0,32 mm i.d., 0,25 mm d.f.)	MS (EI)	<u>LOD:</u> 0,25 ng/mL  <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,25 ng/mL CBD, THC-COOH 0,5 ng/mL	0,25–50 ng/mL	(Andrews and Paterson, 2012)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Πλάσμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub>	1) 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6,8) + β-γλυκουρονιδάση	BSTFA με 1% TMCS	2D-GC 1) primary DB-1MS capillary	FID MS (EI)	<u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, THC-COOH	Δ <sup>9</sup> -THC, THC-COOH 0,125–25 ng/mL	(Lowe et al., 2007)

		THCCOOH-d <sub>3</sub>	2) ACN 3) 2 N ρυθμιστικό διάλυμα CH <sub>3</sub> COONa (pH 4,0) 4) <u>SPE</u> Στήλη: Clean Screen ZSTHC020 columns (10mL/200 mg) Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας: 80:20 v/v, EtOH		column (15m×0,25mm i.d., 0,25μm film thickness) 2) secondary ZB-50 capillary column (30m×0,32mm i.d., 0,25μm film thickness)		0,125 ng/mL 11-OH-THC 0,25 ng/mL	25–100 ng/mL  11-OH-THC 0,25–10 ng/mL 10–75 ng/mL	
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Ολικό αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) AcOH 10% 2) <u>LLE</u> Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1 v/v	TFAA HFIP	fused-silica capillary column DB-5MS (15m×0,25mm i.d., film thickness 0,25μm)	MS/MS (NICI)	<u>LOD:</u> 0,1-0,2 ng/mL <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,5 ng/mL THC-COOH 2,5 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,5–20 ng/mL  THC-COOH 2,5–100 ng/mL	(Thomas et al., 2007b)
CBD Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Σιελο	CBD-d <sub>3</sub> Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) ACN 2) <u>SPE</u> Στήλη: CEREX Polycrom THC (3 cm <sup>3</sup> /35mg) columns  Διαλύτες εκχύλισης: εξάνιο/ακετόνη /οξικός αιθυλεστέρας 60:30:20 v/v/v (CBD, Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC)  εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/AcOH 75:25:2,5 v/v/v (THC-COOH)	BSTFA με 1% TMCS (CBD, Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC)  HFIP, TFAA (THC-COOH)	2D-GC 1) ZB-50 primary column (30m×0,25mm i.d., 0,25μm film thickness) 2) DB-1MS secondary column (15m×0,25mm i.d., 0,25μm film thickness) (Δ <sup>9</sup> -THC, THC-OH, CBD) 1) DB-1MS primary column (15m×0,25mm i.d., 0,25μm film thickness) 2) ZB-50 secondary column (30m×0,32mm i.d., 0,25μm film thickness) (THC-COOH)	MS (EI) (Δ <sup>9</sup> -THC, THC-OH, CBD)  MS (NICI) (THC-COOH)	<u>LOD:</u> CBD, Δ <sup>9</sup> -THC 0,5 ng/mL 11-OH-THC 0,4 ng/mL THC-COOH 6 pg/L <u>LOQ:</u> CBD, Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,5 ng/mL THC-COOH 7,5 pg/mL	CBD, Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,5–50 ng/mL  THC-COOH 7,5–500 pg/mL	(Milman et al., 2010)
CBD Δ <sup>9</sup> -THC	Τρίχες	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub>	1) H <sub>2</sub> O, ακετόνη 2) 1 M NaOH 3) <u>LLE</u> Διαλύτης εκχύλισης: ισοοκτάνιο (×2)	BSTFA με 1% TMCS	capillary column HP5-MS inert	MS	<u>LOD:</u> CBD 0,013 ng/mg Δ <sup>9</sup> -THC 0,012 ng/mg <u>LOQ:</u>	0,03-1,0 ng/mg	(Nadulski and Pragst, 2007)

			4) HS-SPME				CBD 0,037 ng/mg Δ <sup>9</sup> -THC 0,038 ng/mg		
CBD Δ <sup>9</sup> -THC	Τρίχες	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub>	1) πετρελαϊκός αιθέρας, H <sub>2</sub> O, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2) 1M NaOH 3) HS-SPME	BSTFA με 1% TMCS	VF-5ms capillary column (30m×0,25mm i.d., 0,25μm film thickness)	MS/MS (EI)	<u>LOD:</u> CBD 0,007 ng/mg Δ <sup>9</sup> -THC 0,031 ng/mg <u>LOQ:</u> CBD 0,012 ng/mg Δ <sup>9</sup> -THC 0,062 ng/mg	0,1-8,0 ng/mg	(Emidio et al., 2010)
CBD Δ <sup>9</sup> -THC	Τρίχες	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) εξάνιο, ακετόνη, H <sub>2</sub> O, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2) 1 M NaOH 3) <u>LLE</u> Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 9:1 v/v (×2)	BSTFA με 1% TMCS	DB-5ms separation column (30 m × 0,25 mm, 0,25 μm film thickness)	MS	<u>LOD:</u> CBD 0,01 ng/mg Δ <sup>9</sup> -THC 0,003 ng/mg <u>LOQ:</u> CBD 0,03 ng/mg Δ <sup>9</sup> -THC 0,01 ng/mg	CBD 0,03–0,15 ng/mg 0,1–3,0 ng/mg Δ <sup>9</sup> -THC 0,01–0,15 ng/mg 0,1–3,0 ng/mg	(Heinl et al., 2016)
Δ <sup>9</sup> -THC THC-COOH	Πλάσμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) ACN 2) 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (pH 7,0) 3) <u>SPE</u> Στήλη: CleanScreen columns (ZSTHC020) Διαλύτες εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας/NH <sub>4</sub> OH 93:5:2 v/v/v (Δ <sup>9</sup> -THC) εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 70:30 v/v (THC-COOH)	HFIP, TFAA	Hewlett-Packard DB-1 capillary column (30 m x 0,32-mm i.d., 0,25 μm)	MS (NICI)	<u>LLOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 0,5 ng/mL THC-COOH 2,5 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC, 0,5–100 ng/mL THC-COOH 2,5–100 ng/mL	(Huang et al., 2001)

**Πίνακας 3:** Συνοπτική περιγραφή αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού κανναβινοειδών με τη χρήση LC

Προσδιοριζόμενες ουσίες	Βιολογικό υλικό	Εσωτερικό πρότυπο	Μέθοδος εκχύλισης	Στήλη	Κινητή φάση	Ανιχνευτής	LOD/LOQ	Γραμμικότητα	Βιβλιογραφία
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD Δ <sup>9</sup> -THC-glu THC-COOH-glu	Ολικό αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>9</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) MeOH, ACN, 0,2% NH <sub>4</sub> OH 2) SPE Στήλη: 6-mL Bond Elut Plexa cartridges Διαλύτης εκχύλισης: 1% AcOH σε ACN (v/v)	Ultra Biphenyl column (100 × 2,1 mm, 5μm) fitted with an Ultra II Biphenyl guard cartridge (10×2,0mm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 10 mM οξικό αμμώνιο σε H <sub>2</sub> O (pH 6,15) Διαλύτης B: 15% MeOH σε ACN (v/v)	MS/MS (ESI)	<u>LOD:</u> 11-OH-THC, THC-COOH, THC-COOH-glu 1,0 μg/L Δ <sup>9</sup> -THC 0,5 μg/L CBD, Δ <sup>9</sup> -THC-glu 0,25 μg/L <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD 1,0 μg/L Δ <sup>9</sup> -THC-glu 0,5 μg/L THC-COOH-glu 5,0 μg/L	Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD 1,0-100 μg/L Δ <sup>9</sup> -THC-glu 0,5-50 μg/L TH-COOH-glu 5-250 μg/L	(Schwope et al., 2011)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Ολικό αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) ACN, 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα CH <sub>3</sub> COONa (pH 7,0) 2) <u>online SPE</u> Στήλη: Hysphere C <sub>8</sub> -EC exchange (10×2mm) cartridge Διαλύτης εκχύλισης: ACN	Xterra MS C <sub>18</sub> (50mm×3 mm, 5 μm) column	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε H <sub>2</sub> O Διαλύτης B: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε ACN	MS/MS	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 0,6 ng/mL 11-OH-THC 1,1 ng/mL THC-COOH, CBD 0,9 ng/mL <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 1,8 ng/mL 11-OH-THC 3,2 ng/mL THC-COOH, CBD 2,8 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC 2-200 ng/mL 11-OH-THC, THC-COOH, CBD 3-200 ng/mL	(Jagerdeo et al., 2009)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Ολικό αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>9</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) MeOH, ACN με 0,1% μυρμηκικό οξύ 2) <u>SPE</u> Στήλη: Oasis PRiME HLB 96-well plates (30 mg sorbent/well) Διαλύτης εκχύλισης: ACN/ισοπροπανόλη 90:10, ACN/MeOH 50:50 (με 2% μυρμηκικό οξύ)	BEH C <sub>18</sub> column (2,1 × 50 mm, 1,7 μm particles) with a BEH C <sub>18</sub> VanGuard pre-column (2,1 × 5 mm, 1,7 μm particles)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε 5 mM οξικό αμμώνιο Διαλύτης B: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε ACN	MS/MS (ESI)	<u>LLOQ:</u> 0,5-2 μg/L	Δ <sup>9</sup> -THC 0,5-1000 μg/L 11-OH-THC 1,0-100 μg/L THC-COOH 1-1000 μg/L CBD 0,5-100 μg/L	(Hubbard et al., 2020)

Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Πλάσμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>3</sub>	1) 0,1 M AcOH 2) <u>SPE</u> Στήλη: Chromabond C <sub>18</sub> cartridges, 3 ml/500 mg Διαλύτης εκχύλισης: ACN	Luna 3u PhenylHexyl column (50 x 2 mm i.d., 3 μm) fitted with a Polar-RP guard cartridge (4 x 2,0 mm i.d.)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 5 mM οξικό αμμώνιο (pH 6,5)  Διαλύτης B: ACN	MS/MS (ESI)	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,2 ng/mL THC-COOH 1,6 ng/mL <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC 0,8 ng/mL THC-COOH 4,3 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH- THC 1-100 ng/mL  THC-COOH 5-500 ng/mL	(Maralikova and Weinmann, 2004)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Πλάσμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> CBD-d <sub>3</sub>	ACN (με 1% μυρμηκικό οξύ)	Aquity U- HPLC BEH C <sub>18</sub> analytical column (2,1 × 50 mm, 1,7 μm particle size, 130A pore size) preceded by Acquity U- HPLC BEH C <sub>18</sub> VanGuard pre column(2,1 × 5 mm, 130A)	<u>U-HPLC – Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε H <sub>2</sub> O  Διαλύτης B: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε MeOH	MS/MS (ESI)	<u>LLOQ:</u> 1,56 ng/mL	1,56-100 ng/mL	(Jamwal et al., 2017)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Πλάσμα Ούρα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub>	1) 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (pH 6,8) + β-γλυκουρονιδάση  2) ACN, 2 M ρυθμιστικό διάλυμα CH <sub>3</sub> COONa (pH 4,0)  3) <u>SPE</u> Στήλη: Strata C <sub>18</sub> -E (55 μm, 70A) 200mg/3mL  Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο, εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 1:1 v/v	Kinetex C <sub>18</sub> 100Å column (2,6 μm, 150mm x 3mm i.d.) with a guard column (0,5 μm Depth Filter x 0,1mm)	<u>HPLC – Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε H <sub>2</sub> O  Διαλύτης B: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε MeOH	MS/MS (APCI)	<u>LOD:</u> CBD, 11-OH-THC 0,3ng/mL THC-COOH 0,2ng/mL Δ <sup>9</sup> -THC 0,5 ng/mL (πλάσμα) CBD 0,3ng/mL THC-COOH, 11-OH-THC 0,2ng/mL Δ <sup>9</sup> -THC 0,4 ng/mL (ούρα) <u>LOQ</u> Δ <sup>9</sup> -THC, CBD, 11-OH- THC 1 ng/mL THC-COOH 0,5 ng/mL (πλάσμα) CBD, Δ <sup>9</sup> -THC 1 ng/mL THC-COOH 0,6 ng/mL 11-OH-THC 0,5 ng/mL (ούρα)	CBD, Δ <sup>9</sup> -THC 1-1000 ng/mL  11-OH-THC, THC- COOH 1-4000 ng/mL	(Aizpurua- Olaizola et al., 2017)

<p>Δ<sup>9</sup>-THC 11-OH-THC THC-COOH</p>	<p>Στοματικό υγρό Ολικό αίμα Ούρα</p>	<p>Δ<sup>9</sup>-THC-d<sub>3</sub> THCCOOH-d<sub>3</sub></p>	<p>1) 10 N KOH, AcOH (ούρα) ACN, 0,1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (pH 4,5) (αίμα) 2) <u>SPE</u> Στήλη: Bond Elut LRC-Certify columns (10 mL/300 mg) Διαλύτης εκχύλισης: 50 mM φωσφορικό οξύ, 3 mL 50 mM φωσφορικό οξύ/MeOH 80:20 v/v (στοματικό υγρό, ούρα)  Στήλη: Clean Screen ZSTHC020 columns (200 mg/10 mL) Διαλύτης εκχύλισης: 50 mM φωσφορικό οξύ, 3 mL εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 80:20 v/v (αίμα)</p>	<p>Symmetry1 C<sub>18</sub> column (2,1 mm i.d. × 150 mm, 5 mm)</p>	<p>ACN/μυρμηκικό οξύ 0,1% 70:30 v/v</p>	<p>MS (ESI)</p>	<p><u>LOD:</u> Δ<sup>9</sup>-THC 2 ng/mL (στοματικό υγρό) 0,5 ng/mL (ούρα, αίμα) 11-OH-THC 20 ng/mL (ούρα, αίμα) THC-COOH 0,5 ng/mL (ούρα, αίμα) <u>LOQ:</u> Δ<sup>9</sup>-THC 5 ng/mL (στοματικό υγρό) 2 ng/mL (ούρα, αίμα) 11-OH-THC 25 ng/mL (ούρα, αίμα) THC-COOH 2 ng/mL (ούρα, αίμα)</p>	<p>5-2000 ng/mL (THC - στοματικό υγρό)  2-2000 ng/mL (ούρα, αίμα)</p>	<p>(Teixeira et al., 2007)</p>
<p>Δ<sup>9</sup>-THC 11-OH-THC THC-COOH CBD THC-COOH-glu</p>	<p>Ολικό αίμα</p>	<p>Δ<sup>9</sup>-THC-d<sub>3</sub> 11-OH-THC-d<sub>3</sub> THCCOOH-d<sub>9</sub> CBD-d<sub>3</sub> THC-COOH-glu- d<sub>3</sub></p>	<p>1) ACN/MeOH 85:15 v/v 2) <u>SPE</u> Στήλη: Phenomenex Strata-X Drug B columns Διαλύτης εκχύλισης: οξικός αιθυλεστέρας/ ισοπροπανόλη 85:15 v/v</p>	<p>ACE Excel C<sub>18</sub>- PFP analytical column (2 μm, 2,1×50 mm)</p>	<p><u>UPLC-</u> <u>Βαθμιδωτή</u> <u>έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,2% μυρμηκικό οξύ/MeOH 95:5 v/v  Διαλύτης B: : 0,2% μυρμηκικό οξύ/MeOH 5:95 v/v</p>	<p>MS/MS (ESI)</p>	<p><u>LOD:</u> CBD, Δ<sup>9</sup>-THC 0,25 ng/mL THC-COOH, THC- COOH-glu 2,5 ng/mL 11-OH-THC 0,5 ng/mL <u>LLOQ</u> CBD, Δ<sup>9</sup>-THC 0,5 ng/mL THC-COOH, THC- COOH-glu 5,0 ng/mL 11-OH-THC 1,0 ng/mL</p>	<p>Δ<sup>9</sup>-THC, 11-OH- THC, CBD 1-20 ng/mL THC-COOH, THC- COOH-glu 10-200 ng/mL</p>	<p>(House et al., 2017)</p>
<p>Δ<sup>9</sup>-THC 11-OH-THC THC-COOH</p>	<p>Πλάσμα</p>	<p>Δ<sup>9</sup>-THC-d<sub>3</sub> 11-OH-THC-d<sub>3</sub> THCCOOH-d<sub>3</sub></p>	<p>1) MeOH, AcOH 2) <u>SPE</u> Στήλη: Chromabond C<sub>18</sub> cartridges (500 mg, 3 mL) Διαλύτης εκχύλισης: ACN</p>	<p>Mercury Luna C<sub>18</sub> (2) column (20×2 mm i.d., 5 μm particle size) with a C<sub>18</sub> guard column (4×2 mm i.d.)</p>	<p><u>Βαθμιδωτή</u> <u>έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε H<sub>2</sub>O  Διαλύτης B: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε ACN</p>	<p>MS/MS (ESI)</p>	<p><u>LLOQ</u> Δ<sup>9</sup>-THC, THC-COOH 0,05 ng/mL 11-OH-THC 0,2 ng/mL</p>	<p>Δ<sup>9</sup>-THC, THC- COOH 0,05-30 ng/mL 11-OH-THC 0,2-30 ng/mL</p>	<p>(Ferreirós et al., 2013)</p>

Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH	Ολικό αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub>	1) CAN 2) <u>SPE</u> Στήλη: Bond Elut Certify columns (3 mL/ 130 mg) Διαλύτες εκχύλισης: εξάνιο, εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 80:20 v/v	Acquity UPLC BEH C18 column (1,7 μm, 100 x 2,1 mm i.d.)	<u>UPLC-Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ Διαλύτης B: ACN	MS/MS (ESI)	<u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 0,05 ng/mL 11-OH-THC 0,1 ng/mL THC-COOH 0,2 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC 0,05-50 ng/mL 11-OH-THC 0,1-50 ng/mL THC-COOH 0,2-50 ng/mL	(Jamey et al., 2008)
Δ <sup>9</sup> -THC THC-COOH CBD	Τρίχες	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub>	1) H <sub>2</sub> O, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 2) <u>LLE</u> Διαλύτης εκχύλισης: εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας 90:10 v/v	Atlantis T3, 3 mm column (150 mm x 2,1 mm i.d.)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε H <sub>2</sub> O Διαλύτης B: MeOH/ 5% διαλύτη A	MS/MS (ESI)	<u>LOQ:</u> CBD, Δ <sup>9</sup> -THC 50 pg/mg THC-COOH 0,2 pg/mg	CBD, Δ <sup>9</sup> -THC 50-10000 pg/mg THC-COOH 0,2-20 pg/mg	(Dulaurent et al., 2014)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD Δ <sup>9</sup> -THC-glu THC-COOH-glu	Ολικό αίμα	THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THCCOOH-d <sub>9</sub> CBD-d <sub>3</sub> THC-COOH-glu-d <sub>3</sub>	1) ACN 2) <u>Disposable pipette extraction</u>	Kinetex C <sub>18</sub> column (2,1 mm x 50 mm, 2,6 μm) combined with a SecurityGuard C <sub>18</sub> guard column (4 x 2,0 mm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 10 mM οξικό αμμώνιο σε H <sub>2</sub> O Διαλύτης B: MeOH/ACN 15:85 v/v	MS/MS (ESI)	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 0,5 μg/L 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, Δ <sup>9</sup> -THC-glu 0,25 μg/L THC-COOH-glu 1,25 μg/L <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, Δ <sup>9</sup> -THC-glu 0,5 μg/L THC-COOH-glu 5,0 μg/L	THC, THC-COOH 0,5-100 μg/L 11-OH-THC, CBD, THC-glu 0,5-50 μg/L THC-COOH-glu 0,5-500 μg/L	(Scheidweiler et al., 2016)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	EDTA-πλάσμα Ούρα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub>	1) ορθοφωσφορικό οξύ (85%) 2) <u>SPE</u> Στήλη: Varian Bond Elut Certify II cartridges (3 mL/ 130 mg) Διαλύτης εκχύλισης: ACN/αμμωνία 98:2 v/v (EDTA-πλάσμα) 1) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 6,0) + β-γλυκουρονιδάση, AcOH 2) <u>LLE</u>	Synergi MAX-RP 80A C <sub>12</sub> column (length 2 mm x 75 mm, i.d. 4 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 10 mM μυρμηκικό αμμώνιο (pH 3,0) Διαλύτης B: ACN/10 mM μυρμηκικό αμμώνιο (pH 3,0) 90:10 v/v	MS/MS (APCI)	<u>LOD:</u> 0,1 ng/mL (EDTA-πλάσμα) Δ <sup>9</sup> -THC, THC-COOH, CBD 0,5 ng/mL 11-OH-THC 1,0 ng/mL (ούρα) <u>LOQ:</u> 0,2 ng/mL (EDTA-πλάσμα) Δ <sup>9</sup> -THC, THC-COOH, CBD	0,2-100 mg/mL (ούρα)	(Grauwiler et al., 2007)



			Διαλύτης εκχύλισης: διαιθυλαιθέρας/οξικός αιθυλεστέρας 50:50 v/v				1,0 ng/mL 11-OH-THC 2 ng/mL (ούρα)		
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) ACN 2) Παραγωγοποίηση με διάλυμα dabsyl chloride	Atlantis C <sub>18</sub> column (2,1 mm × 150 mm, 3 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,2% μυρμηκικό οξύ σε H <sub>2</sub> O Διαλύτης B: 0,2% μυρμηκικό οξύ σε ACN	MS/MS (ESI)	<u>LOD:</u> 11-OH-THC 0,10 ng/mL Δ <sup>9</sup> -THC, THC-COOH 0,08 ng/mL CBD 0,24 ng/mL <u>LOQ</u> Δ <sup>9</sup> -THC, THC-COOH 0,25 ng/mL 11-OH-THC 0,30 ng/mL CBD 0,80 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC 0,25-100 ng/mL 11-OH-THC 0,30-100 ng/mL, THC-COOH 0,25-250 ng/mL CBD 0,80-50 ng/mL	(Lacroix and Saussereau, 2012)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Στοματικό υγρό	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>9</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) 1 M οξικό αμμώνιο pH 4.0) + β-γλυκουρονιδάση 2) MeOH, AcOH 3) <u>SPE</u> Στήλη: Strata X-C columns (3mL/30mg) Διαλύτες εκχύλισης: διγλωρομεθάνιο/ισοπροπανόλη /NH <sub>4</sub> OH 78:20:2 v/v/v	Selectra PFPP column (100 × 2,1mm, 3 μm particle size) combined with a matched guard column (10 × 2,1mm, 3 μm particle size)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 0,1% μυρμηκικό οξύ σε H <sub>2</sub> O Διαλύτης B: 0,15% μυρμηκικό οξύ σε ACN	MS/MS (APCI)	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC, CBD 0,1 μg/L THC-COOH 15 ng/L <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC, CBD 0,2 μg/L THC-COOH 15 ng/L	Δ <sup>9</sup> -THC 0,2-100 μg/L 11-OH-THC, CBD 0,2-50 μg/L THC-COOH 15-3750 ng/L	(Desrosiers et al., 2015)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Ούρα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>3</sub>	1) 75mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 6,8) + β- γλυκουρονιδάση 3) <u>μ-SPE</u> Στήλη: OMIX C18 tips Διαλύτης εκχύλισης: MeOH	Kinetex C <sub>18</sub> -XB column(5 cm × 2,1 mm ID, 2,6 μm)	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 1,25 mM οξικό αμμώνιο σε MeOH Διαλύτης B: 1,25 mM οξικό αμμώνιο σε H <sub>2</sub> O	MS/MS	<u>LOD:</u> Δ <sup>9</sup> -THC, 11-OH-THC, CBD 3 ng/mL THC-COOH 2 ng/mL <u>LOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 8 ng/mL 11-OH-THC 9 ng/mL CBD 10 ng/mL THC-COOH 6 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC 8-250 ng/mL 11-OH-THC 9-250 ng/mL CBD 10-250 ng/mL THC-COOH 6-250 ng/mL	(Montesano et al., 2014)
Δ <sup>9</sup> -THC 11-OH-THC THC-COOH CBD	Ούρα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> 11-OH-THC-d <sub>3</sub> THC-COOH-d <sub>9</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) ACN 2) <u>Disposable pipette extraction (WAX-S)</u>	Kinetex C <sub>18</sub> 2.1 × 50 mm, 2,6 μm column combined with a 2,1 × 2 mm guard column	<u>Βαθμιδωτή έκλουση</u> Διαλύτης A: 10mM οξικό	MS/MS (ESI)	<u>LOD/LOQ:</u> 0,5μg/L	Δ <sup>9</sup> -THC, THC- COOH 0,5-100 μg/L 11-OH-THC, CBD 0,5-50 μg/L	(Andersson et al., 2016)

					αμμώνιο σε H <sub>2</sub> O Διαλύτης B: 15% MeOH σε CAN				
Δ <sup>9</sup> -THC CBD	Ολικό αίμα	Δ <sup>9</sup> -THC-d <sub>3</sub> CBD-d <sub>3</sub>	1) 0,1% μυρμηκικό οξύ σε ACN 2) <u>SPE</u> Στήλη: OASIS PRiME HLB μElution plate Διαλύτες εκχύλισης: MeOH/ACN 90:10 v/v	Acquity UPLC HSS C <sub>18</sub> column (1.8 μm, 2,1 mm × 100 mm)	<u>Βαθμιδωτή έκλυση</u> Διαλύτης A: 5 mM μυρμηκικό αμμώνιο σε H <sub>2</sub> O (με 0,05% μυρμηκικό οξύ) Διαλύτης B: ACN	MS/MS (ESI)	<u>LLOQ:</u> Δ <sup>9</sup> -THC 1 ng/mL CBD 0,5 ng/mL	Δ <sup>9</sup> -THC 1-500 ng/mL CBD 0,5-500 ng/mL	(Moorthy et al., 2019)



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Δικαστικά ζητήματα λόγω χρήσης προϊόντων κανναβιδιόλης

Η ανίχνευση της  $\Delta^9$ -THC και του 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, κύριου και ανενεργού μεταβολίτη της, σε βιολογικά δείγματα, είναι μια από τις κύριες αναζητήσεις που διενεργούνται στα τοξικολογικά εργαστήρια. Τα βιολογικά υλικά που εξετάζονται κυρίως είναι το αίμα και τα ούρα. Η παρουσία των ανωτέρω ουσιών στα βιολογικά αυτά υλικά υποδηλώνει πως έχει προηγηθεί χρήση κάνναβης στο πρόσφατο ή μη παρελθόν. Η ανίχνευση δε του 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στα ούρα μπορεί να γίνει ακόμα και μετά από ένα μήνα σε χρόνιους χρήστες. Αντίθετα, τα δραστικά  $\Delta^9$ -THC και 11-OH-THC φτάνουν στις μέγιστες συγκεντρώσεις μόλις σε 15-20 λεπτά μετά τη χρήση και η παρουσία τους στο αίμα υποδηλώνει πρόσφατη χρήση κάνναβης, με το άτομο να βρίσκεται υπό την επήρεια των ουσιών αυτών. Μια μελέτη έδειξε πως η ανίχνευση 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στο αίμα σε συγκέντρωση μικρότερη των 3ng/mL υποδηλώνει περιστασιακή λήψη, ενώ σε συγκέντρωση μεγαλύτερη των 40ng/mL υποδηλώνει πρόσφατη και καθημερινή χρήση κάνναβης (Goodwin et al., 2008; Huestis and Smith, 2018).

Τα τελευταία χρόνια έχουν μπει δυναμικά στην ελληνική και διεθνή αγορά προϊόντα με συστατικά της κάνναβης. Κυρίως κυκλοφορούν προϊόντα κανναβιδιόλης, όπως αυτά περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το άρθρο 28 του νόμου 4509/2017 (τροποποίηση της παραγράφου 3 του άρθρου 1 του νόμου 4139/2013), τα ακατέργαστα συγκομιζόμενα προϊόντα που προκύπτουν από την καλλιέργεια ποικιλιών κάνναβης του είδους *Cannabis sativa* L χαμηλής περιεκτικότητας σε  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^9$ -THC) μέχρι 0,2% δεν περιλαμβάνονται στα ναρκωτικά. Επίσης, σύμφωνα με το άρθρο 1 του νόμου 4523/2018, επιτρέπεται κατ' εξαίρεση η παραγωγή, η κατοχή, η μεταφορά, η αποθήκευση και η προμήθεια κάνναβης του είδους *Cannabis sativa* L., περιεκτικότητας σε τετραϋδροκανναβινόλη άνω του 0,2% για την παραγωγή τελικών προϊόντων φαρμακευτικής κάνναβης με αποκλειστικό σκοπό είτε την προμήθεια του κρατικού μονοπωλίου και την διάθεση τους για ιατρικούς σκοπούς, είτε την εξαγωγή τους.

Στην Ευρώπη, τις Η.Π.Α. και τον Καναδά, μπορούν να καλλιεργηθούν ποικιλίες κάνναβης με περιεκτικότητα σε  $\Delta^9$ -THC λιγότερη από 0,2% (Ευρώπη) και 0,3% (Η.Π.Α. και Καναδάς). Σε μερικές ποικιλίες κάνναβης γνωστές ως «πλούσιες σε CBD», όταν η περιεκτικότητα της CBD είναι μεγαλύτερη του 12%, τότε η περιεκτικότητα σε  $\Delta^9$ -THC συνήθως είναι μεγαλύτερη του 0,3%. Για την παραλαβή ενός καθαρού προϊόντος κανναβιδιόλης, το εκχύλισμα από το φυτό πρέπει να υποστεί διαδικασία καθαρισμού για την παραγωγή κρυσταλλικής CBD (Mead, 2017).

Η αυξημένη όμως χρήση των προϊόντων κανναβιδιόλης έχει δημιουργήσει την ανάγκη διαφοροποίησης της παράνομης χρήσης κάνναβης και της λήψης κανναβιδιόλης για ιατρικούς σκοπούς. Αν και οι συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC που βρίσκονται στα προϊόντα αυτά είναι χαμηλές, είναι γνωστό πως η  $\Delta^9$ -THC και οι μεταβολίτες της συσσωρεύονται στον οργανισμό και μπορούν να ανιχνευτούν στα βιολογικά υλικά ατόμων που λαμβάνουν τέτοια προϊόντα. Παρόλο, λοιπόν, που είναι νόμιμη η πώληση και η λήψη ή κατανάλωση αυτών των προϊόντων με τις προϋποθέσεις που διέπονται από τους εκάστοτε νόμους, τίθεται το ερώτημα αν οι συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC στα προϊόντα αυτά είναι ικανές να προκαλέσουν την ανίχνευση της ίδιας της ουσίας ή των μεταβολιτών της στα βιολογικά υλικά και να θεωρηθεί ότι η παρουσία τους οφείλεται στην παράνομη χρήση κάνναβης και όχι στη νόμιμη λήψη προϊόντων κανναβιδιόλης.

Σε έρευνα που διεξήχθη, εισπνοή σκευάσματος που περιείχε 10,5% CBD και 0,39%  $\Delta^9$ -THC είχε ως αποτέλεσμα να γίνει ανίχνευση 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στα ούρα στις 2 από τις 6 περιπτώσεις. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα της εξέτασης μετά από κατανάλωση καθαρής CBD (Spindle et al., 2020a).

Μια επίσης σημαντική παράμετρος που πρέπει να ελέγχεται για την ασφάλεια της χρήσης προϊόντων που περιέχουν κανναβιδιόλη είναι η καθαρότητα αυτής. Επικρατεί η άποψη πως οι ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται μετά από χρήση προϊόντων κανναβιδιόλης που κυκλοφορούν στην αγορά (με εξαίρεση τα εγκεκριμένα σκευάσματα από τους FDA, EMA) οφείλονται στην παρουσία υπολειμματικών συγκεντρώσεων της  $\Delta^9$ -THC στα προϊόντα. Αυτά τα σκευάσματα βασίζονται συνήθως σε ακατέργαστα εκχυλίσματα από το σύνολο του φυτού της κάνναβης που περιέχουν ένα πλήρες φάσμα των φυτοκανναβινοειδών. Αναλύσεις σε

προϊόντα κανναβιδιόλης της γερμανικής αγοράς έδειξε πως στο 25% αυτών τα επίπεδα της Δ<sup>9</sup>-THC ήταν υψηλότερα από το χαμηλότερο παρατηρούμενο επίπεδο ανεπιθύμητων ενεργειών (Lowest Observed Adverse Effect Level-LOAEL). Αντίθετα, η περιεχόμενη CBD βρισκόταν κάτω από το όριο εκδήλωσης ανεπιθύμητων ενεργειών (Lachenmeier et al., 2020). Σε αντίστοιχη έρευνα που διεξήχθη στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (Η.Π.Α.) σε προϊόντα κανναβιδιόλης που πωλούνται διαδικτυακά, το 26 % περιείχε λιγότερη και το 43 % περισσότερη CBD από την αναγραφόμενη τιμή, ενώ το 21 % περιείχε Δ<sup>9</sup>-THC σε συγκεντρώσεις έως 6,43 mg/mL, οι οποίες όμως μπορεί να είναι ικανές να επιδράσουν αρνητικά στον ανθρώπινο οργανισμό, ειδικά τα παιδιά (Bonn-Miller et al., 2017).

Τα τελευταία χρόνια, επιπλέον, μεταξύ των επιστημόνων υπάρχει διχογνωμία ως προς την πιθανή μετατροπή της CBD σε Δ<sup>9</sup>-THC στο γαστρικό υγρό και των συνεπειών και ανεπιθύμητων ενεργειών που μπορεί να επιφέρει μια τέτοια μετατροπή. Η μετατροπή της CBD σε Δ<sup>9</sup>-THC περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1968 από τους Gaoni και Mechoulam (Gaoni and Mechoulam, 1968). Επίσης, *in vitro* μελέτη σε προσομοιωμένο γαστρικό υγρό έδειξε πως η CBD μετατρέπεται σε Δ<sup>9</sup>-THC αλλά και σε Δ<sup>8</sup>-THC (Merrick et al., 2016), ενώ μια δεύτερη *in vitro* μελέτη απέδειξε πως η CBD δεν μετατρέπεται μόνο σε Δ<sup>9</sup>-THC αλλά και σε κανναβινόλη, 9<sup>α</sup>-υδροξυ-εξαυδροκανναβινόλη και 8<sup>α</sup>-υδροξυ-ισο-εξαυδροκανναβινόλη (Watanabe et al., 2007). Αντίθετα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν πως αυτή η μετατροπή δεν υφίσταται. Σε *in vivo* μελέτες δεν ανιχνεύθηκε η Δ<sup>9</sup>-THC ή οι μεταβολίτες της μετά από του στόματος χορήγηση CBD (Palazzoli et al., 2018; Wray et al., 2017). Τα αποτελέσματα μιας πιο πρόσφατης μελέτης επιβεβαίωσε πως η CBD δεν μετατρέπεται σε Δ<sup>9</sup>-THC στο γαστρικό υγρό μετά από του στόματος χορήγηση CBD, καθιστώντας τη μια ασφαλή οδό χορήγησης της (Crippa et al., 2020). Ωστόσο, αυτό το θέμα χρήζει περαιτέρω και διεξοδικής διερεύνησης λόγω των σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών που μπορεί να επιφέρει η Δ<sup>9</sup>-THC στον άνθρωπο.

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, λοιπόν, καθώς επίσης και του γεγονότος πως ο νόμος δείχνει μηδενική ανοχή ως προς την κατανάλωση παράνομης κάνναβης και την οδήγηση υπό την επήρεια καννάβης κρίνεται απαραίτητο να γίνει διερεύνηση της για το αν οι συγκεντρώσεις της Δ<sup>9</sup>-THC στα προϊόντα κανναβιδιόλης είναι ικανές να προκαλέσουν την ανίχνευση της ίδιας της ουσίας ή των μεταβολιτών της στα

βιολογικά υλικά. Σε μια τέτοια περίπτωση δημιουργείται το πρόβλημα παρερμηνείας των αποτελεσμάτων μιας τοξικολογικής εξέτασης καθώς δεν διαχωρίζεται αν η παρουσία κανναβινοειδών ή των μεταβολιτών τους στα βιολογικά υλικά προέρχεται από παράνομη χρήση κάνναβης ή λήψη νόμιμου σκευάσματος που περιέχει ως κύριο συστατικό την CBD.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας, η οποία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ήταν η διερεύνηση ανίχνευσης της  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης ( $\Delta^9$ -THC) και του μεταβολίτη της, 11-νορ-9-καρβοξυ-τετραϋδροκανναβινόλης (11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC) καθώς και ο προσδιορισμός των επιπέδων της κανναβιδιόλης (CBD) στο πλάσμα και στα ούρα ασθενών που λάμβαναν προϊόντα κανναβιδιόλης. Η ανίχνευση της  $\Delta^9$ -THC ή/και του 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στα βιολογικά υλικά των ασθενών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε παρερμηνεία του αποτελέσματος μιας τοξικολογικής εξέτασης ως προς το αν το άτομο υπήρξε χρήστης παράνομης κάνναβης ή λάμβανε νόμιμα κάποιο σκεύασμα CBD. Επομένως, είναι αναγκαίο να διερευνηθεί αν η κατανάλωση προϊόντων κανναβιδιόλης μπορεί να οδηγήσει σε ανιχνεύσιμα επίπεδα των  $\Delta^9$ -THC και 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στα βιολογικά υλικά, δεδομένου μάλιστα της μηδενικής ανοχής του ελληνικού νόμου με αποτέλεσμα την πιθανή επιβολή κυρώσεων.

Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και επικύρωση κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου με τη χρήση της τεχνικής της αεριοχρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) για τον προσδιορισμό της CBD, της  $\Delta^9$ -THC και του μεταβολίτη της 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC σε πλάσμα και ούρα. Η τεχνική αυτή αποτελεί σημαντικό εργαλείο στα τοξικολογικά εργαστήρια, ενώ αποτελεί και βασική τεχνική του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Στη συνέχεια η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα πλάσματος και ούρων ασθενών που λάμβαναν σκεύασμα κανναβιδιόλης.

Η αναπτυχθείσα μέθοδος θα πρέπει να δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των υπό μελέτη κανναβινοειδών στα βιολογικά υλικά. Επίσης, στο πλαίσιο των σύγχρονων απαιτήσεων η μέθοδος θα πρέπει να συνδυάζει υψηλή ακρίβεια, ευαισθησία, εκλεκτικότητα και αναπαραγωγιμότητα, καθώς και ευκολία σε συνδυασμό με χαμηλό κόστος με σκοπό την αξιοποίηση της σε ανάλογα περιστατικά.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Οργανολογικός και υλικοτεχνικός εξοπλισμός

## 5.1 Οργανολογικός εξοπλισμός

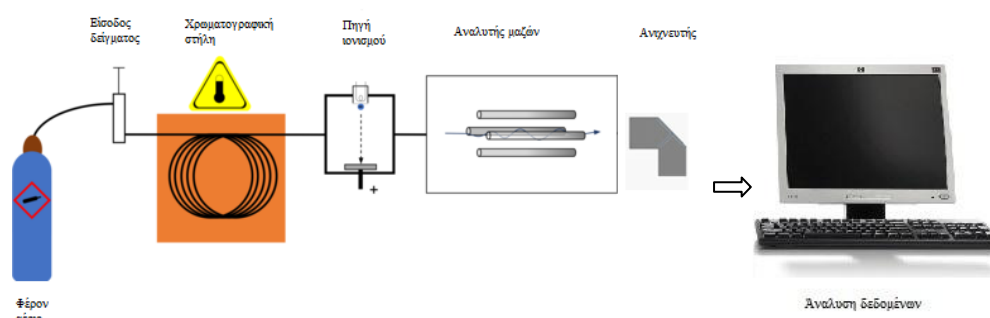
Για την ανάπτυξη, βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού των τριών υπό μελέτη ουσιών (CBD, Δ<sup>9</sup>-THC, 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC) στο πλάσμα χρησιμοποιήθηκε αεριοχρωματογραφία σε σύζευξη με τετραπολικό φασματόμετρο μαζών (GC/MS).

Στα τοξικολογικά εργαστήρια η χρήση GC/MS είναι ευρεία, καθώς αποτελεί μια αποτελεσματική και αξιόπιστη τεχνική, ενώ χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος και εύκολη αυτοματοποίηση. Ο διαχωρισμός των ουσιών επιτυγχάνεται με την κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής φάσης και της στατικής φάσης των στηλών του αέριου χρωματογράφου. Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται είναι το θερμαινόμενο σύστημα εισαγωγής δείγματος, η τριχοειδής στήλη, η πηγή ιονισμού, ο αναλυτής μαζών και ο ανιχνευτής (Σχήμα 17). Στο σημείο εισαγωγής του δείγματος αναπτύσσονται υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες επιτρέπουν την άμεση μετατροπή του δείγματος σε αέρια φάση. Η τριχοειδής στήλη βρίσκεται σε εσωτερικό θάλαμο του οργάνου (κλίβανος) υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία. Με τη βοήθεια υπολογιστή και κατάλληλου λογισμικού προγράμματος υπάρχει η δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας του θαλάμου ώστε να επιτυγχάνεται μέγιστη απόκριση στο όργανο και βέλτιστος διαχωρισμός των ουσιών του δείγματος. Η στατική φάση της στήλης αποτελείται συνήθως από πολυ(διμεθυλοσιλοξυ)πολυ-1,4-δις(διμεθυλοσιλοξυ)φαινυλο-σιλοξάνιο, ενώ ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται το αδρανές αέριο ήλιο, το οποίο μεταφέρει τους αναλύτες από το σημείο έγχυσης, μέσα στη στήλη. Στη συνέχεια φτάνουν στον αναλυτή μαζών, όπου γίνεται καταγραφή των θραυσμάτων (m/z), στα οποία διασπώνται οι ουσίες στην πηγή ιονισμού, μέσω πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact ionization - EI) και τέλος στον ανιχνευτή.

Το χρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιλαμβάνει τα εξής:

1. Αεριοχρωματογράφο Agilent Technologies 6890N Network GC System

2. Φασματόμετρο μαζών Agilent Technologies 5975 inert XL Mass Selective Detector
3. Τετραπολικό αναλυτή μαζών
4. Αυτόματο δειγματολήπτη Agilent Technologies 7683B injector
5. Αντλία κενού Edwards
6. Χρωματογραφική στήλη DB-5MS (J & W Scientific), 30 m × 0,25 mm, film thickness 0,25 μm
7. Λογισμικό πρόγραμμα Chem Station



Σχήμα 17: Σχηματικό διάγραμμα απεικόνισης βασικών τμημάτων του χρωματογραφικού συστήματος GC/MS

## 5.2 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε στο πλαίσιο της μελέτης αυτής είναι ο εξής:

1. Ατομικοί αναδευτήρες περιδίνησης (Chiltren & Labinco)
2. Σύστημα εξάτμισης συνδεδεμένο με άζωτο 9 θέσεων (Reacti-Vap, Pierce)
3. Σύστημα εκχύλισης στερεάς φάσης 10 θέσεων (VacMaster, Biotage)
4. Αναλυτικός ζυγός (RAWWAG)
5. Φυγόκεντροι Heraus Labofuge 400R (Alresa) & 4K10 (Sigma)
6. Κλίβανος (J. P. Selecta)
7. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (5-50 μL) (Thermo)
8. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (20-200 μL) (Gilson)
9. Ρυθμιζόμενη μηχανική πιπέτα (100-1000 μL) (Gilson)
10. Ρύγχη πιπετών (2-200 μL)
11. Ρύγχη πιπετών (200-1000 μL)

12. Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης
13. Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
14. Γυάλινοι εσφυρισμένοι κωνικοί δοκιμαστικοί σωλήνες
15. Γυάλινα σιφώνια μετρήσεως βαθμονομημένα
16. Ογκομετρικοί κύλινδροι
17. Γυάλινα φιαλίδια (vials), 32 mm x 11,6 mm, 2 mL
18. Γυάλινα σιλιανοποιημένα σωληνάκια προσυγκέντρωσης (glass inserts) με επίπεδη βάση, 400  $\mu$ L
19. Πεχάμετρο pH 0-14 (MColorpHast, MilliporeSigma)

### 5.3 Διαλύτες και αντιδραστήρια

Οι διαλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. Υπερκάθαρο νερό (Merck)
2. Μεθανόλη καθαρότητας HPLC (Merck)
3. Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC (Merck)
4. Εξάνιο καθαρότητας HPLC (Merck)
5. Οξικός αιθυλεστέρας καθαρότητας HPLC (Merck)
6. Ακετόνη καθαρότητας HPLC (Merck)
7. Παγόμορφο οξικό οξύ καθαρότητας HPLC (Merck)
8. Οξικό οξύ 1,0 M καθαρότητας HPLC (Merck)
9. Πυκνό υδροχλωρικό οξύ αναλυτικής καθαρότητας (Merck)
10. Υδροξείδιο του καλίου αναλυτικής καθαρότητας (Merck)
11. Άνυδρο οξικό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας (Sigma-Aldrich)
12. Τριένυδρο οξικό νάτριο αναλυτικής καθαρότητας (Merck)
13. BSTFA (*N,O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) με 1% TMCS (trimethylchlorosilane) (Sigma-Aldrich)
14. Ένζυμο  $\beta$ -γλυκουρονιδάση από *Helix pomatia*,  $\geq 100,000$  units/mL (Sigma-Aldrich)

### 5.4 Στήλες εκχύλισης στερεάς φάσεως

Οι στήλες εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι Bond Elut LRC Certify II (200mg, 50 p/k) και οι Bond Elut C18 (200mg, 50 p/k) της εταιρείας Agilent.

## 5.5 Βιολογικό υπόστρωμα

Για την παρασκευή προτύπων εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος και ούρων χρησιμοποιήθηκαν τυφλά δείγματα πλάσματος και ούρων από υποθέσεις του Εργαστηρίου Ιατροδικαστικής και Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών στα οποία δεν διαπιστώθηκε η παρουσία των υπό μελέτη ουσιών και τελικώς έγινε η ανάμιξή τους.

Τα άγνωστα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε ελήφθησαν από άτομα που έκαναν λήψη σκευάσματος κανναβιδιόλης.

## 5.6 Πρότυπες ουσίες αναφοράς, διαλύματα παρακαταθήκης

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ουσίες ως πρότυπες ουσίες αναφοράς και εσωτερικά πρότυπα:

1. CBD: 1 mg (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
2.  $\Delta^9$ -THC: διάλυμα 1,0 mg/mL σε μεθανόλη 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
3. 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC: διάλυμα 1,0 mg/mL σε μεθανόλη 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
4.  $\Delta^9$ -THC-d<sup>3</sup>: : διάλυμα 100 μg/mL σε μεθανόλη 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)
5. 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC-d<sup>3</sup>: : διάλυμα 1,0 mg/mL σε μεθανόλη 1 mL (LGC Promo Chem India Pvt Ltd)

Οι πρότυπες ουσίες αναφοράς και τα πρότυπα διαλύματα των ουσιών αναφοράς και του εσωτερικού προτύπου φυλάσσονταν σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας από όπου προμηθεύτηκαν και μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναφερόταν στο πιστοποιητικό τους. Για την υπό μελέτη ουσία CBD που ήταν σε στερεή μορφή παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1,0 mg/mL σε μεθανόλη διαλύοντας όλη την ποσότητα σε 1 mL μεθανόλη. Όλα τα διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4 °C και έφεραν ετικέτες με την αναγραφή των στοιχείων τους και την ημερομηνία παρασκευής τους.

## 5.7 Μικτά διαλύματα εργασίας

Κατά το στάδιο της ανάπτυξης και της επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών για τη διενέργεια των απαραίτητων δοκιμασιών παρασκευάστηκε μικτό διάλυμα εργασίας των υπό μελέτη ουσιών σε ακετονιτρίλιο σε συγκέντρωση 10,0 µg/mL (Διάλυμα Α) με την παραλαβή 10 µL από το διάλυμα παρακαταθήκης της κάθε ουσίας συγκέντρωσης 1,0 mg/mL και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL. Από το Διάλυμα Α παρασκευάστηκαν τρία πιο αραιά διαλύματα, ως εξής:

- Διάλυμα εργασίας Α<sub>1</sub> συγκέντρωσης 1,0 µg/mL με παραλαβή 100 µL από το διάλυμα Α και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας Α<sub>2</sub> συγκέντρωσης 0,4 µg/mL με παραλαβή 400 µL από το διάλυμα Α<sub>1</sub> και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας Α<sub>3</sub> συγκέντρωσης 0,2 µg/mL με παραλαβή 200 µL από το διάλυμα Α<sub>1</sub> και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας Α<sub>4</sub> συγκέντρωσης 0,06 µg/mL με παραλαβή 60 µL από το διάλυμα Α<sub>1</sub> και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας Α<sub>5</sub> συγκέντρωσης 0,02 µg/mL με παραλαβή 100 µL από το διάλυμα Α<sub>3</sub> και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας Α<sub>6</sub> συγκέντρωσης 0,01 µg/mL με παραλαβή 50 µL από το διάλυμα Α<sub>3</sub> και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας Α<sub>7</sub> συγκέντρωσης 0,004 µg/mL με παραλαβή 20 µL από το διάλυμα Α<sub>3</sub> και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.

Τα διαλύματα Α<sub>1</sub>, Α<sub>2</sub>, Α<sub>3</sub>, Α<sub>4</sub>, Α<sub>5</sub>, Α<sub>6</sub> και Α<sub>7</sub> χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων βιολογικών δειγμάτων βαθμονόμησης (calibration samples, cal). Η παρασκευή των προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης γινόταν με τον εμβολιασμό στο βιολογικό υλικό με 50 µL από τα διαλύματα εργασίας και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον **Πίνακα 4**.



**Πίνακας 4:** Παρασκευή προτύπων δειγμάτων βαθμονόμησης (calibration samples, cal).

Διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, μg/mL)	Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 1,0 mL πλάσματος	Τελική συγκέντρωση (ng/mL) προτύπου δείγματος βαθμονόμησης	Κωδικός προτύπου δείγματος βαθμονόμησης
A <sub>7</sub> (0,004)	50	0,20	Cal 1
A <sub>6</sub> (0,01)	50	0,50	Cal 2
A <sub>5</sub> (0,02)	50	1,00	Cal 3
A <sub>4</sub> (0,06)	50	3,00	Cal 4
A <sub>3</sub> (0,2)	50	10,00	Cal 5
A <sub>2</sub> (0,4)	50	20,00	Cal 6
A <sub>1</sub> (1,0)	50	50,00	Cal 7

Για την παρασκευή δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QC) χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μικτά διαλύματα εργασίας από εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα βαθμονόμησης. Αυτά παρασκευάστηκαν ως εξής:

- Διάλυμα εργασίας A' συγκέντρωσης 10,0 μg/mL με την παραλαβή 10 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης της κάθε ουσίας συγκέντρωσης 1,0 mg/mL και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας A<sub>1</sub>' συγκέντρωσης 0,8 μg/mL με παραλαβή 80 μL από το διάλυμα A' και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας A<sub>2</sub>' συγκέντρωσης 0,3 μg/mL με παραλαβή 30 μL από το διάλυμα A' και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.
- Διάλυμα εργασίας A<sub>3</sub>' συγκέντρωσης 0,012 μg/mL με παραλαβή 40 μL από το διάλυμα A<sub>2</sub>' και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL.

Η παρασκευή των προτύπων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας γινόταν με τον εμβολιασμό στο βιολογικό υλικό με 50 μL από τα διαλύματα εργασίας A<sub>1</sub>', A<sub>2</sub>' και A<sub>3</sub>' και οι συγκεντρώσεις τους φαίνονται στον **Πίνακα 5**.

**Πίνακας 5:** Παρασκευή προτύπων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (quality control samples, QC).

Διάλυμα εργασίας (συγκέντρωση, μg/mL)	Όγκος εμβολιασμού (μL) σε 1,0 mL πλάσματος	Τελική συγκέντρωση (ng/mL) προτύπου δείγματος ελέγχου ποιότητας	Κωδικός προτύπου δείγματος ελέγχου ποιότητας
A <sub>3</sub> ' (0,012)	50	0,60	QC <sub>1</sub>
A <sub>2</sub> ' (0,3)	50	15,00	QC <sub>2</sub>
A <sub>1</sub> ' (0,8)	50	40,00	QC <sub>3</sub>

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε μικτό διάλυμα εργασίας εσωτερικού προτύπου Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης-d<sup>3</sup> και 11-nor-Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινοϊκού οξέος-d<sup>3</sup> συγκέντρωσης 0,3 μg/mL (Διάλυμα Β) σε ακετονιτρίλιο, το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής:

- Παραλαβή 100 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης της Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλης-d<sup>3</sup> συγκέντρωσης 100 μg/mL και 10 μL από το διάλυμα παρακαταθήκης του 11-nor-Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινοϊκού οξέος-d<sup>3</sup> συγκέντρωσης 1,0 mg/mL και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL προς σχηματισμό διαλύματος συγκέντρωσης 10,0 μg/mL (Διάλυμα Β').
- Παραλαβή 30 μL από το διάλυμα Β' και προσθήκη ακετονιτριλίου μέχρι τελικού όγκου 1 mL προς σχηματισμό του διαλύματος Β.

Κατά το στάδιο της επικύρωσης της μεθόδου προσδιορισμού της CBD, της Δ<sup>9</sup>-THC και του 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC, ελέγχθηκε η ειδικότητα της μεθόδου και χρησιμοποιήθηκε διάλυμα εργασίας μίγματος ουσιών, που μπορούσαν εν δυνάμει να συνυπάρχουν με τις υπό μελέτη ουσίες στο δείγμα. Το διάλυμα αυτό περιείχε τις ουσίες διαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, λοραζεπάμη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, σερτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, MDMA, MDA, MBDB, MDEA, κεταμίνη, βουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και μεθυλεστέρα της εκγονίνης σε συγκέντρωση 10,0 μg/mL σε μεθανόλη. Το διάλυμα αυτό παρασκευάστηκε με την λήψη 10 μL από τα διαλύματα

παρακαταθήκης συγκέντρωσης 1 mg/mL για την κάθε ουσία και με την προσθήκη μεθανόλης μέχρι όγκου 1 mL.

## 5.8 Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων και αντιδραστηρίων

Το ρυθμιστικά διαλύματα και τα αντιδραστήρια που παρασκευάστηκαν, καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους παρουσιάζονται παρακάτω:

- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 7,0: 2,05 g οξικού νατρίου ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε περίπου 200 mL υπερκάθαρου νερού. Το pH ρυθμίστηκε στο 7,0 με χρήση KOH 0,1 M και συμπληρώθηκε ο όγκος με υπερκάθαρο νερό μέχρι 250 mL.
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 5,0 (1,0 M): 42,9 g τριένυδρο οξικού νατρίου ζυγίστηκαν και διαλύθηκαν σε 400 mL υπερκάθαρου νερού. Προστίθενται 10,4 mL παγόμορφου οξικού οξέος και συμπληρώθηκε ο όγκος με υπερκάθαρο νερό μέχρι 500 mL. Το pH ρυθμίστηκε στο 5,0 με χρήση 1,0 M οξικού οξέος.
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4,5 (0,1 M): 53,5 g οξικού νατρίου ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 18 mL παγόμορφου οξικού οξέος και συμπληρώθηκε ο όγκος με υπερκάθαρο νερό μέχρι 500 mL. Το pH ρυθμίστηκε στο 4,5 με χρήση KOH 0,1 M.
- Διάλυμα KOH 10 N: 56 g υδροξειδίου του καλίου διαλύθηκαν σε 100 mL νερό.

## 5.9 Μίγματα διαλυτών

Τα μίγματα διαλυτών έκπλυσης και έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν για τις διαδικασίες των εκχυλίσεων στερεής φάσης, καθώς και το μίγμα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία της υγρό – υγρό εκχύλισης, παρασκευάζονταν εντός της ημέρας και ανανεώνονταν σε κάθε νέα σειρά δειγμάτων ανάλυσης. Η παρασκευή των διαλυμάτων γινόταν εντός του απαγωγού και σε ποσότητες που να επαρκούν για ολόκληρη τη σειρά των δειγμάτων ανάλυσης. Τα μίγματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν και ο τρόπος παρασκευής τους περιγράφεται παρακάτω:

- Ρυθμιστικό διάλυμα pH 7:μεθανόλη (95:5, v/v): 5 mL μεθανόλης αναμιγνύονταν με 95 mL ρυθμιστικού διαλύματος pH 7 υπό ανάδευση.

- Μεθανόλη 50%: 20 mL μεθανόλης αναμιγνύονταν με 20 mL υπερκάθαρου νερού.
- Εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (90:10 v/v): σε 5 mL οξικού αιθυλεστέρα προστίθενταν υπό ανάδευση 45 mL εξανίου.
- Εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας:οξικό οξύ (90:10:1 v/v/v): σε 5 mL οξικού αιθυλεστέρα προστίθενταν αρχικά 0,5 mL παγόμορφου οξικού οξέος υπό ανάδευση και στη συνέχεια 45 mL εξανίου.
- Εξάνιο:οξικός αιθυλεστέρας (70:10 v/v): σε 5 mL οξικού αιθυλεστέρα προστίθενταν υπό ανάδευση 35 mL εξανίου.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου προσδιορισμού των κανναβινοειδών στο πλάσμα

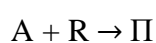
Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, έλαβε χώρα βελτιστοποίηση των παραμέτρων της μεθόδου ώστε να ληφθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα και να παρέχουν στη μέθοδο καλύτερη απόκριση.

### 6.1 Εσωτερικό πρότυπο

Στην διαδικασία ανάπτυξης και βελτιστοποίησης μίας μεθόδου προσδιορισμού μίας ή περισσοτέρων ουσιών, περιλαμβάνεται και η επιλογή του καταλληλότερου εσωτερικού προτύπου για την πορεία της ανάλυσης. Το εσωτερικό πρότυπο είναι μία ουσία, η οποία προστίθεται στο δείγμα μαζί με τους αναλύτες προκειμένου να διορθωθούν οι διαφοροποιήσεις που μπορεί να προκύψουν στα διάφορα στάδια της ανάλυσης των διαφόρων δειγμάτων. Το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να έχει τις ίδιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τους αναλύτες, την ίδια χρωματογραφική συμπεριφορά με αυτούς καθώς και να διαχωρίζεται ικανοποιητικά από τις άλλες ουσίες στο χρωματογράφημα ώστε να μην παρατηρείται συνέκλυση, καθώς επίσης να παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τους αναλύτες και κατά το στάδιο προκατεργασίας των δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν ως εσωτερικά πρότυπα η δευτεριωμένη  $\Delta^9$ -THC ( $\Delta^9$ -THC- $d^3$ ) και το δευτεριωμένο οξύ 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC (11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC- $d^3$ ). Γενικά, τα δευτεριωμένα παράγωγα των αναλυτών αποτελούν εσωτερικά πρότυπα επιλογής των μεθόδων προσδιορισμού των αντίστοιχων ουσιών, αφού διαφέρουν μόνο ως προς το μοριακό βάρος με την υπό προσδιορισμό ουσία και παρουσιάζουν την ίδια χημική συμπεριφορά με αυτή, διευκολύνοντας τη χρωματογραφική τους ανάλυση. Το  $\Delta^9$ -THC- $d^3$  χρησιμοποιήθηκε, καθώς εμφάνισε ίδια χημική συμπεριφορά με την  $\Delta^9$ -THC, ενώ ακολουθεί ικανοποιητικά την CBD. Η 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC- $d^3$  παρουσιάζει ομοιότητες με το 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC. Ως εκ τούτου ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε μίγμα  $\Delta^9$ -THC- $d^3$  και 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC- $d^3$  με την προσθήκη σε κάθε δείγμα 50  $\mu$ L από διάλυμα συγκέντρωσης 0,3  $\mu$ g/mL.

## 6.2 Παραγωγοποίηση

Στην αεριοχρωματογραφία πολλές φορές είναι απαραίτητο το στάδιο της παραγωγοποίησης των ενώσεων, καθώς κάποιες από αυτές δεν μπορούν να αναλυθούν στη μορφή που βρίσκονται. Οι ενώσεις που χρειάζονται παραγωγοποίηση είναι ενώσεις υψηλής πολικότητας, μη πτητικές, θερμικά ασταθείς, ενώ η παραγωγοποίηση συμβάλλει επίσης στην ενίσχυση του σήματος του ανιχνευτή. Κατά την αντίδραση παραγωγοποίησης ο αναλύτης (A) και το αντιδραστήριο παραγωγοποίησης (R) αντιδρούν προς σχηματισμό ενός προϊόντος (Π), με καλύτερη χρωματογραφική συμπεριφορά από το αρχικό.

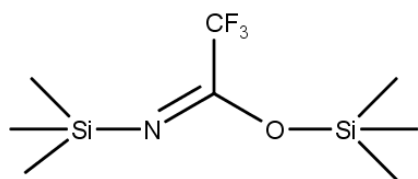


Σε ενώσεις με λειτουργικές ομάδες όπως -COOH, -OH, -NH, -SH η παραγωγοποίηση είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς μπορούν εύκολα να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους και με τα συστατικά της στήλης. Μέσω αλκυλίωσης, ακυλίωσης ή σιλανοποίησης σχηματίζονται παράγωγα των ενώσεων αυτών, με αποτέλεσμα την τροποποίηση την μοριακής δομής και επομένως την ευκολότερη ανάλυση τους με τη χρήση GC. Η τροποποίηση της δομής προκαλεί αλλαγές στο μοριακό βάρος των ενώσεων και επομένως τις διαφοροποιήσεις στην θραυσματοποίησή τους στο GC/MS.

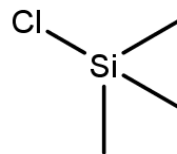
Ως αντιδραστήριο παραγωγοποίησης στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το BSTFA με 1% TMCS (**Σχήμα 18**) και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

1. Παραλαβή 5  $\mu\text{L}$  από το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης της κάθε ουσίας.
2. Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $\text{N}_2$ .
3. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  ACN και 50  $\mu\text{L}$  BSTFA με 1% TMCS και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίισης.
4. Παραμονή σε αμμόλουτρο στους 70  $^\circ\text{C}$  για 30 min.
5. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει συμπύκνωση του δείγματος.
6. Μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια που περιέχουν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης.

## 7. Ένεση 1 $\mu$ L στο GC/MS



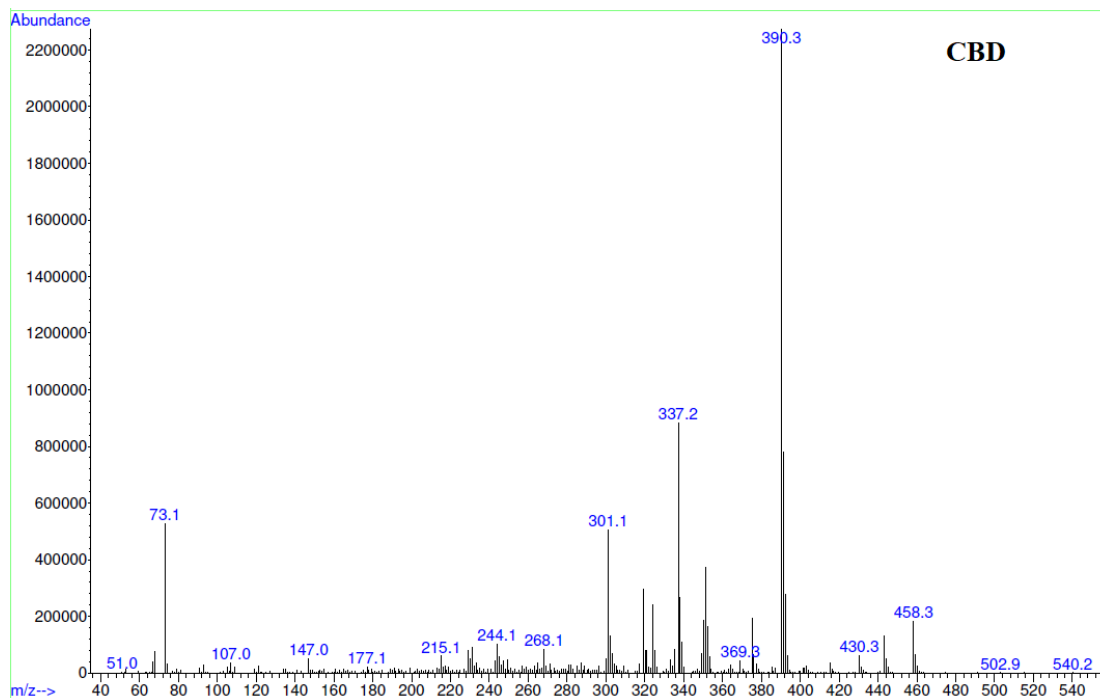
BSTFA



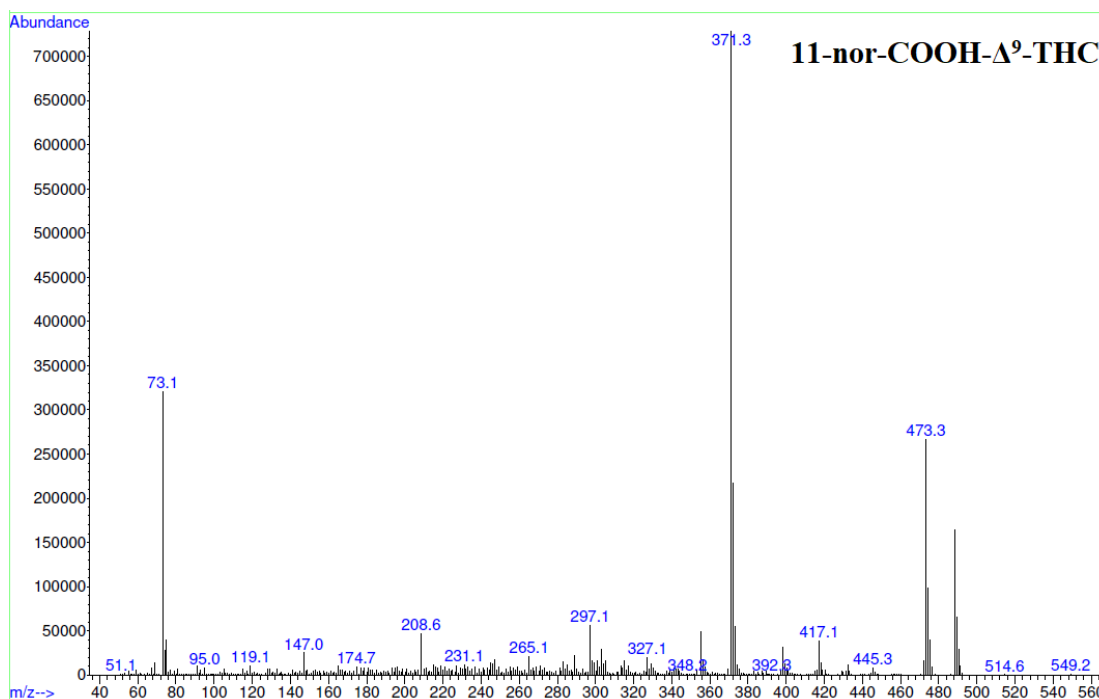
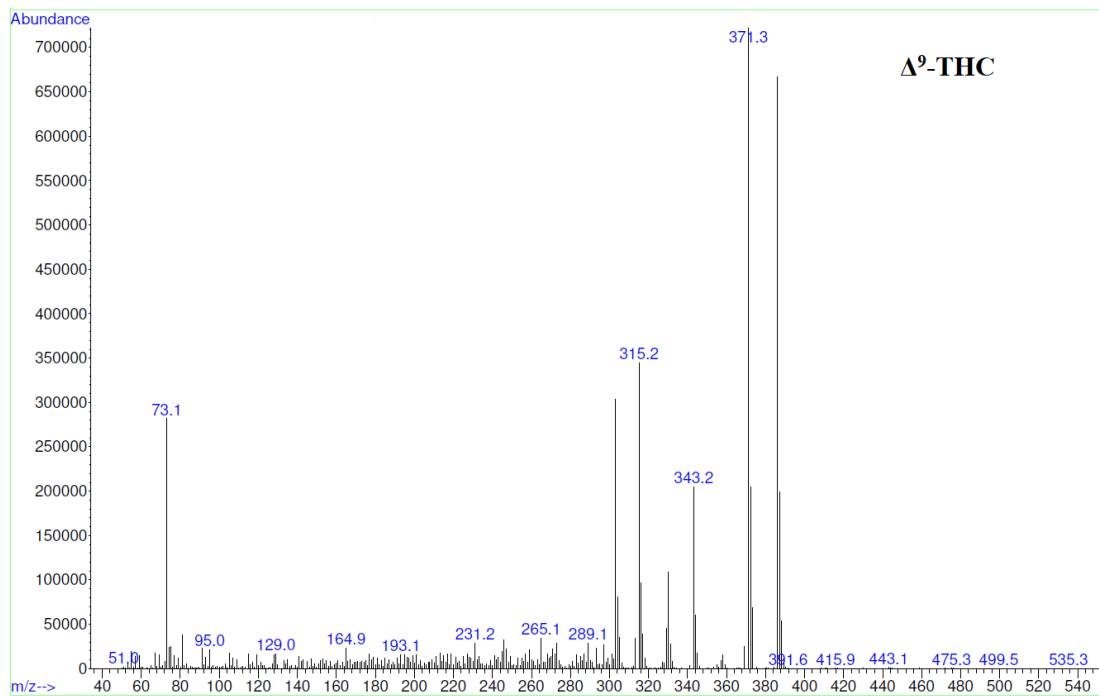
TMCS

Σχήμα 18: Δομές BSTFA και TMCS

Αφού οι πρότυπες ουσίες παραγωγοποιήθηκαν και ενέθηκαν στο χρωματογραφικό σύστημα με τη μέθοδο πλήρους σάρωσης, ελήφθησαν τα φάσματα μαζών των παραγωγοποιημένων ουσιών. Τα φάσματα των τριών ουσιών δίνονται στο **Σχήμα 19**.







**Σχήμα 19:** Φάσματα μαζών των παραγωγοποιημένων υπό μελέτη ουσιών

Από αυτά ελήφθησαν τα τρία σημαντικότερα θραύσματα για την κάθε ουσία, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία μεθόδου παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων (SIM), η οποία και χρησιμοποιήθηκε σ' αυτή τη μελέτη. Στον **Πίνακα 6** παρουσιάζονται τα θραύσματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων, τα δύο υπόλοιπα κυριότερα θραύσματα για την ταυτοποίηση των ουσιών, καθώς και οι χρόνοι ανάλυσης για την κάθε ουσία.

**Πίνακας 6:** Επιλεγμένα θραύσματα (m/z) των αναλυτών και χρόνοι ανάλυσης.

Αναλύτης	Θραύσμα ποσοτικοποίησης	Υπόλοιπα θραύσματα ταυτοποίησης	Χρόνος ανάλυσης (Rt, min)
<b>CBD</b>	390	337, 301	5,598
<b>Δ<sup>9</sup>-THC</b>	371	386, 303	6,021
<b>11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC</b>	371	473, 488	7,264
<b>Δ<sup>9</sup>-THC-d<sup>3</sup></b>	374	-	6,014
<b>11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC-d<sup>3</sup></b>	374	-	7,258

### 6.3 Χρωματογραφικές συνθήκες

Οι χρωματογραφικές παράμετροι που επηρεάζουν την ανάλυση των ουσιών με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας είναι η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης, η ροή του φέροντος αερίου και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης ρυθμίζεται από το λογισμικό στον υπολογιστή και ελέγχει παραμέτρους όπως η αρχική θερμοκρασία, η ενδιάμεση και η τελική θερμοκρασία, καθώς και ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας της στήλης. Οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

**Πίνακας 7:** Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για τον προσδιορισμό των υπό μελέτη ουσιών

Θερμοκρασία σημείου έγχυσης	280 °C
Αρχική θερμοκρασία στήλης	100 °C (παραμονή 1 min)
Ρυθμός ανόδου θερμοκρασίας στήλης	30 °C/min
Τελική θερμοκρασία στήλης	300 °C (παραμονή 5 min)
Ταχύτητα ροής φέροντος αερίου	1,0 mL/min
Θερμοκρασία ανιχνευτή	280 °C
Θερμοκρασία πηγής ιονισμού	230 °C

## 6.4 Βελτιστοποίηση της εκχύλισης

Το πρώτο και ένα από τα σημαντικότερα στάδια στην πορεία της ανάλυσης μιας ουσίας είναι ο διαχωρισμός της από τα ενδογενή συστατικά του δείγματος και από πιθανές προσμείξεις. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές εκχύλισης με τις πιο συνήθεις να είναι η υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE) και η εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας δοκιμάστηκαν αμφότεροι οι δύο τρόποι εκχύλισης. Κριτήριο για την αξιολόγηση των τεχνικών και των επί μέρους συνθηκών εκχύλισης αποτελούσε κάθε φορά η % ανάκτηση της μεθόδου. Ο υπολογισμός της ανάκτησης γινόταν με βάση τη μαθηματική σχέση:

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

όπου,  $E_1$  είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από την εκχύλιση του βιολογικού δείγματος και παραγωγοποίηση και  $E_2$  είναι το εμβαδόν επιφάνειας του κάθε αναλύτη μετά από απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένου μικτού διαλύματος ίδιας συγκέντρωσης.

Σε όλες τις δοκιμασίες 1 mL πλάσματος εμβολιάστηκε με 100  $\mu$ L από το Διάλυμα εργασίας  $A_1$  (1,0  $\mu$ g/mL). Μαζί με τα εκχυλισθέντα δείγματα πλάσματος ετοιμάζονταν και μεθανολικά μικτά διαλύματα εργασίας ίδιας συγκέντρωσης των ουσιών τα οποία υποβάλλονταν σε παραγωγοποίηση υπό τις ίδιες συνθήκες. Τα δείγματα αυτά εγχέονταν στο χρωματογραφικό σύστημα και χρησιμοποιούνταν για υπολογισμό της απόλυτης ανάκτησης κατά το στάδιο της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων. Παράλληλα εγχέονταν στο χρωματογράφο και τυφλά δείγματα πλάσματος για έλεγχο παρεμποδίσεων από τα ενδογενή συστατικά της μήτρας.

### Υγρό – υγρό εκχύλιση

Η υγρό – υγρό εκχύλιση αποτελεί μία παραδοσιακή μέθοδο εκχύλισης. Πραγματοποιείται για την απομόνωση των ουσιών από το βιολογικό υπόστρωμα με κατάλληλο σύστημα διαλυτών και ρύθμιση του pH. Λαμβάνει χώρα διαμέριση της ουσίας μεταξύ της οργανικής και της υδατικής φάσης. Έτσι, επιτυγχάνεται μια κατανομή ισορροπίας μεταξύ των δύο φάσεων. Στόχο αποτελεί η ποσοτική μεταφορά όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας των υπό μελέτη ουσιών από την υδατική στην οργανική φάση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την παραμονή των ουσιών στην ουδέτερη μορφή τους και την αποτροπή ιοντισμού τους, με τη σωστή ρύθμιση του

pH. Με βάση την επιστημονική βιβλιογραφία επιλέχθηκε ρυθμιστικό διάλυμα pH 5 για τη ρύθμιση του pH και ως διαλύτης εκχύλισης μίγμα εξανίου και οξικού αιθυλεστέρα σε αναλογία 7:1.

Τα στάδια της υγρό - υγρό εκχύλισης φαίνονται παρακάτω:

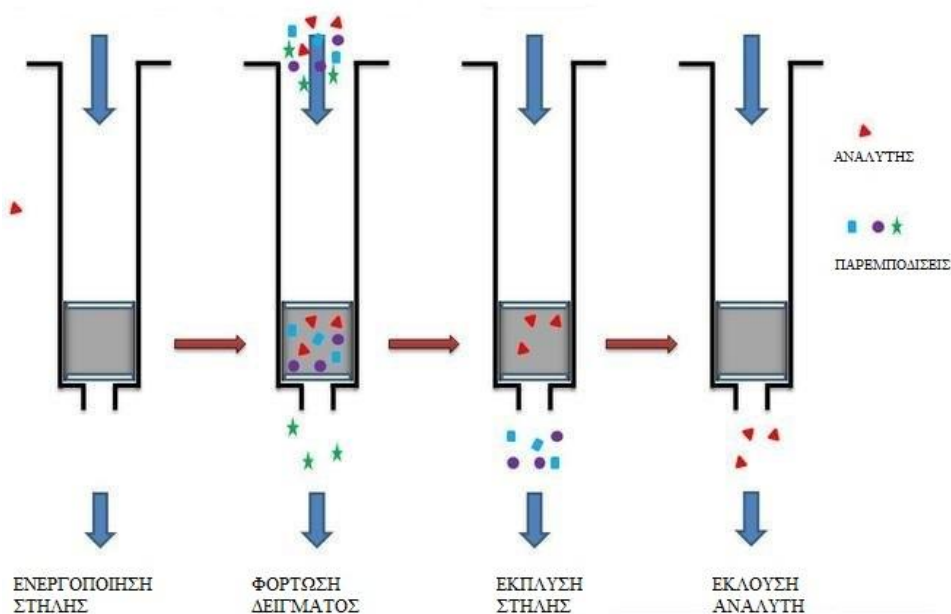
1. Παραλαβή 1 mL πλάσματος και προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  από το Διάλυμα εργασίας  $A_1$  (1,0  $\mu\text{g/mL}$ ).
2. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
3. Ρύθμιση του pH με την προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος pH 5 και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
4. Προσθήκη 3 ml μίγματος εξανίου:οξικού αιθυλεστέρα 7:1 και ανάδευση
5. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.
6. Παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας.
7. Εξάτμιση μέχρι ξηρού υπό ρεύμα  $\text{N}_2$ .
8. Προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  ACN και 50  $\mu\text{L}$  BSTFA με 1% TMCS και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
9. Παραμονή σε αμμόλουτρο στους 70 °C για 30 min.
10. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει συμπύκνωση του δείγματος.
11. Μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια που περιέχουν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης.
12. Ένεση 1 $\mu\text{L}$  στο GC/MS.

### **Εκχύλιση στερεάς φάσης**

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι εξίσου σημαντική μέθοδος εκχύλισης των αναλυτών πριν τη χρωματογραφική ανάλυση. Προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή αναπαραγωγικότητα, εύκολη αυτοματοποίηση και μειωμένη ποσότητα διαλυτών. Οι βασικές αρχές της εκχύλισης στερεάς φάσης (**Σχήμα 20**) περιγράφονται ως εξής:

- Ενεργοποίηση των στηλών εκχύλισης.
- Φόρτωση δείγματος και συγκράτηση του αναλύτη στο προσροφητικό υλικό.

- Έκπλυση των στηλών και απομάκρυνση των ανεπιθύμητων προσμείξεων.
- Έκλυση του αναλύτη με τον κατάλληλο διαλύτη έκλυσης.



**Σχήμα 20:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας εκχύλισης στερεάς φάσης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές στήλες στερεάς φάσης, οι μικτού τύπου, ανιοανταλλακτικές, μη πολικές Bond Elut LRC Certify II και οι μη πολικές υδρόφοβες Bond Elut C18. Δεδομένου ότι τα κανναβινοειδή δεσμεύονται με τις πρωτεΐνες του πλάσματος και στις δύο περιπτώσεις προηγήθηκε της εκχύλισης η καταβύθιση των πρωτεϊνών τόσο για την αποδέσμευση τους όσο και για τον καλύτερο καθαρισμό του δείγματος.

Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης και στις 2 περιπτώσεις, καθώς και της καταβύθισης των πρωτεϊνών παρουσιάζονται παρακάτω:

1. Παραλαβή 1 mL πλάσματος και προσθήκη 2 mL ACN υπό ανάδευση.
2. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.
3. Παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας και εξάτμιση μέχρις όγκου περίπου 500  $\mu$ L.
4. Προσθήκη 5 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 7 και μεθανόλης (95:5 v/v) και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίισης.
5. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.

6. Ενεργοποίηση των στηλών Bond Elut Certify II:
  - A. Προσθήκη 2 mL μεθανόλης.
  - B. Προσθήκη 2 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 7 και μεθανόλης (95:5 v/v).
7. Εφαρμογή του δείγματος.
8. Έκπλυση των στηλών:
  - A. Προσθήκη 2 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 7 και μεθανόλης (95:5 v/v).
  - B. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 10 sec.
  - C. Προσθήκη 100  $\mu$ L ακετόνης.
  - D. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 3 min.
9. Έκλυση της CBD και της  $\Delta^9$ -THC: Προσθήκη εις διπλούν 2 mL μίγματος εξανίου:οξικού αιθυλεστέρα (90:10 v/v) και παραλαβή του εκχυλίσματος σε εσφυρισμένα σωληνάκια.
10. Έκπλυση των στηλών:
  - A. Προσθήκη 3 mL μεθανόλης 50%.
  - B. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 10 sec.
  - C. Προσθήκη 100  $\mu$ L οξικού αιθυλεστέρα.
  - D. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 3 min.
11. Έκλυση του 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC: Προσθήκη εις διπλούν 2 mL μίγματος εξανίου:οξικού αιθυλεστέρα:οξικού οξέος (90:10:1 v/v/v) και παραλαβή του εκχυλίσματος σε εσφυρισμένα σωληνάκια.

Ομοίως με την υγρό – υγρό εκχύλιση, και στην περίπτωση της εκχύλισης στερεάς φάσης μετά την εκχύλιση πραγματοποιήθηκε η παραγωγοποίηση των ουσιών.

Από τα χρωματογραφήματα υπολογίστηκε ο λόγος της επιφάνειας της κορυφής του κάθε αναλύτη μετά από εκχύλιση προς την επιφάνεια κορυφής της κάθε ουσίας σε μεθανολικό διάλυμα. Οι τιμές των % ανακτήσεων για τις υπό μελέτη ουσίες συνοψίζονται στον **Πίνακα 8**. Τα αποτελέσματα των δοκιμών έδειξαν πως η χρήση Bond Elut C18 παρουσιάζει μικρά ποσοστά ανάκτησης. Οι άλλες δύο τεχνικές που δοκιμάστηκαν παρουσιάζουν ικανοποιητική ανάκτηση για όλες τις ενώσεις αλλά η επίδραση του μητρικού υλικού είναι μεγάλη στην περίπτωση της υγρό-υγρό εκχύλισης ιδιαίτερα στον χρόνο ανάκτησης της  $\Delta^9$ -THC, κάτι που επηρεάζει σε

σημαντικό βαθμό την ευαισθησία της μεθόδου για την ουσία αυτή. Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκε η χρήση της εκχύλισης στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας τις στήλες Bond Elut LRC Certify II.

**Πίνακας 8:** Επί τοις εκατό (%) ποσοστά ανάκτηση για τις υπό μελέτη ουσίες με τις τρεις τεχνικές εκχύλισης

Τεχνική εκχύλισης	CBD	$\Delta^9$ -THC	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC
LLE	129	109	81
Bond Elut C18	30	34	54
Bond Elut Certify II	103	95	96

## 6.5 Τελική αναπτυχθείσα μέθοδος

### Προκατεργασία

1. Παραλαβή 1 mL πλάσματος και προσθήκη 50  $\mu$ L διαλύματος εσωτερικού προτύπου, συγκέντρωσης 0,3  $\mu$ g/mL.
2. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
3. Προσθήκη 2 mL ACN υπό ανάδευση.
4. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.
5. Παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας και εξάτμιση μέχρις όγκου περίπου 500  $\mu$ L.
6. Προσθήκη 5 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 7 και μεθανόλης (95:5 v/v).
7. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
8. Φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 5 min.

### Εκχύλιση

9. Ενεργοποίηση των στηλών Bond Elut Certify II:
  - C. Προσθήκη 2 mL μεθανόλης.
  - D. Προσθήκη 2 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 7 και μεθανόλης (95:5 v/v).
10. Εφαρμογή του δείγματος.
11. Έκπλυση των στηλών:
  - E. Προσθήκη 2 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 7 και μεθανόλης (95:5 v/v).

- F. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 10 sec.
  - G. Προσθήκη 100  $\mu$ L ακετόνης.
  - H. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 3 min.
12. Έκλυση της CBD και της  $\Delta^9$ -THC: Προσθήκη εις διπλούν 2 mL μίγματος εξανίου:οξικού αιθυλεστέρα (90:10 v/v) και παραλαβή του εκχυλίσματος σε εσφυρισμένα σωληνάκια.
13. Έκπλυση των στηλών:
- E. Προσθήκη 3 mL μεθανόλης 50%.
  - F. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 10 sec.
  - G. Προσθήκη 100  $\mu$ L οξικού αιθυλεστέρα.
  - H. Εφαρμογή κενού ( $\geq 10$  mmHg) για περίπου 3 min.
14. Έκλυση του 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC: Προσθήκη εις διπλούν 2 mL μίγματος εξανίου:οξικού αιθυλεστέρα:οξικού οξέος (90:10:1 v/v/v) και παραλαβή του εκχυλίσματος σε εσφυρισμένα σωληνάκια.

### **Παραγωγοποίηση**

15. Εξάτμιση των ξεχωριστών εκλουσμάτων μέχρι ξηρού στους 40 °C υπό ρεύμα N<sub>2</sub>.
16. Προσθήκη 50  $\mu$ L ACN και 50  $\mu$ L BSTFA με 1% TMCS και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
17. Παραμονή σε αμμόλουτρο στους 70 °C για 30 min.
18. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να γίνει συμπύκνωση του δείγματος.
19. Μεταφορά σε γυάλινα φιαλίδια που περιέχουν γυάλινα σωληνάκια προσυγκέντρωσης.

### **Ανάλυση**

20. Τοποθέτηση των φιαλιδίων στον αυτόματο δειγματολήπτη και έγχυση όγκου 1  $\mu$ L στο χρωματογραφικό σύστημα GC/MS.





## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Πρωτόκολλο επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου**

Η επικύρωση (validation) των μεθόδων προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών στο πλάσμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA (Food and Drug Administration) (Food and Drug Administration (FDA), 2018), του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA, 2011) και της EURACHEM (EURACHEM Guide, 2014). Το πρωτόκολλο επικύρωσης περιλάμβανε τη μελέτη της εκλεκτικότητας (selectivity), ειδικότητας (specificity) και της γραμμικότητας (linearity), τον προσδιορισμό των κατώτατων ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ), την ανάκτηση (recovery), τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας (intraday precision) και της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (interday precision), καθώς και της ορθότητας εντός της ημέρας (intraday accuracy) και δια των ημερών (interday accuracy).

### **7.1 Εκλεκτικότητα**

Η μελέτη της εκλεκτικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι διαφορετικών τυφλών βιολογικών δειγμάτων πλάσματος και τον έλεγχο των χρωματογραφημάτων, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από ενδογενή συστατικά του πλάσματος στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων.

### **7.2 Ειδικότητα**

Η μελέτη της ειδικότητας πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση έξι βιολογικών δειγμάτων πλάσματος τα οποία είχαν εμβολιαστεί με 50  $\mu\text{L}$  από μίγμα διαλύματος εργασίας 31 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10  $\mu\text{g/mL}$  προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παρεμποδίσεις από τις ουσίες αυτές στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων. Το εν λόγω διάλυμα εργασίας περιείχε ουσίες ή μεταβολίτες αυτών που ενδέχεται να λαμβάνονται, νόμιμα ή παράνομα, από άτομα που λαμβάνουν προϊόντα κανναβιδιόλης και είναι πιθανόν να συνυπάρχουν στα βιολογικά δείγματα των ασθενών αυτών. Οι ουσίες που περιέχονταν στο διάλυμα ήταν οι παρακάτω: διαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, λοραζεπάμη,

κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, σερτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαζίνη, μιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA), 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη (MDA), *N*-μεθυλ-1,3-βενζοδιοξολυλβουταναμίνη (MBDB), 3,4-μεθυλενοδιοξυ-*N*-αιθυλαμφεταμίνη (MDEA), κεταμίνη, βουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και μεθυλεστέρας της εκγονίνης.

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

Ως κατώτατο όριο ανίχνευσης θεωρήθηκε η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη που είχε απόκριση τουλάχιστον 3 φορές μεγαλύτερη από το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος ( $S/N > 3:1$ ), ενώ ως κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης η συγκέντρωση που είχε απόκριση τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη από το θόρυβο ενός τυφλού δείγματος ( $S/N > 10:1$ ).

### 7.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διαγραμμάτων βαθμονόμησης επτά σημείων σε τέσσερις διαφορετικές ημέρες. Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης που επελέγησαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης ( $y=ax+b$ ) των διαγραμμάτων βαθμονόμησης υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων και με συντελεστή βαρύτητας  $1/x^2$ , όπου το  $x$  αντιστοιχεί στην τιμή της συγκέντρωσης του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL, ενώ το  $y$  αντιστοιχεί στο λόγο της απόκρισης (εμβαδόν κορυφής) του αναλύτη προς την απόκριση του αντίστοιχου εσωτερικού προτύπου. Στο πλαίσιο της μελέτης της γραμμικότητας της μεθόδου υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού ( $R^2$ ) για κάθε εξίσωση παλινδρόμησης και έπρεπε να ισχύει ότι  $R^2 \geq 0.98$ .

### 7.5 Απόλυτη Ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για τις υπό μελέτη ουσίες εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Αναλύθηκαν από έξι εμβολιασμένα πρότυπα δείγματα για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, χαμηλό, μεσαίο και υψηλό με βάση την αναπτυχθείσα μέθοδο.

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης των αναλυτών γινόταν παράλληλα απευθείας έγχυση έξι μικτών μεθανολικών διαλυμάτων αντίστοιχων συγκεντρώσεων μετά από παραγωγοποίηση. Η ανάκτηση υπολογίστηκε με βάση την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$\%Ανάκτηση = \frac{E_1}{E_2} \times 100$$

όπου  $E_1$  είναι το εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από την εκχύλιση του βιολογικού δείγματος και παραγωγοποίηση και  $E_2$  είναι το μέσο εμβαδόν επιφάνειας των κορυφών του κάθε αναλύτη μετά από απευθείας έγχυση παραγωγοποιημένου μικτού διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης.

## **7.6 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης**

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

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

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

## **7.7 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα**

Η επαναληψιμότητα (εντός της ημέρας, intraday precision) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (δια των ημερών, interday precision), ελέγχθησαν με επαναλαμβανόμενες αναλύσεις δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC). Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας παρασκευάστηκαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, ένα

χαμηλό QC<sub>1</sub> (συγκέντρωσης τριπλάσιας του πρώτου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης), ένα μεσαίο QC<sub>2</sub> (συγκέντρωσης περίπου στο μέσο του δυναμικού εύρους του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη) και ένα υψηλό QC<sub>3</sub> (συγκέντρωσης ίσης με το 80% της συγκέντρωσης του τελευταίου σημείου του διαγράμματος βαθμονόμησης του κάθε αναλύτη). Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (QC) που επιλέχθηκαν αναφέρονται στον **Πίνακα 5**. Αναλύθηκαν έξι δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο σε κάθε μία από τις τέσσερις ημέρες ανάλυσης (συνολικά 24 δείγματα ελέγχου ποιότητας ανά επίπεδο) σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο. Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος βαθμονόμησης της κάθε ημέρας και στη συνέχεια υπολογίζονταν η μέση τιμή της συγκέντρωσης και η τυπική απόκλιση των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα αποτελούν μέτρο του τυχαίου σφάλματος των μεθόδων και εκτιμήθηκαν από το ποσοστό % της σχετικής τυπικής απόκλισης (% RSD) των μετρήσεων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας της ίδιας συγκέντρωσης που αναλύθηκαν την ίδια ημέρα και σε 4 διαφορετικές ημέρες, σύμφωνα με τη μαθηματική σχέση:

$$\% RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

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

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

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

## **7.8 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών**

Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στα δείγματα ελέγχου ποιότητας της κάθε ημέρας υπολογιζόταν από την αντίστοιχη εξίσωση παλινδρόμησης του διαγράμματος

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

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

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



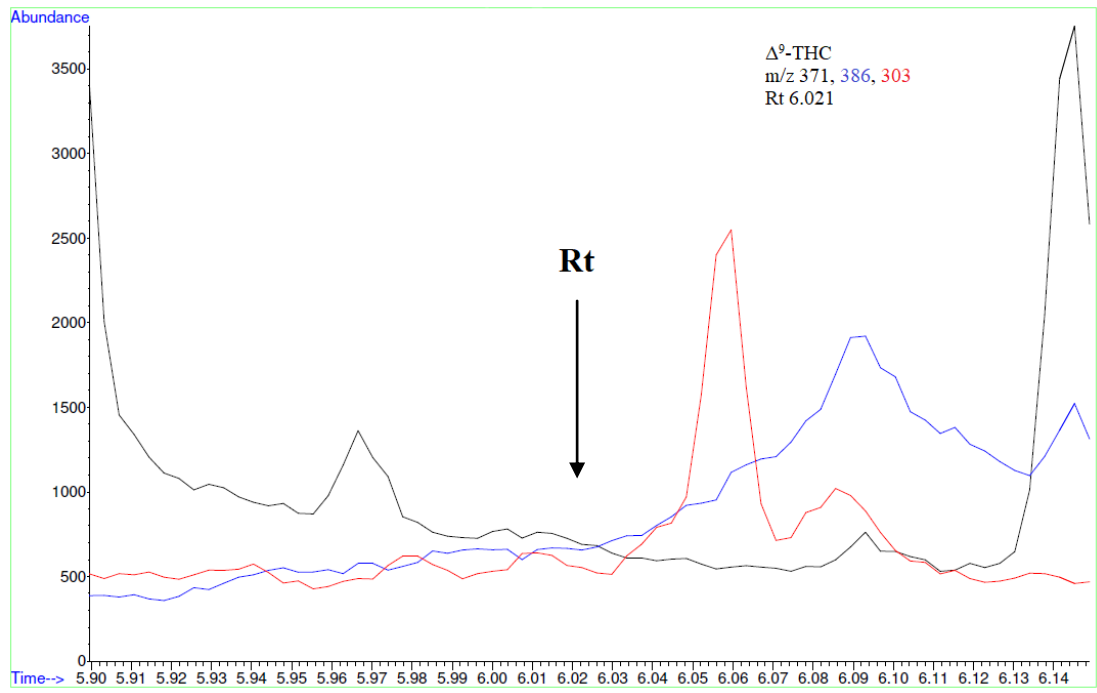
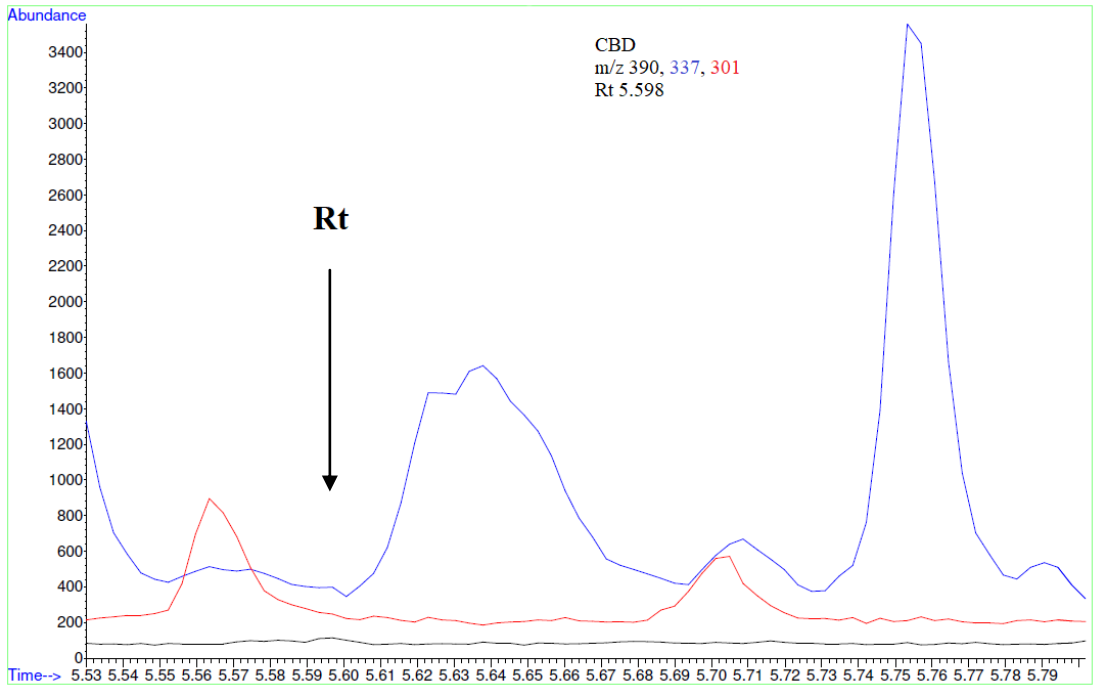
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Αποτελέσματα επικύρωσης της αναπτυχθείσας μεθόδου

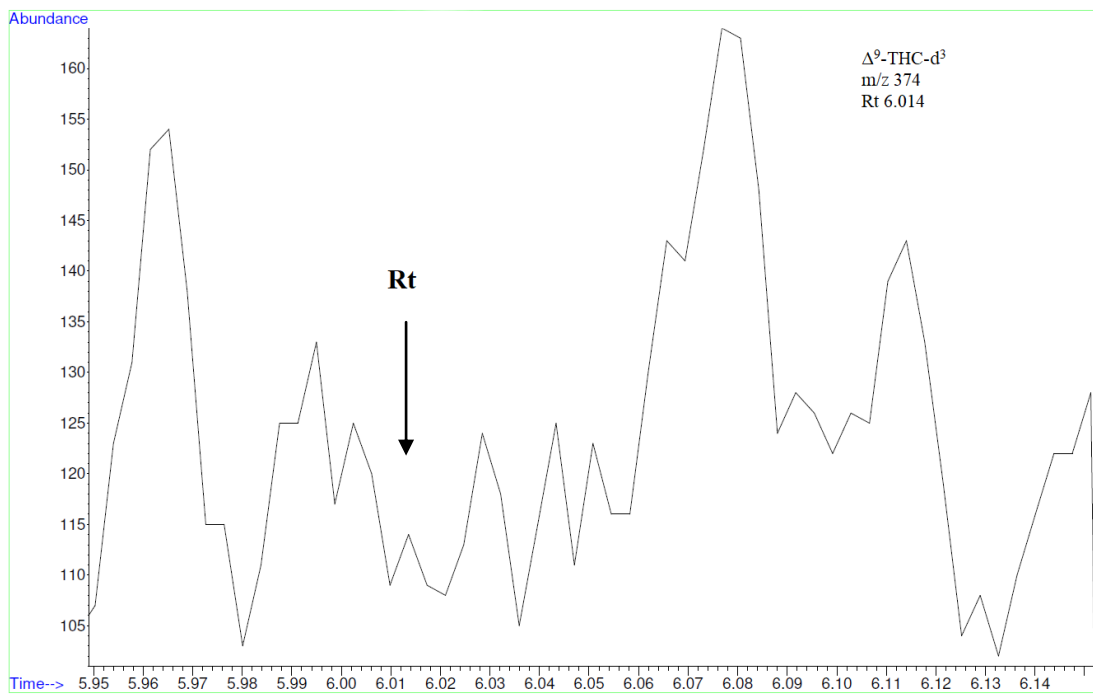
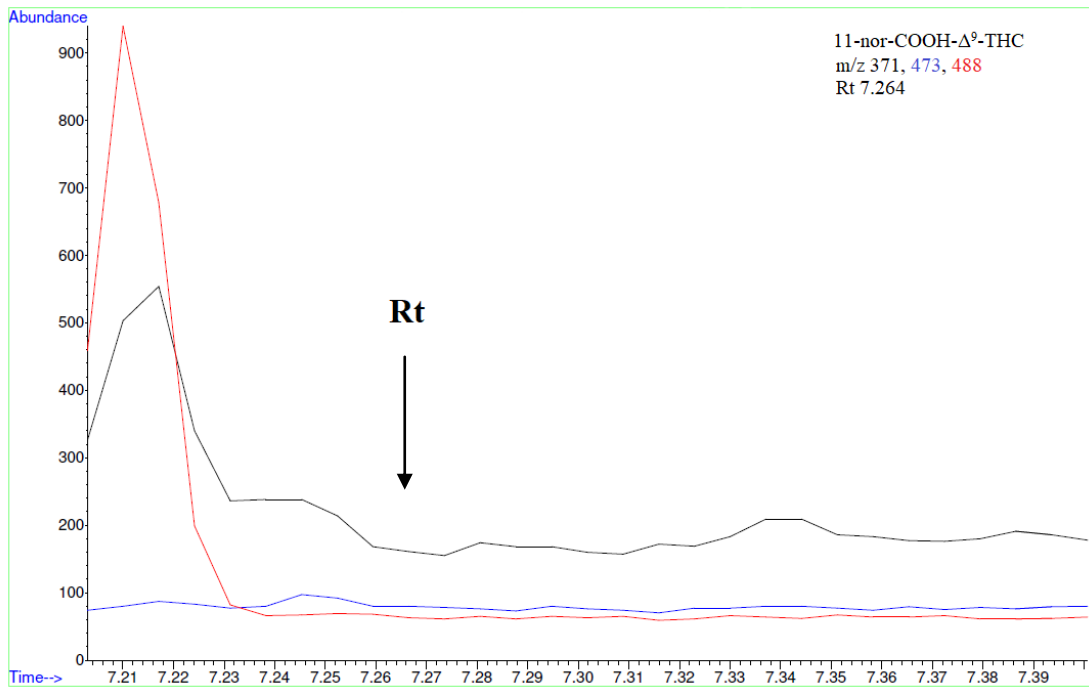
Οι ουσίες που μελετήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας (CBD,  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC), καθώς και τα εσωτερικά πρότυπα ( $\Delta^9$ -THC-d<sup>3</sup>, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC-d<sup>3</sup>) απομονώνονταν από το πλάσμα μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης με στήλες Bond Elut LRC Certify II. Πριν την εκχύλιση προηγήθηκε κατεργασία του πλάσματος με ακετονιτρίλιο, με σκοπό την καταβύθιση των πρωτεϊνών. Μετά την εκχύλιση, οι ουσίες παραγωγοποιήθηκαν με τη χρήση του αντιδραστηρίου παραγωγοποίησης BSTFA με 1% TMCS, στους 70 °C για 30 min και τέλος εγχύθηκαν σε σύστημα του αέριου χρωματογράφου συζευγμένου με αναλυτή φασματόμετρο μαζών και αναλύθηκαν σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring/SIM). Η αναπτυχθείσα μέθοδος περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 6 (υποκεφάλαιο 6.5). Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα της επικύρωσης.

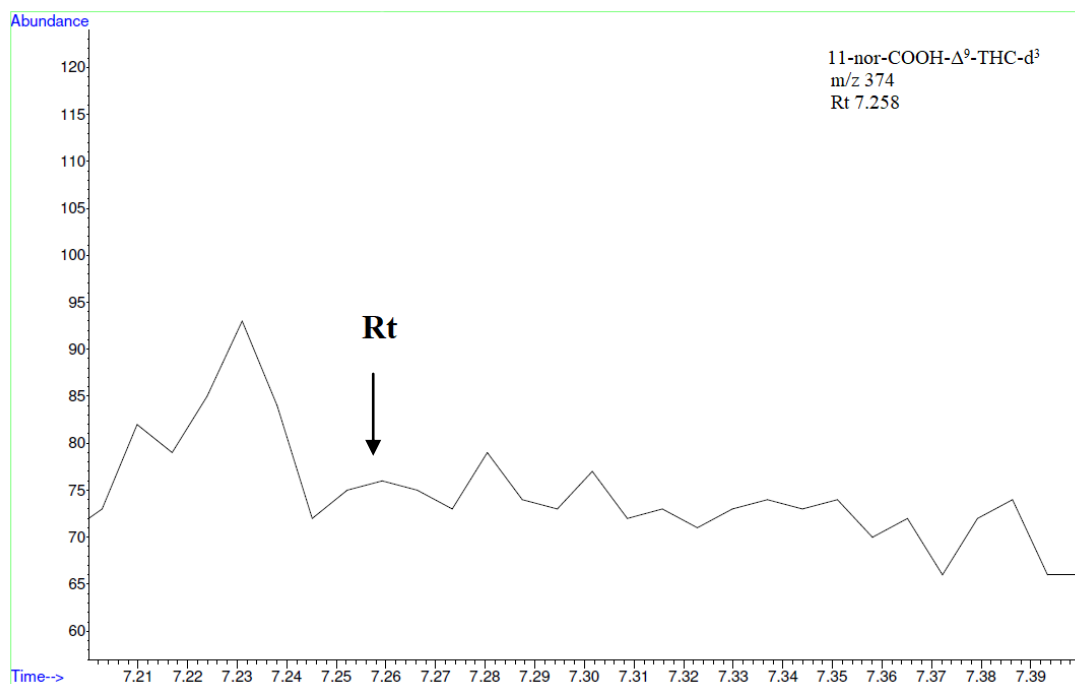
### 8.1 Εκλεκτικότητα

Έξι διαφορετικά τυφλά δείγματα πλάσματος κατεργάστηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού CBD,  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC σε πλάσμα (κεφάλαιο 6), χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου. Σύμφωνα με τα ληφθέντα χρωματογραφήματα, δεν παρατηρήθηκε κάποια παρεμπόδιση από κάποια από τα συστατικά του πλάσματος στους χρόνους ανάλυσης των τριών αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων. Στο **Σχήμα 21**, παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων των αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων που ελήφθησαν από ένα τυφλό δείγμα πλάσματος.









**Σχήμα 21:** Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από την ανάλυση τυφλού δείγματος πλάσματος για την μελέτη της εκλεκτικότητας της μεθόδου προσδιορισμού των τριών ουσιών

## 8.2 Ειδικότητα

Για την μελέτη της ειδικότητας 6 δείγματα πλάσματος εμβολιάστηκαν με 50  $\mu\text{L}$  από μίγμα μικτού διαλύματος εργασίας 31 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Το διάλυμα των ουσιών περιείχε διαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, λοραζεπάμη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, σερτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA), 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη (MDA), *N*-μεθυλ-1,3-βενζοδιοξολυλβουταναμίνη (MBDB), 3,4-μεθυλενοδιοξυ-*N*-αιθυλαμφεταμίνη (MDEA), κεταμίνη, βουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεργονίνη και μεθυλεστέρας της εκγονίνης. Τα δείγματα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο, ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμποδίσεων στους χρόνους ανάλυσης των υπό μελέτη ουσιών. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα τα οποία ελήφθησαν καμία παρεμπόδιση δεν παρατηρήθηκε από τις παραπάνω ουσίες στους χρόνους ανάλυσης των αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων.

### 8.3 Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των τριών υπό μελέτη αναλυτών σε πλάσμα υπολογίστηκαν από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος πλάσματος στο χρόνο της ανάσχεσης, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 ( $S/N \geq 3:1$ ).

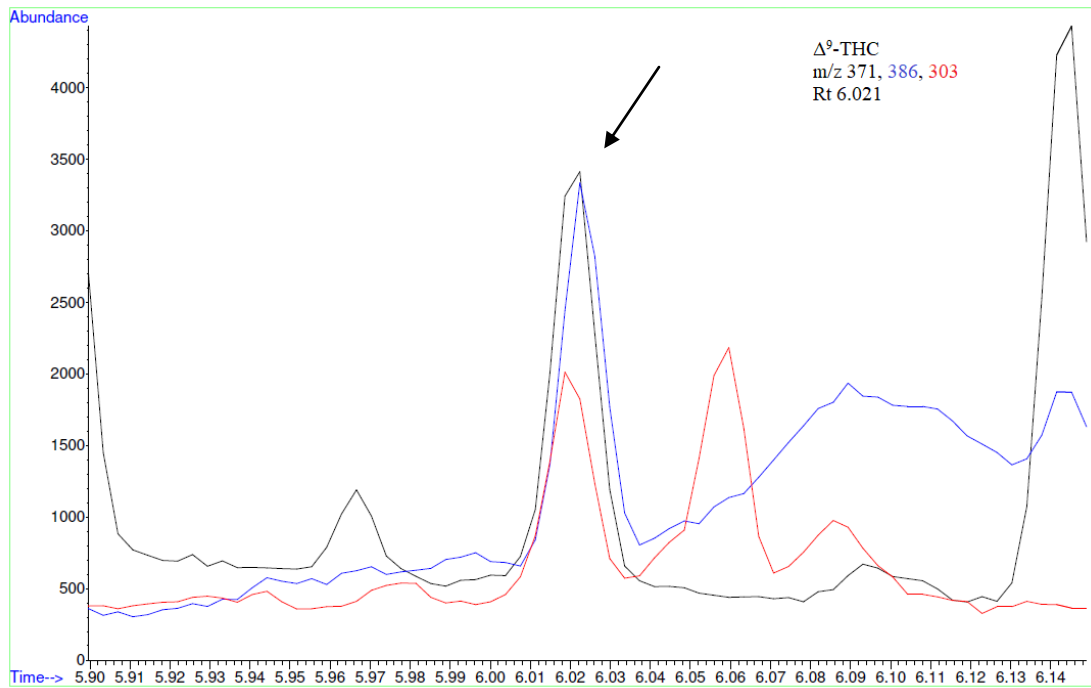
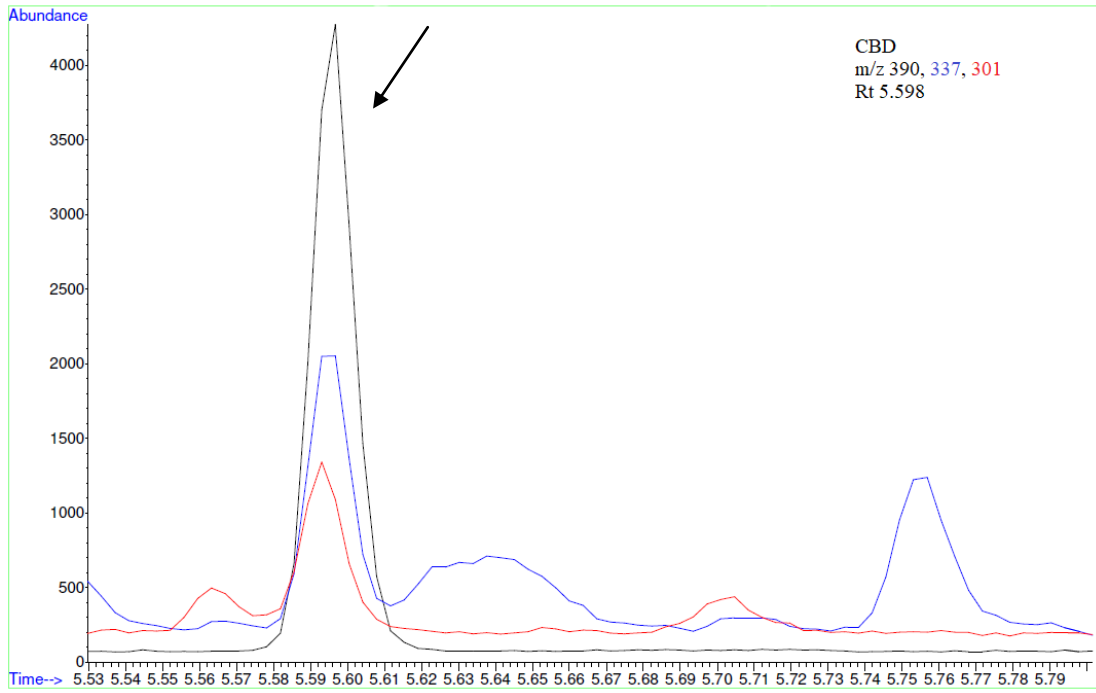
Τα κατώτατα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των τριών υπό μελέτη αναλυτών σε πλάσμα υπολογίστηκαν από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος πλάσματος στο χρόνο της ανάσχεσης, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 ( $S/N \geq 10:1$ ).

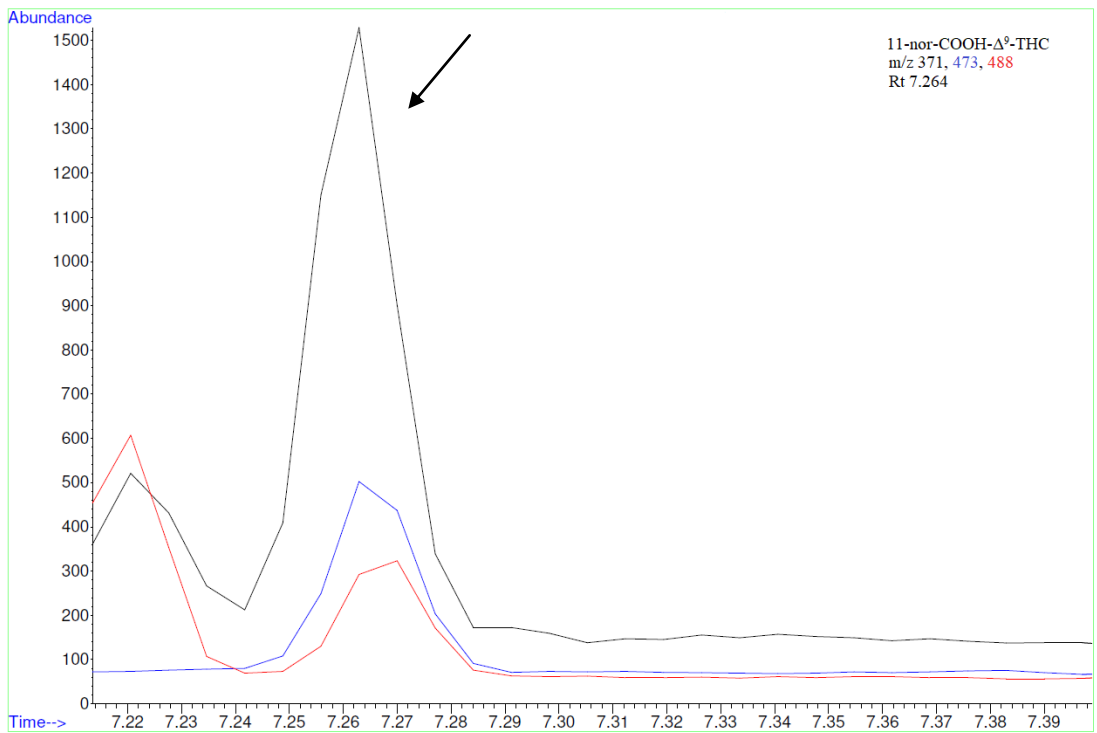
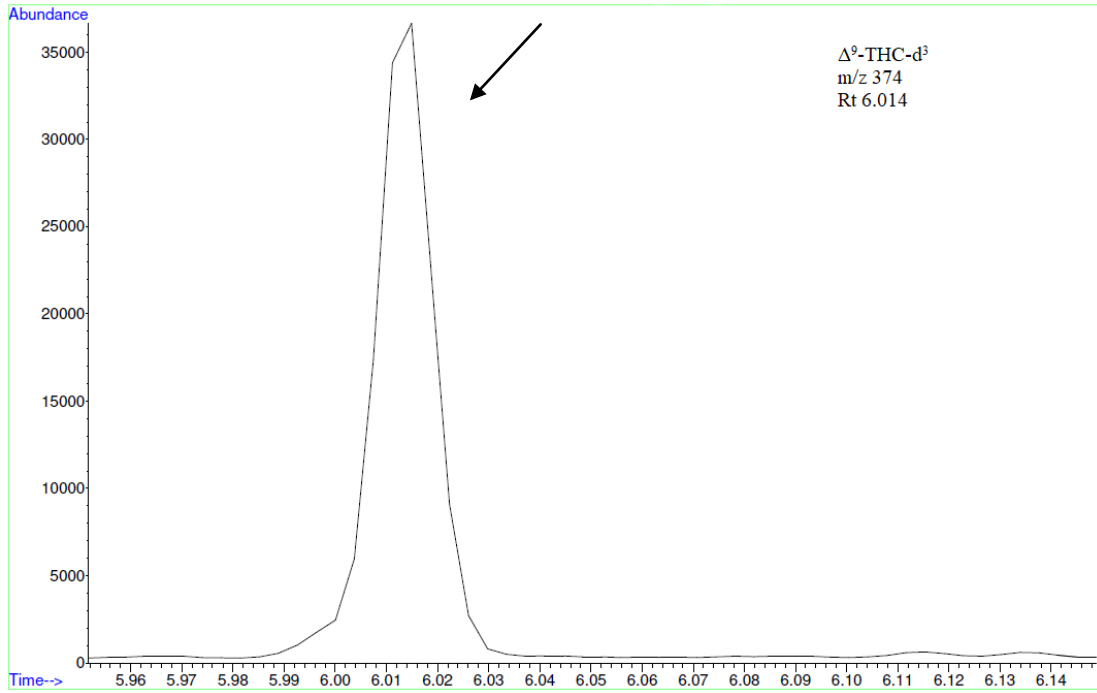
Οι τιμές των LOD και LOQ των υπό εξέταση ουσιών συνοψίζονται στον **Πίνακα 9**.

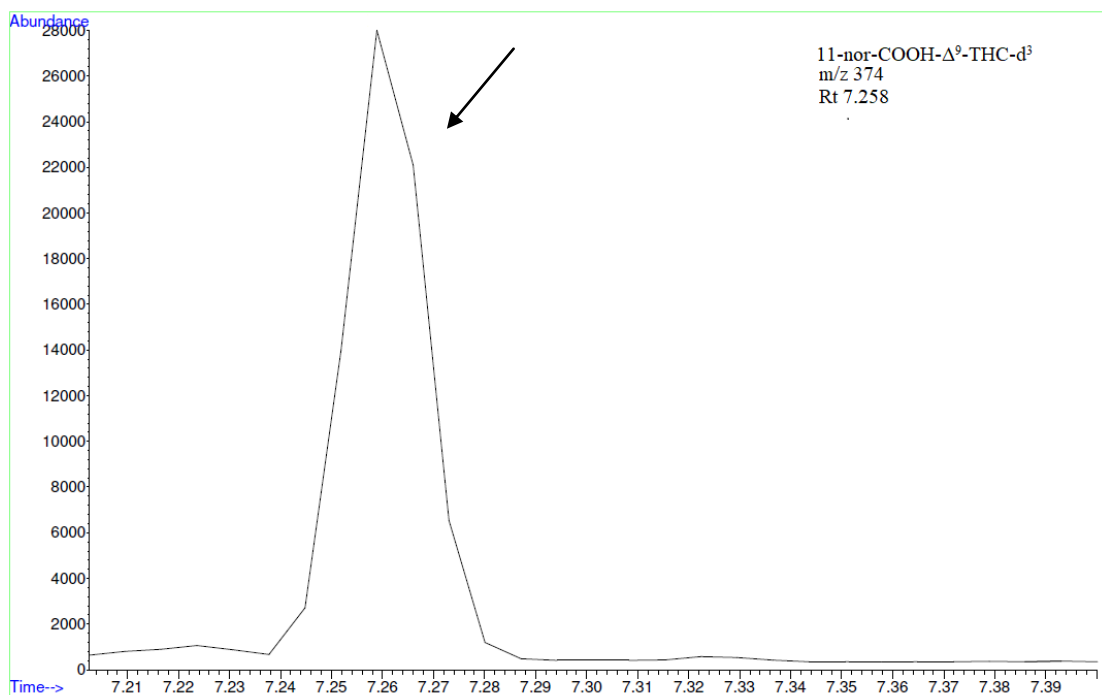
**Πίνακας 9:** Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορισμού των 3 ουσιών στο πλάσμα

Αναλύτες	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
	(S/N $\geq$ 3:1)	(S/N $\geq$ 10:1)
<b>CBD</b>	0,060	0,20
<b><math>\Delta^9</math>-THC</b>	0,060	0,20
<b>11-nor-COOH-<math>\Delta^9</math>-THC</b>	0,060	0,20

Χαρακτηριστικά αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα στο επίπεδο LOQ των 3 αναλυτών που ελήφθησαν με τη μέθοδο παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος, παρουσιάζονται στο **Σχήμα 22**.







**Σχήμα 22:** Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των υπό μελέτη ουσιών στο κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης της κάθε ουσίας

## 8.4 Γραμμικότητα

Η μελέτη της γραμμικότητας της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των τριών υπό μελέτη ουσιών πραγματοποιήθηκε σε 4 διαφορετικές ημέρες με την κατασκευή ισάριθμων διαγραμμάτων βαθμονόμησης 7 σημείων που παρουσίαζαν γραμμική συσχέτιση. Για την κατασκευή των διαγραμμάτων βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε συντελεστής βαρύτητας  $1/x^2$ , όπου το  $x$  αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL. Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για τα σημεία της καμπύλης καθώς και ο τρόπος παρασκευής τους αναφέρονται στον **Πίνακα 4**. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες ήταν της μορφής  $y=a \cdot x + b$ , όπου:

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

**x**, η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη, εκφρασμένη σε ng/mL ( $c_{\text{analyte}}$ ).

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις 4 μέρες, η μέση εξίσωση παλινδρόμησης, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων των καμπυλών για την κάθε ουσία παρουσιάζονται στους **Πίνακες 10-12**. Η % RSD αποτέλεσε κριτήριο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της

αναπτυχθείσας μεθόδου. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση στο εύρος συγκεντρώσεων 0,2-50 ng/mL και για τις τρεις ουσίες. Ο μέσος συντελεστής προσδιορισμού,  $R^2$ , ήταν εντός αποδεκτών ορίων και για τις τρεις ουσίες, σε όλες τις σειρές ανάλυσης ( $R^2 \geq 0,990$ ).

**Πίνακας 10:** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την CBD, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	$R^2$
1 <sup>η</sup>	$y=0,0894 \cdot x + 0,0039$	0,993
2 <sup>η</sup>	$y=0,0963 \cdot x + 0,0011$	0,993
3 <sup>η</sup>	$y=0,0944 \cdot x + 0,0011$	0,992
4 <sup>η</sup>	$y=0,0873 \cdot x - 0,0010$	0,997
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y=0,0919 (\pm 0,0042) \cdot x + 0,0013 (\pm 0,0020)$	
<b>%RSD κλίσεων</b>	4,6%	

**Πίνακας 11:** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την  $\Delta^9$ -THC, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	$R^2$
1 <sup>η</sup>	$y=0,0706 \cdot x + 0,0028$	0,998
2 <sup>η</sup>	$y=0,0691 \cdot x + 0,0011$	0,997
3 <sup>η</sup>	$y=0,0679 \cdot x + 0,0039$	0,994
4 <sup>η</sup>	$y=0,0665 \cdot x + 0,0046$	0,999
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y=0,0685 (\pm 0,0017) \cdot x + 0,0031 (\pm 0,0015)$	
<b>%RSD κλίσεων</b>	2,5%	

**Πίνακας 12:** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για 4 ημέρες και η μέση εξίσωση παλινδρόμησης για την 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, καθώς και η % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) των κλίσεων

Ημέρα	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	$R^2$
1 <sup>η</sup>	$y=0,0884 \cdot x - 0,0036$	0,996



2 <sup>η</sup>	$y=0,0914 \cdot x - 0,0096$	0,999
3 <sup>η</sup>	$y=0,0878 \cdot x - 0,0008$	0,997
4 <sup>η</sup>	$y=0,0921 \cdot x + 0,0124$	0,990
<b>Μέση εξίσωση</b>	$y=0,0899 (\pm 0,0021) \cdot x - 0,0004 (\pm 0,0093)$	
<b>%RSD κλίσεων</b>	2,3%	

## 8.5 Απόλυτη Ανάκτηση

Η απόλυτη ανάκτηση για τις υπό μελέτη ουσίες υπολογίστηκαν στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 13**. Οι τιμές των ανακτήσεων κυμάνθηκαν από 91,7% έως 106,6%.

**Πίνακας 13:** Επί τοις εκατό (%) ποσοστά ανάκτησης της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών

<b>Αναλύτης</b>	<b>Συγκέντρωση (ng/mL) (n=6)</b>	<b>% ανάκτηση (±SD)</b>
<b>CBD</b>	0,60	102,4 (±5,9)
	15,0	101,1 (±4,8)
	40,0	95,4 (±6,1)
<b>Δ<sup>9</sup>-THC</b>	0,60	106,6 (±6,0)
	15,0	92,0 (±7,2)
	40,0	105,1 (±3,3)
<b>11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC</b>	0,60	96,5 (±11,3)
	15,0	96,1 (±5,6)
	40,0	91,7 (±8,1)

## 8.6 Επαναποσοτικοποίηση των δειγμάτων βαθμονόμησης

Οι επαναποσοτικοποιήσεις των δειγμάτων βαθμονόμησης πλάσματος σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και οι αποκλίσεις τους παρουσιάζονται στους **Πίνακες 14-16**. Οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών -14,72 έως 12,00 για όλους τους αναλύτες, σε όλα τα επίπεδα συγκεντρώσεων και για το σύνολο των ημερών. Οι τιμές αυτές ήταν όλες εντός των αποδεκτών ορίων  $\pm 15\%$  και  $\pm 20\%$  για το LOQ.

**Πίνακας 14:** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη CBD

Ημέρα	1 <sup>η</sup>		2 <sup>η</sup>		3 <sup>η</sup>		4 <sup>η</sup>	
Αναμενόμενη συγκέντρωση	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)
<b>0,2</b>	0,18	-10,00	0,19	-5,00	0,21	5,00	0,22	10,00
<b>0,5</b>	0,49	-2,00	0,48	-4,00	0,52	4,00	0,43	-14,00
<b>1,0</b>	1,01	1,00	1,04	4,00	0,90	-10,00	0,92	-8,00
<b>3,0</b>	3,36	12,00	3,30	10,00	3,31	10,33	3,04	1,33
<b>10,0</b>	10,20	2,00	9,83	-1,70	9,91	-0,90	9,30	-7,00
<b>20,0</b>	19,07	-4,65	20,40	2,00	19,38	-3,10	19,97	-0,15
<b>50,0</b>	45,80	-8,40	44,58	-10,84	42,64	-14,72	43,44	-13,12

**Πίνακας 15:** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για τη Δ<sup>9</sup> - THC

Ημέρα	1 <sup>η</sup>		2 <sup>η</sup>		3 <sup>η</sup>		4 <sup>η</sup>	
Αναμενόμενη συγκέντρωση	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)
<b>0,20</b>	0,20	0,00	0,22	10,00	0,19	-5,00	0,18	-10,00
<b>0,50</b>	0,49	-2,00	0,49	-2,00	0,50	0,00	0,49	-2,00
<b>1,00</b>	1,02	2,00	1,01	1,00	0,97	-3,00	0,98	-2,00
<b>3,00</b>	3,06	2,00	3,27	9,00	3,28	9,33	2,99	-0,33
<b>10,00</b>	10,45	4,50	9,96	-0,40	10,50	5,00	10,04	0,40
<b>20,00</b>	19,00	-5,00	19,32	-3,40	19,40	-3,00	20,10	0,50
<b>50,00</b>	48,64	-2,72	47,81	-4,38	52,25	4,50	47,83	-4,34

**Πίνακας 16:** Αποτελέσματα επαναποσοτικοποίησης των δειγμάτων βαθμονόμησης για το 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC

Ημέρα	1 <sup>η</sup>		2 <sup>η</sup>		3 <sup>η</sup>		4 <sup>η</sup>	
Αναμενόμενη συγκέντρωση	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)
<b>0,20</b>	0,20	0,00	0,20	0,00	0,20	0,00	0,18	-10,00
<b>0,50</b>	0,49	-2,00	0,51	2,00	0,49	-2,00	0,50	0,00
<b>1,00</b>	1,04	4,00	0,97	-3,00	1,06	6,00	0,94	-6,00
<b>3,00</b>	3,03	1,00	2,98	-0,67	2,92	-2,67	2,85	-5,00
<b>10,00</b>	10,79	7,90	10,36	3,60	10,49	4,90	10,22	2,20
<b>20,00</b>	19,31	-3,45	20,58	2,90	20,32	1,60	19,11	-4,45
<b>50,00</b>	46,43	-7,14	47,79	-4,42	46,51	-6,98	46,03	-7,94

### 8.7 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

Η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών στο πλάσμα εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

- 0,60 ng/mL (QC<sub>1</sub>, χαμηλό επίπεδο)
- 15,00 ng/mL (QC<sub>2</sub>, μεσαίο επίπεδο)
- 40,00 ng/mL (QC<sub>3</sub>, υψηλό επίπεδο)

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας της μεθόδου για τις 4 ημέρες και στα 3 επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται αναλυτικά στους **Πίνακες 17-19**. Οι τιμές της επαναληψιμότητας ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ( $\pm 15\%$ ) για όλες τις ουσίες.

**Πίνακας 17:** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την CBD στο πλάσμα

Ημέρα	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>			QC <sub>3</sub>		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)
1 <sup>η</sup>	0,60±0,03	5,00	-0,28	14,92±0,70	4,69	-0,57	39,04±2,12	5,43	-2,40
2 <sup>η</sup>	0,60±0,04	6,67	-0,56	14,76±0,67	4,54	-1,62	40,07±1,39	3,47	0,18
3 <sup>η</sup>	0,60±0,04	6,67	-0,56	14,08±0,73	5,18	-6,14	37,99±1,87	4,92	-5,04
4 <sup>η</sup>	0,63±0,03	4,48	4,17	14,94±0,50	3,35	-0,43	38,56±2,17	5,63	-3,61

**Πίνακας 18:** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την Δ<sup>9</sup>-THC στο πλάσμα

Ημέρα	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>			QC <sub>3</sub>		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)
1 <sup>η</sup>	0,61±0,01	1,64	0,83	14,31±0,45	3,14	-4,58	38,19±1,88	4,92	-4,53
2 <sup>η</sup>	0,61±0,02	3,28	0,83	14,58±0,87	5,97	-2,80	38,00±1,69	4,45	-5,00
3 <sup>η</sup>	0,61±0,02	3,28	1,11	14,77±0,36	2,44	-1,60	40,31±1,14	2,83	0,76
4 <sup>η</sup>	0,61±0,03	4,92	1,95	15,11±0,47	3,11	0,71	40,31±1,52	3,77	0,78

**Πίνακας 19:** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας της αναπτυχθείσας μεθόδου για την 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στο πλάσμα

Ημέρα	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>			QC <sub>3</sub>		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση ( $\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ( $\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση ( $\pm$ SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)
1 <sup>η</sup>	0,59 $\pm$ 0,05	8,47	-1,39	14,95 $\pm$ 0,44	2,94	-0,33	38,38 $\pm$ 1,58	4,11	-4,05
2 <sup>η</sup>	0,61 $\pm$ 0,02	3,28	0,83	14,80 $\pm$ 0,88	5,95	-1,33	39,05 $\pm$ 1,87	4,79	-2,38
3 <sup>η</sup>	0,60 $\pm$ 0,05	8,33	0,28	14,88 $\pm$ 0,49	3,29	-0,82	38,58 $\pm$ 1,36	3,53	-3,55
4 <sup>η</sup>	0,58 $\pm$ 0,02	3,45	-3,06	14,62 $\pm$ 0,86	5,88	-2,56	38,78 $\pm$ 3,25	8,38	-3,06

Τα αποτελέσματα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται στους **Πίνακες 20-22**. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα για τις 3 ουσίες ήταν:

- για την CBD: 6,67% για το QC<sub>1</sub>, 4,84% για το QC<sub>2</sub> και 4,66% για το QC<sub>3</sub>
- για την Δ<sup>9</sup>-THC: 3,28% για το QC<sub>1</sub>, 4,15% για το QC<sub>2</sub> και 4,74% για το QC<sub>3</sub>
- για την 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC: 6,67% για το QC<sub>1</sub>, 4,46% για το QC<sub>2</sub> και 5,22% για το QC<sub>3</sub>

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

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

- 4,6 % για την CBD
- 2,5% για την Δ<sup>9</sup>-THC
- 2,3% για την 11-nor-COOH- Δ<sup>9</sup>-THC

**Πίνακας 20:** Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για τη CBD

Ημέρα	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>			QC <sub>3</sub>		
	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)
1 <sup>η</sup>	1	0,58	-3,33	1	15,44	2,93	1	36,25	-9,38
	2	0,59	-1,67	2	15,90	6,00	2	41,86	4,65
	3	0,55	-8,33	3	14,63	-2,47	3	40,53	1,33
	4	0,64	6,67	4	13,98	-6,80	4	40,10	0,25
	5	0,63	5,00	5	14,43	-3,80	5	37,54	-6,15
	6	0,60	0,00	6	15,11	0,73	6	37,97	-5,08
2 <sup>η</sup>	1	0,56	-6,67	1	14,30	-4,67	1	41,85	4,63
	2	0,61	1,67	2	15,10	0,67	2	41,63	4,08
	3	0,59	-1,67	3	15,14	0,93	3	38,92	-2,70
	4	0,64	6,67	4	13,60	-9,33	4	39,09	-2,27
	5	0,54	-10,00	5	15,11	0,73	5	38,76	-3,10
	6	0,64	6,67	6	15,29	1,93	6	40,17	0,43
3 <sup>η</sup>	1	0,52	-13,3	1	14,46	-3,60	1	35,24	-11,90
	2	0,64	6,67	2	14,04	-6,40	2	38,88	-2,80
	3	0,60	0,00	3	13,8	-8,00	3	36,56	-8,60
	4	0,59	-1,67	4	15,33	2,20	4	38,64	-3,40
	5	0,59	-1,67	5	13,49	-10,07	5	38,01	-4,98
	6	0,64	6,67	6	13,35	-11,00	6	40,58	1,45
4 <sup>η</sup>	1	0,61	1,67	1	15,58	3,87	1	41,85	4,63
	2	0,66	10,00	2	14,42	-3,87	2	41,63	4,08
	3	0,65	8,33	3	14,80	-1,33	3	38,92	-2,70
	4	0,64	6,67	4	15,04	0,27	4	39,09	-2,27
	5	0,60	0,00	5	14,37	-4,20	5	38,76	-3,10
	6	0,59	-1,67	6	15,40	2,67	6	40,17	0,43
	Μέση τιμή	0,60	0,70	Μέση τιμή	14,67	-2,19	Μέση τιμή	39,29	-1,77
	SD	0,04		SD	0,71		SD	1,83	
	RSD	6,67		RSD	4,84		RSD	4,66	

**Πίνακας 21:** Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για τη Δ<sup>9</sup> - THC

Ημέρα	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>			QC <sub>3</sub>		
	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)
1 <sup>η</sup>	1	0,59	-1,67	1	14,13	-5,80	1	36,94	-7,65
	2	0,62	3,33	2	13,80	-8,00	2	40,28	0,70
	3	0,61	1,67	3	15,14	0,93	3	36,68	-8,30
	4	0,61	1,67	4	14,28	-4,80	4	40,90	2,25
	5	0,59	-1,67	5	14,42	-3,87	5	37,18	-7,05
	6	0,61	1,67	6	14,11	-5,93	6	37,14	-7,15
2 <sup>η</sup>	1	0,62	3,33	1	14,26	-4,93	1	40,17	0,43
	2	0,61	1,67	2	13,86	-7,60	2	40,03	0,08
	3	0,61	1,67	3	14,06	-6,27	3	37,21	-6,98
	4	0,58	-3,33	4	15,65	4,33	4	37,51	-6,23
	5	0,62	3,33	5	13,93	-7,13	5	36,95	-7,62
	6	0,59	-1,67	6	15,72	4,80	6	36,14	-9,65
3 <sup>η</sup>	1	0,64	6,67	1	15,14	0,93	1	41,80	4,50
	2	0,60	0,00	2	14,72	-1,87	2	40,63	1,58
	3	0,63	5,00	3	15,20	1,33	3	38,30	-4,25
	4	0,58	-3,33	4	14,49	-3,40	4	40,29	0,72
	5	0,59	-1,67	5	14,80	-1,33	5	40,62	1,55
	6	0,60	0,00	6	14,26	-4,93	6	40,19	0,47
4 <sup>η</sup>	1	0,61	1,67	1	15,58	3,87	1	41,23	3,07
	2	0,57	-5,00	2	14,79	-1,40	2	41,50	3,75
	3	0,57	-5,00	3	14,65	-2,33	3	42,15	5,38
	4	0,64	6,67	4	15,64	4,27	4	39,06	-2,35
	5	0,63	5,00	5	14,64	-2,40	5	39,57	-1,08
	6	0,65	8,33	6	15,34	2,27	6	38,36	-4,10
	Μέση τιμή	0,61	1,18	Μέση τιμή	14,69	-2,05	Μέση τιμή	39,20	-2,00
	SD	0,02		SD	0,61		SD	1,86	



	RSD	3,28		RSD	4,15		RSD	4,74	
--	-----	------	--	-----	------	--	-----	------	--

**Πίνακας 22:** Αποτελέσματα ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας και ορθότητας δια των ημερών για το 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC

Ημέρα	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>			QC <sub>3</sub>		
	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)	Δείγμα	Ευρεθείσα συγκέντρωση	Er (%)
1 <sup>η</sup>	1	0,55	-8,33	1	15,45	3,00	1	37,89	-5,28
	2	0,55	-8,33	2	14,21	-5,27	2	40,30	0,75
	3	0,55	-8,33	3	14,82	-1,20	3	36,40	-9,00
	4	0,61	1,67	4	14,85	-1,00	4	37,88	-5,30
	5	0,62	3,33	5	15,33	2,20	5	37,53	-6,18
	6	0,67	11,7	6	15,04	0,27	6	40,29	0,72
2 <sup>η</sup>	1	0,61	1,67	1	15,43	2,87	1	37,50	-6,25
	2	0,58	-3,33	2	15,59	3,93	2	40,94	2,35
	3	0,60	0,00	3	14,15	-5,67	3	37,05	-7,38
	4	0,59	-1,67	4	15,73	4,87	4	37,65	-5,88
	5	0,63	5,00	5	13,71	-8,60	5	41,23	3,07
	6	0,62	3,33	6	14,19	-5,40	6	39,93	-0,18
3 <sup>η</sup>	1	0,55	-8,33	1	15,63	4,20	1	38,00	-5,00
	2	0,54	-10,00	2	14,45	-3,67	2	37,31	-6,72
	3	0,60	0,00	3	14,75	-1,67	3	40,45	1,13
	4	0,60	0,00	4	14,49	-3,40	4	37,35	-6,63
	5	0,65	8,33	5	15,35	2,33	5	40,07	0,18
	6	0,67	11,67	6	14,59	-2,73	6	38,31	-4,22
4 <sup>η</sup>	1	0,62	3,33	1	13,80	-8,00	1	42,35	5,88
	2	0,56	-6,67	2	14,20	-5,33	2	37,42	-6,45
	3	0,60	0,00	3	13,69	-8,73	3	35,10	-12,25
	4	0,56	-6,67	4	15,59	3,93	4	37,03	-7,43
	5	0,57	-5,00	5	14,81	-1,27	5	43,26	8,15
	6	0,58	-3,33	6	15,61	4,07	6	37,49	-6,28

Μέση τιμή	0,60	-0,83	Μέση τιμή	14,81	-1,26	Μέση τιμή	38,70	-3,26
SD	0,04		SD	0,66		SD	2,02	
RSD	6,67		RSD	4,46		RSD	5,22	

## 8.8 Ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Η ορθότητα εντός της ημέρας εκτιμήθηκε στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας με υπολογισμό των % σχετικών σφαλμάτων (%Er) των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας για 4 μέρες.

Τα αποτελέσματα της ορθότητας εντός της ημέρας για τη CBD, τη Δ<sup>9</sup>-THC και το 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC τις 4 μέρες ανάλυσης στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους **Πίνακες 17-19**. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ορθότητα εντός της ημέρας για τις 3 ουσίες ήταν:

- για την CBD: από -6,14% έως 4,17% και για τα τρία QC
- για την Δ<sup>9</sup>-THC: από -5,00% έως 1,95% και για τα τρία QC
- για την 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC: από -4,05% έως 0,83% και για τα τρία QC

Τα αποτελέσματα της ορθότητας δια των ημερών για τους 3 αναλύτες, τις 4 μέρες ανάλυσης στα 3 επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου, παρουσιάζονται αναλυτικά στους **Πίνακες 20-22**. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ορθότητα δια των ημερών για τις 3 ουσίες ήταν:

- για την CBD: 0,70% για το QC<sub>1</sub>, -2,19% για το QC<sub>2</sub> και -1,77% για το QC<sub>3</sub>
- για την Δ<sup>9</sup>-THC: 1,18% για το QC<sub>1</sub>, -2,05% για το QC<sub>2</sub> και -2,00% για το QC<sub>3</sub>
- για την 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC: -0,83% για το QC<sub>1</sub>, -1,26% για το QC<sub>2</sub> και -3,26% για το QC<sub>3</sub>

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



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Μέθοδος προσδιορισμού των κανναβινοειδών στα ούρα

Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε για τον προσδιορισμό των τριών υπό μελέτη ουσιών στο πλάσμα, δοκιμάστηκε και επαληθεύτηκε και για την ανίχνευση αυτών στα ούρα. Η ανάλυση των ούρων απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο πριν την εκχύλιση των δειγμάτων. Στα ούρα οι ουσίες βρίσκονται με τη μορφή γλυκουρονιδίων γι' αυτό κρίνεται σκόπιμη η υδρόλυση και απογλυκουρονιδοποίηση αυτών. Πραγματοποιήθηκαν 2 υδρολύσεις, αλκαλική υδρόλυση για την απογλυκουρονιδοποίηση της 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC και ενζυμική υδρόλυση για την απογλυκουρονιδοποίηση των CBD και  $\Delta^9$ -THC, καθώς έχει παρατηρηθεί πως με την αλκαλική υδρόλυση τα γλυκουρονίδια των CBD και  $\Delta^9$ -THC δεν υδρολύονται πλήρως, ενώ ο μεταβολίτης απογλυκουρονιδιώνεται ικανοποιητικά (Bergamaschi et al., 2013; Kemp et al., 1995).

Το στάδιο της προκατεργασίας που πραγματοποιήθηκε στα δείγματα ούρων μέχρι το στάδιο προσθήκης των δειγμάτων στις στήλες εκχύλισης περιγράφεται παρακάτω. Η διαδικασία της αλκαλικής υδρόλυσης περιλαμβάνει:

1. Παραλαβή 1 mL ούρων και προσθήκη 50  $\mu$ L από τα διαλύματα βαθμονόμησης για τα δείγματα βαθμονόμησης ή από τα διαλύματα ελέγχου ποιότητας για τα δείγματα ελέγχου ποιότητας.
2. Προσθήκη 50  $\mu$ L διαλύματος εσωτερικού προτύπου, συγκέντρωσης 0,3  $\mu$ g/mL και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
3. Προσθήκη 200  $\mu$ L διαλύματος KOH 10 N.
4. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
5. Παραμονή σε κλίβανο στους 50 °C για 15 min.
6. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Ρύθμιση του pH με προσθήκη σταγόνων π. HCl έως pH 4-5.

Η διαδικασία της ενζυμικής υδρόλυσης που ακολουθούσε, περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

8. Προσθήκη 300  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 4,5 και ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
9. Προσθήκη 30  $\mu\text{L}$  (3000 IU)  $\beta$ -γλυκουρονιδάσης από *Helix pomatia*.
10. Ήπια ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
11. Επώαση στους 37  $^{\circ}\text{C}$  για 16 h.
12. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Προσθήκη 5 mL μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 7 και μεθανόλης (95:5 v/v)
14. Ανάδευση σε αναδευτήρα περιδίνισης.
15. Φυγοκέντρωση στις 3000 rpm για 5 min.

Για τα στάδια της εκχύλισης, παραγωγοποίησης και ανάλυσης ακολούθησε η ίδια πορεία με αυτή στην περίπτωση της ανάλυσης πλάσματος.

### **Εκλεκτικότητα**

Έξι διαφορετικά τυφλά δείγματα ούρων κατεργάστηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού CBD,  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC χωρίς την προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου. Δεν παρατηρήθηκε κάποια παρεμπόδιση από κάποια από τα συστατικά των ούρων στους χρόνους ανάλυσης των τριών αναλυτών και των εσωτερικών προτύπων.

### **Ειδικότητα**

Για την μελέτη της ειδικότητας 6 δείγματα ούρων εμβολιάστηκαν με 50  $\mu\text{L}$  από μίγμα μικτού διαλύματος εργασίας 31 διαφορετικών ουσιών συγκέντρωσης 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Το διάλυμα των ουσιών περιείχε διαζεπάμη, αλπραζολάμη, βρωμαζεπάμη, λοραζεπάμη, κουετιαπίνη, ολανζαπίνη, ρισπεριδόνη, σερτραλίνη, παροξετίνη, βενλαφαξίνη, μιρταζαπίνη, μαπροτιλίνη, παρακεταμόλη, σιταλοπράμη, φλουοξετίνη, ζολπιδέμη, αμφεταμίνη, μεθαμφεταμίνη, 3,4-μεθυλενοδιοξυμεθαμφεταμίνη (MDMA), 3,4-μεθυλενοδιοξυαμφεταμίνη (MDA), *N*-μεθυλ-1,3-βενζοδιοξολυλβουταναμίνη (MBDB), 3,4-μεθυλενοδιοξυ-*N*-αιθυλαμφεταμίνη (MDEA), κεταμίνη, βουπρενορφίνη, μεθαδόνη, μορφίνη, κωδεΐνη, 6-μονοακετυλομορφίνη, κοκαΐνη, βενζοϋλοεκγονίνη και μεθυλεστέρας της εκγονίνης. Τα δείγματα κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με την αναπτυχθείσα μέθοδο,

ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν παρεμποδίσεων στους χρόνους ανάσχεσης των υπό μελέτη ουσιών. Δεν παρατηρήθηκε καμία παρεμπόδιση από τις παραπάνω ουσίες στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και των εσωτερικών τους προτύπων.

### **Κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ)**

Τα κατώτατα όρια ανίχνευσης (LOD) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των τριών υπό μελέτη αναλυτών στα ούρα υπολογίστηκαν από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ούρων στο χρόνο της ανάσχεσης, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 3 ( $S/N \geq 3:1$ ).

Τα κατώτατα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) της αναπτυχθείσας μεθόδου προσδιορισμού των τριών υπό μελέτη αναλυτών στα ούρα υπολογίστηκαν από το λόγο της απόκρισης του κάθε αναλύτη προς το θόρυβο τυφλού δείγματος ούρων στο χρόνο της ανάσχεσης, που πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 ( $S/N \geq 10:1$ ).

Το LOD για όλες τις ουσίες στα ούρα ήταν 0,060 ng/mL, ενώ το LOQ 0,20 ng/mL.

### **Γραμμικότητα**

Κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα βαθμονόμησης 7 σημείων που παρουσίασε γραμμική συσχέτιση για την κάθε ουσία. Για την κατασκευή των διαγραμμάτων βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκε συντελεστής βαρύτητας  $1/x^2$ , όπου το  $x$  αντιστοιχεί στην συγκέντρωση του κάθε αναλύτη εκφρασμένη σε ng/mL. Οι εξισώσεις παλινδρόμησης για όλες τις ουσίες ήταν της μορφής  $y=a \cdot x + b$ , όπου:

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

$x$ , η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη, εκφρασμένη σε ng/mL ( $c_{\text{analyte}}$ ).

Οι εξισώσεις παλινδρόμησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 23**. Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση στο εύρος συγκεντρώσεων 0,20-50,00 ng/mL και για τις τρεις ουσίες. Ο συντελεστής προσδιορισμού,  $R^2$ , ήταν εντός αποδεκτών ορίων και για τις τρεις ουσίες ( $R^2 \geq 0,992$ ).

**Πίνακας 23:** Οι εξισώσεις παλινδρόμησης των διαγραμμάτων βαθμονόμησης για τις 3 ουσίες

Ουσία	Εξίσωση διαγράμματος παλινδρόμησης	R <sup>2</sup>
CBD	$y=0,1141 \cdot x - 0,0054$	0,993
$\Delta^9$ -THC	$y=0,0685 \cdot x + 0,0106$	0,992
11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	$y=0,0767 \cdot x + 0,0083$	0,995

### Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας

Η επαναληψιμότητα και η ορθότητα εντός της ημέρας της μεθόδου προσδιορισμού των υπό μελέτη ουσιών στα ούρα εκτιμήθηκαν στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

- 0,60 ng/mL (QC<sub>1</sub>, χαμηλό επίπεδο)
- 15,00 ng/mL (QC<sub>2</sub>, μεσαίο επίπεδο)
- 40,00 ng/mL (QC<sub>3</sub>, υψηλό επίπεδο)

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας και της ορθότητας εντός της ημέρας της μεθόδου στα 3 επίπεδα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα 24**. Οι τιμές της επαναληψιμότητας και της ορθότητας εντός της ημέρας ήταν εντός των αποδεκτών ορίων ( $\pm 15\%$ ) για όλες τις ουσίες.

**Πίνακας 24:** Επαναληψιμότητα και ορθότητα εντός της ημέρας για τις 3 ουσίες στα ούρα

Αναλυτής	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>			QC <sub>3</sub>		
	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)	Ευρεθείσα συγκέντρωση (±SD, n=6)	Επαναληψιμότητα (%RSD)	Ορθότητα εντός της ημέρας (%Er)
CBD	0,62±0,04	6,45	2,50	14,68±0,85	5,79	-2,16	39,01±2,63	6,74	-2,47
Δ <sup>9</sup> -THC	0,61±0,03	4,92	1,11	14,89±0,64	4,30	-0,72	39,90±2,35	5,89	-0,25
11-nor-COOH-Δ <sup>9</sup> -THC	0,61±0,04	6,56	1,94	15,35±0,54	3,50	2,33	40,03±1,59	3,97	0,08





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10: Προσδιορισμός των κανναβινοειδών σε δείγματα ατόμων που λάμβαναν σκεύασμα κανναβιδιόλης

Η μέθοδος προσδιορισμού κανναβιδιόλης,  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης και του μεταβολίτη της που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στο πλάσμα και ελέγχθηκε στα ούρα εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε δείγματα πλάσματος και ούρων ατόμων που λάμβαναν σκευάσματα κανναβιδιόλης. Έτσι, επιβεβαιώθηκε και η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά περιστατικά. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναλύθηκαν συνολικά 58 δείγματα, 38 δείγματα πλάσματος και 20 δείγματα ούρων που ελήφθησαν από 10 άτομα (5 άντρες και 5 γυναίκες) που λάμβαναν προϊόν CBD (έλαιο κανναβιδιόλης) που κυκλοφορεί στο εμπόριο και χορηγείται ως στοματικό διάλυμα απορροφούμενο στη στοματική κοιλότητα. Τα άτομα αυτά λάμβαναν το προϊόν πρωινές ώρες μία φορά την ημέρα (6 σταγόνες) για τουλάχιστον 5 ημέρες.

Το προϊόν CBD που έλαβαν τα άτομα, αφού διαλύθηκε σε εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 7:3 και μετά από τις κατάλληλες αραιώσεις αναλύθηκε σε GC/MS. Από τα αποτελέσματα βρέθηκε πως περιείχε 3,33% (w/w) CBD και 0,14% (w/w)  $\Delta^9$ -THC, περιεκτικότητα. Έτσι, η ημερήσια δόση για την CBD και  $\Delta^9$ -THC ήταν 5,63 mg και 0,24 mg αντίστοιχα.

Στον **Πίνακα 25** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αναλύσεων των βιολογικών δειγμάτων των 10 ατόμων. Δείγματα αίματος ελήφθησαν σε χρόνο 0 (πριν τη λήψη) και 1, 2 και 3 ώρες μετά από τη λήψη του σκευάσματος. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε ειδικά σωληνάρια με αντιπηκτικό και η παραλαβή του πλάσματος από το ολικό αίμα πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση στις 3000 rpm για 15 min και παραλαβή της υπερκείμενης στιβάδας.

Όσον αφορά τα δείγματα των ούρων, πραγματοποιήθηκαν 2 δειγματοληψίες. Έγινε λήψη πρωινών ούρων και μετά από περίπου 3 ώρες μετά τη λήψη του σκευάσματος. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των ούρων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 26**. Η επεξεργασία των δειγμάτων πλάσματος και ούρων πραγματοποιήθηκε την ίδια μέρα.

**Πίνακας 25:** Αποτελέσματα από τα δείγματα πλάσματος που αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού

α/α		Πριν τη λήψη	Μετά από 1 ώρα	Μετά από 2 ώρες	Μετά από 3 ώρες
	Ανιχνευθείσα ουσία	Συγκέντρωση στο πλάσμα (ng/mL)	Συγκέντρωση στο πλάσμα (ng/mL)	Συγκέντρωση στο πλάσμα (ng/mL)	Συγκέντρωση στο πλάσμα (ng/mL)
1	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	0,87
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	0,26	0,26	0,52	1,81
2	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	< LOQ*	0,30	< LOQ*
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	0,58	2,26	2,42	1,97
3	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	< LOQ*	0,63	0,52
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	< LOQ*	< LOQ*
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	0,20	0,28	1,93	1,28
4	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	1,58	1,05	0,28
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	0,45	0,53	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	1,79	0,90	Δεν ανιχνεύτηκε
5	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	0,76	0,34	Δεν ανιχνεύτηκε
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	0,31	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	0,60	1,24	2,44	2,27
6	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	0,49	1,09	0,33
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	0,22	0,28	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	0,53	0,96	0,42
7	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	0,68	1,00	0,27
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	< LOQ*	< LOQ*	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	< LOQ*	0,70	1,17	0,78
8	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	0,53	0,31	< LOQ*
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	0,62	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε

		ανιχνεύτηκε		ανιχνεύτηκε	ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	< LOQ*	< LOQ*	0,58	0,44
9	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	0,20	0,40	-
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	-
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	< LOQ*	0,61	1,03	-
10	CBD	Δεν ανιχνεύτηκε	< LOQ*	< LOQ*	-
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε	-
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	0,23	0,24	0,24	-

< LOQ\* Οι συγκεντρώσεις βρίσκονται ανάμεσα στο LOD (0,060 ng/mL) και στο LOQ (0,20 ng/mL)

- Δεν κατέστη εφικτή η λήψη του δείγματος

**Πίνακας 26:** Αποτελέσματα από τα δείγματα ούρων που αναλύθηκαν με την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιορισμού

α/α		Πρωινά ούρα	Μετά από περίπου 3 ώρες
	Ανιχνευθείσα ουσία	Συγκέντρωση στα ούρα (ng/mL)	Συγκέντρωση στα ούρα (ng/mL)
1	CBD	0,29	4,46
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	1,48	3,92
2	CBD	1,06	76,36
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	1,99	5,09
3	CBD	2,45	4,64
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	1,77	0,69
4	CBD	2,52	14,10
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	3,11	1,74
5	CBD	11,62	61,92
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	9,85	23,06
6	CBD	3,19	96,78
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε

	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	5,90	4,90
7	CBD	1,92	18,12
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	5,82	3,36
8	CBD	1,60	1,88
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	1,40	0,75
9	CBD	10,55	96,59
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	7,25	4,57
10	CBD	9,23	20,01
	$\Delta^9$ -THC	Δεν ανιχνεύτηκε	Δεν ανιχνεύτηκε
	11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC	1,90	3,90

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προκύπτει πως η  $\Delta^9$ -THC δεν ανιχνεύεται σε κανένα δείγμα ούρων ενώ ανιχνεύτηκε στα δείγματα πλάσματος των 6 από τα 10 άτομα. Στα δείγματα πλάσματος η  $\Delta^9$ -THC εμφανίζεται σε μικρές συγκεντρώσεις (εύρος συγκεντρώσεων 0,21 μέχρι 0,62 ng/mL) κυρίως 1 μέχρι 2 ώρες μετά τη λήψη, ενώ σε 4 δείγματα οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται μεταξύ του LOD (0,060 ng/mL) και του LOQ (0,20 ng/mL). Σε κανένα δείγμα πλάσματος που ελήφθη πριν τη λήψη του σκευάσματος δεν ανιχνεύτηκε η ουσία, ενώ μόνο σε μία περίπτωση ανιχνεύτηκε, σε τιμή κάτω από το LOQ, στις 3 ώρες μετά τη λήψη του σκευάσματος. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ της μη συσσώρευσης της ουσίας στον οργανισμό και της γρήγορης βιομετατροπής προς τους μεταβολίτες της, οι δε ευρεθείσες συγκεντρώσεις  $\Delta^9$ -THC (με T<sub>max</sub> 1-2 ώρες) αποδίδονται στην τελευταία λήψη του σκευάσματος.

Αντίθετα με την  $\Delta^9$ -THC, ο μεταβολίτης της **11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC** είναι ανιχνεύσιμος τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα. Στα ούρα ο μεταβολίτης ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0,69 και 23,06 ng/mL, συγκεντρώσεις μεγαλύτερες σε σχέση με αυτές που βρέθηκαν στο πλάσμα. Στο πλάσμα, ο μεταβολίτης ανιχνεύτηκε στην πλειονότητα των δειγμάτων με τις συγκεντρώσεις να κυμαίνονται μεταξύ 0,20 και 2,44 ng/mL (4 δείγματα είχαν τιμή κάτω από το LOQ) ενώ η μέση C<sub>max</sub> ήταν 1,54 ng/mL. Η ανίχνευση του μεταβολίτη στα δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν πριν την τελευταία λήψη του σκευάσματος στα οκτώ από τα δέκα άτομα

συνηγορεί υπέρ της τάσης συνάθροισης της ουσίας στον οργανισμό, ενώ η αυξανόμενη τιμή των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη με την πάροδο του χρόνου (εκτιμώμενο T<sub>max</sub> 2 ώρες) μετά τη λήψη του σκευάσματος οφείλεται στην γρήγορη μετατροπή της Δ<sup>9</sup>-THC προς το μεταβολίτη.

Η **CBD** ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα ούρων και στην πλειοψηφία των δειγμάτων πλάσματος. Ειδικότερα, στα ούρα οι συγκεντρώσεις κυμαίνονταν από 0,26 μέχρι 96,78 ng/mL, ενώ παρατηρείται σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης μετά από 3 ώρες μετά τη λήψη του σκευάσματος σε σύγκριση με τα πρωινά ούρα. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στην γρήγορη απέκκριση της CBD και εξηγείται από το γεγονός ότι στα δείγματα αυτά έχει αρχίσει να απεκκρίνεται και ποσότητα CBD που προέρχεται από την τελευταία λήψη. Η ανίχνευση της CBD σε όλα τα πρωινά ούρα και ταυτόχρονα η μη ανίχνευση της σε κανένα από τα δέκα δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν πριν την τελευταία λήψη του σκευάσματος σημαίνει πιθανότατα συσσώρευση της ουσίας στον οργανισμό αλλά σε μικρό βαθμό που οδηγεί σε συγκεντρώσεις της ουσίας στο πλάσμα κάτω από το LOD της αναπτυχθείσας μεθόδου. Στα δείγματα πλάσματος οι συγκεντρώσεις CBD κυμαίνονταν μεταξύ 0,20 και 1,58 ng/mL (σε 5 δείγματα η τιμή ήταν κάτω από το LOQ). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν μεταξύ 1 και 2 ωρών μετά τη λήψη, με την μέση C<sub>max</sub> να είναι 0,70 ng/mL.

Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της μελέτης, η Δ<sup>9</sup>-THC είναι πιθανό να βρεθεί αν και σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα που βάση νομοθεσίας υποδηλώνει πως το άτομο βρίσκεται υπό την επήρεια κάνναβης. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι ο μεταβολίτης της Δ<sup>9</sup>-THC, 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC, ανιχνεύεται και στα ούρα και στο πλάσμα των ατόμων που έλαβαν μέρος στην μελέτη εγείρουν ερωτήματα και προβληματισμούς δικαστικής φύσεως ως προς την ερμηνεία των απαντήσεων των τοξικολογικών εξετάσεων και αυτό διότι τόσο η Δ<sup>9</sup>-THC όσο και ο μεταβολίτης της αποτελούν δείκτες της παράνομης χρήσης κάνναβης. Για το λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαίο η αναζήτηση νέων δεικτών στα βιολογικά δείγματα που αναλύονται στο πλαίσιο διερεύνησης υποθέσεων δικαστικού και κλινικού ενδιαφέροντος για τον διαχωρισμό των ασθενών που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα κανναβιδιόλης από τους χρήστες παράνομης κάνναβης.



## Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια, η πώληση και χρήση προϊόντων κανναβιδιόλης παρουσιάζει ανοδική τάση τόσο στην Ελλάδα όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο. Η CBD είναι γνωστό πως δεν έχει ψυχότροπες ιδιότητες, σ' αντίθεση με το βασικό συστατικό της κάνναβης, τη Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη που χαρακτηρίζεται από έντονες ψυχοδραστικές ιδιότητες και σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Οι FDA και EMA έχουν ήδη εγκρίνει την κυκλοφορία σκευάσματος που περιέχει CBD για τη διαχείριση κρίσεων που σχετίζονται με δύο σπάνιες αλλά σοβαρές μορφές επιληψίας, ενώ στην Ελλάδα έχει εγκριθεί ένα σκεύασμα που περιέχει Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη και κανναβιδιόλη σε αναλογία 1:1 με ένδειξη την σκλήρυνση κατά πλάκας, το νευροπαθητικό πόνο και τη σπαστικότητα. Παράλληλα, κυκλοφορούν διάφορα σκευάσματα CBD που αποτελούν εκχυλίσματα βιομηχανικής κάνναβης και χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανακούφιση του πόνου, τη βελτίωση του ύπνου και τη μείωση του άγχους. Στα προϊόντα αυτά υπάρχει ως συστατικό και η Δ<sup>9</sup>-THC, υπάρχει όμως αυστηρή νομοθεσία όσον αφορά την περιεκτικότητα της Δ<sup>9</sup>-THC σ' αυτά τα σκευάσματα. Δεδομένου όμως ότι ο νόμος δείχνει μηδενική ανοχή ως προς την παράνομη λήψη κάνναβης κρίνεται απαραίτητο να γίνει διερεύνηση για το αν οι συγκεντρώσεις της Δ<sup>9</sup>-THC στα προϊόντα κανναβιδιόλης είναι ικανές να οδηγήσουν στην ανίχνευση της ίδιας της ουσίας ή του μεταβολίτη της 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC στα βιολογικά υλικά των ατόμων που λαμβάνουν θεραπευτικά τα προϊόντα αυτά. Σε μια τέτοια περίπτωση δημιουργείται το πρόβλημα παρερμηνείας των αποτελεσμάτων μιας τοξικολογικής εξέτασης καθώς δεν είναι εύκολο να διαχωριστεί αν η παρουσία Δ<sup>9</sup>-THC ή του μεταβολίτη της στα βιολογικά υλικά προέρχεται από παράνομη χρήση κάνναβης ή λήψη νόμιμου σκευάσματος που περιέχει ως κύριο συστατικό την CBD.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας ήταν η αναζήτηση των Δ<sup>9</sup>-THC, 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC στο πλάσμα και τα ούρα ατόμων που λάμβαναν προϊόντα κανναβιδιόλης. Για το λόγο αυτό ήταν απαραίτητο η ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού των ουσιών τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα που να συνδυάζουν υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια, εκλεκτικότητα, χαμηλό κόστος και σύντομο χρόνο ανάλυσης.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό της Δ<sup>9</sup>-THC, του μεταβολίτη της, 11-nor-COOH-Δ<sup>9</sup>-THC, καθώς και της CBD στο πλάσμα χρησιμοποιώντας την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρίας μάζας (GC/MS), η οποία



αποτελεί μία από τις βασικές αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιείται στα τοξικολογικά εργαστήρια παγκοσμίως.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε περιλαμβάνει καταβύθιση των πρωτεϊνών του πλάσματος με ακετονιτρίλιο και απομόνωση των υπό μελέτη ουσιών από το πλάσμα μέσω εκχύλισης στερεάς φάσης, χρησιμοποιώντας στήλες Bond Elut LRC Certify II. Μετά την εκχύλιση των ουσιών ακολούθησε η παραγωγοποίηση τους με BSTFA με 1% TMCS σε θερμοκρασία 70 °C για 30 min, με σκοπό την αύξηση της πτητικότητας των ουσιών που διαθέτουν λειτουργικές ομάδες και τη βελτιστοποίηση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς τους με απώτερο σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου και τέλος η ένεση τους στο GC/MS.

Η μέθοδος ελέγχθηκε ως προς την εκλεκτικότητα, την ειδικότητα, τη γραμμικότητα, την επαναληψιμότητα, την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, την ορθότητα εντός και δια των ημερών και τέλος την ανάκτηση, δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα. Επίσης, η ίδια μέθοδος δοκιμάστηκε και επαληθεύτηκε και στην ανάλυση ούρων για τις τρεις υπό μελέτη ουσίες της παρούσας εργασίας.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε διαθέτει:

- κοινή μέθοδο παραγωγοποίησης και για τους τρεις αναλύτες
- επικύρωσή της σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες
- χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης και συνεπώς υψηλή ευαισθησία (το LOQ ήταν 0,2 ng/mL για όλες τις ουσίες)
- μεγάλο δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων των αναλυτών (0,2 – 50,0 ng/mL)
- υψηλή ανάκτηση ( $\geq 91,7\%$  για όλες τις ουσίες)
- υψηλή γραμμικότητα ( $R^2 \geq 0,990$  για όλες τις ουσίες)
- υψηλή επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα
- υψηλή ορθότητα εντός της ημέρας και δια των ημερών

Σε σύγκριση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους που χρησιμοποιούν αεριοχρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματογραφία μαζών για τον προσδιορισμό CBD,  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC σε βιολογικά υλικά, η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί στα εξής:

- Επιτυγχάνει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της  $\Delta^9$ -THC και του μεταβολίτη της, καθώς και της CBD, σε αντίθεση με τις περισσότερες μεθόδους οι οποίες περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό κυρίως της  $\Delta^9$ -THC και του μεταβολίτη της (Castro et al., 2018; Gasse et al., 2016)

- Καλύπτει ένα δυναμικό εύρος συγκεντρώσεων μεγαλύτερο από άλλες δημοσιευμένες μεθόδους (Nadulski and Pragst, 2007; Nadulski et al., 2005)
- Έχει χαμηλά όρια ανίχνευσης ή/και ποσοτικοποίησης σε σχέση με άλλες μεθόδους άρα και υψηλότερη ευαισθησία (Abraham et al., 2007; Castro et al., 2018; Gustafson et al., 2003; Nadulski and Pragst, 2007)
- Έχει επικυρωθεί πλήρως σ' αντίθεση με άλλες δημοσιευμένες μεθόδους (Nadulski et al., 2005)
- Η ίδια μέθοδος δοκιμάστηκε και επαληθεύτηκε και σε ένα δεύτερο βιολογικό υλικό εκτός του πλάσματος (ούρα), σε αντίθεση με άλλες μεθόδους που αναφέρονται σε ένα μόνο βιολογικό υλικό (Gasse et al., 2016)

Η αναπτυχθείσα μέθοδος εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε δείγματα πλάσματος και ούρων από δέκα άτομα που λάμβαναν σκεύασμα κανναβιδιόλης για τουλάχιστον πέντε ημέρες με περιεκτικότητα 3,33% (w/w) CBD και 0,14% (w/w)  $\Delta^9$ -THC. Ελέχθησαν δείγματα αίματος που ελήφθησαν σε χρόνο 0 (πριν τη λήψη) και 1, 2 και 3 ώρες μετά την λήψη του σκευάσματος, ενώ τα δείγματα ούρων αποτελούνταν από πρωινά ούρα και ούρα μετά από περίπου 3 ώρες από τη λήψη.

Σε κανένα δείγμα ούρων δεν ανιχνεύτηκε η δραστική  $\Delta^9$ -THC, ενώ εμφανίστηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις (μέχρι 0,62 ng/mL) σε δείγματα πλάσματος των έξι από τα δέκα άτομα κυρίως στη μία και δύο ώρες μετά τη λήψη του σκευάσματος. Η  $\Delta^9$ -THC δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα δείγμα πλάσματος που ελήφθη πριν τη λήψη του σκευάσματος κάτι που υποδηλώνει μη συσσώρευση της ουσίας στον οργανισμό και γρήγορη βιομετατροπή προς τους μεταβολίτες της, ενώ οι ευρεθείσες συγκεντρώσεις  $\Delta^9$ -THC (με T<sub>max</sub> 1-2 ώρες) αποδίδονται στην τελευταία λήψη του σκευάσματος.

Ο ανενεργός μεταβολίτης της  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, βρέθηκε τόσο στο πλάσμα όσο και στα ούρα. Ο μεταβολίτης ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα ούρων σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες σε σχέση με τα δείγματα πλάσματος στα οποία βρέθηκε, ενώ στο πλάσμα ανιχνεύτηκε στην πλειονότητα των δειγμάτων. Η ανίχνευση του μεταβολίτη στα δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν πριν την τελευταία λήψη του σκευάσματος στα οκτώ από τα δέκα άτομα συνηγορεί υπέρ της τάσης συνάθροισης της ουσίας στον οργανισμό. Η αυξανόμενη τιμή των συγκεντρώσεων του μεταβολίτη με την πάροδο του χρόνου (εκτιμώμενο T<sub>max</sub> 2 ώρες) μετά τη λήψη του σκευάσματος οφείλεται στην γρήγορη μετατροπή της  $\Delta^9$ -THC προς το μεταβολίτη αυτό. Αποτελεί σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής το γεγονός ότι στα ούρα και των δέκα ατόμων καθώς και στα δείγματα πλάσματος των

οκτώ από τα δέκα άτομα που έλαβαν το σκεύασμα κανναβιδιόλης ο μεταβολίτης ανιχνεύεται καθ' όλη τη διάρκεια ενός 24ώρου.

Η CBD ανιχνεύτηκε στα περισσότερα δείγματα πλάσματος σε χαμηλές συγκεντρώσεις και σε όλα τα δείγματα ούρων. Στα δείγματα ούρων που ελήφθησαν 3 ώρες μετά τη λήψη παρουσιάζεται σε αυξημένη συγκέντρωση σε σχέση με τα πρωινά ούρα, γεγονός που οφείλεται στην γρήγορη απέκκριση της CBD και εξηγείται από το γεγονός ότι στα δείγματα αυτά έχει αρχίσει να απεκκρίνεται και ποσότητα CBD που προέρχεται από την τελευταία λήψη. Η ανίχνευση της CBD στα πρωινά ούρα και των δέκα ατόμων δηλώνει πιθανότατα συσσώρευση της ουσίας στον οργανισμό. Από την άλλη η μη ανίχνευσή της σε κανένα από τα δέκα δείγματα πλάσματος που ελήφθησαν πριν την τελευταία λήψη του σκευάσματος σημαίνει ότι βρίσκεται στο πλάσμα σε συγκεντρώσεις κάτω από το LOD της αναπτυχθείσας μεθόδου.

Στην επιστημονική βιβλιογραφία υπάρχουν λίγες μελέτες που σχετίζονται με τον προσδιορισμό των φυτοκανναβινοειδών στα βιολογικά δείγματα ατόμων που έλαβαν νόμιμα προϊόντα κάνναβης. Οι περισσότερες μελέτες αφορούν λήψη μέσω ατμίσματος προϊόντων κάνναβης πλούσια σε CBD (Busardò et al., 2021; Gerace et al., 2021; Pacifici et al., 2020; Spindle et al., 2020b, 2020a), ενώ υπάρχουν επίσης έρευνες στις οποίες πραγματοποιείται από του στόματος πρόσληψη καθαρής CBD (Spindle et al., 2020b, 2020a), εκχύλισμα κάνναβης πλούσιο σε CBD (Wang et al., 2020a, 2020b), έλαιο ή υπογλώσσιο δισκίο (Hosseini et al., 2020). Επίσης, τα φυτοκανναβινοειδή έχουν προσδιοριστεί και σε περιπτώσεις λήψης των εγκεκριμένων από το FDA σκευασμάτων, του Epidiolex (Taylor et al., 2018) και του Sativex (Hosseini et al., 2020; Indorato et al., 2016). Οι μελέτες αυτές επικεντρώνονται στο φαρμακοκινητικό προφίλ των φυτοκανναβινοειδών, αξιολογώντας παραμέτρους που μπορεί να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα αυτών και την επίδραση τους σε ζωτικές λειτουργίες.

Σε μία μελέτη των Spindle et al. ασχολήθηκαν με την ανίχνευση του 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στα ούρα εθελοντών που είτε έλαβαν 100 mg καθαρής CBD μέσω ατμίσματος ή από του στόματος, είτε έλαβαν προϊόν κάνναβης πλούσιο σε CBD (100 mg CBD, 3,7 mg  $\Delta^9$ -THC) μέσω ατμίσματος. Και στις δύο περιπτώσεις λήψης καθαρής CBD ο μεταβολίτης της  $\Delta^9$ -THC στα ούρα δεν ανιχνεύτηκε με όριο ευαισθησίας της μεθόδου τα 15 ng/mL. Αντιθέτως, στις περιπτώσεις ατμίσματος προϊόντος κάνναβης πλούσιο σε CBD, η 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC ανιχνεύτηκε στα ούρα και κυμάνθηκε μεταξύ 1,2 έως 29,9 ng/mL, ενώ σε 2 από τις 6 περιπτώσεις ανιχνεύτηκε σε συγκεντρώσεις άνω του ορίου των 15 ng/mL στις 4-6 και 6-8 ώρες μετά τη λήψη (Spindle et al., 2020a). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία

με τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής εργασίας όσον αφορά την ανίχνευση του μεταβολίτη στα ούρα των εθελοντών. Σε άλλη μελέτη των Spindle et al., η οποία εστίασε στις φαρμακοδυναμικές επιδράσεις μετά από λήψη από του στόματος 100 mg CBD και μετά από άτμισμα 100 mg καθαρής CBD και κάνναβης όπου υπερισχύει η CBD (100 mg CBD & 3,7 mg  $\Delta^9$ -THC), η μέγιστη συγκέντρωση της CBD στο αίμα ήταν 11,1, 104,6 και 181,4 ng/mL, αντίστοιχα. Στο αίμα ανιχνεύτηκε και  $\Delta^9$ -THC με τη μέγιστη συγκέντρωση της να είναι 6,2 ng/mL όταν χορηγήθηκαν 3,7 mg  $\Delta^9$ -THC μέσω ατμίματος. Η μέγιστη συγκέντρωση στις περιπτώσεις λήψης μέσω ατμίματος τη  $\Delta^9$ -THC παρατηρήθηκε στη μία ώρα μετά τη λήψη (Spindle et al., 2020b). Αν και στη μελέτη αυτή ακολουθήθηκε διαφορετική οδός λήψης του προϊόντος κάνναβης, τα αποτελέσματα όσον αφορά την  $T_{max}$  για την  $\Delta^9$ -THC ακολουθούν τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής μελέτης, οι δε διαφοροποίηση στις μέγιστες συγκεντρώσεις στο αίμα οφείλεται στη διαφορετική ποσότητα της ληφθείσας  $\Delta^9$ -THC στο σκεύασμα χορήγησης.

Επίσης, σε άλλη μελέτη μετά από μια περίοδο καπνίσματος 26 ημερών 250 mg πλούσιας σε CBD κάνναβης ανά ημέρα (6% CBD, 0,2%  $\Delta^9$ -THC), το 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC ήταν ανιχνεύσιμο στα ούρα μέχρι και οκτώ ημέρες μετά τη διακοπή, στο στοματικό υγρό η  $\Delta^9$ -THC ανιχνεύτηκε έως και 3 ώρες μετά την πρόσληψη κάνναβης, ενώ δεν ανιχνεύτηκε ούτε η  $\Delta^9$ -THC ούτε ο μεταβολίτης της στις τρίχες μία εβδομάδα μετά το τέλος της μελέτης (Gerace et al., 2021). Επίσης, μια ελβετική μελέτη των Meier et al. ασχολήθηκε με τις συγκεντρώσεις των φυτοκανναβινοειδών στο αίμα και στα ούρα μετά από το κάπνισμα προϊόντος CBD (34 mg CBD, 1,6 mg  $\Delta^9$ -THC), 2 φορές την ημέρα για 10 συνεχόμενες ημέρες. Η  $\Delta^9$ -THC ανιχνεύτηκε στο αίμα, ενώ οι μέγιστες συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC και της CBD στο αίμα παρατηρήθηκαν 15 λεπτά μετά το τελευταίο κάπνισμα και κυμάνθηκαν στα 4,5 ng/mL και 82,6 ng/mL, αντίστοιχα. Στα ούρα η CBD ανιχνεύτηκε σε όλα τα δείγματα, ενώ η  $\Delta^9$ -THC σε κανένα. Αντίθετα, ο μεταβολίτης της βρέθηκε στα ούρα με μέγιστη συγκέντρωση 42,5 ng/mL (Meier et al., 2018). Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν με τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής εργασίας όσον αφορά την ανίχνευση του CBD και 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC σε όλα τα δείγματα ούρων, την ανίχνευση της  $\Delta^9$ -THC στο αίμα και την απουσία της στα δείγματα ούρων.

Στην μελέτη των Pacifici et al. όπου εξετάστηκαν άτομα που κάπνιζαν ελαφριά κάνναβη που περιείχε 1,6 mg  $\Delta^9$ -THC οι μέγιστες συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC και της CBD στο αίμα και στο στοματικό υγρό ανιχνεύτηκαν μισή ώρα μετά τη λήψη. Στο αίμα η μέση μέγιστη συγκέντρωση της  $\Delta^9$ -THC ήταν 9,2 ng/mL μετά από ένα τσιγάρο (1,6 mg  $\Delta^9$ -THC) και 15,6 ng/mL μετά από τέσσερα τσιγάρα (6,4 mg  $\Delta^9$ -THC). Στο στοματικό υγρό η μέγιστη

συγκέντρωση της  $\Delta^9$ -THC ήταν 9,2 ng/mL μετά από ένα τσιγάρο και 17,6 ng/mL μετά από τέσσερα τσιγάρα, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση της CBD ήταν 22,0 ng/mL μετά από ένα τσιγάρο και 26,8 ng/mL μετά από τέσσερα τσιγάρα. Στα ούρα η 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC ανιχνεύτηκε σε όλους τους καπνιστές 8 ώρες από την έναρξη του πειράματος μετά το κάπνισμα ενός τσιγάρου, ενώ μετά το κάπνισμα τεσσάρων ήταν μετρήσιμη 3 ώρες μετά τη λήψη με τη μέγιστη συγκέντρωση της τάξης των 1,4 ng/mL να εμφανίζεται σε 8 ώρες (Pacifichi et al., 2020).

Οι Busardo et al. μελέτησαν ασθενείς που έλαβαν μέσω ατμίσματος ιατρική κάνναβη που περιείχε 6 mg ολικού  $\Delta^9$ -THC ( $\Delta^9$ -THC +  $\Delta^9$ -THCA) και 8 mg ολικού CBD (CBD + CBDA). Στο στοματικό υγρό οι μέγιστες συγκεντρώσεις των  $\Delta^9$ -THC και CBD βρέθηκαν 0,67 ώρες μετά τη λήψη και ήταν 1,29 ng/mL για τη  $\Delta^9$ -THC και 3,27 ng/mL για CBD. Στον ορό οι μέγιστες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν 1,7 ώρες και ήταν 24,92 ng/mL για τη  $\Delta^9$ -THC και 93,17 ng/mL για CBD. Η 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC ανιχνεύτηκε στον ορό μισή ώρα μετά τη λήψη στη μέγιστη συγκέντρωση των 12,08 ng/mL (Busardò et al., 2021).

Σε μια έρευνα των Hosseini et al. κατά την οποία μελετήθηκε η φαρμακοκινητική της CBD μετά τη λήψη διαφορετικών σκευασμάτων χορηγήθηκε CBD από του στόματος υπό τη μορφή διαλύματος ελαίου (50 mg CBD), σπρέι που περιέχει CBD και  $\Delta^9$ -THC σε αναλογία 1:1 (nabiximols - 20 mg CBD & 21,6 mg  $\Delta^9$ -THC) και υπό τη μορφή υπογλώσσιου δισκίου (25 ή 50 mg CBD), με τις μέγιστες συγκεντρώσεις της CBD να παρατηρούνται 4-5 ώρες μετά τη λήψη, πιθανώς λόγω βραδείας απορρόφησης από το στοματικό βλεννογόνο. Όταν χορηγήθηκαν 25 mg CBD ως υπογλώσσιο δισκίο ή ως nabiximols, η μέγιστη συγκέντρωση της CBD ήταν 9,1 και 4,6 ng/mL, αντίστοιχα, ενώ όταν χορηγήθηκε υψηλότερη δόση της τάξης των 50 mg ως υπογλώσσιο δισκίο ή έλαιο, η μέγιστη συγκέντρωση της CBD ήταν 15 και 14 ng / mL, αντίστοιχα. Η  $\Delta^9$ -THC στη μελέτη αυτή δεν ήταν ανιχνεύσιμη στο πλάσμα μετά τη λήψη των σκευασμάτων CBD εν αντιθέσει με τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής εργασίας που η  $\Delta^9$ -THC ανιχνεύτηκε 2 ώρες μετά τη χορήγηση (Hosseini et al., 2020). Σε παιδιατρικούς ασθενείς που έλαβαν από του στόματος διαφορετικής περιεκτικότητας εκχυλίσματα κάνναβης πλούσια σε CBD, η  $\Delta^9$ -THC και η CBD ανιχνεύτηκαν στο πλάσμα με τις μέγιστες συγκεντρώσεις να ανιχνεύονται 2 ώρες μετά τη λήψη. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC στο πλάσμα κυμάνθηκαν από 0,8 έως 3,6 ng/mL και της CBD από 2,0 έως 112,7 ng/mL (Wang et al., 2020a, 2020b), αποτελέσματα που είναι παρόμοια με της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Σε μια έρευνα των Indorato et al., εξετάστηκαν βιολογικά υλικά ασθενών που έλαβαν το σκεύασμα Sativex με δοσολογικό σχήμα μια εισπνοή από του στόματος 6 φορές/ημέρα. Οι συγκεντρώσεις της  $\Delta^9$ -THC στο αίμα 15 λεπτά μετά από μία εισπνοή του σκευάσματος κυμάνθηκαν από 0,21 ng/mL έως 1,24 ng/mL, ενώ σε μία περίπτωση μετά από 30 λεπτά ήταν 1,34 ng/mL. Ο μεταβολίτης της  $\Delta^9$ -THC ανιχνεύτηκε σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 25 ng/mL στα ούρα σε όλους τους ασθενείς (Indorato et al., 2016). Προηγούμενη μελέτη των Stott et al. περιλάμβανε τη χορήγηση από του στόματος σπρέι με 2,7 mg  $\Delta^9$ -THC και 2,5 mg CBD. Η μέγιστη συγκέντρωση της  $\Delta^9$ -THC ήταν 5,40 ng/mL και βρέθηκε μία ώρα μετά τη λήψη μονής δόσης 21,6 mg  $\Delta^9$ -THC, ενώ μετά από πολλαπλές δόσεις ήταν 6,90 ng/mL και βρέθηκε τρεις ώρες μετά. Η μέγιστη συγκέντρωση της CBD ήταν 2,17 ng/mL και βρέθηκε μία ώρα μετά τη λήψη μονής δόσης 20 mg CBD, ενώ μετά από πολλαπλές δόσεις ήταν 3,22 ng/mL και βρέθηκε δύο ώρες μετά. (Stott et al., 2013). Επιπροσθέτως, οι Taylor et al. μελέτησαν τη φαρμακοκινητική της CBD μετά από λήψη του σκευάσματος Epidiolex. Η μέγιστη συγκέντρωση της CBD βρέθηκε 4-5 ώρες μετά την από του στόματος λήψη και εξαρτήθηκε από το δοσολογικό σχήμα που χορηγήθηκε (Taylor et al., 2018).

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι πολλά από τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής μελέτης είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα των προηγούμενων δημοσιευμένων μελετών μολονότι έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικές δόσεις και διαφορετικοί τρόποι χορήγησης των σκευασμάτων. Επίσης στη μοναδική μελέτη όπου εξετάστηκε έλαιο CBD, η χορηγούμενη δόση περιείχε 50 mg CBD, μια δόση πολύ υψηλότερη από αυτή που χορηγήθηκε στη παρούσα μελέτη (5,63 mg).

Επίσης, αξίζει να αναφερθεί πως κυκλοφορούν στην αγορά προϊόντα κανναβιδιόλης, που όπως έχει αποδειχθεί σε έρευνες που διεξήχθησαν, αναγράφουν λανθασμένα στοιχεία στις ετικέτες τους ως προς την περιεκτικότητα της CBD αλλά και της  $\Delta^9$ -THC. Σε πολλά σκευάσματα η περιεκτικότητα σε  $\Delta^9$ -THC ήταν μεγαλύτερη του επιτρεπόμενου ορίου, με αποτέλεσμα την πιθανή εμφάνιση ανεπιθύμητων ενεργειών εξαιτίας της  $\Delta^9$ -THC αλλά και την εμφάνιση της ίδιας ή του μεταβολίτη της στα βιολογικά υλικά σε περίπτωση τοξικολογικής ανάλυσης (Bonn-Miller et al., 2017).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας σε συνδυασμό με αυτά άλλων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, προκύπτει το συμπέρασμα πως μπορεί να υπάρξει παρερμηνεία στην αξιολόγηση των θετικών αποτελεσμάτων μιας τοξικολογικής εξέτασης για το 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στο πλάσμα και τα ούρα, καθώς και για την  $\Delta^9$ -THC στο αίμα μετά από 1-3 ώρες μετά τη λήψη σκευασμάτων κανναβιδιόλης. Η  $\Delta^9$ -THC είναι πιθανό να βρεθεί αν και σε

χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι ο μεταβολίτης της  $\Delta^9$ -THC, 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC, ανιχνεύεται και στα ούρα και στο πλάσμα των ατόμων που έλαβαν μέρος στην μελέτη εγείρουν ερωτήματα και προβληματισμούς δικαστικής φύσεως ως προς την ερμηνεία των απαντήσεων των τοξικολογικών εξετάσεων και αυτό διότι τόσο η  $\Delta^9$ -THC όσο και ο μεταβολίτης της αποτελούν δείκτες της παράνομης χρήσης κάνναβης. Δημιουργείται το ζήτημα ότι άτομα που λαμβάνουν νόμιμα προϊόντα κανναβιδιόλης ενδέχεται να έρθουν αντιμέτωποι με το νόμο λόγω κατηγορίας για παράνομη χρήση κάνναβης, καθώς η ελληνική νομοθεσία δείχνει μηδενική ανοχή ως προς την χρήση παράνομης κάνναβης και την οδήγηση υπό την επήρεια καννάβης. Η ανίχνευση  $\Delta^9$ -THC στο αίμα καταδεικνύει πως το άτομο βρίσκεται υπό την επήρεια κάνναβης ενώ η ανίχνευση του μεταβολίτη της, του 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στο πλάσμα/αίμα και στα ούρα υποδηλώνει πως το άτομο είναι ή έχει υπάρξει χρήστης κάνναβης.

Τα παραπάνω, λοιπόν, υποδεικνύουν πως εκτός από τον ενδεδειγμένο έλεγχο των προϊόντων κανναβιδιόλης που κυκλοφορούν στην αγορά ως προς την παρουσία της επιτρεπτής ποσότητας  $\Delta^9$ -THC, υπάρχει έντονη ανάγκη πιθανής θέσπισης ορίων για την  $\Delta^9$ -THC και το μεταβολίτη της 11-nor-COOH- $\Delta^9$ -THC στα βιολογικά υλικά αλλά και την αναζήτηση νέων δεικτών στα βιολογικά υλικά που αναλύονται στο πλαίσιο διερεύνησης υποθέσεων δικαστικού και κλινικού ενδιαφέροντος για τον διαχωρισμό των ασθενών που λαμβάνουν κάποιο σκεύασμα κανναβιδιόλης από τους χρήστες παράνομης. Ωστόσο είναι απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη και διεξαγωγή εκτενέστερων ερευνών που να περιλαμβάνει μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ακόμη και εναλλακτικών βιολογικών υλικών όπως ο σίελος, και σκευάσματα ποικίλων περιεκτικοτήτων κανναβιδιόλης καθώς επίσης και την ανάλυση δειγμάτων που προέρχονται από χρήστες παράνομης κάνναβης για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων.

## Βιβλιογραφία

- Abraham, T.T., Lowe, R.H., Pirnay, S.O., Darwin, W.D., and Huestis, M.A. (2007). Simultaneous GC-EI-MS determination of Delta9-tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-Delta9-tetrahydrocannabinol, and 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in human urine following tandem enzyme-alkaline hydrolysis. *J Anal Toxicol* *31*, 477–485.
- Aizpurua-Olaizola, O., Zarandona, I., Ortiz, L., Navarro, P., Etxebarria, N., and Usobiaga, A. (2017). Simultaneous quantification of major cannabinoids and metabolites in human urine and plasma by HPLC-MS/MS and enzyme-alkaline hydrolysis: Simultaneous quantification of major cannabinoids and metabolites in human urine and plasma. *Drug Test. Analysis* *9*, 626–633.
- Andersson, M., Scheidweiler, K.B., Sempio, C., Barnes, A.J., and Huestis, M.A. (2016). Simultaneous quantification of 11 cannabinoids and metabolites in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry using WAX-S tips. *Anal Bioanal Chem* *408*, 6461–6471.
- Andrenyak, D.M., Moody, D.E., Slawson, M.H., O’Leary, D.S., and Haney, M. (2017). Determination of  $\Delta$ -9-Tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, 11-nor-9-carboxy-THC and Cannabidiol in Human Plasma using Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* *41*, 136–141.
- Andrews, R., and Paterson, S. (2012). A validated method for the analysis of cannabinoids in post-mortem blood using liquid–liquid extraction and two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry. *Forensic Science International* *222*, 111–117.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., Smith, E., and Rahman, M.M. (2008). Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: A Structure–Activity Study. *J. Nat. Prod.* *71*, 1427–1430.
- Aviello, G., Romano, B., Borrelli, F., Capasso, R., Gallo, L., Piscitelli, F., Di Marzo, V., and Izzo, A.A. (2012). Chemopreventive effect of the non-psychoactive phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *J Mol Med* *90*, 925–934.
- Baek, S.H., Kim, Y.O., Kwag, J.S., Choi, K.E., Jung, W.Y., and Han, D.S. (1998). Boron trifluoride etherate on silica-A modified lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Arch. Pharm. Res.* *21*, 353–356.
- Banerjee, S.P., Snyder, S.H., and Mechoulam, R. (1975). Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *194*, 74–81.
- Barann, M., Molderings, G., Brüss, M., Bönisch, H., Urban, B.W., and Göthert, M. (2002). Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *British Journal of Pharmacology* *137*, 589–596.
- Bergamaschi, M.M., Barnes, A., Queiroz, R.H.C., Hurd, Y.L., and Huestis, M.A. (2013). Impact of enzymatic and alkaline hydrolysis on CBD concentration in urine. *Anal Bioanal Chem* *405*, 4679–4689.
- Bisogno, T., Hanuš, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., and Di Marzo, V. (2001). Molecular targets for cannabidiol



and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British Journal of Pharmacology* 134, 845–852.

Bolognini, D., Rock, E., Cluny, N., Cascio, M., Limebeer, C., Duncan, M., Stott, C., Javid, F., Parker, L., and Pertwee, R. (2013). Cannabidiolic acid prevents vomiting in *Suncus murinus* and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: CBDA, 5-HT<sub>1A</sub> receptor, emesis and nausea. *Br J Pharmacol* 168, 1456–1470.

Bonini, S.A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., and Mastinu, A. (2018). Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology* 227, 300–315.

Bonn-Miller, M.O., Loflin, M.J.E., Thomas, B.F., Marcu, J.P., Hyke, T., and Vandrey, R. (2017). Labeling Accuracy of Cannabidiol Extracts Sold Online. *JAMA* 318, 1708.

Borrelli, F., Aviello, G., Romano, B., Orlando, P., Capasso, R., Maiello, F., Guadagno, F., Petrosino, S., Capasso, F., Di Marzo, V., et al. (2009). Cannabidiol, a safe and non-psychoactive ingredient of the marijuana plant *Cannabis sativa*, is protective in a murine model of colitis. *J Mol Med* 87, 1111–1121.

Bozzi, Y., Casarosa, S., and Caleo, M. (2012). Epilepsy as a Neurodevelopmental Disorder. *Front. Psychiatry* 3.

Busardò, F.P., Pérez-Acevedo, A.P., Pacifici, R., Mannocchi, G., Gottardi, M., Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Martín, S., Poyatos, L., Pichini, S., et al. (2021). Disposition of Phytocannabinoids, Their Acidic Precursors and Their Metabolites in Biological Matrices of Healthy Individuals Treated with Vaporized Medical Cannabis. *Pharmaceuticals (Basel)* 14.

Candore, G., Bulati, M., Caruso, C., Castiglia, L., Colonna-Romano, G., Di Bona, D., Duro, G., Lio, D., Matranga, D., Pellicanò, M., et al. (2010). Inflammation, Cytokines, Immune Response, Apolipoprotein E, Cholesterol, and Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Therapeutic Implications. *Rejuvenation Research* 13, 301–313.

Carrier, E.J., Auchampach, J.A., and Hillard, C.J. (2006). Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: A mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 7895–7900.

Cascio, M.G., and Pertwee, R.G. (2014). Known Pharmacological Actions of Nine Nonpsychoactive Phytocannabinoids. In *Handbook of Cannabis*, R. Pertwee, ed. (Oxford University Press), pp. 137–156.

Castro, A.L., Tarelho, S., Melo, P., and Franco, J.M. (2018). A fast and reliable method for quantitation of THC and its 2 main metabolites in whole blood by GC–MS/MS (TQD). *Forensic Science International* 289, 344–351.

Cawthore, M., Wargent, E., Zaibi, M., Stott, C., and Wright, S. (2007). The CB1 antagonist, delta-9-tetrahydrocannabivarin (THCV) has anti-obesity activity in dietary-induced obese (DIO) mice. 141.

Chagas, M.H.N., Eckeli, A.L., Zuardi, A.W., Pena-Pereira, M.A., Sobreira-Neto, M.A., Sobreira, E.T., Camilo, M.R., Bergamaschi, M.M., Schenck, C.H., Hallak, J.E.C., et al. (2014a). Cannabidiol can improve complex sleep-related behaviours associated with rapid eye

movement sleep behaviour disorder in Parkinson's disease patients: a case series. *J Clin Pharm Ther* 39, 564–566.

Chagas, M.H.N., Zuardi, A.W., Tumas, V., Pena-Pereira, M.A., Sobreira, E.T., Bergamaschi, M.M., dos Santos, A.C., Teixeira, A.L., Hallak, J.E., and Crippa, J.A.S. (2014b). Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: An exploratory double-blind trial. *J Psychopharmacol* 28, 1088–1098.

Costa, B., Trovato, A.E., Comelli, F., Giagnoni, G., and Colleoni, M. (2007). The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *European Journal of Pharmacology* 556, 75–83.

Crippa, J.A.S., Zuardi, A.W., Hallak, J.E.C., Miyazawa, B., Bernardo, S.A., Donaduzzi, C.M., Guzzi, S., Favreto, W.A.J., Campos, A., Queiroz, M.E.C., et al. (2020). Oral Cannabidiol Does Not Convert to  $\Delta^8$ -THC or  $\Delta^9$ -THC in Humans: A Pharmacokinetic Study in Healthy Subjects. *Cannabis and Cannabinoid Research* 5, 89–98.

De Petrocellis, L., Ligresti, A., Moriello, A.S., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., and Di Marzo, V. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched *Cannabis* extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes: Novel pharmacology of minor plant cannabinoids. *British Journal of Pharmacology* 163, 1479–1494.

DeLong, G.T., Wolf, C.E., Poklis, A., and Lichtman, A.H. (2010). Pharmacological evaluation of the natural constituent of *Cannabis sativa*, cannabichromene and its modulation by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence* 112, 126–133.

Desrosiers, N.A., Scheidweiler, K.B., and Huestis, M.A. (2015). Quantification of six cannabinoids and metabolites in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Quantification of cannabinoids in oral fluid. *Drug Test. Analysis* 7, 684–694.

Devinsky, O., Marsh, E., Friedman, D., Thiele, E., Laux, L., Sullivan, J., Miller, I., Flamini, R., Wilfong, A., Filloux, F., et al. (2016). Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *The Lancet Neurology* 15, 270–278.

Devinsky, O., Cross, J.H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., Scheffer, I.E., Thiele, E.A., and Wright, S. (2017). Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N Engl J Med* 376, 2011–2020.

Dulaurent, S., Gaulier, J.M., Imbert, L., Morla, A., and Lachâtre, G. (2014). Simultaneous determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Science International* 236, 151–156.

Duran, M., Pérez, E., Abanades, S., Vidal, X., Saura, C., Majem, M., Arriola, E., Rabanal, M., Pastor, A., Farré, M., et al. (2010). Preliminary efficacy and safety of an oromucosal standardized cannabis extract in chemotherapy-induced nausea and vomiting: Standardized cannabis extract in chemotherapy-induced nausea and vomiting. *British Journal of Clinical Pharmacology* 70, 656–663.

El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M., and Ross, S. (2010). Antidepressant-like effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 95, 434–442.

EMA (2011). Guideline on bioanalytical method validation.

EMA (2019). Epidyolex.

Emídio, E.S., de Menezes Prata, V., and Dórea, H.S. (2010). Validation of an analytical method for analysis of cannabinoids in hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 670, 63–71.

Esposito, G., De Filippis, D., Carnuccio, R., Izzo, A.A., and Iuvone, T. (2006a). The marijuana component cannabidiol inhibits  $\beta$ -amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway rescue in PC12 cells. *J Mol Med* 84, 253–258.

Esposito, G., De Filippis, D., Maiuri, M.C., De Stefano, D., Carnuccio, R., and Iuvone, T. (2006b). Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in  $\beta$ -amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF- $\kappa$ B involvement. *Neuroscience Letters* 399, 91–95.

Esposito, G., Scuderi, C., Savani, C., Steardo, L., Filippis, D., Cottone, P., Iuvone, T., Cuomo, V., and Steardo, L. (2007). Cannabidiol in vivo blunts  $\beta$ -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 $\beta$  and iNOS expression: CBD blunts A $\beta$  induced neuroinflammation in vivo. *British Journal of Pharmacology* 151, 1272–1279.

EURACHEM Guide (2014). The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.

Evans, F. (1991). Cannabinoids: The Separation of Central from Peripheral Effects on a Structural Basis. *Planta Med* 57, S60–S67.

Fasinu, P.S., Phillips, S., ElSohly, M.A., and Walker, L.A. (2016). Current Status and Prospects for Cannabidiol Preparations as New Therapeutic Agents. *Pharmacotherapy* 36, 781–796.

FDA (2018). FDA Approves First Drug Comprised of an Active Ingredient Derived from Marijuana to Treat Rare, Severe Forms of Epilepsy (FDA).

Ferreirós, N., Labocha, S., Walter, C., Lötsch, J., and Geisslinger, G. (2013). Simultaneous and sensitive LC–MS/MS determination of tetrahydrocannabinol and metabolites in human plasma. *Anal Bioanal Chem* 405, 1399–1406.

Food and Drug Administration (FDA) (2018). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation.

Freeman, A.M., Petrilli, K., Lees, R., Hindocha, C., Mokrysz, C., Curran, H.V., Saunders, R., and Freeman, T.P. (2019). How does cannabidiol (CBD) influence the acute effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in humans? A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 107, 696–712.

Gaoni, Y., and Mechoulam, R. (1968). The *ISO* -Tetrahydrocannabinols. *Isr. J. Chem.* 6, 679–690.

García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J.A., Mechoulam, R., and Fernández-Ruiz, J. (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat

- model of Parkinson's disease: Importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Research* 1134, 162–170.
- Gasse, A., Pfeiffer, H., Köhler, H., and Schürenkamp, J. (2016). Development and validation of a solid-phase extraction method using anion exchange sorbent for the analysis of cannabinoids in plasma and serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Int J Legal Med* 130, 967–974.
- Gasse, A., Pfeiffer, H., Köhler, H., and Schürenkamp, J. (2018). 8 $\beta$ -OH-THC and 8 $\beta$ ,11-diOH-THC—minor metabolites with major informative value? *Int J Legal Med* 132, 157–164.
- Geffrey, A.L., Pollack, S.F., Bruno, P.L., and Thiele, E.A. (2015). Drug-drug interaction between clobazam and cannabidiol in children with refractory epilepsy. *Epilepsia* 56, 1246–1251.
- Gerace, E., Bakanova, S.P., Di Corcia, D., Salomone, A., and Vincenti, M. (2021). Determination of cannabinoids in urine, oral fluid and hair samples after repeated intake of CBD-rich cannabis by smoking. *Forensic Science International* 318, 110561.
- Giacoppo, S., Bramanti, P., and Mazzon, E. (2017). Sativex in the management of multiple sclerosis-related spasticity: An overview of the last decade of clinical evaluation. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 17, 22–31.
- Goodwin, R.S., Darwin, W.D., Chiang, C.N., Shih, M., Li, S.-H., and Huestis, M.A. (2008). Urinary Elimination of 11-Nor-9-Carboxy-9-tetrahydrocannabinol in Cannabis Users During Continuously Monitored Abstinence. *Journal of Analytical Toxicology* 32, 562–569.
- Grauwiler, S.B., Scholer, A., and Drewe, J. (2007). Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts. *Journal of Chromatography B* 850, 515–522.
- Grotenhermen, F. (2003). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids: *Clinical Pharmacokinetics* 42, 327–360.
- Grotenhermen, F. (2004). Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol. Lett.* 25, 14–23.
- Gustafson, R., Moolchan, E., Barnes, A., Levine, B., and Huestis, M. (2003). Validated method for the simultaneous determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry with positive chemical ionization. *Journal of Chromatography B* 798, 145–154.
- Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J., and Wink, D. (1998). Cannabidiol and (-)-9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 8268–8273.
- Heinl, S., Lerch, O., and Erdmann, F. (2016). Automated GC–MS Determination of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, Cannabinol and Cannabidiol in Hair. *J Anal Toxicol* 40, 498–503.
- Hosseini, A., McLachlan, A.J., and Lickliter, J.D. (2020). A phase I trial of the safety, tolerability and pharmacokinetics of cannabidiol administered as single-dose oil solution and single and multiple doses of a sublingual wafer in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.*

- House, C.J., Lyttle, C., and Blanchard, C. (2017). An ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the detection of cannabinoids in whole blood using solid phase extraction. *Canadian Society of Forensic Science Journal* 50, 103–113.
- Howlett, A.C. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews* 54, 161–202.
- Huang, W., Moody, D.E., Andrenyak, D.M., Smith, E.K., Foltz, R.L., Huestis, M.A., and Newton, J.F. (2001). Simultaneous Determination of 9-Tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-Carboxy-9-Tetrahydrocannabinol in Human Plasma by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Negative Ion Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 25, 531–537.
- Hubbard, J.A., Smith, B.E., Sobolesky, P.M., Kim, S., Hoffman, M.A., Stone, J., Huestis, M.A., Grelotti, D.J., Grant, I., Marcotte, T.D., et al. (2020). Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method to detect cannabinoids in whole blood and breath. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 58, 673–681.
- Huestis, M.A. (2007). Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *C&B* 4, 1770–1804.
- Huestis, M.A., and Smith, M.L. (2007). Human Cannabinoid Pharmacokinetics and Interpretation of Cannabinoid Concentrations in Biological Fluids and Tissues. In *Marijuana and the Cannabinoids*, M.A. ElSohly, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 205–235.
- Huestis, M.A., and Smith, M.L. (2018). Cannabinoid Markers in Biological Fluids and Tissues: Revealing Intake. *Trends in Molecular Medicine* 24, 156–172.
- Huestis, M.A., Solimini, R., Pichini, S., Pacifici, R., Carlier, J., and Busardò, F.P. (2019). Cannabidiol Adverse Effects and Toxicity. *CN* 17, 974–989.
- Hussain, S.A., Zhou, R., Jacobson, C., Weng, J., Cheng, E., Lay, J., Hung, P., Lerner, J.T., and Sankar, R. (2015). Perceived efficacy of cannabidiol-enriched cannabis extracts for treatment of pediatric epilepsy: A potential role for infantile spasms and Lennox–Gastaut syndrome. *Epilepsy & Behavior* 47, 138–141.
- Iannotti, F.A., Di Marzo, V., and Petrosino, S. (2016). Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Progress in Lipid Research* 62, 107–128.
- Indorato, F., Liberto, A., Ledda, C., Romano, G., and Barbera, N. (2016). The therapeutic use of cannabinoids: Forensic aspects. *Forensic Sci Int* 265, 200–203.
- Jagerdeo, E., Schaff, J.E., Montgomery, M.A., and LeBeau, M.A. (2009). A semi-automated solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the analysis of tetrahydrocannabinol and metabolites in whole blood. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 2697–2705.
- Jamey, C., Szwarc, E., Tracqui, A., and Ludes, B. (2008). Determination of Cannabinoids in Whole Blood by UPLC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 32, 349–354.
- Jamwal, R., Topletz, A.R., Ramratnam, B., and Akhlaghi, F. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. *Journal of Chromatography B* 1048, 10–18.

- Jhavar, N., Schoenberg, E., Wang, J.V., and Saedi, N. (2019). The growing trend of cannabidiol in skincare products. *Clinics in Dermatology* 37, 279–281.
- Jones, N.A., Hill, A.J., Smith, I., Bevan, S.A., Williams, C.M., Whalley, B.J., and Stephens, G.J. (2010). Cannabidiol Displays Antiepileptiform and Antiseizure Properties In Vitro and In Vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 332, 569–577.
- Kargl, J., Andersen, L., Hasenöhrl, C., Feuersinger, D., Stančić, A., Fauland, A., Magnes, C., El-Heliebi, A., Lax, S., Uranitsch, S., et al. (2016). GPR55 promotes migration and adhesion of colon cancer cells indicating a role in metastasis: GPR55 in colon cancer. *British Journal of Pharmacology* 173, 142–154.
- Karniol, I.G., Shirakawa, I., Takahashi, R.N., Knobel, E., and Musty, R.E. (1975). Effects of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol and Cannabinol in Man. *Pharmacology* 13, 502–512.
- Karschner, E.L., Barnes, A.J., Lowe, R.H., Scheidweiler, K.B., and Huestis, M.A. (2010). Validation of a two-dimensional gas chromatography mass spectrometry method for the simultaneous quantification of cannabidiol,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in plasma. *Anal Bioanal Chem* 397, 603–611.
- Kemp, P.M., Abukhalaf, I.K., Manno, J.E., Manno, B.R., Alford, D.D., McWilliams, M.E., Nixon, F.E., Fitzgerald, M.J., Reeves, R.R., and Wood, M.J. (1995). Cannabinoids in Humans. II. The Influence of Three Methods of Hydrolysis on the Concentration of THC and Two Metabolites in Urine. *Journal of Analytical Toxicology* 19, 292–298.
- Kovalchuk, O., and Kovalchuk, I. (2020). Cannabinoids as anticancer therapeutic agents. *Cell Cycle* 1–29.
- Lachenmeier, D.W., Habel, S., Fischer, B., Herbi, F., Zerbe, Y., Bock, V., Rajcic de Rezende, T., Walch, S.G., and Sproll, C. (2020). Are side effects of cannabidiol (CBD) products caused by tetrahydrocannabinol (THC) contamination? *F1000Res* 8, 1394.
- Lacroix, C., and Saussereau, E. (2012). Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. *Journal of Chromatography B* 905, 85–95.
- Lafaye, G., Karila, L., Blecha, L., and Benyamina, A. (2017). Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues Clin Neurosci* 19, 309–316.
- Landmark, C.J., and Brandl, U. (2020). Pharmacology and drug interactions of cannabinoids. *Epileptic Disorders* 22, S16–S22.
- Laprairie, R.B., Bagher, A.M., Kelly, M.E.M., and Denovan-Wright, E.M. (2015). Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB<sub>1</sub> receptor: Negative allosteric modulation of CB<sub>1</sub> by cannabidiol. *British Journal of Pharmacology* 172, 4790–4805.
- Lee, D., Vandrey, R., Milman, G., Bergamaschi, M., Mendu, D.R., Murray, J.A., Barnes, A.J., and Huestis, M.A. (2013). Oral fluid/plasma cannabinoid ratios following controlled oral THC and smoked cannabis administration. *Anal Bioanal Chem* 405, 7269–7279.
- Levinsohn, E.A., and Hill, K.P. (2020). Clinical uses of cannabis and cannabinoids in the United States. *Journal of the Neurological Sciences* 411, 116717.

- Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkötter, J., Hellmich, M., and Koethe, D. (2012). Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2, e94–e94.
- Ligresti, A., Moriello, A.S., Starowicz, K., Matias, I., Pisanti, S., De Petrocellis, L., Laezza, C., Portella, G., Bifulco, M., and Di Marzo, V. (2006). Antitumor Activity of Plant Cannabinoids with Emphasis on the Effect of Cannabidiol on Human Breast Carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 1375–1387.
- Linares, I.M., Zuardi, A.W., Pereira, L.C., Queiroz, R.H., Mechoulam, R., Guimarães, F.S., and Crippa, J.A. (2019). Cannabidiol presents an inverted U-shaped dose-response curve in a simulated public speaking test. *Braz. J. Psychiatry* 41, 9–14.
- Lodzki, M., Godin, B., Rakou, L., Mechoulam, R., Gallily, R., and Touitou, E. (2003). Cannabidiol—transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *Journal of Controlled Release* 93, 377–387.
- Lowe, R.H., Karschner, E.L., Schwilke, E.W., Barnes, A.J., and Huestis, M.A. (2007). Simultaneous quantification of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, and 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in human plasma using two-dimensional gas chromatography, cryofocusing, and electron impact-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1163, 318–327.
- Lu, D., and Potter, D.E. (2017). Cannabinoids and the Cannabinoid Receptors: An Overview. In *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*, (Elsevier), pp. 553–563.
- Lucas, C.J., Galettis, P., and Schneider, J. (2018). The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol* 84, 2477–2482.
- Maralikova, B., and Weinmann, W. (2004). Simultaneous determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in human plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 39, 526–531.
- Marcu, J.P., Christian, R.T., Lau, D., Zielinski, A.J., Horowitz, M.P., Lee, J., Pakdel, A., Allison, J., Limbad, C., Moore, D.H., et al. (2010). Cannabidiol Enhances the Inhibitory Effects of 9-Tetrahydrocannabinol on Human Glioblastoma Cell Proliferation and Survival. *Molecular Cancer Therapeutics* 9, 180–189.
- Martín-Moreno, A.M., Reigada, D., Ramírez, B.G., Mechoulam, R., Innamorato, N., Cuadrado, A., and de Ceballos, M.L. (2011). Cannabidiol and Other Cannabinoids Reduce Microglial Activation In Vitro and In Vivo: Relevance to Alzheimer’s Disease. *Mol Pharmacol* 79, 964–973.
- Massi, P., Vaccani, A., Ceruti, S., Colombo, A., Abbracchio, M.P., and Parolaro, D. (2004). Antitumor Effects of Cannabidiol, a Nonpsychoactive Cannabinoid, on Human Glioma Cell Lines. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 838–845.
- Massi, P., Vaccani, A., Bianchessi, S., Costa, B., Macchi, P., and Parolaro, D. (2006). The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2057–2066.

- Massi, P., Solinas, M., Cinquina, V., and Parolaro, D. (2013). Cannabidiol as potential anticancer drug. *Br J Clin Pharmacol* 75, 303–312.
- McAllister, S.D., Murase, R., Christian, R.T., Lau, D., Zielinski, A.J., Allison, J., Almanza, C., Pakdel, A., Lee, J., Limbad, C., et al. (2011). Pathways mediating the effects of cannabidiol on the reduction of breast cancer cell proliferation, invasion, and metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 129, 37–47.
- McGuire, P., Robson, P., Cubala, W.J., Vasile, D., Morrison, P.D., Barron, R., Taylor, A., and Wright, S. (2018). Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *AJP* 175, 225–231.
- McHugh, D., Hu, S.S., Rimmerman, N., Juknat, A., Vogel, Z., Walker, J.M., and Bradshaw, H.B. (2010). N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci* 11, 44.
- McHugh, D., Page, J., Dunn, E., and Bradshaw, H.B. (2012).  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol and N-arachidonoyl glycine are full agonists at GPR18 receptors and induce migration in human endometrial HEC-1B cells: Novel CB pharmacology at GPR18. *British Journal of Pharmacology* 165, 2414–2424.
- Mead, A. (2017). The legal status of cannabis (marijuana) and cannabidiol (CBD) under U.S. law. *Epilepsy & Behavior* 70, 288–291.
- Mechoulam, R., and Parker, L.A. (2013). The Endocannabinoid System and the Brain. *Annu. Rev. Psychol.* 64, 21–47.
- Meier, U., Dussy, F., Scheurer, E., Mercer-Chalmers-Bender, K., and Hangartner, S. (2018). Cannabinoid concentrations in blood and urine after smoking cannabidiol joints. *Forensic Science International* 291, 62–67.
- Merrick, J., Lane, B., Sebree, T., Yaksh, T., O’Neill, C., and Banks, S.L. (2016). Identification of Psychoactive Degradants of Cannabidiol in Simulated Gastric and Physiological Fluid. *Cannabis and Cannabinoid Research* 1, 102–112.
- Millar, S.A., Stone, N.L., Yates, A.S., and O’Sullivan, S.E. (2018). A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. *Front. Pharmacol.* 9, 1365.
- Milman, G., Barnes, A.J., Lowe, R.H., and Huestis, M.A. (2010). Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 1513–1521.
- Ministry of Hemp (2020). Different Types of CBD Oil Products: Choose The Right Type Of CBD Oil.
- Montesano, C., Sergi, M., Odoardi, S., Simeoni, M.C., Compagnone, D., and Curini, R. (2014). A  $\mu$ -SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC–MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 91, 169–175.
- Moorthy, G.S., Vedar, C., DiLiberto, M.A., and Zuppa, A.F. (2019). A patient-centric liquid chromatography-tandem mass spectrometry microsampling assay for analysis of cannabinoids in human whole blood: Application to pediatric pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B* 1130–1131, 121828.



- Morales, P., Hurst, D.P., and Reggio, P.H. (2017). Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. In *Phytocannabinoids*, A.D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, and J. Kobayashi, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 103–131.
- Morano, A., Fanella, M., Albini, M., Cifelli, P., Palma, E., Giallonardo, A.T., and Di Bonaventura, C. (2020). Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Current Status and Future Prospects. *NDT Volume 16*, 381–396.
- Moreno-Sanz, G. (2016). Can You Pass the Acid Test? Critical Review and Novel Therapeutic Perspectives of  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinolic Acid A. *Cannabis and Cannabinoid Research 1*, 124–130.
- Nadulski, T., and Pragst, F. (2007). Simple and sensitive determination of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B 846*, 78–85.
- Nadulski, T., Sporkert, F., Schnelle, M., Stadelmann, A.M., Roser, P., Schefter, T., and Pragst, F. (2005). Simultaneous and Sensitive Analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in Plasma after Oral Application of Small Doses of THC and Cannabis Extract. *Journal of Analytical Toxicology 29*, 782–789.
- Navarro, G., Varani, K., Reyes-Resina, I., Sánchez de Medina, V., Rivas-Santisteban, R., Sánchez-Carnerero Callado, C., Vincenzi, F., Casano, S., Ferreiro-Vera, C., Canela, E.I., et al. (2018). Cannabigerol Action at Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors and at CB1–CB2 Heteroreceptor Complexes. *Front. Pharmacol. 9*, 632.
- Newmeyer, M.N., Swortwood, M.J., Barnes, A.J., Abulseoud, O.A., Scheidweiler, K.B., and Huestis, M.A. (2016). Free and Glucuronide Whole Blood Cannabinoids' Pharmacokinetics after Controlled Smoked, Vaporized, and Oral Cannabis Administration in Frequent and Occasional Cannabis Users: Identification of Recent Cannabis Intake. *Clinical Chemistry 62*, 1579–1592.
- Ohlsson, A., Lindgren, J.-E., Wahlen, A., Agurell, S., Hollister, L.E., and Gillespie, H.K. (1980). Plasma delta-9-tetrahydrocannabinol concentrations and clinical effects after oral and intravenous administration and smoking. *Clin Pharmacol Ther 28*, 409–416.
- Pacifici, R., Pichini, S., Pellegrini, M., Rotolo, M.C., Giorgetti, R., Tagliabracci, A., Busardò, F.P., and Huestis, M.A. (2020). THC and CBD concentrations in blood, oral fluid and urine following a single and repeated administration of “light cannabis.” *Clin Chem Lab Med 58*, 682–689.
- Palazzoli, F., Citti, C., Licata, M., Vilella, A., Manca, L., Zoli, M., Vandelli, M.A., Forni, F., and Cannazza, G. (2018). Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD),  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral administration of a single high dose of CBD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 150*, 25–32.
- Parker, L.A., Mechoulam, R., and Schlievert, C. (2002). Cannabidiol, a non-psychoactive component of cannabis and its synthetic dimethylheptyl homolog suppress nausea in an experimental model with rats: *Neuroreport 13*, 567–570.

- Parker, L.A., Rock, E.M., and Limebeer, C.L. (2011). Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids: Cannabinoids and nausea and vomiting. *British Journal of Pharmacology* 163, 1411–1422.
- Paudel, K.S., Hammell, D.C., Agu, R.U., Valiveti, S., and Stinchcomb, A.L. (2010). Cannabidiol bioavailability after nasal and transdermal application: effect of permeation enhancers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 36, 1088–1097.
- Pertwee, R.G. (2008). The diverse CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor pharmacology of three plant cannabinoids:  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology* 153, 199–215.
- Pisanti, S., Malfitano, A.M., Ciaglia, E., Lamberti, A., Ranieri, R., Cuomo, G., Abate, M., Faggiana, G., Proto, M.C., Fiore, D., et al. (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology & Therapeutics* 175, 133–150.
- Poleg, S., Golubchik, P., Offen, D., and Weizman, A. (2019). Cannabidiol as a suggested candidate for treatment of autism spectrum disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 89, 90–96.
- Press, C.A., Knupp, K.G., and Chapman, K.E. (2015). Parental reporting of response to oral cannabis extracts for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsy & Behavior* 45, 49–52.
- Qin, N., Neeper, M.P., Liu, Y., Hutchinson, T.L., Lubin, M.L., and Flores, C.M. (2008). TRPV2 Is Activated by Cannabidiol and Mediates CGRP Release in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neuroscience* 28, 6231–6238.
- Rabgay, K., Waranuch, N., Chaiyakunapruk, N., Sawangjit, R., Ingkaninan, K., and Dilokthornsakul, P. (2020). The effects of cannabis, cannabinoids, and their administration routes on pain control efficacy and safety: A systematic review and network meta-analysis. *Journal of the American Pharmacists Association* 60, 225-234.e6.
- Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H., and Hinz, B. (2010a). Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochemical Pharmacology* 79, 955–966.
- Ramer, R., Rohde, A., Merkord, J., Rohde, H., and Hinz, B. (2010b). Decrease of Plasminogen Activator Inhibitor-1 May Contribute to the Anti-Invasive Action of Cannabidiol on Human Lung Cancer Cells. *Pharm Res* 27, 2162–2174.
- Ramer, R., Bublitz, K., Freimuth, N., Merkord, J., Rohde, H., Haustein, M., Borchert, P., Schmuhl, E., Linnebacher, M., and Hinz, B. (2012). Cannabidiol inhibits lung cancer cell invasion and metastasis *via* intercellular adhesion molecule-1. *FASEB j.* 26, 1535–1548.
- Ramer, R., Heinemann, K., Merkord, J., Rohde, H., Salamon, A., Linnebacher, M., and Hinz, B. (2013). COX-2 and PPAR- Confer Cannabidiol-Induced Apoptosis of Human Lung Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 12, 69–82.
- Reddy, D. (2017). The Utility of Cannabidiol in the Treatment of Refractory Epilepsy. *Clin. Pharmacol. Ther.* 101, 182–184.
- Rhee, M.-H., Vogel, Z., Barg, J., Bayewitch, M., Levy, R., Hanuš, L., Breuer, A., and Mechoulam, R. (1997). Cannabinol Derivatives: Binding to Cannabinoid Receptors and Inhibition of Adenylyl cyclase. *J. Med. Chem.* 40, 3228–3233.

- Rock, E., Bolognini, D., Limebeer, C., Cascio, M., Anavi-Goffer, S., Fletcher, P., Mechoulam, R., Pertwee, R., and Parker, L. (2012). Cannabidiol, a non-psychotropic component of cannabis, attenuates vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT<sub>1A</sub> somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus: CBD, 5-HT<sub>1A</sub> agonism and nausea. *British Journal of Pharmacology* *165*, 2620–2634.
- Rubin, R. (2019). Cannabidiol Products Are Everywhere, but Should People Be Using Them? *JAMA* *322*, 2156.
- Russo, E.B. (2011). Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects: Phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* *163*, 1344–1364.
- Russo, E.B., Burnett, A., Hall, B., and Parker, K.K. (2005). Agonistic Properties of Cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> Receptors. *Neurochem Res* *30*, 1037–1043.
- Ryberg, E., Larsson, N., Sjögren, S., Hjorth, S., Hermansson, N.-O., Leonova, J., Elebring, T., Nilsson, K., Drmota, T., and Greasley, P.J. (2007). The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor: GPR55, a novel cannabinoid receptor. *British Journal of Pharmacology* *152*, 1092–1101.
- Scheidweiler, K.B., Newmeyer, M.N., Barnes, A.J., and Huestis, M.A. (2016). Quantification of cannabinoids and their free and glucuronide metabolites in whole blood by disposable pipette extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* *1453*, 34–42.
- Schwoppe, D.M., Scheidweiler, K.B., and Huestis, M.A. (2011). Direct quantification of cannabinoids and cannabinoid glucuronides in whole blood by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* *401*, 1273–1283.
- Sekar, K., and Pack, A. (2019). Epidiolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: a comprehensive review with a focus on adverse effects. *F1000Res* *8*, 234.
- Shannon, S. (2019). Cannabidiol in Anxiety and Sleep: A Large Case Series. *Permj*.
- Shrivastava, A., Kuzontkoski, P.M., Groopman, J.E., and Prasad, A. (2011). Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics* *10*, 1161–1172.
- Simmerman, E., Qin, X., Yu, J.C., and Baban, B. (2019). Cannabinoids as a Potential New and Novel Treatment for Melanoma: A Pilot Study in a Murine Model. *Journal of Surgical Research* *235*, 210–215.
- Skelley, J.W., Deas, C.M., Curren, Z., and Ennis, J. (2020). Use of cannabidiol in anxiety and anxiety-related disorders. *Journal of the American Pharmacists Association* *60*, 253–261.
- Soroceanu, L., Murase, R., Limbad, C., Singer, E., Allison, J., Adrados, I., Kawamura, R., Pakdel, A., Fukuyo, Y., Nguyen, D., et al. (2013). Id-1 Is a Key Transcriptional Regulator of Glioblastoma Aggressiveness and a Novel Therapeutic Target. *Cancer Research* *73*, 1559–1569.
- Specchio, N., Pietrafusa, N., and Cross, H.J. (2020). Source of cannabinoids: what is available, what is used, and where does it come from? *Epileptic Disord* *22*, 1–9.

- Spindle, T.R., Cone, E.J., Kuntz, D., Mitchell, J.M., Bigelow, G.E., Flegel, R., and Vandrey, R. (2020a). Urinary Pharmacokinetic Profile of Cannabinoids Following Administration of Vaporized and Oral Cannabidiol and Vaporized CBD-Dominant Cannabis. *Journal of Analytical Toxicology* 44, 109–125.
- Spindle, T.R., Cone, E.J., Goffi, E., Weerts, E.M., Mitchell, J.M., Winecker, R.E., Bigelow, G.E., Flegel, R.R., and Vandrey, R. (2020b). Pharmacodynamic effects of vaporized and oral cannabidiol (CBD) and vaporized CBD-dominant cannabis in infrequent cannabis users. *Drug Alcohol Depend* 211, 107937.
- Stinchcomb, A.L., Valiveti, S., Hammell, D.C., and Ramsey, D.R. (2004). Human skin permeation of  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56, 291–297.
- Stott, C., White, L., Wright, S., Wilbraham, D., and Guy, G. (2013). A Phase I, open-label, randomized, crossover study in three parallel groups to evaluate the effect of Rifampicin, Ketoconazole, and Omeprazole on the pharmacokinetics of THC/CBD oromucosal spray in healthy volunteers. *SpringerPlus* 2, 236.
- Taylor, L., Gidal, B., Blakey, G., Tayo, B., and Morrison, G. (2018). A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects. *CNS Drugs* 32, 1053–1067.
- Teixeira, H., Verstraete, A., Proença, P., Corte-Real, F., Monsanto, P., and Vieira, D.N. (2007). Validated method for the simultaneous determination of  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray ionization. *Forensic Science International* 170, 148–155.
- Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., and Pertwee, R.G. (2007a). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro: Cannabinoid antagonism by cannabidiol. *British Journal of Pharmacology* 150, 613–623.
- Thomas, A., Widmer, C., Hopfgartner, G., and Staub, C. (2007b). Fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry for forensic analysis of cannabinoids in whole blood. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45, 495–503.
- Turner, C.E., Elsohly, M.A., and Boeren, E.G. (1980). Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A Review of the Natural Constituents. *J. Nat. Prod.* 43, 169–234.
- Überall, M.A. (2020). A Review of Scientific Evidence for THC:CBD Oromucosal Spray (Nabiximols) in the Management of Chronic Pain. *JPR Volume* 13, 399–410.
- Ujváry, I., and Hanuš, L. (2016). Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research* 1, 90–101.
- Vaccani, A., Massi, P., Colombo, A., Rubino, T., and Parolaro, D. (2005). Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *British Journal of Pharmacology* 144, 1032–1036.

Vara, D., Morell, C., Rodríguez-Henche, N., and Diaz-Laviada, I. (2013). Involvement of PPAR $\gamma$  in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 4, e618–e618.

Wang, G.S., Bourne, D.W.A., Klawitter, J., Sempio, C., Chapman, K., Knupp, K., Wempe, M.F., Borgelt, L., Christians, U., Leonard, J., et al. (2020a). Disposition of Oral Cannabidiol-Rich Cannabis Extracts in Children with Epilepsy. *Clin Pharmacokinet* 59, 1005–1012.

Wang, G.S., Bourne, D.W.A., Klawitter, J., Sempio, C., Chapman, K., Knupp, K., Wempe, M.F., Borgelt, L., Christians, U., Heard, K., et al. (2020b). Disposition of oral delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) in children receiving cannabis extracts for epilepsy. *Clin Toxicol (Phila)* 58, 124–128.

Watanabe, K., Itokawa, Y., Yamaori, S., Funahashi, T., Kimura, T., Kaji, T., Usami, N., and Yamamoto, I. (2007). Conversion of cannabidiol to  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in artificial gastric juice, and their pharmacological effects in mice. *Forensic Toxicol* 25, 16–21.

WHO (2018a). Cannabidiol (CBD) Critical Review Report (Expert Committee on Drug Dependence, Fortieth Meeting, World Health Organization).

WHO (2018b). delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) Pre-review report (Expert Committee on Drug Dependence, Fortieth Meeting, World Health Organization).

Williams, S.J., Hartley, J.P., and Graham, J.D. (1976). Bronchodilator effect of delta-1-tetrahydrocannabinol administered by aerosol of asthmatic patients. *Thorax* 31, 720–723.

Wray, L., Stott, C., Jones, N., and Wright, S. (2017). Cannabidiol Does Not Convert to  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol in an *In Vivo* Animal Model. *Cannabis and Cannabinoid Research* 2, 282–287.

Zendulka, O., Dovrtělová, G., Nosková, K., Turjap, M., Šulcová, A., Hanuš, L., and Juřica, J. (2016). Cannabinoids and Cytochrome P450 Interactions. *CDM* 17, 206–226.

Zuardi, A., Crippa, J., Hallak, J., Pinto, J., Chagas, M., Rodrigues, G., Dursun, S., and Tumas, V. (2009). Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *J Psychopharmacol* 23, 979–983.

Zuardi, A.W., Cosme, R.A., Graeff, F.G., and Guimarães, F.S. (1993). Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol* 7, 82–88.

Zuardi, A.W., Rodrigues, N.P., Silva, A.L., Bernardo, S.A., Hallak, J.E.C., Guimarães, F.S., and Crippa, J.A.S. (2017). Inverted U-Shaped Dose-Response Curve of the Anxiolytic Effect of Cannabidiol during Public Speaking in Real Life. *Front. Pharmacol.* 8, 259.

Καπαρουδάκης, Α. (2018). Οδηγός χρήσης Φαρμακευτικής Κάνναβης.

Κουτσελίνης, Α. (2004). Τοξικολογία.