



UNIVERZITET U BANJALUCI
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



mr Mirjana M. Dragoljić

**PRAĆENJE HEMIJSKIH I FIZIČKIH
PARAMETARA BILJKE *CANNABIS SATIVA L.*
I NJENIH PREPARATA ZNAČAJNIH ZA
FORENZIČKU ANALIZU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2020.



UNIVERSITY OF BANJALUKA
FACULTY OF SCIENCE



Mr.Sci. Mirjana M. Dragoljić

**MONITORING OF CHEMICAL AND
PHYSICAL PARAMETERS OF THE *CANNABIS
SATIVA L.* PLANT AND ITS PREPARATIONS
THAT ARE IMPORTANT FOR FORENSIC
ANALYSIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2020.

Mentori	Prof. Dr Branka Rodić Grabovac, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Banja Luci
	Prof. Dr Ljubica Vasiljević, vanredni profesor, Tehnološki fakultet u Zvorniku, Univerzitet u Istočnom Sarajevu
Naslov doktorske disertacije	Praćenje hemijskih i fizičkih parametara biljke <i>Cannabis sativa</i> L. i njenih preparata značajnih za forenzičku analizu
Rezime	<p>Proizvodi biljke <i>Cannabis sativa</i> L. su najraširenija ilegalna droga u svijetu. U Republici Srpskoj najzastupljenija je marihuana (osnovni preparat kanabis biljke) i predstavlja preko 90% od ukupno zaplijenjene količine droga. U svijetu se decenijama bilježi porast psihoaktivnog potencijala kanabisa, posebno kod biljaka uzgojenih u vještačkim uslovima, stoga je dio istraživanja u ovom radu posvećen praćenju psihoaktivnog potencijala uzorka kanabis biljke zaplijenjenih na području Republike Srpske, u svrhu procjene budućih trendova. Rezultati istraživanja, koji su obuhvatili period 1999. – 2016. godine, pokazali su povećanje broja visokotentnih uzoraka, posebno nakon 2012. godine. Istraživanje je obuhvatilo sadržaj i međusobni odnos tri osnovna kanabinoida, zanačajna za forenzičku identifikaciju kanabisa, u svrhu određivanje hemotipa radi determinacije pripadnosti kanabis uzorka droga-tip ili vlakno-tip varijetetu. Podaci proistekli iz ove disertacije daju više informacija o stanju i trendovima psihoaktivnog potencijala kanabis preparata na ilegalnom tržištu, koje mogu biti korisne za različite aspekte problematike ilegalnih droga (zdravstveni, socijalni, pravosudni i sl.), kao i za izradu strategija za suzbijanje prometa i upotrebe ilegalnih droga.</p> <p>Dio istraživanja posvećen je promjeni hemijskih osobina uzorka koji se čuvaju u depozitu, sa akcentom na koncentraciji Δ^9-tetrahidrokanabinola, na osnovu koje je određena konstanta brzine reakcije degradacije tog psihoaktivnog sastojka. Istraživanje predstavlja doprinos boljem razumijevanju forenzički značajnih karakteristika</p>

kanabis preparata, te daje smjernice za postupanje sa uzorcima tokom istražnog postupka.

Dio rada posvećen je postupku pripreme i analize uzorka, u svrhu determinisanja optimalnih parametara analitičkih metoda, sa težištem na faze postupka i parametre koji imaju uticaj na identifikaciju i kvantifikaciju kanabinoida. Definisan je postupak za validaciju metode semikvantitativne analize Δ^9 -tetrahidrokanabinola primjenom hromatografije na tankom sloju, koja je praktična za primjenu u laboratorijama sa velikom frekvencijom uzorka. Kod gasnohromatografskih metoda, najznačajniji doprinos rada je eksperimentalna potvrda za primjenu referentnog standarda kanabinola, kao indirektnog standarda za određivanje koncentracije Δ^9 -tetrahidrokanabinola, čime se prevazilazi problem nepouzdanosti standarda Δ^9 -tetrahidrokanabinola, zbog njegove nestabilne prirode.

Ključne riječi *Cannabis sativa L.*, kanabinoidi, Δ^9 -tetrahidrokanabinol, kanabinol, psihoaktivni potencijal, tankoslojna hromatografija, gasna hromatografija.

Naučna oblast Prirodne nauke

Naučno polje Organska hemija

Klasifikaciona oznaka P390

Tip odabrane licence
Kreativne zajednice CC BY-NC-ND

Mentors

Branka Rodić Grabovac, PhD, Associate Professor, Faculty of Technology, University of Banja Luka

Ljubica Vasiljević, PhD, Associate Professor, Faculty of Technology Zvornik, University of Istočno Sarajevo

Title of doctoral

thesis Monitoring of chemical and physical parameters of the *Cannabis sativa* L. plant and its preparations that are important for forensic analysis

Summary

The products of the plant *Cannabis sativa* L. are the most widespread illegal drug in the world. In Republika Srpska, marijuana (basic preparation of the cannabis plant), is the most prevalent and represents over 90% of the total amount of confiscated drugs. The world has seen an increase in the psychoactive potential of cannabis for decades, especially in plants grown in artificial conditions, so part of this research deals with the psychoactive potential of cannabis plant samples seized in Republika Srpska, for the purpose of assessing future trends. The results of the research, which covered the period 1999-2016, showed an increase in the number of highly potent samples, especially after 2012. The research included the content and mutual ratios of three basic cannabinoids, important for forensic identification of cannabis, for the purpose of chemotype determination, to determine the affiliation of cannabis samples to a drug-type or fiber-type variety. The data from this dissertation provide more information on the situation and trends of the psychoactive potential of cannabis preparations on the illegal market, which can be useful for various aspects of the problem of illegal drugs (health, social, judicial, etc.), as well as for development of strategies for combating trafficking and use of illegal drugs.

Part of the research is dedicated to the change of chemical properties of samples stored in a deposit, with an emphasis on the concentration of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol, on the basis of which the constant rate of degradation reaction of that psychoactive ingredient is determined. The research contributes to a better understanding of the forensically

significant characteristics of cannabis preparations, and provides guidelines for handling samples during the investigative process.

Part of the paper is dedicated to the process of sample preparation and analysis, in order to determine the optimal parameters of analytical methods, with a focus on the stages of the process and parameters that have an impact on the identification and quantification of cannabinoids. A procedure for the validation the method of semiquantitative analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol using thin layer chromatography, which is practical for use in laboratories with a high frequency of samples, has been defined. In gas chromatographic methods, the most significant contribution of the paper is the experimental confirmation for the application of the cannabinol reference standard, as an indirect standard for determining the concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, thus overcoming the problem of unreliability of the Δ^9 -tetrahydrocannabinol reference standard, due to its unstable nature.

Key words

Cannabis sativa L., cannabinoids, Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol, psychoactive potential, thin layer chromatography, gas chromatography.

Scientific discipline Natural sciences

Scientific field Organic chemistry

Classification code P390

Type of selected license

Creative commons CC BY-NC-ND

LISTA SKRAĆENICA

AIDS – Acquired immunodeficiency syndrome (sindrom stečenog gubitka imuniteta)

BSTFA – bis-sililtrimetil-trifluoroacetamid

CB1 i CB2 – kanabinoidni receptori

CBC – cannabichromene (kanabihromen)

CBCA – cannabichromenic acid (kanabihromenska kiselina)

CBCV – cannabichromevarin (kanabihromevarin)

CBD – cannabidiol (kanabidiol)

CBDA – cannabidiolic acid (kanabidiolna kiselina)

CBDV – cannabidivarin (kanabidivarin)

CBG – cannabigerol (kanabigerol)

CBGA – cannabigerolic acid (kanabigerolna kiselina)

CBGM – cannabigerol monomethyl ether (kanabigerol monometil eter)

CBN – cannabinol (kanabinol)

CBNA – cannabinolic acid (kanabinolna kiselina)

CC – Column chromatography (hromatografija u koloni)

CNS – centralni nervni sistem

DAD – Diode array detector (diodni detektor)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

EC – Electrochemical detector (elektrohemski detektor)

ECD – Electron capture detector (detektor zasnovan na elektronskom zahvatu)

FID – Flame ionization detector (plameno jonizacioni detektor)

FL – fluorescentni detektor

FTIR – Fourier-transform infrared detector (infracrveni detektor na bazi Furijeove transformacije)

GC – Gas chromatography (gasna hromatografija)

GC/FID – Gas chromatography with flame ionization detector (gasna hromatografija sa plameno ionizacionim detektorom)

GC/MS – Gas chromatography with mass spectrometry (gasna hromatografija sa masenim spektrometrom)

HID – High intensity discharge lamp (lampa visokog intenziteta pražnjenja)

HPLC – High performance liquid chromatography (tečna hromatografija visokih performansi)

HPLC/MS – High-performance liquid chromatography with mass spectrometry (tečna hromatografija visokih performansi sa masenim spektrometrom)

HPS – High pressure sodium lams (natrijumska lampa visokog pritiska)

HPTLC – High performance thin-layer chromatography (tankoslojna hromatografija visokih performansi)

IR – Infrared spectroscopy (infracrvena spektroskopija)

IS – interni standard

IRMS – Isotope ratio – mass spectrometry (masena spektrometrija odnosa masa stabilnih izotopa)

IUPAC – Internationale union of pure and applied chemistry (Međunarodna unija čiste i primjenjene hemije)

L. – Linnaeus, Carl (Karl Line)

LC – Liquid chromatography (tečna hromatografija)

LC/MS – Liquid chromatography with mass spectrometry (tečna hromatografija sa masenim spektrometrom)

LD₅₀ – letalna doza 50% (doza koja ubija 50% populacije)

MH – Metal halides (halogenidi metala)

MS - masena spektrometrija

MSD – maseni spektrometrijski detektor

MSTFA – metil-siliktrimetil-trifluoroacetamid

NPD – Nitro-phosphor detector (azot – fosfor detektor)

PC – Paper chromatography (hromatohrafija na papiru)

PDA – Photodiode array detector (fotodiodni detektor)

PTSP – postraumatski stresni poremećaj

RI – indeks refrakcije

SAD – Sjedinjene Američke Države

SPE – Solid phase extraction (ekstrakcija na čvrstoj fazi)

SPME – Solid phase micro extraction (mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi)

TBA – tribenzilamin

TCD – Thermal conductivity detector (detektor termičke provodljivosti)

TCS – tetracosan (tetrakosan)

THC – tetrahydrocannabinol (tetrahidrokanabinol)

THCA – tetrahydrocannabinolic acid (tetrahidrokanabinolna kiselina)

THCV – tetrahydrocannabivarin (tetrahidrokanabivarin)

TLC – Thin-layer chromatography (hromatografija na tankom sloju)

TMCS – trimethylchlorosilane (trimetilchlorsilan)

TMS – trimetilsilil

UHPLC – Ultra high-performance liquid chromatography (tečna hromatografija ultravisokih performansi)

UHPLC/MS – Ultra high-performance liquid chromatography with mass spectrometry (tečna hromatografija ultravisokih performansi sa masenim spektrometrom)

UV – ultravioletno svjetlo/zračenje/lampa/spektroskopija

UV-VIS – ultravioletna-vidljiva spektroskopija

S A D R Ž A J

1.	UVOD	1
2.	BILJKA <i>CANNABIS SATIVA L.</i>	4
2.1.	Fizičke osobine.....	6
2.2.	Hemiske osobine	8
2.2.1.	Tetrahidrokanabinol (THC).....	9
2.2.2.	Kanabidiol (CBD)	10
2.2.3.	Kanabinol (CBN)	11
2.2.4.	Ostali kanabinoidi	11
2.2.5.	Biosinteza kanabinoida	12
2.2.6.	Sastojci nekanabinoidnog tipa.....	13
2.3.	Ciklus rasta i uzgoj.....	14
2.3.1.	Uzgoj na otvorenom	14
2.3.2.	Uzgoj u zatvorenom	17
2.4.	Upotreba.....	21
2.4.1.	Ilegalni kanabis preparati	22
2.4.1.1.	Biljni kanabis (marihuana)	22
2.4.1.2.	Kanabis smola (hašiš).....	24
2.4.1.3.	Kanabis ulje (hašiš ulje)	26
2.4.2.	Industrijska primjena kanabis biljke	26
2.4.2.1.	Tekstilna vlakna.....	27
2.4.2.2.	Kanabis sjeme i sjemeno ulje	29
2.4.2.3.	Kanabis esencijalno ulje	30
2.4.2.4.	Ostali proizvodi	31
2.4.3.	Klasifikacija i efekti	32
2.4.3.1.	Medicinska primjena	34
3.	ANALIZA KANABIS PROIZVODA U FORENZIČKE SVRHE.....	45
3.1.	Uzorkovanje	46
3.2.	Morfološko ispitivanje	49
3.2.1.	Makroskopske karakteristike.....	49
3.2.2.	Mikroskopske karakteristike	49
3.3.	Hemisko ispitivanje.....	51

3.3.1. Preliminarni testovi	52
3.3.1.1. Hemijski testovi.....	52
3.3.1.2. Imuno-hromatografski testovi	56
3.3.2. Hromatografske metode i tehnike	57
3.3.2.1. Hromatografija na tankom sloju (TLC).....	61
3.3.2.2. Instrumentalne hromatografske tehnike i metode.....	67
3.3.2.2.1. Gasna hromatografija (GC)	67
3.3.2.2.2. Tečna hromatografija (LC)	75
3.3.3. Dodatne analitičke tehnike i pristupi za analizu kanabis proizvoda.....	78
3.3.3.1. Masena spektrometrija odnosa masa stabilnih izotopa (IRMS)	78
3.3.3.2. DNK profilisanje	78
4. MATERIJAL I METODE.....	80
4.1. Uzorci	80
4.2. Hemikalije i pribor	81
4.3. Analitički postupci	81
4.3.1. Preliminarno testiranje	81
4.3.2. Hromatografija na tankom sloju.....	81
4.3.3. Gasna hromatografija	82
5. REZULTATI I DISKUSIJA	83
5.1. Sadržaj i međusobni odnos osnovnih kanabinoida u biljci <i>Cannabis sativa L.</i>	83
5.1.1. Sadržaj psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola (THC) – psihoaktivni potencijal kanabisa.....	84
5.1.2. Sadržaj kanabidiola (CBD)	90
5.1.3. Sadržaj kanabinola (CBN)	91
5.1.4. Međusobni odnosi osnovnih kanabinoida	92
5.2. Promjena koncentracije tetrahidrokanabinola (THC) i kanabinola (CBN) sa vremenom.....	97
5.3. Neki aspekti pripreme i analize kanabis uzorka	103
5.3.1. Uzorkovanje kanabis biljke i njenih preparata	104
5.3.2. Hromatografija na tankom sloju - kvalitativna i semikvantitativna analiza.....	107
5.3.2.1. Procjena selektivnosti i specifičnosti metode hromatografije na tankom sloju.....	109
5.3.2.2. Određivanje granice detekcije THC metodom tankoslojne hromatografije	111
5.3.2.3. Ispitivanje uticaja matriksa na identifikaciju kanabinoida metodom tankoslojne hromatografije	112
5.3.2.4. Ponovljivost, međupreciznost i otpornost metode tankoslojne hromatografije.....	113

5.3.2.5. Semikvantitativno određivanje THC metodom tankoslojne hromatografije	115
5.3.3. Metode gasno-hromatografske analize kanabisa.....	117
5.3.3.1. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC/FID)	117
5.3.3.2. Gasna hromatografija sa masenim spektrometrijskim detektorom (GC/MS)	120
5.3.3.3. Kvantitativna gasno-hromatografska analiza kanabisa	127
5.3.3.3.1. Izbor reprezentativnih dijelova biljke	128
5.3.3.3.2. Priprema uzorka za analizu	130
5.3.3.3.3. Ekstrakcija biljnog materijala	132
5.3.3.3.4. Tehnika injektiranja uzoraka	135
5.3.3.3.5. Metoda eksternog i metoda internog standarda	136
5.3.3.3.6. Primjena indirektnog standarda za određivanje kanabinoida	139
6. ZAKLJUČCI	145
7. LITERATURA.....	148

1. UVOD

Dinamika proizvodnje, prometa i upotrebe pojedinih vrsta ilegalnih droga mijenja se kroz vrijeme. Neke supstance koje su bile masovnije zastupljene prije četrdesetak godina, kao npr. barbiturati, nisu više tako česte [Siegel, 2005]. Sa druge strane, u poslednjoj deceniji bilježi se porast tzv. „novih psihoaktivnih supstanci“, uglavnom sintetičkog porijekla, koje nisu nove u smislu njihove sinteze (mnoge su sintetizovane 70-tih godina prošlog vijeka), ali su u novije vrijeme prilagođene u cilju izazivanja efekata na organizam, sličnih poznatim ilegalnim drogama [UNODC, 2013a]. Broj i vrsta supstanci, dostupnih korisnicima, nikada nisu bili raznovrsniji. Međutim i pored navedene dinamike, proizvodi biljke *Cannabis sativa* L. tradicionalno predstavljaju najrašireniju ilegalnu drogu u svijetu. Procjenjuje se da oko 4% svjetske populacije u dobu od 15-64 godina koristi kanabis preparate [EMCDDA, 2018a; UNODC, 2018]. Preko 60% slučajeva zaplijene i zaplijenjene količine droga na globalnom nivou odnosi se na kanabis preparate [UNODC, 2015]. Slično stanje je u Bosni i Hercegovini, gdje je najzastupljenija marihuana (osnovni preparat kanabis biljke), dok je kanabis smola (hašiš) mnogo rjeđa [EMCDDA, 2018b]. U Republici Srpskoj marihuana je takođe najzastupljenija droga na ilegalnom tržištu i predstavlja preko 90% od ukupno zaplijenjene količine droga. Pored tradicionalnog uzgoja u prirodnim uslovima (plantaže na otvorenom), poslednjih decenija zabilježen je porast uzgoja kanabis biljke u zatvorenom prostoru, u vještačkim uslovima, što pored povećanog prinosa, ima značajan uticaj na hemijski sastav biljke [King et al., 2004; Toonen et al., 2006; Clarke and Watson, 2007; UNODC, 2012, 2013b, 2014a, 2014b, 2015]. Ova pojava prisutna je i na prostoru Republike Srpske [Dragoljić i Vasić-Dakić, 2014], gdje je u posljednjoj deceniji otkriveno više ilegalnih laboratorija za proizvodnju marijuane. Psihoaktivni potencijal ilegalnih uzoraka kanabisa prati se već duže vrijeme u mnogim državama, u svrhu procjene uticaja na zdravlje korisnika [ElSohly et al., 1984, 2000, 2016; King et al., 2004; Potter et al., 2008; Mehmedić et al., 2010; UNODC, 2011, 2014a; Cascini et al., 2012; Dujourdy and Besacier, 2017; Freeman et al., 2018]. Kada su u pitanju droge, poznato je da korisnici dozu prilagođavaju potenciji uzorka, te ne znači da su samo visokotentntni uzorci prijetnja za zdravlje. Zdravstveni rizik predstavljaju i nagle promjene potencijala pojedine droge na tržištu ili velike međusobne razlike u psihoaktivnom potencijalu ilegalnih uzoraka, što također može izazvati zdravstvene probleme ili neočekivano predoziranje [Tsumura et al., 2012]. U posljednjim decenijama zabilježen je porast psihoaktivnog potencijala

kanabisa, posebno kod biljaka koje se gaje u vještačkim uslovima (u zatvorenom prostoru) [Potter et al., 2008; Mehmedić et al., 2010; UNODC, 2011, 2014a; Freeman et al., 2018]. Zapaženo je da su uzorci kanabisa sa visokim sadržajem psihoaktivnog sastojka na području Republike Srpske brojniji nego u ranijem periodu, ali nema sveobuhvatnog istraživanja koje bi dalo precizniju sliku o kretanju i trendovima psihoaktivnog potencijala kanabisa. Zbog toga je jedan dio istraživanja u ovom radu posvećen praćenju potencijala uzoraka kanabis biljke zaplijjenjenih na području Republike Srpske, u svrhu praćenja psihoaktivnog potencijala uzoraka dostupnih na ilegalnom tržištu i procjene trendova koji se mogu očekivati u budućnosti. Rezultati istraživanja pokazali su da su na ilegalnom tržištu prisutni uzorci kanabis biljnog materijala sa veoma različitim sadržajem psihoaktivnog sastojka, od tzv. niskopotentnih do visokopotentnih, te da je broj visokopotentnih uzoraka u porastu. Istraživanje je obuhvatilo i određivanje hemotipa (hemijskog fenotipa) u cilju determinacije pripadnosti biljke varijetu tzv. droga-tip konoplje ili industrijske vlakno-tip konoplje [Maksimović i sar., 1998; Raman and Joshi, 2003; UNODC, 2009a].

Karakteristični hemijski sastojci kanabis biljke (*Cannabis sativa L.*) su kanabinoidi, kojih je iz biljke izolovano 120 [ElSohly et al., 2017; Radwan et al., 2017], od kojih se tri osnovna koriste za forenzičku identifikaciju kanabis preparata: kanabidiol, kanabinol i psihoaktivni tetrahidrokanabinol [Maksimović i sar., 1998]. Poznato je da svi dijelovi biljke ne sadrže istu količinu psihoaktivnog sastojka [UNODC, 2009a], ali neka istraživanja daju različite rezultate u pogledu sadržaja psihoaktivnog sastojka u nekim biljnim dijelovima (npr. sjemenke) [Ross et al., 2000; Yang et al., 2017]. Stoga je ovo istraživanje obuhvatilo ispitivanje sadržaja psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola u različitim dijelovima biljke (cvat, list, stabljika, korijen, sjemenke). Takođe je poznato da nivo psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola opada sa vremenom u uzorcima biljke i drugih kanabis preparata [UNODC, 2009a; Trofin et al., 2011; 2012a; 2012b]. Istraživanja u oblasti dinamike razlaganja tetrahidrokanabinola dala su određene rezultate [Ross and ElSohly, 1997], ali postupanje sa uzorcima u tim eksperimentima ne odgovara našoj forenzičkoj praksi postupanja sa uzorcima koji su materijalni dokaz za sudski postupak. Određena istraživanja na temu promjene koncentracije psihoaktivnog sastojka sa vremenom rađena su i kod nas [Dragoljić, 2012; Dragoljić i sar. 2013], te je predmet ovog rada nastavak praćenja promjene hemijskih osobina uzoraka kanabisa, sa ciljem procjene vremena u kojem ima smisla čuvati uzorke u depozitu, odnosno vremena u kojem se uzorci kanabisa mogu uspješno upotrijebiti makar za kvalitativnu forenzičku analizu osnovnih kanabinoida.

Preporuke za postupak uzorkovanja, pripremu uzoraka za analizu, kao i metode analiza primjenom različitih analitičkih tehnika, mogu se naći u brojnoj literaturi, gdje se preporučeni postupci i metode manje ili više međusobno razlikuju [UNDCP, 1994; Maksimović i sar., 1998; SWGDRUG, 2005, 2016; Siegel, 2005; UNODC and ENFSI, 2009; Fischedick et al., 2010]. Uticaj pojedinih parametara (temperatura u pojedinim fazama pripreme, izbor rastvarača za ekstrakciju itd.) na rezultat kvantitativne analize tj. određivanje koncentracije pojedinih kanabinoida, nije detaljno obrazložen. Zbog toga su u ovom istraživanju izvršena određena ispitivanja koja se odnose na pripremu i analizu uzorka. Praćena je stabilnosti rastvora referentnih standarda i ekstrakata uzorka, čuvanih u različitim uslovima (na sobnoj temperaturi i u frižideru). Izvršeno je upoređivanje rezultata dobijenih gasnohromatografskom analizom primjenom metode eksternog i metode internog standarda, kao i rezultati dobijeni tehnikom ručnog injektiranja i injektiranja pomoću autosemplera. Ovo ispitivanje postupaka pripreme i analize provedeno je u svrhu podešavanja optimalnih parametara metode za analizu osnovnih kanabinoida [UNODC, 2009b, 2009c]. Ispitana je i mogućnost primjene referentnog standarda kanabinola, kao indirektnog standarda za određivanje koncentracije tetrahidrokanabinola u kanabis uzorcima.

Optimizacija uslova pripreme i analize uzorka predstavlja značajan doprinos forenzičkoj analitičkoj praksi. Podaci o hemijskim i fizičkim osobinama uzorka kanabis biljke i njenih preparata dobijeni na osnovu eksperimenata doprinose boljem razumijevanju forenzički značajnih karakteristika kanabis uzorka, kao i tumačenju prilikom vještačenja u sudskim postupcima. Saznanja proistekla iz eksperimenata mogu poslužiti i kao smjernice za postupanje sa uzorcima tokom istražnog postupka.

Ova disertacija takođe daje više podataka o stanju, trendovima i psihoaktivnom potencijalu kanabis preparata na domaćem ilegalnom tržištu. Ti podaci mogu biti korisni ustanovama koje se bave problematikom ilegalnih droga (zdravstvenim, socijalnim, pravosudnim i sl.), kao i za izradu strategija za suzbijanje prometa i upotrebe ilegalnih droga u Republici Srbiji.

2. BILJKA CANNABIS SATIVA L.

Cannabis sativa L., kod nas poznata kao konoplja, je biljna vrsta koju prate brojne kontroverze po raznim pitanjima, kao što su porijeklo, klasifikacija, hemijski sastav, djelovanje na ljudski organizam i zakonska regulativa. S druge strane, ona je kroz istoriju imala važnu ulogu u industriji, kulturi, religiji i medicini.

Botanička i hemotaksonomska klasifikacija konoplje je predmet mnogih diskusija u stručnim krugovima još od vremena švedskog naučnika Karla Linea (*Carl Linnaeus*), koji je poznat kao otac taksonomije [Singh, 2010]. Line je 1735 konoplju klasifikovao kao jednu biljnu vrstu pod nazivom *Cannabis sativa*. Nešto kasnije, Lamark je opisao biljku *Cannabis indica* i klasifikovao je kao posebnu biljnu vrstu [Iversen, 2000]. Kontroverzu vezanu za klasifikaciju konoplje uglavnom predstavlja pitanje o tome da li rod *Cannabis* sadrži jednu ili više biljnih vrsta. Najviše neslaganja u stručnim krugovima izazivala je dilema da li su *Cannabis sativa* i *Cannabis indica* dvije biljne vrste ili su to samo podvrste jedne biljne vrste [Hilling and Mahlberg, 2004; Clarke and Merlin, 2013; Houck and Siegel, 2015; Piomelli and Russo, 2016; Pollio, 2016; Small, 2017a, 2017b]. Jedno od najobimnijih istraživanja taksonomije kanabisa proveli su *Small* i *Cronquist* 1976. godine. Na osnovu pregleda literature koja je obuhvatala hemijski sastav, morfologiju biljke i sjemena, kao i uticaj selekcije prilikom uzgoja kroz vijekove, došli su do zaključka da je *Cannabis sativa* jedna biljna vrsta, ali je veoma varijabilna [Raman, 2003; Small, 2017a, 2017b; McPartland, 2018]. Na bazi morfoloških, anatomske, fitohemijskih i genetičkih studija, danas je uglavnom prihvaćeno stanovište da je *Cannabis sativa* L. jedna biljna vrsta iz roda *Cannabis*, koji pripada porodici *Cannabaceae* iz reda *Urticales*. U okviru te biljne vrste postoji nekoliko podvrsta (*C. sativa* subsp. *sativa*, *C. sativa* subsp. *indica*, *C. sativa* subsp. *ruderalis*, *C. sativa* subsp. *spontanea*, *C. sativa* subsp. *kafiristanica*) i više različitih bioloških, hemijskih, morfoloških i geografskih varijeteta, čije hemijske i morfološke razlike nisu lako uočljive, a mijenjaju se i variraju pod uticajem uslova okoline [ElSohly and Slade, 2005; UNODC, 2009a; Khan et al., 2012; Thomas, B. and ElSohly, 2016; Hazekamp et al., 2016; ElSohly et al., 2017; Onofri and Mandolino, 2017; Piomelli et al., 2019; De la Fuente et al., 2020]. Razlike između varijeteta nisu konstantne iz razloga što se konoplja brzo prilagođava uslovima rasta i klimatskim prilikama, pri čemu se mijenjaju njene fizičke, hemijske i fiziološke osobine [Green, 2001]. Zbog toga je uobičajeno da se naziv *Cannabis sativa* L. koristi za sve kanabis biljke, bez obzira na podvrstu ili varijitet [Cole, 2003;

Hazekamp, 2008-2009; UNODC, 2009a; Small, 2017a]. Na osnovu različitih pristupa klasifikaciji kanabis biljke i njenih podvrsta i varijeteta, koji se mogu naći u brojnoj literaturi, realno je očekivati da će ova oblast i u budućnosti biti predmet rasprava u naučnim krugovima.

Porijeklo biljnih vrsta je teško precizno odrediti kada se uzme u obzir uticaj čovjeka. Kao moguće prirodno stanište kanabis biljke navodi se područje od Kaspijskog mora preko Srednje i Južne Rusije do Sjeverne Indije i Himalaja, a većina stručnjaka Centralnu Aziju smatra njenom domovinom [Iversen, 2000; Raman and Joshi, 2003; Hazekamp et al., 2010; Piomelli and Russo, 2016]. Prema arheološkim istraživanjima procjenjuje se da je ova biljka uzgajana u Kini prije 6000 ili 8000, pa čak i 10000 godina [Hazekamp et al., 2010; Small, 2017a]. Najraniji zapisi o upotrebi konoplje potiču od najstarijih poznatih neolitskih kultura u Kini, u dolini Žute rijeke, prije oko 6500 godina. S obzirom da se konoplja lako prilagođava različitim klimatskim uslovima, kroz vijekove se odomaćila širom različitih temperturnih zona svijeta, a posebno u područjima umjerene i tropske klime. Stari narodi su je koristili za proizvodnju tekstilnih vlakana za izradu užadi, ribarskih mreža, odjeće i sl., a sjeme je bilo vrijedan izvor hrane. Kina je do današnjih dana ostala glavni svjetski proizvođač konopljinih vlakana [Thomas, M., 2012; Small, 2017a]. Kanabis biljka je navedena i u kineskim medicinskim zapisima 2700 god. prije Hrista [Khan et al., 2012]. Postoje indicije da je konoplja korištena u prehrambene ili ljekovite svrhe i u starom Egiptu. U stvari, konoplja je jedna od najstarijih ljekovitih biljaka i opisana je u skoro svim antičkim priručnicima ljekovitog bilja, najčešće u formi tinkture ili čaja. Zbog svojih osobina ova biljka bila je bliska i nekim religijama. Npr. prema Hindu legendi vjerovalo se da je kanabis omiljena hrana boga Šive, zbog njenih enegretskih osobina [Hazekamp et al., 2010].

Početkom XX vijeka učestala je zloupotreba kanabis biljke kao droge, zbog čega su se u mnogim zemljama počeli donositi propisi o zabrani uzgoja. Ipak, u nekim dijelovima Azije (posebno Kini), u većem dijelu Sovjetskog Saveza, u većini zemalja Istočne Evrope (uključujući Srbiju), kao i u Francuskoj i Španiji, konoplja za industrijske svrhe i dalje se uzgajala u većoj ili manjoj mjeri, zavisno od potreba tržišta. Značajno interesovanje za ponovni uzgoj u industrijske svrhe u mnogim zemljama zapadne Evrope, ali i u Australiji i Kanadi počeo je 1990-tih godina. U većini Sjedinjenih Američkih Država usvojeni su propisi koji dozvoljavaju industrijski uzgoj [Small, 2017a]. Istovremeno je zaživjela i ponovna upotreba u medicinske svrhe, pa je sve više zahtjeva za dekriminalizacijom i djelimičnom legalizacijom kanabisa.

2.1. Fizičke osobine

Cannabis sativa L. je jednogodišnja biljka cvjetnica, uglavnom je dvodomna (muški i ženski cvjetovi nalaze se na zasebnim biljkama), iako se ponekad mogu pojaviti hermafroditni primjeri tj. jednodomna biljka (muški i ženski cvjetovi na istoj biljci) [Thomas, M., 2012; Clarke and Merlin, 2013; Thomas, B. and ElSohly, 2016]. Prije cvjetanja muške i ženske biljke imaju sličan izgled i teško ih je razlikovati. Zrele muške biljke su obično 10-15% više od ženskih, ali su tanje i nešto manje razgranate [Small, 2017a]. Kanabis biljka ima glavni korijen dužine oko 1/10 stabljike, sa manjim izdancima koji se granaju od glavnog korijena [Raman, 2003]. Visina biljke može varirati 0,2-6 m, zavisno od varijeteta i uslova gajenja, mada je uobičajena visina 1-3 m [Upton et al., 2013]. Stabljika biljke je zelena, uspravna, uzdužno udubljena/izbrazdana, ponekad šuplja i manje ili više razgranata. Prečnik stabljike kreće se od 6 do 20 mm [Small, 2017a]. Bočne grane su nasuprot raspoređene duž cijele glavne stabljike. Raspored lista je unakrsno naizmjeničan na suprotnim stranama stabljike. Stabljike lista (peteljke) duge su 2-7 cm sa uskim udubljenjem po gornjoj strani. List je oblika dlana i sastoji se od neparnog broja (3 do 15), najčešće 5, 7 ili 9 uskih listića lancetastog oblika [Raman, 2003; UNODC, 2009a].



Slika 1. *Cannabis sativa L.*



Slika 2. Karakterističan izgled lista
biljke *Cannabis sativa L.*

(Izvor fotografija: Upton et al., 2013)

Listići na jednoj petljci su prstasti, različite dužine (obično 3-11 cm, a najduži oko 15 cm), širine 0,2-1,7 cm, meke su građe, uski, kopljasti, testerastog izgleda tj. po rubu nazubljeni (zubi usmjereni ka vrhu lista), a vene usmjerene ukoso od srednjeg rebra ka vrhovima zuba. Donja površina (naličje) je bijelo zelena, sa raštrkanim bijelim do žućkasto smeđim smolastim žlijezdastim tvorevinama (trihomama). Svježi listovi su zelene boje, a sušenjem poprime smeđu boju. Cvjetovi su sitni, veoma bogati, skupljeni su u gornjoj trećini stabljike i čine cvat. Muška

i ženska biljka razlikuju se po cvatu. Muški cvjetovi imaju žućastu do bijedo zelenu boju, cvat se sastoji od mnogo pojedinačnih cvjetova, izdvojen je od lišća i ima izgled metlice. Muški cvijet se sastoji od pet bjelkasto-zelenih minuciozno dlakavih ovojnica dugih oko 2,5-4 mm i pet visećih prašnika. Ženski cvjetovi (tučkovi) su svjetlo-zelene boje, kompaktni, kratki i nisu istureni izvan okolnog lišća, više ili manje su kitnjasti i niču u parovima. Svaki cvijet ima jajnik ovijen zelenim lisnatim omotačem koji formira cjevast plašt dužine oko 2 mm oko jajnika, sa dvije duge tanke stigme koje se uzdižu iznad omotača [Raman, 2003]. Površina stigme je gusto pokrivena veoma malim papilama (izrasline nalik nitima) koje služe za prihvatanje polena. Plod konoplje je ujedno i sjeme. To je dvokrilni orašac jajolikog oblika, malo izdužen i komprimovan, dužine oko 3-6 mm, u najširem dijelu prečnika 2,5-4 mm. Divlje sorte imaju sitnije sjeme (600 do 1000 sjemenki po gramu), dok kultivisane sorte imaju krupnije sjemenke (oko 15 sjemenki po gramu) [Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a]. Plod je omotan ljskom koja je tvrda i mehanički štiti sjeme. Na površini ljske prostim okom se vide karakteristične žilice mrežastog uzorka nalik kornjačinom oklopu. Boja ploda se mijenja prema stepenu zrelosti: nezreli plod je zelenkaste boje, dok zreli može biti srebrnasto-sive, tamno-sive do smeđe pa čak i mrke boje. Boje na plodu se prelijevaju i slijevaju u smjesu boja koju nije uvijek lako odrediti, a zbog pruga i žilica koje presjecaju ljsku plod daje utisak mozaika.



Slika 3. Sjemenke *Cannabis sativa L.*

Fizičke osobine (visina, nijansa boje svežeg i osušenog lista, obim grananja, gustoća lista i cvata i sl.) zavise od nasljednih faktora, uslova okoline i načina uzgoja, a mogu se razlikovati i zavisno od podneblja u kojem se uzgaja [UNODC, 2009a].

2.2. Hemijske osobine

Pored ostalog, *Cannabis sativa* L. je dugo vremena zanimljiva za istraživanje i zbog njenog složenog hemijskog sastava. Smola koju luče žljezdane trihome, prisutne na površini skoro svih biljnih dijelova, a posebno cvjetova i listova, bogata je različitim sastojcima, među kojima su kanabinoidi, terpenoidi i flavonoidi, koji imaju ulogu u biološkoj aktivnosti kanabis biljke [Hazekamp et al., 2010; Small, 2017a]. Do sada je iz ove biljke izolovano i identifikovano 565 raznovrsnih hemijskih jedinjenja, uključujući 120 kanabinoida, jedinjenja koja su karakteristični sastojci kanabis biljke [ElSohly et al., 2017; Radwan et al., 2017]. Vremenom su neki kanabinoidi dobijeni sintetičkim putem, a 1990-tih godina su srodnna jedinjenja otkrivena i u živim organizmima, uglavnom sisara (endokanabinoidi). Zbog toga se u novije vrijeme za kanabinoide izolovane iz biljke često koristi izraz „fitokanabinoidi“, kako bi se isti razlikovali od sintetičkih kanabinoida i endokanabinoida [ElSohly and Slade, 2005; Brenneisen, 2007]. Međutim, u većini stručne literature izraz kanabinoidi još uvijek uglavnom podrazumijeva kanabinoide iz biljke, ako nije drugačije naglašeno. Kanabinoidi su grupa C₂₁ terpenofenolnih jedinjenja (ili C₂₂, ako su u formi kanabinoidnih karboksilnih kiselina) koji predstavljaju glavne aktivne hemijske sastojke karakteristične za kanabis biljku. U ovu grupu jedinjenja, pored neutralnih kanabinoida, spadaju njihove karboksilne kiseline, analozi i proizvodi razlaganja. [Raman and Joshi, 2003; ElSohly and Slade, 2005; Brenneisen, 2007; Hazekamp, 2008-2009; Small, 2015; Andre et al., 2016]. Prema struktturnom tipu, kanabinoidi se mogu razvrstati u 11 struktturnih grupa (Tabela 1) [ElSohly et al., 2017; Radwan et al., 2017].

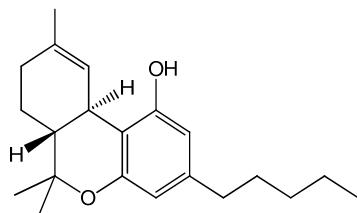
*Tabela 1. Strukturne grupe kanabinoida izolovanih iz biljke *Cannabis sativa* L.*

Strukturna grupa kanabinoida	Broj jedinjenja u grupi
1 (-)-Δ ⁹ -trans-tetrahidrokanabinol (Δ ⁹ -THC) tip	23
2 (-)-Δ ⁸ -trans-tetrahidrokanabinol (Δ ⁸ -THC) tip	5
3 kanabigerol (CBG) tip	16
4 kanabihromen (CBC) tip	9
5 kanabidiol (CBD) tip	7
6 kanabinodiol (CBND) tip	2
7 kanabielsoin (CBE) tip	5
8 kanabiciklol (CBL) tip	3
9 kanabinol (CBN) tip	11
10 kanabitriol (CBT) tip	9
11 ostali	30

Najzastupljeniji i forenzički najinteresantniji su tzv. osnovni kanabinoidi: tetrahidrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD) i kanabinol (CBN).

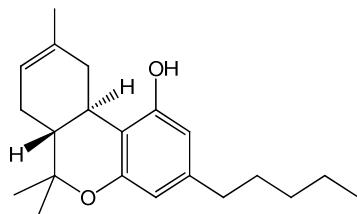
2.2.1. Tetrahidrokanabinol (THC)

Tetrahidrokanabinol (THC) je glavni psihoaktivni sastojak biljke *Cannabis sativa* L. i proizvoda dobijenih od nje. Prema hemijskoj nomenklaturi to je 6a,7,8,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-3-pentil-6H-dibenzo[b,d]piran-1-ol [WHO, 2018]. Zavisno od sistema numerisanja jedinjenja u organskoj hemiji ovo jedinjenje može biti nazvano Δ^9 -tetrahidrokanabinol (dibenzopiranski sistem) ili Δ^1 -tetrahidrokanabinol (monoterpenoidni sistem) [Raman and Joshi, 2003; Bell, 2006; Small, 2017a]. U literaturi se češće koristi dibenzopiranski sistem. Δ^9 -THC ima 2 hiralna atoma ugljika (C6a i C10a) koji generišu četiri stereoizomera: (–)-trans- Δ^9 -THC, (+)-trans- Δ^9 -THC, (–)-cis- Δ^9 -THC i (+)-cis- Δ^9 -THC. Iz kanabis biljke izolovan je (–)-trans- Δ^9 -THC (prema IUPAC nomenklaturi: 6a,10a-trans-6a,7,8,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-3-pentil-6H-dibenzo[b,d]piran-1-ol) dok su ostala tri izomera sintetizovana [WHO, 2018]. U forenzičkoj literaturi koristi se naziv (–)-trans- Δ^9 -tetrahidrokanabinol ili samo tetrahidrokanabinol (THC), pri čemu se, ako nije drugačije naglašeno, podrazumijeva Δ^9 -izomer (Slika 4).



Slika 4. Struktorna formula Δ^9 -THC

Izomer trans- Δ^8 -tetrahidrokanabinol (Slika 5) ima slabije psihoaktivno djelovanje, a kada je prisutan u biljci onda je to u mnogo nižoj koncentraciji od Δ^9 -izomera [Khan et al., 2012; Small, 2017a].



Slika 5. Struktorna formula Δ^8 - THC

Tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC) je prvi put izolovan 1942.godine, ali su tek 1964.godine njegovu strukturu identifikovali i objavili *Gaoni i Mechoulam*. Kasnije je sintetizovan i u laboratoriji [Brenneisen, 2007; Small, 2017a; ElSohly et al., 2017]. Na sobnoj temperaturi (–)-trans- Δ^9 -

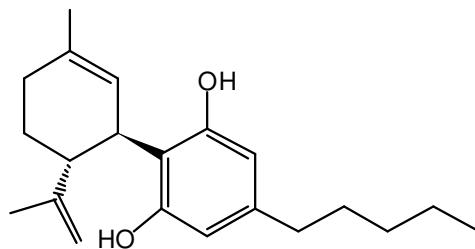
THC je bezbojna do svjetlo žuta uljasta tečnost [WHO, 2018] Kanabis biljka koja raste u prirodnim uslovima uobičajeno sadrži od 0,5 do 5% tetrahidrokanabinola, a u posebnim uslovima gajenja sadržaj tog psihoaktivnog sastojka može se povećati preko 25%.

Žlijezdane trihome koje luče smolu bogatu kanabinoidima nalaze se na skoro svim biljnim dijelovima, ali se razlikuje njihova gustina i veličina, što utiče na sadržaj kanabinoida u različitim dijelovima biljke. Ženski cvjetni vrhovi su glavni izvor kanabinoida, uključujući i psihoaktivni THC. Ženski cvjetovi uobičajno sadrže 10-12%, a neoprašeni cvjetni vrhovi mogu da sadrže znatno više od 20% THC. Gornji listovi obično sadrže 2-3%, za razliku od donjih listova sa 1-2% THC. Sadržaj THC u stabljici kreće se od 0,1 do 0,3%, dok u korijenu mogu biti prisutni tragovi THC (0,03%) [UNODC, 2009a; Potter, 2014]. Sjemenke uglavnom ne sadrže psihoaktivni sastojak, iako su neki autori prijavili da su našli malu količinu THC u unutrašnjosti sjemena (manje od 2 µg/g) [Ross et al., 2000]. Ross i saradnici [2005] su utvrdili prisustvo 16 kanabinoida u polenu biljke, uključujući i THC.

Ženske biljke sadrže znatno više psihoaktivnog sastojka od muških, ali i muške biljke mogu da sadrže potrošne količine THC. Mlade, nezrele biljke imaju znatno manje THC od zrelih biljaka. Stajanjem ubranog biljnog materijala nivo THC opada, a njegovom razgradnjom nastaje uglavnom CBN i manjim dijelom Δ^8 -THC. Razgradnji doprinose svjetlost, kiseonik, povišena temperatura i vlažnost [Hazenkamp et al., 2010; Small, 2017a].

2.2.2. Kanabidiol (CBD)

Kanabidiol (Slika 6) takođe ima psihoaktivno djelovanje, tako što umanjuje psihoaktivne efekte tetrahidrokanabinola.



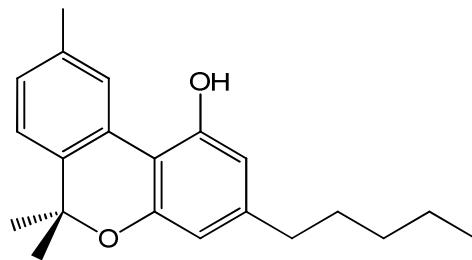
Slika 6. Strukturna formula kanabidiola (CBD)

Postupkom izomerizacije, u kiseloj sredini, moguće je konvertovati CBD u THC. U prvi mah se čini da to daje mogućnost da se industrijski varijeteti sa visokim sadržajem CBD mogu koristiti za dobijanje THC konverzijom, ali nema podataka o takvim pokušajima ilegalne proizvodnje THC, vjerovatno zbog složene hemijske reakcije konverzije [Thomas, M., 2012; Small, 2017a]. Pored reakcije provedene u laboratorijskim uslovima uz simuliranu želučanu

kiselinu, provedene su studije sa ljudima kojima je data relativno visoka oralna doza CBD, ali je ostalo nejasno da li se u organizmu dešava konverzija CBD u psihoaktivni Δ^9 -THC [Thomas, B. and ElSohly, 2016].

2.2.3. Kanabinol (CBN)

Kanabinol (Slika 7) je prvi izolovan kanabinoid, a njegova struktura je razjašnjena ranih 1940-tih godina. Svježe biljke ga ne sadrže u značajnijoj količini, a nastaje kao proizvod razlaganja Δ^9 -THC u ubranom biljnom materijalu, odnosno uskladištenim kanabis preparatima [Mechoulam and Ben-Shabat, 1999; Hazenkamp et al., 2010]. Smatra se da CBN ima ograničen psihoaktivni potencijal, oko 10% potencijala THC [Small, 2017a].



Slika 7. Strukturna formula kanabinola (CBN)

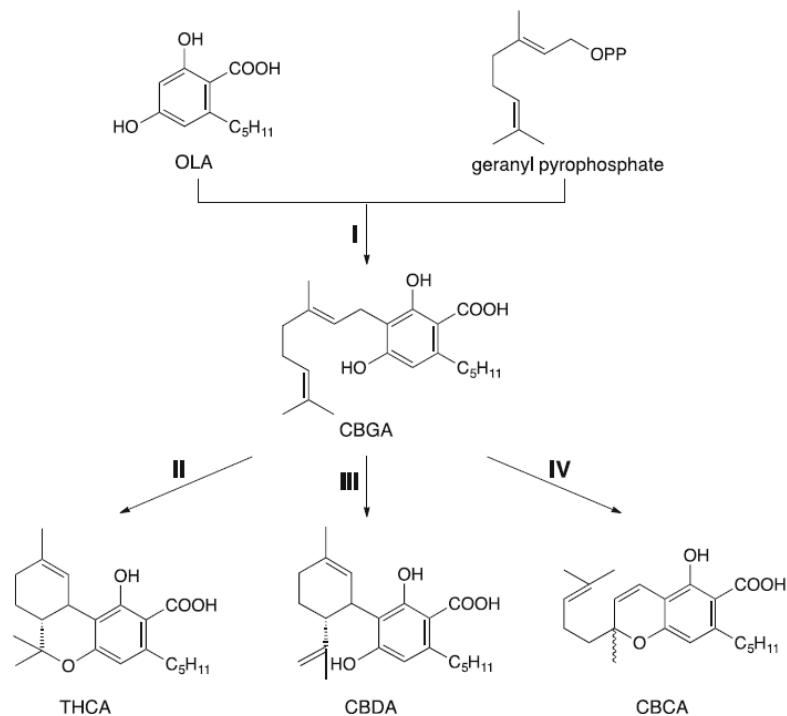
2.2.4. Ostali kanabinoidi

Kanabinoidi kao što su CBC, CBG, CBGM, CBDV, THCV nemaju psihoaktivno djelovanje u smislu izazivanja euforije, a ako su prisutni u biljci javljaju se u malim koncentracijama. [Small, 2017a]. Kanabihromen (CBC) i kanabihromevarin (CBCV) su u značajnijoj količini prisutni u listovima veoma mladih biljaka i njihova koncentracija opada sa zrenjem [de Meijer et. al., 2009; Potter, 2014].

Iako je poznat velik broj različih kanabinoida, to ne znači da su svi prisutni u svakom kanabis proizvodu. Oni su otkriveni tokom nekoliko dekada proučavanja mnogo različitih vrsta kanabis proizvoda i različitih, ponekad rijetkih, kanabis biljaka različitog porijekla i kvaliteta [Hazeckamp et al., 2010]. Na hemijski sastav biljke, koji može biti veoma različit, mogu da utiču klimatski uslovi, način uzgajanja, kvalitet zemljišta, oštećenja koja mogu nanijeti insekti. Promjene hemijskog sastava mogu se pojaviti, kako tokom rasta i razvoja biljke, tako i za vrijeme skladištenja ili tokom prerade kanabisa.

2.2.5. Biosinteza kanabinoida

Mehanizam biosinteze kanabinoida dugo je bio nejasan u nedostatku eksperimentalnih dokaza. U rasvjjetljavanju tog mehanizma ključna je bila identifikacija biosintetičkih enzima. Biosintetički put osnovnih kanabinoida sa bočnim pentil lancem ($-C_5H_{11}$) uspostavljen je srednom 1990-ih godina. Danas je poznato da kanabinoidi nastaju u formi karboksilnih kiselina metabolizmom biljke. Potvrđeno je da su geranil-pirofosfat na bazi terpena i olivetolna kiselina specifični intermedijeri u biosintezi kanabinoida. Međutim, biosinteza olivetolne kiseline još nije dovoljno poznata, ali se predpostavlja da uključuje poliketid sintazu. Zanimljivo je da sama olivetolna kiselina nikad nije izolovana iz biljnog materijala, što ukazuje da je ona intermedijer veoma kratkog vijeka trajanja. Prvi specifični korak u biosintezi je kondenzacija fenolnog derivata olivetolne kiseline sa geranil-pirofosfatom, tokom koje uz pomoć enzima nastaje kanabigerolna kiselina (CBGA) [Mahlberg and Kim, 2004; Hazekamp, 2008-2009; Small, 2015; ElSohly et al., 2017]. Dalje se iz CBGA, sintetizuju tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA), kanabidiolna kiselina (CBDA) i kanabihromenska kiselina (CBCA), svaka uz pomoć odgovarajućeg enzima, pri čemu je kanabigerolna kiselina (CBGA) prekursor za te kanabinoidne kiseline (Slika 8) [Small, 2017a; Sirikantaramas and Taura, 2017].



Slika 8. Shema biosinteze kanabinoidnih kiselina
(Izvor: Sirikantaramas and Taura, 2017)

Sekretorne ćelije žljezdanih trihoma, pored kanabinoida, proizvode i biosintetičke enzime. Tokom reakcije oksidociklizacije CBGA, pomoću enzima THCA-sintaze, pored THCA nastaje i vodonik-peroksid, koji kao i kanabinoidi ima antimikrobne osobine, te se smatra da kanabis biljka akumulira ova jedinjenja u žljezdanim trihomama na površini biljke radi samoodbrane od insekata, što je uobičajena funkcija sekundarnih metabolita kod biljaka [Hazekamp et al., 2010; Sirikantaramas and Taura, 2017].

U svježoj biljci kanabinoidi su uglavnom prisutni u formi kanabinoidnih kiselina, koje se pod uticajem svjetla, topote ili dužeg skladištenja, neenzimatskom dekarboksilacijom, odnosno gubitkom relativno nestabilne karboksilne grupe u obliku ugljen-dioksida, konvertuju u odgovarajuće dekarboksilovane analoge (neutralne kanabinoide), kao što su tetrahidrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG) i kanabiromen (CBC) [UNODC, 2009a; Hazekamp et al., 2010; Andre et al., 2016; Small, 2017a].

Grupa kanabinoida koji se pojavljuju kao rezultat degradativnih uslova zасlužuje posebnu pažnju, jer je njihovo prisustvo uglavnom rezultat različitih nepredvidivih uslova tokom rasta, žetve, prerade, skladištenja i upotrebe. Kao rezultat tih uslova, kanabis preparati mogu relativno brzo promijeniti svoj hemijski sastav i biološku aktivnost. Degradacija THC rezultira formiranjem CBN i Δ^8 -THC, dok THCA može degradirati do CBNA [Hazekamp et al., 2010].

Dakle, sa fitohemijskog aspekta kanabinoidi se mogu podijeliti u tri grupe: kanabinoidne kiseline (proizvodi biosinteze), neutralni kanabinoidi (proizvodi dekarboksilacije) i proizvodi degradacije [Hazekamp et al., 2010].

2.2.6. Sastojci nekanabinoidnog tipa

Kanabis biljka, pored kanabinoida, sadrži brojna druga jedinjenja. Prema posljednjim podacima, identifikovano je 445 različitih jedinjenja nekanabinoidnog tipa u kanabis biljci [ElSohly et al., 2017]. Iz različitih dijelova biljke izolovano oko 140 različitih terpenoida, 50 ugljovodonika, više od 70 azotnih jedinjenja (alkaloidi, amini, amidi, aminokiseline, proteini, glukoproteini i enzimi), preko 20 flavonida, više od 30 masnih kiselina (uglavnom nezasićenih) i više od 30 fenola. U biljci su prisutni i ugljeni hidrati (monosaharidi, disaharidi, polisaharidi, hidroksilni šećeri i amino-šećeri), zatim steroidi, terpeni, prosti alkoholi, aldehydi, ketoni, kiseline i esteri, fitosteroli, ksantofili, ciklitoli, karoten, vitamini i pigmenti, te 9 elemenata (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Hg). Većina ovih jedinjenja prisutna su i u drugim biljnim vrstama, te za razliku od kanabinoida, nisu specifična za kanabis [Brenneisen, 2007; Hazekamp, 2008-2009].

Žljezdane trihome, pored kanabinoida, proizvode i druge sekundarne metabolite, kao što su terpeni, koji su odgovorni za karakterističan miris kanabis biljke i njenih preparata [Andre et al., 2016; Fischedick, 2017]. Fitokanabinoidi i terpeni mogu djelovati sinergički, što može biti značajno za proširenje kliničke primjene i unaprijeđenje terapeutskog djelovanja kanabis preparata [Russo, 2011]. Primjer sinergije između terpena i fitokanabinoida, usmjerene odbrani od predavara, ogleda se u djelovanju smjesi monoterpena i seskviterpena određenog viskoziteta i ljepljivosti, koju luči biljka, a služi kao zamka za insekte, sa jedne strane, dok sa druge strane, fitokanabinoidne kiseline djeluju kao insekticid [Hazekamp 2008-2009; Andre et al., 2016].

2.3. Ciklus rasta i uzgoj

Cannabis sativa L. se dobro prilagođava klimatskim uslovima pa je široko rasprostranjena kao divlja samonikla biljka, ali se vijekovima uzgaja i kao kultivisana biljka. Kanabis biljka se može uzgajati iz sjemena ili iz reznica, na otvorenom ili u zatvorenom prostoru.

2.3.1. Uzgoj na otvorenom

Kanabis biljci pogoduje toplija klima i otvoren prostor sa dosta sunca, ali je tolerantna i prema nešto hladnijim klimatskim uslovima. Veoma je prilagodljiva i može uspjevati u veoma različitim klimatskim i ekološkim uslovima, zbog čega je široko rasprostranjena. U prirodi se biljka razmnožava iz sjemena, a rasprostire se vjetrom ili uz pomoć ptica i drugih životinja. Ova biljka može rasti u bilo kojoj vrsti zemljišta, mada je za kvalitet i dobar prinos potrebno dovoljno vlažno, ali ne močvarno tlo. Kanabis dobro uspjeva u rastresitom pjeskovitom zemljištu, ilovači, dobro strukturiranoj neutralnoj do alkalnoj glini, dobro dreniranoj, ali sa dovoljnim kapacitetom zadržavanja vode. Sjeme obično klija 3-7 dana nakon sijanja, a brže klija sjeme pripitomljenih varijeteta u odnosu na sjeme divljih biljaka. Oko 90% svježeg sjemena je sposobno klijati, dok se sposobnost klijanja smanjuje starenjem sjemena, što zavisi i od uslova čuvanja, pa se preporučuje čuvanje u hladnom prostoru kako bi zadržalo odgovarajući sadržaj vlage (oko 10%) i sposobnost klijanja [Raman, 2003; Thomas, M., 2012; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a].

Za dobar prinos, zemljište treba biti bez korova, dobro đubreno, sa dovoljno hranjivih sastojaka. Kao i većini biljaka i kanabis biljci su potrebni različiti nutrijenti u različitim fazama života. Pored primarnih makronutrijenta, kao što su azot (N), fosfor (P) i kalijum (K), potrebni su i

sekundarni nutrijenti: kalcijum (Ca), magnezijum (Mg) i sumpor (S), koji su obično prisutni u zemljištu, a mogu se dodati i putem odgovarajućih preparata. Mikronutrijente, kao što su željezo (Fe), bor (B), hlor (Cl), mangan (Mn), bakar (Cu), cink (Zn) i molibden (M), biljka koristi u manjim količinama. Kanabis je prirodno nitrofilna biljka, koja u fazi klijanja i vegetativnoj fazi treba dosta azota, koji potiče rast biljke i sintezu proteina, dok u fazi cvjetanja biljka treba više kalijuma, a posebno fosfora koji potiče cvjetanje. Rastvor hidrogen peroksida (H_2O_2) koristi se za povećanje sadržaja kiseonika, ali i kao zaštita od bakterija i gljivica. Kanabis biljka je prilično otporna na insekte i druge štetne organizme, pa rijetko zahtijeva tretman zaštite, mada određeni insekti, bakterije, virusi i gljivice mogu napasti pojedine biljne dijelove. Osjetljivost kanabis biljke na štetočine i biljne bolesti varira zavisno od uslova gajenja i genetskog faktora (varijeteta). Npr., rijedak je značajniji uticaj insekata, bolesti ili korova na prinos vlaknastih varijeteta, te se oni mogu uzgajati organski, bez primjene herbicida, insekticida i fungicida. S druge strane, veliku štetu na plantažama konoplje mogu izazvati divlje životinje i ptice [Green, 2001; Thomas, M., 2012; Small, 2017a].

Sezona uzgoja kanabis biljke varira od četiri do devet mjeseci, zavisno od podneblja i varijeteta biljke, a obično počinje u martu ili aprilu, dok je za sjevernu hemisferu karakteristično da se sije u maju. Biljka raste dnevno 7-10 cm, a pod povoljnim uslovima i do 15 cm po danu, a vegetacioni period traje oko 3 mjeseca [Green, 2001; Raman, 2003; Thomas, B. and ElSohly, 2016; Small, 2017a; ElSohly et al., 2017]. Ciklus cvjetanja varira i može trajati između 4 i 12 sedmica, što zavisi od varijeteta i uslova okoline (npr. viša temperatura može ubrzati cvjetanje). Kod biljaka koje rastu iz reznica proces cvjetanja može potrajati sedmicu ili nešto duže. Sjeme sazrijeva krajem tople sezone, a njegovom širenju u prirodnim uslovima doprinose ptice. Znak zrelosti biljke je boja stigme koja nalikuje kosi (dlakama). Kada oko 75% stigme promijeni boju iz bijele do smeđe ili narandžaste, biljke su spremne za berbu. Muške biljke sazrijevaju 1-3 sedmice prije ženskih, te se preporučuje prvo branje muških biljaka, a oko 15 dana kasnije beru se i ženske biljke. Biljke se obično beru od kraja avgusta do sredine oktobra, a zavisno od podneblja sezona može da traje i do novembra [Green, 2001; Lee, 2005; UNODC, 2009a; Small, 2017b]. Morfologija muških biljaka je prilagođena za širenje polena posredstvom vjetra (više su od ženskih, a razgranati cvjetovi doprinose da prašnici budu izloženi vjetru). Pošto muške biljke proizvode veliku količinu polena, za opršivanje je dovoljan manji broj biljaka, te se većina muških biljaka može brati odmah nakon cvjetanja. Uloga muških biljaka je proizvodnja polena, te one uvenu ubrzo poslije opršivanja. Ženske biljke u prirodnim uslovima preživljavaju do početka surovih klimatskih uslova (mraza u umjerenim zonama ili suše u

tropskim), a kada se uzgajaju u zatvorenom prostoru, ženske bijke mogu opstati više godina. [Raman, 2003; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a].

Vegetativni rast, sazrijevanje i prinos mogu se pospješiti upotrebom vještačkih đubriva, biljnih hormona, steroida, insekticida i tehnika navodnjavanja. Dakle, uslovima gajenja svjesno se može uticati na osobine biljke i kvalitet pojedinih njenih dijelova, što pokazuje da pripadnost biljke određenom varijetetu nije stalna nego promenljiva kategorija. Uslovi gajenja na koje utiče čovjek, zavise od namjene za koju se uzgaja. Ukoliko se biljka uzgaja za proizvodnju vlakana sadiće se gušće jedna do druge, čime je grananje ograničeno, pa će stabljične biti duge i vitke, a vlakna kvalitetnija [Thomas, M., 2012; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a]. S druge strane, ukoliko se kanabis biljka uzgaja za medicinsku i rekreativnu upotrebu, sije se sa većim razmakom (oko 1,3 m), jer će biljke u tom slučaju biti razgranatije, sa više lišća i cvjetnih vrhova, koji su sirovina za proizvodnju kanabis preparata [Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a].

Nakon opršivanja ženske biljke svu energiju usmjeravaju na proizvodnju sjemena, što negativno utiče na proizvodnju biljne smole. Kanabis smola je ljepljiva i smatra se da je biljka koristi kako bi uhvatila polen, stoga neoprašene biljke proizvode više smole. Kanabis smola sadrži kanabinoide, uključujući i psihoaktivni tetrahidrokanabinol (THC), što znači da biljke sa više smole imaju i veći sadržaj psihoaktivnog sastojka. U određenoj fazi razvoja može se uklanjati cvat sa muških biljaka, prije nego što oslobode polen, kako ne bi došlo do opršivanja ženskih biljaka i razvoja sjemena. Ovako uzgojene ženske biljke mogu imati i do pet puta više THC, a poznate su pod nazivom "sensemila" (od španske riječi *sen semile*, što znači "bez sjemena"). Sensemila se može proizvoditi i pomoću vještačkih izazvanih ženskih hermafrodita ili kloniranjem, pa se pojam sensemila se više odnosi na tehniku uzgoja nego na genetski soj [Iversen, 2000; Green, 2001; Legget, 2006; Thomas, M., 2012].

Iako je pol biljke genetski determinisan, faktori okoline, uključujući ciklus dnevne svjetlosti, mogu uticati na promijenu pola. Prirodni hermafrodit sa muškim i ženskim dijelovima obično su sterilni, dok vještački izazvani hermafrodit mogu imati potpuno funkcionalne reproduktivne organe. „Feminizovano” sjeme proizvodi se iz ženske biljke tretirane hormonima ili srebro tiosulfatom, što uzrokuje pojavu vještačkih hermafrodita, gdje polen muškog cvijeta oprasi ženski cvijet, a kao rezultat dobiju se sjemenke koje nemaju muškog hromozoma. Od feminizovanog sjemena dobiju se ženske biljke i do 20% hermafrodit, dok se od prirodnog sjemena očekuje podjednak prinos (po oko 50%) muških i ženskih biljaka [UNODC, 2009a; Thomas, M., 2012].

Kloniranje podrazumijeva uzimanje reznica od tzv. „majke“ biljke i presađivanje, pri čemu će klon biti potpuna genetska kopija majke biljke [Green, 2001; Thomas, M., 2012]. Ipak, najveće količine kanabisa u svijetu još uvijek se uzgajaju iz sjemena i na otvorenom [UNODC, 2009a].

Vještačkim načinom uzgoja, ukrštanjem *sativa* i *indica* sojeva, dobijeni su hibridi koji ranije sazrijevaju, daju dobar prinos i imaju visok sadržaj psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola (THC). Dobar primjer je tzv. „skunk“ hibrid, za koji se može reći da je 75% subsp. *sativa* i 25% subsp. *indica*. Ovaj hibrid je jedan od prvih koji kombinuje visoki sadržaj THC, karakterističan za *C. sativa* subsp. *sativa*, sa brzim ciklusom rasta i prinosom, karakterističnim za *C. sativa* subsp. *indica*. Smatra se da naziv hibrida potiče od intenzivnog mirisa, koji ga karakteriše (eng. *skunk* = tvor), mada se sve češće naziv „skunk“ koristi za sve kanabis biljke sa visokim sadržajem THC [Leggett, 2006; UNODC, 2009a].

Za forenziku i pravosuđe ponekad može biti značajna procjena srednjeg i/ili minimalnog prinosu. Međutim, prinos je teško procjeniti, jer dosta zavisi od sorte, tehnike uzgoja, prehrane, intenziteta, trajanja i dinamike svjetlosti itd. Na otvorenom prostoru prinos varira od niskog (oko 50 g/m²) kod samoniklih biljaka koje rastu u manje povoljnim klimatskim uslovima i bez navodnjavanja, do oko 500 g/m² kod biljaka u vrtovima i na plantažama koji se dobro održavaju [Leggett, 2006]. Kada se biljke gaje za medicinsku ili rekreativnu svrhu, može se očekivati dobar prinos suhih vrhova po zreloj biljci, zavisno od uslova tokom sezone. Npr. ako su biljke izložene sunčevoj svjetlosti oko 5 sati dnevno, uz dovoljno prostora po stabljici, prinos, zavisno od varijeteta, može biti i preko 900 g suhih vrhova po biljci (varijitet *Cannabis sativa*). Pri istim uslovima, prinos varijeteta *Cannabis indica* je oko 500 g suhih vrhova po biljci, dok je prinos varijeteta *Cannabis ruderalis* do 300 g po biljci [Thomas, M., 2012].

Uzgoj na otvorenom ima određene prednosti, ali i određene nedostatke u odnosu na uzgoj u zatvorenom prostoru. Na otvorenom su biljke obično više, razgranatije i imaju više biomase. Uzgoj u prirodnom okruženju ne zahtjeva ulaganje u opremu, za razliku od uzgoja u zatvorenom prostoru. Primarni nedostatak uzgoja na otvorenom je teža kontrola klimatskih uslova, koji mogu biti nepovoljni, pa nevrijeme i oluje mogu nanijeti znatnu štetu na plantaži. Na otvorenom se postiže jedna žetva u sezoni, dok se u zatvorenom prostoru može postići 3-5 ciklusa godišnje [Thomas, B. and ElSohly, 2016].

2.3.2. Uzgoj u zatvorenom

Zbog povećanih aktivnosti službi za sprovođenje zakona na iskorijenjivanju ilegalnih plantaža, uzgajivači su se premjestili u zatvorene prostore, kao način da izbjegnu otkrivanje od strane

istražitelja, koji za otkrivanje plantaža često koriste pregled terena iz aviona [Lee, 2005; Small, 2017a]. Uzgoj u zatvorenom prostoru, pod vještačkim uslovima, postao je popularan 1990-tih godina, a u nekim zapadnoevropskim zemljama to je dominantan način proizvodnje visokotentne kanabis biljke [Clarke and Watson, 2007]. U Holandiji, više od polovine kanabisa konzumiranog u namjenskim klubovima potiče iz domaćeg uzgoja u zatvorenom prostoru [Iversen, 2000]. Pored optimalnih uslova uzgoja, uglavnom se koriste veoma potentni hibridi, kao što su "skunk/tvor", "white widow/bijela udovica" itd. [UNODC, 2009a].

U zatvorenom prostoru kanabis biljka se može uzgajati u zemljištu na klasičan način, a mogu se primjeniti organska ili hidropomska metoda uzgoja. Metoda organskog uzgoja podrazumijeva uzgoj bez primjene pesticida ili vještačkog đubriva, a organski nutrienti se, pod uticajem mikroorganizama, lagano razlažu u zemljištu. Hidropomska tehnika podrazumijeva uzgoj biljaka u hranjivoj podlozi umjesto tla. Kao podloga se koriste inertni sterilni mediji: šljunak, pjesak, mineralna vuna, kokosova vlakna, glinene kuglice, vermikulit i sl., a nutrienti se rastvaraju u vodi i dovode biljkama putem raznih tehnika navodnjavanja. Prednosti ove tehnike ogledaju se u brzini uzgoja (3/4 vremena u odnosu na uzgoj u zemlji), fleksibilnosti tehnike i mogućnosti kontrole optimalnog nivoa prihrane, pa se primjenom hidroponike može značajno pospješiti rast i kvalitet biljaka, zbog čega hidroponski uzgoj kanabisa ima rastući trend. Iako se hidropomske tehnike češće koriste u zatvorenom prostoru, moguće ih je primjeniti i na otvorenom [Green, 2001; Thomas, M., 2012].

Dok uzgoj kanabisa iz sjemena podrazumijeva da oko polovine usjeva mogu biti muške biljke, koje imaju manje psihoaktivnog sastojka, pa su manje cijenjene za proizvodnju droge, kod intenzivne plasteničke proizvodnje to se obično izbjegne kloniranjem od majke biljke. Postupak kloniranja često se kombinuje sa proizvodnjom u zatvorenom, a biraju se niži i kompaktniji varijeteti koji mogu formirati cvjetne vrhove od vrha do dna biljke. Proizvodnja u zatvorenom prostoru, pod vještačkim uslovima, uglavnom je zastupljena u tehnološki razvijenim zemljama, gdje se obično koriste veliki podrumi, neiskorišteni komercijalni i industrijski objekti (skladišta, zatvorene fabrike), nenaseljene kuće, a ima slučajeva da je jedna ili više soba u kućama ili stanovima pretvorena u prostor za uzgoj [UNODC, 2009a]. Uzgajivači kanabisa u zatvorenom često primjenjuju napredna agronomска dostignuća, kao što su: automatsko snabdijevanje hranjivim materijama i vodom, klima uređaji, sistemi za filtriranje i dezodorisanje vanjskog vazduha i atmosferu obogaćenu ugljen-dioksidom, kontrolu temperature i vlažnosti u prostoru, te sistemi za automatsko osvjetljenje za oponašanje faza dana i noći. Navedeni sistemi utiču na povećanu potrošnju električne energije. Stoga istražioci, u novije vrijeme, koriste helikoptere

opremljene termalnim kamerama, kako bi identifikovali neuobičajene izvore topote u naizgled napuštenim kućama, što zajedno sa visokim računima za električnu energiju, može biti pokazatelji da se kuće ne koriste za stanovanje nego za neke druge radnje, kao što je uzgoj marihuane [Lee, 2005; Thomas, M., 2012; Small, 2017a].

U različitim fazama razvoja biljka zahtijeva različite uslove, stoga je prilikom uzgoja u zatvorenom prostoru važno zadovoljiti sljedeće zahtjeve: svjetlost odgovarajućeg spektra, voda odgovarajuće temperature, izbalansirani nutrijenti, dobra cirkulacija vazduha obogaćenog ugljen-dioksidom, odgovarajuća temperatura i vlažnost u prostoru.

Svetlost, kao vitalna komponenta za fotosintezu u biljkama, je jedan od glavnih faktora koji utiče na rast biljke. Odgovarajući kvalitet svjetla, optimalnog intenziteta i izblanasirani fotoperiodi veoma su važni prilikom uzgoja u zatvorenom prostoru [Green, 2001; Chandra et al., 2008; Potter and Duncombe, 2012; Thomas, B. and ElSohly, 2016]. Kod uzgoja u zatvorenom, svjetlost se obezbjeđuje pomoću odgovarajućih lampi. Postoji veliki izbor lampi koje se mogu koristiti za ovu svrhu, a veoma dobar izbor su profesionalne lampe visokog intenziteta pražnjena (*High Intensity Discharge Lamps/HID*), pri čemu se najbolji rezultati postižu kombinovanjem lampi sa halogenidima metala (*Metal halides/MH*) u fazi vegetativnog rasta i natrijumskih lampi visokog pritiska (*High Pressure Sodium/HPS*) u fazi cvjetanja. Biljke bolje uspjevaju uz više svjetla, zbog čega je potrebno obezbjediti dovoljno lampi koje će dati dovoljnu količinu svjetla [Green, 2001; Thomas, M., 2012]. Lampe se postave iznad biljaka na odgovarajućoj udaljenosti, tako da biljke prime dovoljno svjetla, a da ne dođe do pregrijavanja biljaka (Slika 9).



Slika 9. Uzgoj kanabis biljke u zatvorenom prostoru

Radi maksimalnog iskorištenja svjetlosti, iznad lampi su postavljene reflektujuće površine koje svjetlost usmjeravaju ka biljkama. Boljoj raspodjeli svjetla u prostoriji za uzgoj doprinijeće bijela boja zidova ili pokrivanje zidova reflektujućim materijalom (npr. aluminijске folije). Bolje opremljene uzgajivačnice raspolažu automatskim sistemima za upravljanje svjetlom (periodično paljenje i gašenje lampi) kojim se oponašaju faze dana i noći i tako utiče na brzinu rasta i sazrijevanja biljaka. Biljke se izlažu vještačkom svjetlu 18 ili više sati u vegetativnoj fazi, radi podsticanja bržeg rasta, dok je u fazi cvjetanja važno da biljke borave u tami 12 sati dnevno. Ultraljubičasto svjetlo podstiče proizvodnju tetrahidrokanabinola (THC) u biljci i smatra se da ga biljka proizvodi radi zaštite od štetnog djelovanja UV-zračenja, jer je poznato da više THC proizvode biljke koje rastu na višim nadmorskim visinama. Zato ilegalni uzgajivači koriste UV-lampe za proizvodnju biljaka sa višim nivoom THC, tako što se biljke izlažu UV svjetlu 3 puta dnevno po 10 minuta [Green, 2001; Thomas, M., 2012; ElSohly et al., 2017].

Cirkulacija vazduha je veoma važan faktor, a prilikom uzgoja u zatvorenom prostoru postiže se pomoću ventilacionih sistema. Ugljen-dioksid je neophodan za rast biljke. Kod koncentracije CO₂ oko 700 µmol/mol ubrzava se fotosinteza kod različitih varijeteta kanabisa za 38-48% u odnosu na koncentraciju CO₂ u atmosferi (oko 390 µmol/mol), pri čemu se očekuje povećan prinos [Chandra et al., 2008; Chandra et al., 2011; ElSohly et al., 2017]. Veoma su efikasni generatori sa automatskim sistemom za obogaćivanje atmosfere ugljen-dioksidom, gdje programirani sistem isključuje snabdijevanje u periodu kada biljka ne treba CO₂ (tokom oponašanja faze noći) [Thomas, M., 2012].

Temperatura prostora održava se pomoću klima uređaja i grijalica, uz ventilatore koji obezbjeđuju kruženje vazduha u prostoru. Preporučuje se dnevna temperatura prostora u intervalu 21-26°C, a kada se dodaje CO₂, preporučuje se 26-32°C. Tokom noći temperaturu treba održavati iznad 15°C. Za vrijeme vegetativnog rasta preporučuje se vlažnost vazduha 50%, a za vrijeme cvjetanja između 30% i 40% [Thomas, M., 2012].

Potrebna količina vode zavisi od faze rasta biljke. Tokom rane vegetativne faze preporučuje se održavanje dovoljno vlage u zemljištu, a kasnije je potrebno periodično zalijevati zavisno od količine zemlje ili supstrata, temperature, vlažnosti okoline i dr. faktora [Thomas, B. and ElSohly, 2016; ElSohly et al., 2017].

Neophodni nutrijenti u hidroponskoj prihrani su makronutrijenti (potrebni u većim količinama), kao što su: N, K, P, Mg, Ca i S i mikronutrijenti (potrebni u manjim količinama). Biljci su

takođe potrebni ugljenik, kiseonik i vodonik koje dobija iz vode i atmosfere. Treba voditi računa o tvrdoći vode sa kojom se pripremaju hidroponski rastvori, te podešavanju optimalne pH vrijednosti. Idealan pH za uzgoj kanabisa u hidroponskim rastvorima je oko 5,5, za razliku od uzgoja u zemlji gdje se preporučuje pH od 6,5 do 7 [Thomas, M., 2012; Small, 2017a]. Za optimalno iskorištenje, temperatura nutritivnih rastvora podešava se na oko 24°C. Za dobijanje boljeg prinosa i kvaliteta mogu se koristiti razni preparati koji sadrže stimulatore rasta, hormonske i vitamske suplemente i sl. [Thomas, M., 2012].

Prinos značajno varira zavisno od više faktora, kao što su: varijetet, intenzitet svjetla, uslovi okoline, tehnike uzgoja, vrijeme branja i sl., te se u literaturi mogu naći različiti podaci o prinosu suhih cvjetnih vrhova, po biljci ili po jedinici površine. Neki autori navode prinos oko 50-250 g suhih cvjetnih vrhova po biljci, zavisno od prostora po stabljici, dužine vegetativnog perioda, intenziteta osvjetljenja i drugih faktora [Thomas, M., 2012], dok neki navode da se prinos obično kreće od 250 do 500 g/m², po ciklusu [Small, 2017a]. Toonen i saradnici [2006] procijenili su prosječan prinos od 33,7 g po biljci ili 505 g/m², prilikom uzgoja u zatvorenom prostoru sa prosječnom gustinom od 15 biljaka/m². Vanhove i saradnici [2011, 2012] su zaključili da prinos po biljci, pored varijeteta, zavisi od gustine biljaka, pri čemu je viši prosječan prinos po biljci pri manjoj gustini biljaka, dok je prinos po kvadratnom metru bio približno isti. Oni su takođe pokazali da veći intenzitet svjetla pozitivno utiče na prinos. Kada se gaji u zatvorenom prostoru kanabis biljka, zavisno od varijeteta i tehnike uzgoja, sazre za oko 8 do 10 sedmica, što omogućuje 4 do 6 ciklusa godišnje u istom prostoru, odnosno kontinuiranu proizvodnju tokom cijele godine, pri čemu ukupan prinos suhih cvjetnih vrhova može biti znatno veći od 2 kg/m² [Leggett, 2006; Toonen et al., 2006; Thomas, M., 2012].

2.4. Upotreba

Biljka *Cannabis sativa* L. je jedna od najstarijih kultivisanih biljaka na svijetu. Vijekovima se uzgajala kao poljoprivredna kultura i industrijska biljka. Pojedini dijelovi konoplje bili su sirovina za proizvodnju različitih proizvoda, a korištena je u religioznim i kulturološkim ritualima, ali i u ljekovite svrhe [Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a].

Psihoaktivne osobine konoplje bile su razlog za kontrolu, a u mnogim zemljama i potpunu zabranu njene proizvodnje, zbog čega je uzgoj ove poljoprivredne kulture u svijetu značajno opao sredinom XX vijeka. Kao posljedica stavljanja pod kontrolu legalnog uzgoja, počela je da cvjeta ilegalna proizvodnja, pa se od tada do danas najveće količine konoplje u svijetu užgajaju

radi proizvodnje preparata namijenjenih za rekreativne svrhe (ilegalne droge). Strogi zakonski propisi u mnogim zemljama još uvijek ograničavaju legalni uzgoj konoplje. Ipak, zbog sve većeg interesa za proizvodnju različitih korisnih i ekološki prihvatljivih proizvoda, može se očekivati da će vremenom propisi postati fleksibilniji [Small, 2017a].

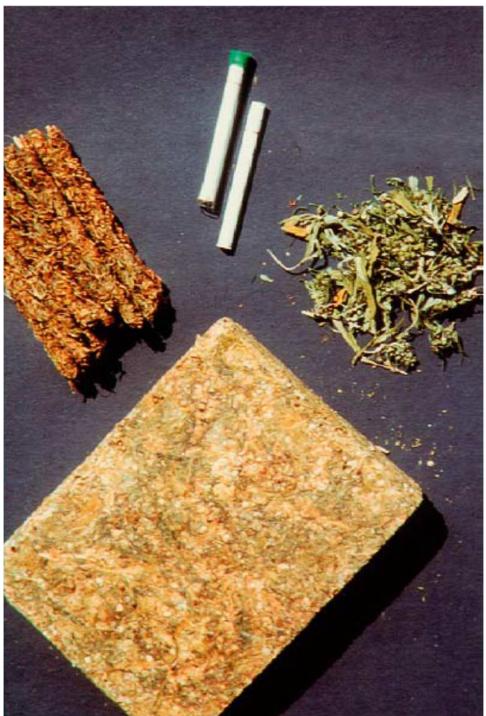
2.4.1. Ilegalni kanabis preparati

Biljka *Cannabis sativa* L. je osnovna sirovina za proizvodnju ilegalnih kanabis preparata koji se mogu svrstati u tri glavne grupe: biljni kanabis (marihuana), kanabis smola (hašiš) i tečni kanabis (kanabis ulje). Različit sadržaj psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola (THC) u kanabis preparatima, rezultat je, kako postupka proizvodnje, tako i biljnih dijelova korištenih za proizvodnju određenog preparata. Proizvedeni od raznolikih varijeteta kanabis biljke, primjenom različitih postupaka proizvodnje, a potom podvrgnuti obradi i transformaciji u svrhu trgovine i konzumiranja, kanabis preparati se na tržištu mogu pojaviti u mnoštvu oblika, da skoro ne postoje dva ilegalna kanabis preparata istog pojavnog oblika.

2.4.1.1. Biljni kanabis (marihuana)

Osušeni biljni materijal je ilegalni preparat najjednostavnijeg načina proizvodnje, koji se sastoji u sušenju biljnog materijala na vazduhu, slično duvanu. Širom svijeta postoji mnogo različitih naziva za ovaj preparat, ali je naziv „marihuana“ najrašireniji i najpoznatiji.

Sadržaj vlage u svježim biljkama iznosi oko 75-80%. Najjednostavniji postupak sušenja vrši se tako da se cijele biljke ili dijelovi biljke (cvjetni vrhovi) okrenu naopako i suše na vazduhu, u tamnom i ventiliranom prostoru [Green, 2001]. Zavisno o vlažnosti i temperaturi okoline, sušenje prirodnim putem može da traje od 72 sata do jedne sedmice, a preostali sadržaj vlage u biljnom materijalu je oko 8-13% [UNODC, 2009a; Small, 2017a]. Sušenje se može provoditi u sušnici ili industrijskim sušarama za duvan, kada su u pitanju velike količine. Preporučena temperatura za sušenje u sušnici je oko 40°C, a svakako ne treba biti viša od 70°C, pri čemu je obično dovoljno sušenje preko noći [UNODC, 2009a; Thomas, B. and ElSohly, 2016; ElSohly et al., 2017]. Sušenje je završeno kada stabljične i listove uz cvjetne vrhove postanu krhki. Ileglni uzorci ponekad sadrže nešto više vlage (12-16%), radi veće mase u svrhu prodaje, dok je kod biljaka za medicinsku upotrebu preporučen sadržaj vlage oko 10%. Nakon uklanjanja stabljične i sjemena, iskorištenje je između 1/4 i 1/3 (oko 28%). Uopšteno, prosječan odnos masa vlažne biljke : masa osušene biljke : masa proizvoda, iznosi približno 10:3:1 [Leggett, 2006].



Slika 10. Različite forme marihuane
(Izvor fotografije: UNODC, 2003)

Nakon sušenja listovi i cvjetni vrhovi se manje ili više usitne i tako pripremljen proizvod se već može konzumirati. Ilegalno pripremljen biljni materijal, pored gornjih listova i cvjetnih vrhova (u kojima je najveća koncentracija psihohemikalijskog sastojka THC), nerijetko sadrži donje listove, listove muških biljaka koji sadrže manje THC, sitnije djeliće stabljike, peteljke i poneku sjemenku.

Forma osušenog i usitnjene biljnog materijala je uobičajen oblik ovog ilegalnog preparata, a može se naći i u obliku blokova presovanog biljnog materijala (komprimovane ploče) ili nekoj sličnoj formi [UNODC, 2009a].

Osušen biljni materijal može se čuvati nekoliko mjeseci. Preporučuje se čuvanje u tamnom i hladnom prostoru, jer THC degradira sa vremenom, posebno kada je materijal izložen vazduhu, svjetlu, povišenoj temperaturi i vlažnosti. Kraće vrijeme se može čuvati na temperaturi 18-20°C, dok se za dugotrajno čuvanje preporučuje temperatura od -10°C [ElSohly et al., 2017].

Pojavni oblici biljnog materijala variraju na ilegalnom tržištu od regije do regije, ali i među zemaljama pojedine regije. Visoko kvalitetan proizvod može se dobiti prosijavanjem izlomljenog kanabis biljnog materijala, radi uklanjanja dijelova biljke koji ne sadrže, ili sadrže relativno nizak nivo kanabinoida (kao što su sjemenke i dijelovi stabljike), čime se vrši svojevrsno obogaćivanje. Ovaj preparat, karakterističan za Sjevernu Afriku, poznat je kao „kif”. Tako prosijan biljni materijal ima visok sadržaj kanabis smole i može se presovati u ploče, slično hašišu. Ipak, radi se o određenom obliku „prečišćene marijuane”, jer se mikroskopskim pregledom može utvrditi da su zadržana esencijalna biljna obilježja [UNODC, 2009a].

Kombinacijom varijeteta sa visokim sadržajem THC i optimalnih uslova gajenja mogu se dobiti proizvodi sa 2 do 10 puta većim sadržajem THC nego u kasnim 1980-tim, kada je marijuana obično imala do 5% THC. U posljednjim decenijama nisu rijetki uzorci sa sadržajem THC preko 10% [UNODC, 2009a], a zabilježeni su i primjeri sa oko 30% THC u suhoj masi biljnog materijala [Small, 2017a].



Marihuana se najčešće konzumira pušenjem, sama ili pomiješana sa duvanom, tako što se umota u improvizovane cigarete (“joint”) ili korištenjem različitih lula. Smatra se da pušenje kanabisa sa duvanom može udvostručiti otpuštanje THC u dim, u poređenju sa pušenjem čistog kanabisa, ali mehanizam tog djelovanja još uvijek nije razjašnjen [Hazekamp et al., 2010]. Biljni materijal se može konzumirati i oralno, najčešće u obliku različitih napitaka (čaj). To su obično preparati sa manjim psihoaktivnom potencijalom, jer na temperaturi ključanja vode dekarboksilacija THCA kiseline (koja nije psihoaktivna) do psihoaktivnog THC nije potpuna, kao što je to prilikom konzumiranja pušenjem (na višoj temp.).

Slika 11. Nargila

Poznato je da se THC slabo rastvara u vodi, a rastvorljiv je u mastima, pa se dodatkom mlijeka u čaj može povećati rastvorljivost THC. Pošto je THC dobro rastvorljiv u alkoholu, kanabis biljka je pogodna za pripravljanje tinktura. U improvizovanim uslovima biljni materijal se jednostavno prelije alkoholnim pićem i ostavi 6-8 sedmica da se kanabinoidi rastvore [Small, 2017a].

Na našem prostoru uglavnom je zastupljen najjednostavniji način prerade (sušenje i usitnjavanje biljnog materijala) i konzumiranje pušenjem.

2.4.1.2. Kanabis smola (hašiš)

Kada se prikuplja smolasta izlučevina biljke, proizvedena u žlezdanim trihomama, koje su najgušće na cvjetnim vrhovima i listovima biljke, dobije se proizvod sa višim sadržajem THC, koji uglavnom ne sadrži prepoznatljive biljne dijelove. Prerada konoplje u cilju proizvodnje biljne smole, poznatije kao “hašiš”, može se vršiti na više načina, koji mogu biti karakteristični za određena geografska područja [Small, 2017a]. Za razliku od marihuane, koja se proizvodi u skoro svim dijelovima svijeta, proizvodnja kanabis smole uglavnom je locirana u nekoliko regija: zemlje sjeverne Afrike, oko južnog i istočnog dijela Mediterana i zemlje Srednjeg istoka, te južne i jugozapadne Azije, u kojima se koriste različiti postupci za proizvodnju kanabis smole, mada se uopšteno može reći da države jedne regije koriste slične tehnike [UNODC, 2009a, 2016b]. Npr. u južnoj i jugozapadnoj Aziji se tradicionalno koriste sljedeće tehnike:

tresenje biljnog materijala (npr. od zid), trljanje biljnog materijala između dlanova ili odgovarajućeg platna, usitnjavanje suhog biljnog materijala u praškasti oblik koji se kasnije gnjeći, te potapanje biljnog materijala u ključalu vodu i skidanje smole sa površine [UNODC, 2016a]. Zavisno od postupka, za dobijanje 1-3 kg smole potrebno je oko 100 kg prosijanog kanabis biljnog materijala (kif) [Stambouli et al., 2005].



Slika 12. Kanabis smola (hašiš)
(Izvor fotografije: UNODC, 2003)

Za proizvodnju hašiša obično se koriste varijeteti koji daju dosta smole, iako pored psihoaktivnog THC mogu da sadrže i značajnije količine CBD [Clarke and Watson, 2007; Small, 2017b].

Karakterističan pojavnji oblik ovog proizvoda je smolasta supstanca smeđe boje, koja starenjem poprima tamniju, skoro crnu boju. Obično se presuje u blokove i pogače različitih oblika, a pošto vremenom gubi vlagu, postaje suha i krta, pa se može usitniti u praškasti oblik [UNODC, 2009a].

Paralelno sa razvojem uzgoja u zatvorenom prostoru, razvijen je efikasan metod odvajanja smole u posebnim uređajima. Uređaji mogu biti na principu rotacije uz hlađenje, što pospješuje odvajanje smole koja se lijepi na plastične zidove uređaja ili sita sa mehaničkom mješalicom u koje se stave kocke leda koje uzrokuju da se kuglice smole zamrznu i spadaju sa biljke, te hvataju u odgovarajuća sita. Ovim postupkom može se postići obogaćivanje tetrahidrokanabinolom i do 8 puta [UNODC, 2009a].

Koncentracija psihoaktivne supstance u kanabis smoli (hašišu) je znatno veća nego u bilnjom materijalu i uobičajeno se kreće od 5% do 25%, a može biti 45%, pa i više [Small, 2017a]. Kada se koriste visokotentni biljni varijeteti, u kombinaciji sa mehaničkim tehnikama za prikupljanje smole, može se dobiti veoma potentan i čist hašiš sa više od 50% THC, pri čemu skoro da nema CBD [Clarke and Watson, 2007].

Hašiš se može konzumirati pušenjem, često pomiješan sa duvanom (u odnosu 1:10), a može se uzimati i oralno, kao sastojak prehrabnenih proizvoda (npr. pogačice i kolači). Poznat je i način konzumiranja inhaliranjem isparenja koja se oslobođaju nakon zagrijavanja kanabis smole, ali

bez sagorijevanja [Leggett, 2006]. Inhaliranje može biti pogodno kada se kanabis koristi u ljekovite svrhe, kao način konzumiranja manje štetan od pušenja.

Evropa je dugo bila glavni potrošač kanabis smole, mada je u posljednje vrijeme zapaženo da u mnogim zemljama preovladava biljni kanabis [UNODC, 2016b].

2.4.1.3. Kanabis ulje (hašiš ulje)

Kanabis ulje ili hašiševo ulje je koncentrovan tečni ekstrakt dobijen ekstrakcijom cvjetnih vrhova i lišća kanabis biljke ili već izolovane kanabis smole. Ekstrakcija se vrši pomoću organskih rastvarača (npr. petrol eter, etanol, metanol, aceton, a u improvizovanim uslovima može i benzinom) na sobnoj temperaturi, uz miješanje. Nakon ekstrakcije suspenzija se filtrira i ekstrahovani materijal odbacuje, a potom se rastvarač upari i dobije se gusta, viskozna, uljasta tečnost tamno-zelene ili tamno-smeđe do crvene boje [UNODC, 2009a]. Ekstrakcija se može provesti brže i sa većim iskorištenjem, korištenjem složenijih tehnika ekstrakcije, ali je za to potrebna odgovarajuća aparatura i stručno znanje [Small, 2017a].

Od svih ilegalnih kanabis preparata, kanabis ulje sadrži najveću koncentraciju psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola (THC). Proizvodnjom preparata tečnog kanabisa koncentriše se psihoaktivni sastojak u manjoj količini proizvoda, što olakšava ilegalnim trgovcima skrivanje robe i smanjuje mogućnost otkrivanja prilikom prometa.

Ulje uobičajeno sadrži 10-30%, a može da sadrži i do 80% THC. Obično se konzumira pušenjem (1 do 2 kapi na duvan ili na papir za cigaretu), a može se uzimati i oralno. S obzirom da je THC rastvorljiv u mastima, može se dodati širokoj paleti prehrambenih proizvoda, rastvoren u mlijeku, puteru, maslinovom ulju i sl. [Iversen, 2000; Small, 2017a].

Kanabis biljka, u formi marihuane, je najzastupljenija ilegalna droga u Republici Srpskoj, dok su smola i ulje mnogo rjeđe zastupljeni. U posljednje vrijeme kanabis ulje se pojavljuje kao ljekoviti preparat, iako kanabis još nije odobren u terapeutske i medicinske svrhe.

2.4.2. Industrijska primjena kanabis biljke

Kanabis biljka se vijekovima uzgaja i kao poljoprivredna kultura i industrijska biljka za dobijanje različitih proizvoda u Aziji, Africi, Evropi i Americi. Međutim, 60-tih godina XX vijeka, na osnovu preporuka Ujedinjenih Nacija (Konvencija o narkotičkim drogama i Konvencija o psihotropnim supstancamaaaa), uspostavlja se restrikcija uzgoja kanabisa u većini zemalja, radi suzbijanja uzgoja za narkotičke svrhe [UN, 1961, 1971]. Dijelom zbog te

restrikcije, a dijelom zbog smanjene potražnje za konopljinim vlaknima pojavom atraktivnijih prirodnih i sintetičkih alternativa, industrijski uzgoj konoplje je značajno smanjen. U XX vijeku, konoplja se uglavnom uzgajala u Kini, Sovjetskom savezu i zemljama istočne Evrope (Mađarska, Rumunija, Ukrajina, Rusija, bivša Čekoslovačka, Srbija, Hrvatska), te nekim zapadnoevropskim zemljama (Španija i Francuska). U posljednjim decenijama ponovo raste interes za konoplju kao industrijsku biljku, pa se u nekim evropskim zemljama (npr. Holandija, Njemačka i dr.) vrše istraživanja sorti i varijeteta konoplje, pogodnih za različite namjene [Raman, 2003; Clarke and Merlin, 2013].

U većini zemalja, za industrijske svrhe je dozvoljeno uzgajati sorte sa niskim ukupnim sadržajem THC, pri čemu se pod ukupnim sadržajem podrazumijeva zbir THC i THCA izražen kao procentni udio u suhoj masi biljnog materijala. U nekim zemljama dozvoljeno je uzgajati sorte koje sadrže do 0,3% THC u suhoj masi cvjetnih vrhova, dok je u nekim zemljama ta granica do 0,2% THC [UNODC, 2009a; Small, 2017b; Sl. gl. BiH br. 08/06].

Brojni istraživači bavili su se determinacijom hemotipa (hemiskog fenotipa) kanabisa, bilo na osnovu apsolutnog sadržaja ili na osnovu međusobnog odnosa, najčešće THC i CBD, ali i drugih kanabinoida [De Meijer et al., 1992; Clarke and Merlin, 2013]. Međutim, uopšteno se može reći da droga-tip varijetete u pravilu karakteriše visok sadržaj THC i veoma nizak CBD, ako ga uopšte sadrže, dok je kod industrijskih vlakno-tip varijeteta i varijeteta za proizvodnju sjemena obrnuto – karakteriše ih visok sadržaj CBD, a veoma malo THC [Small, 2017a].

2.4.2.1. Tekstilna vlakna

Konoplja (lat. *Cannabis sativa* L.) je jedna od najstarijih biljaka za proizvodnju vlakana. Arheolozi su pronašli ostatke konopljine tkanine za koju se smatra da datira od prije 6000 godina, kada je konoplja korištena za proizvodnju vlakana u Aziji i Egiptu, odakle se proširila u Evropu između 1000. i 2000. godine prije nove ere. Kultivisani uzgoj u Evropi raširio se nakon 500-te godine nove ere, dok je u Južnu Ameriku prenesena 1545. godine, a u Sjevernu Ameriku 1606. godine. Konoplja je bila vodeća sirovina za proizvodnju vlakana od XVI do sredine XIX vijeka [Small, 2017a], kada se u većini zapadnih zemalja proizvodnja počinje smanjivati ili potpuno napuštati. U XX vijeku Sovjetski savez i Kina bili su najveći proizvođači konopljinih vlakana u svijetu, a Kina je ostala vodeći proizvođač do danas, dok je Francuska lider u Evropi [Clarke and Merlin, 2013; Small, 2015; Small, 2017a].

S obzirom na dugu istoriju uzgoja konoplje za proizvodnju vlakana, vremenom su se razvili varijeteti koje karakteriše bolji prinos i kvalitet vlakana, u odnosu na varijetete pogodne za

proizvodnju sjemenog ulja ili marihuane. Vlknaste sorte imaju nizak sadržaj psihoaktivnog sastojka (obično niži od 1%), mada neke vlknaste sorte koje rastu u subtropskoj Aziji mogu imati sadržaj THC i oko 3% [Small, 2017a].

Sirovina za proizvodnju konopljinih vlakana je stabljika, iz čije ukupne mase se izdvoji oko 17-20% vlakana. Dimenzije stabljike, kao i veličina i hemijske karakteristike vlakana, pored genetskih faktora zavise i od uslova okoline, a značajan uticaj imaju i uslovi uzgoja. Vlknasti varijeteti se sade gušće (npr. 200-250 biljaka po kvadratnom metru), da bi stabljika bila viša, a vlakna duža i kvalitetnija. Ukoliko se želi dobiti i vlakno i sjeme, muške biljke, koje su inače više, tanje, manje razgranate i imaju kvalitetnija vlakna, beru se odmah nakon opršivanja, dok se ženke biljke beru nešto kasnije, nakon što se formira sjeme [Small, 2017a].

Konopljino vlakno dostiže dužinu 1-4,5 m i obično sadrži oko 70-80% celuloze (uključujući hemicelulozu) i 17-20% lignina [Raman, 2003; Small, 2017a]. Konopljina vlakna su među najčvršćim vlknima prirodnog porijekla, otporna su na trulenje, a posjeduju i druge karakteristike koje ih čine pogodnim za izradu različitih proizvoda. U prošlosti su se od konopljinih vlakana izrađivale ribarske mreže, užad i vreće za razne namjene, kao i tkanina za odjevne predmete, koja je grublja, ali ima bolje izolacione osobine, bolje upijanje, čvršća je, izdržljivija, a time i dugotrajnija od pamučne [Thomas, M., 2012; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a]. Često se navodi da su originalne *Levi's* farmerke izrađivane od konopljinih vlakana [Iversen, 2000; Brown, 2003; Hazekamp, 2008-2009]. Vremenom je odjeća od konopljine tkanine potisnuta udobnjim i mekšim pamučnim i lanenim tkaninama, a potom i sintetičkim tkaninama raznih vrsta. Međutim, u novije vrijeme, odgovarajućim postupcima prerade vlakana, uz miješanje sa drugim prirodnim vlknima, značajno je unaprijeđena tekstura tkanine od konopljinih vlakana, pa se ona vraća u odjevnu industriju, dok se gruba tkanina od konopljinih vlakana koristi za izradu cerada, presvlaka i prostirki [Small, 2017a].

Postupak proizvodnje konopljinih vlakana obično nema forenzički značaj, ali u nekim slučajevima tužilaštva i sudovi traže upoređivanje postupka prerade kanabis biljke za proizvodnju vlakana u odnosu na postupak za proizvodnju droga. Iako su ti postupci prerade potpuno različiti, to ne može dati potpun odgovor o namjeri uzgajivača, jer se jedni dijelovi biljke koriste za proizvodnju vlakana (stabljika), a drugi za proizvodnju droga (listovi i cvjetni vrhovi). Praktično se od iste biljke mogu proizvesti oba proizvoda istovremeno, ukoliko se ne radi o namjenskom varijetu pogodnom za vlakna, sa izuzetno niskim sadržajem THC, koji u tom slučaju nije pogodan za proizvodnju droge [Dragoljić, 2002].

2.4.2.2. Kanabis sjeme i sjemo ulje

Sjeme kanabis biljke ne sadrži psihoaktivnu komponentu. Međutim, sjemenke su ovijene brakteolom, koja je dio biljke sa najvećom gustinom žljezdanih trihoma, a time i najvišom koncentracijom THC, pa sjemenke mogu biti spolja kontaminirane smolom iz cvjetnih vrhova i listova, što može rezultirati detektujućom količinom tragova THC prilikom analize. Kontaminacija sjemena tetrahidrokanabinolom, može se svesti na najmanju mjeru ili u potpunosti izbjegći primjenom efikasnijih tehnika za čišćenje sjemena, ali i korištenjem varijeteta sa nižim sadržajem THC [Ross et al., 2000; Kwong, 2008; Small, 2017a; Yang et al., 2017].

Prema arheološkim nalazima, kanabis sjeme je korišteno u Kini prije 3000 godina, kao hrana za ljude i životinje. Novija istraživanja su takođe pokazala da se sjeme i proizvodi od sjemena mogu koristiti u prehrani. Sjemenke sadrže esencijalne masne kiseline i lako probavljive proteine, zbog čega su pogodne kao dodatak ishrani. Kanabis sjemenke su takođe bogate fenolima i polifenolima, sadrže i ugljene hidrate, probavljiva vlakna, vitamine i minerale (posebno Ca, Fe, Mg, P, K, S i Zn) [Callaway, 2004; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a].

Iz sjemena se može dobiti ulje, koje kao i same sjemenke, ne sadrži psihoaktivni THC, a ukoliko se u ulju nađu tragovi THC, on najvjeroatnije potiče od nepotpunog odvajanja sjemena od pokrovnih listića (brakteola). Sadržaj ulja u sjemenu varira zavisno od varijeteta, klimatskih uslova, podneblja, načina uzgoja i sl. [Small, 2017a]. Sjeme obično sadrži oko 30-35% ulja po masi. Jestivo ulje se proizvodi cijedenjem pod visokim pritiskom, a nakon toga se uklanaju djelići sjemenki sedimentacijom, filtriranjem i drugim postupcima rafinisanja. Povišena temperatura, kao posljedica trenja tokom procesa presovanja, negativno utiče na ukus, miris i nutritivnu vrijednost, pa je potrebno održavati temperaturu na oko 40°C. Hladno-presano ulje je kvalitetnije, jer se tako sačuvaju bioaktivni sastojci, kao što su esencijalne masne kiseline, fenoli, flavonidi, tokoferoli i dr. Kanabis sjemo ulje je providna žuta tečnost bogata nezasićenim masnim kiselinama (oko 80%) i aminokiselinama. Ulje ima visok sadržaj linolne (Ω -6) i α -linolenske (Ω -3) kiseline, a sadrži i njihove odgovarajuće biološke metabolite γ -linolensku (Ω -6) i stearidonsku kiselinsku (Ω -3). Dobro izbalansiran odnos Ω -6 i Ω -3 masnih kiselina (između 2:1 i 3:1) doprinosi hranljivoj vrijednosti ulja [Callaway, 2004; Hazekamp, 2008-2009]. Prema hranljivoj vrijednosti ovo ulje ne zaostaje za ostalim jestivim uljima, ali je vremenom postalo manje cijenjeno zbog reskog mirisa i okusa. Zbog visokog udjela nezasićenih masnih kiselina ono ima tendenciju da se vrlo brzo užegne, ako se ne čuva na hladnom i tamnom mjestu.

Upotreba konopljinog sjemena u prehrambene svrhe bila je karakteristika siromašnih slojeva stanovništva, a jestivo ulja od konopljinog sjemena bilo je rašireno kod seoskog stanovništva u nekim dijelovima Rusije, gdje je proizvodnja dostigla vrhunac u XIX vijeku [Clarke and Merlin, 2013; Small, 2015]. Koristilo se i za rasvjetu, kao dodatak bojama, za pravljenje sapuna, u veterinarske svrhe, a pogače koje ostanu nakon dobijanja ulja mogu poslužiti kao visokoproteinska stočna hrana i kao đubrivo. Sjemenke se tradicionalno koriste kao hrana za ptice i perad, a mogu se koristiti i kao mamac za ribe [Iversen, 2000; Small, 2017a]. Krajem XX vijeka ulje je postalo zanimljivo kao sastojak kozmetičkih preparata [Hazekamp, 2008-2009; Small, 2017a]. Od 2000. godine dolazi do ekspanzije industrije konopljinog sjemena i povećane proizvodnje za prehrambene svrhe, pa se *Cannabis sativa* L. uzgaja i kao nova prehrambena sirovina, ali i kao sirovina za druge proizvode od sjemenog ulja. S obzirom da je kanabis sjemeno ulje nezasićeno, njegova temperatura očvrščavanja je niža nego kod zasićenih ulja, što mu daje prednost za korištenje u biodizel motorima u veoma hladnim uslovima. Međutim, zbog visoke cijene, kanabis sjemeno ulje nije konkurentno drugim jeftinijim biljnim uljima koja se koriste za proizvodnju biodizela [Small, 2017a].

Pored varijeteta namijenjenih za proizvodnju vlakana ili sjemena, koriste se i varijeteti za dualnu upotrebu, iako se tehnike uzgoja za različite svrhe manje ili više razlikuju. Npr. pri većem razmaku između biljaka, one će biti razgranatije, sa dosta cvata, a time i sjemena. Neki droga-tip varijeteti, bogati cvjetovima, mogu dati prinos sjemena od oko 1 kg po biljci. Prosječan prinos evropskih sjemenih varijeteta je od 600 do 1000 kg sjemena po hektaru [Hazekamp, 2008-2009; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a]. Finski industrijski varijetet „Finola“, sa niskim sadržajem THC (0,10-0,15%) daje više sjemena od drugih varijeteta, a uz dobre agronomiske uslove zabilježen je prinos od preko 2000 kg sjemena po hektaru [Callaway, 2004].

2.4.2.3. Kanabis esencijalno ulje

Esencijalno ulje, poznato i kao eterično ulje ili isparljivo ulje kanabisa, je tečnost blijedo žute boje koja se dobija destilacijom pomoću vodene pare iz svježe ubrane kanabis biljke. Eterično ulje kanabisa je složena smjesa organskih jedinjenja u kojoj dominiraju terpeni i terpenoidi, a sadrži i alkohole, estere, etere, aldehyde, ketone, fenole i dr. Poznato je da se u istim epidermalnim žljezdanim trihomama proizvode kanabinoidi i terpeni, ali ovo ulje ne sadrži kanabinoide, jer oni nisu rastvorljivi u vodi [Small, 2017a]. Isparljivi mono- i seskviterpenoidi su jedinjenja koja daju specifičan miris kanabis proizvodima, zbog čega su osnova za identifikaciju kanabisa od strane pasa tragača. Npr. seskviterpenoid beta-kariofilen-epoksid je

glavno jedinjenje koje prepoznaju trenirani psi [Hazekamp, 2008-2009]. Neki terpeni štite biljku od insekata, zahvaljujući njihovom djelovanju protiv gljivica, virusa, parazita i drugih mikroorganizama, a smatra se da doprinose i odbijanju konkurentnih biljaka. Sastav eteričnog ulja varira zavisno od varijeteta, pri čemu droga-tip varijeteti, posebno ženske biljke sa više cvjetova, sadrže više eteričnog ulja i prijatnijeg su mirisa od vlakno-tip varijeteta. Eterično ulje kanabisa ima ograničenu komercijalnu vrijednost, zbog malog prinosa (oko 10 l/ha) i stoga veoma visoke cijene, ali je zbog svoje aromatičnosti zanimljivo kao dodatak kozmetičkim proizvodima (kreme, melemi, ulja i sl.), šamponima, sapunima, parfemima i mirisnim svijećama, ali i kao dodatak prehrambenim proizvodima (slatkiši i napici). Terapeutska primjena eteričnih ulja (aromaterapija) postaje sve popularnija, pa se može očekivati da i eterično ulje kanabisa nađe svoje mjesto u toj oblasti [Small, 2015, 2017a; Thomas, B. and ElSohly, 2016].

2.4.2.4. Ostali proizvodi

U davnina vremena konoplja se koristila za izradu papira. Smatra se da je papir kineski izum, iz vremena dinastije Han (oko 100-te godine nove ere), a pravljen je od konoplje [Thomas, M., 2012; Clarke and Merlin, 2013], te da je otkriće čuvano u tajnosti do IX vijeka, kada su postupak proizvodnje usvojili i proširili Arapi [Thomas, M., 2012]. Sredinom XIX vijeka uvedena je proizvodnja papira iz drveta, koje danas predstavlja više od 95% sirovine za papir. Proizvodnja papira od konoplje je skuplja, te se konopljin papir koristi za posebne namjene, kao što su novčanice i papir za cigarete, koji je trenutno najprofitabilniji papirni proizvod [Iversen, 2000; Hazekamp, 2008-2009; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a].

U posljednje vrijeme u industriji su cijenjeni lagani, biodegradabilni materijali, koji se mogu reciklirati, a konopljina vlakna zadovoljavaju zahtjeve u tom pogledu. Zahvaljujući dobrim mehaničkim osobinama pogodna su za izradu kompozitnih materijala. Kompoziti konoplje, u kombinaciji sa drugim prirodnim vlaknima ili različitim vrstama plastičnih materijala i smola, mogu se koristiti za proizvodnju punjenja za duševe ili kao podloge u prostorima gdje boravi stoka [Clarke and Merlin, 2013]. Savremena primjena kompozita sa konopljom proširena je na izradu različitih proizvoda u automobilskoj industriji, kao što su instrument table, obloge vrata, nasloni sjedišta, nasloni za ruke, ladice, štitnici od sunca i drugi dijelovi. Bioplastika sa konopljinim vlaknima je čvršća, a lakša je od polipropilenske plastike i ekološki je prihvatljivija. Kompoziti konoplje koriste se i za proizvodnju namještaja, materijala za izolaciju, konstrukcionalnih građevinskih materijala itd. Kada se vlakna konoplje dodaju betonu povećavaju zateznu čvrstoću, istovremeno smanjujući pucanje. Beton od konoplje i kreča je

lakši od običnog betona, potrebno je manje energije za njegovu proizvodnju, pa ima ekonomske i ekološke prednosti. Temelji, zidovi, podovi i stropovi kuća mogu se izrađivati od materijala dobijenih od drvenaste jezgre konopljine stabljike, pomiješane sa prirodnim krečom i vodom. Dobijeni materijal se može naliti poput betona, mnogo je lakši od cementa, a ima bolje toplotne i zvučno-izolacijske osobine [Small, 2017a].

Konoplja je pogodna i kao izvor energije, za grijanje ili za proizvodnju biogoriva [Iversen, 2000; Thomas, M., 2012; Small, 2017a]. Prilikom sagorijevanja konoplje zaostaje nizak nivo pepela (ispod 2%), što je dobra osobina čvrstih goriva (briketi i pelet), ali proizvodnja tih goriva još nije ekonomski opravdana. Konoplja spada u usjeve sa srednjim energetskim kapacitetom, ali sa velikim potencijalom za unaprijeđenje prinosa [Small, 2017a].

Osušeni i usitnjeni biljni dijelovi i ekstrakti kanabis biljke korišteni su kao prirodni insekticidi kućne izrade, protiv biljnih vaški i drugih nameta [Small, 2017a].

Činjenica da čisti THC u većim dozama djeluje kao snažan otrov, zajedno sa mogućnošću dobijanja sintetičkim putem u većim količinama, navela je vojne stručnjake na razmišljanja o THC kao eventualnom bojnom otrovu sa specifičnim djelovanjem. Naime, utvrđeno je da THC unesen u organizam može izazvati kolapsno stanje pri naglom ustajanju iz horizontalnog položaja zbog naglog pada krvnog pritiska (ortostatska hipotenzija), zbog čega bi osobe zatrovane tetrahidrokanabinolom postale maksimalno neefikasne u dinamičnim ratnim situacijama. Iako su neke vojne laboratorije proučavale psihofiziološke efekte THC u cilju primjene protiv neprijateljske žive sile [Petrović, 1989], nije poznato da je ta primjena zaživjela u praksi.

2.4.3. Klasifikacija i efekti

Klasifikacija droga zavisi od aspekta proučavanja. Kanabis preparati prema porijeklu pripadaju grupi droga prirodnog porijekla. Sa pravnog stanovišta, u većini zemalja, svrstani su u ilegalne droge. Po hemijskom sastavu i strukturi aktivnih komponenti oni čine posebnu grupu pod nazivom „kanabis”. Prema efektima na ljudski organizam kanabis proizvodi su često bili svrstavani u halucinogene supstance, iako se kod korisnika javljaju i simptomi karakteristični za psihostimulanse, ali i psihodepresore. Veoma različiti, katkad i suprotni efekti, doprinijeli su tome da se ova biljna droga sve češće determiniše kao poseban tip farmakološki psihoaktivnih supstanci. Pri niskim dozama simptomi mogu biti suprotni simptomima koji se javljaju kao posljedica visokih doza, a efekti se mogu ispoljiti kao euforija ili disforija, opuštanje ili napetost, uzbuđenje praćeno umirenjem, povećane motorne aktivnosti praćene

nekoordinacijom. Ta dualna priroda kanabisa bila je poznata još u antičkim civilizacijama, posebno Indije i Kine. Psihološki efekti, pored doze, zavise od načina konzumiranja, stepena tolerancije i drugih individualnih osobina korisnika [Small, 2017a].

Očekivani efekti rekreativnih korisnika kanabisa mogu se ispoljavati po fazama. U početku efekti mogu biti promjena stanja svijesti, koju karakteriše zadovoljstvo, dobro raspoloženje, euforija i uzbuđenje, pa osobe postaju društvenije, pričljivije i sklone nekontrolisanom smijehu. Javlja se i promjena percepcije, npr. poremećen osjećaj za vrijeme i prostor, intenziviranje emotivnih iskustava koje je prilično individualno (neki tvrde da im kanabis podstiče kreativnost, dok drugi pak kažu da ih samo uspavljuje). U kasnijoj fazi nailazi opuštanje, osjećaj sreće i stanje kao u snu, a nakon nekog vremena može nastupiti letargija i pospanost [Petrović, 1989].

Redovni korisnici obično konzumiraju 1 g marihuane dnevno, uz napomenu da jedna improvizovana cigareta sadrži oko 0,5-1 g. Kada se koriste visoko-potentni varijeteti, za pojavu očekivanih efekata dovoljno je 0,05-0,1 g marihuane, konzumirane pušenjem [Leggett, 2006]. Kod medicinskih korisnika ili rekreativnih korisnika koji žele biti pod permanentnim uticajem, zabilježeno je konzumiranje 5-10 g dnevno [Small, 2017a].

Povećan broj rekreativnih korisnika kanabisa dovodi se u vezu sa sve raširenijim stanovištem da kanabis ima ljekovita svojstva, pa se stvara utisak da kanabis preparati nisu štetni, nego naprotiv, da su korisni za zdravlje. Međutim, poznato je da kanabis djeluje na mnoge organe u tijelu, počev od centralnog nervnog sistema, preko kardiovaskularnog, endokrinog, respiratornog i imunog sistema. Poznati fiziološki efekti su: ubrzan rad srca, pad krvnog pritiska i vrtoglavica u stojećem stavu, sniženje tjelesne temperature, povećana potreba za kiseonikom, umor i slabost mišića, suhoća usta, crvenilo očiju, usporena funkcija probavnih organa, čest osjećaj gladi i povećana želja za slatkišima. Rizici povezani sa pušenjem kanabisa slični su kao kod duvana, jer su u dimu prisutni mnogi toksini i kancerogeni koji štetno djeluju na respiratorični sistem, izazivajući akutni ili hronični bronhitis, emfizem i bronhijalnu astmu. Duža upotreba predstavlja zdravstveni rizik za reproduktivni sistem, a može negativno uticati i na imuni sistem. Polen kanabisa može djelovati kao alergen. Iako često podcijenjen, značajan je uticaj kanabis preparata na psihološko stanje i ponašanje korisnika. Postoje zagovornici stanovišta da kanabis nema negativan uticaj na kognitivne sposobnosti i da može pozitivno djelovati na mentalno zdravlje, ali postoje dokazi o negativnim efektima kanabisa na kognitivne i psihomotorne osobine, poput uticaja na memoriju, koncentraciju i sposobnost rješavanja problema [Volkow et al., 2016], na motornu koordinaciju i vrijeme reakcije, kao i na druge

vještine (npr. vozačke sposobnosti). Uprkos debatama o uticaju na pojedine funkcije, pojedini sastojci kanabisa, zavisno od doze i individualnih karakteristika korisnika, mogu izazvati različita psihološka stanja kao što su depresija, anksioznost, agorafobija, panika i paranoja, a velike doze mogu izazvati halucinacije [Petrović, 1989]. Pri tome, visokotentni preparati predstavljaju veći zdravstveni rizik, posebno ukoliko koncentracija psihoaktivnog sastojka nije poznata korisniku. Konzumiranje neprilagođene doze visokotentnih kanabis preparata je u korelaciji sa učestalim posjetama korisnika kanabisa hitnim medicinskim službama [UNODC, 2017; Freeman et al., 2018]. Pored akutnih efekata, dugogodišnje korištenje kanabisa može uzrokovati dugotrajne psihološke probleme, te određeni stepen zavisnosti. Kada se govori o obliku i stepenu zavisnosti od kanabisa, stanovišta su različita. Neki smatraju da se postepeno razvija psihička zavisnost, poznata kao amotivacioni sindrom, kada osoba gubi interesovanje za sve aktivnosti, bezvoljna je i apatična, emocionalno tupa i nesposobna da se koncentriše [Volkow et al., 2016]. Zavisnost od kanabisa svakako je slabija nego zavisnost od drugih ilegalnih droga (npr. heroin, kokain i dr.), ali i od mnogih psihoaktivnih lijekova, pa je često upoređuju sa alkoholnom i nikotinskom zavisnosti ili zavisnosti od kafe. Inače, psihaktivni sastojak kanabisa, tetrahidrokanabinol je četvrta najpopularnija rekreativna hemikalija adiktivnog tipa, poslije kofeina, etil-alkohola i nikotina. Zbog izostanka naglašenih apstinencijalnih simptoma prilikom prestanka konzumiranja, postoje stanovišta da ne izaziva fizičku zavisnost, ili je ona zanemariva. Neka istraživanja su ipak pokazala postojanje klinički značajnog apstinencijalnog sindroma srednjeg intenziteta kod dugogodišnjih korisnika, gdje su karakteristični apstinencijalni simptomi nervosa, napetost, nemir, poremećaj sna i gubitak apetita, dok su drhtavica, znojenje, glavobolja i bol u stomaku nešto rjeđi. Iako se stručnjaci ne slažu oko ozbiljnosti fizioloških simptoma, većina se slaže da psihološki poremećaji izazvani kanabisom mogu zahtijevati određeni tretman. Procijenjeni rizik za razvijanje zavisnosti od marihuane je 9-10% [Petrović, 1989; Iversen, 2000; Leggett, 2006; Gardner, 2014; Piomelli et al., 2016; Small, 2017a]. Zbog velike popularnosti marihuane, postoje stanovišta da je ona ulaznica u svijet droge. Smatra se da je većina korisnika heroina, kokaina i dr. droga, počela konzumiranjem marihuane [Lee, 2005].

2.4.3.1. Medicinska primjena

Može se reći da nijedna biljka nije toliko proučavana kao *Cannabis sativa* L. Objavljeno je više od 10000 radova koji opisuju različite aspekte biološke aktivnosti biljke. Većina studija o biološkim efektima kanabisa fokusirala se na kanabinoidne. Razlog za to je činjenica da su kanabinoidi jedinstveni za kanabis biljku, dok se druga jedinjenja prisutna u ovoj biljci mogu

naći i drugdje u prirodi. Pored toga, naučnici imaju suprotstavljene stavove kada je u pitanju medicinska upotreba kanabisa, pa se može reći da je kanabis najkontraverznijsa biljka u istoriji čovječanstva [Hazekamp, 2008-2009].

Kontraverznost kod upotrebe kanabisa nađena je još u pisanim dokumentima legendarnog kineskog cara Šen Nunga, koji se smatra ocem kineske medicine [Clarke and Merlin, 2013]. U rukopisima za koje se vjeruje da datiraju iz perioda oko 2700 godina prije nove ere za kanabis se vezuje dilema “lijek” ili “otrov”, gdje su jedni smatrali da ih vodi u raj, a drugi u pakao. Ova nedoumica o djelovanju kanabisa se, na izvjestan način, zadržala do danas.

Prema antičkim zapisima, medicinska upotreba kanabisa ima veoma dugu istoriju na području Azije, posebno u Kini i Indiji. Dalje se širila preko Srednjeg istoka i Afrike, a korištena je u terapiji različitih oboljenja u staroj Grčkoj i Rimskom carstvu. Prva značajnija evropska medicinska iskustva sa kanabisom datiraju iz prve polovine XIX vijeka, kada je irski ljekar *William B. O'Shaugnessy*, nakon dužeg boravka i rada u Indiji, objavio šиру studiju o djelovanju ove biljke na ljudi i životinje. On je primjetio da kanabis u malim dozama stimuliše apetit, a u većim dozama djeluje kao sedativ. Također je zapazio da ima protivupalno i antibiotsko djelovanje, da ublažava bolove kod reumatizma i migrene, djeluje protiv mučnine, konvulzija i spazma. Zahvaljujući radu doktora *O'Shaugnessy*-ja, kanabis ekstrakti i tinkture uvedeni su kao terapeutsko sredstvo širom Evrope, a kasnije i Sjedinjenih Američkih Država [Iversen, 2000; Hazekamp et al., 2010; Clarke and Merlin, 2013; Martin and Rashidian, 2014; Russo, 2017; Small, 2017a]. Na vrhuncu popularnosti bilo je poznato više od 28 različitih medicinskih kanabis preparata koji su se koristili za različite indikacije, kao što su menstrualne tegobe, astma, kašalj, nesanica, podrška pri porođaju, migrena, infekcija grla, odvikavanje od upotrebe opijuma i dr. [Iversen, 2000; Hazekamp, 2008-2009].

Zbog nedovoljno funkcionalnog sistema kontrole kvaliteta, u XIX vijeku nije bilo moguće pripremiti standardizovani preparat ujednačenog sastava i djelovanja. Kanabis ekstrakt, za razliku od opijata, nije rastvorljiv u vodi pa nije pogodan za injekciono unošenje, dok se prilikom oralnog unošenja sporo i neujednačeno apsorbuje [Hazekamp, 2008-2009]. Bilo je i drugih nepoznanica u vezi kanabisa, kao što su mehanizam djelovanja, toksičnost i dr. Zbog svega toga, ali i povećane zloupotrebe kanabisa u rekreativne svrhe, te pojave sintetičkih medikamenata (aspirina, barbiturata i sl.) kanabis je u prvoj polovini XX vijeka isključen iz medicinske upotrebe [Raman, 2003; Small, 2017a]. Kanabis preparati su 1937. godine uklonjeni iz američke farmakopeje, a taj primer slijedila je većina zapadnih zemalja [Hazekamp et al., 2010]. Međutim, i nakon toga, rasprave o medicinskom potencijalu kanabisa sa naučnog i

političkog aspekta nisu prestajale, a vremenom je ova tema dobijala sve više pažnje. Nakon otkrića aktivnog sastojka tetrahidrokanabinola 1964. godine, provedene su različite kliničke studije sa ciljem da se utvrde njegova analgetička, antiemetička, antidepresivna svojstva, stimulativni uticaj na apetit, mogućnost za tretman glaukoma, uticaj na mučnine uzrokovane hemoterapijom itd. [Radwan et al., 2015]. Primjena kanabis preparata, koji sadrže psihoaktivnu supstancu THC, u ljekovite svrhe, ponovo je zaživjela 80-tih i 90-tih godina XX vijeka. Iako je medicinski potencijal kanabisa, u odnosu na štetne efekte i dalje sporna tema, a kanabis preparati u većini zemalja ilegalni, pacijenti ih ipak nabavljaju na crnom tržištu i koriste za liječenje [Iversen, 2000]. Neki istraživači tvrde da kanabis ima veliki medicinski potencijal i smatraju ga „aspirinom XXI vijeka“, ali klasifikacija kanabisa kao droge, ozbiljno opstruiše medicinski razvoj. S druge strane, razlika između droge i lijeka može se napraviti na odgovarajući način, dobro provedenim istraživanjem kombinovanim sa racionalnim pristupom, kao u slučaju opijata (npr. morfin, kodein). Stoga je jedan od ciljeva istraživanja medicinskog kanabisa da se razdvoji pozitivno djelovanje od neželjenih efekata [Hazekamp et al., 2010; Piomelli et al., 2019]. Godišnje se objavi hiljade publikacija o medicinskom aspektu kanabisa, ali u stručnim krugovima još uvijek nema konsenzusa o medicinskoj vrijednosti kanabisa u odnosu na štetno djelovanje. Naučnici raznih profila (medicinari, pravnici i dr.), političari i javnost podijeljeni su po pitanju dobrobiti i zloupotrebe tzv. medicinske marihuane. U stvari, činjenice o medicinskom djelovanju nisu u potpunosti razjašnjene, jer je višedecenijska zabrana upotrebe negativno uticala na objektivna istraživanja [Small, 2017a]. Kalifornija je 1996. godine postala prva američka država u kojoj je dozvoljena medicinska upotreba kanabisa. Kanada je 2001. godine postala prva država u svijetu koja je usvojila regulativu za upotrebu kanabis biljnog materijala u medicinske svrhe, a taj trend su nastavile i mnoge druge zemlje. To je navelo hiljade stručnjaka da se bave istraživanjem kanabisa u brojnim projektima, čiji rezultat su obećavajuće prognoze za širu medicinsku primjenu kanabis preparata, uključujući i veterinarsku medicinu [Small, 2017a].

Ljekoviti potencijal kanabisa bio je ignorisan u naučnim krugovima, sve do otkrića čovječijeg endokanabinoidnog sistema (1990-tih godina XX vijeka) koji interreaguje sa sastojcima kanabis biljke. Karakteristike tog endogenog sistema su kanabinoidni receptori (CB1 i CB2), njihovi endogeni ligandi, odnosno endokanabinoidi među kojima su najpoznatiji arahidoniletanolamid ili anandamid i 2-arahidonilglicerol, njihovi biosintetički prekursori i enzimi uključeni u biosintezu, transport i razgradnju endogenih kanabinoida. Receptori su proteini, smješteni u ćeliji ili ćelijskoj membrani, a odgovaraju na hemikalije utičući na metaboličke funkcije u ćeliji. Endokanabinoidni receptori pripadaju grupi guanin-protein-

kuplovanih receptora. CB1 receptor je najzastupljeniji u mozgu i perifernom tkivu centralnog nervnog sistema (CNS), a nađen je i u određenim perifernim organima i tkivima, kao što su pluća, jetra i bubrezi. CB2 receptor je nađen uglavnom van CNS, u tkivima povezanim sa imunim sistemom tijela (leukociti, slezina i krajnici), ali je prisutan i u neuronima mozga. THC djelimično aktivira obe vrste receptora, ali ima veći afinitet prema CB1 receptorima. Endokanabinoidni sistem je važan fiziološki sistem, čiji receptori i endogeni ligandi imaju važnu ulogu u kontroli mnogih funkcija ljudskog tijela, kao što su imuni sistem, motorna koordinacija, tjelesna temperatura, formiranje kostiju, uzimanje hrane, kognitivna, emocionalna, perceptivna i ponašajna stanja, opuštanje i spavanje, zaboravljanje (posttraumatsko), zaštita neurona i različiti aspekti hormonske kontrole. Aktiviranje endogenog kanabinoidnog sistema može biti značajno za svaku od ovih funkcija. Promjene endokanabinoidnog sistema utvrđene su kod nekih oboljenja, kao što su multipla skleroza, kancer, ateroskleroza, infarkt miokarda, hipertenzija, glaukom, pretilost, osteoporozu i dr., stoga su nove terapeutske strategije usmjerene na uspostavljanje normalne funkcionalnosti tog sistema. Smatra se da endokanabinoidni sistem ima terapeutski potencijal za široki spektar oboljenja, uključujući neurodegenerativne, kardiovaskularne, upalne i metaboličke poremećaje, te za kontrolu bola. Endokanabinoidni sistem koji je odgovoran za naš fiziološki odgovor na upotrebu kanabisa analogan je morfin – endorfinskom sistemu [Iversen, 2000; Hazekamp et al., 2010; Clarke and Merlin, 2013; Radwan et al., 2015; Andre et al., 2016; Small, 2017a].

Kanabis biljka se vijekovima koristila za gastrointestinalne poremećaje kao što su gastroenteritis, čir želuca, Kronova bolest, sindrom nadraženih crijeva, dijareja, a djeluje protiv mučnine i povraćanja, protiv upala, bola u trbuhi i sl. [Small, 2017a]. Brojne studije su potvrdile da kanabinoidi mogu sniziti intraokularni pritisak, stoga mogu biti korisni za tretman glaukoma [Tomida et al., 2004]. Kanabis djeluje protiv glavobolje i migrene [Cuttler et al., 2020], te kao pomoćna terapija kod multiple skleroze za opuštanje spazma, gdje antikonvulzivne efekte pokazuju THC, CBD, CBN, 11-OH-THC i Δ^8 -THC [Hazekamp, 2008-2009; Nielsen et al., 2018]. Zbog uticaja na povećanje apetita, kanabis se koristi kao pomoćna terapija kod anoreksije i AIDS-a, a smatra se da ima pozitivan uticaj na imunitet organizma [Thomas, B. and ElSohly, 2016]. Kanabis preparati su se pokazali efikasni za tretman hroničnog bola [Weizman et al., 2018] i to je vjerovatno terapeutska primjena kanabisa koja najviše obećava, jer za razliku od opioida, ne postoji mogućnost za predoziranje. Iako je svrha analgetika da suzbiju bol, zadovoljstvo kao stanje suprotno bolu, rijetko je medicinski cilj, pa se tako euforija, karakteristična za kanabis preparate, smatra neželjenom pratećom pojavom. S druge strane, ti efekti koji se inače smatraju neželjenim nuspojavama, mogu biti korisni

pacijentima koji boluju od teških oboljenja praćenih intenzivnim bolom. Potencijal kanabisa da popravi raspoloženje, smanji anksioznost i djeluje umirujuće, predstavlja dobrobit za takve pacijente, a eventualna mogućnost izazivanja zavisnosti procjenjuje se prema individualnim karakteristikama i stanju pacijenta, kao i kod drugih lijekova koji mogu izazvati zavisnost (opioda, benzodiazepina i sl.). Lista medicinskih indikacija za tretman kanabisom povećava se brzinom koja prevaziđa tempo naučne evaluacije. U javnosti je rašireno stanovište da kanabis ima antikancerogeni potencijal, ali kliničke studije još nisu dale jasne dokaze o djelotvornom terapijskom tretmanu kancera pomoću kanabis preparata. S druge strane, palijativni efekti kanabisa i psihoaktivnog sastojka THC su dobro poznati, a očituju se u suzbijanju mučnine izazvane hemoterapijom ili radioterapijom, stimulisanju apetita, djelovanju protiv bola i nesanice, te popravljanju raspoloženja, zbog čega se medicinski kanabis smatra korisnom pomoćnom terapijom za tretman pacijenata sa kancerom. Postoje stanovišta da se postraumatski stresni poremećaj (PTSP) može tretirati medicinskom marihanom, iako su dokazi o efikasnosti tretmana nedovoljni [Thomas, B. and ElSohly, 2016]. Kanabisu se pripisuju pozitivni efekti pri tretmanu astme, artritisa, osteoporoze, Alchajmerove bolesti, demencije, epilepsije, anksioznosti i depresije, nesanice, šizofrenije i drugih poremećaja [Thomas, M., 2012]. Pozitivno djelovanje kanabis preparata za tretman mnogih poremećaja rezultat je određenih pretkliničkih studija provedenih *in vitro* i *in vivo*, ali nije u potpunosti medicinski dokazano, stoga u stručnim krugovima postoji konsenzus o nastavku istraživanja i provođenju detaljnih kliničkih studija o efektima kanabisa na određena oboljenja [Small, 2017a; Cascio et al., 2017]. Istovremeno, postoje i oni koji se ne slažu sa tim da još treba dokazivati nešto što je medicini poznato već 5000 godina [Clarke and Merlin, 2013]. U svakom slučaju, farmakološka karakterizacija što većeg broja sastojaka prisutnih u biljci značajno bi unaprijedila razumijevanje farmakoloških efekata kanabisa, bilo da se koristi u medicinske svrhe ili rekreativno, što bi bio značajan doprinos medicinskoj primeni postojećih i otkrivanju novih kanabis preparata [Cascio et al., 2017]. Neetično je promovisati ili distribuisati složeni preparat, kakav je kanabis, za indikacije za koje nije provedena i dokumenovana potpuna evaluacija. Relevantna biološka aktivnost, proučena kroz multidisciplinarna laboratorijska istraživanja i potvrđena kroz adekvatno sprovedene kliničke studije, najbolja je provjera medicinske primjene kanabisa. Rezultati detaljnih naučnih studija moraju biti vodilja za korištenje medicinskog kanabisa, kao i vodilja za zakonsko regulisanje te oblasti [Mechoulam and Ben-Shabat, 1999; Hazekamp, 2008-2009; Thomas, B. and ElSohly, 2016].

Tetrahidrokanabinol, glavni psihoaktivni sastojak kanabis biljke, farmakološki i toksikološki nabolje je proučen i pripisuje mu se najviše efekata. Koncentracije THC od 0,3 do 0,9% imaju

neznatan potencijal, dok se 0,9% THC smatra minimalnom koncentracijom koja može izazvati efekte [Small, 2017a]. Većina savremenih medicinskih preparata zasnovana je na tetrahidrokanabinolu, te se u medicinske svrhe uglavnom koristi droga-tip kanabis. Međutim, i drugi sastojci kanabisa su biološki aktivni i imaju medicinski značaj. Iako se u literaturi kanabidiol (CBD) često navodi kao fitokanabinoid koji nije psihoaktivno, on je blago stimulativan u niskim i srednjim dozama, dok u višim dozama djeluje sedativno i uspavljajuće. CBD je također farmakološki aktivno sa značajnim potencijalom za terapeutsku upotrebu, zbog protivupalnog, antioksidativnog i analgetičkog djelovanja, kao i ublažavanja spazma [Martin and Rashidian, 2014]. Njegov klinički značaj, između ostalog, leži u njegovoj sposobnosti da ublaži anksioznost i druge neugodne psihotropne nuspojave THC, inhibirajući hidroksilaciju THC do 11-hidroksi metabolita koji ima 3-4 puta jače psihoaktivno djelovanje od THC [McPartland and Russo, 2001; Brenneisen, 2007; Iseger and Bossong, 2015]. Umanjujući neželjene psihoaktivne efekte, CBD doprinosi zdravstvenoj bezbjednosti ljekovitih kanabis preparata [Andre et al., 2016]. Postoje dokazi da CBD ima terapeutski učinak kod alkoholom oštećene jetre, kao i antibakterijsko i protivgljivično djelovanje sa terapeutskim potencijalom za tretman kože, npr. *acne vulgaris* [Small, 2017a]. Zabilježene su aktivnosti CBD kao antiepiletičnog agensa, ali je na tom polju potrebno provesti još detaljnih studija [Devinsky et al., 2014]. Nekoliko kliničkih studija, koje su se bavile tretmanom pacijenata sa psihotičnim simptomima, pokazale su da CBD ima potencijala kao efektivan i siguran antipshiotik koji se dobro podnosi, ali je također potrebno provesti još detaljnih kliničkih studija prije uvođenja u kliničku praksu [Leweke et al., 2012; Iseger and Bossong, 2015]. Poznato je da CBD dominira u smoli vlakno-tip varijeteta, a varijeteti namjenjeni proizvodnji sjemena su još značajniji izvor CBD, jer daju više cvjetnih vrhova koji su glavni izvor smole, koja sadrži kanabinoide. Stoga te varijetete preferiraju oni koji pate od nesanice, jer je poznato da CBD djeluje umirujuće i uspavljuje [Hazekamp, 2008-2009; Piomelli and Russo 2016; Small, 2017a]. Eksperimentalne studije su pokazale da i drugi kanabinoidi imaju medicinski potencijal. Tako kanabinol (CBN) i tetrahidrokanabivarin (THCV) imaju protivupalne i antikonvulzivne osobine, dok kanabigerol (CBG) i kanabihromen (CBC) imaju sedativno, antibiotsko, antidepresivno, antihipertenzivno, antibakterijsko i protivgljivično djelovanje [McPartland and Russo, 2001; Small, 2017a]. THCV djeluje i na nivo glukoze, insulina i triglicerida u plazmi, što mu daje potencijal za tretman metaboličkog sindroma i dijabetesa tipa 2, o čemu je potrebno sprovesti još istraživanja u svrhu razvoja korisnog terapeutskog sredstva [Abioye et al., 2020].

Nekanabinoidni sastojci takođe doprinose terapeutskom potencijalu kanabisa. Biološka aktivnost terpena ogleda se u protivuplanom, analgetskom, imunostimulišućem i dr. djelovanju

[Andre et al., 2016]. Interakcije fitokanabinoida i terpena mogu djelovati sinergički pri tretmanu različitih poremećaja, kao što su tretman bola, upalni procesi, gljivične i bakterijske infekcije, depresija, anksioznost, karcinom [Russo, 2011]. Neki terpeni u kanabisu mogu poslužiti kao kratkotrajni antidoti kod trovanja alkoholom [Small, 2017a]. Mircen, najzastupljeniji terpen u biljci *C. Sativa* (posebno u varijetetima sa više CBD) djeluje kao sedativ. Terapeutski potencijal ima i esencijalno ulje kanabisa, koje je bogato terpenoidima [McPartland and Russo, 2001; Small, 2017a]. Flavonodi, aromatični policiklični fenoli, pokazuju širok opseg bioloških efekata od kojih su neki slični efektima kanabinoida i terpena [Andre et al., 2016]. Pored protivupalnog, antioksidativnog i dr. djelovanja, flavonodi mogu uticati na farmakokinetiku THC [McPartland and Russo, 2001]. U tradicionalnoj istočnjačkoj medicini sjeme kanabisa korišteno je za tretman različitih poremećaja, npr. protiv kašla i grčeva u trbuhu, za tretman rana i sl. Zbog sadržaja nezasićenih masnih kiselina, preparati od kanabis sjemenog ulja imaju potencijal za tretman neurodermatoza i psorijaze [Small, 2017a].

Razvijeni su i farmaceutski proizvodi koji najčešće sadrže THC, dobijen sintetičkim putem. Nabilon je sintetički analog THC sa nešto modifikovanom molekulskom strukturu, a sastojak je oralnog farmaceutskog proizvoda Cesamet® – kapsule koje sadrže nabilon u obliku kristalne supstance. Licenciran je u Kanadi, SAD i nekim evropskim državama, za tretman mučnine izazvane hemoterapijom kod pacijenata koji boluju od karcinoma. Određene kliničke studije pokazale su ohrabrujuće preliminarne rezultate za primjenu nabilona kod tretmana PTSP [Iversen, 2000; Hazekamp, 2008-2009; Small, 2017a]. Dronabinol, sintetički dobijen Δ^9 -THC, sastojak je farmaceutskog proizvoda pod nazivom Marinol®. To je preparat za oralno uzimanje u formi kapsula koje sadrže dronabinol rastvoren u sezamovom ulju. Dostupan je u Sjevernoj Americi i nekim evropskim državama, a koristi se protiv mučnine i povraćanja kod pacijenata pod hemoterapijskim tretmanom karcinoma i kao stimulans apetita kod pacijenata oboljelih od anoreksije ili AIDS-a [Iversen, 2000; Martin, 2007; Hazekamp et al., 2010; Radwan et al., 2017]. Ovaj sintetički preparat je skup, nije pogodan za doziranje, a neki pacijenti ga smatraju manje efikasnim nego inhaliranje ili pušenje marihuane [Iversen, 2000; Leggett, 2006; Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a]. Preparat Epidiolex® sadrži CBD koji je izolovan iz bilje i prečišćen, a koristi se za tretman određenih oblika epilepsije kod djece [Devs et al., 2020].

Pacijenti preferiraju upotrebu biljnih preparata u odnosu na sintetičke, prvenstveno zbog polifarmakološkog djelovanja biljnih preparata, za razliku od analognih jednokomponentnih sintetičkih lijekova, koji često imaju nuspojave. Kod biljnih preparata terapeutski efekti primarnog aktivnog sastojka mogu biti u sinergiji sa ostalim sastojcima, ili pak nuspojave

primarnog sastojka mogu biti ublažene drugim jedinjenjima zahvaljujući antagonističkim interakcijama između različitih fitohemikalija [Brenneisen, 2007; Small, 2015; Andre et al., 2016]. Pri tom se ne smije zanemariti mogućnost da i prirodni biljni preparati mogu da sadrže toksična jedinjenja [McPartland and Russo, 2001; Martin and Rashidian, 2014].

Novija istraživanja provode se sa ciljem da se procijeni klinički potencijal brojnih kanabinoida ekstrahovanih iz kanabis biljke, jer se pokazalo da je smjesa kanabinoida manje toksična nego čisti THC [McPartland and Russo, 2001]. Procjenjuje se da kombinacija THC i CBD u medicinskoj primjeni ima određene prednosti, iako priroda njihove interakcije nije u potpunosti razjašnjena. Preparat Sativex® je smjesa kanabis ekstrakata varijeteta sa visokim sadržajem THC i varijeteta sa visokim sadržajem CBD u takvom odnosu da sadrži približno jednaku količinu oba kanabinoida. Pored približno jednakih dijelova THC i CBD, ovaj preparat u manjim količinama sadrži i druge kanabinoide, terpenoide, sterole, trigliceride, alkane, tokoferol, karotenoide i druga jedinjenja prisutna u kanabis biljci. Sativex® je alkoholni ekstrakt (etanol i propilen glikol) u formi oralnog sublingvalnog spreja, aplicira se pod jezik ili na unutrašnju stranu obraza i apsorbuje se u krvotok putem bukalne sluznice. Namijenjen je za tretman neuropatskog bola i spazma kod pacijenata koji boluju od multiple skleroze, a provode se i kliničke studije za tretman bola kod karcinoma [King, 2009; Hazekamp et al., 2010; Clarke and Merlin, 2013; Martin and Rashidian, 2014; Thomas, B. and ElSohly, 2016; Small, 2017a; Radwan et al., 2017].

Brojne studije su pokazale da, ako se pravilno doziraju, kanabis preparati nisu štetniji od nekih drugih lijekova. Za razliku od narkoanalgetika na bazi opioida, kanabis nema potencijal za predoziranje [Iversen, 2000; Thomas, M., 2012; Martin and Rashidian, 2014; Small, 2017a]. Procijenjena LD₅₀ za oralno unešen THC je oko 1 g/kg tjelesne težine, što znači da bi prosječna odrasla osoba za dostizanje LD₅₀ nivoa trebala konzumirati 50-100 g čistog THC, što bi odgovaralo 500-1000 g kanabis preparata sa oko 10% THC. Iako nisu zabilježeni smrtni slučajevi od predoziranja kanabis preparatima, oni u kombinaciji sa drugim drogama, indirektno mogu doprinijeti fatalnom ishodu, zbog sinergičkog djelovanja [Small, 2017a].

Provedena su istraživanja različitih načina uzimanja kanabis preparata, od udisanja (pušenjem ili inhaliranjem), preko sublingvalnih do klasičnih oralnih preparata (čaj, napici sa mljekom, pogačice i sl.). Kod svih oblika grijanje je najvažniji korak u konverziji kanabinoidnih kiselina u odgovarajuće farmakološki aktivne neutralne kanabinoide. S druge strane, različiti preparati mogu imati različite profile jedinjenja, što zavisi od intenziteta grijanja, gubitka isparavanjem i metabolizma, ali i od varijeteta, uslova i vremena skladištenja. Kao rezultat uzimanja pojedinih

preparata, u organizam dospjeva odgovarajući spektar jedinjenja, gdje razni preparati mogu izazvati različite efekte, čije trajanje može varirati [Hazekamp et al., 2010].

Pušenje kanabis preparata karakteristično je za rekreativne korisnike, ali i neki pacijenti preferiraju taj način konzumiranja, zbog većeg iskorištenja THC pod uticajem visoke temperature (sagorijevanje kanabisa dešava se na oko 230°C) [McPartland and Russo, 2001]. Pod uticajem temperature tetrahidrokanabinolna kiselina (Δ^9 -THCA), koja nije psihoaktivna, a prisutna je u kanabis biljci, konvertuje se u psihoaktivni tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC), čije se iskorištenje povećava na taj način. Međutim, povišena temperatura pospješuje i oksidativnu razgradnju Δ^9 -THC do CBN, te izomerizaciju do Δ^8 -THC, pa korisnici mogu biti izloženi i različitim neželjenim hemikalijama koje su proizvodi sagorijevanja kanabisa [Thomas, B. and ElSohly, 2016]. Konzumiranje pušenjem je nekompatibilno zdravstvenom aspektu i ni jedan drugi lijek se ne konzumira na taj način. Nešto prihvatljivije bi moglo biti korištenje lula sa vodom, jer voda filtrira toksine nastale sagorijevanjem, pri čemu THC prolazi, jer nije rastvorljiv u vodi. Tehnika isparavanja, na temperaturi nižoj od temperature sagorijevanja, pri kojoj se kanabinoiodi pojavljuju u formi isparenja koja se udišu, omogućuje korisnicima medicinskog kanabisa prednost brze resorpcije preparata kroz pluća, uz izbjegavanje štetnih efekata pušenja [Hazekamp, 2010; Small, 2017a]. Za inhaliranje su pogodni evaporatori, uređaji koji zagrijavaju do temperature 185°C, na kojoj većina THC isparava, a pri tome ne dolazi do sagorijevanja, pa tako ni do oslobađanja štetnih i kancerogenih proizvoda sagorijevanja [McPartland and Russo, 2001]. Za grijanje kanabis ekstrakata i inhaliranje nastalih isparenja mogu se koristiti i e-cigarete [Thomas, B. and ElSohly, 2016].

THC je dobro rastvorljiv u mastima, pa kada se u organizam unosi udisanjem lako prolazi kroz alveole u plućne kapilare i putem krvotoka dospjeva do srca i mozga. Efekti proizvodi u roku nekoliko minuta, sa maksimumom od oko 10-30 minuta i trajanjem 2-3 sata. Prilikom oralnog konzumiranja efekti nastupaju sporije (u roku od 30 minuta do 3 sata), a traju duže (5 do 8 sati, ponekad i duže, zavisno od doze). Nakon oralnog uzimanja, THC se najvećim dijelom metaboliše u jetri pri čemu nastaju dva glavna metabolita 11-hidroksi-THC (11-OH-THC) i 11-nor-9-karboksi-THC (11-COOH-THC). Za razliku od 11-COOH-THC metabolita koji nije psihoaktivna, 11-OH-THC je glavni psihotropni metabolit, 3 do 4 puta psihoaktivno potentniji, sa dugotrajnjim djelovanjem i više neprijatnih nuspojava nego THC iz biljke [Hazekamp et al., 2010; Clarke and Merlin, 2013; Martin and Rashidian, 2014; Small, 2017a]. Najveći dio THC unesenog u organizam izluči se u obliku metabolita, dok se manje od 5% izluči u neizmjenjenom obliku. Kanabinoidi su rastvorljivi u mastima i akumuliraju se u masnom tkivu,

odakle se lagano otpuštaju i izlučuju duže vrijeme, pa se metaboliti THC mogu detektovati u urinu, duže od mjesec dana nakon konzumiranja [Hazekamp et al., 2010; Small, 2017a].

Pored inhalacije i oralne aplikacije, koje su najčešće metode primjene medicinskih preparata kanabisa, postoje i preparati u formi kapi za oči, sprejeva i aerosola, te preparati za intravenoznu aplikaciju. Postoje i rektalne suspozitorije sa kanabinoidima, čija primjena nije dovoljno raširena iako imaju određene prednosti, jer apsorpcija zaobilazi jetru i time se izbjegavaju problemi vezani za metabolizam u jetri, koji ograničavaju upotrebu oralnih preparata. Nivo u plazmi se postiže u roku od 15-30 minuta, a efekti traju 4 do 8 h [Iversen, 2000; Thomas, B. and ElSohly, 2016]. Značajnu ulogu u prihvatanju medicinskog kanabisa mogli bi imati novi farmaceutski preparati, pogodnog načina konzumiranja i efektivnog iskorištenja sastojaka kanabisa [Clarke and Merlin, 2013; Small, 2017a].

Uz veću potražnju za ljekovitim preparatima na biljnoj bazi, raste i potreba da se pouzdano dokaže njihova efikasnost i zdravstvena bezbjednost. Ograničenje za upotrebu kanabis preparata u savremenoj medicini ogleda se u činjenici da nije lako proizvesti biljni preparat ujednačenog kvaliteta (hemijskog sastava), što je jedan od standarda moderne farmacije. Neujednačen kvalitet biljnih preparata može biti posljedica genetske varijabilnosti i uslova uzgoja. Isto tako, pri analizi biljnih ekstrakata postiže se ponovljivost do 40%, što ograničava entuzijazam u razvoju farmaceutika na biljnoj bazi [Gorelick and Bernstein, 2017].

Medicinska marihuana obično je u formi cvjetnih vrhova ili granulisanog materijala, sa sadržajem THC 10-30%. Za proizvodnju medicinskih kanabis preparata moraju se zadovoljiti visoki standardi kavliteta, stoga se biljke moraju uzbogati pod strogo kontrolisanim uslovima. To podrazumijeva primjenu sofistikovane opreme i tehnika, angažovanje stručnog osoblja visokih etičkih standarda koji poštuju dobru poljoprivrednu praksu, radi dobijanja kvalitetnog i bezbjednog proizvoda. Prilikom proizvodnje, pakovanja i skladištenja biljnih medicinskih preparata treba primjenjivati dobru proizvođačku praksu, a potrebno je provesti i testove stabilnosti, kojima se utvrđuje kako se preparat mijenja sa vremenom, kako faktori okoline utiču na njihovu stabilnost, odnosno pod kojim uslovima i koliko dugo se preparati mogu čuvati. Uslovi skladištenja trebaju biti kontrolisani, na način da kanabis materijal ne bude izložen vlažnosti, svjetlu ili povišenoj temperaturi. I pored idealnih uslova skladištenja kanabinoidne kiseline lagano degradiraju kroz reakciju dekarboksilacije do odgovarajućih neutralnih kanabinoida. Na sobnoj temperaturi, dekarboksilacija THCA odvija se eksponencijalno, dok se degradacija neutralnih kanabinoida odvija nešto sporije. Poznato je da THCA degradira brže u ekstraktima nego u kanabis smoli (hašiš), stoga ekstrakte treba čuvati u frižideru. Terpeni i

flavonoidi također degradiraju ili se gube isparavanjem. Dakle, stabilnost hemijskog sastava najbolje se postiže čuvanjem na niskoj temperaturi, u inertnoj atmosferi i u odsustvu svjetlosti [Thomas, B. and ElSohly, 2016].

Nauka i znanje trebaju biti u službi prakse, a u tom lancu analitička hemija ima značajnu ulogu u karakterizaciji kanabis preparata i proučavanju fizioloških procesa prilikom terapijske primjene [Potter, 2014; Thomas, B. and ElSohly, 2016; Small, 2017a]. Za proučavanje pojedinih hemijskih sastojaka neophodni su referentni standardi odgovarajućih jedinjenja. Nedostatak referentnih standarda, bez sumnje, uveliko je ograničavao detaljno proučavanje hemijskog sastava kanabisa, jer su donedavno bili dostupni referentni standardi samo nekoliko glavnih kanabinoida (Δ^9 -THC, CBD, CBN i Δ^8 -THC) [Hazekamp et al., 2010].

3. ANALIZA KANABIS PROIZVODA U FORENZIČKE SVRHE

Forenzička hemija ima određene specifičnosti, u odnosu na druge oblasti hemijskih analiza. Prilikom izbora odgovarajućeg postupka analize u svakom pojedinom slučaju, pored hemijskih imperativa i ograničenja, analitičar mora biti svjestan i pravosudnog aspekta, odnosno uticaja pravnih propisa na analitičke zahtjeve. Pažnju treba posvetiti rukovanju sa materijalom od prijema do odlaganja na čuvanje, kako bi pored analitičkih, bili zadovoljeni i procesni zahtjevi. Forenzički analitičar naglasak stavlja na dokaznu vrijednost analitičkih metoda, uzimajući u obzir stepen njihove tačnosti i preciznosti, pri tom vodeći računa o količini uzorka potrebnoj za svaku analizu. U forenzičkoj laboratoriji analitičari primjenjuju različite analitičke tehnike za analizu brojnih i raznovrsnih uzoraka koji nerijetko potiču iz teških krivičnih djela, koja treba rasvijetliti, zbog čega je potrebno rezultat dati u što kraćem vremenu. Analitičar takođe mora biti svjestan mjesta i uloge svake metode primjenjene u postupku analize, čiji rezultati će omogućiti da sudu predoči stručno mišljenje zasnovano na nauci. Forenzički analitičar posebnu pažnju posvećuje osobinama uzorka čija analiza je složenija od rutinske, a koje mogu biti komplikovane prilikom stručnog tumačenja na sudu. Njegova obaveza je da svoj nalaz prezentuje na sudu, na odgovarajući način, razumljiv i osobama koje nisu hemijske struke, što nije uvijek jednostavan zadatak [Siegel, 2005; Terrell et al., 2008].

Forenzičkim analitičarima su na raspolaganju brojne metode analiza, a izbor metoda koje će se primjeniti u svakom konkretnom slučaju procjenjuju se prema raspoloživoj formi i količini uzorka, raspoloživoj opremi i u skladu sa zakonskim nadležnostima analitičara. Kada je u pitanju analiza ilegalnih droga i drugih psihotropnih supstanci pod kontrolom zakona, prema stručnoj praksi forenzičkih hemijskih laboratorijskih, za pouzdanu identifikaciju preporučuje se primjena najmanje dvije analitičke tehnike zasnovane na različitom mehanizmu detekcije i identifikacije. Američka stručna asocijacija pod nazivom Naučna radna grupa za analizu zaplijjenjenih droga (*Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs/SWGDRUG*) formulisala je opšta pravila za izbor metoda analiza, u okviru preporuka koje su prepoznate kao minimalan standard i temelj dobre laboratorijske prakse za forenzičku identifikaciju ilegalnih droga [SWGDRUG, 2016].

Identifikacija kanabis preparata, pored identifikacije biljnog materijala u smislu njegove pripadnosti biljnoj vrsti *Cannabis sativa* L., podrazumijeva i kvalitativnu hemijsku analizu

prisustva kanabinoida, kao karakterističnih sastojaka kanabis biljke. Metode koje se koriste za identifikaciju kanabisa prvenstveno zavise od prirode preparata. Za preparate koji sadrže odgovarajuće biljne dijelove karakterističnih osobina, pogodne za morfološku identifikaciju, kombinacija fizičkih (makroskopskih i mikroskopskih) ispitivanja, obojenih testova i hromatografije na tankom sloju smatra se minimalno prihvatljivim analitičkim pristupom za pozitivnu identifikaciju odnosno dokazivanje pripadnosti ispitivanog uzorka biljnoj vrsti *Cannabis sativa L.* Kod preparata kod kojih morfološke osobine nisu uočljive, kao u slučaju kanabis smole i ulja, identifikacija se zasniva na primjeni odgovarajuće kombinacije metoda hemijske analize, kojima se utvrđuje prisustvo kanabinoida [UNODC, 2009a]. U slučaju veoma male količine, kao što su tragovi na priboru (lule, šprice, kašike i sl.) koji nisu dovoljni za primjenu više analitičkih tehnika, primjenjuje se ona tehnika koja će dati najbolje rezultate. U tom smislu, gasna hromatografija sa masenom detekcijom (GC/MS) je tehnika izbora za forenzičku analizu droga [Siegel, 2005].

Savremene instrumentalne tehnike koriste veoma male alikvote uzorka za analizu, stoga je neophodno da su ti alikvoti reprezentativni za kompletну količinu materijala od kojeg su uzeti [UNODC, 2009a; McDermott, 2011]. U tom smislu, potrebno je odgovarajuću pažnju posvetiti uzorkovanju materijala za analizu.

3.1. Uzorkovanje

Svrha uzorkovanja je dobijanje podataka o materijalu koji je predmet ispitivanja, na bazi rezultata analiza odabranih uzoraka [SWGDRUG, 2016]. U skladu sa načelima efikasnosti i ekonomičnosti, uzorkovanje dolazi do izražaja kada je predmet analize velika količina materijala ili veliki broj naizgled sličnih uzoraka [Siegel, 2005]. Kada je u pitanju veliki broj uzoraka, među kojima se neki razlikuju po fizičkom izgledu, potrebno ih je podijeliti u podgrupe sa sličnim osobinama i uzorkovanje izvršiti iz svake podgrupe [ENFSI, 2003; UNODC and ENFSI, 2009].

Uzorkovanje se obavlja u skladu sa stručnim principima analitičke hemije, a može biti definisano naredbom tužilaštva u konkretnom slučaju, propisano (npr. zakonskim propisima, farmakopejama i sl.) ili preporučeno od strane stručnih međunarodnih organizacija, kao što su Laboratorijska i naučna sekcija (*Laboratory and Scientific Section/LSS*) pri Kancelariji Ujedinjenih Nacija za droge i kriminal (*United Nations Office on Drugs and Crimes/UNODC*), Evropska mreža forenzičkih naučnih instituta (*European Network of Forensic Science*

Institutes/ENFSI) ili Naučna radna grupa za analizu zaplijenjenih droga (SWGDRUG). Smjernice koje daju stručne organizacije su u formi preporuka, pri čemu svaka laboratorija razvija vlastitu strategiju uzorkovanja zavisno od zakonskih propisa u okviru kojih djeluje, zahtjeva korisnika i primjene rezultata u konkretnoj istrazi. Konačno, analitičar odlučuje koji postupak uzorkovanja će primjeniti, zavisno od okolnosti u svakom pojedinačnom slučaju [ENFSI, 2003; UNODC, 2009a; UNODC and ENFSI, 2009; ENFSI, 2014; SWGDRUG, 2016]. Prednosti razvijanja strategije i plana uzorkovanja ogledaju se u optimizaciji broja analiza, a time i skraćenju vremena rukovanja i izlaganja potencijalno opasnim supstancama u uzorku, koji može biti kontaminiran i biološki hazardnim materijama [McDermott, 2011].

Prilikom uzorkovanja važno je zadovoljiti sljedeće principe:

- da je uzorak reprezentativan, odnosno da vjerno predstavlja materijal iz kojeg je uzet;
- da svaka jedinka populacije ima istu šansu da bude odabrana [ENFSI, 2003; UNODC and ENFSI, 2009].

Zavisno od količine, može se izvršiti homogenizacija materijala prije uzorkovanja. Kod homogenih materijala, jedan uzorak može biti dovoljan za kvalitativnu analizu. U slučaju velike količine materijala, kada homogenizacija nije praktična, može se primjeniti metoda uzorkovanja koja podrazumjeva uzimanje nekoliko uzoraka sa različitih mesta [Siegel, 2005; SWGDRUG, 2016].

Kada je u pitanju veliki broj naizgled sličnih uzoraka, za određivanje broja uzoraka koji će se analizirati primjenjuju se metode uzorkovanja koje mogu biti statističke ili nestatističke. U mnogim slučajevima zadovoljavaju proizvoljne nestatističke metode, od kojih je metoda „kvadratnog korijena“ veoma raširena u forenzičkim laboratorijama [ENFSI, 2003; Siegel, 2005; UNODC and ENFSI, 2009; SWGDRUG, 2016]. Kada se raspolaze sa velikim brojem pakovanja, koja su vizuelno istovrsnog sadržaja, praksa je da se u slučaju do 30 pakovanja sve dostavlja u laboratoriju. Kada je broj istovrsnih pakovanja do 100, za laboratorijsku analizu se uzima 10 pakovanja, a kod broja pakovanja većeg od 100, za analizu se uzima kvadratni korijen od ukupnog broja pakovanja, a može se koristiti i neka od statističkih metoda uzorkovanja.

Broj uzoraka uzetih primjenom nestatističkih metoda, može se kretati od minimalističkog pristupa (analizirati samo jedan uzorak iz populacije) do maksimalističkog pristupa (analizirati sve uzorce u populaciji), što zavisi od pitanja na koja treba odgovoriti u konkretnom slučaju. Prednost nestatističkih metoda je jednostavan pristup i izvođenje, dok se osnovni nedostatak ogleda u nemogućnosti statističkog zaključivanja o karakteristikama cjelokupnog materijala.

Nedostatak ovih metoda je i to što, u slučaju velike količine materijala, mogu dovesti do uzimanja nepotrebno velikog broja uzoraka [ENFSI, 2003; UNODC and ENFSI, 2009].

Statističke metode uzorkovanja omogućuju zaključivanje o osobinama ukupne količine materijala, na osnovu rezultata analiza odabralih uzoraka. Za uzorkovanje droga najčešće se koriste frekventistička metoda hipergeometrijske distribucije i Bajesova metoda [ENFSI, 2003; Siegel, 2005; UNODC and ENFSI, 2009; SWGDRUG, 2016]. Radi lakše primjene statističkih metoda u praksi, razvijeni su softveri i tablice pomoću kojih se procjenjuje broj uzoraka koje treba uzeti za analizu iz određene populacije. Za razliku od Bajesove metode, hipergeometrijska metoda ne uzima u obzir dodatne podatke o materijalu, kao što su izgled, miris, rezultati preliminarnog testiranja i sl., na osnovu kojih se, prema ranijem iskustvu, prepostavlja eventualno prisustvo negativnih uzoraka (uzoraka koji ne sadrže droge). Za isti stepen vjerovatnoće i interval povjerenja, broj uzoraka koji će se uzeti za analizu, povećava se u skladu sa brojem očekivanih negativnih uzoraka. Prilikom uzorkovanja kanabis biljaka, na osnovu vizuelnog pregleda mogu se uočiti karakteristične fizičke osobine, te na osnovu prethodnog iskustva, primjena Bajesove metode omogućuje uzimanje manjeg broja uzoraka za analizu [ENFSI, 2003; UNODC and ENFSI, 2009].

Kvantitativna analiza bi trebala dati odgovor o koncentraciji pojedinih komponenti u materijalu koji je predmet ispitivanja. Za razliku od industrijskih npr. farmaceutskih proizvoda, ilegalne droge su često heterogeni materijali, koji mogu imati prilično neujednačen sastav, o čemu treba voditi računa prilikom uzorkovanja. Ukoliko, zbog velike količine, nije praktično homogenizovati sav materijal, preporučuje se uzimanje više uzoraka sa različitih mesta, koji se potom pomiješaju i homogenizuju u cilju pripreme reprezentativnog primarnog uzorka [McDermott, 2011; ENFSI, 2014]. Iako jedan primarni uzorak može biti dovoljan za analizu, preporučuje se pripremiti najmanje dva takva uzorka. Visokokoncentrovani uzorci su obično homogeniji od razblaženih, uličnih uzoraka, šta takođe može uticati na odluku o broju uzoraka koji će se uzeti za kvantitativnu analizu [ENFSI, 2014].

Teško je definisati koja strategija uzorkovanja je optimalna i pod kojim uslovima, jer na izbor strategije utiču brojni faktori, kao što su vrsta i pojavnji oblik droga, količina materijala, kapacitet laboratorije, iskustvo analitičara, cilj istrage i sl. [ENFSI, 2003; UNODC and ENFSI, 2009]. Postoje situacije kada se, zbog pravnih razloga, ne mogu ispoštovati uobičajena pravila uzorkovanja, kao npr. kada je količina uzorka ograničena, a analitičar treba sačuvati dio uzorka kao fizički dokaz na sudu [UNODC, 2009a]. Stoga je cilj da odabrana strategija uzorkovanja odgovara potrebama tužilaštva i suda u svakom pojedinačnom slučaju [ENFSI, 2003; UNODC

and ENFSI, 2009]. Prilikom izbora strategije uzorkovanja treba imati u vidu da se eventualne greške nastale tokom uzorkovanja ne mogu ispraviti kasnije tokom analize [ENFSI, 2014].

3.2. Morfološko ispitivanje

3.2.1. Makroskopske karakteristike

Makroskopske karakteristike, odnosno izgled biljke i njenih pojedinih dijelova detaljno su opisani u poglavlju *2.1. Fizičke osobine*.

Kada se govori o identifikaciji na osnovu tih osobina značajno je naglasiti da je izgled lista, sjemena i cvijeta karakterističan za konoplju, pa se detaljnim pregledom tih dijelova, ukoliko su prisutni u uzorku, može se sa velikom vjerovatnoćom utvrditi da li se radi o biljnoj vrsti *Cannabis sativa L.*

Za pouzdaniju identifikaciju ili kada se radi o sitnijim, manje prepoznatljivim dijelovima biljnog materijala pristupa se mikroskopskom pregledu.

3.2.2. Mikroskopske karakteristike

Biljka *Cannabis sativa L.* ima karakterističnu morfološku građu pogodnu za mikroskopsko ispitivanje. Pojedini dijelovi biljke obiluju trihomama, odnosno dlakastim tvorevinama iz epidermalnih ćelija, čije prisustvo je karakteristična osobina kanabis biljke, koja se može da se uoči mikroskopskim ispitivanjem. Postoje dvije vrste trihoma koje se mogu posmatrati mikroskopom sa faktorom povećanja 40, kojom prilikom se jasno uočavaju žljezde koje luče smolu i dlačice sa cistolitima koje potiču od epidermalnog tkiva lista [UNODC, 2009a; McDermott, 2011].

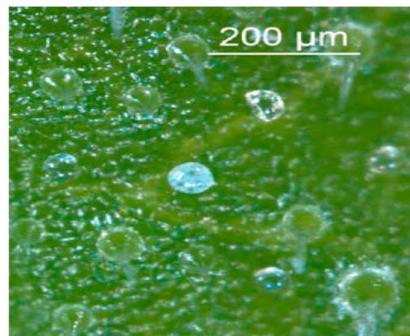
Žljezdane trihome su primarne strukture u kojima se proizvodi i pohranjuje kanabis smola, odnosno u njima se sintetizuju kanabinoidi. Cvjetni vrhovi ženskih biljaka su posebno bogati ovim strukturama, ali se mogu naći i na donjoj strani lišća, a ponekad na stabljikama mladih biljaka [Mahlberg and Kim, 2004; UNODC, 2009a].

Postoje tri vrste žljezdanih trihoma:

- Kitnjaste žljezdane trihome su najizraženje tokom ranog razvoja. Uglavnom se nalaze na epidermu donje površine lista, peteljkama i mladim stabljikama. Žljezde se sastoje

od okrugle glave prečnika 30-50 μm (Slika 13). Iako izgleda da su bez stabljike, one imaju veoma kratku jednoćelijsku stabljiku [Raman, V. et al., 2017].

- Žljezde okrugle glave prečnika 50-70 μm na višećelijskoj stabljici dužine 100-200 μm (Slika 14), posebno su gusto zastupljene na ženskim biljkama. Štite biljku od štetnog svjetlosnog zračenja reflektujući IC i UV svjetlost. Ove žljezde proizvode najveću količinu smole [Mahlberg and Kim, 2004; McDermott, 2011; Potter, 2014; Raman, V. et al., 2017].
- Male gomoljaste žljezdane trihome prečnika 10-20 μm sa kratkom stabljikom (15-30 μm) prisutne su na svim površinama biljke [Mahlberg and Kim, 2004; Potter, 2014; Raman, V. et al., 2017].



Slika 13. Kitnjaste žljezde

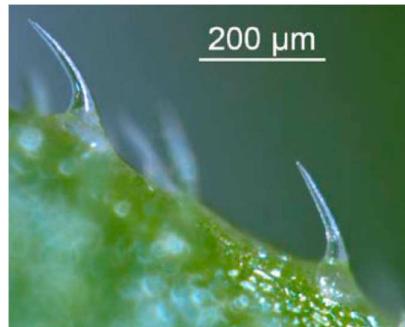


Slika 14. Stabljične žljezdane trihome

(Izvor fotografija: UNODC, 2009a)

Ne-žljezdane trihome su brojne, jednoćelijske, krute i zakrivljene dlake, sa vitkim istaknutim vrhom:

- Cistolitične trihome (Slika 15), dužine 50-125 μm , sa bazom prečnika 60-140 μm , nalaze se na gornjoj površini kanabis lista i imaju karakterističan oblik medvjedih kandži usmjerenih prema vrhu lista. Baza ovih jednoćelijskih dlačica sadrži kristale kalcijevog karbonata (cistolite). Često se kod slomljenih trihoma cistolit oslobađa. Cistolitične trihome zajedno sa kristalima kalcijevog oksalata prisutnim u čelijama lišća štite biljku od insekata [UNODC, 2009a; McDermott, 2011; Small, 2017a; Raman, V. et al., 2017];
- Ne-cistolitične trihome (Slika 16), dužine 250-370 μm , prisutne su na obe strane lista, ali ih je više na donjoj strani. Ima ih i na površini stabljike i peteljki. Također djeluju kao fizička zaštita od insekata, koji preferiraju donju površinu lišća [Small, 2017a; Raman, V. et al., 2017].



Slika 15. Cistolitične trihome



Slika 16. Ne-cistolitične trihome

(Izvor fotografija: UNODC, 2009a)

Istovremeno prisustvo cistolitičnih dlačica oblika medveđe kandže na gornjoj površini lista i dugih trihoma i kitnjastih žljezda na donjoj površini, je karakteristika jedinstvena za biljku *Cannabis sativa* L. i omogućuje pozitivnu identifikaciju čak i fragmenata biljnog materijala [UNODC, 2009a].

Nedostatak mofološkog ispitivanja dolazi do izražaja u slučaju veoma mladih sadnica ili stabljika bez lišća, koje ne mogu biti pouzdano identifikovane pregledom botaničkih karakteristika.

3.3. Hemijsko ispitivanje

U forenzičkoj praksi, kvalitativnom i kvantitativnom hemijskom analizom ispituje se prisustvo i koncentracija tri osnovna kanabinoida: tetrahidrokanabinola (THC), kanabidiola (CBD) i kanabinola (CBN). U svježem biljnom materijalu prisutni su THC i CBD, dok CBN uglavnom nije prisutan u svježoj biljci, a nastaje razgradnjom THC u ubranom biljnom materijalu i drugim kanabis preparatima tokom skladištenja. Kako psihoaktivni sastojak tetrahidrokanabinol (THC) nastaje iz tetrahidrokanabinolne kiseline (THCA) neenzimatskom dekarboksilacijom, kvantitativni analitički pristup zavisi od toga da li se THCA i THC određuju odvojeno ili se određuje tzv. „ukupan THC“ (THC + THCA). To može biti definisano nacionalnim zakonodavstvom, a ukoliko to nije slučaj, uobičajena forenzička praksa podrazumijeva određivanje ukupnog THC, budući da to najbolje predstavlja farmakološko djelovanje preparata. Ukupan THC obezbjedi se dekarboksilacijom THCA do THC, što se može provesti zagrijavanjem ekstrakta prije analize ili u injektoru gasnog hromatografa [UNODC, 2009a].

3.3.1. Preliminarni testovi

Preliminarno testiranje droga može se obavljati u laboratoriji i na terenu, a zasniva se na hemijskim ili enzimatskim reakcijama aktivnih komponenti droga sa odgovarajućim reagensima.

Proizvođači kriminalističko-tehničke opreme, isporučuju komplete u kojima se nalaze testovi za ispitivanje najfrekventnijih grupa droga. Metode testiranja su jednostavne za izvođenje, a test reagensi i pribor su prilagođeni tako da ih, praćenjem uputstva za rad, mogu primjeniti i osobe koje nisu hemijske struke (npr. kriminalistički inspektor), uz napomenu da je za pravilnu primjenu i tumačenje rezultata potrebna odgovarajuća obuka. Pored jednostavne primjene, ove testove karakteriše visoka osjetljivost, pa tako i mali utrošak materijala, te brzo dobijanje rezultata, zbog čega se ponekad nazivaju „brzi testovi“. S druge strane ovi testovi nisu uvijek dovoljno specifični za određenu drogu ili grupu droga. Naime, uzorci droga mogu da sadrže različite razblaživače, farmakološki aktivne i neaktivne dodatke, te komponente prisutne u prirodnim materijalima, koji mogu ometati hemijsku reakciju i uticati na rezultat testa. Isto tako, u ilegalnom prometu nisu rijetki uzorci koji mogu biti kombinacija nekoliko droga, što također može uticati na rezultat testiranja. Zbog toga se pozitivan rezultat testa tumači samo kao moguće prisustvo jedinjenja ili grupe jedinjenja za koju je test namijenjen i u svim slučajevima pozitivnog rezultata, uzorak mora biti dostavljen u laboratoriju na detaljnu analizu [UNIDCP, 1994; Widdop, 2011]. Negativan rezultat testiranja pokazuje da, u granicama osjetljivosti testa, u uzorku nije utvrđeno prisustvo onih droga za koje je testiranje provedeno. U cilju pouzdanijeg zaključka, na istom uzorku se mogu primjeniti dva testa zasnovana na različitim hemijskim mehanizmima [UNIDCP, 1994]. Prilikom tumačenja rezultata, potrebno je dobro poznавanje mehanizma i pouzdanosti određenog testa, te poznавanje osobina i strukture droge i matriksa. Međutim, uvijek treba imati na umu da su testovi namijenjeni samo preliminarnoj identifikaciji sumnjivog materijala i ne mogu poslužiti kao dokaz [UNIDCP, 1994; Kwong, 2008].

Pored određenih ograničenja, dugogodišnje iskustvo pokazuje da su preliminarni testovi koristan alat, kako za dijagnozu i tretman pacijenata, tako i za službe koje sprovode zakon, u slučajevima kada treba preduzeti hitne aktivnosti na terenu i donijeti odluku u vezi sa sumnjivim materijalom [UNIDCP, 1994; Kwong, 2008].

3.3.1.1. Hemijski testovi

Spot-testovi koji su zasnovani na hemijskim reakcijama poznati su i kao “obojeni testovi”, jer se kao rezultat reakcije odgovarajućeg reagensa i aktivne komponente u uzorku, pojavljuje

karakteristično obojenje. Iako su testovi za kanabis među najspecifičnijim obojenim testovima i neke druge biljka (kana, muškatni oraščić, topuz i petrovac) sadrže jedinjenja koja pokazuju sličnu reakciju, te mogu dati lažno pozitivne rezultate. Zbog toga je pozitivan rezultat testa (pojava očekivane boje) samo indicija o mogućem prisustvu kanabisa, a nikako konačna identifikacija. Preliminarni rezultat testa neophodno je potvrditi primjenom dodatnih, specifičnijih i selektivnijih tehnika [UNODC, 2009a; McDermott, 2011].



Slika 17. Primjer komercijalnog testa za marihuanu

Radi provjere rezultata testa, te funkcionalnosti i pouzdanosti test reagenasa, preporučuje se paralelno testirati i kontrolni uzorak kanabisa (npr. referentni standard THC ili smjesu referentnih standarda osnovnih kanabinoida) i slijepi uzorak [UNODC, 2009a; Widdop, 2011].

U nastavku su navedeni obojeni testovi za ispitivanje kanabisa koji su najčešće u upotrebi.

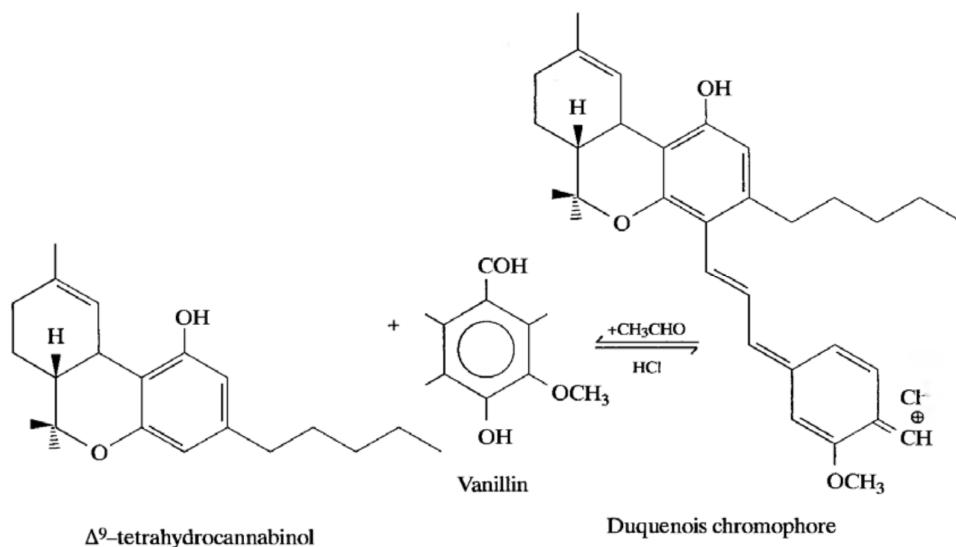
Duquenois-Levine Test

Prvu verziju ovog testa razvio je *Duquenois*, a vremenom se pojavilo više modifikacija istoga. Studija sa 270 različitih biljnih vrsta i 200 organskih jedinjenja pokazala je da je *Duquenois-Levine* modifikacija najspecifičnija, te se najčešće primjenjuje [Brenneisen, 2007; Hazekamp et al., 2010].

Test reagensi: 2 g vanillina i 2,5 ml acetaldehyda rastvoren u 100 ml etanola; HCl_{konz.}; hloroform [UNIDCP, 1994; Widdop, 2011].

Postupak: Malu količinu usitnjenog uzorka, sa 2 ml (oko 50 kapi) reagensa, mućkati u epruveti 1 minutu. Dodati 2 ml konc. hlorovodonične kiseline i promućkati, pa ostaviti da stoji par minuta. Ako se boja razvije u roku 2-3 minute, dodati 2 ml hloroforma i lagano promućkati [UNIDCP, 1994].

Rezultat: Ljubičasta boja donjeg (hloroformskog) sloja indicira prisustvo kanabisa [UNIDCP, 1994; Widdop, 2011].



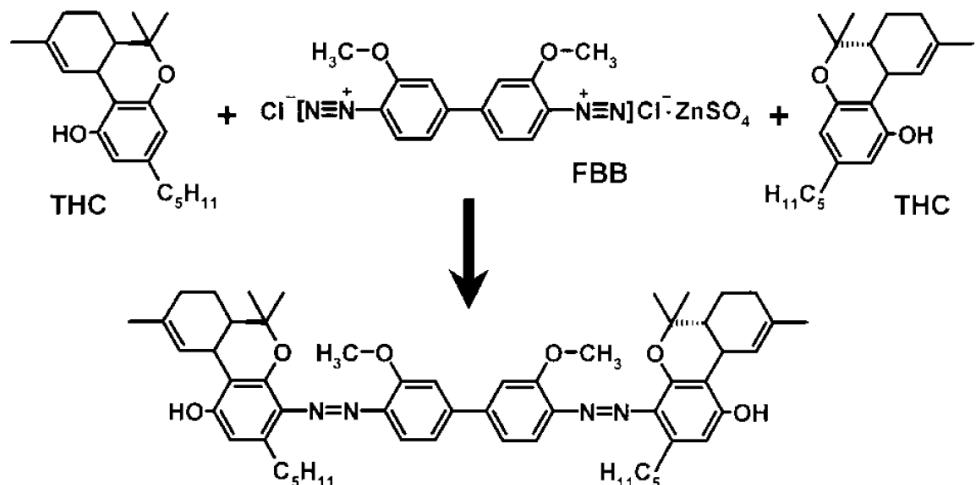
Slika 18. Hemiska reakcija Duquenois-Levine testa [Izvor: Bell, 2006]

Fast Blue B Salt Test

Test reagensi: 2,5 g *Fast Blue B Salt* (di-o-anizidin-tetrazolium-hlorid) pomiješan sa 100 g anhidrovanog natrijum-sulfata; hloroform (alternativno petroleter); 0,1 N rastvor natrijum-hidroksida (alternativno 10% natrijum-bikarbonat) [UNIDCP, 1994; UNODC, 2009a].

Postupak: U epruvetu staviti po malo (na vrh špatule) usitnjenog uzorka i reagensa. Dodati 25 kapi hloroforma i mućkati 1 minutu. Dodati 25 kapi 0,1 N rastvora natrijum-hidroksida i mućkati 2 minute [UNIDCP, 1994].

Rezultat: Ružičasto-crvena boja donjeg (hloroformskog) sloja indicira prisustvo kanabisa [UNIDCP, 1994]. Ova boja je kombinacija boja nastalih reakcijom sa osnovnim kanabinoidima: prisustvo THC – ružičasta, CBN – ljubičasta i CBD – narandžasto-smeđa.



Slika 19. Reakcija THC i Fast Blue B, pri čemu nastaje ružičasto-crveno obojenje (diazonijum so)

[Izvor: Chinaka et al., 2000]

Fast Blue B Salt reagens češće se primjenjuje kao sredstvo za vizuelizaciju kod hromatografije na tankom sloju, ali se može koristiti i kao preliminarni spot-test [Brenneisen, 2007; Hazekamp et al., 2010].

Fast Corinth V Salt Test

Test reagensi: petroleter; cink-hlorid; 2-metoksi-5-metil-4-(4-metil-2-nitrofenil)diazenilbenzendiazonijum-dihlorid (1% u anhidrovanom natrijum-sulfatu), 1%-tni voden rastvor natrijum-bikarbonata.

Postupak: Dva filter papira zajedno saviti na četvrtinu, pa razmotati u formu lijevka. Staviti malu količina usitnjjenog uzorka na sredinu gornjeg filter papira, dodati dvije kapi petroletera i sačekati da prodre do donjeg filter papira, pa gornji papir odbaciti. Sačekati da se donji filter papir osuši i dodati veoma malu količina reagensa u sredinu filter papira. Na kraju dodati 2 kapi 1% vodenog rastvora natrijum-bikarbonata.

Rezultat: Pojava ružičasto-crvenog obojenja indicira prisustvo kanabisa. THC, CBN i CBD daju istu nijansu, što je određena prednost reagensa za testiranje uzoraka različite starosti ili porijekla [UNODC, 2009a].

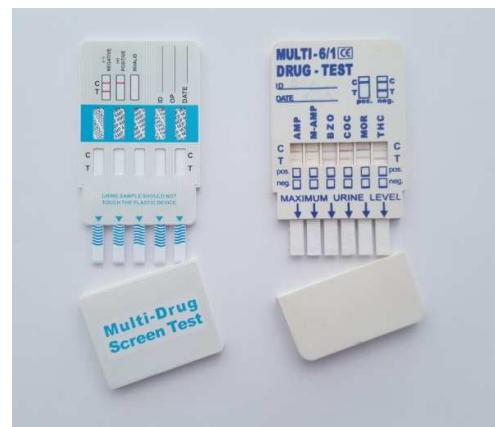
3.3.1.2. Imuno-hromatografski testovi

Imuno-hromatografski testovi bazirani su na specifičnim biohemijskim enzimatskim antigen – antitijelo reakcijama, odnosno imunotestovi sadrže antitijela pomoću kojih se detektuje određena droga ili njen metabolit, koji prepoznaju kao antigen, stvarajući kompleks antigen-antitijelo [Moeller et al., 2008; Dasgupta and Datta, 2008; Denić i sar., 2013]. Obično se koriste za testiranje prisustva tragova droga u biološkom materijalu (urin, oralna tečnost, rjeđe znoj) osoba za koje se sumnja da su konzumirale drogu, ali se mogu primjeniti i na uzorke zaplijjenjenog materijala sumnjivog na droge, ako se isti prilagodi testiranju (ekstrakcijom ili rastvaranjem).

Testovi su dostupni kao komercijalni kompleti koji sadrže testove namijenjene testiranju određene droge ili grupe droga, u formi singl-test i multi-test traka ili kartica, u zavisnosti da li se testira prisustvo jedne ili više droga (Slike 20 i 21).



Slika 20. Primjer singl-test traka i kartica



Slika 21. Primjer multi-test traka

Postoje uređaji za preliminarnu detekciju i identifikaciju droga zasnovani na različitim tehnikama, kao što su hemiluminescencija, fluorescencija i radioimunotestiranje i sl. [Kwong, 2008; Niedbala and Gonzalez, 2011]. Uređaji su praktičnog dizajna i prilagođeni za korištenje na terenu, koriste veoma malu količinu uzorka, potpuno su automatizovani i jednostavni za rukovanje, a rezultati se dobiju u roku nekoliko minuta [Dasgupta and Datta, 2008; Kwong, 2008]. Uređaji za testiranje oralne tečnosti postali su popularni za testiranje učesnika u saobraćaju, zahvaljujući mogućnosti uzorkovanja na licu mesta i pod nadzorom, za razliku od urina. Koncentracija droga u oralnoj tečnosti je u boljoj korelaciji sa koncentracijom u krvi, te ukazuje na to da li je droga skoro konzumirana, dok tragovi droga i njihovih metabolita u urinu mogu poticati od droge konzumirane prije više dana pa i sedmica. Osnovni nedostaci oralne

tečnosti kao uzorka su niska koncentracija aktivnih komponenti nekih droga (npr. THC) i ograničena količina uzorka [Garg, 2008].

Iako su imuno-hromatografski testovi specifičniji i pouzdaniji od obojenih testova, praksa je pokazala da i oni mogu dati lažno pozitivan ili lažno negativan rezultat [Dragoljić i sar., 2019a]. Lažni rezultati testiranja mogu poticati od ukrštenih reakcija sa jedinjenjima slične strukture prisutnim u uzorku ili matriksu [Dasgupta and Datta, 2008; Kwong, 2008; Niedbala and Gonzalez, 2011]. Sastojci nekih lijekova – npr. nesteroidni antiinflamatorni lijekovi i inhibitori protonske pumpe mogu biti uzročnici lažno pozitivnih rezultata na kanabis [Moeller et al., 2008]. Lažno negativni rezultat testa može biti posljedica niske koncentracije droge u testiranom uzorku (ispod granice detekcije testa) ili interferencije sa nekim jedinjenjima prisutnim u uzorku, a može biti da test nije dovoljno specifičan na neka jedinjenja iz određene grupe droga, pa ih ne detektuje. Zbog svega navedenog, ovi testovi se smatraju preliminarnim i preporučuju se za terensku upotrebu, a u laboratoriji se koriste samo kao prva dijagnostička „skrining tehnika“, jer su jednostavnii za izvođenje i brzo se dobiju preliminarni rezultati, koji su korisni za usmjeravanje daljih analiza [Moeller et al., 2008; Kwong, 2008; Denić i sar., 2013].

Zbog preliminarne prirode ovih testova i mogućih lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata, ne smije se dozvoliti stigmatizacija niti vođenje postupaka protiv ispitanika, prije nego što se izvrši provjera rezultata, primjenom specifičnih i selektivnih analitičkih metoda i tehniku u laboratoriji ovlaštene ustanove. Pouzdan i pravno valjan rezultat dobije se jedino potvrdnim metodama, a kao zlatni standard u forenzici se koriste visoko-osjetljive analitičke tehnike gasne ili tečne hromatografije sa masenom detekcijom (GC/MS, LC/MS), pomoću kojih se može pouzdano izvršiti detekcija, identifikacija i kvantifikacija ciljanog analita u uzorku i tako potvrditi ili opovrgnuti rezultat preliminarnog testiranja [Moeller et al., 2008; Kwong, 2008].

3.3.2. Hromatografske metode i tehnike

Kanabis proizvodi se, zbog njihovog hemijskog sastava, mogu smatrati složenim smjesama, te se za razdvajanje, detekciju i identifikaciju pojedinih komponenti u tim proizvodima mogu veoma uspješno primjeniti hromatografske tehnike.

Hromatografija, kao hemijska analitička tehnika, prvi put se javila u stručnoj literaturi 1903. godine kada je ruski naučnik Mihail Semenovič Cvet uspio da razdvoji pigmente hloroplasta iz petroletarskog ekstrakta biljnog zelenila primjenjujući elucionu metodu, tako što

je u staklenoj cijevi napunjenoj čvrstim nosačem (kalcijum karbonat) na vrh kolone nanio ekstrakt biljke, a zatim nakapavao čisti alkohol koji je za sobom povlačio komponente iz ekstrakta. Rezultat je bio razdvajanje smjese u niz žutih i zelenih zona. Zbog tih efekata razdvajanja koji su se ogledali u razdvojenim obojenim zonama pigmenata hloroplasta (karotenoida i hlorofila) Cvet je ovu metodu nazvao hromatografija, što potiče od grčkih riječi „hromos“ – boja i „grafos“ – pisati. Ta metoda je danas poznata kao adsorpciona hromatografija [Maksimović i sar., 1998; Marjanović, 2001; Jokanović, 2014; Luterotti, 2014]. U svojim obimnim istraživanjima M.S. Cvet je ispitao preko stotinu različitih punjenja kolone i efekte upotrebe različitih rastvarača, tako da je, osim za uvođenje hromatografije u analitičku praksu, zaslužan i za razvoj adsorpcione hromatografije i kolonske tehnike hromatografije. Značajno je napomenuti da je M.S. Cvet predpostavio da se ovom metodom mogu razvijati i neobojene supstance, što je danas najčešći slučaj [Marjanović, 2001]. Na osnovnim principima koje je postavio Cvet zasnivaju se i savremene hromatografske metode iako se danas razdvajanje supstanci vrši na različite načine.

Pod pojmom hromatografije danas se uobičajeno podrazumjevaju fizičko-hemijske analitičke tehnike koje omogućavaju razdvajanje, a potom identifikaciju sastojaka u multikomponentnim uzorcima (smjesama). Razdvajanje se odvija u sistemu dvije faze, nepokretne (stacionarne) faze koja može biti čvrsta ili tečna i pokretne (mobilne) faze koja može biti gas ili tečnost. Hromatografski postupci razdvajanja zasnivaju se na diferencijalnoj migraciji i distribuciji sastojaka smjese i njihovoj raspodjeli između nepokretne faze velike površine i pokretne faze koja prelazi preko nepokretne noseći sa sobom komponente uzorka koji se analizira. Jedan od osnovnih i praktičnih koncepata hromatografskog razdvajanja je odnos ravnotežnih koncentracija supstanci uspostavljenih između te dvije faze. U hromatografskom sistemu, koji čine stacionarna faza, mobilna faza i uzorak, uspostavlja se dinamička ravnoteža definisana ravnotežnom konstantom tj. koeficijentom raspodjele (K) [Kalász and Báthori, 2000; Marjanović, 2001; Živanović, 2003; McNair and Miller, 2009; Luterotti, 2014], koji je uopšteno dat izrazom:

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad [1]$$

gdje je:

c_s – koncentracija supstance u stacionarnoj fazi,

c_m – koncentracija supstance u mobilnoj fazi.

Brzina kretanja molekula određene supstance (komponente iz smjese) srazmjerna je brzini kretanja mobilne faze i udjelu vremena koje molekule date supstance provedu u mobilnoj fazi.

Brzina kretanja neke supstance u hromatografskom sistemu zavisi od:

- brzine kretanja mobilne faze, koja je ista za sve komponente u smjesi;
- odnosa zapremine stacionarne i mobilne faze, koja je ista za sve komponente u smjesi;
- koeficijenta raspodjele, koji je specifičan za određenu supstancu tj. komponentu iz smjese i određeni hromatografski sistem.

Do različitih brzina kretanja komponenti iz smjese, odnosno njihovog razdvajanja u prostoru ili vremenu dolazi zbog razlika u koeficijentima raspodjele, jer su ostale veličine jednake za sve komponente u smjesi [Marjanović, 2001]. Ako se razdvajanje vrši pri konstantnom vremenu, zavisnost kvalitativne karakteristike supstance od brzine kretanja je:

$$R_{f,i} = \frac{l_i}{l_f} = \frac{\text{pređeni put komponente}}{\text{pređeni put mobilne faze}} \quad [2]$$

Princip hromatografskog razdvajanja zasniva se na interakciji molekula komponenti iz smjese sa molekulama podloge, odnosno na razlikama u raspodjeli pojedinih komponenti između mobilne i stacionarne faze [Živanović, 2003; Jokanović, 2014], što je posljedica različitih fizičko-hemijskih procesa prikazanih u tabeli 2 [Marjanović, 2001].

Tabela 2. Hromatografske metode prema fenomenu dominantnom u procesu razdvajanja

Hromatografska metoda	Fizičko-hemijski mehanizam
adsorpciona hromatografija	fenomen adsorpcije
podiona hromatografija	fenomen raspodjele između dvije faze
hromatografija na izmjenjivačima jona	fenomen izmjene jona
hromatografija na molekulskim sitima	fenomen molekulskog sita
afinitetna hromatografija	fenomen visokospecifičnog afiniteta

Mehanizam hromatografskog razdvajanja supstanci koristi se u preparativne i analitičke svrhe. Analitička hromatografija primjenjuje se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu, a preparativna hromatografija podrazumijeva razdvajanje komponenti iz smjese u fazi pripreme uzorka za dalje analize, obično primjenom odgovarajućih instrumentalnih tehnika [Jokanović, 2014]. Za preparativnu hromatografiju koriste se postupci za ekstrakciju na čvrstoj fazi (*Solid Phase*

Extraction/SPE i *Solid Phase Micro Extraction/SPME*), koji funkcionišu na principu sličnom hromatografiji u koloni, a zasnivaju se na adsorpciji, kinetičkim i difuzionim mehanizmima. U odnosu na tradicionalne postupke ekstrakcije, primjenom SPE i SPME postupaka skraćuje se vrijeme izolacije analita i smanjuje se potrošnja organskih rastvarača [Luterotti, 2014]. Mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi koristi se za uzorkovanje isparljivih hemijskih sastojaka *headspace* tehnikom, direktno iz sumnjivog materijala, a potom se analiza vrši gasnom hromatografijom [UNODC, 2009a; Zadora and Zuba, 2009; Carlin and Dean, 2013].

Vremenom su razvijene brojne hromatografske tehnike, koje se koriste za razdvajanje komponenti iz smjese u preparativnoj i analitičkoj hemiji.

Osnovna podjela hromatografskih tehnika:

- kolonske tehnike (klasična hromatografija u koloni, gasna hromatografija i tečna hromatografija);
- laminarne tehnike – hromatografije na ravnim površinama (hromatografija na papiru i hromatografija na tankom sloju) [Marjanović, 2001].

Pored navedene osnovne podjele, hromatografske tehnike mogu se podijeliti prema tome da li se radi o klasičnim ili instrumentalnim tehnikama.

Klasične hromatografske tehnike:

- hromatografija u koloni (CC);
- hromatografija na papiru (PC);
- hromatografija na tankom sloju (TLC).

Instrumentalne hromatografske tehnike:

- gasna hromatografija (GC):
 - pirolizna gasna hromatografija,
 - gasno-masena hromatografija (GC/MS);
- tečna hromatografija (LC):
 - tečna hromatografija visokih ili ultra visokih performansi (HPLC ili UHPLC),
 - tečno-masena hromatografija (LC/MS, HPLC/MS ili UHPLC/MS).

Hromatografske tehnike koriste se za razdvajanje hemijskih smjesa, organskog i neorganskog porijekla i različitih agregatnih stanja, na sastavne komponente, čije se molekulske mase mogu

kretati u veoma širokom rasponu, od najnižih (npr. molekul vodonika) do najviših (npr. amiloza i amilopektin). Naravno, hromatografskim tehnikama se mogu analizirati i jednokomponentne supstance, u cilju njihove identifikacije.

Danas hromatografske metode spadaju u red najselektivnijih analitičkih i preparativnih metoda razdvajanja, a razvojem sistema za detekciju komponenti razdvojenih iz smjese, posebno u kombinaciji sa drugim instrumentalnim metodama (infracrvena spektrofotometrija, masena spektrometrija i dr.) dospjele su u sam vrh analitičkih metoda i po svojoj osjetljivosti, zbog čega su veoma raširene u primjeni. O značaju hromatografije može se zaključiti po tome što se danas analize kompleksnog materijala ne mogu izvesti bez primjene hromatografskih metoda, kao i iz činjenice da je čitav niz Nobelovih nagrada za nauku dodijeljen autorima hromatografskih tehika ili naučnicima koji su u svom radu koristili hromatografske metode [Marjanović, 2001].

U daljem tekstu opisane su hromatografske tehnike koje se najčešće koriste za analizu kanabis proizvoda.

3.3.2.1. Hromatografija na tankom sloju (TLC)

Preteča hromatografije na tankom sloju je hromatografija na papiru, koja je imala određene nedostatke: sporo razvijanje hromatograma, nepravilan put pojedinih komponenti, potreba relativno velike količine uzoraka i sl. U pokušaju da se uočene manjkavosti prevaziđu, njemački naučnik *Stahl* je 1956. godine uspio da riješi problem ravnomernog nanošenja tankog sloja adsorbensa (smjese silikagela i gipsa) na staklenu ploču i tako dobio veoma reproduktivne rezultate pri razvijanju hromatograma [Maksimović i sar., 1998], čime je u analitičku praksu uveo tehniku koja se u raznim varijantama koristi i danas.

Hromatografsko razdvajanje komponenti na tankom sloju može se izvesti pomoću svih vidova hromatografije, ali se najčešće koriste:

- adsorpciona hromatografija, zasnovana na adsorpciji rastvorenih komponenti na graničnoj površini pokretne i nepokretne faze pod uticajem međumolekulske sila,
- podiona hromatografija, čija je osnova u raspodjeli analiziranih komponenti između dvije međusobno nerastvorljive tečne faze, od kojih je jedna fiksirana na čvrstom nosaču (stacionarna), a druga pokretna (mobilna) i ima ulogu da kretanjem kroz stacionarnu fazu nosi sa sobom komponente nanesene na tanki sloj [Maksimović i sar., 1998; Marjanović, 2001].

U vrijeme kada je ova tehnika nastala tanki sloj adsorbensa ili inertnog nosača nanosio se na staklenu ploču u laboratoriji, dok danas proizvođači hemijske opreme i potrošnog materijala izrađuju TLC-ploče sa fabrički nanesenim tankim slojem (silika gel, aluminijum ili magnezijum oksid u smjesi sa gipsom, karboksimetil celuloza, inulin i sl.) na staklenu ploču, aluminijsku ili plastičnu foliju. Dimenzije TLC-ploča su obično standardizovane, kao 20 x 20 cm, 20 x 10 cm, 10 x 10 cm, 5 x 10 cm, mada neki proizvođači izrađuju i ploče drugih dimenzija. Debljina tankog sloja kreće se od 0,2 do 2 mm. Tanki sloj može biti impregniran fluorescentnim indikatorom (oko 1%), što omogućuje identifikaciju pomoću UV svjetla. [Kalász and Báthori, 2000; Poole, 2011; Jokanović, 2014; Luterotti, 2014].

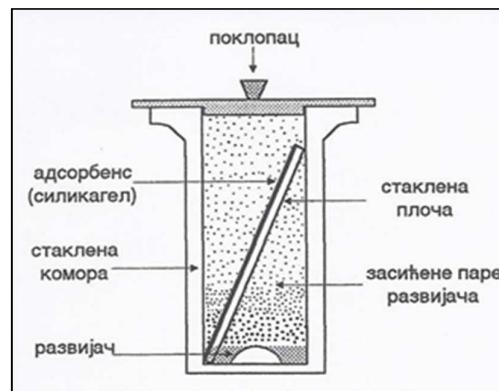
Hromatografija na tankom sloju se, kao i hromatografija na papiru, sastoji iz tri faze: obrazovanje hromatograma, razvijanje hromatograma i detekcija (otkrivanje) zona ili tzv. izazivanje hromatograma (popularno vizuelizacija). Vizuelizacija se vrši kada ispitivane komponente nisu obojene.

Obrazovanje hromatograma

Nanošenje rastvora uzorka i referentnih supstanci na hromatografsku ploču, volumena 1-10 μl , vrši se pomoću kapilarnih cjevčica ili mikropipete na udaljenosti 1-2 cm od donjeg ruba i 2 cm od bočnih rubova ploče. Razmak između startnih tačaka uzorka može biti 1-1,5 cm. [Moffat, 1986; Živanović, 2003].

Razvijanje hromatograma

Nakon sušenja, TLC ploča se stavi na razvijanje hromatograma u staklenu komoru, u koju je prethodno stavljen razvijač, odnosno mobilna faza (Slika 22).



Slika 22. Shema razvijanja TLC ploče u staklenoj komori, uzlaznom tehnikom
(Izvor: Maksimović i sar., 1998)

Kao razvijači koriste se rastvarači ili smjese rastvarača u različitim odnosima, a njihov izbor zavisi od vrste stacionarne faze i prirode supstanci koje se analiziraju. Komponente razvijača (mobilne faze) trebaju biti hemijski inertne u odnosu na supstance koje se analiziraju. Pored toga, mobilna faza treba biti isparljiva na sobnoj temperaturi. U stručnoj literaturi mogu se naći preporučeni sistemi za razvijanje odgovarajućih grupa jedinjenja. Tehnike za razvijanje hromatograma kod tankoslojne hromatografije su: uzlazna hromatografija, silazna hromatografija i horizontalna hromatografija. Najčešće se koristi uzlazna tehnika, kod koje se mobilna faza (razvijač) pod uticajem kapilarnih sila kreće preko ploče od dna prema vrhu ploče [Maksimović i sar., 1998; Živanović, 2003; Jokanović, 2014]. Molekuli uzorka kreću se nošeni mobilnom fazom i to tako da se različite komponente kreću različitim brzinama. Nakon nekog vremena pojedine komponente se nalaze na različitim rastojanjima od startne tačke, odnosno na različitim visinama na hromatografskoj ploči, kao vidljive ili nevidljive zone, pri čemu se iste komponente u istim uslovima rada penju do jednakih visina. Nivo do kojeg dospjeva razvijač (mobilna faza) predstavlja front koji ne smije preći preko gornje ivice ploče, da ne bi istisnuo komponente. Postoje i komore za istovremeno razvijanje većeg broja hromatografskih ploča (npr. 5 ploča), kao i komore sa dvodijelnim dnom, pogodnim za istovremeno razvijanje dvije ploče u dva različita razvijača [Kalász and Báthori, 2000; Moffat, 1986; Živanović, 2003].

Vizuelizacija (detekcija ili otkrivanje zona, odnosno izazivanje hromatograma)

Nakon razvijanja hromatograma, ploča se suši i pristupa se vizuelizaciji tj. detekciji razdvojenih komponenti, koja se može vršiti na više načina:

- vizuelnim uočavanjem obojenih komponenti,
- posmatranjem pod UV svjetлом, na talasnoj dužini 254 nm analiti se lociraju kao nefluorescirajuće mrlje, na pločama sa fluorescentnim indikatorom, a na talasnoj dužini 350 nm supstance koje fluoresciraju (veliki broj organskih supstanci) mogu se uočiti i na pločama bez fluorescentnog indikatora.
- hemijskom vizuelizacijom – prskanjem sa hemijskim reagensima u spreju, koji stupaju u hemijsku reakciju sa pojedinim komponentama gradeći obojena jedinjenja.

Navedeni redoslijed vizuelizacije uvijek treba poštovati, uz naglasak da hemijska vizuelizacija treba biti poslednja.



Slika 23. TLC hromatogram kanabis biljke i ref. standarda osn. kanabinoida

U stručnoj literaturi može se naći čitav niz reagenasa za hemijsku vizuelizaciju nevidljivih komponenti, preporučenih za određena jedinjenja ili grupe jedinjenja. Kada se ispituju nepoznate supstance preporučuje se primjena hemijskih vizuelizatora opšte namjene tzv. univerzalni, koji stupaju u reakciju sa grupama jedinjenja (npr. jodoplatinat ili ninhidrin sprej, Dragendorfov reagens i sl.). Nakon vizuelizacije uočavaju se obojene mrlje pojedinih komponenti, a mjeranjem dužine od startne tačke do mrlje komponente i od startne tačke do fronta razvijača, određe se veličine na osnovu kojih se izračunava R_f - vrijednost tj. odnos između pređenog puta komponente i pređenog puta razvijača.

R_f - vrijednost se kreće u intervalu 0 – 1, a može se izraziti i kao $R_f \times 100$, čime se eliminišu decimalni brojevi [Moffat, 1986; Kalász and Báthori, 2000; Poole, 2011; Luterotti, 2014; Jokanović, 2014]. Kvalitativna analiza tj. identifikacija komponenti kod tankoslojne hromatografije vrši se na osnovu boje mrlje i R_f - vrijednosti. R_f - vrijednosti zavise od laboratorijskih uslova (temperatura, vlaga, itd.), zbog toga se preporučuje razvijanje referentnih standarda odgovarajućih komponenti na istoj TLC ploči sa uzorcima [Moffat, 1986; Marjanović, 2001; Živanović, 2003; UNODC, 2009a; Luterotti, 2014].

Kvantitativna analiza je znatno složenija od kvalitativne i za njeno izvođenje neophodno je koristiti dodatne uređaje, a nanošenje uzorka na ploču vrši se precizno pomoću odgovarajućih dozatora.

Kvantitativna tankoslojna analiza može se izvršiti na više načina:

- Mjeranjem intenziteta boje mrlje, primjenom posebno konstruisanih spektrofotometara – denzitometara, pomoću kojih se vrši skeniranje svake izdvajene komponente, što se na pisaču prenosi kao zapis u vidu krive. Površina mrlje i intenzitet boje komponente direktno su srazmerni koncentraciji ispitivane komponente [Maksimović i sar., 1998; Živanović, 2003].

- Mjeranjem površine mrlje određene komponente i komparacijom sa površinom mrlje referentnog standarda iste komponente poznate koncentracije, vrši se proračun koncentracije ispitivane komponente u uzorku, pri čemu je površina mrlje direktno srazmjerna koncentraciji komponente [Živanović, 2003].
- Skidanjem razdvojenih komponenti sa ploče struganjem sloja adsorbensa zajedno sa komponentom ili eluiranjem komponente odgovarajućim rastvaračem pomoću namjenskog uređaja (eluohroma). Nakon skidanja kvantitativni sadržaj komponente određuje se primjenom neke druge analitičke metode (npr. IR- ili UV- spektroskopije) [Maksimović i sar., 1998; Marjanović, 2001; Živanović, 2003; Luterotti, 2014].

Dvodimenzionalna hromatografija na ravnim površinama (na tankom sloju ili na papiru) izvodi se tako što se ploča ili papir razvija u jednom pravcu u jednom razvijaču, potom se suši i ponovo razvija okrenuta za 90° u istom ili drugom razvijaču. Nakon sušenja i vizuelizacije dobije se hromatogram gdje su razdvojene komponente smjese raspoređene po cijeloj površini ploče. Komponente se definišu sa dvije R_f - vrijednosti, koje se mijere od startne tačke do fronta oba razvijača. Ovom tehnikom se povećava efikasnost razdvajanja, što omogućuje razdvajanje komponenti srodne strukture koje se ne bi mogle razdvojiti samo jednim sistemom razvijača, ali se na jednu ploču može nanijeti samo jedan uzorak [Moffat, 1986; Kalász and Báthori, 2000; Poole, 2011; Jokanović, 2014; Luterotti, 2014].

Tankoslojna hromatografija visokih performansi (*High Performance Thin-layer Chromatography/HPTLC*) je unaprijeđena tehnika, kod koje se koriste ploče sa značajno manjim česticama, a tme i većom površinom tankog sloja u odnosu na klasične TLC ploče. U literaturi je poznata i pod nazivom tankoslojna hromatografija pod visokim pritiskom, jer se u komoru za hromatografisanje uvodi odgovarajući gas (npr. azot) pod pritiskom, uslijed čega dolazi do bržeg kretanja mobilne faze preko tankog sloja stacionarne faze. Za ovu tehniku koristi se manji volumen uzorka, a na jednoj ploči može se razviti 20-30 uzoraka. Potrebni tehnički uslovi podrazumijevaju specijalne komore za razvijanje, automatski aplikator za nanošenje uzorka i denzitometar za kvantitativnu analizu. U poređenju sa klasičnom TLC, primjenom HPTLC tehnike postiže se bolja rezolucija, veća osjetljivost, kraće vrijeme analize, a u prednosti je i u pogledu reproduktibilnosti [Živanović, 2003; Fischedick et al., 2009; Mohammad et al., 2010; Poole, 2011; Agatonovic-Kustrin and Loescher, 2013]. HPTLC tehnika se takođe može uspješno koristiti za detekciju i semikvantitativnu analizu metabolita kanabisa u biološkim uzorcima, npr. urinu [Sharma et al., 2010].

Hromatografija na tankom sloju ima široku primjenu u analitičkoj hemiji organskih i neorganskih jedinjenja. Pored razvoja visokoosjetljivih instrumentalnih metoda, tankoslojna hromatografija se u forenzičkoj primjeni zadržala do danas zahvaljujući jednostavnosti postupka izvođenja analize, ekonomičnosti, mogućnosti istovremene analize većeg broja uzoraka na jednoj ploči. U forenzičkim laboratorijama pomoću tehnike tankoslojne hromatografije analiziraju se uzorci droga i lijekova, eksploziva, tragovi lako zapaljivih supstanci (npr. naftni derivati) i drugi nepoznati uzorci koje je potrebno identifikovati primjenom hemijskih metoda i tehnika. Međutim, treba imati na umu da je osjetljivost ove tehnike manja u odnosu na instrumentalne hromatografske tehnike.

Postoji nekoliko metoda za kvalitativnu i semikvantitativnu TLC analizu kanabis preparata korištenjem različitih stacionarnih faza i sistema razvijača, te metoda za pripremu uzorka i tehnika vizualizacije mrlja. Većina tih metoda daju prihvatljive rezultate, uz napomenu da svaka metoda koja se uvodi u laboratorijsku praksu mora biti provjerena i potvrđena prije rutinske upotrebe [UNODC, 2009a; Goutam, et al., 2015]. Za analizu kanabis preparata obično se koriste staklene ploče ili aluminijске folije, sa tankim slojem stacionarne faze Silica gel. Kao mobilna (pokretna faza) mogu se koristiti razni sistemi razvijača, a razvijanje se odvija uzlaznom tehnikom dok se ne postigne željeni front razvijača (oko 30 – 60 minuta, zavisno od ambijentalne temperature).

U stručnoj literaturi [Moffat, 1986; Galand et al., 2004; Sharma et al., 2010; Poole, 2011; Goutam et al., 2015; UNODC, 2009a] preporučeni su brojni sistemi razvijača za analizu kanabinoida i kanabinoidnih kiselina:

- toluen
- ksilen:heksan:dietilamin (25:10:1)
- n-heksan:dietil eter (80:20)
- hloroform:etanol (90:10)
- benzen
- benzen:n-heksan:dietilamin (25:10:1)
- petrol eter:dietil eter (80:20)
- cikloheksan:di-izopropileter:dietilamin (52:40:8)
- n-heksan:dioksan:metanol (70:20:10) – preporučuje se za razdvajanje i identifikaciju kanabinoidnih kiselina, dok ne omogućuje odgovarajuće razdvajanje THC, CBD i CBN.

Vizuelizacija kanabinoida vrši se pod UV svjetлом i odgovarajućim reagensom u formi spreja. Najčešće se za vizuelizaciju koristi reagens poznat kao *Fast Blue B Salt* (di-o-anizidin tetrazolium-hlorid). Sve češće se kao reagens koristi *Fast Blue BB Salt* (4-benzoilamino-2,5-dietoksibenzendiazonijum-hlorid), umjesto *Fast Blue B Salt*, za koji se smatra da je kancerogen [Maksimović i sar., 1998; UNODC, 2009a; Khan, 2012; Goutam et al., 2015].

Tri osnovna kanabinoida (CBD, THC i CBN) mogu se veoma lako identifikovati po mrljama karakterističnih boja, na različitim udaljenostima od startne tačke (R_f - vrijednostima), pri čemu kanabidiol daje narandžastu, tetrahidrokanabinol ružičastu, a kanabinol ljubičastu mrlju.

3.3.2.2. Instrumentalne hromatografske tehnike i metode

Kod instrumentalnih hromatografskih tehnika cijeli proces raspodjele i detekcije vrši se u zatvorenom sistemu komplikovanih, ali veoma pouzdanih i visokoosjetljivih uređaja.

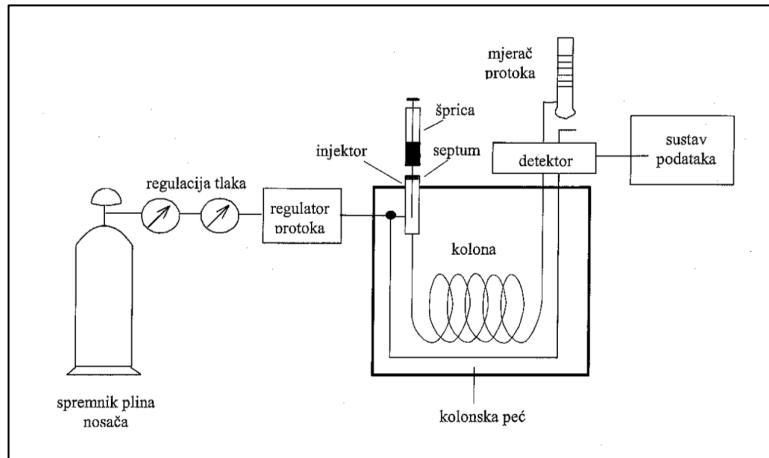
Instrumentalnim hromatografskim tehnikama mogu se analizirati čvrsti, tečni i gasoviti uzorci, s tim da zahtijevaju određenu pripremu prije same analize. Čvrsti uzorci se rastvaraju u pogodnom rastvaraču, tečni se po potrebi razređuju ili ekstrakcijom prevode u odgovarajući rastvor, dok se gasni uzorci u instrument uvode pomoću namjenskih gasnih šprica ili pomoću *headspace* sistema.

Prilikom analize kanabis biljke i njenih preparata instrumentalne analitičke tehnike koriste se za identifikaciju, kvantifikaciju, klasifikaciju (droga tip ili vlakno tip) i individualizaciju (ispitivanje porijekla uzorka) [Hazekamp, 2008-2009].

3.3.2.2.1. Gasna hromatografija (GC)

Gasna hromatografija je instrumentalna analitička tehnika kod koje se razdvajanje komponenti iz smjese vrši u hromatografskoj koloni. Mobilna faza je uvijek gas, a stacionarna faza može biti čvrsta (adsorpciona hromatografija) ili tečna (podiona hromatografija) [Leach and Ramsey, 1986; Maksimović i sar., 1998]. Otkriće ove tehnike pripisuje se britanskim naučnicima Martinu i Synge-u, za koje su 1952. godine dobili Nobelovu nagradu, a metodu su razradili i u praksi uveli James i Martin [Marjanović, 2001; Stafford, 2005; Dawling, 2011].

Gasnohromatografski sistemi razlikuju se po vrsti gasa nosača, sistemu injektiranja, vrsti kolona i detektora. Prema tome, osnovni dijelovi gasnog hromatografa (Slika 24) su: izvor gasa nosača (boca ili generator), injekcioni blok (uređaj za unošenje uzorka), hromatografska peć sa kolonom, detektor i pisač hromatograma (kompjuter sa programom za obradu hromatograma) [McNair and Miller, 2009; Luterotti, 2014].



Slika 24. Shematski prikaz gasnog hromatorafa

(Izvor: Luterotti, 2014)

Za gasnohromatografsku analizu supstance trebaju biti dovoljno isparljive do temperature 400°C (molekulska težina < 600). Ukoliko jedinjenje ima više polarnih funkcionalnih grupa isparljivost mu opada. Taj problem se prevazilazi derivatizacijom – polarne funkcionalne grupe prevode se u nepolarne reakcijom metiliranja, acetiliranja ili sililiranja, pa se dobijeni derivat analizira [Marjanović, 2001; Dawling, 2011].

Uzorak, u tečnom ili gasovitom stanju, unosi se kroz injektor u struju gasa nosača, pomoću odgovarajuće šprice, ručno ili autosemplerom. Svrha injektora je da se rastvor uzorka uvede u sistem i da se odmah prevede u gasnu fazu, što se postiže podešavanjem odgovarajuće temperature injektora, koja je bar za 50°C viša od temperature kolone. Zbog naglog šrenja nastale gasne faze, potrebno je prilagoditi injekcioni volumen koji je najčešće između 0,1 i 10 μl [Marjanović, 2001; Živanović, 2003; Jokanović, 2014]. Npr. kod kapilarnih kolona prečnika 0,25 mm, injekcioni volumen tečnog uzorka obično je do 1,5 μl [Stafford, 2005].

Danas postoje tri vrste injektora: *split*, *splitless* i *on-column* (direktni) injektor. Izborom odgovarajućeg staklenog lajnera koji se postavlja u tijelo injektora postiže se *split* ili *splitless* način injektiranja. Kod *split* injektiranja podešavanjem protoka na odgovarajućim ventilima omogućuje se *vent:column* odnos u opsegu od 25:1 do 100:1, pri čemu manji dio uzorka ulazi u kolonu. *Split* injektiranje je najjednostavniji način, a daje prihvatljive rezultate za većinu analiza. Međutim, za uzorce koji sadrže lako isparljive komponente ili kada je niska koncentracija analita u uzorku (smjesi), preporučuje se *splitless* tehnika injektiranja. *Splitless* injektiranjem 80-95% injektiranog uzorka ulazi u kolonu, čime se povećava osjetljivost za komponente koje u uzorku mogu biti prisutne u tragovima. Kod *on-column* injektiranja uzorak

se unosi direktno u hladnu kapilarnu kolonu, pa je pogodan za rad sa termički nestabilnim supstancama. Ova tehnika zahtijeva posebnu opremu i pribor, a nešto je složenija za rukovanje, te je potrebna određena vještina i praksa [Stafford, 2005; Dawling, 2011; McNair and Miller, 2009; Carlin and Dean, 2013].

Pomoću mobilne (pokretne) faze – gase nosača (hemski inertni gas malog viskoziteta, npr. *H*, *He*, *Ar*, *N*) odgovarajućeg protoka, čiji izvor može biti boca sa gasom visoke analitičke čistoće ili generator gasova [Carlin and Dean, 2013], uzorak iz injektora putuje kroz kolonu u kojoj se nalazi stacionarna (nepokretna) faza. Kolone mogu biti punjene i kapilarne. Punjene kolone su staklene ili metalne (bakar ili nerđajući čelik) cijevi, obično dužine od 1 do 10 m i unutrašnjeg prečnika 2-6 mm. Za punjene kolone u adsorpcionoj gasnoj hromatografiji koriste se punioci u čvrstom stanju, kao što su molekulska sita (Al-silikat), silikagel, dijatomejska zemlja, porozni polimeri (polistiren-divinilbenzen kopolimeri), aktivni ugalj ili teflonske kuglice [McNair and Miller, 2009; Dawling, 2011; Luterotti, 2014]. Kolone za podionu gasnu hromatografiju pune se inertnim čvrstim nosačem (npr. dijatomejska zemlja) koji je prekriven mikro-slojem tečne, ali neisparljive stacionarne faze (najčešće silikon ili veoma viskozne tečnosti) [Maksimović i sar., 1998]. Kapilarne kolone, koje se sve više koriste, izrađene su od kvarca, obložene poliamidom, radi bolje savitljivosti, a tanki film (0,1-1,5 µm) stacionarne faze nanesen je na unutrašnji zid kolone. Stacionarne faze su obično visokomolekularni, termički i hemski stabilni polimeri, npr. polisilosani i polietilen glikoli. Stacionarna faza može biti polarna, nepolarna ili semipolarna, a primjenjuje se u zavisnosti od vrste supstanci koje se analiziraju, odnosno njihove polarnosti. Postoje i hiralne stacionarne faze koje se koriste za razdvajanje optičkih izomera (D i L enantiomera). Izbor stacionarne faze je od suštinskog značaja za kvalitet razdvajanja komponenti. Rezolucija zavisi i od dimenzija kolone, bolja je u užoj i dužoj koloni. Npr. sa dvostruko dužom kolonom rezolucija se poveća za oko 40%. Uobičajena dužina kapilarnih kolona je od 5 do 60 metara, a mogu biti duge i do 120 m. Unutrašnji prečnik kapilarnih kolona obično se kreće od 0,2 – 0,75 mm. Primjenom kapilarnih kolona dobije se bolja rezolucija i uži pikovi nego kod punjenih, što podrazumijeva bolje razdvajanje komponenti i kada su slične strukture, zbog čega su kapilarne kolone efikasnije. Širina pika kod kapilarnih kolona je obično 15 do 30 sekundi ili manje [Leach and Ramsey, 1986; Stafford, 2005; McNair and Miller, 2009; Dawling, 2011; Carlin and Dean, 2013; Jokanović, 2014; Luterotti, 2014]. Danas u ponudi postoji širok spektar kolona različitih dimenzija i stacionarnih faza, sa navedenim uslovima i preporukama za primjenu istih, koji se mogu naći u katalozima raznih proizvođača hemijske opreme (*Shimadzu*, *Thermo*, *Supelco*,...).

Kolona je smještena u hromatografskoj peći, koja se može zagrijavati po temperaturnom programu koji se podešava prema prirodi supstanci koje se analiziraju. Razdvajanje komponenti iz smjese u hromatografskoj koloni vrši se na osnovu interakcije pojedine komponente sa stacionarnom fazom, što rezultira različitim vremenom potrebnim za prolazak pojedinih komponenti smjese kroz kolonu. Vrijeme zadržavanja u koloni ili retenciono vrijeme (R_t) karakteristično je za pojedine komponente analizirane smjese, pa nakon prolaska kroz kolonu, komponente u različitim vremenskim razmacima dolaze na detektor, gdje se pojava svake komponente bilježi pojavom jednog pika (maksimuma) na dijagramu – hromatogramu (kvalitativna analiza) [Leach and Ramsey, 1986; Dawling, 2011; Jokanović, 2014]. Retenciono vrijeme (R_t) zavisi od temperature kolone, protoka i vrste gasa nosača, pada pritiska u koloni, vrste stacionarne faze i dimenzija kolone [Luterotti, 2014]. Npr., retenciono vrijeme je direktno proporcionalno dužini kolone, a obrnuto proporcionalno brzini proticanja gasa nosača [Živanović, 2003]. Kod kvantitativne analize mjera koncentracije analita je površini pika, pri čemu je količina pojedine komponente proporcionalna površini pika te komponente u hromatogramu.

Uloga detektora u instrumentalnim hromatografskim tehnikama je da detektuju jedinjenja nakon izlaska iz hromatografske kolone. Postoji više vrsta detektora koji se koriste zavisno od supstanci koje se analiziraju. U nastavku su navedeni detektori koji se najčešće primjenjuju.

Plameno-jonizacioni detektor (*Flame Ionization Detector/FID*) osjetljiv je na veliki broj supstanci, zbog čega se smatra donekle univerzalnim i najčešće se koristi. Radi na principu jonizacije molekula u anodnom cilindru, izazvane visokom tempeaturom vodonik-kiseoničnog plamena. Kada se između središnje katode i cilindrične anode uspostavi razlika potencijala dolazi do protoka struje. Jačina struje zavisi od broja jona koji se nađu u međuelektronskom prostoru. Tehnički je izведен tako što se u njegovu komoru direktno uvodi oksidans (kiseonik ili vazduh), dok se kroz plamenik uvodi gorivi gas – vodonik i gas nosač [Maksimović i sar., 1998; Živanović, 2003; McNair and Miller, 2009; Dawling, 2011; Carlin and Dean, 2013]. U rutinskim forenzičkim analizama, za identifikaciju i kvantitativno određivanje sadržaja osnovnih kanabinoida obično se koristi GC/FID tehnika.

Detektor termičke provodljivosti (*Thermal Conductivity Detector/TCD*) radi na principu promjene električne provodljivosti u zavisnosti od termičke provodljivosti izdvojene gasne komponente. Osjetljivost ovog detektora proporcionalna je toplotnoj provodljivosti gase nosača. Detektor radi na principu mjerena razlike u toplotnoj provodljivosti čistog gasa i gase sa eluiranom supstancom nakon izlaska iz kolone. Univerzalan je pa može da detektuje sva

jedinjenja, ali ima manju osjetljivost od većine ostalih detektora [Leach and Ramsey, 1986; Maksimović i sar., 1998; Marjanović, 2001; Živanović, 2003; McNair and Miller, 2009].

Detektor zasnovan na elektronском zahvatu (*Electron Capture Detector/ECD*) radi na principu jonizacije gasa nosača, ali pod dejstvom radioaktivnog β -zračenja uz pomoć nekog β -emitera (^{63}Ni , ^3H , ^{90}Sr). Ima mali dinamički opseg, ali je veoma selektivan, sa visokom osjetljivošću prema komponentama koje imaju visok afinitet prema elektronima. Koristi se za analizu jedinjenja koja sadrže halogene (npr. hlorovani insekticidi, halogenizovani pesticidi i herbicidi), nitro-grupu ili karbonilnu grupu (npr. u analitici lijekova). U forenzici se koristi za identifikaciju nitro-aromatskih eksploziva [Živanović, 2003; McNair and Miller, 2009; Zadora and Zuba, 2009; Dawling, 2011; Carlin and Dean, 2013]. Radioaktivan je, zbog čega ga u nekim zemljama ne može imati svaka laboratorija – za nabavku je potrebna dozvola nadležnog državnog organa.

Azot-fosfor detektor (*Nitrogen-phosphorus Detector/NPD*) koristi se za identifikaciju jedinjenja koja sadrže azot i fosfor (npr. organofosforne pesticide) i neka halogena jedinjenja, za koje prethodno opisani detektori nemaju dovoljnu osjetljivost. U konstrukcionom pogledu vrlo je sličan plameno-jonizacionom detektoru [McNair and Miller, 2009; Carlin and Dean, 2013].

Maseni spektrometrijski detektor (MSD) je ustvari maseni spektrometar konstruisan tako da može biti detektor hromatografu. Radi na principu jonizacije molekula koje izlaze iz gasnog hromatografa. Molekuli se ionizuju pogodjeni brzim elektronima koje emituje zagrijani filament u jonskom izvoru detektora. Kao rezultat jonizacije dobije se matični jon (odgovara molekulskoj masi supstance), a često zbog visoke energije elektrona (70 eV) nastaju i fragmentni joni, pa se kao rezultat dobije karakterističan maseni spektar jedinjenja, koji je jedinstven za datu supstancu. Maseni selektivni detektor sa gasnim hromatografom predstavlja sistem instrumenata poznat kao gasno-maseni hromatograf (GC/MS), čijom primjenom se dobiju posebno dobri analitički rezultati [Kwong, 2008; McNair and Miller, 2009; Carlin and Dean, 2013; Jokanović, 2014]. GC/MS je tehnika izbora za ispitivanje hemijskog profila kanabisa, radi utvrđivanja porijekla uzorka. Pored hromatografske identifikacije po retencionom vremenu, identifikacija se vrši i na osnovu masenog spektra svake komponente prisutne u hromatogramu uzorka, što se može smatrati dvostrukom identifikacijom. Za hemometrijsku klasifikaciju koriste se standardizovani GC profili, a pored kanabinoida određuju se i terpenoidi, koji se uglavnom sastoje od seskviterpena. GC profili kanabisa sa istim porijekлом pokazuju slične hromatografske obrasce, što ukazuje na vezu među uzorcima.

Korelace studije pokazuju da bi moglo biti moguće procijeniti geografsko porijeklo kanabis uzorka na osnovu njegovog hemijskog potpisa. Međutim, zbog visoke prirodne varijabilnosti kanabisa, potrebe za autentičnim referentnim materijalom kanabisa poznatog porijekla i korištenja vjerovatnoće za opis regije porijekla, forenzička vrijednost GC profila za potrebe određivanja porijekla može biti ograničena. S druge strane, ovaj pristup može se koristiti za upoređivanje serija analiza. To bi moglo pružiti priliku da se povežu uzorci iste starosti, fenotipa i načina proizvodnje. Izvodljivost bi trebala biti dokazana korištenjem velikog skupa podataka. [ElSohly et al., 2007; Hazekamp et al., 2010; Watson, 2011]. GC/MS tehnika je gotovo nezamjenjiva kada je u pitanju analiza smjese organskih jedinjenja nepoznatog sastava, a savremena tehnika tandem mas spektrometrije, koja značajno unaprijeđuje selektivnost instrumenta, postala je standard za identifikaciju droga i lijekova u biološkim uzorcima. Najčešća tehnička izvedba tandem mas spektrometrije je konfiguracija serijski povezanih kvadropolnih detektora (MS/MS), gdje prvi kvadropol djeluje kao maseni filter, dopuštajući samo jonima određenog odnosa m/z da prođu do drugog kvadropola (kolizione ćelije) gdje se odvija fragmentacija jona. Treći kvadropol dalje vrši selekciju jednog ili više fragmentnih jona koji prolaze do detektora [Kwong, 2008; Watson, 2011].



Moderni instrumenti su opremljeni softverima za podešavanje i praćenju parametara tokom analize, kao i za prikupljanje podataka, te za korištenje biblioteka spektara referentnih supstanci nekoliko stotina hiljada jedinjenja (npr. biblioteke spektara *NIST*, *Wiley* i dr.), što značajno olakšava identifikaciju nepoznatih komponenti i skraćuje vrijeme analize [McNair and Miller, 2009; Watson, 2011; Carlin and Dean, 2013].

Slika 25. Sistem instrumenata GC/MS-FID sa autosamplerom

U komercijalnim MS bibliotekama spektara mogu se naći referentni maseni spektri najčešćih kanabinoida, u derivatizovanom ili nederivatizovanom obliku [UNODC, 2009a]. Ove pogodnosti značajne su kod forenzičkih i toksikoloških analiza, gdje su smjese nepoznatog sastava (npr. ilegalni uzorci droga) čest predmet analize, a brzina analize dolazi do izražaja kao doprinos efikasnom djelovanju nadležnih službi po završenoj analizi (npr. doprinos efikasnosti

istrage ili pružanje adekvatne medicinske pomoći na osnovu toksikološke analize). Masena spektrometrija, kao visoko osjetljiva i selektivna analitička tehnika svoje mjesto nalazi i u industriji, a posebno je pogodna za hemijske analize složenih prirodnih proizvoda, koji često sadrže nekoliko stotina jedinjenja u različitim koncentracijama, kao što su kanabis proizvodi. Pored endogenih organskih jedinjenja, kao što su kanabinoidi, terpeni i flavonoidi, masenim detektorom se uspješno analiziraju i egzogena jedinjenja, kao što su mikotoksini, pesticidi i herbicidi, ukoliko su prisutni u proizvodima [Nie et al., 2019].

Infracrveni spektrofotometar (model FTIR/*Fourier-transform infrared detector*) također može biti konstruisan kao detektor gasnom hromatografu. Kao rezultat se, pored hromatograma, dobije i infracrveni spektar ispitivane supstance. Za neke supstance je manje osjetljiv od masenog detektora, ali ima određene prednosti, jer može razlikovati izomere i nedestruktivan je, pa se nakon ovog detektora u instrumentalnu liniju može dodati i maseni detektor čime se dobije instrumentalna linija GC/FTIR/MS, što dodatno doprinosi kvalitetu identifikacije [McNair and Miller, 2009; Dawling, 2011; Jokanović, 2014].

Gasni hromatograf se može povezati i sa pirolizerom čime se dobije sistem uređaja pirolizer – gasni hromatograf, gdje se uzorak prvo razlaže pod uticajem visoke temperature u pirolizeru, nakon čega se proizvodi piroliznog razlaganja uvode u gasni hromatograf gdje se dalje analiziraju po principu klasične gasnohromatografske analize i identifikuju odgovarajućim detektorom. Kao rezultat analize dobije se hromatogram – pirogram na osnovu kojeg se vrši kvalitativna i kvantitativna analiza komponenti nastalih pirolizom. Ova metoda se u forenzici koristi za analizu organskih sastojaka boja i lakova, mastila, vlakana, različitih materijala na bazi polimera i sl. [Zadora and Zuba, 2009; Carlin and Dean, 2013].

Kvalitativna gasnohromatografska analiza može se izvoditi direktno ili indirektno. Direktna metoda kvalitativne analize vrši se na bazi retencionog vremena u komparaciji sa retencionim vremenom referentnog standarda odgovarajućeg analita. Indirektna metoda kvalitativne analize zasniva se na modifikacijama analiziranih supstanci, a primjenjuje se prilikom identifikacije supstanci koje se ne rastvaraju u određenoj grupi rastvarača ili se ne mogu prevesti u gasovito agregatno stanje na određenoj temperaturi kolone, kao i u slučajevima preklapanja pikova, odnosno nedovoljne rezolucije analita u uzorku. Modifikacija može da podrazumijeva degradaciju analiziranih supstanci, a može se izvesti pirolitički (cijepanjem molekula na dva ili više proizvoda pirolize) ili fotolitički (izlaganje supstance UV ili VIS zračenju). Hemijska modifikacija (derivatizacija), koja se u forenzici češće primjenjuje, podrazumijeva reakciju supstanci sa odgovarajućim hemijskim agensima, sa ciljem dobijanja novih jedinjenja (derivata)

koja su rastvorljiva, isparljiva i stoga pogodna za analizu. Derivatizacijom se obično polarne funkcionalne grupe prevode u manje polarne ili nepolarne, a provodi se sa ciljem povećanja osjetljivosti ili rezolucije. Za identifikaciju se koriste retencionu vremena derivata, koja se upoređuju sa retencionim vremenim referentnih standarda koji su takođe prevedeni u derivate iste vrste. Derivatizacija se koristi i u kvantitativnoj analizi. Derivatizacioni postupci koji se često koriste su metiliranje, acetiliranje i sililiranje. Kao metil-agens koristi se diazometan, acetil-agensi su acetanhidrid, acetil-hlorid i acetil-imidazol, a poznati silatni agensi su trimetilsililhlorid, N-metil-N-trimetilsilil-trifluoracetamid (MSTFA) i N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamid/trimetilhlosilan (BSTFA/TMCS) [Leach and Ramsey, 1986; Živanović, 2003; McNair and Miller, 2009; Carlin and Dean, 2013].

Kanabis preparati se za GC analizu mogu pripremiti sa ili bez postupka derivatizacije, što zavisi od svrhe analize. Ako je potrebno odrediti posebno sadražaj tetrahidrokanabinola (THC), a posebno tetrahidrokanabinolne kiseline (THCA), neophodno je provesti derivatizaciju (npr. sililiranje sa MSTFA) prije GC analize [Brenneisen, 2007]. Ograničenja se javljaju prilikom proučavanja sveukupnog hemijskog sastava kanabis proizvoda, jer je teško izvršiti kvantitativnu derivatizaciju svih komponenti u složenoj smjesi kao što je kanabis [Hazekamp et al., 2010]. Ukoliko se određuje ukupan THC u uzorku (zbir slobodnog THC i THC generisanog od THCA) ne vrši se derivatizacija. U tom slučaju je potrebno osigurati potpun proces dekarboksilacije THCA do THC.

Postoji više metoda kvantitativne gasnohromatografske analize, a izbor metode zavisi od potrebne preciznosti rezultata. Najčešće se koriste metoda eksternog standarda, metoda internog standarda i metoda kalibracione krive. Metoda eksternog standarda zasniva se na primjeni referentnog standarda ispitivanog analita. Standardni rastvor poznate koncentracije analizira se pod istim radnim uslovima kao uzorak, te služi za proračun koncentracije ispitivanog analita u uzorku. Ova metoda je praktična za izvođenje i daje dobre rezultate ukoliko se održavaju isti radni uslovi instrumenta. Metoda internog standarda podrazumijeva dodavanje odgovarajućeg inertnog jedinjenja referentnom standardu i uzorku u fazi pripreme rastvora. Interni standard služi za proračun koncentracije ispitivanog analita, na osnovu međusobnog odnosa internog standarda i referentnog standarda poznatih koncentracija, te odnosa internog standarda i analita iz uzorka. Interni standard dodat uzorku u fazi pripreme podvrgnut je istom postupku kao uzorak, a niveliše i injekcioni volumen, što doprinosi preciznosti. Kao interni standard pri analizi kanabisa obično se koriste se tribenzilamin (TBA) ili tetrakosan (TCS). Metoda kalibracione krive podrazumijeva pripremu rastvora referentnog

standarda različitih koncentracija, koji se analiziraju pod istim radnim uslovima kao uzorak, te služe u svrhu uspostavljanja kalibracione funkcije. Kvantitativna analiza se zasniva na interpolaciji površina pikova analita iz hromatograma uzorka u prethodno definisanu kalibracionu krivu [Leach and Ramsey, 1986; Marjanović, 2001; Živanović, 2003; Jokanović, 2014; Luterotti, 2014].

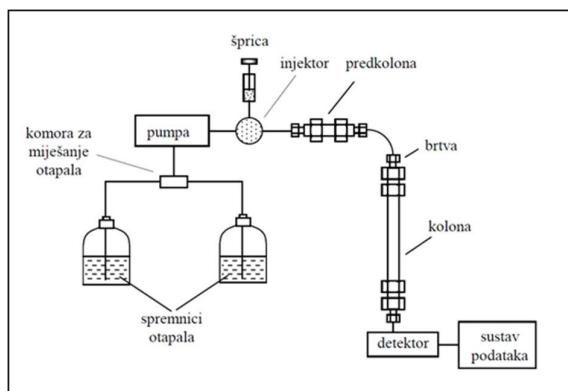
Analitička tehnika gasne hromatografije primjenjuje se u farmaciji, petrohemiji, ekologiji, prehrambenoj industriji, a u forenzici se primjenjuje za analizu uzorka droga i lijekova, alkohola i droga u biološkim uzorcima (krv i urin) i druge toksikološke analize, zatim za analizu tragova eksploziva, tragova lako zapaljivih supstanci itd.

3.3.2.2.2. Tečna hromatografija (LC)

Tečna hromatografija je instrumentalna hromatografska tehnika, kod koje se, slično drugim hromatografskim tehnikama, supstance razdvajaju na osnovu distribucije između stacionarne i mobilne faze, pri čemu je mobilna faza tečna.

Klasična tečna hromatografija koristila je plastične ili staklene kolone dužine do 50 cm i prečnika 2-5 mm, ispunjene poroznim materijalom, a mobilna faza kretala se kroz kolonu silom gravitacije ili je uređaj bio opremljen pumpom osrednjih performansi, zbog čega se ta tehnika danas ne smatra dovoljno efikasnom.

Tečna hromatografija visokih performansi (*High Performance Liquid Chromatography/HPLC*) je modernija analitička tehnika kod koje se mobilna faza dovodi pomoću pumpe pod visokim pritiskom, zbog čega se ova tehnika često naziva i tečna hromatografija visokog pritiska [Gill, 1986; Marjanović, 2001; Jokanović, 2014]. Osnovni dijelovi tečnog hromatografa (slika 26) su: rezervoar mobilne faze, pumpa, injektor, kolona, detektor i pisač hromatograma (kompjuter sa programom za obradu hromatograma).



Slika 26. Shema tečnog hromatografa (Izvor: Luterotti, 2014)

Pumpa obezbeđuje ulazni pritisak mobilne faze i odgovarajući konstantan protok kroz hromatografski sistem [Marjanović, 2001; Kupiec and Kemp, 2011]. Rastvarači koji se koriste kao mobilna faza trebaju biti visoke čistoće (*HPLC-grade*), a pri izboru treba voditi računa o polarnosti rastvarača i supstanci koje se analiziraju, te o vrsti kolone i detektora [Živanović, 2003; Kupiec and Kemp, 2011]. Smjesa rastvarača može biti stalnog sastava, odnosno elucione moći (izokratski postupak) ili promjenjivog sastava, pri čemu se eluciona moć mijenja po unaprijed definisanoj funkciji (programirana ili progresivna elucija) [Marjanović, 2001; Kupiec and Kemp, 2011]. Rastvoreni uzorak se u injektor unosi autosemplerom ili ručno pomoću mikrolitarske šprice, a mobilna faza ga konstantnom brzinom pod visokim pritiskom uvodi u kolonu. Kolona je ključna za dobro hromatografsko razdvajanje komponenti i njeno održavanje doprinosi funkcionalnosti HPLC sistema. Stoga se preporučuje postavljanje kratke zaštitne predkolone ili predkolonskog filtera ispred analitičke kolone, radi zaštite kolone od nečistoća iz uzorka. Analitičke HPLC kolone su cijevi od nerđajućeg čelika ili stakla, uobičajene dužine 10 do 30 cm, unutrašnjeg prečnika do 5 mm, punjene sa SiO₂, dijatomejskom zemljom ili nekim polimerom u obliku sferičnih zrnca prečnika 3 do 10 µm, na koja je nanesena tečna stacionarna faza [Gill, 1986; Kupiec and Kemp, 2011; Luterotti, 2014].

Kao i kod gasne hromatografije, identifikacija se vrši na osnovu retencionog vremena pikova prisutnih u hromatogramu, a kvantitativna analiza se zasniva na činjenici da je koncentracija komponenti srazmjerna visini ili površini pika.

Za detekciju se mogu koristiti različiti detektori, čiji izbor zavisi od prirode supstanci koje se analiziraju:

- Spektroskopski detektori (UV-VIS i IR),
- Fluorescentni detektor (FL),
- Fotodiodni detektori (DAD ili PDA),
- Elektrohemski detektor (EC),
- Detektor na bazi mjerena indeksa refrakcije (RI),
- Maseni spektrometrijski detektor (MS).

Tehnikom tečne hromatografije može se postići mnogo efikasnije razdvajanje, zbog čega je ovo jedna od najmoćnijih tehnika u analitičkoj hemiji. Pomoću nje se mogu razdvojiti, identifikovati i kvantifikovati rastvorljive komponente iz veoma složenih uzoraka (smjese velikog broja sličnih analita). Ova tehnika je i veoma osjetljiva, što omogućuje identifikaciju komponenti prisutnih u tragovima (milioniti, bilioniti dio). Primjenom posebnih hromatografskih kolona i

specifičnom vrstom pumpe koja obezbeđuje konstantan i visok pritisak u sistemu postignuta je i zadovoljavajuća brzina analize.



Slika 27. Sistem instrumenata HPLC/MS/MS-PDA

Unaprijeđena metoda tečne hromatografije pod visokim pritiskom ultra visokih performansi (*Ultra-high performance liquid chromatography/UHPLC*) zadržava principe i selektivnost *HPLC*, ali ima poboljšanu osjetljivost, rezoluciju i kraće vrijeme analize, čime se još proširuje primjenjivost ove hromatografske tehnike [Kupiec and Kemp, 2011; Radwan et. al., 2017].

Zahvaljujući visokoj osjetljivosti i rezoluciji, ova tehnika se primjenjuje u farmaceutskoj, biohemijskoj, kliničkoj, kozmetičkoj i industrijskoj praksi, te ekologiji i drugim oblastima. Veoma je značajna primjena u forenzici, za analizu uzoraka organskog porijekla kao što su tragovi eksploziva, uzorci droga, ali i za analizu tragova droga i lijekova, te njihovih metabolita u biološkim uzorcima, kao i za druge toksikološke analize [Radwan et. al., 2017]. Zbog mogućnosti analize makromolekula kao što su steroidi, aminokiseline, šećeri i slične supstance koje nisu pogodne za gasnohromatografsku analizu, ovo je tehnika izbora za doping kontrole. Tečna hromatografija sa masenim detektorm (LC/MS, HPLC/MS i UHPLC/MS sistemi) je veoma pogodna za identifikaciju mikotoksina, tragova ili metabolita droga i lijekova, a postupak identifikacije se značajno unaprijeđuje primjenom tandem MS detektora (LC/MS/MS, HPLC/MS/MS i UHPLC/MS/MS sistemi instrumenata), zbog čega je ova tehnika zastupljena u farmaceutskoj industriji, forenzičkim i istraživačkim laboratorijama [Kupiec and Kemp, 2011; Watson, 2011; Nie et al., 2019].

Tečna hromatografija omogućuje istovremenu identifikaciju kiselih i neutralnih fitokanabinoida bez derivatizacije, u svrhu određivanja hemotipa, procjene starosti uzorka, proučavanja efekata proizvodnih procesa i uslova skladištenja, komparacije serije uzoraka ili direktnе kvantifikacije THC u vodenom biljnom preparatu (npr. kanabis čaj) [Brenneisen,

2007]. HPLC tehnikom, koristeći UV ili PDA detektor, mogu se efikasno analizirati kanabinoidi bez degradiranja komponenti uzorka, stoga se HPLC tehnika koristi u mnogim laboratorijama. Za kvalitativnu identifikaciju, retenciono vrijeme i spektar pojedinog kanabinoida moraju se podudarati. Ipak, nije lako postići analizu svih glavnih kanabinoida u kanabis ekstraktu, jer kod složenih uzoraka može doći do preklapanja hromatografskih pikova. U cilju prevazilaženja tog problema, sve više je u primjeni maseni detektor (HPLC/MS ili UHPLC/MS – sistem instrumenata). Važan faktor za efikasnu analizu fitokanabinoida je dostupnost pouzdanih spektroskopskih i hromatografskih podataka. Iako su takvi podaci, dobijeni tokom eksperimenata izolacije i identifikacije, objavljeni za skoro sve poznate kanabinoide, oni su raštrkani po ogromnoj količini naučnih radova [Hazekamp et al., 2010].

3.3.3. Dodatne analitičke tehnike i pristupi za analizu kanabis proizvoda

Istraživanje novih metoda analize kanabinoida i dalje je aktuelno i u literaturi se povremeno opisuje primjena novih postupaka. Tehnika kapilarne elektrohromatografije sa PDA detektorom pokazala se primjenjivom za analizu fitokanabinoida. Proučavana je i superkritična tečna hromatografija povezana sa hemijskom ionizacijom na atmosferskom pritisku i MS detektorom, ali sa ograničenim uspjehom, iako je karakteriše kraće vrijeme analize nego GC ili HPLC tehnike i ne zahtijeva derivatizaciju [Brenneisen, 2007; Hazekamp, 2008-2009].

3.3.3.1. Masena spektrometrija odnosa masa stabilnih izotopa (IRMS)

Masenom spektrometrijom odnosa masa stabilnih izotopa može se odrediti sadržaj ugljenikovog izotopa C¹³ u bilnjom materijalu. Varijacije odnosa stabilnih izotopa ugljenika i azota mogu biti koristan podatak u forenzičkom smislu, za određivanje geografskog porijekla biljnog materijala [Nie et al., 2019]. Za razliku od drugih droga poput heroina i kokaina, ilegalni kanabis nije hemijski obrađen i samim tim održava svoj prvobitni profil elemenata i izotopa, koji se može koristiti kao pokazatelj geografskog porijekla. Međutim, različiti uslovi uzgoja (npr. uzgoj u zatvorenom ili na otvorenom, odnosno u zemljištu ili hranjljivoj podlozi, vrsta zemljišta i đubriva, navodnjavanje itd.) mogu uticati na izotopski sastav biljke, a time i diskriminacija može biti ograničena. Osim toga, upotrebljivi rezultati mogući su samo kada je dostupan autentičan referentni materijal kanabisa, poznatog porijekla [UNODC, 2009a].

3.3.3.2. DNK profilisanje

DNK polimorfizmi mogu biti korisni za određivanje fenotipa biljke u svrhu razlikovanja droga-tip i vlakno-tip kanabisa, u ranoj fazi uzgoja [Piluzza et al., 2013]. Određivanje genetskih profila

uzoraka i njihovo upoređivanje moglo bi biti primjenjivo u istrazi za povezivanje proizvođača, trgovaca i potrošača. Pri tome se ne smije zanemariti da, za razliku od ljudske DNK koja je kao otisak prsta, biljna DNA ne mora biti jedinstvena, jer je kloniranje biljaka, pa tako i kanabis varijeteta, prilično uobičajeno. Odgovarajući DNA profili dva uzorka dokazuju da isti potiču od istog varijeteta, ali ne dokazuju da potiču od istog uzgajivača, jer uzgajivači često prodaju reznice. Takođe, DNA testiranjem se ne mogu razlikovati uslovi okoline u kojima je biljka uzgajana. Stoga je ponekad upitna forenzička vrijednost poređenja uzoraka na osnovu rezultata dobijenih sa ovom relativno skupom tehnikom [ElSohly et al., 2007; UNODC, 2009a].

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorci

Uzorci biljnog materijala biljke *Cannabis sativa L.*, korišteni u istraživanju, potiču iz zaplijena širom Republike Srpske. Biljni materijal nije razvrstan prema porijeklu (domaći ili uvozni), načinu uzgoja (na otvorenom ili u zatvorenom), jer ti podaci nisu uvijek dostupni kod zaplijjenjenih ilegalnih uzoraka. Takođe, nisu razdvojene sorte (sense mila, industrijska konoplja i sl.), jer ih kod ilegalnih uzoraka nije uvijek moguće procijeniti prema izgledu, posebno kada je uzorak u obliku usitnjenog biljnog materijala pripremljenog za tržiste ili konzumiranje ili kada je u pitanju sadržaj cigareta.

Uzorci biljnog materijala su različitog pojavnog oblika:

- osušeni biljni vrhovi;
- osušen i usitnjen biljni materijal (forma poznata kao marihuana), u manjim ili većim pakovanjima;
- sadržaj improvizovanih cigareta (osušen i usitnjen biljni materijal, sam ili pomiješan sa duvanom);
- svježe stabljike biljaka,
- osušeni grumenovi smole, tamno smeđe boje.

Prije analize izvršeno je vaganje uzoraka, pregled fizičkih karakteristika, a mikroskopski pregled morfoloških karakteristika biljnog materijala rađen je po potrebi. Materijal je uzorkovan i pripremljen na odgovarajući način zavisno od pojavnog oblika. Za analizu je korišten osušen, usitnjen i homogenizovan biljni materijal, iz kojeg su odstranjene sjemenke i dijelovi stabljike. Gdje je bilo moguće odabrani su vrhovi biljke, kao reprezentativni kada je u pitanju analiza psihoaktivnog sastojka. Prilikom uzorkovanja sadržaja improvizovanih cigareta, odstranjen je duvan, ukoliko je bio prisutan. Količina usitnjenog biljnog materijala korištenog za pojedinačne analize iznosila je od 0,1 do 0,5 g, zavisno od raspoložive količine uzorka i primjenjene analitičke tehnike.

Nakon prve analize, ostatak biljnog materijala pakovan je u papirnu ambalažu, a uzorci za slijedeće analize uzmani su periodično. Imajući u vidu uticaj vazduha (kiseonika), svjetlosti i

povišene temperature na razgradnju psihoaktivnog sastojka THC, uzorci su čuvani u suhom i tamnom prostoru, na sobnoj temperaturi.

4.2. Hemikalije i pribor

Referentni standardi osnovnih kanabinoida, marke *Alltech®* i *Lipomed AG®*, korišteni su za pripremu standardnih rastvora. Referentni standardi kanabidiola (CBD) i kanabinola (CBN) su u formi praška, čistoće 98,80-100% i 98,4-100% redom. Standardi tetrahidrokanabinola (THC) su u formi rastvora u metanolu ili etanolu, koncentracije 1 mg/ml, 2 mg/ml ili 5 mg/ml, čistoće 99,9 – 100%.

Za ekstrakciju su korišteni organski rastvarači hloroform (čistoće 99-99,4%), etanol (čistoće 99,8%), toluen (čistoće 99%) i petroleter (*pure*, < 15% n-heksana).

Za mjerjenje mase referentnih standarda i alikvota uzorka korištene su digitalne analitičke vase, preciznosti 0,0001 g. Usitnjavanje i homogenizacija uzorka rađena je u porculanskom avanu. Za pospešenje ekstrakcije biljnog materijala korišteni su horizontalni šejker *Promax 1020*, *Heidolph* ili ultrazvučno kupatilo *Ultrasonic 475H, Langford Sonomatic*.

4.3. Analitički postupci

4.3.1. Preliminarno testiranje

Preliminarno testiranje pomoću spot-test obojenih reakcija, primjenom reagenasa *Fast Blue B Salt* ili *Duquenois-Levine*, rađeno je u samo određenim slučajevima, prema procjeni analitičara, uglavnom kod usitnjenog biljnog materijala kod kojeg se slabije uočavaju morfološke karakteristike ili kada su u pitanju uzorci smole ili ulja.

4.3.2. Hromatografija na tankom sloju

Tehnika hromatografije na tankom sloju korištena je za kvalitativnu analizu, odnosno hemijsku identifikaciju osnovnih kanabinoida prisutnih u uzorcima, kao skrining tehnika u slučaju istovremene analize većeg broja uzorka.

Metodom semikvantitativne hromatografije na tankom sloju rađeno je semikvantitativno određivanje tetrahidrokanabinola (THC), u odnosu na koncentraciju 0,2% THC, pri čemu je izvršena validacija metode.

Korištene su TLC ploče sa tankim slojem 200 µm Silica gel 60 F₂₅₄ (sa fluorescentnim indikatorom) na aluminijskoj podlozi, dimenzija 20 x 20 cm, na koje se može nanijeti 10-15 uzoraka.

Razvijanje TLC-hromatograma odvijalo se u zatvorenoj TLC-komori, uz laznom tehnikom, u sistemima razvijača:

- n-hexan : dietileter (80:20)
- cikloheksan : diizopropileter : dietilamin (52:40:8)

Vizuelizacija kanabinoida rađena je:

- UV svjetlom na 254 nm,
- *Fast Blue B Salt* reagensom.

4.3.3. Gasna hromatografija

Kvalitativne i kvantitativne gasnohromatografske analize rađene su primjenom instrumenata:

- *GC-17A*, marke *SHIMADZU* sa FID detektorom,
- *GC Trace*, marke *Thermo Scientific* sa FID i MS detektorom,
- *GC System 7890B*, marke *Agilent Technologies* sa FID detektorom.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Sadržaj i međusobni odnos osnovnih kanabinoida u biljci *Cannabis sativa L.*

Podaci o sadržaju osnovnih kanabinoida u uzorcima biljnog materijala biljke *Cannabis sativa L.*, dobijeni su analizama uzoraka u hemijskoj laboratoriji Jedinice za forenzu – Kriminalističko-tehničkog centra, Ministarstva unutrašnjih poslova Republike Srpske u Banja Luci. Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 3718 uzoraka biljnog materijala i 28 uzoraka kanabis smole (hašiš), koji potiču iz zaplijena širom Republike Srpske u dužem vremenskom periodu (period 1999. – 2008. godine i 2011. – 2016. godine). Istraživanjem nisu obuhvaćene 2009. i 2010. godina, jer u tim godinama nije rađena kvantitativna analiza dovoljnog broja uzoraka. U tabeli 3 prikazan je broj analiziranih uzoraka po godinama, uz napomenu da broj uzoraka ne odražava broj zaplijena, jer određen broj zaplijjenjenih uzoraka koji su analizirani samo kvalitativno – tehnikom hromatografije na tankom sloju ili kvalitativnom gasnohromatografskom analizom, takođe nije obuhvaćen ovim istraživanjem.

Tabela 3. Broj analiziranih uzoraka po godinama

Godina	Br. uzoraka biljke	Br. uzoraka smole	Godina	Br. uzoraka biljke	Br. uzoraka smole
1999	114	1	2007	221	-
2000	153	-	2008	175	-
2001	190	-	2011	152	-
2002	205	-	2012	242	1
2003	211	-	2013	333	-
2004	148	4	2014	462	4
2005	177	4	2015	341	8
2006	202	1	2016	392	5
Ukupno analizirano uzoraka:				3718	28

Iz podataka navedenih u tabeli 3 vidi se da je kanabis smola mnogo rjeđa i pojavljivala se samo povremeno do 2014. godine, od kada je prisutno nešto više ovih uzoraka, ali je njihov broj i dalje zanemariv u odnosu na biljne uzorke.

Za potrebe istraživanja obrađeni su podaci analiza tri osnovna kanabinoida u uzorcima biljnog materijala: psihoaktivni tetrahidrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD) i kanabinol (CBN). Podaci dobijeni analizom i proračunom (procentualni sadržaj i međusobni odnosi osnovnih kanabinoida) obrađeni su korištenjem Microsoft Excel 2016.

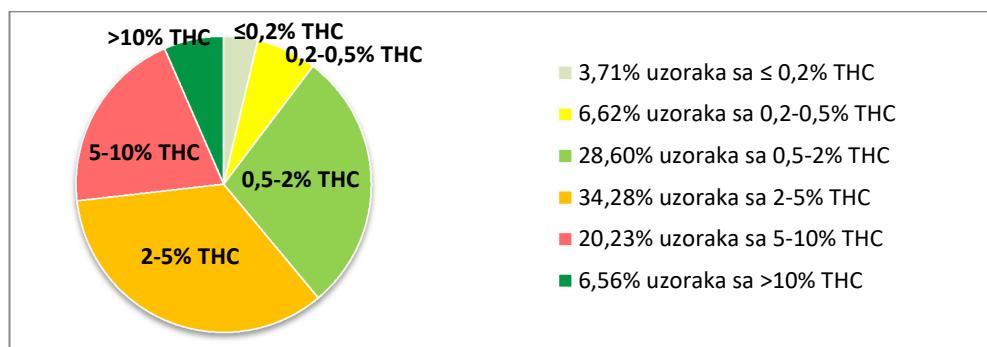
5.1.1. Sadržaj psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola (THC) – psihoaktivni potencijal kanabisa

Rezultati analiza pokazali su da se sadržaj tetrahidrokanabinola (THC) kreće od 0,01 do 27,48% u uzorcima biljnog materijala i do 31,57% u uzorcima kanabis smole, što pokazuje da su na ilegalnom tržištu prisutni kanabis preparati sa velikim razlikama u psihoaktivnom potencijalu.

Na osnovu rezultata analiza, uzorci biljnog materijala su razvrstani prema sadržaju THC u šest grupa:

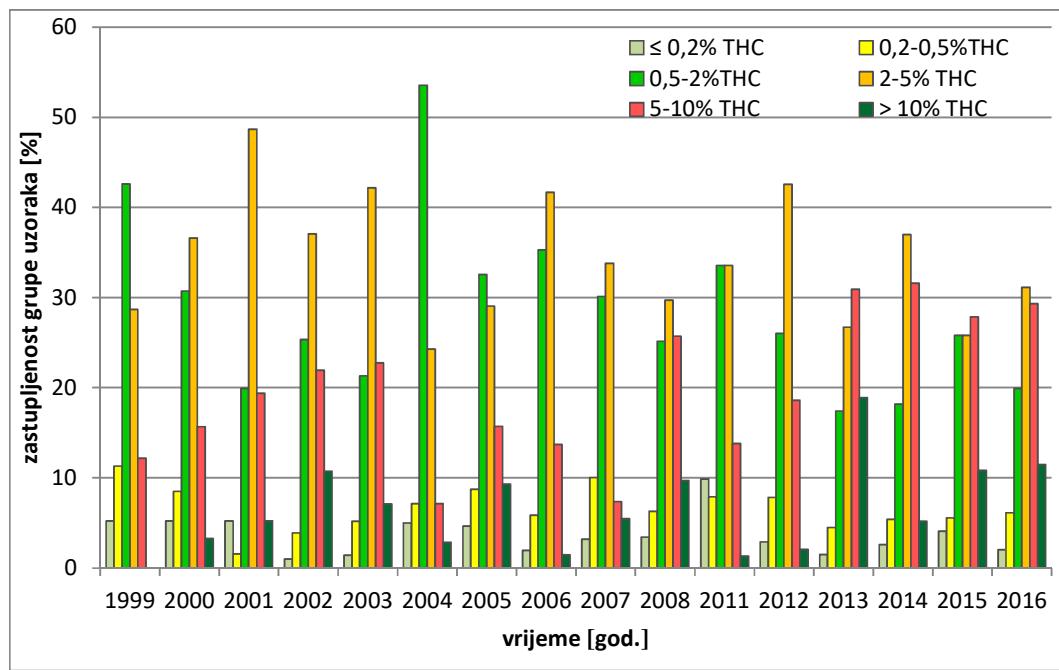
- I - uzorci sa sadržajem THC $\leq 0,2\%$ (ne smatraju se drogom);
- II - uzorci sa sadržajem THC 0,2 – 0,5% (efekti pri konzumiranju su minimalni);
- III - uzorci sa sadržajem THC 0,5 – 2% (niskopotentni);
- IV - uzorci sa sadržajem THC 2 – 5% (srednjepotentni);
- V - uzorci sa sadržajem THC 5 – 10% (srednje do visokopotentni);
- VI - uzorci sa sadržajem THC $> 10\%$ (visokopotentni).

Kada se posmatra ukupan broj analiziranih biljnih uzoraka (Slika 28), može se konstatovati da najveći udio predstavljaju tzv. droga-tip uzorci sa sadržajem THC $> 0,2\%$. Njihova prosječna zastupljenost u periodu 1999. – 2016. godine iznosi 96,29% i kreće se od 90,13% (2011. god.) do 99,02% (2002. god.) (tabele 4 i 5).



Slika 28. Dijagram procentualne zastupljenosti uzoraka prema sadržaju psihoaktivnog sastojka THC

Među uzorcima sa sadržajem THC $> 0,2\%$ najzastupljeniji su uzorci III grupe (0,5 – 2% THC) i IV grupe (2 – 5% THC) i zajedno čine preko 60% od ukupnog broja uzoraka.



Slika 29. Zastupljenost grupa uzoraka po godinama

Posmatrano po godinama (Slika 29, tabele 4 i 5), može se uočiti trend smanjenja udjela uzoraka sa nižim sadržajem THC (grupe I, II i III), te porast zastupljenosti uzoraka sa visokim sadržajem THC (grupe V i VI) i pored povremenog odstupanja u pojedinim godinama.

Tabela 4. Procentualna zastupljenost grupa uzoraka prema sadržaju THC za period 1999. – 2008.god.

Godina	Procentualna zastupljenost grupa prema sadržaju THC					
	I ($\leq 0,2\%$)	II (0,2-0,5%)	III (0,5-2%)	IV (2-5%)	V (5-10%)	VI (>10%)
1999	5,22	11,30	42,61	28,70	12,18	-
2000	5,23	8,50	30,72	36,60	15,68	3,27
2001	5,24	1,57	19,90	48,69	19,37	5,24
2002	0,98	3,90	25,36	37,07	21,95	10,73
2003	1,42	5,21	21,33	42,18	22,75	7,11
2004	5,00	7,14	53,57	24,29	7,14	2,86
2005	4,65	8,72	32,56	29,07	15,70	9,30
2006	1,96	5,88	35,30	41,67	13,72	1,47
2007	3,20	10,05	30,13	33,79	17,35	5,48
2008	3,43	6,29	25,15	29,71	25,72	9,71

Tabela 5. Procentualna zastupljenost grupa uzorka prema sadržaju THC za period 2011. – 2016. god.

Godina	Procentualna zastupljenost pojedine grupe prema sadržaju THC					
	I ($\leq 0,2\%$)	II (0,2-0,5%)	III (0,5-2%)	IV (2-5%)	V (5-10%)	VI (>10%)
2011	9,87	7,89	33,55	33,55	13,82	1,32
2012	2,89	7,85	26,03	42,56	18,60	2,07
2013	1,50	4,50	17,42	26,73	30,93	18,92
2014	2,60	5,41	18,18	37,01	31,60	5,19
2015	4,11	5,57	25,81	25,81	27,86	10,85
2016	2,04	6,12	19,90	31,12	29,34	11,48

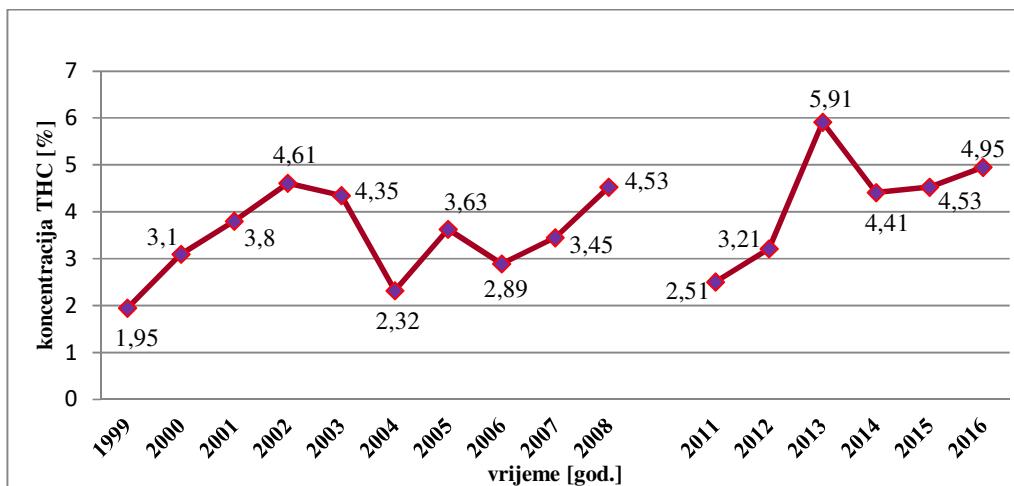
Do 2012. godine najzastupljeniji su uzorci III i IV grupe, nakon čega se bilježi značajno povećanje procentualne zastupljenosti uzorka V grupe. Njihov udio u ukupnom broju uzorka 2013. godine iznosio je 30,93%, što predstavlja značajno povećanje u odnosu na zastupljenost od 7,14 – 25,72% u prethodnom periodu. Iste godine zabilježen je maksimalan udio visokotentnih uzorka grupe VI. Uzorci IV grupe su uglavnom najbrojniji i njihova zastupljenost je relativno stabilna u vremenu [Dragoljić i sar., 2018].

Povećanje broja visokotentnih i smanjenje broja niskotentnih uzorka rezultira povećanjem srednjeg godišnjeg potencijala (srednja vrijednost sadržaja THC u uzorcima određene godine) u vremenu, kao što je prikazano u tabeli 6 i dijagramu (Slika 30). To je posebno izraženo u određenim godinama: 2002., 2003., 2008. i u periodu 2013. – 2016. god., u kojima srednji godišnji potencijal ima više vrijednosti, sa značajnim udjelom visokotentnih uzorka i malim udjelom niskotentnih uzorka.

Tabela 6. Srednji godišnji potencijal (prosječan sadržaj THC), standradna devijacija, najmanji i najveći procenat THC, po godinama

Godina	Sr. THC [%]	SD [\pm]	Min. THC [%]	Maks. THC [%]
1999	1,95	1,81	0,02	8,61
2000	3,10	2,81	0,06	14,01
2001	3,80	2,74	<0,01	17,08
2002	4,61	3,92	0,02	22,58
2003	4,35	3,53	0,02	22,63
2004	2,32	2,71	0,01	22,59
2005	3,63	3,69	0,01	22,45
2006	2,89	2,13	0,04	11,88
2007	3,45	3,14	0,03	17,30
2008	4,53	3,97	0,08	27,48
2011	2,51	2,26	0,02	11,00
2012	3,21	2,37	0,06	12,12
2013	5,91	4,21	0,10	25,80
2014	4,41	3,07	0,04	20,80
2015	4,53	3,79	0,02	18,30
2016	4,95	3,89	0,04	22,91

Posmatrano u vremenu, srednji godišnji psihoaktivni potencijal uzorka kanabis biljnog materijala je u porastu i kreće se od 1,95% THC u 1999. godini do 4,95% u 2016. godini, sa maksimumom u 2013. godini (5,91% THC). Srednji potencijal na bazi svih obrađenih uzoraka iznosi $3,76 \pm 1,04\%$ THC.



Slika 30. Dijagram potencijala uzorka kanabis biljnog materijala za period 1999. – 2008. god. i 2011.-2016

Iz pregleda srednjeg godišnjeg psihoaktivnog potencijala analiziranih uzoraka, prikazanog na slici 30 i u tabeli 6, vidljivo je da je i pored povremenog pada (2004., 2006. i 2011. godine) psihoaktivni potencijal biljnog materijala, generalno u porastu.

Ovaj povremeni pad potencijala može se dovesti u vezu sa prethodno provedenim policijskim akcijama u kojima su otkrivene i procesuirane organizovane kriminalne grupe, gdje je kao posljedica došlo do pada ukupne ponude droga na ilegalnom tržištu na određeno vrijeme [Vlada RS, 2016].

Kada se dobijeni podaci uporede sa dostupnim podacima iz drugih država, uočava se sličan trend. Brojne studije pokazuju da je u posljednjim decenijama došlo do značajnog povećanja potencijala kanabisa širom svijeta [Pijlman et al., 2005; McLaren et al., 2008; Mehmedic et al., 2010; Cascini et al., 2012; Tsumura et al., 2012; Swift et al., 2013; Niesnik et al., 2015; ElSohly et al., 2016; Dujourdy and Besacier, 2017; Freeman et al., 2018]. U izveštajima Kancelarije Ujedinjenih Nacija za droge i kriminal, porast potencijala kanabisa zabilježen je u Evropi, Sjedinjenim Američkim Državama i Australiji [UNODC, 2011, 2012, 2013b, 2014b, 2015].

Prema izveštaju Evropskog monitoring centra za droge i zavisnost (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction/EMCDDA*) i Europola, potencijal kanabis preparata

skoro je udvostručen u posljednjoj deceniji [EMCDDA and Europol, 2016]. Na osnovu dostupnih podataka [EMCDDA, 2018c], prikazanih u tabeli 7., može se zaključiti da je u posmatranom periodu (2000. – 2016. god.), a posebno od 2003. godine, potencijal kanabis biljke u nekim evropskim državama, npr. Bugarskoj, Češkoj, Estoniji, Mađarskoj, Poljskoj, Portugalu i Slovačkoj, višestruko uvećan, dok je u Austriji udvostručen.

Tabela 7. Srednji godišnji potencijal kanabis biljnog materijala u nekim evropskim državama, za period 2000. – 2016. godine

Godina	Srednji potencijal kanabis biljnog materijala (% THC)										
	Austrija	Belgija	Bugarska	Česka	Estonija	France	Italija	Luksemburg	Mađarska	Poljska	Portugal
2000	-	10,4	-	-	-	< 2,0	6,3	-	-	-	0,2
2001	5,0	6,0	-	-	-	< 2,0	5,8	1,0	-	5,2	1,6
2002	9,0	6,0	-	-	-	8,0	4,9	8,0	0,5	-	3,1
2003	-	13,8	2,0	9,2	-	8,5	7,9	1,2	-	1,4	3,8
2004	4,8	13,3	-	3,0	-	8,0	5,8	1,7	0,6	3,5	2,6
2005	5,6	-	2,4	3,8	3,3	6,1	-	1,7	1,0	3,0	6,1
2006	7,2	6,7	2,0	4,5	2,0	7,8	5,4	1,8	1,3	6,3	6,4
2007	6,7	9,2	1,5	4,7	-	7,5	2,2	10,2	1,2	5,2	3,9
2008	7,2	9,1	1,6	5,5	6,6	5,8	4,7	9,8	1,4	6,9	4,8
2009	5,9	9,9	2,4	4,2	8,0	8,5	5,9	11,2	1,3	7,7	3,8
2010	7,5	11,1	7,5	7,7	10,0	9,8	7,8	11,8	1,3	7,6	5,2
2011	7,0	10,7	3,7	7,2	11,1	10,6	6,4	11,3	1,0	9,6	5,2
2012	9,7	13,2	3,5	7,1	13,4	10,0	8,5	9,1	5,0	8,7	5,4
2013	9,6	10,4	9,1	10,0	13,4	12,7	12,4	8,5	6,5	9,8	6,6
2014	8,9	13,0	13,1	8,2	12,7	13,0	10,5	11,2	7,2	11,0	7,8
2015	9,8	21,7	12,3	8,3	13,5	11,4	8,9	11,3	6,8	10,0	8,3
2016	10,7	12,1	-	7,4	13,9	11,4	10,8	9,9	8,7	9,9	7,2

U Francuskoj je značajan porast psihoaktivnog potencijala zabilježen do 2002. godine, a potom je uslijedio period sa relativno stabilnim vrijednostima. Od 2005. do 2010. godine uočljive su fluktuacije potencijala, nakon čega 2011. godine ponovo dolazi do značajnijeg porasta. Potencijal kanabisa u Italiji bio je relativno stabilan do 2012. godine, kada je došlo do značajnijeg porasta. Belgija, Luksemburg i Njemačka spadaju u zemlje sa relativno stabilnim, ali i tradicionalno visokim potencijalom kanabisa. Prema dostupnim podacima EMCDDA, u periodu 2002. – 2014. godine potencijal u Njemačkoj varirao je u rasponu 8 – 10% THC, a u Luksemburgu 8-11% THC. U Belgiji je 2015. godine zabilježena rekordna vrijednost srednjeg godišnjeg psihoaktivnog potencijala kanabis biljke od 21,7% THC.

Marihuana uzgojena u Sjedinjenim Američkim Državama, ranije je smatrana slabom (nizak sadržaj THC) u odnosu na evropsku, ali su unaprijeđenja u oblasti selekcije i uzgoja vremenom rezultirala potentniju marihanu. Tako je 1974. godine srednji sadržaj THC u američkoj ilegalnoj marihanii bio ispod 1%, u 1980-im srednji sadržaj THC iznosio je u prosjeku 3%, a 1994. godine zabilježena je srednja vrijednost sadržaja THC 5%. Danas procenat THC varira od 0,5% u divljim biljkama do preko 20% u vještačkim hibridnim varijetetima koji, nasuprot visokom sadržaju THC, obično sadrže veoma nizak nivo CBD i drugih kanabinoida [Lee, 2005; Andre et al., 2016].

Iako psihoaktivni potencijal kanabis biljke na prostoru Republike Srpske nije visok kao u nekim evropskim državama (Belgija, Njemačka, Luksemburg, Francuska, Italija itd.) i kod nas je evidentan trend rasta, kako srednjeg psihoaktivnog potencijala tako i broja visokotentnih uzoraka kanabisa [Dragoljić i sar., 2018]. Takav trend se može očekivati i u budućnosti na našim prostorima, imajući u vidu da postoji veza između visokog potencijala biljke i uzgoja u zatvorenom prostoru, pod vještačkim uslovima, što je fenomen koji je već neko vrijeme prisutan i kod nas [Dragoljić i Vasić-Dakić, 2014].

Iako poređenje rezultata analiza između država, posebno u dužem vremenu, zavisi od više faktora (vrsta kanabis proizvoda, način uzorkovanja, prirodna degradacija THC u vremenu, primjena različitih analitičkih tehnika itd.) predočeni podaci jasno pokazuju promjene psihoaktivnog potencijala kanabisa, te ukazuju na trendove koji se mogu očekivati u budućnosti. Međunarodne organizacije koje se bave problematikom ilegalnih droga, kao što su Kancelarija Ujedinjenih Nacija za droge i kriminal, Evropska mreža forenzičkih naučnih instituta i Naučna radna grupa za analizu ilegalnih droga, preporučuju standardizovane procedure za uzorkovanje i analizu [UNODC, 2009a; UNODC and ENFSI, 2009; SWGDRUG, 2005, 2016] i organizuju međulaboratorijska testiranja, radi relevantnije komparacije rezultata između laboratorija.

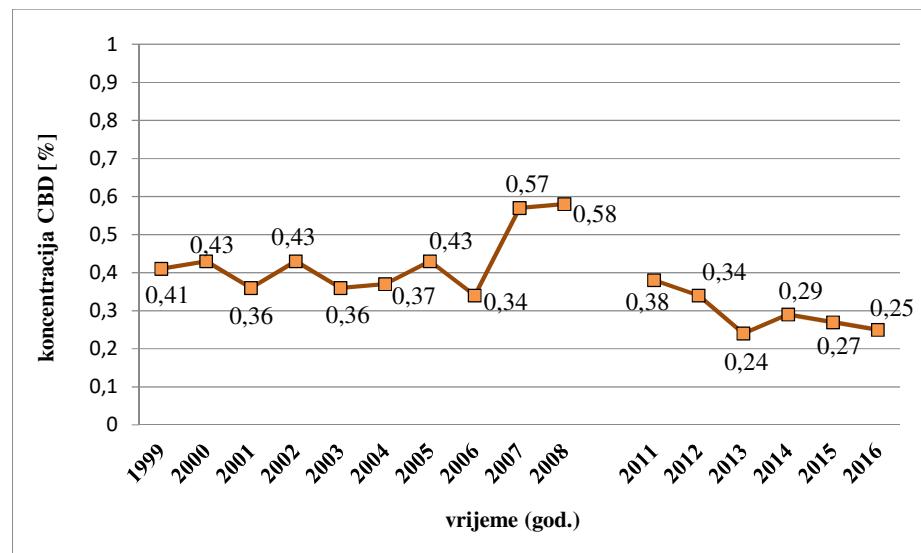
Praćenje potencijala ilegalnih kanabis proizvoda, kao pokazatelja onoga šta se trenutno koristi u populaciji, važno je sa stanovišta efekata na zdravlje korisnika, posebno kada se radi o potentnijim proizvodima [ElSohly et al., 2016]. Rekreativna upotreba kanabis preparata ima negativan uticaj na zdravlje, posebno u ranoj adolescenciji, pri čemu visokotentni preparati kanabisa predstavljaju veći zdravstveni rizik za korisnike, što je u korelaciji sa učestalom posjetama korisnika kanabisa hitnim medicinskim službama [Volkov et al., 2014; UNODC, 2015, 2017]. Zabilježeno je povećanje posjeta adolescenata (u dobu od 15 do 17 godina) zdravstvenim ustanovama, povezanih sa upotrebotom marihuane, za skoro 50% u periodu 2005

– 2010. godine [CBHSQ-DAWN, 2012], što se podudara sa povećanjem potencijala kanabisa tokom istog perioda [UNODC, 2017]. Ako se uzme u obzir da se od potentne biljke dobiju i potentniji preparati: kanabis smola (hašiš) i kanabis ulje, koji zavisno od postupka proizvodnje, mogu sadržavati i 80 – 90% THC, to za korisnike može predstavljati ozbiljan zdravstveni rizik. Ovom pitanju svakako treba posvetiti značajnu pažnju, jer pored ilegalnog konzumiranja, kanabis ulje se sve više koristi kao pomoćna terapija kod određenih oboljenja.

5.1.2. Sadržaj kanabidiola (CBD)

Psihoaktivni potencijal i farmakološko djelovanje kanabisa su složena pitanja i zavise od više faktora. Biljka *Cannabis sativa L.* sadrži 120 kanabinoida, čiji efekti nisu u potpunosti poznati. Između ostalog, smatra se da kanabidiol (CBD) umanjuje psihoaktivne efekte tetrahidrokanabinola (THC), pa za kompletniju sliku o farmakološkim osobinama kanabisa, treba uzeti u obzir i sadržaj CBD, koji nije tako često monitorisan, što stvara poteškoće u procjeni uticaja kanabisa na zdravlje [UNODC, 2015].

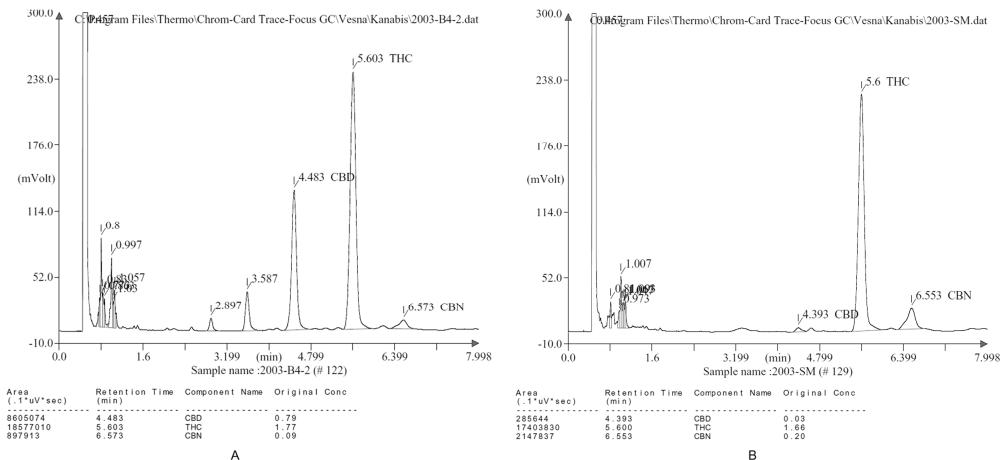
Kada se prati sadržaj CBD u analiziranim uzorcima, vidljivo je da njegova koncentracija opada u zadnjih nekoliko godina, sa oko 0,4%, koliko je u prosjeku iznosio do 2012. godine, na oko 0,26% u periodu 2013. – 2016. godine (Slika 31).



Slika 31. Dijagram srednje koncentracije CBD, po godinama

Tokom obrade rezultata konstatovano je da je, paralelno sa sve većim brojem visokotentnih uzoraka, u porastu i broj uzoraka sa niskim sadržajem CBD, za razliku od ranijeg perioda kada je u uzorcima, pored različite koncentracije THC, bio prisutan i CBD u značajnijoj količini

[Dragoljić i sar., 2016]. Kao primjer, na slici 32 prikazani su hromatogrami dva uzorka sa istim sadržajem THC (3,5%), dok se sadržaj CBD u njima značajno razlikuje i iznosi: 1,6% (slika 32 A) i 0,05% (slika 32 B).



Slika 32. Primjeri hromatograma uzorka sa različitim sadržajem CBD

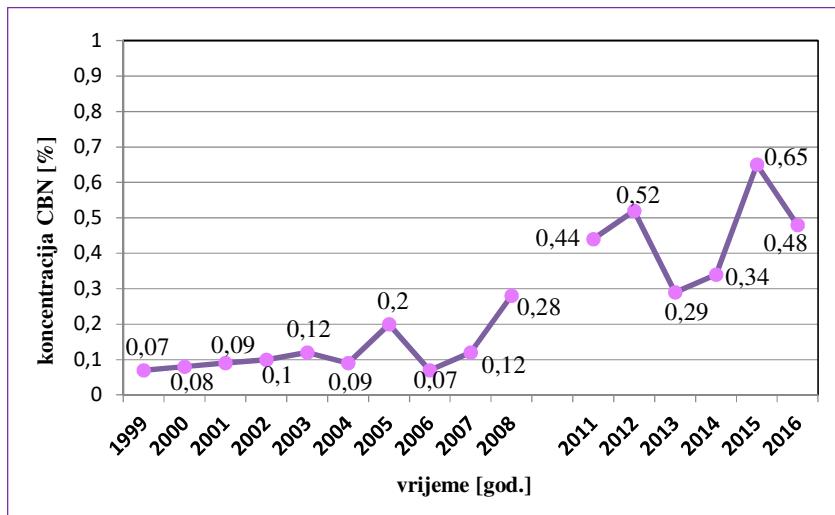
Istovremeno je zapažen sve veći broj uzoraka koji uopšte ne sadrže CBD, što ranije nije bio slučaj. Naime, do 2006. godine CBD je redovno bio prisutan u uzorcima, u 2007. godini utvrđeno je da 3,6% uzoraka ne sadrži CBD, u 2013. godini 6,7% uzoraka nisu imali CBD, dok se broj uzoraka bez CBD popeo na 17,4% u 2014. godini i takvo stanje se zadržalo do 2016. godine [Dragoljić i sar., 2019b]. Sličan trend postoji i u drugim evropskim državama, a povezuje se sa unaprijeđenim metodama uzgoja u zatvorenom koje obezbjeđuju kanabis sa višim sadržajem THC i niskim CBD [Zamengo et al., 2013].

Kako CBD ima anti-psihotičke efekte, odnosno umanjuje psihoaktivni potencijal THC, smanjujući tako rekreativnu vrijednost kanabisa, konzumenti koji koriste kanabis bez CBD mogu biti u većem riziku, jer visoko-potentni kanabis proizvodi bez CBD imaju potencijal da budu štetniji [Potter et al., 2008]. Zbog toga Kancelarija Ujedinjenih Nacija za droge i kriminal preporučuje da se u evaluacijama potencijala kanabisa, pored THC, prati i nivo CBD [UNODC, 2006].

5.1.3. Sadržaj kanabinola (CBN)

Kanabinol (CBN) nije prisutan u svježoj biljci i smatra se primarnim proizvodom oksidativne degradacije THC tokom skladištenja biljnog materijala, te može biti indikator starosti uzorka [Ross and Elsohly, 1997; De Backer et al., 2012].

Na dijagramu koncentracije CBN (Slika 33) može se očitati da su uzorci do 2007. godine imali manje CBN (od 0,07 do 0,2%), za razliku od uzorka iz kasnijeg perioda, u kojima je sadržaj CBN u rasponu od 0,28 do 0,65%.



Slika 33. Dijagram srednje koncentracije CBN, po godinama

Viša koncentracija CBN u uzorcima dostavljenim na analizu posljednjih godina može se dovesti u vezu sa dinamikom dostavljanja uzorka u laboratoriju. Naime, u ranijem periodu uzorci su dostavljeni u laboratoriju odmah nakon zaplijene pa je sadržaj kanabinoida utvrđen analizom vjerno predstavljao stanje u vrijeme zaplijene. Kasnije, promjenom određenih procedura u istražnom postupku, zapaženo je da se uzorci dostavljaju u laboratoriju mjesecima nakon zaplijene, a u međuvremenu se čuvaju u depozitima, pod različitim uslovima. Tokom tog perioda skladištenja dolazi do degradacije THC, te je u vrijeme analize sadržaj THC niži, a sadržaj CBN viši nego u momentu zaplijene uzorka. Dakle, analizom starijih uzorka kanabisa ne dobije se vjerna slika sadržaja kanabinoida u uzorcima u vrijeme zaplijene. Zbog toga se preporučuje uzorce kanabis preparata dostaviti u laboratoriju na analizu odmah nakon zaplijene, kako bi rezultat analize odražavao stvarno stanje sadržaja kanabinoida u vrijeme zaplijene uzorka i tako bio vjerodostojan dokaz za potrebe sudskog postupka.

5.1.4. Međusobni odnosi osnovnih kanabinoida

S obzirom da sadržaj kanabinoida, posebno THC, u biljnog materijalu nije stabilan i mijenja sa vremenom, karakterizacija bijke u svrhu razlikovanja hemijskog fenotipa (hemotipa) može se izvršiti na osnovu određivanja međusobnog odnosa osnovnih kanabinoida, definisanih kao hemotip indeksi. Za razliku od kvantitativnog sadržaja kanabinoida, koji može varirati, njihov međusobni odnos u biljci je prilično stabilan [Tipparat et al., 2014; Grassi and McPartland,

2017]. *Fetterman* i saradnici [1971] su predložili relativno jednostavnu metodu karakterizacije hemijskog fenotipa biljke, baziranu na međusobnom odnosu tri osnovna kanabinoida, koja je najraširenija u forenzičkoj praksi:

$$fenotip\ odnos = \frac{\% \Delta^9 - THC + \% CBN}{\% CBD} \quad [3]$$

Uzorci sa fenotip odnosom > 1 su klasifikovani kao „droga-tip“, a uzorci sa fenotip odnosom < 1 kao „vlakno-tip“ kanabis [Fetterman et al., 1971]. Analogno se, za određivanje hemijskog fenotipa biljke, koristi i odnos THC/CBD, gdje „droga-tip“ biljke karakteriše odnos THC/CBD > 1 , a „vlakno-tip“ biljke odnos THC/CBD < 1 [De Meijer et al., 1992; Grassi and McPartland, 2017].

Small i *Beckstead* (1973) su prepoznali intermedijer hemotip. Prema njihovom sistemu klasifikacije, biljke sa visokim odnosom THC/CBD (znatno viši od 1) pripadaju hemotipu I (droga-tip), biljke čiji je odnos THC/CBD oko 1 pripadaju hemotipu II (intermedijer tip), dok biljke sa niskim THC/CBD odnosom (mnogo nižim od 1) pripadaju hemotipu III (vlakno-tip) [Hillig and Mahlberg, 2004]. *Small* i *Beckstead* su predložili i definisanje hemotipa na osnovu kvantitativnog određivanja THC i CBD, izraženog kao postotak kanabinoida u suhoj masi biljnog materijala, te u skladu sa sadržajem istih predložili su sljedeće kategorije:

Hemotip I: THC $> 0,3\%$, CBD $< 0,5\%$;

Hemotip II: THC $> 0,3\%$, CBD $> 0,5\%$;

Hemotip III: THC $< 0,3\%$, CBD $> 0,5\%$.

Hemotip IV: biljke sa značajnim sadržajem kanabigerol monometiletera (CBGM) [Raman and Joshi, 2003; Grassi and McPartland, 2017].

U ovom slučaju droga-tip biljke bi bile sa sadržajem THC $> 0,3\%$, jer se smatra da uzorci sa sadržajem THC do $0,3\%$ u suhoj masi biljnog materijala nemaju potencijal za korištenje u rekreativne svrhe. Ovaj kriterijum pogodan je za determinaciju potencijala odrasle biljke, dok se za razlikovanje visokotentnog i niskotentnog tipa mladih nezrelih biljaka koristi odnos koncentracija THC i CBD [De Backer et al., 2012; Small, 2017b].

Hillig i *Mahlberg* su koristili logaritam odnosa THC/CBD i predložili sistem klasifikacije determinišući tri hemotipa kanabis biljke: hemotip I – droga-tip biljke imaju odnos $\log_{10}(\text{THC/CBD}) > 1$ (odgovarajući odnosu THC/CBD > 10), hemotip II – intermedijer-tip biljke ima srednji $\log_{10}(\text{THC/CBD})$ odnos između $-0,6$ i 1 (odgovarajući odnosu THC/CBD od $0,25$ do 10) i hemotip III – tzv. vlakno-tip biljke ima odnos $\log_{10}(\text{THC/CBD}) < -0,7$

(odgovarajući odnosu THC/CBD < 0,2) [Hillig and Mahlberg, 2004, Dujourdy and Besacier, 2017].

Na osnovu analiza sadržaja tri osnovna kanabinoida u uzorcima biljnog materijala koji su predmet ovog istraživanja, izvršeno je izračunavanje njihovog međusobnog odnosa na tri prethodno opisana načina, te su zajedno sa odgovarajućim hemotipom, prikazani u tabeli 8.

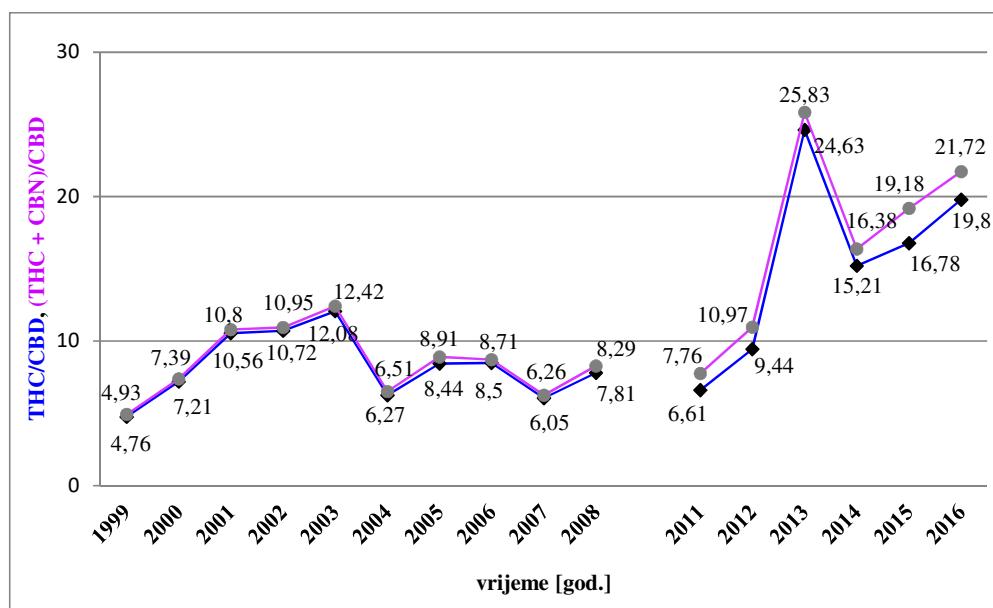
Tabela 8. Međusobni odnos osnovnih kanabinoida i hemotip

Godina	$\frac{\text{THC} + \text{CBN}}{\text{CBD}}$	$\frac{\text{THC}}{\text{CBD}}$	Hemotip	$\log_{10}\left(\frac{\text{THC}}{\text{CBD}}\right)$	Hemotip
1999	4,93	4,76	I	0,68	II
2000	7,39	7,21	I	0,86	II
2001	10,80	10,56	I	1,02	I
2002	10,95	10,72	I	1,03	I
2003	12,42	12,08	I	1,08	I
2004	6,51	6,27	I	0,80	II
2005	8,91	8,44	I	0,93	II
2006	8,71	8,50	I	0,93	II
2007	6,26	6,05	I	0,78	II
2008	8,29	7,81	I	0,89	II
2011	7,76	6,61	I	0,82	II
2012	10,97	9,44	I	0,97	II
2013	25,83	24,63	I	1,39	I
2014	16,38	15,21	I	1,18	I
2015	19,18	16,78	I	1,22	I
2016	21,72	19,80	I	1,30	I

Primjenom različitih metoda karakterizacije hemotipa uzoraka, može se zaključiti da hemotip indeksi određeni prema *Fettermann* odgovaraju droga-tipu uzoraka (hemotip I), dok hemotip indeksi određeni prema logaritamskoj vrijednosti odnosa THC/CBD svrstavaju više od 50% obrađenih uzoraka u intermedijer-tip kanabisa (hemotip II). Uopšteno se može reći da korištenje hemotip indeksa prema $\log_{10}(\text{THC}/\text{CBD})$ ide u korist intermedijera ili vlakno-tipa kanabisa, dok primjena hemotip indeksa prema *Fettermann* većinu analiziranih uzoraka svrstava u droga-tip. Stoga neki autori preferiraju primjenu $\log_{10}(\text{THC}/\text{CBD})$ parametra za određivanje fenotipa kanabisa [Tipparat et al., 2014].

Kada se posmatraju srednje godišnje koncentracije THC i CBD (Slike 30 i 31) uočava se trend porasta THC i smanjenja CBD, rezultirajući promjenu odnosa THC/CBD od oko 5, koliko je iznosio 1999. godine do oko 25 u 2013. godini (tabela 8 i Slika 34), a time i povećanje ukupnog kanabis potencijala.

Na slici 34 je vidljivo da međusobni odnos osnovnih kanabinoida, izražen odnosom THC/CBD ili (THC+CBN)/CBD ima slične vrijednosti, za period do 2008. godine, kada su uzorci u prosjeku imali niži sadržaj CBN, a do određenih razlika dolazi nakon toga, sa porastom CBN u uzorcima. Inače, smatra se da odnos tri osnovna kanabinoida, definisan relacijom (THC+CBN)/CBD, vjernije odražava diferencijaciju između droga-tip i vlakno-tip biljaka, iz razloga što CBN nije prisutan u svježoj biljci i nastaje degradacijom THC sa vremenom. U tom smislu, može se smatrati da analizom utvrđen CBN u uzorku biljnog materijala potiče od razgrađenog THC, stoga njihov zbir približno odgovara sadržaju THC u biljci u momentu branja.



Slika 34. Međusobni odnos THC/CBD i (THC + CBN)/CBD, po godinama

Međusobni odnos osnovnih kanabinoida značajan je i kao pokazatelj rizika od psihotičnih efekata, a time i rizika od razvijanja zavisnosti. Kanabis preparati sa višim sadržajem psihoaktivnog THC i nižim sadržajem CBD, koji ima antipsihotične efekte, potentniji su i predstavljaju veći zdravstveni rizik [Freeman and Winstock, 2015; Piomelli et al., 2016]. Pored sadržaja THC, podatak o sadržaju CBD, te odnos THC/CBD pružaju značajne informacije o štetnim efektima kanabisa [Freeman et al., 2018]. Prema tome, moglo bi se reći da odnos THC/CBD predstavlja ukupni psihoaktivni potencijal biljke. Trend porasta ukupnog kanabis potencijala u Republici Srpskoj odgovara međunarodnim trendovima, koji bilježe dramatičan porast potencijala kanabis preparata tokom godina, rezultirajući negativan uticaj na zdravlje korisnika [Di Forti et al., 2014, 2015; Volkow et al., 2014; Niesink et al., 2015; ElSohly et al., 2016; Dujourdy and Besacier, 2017; Freeman et al., 2018].

S obzirom da se hemotip indeksi određuju radi razlikovanja industrijskog vlakno-tipa biljke od droga-tip biljke namijenjene zloupotrebi, proučavanje i poređenje hemotip indeksa dobijenih na različite načine mogu doprinijeti usaglašavanju i razvoju kriterija za regulisanje dozvoljenog uzgoja, za kojim postoji sve veće interesovanje [Tipparat et al., 2012]. Neki autori sugeriraju da bi detaljnija analiza sastojaka, koja bi obuhvatila veći broj kanabinoida i još neka jedinjenja (npr. terpene), unaprijedila determinaciju hemijskog profila i karakterizaciju tipa biljke [Elzinga et al., 2015; Aizpurua-Olaizola et al., 2016; Hazekamp et al., 2016; Fischedick, 2017; De la Fuente et al., 2020].

Međutim, u forenzičkoj praksi se pokazalo da određivanje hemotipa na osnovu međusobnog odnosa osnovnih kanabinoida nije dovoljno za determinaciju tipa kanabis biljke i može prouzrokovati nejasnoće u sudskom postupku. Diferencijacija između droga-tipa i vlakno-tipa biljke u forenzici manje se oslanja na hemijsku karakterizaciju na osnovu hemotipa, dok je sadržaj psihoaktivnog sastojka presudan za procjenu o tome da li se biljka može koristiti kao droga. Klasifikacija prema hemotip indeksu na osnovu odnosa kanabinoida može se koristiti kao sekundarni kriterijum [Kallawicha et al., 2008]. Npr. u slučajevima kada nije kvantitativno određen sadržaj THC, determinacija tipa biljke može se odrediti pomoću hemotip indeksa na osnovu međusobnog odnosa površina pikova osnovnih kanabinoida u hromatogramu.

5.2. Promjena koncentracije tetrahidrokanabinola (THC) i kanabinola (CBN) sa vremenom

Poznato je da se u ubranom bilnjom materijalu biljke *Cannabis sativa* L. psihohaktivni sastojak tetrahidrokanabinol (THC) razgrađuje i da njegova koncentracija opada sa vremenom, pri čemu se najvećio dio tetrahidrokanabinola (THC) razlaže do kanabinola (CBN), koji inače nije prisutan u svježoj biljci u značajnoj količini, nego nastaje kao poizvod oksidativne degradacije THC tokom stajanja ubranog biljnog materijala.

U ovom radu nastavljeno je ranije istraživanje rađeno sa ciljem utvrđivanja dinamike razgradnje THC i nastajanja CBN. U prethodnom istraživanju praćena je promjena koncentracije THC i CBN u vremenu, za 20 uzoraka biljnog materijala, tokom perioda od šest godina. Na osnovu rezultata analiza određeni su osnovni kinetički parametri reakcije razlaganja THC i tom prilikom je zaključeno da najprihvatljivija zakonitost za razgradnju tetrahidrokanabinola odgovara reakcijama prvog reda, na osnovu čega je određena konstanta brzine reakcije razlaganja THC, prema relaciji:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{c_0}{c_A} \quad [4]$$

Srednja vrijednost konstante brzine reakcije razlaganja THC određena na osnovu šestogodišnjeg istraživanja 20 uzoraka iznosila je $k_{sr.} = 0,547$ godina⁻¹, pri čemu je poluvrijeme reakcije $t_{1/2} = 1,27$ [Dragoljić, 2012]. Istraživanje je nastavljeno praćenjem promjene koncentracije THC i CBN u deset uzoraka tokom naredne tri godine, a rezultati analiza za svih devet godina prikazani su u tabelama 9 i 10. Oznake uzoraka odgovaraju oznakama iz ranijeg istraživanja.

Tabela 9. Pregled koncentracije THC u 10 uzoraka tokom perioda od 9 godina

starost uzorka	Koncentracija THC u uzorcima [%]									
	1	3	4	5	7	10	14	16	17	19
c ₀ (THC)	17,30	13,04	9,04	7,20	5,30	3,00	2,30	2,22	1,03	0,50
1 god.	11,01	7,95	4,61	3,64	2,71	1,63	1,64	1,33	0,67	0,31
2 god.	7,00	5,49	2,35	1,84	1,39	0,88	1,06	0,80	0,44	0,20
3 god.	4,46	3,38	1,20	0,93	0,70	0,47	0,73	0,48	0,29	0,12
4 god.	2,84	2,15	0,62	0,47	0,36	0,26	0,56	0,29	0,19	0,08
5 god.	1,80	1,37	0,31	0,24	0,18	0,14	0,51	0,17	0,12	0,05
6 god.	1,15	0,98	0,16	0,12	0,10	0,06	0,39	0,10	0,08	0,03
7 god.	0,58	0,54	0,08	0,07	0,05	0,04	0,23	0,07	0,05	0,02
8 god.	0,36	0,34	0,04	0,03	0,03	0,02	0,11	0,04	0,03	0,01
9 god.	0,29	0,22	0,02	0,02	0,01	0,01	0,06	0,03	0,02	0,01

Rezultati analiza pokazuju da u ubranom biljnom materijalu sadržaj THC opada sa vremenom (tabela 9). Pad koncentracije THC značajniji je u prvim godinama, što je izraženije kod uzorka sa višom početnom koncentracijom (uzorci 1 i 3). Takođe je zapaženo da je u osmoj godini kod većine uzorka THC prisutan u tragu, a posebno u uzorcima sa početnom koncentracijom THC 9,04% i nižom, kod kojih je THC pao na oko 0,01 – 0,04%. Nakon toga, u devetoj godini, promjena koncentracije THC je minimalna i dešava se na nivou druge decimale.

Istovremeno sa padom koncentracije THC u uzorcima se povećava sadržaj CBN (tabela 10).

Tabela 10. Pregled koncentracije CBN u 10 uzoraka tokom perioda od 9 godina

starost uzorka	Koncentracija CBN u uzorcima [%]									
	1	3	4	5	7	10	14	16	17	19
C ₀ (CBN)	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1 god.	0,11	0,09	0,07	0,07	0,06	0,02	0,04	0,04	0,03	0,02
2 god.	0,29	0,27	0,15	0,16	0,23	0,05	0,14	0,12	0,07	0,04
3 god.	0,67	0,60	0,28	0,29	0,44	0,17	0,29	0,23	0,09	0,05
4 god.	0,91	0,91	0,40	0,43	0,62	0,28	0,36	0,40	0,14	0,07
5 god.	1,31	1,27	0,57	0,47	0,69	0,33	0,40	0,49	0,17	0,09
6 god.	1,69	1,53	0,61	0,51	0,75	0,36	0,47	0,51	0,19	0,10
7 god.	1,81	1,66	0,64	0,54	0,77	0,37	0,51	0,53	0,20	0,11
8 god.	1,90	1,76	0,65	0,55	0,78	0,37	0,55	0,54	0,21	0,11
9 god.	1,93	1,79	0,65	0,55	0,78	0,37	0,57	0,55	0,21	0,11

Slično kao kod THC, promjena koncentracije CBN veća je u prvim godinama nego kasnije, pa se tako u osmoj i devetoj godini koncentracija CBN gotovo ne mijenja. Može se reći da je CBN u ispitivanim uzorcima dostigao plato u osmoj godini, nakon čega njegove vrijednosti ostaju relativno konstantne. To je očekivano, s obzirom da je CBN glavni proizvod degradacije THC, nakon što je THC pao na minimalne vrijednosti CBN nema više od čega da nastaje.

Promjene koncentracija oba kanabinoida proporcionalne su vremenu čuvanja, što može poslužiti za procjenu približne starosti uzorka marihuane na osnovu njihovog sadržaja u uzorku i međusobnog odnosa CBN/THC. Međutim, prilikom procjene starosti uzorka treba uzeti u obzir uslove skladištenja uzorka (prisustvo svjetlosti, vlažnost i temperatura) koji imaju značajan uticaj na proces degradacije THC [Turner et al. 1973, Trofin et al., 2011; Sevigny, 2013; Dragoljić i sar., 2013]. Generalno, što je viši odnos CBN/THC, to su uzorci stariji.

Radi praćenja dinamike degradacije, na osnovu rezultata analiza deset uzoraka određene su konstante brzine reakcije razlaganja THC. U tabelama 11 i 12 prikazani su odgovarajući parametri i konstante brzine reakcije iz istraživanja u ukupnom periodu od devet godina.

Tabela 11. Koncentracija THC, $\ln c_0/c_t$ i konstante brzine reakcije za uzorke 1, 3, 4, 5 i 6

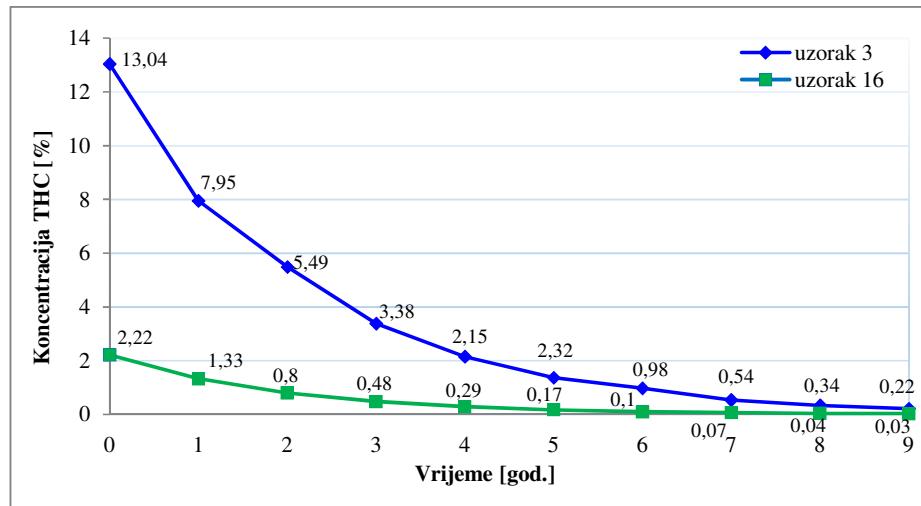
Vrijeme [god.]	Uzorak br. 1		Uzorak br. 3		Uzorak br. 4		Uzorak br. 5		Uzorak br. 6	
	c _{THC}	ln c ₀ /c _t	c _{THC}	ln c ₀ /c _t	c _{THC}	ln c ₀ /c _t	c _{THC}	ln c ₀ /c _t	c _{THC}	ln c ₀ /c _t
0	17,30		13,04		9,04		7,20		5,30	
1	11,01	0,452	7,95	0,495	4,61	0,673	3,64	0,682	2,71	0,671
2	7,00	0,905	5,49	0,865	2,35	1,347	1,84	1,364	1,39	1,338
3	4,46	1,355	3,38	1,350	1,20	2,019	0,93	2,047	0,70	2,024
4	2,84	1,807	2,15	1,803	0,62	2,680	0,47	2,729	0,36	2,689
5	1,80	2,263	1,37	2,253	0,31	3,373	0,24	3,401	0,18	3,382
6	1,15	2,711	0,98	2,588	0,16	4,034	0,12	4,094	0,10	3,970
	$k = 0,452 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,450 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,673 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,681 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,670 \text{ godina}^{-1}$	
7	0,58	3,395	0,54	3,184	0,08	4,727	0,07	4,633	0,05	4,663
8	0,36	3,872	0,34	3,647	0,04	5,420	0,03	5,481	0,03	5,174
9	0,29	4,088	0,22	4,082	0,02	6,114	0,02	5,886	0,01	6,273
	$k = 0,459 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,453 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,674 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,677 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,670 \text{ godina}^{-1}$	

Tabela 12. Koncentracija THC, $\ln c_0/c_t$ i konstante brzine reakcije za uzorke 10, 14, 16, 17 i 19

Vrijeme [god.]	Uzorak br. 10		Uzorak br. 14		Uzorak br. 16		Uzorak br. 17		Uzorak br. 19	
	c _{THC} [%]	ln c ₀ /c _t	c _{THC} [%]	ln c ₀ /c _t	c _{THC} [%]	ln c ₀ /c _t	c _{THC} [%]	ln c ₀ /c _t	c _{THC} [%]	ln c ₀ /c _t
0	3,00		2,30		2,22		1,03		0,50	
1	1,63	0,610	1,64	0,338	1,33	0,512	0,67	0,430	0,31	0,478
2	0,88	1,226	1,06	0,775	0,80	1,021	0,44	0,850	0,20	0,916
3	0,47	1,854	0,73	1,148	0,48	1,531	0,29	1,267	0,12	1,427
4	0,26	2,446	0,56	1,413	0,29	2,035	0,19	1,690	0,08	1,833
5	0,14	3,065	0,51	1,506	0,17	2,569	0,12	2,150	0,05	2,303
6	0,06	3,912	0,39	1,775	0,10	3,100	0,08	2,555	0,03	2,813
	$k = 0,611 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,341 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,510 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,426 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,469 \text{ godina}^{-1}$	
7	0,04	4,317	0,23	2,303	0,07	3,457	0,05	3,025	0,02	3,219
8	0,02	5,011	0,11	3,040	0,04	4,016	0,03	3,536	0,01	3,912
9	0,01	5,704	0,06	3,646	0,03	4,304	0,02	3,941	0,01	3,912
	$k = 0,616 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,351 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,505 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,430 \text{ godina}^{-1}$		$k = 0,466 \text{ godina}^{-1}$	

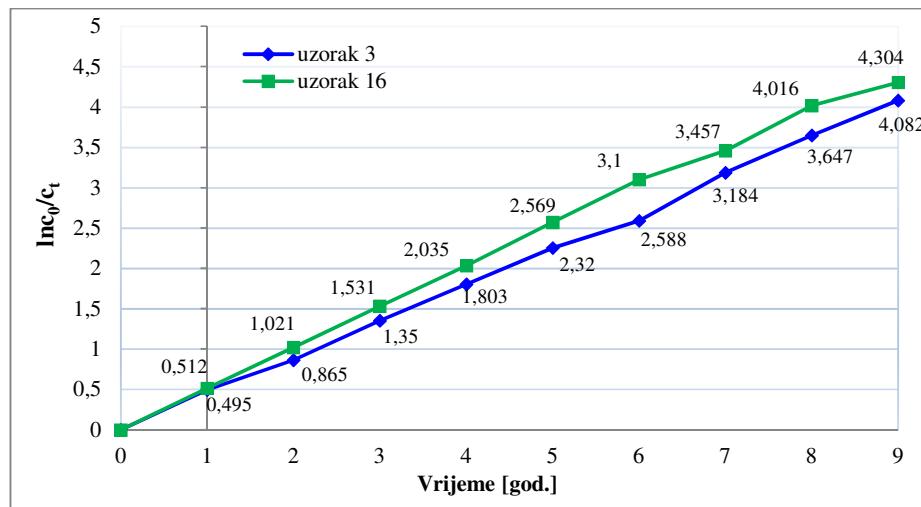
Srednja vrijednost konstante brzine reakcije razlaganja THC određena na osnovu analiza deset uzoraka tokom perioda od devet godina iznosi je $k_{sr.} = 0,530 \text{ godina}^{-1}$.

Na primjerima uzorka broj 3 i 16 prikazan je dijagram zavisnosti koncentracije u funkciji vremena, prema kojem se može grafički određivati koncentracija THC (Slika 35).



Slika 35. Dijagram zavisnosti $c_{THC} = f(t)$, za uzorke br. 3 i 16

Na osnovu dijagrama zavisnosti $\ln \frac{c_0}{c_t} = f(t)$, može se grafički odrediti konstanta brzine ove hemijske reakcije kao reakcije prvog reda (linearna zavisnost $\ln \frac{c_0}{c_t}$) (Slika 36).



Slika 36. Dijagram zavisnosti $\ln c_0/c_t = f(t)$, za uzorke br. 3 i 16

Za reakcije prvog reda poluvrijeme reakcije određuje se na osnovu relacije:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad [5]$$

Prema srednjoj vrijednosti konstante brzine razlaganja THC ($k_{sr.} = 0,530 \text{ godina}^{-1}$), dobijene na osnovu analiza deset uzoraka tokom devet godina, poluvrijeme ove reakcije iznosi $t_{1/2} = 1,3$ godina. To znači da se sadržaj aktivne komponente smanji na polovinu početne vrijednosti za nešto više od godinu dana.

Na osnovu izraza za konstantu brzine reakcije prvog reda i podataka dobijenih analizama, mogu se izračunati forenzički vrijedni podaci, kao što je vrijeme za koje će koncentracija THC pasti ispod forenzički značajne vrijednosti (npr. ispod 0,2% ili čak do 0,00). Takođe, može se izračunati koncentracija koja se, na osnovu dinamike razlaganja, očekuje u uzorku nakon određenog vremena čuvanja:

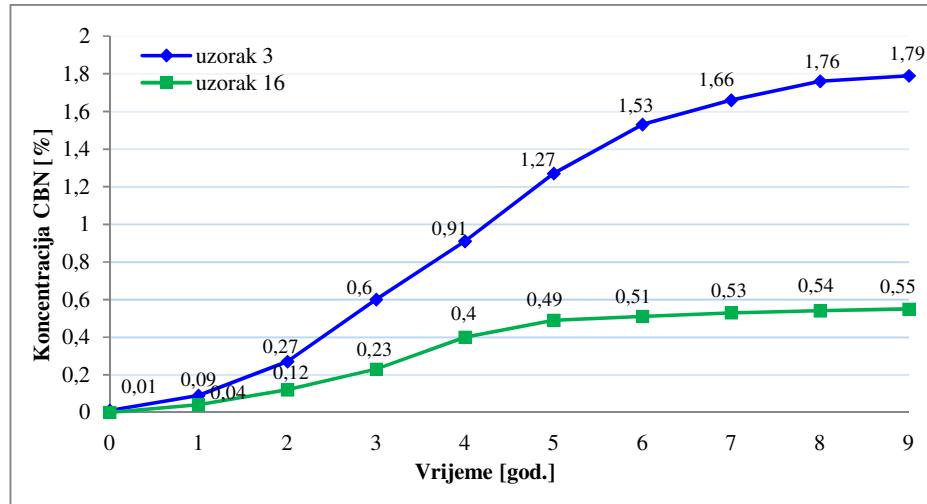
$$c_t = c_0 \cdot e^{-kt} \quad [6]$$

Npr. kod uzorka br. 16, sa početnom koncentracijom 2,22% THC, prema relaciji [6] za godinu dana ostalo bi još 1,31% THC, što približno odgovara eksperimentalno dobijenoj vrijednosti od 1,33% THC.

Analogno tome, u slučajevima kada je iz određenog razloga analiza biljnog materijala rađena nakon protoka određenog vremena (uzorak čuvan u depozitu), na osnovu dobijene koncentracije THC (c_t) i konstante brzine reakcije razlaganja THC, može se izračunati početna koncentracija THC (c_0), odnosno koncentracija u vrijeme kada je biljka ubrana, što može imati forenzički značaj.

Stopa degradacije THC viša je u prvoj godini nego u narednim godinama, pa se može konstatovati da je postotak gubitka sadržaja THC u funkciji njegove početne koncentracije. Razgradnja je brža, posebno u prvim godinama, kod uzorka sa većom početnom koncentracijom THC, dok je kod uzorka sa nižom početnom koncentracijom (npr. ispod 1%) razgradnja ravnomjernija. U korelaciji sa stopom opadanja koncentracije THC, koncentracija CBN raste po višoj stopi u prvim godinama nego kasnije, što se može vidjeti na dijagramu zavisnosti koncentracije CBN u funkciji vremena (Slika 37).

Iako je CBN glavni proizvod razgradnje THC, iz odnosa njihovih koncentracija dobijenih analizama jasno je da se sav razgrađeni THC ne konvertuje u CBN, što ukazuje na postojanje i drugih proizvoda razgradnje. Naime, javlja se izomerizacija Δ^9 -THC u Δ^8 -THC, koja je izraženija na povišenoj temperaturi, sa ravnotežom u korist termodinamički stabilnijeg izomera Δ^8 -THC [Hazekamp et al., 2010].



Slika 37. Dijagram zavisnosti $c_{CBN} = f(t)$, za uzorke br. 3 i 16

Turner i ElSohly [1979] su predložili mogući put razgradnje THC, koji uključuje formiranje složenih i nestabilnih racemskih smjesa epoksidnih i hidroksilovanih intermedijera, kao što su 9,10-dihidroksi- $\Delta 6a(10a)$ -THC, 10-etoxy-9-hydroxy- $\Delta 6a(10a)$ -THC i 8,9-dihidroksi- $\Delta 6a(10a)$ -THC. Oni su takođe zaključili da se ovi intermedijeri mogu detektovati samo gasnom hromatografijom kao njihovi trimetilsilil (TMS) derivati, te da su ta jedinjenja osjetljiva na toplotu, a kao najzastupljeniji konačni proizvod nastaje CBN. Stoga se u uzorku koji je uskladišten duže vrijeme može naći relativno velika količina CBN.

Prilikom obrade rezultata primjećene su određene varijacije između uzoraka, koje se odnose na procenat gubitka THC, a time i na konstante brzine reakcije, kao i na nastanak CBN. Tu treba imati u vidu da biljne uzorke karakteriše heterogenost po više osnova, pa tako sadržaj kanabinoida zavisi od više faktora, kao što su varijetet biljke, geografsko područje, klima i uslovi uzgoja, ženska ili muška biljka (ženske sadrže više THC), te činjenice da različiti dijelovi iste biljke imaju različit sadržaj kanabinoida (npr. cvjetni vrhovi i gornji listovi sadrže više THC). Kod zaplijenjenih uzoraka ti faktori nisu poznati, što na izvjesan način otežava obradu rezultata analiza. Izborom reprezentativnog dijela uzorka biljnog materijala u fazi uzorkovanja, kao i homogenizacijom uzorka u fazi pripreme za analizu, smanjuje se uticaj heterogenosti uzorka na rezultate.

Ipak, ovaj kinetički pristup, kako za retrogradnu procjenu koncentracije THC na osnovu naknadno izvršene analize, tako i za procjenu starosti kanabis uzorka, može se primjeniti samo u poznatim uslovima skladištenja uzorka. To znači da bi svaka laboratorija trebala odrediti kinetičku konstantu na vlastitim uzorcima, koji se čuvaju u određenim uslovima.

5.3. Neki aspekti pripreme i analize kanabis uzorka

U stručnoj literaturi mogu se naći brojne metode za pripremu i analizu kanabisa, primjenom različitih analitičkih tehnika. Svaka forenzička laboratorijska procjenjuje koje metode i tehnike će se primjenjivati u svakodnevnom rutinskom radu, a koje u određenim situacijama, zavisno od specifičnih zahtjeva. Na izbor metoda i tehnika utiče pojarni oblik i količina uzorka, zahtjevi definisani propisima, kapacitet laboratorije u pogledu tehničke opremljenosti, kao i frekvencija i broj uzoraka koji se dostavljaju na analizu.

Prema Zakonu o sprečavanju i suzbijanju zloupotrebe opojnih droga u Bosni i Hercegovini, biljka *Cannabis sativa L.*, njeni dijelovi, aktivni sastojci biljke izdvojeni u bilo kojem obliku (smole, ekstrakti i tinkture), kao i njen glavni psihoaktivni sastojak tetrahidrokanabinol svrstani su u Tabelu I: Zabranjene supstance i biljke [Sl. gl. BiH br. 08/06]. Stoga je forenzička analiza uzorka sumnjivih na kanabis preparate usmjerena na identifikaciju, u smislu utvrđivanja da li isti potiču od biljne vrste *Cannabis sativa L.*, a posebno na analizu prisustva psihoaktivnog sastojka Δ^9 -tetrahidrokanabinola. Istim Zakonom dozvoljen je uzgoj i promet biljke konoplje (*Cannabis sativa L.*) u industrijske svrhe, ukoliko sadržaj tetrahidrokanabinola u suhoj supstanci biljke ne prelazi 0,2%, uz dozvole nadležnih organa. Stoga, forenzička analiza u nekim slučajevima podrazumijeva i analizu sadržaja tetrahidrokanabinola.

Hemisna forenzička laboratorijska identifikacija ilegalnih droga bazira na hemijskim analizama, pa je mikroskopski pregled uzorka ispitivanih u ovom radu korišten samo u slučaju kada morfološke karakteristike biljnih dijelova nisu bile makroskopski vidljive. U sličnim situacijama, korišteni su i obojeni spot testovi, s obzirom na njihovu preliminarnu prirodu, samo kao skrining tehnika. Za pouzdanu identifikaciju uzorka sumnjivih na kanabis korištene su metode i tehnike hemijske analize, kao što su hromatografija na tankom sloju i gasna hromatografija.

Metode analiza koje se koriste za forenzička ispitivanja moraju biti pouzdane, kako bi se njihovom primjenom dobili tačni i nedvosmisleni rezultati, koji će biti prihvaćeni kao dokaz u sudskim postupcima [ILAC, 2002]. U tom smislu, prednost se daje upotrebi priznatih metoda objavljenih u relevantnoj stručnoj literaturi, koje su provjerene i potvrđena im je pouzdanost u konkretnim laboratorijskim uslovima. Mogu se primjenjivati i metode razvijene ili prilagođene u laboratoriji, uz proveden postupak validacije metode. Validacija metode podrazumijeva potvrđivanje, ispitivanjem i prikupljanjem objektivnih dokaza, da su zahtjevi za predviđenu specifičnu upotrebu zadovoljeni i mora biti toliko sveobuhvatna koliko je dovoljno da se

zadovolje potrebe za određenu primjenu [BAS EN ISO/IEC 17025:2006]. Prema tome, postupak validacije metode obuhvata provođenje eksperimenata i njihovo dokumentovanje sa ciljem prikupljanja objektivnih dokaza da metoda odgovara planiranoj upotrebi. To podrazumijeva eksperimentalno utvrđivanje odabralih parametara validacije i poređenje sa kriterijima utvrđenim za te parametre, pri čemu oprema i pribor moraju biti kalibrисани, a referentni materijali moraju biti sljedivi do nivoa certifikovanih referentnih materijala. Za uspješnu validaciju analitičke metode neophodno je na početku definisati zahtjevane performanse metode i sačiniti plan validacije, kojeg se treba pridržavati tokom postupka validacije. Validacija treba obuhvatiti cijeli proces od pripreme uzorka do analize, uključujući tumačenje rezultata [BAS EN ISO/IEC 17025:2006; UNODC, 2009c; Carlin and Dean, 2013; ILAC, 2013; BATA 2014, 2017].

U nastavku je pažnja posvećena faktorima koji mogu da utiču na rezultat analize, počev od uzorkovanja, preko pripreme uzorka do analize. Eksperimentalno su ispitane performanse primjenjenih metoda tankoslojne i gasne hromatografije, kao što su: specifičnost/selektivnost, granica detekcije, uticaj matriksa, ponovljivost, međupreciznost i otpornost (robustnost). Ispitan je i uticaj nekih faktora na rezultat kvantitativne analize, kao što su postupak ekstrakcije, tehnika injektiranja, primjena metode eksternog ili internog standarda i primjena indirektnog referentnog standarda.

5.3.1. Uzorkovanje kanabis biljke i njenih preparata

Biljke i biljne preparate karakteriše visoka heterogenost, kako u fizičkom tako i u hemijskom smislu (svaki dio biljke ima različit hemijski sastav), te je postupak uzorkovanja veoma važan za dobijanje pouzdanih rezultata analize [Sexton and Ziskind, 2013; ENFSI, 2014].

Za uzorkovanje sa plantaža može se primjeniti postupak uzorkovanja zasnovan na preporukama Evropske Unije za plantaže industrijske konoplje, koji je prilagođen praktičnim aspektima i raznovrsnosti ilegalnih kanabis preparata. Kada se vizuelno konstatiše da su biljke na plantaži iste vrste, može se uzeti, po slučajnom izboru, 30 cvjetnih vrhova (jedan vrh po biljci), odsjeći u dužini od oko 20 cm i spremiti u papirnu vrećicu. Potrebno je voditi računa da se uzorci uzimaju sa cijele površine plantaže, a ne samo sa rubova [UNODC, 2009a].

Prilikom uzorkovanja velike količine ilegalnog kanabisa, koji može biti u obliku ubranih stabljika biljnog materijala (Slika 38), suhih cvjetnih vrhova ili biljnog materijala pakovanog na drugi način, za potrebe laboratorijske analize obično se uzima po jedan uzorak na svakih 30 istovrsnih uzoraka. Ukoliko je broj uzoraka manji od 30 svi se dostavljaju u laboratoriju. Kada

je u pitanju veliki broj jedinki sa prepoznatljivim karakteristikama kanabisa, može se primjeniti i statistička metoda uzorkovanja zasnovana na Bajesovom modelu vjerovatnoće [UNODC, 2009a].



Slika 38. Ubrane biljke *Cannabis sativa L.*

Ukoliko se radi o većoj količini (npr. 5-10 kg) djelimično usitnjenoj biljnog materijala (forma marihuane), koji se sastoji od malih fragmenata cvjeta, lista i stabljike, za uzorkovanje se preporučuje metoda uzorkovanja poznata kao „*coning and quartering*“. Postupak podrazumijeva formiranje materijala u obliku hrpe, koja se potom spljošti u formu kruga ili kvadrata, pa se krug podijeli na četiri približno ista dijela. Dvije naspramne četvrtiny se uzmu i pomiješaju, a preostale dvije četvrtiny se odbace. Postupak se ponavlja dok se količina ne redukuje na potrebnu količinu uzorka, koji će se koristiti za analize [Sexton and Ziskind, 2013; ENFSI, 2014].

Uzorci kanabis smole mogu se uzeti u stanju u kojem su pronađeni (Slika 39). Ukoliko je smola u obliku komprimovanih ploča – blokova, potrebno je uzorke za ispitivanje uzeti sa različitih područja, kako bi oni bili reprezentativni za cijeli blok. To se postiže mjestimičnim otvaranjem bloka i uzimanjem uzorka. Budući da je poznato da na površini dolazi do oksidacije, uzorke treba uzeti iz svježe slomljene unutrašnje površine bloka [UNODC, 2009a].



(a)



(b)

Slika 39. Uzorci kanabis smole

Za kvantitativnu analizu veće količine kanabis smole može se primjeniti postupak uzorkovanja kao za praškaste materijale, tako što se sa više mjesta uzmu uzorci od oko 1 g, koji se potom pomješaju da se dobije reprezentativan primarni uzorak [ENFSI, 2014].

Da se izbjegne trulenje i biodegradabilnost biljnog materijala, koji u pravilu sadrži određenu količinu vlage, uzorke treba prosušiti na vazduhu i pakovati u papirnu ambalažu. Do dostavljanja u laboratoriju uzorke treba čuvati na tamnom i hladnom mjestu. U takvim uslovima skladištenja usporava se degradacija psihoaktivnog sastojka tretrahidrokanabinola, osjetljivog na kiseonik iz vazduha i UV svjetlo, koji ga oksidiraju do CBN [UNODC, 2009a].

5.3.2. Hromatografija na tankom sloju - kvalitativna i semikvantitativna analiza

Hromatografija na tankom sloju koristi se u forenzičkoj praksi za rutinske analize, zahvaljujući ekonomičnosti, relativno jednostavnom postupku izvođenja analize, mogućnosti istovremene analize većeg broja uzoraka na jednoj ploči (10 do 15 uzoraka srodne vrste), što doprinosi efikasnosti laboratorijskog rada.

Hemiska identifikacija kanabisa za forenzičke svrhe podrazumjeva identifikaciju kanabinoida u uzorku (kvalitativna analiza), a forenzička praksa se bazira na identifikaciju tri osnovna kanabinoida, gdje se pored ciljnog analita psihohaktivnog tetrahidrokanabinola (THC), kao prateći analiti identifikuju kanabidiol (CBD) i kanabinol (CBN), ukoliko su prisutni u uzorku.

Ako je za ispitivanje dovoljno kvalitativno dokazivanje prisustva kanabinoida (potvrda predpostavke zasnovane na mikroskopskom ili makroskopskom pregledu da je biljni materijal kanabis) homogenizacija biljnog materijala nije neophodna. Dovoljno je za ekstrakciju odabrati dijelove biljke sa višim nivoom kanabinoida (cvjetni vrhovi i gornji listovi).

Za ekstrakciju je odabran reprezentativan dio uzorka marihuane: biljni materijal koji se sastoji od osušenih i usitnjениh cvjetnih vrhova i listova, bez sjemenki i dijelova stabljike. Uzorci svježe biljke sušeni su na sobnoj temperaturi, a potom su cvjetni vrhovi i listovi usitnjeni za ekstrakciju.

Uzimajući u obzir uobičajene koncentracije osnovnih kanabinoida u kanabis preparatima, pogodnom količinom materijala za ekstrakciju može se smatrati oko 500 mg kanabis biljke, 100 mg kanabis smole i 50 mg kanabis ulja. Ekstrakcija se vrši na sobnoj temperaturi sa 10 ml organskog rastvarača mučkanjem na horizontalnom šejkeru ili u ultrazvučnom kupatilu 15 minuta, a može se primjeniti i pasivna ekstrakcija kada se smjesa uzorka i rastvarača ostavi da stoji oko 1 sat. Za kvalitativnu identifikaciju, mogu biti dovoljne i manje količine uzorka i rastvarača, prema procjeni analitičara, uz napomenu da svaku modifikaciju metode treba provjeriti i potvrditi. Budući da su kanabinoidi rastvorljivi u većini organskih rastvarača (metanol, petrol eter, n-heksan, toluen, hloroform) i kombinacijama rastvarača kao što su metanol : hloroform (9:1 ili 1:1), svi se mogu koristiti za ekstrakciju. Ipak treba uzeti u obzir da nepolarni rastvarači daju relativno čist ekstrakt neutralnih kanabinoida kvantitativno, dok polarni rastvarači i njihove kombinacije daju dobre kvantitativne ekstrakcije kanabinoidnih kiselina. Nakon ekstrakcije preporučuje se filtriranje, a može se koristiti i tečni supernatant bez prethodnog filtriranja [UNODC, 2009a].

Standardni rastvori kanabinoida pripremljeni su u koncentraciji 0,5 mg/ml odgovarajućeg kanabinoida u metanolu ili etanolu, a do upotrebe su čuvani na hladnom i tamnom mjestu.

Prilikom validacije metode kvalitativne analize, potrebno je ispitati sljedeće performanse metode: specifičnost/selektivnost, granicu detekcije, uticaj matriksa, ponovljivost, međupreciznost i otpornost (robustnost) [UNODC, 2009c; Trullols et al., 2004].

Ispitivanje performansi metode sprovedeno je analizom uzoraka kanabis biljke zajedno sa referentnim standardima osnovnih kanabinoida, prema sljedećim koracima:

- Na TLC-ploču dimenzija 20 x 10 cm pomoću mikrokapilara nanesu se rastvori referentnih standarda i ekstrakti uzoraka na prethodno obilježene startne tačke sa međusobnim razmakom 1,5 cm, na udaljenosti 1 cm od donjeg ruba ploče. Prije korištenja mikrokapilare se isperu čistim rastvaračem (ista vrsta rastvarača kao za rastvaranje i ekstrakciju). Za svako nanošenje koristi se čista mikrokapilara, posušena na filter papiru, a nakon upotrebe mikrokapilare se odlažu u drugu čašu sa istom vrstom rastvarača, radi ispiranja. Na prvu startnu tačku nanese se slijepa proba (čist rastvarač), potom pojedinačni rastvori standarda THC, CBN i CBD poznate koncentracije, pa rastvor smjese standarda i ekstrakti uzoraka. Po 10 µl rastvora standarda i ekstrakata uzoraka nanosi se postepeno na prethodno obilježene startne tačke, tako da prečnik startne mrlje ne prelazi 3-4 mm. Na kraju se obilježi linija fronta za razvijanje, preporučeno 1 cm od gornjeg ruba ploče (dužina fronta 8 cm za ploču visine 10 cm).
- Nakon nanošenja rastvora standarda i ekstrakata uzoraka, formirane startne mrlje se suše na sobnoj temperaturi, a za to vrijeme se pripremi odgovarajuća mobilna faza (sistem razvijača). Mobilna faza se sipa u staklenu komoru, predviđenu za razvijanje ploče (nivo tečnosti do 1 cm) i ostavi poklopljeno 10 do 15 minuta, da se postigne zasićenje para razvijača.
- Ploča se stavlja u komoru, tako da je donji kraj potopljen u mobilnu fazu, radi razvijanja uzlaznom tehnikom. Razvijanje je završeno kada mobilna faza dostigne obilježenu liniju fronta.
- Prije vizuelizacije ploče treba osušiti, što se može obaviti u digestoru na sobnoj temperaturi ili kratko pomoću toplog vazduha (fenom), a može se koristiti i sušnica. Ploče se prvo posmatraju pod UV-svetlom (254 nm), a uočene mrlje se označe grafitnom olovkom, nakon čega slijedi hemijska vizuelizacija rastvorom *Fast Blue B Salt*, u formi sprej-reagensa.

Reagens *Fast Blue B Salt* treba biti svježe pripremljen. Preporučuje se dnevna priprema reagensa na jedan od sljedećih načina:

- reagens 1: 50 mg u 20 ml NaOH (0,1N),
- reagens 2: 50 mg u 1 ml vode i dodati 20 ml metanola.

Za pravilno razvijanje boja važno je da TLC ploče budu alkalne, što se može postići upotrebom reagenasa 1 ili alternativno, nanošenjem dietilamina u spreju, prije prskanja ploče sprej-reagensom *Fast Blue B Salt*. Sličan efekat se može postići prskanjem rastvorom *Fast Blue B Salt* u vodi, pa potom rastvorom 0,1 M NaOH [UNODC, 2009a; Hazekamp et al. 2010].

Ako je potrebno da boje budu postojane duže vrijeme to se može postići slijedećim redoslijedom prskanja: Dietilamin – *Fast Blue B Salt* rastvor (reagens 2) – Dietilamin. U čistoj plastičnoj vrećici ploče se mogu čuvati duže vrijeme, bez tamnjenja. Kao alternativa, razvijene i vizuelizovane ploče (TLC – hromatogrami) mogu se skenirati ili fotografisati radi obezbjeđenja trajnog zapisa rezultata analize [Moffat, 1986; UNODC, 2009a].

5.3.2.1. Procjena selektivnosti i specifičnosti metode hromatografije na tankom sloju

Metoda je selektivna ako su osnovni kanabinoidi dobro hromatografski razdvojeni međusobno, ali i od ostalih jedinjenja koja čine matriks kanabisa, a mogu se analizirati istom metodom. Isto tako, potrebno je dobro razdvajanje od supstanci koje se koriste za pripremu uzorka (rastvarači i komponente razvijača). Selektivnost kod metode tankoslojne hromatografije ogleda se u tome da svaki osnovni kanabinoid u matriksu ima svoju mrlju, karakterističnu po boji i Rf-vrijednosti, te da su im mrlje međusobno razdvojene za minimum 0,1 cm.

Metoda je specifična ukoliko se mrlje osnovnih kanabinoida iz uzorka biljke slažu po boji i Rf-vrijednostima sa mrljama referentnih standarda, pri čemu odstupanje u Rf-vrijednostima ne smije biti veće od 0,2.

Selektivnost i specifičnost metode testirane su pomoću rastvora referentnih standarda THC, CBN i CBD.

Za određivanje Rf-vrijednosti pripremljeni su i analizirani rastvori referentnih standarda tri osnovna kanabinoida u etanolu, koncentracije 1 mg/ml, kao i smjesa standarda.

Nakon razvijanja TLC-ploče izvršena je vizuelizacija hromatograma, a potom mjerjenje pređenog puta svakog kanabinoida (d) i određivanje međusobnog rastojanja mrlja:

$$d_{THC} - d_{CBN} = 5,5 \text{ cm} - 5,0 \text{ cm} = 0,5 \text{ cm} > 0,1$$

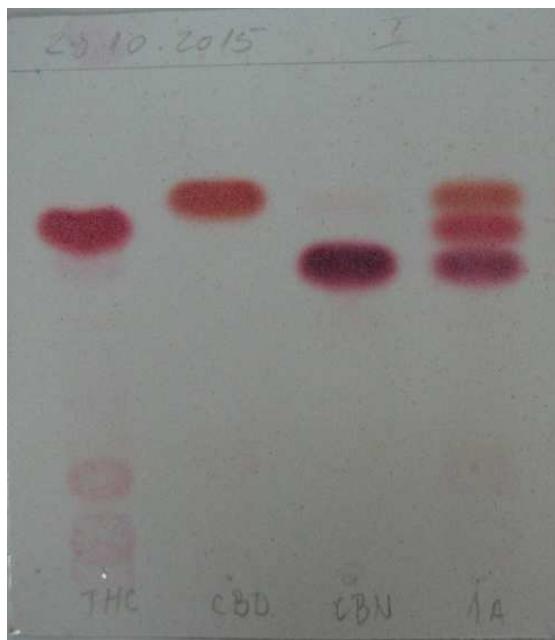
$$d_{CBD} - d_{THC} = 6,0 \text{ cm} - 5,5 \text{ cm} = 0,5 \text{ cm} > 0,1$$

Izračunavanje Rf-vrijednosti izvršeno je prema formuli 2, a iste su u formi Rf x 100, pojedinačno i u smjesi, prikazane u tabeli 13.

Tabela 13. Rf - vrijednosti osnovnih kanabinoida

Ref. standardi	Rf x 100		
	THC	CBD	CBN
St. _(CBD)	-	75,0	-
St. _(THC)	68,7	-	-
St. _(CBN)	-	-	62,5
Smjesa st.	68,7	75,0	62,5

Na slici 40 jasno se uočavaju mrlje različitih boja, karakterističnih za svaki kanabinoid: THC – ružičasta, CBD – oranž-smeđa, CBN – ljubičasta, međusobno razdvojene za ne manje od 0,1 cm, te se može zaključiti da metoda obezbeđuje dobro hromatografsko razdvajanje tri osnovna kanabinoida, što znači da je metoda selektivna.



Slika 40. TLC hromatogram ref. standarda osnovnih kanabinoida

Upoređivanjem boja i Rf-vrijednosti mrlja kanabinoida u smjesi standardnih rastvora, sa bojama i Rf-vrijednostima odgovarajućih kanabinoida u rastvorima pojedinačnih standarda

utvrđeno je podudaranje, pri čemu odstupanje Rf-vrijenosti nije veće od 0,2, čime je dokazana specifičnost ispitivane analitičke metode.

5.3.2.2. Određivanje granice detekcije THC metodom tankoslojne hromatografije

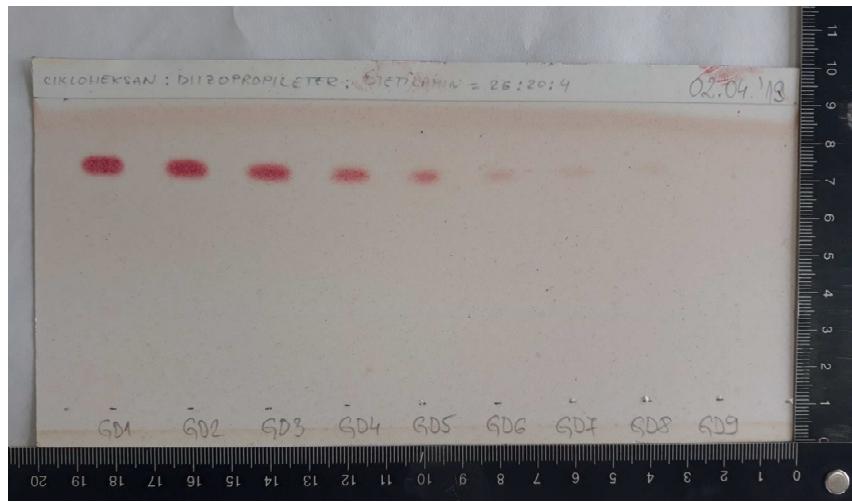
Granica detekcije definiše se kao najniža koncentracija analita koja može biti detektovana određenom metodom u datom matriksu [Trullols et al., 2004]. Granica detekcije određena je za ciljni analit – psihoaktivni tetrahidrokanabinol, korištenjem rastvora THC standarda različitih koncentracija. Potrebno je odrediti da li metoda omogućava identifikaciju THC u uzorcima kanabisa sa niskom koncentracijom THC (ispod 0,2%).

Rastvori različitih koncentracija pripremljeni su razblaženjem standardnog rastvora THC conc. 1 mg/ml (tabela 14). Na startne tačke naneseno je po 10 µl rastvora koji su analizirani tankoslojnom hromatografijom. Nakon vizuelizacije razvijenog hromatograma rastvora referentnog standarda različitih koncentracija, THC je identifikovan na osnovu karakteristične boje mrlje odgovarajuće Rf-vrijednosti.

Tabela 14. Referentni standard THC različitih koncentracija

Oznaka	V(10 µl), konc. THC [mg/ml]	Nanесена маса THC [µg]	Rf
GD1	1	10,00	0,77
GD2	0,5	5,00	0,76
GD3	0,2	2,00	0,76
GD4	0,067	0,67	0,75
GD5	0,04	0,40	0,74
GD6	0,008	0,08	0,75
GD7	0,004	0,04	0,76
GD8	0,0027	0,027	0,77
GD9	0,0016	0,016	-

Granica detekcije određena je kao najniža nanesena masa THC za koju je jasno vidljiva mrlja (0,08 µg), dok se kod rastvora sa manje THC mrlja ne uočava jasno (Slika 41).



Slika 41. TLC hromatogram razvijenih standarda THC različitih koncentracija

5.3.2.3. Ispitivanje uticaja matriksa na identifikaciju kanabinoida metodom tankoslojne hromatografije

Metoda mora omogućiti identifikaciju THC u prisustvu svih jedinjenja koji se nalaze u biljci (matriks), a mogu se detektovati ovom tehnikom. Drugim riječima, ni jedno jedinjenje prisutno u biljci ne smije ometati identifikaciju THC.

Kanabis biljka sadrži preko 500 različitih jedinjenja, od kojih je preko 100 kanabinoida, tako da je gotovo nemoguće nabaviti referentne standarde i eksperimentalno odrediti Rf svih jedinjenja koja se mogu nalaziti u biljci. Međutim, tokom dugogodišnje primjene tehnike tankoslojne hromatografije za analizu kanabis uzorka, nije zabilježen slučaj da se Rf-vrijednost nekog od osnovnih kanabinoida (THC, CBD i CBN) poklopila sa Rf-vrijednosti neke druge komponente iz kanabis biljke. Ipak, u cilju potvrde da matriks biljke nema uticaj na identifikaciju ciljnih analita, tokom postupka validacije metode izvršena je analiza uzorka biljke *Cannabis sativa* L., prethodno analiziranih primjenom druge analitičke tehnike (GC/MS) kojom je potvrđeno prisustvo THC, CBD i CBN u uzorcima.

Odvagano je po 250 mg usitnjениh biljnih uzoraka koji su ekstrahovani sa po 5 ml hloroformu u trajanju 30 minuta na horizontalnom šejkeru. Nakon ekstrakcije izvršeno je filtriranje, a potom uparavanje filtrata radi dekarboksilacije kanabinoidnih kiselina, te su upareni ostaci rastvorenih hloroformom i ekstrakti podešeni na koncentraciju 50 mg/ml i analizirani.

Vizuelizacijom razvijenog TLC-hromatograma biljnih ekstrakata konstatovano je prisustvo mrlja u bojama karakterističnim za tri osnovna kanabinoida, na odgovarajućim Rf-

vrijednostima, čime je dokazano da matriks uzorka nema uticaj na selektivnost i specifičnost metode.

5.3.2.4. Ponovljivost, međupreciznost i otpornost metode tankoslojne hromatografije

Ponovljivost je provjerena nizom analiza standarda različitih koncentracija i uzorka, koje su izvedene kako pod istim uslovima, tako i pod različitim uslovima (npr. dnevna temperatura i vlažnost u laboratoriji). Međupreciznost je provjerena tako što iste rastvore na istu ploču nanesu dva analitičara.

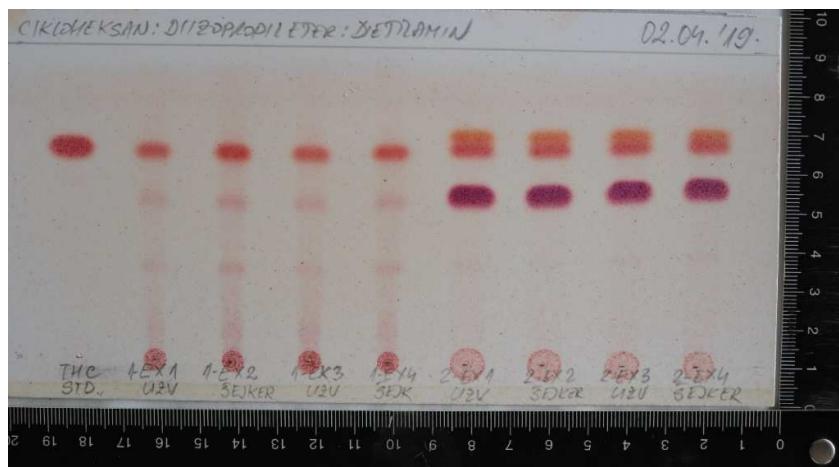
Ponovljivost i međupreciznost su potvrđene time što u nizu izvedenih analiza postoji visok kvalitet slaganja mrlja odgovarajućih kanabinoida po boji Rf-vrijednosti, pri istim uslovima, odnosno na istoj TLC-ploči.

Provjerom otpornosti (robustnosti) utvrđuje se koliko je metoda otporna na neke promjene koje se mogu očekivati u rutinskom laboratorijskom radu. U tom smislu provjeren je uticaj rastvarača koji se koristi za ekstrakciju kanabis uzorka, uticaj načina ekstrakcije i stabilnost ekstrakta uzorka čuvanog u različitim uslovima određeno vrijeme.

Ispitivanje uticaja rastvarača provjero je tako što su uzorci biljnog materijala ekstrahovani sa četiri različita rastvarača: hloroform, toluen, etanol i petroleter, te analizirani po prethodno opisanom postupku. Utvrđeno je da tri osnovna kanabinoida imaju mrlje karakterističnih boja i odgovarajućih Rf-vrijednosti u sva četiri rastvarača, pa se može zaključiti da se bilo koji od ispitanih rastvarača može koristiti za ekstrakciju. Na isti način mogu se ispitati i drugi rastvarači ili kombinacije rastvarača, pogodni za ekstrakciju kanabisa (npr. n-heksan, metanol:hloroform (9:1) i dr.).

Provjera uticaja načina ekstrakcije na rezultat analize izvršena je tako što su biljni uzorci ekstrahovani 30 minuta na horizontalnom šejkeru ili 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Nakon analize ekstrakata utvrđeno je da su vidljive karakteristične mrlje odgovarajućih Rf-vrijednosti za sva tri kanabinoida, te se može konstatovati da se mogu primjenjivati oba načina ekstrakcije.

Stabilnost ekstrakta biljnog uzorka provjero je tako što su ekstrakti analizirani odmah nakon ekstrakcije, a potom su podijeljeni na dva dijela, od kojih je dio čuvan na sobnoj temperaturi, a dio u frižideru na +4°C. Nakon 24 h izvršena je analiza, pri čemu su u biljnim ekstraktima identifikovani osnovni kanabinoidi na osnovu mrlja karakterističnih boja i odgovarajućih Rf-vrijednosti (Slika 42). Na osnovu toga se može zaključiti da su biljni ekstrakti stabilni 24 h, bilo da se čuvaju u frižideru ili na sobnoj temperaturi.



Slika 42. TLC hromatogram razvijenih biljnih ekstrakata

Slično se može ispitati stabilnost ekstrakata i u dužem periodu, npr. do tri dana [Matić i sar., 2017], ukoliko je to potrebno, ali se period od 24 h smatra dovoljnim. Naime, ukoliko se svi ekstrakti pripremljenih uzoraka ne stignu analizirati istog dana, analiza preostalih ekstrakata analiziraće se sljedeći dan.

Prema izvršenim ispitivanjima parametara za praćenje otpornosti metode, analitičar može odabratи način pripreme uzorka, u smislu izbora rastvarača, načina ekstrakcije i čuvanja ekstrakata. Kada se procijeni da je potrebno, mogu se ispitati i drugi parametri koji mogu imati uticaj na otpornost metode.

5.3.2.5. Semikvantitativno određivanje THC metodom tankoslojne hromatografije

Metoda semikvantitativne tankoslojne hromatografske analize kanabisa za forenzičke svrhe namijenjena je semikvantitativnom određivanju glavnog psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola (THC), pri čemu se istovremeno može kvalitativno dokazati prisustvo kanabidiola (CBD) i knabinola (CBN). S obzirom da je, prema propisima, za industrijske svrhe dozvoljen uzgoj i promet biljke čiji sadržaj tetrahidrokanabinola u suhoj supstanci biljke ne prelazi 0,2%, metodom semikvantitativne analize određuje se da li je sadržaj THC u uzorku manji ili veći od te vrijednosti.

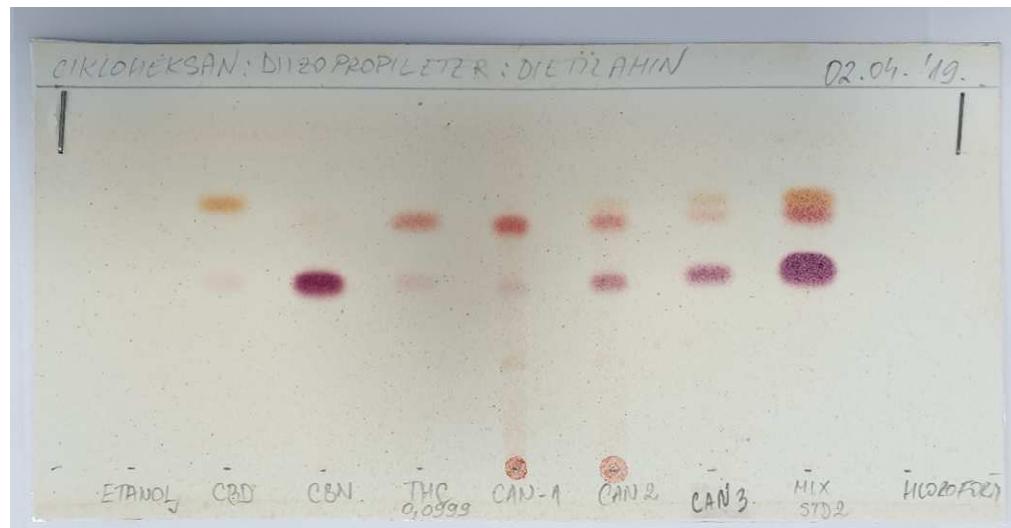
Kriterijumi za potvrđivanje rezultata prilikom analize kanabis uzoraka (biljka, smola ili ulje) semikvantitativnom metodom tankoslojne hromatografije:

- da se Rf-vrijednost i boja mrlje THC u ekstraktu uzorka slaže sa referentnim standardom THC (razlika Rf ne veća od 0,2);
- da rastojanje između mrlje THC i mrlja CBD i CBN nije manje 0,1 cm;
- da je mrlja THC u ekstraktu uzorka po intenzitetu boje ista ili intenzivnija od mrlje standarda, za sadržaj THC jednak ili veći od 0,2%.

Radi provjere navedenih kriterijuma izvršena je analiza tri uzorka biljnog materijala metodom tankoslojne hromatografije, a rezultati su upoređeni sa gasnohromatografskom analizom istih uzoraka.

Odvagano je po 100 mg tri uzorka osušenog i usitnjенog biljnog materijala, te su nakon ekstrakcije i uparavanja rastvaranjem sa po 2 ml hloroforma podešeni na masenu koncentraciju biljne materije 50 mg/ml, odnosno 50 µg/µl. Na ploču je naneseno po 10 µl biljnih ekstrakata, što odgovara masi 500 µg uzorka i 10 µl standarda THC koncentracije 0,1 mg/ml, odnosno 1 µg THC. Na osnovu toga, maseni udio THC u uzorcima za mrlje istog intenziteta kao u standardu, dat je izrazom:

$$\omega = \left(\frac{1 \mu g}{500 \mu g} \right) \cdot 100 = 0,2\% \quad [7]$$



Slika 43. TLC ploča razvijenih standarda kanabinoida i biljnih uzoraka

Prema slici 43, kada je mrlja THC u uzorku istog ili većeg intenziteta boje u odnosu na mrlju standarda THC konc. 0,1 mg/ml, udio THC u uzorku je jednak ili veći 0,2% (uzorci CAN-1 i CAN-2). Izostanak mrlje ili pojava mrlje manjeg intenziteta boje od mrlje standarda upućuje na to da je procenat THC u uzorku manji od 0,2% (uzorak CAN-3).

Isti biljni ekstrakti su analizirani metodom gasne hromatografije (GC/FID) i utvrđen je sadržaj THC:

- uzorak CAN-1 sadrži 1,08% THC,
- uzorak CAN-2 sadrži 0,62% THC i
- uzorak CAN-3 sadrži 0,12% THC.

Poređenjem ovih rezultata sa rezultatima tanskoslojne hromatografije može se zaključiti da semikvantitativna metoda tanskoslojne hromatografije zadovoljava potrebne kriterijume, pri čemu treba naglasiti da se semikvantitativnom metodom ne određuje tačan procenat THC u uzorcima, već se samo određuje da li je udio THC manji ili veći od 0,2%, što je granica za dozvoljeni uzgoj, u skladu sa propisima.

5.3.3. Metode gasno-hromatografske analize kanabisa

Gasna hromatografija je tehnika izbora za analizu kanabis preparata, a pogodna je kako za analizu različitih uzoraka tako i za analizu tragova (npr. tragovi na priboru). Za analizu kanabis preparata najčešće se koriste tehnike gasne hromatografije sa plameno jonizacionim detektorom (GC/FID) i gasne hromatografije sa masenim spektrometrom kao detektorom (GC/MS).

5.3.3.1. Gasna hromatografija sa plameno-jonizacionim detektorom (GC/FID)

Kod gasne hromatografije identifikacija se vrši na osnovu retencionog vremena (R_t) određene komponente uzorka u komparaciji sa R_t referentnog standarda odgovarajuće komponente. Radni uslovi instrumenta trebaju biti podešeni tako da svaki kanabinoid ima specifično R_t , a za selektivnost je važno dobro razdvajanje pikova, kako osnovnih kanabinoida, tako i drugih komponenti prisutnih u matriksu uzorka. Iako se u literaturi može naći mnogo metoda preporučenih za analizu kanabis preparata, optimalni radni uslovi definišu se nizom eksperimenata, sa ciljem dobijanja kvalitetnih, međusobno dobro razdvojenih pikova u razumnom vremenu analize. Za smjese jedinjenja sa sličnim retencionim osobinama može se primjeniti izotermna metoda (tabela 15), kojom se izbjegava postupak hlađenja hromatografske peći sa maksimalne do početne temperature, nakon analize svakog uzorka, što ima uticaj na trajanje analize. To posebno dolazi do izražaja prilikom analize serije istovrsnih uzoraka.

Tabela 15. Radni uslovi gasnog hromatografa

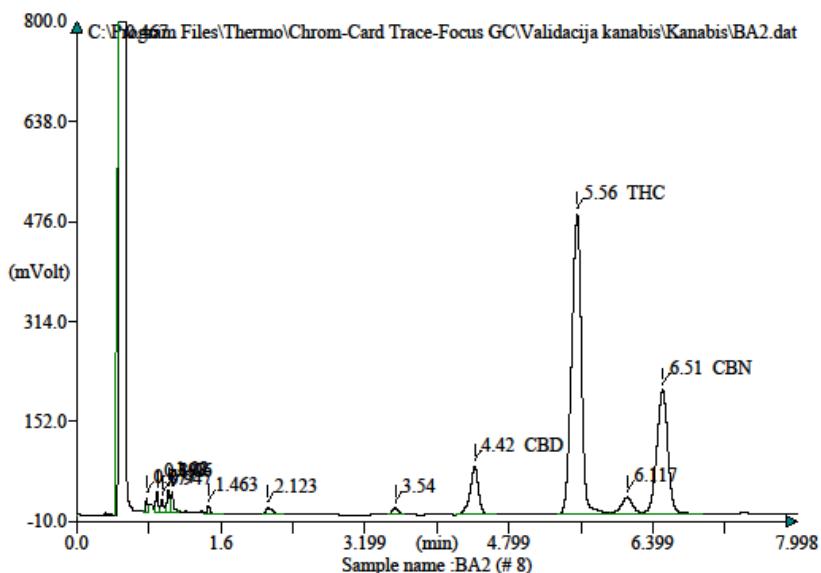
Kolona	Kapilarna, stacionarna faza: 5% difenil, 95% dimetilpolisilosan), dimenzija: 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm
Injektor	Split/Splitless, temp. 280°C
Injekcioni volumen	1 µl (injektiranje ručno ili autosemplerom)
Split ratio	20:1
Temperatura peći	260°C izotermno, 8 min.
Gas nosač	azot (N ₂) čistoće 99.9999%, konstantnog protoka 2 ml/min,
Detektor	FID (plameno-jonizacioni detektor), temp. 300°C, Protok gasova: H ₂ 35 ml/min i vazduh 350 ml/min.

Određivanje specifičnih retencionih vremena (R_t) za tri osnovna kanabinoida (THC, CBD i CBN) izvršeno je analizom rastvora referentnih standarda svakog kanabinoida, prema radnim uslovima instrumenta navedenim u tabeli 15. Uticaj rastvarača na selektivnost i specifičnost metode GC/FID, kao važnih parametara validacije, testiran je sa hloroformom, etanolom i toluenom. Analiza biljnog materijala ekstrahovanog sa ova tri rastvarača izvršena je pod istim radnim uslovima instrumenta, a R_t kanabinoida u ekstraktima uzoraka u komparaciji sa R_t kanabinoida u rastvorima standarda prikazana su u tabeli 16.

Tabela 16. Rt kanabinoida u rastvorima standarda i ekstraktima uzorka

Kanabinoid	Rt standarda	Smjesa stanadarda	Rt kanabinoida u ekstraktima uzorka biljke <i>Cannabis sativa L.</i>		
			Hloroform	Toluen	Etanol
CBD	4,46	4,45	4,41	4,42	4,42
THC	5,57	5,56	5,56	5,56	5,57
CBN	6,54	6,54	6,49	6,51	6,50

Na osnovu retencionih vremena CBD, THC i CBN u rastvorima standarda i ekstraktima uzorka može se zaključiti da su Rt u prihvatljivim granicama ($\pm 0,05$). Na hromatogramu biljnog ekstrakta (Slika 44) može se vidjeti redoslijed eluacije CBD, THC i CBN, pri stacionarnoj fazi kolone, navedenoj u tabeli 15.



Slika 44. Hromatogram ekstrakta kanabis biljke

Na hromatogramu se takođe vidi se da su osnovni kanabinoidi dobro hromatografski razdvojeni, što znači da je metoda selektivna. Pikovi su oštiri, bez tejlinga i dvostrukih vrhova, što ukazuje da nema uticaja matriksa na rezultat kvalitativne analize. Za ekstrakciju biljnih uzoraka može se upotrebiti bilo koji od ispitanih rastvarača, a na sličan način se mogu ispitati i drugi rastvarači ili njihove kombinacije.

Donja granica detekcije je najmanja koncentracija analita koja se određenom metodom može detektovati. Procjena može biti vizuelna, na osnovu odnosa signal/šum (S/N) i predstavlja najmanji signal koji se vizuelno može prepoznati. U forenzičkoj praksi određuje se donja

granica detekcije za psihoaktivni sastojak THC, pri čemu je prihvatljiva donja granica detekcije koncentracija od 0,01 mg/ml, iako mogu biti detektovane i niže vrijednosti. Pik treba biti vidljiv, pri čemu ga instrument detektuje na odgovarajućem retencionom vremenu.

Za određivanje donje granice detekcije, još jednog značajnog parametra validacije, pripremljeni su rastvori referentnog standarda THC različitih koncentracija. Analize su ponovljene u tri dana od strane tri analitičara, čime je dokazana ponovljivost i međupreciznost. Rezultati analiza su prikazani u tabeli 17.

Tabela 17. Rastvori referentnog standarda THC različitih koncentracija

Konc. THC [mg/ml]	Rt THC u rastvorima standarda različitih koncentracija		
	I dan 1.analitičar	II dan 2.analitičar	III dan 3.analitičar
1,000	5,54	5,56	5,55
0,500	5,54	5,55	5,54
0,250	5,54	5,55	5,53
0,125	5,54	5,54	5,53
0,062	5,54	5,54	5,53
0,031	5,54	5,53	5,53
0,016	5,54	5,55	5,55
0,008	5,53	5,55	5,52
0,004	-	-	-
0,002	-	-	-
0,001	-	-	-

Kod svih detektovanih pikova Rt je u granicama prihvatljivosti ($\pm 0,05$). Utvrđena je donja granica detekcije pri koncentraciji 0,008 mg/ml, pri kojoj je pik vidljiv i instrument ga detektuje kao THC, što je preciznije od potrebnog uslova prihvatljive granice detekcije od 0,01 mg/ml. Rastvori su analizirani tokom tri dana čime je utvrđena i stabilnost rastvora THC tokom tog perioda.

Gornja granica detekcije je najveća koncentracija pri kojoj se pik na hromatogramu identificuje kao pik THC. Određivanje gornje granice detekcije u ovom slučaju nije od značaja, jer biljka ne sadrži tako visoke koncentracije THC, dok se koncentrovani preparati (npr. kanabis ulje) mogu razblažiti do koncentracije koja će dati pik prepoznatljive veličine. Zbog toga nije neophodno ispitivati gornju granicu detekcije prilikom kreiranja metode za analizu kanabisa.

Gasnohromatografska identifikacija po retencionom vremenu nije potpuno pouzdana, kada se uzme u obzir postojanje nekoliko desetina hiljada organskih jedinjenja, jer praktično može doći do poklapanja retencionog vremena dva ili više jedinjenja srođne strukture [McNair and Miller,

2009]. Ta mogućnost je posebno izražena prilikom analize složenih smjesa, kao što je kanabis biljka koja sadrži više od 500 jedinjenja. Stoga je, kada se koristi tehnika gasne hromatografije sa FID ili nekim drugim univerzalnim detektorom, neophodno primjeniti još neku analitičku tehniku. Kod biljnog materijala to može biti makroskopski i mikroskopski pregled fizičkih karakteristika, ukoliko su one vidljive (poglavlja 2.1. i 3.2.2.). Kada te karakteristike nisu uočljive, kao u slučaju veoma usitnjene biljnog materijala ili preparata kanabis smole i ulja, primjenjuju se hemijske tehnike, kao što je tankoslojna hromatografija, kojom se vrši dvostruka identifikacija – prema R_f vrijednosti i prema karakterističnim bojama osnovnih kanabinoida sa reagensom za vizuelizaciju (poglavlje 5.3.2.).

Međutim, kada se raspolaže sa malom količinom uzorka, nedovoljnom za primjenu više različitih tehnika, a imajući u vidu da retenciono vrijeme kao parametar gasne hromatografije ne može pouzdano potvrditi identitet pikta, tada je tehnika izbora gasna hromatografija sa masenim spektrometrijskim detektorom, poznata kao gasno-masena hromatografija (GC/MS).

5.3.3.2. Gasna hromatografija sa masenim spektrometrijskim detektorom (GC/MS)

Ova kombinovana tehnika je široko rasprostranjena za analizu organskih jedinjenja u složenim smjesama, jer pored hromatografske identifikacije po retencionom vremenu, omogućuje identifikaciju pojedinih komponenti na osnovu masenih spektara jedinjenja, što doprinosi pouzdanosti identifikacije. Dakle, kod gasno-masene hromatografije, specifično je retenciono vrijeme ciljnih analita u hromatogramu, kao i prisustvo karakterističnih pikova (*m/z*) u masenim spektrima, dok za selektivnost metoda mora omogućiti dobro hromatografsko razdvajanje.

Selektivnost kao parametar validacije GC/MS metode ispitana je poređenjem retencionih vremena (R_t) osnovnih kanabionoida određenih pojedinačno i R_t vrijednosti kanabionoida u smjesi. Za određivanje retencionih vremena (R_t) pripremljeni su rastvori referentnih standarda tri osnovna kanabinoida u metanolu, koncentracije 0,5 mg/ml i analizirani su pojedinačno, a potom je analizirana smjesa tri standarda. Radni uslovi instrumenta podešeni su tako da se obezbijedi zadovoljavajuća detekcija i prihvatljivo razdvajanje tri osnovna kanabinoida u hromatogramu (tabela 18).

Tabela 18. Radni uslovi instrumenta

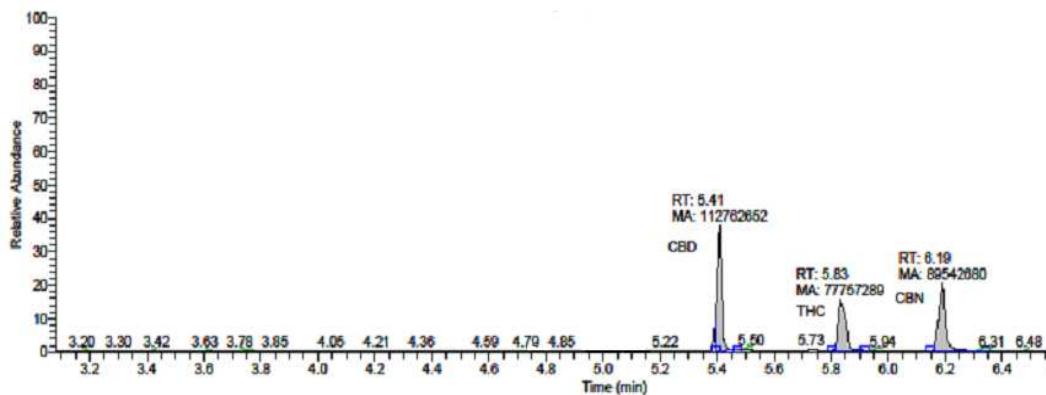
Injecto r	Temperatura 260°C Injekcioni volumen: 1 µl (<i>autosampler</i>) <i>Split ratio</i> 25:1
Gas nosač	He (5.0), 2 ml/min,
Kolona	TR-5MS: 30 m × 0,32 mm × 0,25 µm, 5% <i>Phenyl Polysilphenylene Siloxane</i>
Program hromatografske peći	Početna temperatura: 170°C – 1 min. Rata: 20°C/min. do 260°C Konačna temperatura: 260°C – 3 min. Ukupno vrijeme analize: 8,5 min.
Detektor (MS)	<i>Transfer line</i> : 270°C, <i>Solvent delay</i> : 2 min.

Rezultati analiza prikazani su u Tabeli 19, gdje se vidi da svaki kanabinoid ima svoje specifično retenciono vrijeme, a stepen slaganja Rt pojedinog kanabinoida u smjesi standarda sa Rt odgovarajućeg standarda kanabinoida zadovoljava kriterijum ±0,05 minuta.

Tabela 19. Rt kanabinoida u rastvorima referentnih standarda pojedinačno i u smjesi

Rastvor standarda	Rt		
	CBD	THC	CBN
THC-st.	-	5,84	-
CBD-st.	5,41	-	-
CBN-st.	-	-	6,19
Smjesa standarda	5,41	5,83	6,19

Na osnovu retencionih vremena može se zaključiti da metoda obezbjeđuje dobro hromatografsko razdvajanje osnovnih kanabinoida (Slika 45), što znači da je metoda selektivna.



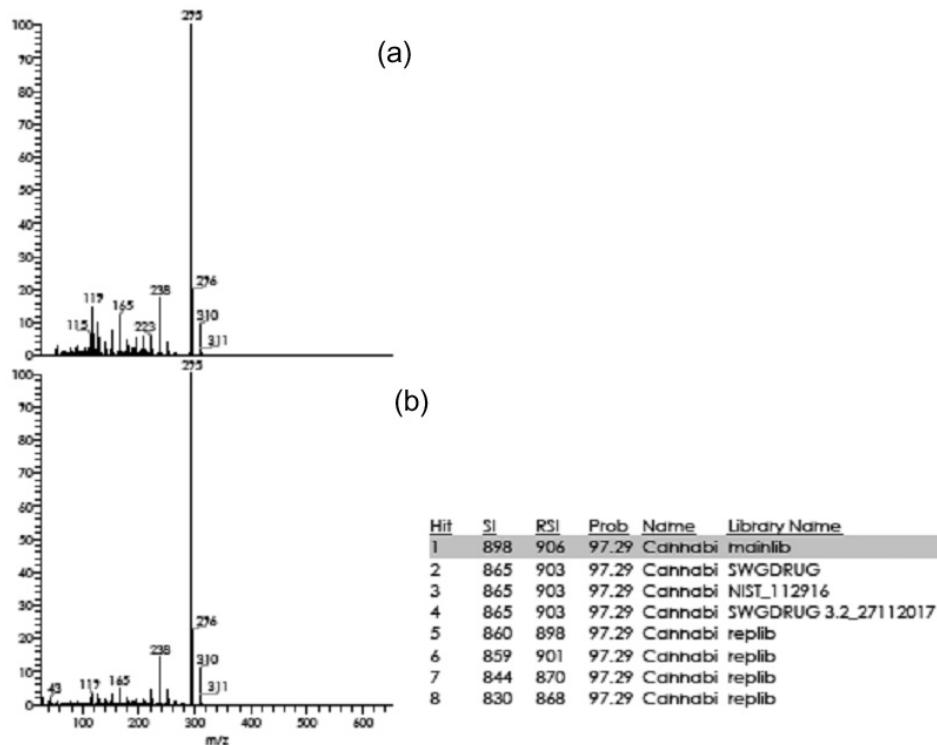
Slika 45. Hromatogram smjese referentnih standarda osnovnih kanabinoida (CBD, THC i CBN)

Maseni spektri osnovnih kanabinoida evaluirani su pomoću biblioteke spektara kojom raspolaže softver instrumenta (SWGDRUG, NIST) i poređenjem sa spektrima u literaturi. Karakteristični pikovi (m/z) masenih spektara osnovnih kanabinoida, prema komercijalnim bibliotekama (NIST, Willey) i stručnoj literaturi prikazani su u tabeli 20 [Moffat et al., 1986; SWGDRUG, 2005].

Tabela 20. Karakteristični pikovi (m/z) osnovnih kanabinoida u masenom spektru

Kanabinoidi	CAS	m/z
Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC)	1972-08-3	299, 231, 314, 271, 243, 258
kanabidiol (CBD)	13956-29-1	231, 246, 174, 193, 314
kanabinol (CBN)	521-35-7	295, 238, 310, 119, 251

Sličnost spektara vrednuje se indeksom kvaliteta (*match quality*), a identifikacija se bazira na podacima punog spektra (*SCAN*). Ako maseni spektar jedinjenja odgovara spektru iz biblioteke sa indeksom kvaliteta ≥ 90 zahtjev je zadovoljen. Ako je indeks kvaliteta $\geq 80 < 90$ dozvoljeno je primjeniti softverske alate radi poboljšanja spektra. Za definitivnu identifikaciju ciljnog analita treba biti prisutan i molekularni jon-pik u spektru. Identifikacija jedinjenja prema masenom spektru prikazana je na primjeru kanabinola (Slika 46).



Slika 46. Maseni spektar CBN u rastvoru smješe referentnih standarda (a) i spektar CBN iz biblioteke spektara instrumenta (b), sa indeksom kvaliteta

Prisustvo karakterističnih pikova (*m/z*) u spektrima analiziranih rastvora referentnih standarda osnovnih kanabinoida, uključujući i molekularni jon-pik, pokazalo je da spektri kanabinoida iz smjese standarda odgovaraju spektrima standarda pojedinih kanabinoida, čime je zadovoljen uslov specifičnosti na osnovu masenih spektara.

Za ispitivanje donje granice detekcije za psihoaktivni sastojak THC, kao parametra validacije GC/MS metode, pripremljeni su rastvori različitih koncentracija, razblaživanjem rastvora referentnog standarda do koncentracije 0,0015 mg/ml (tabela 21).

Tabela 21. Rastvori referentnog standarda THC različitih koncentracija

Oznaka rastvora	Konc. THC [mg/ml]	Rt
THC-1	0,20	5,84
THC-2	0,10	5,84
THC-3	0,07	5,85
THC-4	0,04	5,84
THC-5	0,01	5,84
THC-6	0,004	5,83
THC-7	0,0025	5,83
THC-8	0,0015	-

Utvrđena je donja granica detekcije na koncentraciji 0,0025 mg/ml, pri kojoj je pik THC u hromatogramu vidljiv i instrument ga detektuje kao Δ^9 -THC, što je preciznije od potrebnog uslova prihvatljive donje granice detekcije od 0,01 mg/ml.

Detektovani pikovi THC u analiziranim rastvorima od THC-1 do THC-7 imaju Rt u granicama prihvatljivosti od $\pm 0,05$ minuta (prihvatljiv interval 5,79 – 5,89 minuta), kao i karakteristične masene spektre.

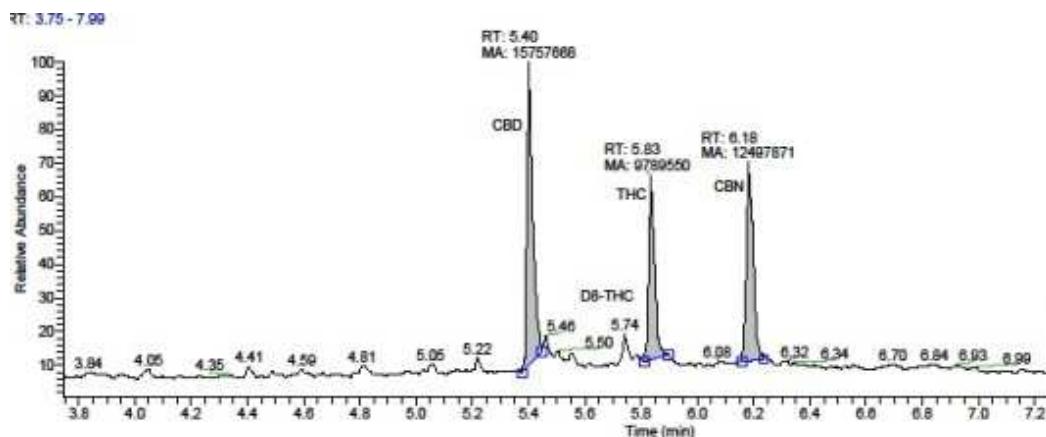
Specifičnost i selektivnost kao parametri validacije GC/MS metode testirani su na uzorcima ekstrahovanim u 2 različita rastvarača, hloroformu i etanolu. Uticaj matriksa na identifikaciju osnovnih kanabinoida, primjenom GC/MS metode, ispitana je analizom tri uzorka kanabis biljke, prethodno analizirana primjenom drugih analitičkih tehnika (TLC i GC/FID) kojima je potvrđeno prisustvo THC, CBD i CBN u uzorcima.

Za analize je odvagano po 100 mg osušenog i usitnjeno biljnog materijala koji su ekstrahovani na sljedeći način:

- uzorak obilježen kao Cann-1 ekstrahovan je etanolom, a uzorak obilježen kao Cann-2 hloroformom, 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu;
- uzorak obilježen kao Cann-3, ekstrahovan je hloroformom, 30 minuta pomoću horizontalnog šejkera.

Nakon filtriranja, filtrati su upareni do suha, suhi ostatak je rastvoren u 3 ml odgovarajućeg rastvarača. Tako pripremljeni ekstrakti su analizirani. Ekstrakti uzorka Cann-2 i Cann-3 su zatim podijeljeni u dva dijela, od kojih je dio čuvan na sobnoj temperaturi (Cann-2A i Cann-3A), a drugi dio u frižideru (Cann-2B i Cann-3B), te su ponovo analizirani nakon 24 sata.

Na hromatogramu analiziranog uzorka (Slika 47) jasno su vidljivi pikovi CBD, THC i CBN, sa vrijednostima Rt u granicama $\pm 0,05$ minuta (tabela 22), u odnosu na Rt referentnih standarda (tabela 19).

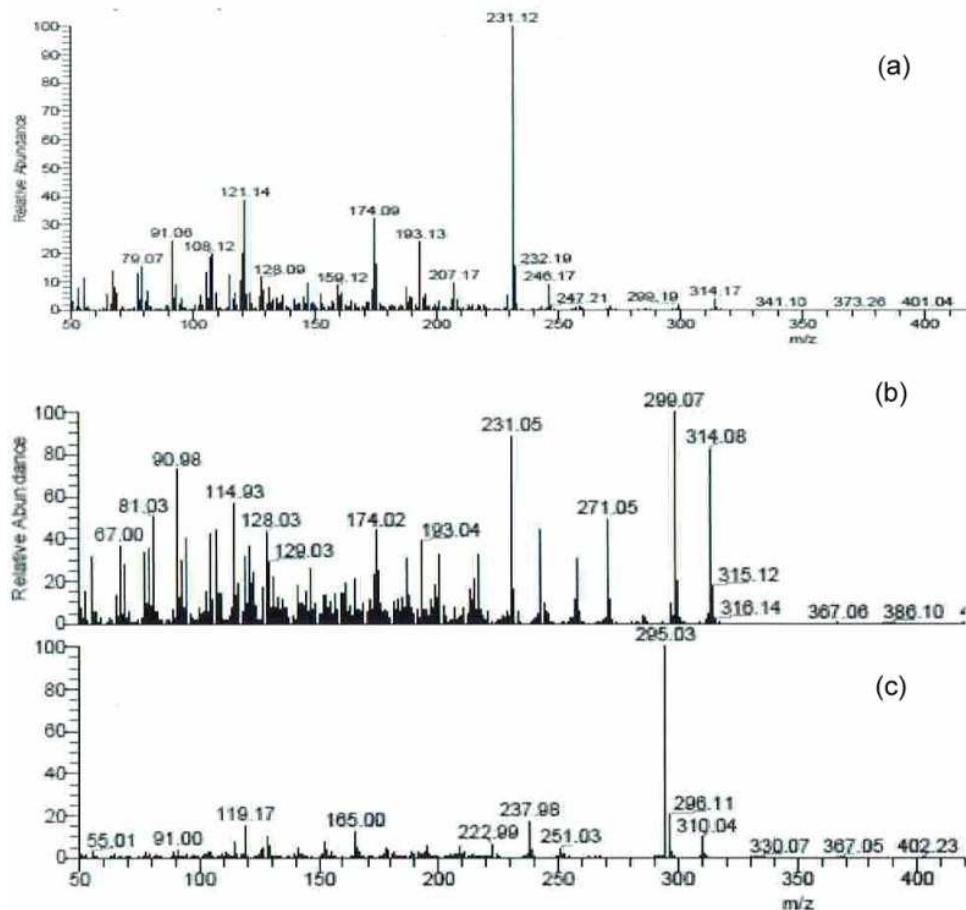


Slika 47. Hromatogram ekstrakta kanabis biljke (uzorak Cann-2A)

Tabela 22. Rt vrijednosti kanabinoida u ekstraktima biljnih uzoraka

Biljni ekstrakti	Rt		
	CBD	Δ^9 -THC	CBN
Cann-1	5,41	5,84	6,19
Cann-2	5,41	5,84	6,19
Cann-2A	5,40	5,83	6,18
Cann-2B	5,40	5,83	6,18
Cann-3	5,41	5,84	6,19
Cann-3A	5,40	5,83	6,18
Cann-3B	5,40	5,83	6,18

Maseni spektri kanabinoida u analiziranim ekstraktima biljke odgovaraju masenim spektrima odgovarajućih standarda kanabinoida, sa prisutnim karakterističnim pikovima (m/z) (Slika 48).



Slika 48. Maseni spektri osnovnih kanabinoida u ekstraktu kanabis biljke:
 (a) CBD, (b) Δ^9 -THC i (c) CBN

Na osnovu dobijenih rezultata analiza može se konstatovati da matriks biljnih uzoraka ne ometa identifikaciju osnovnih kanabinoida na odgovarajućim retencionim vremenima, što znači da nema uticaja matriksa na rezultate analiza. Zadovoljena je i ponovljivost, pri čemu je sve analize radio jedan analitičar, na istom instrumentu, tako što su ekstrakti analizirani po dva puta u istom danu.

Tokom ispitivanja uticaja matriksa ispitana je i otpornost, odnosno osjetljivost analitičke metode na manje promjene radnih uslova, koje se mogu očekivati u laboratorijskom radu (upotreba različitih rastvarača za ekstrakciju, način ekstrakcije, stabilnost ekstrakta u vremenu, temperatura i sl.). Manje promjene radnih uslova, koje ne utiču bitno na rezultat analize, ulaze

u području otpornosti metode. Ispitivanjem tih promjena definiše se područje radnih uslova u kojem se metoda može koristiti.

Ovom prilikom ispitani su rastvarači etanol i hloroform, a mogu se koristiti i drugi rastvarači ili kombinacije rastvarača (npr. toluen, petroleter i sl.) [Dragoljić i sar., 2017]. Na osnovu podudarnosti Rt i masenih spektara pojedinih kanabinoida može se zaključiti da se analizom etanolnih i hloroformskih ekstrakata dobiju prihvatljivi rezultati, te se oba rastvarača mogu koristiti za ekstrakciju. Prateći rezultate za uzorke Cann-2 i Cann-3 (tabela 22) može se zaključiti da način ekstrakcije pomoću ultrazvučnog kupatila ili horizontalnog šejkera, ne utiče na rezultat analize osnovnih kanabinoida, te se može primjeniti bilo koji od navedenih postupaka ekstrakcije.

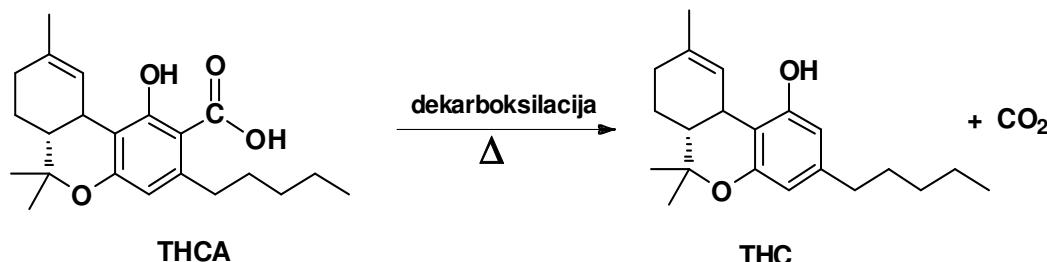
Nakon 24 sata analizirani su isti ekstrakti, koji su za to vrijeme čuvani na sobnoj temperaturi (Cann-2A i Cann-3A) i u frižideru na +4°C (Cann-2B i Cann-3B). Iz hromatograma analiziranih biljnih ekstrakata (slika 47, tabela 22) može se zaključiti da su Rt kanabinoida u granicama $\pm 0,05$ minuta u odnosu na Rt odgovarajućih kanabinoida u rastvorima referentnih standarda (tabela 19). Isto tako, maseni spektri pojedinih kanabinoida u analiziranim ekstraktima odgovaraju masenim spektrima referentnih standarda (Slika 48, tabela 20). Dakle, sva tri osnovna kanabinoida (THC, CBD i CBN) su stabilna u ekstraktima u vremenskom intervalu od 24 sata, a temperaturni uslovi u kojima su čuvani biljni ekstrakti (na sobnoj temperaturi i u frižideru) ne utiče na rezultat kvalitativne analize.

Za ispitivanje prenesenog efekta (engl. *carry over effect*), nakon analiza rastvora referentnih standarda i uzoraka, izvršene su analize čistih rastvarača etanola i hloroforma (slijepe probe), kojom prilikom nije utvrđeno prisustvo tragova kanabinoida u granicama detekcije. Dakle, u instrumentu nisu zaostali tragovi analiziranih uzoraka u granicama detekcije, odnosno nema prenesenog efekta, stoga nije neophodno injektirati slijepe probe poslije svake analize kanabis uzorka, nego samo kada analitičar procijeni da je to potrebno – npr. preporučuju se slijepe probe nakon analize uzorka sa visokom koncentracijom kanabinoida.

Rezultati analiza, provedenih tokom ispitivanja performansi metode za analizu osnovnih kanabinoida tehnikom gasno-masene hromatografije, pokazali su da metoda zadovoljava definisane specifikacije i pogodna je za predviđenu svrhu, što znači da se može koristiti za identifikaciju osnovnih kanabinoida u rutinskom laboratorijskom radu [Dragoljić i sar., 2020].

5.3.3.3. Kvantitativna gasno-hromatografska analiza kanabisa

Kvantitativnom analizom kanabisa za forenzičke svrhe utvrđuje se sadržaj tri osnovna kanabinoida u uzorcima (THC, CBD i CBN), pri čemu se obično određuje ukupan sadržaj kanabinoida, što podrazumijeva neutralne kanabinoide i kanabinoidne kiseline. Dekarboksilacija kanabinoidnih kiselina u neutralne kanabinoide odvija se na povišenoj temperaturi (Slika 49).



Slika 49. Reakcija dekarboksilacije THCA do THC

Dekarboksilacija može biti potpuna u GC lajneru instrumenta, mada neki injektorski sistemi pokazuju veoma slabu sposobnost dekarboksilacije THCA na istoj temperaturi, što vjerovatno zavisi od geometrije injektor-a. Stoga se preporučuje provođenje dekarboksilacije prije GC analize, u fazi pripreme uzorka, zagrijavanjem ekstrakta kanabisa, vodeći računa da ne dođe do razgradnje THC. Ekstrakt se može grijati 12 minuta na 150°C, pri čemu se u otvorenoj staklenoj bočici dekarboksilacija postiže u roku od 5 minuta nakon isparavanja rastvarača [UNODC, 2009a; Thomas B. and ElSohly, 2016]. Romano i Hazekamp [2013] su grijanjem 30 minuta na 145°C postigli značajnu dekarboksilaciju, uz veoma malo razgradnje THC do CBN. Dekarboksilacija se odvija i u koloni gasnog hromatografa, pod uticajem visoke temperature [Pijlman et al., 2005; Stambouli et al., 2005; Hazekamp et al., 2016].

Ukupan sadržaj THC predstavlja maksimalan potencijal kanabisa, a time i relevantan parametar u forenzičkom smislu. Naime, podrazumijeva se da i prilikom konzumiranja (najčešće pušenjem), dolazi do dekarboksilacije THCA pod uticajem visoke temperature, pa ukupan THC predstavlja realan potencijal uzoraka namijenjenih zloupotrebi [Pijlman et al., 2005; Rymanovski, 2014].

U nastavku rada istaknuti su neki faktori koji mogu da utiču na rezultat kvantitativne analize osnovnih kanabinoida u biljnim uzorcima, sa naglaskom na psihoaktivni sastojak THC, kao forenzički najznačajniji.

5.3.3.3.1. Izbor reprezentativnih dijelova biljke

Zbog heterogene prirode biljnog materijala i različitog sadržaja kanabinoida u različitim dijelovima biljke, za kvantitativnu analizu biljnog materijala neophodno je, prilikom uzorkovanja, izvršiti pravilan izbor reprezentativnih dijelova biljke.

Radi određivanja sadržaja THC u pojedinim biljnim dijelovima izvršena je analiza biljnih dijelova osam uzoraka biljaka (slike 50 i 51).



Slika 50. Osušene stabljike kanabis biljke



Slika 51. Osušena i izlomljena stabljika kanabis biljke

Biljke prikazane na slici 50 bile su dužine od 55 do 91 cm, sa korijenom, listovima i cvjetovima, a rezultati analiza THC u pojedinim dijelovima biljke prikazani su u tabeli 23.

Tabela 23. Sadržaj THC u pojedinim dijelovima biljke

Uzorak biljke	Sadržaj THC [%]				
	Cvijet	Listovi	Dno stabljike	Vrh stabljike	Korijen
Biljka 1	5,58	1,50	0,01	0,03	0,02
Biljka 2	2,22	1,81	trag	0,15	0,03
Biljka 3	7,31	1,64	trag	0,02	0,03
Biljka 4	5,60	0,29	trag	0,09	0,02
Biljka 5	4,66	0,66	0,01	0,03	0,05
Biljka 6	6,00	0,60	0,02	0,03	0,003
Biljka 7	8,09	0,36	0,01	0,06	0,02

Rezultati pokazuju da se najviše THC nalazi u cvjetovima, dok listovi sadrže manju, ali ipak značajnu količinu tog psihoaktivnog sastojka (npr. prve tri biljke u tabeli 23). Sadržaj THC u stabljici i korijenu je zanemarljivo mali, te se oni smatraju dijelovima biljke koji gotovo da ne sadrže psihoaktivni sastojak.

Biljka prikazana na slici 51 bila je dužine 2 m, bez korijena, sa listovima, cvjetovima i sjemenkama. Sadržaj THC u tri uzorka cvjetova iznosio je 9,62% u prosjeku, dok su listovi sa vrha biljke imali 0,79% THC, listovi sa sredine biljke 0,75%, a listovi sa donjeg dijela biljke 0,46% THC. Ovdje se uočava da donji listovi sadrže manju, ali ipak potrošnu količinu THC.

Sadržaj THC u stabljici kretao se od 0,0003 do 0,03%. Odvajanjem kore, drvenastog dijela stabljike i srži (Slika 52), u kori je utvrđeno 0,0003% THC, dok u drvenastom dijelu i srži nije utvrđeno prisustvo THC.



Slika 52. Presjek stabljike kanabis biljke

Sjemenke su ispitivane tako što su prvo namočene u hloroform, koji je potom analiziran i utvrđeno je prisustvo THC u tragu. Potom su sjemenke smrvljene i ekstrahovane hloroformom. U hloroformskom ekstraktu nije utvrđeno prisustvo THC. Na osnovu toga se može zaključiti da sjemenke ne sadrže THC, te da tragovi THC potiču sa površine sjemenki. Inače, sjemenke se na biljci nalaze u cvjetnim vrhovima, bogatim smolom koja sadrži dosta THC, pa smola u tim uslovima može da prijanja na površinu sjemenki i kontaminira ih THC-om.

Na osnovu rezultata analiza sadržaja THC u različitim biljnim dijelovima, može se zaključiti da je za forenzičku analizu veoma značajan pravilan izbor reprezentativnog biljnog materijala. U forenzičkom smislu reprezentativnim se smatraju dijelovi biljke koji sadrže više psihoaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola (cvjetni vrhovi i listovi), za razliku od dijelova koji ga ne sadrže ili je prisutan samo u tragovima (sjemenke, stabljika, korijen). Dakle, kada je moguće, zavisno od pojavnog oblika materijala, preporučuje se za analizu uzeti cvjetne vrhove ili listove biljke.



Slika 53. Vrh kanabis biljke

Kada je materijal u formi marihuane (osušen i usitnjen biljni materijal koji, pored cvjetova i listova, nerijetko sadrži izlomljene dijelove stabljike i sjemenke), potrebno je odstraniti sjemenke i dijelove stabljike, koji su u forenzičkom smislu nepoželjni, a mogu da utiču na rezultat kvantitativne analize.

5.3.3.3.2. Priprema uzorka za analizu

Biljni materijal treba osušiti prije uzimanja uzorka za analizu. To je posebno značajno kada je na analizu dostavljen svjež ili djelimično vlažan biljni materijal. Odvaga vlažnog uzorka bi se odrazila na rezultat kvantitativne analize, jer se sadržaj kanabinoida u forenzičkoj praksi izražava kao procentualni sadržaj pojedinog kanabinoida u suhoj masi biljnog materijala. Zavisno od vlažnosti uzorka i od ambijentalne temperature, sušenje je obavljano na vazduhu, pri sobnoj temperaturi u trajanju 2-3 dana, dok lišće ne postane krhko (Slika 54).



Slika 54. Osušeni listovi biljke

Nakon sušenja, odaberu se reprezentativni dijelovi biljnog materijala i usitne u odgovarajućem mlinu ili u tarioniku, nakon čega se može prosijati, čime se doprinosi homogenosti uzorka. Usitnjavanjem se veličina čestica može redukovati na ispod $500 \mu\text{m}$ [Sexton and Ziskind, 2013; ENFSI, 2014].



Slika 55. Osušen i usitnjen biljni materijal

Kanabis smolu je potrebno usitniti na male komadiće. Ukoliko je materijal ljepljiv, uzorak se može ohladiti tečnim azotom, pa usitniti [UNODC, 2009a]. Usitnjeni uzorci biljke ili smole ekstrahuju se odgovarajućim rastvaračem (hloroform, toluen, petroleter, etanol,...), nakon čega

se filtrira, a filtrat se analizira odabranom tehnikom. Kanabis ulje se može direktno razrijediti rastvaranjem u odabranom organskom rastvaraču, a potom analizirati.

5.3.3.3.3. Ekstrakcija biljnog materijala

Kada su u pitanju faktori koji bi mogli da utiču na rezultat kvantitativne analize, ispitana je uticaja rastvarača za ekstrakciju biljnog materijala. Izvršena je ekstrakcija četiri biljna uzorka sa različitim rastvaračima koji se najčešće koriste: hloroform, etanol, toluen i petroleter (Slika 56).



Slika 56. Ekstrakti kanabis biljke u različitim rastvaračima

Kvantitativna analiza osnovnih kanabinoida u ekstraktima biljnih uzoraka rađena je primjenom metode eksternog standarda, a rezultati analiza sadržaja osnovnih kanabinoida u ekstraktima prikazani su u tabeli 24.

Tabela 24. Sadržaj kanabinoida u ekstraktima biljnih uzoraka

Uzorak biljke	Rastvarač za ekstrakciju	Sadržaj kanabinoida [%]		
		CBD	THC	CBN
1	Hloroform	0,23	2,89	0,13
	Toluen	0,25	2,97	0,12
	Etanol	0,24	3,06	0,14
	Petroleter	0,24	2,87	0,12
2	Hloroform	0,38	3,38	0,32
	Toluen	0,38	3,27	0,28
	Etanol	0,38	3,21	0,28
	Petroleter	0,36	3,27	0,32
3	Hloroform	0,15	5,56	0,77
	Toluen	0,16	5,63	0,68
	Etanol	0,17	5,71	0,79
	Petroleter	0,18	5,87	0,73
4	Hloroform	0,53	3,35	0,59
	Toluen	0,49	3,30	0,52
	Etanol	0,52	3,31	0,50
	Petroleter	0,49	3,31	0,52

Na osnovu rezultata iz tabele 24 može se zaključiti da se sadržaj tri osnovna kanabinoida ne razlikuje bitno u ekstraktima biljnih uzoraka dobijenim ekstrakcijom primjenjenim rastvaračima. Odnosno, ne može se izdvojiti neki od rastvarača koji znatno bolje ili znatno slabije ekstrahuje osnovne kanabinoide. Stoga se za ekstrakciju biljnih uzoraka može primjeniti bilo koji od ispitanih rastvarača.

Pored uticaja rastvarača, ispitana je i uticaj određenih faza postupka pripreme konačnog ekstrakta na rezultat kvantitativne analize. Nakon ekstrakcije, postupkom filtriranja vrši se odvajanje biljnog materijala od ekstrakta, koji se dalje uprava na povišenoj temperaturi, radi dekarboksilacije, a potom se suhi ostatak rastvara određenom količinom rastvarača za kvantitativnu analizu. Kako bi se utvrdilo da li se i koja količina kanabinoida zadržava u ostatku biljnog materijala na filter papiru, nakon filtriranja, te kako to utiče na rezultat kvantitativne analize, izvršen je eksperiment sa četiri biljna uzorka. Filtriranjem je dobijen prvi ekstrakt, a potom je biljni materijal na filter papiru ispran rastvaračem u tri odvojene porcije. Rezultati analiza osnovnih kanabinoida u četiri dobijena rastvora (I ekstrakt i I, II i III ispiranje) prikazani su u tabeli 25.

Tabela 25. Sadržaj kanabinoida u ekstraktu i rastvorima od ispiranja

Uzorak biljke	Ekstrakcija i ispiranje	Sadržaj kanabinoida [%]		
		CBD	THC	CBN
1	I ekstrakt	0,40	15,89	0,41
	I ispiranje	-	0,42	0,04
	II ispiranje	-	-	-
	III ispiranje	-	-	-
	Ukupan sadržaj	0,40	16,31	
2	I ekstrakt	0,36	11,31	0,39
	I ispiranje	-	0,69	0,05
	II ispiranje	-	0,02	-
	III ispiranje	-	-	-
	Ukupan sadržaj	0,36	12,02	
3	I ekstrakt	0,15	5,53	0,77
	I ispiranje	-	0,08	-
	II ispiranje	-	-	-
	III ispiranje	-	-	-
	Ukupan sadržaj	0,15	5,61	0,77
4	I ekstrakt	0,50	3,28	0,59
	I ispiranje	0,06	0,41	0,09
	II ispiranje	-	0,06	-
	III ispiranje	-	-	-
	Ukupan sadržaj	0,56	3,75	0,68

Sadržaj THC u rastvorima I ispiranja nije zanemarljiv, posebno u uzorcima 1, 2 i 4, gdje utvrđeno od 0,41 do 0,69% THC. U rastvorima dobijenim II ispiranjem, u uzorcima 2 i 4 prisutni su tragovi THC (0,02 i 0,06%), dok u uzorcima 1 i 3 THC nije prisutan. Preostala dva kanabinoida (CBD i CBN) su u rastvorima I i II ispiranja prisutni u znatno nižoj koncentraciji ili uopšte nisu prisutni, što je u korelaciji sa manjim sadržajem istih u samim uzorcima, odnosno nižom koncentracijom i u prvom ekstraktu.

U rastvoru III ispiranja nije utvrđeno prisustvo kanabinoida kod sva četiri uzorka, na osnovu čega se može zaključiti da je, nakon ekstrakcije i filtriranja, biljni talog dovoljno isprati sa dvije porcije rastvarača, te ukupan ekstrakt dalje pripremiti za kvantitativnu analizu (uparavanjem i podešavanjem konačnog volumena).

Na osnovu provedenog eksperimenta može se zaključiti da, ukoliko se ne provede potpuna ekstrakcija sa ispiranjem biljnog taloga nakon filtriranja, rezultat analize će pokazati prividno niži sadržaj kanabinoida u odnosu na stvarni sadržaj istih u biljnom uzorku. Stoga je veoma važno pravilno provesti sve faze pripreme uzorka, a posebno sa aspekta analize sadržaja psihoaktivnog sastojka THC, koji je forenzički najznačajniji.

5.3.3.3.4. Tehnika injektiranja uzorka

Pored pojedinih faza pripreme uzorka, ispitan je i uticaj tehnike injektiranja na rezultat kvantitativne analize, tako što su isti rastvori injektirani po 5 puta ručno i autosemplerom. Analize su rađene gasnom hromatografijom sa masenom detekcijom, po metodi eksternog standarda, a rezultati su prikazani u tabeli 26.

Tabela 26. Rezultati analiza rastvora kanabinoida primjenom različitih tehniki injektiranja

Tehnika injektiranja	Rastvor	CBD		THC		CBN	
		Površina	Konc.	Površina	Konc.	Površina	Konc.
		[%]		[%]		[%]	
Ručno	I-R	12.552.545	2,37	9.549.256	1,75	8.759.875	1,73
	II-R	12.096.002	2,28	9.484.933	1,88	9.018.325	1,78
	III-R	11.533.176	2,18	8.630.496	1,71	7.793.496	1,54
	IV-R	11.857.151	2,24	9.285.015	1,84	7.837.794	1,55
	V-R	11.267.982	2,13	9.120.788	1,81	7.563.358	1,50
Srednje vrijednosti ±SD		2,24±0,08		1,80±0,06		1,62±0,11	
Autosemplerom	I-A	11.564.545	2,18	9.432.638	1,87	7.786.232	1,54
	II-A	11.901.982	2,25	9.339.759	1,85	8.522.495	1,69
	III-A	11.809.134	2,23	9.474.712	1,88	8.556.144	1,69
	IV-A	11.003.973	2,08	9.383.462	1,86	8.196.066	1,62
	V-A	11.470.896	2,17	9.384.174	1,86	8.333.824	1,65
Srednje vrijednosti ±SD		2,18±0,06		1,86±0,01		1,64±0,06	

Na osnovu rezultata analiza iz tabele 26, može se uočiti sljedeće:

- kod ručnog injektiranja razlika najveće i najmanje vrijednosti koncentracije iznosi 0,28 kod CBN, gdje je i najveće odstupanje od srednje vrijednosti 0,16, te najviša vrijednost standardne devijacije 0,11;
- kod injektiranja autosemplerom razlika najveće i najmanje vrijednosti koncentracije iznosi 0,17 kod CBD, dok je najveće odstupanje od srednje vrijednosti 0,10 i najviša vrijednost standardne devijacije 0,06 (kod CBD i CBN).

Očekivano, autosemplerski injekti su međusobno više ujednačeni od ručnih, mada su i rezultati dobijeni ručnim injektiranjem sasvim prihvatljivi. Srednje vrijednosti ručnih i autosemplerskih injekata razlikuju se za samo 0,06, što je u području standardne devijacije. To pokazuje da iskusni analitičar sa uvježbanim načinom ručnog injektiranja može postići zadovoljavajuću

preciznost injektiranja, a time i preciznost analiza. Ipak, prednost autosemplera ogleda se u mogućnosti programiranja automatskog injektiranja serije analiza, čime je analitičaru omogućeno da istovremeno obavlja druge poslove. Tehnika injektiranja posebno dolazi do izražaja kada se radi metodom eksternog standarda, gdje je za postizanje zadovoljavajućih rezultata potrebno ujednačeno injektiranje.

5.3.3.3.5. Metoda eksternog i metoda internog standarda

Za razliku od metode eksternog standarda, kod koje je veoma važno da injekcioni volumen bude ujednačen, kod metode internog standarda injekcioni volumen nema značajan uticaj na rezultat analiza, jer se interni standard iste koncentracije, u fazi pripreme, dodaje i referentnim standardima i uzorcima, te se prilikom proračuna nivelišu eventualne razlike injekcionog volumena. Zbog toga se metoda internog standarda smatra preciznijom i veoma je raširena u primjeni.

Supstance koje se koriste kao interni standard u hromatografiji moraju da zadovolje određene zahtjeve. Interni standard mora biti inertan, odnosno ne smije da reaguje sa bilo kojom komponentom uzorka, a retencionalno vrijeme internog standarda ne smije se poklapati sa retencionim vremenom bilo koje komponente uzorka.

Komparacija rezultata primjenom metode eksternog standarda i metode internog standarda prikazana je na primjeru analize sadržaja osnovnih kanabinoida u istom ekstraktu kanabis biljke primjenom obe navedene metode. Kao interni standard korišten je tetrakosan, koji zadovoljava potrebne zahtjeve, te se često koristi prilikom analize kanabis preparata. Rastvor tetrakosana u hloroformu, koncentracije 0,5 mg/ml, korišten je za pripremanje referentnih standarda ($c = 0,5$ mg/ml) i ekstrakta biljnog uzorka (~ 20 mg/ml). Analize su rađene gasnom gromatografijom sa FID detektorom, primjenom instrumenta *GC System 7890B* marke *Agilent Technologies*, prema radnim uslovima navedenim u tabeli 27.

Tabela 27. Radni uslovi gasnog hromatografa

Injektor	Temperatura: 280°C Injekcioni volumen: 1 µl (autosempler) Split ratio: 20:1
Kolona	HP-5: 15 m × 0,32 mm × 0,25 µm stacionarna faza: 5% difenil, 95% dimetilpolisilosan
Program hromatografske peći	Početna temperatura: 200°C – 1 min. Rata: 40°C/min. do 240°C Konačna temperatura: 240°C – 6 min. Ukupno vrijeme analize: 8 min.
Gas nosač	azot (N ₂) čistoće 99.9999%, konstantnog protoka 1,2 ml/min,
Detektor	FID (plameno-jonizacioni detektor), temp. 300°C, Protok gasova: H ₂ 35 ml/min i vazduh 350 ml/min.

Određivanje sadržaja kanabinoida u biljnog ekstraktu po metodi eksternog standarda vršeno je prema relaciji:

$$c_x = c_R \cdot \frac{A_s}{c_s \cdot A_R} \cdot 100 [\%] \quad [8]$$

gdje je:

c_x – koncentracija odgovarajućeg kanabinoida (CBD, THC, CBN) u uzorku [%],

c_R – koncentracija referentnog standarda odgovarajućeg kanabinoida [mg/ml],

c_s – koncentracija uzorka [mg/ml],

A_s – površina odgovarajućeg kanabinoida u hromatogramu uzorka,

A_R – površina ref. standarda odgovarajućeg kanabinoida u hromatogramu standarda.

Za određivanje sadržaja kanabinoida po metodi internog standarda primjenjuje se relacija:

$$c_x = c_R \cdot \frac{\frac{A_s}{A_{IS(S)}}}{\frac{A_R}{A_{IS(R)}}} \cdot 100 [\%] \quad [9]$$

gdje je:

c_x – koncentracija odgovarajućeg kanabinoida (CBD, THC, CBN) u uzorku [%],

c_R – koncentracija referentnog standarda odgovarajućeg kanabinoida [mg/ml],

c_s – koncentracija uzorka [mg/ml],

A_s – površina odgovarajućeg kanabinoida u hromatogramu uzorka,

$A_{IS(S)}$ – površina internog standarda u hromatogramu uzorka,

A_R – površina ref. standarda odgovarajućeg kanabinoida u hromatogramu standarda,

$A_{IS(R)}$ – površina internog standarda u hromatogramu standarda.

U tabeli 28. komparativno su prikazani rezultati analiza istog biljnog ekstrakta analiziranog metodom eksternog standarda i metodom internog standarda, pri čemu su izračuante srednje vrijednosti za po 5 injekta i odgovarajuće standardne devijacije.

Tabela 28. Sadržaj kanabinoida u biljnom ekstraktu analiziranom metodom eksternog i metodom internog standarda

Uzorak		Koncentracija kanabinoida [%]					
Injekt		CBD		THC		CBN	
		Met. EKSTERNOG stand.	Met. INTERNOG stand.	Met. EKSTERNOG stand.	Met. INTERNOG stand.	Met. EKSTERNOG stand.	Met. INTERNOG stand.
1		0,08	0,08	1,14	1,12	2,06	1,98
2		0,08	0,07	1,22	1,18	1,97	1,86
3		0,07	0,07	1,21	1,14	2,01	1,85
4		0,07	0,07	1,16	1,17	1,93	1,89
5		0,07	0,07	1,16	1,16	1,86	1,81
Sr. vr. ±SD		0,07±0,004	0,07±0,004	1,18±0,03	1,15±0,02	1,97 ±0,07	1,88 ±0,06

Na osnovu rezultata iz tabele 28 može se uočiti da su razlike koncentracija, a time i vrijednosti standardnih devijacija, između injekta po metodi internog standarda nešto manje nego po metodi eksternog standarda. To je izraženje kod THC i CBN, dok kod CBD nije bilo razlike, zbog njegove niske koncentracije u uzorku. Naime, razlika između najviše i najniže vrijednosti za 5 injekta po metodi internog standarda za THC iznosi 0,06, dok je ta razlika za CBN 0,17. Razlike najviše i najniže vrijednosti po metodi eksternog standarda su za THC 0,09, a za CBN 0,20. Iz ovoga proizlazi da je metoda internog standarda nešto preciznija, jer se prilikom proračuna uzimaju u obzir i površine internog standarda iste koncentracije, dodatog referentnim standardima i uzorku, čime se vrši korekcija eventualnih razlika injektiranih volumena. Međutim, rezultati dobijeni metodom eksternog standarda su takođe sasvim prihvatljivi. Srednje vrijednosti po jednoj i drugoj metodi razlikuju se samo za 0,03 kod THC i 0,09 CBN, dok se standardne devijacije razlikuju za samo 0,01. Dakle, primjenom metode eksternog standarda mogu se dobiti prihvatljivi rezultati, ukoliko je tehnika injektiranja referentnih standarda i uzorka ujednačena (u ovom slučaju autosemplerom). S obzirom da je priprema uzorka i referentnih standarda za metodu eksternog standarda jednostavnija, ova metoda je praktična za primjenu u laboratorijama sa velikom frekvencijom uzorka iste vrste.

5.3.3.3.6. Primjena indirektnog standarda za određivanje kanabinoida

Nabavka referentnih standarda, potrebnih za kvantitativnu analizu ilegalnih droga, nije jednostavna. Naime, kod ilegalnih droga primarno se određuje sadržaj aktivnih komponenti (heroin, kokain, tetrahidrokanabinol i sl.), te se kao referentni standard koriste odgovarajuća jedinjenja visoke čistoće. Pored visoke cijene certifikovanih referentnih standarda droga, postupak nabavke i uvoza tih supstanci je prilično zahtjevan. Kada je u pitanju referentni standard tetrahidrokanabinola, koji je obično u obliku metanolnog ili etanolnog rastvora, javljaju se i druge poteškoće, kao što je nesigurnost u pogledu stabilnosti rastvora zbog prirode THC, koji je sklon degradaciji [Poortman-van der Meer & Huizer, 1999]. Iako se čuva u frižideru, s vremenom se ne može pouzdano tvrditi da stvarni sadržaj THC u rastvoru referentnog standarda odgovara deklarisanom. Dalje, greške se mogu javiti i prilikom razrijeđenja radi pripreme radnih rastvora THC standarda za kalibraciju. Inače, mnogo su pogodniji referentni standardi koji se mogu nabaviti u formi praška, što nije slučaj sa THC-om, koji je u čistom stanju uljasta tečnost. Zbog negativnih iskustava sa THC standardom, te nezadovoljavajućih rezultata međulaboratorijskih testiranja, mnoge laboratorije u Njemačkoj već decenijama za određivanje sadržaja THC u kanabis uzorcima, koriste referentni standard CBN, umjesto THC standarda [Poortman-van der Meer & Huizer, 1999]. Laboratorijska i naučna sekcija Ujedinjenih Nacija takođe preporučuje primjenu referentnog standarda CBN za kvantitativno određivanje THC [UNODC, 2009a]. Na osnovu srodne strukture kanabinoida, može se predpostaviti da se kao indirektni standardi za određivanje THC mogu koristiti referentni standardi CBD i CBN, koji su kao supstance visoke čistoće dostupni u praškastoј formi. Indirektni standardi se obično koriste za kvantitativno određivanje suspstanci za koje referentni standardi ne postoje ili su teško dostupni kao čista i stabilna jedinjenja. Primjena indirektnih standarda u hromatografiji zasniva se na konceptu efektivnog broja ugljenikovih atoma (eng. *effective carbon number*/ECN), koji je u praksi uveo Sternberg sa saradnicima 1961. godine, proučavajući mehanizam FID detektora, u cilju predviđanja faktora odziva na osnovu molekularne strukture. ECN koncept je zasnovan na zapažanju da je odziv FID detektora molekule proporcionalan masi ugljenika prisutnog u uzorku, pri čemu stepen redukcije signala, uslijed djelimične oksidacije ugljenikovih atoma u jedinjenjima sa heteroatomima, može da varira zavisno od heteroatoma i vrste hemijske veze, jer se smatra da samo neoksidovani ugljenikovi atomi efektivno proizvode odziv FID detektora. „Efektivni“ ugljenikovi atomi se ponekad definišu kao oni ugljenikovi atomi vezani za druge ugljenikove atome ili atome vodonika [Katritzky 1994; Poortman-van der Meer & Huizer, 1999]. Efektivni brojevi ugljenika (ECN) za THC, CBD i CBN iz literature (određeni po metodama Sternberga

i saradnika, te Jorgensena i saradnika), formule i molekulske mase jedinjenja, koje su takođe značajne za primjenu ovog koncepta, prikazani su u tabeli 29 [Poortman-van der Meer & Huizer, 1999].

Tabela 29. Efektivni ugljenikov broj kanabinoida, po metodama Sternberga i Jorgensena

Jedinjenje	Formula	Molekulska masa	ECN po Sternbergu	ECN po Jorgensenu
THC	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314,5	19,15	19,48
CBD	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	314,5	19,30	19,52
CBN	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	310,4	19,25	19,58

Na primjer, vrijednost efektivnih brojeva ugljenika po Jorgensenu dobije se na osnovu broja ugljenikovih atoma u molekulu (21) uz korekciju za gubitak odziva detektora uzrokovanih funkcionalnim grupama fenola, etera i dvostrukom vezom između dva atoma ugljenika u alkenskom lancu. U gasnoj hromatografiji faktor odziva (engl. *response factor/RF*) za neko jedinjenje izražava se kao odnos odziva detektora za to jedinjenje i mase tog jedinjenja u uzorku, u skladu sa relacijom [10] [Poortman-van der Meer & Huizer, 1999]. Na tom principu se i zasniva kvantitativna gasno-hromatografska analiza komponenti u uzorcima.

$$RF_{comp.} = \frac{A_{comp.}}{m_{comp.}} \quad [10]$$

Prema podacima dostupnim u literaturi, međusobni odnosi odziva (engl. *response ratio/RR*) detektora za tri osnovna kanabinoide odlično se slažu sa teoretskim konceptom i kreću se:

- odnos THC/CBN od 0,98 do 1,00;
- odnos THC/CBD od 0,99 do 1,03;
- odnos CBN/CBD od 1,01 do 1,03.

Vrijednosti međusobnih odnosa kanabinoida, koji su vrlo blizu 1, potvrđuju predpostavku da se oba kanabinoide (CBD i CBN) mogu koristiti kao referentni standardi za određivanje THC u uzorcima kanabis-a. Dobro slaganje eksperimentalnih rezultata sa teoretskim konceptom zasnovanim na efektivnom broju ugljenika (ECN) očekivano je, zbog srodne strukture kanabinoida [Poortman-van der Meer & Huizer, 1999].

Korištenje indirektnog referentnog standarda za određivanje THC testirano je eksperimentalno sa CBN kao referentnim standardom. Najprije su određeni međusobni odnosi odziva detektora (površine pika), na osnovu ranije analiziranih rastvora referentnih standarda THC i CBN (tabela 30).

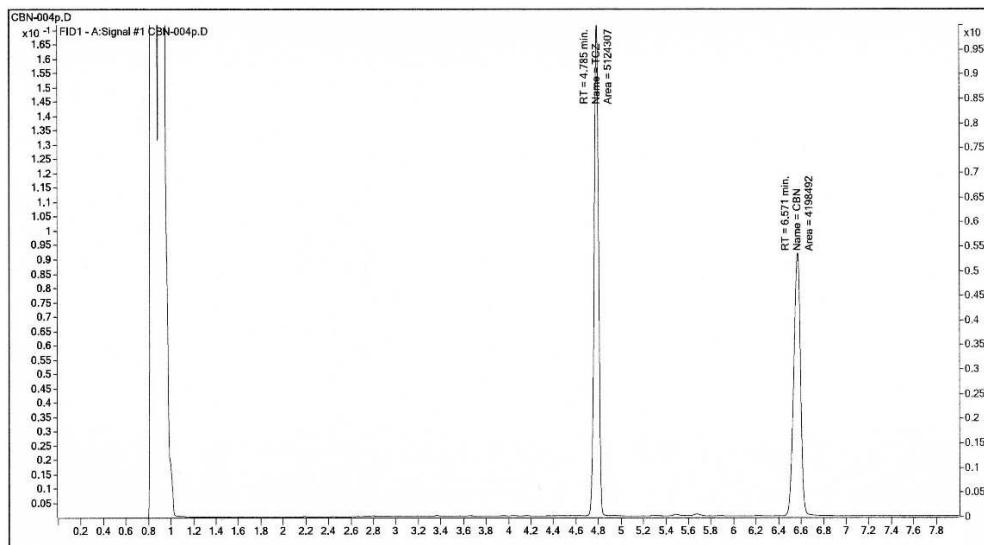
Tabela 30. Odnos površina pikova THC/CBN u analiziranim rastvorima referentnih standarda THC i CBN

Godina analize ref. standarda	Odnos površina pikova THC/CBN
2012	1,010
2015	0,997
2017	1,019
2019	1,007
Srednja vrijednost	1,008

Iz tabele 30. vidljivo je da su odnosi površine pikova THC/CBN vrlo blizu 1, što se slaže sa teoretskim konceptom i podacima iz literature [Poortman-van der Meer & Huizer, 1999].

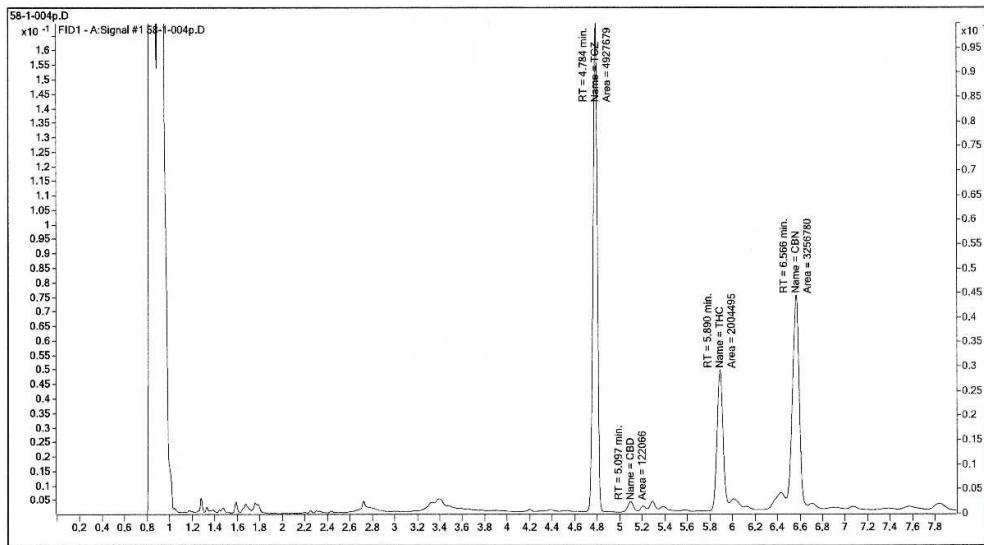
Analize za određivanje THC u uzorku biljnog materijala, pomoću CBN kao indirektnog referentnog standarda, rađene su gasnom hromatografijom sa FID detektorom, po metodi internog standarda, primjenom instrumenta *GC System 7890B* marke *Agilent Technologies*, prema radnim uslovima navedenim u tabeli 27.

Referentni standard CBN pripremljen je u koncentraciji 0,5 mg/ml sa rastvorom internog standarda tetrakosana (TCS) u hloroformu, koncentracije 0,5 mg/ml. Hromatogram standarda prikazan je na slici 57.



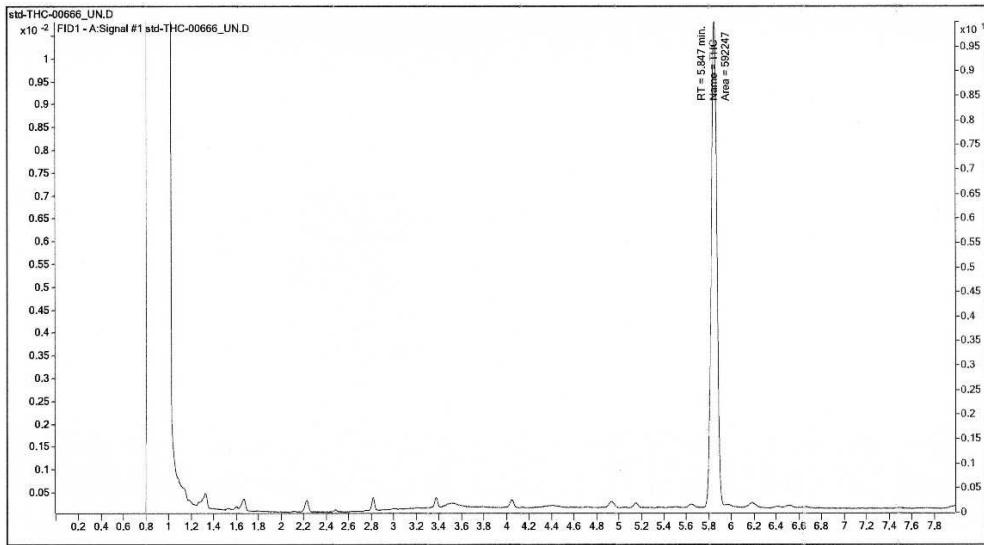
Slika 57. Hromatogram internog standarda TCS i referentnog standarda CBN

Osušen i usitnjen biljni materijal mase 102,2 mg ekstrahovan je hloroformom, a nakon dekarboksilacije i upravanja, rastvoren je sa 5 ml istog rastvora tetrakosana, korištenog za pripremu standarda. Hromatogram biljnog ekstrakta prikazan je na slici 58.



Slika 58. Hromatogram biljnog ekstrakta

Metodom internog standarda, prema relaciji [9], na osnovu CBN kao indirektnog referentnog standarda, sadržaj THC u uzorku biljnog materijala iznosi 1,17%. Sadržaj THC u istom uzorku, određen na osnovu referentnog standarda THC (Slika 59) iznosi 1,16%, što se može smatrati izuzetno dobrom slaganjem sa rezultatom dobijenim preko indirektnog referentnog standarda CBN.



Slika 59. Hromatogram referentnog standarda THC

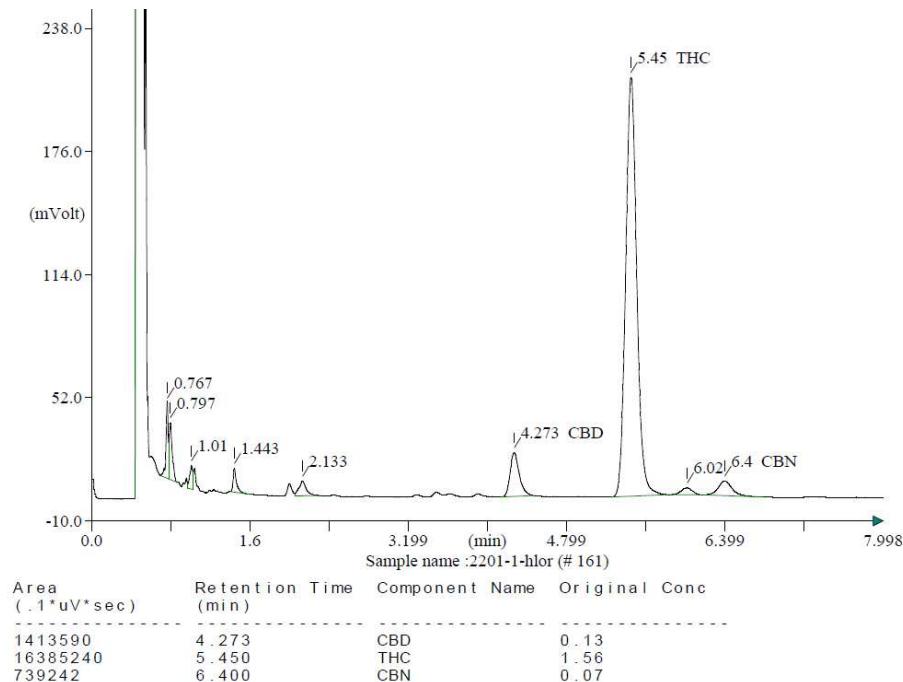
Sa ciljem praćenja ovog principa za određivanje sadržaja THC u uzorcima različite koncentracije, izvršena je komparacija rezultata za još dva uzorka biljnog materijala analizirana

primjenom instrumenta *GC Trace*, marke *Thermo Scientific*, po metodi eksternog standarda (slike 60 i 61). Izračunavanje je rađeno prema relaciji [8], a rezultati su prikazani u tabeli 31.

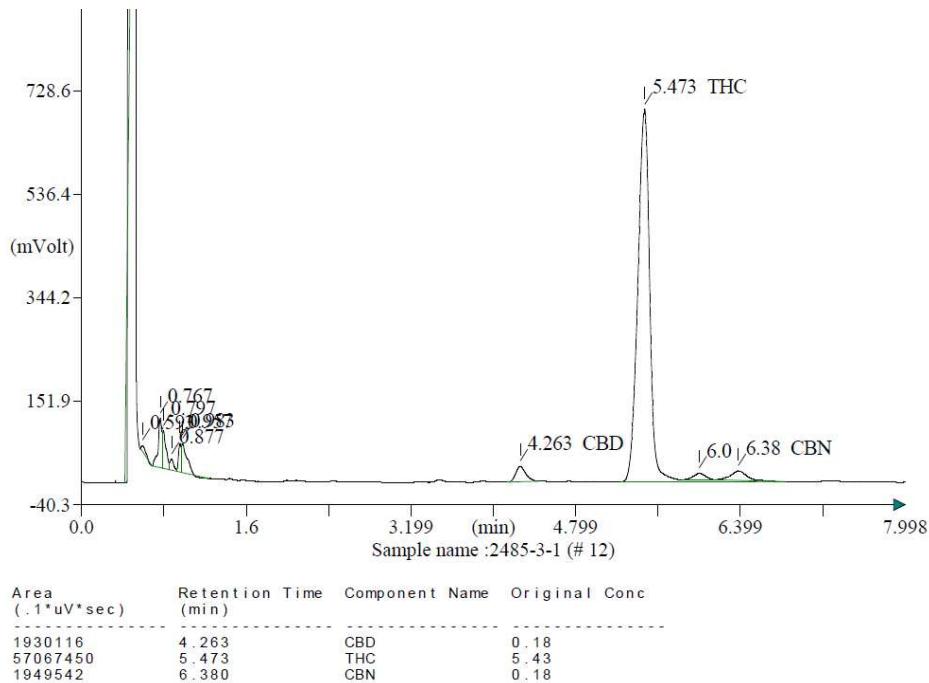
Tabela 31. Komparativni prikaz sadržaja THC u biljnim uzorcima, određenog na osnovu direktnog standarda THC i indirektnog standarda CBN

Oznaka uzorka	Sadržaj THC [%]	
	Na osnovu ref. st. THC (direktni standard)	Na osnovu ref. st. CBN (indirektni standard)
Uzorak 2201-1	3,19	3,18
Uzorak 2485-3-1	11,31	11,27

Iako su analize ova dva uzorka rađene metodom eksternog standarda, koja se smatra nešto manje preciznom, rezultati sadržaja THC u biljnim uzorcima dobijeni na osnovu referentnog standarda THC (direktni standard) i referentnog standarda CBN (indirektni standard) pokazuju veoma dobro slaganje. Kada se rezultati u tabeli 31 zaokruže na jednu decimalu, što je dovoljno precizno za izražavanje sadržaja THC, uzorak 2201-1 sadrži 3,2% THC, a uzorak 2485-3-1 sadrži 11,3% THC, bilo da je izračunavanje rađeno na osnovu direktnog ili indirektnog standarda.



Slika 60. Hromatogram uzorka biljnog materijala sa sadržajem THC 3,2%



Slika 61. Hromatogram uzorka biljnog materijala sa sadržajem THC 11,3%

Rezultati analiza tri uzorka biljnog materijala, provedenih na dva instrumenta, primjenom dvije metode analiza (metoda internog i metoda eksternog standarda) pokazuju veoma dobro slaganje sa teoretskim konceptom i eksperimentalnim rezultatima dostupnim u literaturi, za primjenu referentnog standarda CBN, kao indirektnog standarda za određivanje THC u kanabis uzorcima.

Po istom principu, kao referentni standard za određivanje THC može se koristiti i CBD. Imajući u vidu da, za razliku od THC, CBD i CBN nisu pod kontrolom zakona u smislu kontrole ilegalnih droga, postupak nabavke ovih referentnih standarda je mnogo jednostavniji. Pored toga, referentni standardi CBD i CBN su jeftiniji od THC standarada, a najznačajnije sa stanovišta analize je to što su dostupni u formi praha, zbog čega su stabilniji, te se mogu koristiti duže vrijeme.

6. ZAKLJUČCI

1. Više od 90% zaplijenjenih uzoraka biljnog materijala biljke *Cannabis sativa* L. u Republici Srpskoj sadrže više od 0,2% psihoaktivnog sastojka Δ^9 -tetrahidrokanabinola i pripadaju „droga-tip“ hemotipu.
2. Na ilegalnom tržištu Republike Srpske prisutni su uzorci kanabis biljnog materijala sa veoma različitim sadržajem psihoaktivnog sastojka, od niskopotentnih, preko srednje potentnih do visokotentnih uzoraka. Broj visokotentnih uzoraka kao i srednji godišnji potencijal kanabisa su u porastu. Najniži srednji godišnji psihoaktivni potencijal u posmatranom periodu, izražen kao % THC u suhoj masi biljnog materijala, iznosio je 1,94% (1999. god.), a najviši je bio 5,91% (2013. god.).
Pored porasta broja uzoraka sa visokim sadržajem tetrahidrokanabinola, ustanovljen je sve veći broj uzoraka bez kanabidiola ili sa niskim sadržajem istog, za razliku od ranijeg perioda, do 2012. godine, kada je u uzorcima i kanabidiol bio prisutan u značajnijej količini.
Dobijeni rezultati ukazuju na važnost daljeg praćenja psihoaktivnog potencijala uzoraka kanabis biljke na ilegalnom tržištu, jer zdravstveni rizik predstavljaju kako visokotentni uzorci, tako i velike međusobne razlike, te nagle promjene psihoaktivnog potencijala ilegalnih droga u ponudi.
3. Praćenjem dinamike razlaganja THC u vremenu određena je konstanta brzine reakcije degradacije THC ($k_{sr.} = 0,530 \text{ godina}^{-1}$), što omogućuje retrogradnu procjenu koncentracije THC u vrijeme kada je biljka ubrana, na osnovu analize biljnog materijala koji je čuvan u depozitu. To može biti korisno kada se tokom sudskog postupka ukaže potreba za naknadnom kvantitativnom analizom uzorka koji su prvobitno analizirani samo kvalitativno. Međusobni odnos koncentracija CBN i THC je pokazatelj približne starosti uzorka kanabisa, što u forenzici može poslužiti kao jedan od parametara za eliminaciju kada se sumnja na zajedničko porijeklo zaplijenjenih uzoraka. S obzirom da uslovi skladištenja značajno utiču na razlaganje THC i nastajanje CBN, za primjenu ovog kinetičkog pristupa, potrebno je odrediti konstantu brzine reakcije i odnos CBN/THC za odgovarajuće uslove deponovanja uzorka.

4. Praćenje dinamike razlaganja tetrahidrokanabinola može poslužiti u svrhu stručne preporuke o postupanju sa uzorcima kanabisa tokom istrage. Preporuka je da se uzorci dostave u laboratoriju što prije, kako bi analiza pokazala stvarni sadržaj THC u uzorcima u vrijeme zaplijene. Čuvanje uzorka u depozitima više mjeseci do analize nije dobra praksa, jer za to vrijeme THC degradira, pa sadržaj utvrđen analizom nakon proteklog vremena ne odražava realno stanje u momentu zaplijene uzorka.
- Poznavanje dinamike razlaganja THC može poslužiti i u svrhu stručne preporuke o periodu u kojem ima smisla čuvati ostatake uzorka kanabisa nakon analize, što ima praktični značaja za policijske i sudske depozite u kojima se čuva velika količina ovih relativno voluminoznih uzorka. U ovom radu, za ispitivane uslove depozita, utvrđeno je da je nakon 8 godina sadržaj THC u većini uzorka bio prisutan u tragovima. Kada se koncentracija glavnog psihohaktivnog sastojka razgradi do nivoa mikrotraga ili potpuno, čuvanje uzorka više nema forenzički značaj.
5. Metoda analize kanabis preparata primjenom tehnike hromatografije na tankom sloju može se uspješno primjeniti, kako za utvrđivanje kvalitativnog prisustva osnovnih kanabinoida tako i za semi-kvantitativnu analizu psihohaktivnog sastojka tetrahidrokanabinola, u odnosu na graničnu koncentraciju istog, definisanu odgovarajućim propisima. Prednost primjene ove metode u forenzičkim laboratorijama sa velikom frekvencijom uzorka ogleda se kako u ekonomičnosti tako i mogućnosti istovremene analize većeg broja uzorka, što doprinosi efikasnosti laboratorijskog rada.
6. Gasna hromatografija sa plameno jonizacionim detektorom (GC/FID) pogodna je za kvantitativnu analizu, dok je gasna hromatografija sa masenim detektorom (GC/MS), koja obezbjeđuje dvostruku identifikaciju – po retencionom vremenu i po masenom spektru, posebno pogodna za analizu tragova, kada zbog male količine uzorka nije moguće primjeniti druge analitičke tehnike. Selektivnost i specifičnost gasnohromatografskih metoda analize kanabinoida u ovom radu potvrđena je korištenjem ekstrakata biljnog materijala u različitim rastvaračima. Pri tome je utvrđena donja granica detekcije THC u uzorcima kod 0,008 mg/ml GC/FID metodom, i kod 0,0025 mg/ml GC/MS metodom, što je u oba slučaja preciznije od prihvatljive granice od 0,01 mg/ml.
7. Prilikom pripreme uzorka kanabisa za analizu veoma je važno posvetiti pažnju pojedinim fazama pripreme koje mogu da utiču na rezultat kvantitativnog određivanja

sadržaja kanabinoida u uzorku, kao što su izbor reprezentativnih dijelova bilje, homogenizacija i sušenje biljnog materijala, te postupak ekstrakcije. Jednako je važno optimalno podešavanje instrumentalnih parametara i provođenje instrumentalne analize, zbog čega je potrebno provesti niz eksperimenata prilikom kreiranja analitičke metode i potvrđivanja njene podobnosti za rutinsku primjenu u forenzičkoj laboratoriji.

8. Na osnovu komparacije rezultata analiza biljnog ekstrakta primjenom metode internog standarda i metode eksternog standarda konstatovano je da obe metode daju zadovoljavajuće rezultate. Iako je metoda internog standarda za nijansu preciznija, metodom eksternog standarda mogu se dobiti prihvatljivi rezultati, uz uslov ujednačenog injektiranja. Ujednačeno injektiranje obezbjeđuje se autosemplerom, mada se i ručno može postići zadovoljavajući kvalitet injektiranja.
9. Prema teoretskom konceptu efektivnog broja ugljenikovih atoma, zahvaljujući sroдnoj strukturi kanabinoida, kao indirektni standard za određivanje THC može se koristiti referentni standard CBN. Eksperimentalni rezultati, dobijeni korištenjem CBN u ovom radu, pokazali su veoma dobro slaganje sa teoretskim konceptom i eksperimentalnim rezultatima dostupnim u literaturi. Analogno, CBD bi se takođe mogao primjeniti kao indirektni standard za određivanje sadržaja THC u uzorcima kanabisa, nakon provedenih potrebnih eksperimenata.

7. LITERATURA

- Abioye, A., Ayodele, O., Marinkovic, A., Patidar, R., Akinwekomi, A. and Sanyaolu A. (2020) Δ9-Tetrahydrocannabivarin (THCV): a commentary on potential therapeutic benefit for the management of obesity and diabetes. *Journal of Cannabis Research*, 2(6), 1-6.
- Agatonovic-Kustrin, S. and Loescher, C.M. (2013) Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of *Calendula officinalis* using high resolution plate imaging and artificial neural network data modelling. *Analytica Chimica Acta*, 798, 103-108.
- Aizpurua-Olaizola, O., Soydiner, U., Öztürk, E., Schibano, D., Simsir, Y., Navarro, P., Etxebarria, N. and Usobiaga, A. (2016) Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of *Cannabis sativa* Plants from Different Chemotypes. *J. Nat. Prod.* 79(2), 324–331.
- Andre, C.M., Hausman, J-F and Guerriero, G. (2016) *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front. Plant Sci.* 7:19.
- Bell, S. (2006) *Forensic Chemistry*, West Virginia University-Pearson Education, New Jersey.
- Brenneisen, R. (2007) Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. In *Marijuana and the Cannabinoids*, ElSohly, M.A. (Ed.). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 17-49.
- Brown, T.D. (2003) Non-medical uses of *Cannabis sativa*. In *Cannabis: The Genus Cannabis*, Brown, D.T. (Ed.), Taylor & Francis, Amsterdam, pp 115-124.
- Callaway, J.C. (2004) Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140, 65-72.
- Carlin, M.G. and Dean, J.R. (2013) *Forensic Applications of Gas Chromatography*, CRC Press - Taylor & Francis Group, New York.
- Cascini, F., Aiello, C. and Di Tanna, G.L. (2012) Increasing Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ-9-THC) Content in Herbal Cannabis Over Time: Systematic Review and Meta-Analysis. *Current Drug Abuse Reviews*, 5(1), 32-40.

Cascio, M.G., Pertwee, R.G. and Marini, P. (2017) The Pharmacology and Therapeutic Potential of Plant Cannabinoids. In *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 207-225.

Center for Behavioral Health Statistic and Quality (CBHSQ). Drug Abuse Warning Network (DAWN). Data Spotlight. Emergency department visits involving marijuana among adolescents aged 15 to 17: increase from 2005 to 2010 varied by gender, November 13, 2012.

Chandra, S., Lata, H., Khan, I.A., and ElSohly, M.A. (2008) Photosynthetic response of *Cannabis sativa* L. to variations in photosynthetic photon flux densities, temperature and CO₂ conditions. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 14(4), 299–306.

Chandra, S., Lata, H., Khan, I.A., and ElSohly, M.A. (2011) Photosynthetic response of *Cannabis sativa* L., an important medicinal plant, to elevated levels of CO₂. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 17(3), 291–295.

Chinaka, S., Tanaka, S., Takayama, N., and Ueda, K. (2000) Analysis of Cannabinoids by HPLC Using a Post-Column Reaction with Fast Blue B Salt. *Japanese journal of science and technology for identification*, 5(1), 17-22.

Clarke, R.C. and Merlin, M.D. (2013) *Cannabis: Evolution and Ethnobotany*, University of California Press, Berkeley - Los Angeles - Lonodon.

Clarke, R.C. and Watson, D.P. (2007) Cannabis and Natural Cannabis Medicines. In *Marijuana and the cannabinoids*, ElSohly, M.A. (Ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 1-17.

Cole, M.D. (2003) *The Analysis of Controlled Substances*, John Wiley & Sons, Ltd., Anglia Polytechnic University, Cambridge, UK.

Cuttler, C., Spradlin, A., Cleveland, M.J. and Craft, R.M. (2020) Short- and Long-Term Effects of Cannabis on Headache and Migraine. *The Journal of Pain*, 21(5-6), 722-730.

Dasgupta, A. and Datta, P. (2008) Analytical Techniques for Measuring Concentrations of Therapeutic Drugs in Biological Fluids. In *Handbook of Drug Monitoring Methods*, Dasgupta, A. (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Yersey, pp. 67-86.

- Dawling, S. (2011) Gas Chromatography. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop, B. (Eds.), Pharmaceutical Press, London, pp. 636-717.
- De Backer, B., Maebe, K., Verstraete, A.G. and Charlier, C. (2012) Evolution of the Content of THC and Other Major Cannabinoids in Drug-Type Cannabis Cuttings and Seedlings During Growth of Plants. *J Forensic Sci*, 57(4), 918-922.
- De la Fuente, A., Zamberlan, F., Ferrán, A.S., Carrillo, F., Tagliazucchi, E. and Pallavicini, C. (2020) Relationship among subjective responses, flavor, and chemical composition across more than 800 commercial cannabis varieties, *Journal of Cannabis Research*, 2(21), 1-18.
- De Meijer, E.P.M., van der Kamp, H.J. and van Eeuwijk, F.A. (1992) Characterisation of Cannabis accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica* 62, 187-200.
- De Meijer, E.P.M., Hammond, K.M. and Micheler, M. (2009) The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (III): variation in cannabichromene proportion. *Euphytica*, 165, 293–311.
- Denić, K., Rusić, B., Antunović, M., Đorđević, S., Nešić, V. i Kilibarda, V. (2013) Imunohromatografski skrining urina. Uzroci lažno pozitivnih i negativnih rezultata. *Medicinska revija*, 5(4), 385-389.
- Devinsky, O., Cilio, M.R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W.G. (2014) Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55(6), 791–802.
- Devsí, A., Kiyota, B., Ouellette, T., Hegle, A. P., Rivera-Acevedo, R.E., Wong, J., Dong, Y., Pugsley, M.K. and Fung, T. (2020) A pharmacological characterization of *Cannabis sativa* chemovar extracts. *Journal of Cannabis Research*, 2(17), 1-13.
- Di Forti, M., Sallis, H., Allegri, F., Trotta, A., Ferraro, L., Stilo, S.A., Marconi, A., La Cascia, C., Marques, T.R., Pariante, C., Dazzan, P., Mondelli, V., Paparelli, A., Kolliakou, A., Prata, D., Gaughran, F., David, A.S., Morgan, C., Stahl, D., Khondoker, M., MacCabe, J.H. and Murray, R.M. (2014) Daily Use, Especially of High-Potency Cannabis, Drives

the Earlier Onset of Psychosis in Cannabis Users. *Schizophrenia Bulletin*, 40(6), 1509–1517.

Di Forti, M., Marconi, A., Carra, E., Fraietta, S., Trotta, A., Bonomo, M., Bianconi, F., Gardner-Sood, P., O'Connor, J., Russo, M. (2015) Proportion of patients in south London with first-episode psychosis attributable to use of high potency cannabis: a case-control study. *Lancet Psychiatry*, 2, 233-238.

Dragoljić, M. (2002) Konoplja kao droga. *Vještak – časopis Udruženja sudske vještaka Republike Srpske*, 5, 169-175.

Dragoljić M. (2012) Magistarski rad *Promjena koncentracije tetrahidrokanabinola sa vremenom kao indikator kvaliteta uzorka biljke Cannabis sativa L.*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Banja Luci.

Dragoljić, M., Škundrić, B., Penavin-Škundrić, J. i Matić, V. (2013) Kinetika reakcije razlaganja tetrahidrokanabinola u uzorcima marihuana. *Zbornik radova III međunarodnog naučnog kongresa „Inženjerstvo, ekologija i materijali u procesnoj industriji“*, Jahorina, Bosna i Hercegovina – Republika Srpska, 708-718.

Dragoljić, M. i Vasić-Dakić, B. (2014) Karakteristike istrage ilegalnih laboratorijskih za proizvodnju marijuane – naučni pristup. *Zbornik radova VI međunarodne naučne konferencije “Savremeni materijali 2013”*, Banja Luka, Bosna i Hercegovina – Republika Srpska, knjiga 22, 397-406.

Dragoljić, M., Rodić-Grabovac, B., Vasiljević, Lj., Matić, V. Simurdić, Lj. (2016) Psihoaktivni potencijal uzorka marijuane u Republici Srpskoj. *Zbornik radova međunarodnog naučnog skupa „XI Savjetovanje hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske“*, Teslić, Bosna i Hercegovina – Republika Srpska, 67-74.

Dragoljić, M., Matić, V., Simurdić, Lj. (2017) Validacija metode za identifikaciju kanabisa tehnikom gasne hromatografije. *Journal of Engineering & Processing Management*, 9(1), 50-55.

Dragoljić, M.M., Rodić-Grabovac, B.B., Vasiljević, Lj.C., Matić, V.Č. and Simurdić, Lj.O. (2018) Trend of the psychoactive potential of *Cannabis sativa* L. plant samples. *Kragujevac J. Sci.* 40, 143-151.

Dragoljić, M., Matić, V., Simurdić, Lj., Šmitran, G. (2019a) Testiranje učesnika u saobraćaju na prisustvo droga, *Zbornik radova međunarodnog naučnog skupa „XII Savjetovanje hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske“*, 2-3 Novembar 2018, Teslić, Bosna i Hercegovina – Republika Srpska, 59-67.

Dragoljić, M.M., Rodić-Grabovac, B.B., Vasiljević, C.Lj., Matić, Č.V., Simurdić, O.Lj. (2019b) The content of basic cannabinoids and their mutual ratios in *Cannabis sativa* L. plant. *Acta periodica technologica*, 50, 59-68.

Dragoljić, M., Rodić-Grabovac, B., Vasiljević, Lj., Matić, V., Simurdić, Lj. (2020) Identifikacija osnovnih kanabinoida tehnikom gasne hromatografije sa masenim detektorom – validacija metode. *Zbornik radova XII međunarodne naučne konferencije “Savremeni materijali 2019”*, Banja Luka, Bosna i Hercegovina – Republika Srpska, knjiga 43, 149-161.

Dujourdy, L. and Besacier, F. (2017) A study of Cannabis potency in France over a 25 years period (1992-2016). *Forensic Science International*, 272, 72–80.

ElSohly, M.A., Holley, J.H., Lewis, G.S., Russell, M.H. and Turner, C.E. (1984) Constituents of *Cannabis sativa* L. XXIV: The Potency of Confiscated Marijuana, Hashish, and Hash Oil Over a Ten-Year Period. *Journal of Forensic Sciences*, 29(2), 500-514.

ElSohly, M.A., Ross, S.A., Mehmedic, Z., Arafat, R., Yi, B. and Banahan, B.F. (2000) Potency trends of D9-THC and other cannabinoids in confiscated marijuana from 1980–1997. *Journal of Forensic Sciences*, 45(1), 24–30.

ElSohly, M.A. and Slade, D. (2005) Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78, 539-548.

ElSohly, M.A., Stanford, D.F. and Murphy, T.P. (2007) Chemical Fingerprinting of Cannabis as a Means of Source Identification. In *Marijuana and the Cannabinoids*, ElSohly, M.A. (Ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 51-66.

ElSohly, M.A., Mehmedic, Z., Foster, S., Gon, C., Chandra, S. and Church, J.C. (2016) Changes in Cannabis Potency over the Last Two Decades (1995-2014) - Analysis of Current Data in the United States, *Biological Psychiatry*, 79(7), 613-619.

ElSohly, M.A., Radwan, M.M., Gul, W., Chandra, S. and Galal, A. (2017) Phytochemistry of *Cannabis sativa* L., In *Phytocannabinoids*, Kinghorn, A.D., Falk, H., Gibbons, S. and

- Kobayashi, J. (Eds.), Progress in the chemistry of organic natural products, Vol. 103, (pp. 1-36), Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Elzinga, S., Fischedick, J., Podkolinski, R. and Raber, J.C. (2015) Cannabinoids and Terpenes as Chemotaxonomic Markers in Cannabis. *Nat Prod Chem Res*, 3(4), 1-9.
- European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) Drugs Working Group (2003) *Guidelines on Representative Drug Sampling*. ENFSI, The Hague.
- European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) Drugs Working Group (2014) *Guidelines on Sampling of Illicit Drugs for Quantitative Analysis*. ENFSI.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) and Europol (2016) *EU Drug Markets Report: In-Depth Analysis*, Publications Office of the European Union, Luxembourg, pp. 55-71.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2018a) *European drug report 2018: Trends and developments*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
Retrieved December 26, 2018 from http://www.emcdda.europa.eu/publications-database_en?f%5B0%5D=field_pub_date%3A2018
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2018b) *Bosnia and Herzegovina, National drug situation report 2017*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
Retrieved December 26, 2018 from http://www.emcdda.europa.eu/publications-database_en?f%5B0%5D=field_pub_date%3A2018
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) (2018c) *Statistical bulletin 2018*. Retrieved 04 July 2018 from
<http://www.emcdda.europa.eu/data/stats2018/ppp>.
- Fetterman, P.S., Keith, E.S., Waller, C.W., Guerrero, O., Doorenbos, N.J. and Quimby, M.W. (1971) Mississippi-Grown *Cannabis sativa* L.: Preliminary Observation on Chemical Definition of Phenotype and Variations in Tetrahydrocannabinol Content versus Age, Sex, and Plant Part. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(8), 1246-1249.

- Fischedick, J.T., Glas, R., Hazekamp, A. and Verpoorte, R. (2009) A Qualitative and Quantitative HPTLC Densitometry Method for the Analysis of Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis*, 20, 421–426.
- Fischedick, J.T., Hazekamp, A., Erkelens, T., Choi, Y.H. and Verpoorte, R. (2010) Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71, 2058–2073.
- Fischedick, J.T. (2017) Identification of Terpenoid Chemotypes Among High (-)-trans-D9-Tetrahydrocannabinol-Producing *Cannabis sativa* L. Cultivars. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 34-47.
- Freeman, T.P. and Winstock, A. R. (2015) Examining the profile of high-potency cannabis and its association with severity of cannabis dependence. *Psychological Medicine*, 45, 3181–3189.
- Freeman, T.P., Groshkova, T., Cunningham, A., Sedefov, R., Griffiths, P. & Lynskey, M.T. (2018) Increasing potency and price of cannabis in Europe 2006–16, *Addiction*, 114(6), 1015–1023.
- Galand, N., Ernouf, D., Montigny, F., Dollet, J. and Pothier, J. (2004) Separation and Identification of Cannabis Components by Different Planar Chromatography Techniques (TLC, AMD, OPLC). *Journal of Chromatographic Science*, 42: 130-134.
- Gardner, E.L. (2014) Cannabinoids and Addiction. In *Handbook of Cannabis*, Pertwee, R. (Ed.), Oxford universitu press, Oxford, UK, pp 173-188.
- Garg, U. (2008) Hair, Oral Fluid, Sweat, and Meconium Testing for Drugs of Abuse. In *Handbook of Drug Monitoring Methods*, Dasgupta, A. (Ed.), Humana Press Inc. Totowa, New Yersey, pp. 337-364.
- Gill, R. (1986) High Pressure Liquid Chromatography. In *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material*, Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S. and Widdop, B. (Eds.), The Pharmaceutical Press, London, pp. 201-220.
- Gorelick, J. and Bernstein, N. (2017) Chemical and Physical Elicitation for Enhanced Cannabinoid Production in Cannabis. In *Cannabis sativa* L. – *Botany and*

- Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 439-456.
- Goutam, S., Goutam, M.P., and Yadav, P. (2015) Thin Layer Chromatographic Analysis of Psychoactive Plant *Cannabis Sativa L.* *International Journal of Multidisciplinary Approach and Studies*, 2(6), 166-175.
- Grassi, G. and McPartland, J. (2017) Chemical and Morphological Phenotypes in Breeding of *Cannabis sativa L.* In *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 137-160.
- Green, G. (2001) *The Cannabis Grow Bible. The Definitive Guide to Growing Marijuana for Recreational and Medicinal Use*, Green Candy Press, San Francisco.
- Hazekamp, A. (2008-2009) *Cannabis Review*, Leiden Univeristy, Leiden, The Netherlands.
- Hazekamp, A., Fischedick, J.T., Llano Díez, M., Lubbe, A. and Ruhaak, R.L. (2010) Chemistry of Cannabis. In *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, Volume 3, Mander, L. and Lui, H.-W. (Eds.), Elsevier, Oxford, pp.1033–1084.
- Hazekamp, A., Tejkalova, K., Papadimitriou, S. (2016) Cannabis: From Cultivar to Chemovar II – A Metabolomics Approach to Cannabis Classification. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 202-215.
- Hillig, K.W. and Mahlberg, P.G. (2004) A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (*Cannabaceae*). *Am J. Bot.* 91(6), 966-975.
- Houck, M.M. and Siegel, J.A. (2015) *Fundamentals of forensic science*, Academic Press – Elsevier, Oxford.
- Institut za akreditovanje Bosne i Hercegovine (BATA) (2014) *Uputstvo za validaciju metoda za ispitivanje i kalibraciju – opšti zahtjevi* (OD 07-07).
- Institut za akreditovanje Bosne i Hercegovine (BATA) (2017) *Pravila za prihvatljivu sljedivost mjerena* (OD 07-03).
- Institut za standardizaciju Bosne i Hercegovne (2006) *Opšti zahtjevi za kompetentnost ispitnih i kalibracionih laboratorijskih mjerila* (BAS EN ISO/IEC 17025:2006).

International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) (2002) *Guidelines for forensic science laboratories* (ILAC-G19: 2002).

International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) (2013) *Policy on the Traceability of Measurement Results* (ILAC P10:01/2013).

Iversen, L.L. (2000) *The Science of Marijuana*, Oxford University Press, New York.

Iseger, T.A., and Bossong, M.G. (2015) A systematic review of the antipsychotic properties of cannabidiol in humans. *Schizophr. Res.* 162, 153–161.

Jokanović, V. (2014) *Instrumentalne metode: ključ razumevanja nanotehnologije i nanomedicine*, Inženjerska akademija Srbije i Institut za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd, pp. 521-573.

Kalász, H. and Báthori, M. (2000) Basis and pharmaceutical applications of thin-layer chromatography. In *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification*, Valko, K. (Ed.), *Handbook of Analytical Separations*, Vol. 1, Smith, R.M. (Series Ed.), Elsevier, Amsterdam, 439-501.

Kallawicha, K., Bunyapraphatsara, N., Wilairat, P. and Panvisavas, N. (2008) Survey of *Cannabis sativa* L. “Fiber Type” Cultivated in Thailand Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry Data. *SWU Sci. J.* 24(1), 153-164.

Katritzky, A.R., Ignatchenko, E.S., Barcock, R.A., Lobanov, V.S. and Karelson, M. (1994) Prediction of Gas Chromatographic Retention Times and Response Factors Using a general Quantitative Structure – Property Relationship Treatment. *Analytical Chemistry*, 66 (11), 1799-1807.

Khan, J.V.I., Kennedy, T.J. and Christian, D.R. (2012) *Basic Principles of Forensic Chemistry*, Humana Press, New York, pp. 145-156.

King, L.A., Carpentier, C. and Griffiths, P. (2004) *An overview of cannabis potency in Europe*, Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg, pp 29-41.

King, L.A. (2009) *Forensic Chemistry of Substance Misuse - A Guide to Drug Control*, RSC Publishing, Cambridge, UK.

Kupiec, T. and Kemp, P. (2011) High Performance Liquid Chromatography. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop B. (Eds.), Pharmaceutical Press, London. pp. 718-757.

Kwong, C.T. (2008) Introduction to Drugs of Abuse Testing and Clinical False-Positive Drug Test Results. In *Handbook of Drug Monitoring Methods* Dasgupta, A. (Ed.), Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, pp. 297-315, 395-406.

Leach, H. and Ramsey, J.D. (1986) Gas Chromatography. In *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material*, Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S. and Widdop, B. (Eds.), The Pharmaceutical Press, London, pp. 178-200.

Lee, G.D. (2005) *Global Drug Enforcement: Practical Investigative Techniques*, CRC Press – Boca Raton, London – New York – Washington, D.C.

Leggett, T. (2006) Review of the world cannabis situation. *Bulletin on Narcotics*, Vol. LVIII (1 and 2, 2006), UNODC – Vienna, United Nations, New York.

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. *Translational Psychiatry* 2, e94.

Luterotti, S. (2014) *Uvod u kemiju analizu*, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, pp. 198-251.

Mahlberg, G.P. & Kim, E.S. (2004) Accumulation of Cannabinoids in Glandular Trichomes of Cannabis (*Cannabaceae*). *Journal of Industrial Hemp*, 9(1), 15-36.

Maksimović, R., Bošković, M. i Todorić, U. (1998) *Metode fizike, hemije i fizičke hemije u kriminalistici*, Policijska akademija, Beograd.

Marjanović, N. (2001) *Instrumentalne metode analize I/I. Metode razdvajanja*, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Banja Luci.

Martin, B.R. (2007) The Endocannabinoid System and the Therapeutic Potential of Cannabinoids. In *Marijuana and the Cannabinoids*, ElSohly, M.A. (Ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 124-143.

Martin, A. and Rashidian, N. (2014) *A new Leaf: The End of Cannabis Prohibition*, The New Press, New York.

Matić, V., Dragoljić, M. i Simurdic, Lj. (2018) Validacija metode za identifikaciju kanabisa tehnikom tankoslojne hromatografije. Zbornik radova X međunarodne naučne konferencije „Savremeni materijali 2017“, 9-10 Novembar 2017, Banja Luka, knjiga 35, 479-488.

McDermott, S.D. (2011) Drugs of Abuse. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop, B. (Eds.), Pharmaceutical Press, London. pp. 190-207.

McLaren, J., Swift, W., Dillon, P. and Allsop, S. (2008) Cannabis potency and contamination: a review of the literature. *Addiction* 103, 1100-1109.

McNair, H.M. and Miller, J.M. (2009) *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, New Jersey.

McPartland, J.M. and Russo, E.B. (2001) Cannabis and Cannabis Extracts: Greater Than the Sum of Their Parts? *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1(3/4), 103-132.

McPartland, J.M. (2018) Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 3(1), 203-212.

Mechoulan, R. and Ben-Shabat, S. (1999) From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: the ongoing story of cannabis. *Nat. Prod. Rep.* 16, 131-143.

Mehmedic, Z., Chandra, S., Slade, D., Denham, H., Foster, S., Patel, A.S., Ross, S.A., Khan, I.A. and ElSohly, M.A. (2010) Potency Trends of Δ9-THC and Other Cannabinoids in Confiscated Cannabis Preparations from 1993 to 2008. *Journal of Forensic Science*, 55(5), 1209-1217.

Moffat, A.C. (1986) Thin-layer Chromatography. In *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material*, Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S. and Widdop, B. (Eds.), The Pharmaceutical Press, London, pp. 160-177.

Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S. and Widdop, B. (1986) *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material*, The Pharmaceutical Press, London, pp. 423-425.

Moeller, K.E., Lee, K.C., and Kissack, J.C. (2008) Urine drug screening: Practical Guide for Clinicians. *Mayo Clin Proc.* 83(1), 66-76.

Mohammad, A., Bhawani, S.A., and Sharma, S. (2010) Analysis of Herbal Products by Thin-layer Chromatography: A Review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, V1(2), 1-50.

Nie, B., Henion, J., Ryona, I. (2019) The Role of Mass Spectrometry in the Cannabis Industry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 30(5), 719–730.

Niedbala, R.S. and Gonzalez, J.M. (2011) Immunoassays. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop, B. (Eds.), Pharmaceutical Press, London, pp. 496-506.

Nielsen, S., Germanos, R., Weier, M., Pollard, J., Degenhardt, L., Hall, W., Buckley, N. and Farrell, M. (2018), The Use of Cannabis and Cannabinoids in Treating Symptoms of Multiple Sclerosis: a Systematic Review of Reviews. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 18:8.

Niesink, R.J.M., Righter, S., Koeter, M.W. and Brunt, T.M. (2015) Potency trends of Δ9-THC, cannabidiol and cannabinol in cannabis in the Netherlands: 2005-2015. *Addiction*, 110(12), 1941-1950.

Onofri, C. and Mandolino, G. (2017) Genomics and Molecular Markers in *Cannabis sativa* L. In: *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 319-342.

Petrović, P. S. (1989) *Droga i ljudsko ponašanje*, NIRO Dečje Novine, Gornji Milanovac.

Pijlman, F.T.A., Rigter, S.M., Hoek, J., Goldschmidt, H.M.J. and Niesnik, R.J.M. (2005) Strong increase in total delta-THC in cannabis preparations sold in Dutch coffee shops. *Addiction Biology*, 10, 171-180.

Piomelli, D. and Russo, E.B. (2016) The *Cannabis sativa* Versus *Cannabis indica* Debate: An Interview with Ethan Russo, MD. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 44-46.

Piomelli, D., Haney, M., Budney, A.J., Piazza, P.V. (2016) Roundtable discussion: legal or illegal, Cannabis is still addictive. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 47–53.

- Piomelli, D., Solomon, R., Abrams, D., Balla, A., Grant, I., Marcotte, T., Yoder, J. (2019) Regulatory Barriers to Research on Cannabis and Cannabinoids: A Proposed Path Forward, *Cannabis and Cannabinoid Research*, 4(1), 21–32.
- Piluzza, G., Delogu, G., Cabras, A., Marceddu, S. and Bullitta, S. (2013) Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa L.*) from a collection of wild and domesticated accessions. *Genet Resour Crop Evol*, 60, 2331-2342.
- Pollio, A. (2016) The Name of Cannabis: A Short Guide for Nonbotanists. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 234-238.
- Poole, C.F. (2011) Thin-layer Chromatography. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop, B. (Eds.), Pharmaceutical Press, London, pp. 600-635.
- Poortman van der Meer, A.J. and Huizer, H. (1999) A contribution to the improvement of accuracy in the quantitation of THC. *Forensic Science International*, 101, 1-8.
- Potter, D.J., Clark, P. and Brown, M.B. (2008) Potency of Δ9-THC and Other Cannabinoids in Cannabis in England in 2005. *Journal of Forensic Science*, 53(1), 90-94.
- Potter, D.J. and Duncombe, P. (2012) The Effect of Electrical Lighting Power and Irradiance on Indoor-Grown Cannabis Potency and Yield. *Journal of Forensic Science*, 57(3) 618-622.
- Potter, D.J. (2014) Cannabis horticulture. In *Handbook of Cannabis*, Pertwee, R. (Ed.), Oxford universitu press, Oxford, pp 65-88.
- Radwan, M.M., ElSohly, M.A., El-Alfy, A.T., Ahmed, S.A., Slade, D., Husni, A.S., Manly, S.P., Wilson, L., Seale, S., Cutler, S.J. and Ross, S.A. (2015) Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency Cannabis sativa. *J Nat Prod*, 78(6), 1271-1276.
- Radwan, M.M., Wanas, A.S., Chandra, S. & ElSohly, M.A. (2017) Natural cannabinoids of cannabis and methods of analysis, In *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp. 161-182.

- Raman, A. (2003) The Cannabis Plant: Botany, Cultivation and processing for use. In *Cannabis: The Genus Cannabis*, Brown, D.T. (Ed.), Taylor & Francis, Amsterdam, pp 29-50.
- Raman, A. and Joshi, A. (2003) The Chemistry of Cannabis. In *Cannabis: The Genus Cannabis*, Brown, D.T. (Ed.), Taylor & Francis, Amsterdam, pp. 55-70.
- Raman, V., Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A. and ElSohly, M.A. (2017) Morpho-Anatomy of Marijuana (*Cannabis sativa L.*). In *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 123-136.
- Romano, L.L. and Hazekamp, A. (2013) Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids*, 7(1), 1-11.
- Ross, S.A. and ElSohly, M.A. (1997) CBN and Δ9-THC concentration ratio as an indicator of the age of stored marijuana samples. *Bulletin on Narcotics*, Vol. XLIX and L, 139-147.
- Ross, S.A., Mehmedic, Z., Murphy, T.P., and ElSohly, M.A. (2000) GC-MS analysis of the total Δ9-THC content of both drug- and fiber-type Cannabis seeds. *J. Anal. Toxicol.* 24, 715–717.
- Ross, S.A., ElSohly, M.A., Sultana, G.N.N., Mehmedic, Z., Hossain, C.F., and Chandra, S. (2005) Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa L.* *Phytochem. Anal.* 16, 45–48.
- Russo, E.B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1344–1364.
- Russo, E.B. (2017) History of Cannabis as Medicine: Nineteenth Century Irish Physicians and Correlations of Their Observations to Modern Research. In *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 63.
- Rymanowski, M. (2014) Cannabis – review of the issues related to determination of the total content of delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ-9-THC) and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (Δ-9-THCA-A). *Problemy Kryminalistyki*, 285(3), 1-18.
- Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) (2005) *Marijuana*. Retrieved October 21, 2015 from <http://swgdrug.org>.

Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG) (2016) *Recommendations*, Version 7.1. Retrieved August 26, 2016 from <http://swgdrug.org>.

Sevigny, E.L. (2013) Is today's marijuana more potent simply because it's fresher? *Drug Testing and Analysis*, 5, 62–67.

Sexton, M. and Ziskind, J. (2013) *Sampling Cannabis for Analytical Purposes*, BOTEC Analysis Corporation.

Sharma, P., Bharath, M.M.S. and Murthy, P. (2010) Qualitative high performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in urine samples of Cannabis abusers. *Indian J Med Res*, 132, 201-208.

Siegel, J.A. (2005) Forensic Identification of Illicit Drugs. In *Forensic Science Handbook*, Saferstein, R. (Eds.), Pearson, New Jersey, pp. 111-174.

Singh, G. (2010) *Plant Systematics – An Integrated Approach*, Science Publishers, Enfield, NH, USA.

Sirikantaramas, S. and Taura, F. (2017) Cannabinoids: Biosynthesis and Biotechnological Applications. In *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, Chandra, S., Lata, H. and ElSohly, M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 183-206.

Small, E. (2015) Evolution and Classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *Bot. Rev.* 81, 189-294.

Small, E. (2017a) *Cannabis: a complete guide*, CRC Press, Taylor & Francis, London, New York.

Small, E. (2017b) Classification of Cannabis sativa L. in Relation to Agricultural, Biotechnological, Medical and Recreational Utilization. In *Cannabis sativa L. – Botany and Biotechnology*, Chandra, S.; Lata, H. and ElSohly M.A. (Eds.), Springer International Publishing, Cham, Switzerland, pp 1-62.

Stafford, D.T. (2005) Forensic Capillary Gas Chromatography. In *Forensic Science Handbook*, Saferstein, R. (Ed.), Pearson, New Jersey, pp. 81-109.

- Stambouli, H., El Bouri, A., Bellimam, M.A., Bouayoun, T. and El Karni, N. (2005) Cultivation of *Cannabis sativa* L. in northern Morocco. *Bulletin on Narcotics*, Vol. LVII, No 1 and 2, 79-118.
- Swift, W., Wong, A., Li, K.M., Arnold, J.C. and McGregor, I.S. (2013) Analysis of Cannabis Seizures in NSW, Australia: Cannabis Potency and Cannabinoid Profile. *Plos One* 8(7): e70052.
- Terrell, A., Clarke, W., Evans, M. and Collins, J. (2008) Providing Expert Witness for Alcohol and Positive Drugs of Abuse Test Results. In *Handbook of Drug Monitoring Methods*, Dasgupta, A. (Ed.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp. 407-420.
- Thomas, M. (2012) *Cannabis Cultivation - A Complete Grower's Guide*, Green Candy Press, San Francisco, CA.
- Thomas, B.F. and ElSohly, M.A. (2016) *The Analytical Chemistry of Cannabis*, Elsevier, Amsterdam.
- Tipparat, P., Natakankitkul, S., Chamnivikaipong, P. and Chutiwat, S. (2012) Characteristics of cannabinoids composition of Cannabis plants grown in Northern Thailand and its forensic application. *Forensic Science International*, 215, 164–170.
- Tipparat, P., Kunkaew, W., Julsrigival, S., Pinmanee, S., Natakankitkul, S. (2014) Classification of Cannabis Plants Grown in Northern Thailand using Physico-Chemical Properties. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(4), 46-54.
- Tomida, I., Pertwee, R.G. and Azuara-Blanco, A. (2004) Cannabinoids and glaucoma. *Br J Ophthalmol*, 88, 708-713.
- Toonen, M., Ribot, S. and Thissen, J. (2006) Yield of Illicit Indoor Cannabis Cultivation in The Netherlands. *J. Forensic Sci.* 51(5), 1050-1054.
- Trofin, I.G., Vlad, C.C., Dabija, G., Filipescu, L. (2011) Influence of Storage Conditions on the Chemical Potency of Herbal Cannabis. *Rev. Chim.* 62(6), 639-645.
- Trofin, I.G., Dabija, G., Vaireanu, D.I., Filipescu, L. (2012a) Long-term Storage and Cannabis Oil Stability. *Rev. Chim.* 63(3), 293-297.

- Trofin, I.G., Dabija, G., Vaireanu, D.I., Filipescu, L. (2012b) The Influence of Long-term Storage Conditions on the Stability of Cannabinoids derived from Cannabis Resin. *Rev. Chim.* 63(4), 422-427.
- Trullols, E., Ruisánchez, I. and Rius, F.X. (2004) Validation of qualitative analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(2), 137-145.
- Tsumura, Y., Aoki, R., Tokieda, Y., Akutsu, M., Kawase, Y., Kataoka, T., Takagi, T., Mizuno, T., Fukada, M., Fujii, H. and Kurahashi, K. (2012) A survey of the potency of Japanese illicit cannabis in fiscal year 2010. *Forensic Science International*, 221(1-3), 77-83.
- Turner, C.E., Hadley, K.W., Fetterman, P.S., Doorenbos, N.J., Quimby, M.W., Waller, C. (1973) Constituents of *Cannabis sativa* L. IV: Stability of cannabinoids in stored plant material. *J Pharm Sci*, 62(10), 1601–1605.
- Turner, C.E. and ElSohly, M.A. (1979) Constituents of *Cannabis sativa* L.: XVI. A possible decomposition pathway of Δ9-tetrahydrocannabinol to cannabinol, *J. Heterocyclic Chem.* 37, 1667-1668.
- United Nations: *Single Convention on Narcotic Drugs* (1961). *Convention on Psychotropic Substances* (1971).
- United Nations International Drug Control Programme (UNIDCP) – Vienna (1994) *Rapid Testing Methods of Drugs of Abuse*, United Nations, New York.
- United Nations Office on Drug and Crime - Laboratory and Scientific Section (UNODC-LSS) (2003) *Terminology and Information on Drugs*, 2nd ed., United Nations, New York.
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2006) *World Drug Report 2006*, United Nations, New York, pp 172-185.
- United Nations Office on Drugs and Crime - Laboratory and Scientific Section (UNODC-LSS) and European Network of Forensic Science Institutes - Drugs Working Group (ENFSI - DWG) (2009) *Guidelines on Representative Drug Sampling*, United Nations, New York.
- United Nations Office on Drug and Crime - Laboratory and Scientific Section (UNODC - LSS) (2009a) *Recommended Methods for the Identification and Analisys Cannabis and Cannabis Products*, United Nations, New York.

United Nations Office on Drugs and Crime - Laboratory and Scientific Section (UNODC-LSS) (2009b) *Guidance for the Implementation of a Quality Management System in Drug Testing Laboratories*, United Nations, New York.

United Nations Office on Drugs and Crime - Laboratory and Scientific Section (UNODC-LSS) (2009c) *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimen*, United Nations, New York.

United Nations Office for Drug and Crime (UNODC) (2011) *World Drug Report 2011*, United Nations, pp. 175-206.

United Nations Office for Drug and Crime (UNODC) (2012) *World Drug Report 2012*, United Nations, pp. 2-3, 43-50.

United Nations Office on Drug and Crime (UNODC) (2013a) The challenge of new psychoactive substances. In *Report from the Global SMART Programme*, United Nations.

United Nations Office on Drug and Crime (UNODC) (2013b) *World Drug Report 2013*, United Nations, pp. 24-29.

United Nations Office for Drug and Crime (UNODC) (2014a) *The Illicit Drug Trade Through South-Eastern Europe*, United Nations, pp. 98-107.

United Nations Office for Drug and Crime (UNODC) (2014b) *World Drug Report 2014*, United Nations, pp. 39- 43.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2015) *World Drug Report 2015*, United Nations, pp. 57-66.

United Nations Office on Drug and Crime (UNODC) (2016a) *Terminology and Information on Drugs*, 3rd ed., United Nations, New York.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2016b) *World Drug Report 2016*, United Nations, New York, pp 43-51.

United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2017) *World Drug Report 2017*, United Nations: New York, pp 37-56.

United Nations Office on Drugs and Crime (2018) *World drug report 2018*. United Nations publication. Retrieved December 26, 2018 from <https://www.unodc.org/wdr2018>

Upton, R., Craker, L., ElSohly, M., Romm, A., Russo, E. and Sexton, M. (Eds. and Technical Advisors) (2013) Cannabis Inflorescence and Leaf. In *American Herbal Pharmacopoeia* (AHP), Scott's Valley, CA, USA.

Vanhove, W., Van Damme, P. and Meert, N. (2011) Factors determining yield and quality of illicit indoor cannabis (*Cannabis spp.*) production. *Forensic Science International*, 212, 158–163.

Vanhove, W., Surmont, T., Van Damme, P., De Ruyver, B. (2012) Yield and turnover of illicit indoor cannabis (*Cannabis spp.*) plantations in Belgium, *Forensic Science International*, 220, 265–270.

Vlada Republike Srpske (2016) *Strategija nadzora nad opojnim drogama i suzbijanje opojnih droga u Republici Srpskoj za period od 2016. do 2021.godine*.

Volkow, N.D., Baler, R.D., Compton, W.M. and Weis, S.R.B. (2014) Adverse health effect of marijuana use. *N Engl J Med.* 370 (23), 2219-2227.

Volkow, N.D., Swanson, J.M., Evins, A.E., DeLisi, L.E., Meier, M.H., Gonzalez, R. Bloomfield, M.A.P., Curran, H.V., Baler, R. (2016) Effects of Cannabis Use on Human Behavior, Including Cognition, Motivation and Psychosis: A Review. *JAMA Psychiatry*, 73(3), 292-297.

Watson, D. (2011) Mass Spectrometry. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop, B. (Eds.), Pharmaceutical Press, London, pp. 577-593.

Weizman, L., Dayan, L., Brill, S., Nahman-Averbuch, H., Hendler, T., Jacob, G. And Sharon, H. (2018) Cannabis analgesia in chronic neuropathic pain is associated with altered brain connectivity. *Neurology*, 2018, 91(14), e1285-e1294.

Widdop, B. (2011) Colour Tests. In *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop, B. (Eds.), Pharmaceutical Press, London, pp. 471-495.

World Health Organization (WHO) Expert Committee on Drug Dependence (ECDD) (2018) *Pre-Review – delta-9-tetrahydrocannabinol*, WHO Document Production Services, Geneva.

- Yang, Y., Lewis, M. M., Bello, A.M., Wasilewski, E., Clarke, H.A. and Kotra, L.P. (2017) Cannabis sativa (Hemp) Seeds, D9-Tetrahydrocannabinol, and Potential Overdose. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 274-281.
- Zadora, G. and Zuba, D. (2009) Gas Chromatography in Forensic Science. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons.
- Zamengo, L., Frison, G., Bettin, C. and Sciarrone, R. (2013) Variability of cannabis potency in the Venice area (Italy): A survey over the period 2010–2012. *Drug Testing and Analysis*.
- Živanović, Lj. (2003) *Odabrane metode za farmaceutsku analizu*, Nijansa, Zemun, pp. 137-223.
- Zakon o sprečavanju i suzbijanju zloupotrebe opojnih droga sa Listom opojnih droga i psihotropnih supstanci, biljaka iz kojih se može dobiti opojna droga i prekursora (Službeni glasnik Bosne i Hercegovine broj 08/06, 103/08 i 51/11).

BIOGRAFIJA

Mirjana Dragoljić je rođena 16.02.1963. godine u Goraždu. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Banja Luci. Diplomirala je na Tehnološkom fakultetu u Banja Luci, Hemijsko-tehnološki odsjek, na katedri Konstrukcioni materijali i koroziona zaštita, sa temom „Uticaj nekih dodataka na hemijsko niklovanje aluminijuma iz kiselih elektrolita“, pod nadzorom prof. dr Đurađa Davidovića. Magistarski rad na temu „Promjena koncentracije tetrahidrokanabinola sa vremenom kao indikator kvaliteta uzorka biljke *Cannabis sativa L.*“ odbranila je na Tehnološkom fakultetu u Banja Luci, pod mentorstvom prof. dr Jelene Penavin Škundrić.

Od 1990. godine radila je na poslovima profesora hemije u Srednjoškolskom centru u Ključu i Elektrotehničkoj školi u Banjaluci. U Ministarstvu unutrašnjih poslova Republike Srpske zaposlena je od 1993. godine, kao profesor hemije u Srednjoj školi za unutrašnje poslove u Banja Luci. Od 1994. godine radila je u Kriminalističko-tehničkom centru na poslovima vještaka za hemijska ispitivanja i rukovodioca laboratorija, a od 2003. do 2013. godine obavljala je poslove načelnika Kriminalističko-tehničkog centra. Od novembra 2013. godine raspoređena je na poslove stručnog savjetnika u kabinetu direktora policije. Za sudskog vještaka hemijske struke imenovana je 1995. godine. Od 2010. godine je član komisije za imenovanje vještaka hemijsko-tehnološke struke pri Ministarstvu pravde. Kao stručni edukator sarađuje sa Centrom za edukaciju sudija i javnih tužilaca od 2005. godine, a 2017. godine je imenovana za stalnog edukatora tog Centra.

Učestvuje u procesu edukacije kadrova Ministarstva unutrašnjih poslova, kao saradnik u izradi nastavnih planova i programa, te izvođenjem teorijske i praktične nastave iz oblasti primjenjene hemije, kriminalističke tehnike i forenzičke, za različite nivoe obuke. Od 2006. do 2016. godine bila je angažovana na Visokoj školi unutrašnjih poslova, na predmetima Kriminalistička tehnika i Forenzičke nauke. Odlukom Senata Univerziteta u Banjaluci, 2013. godine je izabrana u zvanje predavača visoke škole.

Pohađala je stručne edukacije iz forenzičkih oblasti u zemlji i inostranstvu. Učestvovala je na naučnim i stručnim savjetovanjima i konferencijama kao autor i koautor naučnih i stručnih radova.