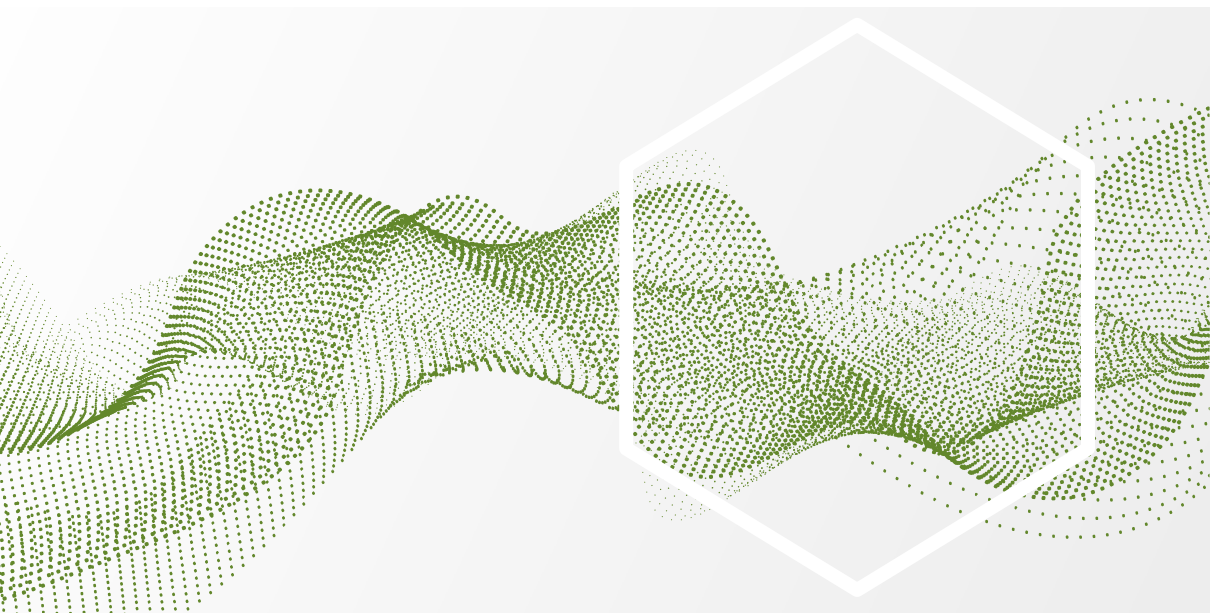




UNODC

Kancelária Spojených národov pre drogy a zločin

Odporúčané postupy
**IDENTIFIKÁCIE A ANALÝZY
KONOPE A KONOPNÝCH
PRODUKTOV**



Používateľská príručka pre
**ŠTÁTNE LABORATÓRIÁ
NA ANALÝZU DROG**

Laboratórna a vedecká služba
KANCELÁRIA ORGANIZÁCIE SPOJENÝCH
NÁRODOV PRE DROGY A ZLOČIN
Viedeň

**Odporúčané postupy
identifikácie
a analýzy konope a
konopných produktov**
(Revidované a aktualizované)

POUŽÍVATEĽSKÁ PRÍRUČKA PRE ŠTÁTNE
LABORATÓRIÁ NA ANALÝZU DROG



Organizácia Spojených národov
Viedeň 2022

Poznámka

Prevádzkové a pokusné podmienky sú zreprodukované z pôvodných zdrojových materiálov, vrátane nepublikovaných postupov, validovaných a použitých vo vybraných štátnych laboratóriách podľa zoznamu použitej literatúry. Rôzne alternatívne podmienky a nahradenie uvedených komerčných produktov môže v mnohých prípadoch poskytnúť porovnateľné výsledky, ale akákoľvek modifikácia musí byť pred zapracovaním do rutinných laboratórnych postupov validovaná.

ST/NAR/40/REV.1

Pôvodný jazyk: Anglický

© Spojené národy, marec 2022. Všetky práva vyhradené.

Označenia a prezentácie materiálu použité v tejto publikácii nenavodzujú vyjadrenie žiadneho názoru akéhokoľvek druhu v mene Sekretariátu Spojených národov, týkajúceho sa právneho štatútu akejkoľvek krajiny, teritória, mesta alebo oblasti, či ich orgánov alebo týkajúceho sa vymedzenia ohraničenia, či hraníc. Uvedenie mien spoločností a komerčných produktov neznamená, že Organizácia spojených národov ich schvaľuje.

Táto publikácia nebola formálne redigovaná.

Vydavateľská produkcia: Anglická, publikačná a knižničná sekcia, Kancelária Spojených národov vo Viedni.

Pod'akovanie

Laboratórna a vedecká služba (LSS, vedená Dr. Justice Tettey) Kancelárie Spojených národov pre drogy a zločin (UNODC) by chcela vyjadriť svoje uznanie a pod'akovanie všetkým nasledujúcim odborníkom za ich cenné príspevky, vrátane validovaných metód a pripomienok k obsahu tejto príručky a procesu recenzovaného hodnotenia: Dr. Angeline Tiong Whei Yap; pani Wendy Jong Lee Lim; Dr. Mei Ching Ong; pani Ying Ying Tan; pani Joey Joo Yee Ng; Dr. Christopher Kiu Choong Syn; Dr. Ping Xiang; Dr. Yu Wei Phua; Dr. Yi Ju Yao; Dr. Gina Chew; Dr. Nuan Ping Cheah z Orgánu pre zdravotnícku vedu, Singapur; Dr. Michael Bovens a pán Markus Schläpfer, Inštitút forezných vied v Zürichu, Švajčiarsko; Dr. Sandra E. Rodriguez-Cruz, Špeciálne testujúce a výskumné laboratórium DEA, USA; pán André Robichaud a pán Simon Ouellette z Divízie laboratórií pre konope, Regulačné činnosti a presadzovanie, pobočka zdravotníctva, Kanada; pán Jorge Jardim Zacca z Brazílskej federálnej polície; pán Martin Woodbridge, Woodbridge Research Ltd., Nový Zéland; a Dr. Barry Logan, Centrum pre forezný výskum a vzdelávanie, v Nadácii Fredric Rieders Family Foundation a NMS Labs (*Laboratóriá národného výskumu v oblasti zdravia*), USA.

Prípravu tejto príručky koordinovali Dr. Iphigenia Naidis a Dr. Conor Crean, pracovníci LSS.

Obsah

1.	Úvod	1
1.1	Východisko	1
1.2	Účel a používanie príručky.....	2
2.	Produkcia konope, trh a trendy	5
3.	Všeobecný úvod	7
3.1	Názov konopnej rastliny.....	7
3.2	Definície	7
3.3	Synonymá.....	7
3.4	Taxonómia	8
3.5	Fyzický vzhľad.....	8
3.6	Rozmnožovanie a pestovanie	10
3.7	Konopné produkty	12
3.8	Konope na priemyselné a poľnohospodárske účely	17
3.9	Konope na lekárske a vedecké účely.....	17
4.	Chémia konope.....	19
4.1	Biosyntéza.....	22
4.2	Chemická syntéza THC.....	23
4.3	Stabilita kanabinoidov.....	23
4.4	Extrakcia kanabinoidov v rôznych roztokoch.....	25
4.5	Distribúcia THC v rastlinách konope a konopných produktoch.....	25
4.6	Drogové konope verzus konope na priemyselné účely.....	26
5.	Kvalitatívna a kvantitatívna analýza konopných produktov	27
5.1	Odoberanie vzoriek.....	27
5.2	Minimálne kritériá na pozitívnu identifikáciu konope.....	29
5.3	Fyzické preskúmanie	29
5.4	Chemické preskúmanie.....	36
6.	Zoznam použitej literatúry	67

1. Úvod

1.1 Východisko

Na rozdiel od iných rastlinných drog, pri ktorých sa pestovanie a produkcia sústreďujú iba do zopár krajín, konope sa produkuje takmer vo všetkých krajinách na celom svete a konopné produkty sú najrozšírenejšie pašované drogy. Pašovaním konope sú ovplyvnené v podstate všetky krajiny sveta. V roku 2019 bolo hlásených celosvetovo 5 000 ton zhabaného konope (rastliny a živica). Konope naďalej zostáva najpoužívanjšou drogou vo svete s odhadovaným počtom 200 miliónov ľudí, ktorí v roku 2019 užili konope, takmer 18 % nárast v porovnaní s uplynulou dekadou a ekvivalent 4 % svetovej populácie vo veku od 15 až 64 rokov [1].

Od konca uplynulého storočia nastal rýchly rozvoj v technikách pestovania konope a metódy produkcie sa stali sofistikovanejšie. Vývoj legislatívy v niektorých krajinách viedol k zmenám v dynamike pestovania, produkcie a na trhoch s konope a konopnými produktmi. Tieto faktory vyústili v dostupnosť širokého sortimentu konope na ilegálnych trhoch s rastúcimi hladinami tetrahydrokanabinolu (THC), ktorý sa týka psychoaktívnych zložiek konope a pozostáva z rôznych izomérov a stereochemických variantov, ktoré sú zahrnuté v medzinárodných dohodách o kontrole drog. Objavil sa tiež nárast sortimentu produktov obsahujúcich THC a prostriedkov ich užívania, vrátane požívatín, vapov a dabov a tiež nárast dostupnosti konopných produktov obsahujúcich hlavne kanabidiol (CBD), ale ktoré obsahujú aj nízke hladiny THC [2].

V dôsledku toho sa analýza konope a konopných produktov pre laboratóriá na testovanie drog stala komplexnejšou, s potrebou identifikovať a často kvantifikovať nízke hladiny THC, diferencovať jeho izoméry a zvlášť *delta*-9-THC (Δ^9 -THC) a *delta*-8-THC (Δ^8 -THC) a identifikovať iné prítomné kanabinoidy. Toto predstavuje rozmanité analytické výzvy, ktoré si vyžadujú spoľahlivé, reprodukovateľné a citlivé analytické metódy a techniky. Okrem toho nedostatok dostupného referenčného materiálu o Δ^9 -THC, jeho izoméroch a iných kanabinoidoch je pre forenzné laboratóriá rastúcim problémom.

1.2 Účel a používanie príručky

Táto príručka je jednou zo série podobných publikácií UNODC, zaoberajúcich sa identifikáciou a analýzou rôznych typov drog podliehajúcich medzinárodnej kontrole. Tieto príručky sú výsledkom programu, ktorý UNODC využíva od začiatku 80-tych rokov s cieľom harmonizovať a vytvoriť odporúčané postupy analýzy pre štátne forenzné laboratóriá na analýzu drog.

V roku 1987 UNODC pripravil prvú príručku *Odporúčané metódy na testovanie konope* (ST/NAR/8), ktorá bola revidovaná v roku 2009. Táto príručka je revíziou príručky UNODC *Odporúčané metódy na identifikáciu a analýzu konope a konopných produktov*, (ST/NAR/40), ktorá bola pripravená ako odozva na súčasné výzvy, ktorým čelia štátne laboratóriá na testovanie drog.

V súlade s celkovým cieľom tejto série publikácií UNODC, navrhuje táto príručka prístupy, ktoré môžu pomôcť pracovníkom analyzujúcim drogy pri výbere vhodných postupov pre skúmanú vzorku a rozsahu technológií a zdrojov, ktoré môžu mať v laboratóriách k dispozícii, pričom ponecháva priestor na adaptáciu podľa úrovne vybavenosti rôznych laboratórií a rôznych právnych potrieb.

Príručka zahŕňa analytické metodológie, použitie rôznych techník a praktických režimov prevádzky. Väčšina metód uvedených v tejto príručke bola validovaná a mnohé boli tiež publikované vo vedeckej literatúre. Čitateľ by mal mať na zreteli, že sú k dispozícii aj iné publikované metódy, ktoré tiež môžu priniesť prijateľné výsledky. Akýkoľvek nový postup, ktorý sa má použiť v laboratóriu, však musí byť pred rutinným používaním validovaný a/alebo overený.

Hoci existuje niekoľko sofistikovaných prístupov, nemusia byť pre rutinné prevádzkové uplatnenie potrebné. Preto by postupy, ktoré sú tu popísané, mali byť chápané ako usmernenie; mierne úpravy na prispôbenie sa miestnym okolnostiam by bežne nemali zmeniť validitu výsledkov. Výber metodológie a prístup k analýze, ako aj rozhodnutie, či je potrebné použiť dodatočné postupy, spočíva na analyzujúcom pracovníkovi a môže tiež závisieť od dostupnosti primeraného vybavenia a úrovne právnej akceptovateľnosti dôkazu v jurisdikcii kde analytik pracuje.

Pozornosť treba upriamiť aj na nesmierne dôležitú dostupnosť referenčných materiálov pre analyzujúcich pracovníkov, literatúry o zneužívaní drog a technikách analýzy. A čo viac, analyzujúci pracovník musí byť neustále oboznámený s aktuálnymi trendmi v analyzovaní drog, dôsledne sledovať aktuálnu analytickú a forenznú vedeckú literatúru.

Laboratórna a vedecká sekcia UNODC víta pripomienky k obsahu a užitočnosti predkladanej príručky. Pripomienky a návrhy môžete adresovať na:

Laboratórna a vedecká služba
Kancelária Organizácie Spojených národov pre drogy a zločin,
Medzinárodné centrum Viedeň
P.O. Box 500
1400 Viedeň, Rakúsko
Fax: (+43-1) 26060-5967
Email: lab-unodc@un.org

Všetky príručky a tiež smernice a iné vedecko-technické publikácie si môžete vyžiadať na vyššie uvedenej adrese alebo ich získať cez online prístup.

2. Produkcia konope, trh a trendy

Pestovanie a produkcia konope ovplyvňuje všetky regióny na celom svete a konopné produkty sú stále najrozšírenejšie používané drogy. Konope môže rásť v podstate v ľubovoľnej krajine a tiež sa stále častejšie pestuje v interiéri. Počas uplynulej dekády nahlásilo pestovanie konopnej rastliny UNODC 151 krajín, pričom niektoré krajiny hlásili pestovanie v exteriéri aj interiéri. Exteriérové pestovanie konope je vo svete naďalej rozšírenejšie ako interiérové pestovanie, hoci jeho nárast je podstatne vyšší. Častejšie hlásené pestovanie konope v interiéri je problémom v krajinách Európy a Severnej Ameriky, s hlavným zameraním na dosiahnutie vysokého obsahu *delta-9-THC* [1]. Hoci produkcia rastlinného konope (marihuana) je široko rozptýlená po svete, konopná živica (hašiš) sa produkuje hlavne v niektorých krajinách severnej Afriky, Stredného východu a juhozápadnej Ázie.

Okrem hlavnej transformácie pestovania konope v uplynulých rokoch sa aj trh s konope diverzifikoval do takej miery, že teraz pozostáva zo širokého sortimentu produktov s rôznym obsahom *delta-9-THC* a prostriedkami užívania, účinnosťou a účinkami [1]. Konopná živica predávaná v Európe má teraz vyššiu účinnosť ako predtým, s obsahom *delta-9-THC* v priemere medzi 20 až 28 %, čo je takmer dvojnásobok rastlinného konope (8-13 %). Konopné produkty dostupné v Európe teraz zahŕňajú aj tie s vysokým obsahom *delta-9-THC* a tiež produkty obsahujúce konopné výťažky s nízkou hladinou *delta-9-THC*. Na nelegálnych trhoch sa tiež objavili nové formy konope, čo zvyšuje obavy o zdravie. Objavujú sa aj správy o produkcii vysoko účinných výťažkov konope na malých plochách. Podrobnejší a aktuálnejší prehľad celosvetovej produkcie, pašovania a užívania konope nájdete vo výročných Svetových správach o drogách, publikovaných Kanceláriou Organizácie Spojených Národov pre drogy a zločin.

3. Všeobecný úvod

3.1 Názov konopnej rastliny

Cannabis sativa L. (Linnaeus)

3.2 Definície

Definície konope a konopných produktov uvedené v článku 1 Jednotného dohovoru o omamných látkach z roku 1961 v znení Protokolu z roku 1972 [3] sú uvedené nižšie.

Článok 1. Definície

(b) "Konope" znamená kvitnúce alebo rodiace vršky rastliny konope (okrem semien a listov, ak nie sú prítomné na vrškoch), z ktorých nebola extrahovaná živica, bez ohľadu na to, akým názvom sa označujú.

(c) "Konopná rastlina" znamená akákoľvek rastlina z rodu *Cannabis*.

(d) "Konopná živica" znamená separovaná živica, či už surová alebo prečistená, získaná z konopnej rastliny.

"Konope a konopná živica a extrakty a tinktúry z konope" sú zahrnuté v Prílohe I Jednotného dohovoru o omamných látkach z roku 1961 v znení Protokolu z roku 1972 [3].

Chemické zlúčeniny konope, ktoré sú uvedené v Dohovore o psychotropných látkach z roku 1971 sú uvedené v časti 4.

3.3 Synonymá

Existuje veľa miestnych a pouličných názvov a synonym používaných pre konope a uvádzať ich všetky je mimo rozsah tejto príručky. Patria sem názvy ako napríklad marihuana, pot, gandža, tráva, chanvre [4]. Pojem "konope" sa tiež vo všeobecnosti používa na opísanie rôznych produktov získaných z konopnej rastliny [5].

3.4 Taxonómia

Rody *Cannabis* a *Humulus* (chmel) patria do rovnakej rodiny *Cannabaceae*, ktorá tiež zahŕňa iné rody [6], [7].

Bez ohľadu na pretrvávajúcu diskusiu o tom, či je rod *Cannabis* zastúpený jedným alebo viacerými druhmi, vo všeobecnosti sa považuje sa jednodruhový (*Cannabis sativa* L.) a zahŕňa poddruhy, ako napríklad *C. sativa* poddruh *sativa* a *C. sativa* poddruh *indica* [6], [8]. Medzi odrody, ktoré boli hlásené patria *Cannabis sativa* L. poddruh *sativa* var. *sativa*; *Cannabis sativa* L. poddruh *sativa* var. *spontanea* Vavilov (= *C. ruderalis*, Janishevsky); *Cannabis sativa* L. poddruh *indica* var. *indica* (Lam) Wehmer; *Cannabis sativa* L. poddruh *indica* var. *kafiristanica* (Vavilov) [9], [10].

Chemické a morfológické rozdiely rôznych poddruhov často nie sú voľne rozlíšiteľné, javia sa ako environmentálne modifikovateľné a neustále sa rôznia. Štúdie DNA [6], [8], [11]–[14] však podporili náhľad, že konope je monotypický rod iba s jedným druhom, *Cannabis sativa* L., a pre väčšinu účelov postačí, ak budeme používať tento názov na všetky zaznamenané konopné rastliny [15].

3.5 Fyzický vzhľad

Konope je jednoročná kvitnúca bylina. Väčšina rastlín je dvojdomá (tzn. samčie a samičie kvety sa nachádzajú na rôznych rastlinách), hoci sa môžeme stretnúť aj s jednodomými rastlinami (tzn. samčie aj samičie kvety na jednej rastline). Tyčinkové (samčie) rastliny sú obyčajne vyššie a menej mohutné ako piestikové (samičie) rastliny. Stonky sú priame a ich výška sa môže pohybovať od 0,2 do 6 m. Väčšina rastlín však dosahuje výšku od 1 do 3 m. Rozsah vetvenia ako aj výška rastliny závisia od prírodných podmienok a dedičných faktorov a tiež od spôsobu pestovania. Obrázok I poskytuje prehľad morfológických znakov rastliny *Cannabis sativa* L. (Linnaeus). Podrobnosti o vlastnostiach rastliny sú uvedené v časti 5.3.

3.6 Rozmnožovanie a pestovanie

V prírode sa rastlina konope rozmnožuje zo semena a najlepšie sa jej darí v dobre prekyprených neutrálnych až alkalických hlinitých a ílovitých pôdach s dobrou kapacitou pre udržanie vlhky, ktoré nie sú premokrievané. Po niekoľko desaťročí produkujú pokútne pestovatelia konope typy rastlín na drogy a v ilegálnom obchode sa ponúkajú a boli pomenované stovky možností. Pestuje sa široký sortiment konope s rôznymi vlastnosťami, čo sa týka morfológického a chemického zloženia. Kríženie kmeňov konope viedlo k vypestovaniu tzv. "skunk" hybridu, ktorý má mať 75 % z rodu *sativa* a 25 % z rodu *indica*. Hovorí sa, že tento kmeň je jeden z prvých, v ktorom sa spája vysoký obsah THC rodu *C. sativa* poddruh *sativa* s rýchlym rastovým cyklom a výnosom rodu *C. sativa* poddruh *indica*. Moderné, selektívne pestovateľské technológie rozmnožujú konopné rastliny klonovaním alebo bezpohlavnou reprodukciou, kontrolou genetiky rastliny a profilu kanabinoidov. Predmetom pestovania je THC a v poslednom čase aj CBD, teda zvýšenie alebo zníženie ich obsahu v rastlinách.

Obrázok I. Morfológické znaky *Cannabis sativa* L. [16]

A Okvetie samčej (tyčinkovej) rastliny

B Plodiaca samičia (piestiková) rastlina

1 Tyčinkový kvet

2 Tyčinka (prášnica a krátky filament)

3 Tyčinka

4 Zrnká peľu

5 Piestikový kvet s listeňom

6 Piestikový kvet bez listeňa

7 Piestikový kvet s viditeľným semennikom (pozdĺžny prierez)

8 Semeno (nažka*) s listeňom

9 Semeno bez listeňa

10 Semeno (pohľad zo strany)

11 Semeno (stredový prierez)

12 Semeno (pozdĺžny prierez)

13 Semeno bez oplodia (ošúpané)

* Semeno je v skutočnosti ovocie, alebo odborné nažka. Obsahuje jedno semeno s tvrdou šupkou.

3.6.1 Sinsemilla

Pojem sinsemilla (španielsky termín pre "bez semena") sa týka skôr techniky pestovania a nie genetického kmeňa. Konope s najvyššou úrovňou THC sa skladá výlučne z hlavičiek samičích kvetov ("pukov"), ktoré ostávajú neopelené po celú zrelosť a ktoré v dôsledku toho neobsahujú semená. Produkcia sinsemilly vyžaduje identifikovanie samičích rastlín a zabezpečenie toho, že nebudú vystavené peľu.

3.6.2 Klonovanie

Prvým a najzjavnejším posilnením produkcie sinsemilly bolo používanie klonov. Klonovanie jednoducho znamená rozmnožovanie z úspešnej "materskej" rastliny. Odrezok sa zakorení a presadí. Ide o genetický duplikát matky a teda sa môže použiť na vytvorenie ďalších odrezkov. Meter štvorcový materských rastlín môže zabezpečiť množstvo klonov týždenne.

3.6.3 Umelo indukované hermafrodity

Hoci genetika nastavila rastlinu tak, aby bola samčia a samičia, environmentálne faktory, vrátane denného svetelného cyklu môžu zmeniť pohlavie (hermafrodity). Prírodné hermafrodity so samčiami aj samičími časťami sú obyčajne sterilné, ale umelo indukované hermafrodity môžu mať plne funkčné reprodukčné orgány. "Feminizované" semená, ktoré predávajú mnohí komerční dodávatelia semien, je možné získať z umelo hermafrodizovaných samičích rastlín, ktorým chýba samčí chromozóm alebo ošetrovaním semien hormónmi či tiosíranom strieborným. Je teda možné dosiahnuť aj produkciu iba piestikových (samičích) rastlín zo semena. "Feminizácia" semien pomáha zabezpečiť, že sa zo semena vypestujú iba samičie rastliny. Eliminovaním rastu samčích konopných rastlín sa účinne dosahujú vyššie výnosy na štvorcový meter pestovateľskej plochy.

3.6.4 Exteriérová produkcia

Hlavná celosvetová nelegálna produkcia konope sa stále uskutočňuje v exteriéri a tieto rastliny sa vo všeobecnosti, ale nie nevyhnutne, pestujú zo semien. Výnos konope pestovaného v exteriéri výrazne závisí od klimatických a environmentálnych podmienok. Exteriérová produkcia sinsemilly sa uskutočňuje identifikovaním a zničením samčích rastlín pred opelením alebo pomocou umelo indukovaných hermafroditických samičích rastlín (pozri časť 3.6.1 a 3.6.3).

3.6.5 Interiérová produkcia

Interiérová produkcia sa obyčajne štandardizuje pomocou kontrolovaných environmentálnych podmienok ako sú svetlo, teplota, cirkulácia vzduchu, zvlhčovanie, výživa rastlín a iné faktory, ktoré môžu ovplyvniť chemický a morfológický profil konopných rastlín. Interiérové pestovanie často využíva hydroponické techniky, tzn. rastliny rastú bez pôdy vo výživových roztokoch alebo v piesku v umelom prostredí. Pestovanie v takto kontrolovaných rastových podmienkach umožňuje kontinuálne pestovanie po celý rok a môže viesť k štyrom až šiestim plným zberom úrody za rok. Na porovnanie, exteriérové pestovanie obyčajne produkuje úrodu iba raz do roka.

3.6.6 Kvitnutie

Kvitnutie obyčajne začína, keď tma presiahne 11 hodín denne. Cyklus kvitnutia môže trvať ľubovoľnú dobu od 4 do 12 týždňov, v závislosti od odrody a prírodných podmienok. Časy kvitnutia, ktoré uvádzajú semenárske podniky sa obyčajne týkajú vykvitnutia, keď sa pestuje zo semena. Rastliny pestované z odrezkov môžu kvitnúť približne o týždeň i viac dlhšie.

3.6.7 Zber

Dobrym znakom zrelosti je farba vlasových štruktúr (blizien). Ako každý kvet dozrieva, obyčajne sa tieto zošúveria a zhnednú. Keď je asi 75 % blizien hnedých, rastliny sú pripravené na zber. Zber sa zvyčajne začína zrezaním hornej polovice rastliny, ktorá sa potom zavesí hlavou dolu na sušiaci vozík alebo podobné zariadenie.

3.6.8 Výnos

Priemerné a/alebo minimálne odhadované výnosy sú z forezného a legálneho hľadiska zaujímavé. Odhady výnosov sú však zložité, vo veľkej miere závislé na odrode/druhu, technike pestovania, výžive, intenzite svetla, trvaní a rytme, atď. Štúdie uskutočnené v Austrálii a na Novom Zélande ukázali, že výnosy z interiérového a exteriérového pestovaných rastlín sú také rôzne, že nemá význam aplikovať stanovený vzorec na mokrý, suchý, predajný materiál z hľadiska gramov na rastlinu alebo štvorcový meter.* Napriek tomu sú k dispozícii niektoré empirické štúdie sumarizované nižšie. Je potrebné zvážiť odchýlky spôsobené rôznymi uvedenými pestovateľskými faktormi. Štúdie z Nemecka, Holandska a z EUROPOL-u sú uvedené v tabuľkách 1 a 2:

Tabuľka 1. Indikatívne minimum a/alebo priemerné výnosy kvitnúcich špičiek na jednu interiérovú pestovanú rastlinu konope

<i>Minimálny výnos (g/rastlina)</i>	<i>Priemerný výnos (g/rastlina)</i>	<i>Referencie</i>
	22	[17]
25	40	[18]
	33,7	[19]
28		[20]

Autori referencie 18 potvrdili, že údaje o výnosoch sa od roku 2019 do 2021 nezmenili.

* Nepublikované údaje.

Tabuľka 2. Indikatívne výnosy sušeného rastlinného konope na jednotku pestovateľskej plochy

<i>Exteriérové pestovanie (g/m²)</i>	<i>Interiérové pestovanie (g/m²)</i>	<i>Referencie</i>
75		[21]
	505	[19]
	400	[20]

Odkaz 21 tiež naznačuje, že na získanie 1-3 kg živice je potrebných približne 100 kg rastlinného konope ("kif").

3.7 Konopné produkty

Konope sa storočia používalo ako poľnohospodárska plodina na textilné vlákna. Medzi ostatné zákonom povolené konopné produkty patria konopné semená, olej z konopných semien a esenciálny olej z konope. Nelegálne konopné produkty spadajú do troch hlavných kategórií: rastlinné konope, konopná živica a konopný olej (hašišový olej). Konopné produkty sa derivujú z vysoko premenlivého prírodného materiálu s dávkami s rôznou variabilitou, ktoré sa následne podrobujú spracovaniu a transformácii na účely pašovania. Konopné produkty sa objavujú na nelegálnych trhoch v rôznych formách.

3.7.1 Rastlinné konope

Plodiace a kvitnúce špičky a listy najbližšie ku kvitnúcim špičkám obsahujú najvyššie množstvo THC. Sú známe ako "časti obsahujúcu drogu" a vo všeobecnosti sa na nelegálnych trhoch predávajú iba tieto časti rastliny. Nelegálne konzumované rastlinné konope však zahŕňa aj väčšie listy umiestnené vo väčšej vzdialenosti od kvitnúcich špičiek. Hoci listy v blízkosti samčích kvitnúcich špičiek účinných konopných rastlín obsahujú THC, obsah je oveľa nižší ako u samičích rastlín. Stredová stonka a hlavné vedľajšie stonky obsahujú málo THC, ale môžu sa aj tak použiť na produkciu konopného oleja (pozri časť 3.7.3).

Sušené listy a kvety konopnej rastliny sú bežne známe ako "marihuana", existuje však mnoho iných regionálnych názvov [4]. "Marihuana" sa nachádza na nelegálnom trhu nezmenená, tzn. surová z rastliny (tiež sa nazýva "suchý kvet"), spracovaná ako zlisované tehličky alebo mince alebo ako rozomletý materiál. Prezentácia rastlinného materiálu na nelegálnych trhoch sa rôzne mení od regiónu k regiónu a tiež v rámci krajín každého regiónu.

Vysoko kvalitný produkt môže byť vyrobený preosievaním rozdrveného rastlinného konope na odstránenie tých častí rastliny, ktoré obsahujú relatívne nízku alebo žiadnu úroveň kanabinoidov - hlavne semená a časti stoniek. Všetok materiál, ktorý prechádza procesom preosievania sa získava z

kvitnúcich a plodiach špičiek rastlinného materiálu, čo vedie k relatívnemu obohateniu o THC. V nelegálnom obchode je tento produkt známy ako "Kif", typický produkt severnej Afriky. Takýto materiál má vysoký obsah konopnej živice a môže byť zlisovaný do tehličiek, ktoré sa podobajú na tehličky konopnej živice (pozri časť 3.7.2). Keď sú však podrobené mikroskopickému skúmaniu ukazuje sa, že takéto tehličky si uchovávajú podstatné rastlinné vlastnosti (pozri tiež časť 5.3.2) a považujú sa za druh "očistenej marihuany".

Iný spôsob produkcie vysoko kvalitného rastlinného konope je interiérová produkcia. Veľmi účinné hybridy, napríklad "skunk", "biela vdova", atď. sa produkujú pomocou optimalizovaných podmienok pestovania. Reprodukcia sa uskutočňuje hlavne klonovaním materských rastlín (pozri časť 3.6.2). Miesta na interiérové pestovanie sú často vybavené automatizovaným dodávaním výživy a vody, vzduchotechnikou, systémami filtrovania a parfumovania vychádzajúceho vzduchu a automatického osvetlenia na navodenie fáz dňa a noci. Kombinácia ideálnych rastových podmienok a kultivarov s vysokým THC môže vygenerovať rastlinné konope s celkovým obsahom THC v rozmedzí od 10 do 25 %, konopnú živicu s 25 % THC a konopný olej so 60 % THC.

Proces sušenia rastlinného konope je priamočiary. Buď sa časti obsahujúce drogu odrežú alebo sa celá rastlina zavesí dolu hlavou a vysuší sa na vzduchu. Sušenie je ukončené, keď sú listy v blízkosti kvitnúcich špičiek krehké. V závislosti od vlhkosti a teploty okolitého prostredia to trvá približne 24 až 72 hodín. Zvyškový obsah vody v tomto materiáli je asi 8 - 13 %. Tento materiál je vhodný na fajčenie a môže sa skladovať mnoho mesiacov, hoci THC časom degraduje, keď je vystavené vzduchu, svetlu a vlhkosti (pozri časť 4.3).

3.7.2 Konopná živica (hašiš)

Živicové výlučky rastliny, produkované v glandulárnych trichómoch (pozri časť 5.3.2) sa môžu zbierať na získanie produktu s vyšším obsahom THC ako rastlinné konope, z ktorého sa odstráni najrozpoznatelnejší rastlinný materiál. Konopná živica pozostáva z jemnejšieho rastlinného materiálu a javí sa ako voľný alebo lisovaný lepkavý prášok, v závislosti od spôsobu produkcie.

Produkcia konopnej živice sa uskutočňuje predovšetkým v dvoch regiónoch: v krajinách južného a východného Stredomoria a krajinách južnej a juhozápadnej Ázie. V oboch regiónoch sa používajú rôzne postupy na produkciu konopnej živice, preosievanie je však dôležitou súčasťou procesu v oboch regiónoch.

Konopná živica z krajín Stredomoria

V tomto regióne sa obyčajne sušený rastlinný materiál drví udieraním o stenu, aby sa časti produkujúce živicu mohli oddeliť od vláknitejších častí rastliny. Materiál sa potom preosieva, aby sa odstránili semená a veľké vláknité časti. Výsledný produkt je teraz obohatený o obsah živice a teda o THC. V tomto štádiu sú makroskopické botanické vlastnosti prakticky neprítomné, ale mikroskopicky materiál stále vykazuje veľa botanických

vlastností. Fyzikálne pripomína jemný lepkavý prášok a v tomto štádiu sa obyčajne lisuje do tehličiek. Niekedy sa do tehličiek vtlačí logo, ktoré sa môže používať na popis a porovnanie. V niektorých krajinách (východné Stredomorie) sa materiál ukladá pred lisovaním do textilných vreciek, zatiaľ čo v iných lokalitách (severná Afrika) sa pred lisovaním pridáva celulózový obal. V severovýchodnom Stredomorí a v strednej Európe sa občas pašuje jemný lepkavý prášok, ktorý nebol zlisovaný do tehličiek.

Konopná živica z južnej a juhozápadnej Ázie

Bežný prístup k produkcii konopnej živice v krajinách južnej a juhozápadnej Ázie pozostáva zo súchania plodiach a kvitnúcich špičiek čerstvých konopných rastlín medzi dlaňami, takže sa živica preniesie z rastliny na dlaň. Vysoké hladiny živice vytvárajú tie časti rastliny, ktoré sú na dotyk veľmi lepkavé.

Môže sa to robiť aj súchaním lepkavých častí o gumovú podložku, alebo prechádzaním cez konopné pole v gumovom alebo koženom oblečení. Živica sa vyzbiera na povrchu, potom sa guma alebo koža zoškriabe do čista a materiál sa lisuje do tehličiek.

Prípadne je možné zbierať kvitnúce a zrejúce špičky rastlín podobným spôsobom, aký sa používa pri produkcii rastlinného konope, nechajú sa usušiť a potom sa polámu a rozdrvia medzi rukami na hrubý prášok. Tento prášok sa potom preosieva, takže získa jemnosť aká sa dosahuje v Stredomorskej oblasti. Jemný zelený prášok sa skladuje v kožených vakoch štyri až päť mesiacov, potom sa vystaví na krátku dobu na slnko, dostatočnú na roztopenie živice. Najprv sa umiestni späť do kožených vakov na niekoľko dní, potom sa vyberie a dobre premieša pomocou drevených palíc tak, aby sa isté množstvo olejovitej látky objavilo na povrchu. Pokračuje sa v miešaní, až kým je materiál vhodný na zlisovanie do tehličiek.

Iná metóda zahŕňa ponáranie rastlinného materiálu bez hlavnej stonky vo vriacej vode na odstránenie živice z plodiach a kvitnúcich špičiek. Po ochladení extrahovanej tekutiny sa na povrchu vytvorí vrstva stuhnutej živice. Živica sa odstráni a vytvaruje do tehličiek alebo ľubovoľného obľúbeného tvaru. Touto metódou sa do živice dostáva voda, čo často neskôr vedie k vytvoreniu plesne. Týmto prepracovaným spôsobom sa vyrába malé množstvo konopnej živice.

Konopná živica od "pollinators"/"ice-o-lators" (opeľovačov/izolátorov)

Účinná metóda separácie živice pozostáva zo zariadenia podobného sušičke na bielizeň, vystlaného jemnou tkanou sieťovinou, umiestnenou v plastom vyloženej nádobe. Tento takzvaný "opeľovač" je čiastočne naplnený sušenými a hlbokozmrazenými kvitnúcimi a plodiachmi špičkami konopnej rastliny. Nízka teplota znižuje lepivosť živice. Počas rotácie opeľovača sa časti listov a kvitnúcich špičiek obsahujúce THC odlomia a prepadávajú cez sieť. Prilepia sa na plastové steny a dno a môžu sa pozbierať ako jemný prášok. V porovnaní s východiskovým suchým materiálom je týmto postupom možné dosiahnuť osemnásobné obohatenie obsahu THC.

Obrázok II. "Opeľovač" a prášková lepivá živica (produkt) [22]



Podobný postup sa používa na produkciu takzvaného "ľadového hašu", pri ktorom sa suchý rastlinný materiál umiestni do hrubého sita s kockami ľadu a potom sa mieša pomocou mechanického miešača farieb. Kvapky živice zmrznú a odpadnú z rastliny. Postup sa opakuje cez viacero sítiok pričom sa postupne znižuje sieťovina, až kým sa nedosiahne práškový produkt (obrázok II).

3.7.3 Konopný olej (hašišový olej)

Konopný olej je koncentrovaný tekutý výťažok, buď z rastlinného konopného materiálu, alebo z konopnej živice. Vo všeobecnosti, či už sa vyrábajú z konope alebo konopnej živice, sú výťažky z konope tmavohnedej alebo tmavozelenej farby a majú konzistenciu hustého oleja alebo pasty. Dôvodom ich výroby je koncentrovať THC a teda umožniť pašovanie menších množstiev produktu s vyšším obsahom THC.

Extrakcia sa vykonáva vo vhodnej nádobe pomocou organického rozpúšťadla (napr. petrolejový éter, etanol, metanol, acetón) pri izbovej teplote miešaním, pasívnou extrakciou alebo pomocou deflegmátora. Keď je dávka rastlinného konope alebo konopnej živice úplne extrahovaná, suspenzia sa filtruje a vyextrahovaný materiál sa znehodnotí. Do nádoby je možné umiestniť druhú, čerstvú dávku konopného materiálu a extrahovať rovnakou dávkou rozpúšťadla ako pri pôvodnej extrakcii. Tento postup je možné opakovať tak často, ako je to potrebné, pričom používame viac dávok konope alebo konopnej živice s jednou dávkou extrahujúceho rozpúšťadla. Po extrahovaní záverečnej dávky sa rozpúšťadlo odparí, aby sme získali požadovanú konzistenciu oleja. V niektorých pokútnych laboratóriách sa môže zbytkové rozpúšťadlo uchovávať pre ďalšie použitie.

3.7.4 Konopné semená a olej z konopných semien

Konopné semená sú účinným zdrojom Ω -3-mastných kyselín. Olej z konopných semien je číra žltá tekutina. Semená obsahujú približne 29 až 34 % oleja podľa hmotnosti [23].

100 g oleja z konopných semien obsahuje asi 19 g α -linolénovej kyseliny. Pomer asi 3:1 Ω -6- k Ω -3-masťným kyselinám dáva oleju z konopných semien vysokú výživovú kvalitu. Ak sa však neskladuje na chladnom a tmavom mieste, tento olej rýchlo podlieha skaze, kvôli vysokému obsahu nenasýtených masťných kyselín.

Hoci je semeno uzatvorené v listeni, ktorý je súčasťou rastliny s najvyššou hustotou glandulárnych trichómov a teda obsahuje najvyššiu koncentráciu THC, semená samotné THC neobsahujú. Môžu byť však kontaminované konopnými látkami (napr. kvitnúcimi špičkami, strukmi, živivicou), čo spôsobí detekovateľné množstvá THC. Podobne ak je THC detegované v oleji z konopných semien je pravdepodobné, že pochádza zo slabej separácie semien od listeňa [24].

3.7.5 Esenciálny konopný olej

Esenciálny olej z konope je číra a jemne žltá sfarbená tekutina. Získava sa parnou destiláciou čerstvo zrezaných konopných rastlín. Esenciálny olej neobsahuje THC, ale je zodpovedný za charakteristickú vôňu konopných produktov a je tiež základom identifikácie pomocou detekčných psov. Neexistuje veľký dopyt po esenciálnom oleji a zdá sa, že je to skôr vedľajší produkt výroby oleja zo semien alebo výroby hašišového oleja. V niektorých krajinách sa však používa ako dochucovacia prísada do hašiša a požívatín.

3.7.6 Konopné požívatiny a iné produkty

Metódy používané na výrobu požívatín sú zohriatie konope v tekutine na báze oleja (konopné maslo/olej) alebo rastlinné konope (po dekarboxylácii) namočené do vysoko stupňového alkoholu (konopná tinktúra). Tieto produkty môžu byť v mnohých formách, vrátane pečivového tovaru, sladkostí, gumených cukríkov, čokolády, pastiliek, čaju, kávy a nápojov. V uplynulých rokoch boli chemické zlúčeniny konope identifikované aj v elektronických cigaretách a tekutinách na vapovanie.

Iné produkty, napríklad chmelový olej, sa stále častejšie používajú ako prísady v rôznych kozmetických produktoch [25], vrátane produktov starostlivosti o vlasy, pokožku a ústnu dutinu. Vo všeobecnosti sa konopné semená a listy (bez hornej časti rastliny, kvetov alebo plodov) chmelových odrôd používajú na prípravu kozmetických produktov. Štúdie ukázali, že obsah THC v takýchto produktoch je obvyčajne maximálne 0,05 % [26]. Rôznorodé produkty obsahujúce konope majú priamy dopad na metódy a postupy, ktoré používajú forenzné laboratória na ich analýzu a identifikáciu.

3.8 Konope na priemyselné a poľnohospodárske účely

Existuje množstvo kmeňov *Cannabis sativa* L. s nízkym obsahom THC, ktoré sú určené na priemyselné alebo poľnohospodárske účely. Pestujú sa predovšetkým na semená a vlákna. Zber na vlákna sa uskutočňuje na konci obdobia kvitnutia samičích rastlín pred vytvorením semena.

V mnohých európskych krajinách je aktuálny horný zákonom povolený limit na pestovanie priemyselného konope 0,2 % THC a napríklad v Kanade a USA je zákonom povolený limit 0,3 %. V mnohých krajinách existujú "zoznamy schválených kultivarov" a odrody, u ktorých sa neustále zisťuje prekročenie zákonom stanovených prijateľných úrovní THC môžu byť z týchto zoznamov odstránené. Pestovanie konope na priemyselné alebo poľnohospodárske účely v niektorých krajinách rastie kvôli produkcii papiera, textilu, povrazov a konštrukčných materiálov na báze vlákniiny. Semená sa používajú v potravinárskych produktoch, kozmetike, výrobe plastov a paliva.

3.9 Konope na lekárske a vedecké účely

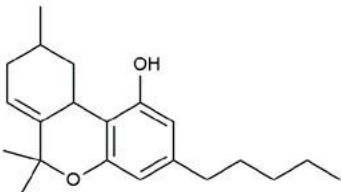
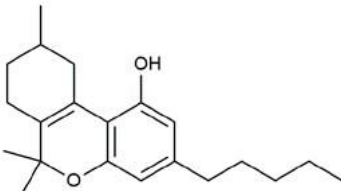
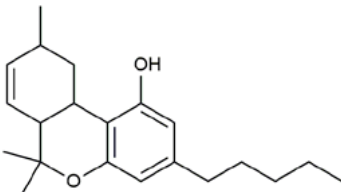
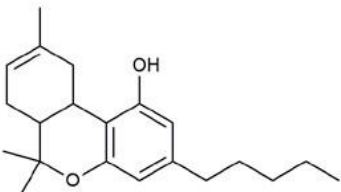
V niektorých krajinách sa konope používa na lekárske a vedecké účely v súlade s ustanoveniami medzinárodných dohovorov na kontrolu drog - "produkcia, výroba, export, import, distribúcia, obchodovanie, používanie a vlastníctvo drog je obmedzené výhradne na lekárske a vedecké účely " [3]. Príklady produktov, ktoré sú medicínsky schválené ne terapeutické účely zahŕňajú:

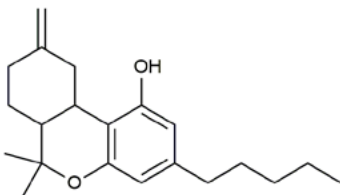
- Nabiximol (Sativex®), tekutý konopný extrakt THC a kanabidiolu, ktorý je určený na liečbu bolesti a kŕčovitosti pri skleróze multiplex
- Dronabinol (Marinol®), (-)-*trans*- Δ^9 -tetrahydrokanabinol, špecifický izomér THC (v zmysle Prílohy II Dohovoru o psychotropných látkach z roku 1971)[3], ktorý je indikovaný na liečbu nechutenstva u pacientov s AIDS a pri vážnej nevoľnosti a vracaní v súvislosti s chemoterapiou pri rakovine

Existuje viacero prebiehajúcich štúdií o iných kanabinoidových produktoch na možné terapeutické využitie.

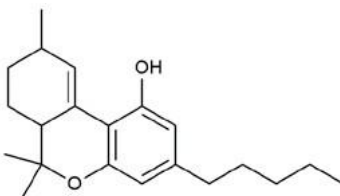
4. Chémia konope

Tetrahydrokanabinol (THC) sa týka psychotropných zlúčenín konope a zahŕňa viaceré izoméry a stereochemické varianty, ktoré sú zahrnuté v medzinárodných dohovoroch na kontrolu drog. THC, nasledujúce izoméry a ich stereochemické varianty sú uvedené v Prílohe I Dohovoru o psychotropných látkach z roku 1971 [3].

Štruktúra	Chemické názvy
	8,9,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimetyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol $\Delta^{6a(7)}$ -tetrahydrokanabinol $\Delta^{6a(7)}$ -THC <i>delta-6a(7)</i> -tetrahydrokanabinol <i>delta-6a(7)</i> -THC
	7,8,9,10-tetrahydro-6,6,9-trimetyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol $\Delta^{6a(7)}$ -tetrahydrokanabinol $\Delta^{6a(7)}$ -THC <i>delta-6a(10a)</i> -tetrahydrokanabinol <i>delta-6a(10a)</i> -THC
	6a,9,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimetyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol Δ^7 -tetrahydrokanabinol Δ^7 -THC <i>delta-7</i> -tetrahydrokanabinol <i>delta-7</i> -THC
	6a,7,10,10a-tetrahydro-6,6,9-trimetyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol Δ^8 -tetrahydrokanabinol Δ^8 -THC <i>delta-8</i> -tetrahydrokanabinol <i>delta-8</i> -THC



6a,7,8,9,10,10a-hexahydro-6,6-dimethyl-9-metylen-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol
 $\Delta^9(11)$ -tetrahydrokanabinol
 $\Delta^9(11)$ -THC
 delta-9,11-tetrahydrokanabinol
 delta-9,11-THC
 Exo-THC



6a,7,8,9-tetrahydro-6,6,9-trimetyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol
 Δ^{10} -tetrahydrokanabinol
 Δ^{10} -THC
 delta-10-tetrahydrokanabinol
 delta-10-THC

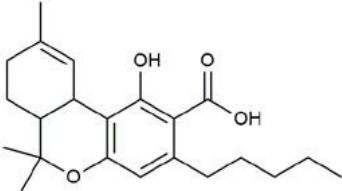
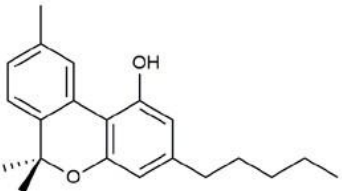
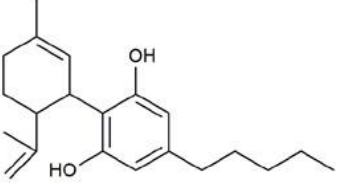
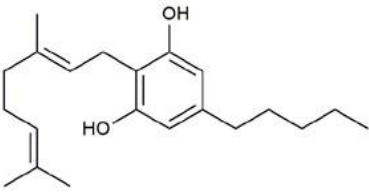
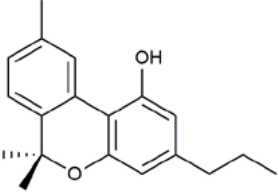
Dronabinol, špecifický izomér a jeho stereochemické varianty sú uvedené v Prílohe II Dohovoru o psychotropných látkach z roku 1971 [3].

Štruktúra	Chemické názvy	Vlastnosti
	(6aR,10aR)-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimetyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrokanabinol (-)-trans- Δ^9 -THC (-)-trans-delta-9-THC	CAS: 1972-08-3 Stechiometrický vzorec: C ₂₁ H ₃₀ O ₂ Molekulová hmotnosť: 314,46 g/mol Bod topenia: viskózný olej pKa: 10,6 log P: 6,99 (oktanol/voda)

Stereochemické varianty dronabinolu sú:

- (-)-trans- Δ^9 -THC
- (+)-trans- Δ^9 -THC
- (-)-cis- Δ^9 -THC
- (+)-cis- Δ^9 -THC

(-)-trans- Δ^9 -THC je jediným z týchto stereochemických variantov, ktorý sa vyskytuje prirodzene v konopnej rastline a považuje sa za primárnu psychoaktívnu zložku konope. Pojem delta-9-THC použitý v tejto príručke obsahuje všetky stereochemické varianty, ak to nie je uvedené inak. Chemické zloženie vybraných zlúčenín konope, ktoré majú forenzný význam sú nasledovné:

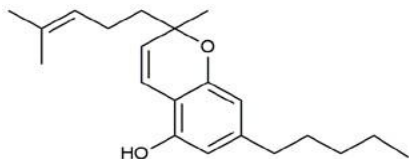
Štruktúra	Vlastnosti
<p>delta-9-tetrahydrokanabinolická kyselina (THCA)</p> 	<p>CAS: 23978-85-0 Stechiometrický vzorec: C₂₂H₃₀O₄ Molekulová hmotnosť: 358,21 g/mol Bod topenia: Nie je k dispozícii (rozklad/ dekarboxylácia THCA na THC asi pri 125-150 °C) Rozpúšťadlá: Voda: nerozpustné Etanol: rozpustné Chloroform: rozpustné Hexán: rozpustné</p>
<p>kanabinol (CBN)</p> 	<p>CAS: 521-35-7 Stechiometrický vzorec: C₂₁H₂₆O₂ Molekulová hmotnosť: 310,43 g/mol Bod topenia: 76–77 °C log P 6,23 (oktanol/voda) Rozpúšťadlá: Voda: nerozpustné Etanol: rozpustné Chloroform: rozpustné Hexán: rozpustné</p>
<p>kanabidiol (CBD)</p> 	<p>CAS: 13956-29-1 Stechiometrický vzorec: C₂₁H₃₀O₂ Molekulová hmotnosť: 314,46 g/mol Bod topenia: 66–67 °C log P: 5,79 (oktanol/voda) Rozpúšťadlá: Voda: nerozpustné Etanol: rozpustné Chloroform: rozpustné Hexán: rozpustné</p>
<p>kanabigerol (CBG)</p> 	<p>CAS: [25654-31-3] (E);[95001-70-0] (E/Z) Stechiometrický vzorec: C₂₁H₃₂O₂ Molekulová hmotnosť: 316,48 g/mol</p>
<p>kanabivarín (CBV)</p> 	<p>CAS: 33745-21-0 Stechiometrický vzorec: C₂₁H₂₂O₂ Molekulová hmotnosť: 282,38 g/mol</p>

kanabichromén(CBC)

CAS:20675-51-8

Stechiometrický vzorec: C₂₁H₃₀O₂

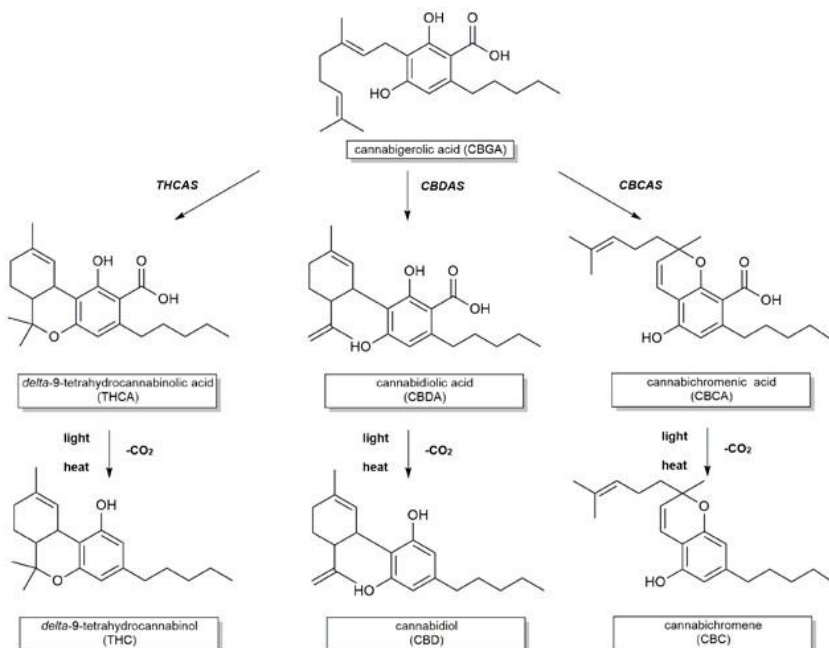
Molekulová hmotnosť: 314,46 g/mol



4.1 Biosyntéza

Hlavné fytkanabinoidné zložky konope sú *delta*-9-THC, CBD, and CBC. V čerstvej biomase existuje 95 % týchto zložiek ako ich kyslí rodičia: *delta*-9-tetrahydrokanabinolická kyselina (THCA), kanabidiolická kyselina (CBDA) a kanabichromenická kyselina (CBCA). Tieto látky sa tvoria prostredníctvom enzymatickej katalýzy kanabigerolickej kyseliny (CBGA) pomocou príslušných syntéz enzýmov, konkrétne syntázy THCA, syntázy CBDA a syntázy CBCA (schéma 1). Príslušné *delta*-9-THC, CBD a CBC sa potom generujú dekarboxyláciou indukovanou svetlom/teplom vrátane fajčenia alebo pečenia [27]. Je potrebné poznamenať, že kanabinol (CBN) je produkt degradácie THC (pozri časť 4.3). Nevyskytuje sa prirodzene.

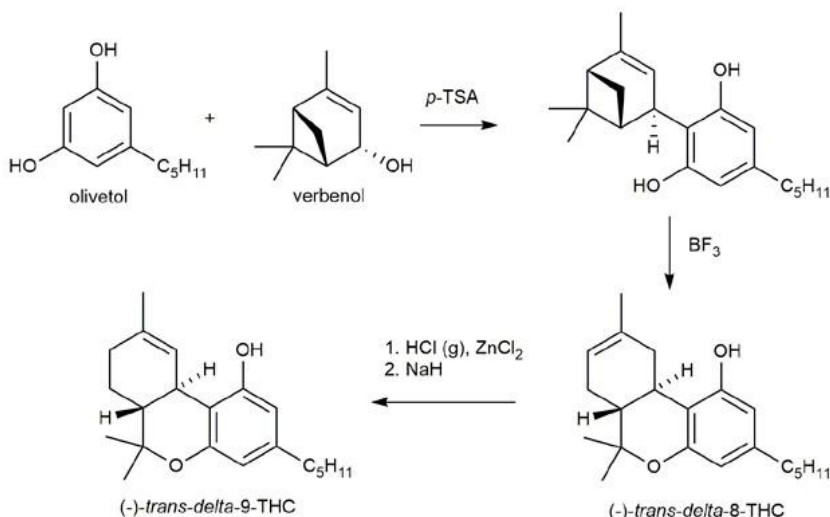
Schéma 1. Biosyntéza hlavných fytkanabinoidov *delta*-9-tetrahydro- kanabinol (THC), kanabidiol (CBD) a kanabichromén (CBC)



4.2 Chemická syntéza THC

Delta-9-THC a (-)-CBD boli izolované a štruktúrne charakterizované v NMR [28] v roku 1964 a o tri roky neskôr (-)-*trans-delta-8-THC* boli syntetizované Friedel-Craftsovou alkyláciou olivetolu s (-)-verbenolom nasledovaná boron trifluoridom spôsobenou cyklizáciou. Následná izomerizácia prostredníctvom chlorinácie a bázo indukovanej eliminácie viedla k prvej syntéze (-)-*transdelta-9-THC* (schéma 2) [29], [30]. V literatúre je možné nájsť rôzne iné syntetické cesty a niektoré sú zhrnuté v nedávnom prehľade od Bloemendala *et.al.* [30].

Schéma 2. Chemická syntéza (-)-*trans-delta-9-THC* cez reakciu olivetolu s verbenolom [29]



p-TSA=kyselina *para*-toluénosulfonová, BF_3 =boron triflorid, NaH =hydroxid sodný.

4.3 Stabilita kanabinoidov

Pri zaobchádzaní s konope a konopnými produktmi existujú štyri hlavné chemické ťažkosti, čo sa týka stability kanabinoidov a jej dopadu na skladovanie vzoriek, laboratórnu analýzu a interpretáciu výsledkov (pozri časť 5.4) a sú to:

- Dekarboxylácia THCA
- Degradácia THC na CBN cez oxidáciu
- Konverzia CBD na izoméry THC
- Izomerizácia Δ^9 -THC na Δ^8 -THC

4.3.1 Dekarboxylácia a degradácia

Dekarboxylácia THCA sa vyskytuje, keď sa konope zbiera a suší, čo vedie k tvorbe THC. Dekarboxylácia sa tiež vyskytuje, keď sa vzorka konope zahreje, napríklad pri fajčení, vystavení svetlu alebo počas určitých chemických analýz [31]. THC ako také je možné konvertovať na CBN pri podobných podmienkach. Preto primerané skladovanie vzoriek konope a výber primeraných metodológií na ich chemické preskúmanie je veľmi dôležité (pozri časť 5.4) a stabilita kanabinoidov je dôležitým hľadiskom pri určovaní celkového obsahu THC.

Je možné odhadovať vek danej vzorky marihuany na základe obsahu THC a CBN, za predpokladu, že sa skladovala pri izbovej teplote. Práve z tohto dôvodu sa analýza na porovnávacie účely obyčajne vykonáva najneskôr do troch mesiacov po zhabaní vzorky [32]. Jedna štúdia navrhuje, že vzorky s pomerom CBN voči THC nižším ako 0,013 sú menej ako šesť mesiacov staré a tie, ktorých pomer je medzi 0,04 až 0,08 sú od jedného do dvoch rokov staré. Keď sa však tento postup používa na odhad veku vzoriek konope, je potrebné zvážiť odchýlky od výskumných podmienok [33]. Miera dekarboxylácie THCA na THC a degradácia THC na CBN sú nelineárne [34], [35].

4.3.2 Izomerizácia a konverzia

Okrem stereoselektívnych syntéz uvedených vyššie je v literatúre dobre zdokumentovaná aj konverzia CBD na Δ^9 -THC / Δ^8 -THC ako aj iné kanabinoidy [36]–[39]. V uplynulých rokoch získali CBD a Δ^8 -THC rastúcu pozornosť. Konkrétne Δ^8 -THC, čo je malá zložka v prírodne sa vyskytujúcej konopnej rastline, bola zaznamenaná ako zásadná zložka v produktoch ako sú vapovacie tekutiny, gumené cukríky a tinktúry [40]–[42]. Okrem Δ^8 -THC boli vo vapovacích tekutinách zistené aj iné izoméry THC, napríklad $\Delta^{6a,10a}$ -THC a Δ^{10} -THC.

V literatúre sa uvádza aj izomerizácia a konverzia Δ^9 -THC na Δ^8 -THC. Reakcia Δ^9 -THC s kyselinou vedie k zmesi Δ^9 -THC a Δ^8 -THC. V závislosti od podmienok reakcie (kyslosť, Lewisova kyselina ako katalyzátor) môžu byť vyprodukované rôzne pomery izomérov [43]. Konverzia CBD na Δ^9 -THC a tiež izomerizácia Δ^9 -THC na Δ^8 -THC v dôsledku používania derivatizačných činidiel kyslého anhydridu sa tiež uvádzajú (pozri časť 5.4.5). Vysoké hladiny Δ^8 -THC v konopných vzorkách obyčajne naznačujú, že mohli byť obohatené konvertovaným THC.

4.3.3 Stabilita kanabinoidov v konopnej živici

Keďže konopná živica sa zvyčajne tvaruje do veľkých, hustých blokov, stupeň dekarboxylácie a degradácie kanabinoidov a následne profil kanabinoidov sa líši v rôznych častiach blokov, kvôli rôznej miere vystavenia živice svetlu a teplu. Takže boli napríklad pozorované nižšie koncentrácie THCA a vyššie THC na vonkajšej strane bloku v porovnaní s vnútornou, kvôli dekarboxylácii [44] (pozri časť 5.1.2). Pri vyšších teplotách sa môžu vyskytnúť aj iné reakcie, napríklad polymerizácia a disproporcionácia [45] Konopná živica by sa mala tiež skladovať na chladnom, tmavom mieste.

4.3.4 Stabilita kanabinooidov v štandardných roztokoch

Stabilita v štandardných roztokoch závisí od výberu rozpúšťadla a podmienok skladovania. Uprednostňuje sa príprava THC a THCA v roztokoch metanolu alebo metanol:chloroform (9:1) pred chloroformom alebo petrolejovým éterom, keďže kanabinoidy sú v týchto roztokoch stabilnejšie [43], [44]. Poradie stability kanabinooidov v metanole je $CBN > \Delta^9\text{-THC} > \Delta^9\text{-THCA}$.

Štúdie [46] naznačujú, že metanolvý zásobný roztok $\Delta^9\text{-THC}$ bol stabilný minimálne jeden rok, keď sa skladoval pri teplote $-20\text{ }^\circ\text{C}$, pričom riedené pracovné roztoky boli stabilné minimálne jeden mesiac, keď sa skladovali pri teplote $+5\text{ }^\circ\text{C}$. Zásobné roztoky $\Delta^9\text{-THCA}$ pripravené v metanole boli stabilné minimálne tri mesiace, keď sa skladovali pri teplote $-20\text{ }^\circ\text{C}$, pričom rozriedené pracovné roztoky boli stabilné minimálne dva týždne, keď sa skladovali pri teplote $+5\text{ }^\circ\text{C}$. Okrem toho sa $\Delta^9\text{-THC}$ javí ako stabilnejšie v základných roztokoch ako v kyslých roztokoch [46].

Laboratóriá by mali overovať stabilitu svojich pripravených štandardných roztokov v porovnaní so svojimi akceptačnými kritériami laboratória určením percenta rozdielu v koncentrácii roztokov v rôznych dňoch s prihliadnutím na koncentráciu v deň nula prípravy, pomocou príslušnej metódy (pozri časť 5.4).

4.4 Extrakcia kanabinooidov v rôznych roztokoch

Na chemickú analýzu konopných vzoriek musia byť kanabinoidy extrahované pomocou vhodného rozpúšťadla. Je možné použiť široký sortiment rozpúšťadiel, líšia sa však účinnosťou extrakcie a špecifickosťou. Vo všeobecnosti extrahujú nepolárne rozpúšťadla ako hexán a petrolejový éter neutrálne kanabinoidy, zatiaľ čo kyslé kanabinoidy (napríklad THCA) sa extrahujú slabo. Tieto extrakty sú teda vhodné na kvalitatívnu analýzu a nie na kvantitatívnu analýzu THCA alebo obsahu "celkového THC" (súčet THC a THCA). Na extrakciu kyslých kanabinooidov je možné použiť polárne rozpúšťadlá ako sú izopropyl alkohol, etanol a metanol a tiež roztokové zmesi ako napríklad metanol:chloroform (9:1 v/v) a acetónitril:metanol (8:2 v/v) [47], [48].

Výber vhodného roztoku na príslušnú analýzu je dôležitý. Laboratóriá by mali overovať vhodnosť vybraného roztoku na príslušný účel a tiež že účinnosť extrakcie a obnovenie vybraného roztoku spĺňajú požiadavky laboratória. V niektorých prípadoch môže byť potrebné vykonať aj viac ako jednu extrakciu na dosiahnutie uspokojivého výťažku [49].

4.5 Distribúcia THC v rastlinách konope a konopných produktoch

Obsah THC sa mení v závislosti od časti rastliny [50]. Nižšie uvedené obrázky sa týkajú obsahu "celkového THC" (pozri časť 5.4.1).

10-12 %	v piestikových kvetoch
1-2 %	v listoch
0,1-0,3 %	v stonkách
< 0,03 %	v koreňoch

Obsah THC v rôznych konopných produktoch (rastlina, živica a olej) je výsledkom pomeru rôznych častí rastliny, použitých na ich výrobu. Švajčiarska štúdia z roku 2020 napríklad poukázala na to, že u dvoch tretín zhabaného rastlinného konope sa THC pohybovalo od 3 do 13 %. Dve tretiny zhabanej živice obsahovali od 7 do 17 %, v závislosti od podrobností pestovania a metódy výroby (pozri tiež kapitolu 3.7.2), pričom extrakcia živice a/alebo kvitnúcich špičiek môže viesť k produkcii konopného oleja s obsahom THC do 80 % [51].

4.6 Drogové konope verzus konope na priemyselné účely

Ako je popísané v časti 3.8, celkový obsah THC sa používa na definovanie konope na priemyselné účely. Ďalší jednoduchý spôsob ako rozlíšiť konope na drogu a konope na priemyselné účely je pomocou pomeru hlavných kanabinoidov THC, CBN a CBD [52].

Ak sa analýza vykonáva pomocou plynovej chromatografie (GC) alebo tekutej chromatografie (LC) a pomer plochy píku [THC]+[CBN] : [CBD] v chromatografe je <1, potom sa konopná rastlina považuje za rastlinu na priemyselné účely. Ak je pomer >1, považuje sa za typ konope na drogu. Pretože po odrezaní a usušení rastlinného materiálu THC čiastočne oxiduje na CBN (pozri časť 4.3), používa sa suma plochy píku THC a CBN a delí sa plochou CBD.

$$X = \frac{[THC] + [CBN]}{[CBD]}$$

$X > 1$ označuje drogový typ konope

$X < 1$ označuje konope na priemyselné účely

5. Kvalitatívna a kvantitatívna analýza konopných produktov

5.1 Odoberanie vzoriek

Hlavný dôvod odoberania vzoriek je umožniť presnú a zmysluplnú chemickú analýzu. Pretože väčšina postupov, kvalitatívnych a kvantitatívnych, používaných forenznými vedeckými laboratóriami na analyzovanie drog vyžaduje veľmi malé čiastočky materiálu, je nesmierne dôležité, aby boli tieto malé čiastočky reprezentatívne vzhľadom na množstvo, z ktorého boli odobraté. Odoberanie vzoriek má byť v súlade so zásadami analytickej chémie, ako je uvedené napríklad v národných liekopisoch alebo ako uvádzajú regionálne či medzinárodné organizácie. Čo sa týka zhabaného materiálu so zjavnými externými znakmi, preferuje sa metóda odoberania vzoriek na základe Bayesiánskeho prístupu pred hypergeometrickým prístupom.

Použitie prístupu odoberania vzoriek odporúčaného medzinárodnými smernicami a prijatého laboratóriom pomôže uchovať cenné zdroje a čas, znížením počtu potrebných zisťovaní. Uznáva sa, že sa môžu vyskytnúť situácie, kedy zo zákonných dôvodov nie je možné postupovať podľa bežných pravidiel odoberania vzoriek a homogenizácie. Môže sa to stať vtedy, ak napríklad analytik chce uchovať určitú časť dôkazu ako vizuálnu evidenciu na súde. Čo sa týka lisovaných tehličiek, je tiež dôležité uistiť sa, že celý blok sa skladá z konope. Dosahuje sa to rozlomením tehličky a starostlivým preskúmaním materiálu.

Čo sa týka všeobecných aspektov reprezentatívneho odoberania multi-jednotkových vzoriek, pozrite si *Smernice reprezentatívneho odoberania vzoriek drog* [53]. Proces odoberania vzoriek na určenie čistoty má špecifické aspekty, ktoré je potrebné brať do úvahy a čitateľ je usmernený materiálom *Smernice na odoberanie vzoriek nelegálnych drog na kvantitatívnu analýzu* zverejneným Európskou sieťou forenzných ústavov (ENFSI) [54].

5.1.1 Odoberanie vzoriek rastlín (interiérové a exteriérové plantáže)

Nižšie uvedené postupy vychádzajú z odporúčaného postupu odoberania vzoriek od Európskej únie pre exteriérové konopné plantáže na priemyselné konope [55] a boli upravené tak, aby zohľadňovali praktické aspekty a rozmanitosť konopných produktov na nelegálnom trhu.

Na každé konopné pole, ktoré je vizuálne považované za jednodruhovú, sa odreže 30 plodiach alebo kvitnúcich špičiek, jedna z každej rastliny, náhodne vybratých, nie z okraja poľa, v dĺžke cca 20 cm (obrázok III) a uloží sa do papierového vrečka. Na účely identifikácie (kvalitatívna analýza) sa považuje odobratie vzorky z jednej reprezentatívnej rastliny popísaným spôsobom obyčajne za dostačujúce [53]. Príklad odoberania vzoriek z konopného poľa je uvedený v odkaze 53 v súvislosti s porovnaním hydrogeometrickej a Bayesiánskej metódy použitej na odoberanie vzoriek z konopných rastlín.

Obrázok III. Odoberanie vzoriek zo špičiek konopnej rastliny



Vždy, keď je to možné, by vzorka mala byť pred odoslaním do laboratória vysušená. Ak je potrebné ju pred analýzou skladovať, mala by sa uchovávať na tmavom a chladnom mieste, aby sa zabránilo degradácii hlavných kanabinooidov. V tomto štádiu je THC stále citlivé na vzduch a ultrafialové (UV) svetlo, ktoré môže spôsobiť oxidáciu THC na CBN a teda je potrebné prijať opatrenia, čo sa týka podmienok skladovania (pozri časť 4.3).

5.1.2 Odoberanie vzoriek zo zhabaných konopných produktov

Na všeobecné účely kvalitatívneho odoberania multi-jednotkových vzoriek je potrebné pozrieť či odkaz 53. Čo sa týka materiálu so zjavnými vonkajšími znakmi, teda materiálu celkovo rozpoznateľného ako konope, uprednostňuje sa ako metóda odoberania vzoriek Bayesiánsky prístup pred hypergeometrickým prístupom, keďže prvý prístup umožňuje použiť iné relevantné, tzv. prvotné informácie (tzn. vonkajšie znaky) [53].

Rastlinné konope

Na nelegálnom trhu je možné nájsť široký sortiment rastlinných konopných produktov, vrátane voľného rastlinného materiálu alebo vo forme "suchých kvetov", "vrecúšok" alebo "bylinného čaju". Ako bolo popísané v časti o odoberaní vzoriek rastlín (pozri časť 5.1.1), za jednu vzorku sa považuje 30 kusov rastlinného konope, ktoré patria k rovnakému fenotypu. Ak je k dispozícii menej materiálu, treba odobrať všetko. Materiál z hrubej stonky sa odreže. Semená v zrejmých špičkách zostávajú ako dôkaz. Vlhký materiál sa musí zabaliť do papierových vreciek. Na suchý materiál sú vhodné plastové vrecká.

Konopná živica

Požadované množstvo na vzorku (pozri časť 5.4) je možné odobrať strúhadlom z rôznych častí tehličky. Keďže povrchy tehličiek sú obyčajne zoxidované, vzorky je potrebné odobrať z čerstvo odlomeného vnútorného povrchu tehličky (pozri časť 4.3).

Konopný olej (hašišový olej)

Požadované množstvo konopného oleja (pozri časť 5.4) je možné odobrať priamo z hmoty vzorky.

5.2 Minimálne kritériá na pozitívnu identifikáciu konope

Nasledujúce časti popisujú rôzne metódy skúmania a analýzy konopných produktov. Výber metodológie a prístup k analýze, ako aj rozhodnutie, či je potrebné použiť dodatočné postupy alebo nie, spočíva na analyzujúcom pracovníkovi a závisí tiež od dostupnosti primeraného vybavenia a úrovne právnej akceptovateľnosti dôkazu v jurisdikcii, kde analytik pracuje.

Čo sa týka konopných produktov, ktoré vykazujú charakteristické botanické vlastnosti, za akceptovateľný minimálny analytický prístup na pozitívnu identifikáciu sa považuje kombinácia testu farby, chromatografie na tenkých vrstvách a fyzického (makroskopického a mikroskopického) preskúmania. Iné analytické techniky sú akceptovateľné, ak sú analytická schéma a úroveň citlivosti dostatočné na vedecké podporenie záveru, pričom sa dodržiava miestna legislatíva a laboratórne protokoly. Všeobecné pravidlá pre postup výberu stanovila Vedecká pracovná skupina pre analýzu zhabaných drog (SWGDRUG) [56].

5.3 Fyzické preskúmanie

Metódy, ktoré je možné použiť na identifikovanie konope a konopných produktov, závisia od povahy skúmaného materiálu. Rastlinný materiál je možné identifikovať na báze jeho morfológických vlastností. Tam, kde nie sú žiadne morfológické vlastnosti, ako v prípade konopnej živice alebo hašišového oleja, je identifikácia založená iba na chemickej analýze, dokazujúcej prítomnosť kanabinooidov, ako napríklad THC, jeho degradujúci produkt CBN a/alebo CBD (pozri časť 4.4).

Fyzické preskúmanie konope na báze jeho makroskopických a mikroskopických vlastností je popísané nižšie.

5.3.1 Makroskopické vlastnosti

Morfologické vlastnosti a odlišnosti vo farbe konopných rastlín sú ovplyvnené kmeňom semena a tiež environmentálnymi faktormi ako napríklad svetlo, voda, výživa, teplota a priestor.

Konope je jednoročná kvitnúca bylina [57]. Rastliny sa môžu líšiť z hľadiska výšky od 0,2 do 6 m, hoci väčšina rastlín dosahuje výšku približne 1 - 3 m. Čerstvé rastliny obsahujú 60 - 80 % vody z hľadiska hmotnosti.

Rastlina je obvyčajne dvojdomá, pričom samčie a samičie kvety sa vyskytujú na oddelených rastlinách. Príležitostne sa môžu objaviť aj jednodomé rastliny, kedy sa samčie a samičie kvety vyskytujú na rovnakej rastline dokonca na rovnakých vetvách. Pestovatelia uprednostňujú samičie rastliny pred samčiami kvôli ich vyššej účinnosti a samčie rastliny sú teda obvyčajne znehodnotené, lebo opeľovanie samičích kvetov zníži produkciu živice (pozri 3.6.1 a 3.6.4). Príležitostne bol pozorovaný aj hermafroditizmus (pozri časť 3.6.3), kde sa tvorba nažiek (charakteristická pre samčie kvety) vyskytuje na samičích kvetoch [58].

Samčie rastliny sú obvyčajne vyššie, ale menej robustné ako samičie, pričom samičie rastliny majú viac kvetov a vetiev. Pohlavie rastlín však nie je možné určiť, kým sa nevytvoria kvety. Stonky sú zelené, hranaté, priame, niekedy holé a pozdĺžne ryhované (obrázok IV). Rozsah vetvenia, ako aj výška rastliny, závisia od prírodných podmienok a dedičných faktorov a tiež od spôsobu pestovania.

Prvý pár skutočných listov s jediným párom lístkov sa objavuje nad klíčovými lístkami a následne sa usporadúvajú listy v protistojných pároch a v pravých uhloch voči predchádzajúcemu páru (krížové usporiadanie). Ako rastlina dozrieva, počet listov sa zvyšuje a usporiadanie listov sa mení z krížového (protistojne usporiadané) na striedavé. Počet lupienkov na list sa tiež znižuje, až kým sa nevytvorí iba jediný lupienok pred rozkvitnutím.

Obrázok IV. Ryhovaná stonka
Cannabis sativa L.



© Federal Criminal Police, Brazil
(Federálna kriminálna polícia, Brazília)

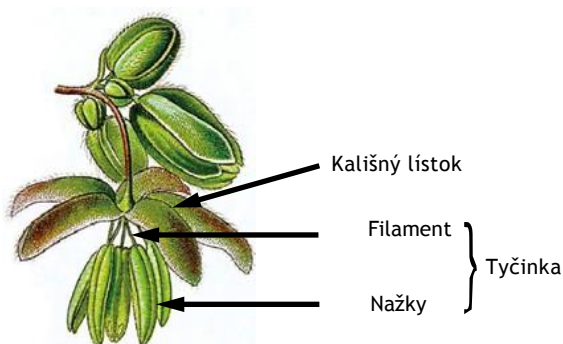
Obrázok V. Abaxiálny (vľavo)
a adaxiálny (vpravo) povrch
listov *Cannabis sativa* L.



Stebľá listov (čapíky) sú dlhé 2 - 7 cm s úzkym vrúbkovaním pozdĺž hornej strany. List má dlaňovitý tvar (známy aj ako prstovitý) a obyčajne pozostáva z nepárneho počtu kopijovitých listových čepeľok, často v rozsahu od 3 do 9 lístkov. Niekedy je možné pozorovať aj párny počet lístkov. Tvar lístkov sa pohybuje od lineárno-kopijovitého po obráteno-kopijovitý alebo široký. Okraje listu sú hrubo zúbkované, zúbky smerujú ku špičke; žilky vedú šikmo von zo stredu k okrajom zúbkov (zložené žilkovanie). Nižšie (abaxiálne) povrchy sú svetlejšie zelené, čo sa farby týka ako vrchný (adaxiálny) povrch listu (Obrázok V).

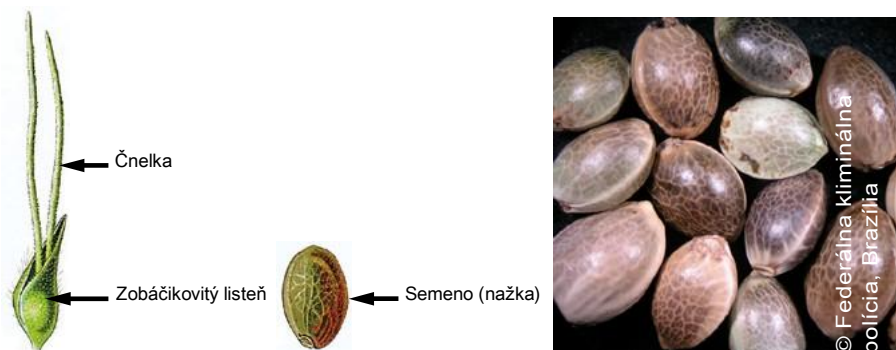
Samčie kvetenstvo je voľne rozmiestnené, s mnohými vetvami a vyčnieva mimo listov, s vetvami dlhými do 20 cm. Každý tyčinkový (samčí) kvet pozostáva z piatich bielo-zelených jemne ochlpených kališných lístkov asi 2,5 až 4 cm dlhých a piatich visiacich tyčiniek s tenkými filamentmi a vystupujúcimi prášnicami (obrázky VI a VIII).

Obrázok VI. Morfológické vlastnosti samčích kvetov



Samičie kvetenstvo je kompaktné a kratšie ako listy. Piestikové (samičie) kvety sú takmer bezstonkové a vyskytujú sa v pároch. Samičie kvety sú protilahlé voči páru palistov pri uzle stonky. Každý kvet má malý zelený listeň, ktorý uzatvára semenník dvomi dlhými tenkými čnelkami, ktoré vystupujú nad listeň (obrázky VII a VIII).

Obrázok VII. Morfológické vlastnosti samičích kvetov a semien (nažka)



Plod, nažka, obsahuje jediné semeno s tvrdou šupkou, tesne pokrytou tenkou stenou semenníka. Je to elipsoid, jemne stlačený, hladký, asi 2 - 5 mm dlhý, vo všeobecnosti hnedastý a strakatý. Jeho povrch má charakteristický mriežkovaný vzor ("korytnačí pancier") (obrázok VII). Plod si laik často môže pomýliť so semenom.

Obrázok VIII. Trsy samčích (vľavo) a samičích (vpravo) kvetov



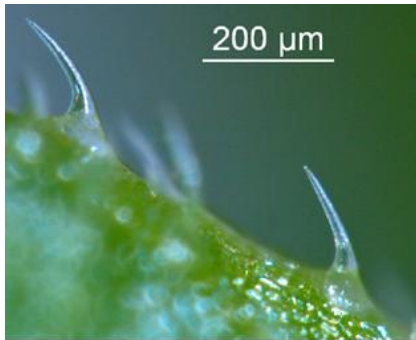
5.3.2 Mikroskopické vlastnosti

Cannabis sativa L. má charakteristické morfológické vlastnosti a je možné ho identifikovať kvôli prítomnosti trichómov (tzn. akoby vláskovité výčnelky z epidermálnej bunky rastliny), čo sú mikroskopické štruktúry na povrchu rastliny [32], [59], [60]. Vyskytujú sa dva druhy trichómov, neglandulárne trichómy a glandulárne trichómy a je možné pozorovať ich pri faktore zväčšenia 40, ako je znázornené na obrázkoch IX a X. Na obrázku XI. je vyobrazený schematický náčrt prierezu listeňa z plodiacej rastliny z rôznymi typmi trichómov.

(a) Neglandulárne trichómy sú početné, jednobunkové, tvrdé, zaoblené vlasy, s tenkým špicatým vrcholom:

- Charakteristické trichómy v tvare medvedej laby sa nachádzajú iba na hornom (adaxiálnom) povrchu konopných listov. Tieto trichómy môžu mať niekedy viditeľné kalciovo karbónové kryštály (cystolity) na svojej báze (cystolitické trichómy). Často je trichóm poškodený a cystolity sa uvoľňujú.
- Necystolitické dlhé a tenké trichómy sa vyskytujú na spodnej strane (abaxiálnej) listov, listeňov, stoniek, palistov a stopiek listov a chýba im zväčšená základňa. Obyčajne sú výdatnejšie ako cystolitické trichómy.
- Simultánna prítomnosť týchto trichómov v tvare medvedej laby na hornom povrchu a jemných, tenkých necystolitických trichómov na spodnej strane listov je pre konope charakteristická.

Obrázok IX. Mikroskopický pohľad na neglandulárne trichómy [61]



© Wissenschaftlicher Dienst Stadtpolizei Zürich

Cystolitické trichómy



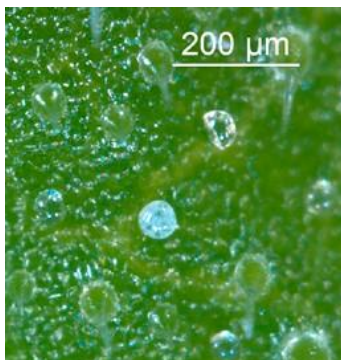
© Wissenschaftlicher Dienst Stadtpolizei Zürich

Necystolitické trichómy

(b) Glandulárne trichómy sú štruktúry, v ktorých sa produkuje a skladuje konopná živica. Tieto glandulárne trichómy sa spájajú predovšetkým so samičími kvetmi, ale môžeme ich nájsť aj na listoch, na žilkách a príležitostne na stonkách mladých rastlín. Existujú tri hlavné druhy glandulárnych trichómov:

- Cibul'ovité: malé zaguľatené hlavičky s jednobunkovou stopkou, prítomné na všetkých vegetatívnych častiach a kvetoch, ale ťažko sa pozorujú kvôli malej veľkosti.
- Hlávkovito-sesilné: veľká guľatá hlavička bez stopky, vo všeobecnosti sa nachádza na spodnom povrchu listov a niekedy ich možno pozorovať na hornom povrchu listov, žiliek a stoniek.
- Hlávkovito-stonkové: najdôležitejšie glandulárne trichómy, ktoré sa javia ako guľovité hlavičky na dlhých viacbunkových stopkách, prítomné vo veľkých množstvách na listeňoch samičích kvetov a niekedy je možné ich pozorovať na listoch a žilkách listov.

Obrázok X. Mikroskopický pohľad na glandulárne trichómy [61]

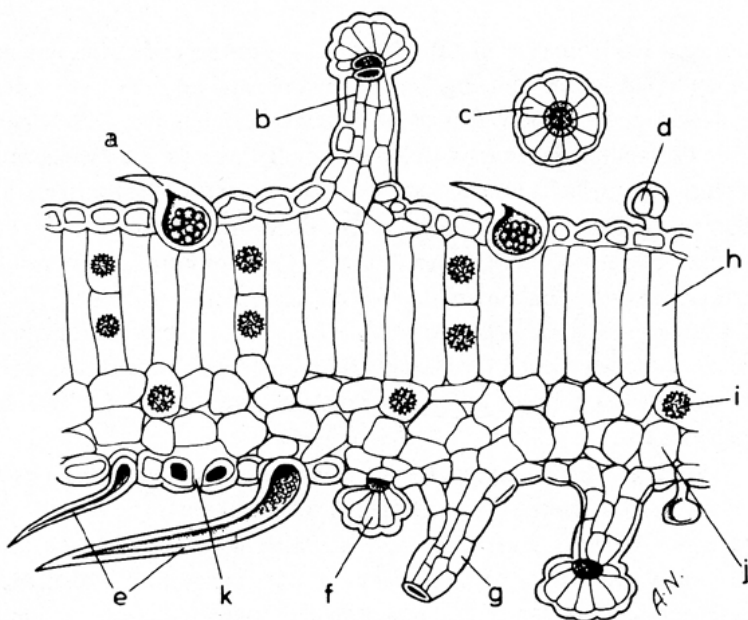


Sesilné žľazy



Stonkové glandulárne trichómy

Obrázok XI. Prierez listeňa zo zrejúcej rastliny [62]



a: cystolitický trichóm; b: veľký glandulárny trichóm s niekoľkými bunkami na hlavičke a stonke; c: hlavička jedného z veľkých glandulárnych trichómov; d: malý glandulárny trichóm s dvojbunkovou hlavičkou a jednobunkovou stonkou; e: hrubostenné kónické trichómy; f: veľký vyvíjajúci sa glandulárny trichóm; g: stonka veľkého glandulárneho trichómu; h: palisádová bunka; i: klaster kryštálu; j: parenchýmová bunka; k: ústny otvor

Kombinácia cystolitických vlások na hornom povrchu listu a dlhších trichómov a sesilných žliaz na spodnom povrchu, je jedinečná pre *Cannabis sativa* L., čo umožňuje pozitívnu identifikáciu aj fragmentovaného materiálu. Je však potrebné poznamenať, že veľmi nezrelé priesady a stonky bez listov nie je možné definitívne identifikovať ako konope pomocou botanického preskúmania.

Viac podrobností o identifikácii konope a iných mikroskopických postupoch nájdete v literatúre [63]–[66].

5.3.3 Odlíšenie od rastlín podobných konope

Niektoré rastlinné druhy môžu mať niekoľko morfológických vlastností, ktoré vykazujú istú podobnosť s *Cannabis sativa* L. Niektoré sú znázornené na obrázku XII. Bližší pohľad na ich úplné makroskopické a/alebo mikroskopické vlastnosti umožňuje rozlíšenie na základe výrazných morfológických vlastností konope, ako napríklad vzhľad listu, stonky, samčie a samičie kvety a tiež prítomnosť rôznych druhov trichómov na častiach rastliny pod mikroskopom [15] (pozri časti 5.3.1 a 5.3.2).

Obrázok XII. Niektoré druhy rastlín, ktoré majú morfológické vlastnosti podobné ako *Cannabis sativa* L.



Hibiscus cannabinus



Hacer palmatum



Urtica cannabina



Dizygotheca elegantissima



Potentilla recta



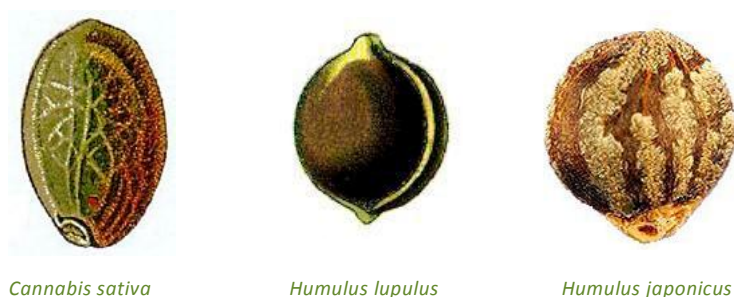
Datisca cannabina

Niektoré rastliny majú trichómy, ktoré je možné pomýliť si s trichómami na *Cannabis sativa* L. a pri definitívnej identifikácii je potrebné postupovať opatrne. Kombinácia trichómov v tvare medvedej laby na hornom povrchu listov a jednobunkových trichómov na spodnom povrchu je pre *Cannabis sativa* L. jedinečná a umožňuje pozitívnu identifikáciu dokonca aj zlomkového materiálu listov (pozri časť 5.3.2).

Okrem toho sú k dispozícii jednoduché predpokladové testy na odlíšenie *Cannabis sativa* L. od iného rastlinného materiálu (pozri časť 5.4.3) a tiež konfirmačné techniky na identifikovanie kanabinoïdov, ktoré sa nachádzajú iba v rastlinách konope (pozri časť 5.4).

Plody (nažky) obyčajného konope (*Humulus lupulus*) a japonského konope (*Humulus japonicus*) si je možné pomýliť so semenami *Cannabis sativa* L. Je ich však možné účinne odlíšiť prostredníctvom prítomnosti charakteristického mriežkovaneho vzoru ("korytnačí pancier") na povrchu konopných plodov (obrázok XIII) [67].

Obrázok XIII. Semená (nažky), ktoré majú morfológické vlastnosti podobné ako semená *Cannabis sativa* L.



5.4 Chemické preskúmanie

5.4.1 Všeobecné aspekty

Chemické preskúmanie materiálu z konopnej rastliny a konopných produktov je možné vykonať pomocou rôznych analytických postupov a metodológií, napríklad jednoduchý test farby, chromatografia na tenkej vrstve (TLC), plynová chromatografia - ionizačné detektory plameňa (GC-FID), plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria (GC-MS), kvapalná chromatografia (LC) alebo kvapalná chromatografia - hmotnostná spektrometria (LC-MS alebo LS-MS/MS) a ich kombinácie. Výber vhodnej metódy a prístupu závisí od účelu analýzy a príslušných analytických požiadaviek, napríklad kvalitatívnych a/alebo kvantitatívnych. Analýza môže byť potrebná aj na identifikovanie a často kvantifikovanie nízkych úrovní Δ^9 -THC, rozlíšenie ich izomérov, konkrétne Δ^9 -THC a Δ^8 -THC a identifikovanie iných kanabinoïdov prítomných vo vzorke. Akákoľvek metóda použitá v laboratóriu by mala byť validovaná a/alebo verifikovaná, aby preukázala, že metóda a analytický nástroj poskytujú správne a presné výsledky a sú na daný účel vhodné. Je potrebné zaviesť kontroly kvality a ich frekvenciu podľa stratégie riadenia kvality v danom laboratóriu.

Niektoré dôležité aspekty týkajúce sa povahy konope a konopných produktov je potrebné zvážiť ešte pred analýzou. Výber vzorky by mal byť primeraný a reprezentatívny voči množstvu materiálu, aby priniesol zmysluplné výsledky na interpretáciu. Rastlinné konope je napríklad heterogénny materiál a pred odoberaním vzorky na kvantitatívnu analýzu by mal byť homogenizovaný (pozri časť 5.4.2). Primeraný výber rozpúšťadiel na extrakciu je dôležitý na extrahovanie neutrálnych kanabinoïdov napríklad THC, CBN, CBD a tiež polárnych kyslých kanabinoïdov napríklad THCA (pozri časť 4.4). Okrem toho je potrebné zvážiť maticu rôznych vzoriek v postupe extrakcie a prípravy vzorky, aby sme sa vyhli akejkoľvek interferencii matrice pri analýze.

Je potrebné zvážiť dekarboxyláciu THCA na THC pri vysokých teplotách počas analýzy, zvlášť keď sa vykonáva analýza GC [68]. Z hľadiska kvantitatívnej analýzy ide o výber či sa THCA a THC kvantifikujú samostatne alebo či sa meria celkový obsah THC vo vzorke konope, čo je súhrnné množstvo (súčet) THC a THCA. Výber niekedy spočíva na národnej legislatíve. Ak neexistujú zákonné požiadavky na ktorýkoľvek postup, je bežnou praxou merať celkové THC, keďže to najlepšie reprezentuje farmakologickú aktivitu materiálu. Celkové THC sa získava dekarboxyláciou THCA na THC a môže sa vyskytnúť počas analýzy alebo sa vykoná pred analýzou (pozri časť 5.4.5 a 5.4.7). Vyššia teplota môže tiež spôsobiť rozklad THC na CBN; analytické podmienky musia byť preto validované, aby sa zabezpečilo, že priniesú kompletnú dekarboxyláciu THCA a nespôsobia rozklad na THC [69].

Pri analýze je tiež potrebné zvážiť konverziu CBD na Δ^9 -THC/ Δ^8 -THC a izomerizáciu Δ^9 -THC na Δ^8 -THC v kyslých podmienkach (pozri časť 4.3). Δ^8 -THC je nepatrne sa prírodne vyskytujúci izomér, ale môže byť prítomný v konopných produktoch. Na detegovanie a zistenie rozdielu izomérov sú potrebné metódy s vysokým rozlíšením, zvlášť pri Δ^9 -THC a Δ^8 -THC, napríklad GCMS, LC-MS alebo LC-MS/MS. Citlivé metódy sa vyžadujú aj na detekciu nízkych koncentrácií THC.

5.4.2 Príprava vzorky na chemické preskúmanie

Príprava rastlinného konope

Výber materiálov z konopnej rastliny na analýzu je potrebné vykonať starostlivo, zvlášť na kvantitatívnu analýzu, keďže konope je heterogénny materiál a rôzne časti rastliny prinášajú rôzne výsledky analýzy (pozri časť 4.5) Výber materiálu a postupy prípravy však závisia na požiadavkách analýzy.

Na extrakciu pre kvalitatívnu analýzu by mali byť vybrané tie časti konopnej rastliny, o ktorých je známe, že obsahujú najvyššie hladiny kanabinoïdov (napr. kvitnúce špičky a horné listy). Na kvantitatívnu analýzu je potrebná pred odobratím vzoriek homogenizácia rastlinného materiálu. Hmota materiálu z rastlinného konope pozostáva z rôznych častí (zvyčajne z výhonkov, listov, stoniek a malých úlomkov). Homogenizácia je potrebná na dosiahnutie správnej kvantifikácie vzorky, keďže na analýzu sa zvažuje iba malá časť [54].

Na sušenie vzoriek sa v literatúre uvádzajú rôzne príklady. Vybrané materiály z rastlinného konope sa napríklad sušia vzduchom pri izbovej teplote niekoľko dní, alebo sa sušia nútenou ventiláciou v rúre pri teplote 35 - 40 °C 24 hodín [31], [70], [71]. Rozdrvenie konopného materiálu je možné vykonať paličkou v mažiari (manuálne) alebo v laboratórnom mlynčeku (napr. nožový alebo guľový mlynček) na rôznu veľkosť vzorky. Výber vhodných parametrov na mletie alebo drvenie [72] závisí od typu vzorky s ktorou sa stretávame a pred použitím by ho laboratórium malo overiť (tabuľka 3). Uvádza sa aj použitie suchého ľadu ako pomôcka pri drvení rastlinného materiálu [49].

Tabuľka 3. Príklady parametrov mletia/drvenia

Typ drievacieho zariadenia	Veľkosť nádoby (ml)	Parametre mletia/drvenia	Veľkosť vzorky (gramy)
Nožový mlyn	40	1 cyklus 2 min. na 25 000 otáčok/min.	1 až 4
	100		2 až 5
	1 000	15 cyklov po 30 sek. 10 000 otáčok/min.	20 až 80

Veľkosť častôčiek po zomletí alebo rozdrvení je možné určiť preosiatím rozdrveného materiálu cez sitko so známou veľkosťou sieťoviny. Veľkosť častice má byť primeraná typu analýzy, ktorá sa má vykonať.

Preosievanie zabezpečuje homogénnosť vzoriek. Ak by sa proces preosievania vynechal, laboratórium musí preukázať, že homogénnosť vzorky je v rámci akceptovateľnej tolerancie. Homogénnosť vzorky práškoveho rastlinného materiálu je možné určiť odobratím primeraného počtu testovacích vzoriek z rôznych častí drveného materiálu a kvantifikovať prítomnosť kanabinoidov (napr. THC alebo CBN).

Nasleduje príklad prípravy vzorky rastlinného konope ako súčasť validovaných metód GC a LC v tejto príručke [73], [74].

Čerstvý (mokrý) rastlinný materiál sa buď suší na vzruchu pri izbovej teplote niekoľko dní alebo sa suší pri teplote 70 °C kým listy nie sú krehké. V tomto štádiu je obsah vody v rastlinnom materiály obvyčajne 8 - 13 %. Vysušený materiál sa potom nahrubo vytriedi (používajú sa iba kvety a listy), rozdrví sa (najlepšie krájačom s vysokou rýchlosťou otáčok, napr. 10 000 o/m) a preoseje (sito s veľkosťou 1 mm). Je potrebné poznamenať, že sušenie aj osievanie je súčasťou validovaných metód popísaných v tejto príručke.

Príprava konopnej živice

Konopná živica sa zredukuje na malé kúsky strúhaním. Prípadne, ak ide o lepkavý materiál, vzorka sa ochladí tekutým dusíkom a okamžite sa drví, ako je popísané vyššie.

Príprava konopného oleja (hašíšový olej)

Konopný olej sa môže používať priamo na analýzu alebo sa primerane rozriedi, aby sa nepreťažili citlivé prístroje.

5.4.3 Pravdepodobnostné testy farby

Pravdepodobnostné testy farby sú vo všeobecnosti nešpecifické testy, ktoré poskytujú pozitívny výsledok jednoducho zmenou farby, ktorú pozorujeme po pridaní činidiel do príslušnej vzorky. Testy farby pre konope však patria k najšpecifickejším dostupným testom farby. Iba niekoľko rastlín, ako napríklad henna, muškátový oriešok, muškátový kvet a repík prinášajú pri teste, ktorý sa používa na konope, falošne pozitívne výsledky [75]. Pozitívny test farby však iba naznačuje možnú prítomnosť materiálu s obsahom konope a nie je to definitívna identifikácia konope. Vždy je potrebná potvrdzujúca analýza.

Negatívna kontrola je potrebná, keď sa vykonáva pravdepodobnostné testovanie, aby sa zabezpečilo, že akákoľvek pozorovaná zmena farby je spôsobená reakciou medzi látkou (látkami) vo vzorke a činidlom a nie samotnými činidlami. Zabezpečiť sa tiež to, že používaný prístroj je dokonale čistý a neexistuje možnosť kontaminácie. Okrem toho by sa mala vykonať pozitívna kontrola na referenčnom materiály, ktorý obsahuje zmes štandardných referenčných kanabinooidov alebo známu vzorku konope, na overenie výsledkov testu (zmena farby) a funkčnosti a reliability všetkých testových činidiel.

Testy Fast Corinth V, Fast Blue B a Rapid Duquenois, ktoré sa obvyčajne používajú na predbežné testovanie konope, sú popísané nižšie.

Soľný test Fast Corinth V

Test sa vykonáva na filtračnom papieriku.		
Činidlo A:	Petrolejový éter	
Činidlo B:	Soľný test Fast Corinth V*	1 % v/v v dehydrovanom sírane sodnom
Činidlo C:	Sóda bikarbóna	1 % v/v vodný roztok
Metóda		
<p>Položte dva filtračné papieriky jeden na druhý, zložte na štvrtiny a čiastočne ich otvorte tak, že sa vytvorí lievik. Vložte malé množstvo rozdrvenej vzorky do stredu vrchného papierika.</p> <p>Pridajte dve kvapky činidla A, čo umožní tekutine dostať sa cez spodný filtračný papierik.</p> <p>Odhodte horný filtračný papierik a nechajte dolný vyschnúť.</p> <p>Pridajte veľmi malé množstvo činidla B do stredu filtračného papierika a potom pridajte dve kvapky činidla C.</p>		
Výsledky		
Fialovočervená škvrna v strede filtračného papierika je ukazovateľom obsahu konope v produkte. THC, CBN a CBD majú rovnaký výsledok.		

* Rýchly soľný test Fast Corinth V ($C_{15}H_{14}N_5O_3 \cdot 0,5 ZnCl_4$):

Chlorid zinočnatý; 2-metoxi-5-metyl-4-(4-metyl-2-nitrofenyl) diazenyl- benzéndiazóniumdichlorid; zložka 39 Azoic Diazo

Rýchly soľný test Fast Blue B

Test sa vykonáva na filtračnom papieriku.		
Činidlo A:	Petrolejový éter	
Činidlo B:	Soľný test Fast Blue B**	1 % v/v rozriedené s dehydrovaným síranom sodným
Činidlo C:	Sóda bikarbóna	10 % v/v vodný roztok
<i>Metóda</i>		
Rovnaký postup so soľným testom Fast Corinth V vyššie		
<i>Výsledky</i>		
Fialovočervená škvrna v strede filtračného papierika je ukazovateľom obsahu konope v produkte. Táto farba je kombináciou farieb, ktoré produkujú hlavné kanabinoidy. THC červená, CBN fialová, CBD oranžová.		
<i>Poznámka</i>		
Soľný test Fast Blue sa skladuje v chladničke. Pri izbovej teplote má tendenciu sa časom znehodnotiť a prášok sa zlepí a stvrdne (zvlášť v teplých regiónoch).		

** Soľný roztok Fast Blue B: Di-*o*-anisidin tetrazolium chlorid

Rýchly Duquenois-Levinov test

Test sa vykonáva v skúmavke.		
Činidlo A:	Acetaldehyd (A1) Vanilín (A2)	0,5 ml (A1) a 0,4 g (A2) rozriedené v 20 ml etanolu
Činidlo B:	Koncentrovaná kyselina	
Činidlo C:	Chloroform	
<i>Metóda</i>		
Umiestnite malé množstvo overovaného materiálu do skúmavky. Pridajte 2 ml činidla A a trepte skúmavkou jednu minútu. Pridajte 2 ml činidla B a zmes znovu pretrepte. Nechajte 10 minút stáť. Keď sa vyvinie farba, pridajte 2 ml činidla C a jemne premiešajte.		
<i>Výsledky</i>		
Fialová farba nižšej vrstvy (chloroform) je ukazovateľom, že produkt obsahuje konope.		
<i>Poznámky</i>		
Roztok sa musí skladovať na chladnom tmavom mieste a zlikvidovať, ak nadobudne tmavožltú farbu. Tento test nie je natoľko citlivý ako dva testy s filtračnými papierikmi vyššie.		

Test 4-Aminofenol (4-AP)

Neďávne štúdie preukázali využitelnosť testu farby 4-aminofenol (4-AP) na počiatkové rozlíšenie medzi konope na drogu a na priemyselné účely [76].

Test sa vykonáva na bodovej doske alebo v skúmavke.		
Činidlo A:	4-Aminofenol (4-AP)	300 mg 4-AP v 995 ml etanolu a 5 ml 2 M kyseliny chlorovodíkovej
Činidlo B:	Hydroxid sodný	30 g hydroxidu sodného v 300 ml vody a 700 ml etanolu
<p><i>Metóda</i></p> <p>Vložte malé množstvo vzorky rastlinného materiálu (napr. 5 mg) na bodovú dosku alebo do skúmavky.</p> <p>Pridajte dostatočné množstvo činidla A, aby bola vzorka ponorená.</p> <p>Pridajte dve až štyri kvapky činidla B. Počet kvapiek závisí od použitého nástroja a množstva činidla A potrebného na prekrytie vzorky.</p>		
<p><i>Výsledky</i></p> <p>Modrá farba sa vygeneruje, keď je v konopnej vzorke hladina THC približne trikrát vyššia ako CBD.</p> <p>Ružová farba je ukazovateľom toho, že hladina THC je približne trikrát nižšia ako hladina CBD.</p>		
<p><i>Poznámky</i></p> <p>Zmenu farby je potrebné pozorovať v prvých dvoch minútach po pridaní činidla B. Nejednoznačné výsledky (akákoľvek iná farba ako modrá alebo ružová) sa pozorujú vtedy, keď je hladina THC a CBD v rámci faktora tri jedného voči druhému, čo preukazuje obmedzenia testu v týchto scenároch.</p> <p>Čo sa týka domácich bylín, nebola zaznamenaná žiadny výrazná reakcia, okrem šalvie a oregana.</p> <p>Činidlá A a B skladované v chladničke (8 °C) v žltých nádobách sú stabilné minimálne šesť mesiacov.</p>		

5.4.4 Chromatografia na tenkej vrstve

Chromatografia na tenkej vrstve (TLC) je bežne používaná technika na oddelenie a identifikáciu drog. Je nenákladná, rýchla a flexibilná pri výbere oboch fáz, stacionárnej aj mobilnej, a prístupná širokému sortimentu látok, v rozsahu od najpolárnejších po nepolárne materiály. TLC zabezpečuje identifikáciu zložiek, keď sa používa v kombinácii s referenčným štandardom drogy. Využíva sa v kombinácii s inými technikami na jednoznačné potvrdenie identity drogy.

Existuje viac metód TLC na kvalitatívnu a semi-quantitatívnu analýzu konope, ktoré využívajú rôzne stacionárne fázy (štítky TLC) a systémy rozpúšťadiel a mierne odlišnú prípravu vzoriek a vizualizačných/detekčných techník. Mnohé z týchto metód prinášajú akceptovateľné výsledky. Akýkoľvek nový postup, ktorý sa má použiť v laboratóriu, však musí byť pred rutinným používaním validovaný a/alebo overený.

Štítky TLC (stacionárna fáza)

Povrch: Kremičitý gél G s vrstvou hrubou 0,25 mm a obsahujúci statický indikátor, ktorý je fluorescenčný pod UV svetlom vlnovej dĺžky 254 nm (kremičitý gél GF₂₅₄).

Typická veľkosť štítku: 20 x 20 cm; 20 x 10 cm; 10 x 5 cm (posledná možnosť sa využíva tak, že 10 cm strana je v nádobe TLC umiestnená vertikálne).

Môžu sa využívať aj vysoko výkonné štítky HPTLC (High Performance TLC). Majú optimalizovaný kremičitý gél sorbent 60 s veľkosťou častíc iba 56 µm, v porovnaní s 10-12 µm, ktoré sa používajú v bežných štítkoch TLC a ponúkajú rýchlejšiu analýzu a citlivosť (pozri metódy TLC nižšie).

Štítky, ktoré si analytik pripraví, musia byť pred použitím aktivované tak, že sa umiestnia do rúry na 120 °C na minimálne 10 až 30 minút. Štítky sa potom skladujú v odmastenom desikátore cez oranžový kremičitý gél. Môže sa použiť aj modrý kremičitý gél. Je však nutná náležitá opatrnosť, lebo modrý gél obsahuje chlorid kobaltnatý (II), ktorý môže byť pre ľudí karcinogénny. Pre komerčne dostupné gélové štítky nie je potrebná aktivácia teplom.

Metódy

Metódy popísané nižšie boli testované v teréne a považujú sa za vhodné na daný účel.

Systémy vyvíjajúcich rozpúšťadiel TLC

Pripravte si vybraný systém vyvíjajúceho rozpúšťadla (ako je popísané nižšie) čo najpresnejšie, ako je to možné, pomocou pipiet, dispenzárov a odmerných valcov. Ponechajte systém rozpúšťadla v nádobe TLC dostatočne dlho, aby sa dosiahla fáza nasýtenia výparov pred analýzou (s nádobami, ktoré sú vystlané absorpčným papierom to trvá približne 5 minút).

Metóda 1

Štítok: HPTLC 10 x 10 cm kremičitý gél		
Systém A:	Petrolejový éter 60/90	80 % v/v
	Dietyléter	20 % v/v
Systém B:	Cyklohexán	52 % v/v
	Diizopropyléter	40 % v/v
	Dietylamín	8 % v/v
Systém C: (pre kanabinooidové kyseliny)	n-Hexán	70 % v/v
	Dioxán	20 % v/v
	Metanol	10 % v/v
Podmienky nádoby: 30 minút s filtračným papierikom na jednej strane		

Metóda 2

Štítok: Vopred pokrytý plastový štítok TLC s kremičitým gélom 60 F ₂₅₄ , 10 cm (výška) x 20 cm (šírka), hrúbka 0,2 mm.		
Systém D: (iba pre neutrálné kanabinoidy)	Toluén Dietylamín	97 % v/v 3 % v/v
Podmienky nádoby: 15 minút s filtračným papierikom na jednej strane		
Vývoj štítku približne 10 minút		

Príprava vzorky

Ak je účel preskúmania kvalitatívny (napr. na potvrdenie mikro- alebo makroskopického dôkazu, že podozrivý materiál je konope), nie je potrebná homogenizácia rastlinného materiálu (pozri časť 5.4.2). Na extrakciu by mali byť vybraté tie časti konopnej rastliny, o ktorých je známe, že obsahujú najvyššie hladiny kanabinooidov (napr. kvitnúce špičky a horné listy).

Vhodné množstvá na extrakciu sú približne 500 mg rastlinného konope, 100 mg konopnej živice a 50 mg tekutého konope (konopný olej). Extrakcia by mala byť naplánovaná tak, aby produkovala záverečné roztoky s koncentraciami THC približne 0,5 mg/ml. Typické úrovne THC v konopnom materiály sú uvedené v časti 4.5.

Vzorka je extrahovaná s 10 ml rozpúšťadla na 15 minút pri izbovej teplote potrasením alebo v ultrasonickom kúpeli. Extrakt sa filtruje pred chromatografiou. Je možné použiť aj pasívnu extrakciu so zmesou vzorky/rozpúšťadla, ktorá sa ponechá stáť. Môže sa vykonať aj filtrácia, ale nevyžaduje sa; použitie kalovej tekutiny by malo priniesť spoľahlivé výsledky. Na účely identifikácie postačujú menšie množstvá rozpúšťadiel a vzorky. Akákoľvek modifikácia popísaného postupu však musí byť overená a schválená v analytikovom laboratóriu.

Keďže kanabinoidy sú ľahko rozpustné vo väčšine organických rozpúšťadiel, sú rovnako vhodné na ich extrakciu metanol, petrolejový éter, n-hexán, toluén, chloroform a kombinácie rozpúšťadiel, ako napríklad metanol:chloroform (9:1 v/v). Nepolárne rozpúšťadlá ako sú n-hexán a petrolejový éter však poskytujú relatívne čistý extrakt, ale extrahujú iba neutrálné/volné kanabinoidy kvantitatívne, pričom iné rozpúšťadlá a ich kombinácie poskytujú aj kvantitatívne extrakcie kanabinooidových kyselín (pozri aj časť 4.4).

Čo sa týka kvalitatívnej analýzy, je využitie petrolejového éteru dostačujúce na extrakciu hlavných kanabinooidov, pričom na účely stanovenia množstva a na určenie celkového THC by sa mali použiť iné rozpúšťadlá alebo kombinácia rozpúšťadiel.

Štandardné riešenia

Štandardné roztoky by sa mali pripraviť v koncentrácii približne 0,5 mg kanabinoidu na ml v metanole a mali by sa skladovať na chladnom tmavom mieste (pozri časť 4.3).

Nanášanie a vývoj

Aplikujte napríklad 1 μ l až 5 μ l pomerných častí roztoku vzorky, 2 μ l štandardných roztokov a 2 μ l rozpúšťadla (negatívna kontrola) ako oddelené body na štítku TLC. Odporúča sa aj vykonať test s prázdnyim rozpúšťadlom v rovnakom čase na preukázanie toho, že rozpúšťadlo použité na extrakciu vzorky neobsahuje žiadne kanabinoidy. Nanášanie sa musí vykonávať opatrne, aby sa zabránilo poškodeniu povrchu štítku.

Analytické poznámky

- Východiskový bod priebehu („lúnia nanášania“) by mal byť 2 cm od dolnej časti štítku.
- Medzery medzi aplikáciami vzorky (nanášané body) by mali mať minimálne 1 cm a body by nemali byť umiestnené bližšie ako 1,5 cm od okraja štítku.
- Aby sme zabránili zmiešaniu bodov počas vývoja, veľkosť vzorky by mala byť čo najmenšia možná (2 mm) aplikovaním roztokov pomerne a nie jediným vstreknutím.
- Nechajte body vysušiť a umiestnite štítok do nádoby nasýtenej rozpúšťadlom. Saturácia plynnej fázy sa dosiahne vystlaním nádoby podložkami alebo filtračným papierom napusteným rozpúšťadlom.
- Rozpúšťadlo v nádobe musí dosahovať pod líniu nanášania.
- Odstráňte štítok z vývojovej nádoby čo najskôr ako je to možné, keď rozpúšťadlo dosiahlo líniu vývoja (10 cm od východiskovej línie) označenú vopred, inak sa body prekryjú.

Vizualizácia/detekcia

Štítky sa pred vizualizáciu musia vysušiť. Dá sa to urobiť pri izbovej teplote alebo pomocou sušičky, rúry alebo horúceho vzduchu. V prípade rúry alebo horúceho vzduchu je potrebné dbať na to, že žiadna zložka nie je vystavená tepelnému rozkladu. Odporúča sa použitie digestora.

Metódy vizualizácie/detekcie

i. UV svetlo s 254 nm

Pozorujú sa tmavé body voči zelenému pozadiu. Body sa označia a ak je to potrebné, zaznamená sa digitálna fotografia.

ii. Sprejové činidlo

Na prípravu sprejového činidla sa používajú aj Fast Blue B alebo solný test Fast Blue BB a tiež Fast Blue RR, tak ako je popísané nižšie (tabuľka 4).

Tabuľka 4. Príprava sprejových činidiel

Činidlo 1	Soľný roztok Fast Blue B	50 mg v 20 ml NaOH (0,1 N)
Činidlo 2	Soľný roztok Fast Blue B	50 mg v 1 ml vody, potom sa pridá 20 ml metanolu.
Činidlo 3	Soľný roztok Fast Blue BB	20 mg v 25 ml vody, následne pridajte približne 3 ml 2,5M NaOH
Činidlo 4	Soľný roztok Fast Blue BB	50 mg v 25 ml metanolu alebo metanol:voda (1:1)

Keď sa používajú Fast Blue BB alebo Fast Blue RR, nie je potrebná každodenná príprava sprejového činidla.

Ak je potrebné štítok s výsledkami analýzy uchovať, použije sa nasledujúca sekvencia sprejovania: Dietylamín - roztok Fast Blue B - Dietylamín. Po vysušení horúcim vzduchom alebo cez noc pri izbovej teplote sa štítok zapečatí do priehľadného plastového vrečka a môže sa skladovať dlhodobo bez stmavnutia.

Analytické poznámky

- Pre správny vývoj farby je dôležité, aby bol štítok TLC alkalický. Preto by pred použitím činidla 2 mal byť na štítok nastriekaný dietylamín (tabuľka 4).
- Štítok TLC sa nesmie pri sprejovaní činidla premokriť, keďže by sa mohli body zmiešať.
- Pri použití testu Fast Blue B je potrebné postupovať s náležitou opatrnosťou, keďže sa považuje za karcinogénny.
- Testy Fast Blue RR a Fast Blue BB sú vhodné alternatívy, hoci obe majú pomalší reakčný čas. Test Fast Blue BB poskytuje body intenzívnejších a živších farieb.

Výsledky (interpretácia)

Po vizualizácii označte body (napr. ceruzkou) a vypočítajte hodnoty retardačného faktora (R_f).

$$R_f = \frac{\text{Migračná vzdialenosť: od pôvodu ku stredu bodu}}{\text{Vývojová vzdialenosť: od pôvodu k prednej strane rozpúšťadla}}$$

Vývojová vzdialenosť: od pôvodu k prednej strane rozpúšťadla

Tabuľka 5. $R_f \times 100$ hodnoty hlavných kanabinooidov s použitím vyššie uvedených metód

Zlúčenina	Systém vývoja, $R_f \times 100$ hodnoty			
	A	B	C	D
CBN	33	26	47	28
THC	37	38	49	35
CBD	42	42	47	41
THCA	6	-	36	-

Výsledky v tabuľke 5 (hodnoty $R_f \times 100$) pre vývojový systém A, B a C sa týkajú využitia metód pomocou štítkov HPTLC ako je popísané v tejto časti. Tradičné štítky 20 x 20 cm s 0,25 mm hrubou vrstvou kremičitého gélu poskytujú porovnateľné separácie, ale je potrebné určiť príslušné hodnoty R_f . Vývojový systém C sa odporúča iba na separáciu a identifikáciu kanabinooidových kyselín. Neposkytuje adekvátnu separáciu CBN, THC a CBD.

Semi-quantitatívna analýza konope pomocou THC

Analytické poznámky

- Hodnoty R_f nie sú vždy reprodukovateľné kvôli malým zmenám v zložení štítku a aktivácii, systémom rozpúšťadiel, saturácii nádoby alebo vzdialenosti vývoja. Podliehajú tiež odchýlkam v závislosti od laboratórnych podmienok (teplota, vlhkosť, atď.). Preto sú získané hodnoty R_f ukazovateľmi chromatografického správania uvedených látok.
- Je nevyhnutné, aby boli na rovnakom štítku vykonané zároveň aj referenčné štandardy.
- Na účely identifikácie by hodnota R_f a farba bodov mali byť vždy zvažované po sprejovaní primeranými vizualizačnými činidlami.

V niektorých prípadoch môže byť užitočné rýchlo odhadnúť koncentráciu THC vzorky konope. Je možné to urobiť vývojom štítku TLC a porovnaním intenzity bodu TLC vzorového roztoku s bodmi TLC produkovanými pridaním zvyšujúceho sa množstva roztoku referenčného štandardu TLC so známou koncentráciou. Napríklad:

Príprava vzorky konope

Hmotnosť odobratej konopnej vzorky	= 500 mg
Množstvo roztoku použité na extrakciu	= 10 ml
Množstvo bodu vzorky na štítku TLC	= 1 μ l

Štandardná príprava THC

Koncentrácia štandardu THC	= 0,5 mg/ml
Množstvo štandardu aplikovaného bodu na štítku THC	= 1, 2, 3 μ l

Porovnajzte intenzitu bodu vzorky s bodmi rôznych koncentrácií štandardného roztoku THC. Ak má bod vzorky podobnú farebnú intenzitu ako 3 μ l štandardný bod THC, je možné odhadnúť obsah neutrálneho THC vo vzorke konope pomocou nasledujúceho vzorca, s použitím 3 μ l štandardného roztoku THC ako príklad:

$$\begin{aligned} & \frac{\text{Koncentrácia THC v bode vzorky} \times \text{množstvo roztoku použité na extrakciu} \times 100 \%}{\text{hmotnosť vzorky konope}} \\ \approx & \frac{\text{Koncentrácia THC v štandardnom bode} \times \text{množstvo roztoku použité na extrakciu} \times 100 \%}{\text{hmotnosť vzorky konope}} \\ & = \frac{(0,5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 3) \times 10 \text{ ml} \times 100 \%}{500 \text{ mg}} = 3.0 \% \end{aligned}$$

5.4.5 Plynová chromatografia - detektor ionizácie plameňa

Plynová chromatografia - detektor ionizácie plameňa (GC-FID) je bežne používaná technika pri analýze zhabaných drog a môže sa využiť na kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu. Pri použití GC na analýzu konope je dôležité zvážiť dekarboxyláciu kyslých kanabinoidov, zvlášť THCA. Rozsah dekarboxylácie THCA na THC závisí od parametrov nástroja a metódy a ovplyvňuje určenie celkového obsahu THC.

Decarboxyláciu je možné vykonať pred analýzou. Prípadne derivatizácia, ktorá zabraňuje dekarboxylácii je prístup na kvantifikovanie THC a THCA oddelene. Je tiež nutné poznamenať, že THC sa môže rozkladať na CBN pri vyšších teplotách GC. Akýkoľvek prístup sa na určenie THC zvolí, mala by byť vykonaná vhodná validácia metódy.

Metóda

Nižšie uvedené parametre pochádzajú z validovanej metódy [73]. Validácia zahŕňa celý proces od prípravy vzorky po analýzu GC. Iné postupy môžu tiež priniesť akceptovateľné výsledky, ale musia byť validované a/alebo overené pred rutinným používaním.

<i>Prevádzkové podmienky GC-FID</i>	
Stípec:	15 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm
Fáza:	5 % difenyl - 95 % dimetylpolysiloxán
Nosič:	Hydrogén, 1,1 ml/min., nepretržitý tok
Vstrekovač:	štiepenie/bez štiepenia, 280 °C
Pomer štiepenia:	20:1
Rúra:	2 min. na 200 °C, 10 °C/min. 200-240 °C, 2 min. na 240 °C
Detektor:	FID 300 °C, H ₂ 35 ml/min., vzduch 350 ml/min.
Interný štandard:	Tribenzylamin (TBA) v etanole (0,5 mg/ml)
Vstrekovanie:	1,5 µl, Štiepenie
Poradie elúcie:	CBD, THC, CBN

Príprava vzorky

200 mg suchého homogenizovaného rastlinného konope (pozri časť 5.4.2) sa extrahuje s 20 ml interného štandardného (ISTD) roztoku (pozri nižšie) na 15 minút v ultrasonickom kúpeli. Kvôli vyššej koncentrácii THC v konopnej živici, stačí iba 100 mg živice. Ak je vzorkou konopný olej (hašišový olej) množstvo 50 mg je dostačujúce.

Dekarboxylácia THCA pred analýzou

Dôrazne odporúčame vykonať krok dekarboxylácie pred analýzou GC, ak špecifický systém plynovej chromatografie a podmienky analýzy nepovedú k úplnej dekarboxylácii THCA.

Preneste 500 µl roztoku do 2 ml ampulky GC. Umiestnite ampulku do zahrievacej jednotky (150 °C) alebo 12 minút na dekarboxyláciu THCA. Keď sa roztok odparí, rozpustite zvyšok v 1,5 ml etanolu, ampulku dobre potraсте a použite roztok na analýzu.

Kalibrácia

Keďže referenčný materiál THC môže degradovať, vo veľkej miere je akceptovaná kvantifikácia THC pomocou referenčného materiálu CBN na kalibráciu. Teoreticky, korelačný faktor CBN voči THC je 1,00 a CBN sa môže použiť na výpočet obsahu THC [74]. Na účely validácie je dobrou stratégiou merať a monitorovať pomer CBN s podobnou zlúčeninou ako je CBD na preukázanie validity faktora teoretickej korelácie v danom plynovom chromatografe.

Roztoky na kalibráciu

Pripravte štandardný roztok CBN v 2 ml nádobkách na GC ako je popísané nižšie:

Zásobný roztok (SS): 1 mg CBN/ml etanol

Stredné rozriedenie (ID): 100 µl zásobný roztok + 900 µl etanol

Interný štandardný roztok (ISTD): 0,5 mg tribenzylamin (TBA)/ml etanol

Č.	ID/SS	Roztok ISTD	Množstvo etanolu	Koncentrácia
Št 1	50 µl ID	+ 500 µl roztoku ISTD	+ ~ 950 µl	0,1 %
Št 2	250 µl ID	+ 500 µl roztoku ISTD	+ ~ 750 µl	0,5 %
Št 3	50 µl SS	+ 500 µl roztoku ISTD	+ ~ 950 µl	1 %
Št 4	150 µl SS	+ 500 µl roztoku ISTD	+ ~ 850 µl	3 %
Št 5	250 µl SS	+ 500 µl roztoku ISTD	+ ~ 750 µl	5 %
Št 6	500 µl SS	+ 500 µl roztoku ISTD	+ ~ 500 µl	10 %
Št 7	800 µl SS	+ 500 µl roztoku ISTD	+ ~ 200 µl	16 %

Rozsah koncentrácií použitého štandardného roztoku je potrebné prispôsobiť očakávanému množstvu THC v analyzovanej vzorke. Štandardné roztoky sa musia skladovať na chladnom, tmavom mieste a môžu sa používať maximálne štyri mesiace.

Derivatizácia

Ak sa THCA analyzovalo oddelene, teda bez dekarboxylácie, musí byť 1,5 ml z vyššie uvedeného extraktu (nie tepelne dekarboxylovaného) derivatizované pred analýzou GC. Často používané derivatizačné činidlo sú:

MSTFA: *N*-metyl-*N*-trimetylsilyltrifluoroacetamid

BSTFA/TMCS: *N,O*-bis(trimetylsilyl)trifluoroacetamid/trimetylchlorosilan (1 %)

Roztoky ako etanol je nutné odstrániť, keďže môžu reagovať s derivatizačným činidlom. Obyčajne sa odstraňujú jemným naparovaním dusíkom. Zvyšok sa odoberie do 1,5 ml chloroformu. Pridajte 100 µl MSTFA a zohrievajte po dobu 30 min. na 70 °C. Výsledný roztok je možné priamo analyzovať.

Ako je uvedené v časti 4.3, v kyslých podmienkach sa môže vyskytnúť cyklizácia CBD na THC a izomerizácia Δ^9 -THC na Δ^8 -THC. Preto nie sú vhodnými činidlami na deriváciu THC a CBD kyslé derivatizačné činidlá, ako napríklad trifluoroacetik anhydridhexafluoroizopropyl alkohol (TFAA-HFIP) alebo pentafluoropropionik anhydridpentafluoropropanol (PFPA-PFPOH) [77], [78].

5.4.6 Plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria

Plynová chromatografia - hmotnostná spektrometria (GC-MS) je jednou z najčastejšie využívaných techník na identifikáciu vzoriek drog vo forenznej vede. Ako naturalizovaná technika, spája silu separácie a citlivosti GC so špecifickosťou analyzovanej vzorky spektrometrickou technikou. Môže poskytnúť vysoko špecifické spektrálne údaje o jednotlivých zlúčeninách v komplexnej zmesi. Táto technika samotná však nie je vhodná na

identifikáciu tepelne nestabilných kanabinoidových kyselín, napríklad THCA a CBDA. Na identifikáciu týchto zlúčenín by bola potrebná derivatizácia pred analýzou GC-MS alebo využitie netepelnej metódy (napr. FTIR alebo LC).

Analýza GC-MS sa môže vykonať podobne ako analýza GC-FID (pozri časť 5.4.5). Parametre z validovanej metódy na kvalitatívnu analýzu bežných kanabinoidov, vrátane kanabinoidových kyselín derivatizáciou sú uvedené nižšie.

Príprava vzoriek s derivatizáciou

Preneste 1 ml (alebo primerané množstvo) extraktu vzorky (nie v silylizabovanom roztoku ako napríklad petrolejový éter) do malej ampulky. Pridajte 50 μ l MSTFA aktivovaný III (MSTFA aktivovaný imidazolom). Uzatvorte nádobku so vzorkou a dajte do vírivky, aby sa dobre premiešala. Nechajte zmes stáť 30 minút pri izbovej teplote. Premiešajte a vstreknite 1 μ l vzorky do GC-MS.

Stípec:	12,5 m x 0,20 mm i.d., 0,33 μ m
Fáza:	Agilent HP-5MS (5 %-fenyl)-metylpolsiloxán
Nosič:	Hélium, 1,6 ml/min, nepretržitý tok
Vstrekovač:	štiepenie/bez štiepenia, 280 °C
Pomer štiepenia:	70:1
Rúra:	0,5 min na 80 °C, 40 °C/min. 300 °C, 1 min.
Detektor:	Detektor hmotnosti, režim elektrónového ionizátora nastavený na perfluorotributylamín (PFTBA) Elektrónová energia: 70 eV Teplota rozhrania: 280 °C Skenovací režim: pozitívny Miera skenovania: 2 ^N , kde N = 1 Teplota iónového zdroja: 230 °C Kvadrupólová teplota: 150 °C Faktor nárastu: 1
Vstrekovanie:	1,0 μ l, štiepenie

Referenčné spektrá najbežnejších kanabinoidov vrátane izomérov THC v derivatizovanej a nederivatizovanej forme sú k dispozícii v bežných komerčných databázach MS a boli uvádzané v literatúre [79], [80].

Doba platnosti GC niektorých izomérov THC a iných kanabinoidov pri použití vyššie uvedenej metódy je uvedená v tabuľke 6 nižšie.

Tabuľka 6. Časy platnosti GC a hmotnostné ióny GC-MS

Kanabinoid	Pribl. doba platnosti (min.)	Hmot. ión (normalizovaný nadbytok %)
CBD 2TMS*	5,05	458 (7), 390 (100), 351 (21), 337 (51), 324 (15), 319 (17), 301 (32)
CBD	5,37	314 (7), 246 (13), 231 (100), 193 (7), 174 (8), 121 (6)
(6 <i>a</i> R,9 <i>S</i>)- Δ^{10} -THC TMS	5,37	386 (89), 371 (100), 343 (34), 330 (18), 315 (39), 303 (31)
(6 <i>a</i> R,9 <i>R</i>)- Δ^{10} -THC TMS	5,45	386 (92), 371 (100), 343 (31), 330 (19), 315 (44), 303 (32)
CBN TMS	5,49	382 (10), 367 (100), 323 (2), 310 (5), 295 (3), 238 (3)
(-)- Δ^8 -THC	5,53	314 (81), 299 (9), 271 (37), 258 (38), 243 (5), 231 (100)
(-)- Δ^8 -THC TMS	5,54	386 (69), 371 (8), 343 (22), 330 (44), 315 (3), 303 (100)
(6 <i>a</i> R,9 <i>R</i>)- Δ^{10} -THC	5,54	314 (72), 299 (100), 271 (44), 258 (24), 243 (27), 231 (45)
(-)- Δ^9 -THC	5,58	314 (85), 299 (100), 271 (46), 258 (23), 243 (30), 231 (70)
(-)- Δ^9 -THC TMS	5,58	386 (98), 371 (100), 343 (29), 330 (16), 315 (53), 303 (45)
(6 <i>a</i> R,9 <i>S</i>)- Δ^{10} -THC	5,62	314 (64), 299 (100), 271 (48), 258 (22), 243 (25), 231 (41)
CBN	5,71	310 (11), 295 (100), 251 (4), 238 (13), 223 (4), 165 (3)

*TMS= trimetylsilyl,

Použitím vyššie uvedenej metódy je možné odlíšiť (-)- Δ^9 -THC od (-)- Δ^8 -THC, (6*a*R,9*R*)- Δ^{10} -THC a (6*a*R,9*S*)- Δ^{10} -THC podľa príslušných časov platnosti. V dôsledku rôznych umiestnení dvojitej väzby na pozíciách 8, 9, a 10 majú izoméry rôzne relatívne pomery iónov hlavnej hmoty ako je uvedené v tabuľke vyššie. Izoméři (-)- Δ^9 -THC a (-)- Δ^8 -THC majú rôzne základné píky, konkrétne m/z 299 a 231. Hoci (-)- Δ^9 -THC a dva Δ^{10} -THC izoméry majú rovnaký základný pík (tzn. m/z 299), je možné ich rozlíšiť porovnaním relatívneho pomeru m/z 299 a 231.

Obrázok XIV. Spektrá GC-MS izomérov THC

Hmotnostné spektrum (-)- Δ^9 -THC

Obrázok grafu - výdatnosť - m/z

Hmotnostné spektrum (-)- Δ^8 -THC

Obrázok grafu - výdatnosť - m/z

Hmotnostné spektrum (6aR,9R)- Δ^{10} -THC

Obrázok grafu - výdatnosť - m/z

Hmotnostné spektrum (6aR,9S)- Δ^10 -THC

Obrázok grafu - výdatnosť - m/z

Je však potrebné poznamenať, že CBD a CBC sa pri použití tejto metódy vymývajú. Na analýzu, ktorá vyžaduje presné určenie CBD či už na kvalitatívne alebo kvantitatívne účely sa použije stĺpec GC s rôznou selektivitou. Stredne polárny stĺpec so (35 % fenyl)-metylpolysiloxán stacionárnou fázou zabezpečuje dobré rozlíšenie CBD a CBC pomocou metódy nižšie. Časy platnosti CBD a CBC získané pomocou tejto metódy sú 11,06 a 10,79 minút.

Stĺpec:	15 m x 0,20 mm i.d., 0,33 μ m;
Fáza:	Agilent HP-35MS (35 %-fenyl)-metylpolysiloxán
Nosič:	Hélium, 12 psi, nepretržitý tlak
Vstrekovač:	štiepenie/bez štiepenia, 280 °C
Pomer štiepenia:	40:1
Rúra:	3 min. na 100 °C, 40 °C/min. 260 °C (7 min.), 40 °C/min. 300 °C (3 min.)
Detektor:	Detektor hmotnosti, režim elektrónového ionizátora nastavený na perfluorotributylamín (PFTBA) Elektrónová energia: 70 eV Teplota rozhrania: 280 °C Skenovací režim: pozitívny Miera skenovania: 2 ^N , kde N = 2 Teplota iónového zdroja: 230 °C Kvadrupólová teplota: 150 °C Faktor nárastu: 1
Vstrekovanie:	1,0 μ l, štiepenie

5.4.7 Tekutá chromatografia

Tekutá chromatografia (LC) je bežná a robustná analytická technika, ktorá sa nepoužíva iba na oddelenie zložiek v zmesi ale môže sa použiť aj na kvantifikáciu. V dôsledku bylinnej podstaty materiálu z konopnej rastliny, je často pred analýzou potrebné vzorku očistiť. Je potrebné poznamenať, že je nutné vyhnúť sa využitiu základných podmienok na určenie množstva kanabinoidových kyselín, keďže to môže ovplyvniť čas platnosti analytu, tvar píku a selektivitu. Píky korešpondujúce s kanabinoidmi by mali byť dobre objasnené, keďže akékoľvek vymývanie s cieľovým analytom bude mať dopad na presnosť kvantifikačných výsledkov.

Jednou výhodou používania LC na kvantifikáciu kanabinoidov je jednoduchosť určenia množstva neutrálnych a kyslých kanabinoidov bez potreby vykonať karboxyláciu. Celkový obsah THC vo vzorke sa teda získa sčítaním množstva THC a THCA z dvoch píkov chromatografu. Nižšie sú uvedené dve metódy s dekarboxyláciou a bez nej.

Metóda 1

Postup uvedený nižšie je validovaná metóda na analýzu celkového obsahu THC (THC + THCA) v rastlinnom konope po extrakcii metanolom/chloroformom a následnej dekarboxylácii [81], [82]. Validácia zahŕňa celý proces od prípravy vzorky po analýzu LC. Pri adekvátnom overení sa môže rovnaký postup použiť aj na iné konopné produkty. Iné postupy môžu tiež priniesť akceptovateľné výsledky, ale musia byť validované a/alebo overené pred rutinným používaním.

Typ stĺpca:	250 x 4 mm LiChrospher® 60 RP-8 (5 µm) predstĺpec 4x4 mm RP-8 (5 µm)
Teplota stĺpca:	30 °C
Fáza mobility:	Acetonitril: voda (80:20 v/v), izokratický, čas zastavenia 8 min.
Prietoková miera:	1 ml/min
Detekcia:	Fotodiódové usporiadanie (PDA), 220 nm a 240 nm
Vstrekovanie:	10 µl
Poradie elúcie:	CBD, CBN, THC, THCA (ak sa nevykoná dekarboxylácia alebo je nekompletná)

Príprava vzorky

Extrakt 500 mg suchého a homogenizovaného rastlinného konope (pozri časť 5.4.2) s 5 ml metanol:chloroform (90:10 v/v) s nasledujúcim postupom: 10 sekúnd na vírivke, 15 min. v ultrasonickom kúpeli, vrátane opakovania vírivky po 5, 10 a 15 minútach, potom odstredenie.

Dekarboxylácia

Preneste 200 µl vyššie uvedeného extraktu do derivatizačnej nádoby. Odparte rozpúšťadlo do sucha pomocou dusíkového plynu. Zohrievajte vzorku 15 minút na 210 °C. Rozpusťte zvyšok v 200 µl metanol:chloroform (90:10 v/v).

Príprava konečného roztoku na analýzu

Vyššie uvedený dekarboxylovaný roztok sa rozriedi metanolom s faktorom 100 (v dvoch krokoch, každý 100 μ l + 900 μ l). Pre nižší obsah THC (< 0,5 %) postačuje faktor riedenia 10 namiesto 100.

Kalibrácia

Zásobný roztok: Štandardný roztok 1 mg (-)- Δ^9 -THC/ml metanol

Roztok 1: 100 μ l (zásobný roztok) + 900 μ l metanol = 0,1 mg THC/ml metanol

Roztok 2: 100 μ l (roztok 1) + 900 μ l metanol = 0,01 mg THC/ml metanol

<i>Nie.</i>	<i>Štd (množs. štand.)</i>	<i>Metanol (množstvo metanolu)</i>	<i>Koncentrácia (mg/ml)</i>
1	10 μ l 0,01 mg/ml	90 μ l	0,001
2	50 μ l 0,01 mg/ml	50 μ l	0,005
3	10 μ l 0,1 mg/ml	90 μ l	0,01
4	50 μ l 0,1 mg/ml	50 μ l	0,05
5	50 μ l 0,1 mg/ml	10 μ l	0,1

Štandardné roztoky sa musia skladovať na chladnom, tmavom mieste a môžu sa používať maximálne štyri mesiace.

Výsledky

Čas platnosti rovnako ako spektrum DAD (Detekcia s diódovým poľom) jednotlivých kanabinoïdov sa používa na ich kvalitatívnu identifikáciu.

<i>Látka</i>	<i>Doba platnosti (min.)</i>	<i>Relatívna doba platnosti</i>
kanabidiol	4,9	0,69
kanabinol	6,0	0,85
(-)- Δ^9 -THC	7,1	1,00
(-)- Δ^9 -THCA	7,4	1,04

Výpočet kvantitatívnych výsledkov sa môže vykonať pomocou ktorejkoľvek z vlnových dĺžok 220 a 240 nm.

Metóda 2

Štúdie preukázali, že proces dekarboxylácie nemusí priniesť úplnú konverziu THCA na THC [69]. Môže sa vyskytnúť aj degradácia THC na CBN, ak nie sú teplota a trvanie dekarboxylácie optimalizované. Pomocou LC je možné vykonať aj analýzu konope bez dekarboxylácie, tak ako je popísané v metóde nižšie.

Túto metódu je možné použiť na analýzu CBD, CBDA, CBN, THC, CBC a THCA v konope a tiež na rozlíšenie Δ^9 -THC a Δ^8 -THC po extrakcii vhodným rozpúšťadlom, napríklad etanol, metanol alebo zmes rozpúšťadiel (pozri nižšie). K dispozícii sú dve variácie tejto metódy (2A a 2B), ktoré využívajú rovnaké nástrojové parametre ale s rôznymi gradientmi mobilnej fázy. Metóda 2B umožňuje separáciu CBD od CBG v prípade potreby.

Príprava vzorky

Extrakt 250 mg suchej a homogenizovanej vzorky konope s 20 ml metanolu. Sonikujte zmes 10 minút alebo premiešajte. Prefiltrujte konečný roztok vzorky cez filter 0,2 μ m PTFE.

Nestále roztoky, ako napríklad petrolejový éter, nie sú vhodné na extrakciu vzoriek, keďže vyššia miera odparovania môže spôsobiť nepresnosti vo výsledkoch. Je tiež dôležité poznamenať, že nepolárne rozpúšťadlá napríklad hexán, nie sú účinné pri extrahovaní kyslých foriem kanabinooidov v porovnaní s inými polárnejšími rozpúšťadlami a ich zmesami (pozri časť 4.4). Keďže matrica rastlinného konope je komplexná, využitie interného štandardu nemusí byť vhodné. Pred rutinným použitím musia byť všetky metódy validované a/alebo overené.

Prevádzkové podmienky LC

Typ stĺpca:	Shimadzu Shim-pack XR-ODS II, 3,0 mm ID x 75 mm, 2,2 μ m
Teplota stĺpca:	50 °C
Mobilná fáza:	Mobilná fáza A: 0,085 % kyselina fosforečná vo vode Mobilná fáza B: 0,085 % kyselina fosforečná v metanole
Prietok:	1 ml/min
Detekcia:	Fotodiódové usporiadanie (PDA), 220 nm
Rozsah spektra:	210-350 nm
Vstrekovanie:	0,5 μ l
Poradie elúcie:	CBD, CBN, THC, THCA

Dva rôzne gradienty mobilnej fázy (metóda 2A a 2B) sú popísané nižšie:

Metóda 2A

Čas (min.)	% Mobilnej fázy A	% Mobilnej fázy B
0	25	75
7,50	10	90
7,51	5	95
9,50	5	95
9,51	25	75
13,00	25	75

Metóda 2B

Čas (min.)	% Mobilnej fázy A	% Mobilnej fázy B
0,00	40	60
5,00	40	60
16,00	28	72
24,00	15	85
25,00	15	85
25,01	40	60
29,00	40	60

Výsledky

Metóda 2A je optimalizovaná na kvantifikáciu CBN, THC a THCA a umožňuje analýzu do 13 minút, zatiaľ čo metóda 2B poskytuje rozlíšenie píku CBD/CBG, ktoré sa dosahuje do 29 minút. V závislosti od toho, či je potrebné kvantifikovať CBD, sa na použitie vyberá vhodná metóda. Príklady príslušných chromatografů z oboch metód sú uvedené nižšie.

Obrázok XV. Príklady chromatografů z metódy 2A a 2B*Metóda 2A*

Obrázok grafu

Metóda 2B

Obrázok grafu

5.4.8 Tekutá chromatografia - tandemová hmotnostná spektrometria

Tekutá chromatografia - tandemová hmotnostná spektrometria (LC-MS/MS) je účinná technika, ktorá spája separačné vlastnosti konvenčnej LC alebo ultra-vysoko výkonnej tekutej chromatografie (UHPLC) s detekčnými schopnosťami tandemovej hmotnostnej spektrometrie, čoho výsledkom je významné zvýšenie selektívnosti a zníženie interferencie medzi aktívnymi prísadami a maticou. S vysokou citlivosťou a selektívnosťou je LC-MS/MS vhodná na kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu nízkych koncentrácií kanabinoidov v komplexných bylinných zmesiach a maticiach, ako napríklad požívatiny s konope [83]–[86].

Dve metódy sú popísané nižšie: Prvá metóda využíva UHPLC-UV-MS na kvalitatívnu a semi-quantitatívnu analýzu kanabinoidov v bylinných zmesiach. Druhá metóda využíva LS-MS/MS na kvalitatívnu analýzu jedlej čokolády napustenej konope a mohla by byť adaptovaná na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu kanabinoidov v iných typoch vzoriek [87].

Metóda 1

UHPLC spolu s ultrazvukovou detekciou a hmotnostnou spektrometriou (UHPLC-UV-MS) je účinná technika, ktorá spája vlastnosti separácie UHPLC so schopnosťami dvojitej detekcie ultrafialového (UV) detektora a hmotnostného spektrometra. S vysokou citlivosťou a selektívnosťou je UHPLC-UV-MS vhodná na kvalitatívnu aj semi-quantitatívnu analýzu kanabinoidov v bylinných zmesiach.

Nižšie uvedená metóda je vhodná na identifikáciu kanabinoidov a semi-quantifikáciu celkového THC (THC a THCA) v rastlinnom konope, konopnej živici a konopnom oleji po extrakcii metanolom. Táto metóda umožňuje identifikovať kanabinoidy pomocou času platnosti, profilu UV a molekulovej hmotnosti zlúčenín. Výsledky semi-quantifikácie sa získavajú detekciou UV. Zlúčeniny sú uvedené v tabuľke 7 a nižšie sú popísané aj parametre nástrojov.

Tabuľka 7. Súhrn analyzovaných kanabinooidov

Názov zlúčeniny	Typ testu
Kyselina kanabidivarinická (CBDVA)	Identifikácia
Kanabivarín (CBV)	Identifikácia
CBDA	Identifikácia
CBGA	Identifikácia
CBG	Identifikácia
CBD	Identifikácia
Tetrahydrokanabivarín (THCV)	Identifikácia
Kyselina tetrahydrokanabivarinická (THCV)	Identifikácia
CBNA	Identifikácia
CBN	Identifikácia
Δ^9 -THC	Semi-quantitatívna
Δ^8 -THC	Identifikácia
Δ^9 -THCA	Semi-quantitatívna
Kanabicyklo (CBL)	Identifikácia
CBC	Identifikácia
Kyselina kanabicykloická (CBLA)	Identifikácia

Príprava roztokov

Príprava roztokov potrebných na analýzu je popísaná nižšie, vrátane prípravy kalibračných štandardných roztokov, roztokov mobilnej fázy, atď.

- 0,1 % kyselina mravčia vo vode: zamiešať 1 ml kyseliny mravčej do 1 l destilovanej vody.
- Riediaci roztok: zamiešať 250 ml 0,1 % kyseliny mravčej do vody a 750 ml metanolu.
- Mobilná fáza A: zamiešať 2 ml kyseliny mravčej do 2 l destilovanej vody, pridať 2,5 g mravčana amónneho a rozpustiť.
- Mobilná fáza B: zamiešať 2 ml kyseliny mliečnej do 2 l acetónitrilu.
- Zásobný roztok Δ^9 -THC 50 $\mu\text{g/ml}$: z referenčného materiálu THC, pripraviť roztok s koncentráciou 50 $\mu\text{g/ml}$ v riediacom roztoku.
- Kalibračný roztok Δ^9 -THC 10 $\mu\text{g/ml}$: pripraviť 10 $\mu\text{g/ml}$ kalibračného roztoku z Δ^9 -THC 50 $\mu\text{g/ml}$ zásobného roztoku.
- Kalibračný kontrolný roztok: referenčné materiály obsahujúce minimálne Δ^9 -THC a Δ^9 -THCA treba pripraviť. Rozried'te podľa potreby v riedidle, aby sa zabezpečilo, že konečné koncentrácie sú medzi 8 - 12 $\mu\text{g/ml}$ Δ^9 -THC/ Δ^9 -THCA.
- Rozlišovací kontrolný roztok: pripravte roztok na overenie rozlíšenia, ktorý obsahuje minimálne kanabinoidy suspektne prítomné v a vyžadujúce identifikáciu. Pripravte tento roztok kanabinooidov rozriedením primeraných množstiev referenčných materiálov s riediacim roztokom.

Príprava vzorky

V 15 ml odstreďovacej skúmavke presne odvážite množstvo medzi 30 - 100 mg reprezentatívnej homogenizovanej vzorky. Pridajte 10,0 ml metanolu. Ak je to potrebné a vzorka je veľmi viskózna, je možné extrakt zahriať na niekoľko minút v teplom vodnom kúpeli.

Mechanicky miešajte skúmavku 30 minút. Sonikujte vzorky 15 minút. Odstreďte vzorky približne 5 minút pri 3 000 o/min.

Ak je to potrebné, riedenie sa môže vykonať v riediacom roztoku (napr. 1 ml extraktu v 10 ml). Prefiltrujte vzorky podľa potreby filtrom 0,2 µm PTFE. Preneste všetko do skúmaviek HPLC na analýzu.

Prevádzkové parametre UHPLC-UV-MS

<i>Nástrojové parametre UHPLC</i>	
Typ stĺpca:	Waters UHPLC HSS, 1,6 µm, 2,1 x 150 mm alebo ekvivalent
Teplota stĺpca:	40 °C
Vstreknuté množstvo:	5 µl
Celkový čas trvania:	16 min.
Mobilná fáza A:	0,1 % kyselina mravčia vo vode + 20 mm mravčana
Mobilná fáza B:	0,1 % kyselina mliečna v acetónitrile
Tlak stĺpca:	8 800 psi
Oplach ihly:	100 % metanol
Oplach uzáveru:	acetónitril : voda (1:9 v/v)
Gradient UHPLC:	pozri nižšie
<i>Detekčné parametre UV</i>	
Kvantifikácia vlnovej dĺžky:	220 nm
Identifikácia vlnovej dĺžky:	skenovanie od 200 nm do 400 nm
<i>Parametre a prietok pre izokratickú pumpu pre zriedenie po stĺpci</i>	
Manažér izokratického rozpúšťadla mobilnej	0,1 % kyselina mliečna v metanole (LCMS stupeň)
Oplach uzáveru:	metanol:voda (1:1 v/v)
Prietok ISM:	0,5 ml/min.
Štiepenie:	100
<i>Detekčné parametre MS</i>	
Nástroj:	Waters ACQUITY QDa Mass Detector
Náraz:	10
Kapilárny:	1,5 kV pozitívny

Sonda:	600 °C
Režim detekcie MS:	Selektívne nahrávanie iónov (SIR)
Ionizačný režim:	Elektro-sprejová ionizácia (ESI)
Miera odoberania vzorky:	10 bodov/sek.
Odkloniť ventil na detektor MS:	0,50 min.
Odkloniť ventil do odpadu:	11,50 min.
Programovanie SIR:	Pozri tabuľku 9

Gradient mobilnej fázy

	Čas (min.)	Prietok (ml/min.)	% Mobilnej fázy A	% Mobilnej fázy B
1	0	0,400	35,0	65,0
2	2,50	0,400	23,0	77,0
3	8,50	0,400	23,0	77,0
4	10,50	0,400	10,0	90,0
5	11,00	0,400	10,0	90,0
6	12,50	0,400	35,0	65,0
7	16,00	0,400	35,0	65,0

Tabuľka 8. Čas elúcie (min) a λ_{max} (nm) zlúčenín

Analyt	Čas elúcie (min.)	λ_{max} (nm)
CBDVA	3,20	223,5; 266,2; 304,3
CBDV	3,86	209,4; 275,7
CBDA	4,28	223,5; 266,2; 304,3
CBGA	4,48	223,5; 266,2; 304,3
CBG	4,81	204,7; 271,0
CBD	5,03	209,4; 275,7
THCV	5,21	209,4; 275,7
THCVA	5,68	223,5; 271,0; 304,3
CBNA	6,29	256,7
CBN	6,70	218,8; 285,3
Δ^9 -THC	8,03	209,4; 275,7
Δ^8 -THC	8,30	209,4; 275,7
Δ^9 -THCA	9,02	223,5; 271,0; 304,3
CBL	9,25	209,4; 275,7
CBC	9,52	228,3; 280,5; 361,3
CBLA	10,44	228,3; 271,0; 304,3

Tabuľka 9. Programovanie selektívneho nahrávania iónov (SIR)

Segment	Analyt	Hmotnosť (Da) [M + H]	Kónické napätie (V)	Navrhované okno akvizície Štart (min.)	Koniec (min.)
1	CBDVA	331,42	15	2,50	3,50
2	CBDV	287,41	15	3,10	4,10
3	CBDA	359,48	15	3,80	4,80
4	CBGA	343,23*	15	4,10	5,10
5	CBG	317,48	15	4,40	5,50
6	CBD	315,46	15	4,60	5,60
7	THCV	287,41	15	4,70	5,70
8	THCVA	331,42	15	4,80	5,80
9	CBNA	355,44	15	5,50	6,70
10	CBN	311,43	15	6,00	7,20
11	Δ^9 -THC	315,46	15	7,20	8,40
12	Δ^8 -THC	315,46	15	7,20	8,40
13	Δ^9 -THCA	359,47	15	8,00	9,40
14	CBL	315,46	15	8,50	9,70
15	CBC	315,46	15	8,50	9,70
16	CBLA	359,47	15	9,60	10,60

*[M-OH]

Parametre detektora MS sa dajú prispôbiť podľa potreby, aby bolo možné získať analyty v primeraných segmentoch, napríklad zmenou začiatku a/alebo konca akvizitívneho okna alebo zmenou Udaloostí (presmerovací ventil).

Kvalitatívna analýza

Identifikácia sa vykonáva porovnaním času platnosti analytu s časom platnosti referenčného štandardu. Ďalej je potrebné porovnať spektrum UV a hmotu analytu s referenčným materiálom.

Semi-quantitatívna analýza (kalibrácia a kalkulácie)

Δ^9 -THC výpočet

Semi-quantifikácia Δ^9 -THC sa vykonáva v externej kalibrácii s jednobodovou kalibráciou voči kalibračnému roztoku Δ^9 -THC 10 $\mu\text{g/ml}$:

Sa = Plocha analyt

Mech = Hmotnosť vzorky (mg)

Sstd = Plocha štandard

FD = Faktor zriedenia (ml)

Cstd = Štandardná koncentrácia ($\mu\text{g/ml}$)

$$\text{Množstvo}(\mu\text{g/ml}) = Sa \times Cstd/Sstd$$

$$\text{Množstvo (mg/g)} = (Sa \times Cstd / Sstd) \times (FD/Mech) \times (mg/1\,000\ \mu\text{g}) \times (1\,000\ \text{mg/g})$$

$$\text{Množstvo (\% v/v)} = (Sa \times Cstd/Sstd) \times (FD/Mech) \times (mg/1\,000\ \mu\text{g}) \times 100$$

Δ^9 -THCA výpočet pomocou faktora relatívnej odozvy (RRF)

Δ^9 -THCA sa vypočíta pomocou odozvy Δ^9 -THC s použitím príslušného faktora relatívnej odozvy (RRF). Hodnota RRF Δ^9 -THCA sa určuje experimentálne ako dôsledok analýzy Δ^9 -THC a kalibračných kriviek Δ^9 -THCA.

Keď sa RRF využíva na semi-kvantifikáciu THCA s aplikovaním korekčného faktora na kalibračný štandard THC, upraví sa vyššie uvedená rovnica nasledovne: Sstd sa nahradí Scorr.

Scorr = Plocha upravená s RRF RRF = Faktor relatívnej odozvy pre THCA

$$Scorr = Sstd \times RRF$$

Je však stále možné, pripraviť kalibračný roztok pre Δ^9 -THCA a kvantifikovať ho ako pre Δ^9 -THC.

Výpočet celkového THC

Aby sme mohli získať celkové hodnoty THC, musí sa množstvo získané pre THCA konvertovať na ekvivalenty THC nasledovne:

$$\text{Ekvivalent THC} = \frac{\text{molekulová hmotnosť THC}}{\text{molekulová hmotnosť THCA}} \times \text{množstvo THCA}$$

$$\text{Ekvivalent THC} = \frac{314,46\ \text{g/mol}}{358,47\ \text{g/mol}} \times \text{množstvo THCA}$$

$$\text{Celkové THC} = \text{Množstvo THC} + \text{Množstvo THCA (v ekvivalente THC)}$$

Metóda 2

Príprava vzorky

Pevné požívateľiny je možné rozdrviť na prášok alebo zredukovať na menšie kúsky pričom tekuté požívateľiny sa môžu použiť priamo alebo po extrakcii. Keď extrakčná metóda neprinesie uspokojivé chromatografické výsledky (tzn. interferencia s maticou) je možné použiť QuEChERS (skratka pre Rýchle, Jednoduché, Lacné, Efektívne, Robustné a Bezpečné) na prípravu

vzorky. QuEChERS bolo pôvodne vytvorené na analýzu pesticídov v potravinách, ale našlo si široké uplatnenie vrátane analýzy kanabinooidov [83], [84].

Homogenizujte materiál na získanie reprezentatívnej vzorky. Napríklad zmrazte (na sucho) vzorku a rozdrvte ju na prášok. Tvrdé alebo lepkavé cukríky, gumové alebo čokoládové je možné ručne nakrájať alebo nasekať na malé kúsky. Odvážte 2 g homogenizovanej vzorky alebo 0,5 g olejového produktu v 50 ml polypropylénovej skúmavke.

Pridajte 10 ml destilovanej vody a keramický homogenizér, krátko premiešajte a nechajte 30 minút stáť. Pridajte interný štandard a 20 ml acetónitrilu a zamiešajte pri cca 1 700 otáčkach/min. asi 3 minúty vo vertikálnom šejkri alebo homogenizéri.

Pridajte solnú zmes QuEChERS obsahujúcu 4 g síranu horečnatého, 1 g chloridu sodného, 1 g citranu trisodného dihydrátu a 0,5 g citranu seskvihydrát hydrogencitrátu disodného. Extrakčné soli pomáhajú uľahčiť fázu separácie a oddelenia analytov od vodnej vrstvy do acetónitrilovej vrstvy. Zamiešajte roztok pri otáčkach 1 700 ot./min. 3 - 5 min. Ak šejker/homogenizér nemá ovládanie teploty, môžu sa skúmavky mierne prehriať kvôli reakcii. Občas uvoľnite veko a vypustite vygenerovaný plyn.

Vložte do odstredivky pri otáčkach 4 000 ot./min. na 5 minút. Čo sa týka pevných požívatín, je možné po odstredení pozorovať tri rozlíšiteľné vrstvy. Prvá vrstva (kalová) je acetónitrilová fáza, obsahujúca kanabinoidy a organicky rozpúšťanú maticiu; druhá vrstva sú zložky nerozpustnej matrice a zložky matrice rozpustné vo vode, ako napríklad cukry; tretia vrstva sú nerozpustné zbytkové soli extrakcie.

Prenešte kal do rýchlo uzatvárateľnej skúmavky a rozriedte 50-násobne s acetónitrilom-vodou (1:1). V závislosti od citlivosti nástroja môže stačiť menšie zriedenie. Odstredte roztok pri otáčkach 1 300 ot./min. 5 minút, aby sa odstránili častičky, potom prenešte kal do skúmavky LC na analýzu.

Metódu pridania štandardu je možné vykonať extrahovaním vzorky tak, ako je popísané vyššie, spolu s inou vzorkou upravenou primerane nízkymi koncentraciami kanabinooidov. Úpravu je možné pridať spolu s interným štandardom (pozri vyššie). Upravená koncentrácia môže byť v regulačných limitoch špecifických kanabinooidov, ak je to relevantné, alebo detekčných limitov nástroja.

Analytické poznámky

- Prístup s pridaním štandardu je vhodný v nasledujúcich prípadoch:
 - a) keď je potrebné vo vzorke overiť neprítomnosť kanabinooidov;
 - b) ak sa predpokladá, že množstvo kanabinooidov bude veľmi nízke; alebo
 - c) ak matrica požívatín nie je bežná.
- Prístup s pridaním štandardu umožňuje kompenzáciu strát, ktoré sa vyskytnú počas extrakcie a efektov matrice vznikajúcich pri menej bežných požívatínach.

- Je dobrou praxou vždy extrahovať negatívnu kontrolu na preukázanie toho, že analytický proces nezavádza chybné píky v chromatografe. Robí sa to vykonaním rovnakého extrakčného postupu bez prítomnosti vzorky.

Prevádzkové podmienky LC [83]

Typ stĺpca:	Waters ACQUITY UPLC BEH Štít RP18 Stĺpec 100 x 2,1 mm (1,7 μ m)
Teplota stĺpca:	40 °C
Mobilná fáza A:	vodný 0,1 % kyselina mravčia
Mobilná fáza B:	acetónitril
Gradient:	Pozri nižšie (celkový čas trvania 13 min.)
Prietoková miera:	0,5 ml/min.
Detekcia:	MS/MS (týka sa tabuľky 10 pre možné monitorovanie viacerých reakcií (MRM Transitions))
Vstrekovanie:	5 μ l
Poradie elúcie:	CBD, CBDA, CBN, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, THCA

Gradient mobilnej fázy

Čas (min.)	% Mobilnej fázy A	% Mobilnej fázy B
0,00	50	50
1,00	50	50
9,00	0	100
11,00	0	100
13,00	50	50

Tabuľka 10. Čas platnosti a údaje MS/MS

Kanabinoid	Ionizačný režim	Prekurzorový ión > možné dcérske ióny (MRM prechod)	Čas platnosti
CBD	pozitívny	315 > 193, 259, 135	4,79
CBDA	negatívny	357 > 245, 339, 226	5,11
CBN	pozitívny	311 > 223, 293, 195	5,47
Δ^9 -THC	pozitívny	315 > 193, 259, 123	5,73
Δ^8 -THC	pozitívny	315 > 193, 259, 123	5,83
THCA	negatívny	357 > 213, 245, 191	6,64
THC-COOH-d3 (IS)	negatívny	349 > 302, 248, 194	3,50

5.4.9 Identifikácia konope na báze DNA

Bežne používaná morfológická identifikácia (tzn. makroskopická a mikroskopická) a chemické analytické metódy (napr. TLC, GC, GC-MS, LC, atď.) sú vo všeobecnosti dostačujúce na identifikáciu konope. Prístup identifikácie konope na báze DNA však ponúka výhodu identifikácie na úrovni druhu a môže byť zvlášť účinný v situáciách, kedy vo vzorke chýbajú morfológické rozlišujúce znaky materiálu konopnej rastliny a/alebo obsahuje nízku hladinu THC, napríklad vysoko rozdrvená forma, mladé sadenice, semená, korene alebo holé vetvy.

V súčasnosti existujú dva veľmi dobre popísané prístupy k identifikácii konope na báze DNA - buď s použitím univerzálnych čiarových kódov DNA alebo špecifických markerov DNA pre konope [88], [89]. Oba prístupy sú založené na jedinečnosti sekvencií DNA v genóme rastliny *Cannabis sativa* L. a zdieľajú podobné metodológie. Všeobecný záver z týchto štúdií však naznačuje, že jediný čiarový kód DNA je nedostatočný na zabezpečenie druhového rozlíšenia pre množstvo rastlinných druhov.

Najpriamejší prístup identifikácie vzoriek *Cannabis sativa* L. je preskúmať špecifické markery DNA pre konope, syntázu THCA a CBDA. Tieto enzýmy sa podieľajú na katalyzovaní cyklickej oxidácie CBGA na THCA a CBDA v tomto poradí (pozri časť 4.1) [68], [90]. Po zväčšovaní PCR a sekvenovaní DNA či už čiarových kódov DNA alebo špecifických markerov DNA konope by nasledovalo porovnanie získaných sekvencií DNA voči referenčným sekvenciám uloženým v repozitári na určenie zdroja druhov vzorky. Toto sa robí cez nástroj Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [91], [92] ako prehľadanie GenBank, čo je ucelená medzinárodná verejná databáza DNA, kde je uložených 9,9 triliónov základných párov z vyše 2,1 bilióna nukleotidových sekvencií, čo predstavuje takmer pol milióna formálne popísaných druhov [93].

6. Zoznam použitej literatúry

- [1] World Drug Report 2021, United Nations Office on Drugs and Crime. www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html (accessed Dec. 18, 2021).
- [2] European Monitoring Centre of Drug Addiction (EMCDDA), European Drug Report 2021, www.emcdda.europa.eu. www.emcdda.europa.eu/edr2021_en (accessed Dec. 18, 2021).
- [3] United Nations Office on Drugs and Crime, The International Drug Control Conventions, [//www.unodc.org/unodc/en/commissions/CND/conventions.html](http://www.unodc.org/unodc/en/commissions/CND/conventions.html) (accessed Dec. 20, 2021).
- [4] United Nations Office on Drug and Crime, The Multilingual Dictionary of Narcotic Drugs and Psychotropic Substances under International Control (ST/NAR/1 Rev.2), New York, 2006. [//www.unodc.org/unodc/en/scientists/multilingual-dictionary-of-narcotic-drugs-and-psychotropic-substances-under-international-control.html](http://www.unodc.org/unodc/en/scientists/multilingual-dictionary-of-narcotic-drugs-and-psychotropic-substances-under-international-control.html) (accessed Dec. 20, 2021).
- [5] United Nations Office on Drugs and Crime, Terminology and Information on Drugs, Third Edition, 2016 (Sales No.E.16.16.XI.8). Accessed: Dec. 20, 2021. https://www.unodc.org/unodc/en/scientists/terminology-and-information-on-drugs_new.html
- [6] J.M. McPartland, *Cannabis and Cannabinoid Research*, vol. 3, no. 1, 203–212, 2018, doi: 10.1089/can.2018.0039.
- [7] S. Schilling, C. Dowling, J. Shi, L. Ryan and D. Hunt, The Cream of the Crop: Biology, Breeding and Applications of Cannabis sativa. 2020. doi: 10.22541/au.160139712.25104053.
- [8] Q. Zhang, X. Chen, H. Guo, L.M. Trindale and E.M.J. Salentijn, *Frontiers in Plant Science*, vol. 9, p. 1876, 2018, doi: 10.3389/fpls.2018.01876.
- [9] R.J. Hill, Marijuana, Cannabis sativa L., Regulatory Horticulture, Weed Circular No. 5, 9 (12), 5766, p. 7, 1983.
- [10] E. Small and A. Cronquist, A Practical and Natural Taxonomy for Cannabis, *Taxon*, vol. 25, no. 4, 405–435, 1976, doi: 10.2307/1220524.
- [11] S. Gilmore, R. Peakall, and J. Robertson, *Forensic Science International*, vol. 172, no. 2, 179–190, 2007, doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.10.025>.
- [12] J. Hey and C. Pinho, *Evolution*, vol. 66, no. 5, 1413–1429, May 2012, doi: 10.1111/j.1558-5646.2011.01542.x.
- [13] J. Sawler, J.M. Stout, K.M. Gardner, D. Hudson and J. Vidmar, *PLOS ONE*, vol. 10, no. 8, p. e0133292, Aug. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0133292.
- [14] R.C. Lynch, D. Vergara, S. Tittes, K. White and C.J. Schwartz, *Critical Reviews in Plant Sciences*, vol. 35, no. 5–6, 349–363, 2016, doi: 10.1080/07352689.2016.1265363.

- [15] "Flora of North America, Cannabis sativa (updated 2020)", <http://floranorthamerica.org/> (retrieved November 2021). http://floranorthamerica.org/Cannabis_sativa (accessed Dec. 20, 2021).
- [16] W. Brandt, M. Gürke, G. Pabst, F.E. Köhler, G. Schellenberg and M. Vogtherr, Köhler's mediz inalpflanzen in naturgetreuen abbildungen mit kurz erläuterndem texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica, austriaca, belgica, danica, helvetica, hungarica, rossica, suecica, neerlandica, British pharmacopoeia, zum Codex medicamentarius, sowie zur Pharmacopoeia of the United States of America. GeraUnternhaus: Verlag von Fr. Eugen Köhler, 1883.
- [17] Europol Drugs Information Bulletin No. 3/2001, p.7.: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/publication/b082e4a4-3049-4013-91ea-b451ea5438d5>
- [18] H. Mahler, "Moderne Methoden zur Anzucht von Cannabispflanzen Berechnung des Ertrags von IndoorPlantagen, Proceedings XV. GTFCh Symposium 2007, Mosbach, ISBN ISBN 978-3-00-023794-2", p. 14.
- [19] M. Toonen, S. Ribot, and J. Thissen, *Journal of Forensic Science*, vol. 51, no. 5, 1050–1054, 2006, doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00228.x.
- [20] Bureau Ontnemingswetgeving Openbaar Ministerie (BOOM) (2005), Wederrechtelijk ver kregen voordeel hennepkwekrij bij binnenteelt onder kunstlicht: Standaardberekeningen en normen.
- [21] H. Stambouli, A.E. Bouri, M.A. Bellimam, T. Bouayoun, and N.E. Karni, *Bulletin on Narcotics*, vol. 57 1–2, 79–118, 2005.
- [22] With permission of Kantonspolizei Zürich, KTA-KF.
- [23] E.R. Service, Industrial Hemp in the United States: Status and Market Potential. www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=41757 (accessed Dec. 20, 2021).
- [24] L.A. King, *The Misuse of Drugs Act: A Guide for Forensic Scientists* (RSC Publication), p. 82., 2003, <https://1lib.at/book/1247461/bf0f71> (accessed Dec. 20, 2021).
- [25] G. Martinelli, A. Magnavacca, M. Fumagalli, M. Dell' Agli, S. Piazza, and E. Sangiovanni, *Planta Medica*, 2021, doi: 10.1055/a-1420-5780.
- [26] A.A. Jairoun, S.S. AlHemyari, M. Shahwan, B. Ibrahim, M.A. Hassali, and S.H. Zyoud, *Cosmetics*, vol. 8, no. 3, 2021, doi: 10.3390/cosmetics8030057.
- [27] B. Thomas and M. ElSohly, "The Botany of Cannabis sativa L.", 2016, 1–26. doi: 10.1016/B978-0-12-804646-3.00001-1.
- [28] Y. Gaoni and R. Mechoulam, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 86, no. 8, 1646–1647, 1964, doi: 10.1021/ja01062a046.
- [29] R. Mechoulam, P. Braun, and Y. Gaoni, *Journal of the American Chemical Society*, vol. 89, no. 17, 4552–4554, 1967, doi: 10.1021/ja00993a072.
- [30] V.R.L.J. Bloemendal, J.C.M. van Hest, and F.P.J.T. Rutjes, *Organic Biomolecular Chemistry*, vol. 18, no. 17, 3203–3215, 2020, doi: 10.1039/D0OB00464B.
- [31] M. Taschwer and M. G. Schmid, *Forensic Science International*, vol. 254, 167–171, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.07.019>.

- [32] D. M. Cole, *The Analysis of Controlled Substances | Analytical Techniques in the Sciences*, 2003. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470868007> (accessed Dec. 20, 2021).
- [33] S.A. Ross and M.A. Elsohly, *Bulletin on Narcotics*, vol. Vol. XLIX and L, 139–147, 1997.
- [34] C. Lindholst, *Australian Journal of Forensic Sciences*, vol. 42, no. 3, 181–190, 2010, doi: 10.1080/00450610903258144.
- [35] J.W. Fairbairn, J.A. Liebmann, and M.G. Rowan, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 28, no. 1, 1–7, 2011, doi: 10.1111/j.20427158.1976.tb04014.x.
- [36] R. Mechoulam and L. Hanuš, *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 121, no. 1, 35–43, 2002, doi:10.1016/s0009-3084(02)00144-5.
- [37] Y. Gaoni and R. Mechoulam, *Tetrahedron*, vol. 22, no. 4, 1481–1488, 1966, doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)994463](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)994463).
- [38] G. R. Webster, L. Sarna, and R. Mechoulam, Conversion of cbd to delta8-thc and delta9-thc, US20040143126A1, 2004 Accessed: Dec. 20, 2021. <https://patents.google.com/patent/US20040143126A1/en>
- [39] P. Golombek, M. Müller, I. Barthlott, C. Sproll, and D.W. Lachenmeier, *Toxics*, vol. 8, no. 2, 2020, doi: 10.3390/toxics8020041.
- [40] B.E. Erickson, Delta8THC Craze Concerns Chemists | RealClearScience, Jul. 12, 2021. www.realclearscience.com/2021/07/12/delta-8thc_craze_concerns_chemists_785049.html (accessed Dec. 20, 2021).
- [41] K. Tsujikawa, Y. Okada, H. Segawa, T. Yamamuro, K. Kuwayama, T. Kanamori and Y.T. Iwata., *Forensic Toxicology*, vol. 40, pp. 125–131, 2022, doi: 10.1007/s11419-021-00592-9.
- [42] A. ChanHosokawa, L. Nguyen, N. Lattanzio, and W.R. Adams., *Journal of Analytical Toxicology*, p. bkab029, 2021, doi: 10.1093/jat/bkab029.
- [43] “World Health Organization (WHO), Expert Committee on Drug Dependence (ECDD), Critical review: Delta-9-tetrahydrocannabinol, 2018”. Accessed: Dec. 20, 2021. www.who.int/medicines/access/controlled-substances/THCv1.pdf
- [44] R.N. Smith and C.G. Vaughan, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 29, no. 1, 286–290, 2011, doi: 10.1111/j.2042-7158.1977.tb11313.x.
- [45] K. Kovar and H. Linder, Investigation of Hashish: Content Uniformity of Different Samples by Coupled HPLC/PC-Analysis., 1992, doi: 10.1002/CHIN.199201294.
- [46] O. Zoller, P. Rhyn, and B. Zimmerli, *Journal of Chromatography A*, vol. 872, no. 1, 101–110, 2000, doi: 10.1016/s0021-9673(99)01287-x.
- [47] C. Citti, D. Braghiroli, M.A. Vandelli, and G. Cannazza, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 147, 565–579, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.06.003.
- [48] M. Wang, Y.H. Wang, B. Avula, M.M. Radwan and S.A. Wanas, *Journal of Forensic Science*, vol. 62, no. 3, 602–611, 2017, doi: 10.1111/1556-4029.13341.
- [49] B. Patel, D. Wene, and Z. Fan, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 146, 15–23, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.021>.

- [50] G. Fritschi, B. Klein, and W. Szilluweit, Verteilung der THCGehalte in Marihuanapflanzen, p. 3.
- [51] THC Statistics, Swiss Federal Office of Public Health, 2020. Accessed: Dec. 18, 2021. [Online]. Available: https://sgrm.ch/inhalte/Forensische-Chemie-und-Toxikologie/Fachgruppe_Chemie/Statistiken/THC/THC_2020_Neu.pdf
- [52] E. de Meijer, H.J. van der Kamp, and F. van Eeuwijk, *Euphytica*, vol. 62, 187–200, 2004.
- [53] Drugs Working Group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and UNODC, “Guidelines on representative sampling (ST/NAR/38)”. 2009. www.unodc.org/unodc/en/scientists/guidelines-on-representative-drug-sampling_new.html
- [54] European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI), Guidelines on Sampling of Illicit Drugs for Quantitative Analysis. 2016. http://enfsi.eu/wp-content/uploads/2016/09/guide-lines_quant_sampling_dwg_printing_vf4.pdf
- [55] Official Journal of the European Communities of 28 December 2000 (L 332/63), Commission Regulation (EC) No 2860/2000 of 27 December 2000, ANNEX VI, ANNEX XIII (article 7b(1)) (<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000R2860&from=FR>).
- [56] Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs (SWGDRUG), Recommendations, Version 8.0, 2019, www.SWGDRUG.org (retrieved November 2021).
- [57] R. Clarke, Marijuana Botany, Ronin Publishing, Inc, ISBN 0-914171-78-X. Ronin Publishing, Inc, 1981.
- [58] Z.K. Punja and J.E. Holmes, *Frontiers in Plant Science*, vol. 11, p. 718, 2020, doi: 10.3389/fpls.2020.00718.
- [59] G.R. Nakamura, *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, vol. 52, no. 1, 5–16, 1969, doi: 10.1093/jaoac/52.1.5.
- [60] G.T. Mitosinka, J.I. Thornton, and T.L. Hayes, *Journal of the Forensic Science Society*, vol. 12, no. 3, 521–529, 1972, doi: 10.1016/S0015-7368(72)70717-3.
- [61] Wissenschaftlicher Dienst, Stadtpolizei Zürich, Switzerland, with permission, 2007.
- [62] C.R.B. Joyce and S.H. Curry, *The botany and chemistry of Cannabis*, 1970.
- [63] B.P. Jackson and D.W. Snowdon, *Powdered vegetable drugs: an atlas of microscopy for use in the identification and authentication of some plant materials employed as medicinal agents*. London: Thornes, 2nd edition, 1974.
- [64] P. Dayanandan and P.B. Kaufman, *American Journal of Botany*, vol. 63, no. 5, 578–591, 1976, doi: 10.1002/j.1537-2197.1976.tb11846.x.
- [65] C.T. Hammond and P.G. Mahlberg, *American Journal of Botany*, vol. 60, no. 6, 524–528, 1973, doi: 10.1002/j.1537-2197.1973.tb05953.x.
- [66] A.B. Segelman, P.A. Babcock, B.L. Braun, and F.H. Segelman, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 62, no. 3, 515–516, 1973, doi: <https://doi.org/10.1002/jps.2600620344>.
- [67] J.L. Fussell, J.I. Thornton and F.W. Whitehurst, *Journal of Forensic Identification*, 59, Accessed: Dec. 21, 2021. https://theiai.org/docs/JFI_2006-2009.pdf

- [68] S. Sirikantaramas, S. Morimoto, Y. Shoyama, Y. Ishikawa, Y. Wada, Y. Shoyama and F. Taura, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 38, 39767–39774, 2004, doi: 10.1074/jbc.M403693200.
- [69] F.E. Dussy, C. Hamberg, M. Luginbühl, T. Schwerzmann, and T.A. Briellmann, *Forensic Science International*, vol. 149, no. 1, 3–10, 2005, doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.05.015>.
- [70] B.D. Backer, B. Debrus, P. Lebrun, L. Theunis and N. Dubois, *Journal of Chromatography B*, vol. 877, no. 32, 4115–4124, 2009, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.11.004>.
- [71] L. Ambach, F. Penitschka, A. Broillet, S. König, W. Weinmann, and W. Bernhard, *Forensic Science International*, vol. 243, 107–111, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.008>.
- [72] M. Bovens, T. Csesztregi, A. Franc, J. Nagy, and L. Dujourdy, *Forensic Science International*, vol. 234, 174–180, 2014, doi: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.09.001>.
- [73] Wissenschaftlicher Dienst, Stadtpolizei Zürich, Switzerland, validated method, with permission, 2007.
- [74] A.J. Poortman van der Meer and H. Huizer, *Forensic Science International*, vol. 101, no. 1, 1–8, 1999, doi: 10.1016/s0379-0738(99)00004-3.
- [75] M.J. de Faubert Maunder, UNODC *Bulletin of Narcotics*, Issue 4, pp. 3742, 1969, www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1969-01-01_4_page006.html
- [76] K. Lewis, R. Wagner, S.E. Rodriguez-Cruz, M.J. Weaver, and J.C. Dumke, *Journal of Forensic Sciences*, vol. 66, no. 1, 285–294, 2021, doi: 10.1111/1556-4029.14562.
- [77] J.M. Holler, M.L. Smith, S.N. Paul, M.R. Past, and B.D. Paul, *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 43, no. 5, 674–679, 2008, doi: 10.1002/jms.1375.
- [78] R. Andrews and S. Paterson, *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 36, no. 1, 61–65, 2012, doi: 10.1093/jat/bkr017.
- [79] T.B. Vree, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, no. 10, 1444–1450, 1977, doi: 10.1002/jps.2600661025.
- [80] D.J. Harvey, *Mass Spectrometry Reviews*, vol. 6, no. 1, 135–229, 1987, doi: 10.1002/mas.1280060104.
- [81] Institute of Legal Medicine, St Gall, Switzerland, validated method, with permission, 2005.
- [82] R. Brenneisen, *Pharmaceutica Acta Helveticae*, vol. 59, no. 9–10, 247–259, 1984.
- [83] N. Christinat, M.C. Savoy, and P. Mottier, *Food Chemistry*, vol. 318, p. 126469, 2020, doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126469.
- [84] I. Di Marco Pisciotano, G. Guadagnuolo, V. Soprano, M. De Crescenzo, and P. Gallo, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 32, no. 19, 1728–1736, 2018, doi: 10.1002/rcm.8242.
- [85] R.F. Klein, *Microgram Journal*, 14(14), 9–32, 2017.
- [86] G. McRae and J.E. Melanson, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 412, no. 27, 7381–7393, Nov. 2020, doi: 10.1007/s00216-020-02862-8.

- [87] AOAC SMPR® 2017.019 Standard Method Performance Requirements (SMPRs®) for Quantitation of Cannabinoids in Edible Chocolate. Accessed: Dec. 19, 2021. [Online]. Available: www.aoc.org/wp-content/uploads/2020/11/SMPR202017_019.pdf
- [88] A. J. Fazekas, K.S. Burgess, P.R. Kesankurti, S.W. Graham and S.G. Newmaster, *PLoS One*, vol. 3, no. 7, p. e2802, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0002802.
- [89] CBOL Plant Working Group, "A DNA barcode for land plants", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 106, no. 31, 12794–12797, 2009, doi: 10.1073/pnas.0905845106.
- [90] F. Taura, S. Sirikantaramas, Y. Shoyama, K. Yoshikai, Y. Shoyama, and S. Morimoto, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, vol. 581, no. 16, 2929–2934, 2007, doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.043.
- [91] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman, *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, 403–410, 1990, doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- [92] S. McGinnis and T.L. Madden, *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. Web Server issue, W20–25, 2004, doi: 10.1093/nar/gkh435.
- [93] E.W. Sayers, M. Cavanaugh, K. Clark, K.D. Pruitt, C.L. Schoch, S.T. Sherry and I. Karsch Mizrahi, "GenBank," *Nucleic Acids Research*, vol. 49, no. D1, D92–D96, 2021, doi: 10.1093/nar/gkaa1023.



UNODC

United Nations Office on Drugs and Crime

Vienna International Centre, P.O. Box 500, 1400 Vienna, Austria

Tel.: (+43-1) 26060-0, Fax: (+43-1) 263-3389, www.unodc.org