



ORIGINALNI NAUČNI ČLANAK

Validacija metode za identifikaciju kanabisa tehnikom gasne hromatografije

Mirjana Dragoljić | Vesna Matić | Ljiljana Simurdić

Ministarstvo unutrašnjih poslova
Republike Srpske, Banja Luka,
BiH.

Odgovorni autor:

Mirjana Dragoljić, Ministarstvo
unutrašnjih poslova Republike
Srpske, Banja Luka, RS

Email: dragoljic@blic.net

Ključne riječi:

Cannabis sativa L., *kanabinoidi*,
tetrahidrokanabinol, *validacija*.

Izvod

Metode analize u forenzici moraju biti pouzdane, kako bi rezultati analiza bili prihvaćeni kao dokaz u sudskim postupcima. Pouzdanost metoda provjerava se postupkom validacije, koji treba provesti prije uvođenja metode u rutinsku praksu laboratorije. Ovaj rad opisuje proceduru za identifikaciju biljke konoplje lat. *Cannabis sativa L.* i njenih preparata (smola – „hašiš“, ulje), primjenom tehnike gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom, kao i postupak validacije metode kojom se identifikuju tri osnovna kanabinoida: psihoaktivni tetrahidrokanabinol, kanabidiol i kanabinol. Postupak validacije metode obuhvata potrebnu opremu, opis zahtjevanih performansi analitičke metode, izvođenje ispitivanja, način i kriterijume vrednovanja rezultata validacije.

1. UVOD

Biljka *Cannabis sativa L.* i proizvodi pripremljeni od ove biljke (kanabis smola – „hašiš“ i kanabis ulje) najraširenija su ilegalna droga i poznati su pod nazivom kanabis preparati.[1] Karakteristični sastojci kanabis biljke su kanabinoidi, terpenofenolna jedinjenja tipa C_{21} . [2-4] Do sada je iz kanabis biljke izolovano i identifikovano 104 kanabinoida.[5] Psihoaktivni sastojak kanabis biljke i njenih preparata je Δ^9 -tetrahidrokanabinol (u literaturi često naveden samo kao tetrahidrokanabinol – THC).

Kanabis biljka uobičajeno sadrži do oko 5% THC-a, dok modifikovane biljke mogu da sadrže i preko 25% tog psihoaktivnog sastojka. Kanabis smola (hašiš) uobičajeno sadrži 20 – 40% THC-a, kanabis ulje oko 60%, a visokopotentni ekstrakti i ulja mogu da sadrže 80-90% THC-a.[6-8] Istraživanja u nekim zemljama pokazuju da je sadržaj THC u kanabis biljkama u porastu.[9-11] Ovaj fenomen zapažen je i u Republici Srpskoj.[12]

Zadatak forenzičke analize je da utvrdi eventualno prisustvo psihoaktivnih sastojaka u ispitivanim uzorcima. Kada su u pitanju kanabis preparati, ciljni analit je psihoaktivni sastojak tetrahidrokanabinol (THC), a kao prateći analiti identifikuju se kanabidiol (CBD) i kanabinol (CBN), ukoliko su prisutni u uzorku.

Pored ostalih analitičkih tehnika i metoda za identifikaciju osnovnih kanabinoida, gasna hromatografija je tehnika izbora za analizu kanabis preparata, bilo da su u pitanju uzorci ili tragovi na priboru.

Ovaj rad opisuje postupak validacije metode za identifikaciju tri osnovna kanabinoida u kanabis biljci i

njenim preparatima (smola – „hašiš“, ulje, ekstrakti, tinkture i sl.), primjenom analitičke tehnike gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Metoda gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom (GC/FID)

Forenzičko ispitivanje počinje pravilnim odabirom alikvota uzorka, na osnovu izvršenih preliminarnih testova primjenom tzv. skrinig tehnika ili prema procjeni analitičara. Ekstrakcija ciljnih analita iz uzorka vrši se odgovarajućom količinom rastvarača (hloroform, toluen ili etanol), srazmjernom odvaganoj masi uzorka. Npr., uobičajene mase uzorka za analizu su 250 mg biljnog materijala, 50 mg smole ili 25 mg ulja, za čiju ekstrakciju se obično koristi 5 ml rastvarača. Količine uzorka i rastvarača mogu biti i drugačije, kada analitičar iz određenih razloga procijeni da je to potrebno ili kada je raspoloživa količina uzorka ograničena. Prilikom analize tragova sa pribora (npr. vage, nargile, mrvilice itd.), pribor se ispere sa dovoljnom količinom rastvarača, a višak rastvarača se upari.

Ekstrakcija uzoraka rađena je primjenom horizontalnog šejkera „PROMAX 1020“ marke „Heidolph“ i ultrazvučnog kupatila „SONOMATIC, LANGFORD ULTRASONIC 475H“.

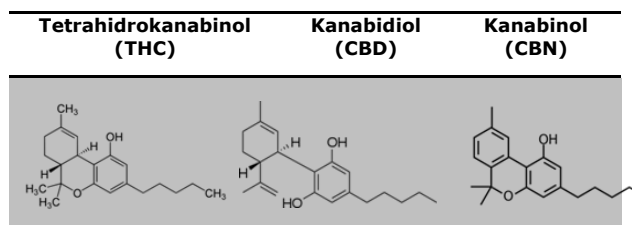
Ekstrakti uzoraka analizirani su tehnikom gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom (GC/FID). Radni uslovi instrumenta i parametri metode prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. – Instrumentalni parametri metode

Injektor	Split/splitless (sa staklenom vunom), Temp.: 260°C, Injekcioni vol.: 1µl (ručno injektiranje), Split ratio: 20:1
Kolona	Kapilarna (Optima-5: 15 m x 0,32 mm x 1 µm, stacionarna faza 5% fenil – 95% dimetilpolisiloksan), Gas nosač: N ₂ (99.9999%), 2 ml/min.
Hrom. peć	Temp. 260°C, izotermno, 8 min.
Detektor	FID, Temp.: 300°C, Protok gasova (ml/min): vazduh: 350, vodoniak: 35

Validacija gasnohromatografske metode za identifikaciju kanabisa izvršena je primjenom instrumenta "Trace GC Ultra" marke "Thermo Scientific", sa „Chrom – Card“ softverom.

Za validaciju su korišteni referentni standardi tetrahidrokanabinola (THC), kanabidiola (CBD) i kanabinola (CBN), proizvođača „Lipomed“ i uzorci biljke *Cannabis sativa* L. Strukture osnovnih kanabinoida prikazane su u tabeli 2.

Tabela 2. – Strukture osnovnih kanabinoida

2.2. Svrha – obim validacije i zahtijevane performanse metode

Pod validacijom se podrazumijeva potvrđivanje, ispitivanjem i prikupljanjem objektivnih dokaza, da su posebni zahtjevi za predviđenu specifičnu upotrebu zadovoljeni.[13] Prema tome, validacija metode obuhvata provođenje eksperimenata i njihovo dokumentovanje sa ciljem prikupljanja objektivnih dokaza da metoda odgovara planiranoj upotrebi. To podrazumijeva eksperimentalno utvrđivanje odabranih parametara validacije i poređenje sa kriterijima utvrđenim za te parametre. Za uspješnu validaciju analitičke metode neophodno je na početku definisati zahtijevane performanse metode i sačiniti plan validacije, kojeg se treba pridržavati tokom postupka validacije.[14]

Oprema i pribor moraju biti kalibrisani, a referentni materijali sljedivi do nivoa certifikovanih referentnih materijala.[13, 15-17]

Postupak počinje izborom pogodnih rastvarača za ekstrakciju uzoraka i ispitivanjem ponašanja sva tri osnovna kanabinoida u rastvaračima. Potom je potrebno ispitati radne uslove instrumenta i podesiti ih tako da obezbjeđuju prihvatljivo razdvajanje pikova tri osnovna kanabinoida na hromatogramu i odrediti retenciona vremena.

Tokom validacije gasnohromatografske metode za kvalitativnu analizu osnovnih kanabinoida potrebno je

ispitati sljedeće performanse metode: specifičnost /selektivnost, uticaj matriksa, donju granicu detekcije, ponovljivost, međupreciznost i robusnost. [17]

Postupak ispitivanja parametara bitnih za performanse metode unosi se u izvještaj o validaciji, a na osnovu kriterijuma prihvatljivosti procjenjuje se da li se metoda može primjenjivati – izjava o validnosti metode. [14]

3. EKSPERIMENTALNI DIO - IZVOĐENJE ISPITIVANJA I KRITERIJUMI OCJENJIVANJA

3.1. Određivanje Rt i ocjena specifičnosti i selektivnosti

Metoda kvalitativne gasnohromatografske analize mora omogućiti dobro razdvajanje pikova tri osnovna kanabinoida i rastvarača koji se koristi za ekstrakciju uzoraka. Specifično za ciljni analit tetrahidrokanabinol (THC) je njegovo retenciona vrijeme (Rt), dok su za selektivnost bitna i retenciona vremena kanabidiola (CBD) i kanabinola (CBN).

Za određivanje retencionih vremena pripremljeni su rastvori referentnih standarda tri osnovna kanabinoida u hloroformu, koncentracije 1mg/ml i analizirani pojedinačno, pri čemu su očitana specifična retenciona vremena za THC, CBD i CBN, te izvršeno izračunavanje dozvoljenog odstupanja od ±1% (tabela 3).

Tabela 3. Retenciona vremena kanabinoida i dozvoljeno odstupanje

Kanabinoid	Rt	Rt -1%	Rt +1%
THC	5,57	5,51	5,62
CBD	4,46	4,41	4,50
CBN	6,54	6,47	6,60

Na osnovu retencionih vremena može se zaključiti da metoda obezbjeđuje dobro hromatografsko razdvajanje sva tri osnovna kanabinoida i rastvarača (Rthloroforma = 0,45), što znači da je metoda selektivna.

3.2. Ispitivanje uticaja matriksa i izbor rastvarača

Kanabis biljka sadrži preko 700 različitih jedinjenja, od kojih je preko 100 kanabinoida [5], zbog čega metoda mora omogućiti identifikaciju THC-a u prisustvu svih jedinjenja koji se nalaze u biljci (matriks), a mogu se detektovati ovom tehnikom. Drugim riječima, ni jedno jedinjenje prisutno u biljci ne smije maskirati THC tj. ometati njegovu identifikaciju ili dati lažno pozitivni rezultat. S obzirom da je gotovo nemoguće nabaviti referentne standarde svih kanabinoida, nije moguće eksperimentalno odrediti Rt svih kanabinoida koji bi se mogli naći u biljci. Međutim, tokom dugogodišnje primjene gasnohromatografskih metoda za analizu, nije zabilježen slučaj da se retenciona vrijeme nekog od osnovnih kanabinoida (THC, CBD i CBN) poklopilo sa retencionim vremenom neke druge komponente iz kanabis biljke.

Ipak, u cilju potvrde da matriks biljke nema uticaj na identifikaciju ciljnih analita, tokom postupka validacije metode izvršena je analiza tri uzorka biljke Cannabis

sativa L., prethodno analizirana primjenom druge dvije tehnike (TLC i GC/MS) kojima je potvrđeno prisustvo THC, CBD i CBN u uzorcima.

Za analize je odvagano po 250 mg usitnjenih biljnih uzoraka koji su ekstrahovani sa po 5 ml različitih rastvarača, kako slijedi:

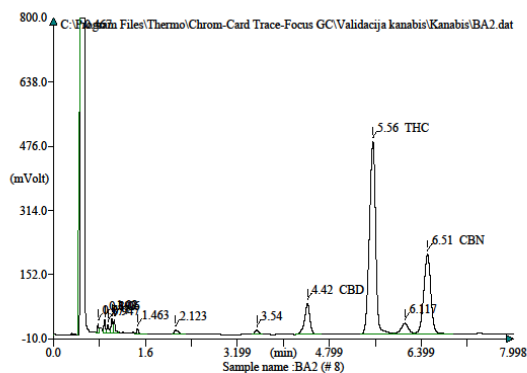
- Prvi uzorak je ekstrahovan sa 5 ml hloroforma u ultrazvučnom kupatilu 5 minuta. Nakon filtriranja analiziran je svjež ekstrakt bez uparavanja (obilježen kao BA1), a potom je uparen do suha na 80°C, ponovo rastvoren u 5 ml hloroforma, pa ponovo analiziran (obilježen kao BB1).

- Drugi uzorak je pripremljen i analiziran u dva koraka, kao i prethodni, samo je ekstrakcija izvršena sa 5 ml toluena (obilježeni kao BA2 i BB2).

- Za treći uzorak ponovljen je isti postupak kao za prethodna dva, samo je ekstrakcija izvršena sa 5 ml etanola (obilježeni kao BA3 i BB3).

Ovim testiranjem ispitan je uticaj matriksa, uticaj primjene različitih rastvarača za ekstrakciju i uticaj temperature uparavanja na rezultate analiza.

Na hromatogramima analiziranih uzoraka (slika 1) jasno su vidljivi pikovi THC-a, CBD-a i CBN-a (Rt u granicama $\pm 1\%$, oštri pikovi bez tejlina, bez duplih vrhova i sl.), te se može konstatovati da u biljnim uzorcima nema komponenti koje bi ometale identifikaciju osnovnih kanabinoida na odgovarajućim retencionim vremenima, što znači da nema uticaja matriksa na rezultate analiza.



Slika 1: Hromatogram ekstrakta kanabis biljke

Pregled rezultata analiziranih uzoraka i retencionih vremena THC-a, CBD-a i CBN-a prikazana su u tabeli 4.

Tabela 4. Uzorci kanabis biljke ekstrahovani sa tri rastvarača

Kanabinoid	Rt kanabinoida u uzorcima biljke <i>Cannabis sativa L.</i>					
	Hloroform		Toluen		Etanol	
	BA1	BB1	BA2	BB2	BA3	BB3
THC	5,56	5,54	5,56	5,54	5,57	5,55
CBD	4,41	4,41	4,42	4,41	4,42	4,42
CBN	6,49	6,49	6,51	6,50	6,50	6,49

Pored uticaja matriksa, eksperimentom je provjereno da vrsta rastvarača i postupak uparavanja ne utiču na rezultat kvalitativne analize, što analitičaru omogućuje izbor rastvarača za ekstrakciju i uslova uparavanja.

3.3. Određivanje granice detekcije

Donja granica detekcije je najmanja koncentracija analita koja se određenom metodom može detektovati. Donja granica detekcije određuje se postepeno, analizom sve nižih koncentracija THC-a, dok se ne dobije razblaženje koje primjenjenom metodom ne daje vidljiv pik. Za potrebe kvalitativne forenzičke analize prihvatljiva je donja granica detekcije od 0,01% THC, mada mogu biti identifikovane i niže vrijednosti. Potrebno je da pik THC-a bude vizuelno vidljiv i da ga instrument detektuje kao THC.

Za određivanje donje granice detekcije pripremljeni su rastvori referentnog standarda THC-a različitih koncentracija, razblaženjem rastvora koncentracije 1 mg/ml do 0,001 mg/ml (rezultati prikazani u tabeli 5).

Tabela 5. Rastvori referentnog standarda THC-a različitih koncentracija

Konc. THC [mg/ml]	1. analitičar 21.10.2015.		2. analitičar 23.10.2015.		3. analitičar 28.10.2015.	
	Pik THC	Rt	Pik THC	Rt	Pik THC	Rt
	Da/Ne		Da/Ne		Da/Ne	
1,000	Da	5,54	Da	5,56	Da	5,55
0,500	Da	5,54	Da	5,55	Da	5,54
0,250	Da	5,54	Da	5,55	Da	5,53
0,125	Da	5,54	Da	5,54	Da	5,53
0,062	Da	5,54	Da	5,54	Da	5,53
0,031	Da	5,54	Da	5,53	Da	5,53
0,016	Da	5,54	Da	5,55	Da	5,53
0,008	Da	5,53	Da	5,55	Da	5,52
0,004	Ne	x	Ne	x	Ne	x
0,002	Ne	x	Ne	x	Ne	x
0,001	Ne	x	Ne	x	Ne	x

Analize su ponovljene tri puta od strane tri različita analitičara, te je ispitana i međupreciznost. U sva tri slučaja donja granica detekcije iznosila je 0,008 mg/ml, što je preciznije od potrebnog uslova prihvatljive donje granice detekcije od 0,01 mg/ml, pri kojoj je pik vizuelno vidljiv i instrument ga detektuje kao THC.

Kod svih detektovanih pikova Rt je u granicama prihvatljivosti ($\pm 1\%$). Rastvori su analizirani tri puta u razmaku od tri dana čime je utvrđena i stabilnost rastvora THC-a tokom tog perioda. Gornja granica detekcije je najveća koncentracija pri kojoj se pik na hromatogramu identifikuje kao pik THC-a. Određivanje gornje granice detekcije nije od velikog značaja, jer biljka ne sadrži tako visoke koncentracije THC-a, a u slučaju koncentrovanih preparata (npr. kanabis ulje) uzorak se može razblažiti do

koncentracije koja će dati pik prepoznatljive veličine.

Zbog toga nije neophodno ispitivati gornju granicu detekcije tokom validacije metode kvalitativne analize.

3.4. Ponovljivost i međupreciznost

Ponovljivost retencionog vremena prati se tako što jedan analitičar, na istom aparatu, u istom danu, iste rastvore injektira dva puta. Uticaj vremena i temperature na ponovljivost rezultata prati se analizom istih rastvora tokom tri dana, kako rastvora koji su čuvani na sobnoj temperaturi, tako i onih koji su čuvani u frižideru na +4°C. Međupreciznost se prati tako da najmanje dva analitičara vrše analize istih rastvora (ne mora u istom danu). Kao prihvatljivo odstupanje Rt uzima se odstupanje do ±1%. Rezultati provjere ponovljivosti i međupreciznosti prikazani su u poglavljima 3.3, 3.5. i 3.6. (tabele 5, 6 i 7).

3.5. Procjena performansi u rastvoru smjese referentnih standarda kanabinoida

Alikvoti od po 0,5 ml prethodno pripremljenih rastvora referentnih standarda kanabinoida stavljeni su u 2 viala (u svakoj viali je smjesa tri standarda ukupnog volumena 1,5 ml).

Rastvor iz prve viala (označen kao 1A) analiziran je nakon mućkanja 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu. Ostatak rastvora podijeljen je na dva dijela, od kojih je dio čuvan na sobnoj temperaturi, a dio u frižideru (1B), te su analizirani u sljedeća dva dana.

Rastvor iz druge viala (označen kao 2A) analiziran je nakon mućkanja 30 minuta na horizontalnom šejkeru. Ostatak rastvora podijeljen je na dva dijela, od kojih je dio čuvan na sobnoj temperaturi, a dio u frižideru (2B), te su analizirani u sljedeća dva dana. Prvog i trećeg dana analize je vršio jedan analitičar, a drugog dana analize je vršio drugi analitičar (rezultati su prikazani u tabeli 6).

Tabela 6. Analiza smjese standarda kanabinoida

Oznaka uzorka	Rt kanabinoida		
	THC	CBD	CBN
I dan – prvi analitičar (21.10.2015.)			
1A	5,56	4,45	6,53
2A	5,55	4,44	6,52
II dan – drugi analitičar (22.10.2015.)			
1A	5,54	4,43	6,51
2A	5,54	4,43	6,51
1B	5,53	4,42	6,50
2B	5,52	4,42	6,49
III dan – prvi analitičar (23.10.2015.)			
1A	5,57	4,46	6,55
2A	5,57	4,46	6,54
1B	5,55	4,45	6,53
2B	5,55	4,44	6,51

Na ovaj način provjerena je ponovljivost, međupreciznost, uticaj vremena i temperature na nivou ponovljivosti i međupreciznosti rezultata, uticaj načina rastvaranja referentnih standarda kanabinoida, robusnost i stabilnost referentnih standarda u rastvaraču, kao i Rt u granicama prihvatljivosti (±1%).

Dakle, kvalitativni rezultat analize, dobijen primjenjenom metodom, ne mijenja se bez obzira na način rastvaranja referentnih standarda u rastvaraču (ultrazvučno kupatilo ili horizontalni šejker), niti zavisi od analitičara koji rade na istom instrumentu. Rezultati su stabilni i kada rastvor stoji tri dana, bilo da se čuva na sobnoj temperaturi ili u frižideru. Ovom prilikom nisu provedena ispitivanja za period duži od tri dana.

3.6. Procijena performansi u ekstraktu biljke konoplje

Isti postupak kao u tački 3.5. proveden je i sa uzorcima kanabis biljke. Dva uzorka usitnjenog bilnog materijala, mase oko 250 mg svaki, ekstrahovana su sa po 5 ml hlороforma.

Jedan uzorak ekstrahovan je 15 minuta u ultrazvučnom kupatilu, a drugi uzorak 30 minuta u horizontalnom šejkeru, nakon čega su filtrirani, a potom podijeljeni na po pet dijelova za analize pod različitim okolnostima:

- po 1 ml, od kojih je dio odmah analiziran, a ostaci su čuvani na sobnoj temperaturi i analizirani drugi i treći dan (označeni kao 3A i 4A);
- po 1 ml, koji su čuvani u frižideru i analizirani drugi i treći dan (označeni kao 3B i 4B);
- po 1 ml, koji su upareni do suva na sobnoj temperaturi, rastvoreni u 1 ml hlороforma i potom analizirani (označeni kao 3C i 4C);
- po 1 ml, koji su upareni do suva na temperaturi od 40°C, rastvoreni u 1 ml hlороforma i potom analizirani (označeni kao 3D i 4D);
- po 1 ml, koji su upareni do suva na temperaturi od 80°C, rastvoreni u 1 ml hlороforma i potom analizirani (označeni kao 3E i 4E).

Rezultati analiza prikazani su u tabeli 7.

Tabela 7. Analiza uzoraka kanabis biljke

Oznaka uzorka	Rt kanabinoida		
	THC	CBD	CBN
I dan – prvi analitičar (21.10.2015.)			
3A	5,57	4,43	6,52
4A	5,58	4,44	6,53
3C	5,57	4,44	6,52
4C	5,59	4,45	6,54
3D	5,59	4,45	6,53
4D	5,58	4,43	6,52
3E	5,57	4,44	6,53
4E	5,58	4,43	6,52
II dan – drugi analitičar (22.10.2015.)			
3A	5,55	4,42	6,51
4A	5,55	4,42	6,50
3B	5,55	4,41	6,49
4B	5,56	4,42	6,50
III dan – prvi analitičar (23.10.2015.)			
3A	5,58	4,45	6,54
4A	5,59	4,46	6,56
3B	5,56	4,44	6,52
4B	5,57	4,44	6,53

Na osnovu rezultata analiza iz tabele 7. provjereno je:

- selektivnost – razdvajanje pikova osnovnih kanabinoida u biljnom ekstraktu;
- dozvoljeno odstupanja Rt u granicama ±1%;
- uticaj matriksa – da li su u ekstraktu biljke prisutne komponente čiji pikovi bi se preklapali sa pikovima THC-a, CBD-a ili CBN-a i tako ometali analizu;
- ponovljivost Rt u biljnom ekstraktu, za analize koje je radio jedan analitičar (prvi i treći dan);
- međupreciznost Rt u biljnim ekstraktima za analize koje su radili različiti analitičari (prvi i treći dan jedan analitičar, a drugi dan drugi analitičar) na istom aparatu;
- uticaj vremena i temperature čuvanja uzoraka na nivou ponovljivosti i međupreciznosti rezultata u biljnim ekstraktima (stabilnost biljnih uzoraka u rastvaraču);

- robusnost – uticaj načina ekstrakcije biljnih uzoraka i načina uparavanja ekstrakta.

Pored navedenih parametara, za praćenje robusnosti ispitivan je i tzv. prenešeni efekat (eng. carry over). Drugim riječima, analizirani su rastvori referentnih standarda kanabinoida i ekstrakti biljnih uzoraka visokih koncentracija THC-a, CBD-a i CBN-a, a odmah potom analiziran je čist rastvarač (hloroform), radi provjere da li, poslije analize rastvora visokih koncentracija, u instrumentu zaostaju tragovi analiziranog uzorka u granicama detekcije. Tokom analize blanko proba nije utvrđeno prisustvo tragova kanabinoida u granicama detekcije.

4. DISKUSIJA

Dobro hromatografsko razdvajanje osnovnih kanabinoida tokom provođenja eksperimenata pokazuje da je metoda specifična i selektivna. Donja granica detekcije od 0,008 mg/ml THC-a, preciznija je od potrebnog uslova prihvatljive donje granice (0,01 mg/ml).

Izbor rastvarača za ekstrakciju kanabinoida iz biljnog materijala ne utiče na rezultat analize. Ispitana su tri rastvarača (hloroform, toluen i etanol), a na isti način se mogu provesti ispitivanja i za druge rastvarače ili kombinacije rastvarača pogodne za ekstrakciju kanabisa (petroleter, n-heksan, metanol:hloroform (9:1)).

Kvalitativni rezultat analize, dobijen primjenjenom metodom, ne zavisi od načina ekstrakcije uzoraka kanabis biljke (ultrazvučno kupatilo ili horizontalni šejker), pripreme bez postupka uparavanja ili sa uparavanjem na temperaturi do 80°C, uslova čuvanja ekstrakta (na sobnoj temperaturi ili u frižideru) do tri dana, niti od toga da li analizu vrše različiti analitičari, ukoliko rade na istom instrumentu. Dakle, ispunjeni su uslovi po pitanju uticaja matriksa, ponovljivosti, međupreciznosti i robusnosti.

Svi rezultati analiza, provedenih tokom ispitivanja performansi metode, uneseni su u validacioni izvještaj, nakon čega je izveden zaključak da metoda zadovoljava zahtjevanje performanse i može se primjenjivati u laboratorijskoj praksi.

5. ZAKLJUČCI

Validacija analitičkih metoda provodi se radi provjere pouzdanosti rezultata analiza. Postupak validacije metode obuhvata potrebnu opremu i pribor, opis zahtjevanih performansi metode kvalitativne analize, izvođenje ispitivanja, način vrednovanja i kriterijume rezultata validacije.

Za uspješnu validaciju analitičke metode neophodno je definisati zahtjevanje performanse metode i sačiniti validacioni plan.

U postupku validacije gasnohromatografske metode za kvalitativnu analizu osnovnih kanabinoida potrebno je ispitati specifičnost / selektivnost, uticaj matriksa, donju granicu detekcije, ponovljivost i međupreciznost i robusnost.

Ispitivanjem zahtjevanih performansi metode dokazuje se da je metoda za kvalitativnu analizu biljke Cannabis sativa L. i njenih preparata, primjenom tehnike gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom, pogodna za namjenjenu svrhu tj. da se može koristiti u rutinskom laboratorijskom radu.

LITERATURA

1. United Nations Office on Drug and Crime - Laboratory and Scientific Section (2016).

- Terminology and Information on Drugs. New York, United Nations, 1-7.
2. Brenneisen, R. (2007). Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents in Marijuana and the cannabinoids, Eds. ElSohly, M. A., New Jersey, USA: Humana Press Inc., 17-49.
3. Hazekamp, A. (2008-2009). Cannabis review. Leiden, Netherlands: Leiden University, 12-28.
4. Raman, A. and Joshi A. (1998). The Chemistry of Cannabis in Cannabis: The Genus Cannabis, Eds. Brown, D. T., Amsterdam, Netherlands: Overseas Publishers Association, 55-70.
5. Radwan, M. M., ElSohly, M. A., El-Alfy, A. T., Ahmed, S. A., Slade, D., Husni, A. S., Manly, S. P., Wilson, L., Seale, S., Cutler, S. J. and Ross, S. A.. (2015). Isolation and Pharmacological Evaluation of Minor Cannabinoids from High-Potency Cannabis sativa. J Nat Prod, 78 (6), 1271-1276.
6. United Nations Office on Drug and Crime - Laboratory and Scientific Section (2009). Recommended Methods for the Identification and Analysis Cannabis and Cannabis Products. New York, United Nations, p. 14, 36-38.
7. Iversen, L. L. (2000). The science of marijuana. New York, USA: Oxford University Press, p. 7.
8. United Nations Office on Drug and Crime (2016). World Drug Report 2016. New York, United Nations, p. 47.
9. Mehmedić, Z., Chandra, S., Slade, D., Denham, H., Foster, S., Patel, A. S., Ross, S. A., Khan, I. A., and ElSohly M. A. (2010). Potency Trends of Δ9-THC and Other Cannabinoids from 1993 to 2008. Journal of Forensic Sciences, 55(6), 1209-1217.
10. Cascini F., Aiello C. and Di Tanna G. (2012). Increasing Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ9-THC) Content in Herbal Cannabis Over Time: Systematic Review and Meta-Analysis. Current Drug Abuse Reviews, Vol. 5, 32-40.
11. Niesink, R. J., Righter, S., Koeter, M. W., Brunt, T. M. (2015). Potency trends of Δ9-THC, cannabidiol and cannabinol in cannabis in the Netherlands: 2005-2015. Addiction, Vol. 110, 1941-1950.
12. Dragoljić, M., Rodić-Grabovac, B., Vasiljević, Lj., Matić, V. i Simurdić, Lj. (2016). Psihoaktivni potencijal uzoraka marihuane u Republici Srpskoj. Zbornik radova XI Savjetovanja hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske, 67-74.
13. Standard BAS EN ISO/IEC 17025:2006, Opšti zahtjevi za kompetentnost ispitnih i kalibracionih laboratorija.
14. Institut za akreditovanje Bosne i Hercegovine (2014). Uputstvo za validaciju metoda za ispitivanje i kalibraciju - opšti zahtjevi.
15. Institut za akreditovanje Bosne i Hercegovine (2015). Pravila za prihvatljivu sljedivost mjerenja.
16. International Laboratory Accreditation Cooperation (2013). Policy on the Traceability of Measurement Results.
17. United Nations Office on Drug and Crime - Laboratory and Scientific Section (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. New York, United Nations, 8-13.

Validation of method for cannabis identification using gas chromatography technique

ABSTRACT

The methods of analysis in forensic must be reliable in order for the results of the analysis to be accepted as evidence in court proceedings. The reliability of methods is checked through the validation process, which should be performed before introducing a method into the routine practice of the laboratory. This paper describes the procedure for identification of *Cannabis sativa* L. plant and its preparations (resin - "hašiš", oil) using a gas chromatography technique with a flame ionization detector, as well as the validation procedure of the method by which identify three basic cannabinoids: psychoactive tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. The method validation process includes the necessary equipment, the description of the required performance of the analytical method, the conducting of the tests, the way and the criteria for evaluation validation results.

Key words: *Cannabis sativa* L., cannabinoid, tetrahydrocannabinol, validation.