

Opšti pregledi/
General reviews

PRIKAZ METODA ZA DOKAZIVANJE
I ODREĐIVANJE KANABINOIDA
U BIOLOŠKOM MATERIJALU

A REVIEW OF METHODS FOR
DETERMINATION OF CANNABINOIDS
IN BIOLOGICAL SAMPLES

Correspondence to:

Dr sc. pharm. Snežana Đorđević,
asistent na Katedri za kliničku,
analitičku i eksperimentalnu toksikologi-
ju i farmakologiju VMA i asistent na
Medicinskoj hemiji Visoke medicinske
škole, akademskih studija, VMA

Tel. 011/36-09-481
E-mail: ivezicnela@yahoo.com

Snežana Đorđević¹, Nadežda Krstić¹, Vesna Kilibarda¹,
Krsta Šulić², Branko Jovanović³

¹Centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

²Zavod za javno zdravlje, Požarevac

³Zdravstveni centar, Čačak

Key words

cannabinoids, Δ^9 -THC, urine, blood,
GC-MS, LC-MS, EMIT

Ključne reči

kanabinoidi, Δ^9 -THC, urin, krv, GC-
MS, LC-MS, EMIT

Apstrakt

Među sredstvima zloupotrebe kanabis ima vodeću poziciju. Pod pojmom kanabis podrazumevaju se svi delovi biljke, osim semena. Biljka sadrži preko 60 jedinjenja slične strukture koja se nazivaju kanabinoidi. Za farmakološku aktivnost odgovoran je Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC). Glavni proizvodi metabolizma Δ^9 -THC su 11-hidroksi- Δ^9 -THC i 11-nor- Δ^9 -THC-karboksilna kiselina. 11-nor- Δ^9 -THC-karboksilna kiselina se eliminiše urinom u vidu konjugata sa glukuronskom kiselinom. Identifikacija 11-nor- Δ^9 -THC-karboksilne kiseline u urinu je veoma značajna za potvrdu zloupotrebe kanabisa. Postoje različite metode za određivanje 11-nor- Δ^9 -THC-karboksilne kiseline u urinu, kao što su imuno testovi, tečna i gasna hromatografija sa maseno-spektrometrijskim detektorom. Najbrži i najjednostavniji test za dokazivanje kanabinoida je imuno test. Međutim, za pouzdano određivanje kanabinoida, posebno u sudsko-medicinskim analizama masena spektrometrija (sa tačnom ili gasnom hromatografijom) je jedina prihvatljiva metoda u analizi biološkog materijala.

UVOD

Marihuana je najčešće zloupotrebljavana droga. Poznata je činjenica da pušenje marihuane nije problem odrasle populacije, već problem adolescentnog doba. Zloupotreba marihuane nastaje u najkritičnijem razvojnom dobu, što je od posebnog značaja.

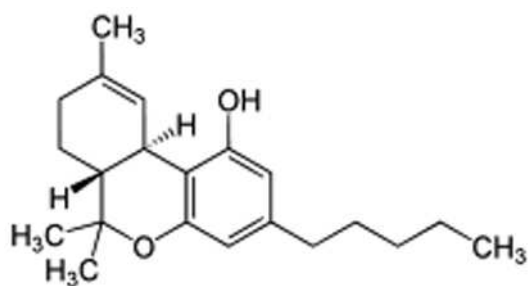
Iako neki autori navode da su štetni efekti minimalni, uzimanje marihuane nije bezopasno. Rezultati velikog broja radova pokazuju da marihuana menja imunobiološke reakcije i ćelijski metabolizam, navode se promene pri vožnji vozila, respiraciona oštećenja, poremećaj razvoja intelektualnih i psihosocijalnih sposobnosti.

Biljka *Cannabis sativa* ima svoju dugu istoriju. Još oko 2000 god. pre hrista korišćena je kao materijal za konopce, hrana i u narodnoj medicini. Prvi uživaoci kanabisa bili su nomadski narodi koji su živeli u ravninama centralne Azije. Oni su kanabis doneli u Kinu, a nešto kasnije u Indiju. 2500 g. pre n. e. Indijsku kulturu su odlikovale religiozne pesme i himne koje su veličale korišćenje "some".

Prvih godina hrišćanskog doba, kanabis je korišćen u Grčkoj i Rimu. Mešan je sa sredstvom za zaslađivanje i služen kao dezert. Širenju kanabisa najviše je doprinelo širenje Islama koji zabranjuje upotrebu alkohola. U Evropu je kanabis došao za vreme Napoleonovih pohoda na Egipat, kada su francuski vojnici su upoznali hašiš. Krajem XIX v. kanabis je korišćen kao lek za astmu, migrenu, kašalj, oboljenja respiratornih organa, nesanicu i za oslobađanje od zavisnosti od opijata.

Pojam kanabis označava celu biljku *Cannabis sativa* (var. *indica* i *americana*), *Cannabaceae* i njene osušene delove, osim semena. Biljka sadrži etarsko ulje, flavonoidne heterozide, šećere i masno ulje. Jedinjenje jake farmakološke aktivnosti, koja se nalaze u ovoj biljci nazivaju se kanabinoidi. Pored kanabinoida, konoplja sadrži i malu količinu supstance slične atropinu (koja može doprineti pojavi suvih usta) i neke supstance slične acetilholinu (koje mogu doprineti iritativnom dejstvu dima).

Izolovano je više od 60 kanabinoida, koji nastaju metabolizmom geranilpirofosfata. Farmakološki najaktivniji kanabinoid je Δ^9 -THC. To je benzotetrahidropiran (slika 1).

Slika 1. Hemisjska struktura Δ^9 -THC

Industrijska konoplja sadži do 0,3% THC, dok var. *Indica* koji se zloupotrebljava sadži do 6% THC. Sadržaj THC u biljci zavisi od klime, kultivacije, vrste zemljišta, sprečavanja oprašivanja, vremena izlaganja biljke sunčevoj svetlosti, uslova čuvanja biljke pre ekstrakcije i sl. Najčešći oblici droge koji se zloupotrebljavaju su marihuana, hašiš i ulje od hašiša.

Marihuana se sastoji od vršnih delova ženskih biljaka u cvetu i sadži do 6% THC.

Hašiš je smola dobijena ekstrakcijom vršnih delova biljke u cvetu nepolarnim rastvaračima i sadži do 20 % THC.

Ulje od hašiša je ekstrakt hašiša i sadži do 50 % THC (1).

Putevi unošenja

Pušenje cigareta je najuobičajeniji način zloupotrebe Cannabisa. Udahnuti dim, koji se zadržuje u plućima 15 do 30 sekundi brzo dovodi do psiholoških efekata. Drugi najčešći put unošenja je oralni, u vidu raznih kolača.

Poznato je da postoji i pasivna inhalacija dima kanabisa. Kada se kanabis puši, koncentracije kanabinoida i atmosferi su značajne. Smatra se da nepušači, koji se nalaze u istoj prostoriji sa pušačima kanabisa, pasivno inhaliraju kanabinoide iz dima, koji se mogu detektovati u krvi i urinu, o čemu se mora voditi računa u sudskoj toksikologiji (1-3).

Apsorpcija

Apsorpcija THC zavisi od načina primene. Dejstvo THC je 2,6-3 puta veće posle pušenja nego posle oralne ingestije.

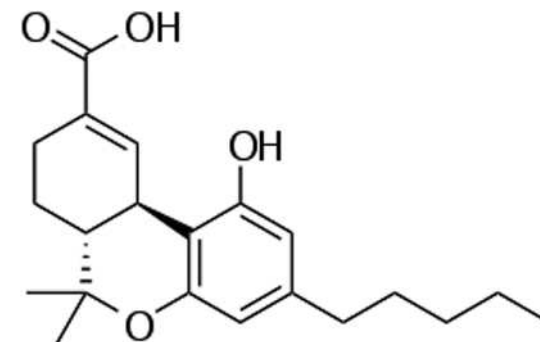
Maksimum koncentracije THC u krvi se postiže 10 min. posle inhalacije i iznosi 30 do 150 ng/mL, a posle 1 sata 3 do 10 ng/mL. Δ^9 -THC se može detektovati u plazmi tri dana posle pojedinačne doze unete inhalacijom ili intravenski.

THC se distribuira u tkiva u visokom stepenu i transformiše u 11-OH- Δ^9 -THC. Δ^9 -THC i njegovi metaboliti mogu se naći u krvi i dva do tri dana u krvi posle unošenja droge, što govori o deponovanju u tkivima. Droga se pretežno vezuje za lipoproteine i albumine (1).

Metabolizam

Metabolička razgradnja Δ^9 -THC kod ljudi obuhvata 20-30% unete doze. U urinu se nalaze uglavnom kiseli metaboliti (1).

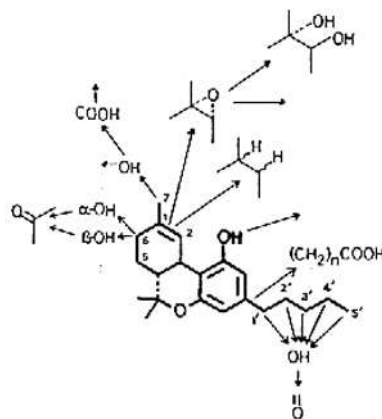
Metabolizam kanabinoida unetih u organizam pušenjem počinje u plućima, a metabolizam kanabinoida unetih oralno u jetri. Posle apsorpcije u plućima droga se može vezati za lipoproteine plazme, kao i tkivne proteine. Glavni metabolit koji nastaje u plućima je hidroksimetabolit koji nastaje oksidacijom bočnog lanca, dok je glavni metabolit koji nastaje u jetri hidroksimetabolit nastao oksidacijom na cikloheksanovom prstenu. Postoji više od 35 metabolita Δ^9 -THC (najznačajniji koji ima farmakološku aktivnost je 11-OH- Δ^9 -THC), 22 metabolita kanabidiola i 22 metabolita kanabinola.

Slika 2. Hemisjska formula 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilne kiseline

Postoje brojni putevi biotransformacije Δ^9 -THC. Oni uključuju alil i alifatičnu hidroksilaciju, oksidaciju metil grupe do aldehida, ketona i kiseline, konjugaciju sa masnim kiselinama ili β -glukuronskom kiselinom, epoksidaciju ili redukciju dvogube veze terpena. Mnogi od metabolita su psihoaktivni, a mnogi nisu.

Metabolička razgradnja se odvija u mikrozomalnim enzimima jetre.

Na slici 3. prikazana je biotransformacija Δ^9 -THC (1-2).

Slika 3. Putevi biotransformacije Δ^9 -THC

Eliminacija

Eliminacija Δ^9 -THC se odvija preko urina i fecesa. Kod hroničnih pušača najveći deo (oko 71%) se eliminiše urinom. Eliminacija droge je veoma spora i traje oko sedam dana.

Kod hroničnih pušača marihuane zapaženo je da su metaboliti Δ^9 -THC odgovorni za njegova dejstva. Koncentracija metabolita u mozgu je 8 puta veća nego u plazmi. Najaktivniji metabolit je 11-hidroksi- Δ^9 -THC, koji vrlo brzo penetrira u CNS (1).

Tolerancija

Korisnici marihuane imaju tzv. "inverznu" toleranciju, koja se manifestuje time da hronični korisnici marihuane postižu efekte manjim dozama u odnosu na segment populacije koji pripada početnicima. Obrnuta tolerancija se može objasniti povećanom osetljivošću receptora na Δ^9 -THC i akumulacijom efekata Δ^9 -THC posle višestrukog unošenja zbog liposolublnosti i deponovanja droge u tkivima (1).

Farmakološki efekti Δ^9 -THC

Effekti marihuane se zapažaju već nekoliko minuta posle pušenja u vidu euforije i osećanja veselosti, pojačanog osećanja zadovoljstva, govornosti. Veličine predmeta i razdaljine su iskrivljene. Vreme se doživljava kao da traje duže nego što pokazuje sat. Pamćenje bliskih događaja i selektivna pažnja su poremećeni, početak rečenice može biti zaboravljen pre nego što je rečenica završena, a ispitanik je vrlo sugestibilan i lako postane rastresen.

Kasnije se pojavljuje suvoća u ustima, povećanje osetljivosti ukusa i laka pospanost. Imaginacija i percepcija su žive i vrlo prijatne. To su stanja "ekstaze". Ovakvo stanje traje 3 do 4 sata, posle čega se oseća mamurluk i nelagodnost.

Mogu se javiti i trnjenja po koži, glavobolje i šumovi u ušima i glavi, poremećaji koordinacije pokreta i govorne smetnje.

Vrlo visoke doze dovode do depersonalizacije, izmene percepcije i telesne šeme. Fizički efekti (tahikardia, EKG promene, dilatacija očnih krvnih sudova, pad očnog pritiska, dilatacija respiratornih puteva, povećanje apetita, mišićna slabost, pojačani tetivni refleksi, poremećaj ravnoteže, tremor) prenose se centralnim putevima kao i povećanjem simpatikusne i inhibicijom parasimpatikusne aktivnosti. Izmene raspoloženja kreću se od euforije, smanjena aksioznosti do pojave agresivnosti. Opisane su panične reakcije i tosične psihoze.

U slučajevima akutnog trovanja smrt nastupa vrlo retko. Kod predoziranja može doći do kolapsa i kome⁽¹⁾.

Navika i zavisnost od marihuane

Pušenje marihuane dovodi do umerene ili jake psihičke zavisnosti. Fizička zavisnost ne postoji i nema karakterističnih apstinencijalnih kriza ako se prekine sa uzimanjem droge, mada je moguća pojava prolaznih psihoza kod predisponiranih osoba⁽¹⁾.

Detekcija kanabinoida u biološkom materijalu

Za uspešnu identifikaciju i određivanje kanabinoida neophodan je pravilan izbor biološkog materijala. Kao biološki materijal mogu se koristiti: krv (za Δ^9 -THC i metabolite) i urin ili feces (za metabolite), a u novije vreme i kosa, saliva, nokti i mekonijum. Međutim biološki materijal izbora je urin zbog toga što se kanabinoidi veoma brzo metabolišu, pa se u urinu nalaze mnogo veće količine metabolita 11-hidroksi- Δ^9 -THC i 11-nor- Δ^9 -THC karboksilne kiseline, nego u krvi.

Urin, kao biološki materijal, je relativno lako dobiti, pa je to jedan od razloga zbog koga je urin materijal izbora za identifikaciju kanabinoida.

Pošto se metaboliti kanabinoida izlučuju urinom u najvećem procentu u obliku konjugata, prethodno je potrebno izvršiti hidrolizu ovih jedinjenja.

Naredni korak do uspešne identifikacije kanabinoida je ekstrakcija metabolita kanabinoida iz urina odgovarajućim organskim rastvaračem. Za ekstrakciju kanabinoida se mogu koristiti različiti organski rastvarači (n-heksan, etar, etil acetat i sl.)⁽¹⁾.

Ekstrakcija kanabinoida i njihovih metabolita se može vršiti i korišćenjem različitih hromatografskih kolona (čvrsto-tečna ekstrakcija SPE)^(1-2,4-5).

Analitičke metode za određivanje kanabinoida

Za detekciju i određivanje kanabinoida mogu se koristiti različite analitičke metode. Imunohemijske metode se najčešće se primenjuju kao screening testovi za dokazivanje prisustva kanabinoida, dok se za pouzdaniju potvrdu koriste hromatografske metode.

Imunohemijske metode

Molekuli kanabinoida su relativno mali i ne mogu izazvati stvaranje antitela. Zato se ovi molekuli vezuju na molekule proteina, čime dobijaju svojstva antigena. Primenom ovakvih molekula može doći do stvaranja specifičnih antitela.

Danas se primenjuju sledeće tehnike za merenje količine antigena odn. antitela:

1. radioimunotehnika (RIA)
2. enzimatska imunotehnika

Radioimunotehnika

Uzorak antigena-kanabinoida iz biološkog materijala se meša sa radioaktivno obeleženim antigenom, a zatim se doda antitelo specifično na taj antigen. Obeleženi i neobeleženi antigen se kompetitivno vezuju na slobodno aktivno mesto antitela. Nakon određenog inkubacionog perioda, izvrši se razdvajanje slobodnih antigena i stvorenog kompleksa antigen-antitelo. Nakon toga se meri radioaktivnost preostale količine slobodnog radioaktivno obeleženog antigena i poredi sa radioaktivnošću standarda poznate koncentracije koji prolazi kroz identičnu proceduru analize. Merenje nivoa radioaktivnosti se vrši scintilacionim brojačem za merenje radioaktivnog tricijuma ^3H ili gama brojačem za radioaktivni jod ^{131}I ⁽²⁾.

Enzimatska imunotehnika (EMIT)

Analizirana supstanca-kanabinoid se obeležava kovalentnim vezivanjem sa enzimom. Slobodna supstanca se »bori« sa unapred obeleženim antigenom za aktivno mesto na antitelu, tako da je količina slobodnog, enzimom obeleženog antigena, srazmerna količini neobeleženog antigena u uzorku. Kada se kovalentno vezan kompleks supstanca-enzim kao antigen veže sa specifičnim antitelom, supstrat se sterno uklanja sa aktivnih centara enzima i na taj način dolazi do pada nivoa aktivnosti enzima. Aktivnost enzima se prati spektrofotometrijski, merenjem nivoa apsorpcije dodatog indikatora u funkciji vremena. Kod ove tehnike nije potrebno odvajati slobodni i vezani antigen, zbog čega se zove još i homogena ili enzimatska višekomponentna imunotehnika^(1-2,6).

Ovi imunotestovi se najčešće primenjuju u analizi uzoraka urina na prisustvo kanabinoida kao *screening* testovi. Svaki pozitivan rezultat mora imati maseno-spektrometrijsku potvrdu. Prednost ovog testa je u tome što nema prethodne pripreme uzoraka, a sama analiza traje relativno kratko. Takođe, mali je broj jedinjenja koja mogu interferirati i dovesti do lažno pozitivnih rezultata⁽²⁾.

Kao *screening* testovi često se primenjuju test trake za detekciju sredstava zloupotrebe, koji se zasnivaju na imunohromatografiji. Najčešće se koriste test trake za detekciju sredstava zloupotrebe iz različitih grupa kao što su kanabinoidi, opijati morfinske strukture, amfetamini, kokain, benzodiazepini (tzv. multi-trake)⁽¹⁾.



a
b
Slika 4. Analiza urina test trakom: urin pozitivan (a) i negativan (b) na kanabinoide

Hromatografske metode

Hromatografija je metoda koja se bazira na raspodeli uzorka između mobilne i stacionarne faze. Uzorci koje treba razdvojiti se kreću kroz sistem nošeni mobilnom fazom. Mobilna faza može biti u gasovitom ili tečnom agregatnom stanju pa se radi o gasnoj, odn. tečnoj hromatografiji.

Gasna hromatografija

Razdvajanje supstanci u gasnoj hromatografiji se vrši u koloni u kojoj se nalazi stacionarna faza. Kao tečne stacionarne faze koriste se polimeri polietilenglikola (Carbowax 20M), dimetilsilikona (SE-30, OV-1, OV-17) ili ugljovodonika dugog lanca (Apiezon L) sa niskim naponom pare vezane za inertne nosače, jednakih veličina čestica i velike površine. Mobilna faza je inertni gas nosač (azot, helijum, argon). Za detekciju analita najčešće se koriste plameno-jonizacioni (FID) i maseno-spektrometrijski (MSD) detektori.

Parry i saradnici su opisali uslove za GC analizu derivata 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilne kiseline uz primenu plameno jonizacionog detektora (FID). Korišćena je kapilarna kolona sa 35% fenil ostataka 30m x 0,25 mm (0,25 μ m debljina filma stacionarne faze), a temperatura FID bila je 300°C (1).

Primenom gasne hromatografije sa MS detekcijom moguće je detektovati Δ^9 -THC, 11-hidroksi- Δ^9 -THC i 11-karboksi- Δ^9 -THC u krvi i urinu sa osetljivošću od 0,2; 0,5 i 0,1 ng/mL za ova tri kanabinoida (1).

Gasna hromatografija zahteva derivatizaciju 11-karboksi- Δ^9 -THC. Sililacija ili metilacija su najčešće korišćene za prevođenje 11-karboksi- Δ^9 -THC u isparljiva estarska jedinjenja. Detekcija dobijenih jedinjenja vrši se pomoću maseno-spektrometrijskog detektora u SIM modu praćenjem molekulskih masa m/z 371, 473 i 488 za 11-karboksi- Δ^9 -THC (7).

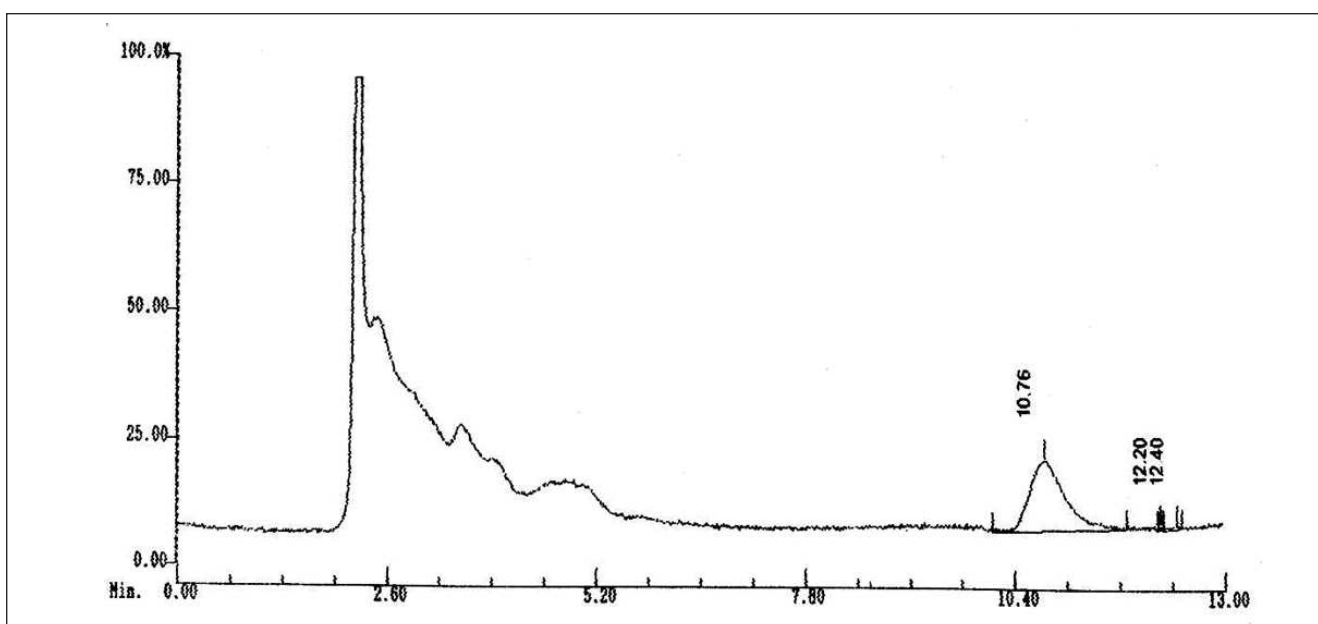
Kanabis se od 2004. nalazi na listi zabranjenih supstanci Svetske antidoping agencije za sve sportove. Za potrebe doping kontrole može se primeniti GC-MS metoda u analizi urina na prisustvo kanabinoida (3).

Tečna hromatografija

Tečna hromatografija je jednostavna i pouzdana metoda za analizu većine jedinjenja, tako da je danas sve više u upotrebi. Posebno je pogodna za analizu termolabilnih jedinjenja. Kao detektori u metodama za određivanje kanabinoida tečnom hromatografijom najčešće se koriste ultraljubičasti (UV) i maseno-spektrometrijski (MS) detektori.

U biološkom materijalu kanabinoidi se mogu detektovati primenom HPLC sa UV detektorom. Veća osetljivost za detekciju Δ^9 -THC i njegovih kiselih metabolita u urinu se postiže na nižim talasnim dužinama. Limit detekcije za kanabinoide u plazmi je 2 ng/mL. Najbolja osetljivost je na talasnoj dužini od 220 nm (1).

Dixit i saradnici preporučuju HPLC za detekciju kanabinoida u urinu posle čvrsto-fazne ekstrakcije na silika gel kolonama pri čemu se dobijaju čisti ekstrakti. Detekcija metabolita THC u ekstraktu urina vrši se na 214 nm na C18 koloni. Kao mobilna faza korišćena je smeša acetonitril-50



Slika 5. UV hromatogram urina pozitivnog na 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilnu kiselinu

mM fosforna kiselina (65:35). Detekcioni limit za ovu metodu iznosio je 10 ng/mL ⁽¹⁾.

11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilna kiselina se može odrediti i na 280 nm na C18 koloni sa mobilnom fazom acetonitril-2% sirćetna kiselina (55:45) na 30°C ⁽¹⁾.

Detekcija 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilne kiseline iz urina se može vršiti i na C8 RP koloni sa UV detekcijom na 220 nm i mobilnom fazom acetonitril-50 mM fosforna kiselina (65:35) ⁽¹⁾.

Merkolini i saradnici su razvili metodu za određivanje Δ^9 -tetrahidrokanabinol i njegovog metabolita 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilne kiseline u plazmi i urinu. Uzorci urina su pripremani baznom hidrolizom a nakon toga čvrstofaznom ekstrakcijom na C8 kertridžima. Hromatografsko razdvajanje vršeno je na C8 koloni uz mobilnu fazu koja je sadržavala 35% fosfatnog pufera (pH 2,7) i 65% acetonitrila, uz UV detekciju na 220 nm ⁽⁵⁾.

Na slici 5 prikazan je UV hromatogram urina pozitivnog na 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilnu kiselinu. Razdvajanje je vršeno na C18 koloni uz korišćenje mobilne faze acetonitril-50mM fosforna kiselina (65:35) i UV detekciju na 230 nm ⁽¹⁾.

Kada su u pitanju sudsko medicinske analize neophodno je izvršiti potvrdu pozitivnih rezultata masenom spektrometrijom. U novije vreme prednost se daje tačnoj hromatografiji sa maseno-spektrometrijskim detektorom, pošto nije potrebno raditi derivatizaciju.

LC-MS-MS analizom moguće je istovremeno određivanje Δ^9 -THC i njegovih hidroksi (11-OH-THC) i karboksil metabolita (THC-COOH) ⁽⁸⁾.

Jagerdeo i saradnici su prikazali automatizovanu čvrstofaznu ekstrakciju u sprezi sa tečnom hromatografijom sa maseno-spektrometrijskom detekcijom. Ekstrakcija je vršena na C8 kertridžima, a hromatografsko razdvajanje na Xterra C18 MS koloni. Ukupno trajanje analize iznosilo je 10 minuta ⁽⁹⁾.

LC-MS-MS metoda je pogodna za detekciju ne samo kanabinoida, već i drugih sredstava zloupotrebe i njihovih metabolita ⁽¹⁰⁾.

Određivanje kanabinoida u urinu značajno je i sa aspekta doping kontrole. Praćenje 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksilne kiseline je vršeno i u pozitivnom i u negativnom modu ⁽¹¹⁾.

Određivanje Δ^9 -THC i njegovih metabolita u urinu, krvi i salivi moguće je primenom LC-MS metode. Komponente se mogu kvantifikovati praćenjem odgovarajućih jona u negativnom modu (m/z 315,31 za THC, 329,18 za 11-OH THC i 343,16 za THC-COOH) ⁽⁴⁾.

ZAKLJUČAK

Zbog sve češće zloupotrebe marihuane u današnje vreme, brza i pouzdana analiza biološkog materijala na prisustvo kanabinoida je veoma značajna. Postoji veliki broj različitih metoda opisanih u literaturi za detekciju i određivanje kako Δ^9 -THC, tako i njegovih metabolita u biološkom materijalu. Za dobijanje preliminarnih rezultata, kao screening testovi uobičajeno se koriste test trake za detekciju sredstava zloupotrebe i EMIT, koji se zasnivaju na imunološkim reakcijama građenja kompleksa kanabinoid antigena sa odgovarajućim antitelom. Pozitivni rezultati dobijeni nakon ovih testova obavezno se moraju potvrditi nekom od hromatografskih metoda. Masena spektrometrija u sprezi sa gasnom ili tečnom hromatografijom omogućava nedvosmislenu potvrdu pozitivnih rezultata.

Abstract

Cannabis is the leader in group of drugs of abuse. Cannabis means the whole plant itself and its dried products expect for its seeds. Plant contains more than 60 compounds with similar structure, which name is cannabinoids. Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) is responsible for pharmacological activity of cannabis. The main products of metabolism Δ^9 -THC are 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 -THC-carboxylic acid. 11-nor- Δ^9 -THC-carboxylic acid is eliminated by urine in form of conjugates with glucuronic acid. Identification of 11-nor- Δ^9 -THC-carboxylic acid in urine is very important for diagnose the abuse of cannabis. There are different methods for determination of 11-nor- Δ^9 -THC-carboxylic acid in urine, such as immuno-assay, liquid or gas chromatography with mass spectrometry. The simplest and fastest method for determination of cannabinoids is immuno assay. But, mass spectrometry (with liquid or gas chromatography) is the only acceptable method for reliable determination cannabinoids in biological samples, especially in forensic cases.

LITERATURA

1. Đorđević S, Zloupotreba kanabisa i načini detekcije u biološkom materijalu, 2006. Zadužbina Andrejević, Beograd
2. Jickells S, Negrusz A, Clarke's analytical forensic toxicology, 2008. Pharmaceutical Press, London-Chicago
3. Brenneisen R, Meyer P, Chtioui H, Saugy M, Kamber M, Plasma and urine profiles of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its metabolites 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol after cannabis smoking by male volunteers to estimate recent consumption by athletes, *Anal Bioanal Chem*, 2010; 396:2493–2502
4. Teixeira H, Verstraete A, Proença P, Corte-Real F, Monsanto P, Vieira DN, Validated method for the simultaneous determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THC-COOH in oral fluid, urine and whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization, *Forensic Sci Int*. 2007;170(2-3):148-5
5. Micolini L, Musengaa A, Comina I, Baccini C, Conti M, Raggi M, Determination of plasma and urine levels of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its main metabolite by liquid chromatography after solid-phase extraction, *J Pharm. Biomed. Anal.* 2008;47:156–163
6. Kovatsi L, Pouliopoulos A, Papadaki A, Samanidou V, Tsoukali H, Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the evaluation of niflumic acid cross-reactivity of two commercial immunoassays for cannabinoids in urine, *J Anal Toxicol*. 2010;34(4):229-32
7. Huq S, Dixon A, Kelly K, Kallury K, Novel solid-phase extraction protocol for 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol from urine samples employing a polymeric mixed-mode cation-exchange resin, Strata-X-C, suitable for gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A*, 2005;1073:355–361
8. Grauwiler S, Scholer A, Drewe J, Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts, *J. Chro. B*, 2007; 850(1-2):515-522
9. Jagerdeo E, Montgomery M, Karas R, Sibum M, A fast method for screening and/or quantitation of tetrahydrocannabinol and metabolites in urine by automated SPE/LC/MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;398(1):329-38
10. Vazquez-Roig P, Andreu V, Blasco C, Picó Y, SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the Natural Park of L'Albufera (València, Spain), *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;397(7):2851-6
11. Chebbah C, Pozo O, Deventer K, Van Eenoo P, Delbeke F, Direct quantification of 11-nor-Delta(9)-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry in relation to doping control analysis, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010;24(8):1133-41