

Konposatu kannabinoideen analisisa matrize biologikoetan: odola, plasma, gernua, listua eta ilea

Maitane Olivares¹, Asier Vallejo², Ibone Alonso¹, Nestor Etxebarria¹

¹Kimika Analitikoa Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea (UPV/EHU)

²Kimika Analitikoa Saila, Farmazia-Fakultatea (UPV/EHU)

maitane.olivares@ehu.es

Jasoa: 2013-03-14

Onartua: 2013-07-16

Laburpena: *Cannabis Sativa* edo marihuana, Europar Batasunean gehien kontsumitzen den legez kanpoko droga da. Δ^9 -THC-a, *Cannabis Sativaren* osagai nagusiaren efektu psikoaktiboak istripu edota ondorio latzen eragile izan daitekeenez, beharrezkoa gertatzen da *Cannabis Sativa* noiz eta zenbat kontsumitu den jakitea edozein istripu ikerketa batean argibideak izateko. Egun, uneko analisi azkarrak jasotzen ahalbidertzen duten detektagailuak erabili daitezkeen arren, beharrezkoak gertatzen dira matrize biologikoetan Δ^9 -THC-aren analisi zehatz eta sentikorak ahalbidetzen dituzten analisi metodoen garapen eta erabilera. Lan honetan beraz, *Cannabis Sativaren* osagai psikoaktiboan eta beraien metabolitoen analisisa egiteko hainbat analisi metodo laburbiltzen dira lau lagin biologikotan: odolean, gernuan, listuan eta ilean hain zuzen ere.

Hitz-gakoak: Matrize biologikoa, kannabinoideen analisisa, kromatografia.

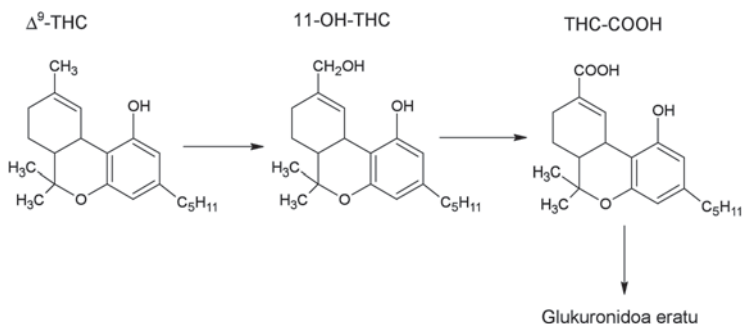
Abstract: *Cannabis Sativa* or marihuana is one of the most consumed illicit drugs in the European Union, following closely the alcohol. Due to the psychoactive effect of the main compound of *Cannabis Sativa*, known as Δ^9 -THC, *Cannabis* is often involved in accidents and other mishaps which require precise information about the amount and time of the consumed drug. Knowing the last time *Cannabis* was used, could be important for determining impairment in accident investigations and clinical tests. Although currently in-situ rapid drug tests are commercially available, the performance of sensitive and robust analytical methods in biological matrices is mostly required. The present manuscript reviews the different approaches present in the literature for determining the concentration of cannabinoid compounds (i.e., Δ^9 -THC and its metabolites) including extraction, clean-up and analysis in biological matrices such as blood and plasma, urine, saliva and hair.

Keywords: Biological matrices, cannabinoids analysis, chromatography.

1. SARRERA

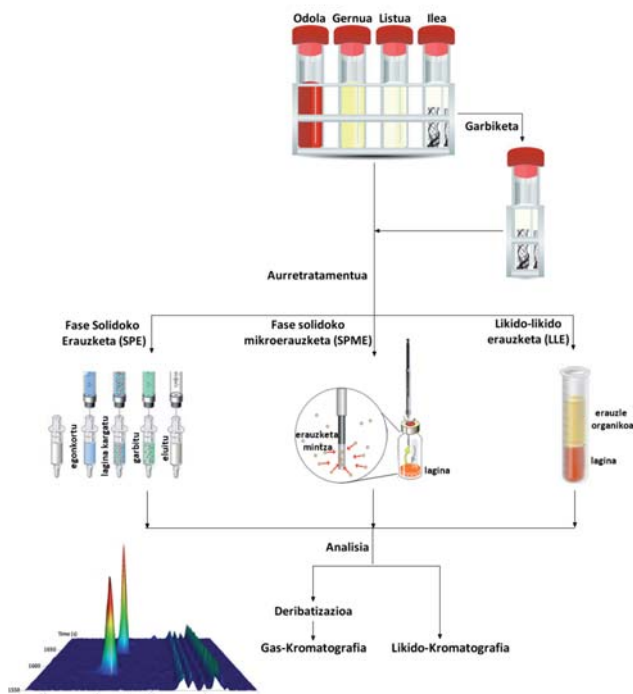
Mundu mailan, landareetatik lor ditzakegun legez kanpoko drogen artean *Cannabis Sativa* da landatuena, garraiatuena eta European eta Estatu Batuetan kontsumituena [1]. Azken urteotan, trafiko-kontrolatan droga honetan positiboa eman duten kasuak erabat igo dira. Δ^9 -tetrahidrokannabinola (Δ^9 -THC) *Cannabis*aren osagai psikoaktibo nagusia da. Ikuspuntu toxikologiko batetik, garrantzitsua gertatzen da Δ^9 -THC eta bere konposatu eratorrien kontzentrazioa determinatzea. Izatez, Δ^9 -THC-aren efektu psikoaktiboak batez beste 6-7 orduko iraupena duenez, auto-istripu batean gidaria kannabinoideen eraginpean zegoen ala ez determina daiteke [2]. Analisi hauetan positibo emateak ondorio larriak ekar ditzake; isuna, gida-baimena edo lana galtzea eta kartzelaratzeko arriskua besteak beste. Hau dela-eta, tentuz aztertu behar dira gezurrezko positiboak ematen dituzten analisiak, hauek hainbat faktoreren menpe baitaude: osagai psikoaktiboaren dosia, prestaketa mota eta administrazio modua, analisiaren matrize biologikoa (besteak beste odola, gernua, ilea, listua) edota detekzio metodoaren sentikortasuna.

Aurretiaz esan bezala, *Cannabis*aren osagai psikoaktibo nagusia Δ^9 -THC-a da eta, bere natura lipofilikoa dela eta, azkar asimilatzen da ehun adiposoan, gibelean edo biriketan. Ondorioz, modu geldoan askatzen da odolera eta beraz, efektuen iraupen luzea espero daiteke. P-450 (CYP) zitokromo entzimek azkar metabolizatzen dute Δ^9 -THC-a 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinol (11-OH-THC) konposatu psikoaktibora eta azken honen oxidazioak, 11-nor-9-karboxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC-COOH) konposatu ez-psikoaktiboa ematen du (1. irudia) [3]. Beraz, konposatu psikoaktiboaren kontzentrazioa determinatzeaz gain, azken honen analisisia funtsezkoa bilakatzen da droga-probetan aske edo glukuronido eran gernuan iraitzen baita. Hala ere, konposatu hauek gernuan oxidazio bidez degrada daitezkeenez, gernuan egindako analisisiek emaitza desagokiak eman ditzakete, hots, dagozkion baino kontzentrazio baxuagoak.



1. irudia. Δ^9 -THC-a metabolizatzerakoan eratzen diren konposatuak.

Ildo honetan beraz, konposatu psikoaktiboen monitorizazio eta kuantifikaziorako egiten diren analisien urratsak zehatzak izan behar dira. Orokorrean Δ^9 -THC-a eta bere metabolitoen lehen detekziorako immunosaiok labor eta azkarrak erabiltzen dira. 90. hamarkadan agertu eta hedatu ziren, uneko analisi azkarrak bermatzen zituzten aparatuak, batez ere, errepideetako kontrol azkarretan erabiltzeko [4]. Garapen hauekin aurrera pausu handiak egin diren arren, beharrezkoa gertatzen da legez kanpoko konposatuen analisi kuantitatiboak, espezifikoak eta zehatzak bermatzen dituzten analisi metodoen aplikazioa. Metodo hauek, hainbat matrize biologikoren tratamenduan, konposatuen erauzketa selektiboan eta analisi kromatografiko sentikorretan oinarritzen dira. Izan ere, konposatu kannabinoideak hainbat matrize biologikotan detekta daitezke. Konposatu kannabinoideen analisia gernuan egitea oso onartua dagoen arren, odolean zein plasman determinatzea gomendatzen dute hainbat erakunde kliniko eta toxikologikok, batez ere istripuen eta autopsien ikerketa beharrezkoa denean [5]. Honenbestez, lan honek lagin biologiko hauetan kannabinoideen analisia egiteko erabil daitezkeen analisi metodoen urratsen (erauzketa, garbiketa eta analisia) xehetasunak laburbiltzen ditu (2. irudia).



2. irudia. Δ^9 -THC eta bere metabolitoak lagin biologikoetan determinatzeko orokorrean erabiltzen diren aurretratamendua, garbiketa eta analisia urratsen laburpena.

2. PLASMA ETA ODOLA

Konposatu kannabinoideen analisia plasma edo odolean egiteak hainbat abantaila ditu: matrize nahiko homogenea da, kannabinoideen identifikazioa zein kuantifikazioa matrize berean egin daiteke, jatorrizko konposatua eta metabolitoak detektatzeko aukera ematen du, eta determinatutako kontzentrazioak uneko kontsumo edo erabileraren berri ematen du. Matrize biak modu berean erabili daitezkeen arren, lortutako kontzentrazioak ezin daitezke zuzenean parekatu, Δ^9 -THC-a plasmako proteinei lotuta baitago gehienbat (% 90) eta ez horrenbeste odoleko zelulei (% 10). Izatez, hainbat lanen arabera, plasman aurki daitezkeen Δ^9 -THC kontzentrazioa odolean aurki daitezkeenaren bikoitza dela esan daiteke.

Jadanik, bibliografian hainbat metodo garatu dira Δ^9 -THC-a eta bere metabolitoak odolean zein plasman determinatzeko [6] (ikus 1. Taula). Lagin biologikotik kannabinoideak erauzteko fase solidoko erauzketa (SPE –*Solid Phase Extraction*) eta likido/likido erauzketa (LLE–*Liquid Liquid Extraction*) erabiltzen dira batik bat. Lagin biologikoa odola denean, erauzketa egin aurretik proteinak hauspeatzea beharrezkoa da. Egile askok aditzera eman dute Δ^9 -THC eta THC-COOH-a aldi berean erauzteko, lagin biologikoa pH 4 inguruan duen disoluzio indargetzaile batekin diluitu ondoren, alderantzizko fase solidoko erauzketa C_{18} motako fase solidoarekin egitea dela egokiena [3,7-9]. Hala ere, badago konposatuen erauzketa banatua (Δ^9 -THC-a eluzio basikoan eta THC-COOH eluzio azidoan) [10,11] edota SPE automatikoa egiteko aukera ere [9,12,13]. *n*-Hexano:etilazetato nahastea edota *n*-hexanoa erauzle moduan erabilita 10 minutuan egin daitezkeen LLE aukeratu izan dute beste egile askok [4,14,15]. Fase solidoko mikroerauzketan (SPME–*Solid Phase Microextraction*) oinarritutako metodoak garatu diren arren [16], prozedura luzea izanik (> 6 ordu) aplikazio kliniko eta forenserako erabat deuseztatu da hainbat kasutan.

Erauzyketaren ondoren, konposatu kannabinoideen identifikazio eta kuantifikazioa egiteko, kromatografian oinarritutako teknikak erabiltzen dira, gas-kromatografia (GC) eta likido-kromatografia (LC) hain zuzen. Ikertzaile askok gas-kromatografia masa-espektrometria teknika (GC-MS –*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) aukeratzen dute nagusiki konposatu kannabinoideak kuantifikatzeko, [7-9,11,14,15,17], baina emaitza onekoak dira era berean, gas-kromatografia elektro-harrapaketa detektagailuari akoplatua (GC-ECD, *Gas Chromatography Electron Capture Detector*), gas-kromatografia garraren bidezko ionizazio-detektagailuari akoplatua (GC-FID, *Gas Chromatography Flame Ionization Detector*), edota gas-kromatografia nitrogeno-fosforo detektagailuari akoplatua (GC-NPD, *Gas Chromatography Nitrogen Phosphorous Detector*).

Bestalde, legediek detekzio maila zeharo baxuak ezartzen dituzte, eta teknika hauen garapen eta moldaketek helburu hauek lortzea bermatzen dute.

Adibide gisa, Teske eta bere lankideek 25 μL odol erabiltzea nahikoa dute kannabinoideen kontzentrazioa determinatzeko, bolumen handiko injekzioak egitea ahalbidetzen duen GC-MS teknikaren moldaketa batekin [8]. Bestalde, Scurlock eta lankideek dimentsio biko GC (GCxGC, *Two dimensional gas chromatography*) erabiltzen dute matrizeak sortzen dituen nahaste konplexuen banaketa hobetu nahian [11]. Gerora, bi kromatografia-zutabez osatuta dagoen bereizmen handiko gas-kromatografia moldaketa hau beste ikertzaile batzuek ere erabili izan dute, izatez, oso zaila baita oso lipofilikoak diren konposatu kannabinoideak matrizek banatu eta bereiztea [18,19].

GC bidez neurtu aurretik, beharrezkoa da termikoki egonkorrak ez diren konposatuen degradazioa saihesteko laginaren analisiaren prestaketan deribatizazio urratsa gehitzea. Helburu honetarako egiten dira giro-tenperaturapeko iodometanoaren bidezko metilazio erreakzioa [7,17] eta, batez ere, 70°C-an N,O-bis(trimetilsilil)fluoroazetamida (BSTFA) erreaktiboarekin, sililazio erreakzioak [9,14,18,19].

GC-n oinarritutako metodoez gain, azken urteotan Δ^9 -THC-a eta bere metabolitoak odolean determinatzeko LC-n oinarrituta garatu diren metodo kopurua anitza da. GC-ren kontrara, LC erabiltzerakoan ez da deribatizazio prozesurik behar, eta ondorioz, analisiaren prozedura arina, erraza eta laburragoa izan daiteke. Likido-kromatografiako ultramore detekzioa (LC-UV-*Liquid Chromatography Ultraviolet Detection*) Δ^9 -THC-a eta bere metabolitoak determinatzeko erabilgarria izan daitekeen arren [20], sentikorrakoak diren likido-kromatografia / masa-espektrometria (LC-MS-*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) oinarritutako metodoak erabiltzen dira aplikazio kliniko eta forensean [21]. Likido-kromatografia tandem masa-espektrometria berriak (LC-MS/MS-*Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*) Δ^9 -THC-a, metabolitoak eta bai glukuronido eran dagoen Δ^9 -THC-a modu sentikorrean determinatzeko. Hori dela-eta, LC-MS/MS moldaketa ezberdinak dituen metodo garatu anitz aurki daitezke: sentikorrakoak diren LC-ESI-MS/MS (ESI-Elektroesprai Ionizazioa; *Electrospray Ionization*) [4,12], edota matrize efektua minimizatzen duen LC-APCI-MS/MS (APCI-Presio atmosferikoko Ionizazio Kimikoa; *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) hain zuzen ere [22].

Kannabinoide eta metabolitoen egonkortasuna askotan oso eztabadaitua da, eta lan ugarik konposatu hauek odolean duten egonkortasuna ikeritzea dute helburu [3,14,15,17,20]. Lan hauen arabera, odol eta plasma laginak -20°C-an mantenduz gero kannabinoideen kontzentrazioa 30 egunean mantentzen daiteke eta giro-tenperaturan berriz 6 orduan.

Kannabinoideen eta antzeko substantzien odoleko determinazioa gero eta garrantzi handiagoa hartzen ari da arlo kliniko eta forensean. Analisi toxikologikoaren gainean gertatutako garapenak analisi toxikologiko zehatz eta sentikorrak ahalbideratu ditu eta gaur egungo joera beraz, hainbat kannabinoide eta antzeko konposatuen aldibereko analisisa egitea da.

3. GERNUA

Gure gorputzean Δ^9 -THC metabolitoen presentzia antzeman ahal izateko, gernua da jariakin biologikorik erabiliena. Δ^9 -THC metabolito anitz gernuan irazten dira, baina hala ere, THC-COOH da gernuko metabolito ugariena, bai aske edo bai glukuronido moduan konjokatuta [23]. Aurretiaz esan bezala, metabolito hauek oso lipofilikoak direnez, erraz banatzen dira gorputzeko ehunetatik eta poliki-poliki kanporatzen dira gernuaren bidez. Esaterako, marihuana zigarro bakar bat erretzean, metabolitoek egun batzuk iraun ditzakete gernuan eta hiru edo lau aste beharko lirateke metabolito hauek eliminatzeko erretzaile porrokatuen kasuan [24]. Beraz, gernuaren analisiaren bidez Δ^9 -THC metabolitoak antzeman daitezke denbora epe erlatiboki luzean [25].

Gernuan agertutako Δ^9 -THC metabolitoen analisirako, immunosaiok dira monitorizazio metodo erabilienak. Metodo hauek metabolitoekiko espezifikoak diren antigorputzen garapenean oinarritzen dira. Metodo hauen artean erradioimmunosaiok (RIA - *Radio Immunoassays*), entzima immunosaiok (EIA - *Enzyme Immunoassays*) eta fluoreszentsia-polarizazioko immunosaiok (FPIA - *Fluorescence Polarization Immunoassays*) daude besteak beste. Gaur egun, entzima-immunosaiok dira erabilienak, alde batetik azkarrak eta errazak direlako eta bestalde, ez dutelako arreta berezirik behar erabiltzerakoan edo hondakinak eliminatzeko orduan. Orokorrean, gomendagarria da metodo hauen bitartez positibo ematen duten laginak gas edo likido-kromatografia bezalako metodo espezifikoagoen bidez berrestea.

Kannabinoideen «in situ» immunosaiok egiteko merkatuan eskuragarriak diren ekipamendu ugari daude gaur egun. Ekipamendu merke hauek nahiko sinpleak dira, erabilpen erraza dute eta analisisen emaitzak azkar lor daitezke. Abuscreen ONTRAK (Roche Diagnostic Systems), Triage®, Bionike One-Step test, Advisor™ eta Abusign™ Drugs-of-Abuse Slide testek, ahalmena dute droga bat baino gehiago detektatzeko: anfetaminak, metanfetaminak, benzodiazepinak, kannabinoideak, metadona edota opiazeoak adibidez. Beste batzuk aldiz, kannabinoideak detektatzeko espezifikoagoak dira, EZ-SCREEN®, accuPINCH™ THC, RapiTest THC, FRONTLINE® Rapid Tests, TDx, EMIT-Coba eta Syva EMIT® besteak beste [26].

Hala ere, immunosaiotetan gertatzen den bezala, hauetan ere kromatografian oinarritutako analisi metodoak behar dira [27] (ikus 1. taula). Ildo honetan, eta gernuaren analisiari dagokionez, metodo gehienak metabolito nagusiaren (THC-COOH) analisia dute helburu nagusia. Askotan, aurretiazko hidrolisi pausu bat behar da glukuronido moduan dagoen THC-COOH-aren hidrolisia egiteko. Modu honetan THC-COOH metabolitoa glukuronidotik askatzen da eta THC-COOH kontzentrazioa handia-gotzen da. Hidrolisia entzimekin egin daiteke, beta-glukuronidasa entzima

erabiliz edo sodio edo potasio hidroxido bezalako disoluzio alkalino indartsuekin. Immunosaiok ez bezala, kromatografia-metodoek laginaren garbiketa luzeak behar izaten dituzte, bai LLE metodoak edo bai SPE erabiliz.

Urte askotan zehar, geruza fineko kromatografia (TLC - *Thin Layer Chromatography*) kannabisaren monitorizazio eta identifikaziorako erabili izan da. Immunosaiok TLC ia guztiz ordezkatu dute monitorizazio metodo gisa. Hala ere, TLC garatu gabeko herrialdeetan oraindik erabili ohi da. TLC-n oinarritutako metodoak THC-COOH-arekiko immunosaiok baino espezifikagoak dira. Gainera, THC-COOH gernuan detektatzeko, badaude merkatuan eskuragarriak diren TLC prozedurak, hala nola, *TOXI-LAB Cannabinoid Screen* metodoa, *TOXI-GRAMS MS (THC)* eta *Toxi.Prep THC metabolitoak* [28-31].

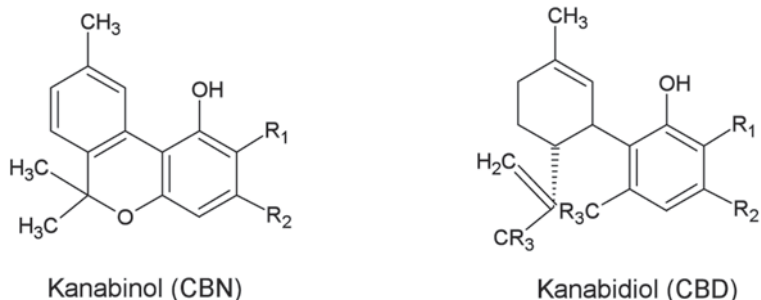
LC-n oinarritutako metodoak immunosaiokin konbinatuz ahalmen handiko tresna bihurtu dira, alde batetik LC-k banaketa ahalmena eta espezifikotasun handia duelako eta bestalde, RIA immunosaiok duen sentikortasunagatik. Moldaketa hau Twitchett eta lankideek [32] erabili zuten lehenengoz gernuan LSD-a determinatzeko. Gerora, moldaketa hau Δ^9 -THC-a eta bere metabolitoak plasma eta gernuan determinatzeko erabili da [33]. Hala ere, ohikoagoa den LC-UV teknika oso erabilia da konposatu kannabinoideak SPE bitartez erauzi ondoren determinatzeko [34-36]. Sentikortasuna hobetu nahian, Weinmann eta lankideek hidrolisi baten ondoren, SPE automatizatua eta LC-APCI-MS/MS-ean oinarritutako metodo bat garatu zuten [37].

Gernuan, LC-az gain GC ere erabili izan ohi da konposatuak deribatizatu ondoren analizatzeko, horrela, GC-FID, GC-ECD edo GC-MS erabilzen dituzten lanak aurki daitezke.

4. LISTUA

Listua da marihuana-konsumoa zehazteko erabiltzen den beste matrize bat, bai analisi kualitatiboak bai analisi kuantitatiboak egiteko; beste matrizeekin konparatuz aurkezten dituen abantailak direla eta (ikus 1. taula). Alde batetik, odola eskuratzeko ez bezala, lagina eskuratzeko ez da inolako tresneria inbasiborik erabili behar eta gernua ez bezala unean bertan lor daiteke. Abantaila hauetaz gain, analisiaren ikuspuntu batetik, listua odola eta gernua baino matrize askoz bakunagoa da. Hala ere, listuan analisiak egiteak hainbat desabantaila aurkezten ditu. Izatez, erretzaile pasiboa izanik faltsu positiboak emateko aukera gehiago daude eta, bestalde, konposatu toxikoen kontzentrazioa baxuagoa denez, lagin bolumen handiagoa beharrezkoa izateaz gain detekzio sentikorra bermatzen duten analisisirako tresneriak beharrezko bilakatzen dira [38,39]. Konposatu psikoaktiboaren artean Δ^9 -THC-a izan da historikoki gehien determinatu den analittoa, listuan

THC-COOH-a THC-COO-Glu-a, kannabinola (CBN) eta kannabidiola (CBD) (3. irudia) baino kontzentrazio altuagoan topa baitaiteke. Hala ere, konposatu hauen agerpena berriki gertatutako kontsumoa (CBN edo CBD metabolitoen agerpena) eta eguneroko kontsumoarekin (THC-COOH edo THC-COO-Glu metabolitoen agerpena) zuzenean erlazionatuta daude, eta ondorioz, konposatu hauen detekzioak erretzaile pasiboen faltsu positiboak ekidin ditzake [40,41].



3. irudia: Kannabinola (CBN) eta Kannabidiolaren (CBD) egitura. Bertan R_1 :H edo COOH taldeak izan daitezke, R_2 , C_3 edo C_5 kateak dira eta R_3 , H edo CH_3 taldeak dira.

Analisi ez-inbasiboak egiteko aukera izanik, immunoanalisi meto-
doetan oinarritutako *in situ* analisiak egiten dira marihuanaren kontsumoa
lehen unean detektatzeko. Teknika hauen zehaztasuna ez da zeharo ego-
kiena, baina lehen analisi kualitatiboak egiteko erabilgarriak dira oso. Gaur
egun, analisi hauek bermatzen dituzten detektagailuen garapenak eta erabi-
lerak bultzada handia jasan dute eta honen ondorioz hainbat «kit» daude es-
kuragarri merkatuan, hala nola, Drug-Id[®], Dräger Drug edo INTEX[®] [42].
Laborategian ere, ELISA bezalako immunosaiioak egin daitezke, analitoen
analisi kualitatiboa egiteko [41,43].

Lehenengo detekzio kualitatibo hauekin lortutako emaitza positiboa
izanez gero, beharrezkoa bilakatzen da analisi kuantitatibo adierazgarria
egitea. Hau lortzeko, egin beharreko lehenengo gauza listuaren biltzea da.
Orokorrean, bi modu daude laginaren bilketarako: (i) listua zuzenean ja-
sotzea esterilizatutako beirazko ontziak erabiltzea eta, (ii) merkatuan es-
kuragarri dauden adsorbaitzaile bereziak dituzten «kit» bereziak erabiltzea
(Intercept[®], Salivette[®], Quantisal[™], Oralline[®]). Azken hauetan, adsorba-
tzaileak ahoan sartzerakoan listua bertan atxikia geratzen da eta ondoren,
adsorbaitzailea disoluzio jakin batean (analitoak egonkor mantentzen di-
ren disoluzio indargetzaileak) murgildu [41,44,45] eta $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -an gordetzen
dira da analisia egin arte [46].

Lagina jasota, hurrengo urratsa laginaren aurretratamenduan da, hots, intereseko analitoak bai listutik bai adsorbatzaileetatik erauzi behar dira. Beste matrizeetan bezala, orokorrean, LLE edo SPE erauzketak dira erabilienak. LLE erabiltzen denean, analitoak modu neutroan mantentzeko orokorrean pH 6-7 tartean finko manten dezakeen disoluzio indargetzailea erabiltzen da, eta *n*-hexano edota *n*-hexano:etilazetato disoluzio nahasteak erabiltzen dira disoluzio erauzle modura [39,47]. Egun gehien erabiltzen den erauzketa metodoa SPE da. Adibide gisa, Teixeira eta laguntzaileek Bond Elut LRC[®] kartutxoa erabili zuten, Δ^9 -THC-aren, THC-COOH-aren eta 11-OH-THC-aren erauzketa egiteko eluitzaile modura 1 mL *n*-hexano:etilazetato (8:2, v/v) erabiliz [45,48]. Moorek eta laguntzaileek aldiz, Trace-N mota-tako kartutxoak erabili zituzten Δ^9 -THC-aren analisisrako eluitzaile modura *n*-hexane:azido azetikoa (98:2) erabiliz. Polimero adsorbatzaileak, Δ^9 -THC-aren, THC-COOH-aren, 11-OH-THC-aren, CBD-aren eta CBN-aren erauzketarako (*n*-hexano:azetona:etilazetato, 60:30:20 v/v, eluitzailea) erabili izan dira eta trukatzaile kationikoak, Δ^9 -THC-aren eta THC-COOH-aren erauzketarako (etilazetato eta etilazetato:amoniako 100:3, v/v erauzleekin) [43,49].

Intereseko analito hauek GC, GCxGC edo LC bidez banatu daitezke. GC eta GCxGC kasuetan, beste matrize mota guztietan bezala, beharrezkoa da deribatizazio prozesu bat aurretiaz egotea: sililazio prozesu bat BSTFA deribatizatzailearekin [43] edo azetilazio erreakzio bat trifluoroazetiko anhidroarekin [49]. Orokorrean, MS da detektagailu erabiliena [31,44], nahiz eta zehaztasun eta sentikortasun altuko MS-MS detektagailuak erabiltzen dituzten lanak ere aurkitu daitezkeen, batez ere THC-COOH determinazioa egin behar denean [41,49].

LC-ri dagokionez, LC-ESI-MS [45] eta LC-MS-MS [4,39,47] dira teknika erabilienak, kannabinoideoen banaketa eta detekzioa egiteko. LC erabiliz, deribatizazio prozesua ekidin daiteke, eta modu berean, GC-MS-arekin lortutako sentikortasuna hobetzen da.-LC-n oinarritutako analisi teknika hauekin ng/mL ordenako kontzentrazio baxuak determinatzea lortu da.

5. ILEA

Drogen kontsumoaren analisisa ilearen bitartez egitea ez da gaur egungo kontua [50,51] (ikus 1. taula). Ilean, drogen metabolitoak metatu egiten dira eta noski, marihuanarenak ere antzerako portaera dute. Metaketa honak, abantaila ikaragarriak erakusten ditu, analitoen detekzio leihoa denboran zehar luzatzen baita, hau da, hiru hilabete igarota ere marihuanaren kontsumoa detektatzeko aukera dago [52].

Historian, marihuanaren 3 analito aurkitu dira ilean, Δ^9 -THC, CBD eta CBN. Hauen metaketa kontzentrazioak THC-COOH-arenak baino handiagoak dira baina, listuan bezala, faltsu positiboak emateko aukera dago, airean zehar, kannabinoideak, ilean metatu baitaitezke [53]; beraz, gaur egun THC-COOH-aren analisiak egiten hasi dira. Hala ere, Δ^9 -THC-COOH-aren kontzentrazioak oso baxuak direnez, teknika instrumental sentikorrago baten erabilera behar da [54-56].

Aurretiaz esan bezala, ileak barnean duen informazioa epe luzekoa da, eta hori dela-eta, ilearen biltzea berezia da. Izatez, luzera jakin bateko ile puska zein ile osoa eta, sustrai edo sustrai gabe analiza baitaiteke [55,56]. Aldakortasun hau ikusita, Han eta laguntzaileek, ile apur ezberdinak aztertu THC-COOH-a gehienbat ile sustraian metatzen zela aditzera eman zuten [55]. Beraz, THC-COOH-aren analisia egiterakoan, ilea sustraiarekin edo sustraia bakarrik erabiltzea gomendatzen dute.

Kannabinoideen determinazioa ilean egiteko beste matrizeetan egiten diren urratsez gain garbiketa ere beharrezkoa da; honela, eman beharreko urratsak honakoak dira: (i) garbiketa, (ii) hidrolisia, (iii) erauzketa, (iv) deribatizazioa (gas-kromatografia bidez banatu nahi badira) eta (v) analisia.

Garbiketan, ilean egon daitekeen zikinkeriaz gain, aireak garraiatua ilean metatu daitezkeen analitoak ere eliminatzen dira; honela, kutsadura gurutzatua ekiditen da. Orokorrean helburu hau lortzeko, diklorometanoa erabili izan ohi da [57,58] nahiz eta metanola edota petrolio eterra ere erabili daitezkeen [59,60].

Hidrolisiari dagokionez, sodio hidroxidoarekin hidrolisi basiko bat egitea da arruntena, (1 M) 85 °C-an 30 minutuz [54-56,61-64]. Beste aukera bat entzimen bidez egindako hidrolisia da, zehazki beta-glukuronidasa eta arisulfatasa entzimak erabilita [65]. Nahiz eta entzimen prozesuak selektiboagoak izan, hidrolisi-denbora luzeak eskatzen dituzenez, hidrolisi basikoak dira ohikoak.

Hidrolisiaren ostean analitoen erauzketa egiten da. LLE erabiltzen da orokorrean *n*-hexano:etilazetato disoluzio nahaste batekin [66-68], edo klorobutanoarekin [69]. SPE erabiltzea da beste aukera bat. Egile askok erauzketa modu hau erabili dute erauzle modura *n*-hexano:etilazetato disolbatzaile nahaste bat erabiliz [46,56,58,70]. Berriki, Malduskik eta laguntzaileek [54] HS-SPME bidezko erauzketa egitea proposatu dute Δ^9 -THC-aren, CBD-aren eta CBN-aren eta THC-COOH-aren determinaziorako GC-MS eta GC-MS-MS bidez, hurrenez hurren.

Erauzketa hauek eraginkorrak izateko, ikerlari askok, analitoak egoera neutroan egotea lortzen dute disoluzio indargetzaile bat edota disoluzio azido bat gehituta digestio ostean [55,61,71].

Analisiari dagokionez, GC-MS edo GC-MS-MS teknikak dira erabilienak eta beraz, aurretiaz, deribatizazio pausu bat jasan behar dute analitoek. Horreratarako, gehien erabiltzen diren errektiboen artean aipatu beharrekoak dira: BSTFA, N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroazetamida (MSTFA), anhidrido trifluoroazetikoa (TFAA), anhidrido pentafluoropropionikoa (PFPA) eta anhidrido heptafluorobutirikoa (HFBA). Deribatizazioaren ondoren analitoak lehorrera eramaten dira eta etilazetatoan edo toluenoan berriskuratu ostean GC bidez banatzeko prest daude.

Δ^9 -THC, CBD eta CBN analisia egiteko GC-MS-ren sentikortasuna nahikoa da, analito hauen kontzentrazioa ilean nahiko altua baita (ng/mg). THC-COOH-a ordea, ez da hain kontzentrazio altuetan topatzen (pg/mg) eta beraz analisi teknika sentikorrago bat erabili behar da; kasu honetan GC-MS-MS da erabiliena. Gaur egun, GC-z aparte LC ere erabili izan da kannabinoideen analisirako. Coulterrek eta laguntzaileek Δ^9 -THC-aren analisia aurrera eraman dute LC-MS-MS baten bidez; honela, deribatizazio pausua saihestu dute [72].

1. taula Kannabinoideak analizatzeko bibliografian agertzen diren metodo analitikoak laburpena.

Lagina	Analitoa	Erauzketa	Deribatutzatzailea	Analisia	Detekzio-muga (ng/mL)	Erref.
Odola	Δ^9 -THC eta 11-OH-THC	SPE	BSTFA	GCxGC-MS	1 (LOQ)	[11]
	Δ^9 -THC, 11-OH-THC, THC-COOH eta THC-COOH-Glu	LLE	BSTFA -----	GC-MS LC-MS/MS	0.3,0.3,1 1.1	[14]
	Δ^9 -THC	LLE	PFFA	GC-MS	1 (LOQ)	[15]
	Δ^9 -THC eta 11-OH-THC	SPME	-----	LC-MS/MS		[16]
Plasma	Δ^9 -THC	LLE	-----	LC-MS/MS	0.5	[4]
	Δ^9 -THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD eta CBN	SPE	BSTFA	GC-MS	0.24, 0.15, 0.26, 0.29, 1.1	[9]
	Δ^9 -THC eta THC-COOH	SPE	TFAA	GC-MS	0.5, 2.5 (LOQ)	[10]
	Δ^9 -THC eta 11-OH-THC	SPE	Metil ioduroa	GC-MS	0.6, 3.4 (LOQ)	[17]
	Δ^9 -THC eta 11-OH-THC	SPE	BSTFA	GC-MS	0.5, 1.0 (LOQ)	[49]
	THC-COOH	SPE	-----	LC-MS/MS	5 (LOQ)	[37]
Gernua	THC-COOH	LLE	BSTFA	GC-MS-MS	5 (LOQ)	[68]
	Δ^9 -THC, CBD, CBN eta THC-COOH	SPE	BSTFA	GC-MS GCxGC-MS	0.5, 1, 0.002 (LOQ)	[41],[44]
Listua	Δ^9 -THC eta THC-COOH	SPE	-----	LC-MS	1	[45],[48]
	Δ^9 -THC eta THC-COOH	LLE	TMAH	GC-MS	1	[73]
	Δ^9 -THC, CBD, CBN, 11-OH-THC eta THC-COOH	LLE	BSTFA TFAA	GC-MS GCxGC-MS	1.5, 7.5, 30 0.3	[40],[49]
	Δ^9 -THC	LLE	-----	LC-MS/MS	0.5	[4],[47]

*Konposatu kannabinoideen analisia matrize biologikoetan:
odola, plasma, gernua, listua eta ilea*

Lagima	Analitua	Erauzketa	Deribatutzatzailea	Analisia	Detekzio-muga (ng/mL)	Erref.
	THC-COOH	LLE	PFPA	GC-MS	0.001	[70]
	Δ^9 -THC eta THC-COOH	LLE	PFPA	GC-MS	0.1	[57]
	THC-COOH	SPE	TFAA	GC-MS	0.0005 (LOQ)	[58]
Ilea	Δ^9 -THC, CBD eta CBN	SPME	----	GC-MS	0.1	[59]
	Δ^9 -THC, 11-OH-THC eta THC-COOH	LLE	TFAA	GC-MS	0.01, 0.25, 0.01	[60]
	Δ^9 -THC, CBD eta CBN	HS-SPME	MSTFA	GC-MS	0.05	[62]
	Δ^9 -THC, CBD eta CBN	HS-SPME	MSTFA	GC-MS	0.1	[63]
	Δ^9 -THC, CBD, CBN eta THC-COOH	LLE	----	GC-MS	0.02	[65]
	THC-COOH	LLE	PFPA	GC-MS	0.005	[67]
	Δ^9 -THC	LLE	BSTFA	GC-MS-MS	5 (LOQ)	[68]

STFA: N,O-bis(trimetil)sililfluoroacetamida, CBD: kannabidiola, CBN: kannabinola, GC-MS: Gas-kromatografia / masa-espektrometria, GC-MS-MS: Gas-kromatografia tandem masa-espektrometria, GCxGC-MS: dimentsio biko gas-kromatografia/masa-espektrometria, HS-SPME: buru gune ko fase solidoko mikroerauzketa, LLE: likido/likido erauzketa, LC-MS: Likido-kromatografia/masa-espektrometria, LC-MS/MS: Likido-kromatografia tandem masa-espektrometria, LOQ: Kuantifikazio muga, MSTFA: N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida, 11-OH-THC: 11-hidroxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinol, PFPA: anhidrido pentafluoropropionikoa, SPE: fase solidoko erauzketa, SPME: fase solidoko mikroerauzketa, TFAA: anhidrido trifluoroacetikoa, Δ^9 -THC: Δ^9 -tetrahidrokannabinola, THC-COOH: 11-nor-9-karboxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinol, THC-COOH-Glu: 11-nor-9-karboxi- Δ^9 -tetrahidrokannabinol glukuronidoa, TMAH: Tetrabutilamonio hidroxidoa.

6. ONDORIOAK

Konposatu kannabinoideen analisisen garrantzia zeharo igo da azken urteotan, batez ere, beraien efektu psikoaktiboen ondorioz suertatutako egoerei irtenbide emateko edota erantzukizunak bilatzeko. Honetarako erabil daitezkeen analisi metodoak analisiaren helburuaren menpe egoteaz gain, aztertutako matrizearen, konposatuaren eta estatuko legediaren menpe daude. Arrazoi hauei egokituta, egunotan erabiltzen diren teknikak sentikor eta espezifikoko dira oso; halakoak dira Δ^9 -THC eta bere metabolitoak determinatzen ahalbidetzen duten GC-MS-MS eta LC-MS-MS. Azken honek zehaztasun handiko analisiak egitea ahalbidetzen du, izatez, analisi azkar eta sentikorrek egitea ahalbidetzen baitu deribatizazio eta aurretratamendu luzeak ekidinez. Aurretratamendua beharrezkoa izatekotan, fase solidoko erauzketa eta likido/likido erauzketa dira erabilienak. Hala ere, gaur egun, selektiboagoak izan daitezkeen metodo eta disolbatzaile kantitateak murrizten dituzten mikroerauzketen garapenek hartu dute bide. Hori dela-eta, esan daiteke garapenaren bultzada uneko analisi azkarrak bermatzen dituzten detektagailu zehatz eta sentikorren ibilbidean doala. Ildo honetan, azken urteotan garatzen ari diren lan askoren helburua, ohiko metodoen eta detektagailu berri eta azkar hauen emaitzen alderaketan oinarrituta daude.

BIBLIOGRAFIA

- [1] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2006. Annual report 2006: the state of the drugs problem in Europe. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- [2] HOLLISTER, L. E.; GILLESPIE, H. K.; OHLSSON, A.; LINDGREN, J. E.; WAHLEN, A. eta AGURELL, S. 1981. «Do plasma concentrations of Δ^9 -tetrahydrocannabinol reflect the degree of intoxication?». *Journal of Clinical Pharmacology*, **21**, 171-177.
- [3] GUSTAFSON, R. A.; MOOLCHAN, E. T.; BARNES, A.; LEVINE, B. eta HUESTIS, M. A. 2003. «Validated method for the simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in human plasma using solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry with positive chemical ionization». *Journal of Chromatography B*, **798**, 145-154.
- [4] LALOUP, M.; FERNÁNDEZ, M. R.; WOOD, M.; DE BOECK, G.; HENQUET, C.; MAES, V. eta SAMYN, N. 2006. «Correlation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol concentrations determined by LC-MS-MS in oral fluid and plasma from impaired drivers and evaluation of the on-site Dra`ger DrugTest®». *Forensic Science International* **161**, 175-179.
- [5] GAILLARD, Y.; PEPIN, G.; MARQUET, P.; KINTZ, P.; DEVEAUX, M. eta MURA, P. 1996. «Identification et dosage de la benzoylecgonine, cocaïne, methylecgo-

- nine-ester, codéine, morphine et 6-acétylmorphine dans le sang total». *Toxicorama* **8**, 17-22.
- [6] KRAEMER, T. eta PAUL, L.D. 2007. «Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **388**, 1415-1435.
- [7] GIROUD, C.; MENETRY, A.; AUGSBURGER, M.; BUCLIN, T.; SÁNCHEZ-MAZAS, P. eta MANGIN, P. 2001. « Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC and Δ^9 -THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people». *Forensic Science International*, **123**, 159-164.
- [8] TESKE, J.; PUTZBACH, K.; ENGEWALD, W. eta MULLER, R. K. 2002. «Determination of cannabinoids by gas chromatography-mass spectrometry and large-volume programmed-temperature vaporizer injection using 25 μ l of biological fluid». *Journal of Chromatography B*, **772**, 299-306.
- [9] NADULSKI, T.; SPORKERT, F.; SCHNELLE, M.; STADELMANN, A. M.; ROSER, P.; SCHEFTER, T. eta PRAGST, F. J. 2005. «Simultaneous and Sensitive Analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in Plasma after Oral Application of Small Doses of THC and Cannabis Extract». *Analytical Toxicology*, **29**, 782-789.
- [10] HUANG, W.; MOODY, D. E.; ANDRENYAK, D. M.; SMITH, E. K.; FOLTZ, R. L. eta HUESTIS, M. A. 2001. «Simultaneous determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human plasma by solid-phase extraction and gas chromatography-negative ion chemical ionization-mass spectrometry». *Journal of Analytical Toxicology*, **25**, 531-537.
- [11] SCURLOCK, R. D.; OHLSON, G. B. eta WORTHEN, D. K. 2006. «The detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THCA) in whole blood using two-dimensional Gas chromatography and EI-mass spectrometry». *Journal of Analytical Toxicology*, **30**, 262-266.
- [12] MARALIKOVA, B. eta WEINMANN, W. J. 2004. «Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification». *Mass Spectrometry*, **39**, 526-531.
- [13] KÖNIG, S.; AEBI, B.; LANZ, S.; GASSER, M. eta WEINMANN, W. 2011. «On-line SPE LC-MS/MS for the quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its two major metabolites in human peripheral blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **400**, 9-16.
- [14] SKOPP, G. eta PÖTSCH, L. 2008. «Cannabinoid concentrations in spot serum samples 24-48 hours after discontinuation of cannabis smoking». *Journal of Analytical Toxicology*, **32**, 160-164.
- [15] CHU, M. H. eta DRUMMER, O. H. 2002. «Determination of THC in Whole Blood using Gas Chromatography-Mass Spectrometry». *Journal of Analytical Toxicology*, **26**, 575-581.

- [16] YANG, R. eta XIE, W. 2006. «Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography-mass spectrometry». *Forensic Science International*, **162**, 135-139.
- [17] STEINMEYER, S.; BREGEL, D.; WARTH, S.; KRAEMER, T. eta MOELLER, M. R. 2002. «Improved and validated method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC and 11-nor-9-carboxy-THC in serum, and in human liver microsomal preparations using gas chromatography-mass spectrometry». *Journal of Chromatography B*, **772**, 239-248.
- [18] KARSCHNER, E. L.; SCHWILKE, E. W.; LOWE, R. H.; DARWIN, W. D.; HERNING, R. I.; CADET, J. L. eta HUESTIS, M. A. 2009. «Implications of Plasma Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy-THC, and 11-nor-9-Carboxy-THC Concentrations in Chronic Cannabis Smokers». *Journal of Analytical Toxicology*, **33**, 469-477.
- [19] KARSCHNER, E. L.; BARNES, A. J.; LOWE, R. H.; SCHEIDWEILER, K. B. eta HUESTIS, M. A. 2010. «Validation of a two-dimensional gas chromatography mass spectrometry method for the simultaneous quantification of cannabidiol, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in plasma». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**, 603-611.
- [20] ABBARA C.; GALY R.; BENYAMINA, A.; REYNAUD, M. eta BONHOMMER-FAIVRE, L. 2006. «Development and validation of a method for the quantitation of tetrahydrocannabinol in human plasma by high performance liquid chromatography after solid-phase extraction». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 1011-1016.
- [21] VALIVETI, S. eta STINCHCOMB, A. L. 2004. «Liquid chromatographic-mass spectrometric quantitation of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and two metabolites in pharmacokinetic study plasma samples». *Journal of Chromatography B*, **803**, 243-248.
- [22] GRAUWILER, S. B., SCHOLER, A. eta DREWE, J. 2007. «Development of a LC/MS/MS method for the analysis of cannabinoids in human EDTA-plasma and urine after small doses of Cannabis sativa extracts». *Journal of Chromatography B*, **850**, 512-522.
- [23] WILLIAMS, P. eta MOFFAT, A. 1980. «Identification in human urine of delta-9-tetrahydrocannabinol-11-oic acid glucuronide: a tetrahydrocannabinol metabolite». *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **32**, 445-448.
- [24] CRIDLAND, J.; ROTTANBURG, D. eta ROBINS, A. 1983. «Apparent half-life of excretion of cannabinoids in man». *Human Toxicology*, **2**, 641-644.
- [25] WERNLY, P. eta THORNMAN, W. 1992. «Confirmation testing of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine with micellar electrokinetic capillary chromatography». *Journal of Chromatography*, **608**, 251-256.
- [26] ELSOHLY, M.; GUL, W. eta SALEM, M. 2008. «Cannabinoids analysis: analytical methods for different biological specimens». *Forensic Science. Handbook of Analytical Separations*, **6**, 203-241.
- [27] KING, P.; MARTEL, P. eta O'DONNELL, C. 1987. «Laboratory detection of cannabinoids [review]». *Clinical Laboratory Medicine*, **7**, 641-653.

- [28] SUTHEIMER, R.; YARBOROUGH, R.; HEPLER, B. eta SUNSHINE, I. 1985. «Detection and confirmation of urinary cannabinoids». *Journal of Analytical Toxicology*, **9**, 156-160.
- [29] FOLTZ, R. eta SUNSHINE, J. 1990. «Comparison of a TLC method with EMIT and GC/MS for detection of cannabinoids in urine». *Journal of Analytical Toxicology*, **14**, 375-378.
- [30] FREDERICK, D.; GREEN, J. eta FOWLER, M. 1985. «Comparison of six cannabinoid metabolite assays». *Journal of Analytical Toxicology*, **9**, 116-120.
- [31] STEINBERG, D.; SOKOLL, L.; BOWLES, K.; NICHOLS, J.; ROBERTS, R.; SCHULTHEIS, S. eta MICHAEL, O. 1997. «Clinical evaluation of Toxi-Prep™: a semiautomated solid-phase extraction system for screening of drugs in urine». *Clinical Chemistry*, **43**, 2099-2105.
- [32] TWITCHETT, P.; FLETCHER, S.; SULLIVAN, A. eta MOFFAT, A. 1978. «Analysis of LSD in human body fluids by high-performance liquid chromatography, fluorescence spectroscopy and radioimmunoassay». *Journal of Chromatography A*, **150**, 73-84.
- [33] WILLIAMS, P.; MOFFAT, A. eta KING, L. 1979. «Combined high-performance liquid chromatography and radioimmunoassay method for the analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol metabolites in human urine». *Journal of Chromatography*, **186**, 595-603.
- [34] ELSOHLY, M.; ELSOHLY, H.; JONES, A.; DIMSON, P. eta WELLS, K. 1983. «Analysis of the major metabolite of delta 9-tetrahydrocannabinol in urine II. A HPLC procedure». *Journal of Analytical Toxicology*, **7**, 262-264.
- [35] PARRY, R.; NOLAN, L.; SHIREY, R.; WACHOB, G. eta GISCH, D. 1990. «Pretreatment of urine samples for the analysis of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid using solid-phase extraction». *Journal of Analytical Toxicology*, **14**, 39-44.
- [36] FERRARA, S.; TEDESCHI, L.; FRISON, G. eta CASTAGNA, F. 1992. «Solid phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine». *Journal of Analytical Toxicology*, **16**, 217-222.
- [37] WEINMANN, W.; GOERNER, M.; VOGT, S.; GOERKE, R. eta POLLAK, S. 2001. «Fast confirmation of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC-COOH) in urine by LC/MS/MS using negative atmospheric-pressure chemical ionisation (APCI)». *Forensic Science International*, **121**, 103-107.
- [38] RAES, E.; VERSTRAETE, A. eta WENNIG, R. 2008. «Drugs and driving». *Forensic Science, Handbook of Analytical Separations*, **6**, 9. Kapituluua, 611-651.
- [39] MOLNAR, A.; LEWIS, J.; DOBLE, P.; HANSEN, G.; PROLOV, T. eta FU, S. 2012. «A rapid and sensitive method for the identification of delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry». *Forensic Science International*, **215**, 92-96.
- [40] MILMAN, G.; SCHWOPE, D. M.; GORELICK, D. A. eta HUESTIS M. A. 2012. «Cannabinoids and metabolites in expectorated oral fluid following controlled smoked cannabis». *Clinica Chimica Acta*, **413**, 765-770

- [41] MOORE, C.; COULTER, C.; UGES, D.; TUYAY, J.; VAN DER LINDE, S.; VAN LEEUWEN, A.; GARNIER, M. eta ORBITA JR, J. 2011. «Cannabinoids in oral fluid following passive exposure to marijuana smoke». *Forensic Science International*, **212**, 227-230.
- [42] www.intex-diagnostika.com/
- [43] CHOI, H.; BAECK, S.; KIM, E.; LEE, S.; JANG, M.; LEE, J.; CHOI, H. eta CHUNG, H. 2009. «Analysis of cannabis in oral fluid specimens by GC-MS with automatic SPE». *Science and Justice*, **49**, 242-246.
- [44] MOORE, C.; VINCENT, M.; RANA, S.; COULTER, C.; AGRAWAL, A. eta SOARES, J. 2006. «Stability of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) in oral fluid using the QuantisalTM collection device». *Forensic Science International*, **164**, 126-130.
- [45] TEIXEIRA, H.; PROENÇA, P.; VERSTRAETE, A.; CORTE-REAL, F. eta NUNO VIEIRA, D. 2005. «Analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in oral fluid samples using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry». *Forensic Science International*, **150**, 205-211.
- [46] UHL, M. 2000. «Tandem mass spectrometry: a helpful tool in hair analysis for the forensic expert». *Forensic Science International*, **107**, 169-179.
- [47] LALOUP, M.; FERNÁNDEZ, M. R.; WOOD, M.; DE BOECK, G.; HENQUET, C.; MAES, V. eta SAMYN, N. 2005. «Quantitative analysis of delta-9-tetrahydrocannabinol in preserved oral fluid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, **1082**, 15-24.
- [48] TEIXEIRA, H.; VERSTRAETE, A.; PROENÇA, P.; CORTE-REAL, F.; MONSANTO, P. eta NUNO VIEIRA, D. 2007. «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 Science International*, **170**, 148-155.
- [49] MILMAN, G.; BARNES, A. J.; ROSS H. LOWE, R. S. eta HUESTIS, M. A. 2010. «Simultaneous quantification of cannabinoids and metabolites in oral fluid by two-dimensional gas chromatography mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, **1217**, 1513-1521.
- [50] KOREN, G.; CHAN, D.; KLEIN, J. eta KARASKOV, T. 2002. «Estimation of fetal exposure to drugs of abuse, environmental tobacco smoke, and ethanol». *Therapeutic Drug Monitoring*, **24**, 23-25.
- [51] PRAGST, F.; ROTHE, M.; SPIEGEL, K. eta SPORKERT, F. 1998. «Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments—a time table of drug exposure?» *Forensic Science. Review*, **10**, 81-111.
- [52] BAUMGARTNER, W. A.; HILL, V. A. eta BLAHD, W. H. 1989. «Hair analysis for drugs of abuse». *Journal of Forensic Science*, **34**, 1433-1453.
- [53] THORSPECKEN, J.; SKOPP, G. eta POETSCH, L. 2004. «In vitro contamination of hair by marijuana smoke». *Clinical chemistry*, **50**, 596-602.
- [54] NADULSKI, T. eta FRITZ, P. 2007. «Simple and sensitive determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry». *Journal of Chromatography B*, **846**, 78-85.

- [55] HAN, E.; CHOI, H.; LEE, S.; CHUNG, H. eta SONG, J. M. 2011. «A study on the concentrations of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH) in hair root and whole hair». *Forensic Science International*, **210**, 201–205.
- [56] HUESTIS, M. A.; GUSTAFSON, R. A.; MOOLCHAN, E. T.; BARNES, A.; BOURLAND, J. A.; SWEENEY, S. A.; HAYES, E. F.; CARPENTER, P. M. eta SMITH, M. L. 2007. «Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users». *Forensic Science International*, **169**, 129-136.
- [57] CIRIMELE, V.; SACHS, H.; KINTZ, P., eta MANGIN, P. 1996. «Testing human hair for cannabis. III. Rapid screening procedure for the simultaneous identification of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol, and cannabidiol». *Journal of Analytical Toxicology*, **20**, 13-16.
- [58] MOORE, C.; GUZALDO, F., eta DONAHUE, T. 2001. «The determination of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol- 9-carboxylic acid (THC-COOH) in hair using negative ion GC/MS and high-volume injection». *Journal of Analytical Toxicology*, **25**, 555-558.
- [59] STRANO-ROSSI, S. eta CHIAROTTI, M. 1999. «Solid-phase microextraction for cannabinoids analysis in hair and its possible application to other drugs». *Journal of Analytical Toxicology*, **23**, 7-10.
- [60] WILKINS, D. G.; HAUGHEY, H.; CONE, E. J.; HUESTIS, M. A.; FOLTZ, R. L., eta ROLLINS, D. E. 1995. «Quantitative analysis of THC, 11-OH-THC, and THCCOOH in human hair by negative ion chemical ionization mass spectrometry». *Journal of Analytical Toxicology*, **19**, 483-491.
- [61] HAN, E.; CHOI, H.; LEE, S.; CHUNG, H. eta SONG, J. M. 2011. « A study on the concentrations of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCCOOH) in hair root and whole hair». *Forensic Science International*, **210**, 201-205.
- [62] MUSSHOF, F.; JUNKER, H. P.; LACHENMEIER, D. W.; KROENER, L. eta MADEA, B. 2002. «Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry». *Journal of Analytical Toxicology*, **26**, 554-560.
- [63] MUSSHOF, F.; LACHENMEIER, D. W.; KROENER, L. eta MADEA, B. 2003. «Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples». *Forensic Science International*, **133**, 32-38.
- [64] LACHENMEIER, D. W.; KROENER, L., MUSSHOF, F. eta MADEA, B. 2003. «Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples». *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **17**, 472-478.
- [65] BAPTISTA, M. J.; MONSANTO, P.V.; PINHO MARQUES, E. G.; BERMEJO, A.; AVILA, S.; CASTANHEIRA, C.; MARGALHO, A. M.; BARROSO, M. eta VIEIRA, D. N. 2002. «Hair analysis for Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-COOH, CBN and CBD, by GC/MS-EI Comparison with GC/MS-NCI for Δ^9 -THC-COOH». *Forensic Science International*, **128**, 66-78.

- [66] KIM, J. Y.; SUH, S. I.; IN, M. K. eta PAENG, K. J. 2005. «Simultaneous determination of cannabidiol, cannabinol, and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human hair by gas chromatography-mass spectrometry». *Archives Of Pharmacal Research*, **28**, 1086-1091.
- [67] KINTZ, P.; CIRIMELE, V. eta MANGIN, P. 1995. «Testing human hair for cannabis. II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof». *Journal of forensic sciences*, **40**, 619-622.
- [68] CHIAROTTI, M. eta COSTAMAGNA, L. 2000. «Analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS-MS)». *Forensic Science International*, **114**, 1-6
- [69] SPORKERT, F. eta RENTSCH, 2004 «Ausgewählte Aspekte der Forensischen Toxikologie», *Heppenheim*, 2004, 334.
- [70] SACHS, H eta DRESSLER, U. 2000. «Detection of THCCOOH in hair by MSD-NCI after HPLC clean-up». *Forensic Science International*, **107**, 239-247.
- [71] SKOPP, G.; STROHBECK-KUEHNER, P.; MANN, K. eta HERMANN, D. 2007. «Deposition of cannabinoids in hair after long-term use of cannabis». *Forensic Science International*, **170**, 46-50.
- [72] COULTER, C.; TARUC, M.; TUYAY, J. eta MOORE, C. 2009. «Drug Testing and Analysis, Quantitation of tetrahydrocannabinol in hair using immunoassay and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection». *Drug Testing and Analysis*, **1**, 234-239.
- [73] CIRIMELE, V.; VILLAIN, M.; MURA, P.; BERNARD, M. eta KINTZ, P. 2006. «Oral fluid testing for cannabis: On-site OraLine IV s.a.t. device versus GC/MS». *Forensic Science International*, **161**, 180-184.