

ΔΡΑΣΗ 21Ε.2.28
ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΝΝΑΒΙΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΣΠΟΡΟΥΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΣΠΟΡΩΝ
ΚΑΝΝΑΒΗΣ, ΠΟΥ ΠΡΟΟΡΙΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.



ΠΗΓΗ ΚΟΡΜΑΛΗ, ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΑΡΓΑΝΤΑΝΗΣ
ΓΕΝΙΚΟ ΧΗΜΕΙΟ ΤΟΥ ΚΡΑΤΟΥΣ
ΧΗΜΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΠΕΙΡΑΙΑ
ΤΜΗΜΑ Α΄ - ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΕΛΕΓΧΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΘΝΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΕΣ ΤΟΞΙΝΕΣ ΣΤΑ
ΤΡΟΦΙΜΑ

Πειραιάς, 31-03-2023

Κωδικός έργου: 21Ε.2.28

Αρμόδια Υπηρεσία: Γενική Διεύθυνση Γενικού Χημείου του Κράτους

Υλοποίηση: Χημική Υπηρεσία Πειραιά

Στοιχεία Επικοινωνίας (e-mail, τηλέφωνα): piraeus.gcs1@aade.gr, 2132118102

Συνολικό Χρονοδιάγραμμα Δράσης: Από 01-01-2022 Έως 31-12-2022

Κύριος έργου: Σ. Ζήση – Προϊσταμένη Γ.Δ. – Γ.Χ.Κ.

Συντονιστής έργου: Κ. Παπαδοπούλου - Προϊσταμένη - Χημική Υπηρεσία Πειραιά

Σχεδιασμός / Υλοποίηση: Π. Κόρμαλη, Ι. Σαργαντάνης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα κανναβινοειδή είναι ουσίες που παράγονται από φυτικά είδη του γένους *Cannabis* spp. Οι σπόροι και τα προϊόντα σπόρων κάνναβης έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε ψυχοδραστικά κανναβινοειδή και χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα. Ανώτατα όρια για την περιεκτικότητα των κανναβινοειδών στα τρόφιμα έχουν θεσπιστεί στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Ο σκοπός της δράσης ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για τον αναλυτικό προσδιορισμό Τετραϋδροκανναβινόλης (THC) και Τετραϋδροκανναβινολικού οξέος (THCA) σε σπόρους και προϊόντα σπόρων κάνναβης που προορίζονται για τρόφιμα. Στα πλαίσια της δράσης ελήφθησαν σπόροι και αρκετά αντιπροσωπευτικά προϊόντα σπόρων κάνναβης, ανασκοπήθηκε η βιβλιογραφία, και αναπτύχθηκε μια μέθοδος προσδιορισμού των THC και THCA με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης - δίδυμη φασματομετρία μάζας LC/MS/MS, η οποία στη συνέχεια επικυρώθηκε με συλλογή δεδομένων από αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων.

ABSTRACT

Cannabinoids are substances produced by plant species of the genus *Cannabis* spp.. Cannabis seeds and cannabis seed products have a low content of psychotropic cannabinoids and are used in food. The purpose of the action was the development of a method for the analytic determination of tetrahydrocannabinol (THC) and tetrahydrocannabinolic acid (THC) in cannabis seeds and cannabis seed products that are destined for food. For this reason, seeds and several representative cannabis seed products were obtained, the literature was reviewed and a method for the determination of THC and THCA was developed using high performance liquid chromatography coupled with mass spectroscopy LC/MS/MS, which was subsequently validated with data collection from spiked samples.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
2. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	5
3. ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	6
4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	7
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
5.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	8
5.2. ΚΥΡΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	9
5.3. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	9
5.4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	9
5.5. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ LC-MS/MS.....	9
5.6. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	11
5.7. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	12
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	13

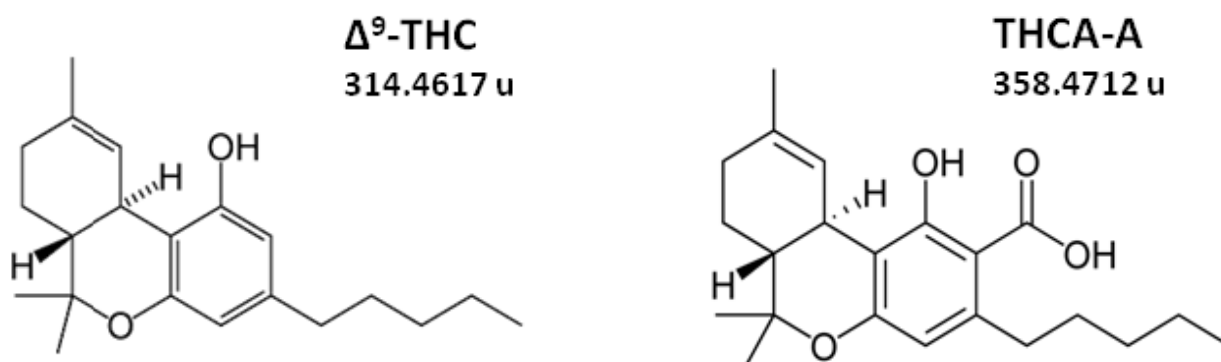
ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ

THC:	Τετραϋδροκανναβινόλη
THCA:	Τετραϋδροκανναβινολικό οξύ
CBD:	Κανναβιδιόλη
CBN:	Κανναβινόλη
CH ₃ OH:	Μεθανόλη
CHCl ₃ :	Χλωροφόρμιο
HCOOH:	Μυρμηγκικό οξύ
EE:	Ευρωπαϊκή Ένωση
GC:	Αέρια χρωματογραφία
HPLC:	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
MS:	Φασματομετρία μάζας
LOD:	Όριο ανίχνευσης
LOQ:	Όριο ποσοτικού προσδιορισμού
UV/DAD:	Ανιχνευτής υπεριώδους / συστοιχίας διόδων
ΔΑΟΕ:	Ολική δόση αναφοράς οξείας έκθεσης
QuEChERS:	Αρχικά από Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – Μέθοδος καθαρισμού εκχυλίσματος
Dwell Time:	Χρόνος παραμονής στην μετρούμενη μετάπτωση
CAD:	Collisionally Activated Dissociation or Decomposition
CUR:	Curtain gas
ISV:	Ion spray Voltage
TEM:	Temperature
GS1:	Gas 1
GS2:	Gas 2
DP:	Declustering potential
EP:	Entrance potential
CEP:	Collision cell entrance potential
CE:	Collision energy
CXP:	Collision cell exit potential

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά του γένους *Cannabis* spp. παράγουν περίπου εξήντα έξι φυσικές ενώσεις, γνωστές ως κανναβινοειδή, οι οποίες είναι μια ομάδα C₂₁ τερπενοφαινολικών ενώσεων ¹). Κάποιες από αυτές παρουσιάζουν ψυχοδραστικές επιδράσεις και χρησιμοποιούνται ως ναρκωτικά. Οι περισσότεροι γνωστές από αυτές είναι η Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC), υπεύθυνη για την παράνομη χρήση της κάνναβης ως ναρκωτικό και το τετραϋδροκανναβινολικό οξύ (THCA). Οι μοριακές δομές των δύο αυτών κανναβινοειδών παρουσιάζονται στο Σχήμα 1. Η ψυχοδραστική Δ9-THC βρίσκεται κυρίως στα φύλλα και στους ανθίζοντες βλαστούς, καθώς και στην ελαιώδη ρητίνη που παράγεται από αυτά τα μέρη. Οι σπόροι, ιδιαίτερα αν έχουν αποφλοιωθεί και πλυθεί, έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε Δ9-THC (λιγότερο από 0.5 µg/g) ².

Σχήμα 1: Χημική δομή των κανναβινοειδών



2. ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ & ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Οι σπόροι κάνναβης, όπως επίσης και το αλεύρι και το έλαιο που προέρχεται από τους σπόρους, έχουν εγκριθεί σαν τρόφιμα και συστατικά για παραγωγή τροφίμων στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Μόνο σπόροι κάνναβης εγκεκριμένοι από την νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια ³. Τα κανναβινοειδή είναι παρόντα σε τρόφιμα που περιέχουν συστατικά κάνναβης, και οι τελικοί καταναλωτές έχουν έκθεση σε αυτά.

Το 2015 η ομάδα για τις μολυσματικές προσμείξεις στην αλυσίδα τροφίμων της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων εξέδωσε επιστημονική γνώμη σχετικά με τους κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου που συνδέονται με την παρουσία τετραϋδροκανναβινόλης (THC) στο γάλα και σε άλλα

¹ Brenneisen R, Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents. In: Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids, (Ed. ElSohly MA) Humana Press Inc. Totowa, New Jersey; 2007:17-49

² Ross SA, Mehmedic Z, Murphy TP, ElSohly MA. GC-MS analysis of the total Δ9-THC content of both drug- and fiber-type cannabis seeds. *J Anal Toxicol.* 2000;24:715-717.

³ The European Commission Council Directive 2002/53/EC of 13 June 2002 on the common catalogue of varieties of agricultural plant species. *OJ* 2002;L193:1-11.

τρόφιμα ζωικής προέλευσης ⁴. Η Αρχή έχει καθορίσει δόση αναφοράς οξείας έκθεσης (ΔΑΟΕ) ίση με 1 μg Δ9-THC/kg σωματικού βάρους.

Προκειμένου να συγκεντρωθούν περισσότερα στοιχεία σχετικά με την παρουσία Δ9-THC και άλλων σημαντικών μη ψυχοδραστικών πρόδρομων ουσιών σε τρόφιμα παραγόμενα από κάνναβη και σε τρόφιμα που περιέχουν κάνναβη ή συστατικά παραγόμενα από κάνναβη, εκδόθηκε η σύσταση (ΕΕ) 2016/2115 της Επιτροπής ⁵.

Στις 7 Ιανουαρίου 2020 η Αρχή δημοσίευσε επιστημονική έκθεση για την αξιολόγηση της οξείας έκθεσης του ανθρώπου στη Δ9-THC ⁶, λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα σχετικά με την παρουσία της, όπως προέκυψαν από τη σύσταση (ΕΕ) 2016/2115. Σε ορισμένες εκτιμήσεις οξείας έκθεσης σημειώθηκε υπέρβαση της ΔΑΟΕ του 1 μg/kg σωματικού βάρους. Παρόλο που είναι αναμενόμενο οι εκτιμήσεις έκθεσης να υπερεκτιμούν την οξεία έκθεση στη Δ9-THC στην Ένωση, η σημερινή έκθεση στη Δ9-THC συνιστά δυνητικό κίνδυνο για την υγεία.

3. ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Με τον Κανονισμό (ΕΕ) 2022/1393 ⁷ έγινε τροποποίηση του Κανονισμού (ΕΕ) 2006/1881 ⁸ και θεσπίστηκαν μέγιστα επιτρεπτά όρια για τα κανναβινοειδή στους σπόρους κάνναβης και τα παράγωγα προϊόντα τους.

Το μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο αναφέρεται στο άθροισμα της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ9-THC) και του Δ9-τετραϋδροκανναβινολικού οξέος (Δ9-THCA), εκφρασμένου ως Δ9-THC. Στο επιτρεπτό επίπεδο του Δ9-THCA εφαρμόζεται συντελεστής 0,877 στην προσδιορισθείσα τιμή, δεδομένου ότι το Δ9-THCA μπορεί να μετατραπεί σε Δ9-THC μέσω επεξεργασίας. Σε περίπτωση ξεχωριστού προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης των Δ9-THC και Δ9-THCA, το μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο αναφέρεται στο άθροισμα της Δ9-THC + 0,877 x Δ9-THCA.

Τα μέγιστα όρια στα τρόφιμα είναι 3 mg/kg όσον αφορά τους σπόρους κάνναβης, τους αλεσμένους σπόρους κάνναβης, τους (μερικώς) απολιπωμένους σπόρους κάνναβης και άλλα παράγωγα/επεξεργασμένα προϊόντα κάνναβης και 7,5 mg/kg για το έλαιο σπόρων κάνναβης.

⁴ Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) *Journal* 2015·13(6):4141.

⁵ Σύσταση (ΕΕ) 2016/2115 της Επιτροπής, της 1ης Δεκεμβρίου 2016, σχετικά με την παρακολούθηση της παρουσίας της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης, των πρόδρομων αυτής και άλλων κανναβινοειδών στα τρόφιμα (ΕΕ L 327 της 2.12.2016, σ. 103).

⁶ EFSA, Arcella D, Cascio C και Mackay K, 2020. Acute human exposure assessment to tetrahydrocannabinol (Δ9-THC), Αξιολόγηση της οξείας έκθεσης του ανθρώπου στην τετραϋδροκανναβινόλη (Δ9-THC). *EFSA Journal* 2020·18(1):5953, 41 σ. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5953>.

⁷ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2022/1393 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 11ης Αυγούστου 2022 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 όσον αφορά τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ9-THC) στους σπόρους κάνναβης και τα παράγωγα προϊόντα τους.

⁸ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 19ης Δεκεμβρίου 2006 για καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Πολλές μέθοδοι για την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών έχουν περιγραφεί στην βιβλιογραφία. Αυτές που βασίζονται στην αέρια χρωματογραφία (GC) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (MS) απαιτούν ένα βήμα παραγωγοποίησης. Από την άλλη, μέθοδοι που βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC/MS) ^{9,10,11,12,13,14,15,16} έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των κυρίων φυσικά απαντώμενων κανναβινοειδών και των μεταβολιτών τους σε φυσικά εκχυλίσματα κάνναβης, αίμα, πλάσμα, στοματικά υγρά και τρίχες. Η μέθοδος LC/MS υπερτερεί της μεθόδου GC/MS λόγω του ότι οι υψηλές θερμοκρασίες του εισαγωγέα δείγματος και του ανιχνευτή στο GC μπορούν να οδηγήσουν σε αποκαρβοξυλίωση των κανναβινοειδικών οξέων ¹⁷. Μια μέθοδος HPLC-UV για τον προσδιορισμό κανναβινοειδών σε προϊόντα κάνναβης αναπτύχθηκε το 2019 από τους Mandrioli et al ¹⁸. Για την ταυτοποίηση και ανίχνευση των κανναβινοειδών σε κάνναβη και προϊόντα κάνναβης εκδόθηκε το 2022 ένας επικαιροποιημένος οδηγός από τα Ηνωμένα Έθνη ¹⁹.

Λιγότερες συγκριτικά αναφορές είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση των κανναβινοειδών σε προϊόντα κάνναβης που προορίζονται για τρόφιμα. Μια μέθοδος HPLC-UV/DAD για τον προσδιορισμό των Δ9-THC και THCA-A σε σπόρους κάνναβης, έλαιο σπόρων κάνναβης, μπισκότα, τσάι και φυτική κάνναβη αναπτύχθηκε από τους Zoller et al in 2000 ²⁰; με όρια ανίχνευσης (LOD) 0,01 ng για το Δ9-THC και 0,05 ng για το THCA-A, και με όγκο ένεσης 10 µL.

Μια μέθοδος για τον προσδιορισμό Δ9-THC, CBD και CBN σε διατροφικά προϊόντα κάνναβης χρησιμοποιώντας μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενης φάσης και ανιχνευτή GC/MS

⁹ Tiscione NB, Miller R, Shan X, Sprague J, Yeatman DT. An efficient, robust method for the determination of cannabinoids in whole blood by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol*. 2016;40:639-648.

¹⁰ Dulaurent S, Gaulier JM, Imbert L, Morla A, Lachâtre G. Simultaneous determination of Δ9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor-Δ9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 2014;236:151-156.

¹¹ Ferreirós N, Labocha S, Walter C, Lötsch J, Geisslinger G. Simultaneous and sensitive LC-MS/MS determination of tetrahydrocannabinol and metabolites in human plasma. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405:1399-1406.

¹² Roth N, Moosmann B, Auwärter V. Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of Δ9-tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), THC, CBN and CBD in hair. *J Mass Spectrom*. 2013;48:227-233.

¹³ Aizpurua-Olaizola O, Omar J, Navarro P, Olivares M, Etxebarria N, Usobiaga A. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406:7549-7560.

¹⁴ Desrosiers NA, Scheidweiler KB, Huestis MA. Quantification of six cannabinoids in oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Test Analysis*. 2015;7:684-694.

¹⁵ Sergi M, Montesano C, Odoardi S, et al. Micro extraction by packed sorbent coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cannabinoids in oral fluids. *J Chromatogr A*. 2013;1301:139-146.

¹⁶ Míguez-Framil M, Cocho JA, Tabernero MJ, Bermejo AM, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P. An improved method for the determination of Δ9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem J* 2014;117:7-17.

¹⁷ Mudge, E.M.; Murch, S.J.; Brown, P.N. Leaner and greener analysis of cannabinoids. *Anal. Bioanal. Chem*. 2017, 409, 3153–3163.

¹⁸ Mandrioli M, Tura M, Scotti S, Toschi TG. Fast Detection of 10 Cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in Cannabis sativa L. *Molecules* 2019, 24(11), 2113.

¹⁹ Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products. 2022. Vienna, United Nations Office on Drugs and Crime.

²⁰ Zoller O, Rhyn P, Zimmerli B. High-performance liquid chromatography of Δ9-tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of Δ9-tetrahydrocannabinol. *J Chromatogr A*. 2000;872:101-110.

αναπτύχθηκε από τους Lachenmeier et al το 2004 ²¹. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν μεταξύ 0,01 και 0,17 mg/kg. Το 2008, οι Holler et al ²² ανέπτυξαν μια μέθοδο GC/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό του Δ9-THC σε διατροφικά προϊόντα κάνναβης του εμπορίου μέσω μιας αρκετά πολύπλοκης διαδικασίας εκχύλισης, με όρια ανίχνευσης τα 1,0 και 2,5 µg/g, αναλόγως του υποστρώματος, και τα 2,5 ng/mL για προϊόντα όπως η μπίρα και το τσάι.

Το 2018 οι Di Marco Pisciotano et al. ²³ ανέπτυξαν μια μέθοδο LC-MS/MS για τον προσδιορισμό 9 κανναβινοειδών σε τρόφιμα με όριο ποσοτικού προσδιορισμού τα 20 µg/kg, χρησιμοποιώντας ένα εκχυλιστικό μίγμα μεθανόλης/χλωροφορμίου 9:1 (v/v) που είχε χρησιμοποιηθεί από τους De Backer et al ²⁴ το 2009. Το 2018 αναπτύχθηκε από τους Meng et al ²⁵ μια μέθοδος LC-MS/MS για τον προσδιορισμό 40 κανναβινοειδών σε τρόφιμα με χρήση επισημασμένων κανναβινοειδών και το 2020 αναπτύχθηκαν από τους Christinat et al ²⁶ (15 κανναβινοειδή) και από τους Lee et al ²⁷ (2 κανναβινοειδή) μέθοδοι LC-MS/MS για τον προσδιορισμό κανναβινοειδών σε τρόφιμα με καθαρισμό του εκχυλίσματος με QuEChERS.

5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κατά τη διάρκεια της δράσης αναπτύχθηκε μέθοδος που περιγράφει τη διαδικασία ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των κανναβινοειδών THC και THCA σε σπόρους κάνναβης και προϊόντα σπόρων κάνναβης με LC/MS/MS με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο συμμόρφωσης προς τις διατάξεις του Κανονισμού (ΕΕ) 1881/2006, όπως έχει τροποποιηθεί από τον Κανονισμό (ΕΕ) 1393/2022 και η οποία συμμορφώνεται με τις απαιτήσεις της SANTE 11312/2021 ²⁸ για την ταυτοποίηση των κανναβινοειδών THC και THCA.

5.1. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Τα κανναβινοειδή εκχυλίζονται από το δείγμα με κατάλληλο μείγμα διαλυτών. Το εκχύλισμα φυγοκεντρείται, ακολουθεί αραίωση του εκχυλίσματος και έγχυση αυτού σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μάζας LC/MS/MS. Τα κανναβινοειδή ταυτοποιούνται, με βάση τον χρόνο κατακράτησής τους και την αναλογία των ιόντων τους σε υγρή χρωματογραφία υψηλής

²¹ Lachenmeier DW, Kroener L, Musshoff F, Madea B. Determination of cannabinoids in hemp food products by use of headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2004;378:183-189.

²² Holler JM, Bosy TZ, Dunkley CS, Levine B, Past MR, Jacobs A. Δ9-tetrahydrocannabinol content of commercially available hemp products. *J Anal Toxicol*. 2008;32:428-432.

²³ Di Marco Pisciotano I, Guadagnuolo G, Sprano V, De Crescenzo M, Gallo P. A rapid method to determine nine natural cannabinoids in beverages and food derived from *Cannabis sativa* by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry on a QTRAP 4000. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2018 Οκτ. 15, 32(19), 1728-1736.

²⁴ De Backer B, Debrus B, Lebrun P, et al. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *J Chromatogr B*. 2009;877:4115-4124.

²⁵ Meng Q, Buchanan B, Zuccolo J, Poulin M-M, Gabriele J, Baranowski DC. A reliable and validated LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 4 cannabinoids in 40 consumer products. 2018, PLoS ONE 13(5): e0196396.

²⁶ Christinat N, Savoy M-C, Mottier, P. Development, validation and application of a LC-MS/MS method for quantification of 15 cannabinoids in food. 2020, Food Chemistry, 317, 126469.

²⁷ Lee, JH, Min, AY, Han, JH, Yang, YJ, Kim, HI, Shin, DW, Development and validation of LC-MS/MS method with QuEChERS clean-up for detecting cannabinoids in foods and dietary supplements. 2020, Food Additives & Contaminants, Part A.

²⁸ DG_SANTE, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed SANTE/11312/2021. 2021. https://ec.europa.eu/food/system/files/2022-02/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2021-11312.pdf.

απόδοσης (HPLC), εφοδιασμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας. Ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη μέθοδο του εσωτερικού προτύπου.

5.2. ΚΥΡΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Μεθανόλη (CH_3OH), LC/MS/MS grade
- Χλωροφόρμιο (CHCl_3), HPLC grade
- Μυρμηγκικό οξύ (HCOOH) LC/MS/MS grade

5.3. ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Πρότυπο διάλυμα THC σε αιθανόλη ονομαστικής συγκέντρωσης $\sim 1000 \mu\text{g/mL}$.
- Πρότυπο διάλυμα THCA σε ισοπροπανόλη ονομαστικής συγκέντρωσης $\sim 1000 \mu\text{g/mL}$.
- Πρότυπο διάλυμα επισημασμένης με δευτέριο THC- d_3 σε αιθανόλη ονομαστικής συγκέντρωσης $\sim 1000 \mu\text{g/mL}$.

5.4. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Ζύγιση 1 g δείγματος (0,25 g για έλαια) σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου.
2. Προσθήκη εσωτερικού προτύπου THC- d_3 .
3. 10 ml εκχυλιστικού διαλύματος μεθανόλης / χλωροφορμίου 9:1 (v/v).
4. Ανάδευση για 30 min.
5. Φυγοκέντρωση στις 4000 rpm και στους 20°C για τουλάχιστον 15 min.
6. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται ποσοτικά σε νέο πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρου.
7. Επανάληψη των βημάτων 3-6.
8. Ενοποίηση και ανάδευση των υπερκείμενων φάσεων των προηγούμενων βημάτων.
9. Αραίωση $\frac{1}{4}$ με διάλυμα μεθανόλης / χλωροφορμίου 9:1 (v/v).
10. Διήθηση με φίλτρο σύριγγας PTFE, διαμέτρου πόρων 0,2 μm και εισαγωγή για ανάλυση.

5.5. ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ LC-MS/MS

- Σύστημα HPLC: Agilent 1200
- Σύστημα MS/MS: Sciex API 3200
- Χρωματογραφική στήλη: C18 Ascentis Express, 7.5 cm x 2.1 mm, 2.7 μm .
- Θερμοκρασία: $50,0^\circ\text{C}$
- Όγκος ένεσης: 5 μl
- Κινητές φάσεις: A: $\text{H}_2\text{O} - \text{HCOOH}$: 99,9 / 0,1 (v/v), B: $\text{MeOH} - \text{HCOOH}$: 99,9 / 0,1 (v/v).
- Ροή κινητής φάσης: 350 $\mu\text{l/min}$.
- Σύσταση κινητής φάσης: Σύμφωνα με τον Πίνακα 1.
- Παράμετροι λειτουργίας της πηγής ιονισμού σε ηλεκτρικό πεδίο με ψεκασμό (ESI): CUR: 40 psi, ISV: 5500 Volt, TEM: 550°C , GS1: 50 psi, GS2: 50 psi,
- Συνθήκες ιονισμού – θραύσης ιόντων: Σύμφωνα με τον Πίνακα 2.

Πίνακας 1: Σύσταση κινητής φάσης

Χρόνος (min)	H ₂ O – HCOOH: 99,9 / 0,1 (v/v)	MeOH – HCOOH: 99,9 / 0,1 (v/v)
0,0	60,0	40,0
0,5	60,0	40,0
1,0	18,0	82,0
5,8	15,0	85,0
8,0	12,8	87,2
8,5	10,0	90,0
9,0	2,0	98,0
13,0	2,0	98,0
14,0	60,0	40,0
19,0	60,0	40,0

Πίνακας 2: Συνθήκες ιονισμού – θραύσης ιόντων

Κανναβινοειδή	ESI	Μητρικό ιόν (m/z)	Θυγατρικά ιόντα (m/z)		Dwell Time (ms)	CAD	DP (Volt)	EP (Volt)	CEP (Volt)	CE (Volt)	CXP (Volt)
THC-1	pos	315,4	193,1	Q	80	5	50	5	15	30	7
THC-2	pos	315,4	123,0	I	80	5	50	5	15	50	7
THC-2	pos	315,4	259,5	I	80	5	50	5	15	25	8
d ₃ THC-1	pos	318,30	196,1	Q	80	5	50	5	15	30	4
d ₃ THC-2	pos	318,3	123,0	I	80	5	50	5	15	40	4
d ₃ THC-3	pos	318,3	262,2	I	80	5	50	5	15	25	4
THCA-1	neg	357,2	313,3	Q	160	5	-70	-5	-40	-45	-7
THCA-2	neg	357,2	191,0	I	160	5	-70	-5	-40	-45	-5
THCA-3	neg	357,2	245,2	I	160	5	-70	-5	-40	-45	-8

5.6. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της SANTE 11312/2021 και της τυποποιημένης διαδικασίας λειτουργίας του Γ.Χ.Κ. 00 00 7.02 02²⁹ και στα παρακάτω υποστρώματα:

- Σπόροι κάνναβης
- Αποφλοιωμένοι σπόροι κάνναβης
- Αλεύρι κάνναβης
- Προϊόν δημητριακών με σπόρους κάνναβης
- Έλαιο σπόρων κάνναβης
- Σουσάμι για πειραματικό προσδιορισμό του ορίου ποσοτικού προσδιορισμού

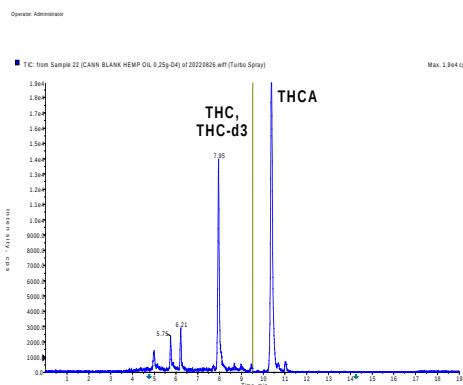
Στα παραπάνω υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων σε διαφορετικά επίπεδα από διαφορετικούς αναλυτές και σε διαφορετικές ημερομηνίες. Από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων υπολογίστηκε η ορθότητα, η πιστότητα, η γραμμικότητα και το LOQ της μεθόδου. Τα στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου που προέκυψαν παρατίθενται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3. Τυπικά χρωματογραφήματα για τα κανναβινοειδή παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.

Πίνακας 3: Στοιχεία επικύρωσης μεθόδου κανναβινοειδών

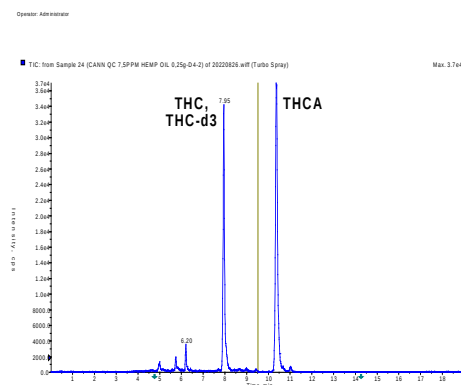
	Κανναβινοειδές	
	THC	THCA
Πεδίο εφαρμογής (mg/kg)	0,5 – 15,0	0,5 – 15,0
LOQ (mg/kg)	0,5	0,5
Γραμμική περιοχή απόκρισης ανιχνευστή (ng/mL)	6,25 - 250	6,25 – 250
Ανάκτηση (%)	90,4	106,6
Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες επαναληψιμότητας (%)	2,07	5,30
Σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (%)	8,82	15,01

Σχήμα 2: Τυπικά χρωματογράφημα κανναβινοειδών

A1



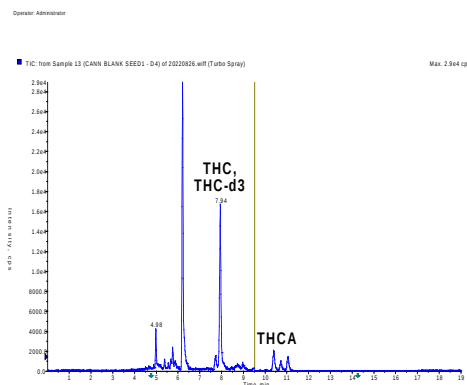
A2



²⁹ Τυποποιημένη Διαδικασία Λειτουργίας (ΤΔΛ) 00 00 7.02.02, ΓΧΚ, Έκδοση 2, 3-11-2020, Επικύρωση μεθόδων.

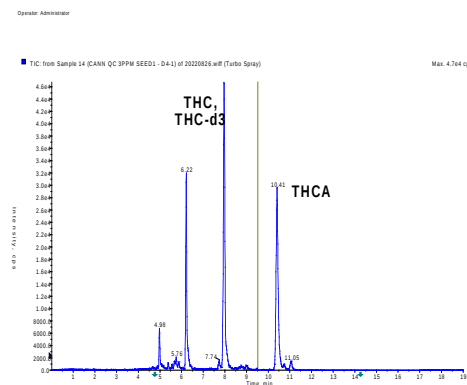
Δείγμα ελαίου κάνναβης

B1



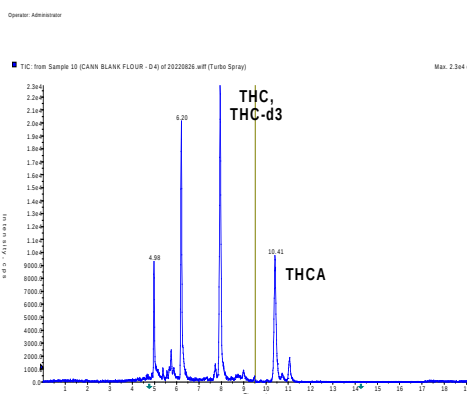
Εμβολιασμένο δείγμα ελαίου κάνναβης στα 7,5 µg/kg

B2



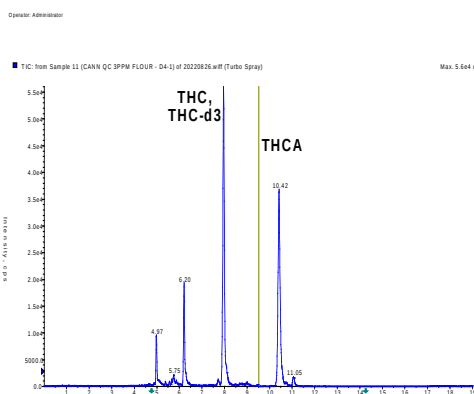
Δείγμα σπόρων κάνναβης

Γ1



Εμβολιασμένο δείγμα σπόρων κάνναβης στα 3,0 µg/kg

Γ2



Δείγμα αλεύρου κάνναβης

5.7. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Στο πλαίσιο της δράσης εξετάστηκαν δείγματα σπόρων κάνναβης, αλεύρου από σπόρους κάνναβης, αποφλοιωμένων σπόρων κάνναβης, προϊόντος δημητριακών με σπόρους κάνναβης, και ελαίου σπόρων κάνναβης. Η περιεκτικότητα των δειγμάτων ως άθροισμα της Δ9-τετραϋδροκανναβινόλης (Δ9-THC) και του Δ9-τετραϋδροκανναβινολικού οξέος (Δ9-THCA), εκφρασμένου ως Δ9-THC απεικονίζεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις Δ9-THC στα δείγματα που εξετάστηκαν

	Συγκέντρωση (µg/kg)
Σπόροι κάνναβης	< 500
Αποφλοιωμένοι σπόροι κάνναβης	774
Αλεύρι κάνναβης	1590
Προϊόν δημητριακών με σπόρους κάνναβης	< 500
Έλαιο σπόρων κάνναβης	9230

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο Τμήμα Α΄ της Χ.Υ. Πειραιά αναπτύχθηκε μέθοδος προσδιορισμού των κανναβινοειδών THC και THCA σε σπόρους κάνναβης και προϊόντα σπόρων κάνναβης με επιδόσεις που πληρούν τα διεθνή πρότυπα και η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τις αναλύσεις κανναβινοειδών σε τρόφιμα στα πλαίσια του Κανονισμού (ΕΕ) 1881/2023, όπως έχει τροποποιηθεί και ισχύει.