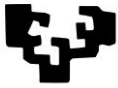
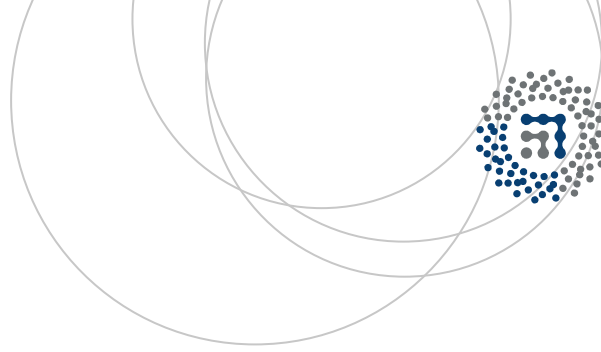


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Kimikako Gradua / Grado en Química

## Konposatu kannabinoideen analisia olioetan

Egilea/Autor:

Laura Ortiz Herrero

Zuzendaria/Director/a:

Nestor Etxebarria eta Aresatz Usobiaga

© 2015, Laura Ortiz Herrero

Leioa, 2015eko ekainaren 23a /Leioa, 23 de junio de 2015





**GRADU AMAIERAKO LANA**

**KIMIKAKO GRADUA**

# **Konposatu kannabinoideen analisia olioetan**

**LAURA ORTIZ HERRERO-K AURKEZTUTAKO MEMORIA**

**MATRIKULAZIO ETA DEFENTSA DATA:** 2015eko ekaina

**ZUZENDARIAK:** Nestor Etxebarria eta Aresatz Usobiaga

**SAILA:** Kimika Analitikoa



## **AURKIBIDEA**

1 SARRERA	1
1.1 Jatorria, sailkapena eta legaltasuna	2
1.2 Cannabis sativa L.	4
1.3 Landarearen osagaiak: kannabinoideak eta terpenoak	6
1.4 Kannabisaren potentzial terapeutikoa	12
1.5 Kannabinoideen analisi kimikoa	15
1.5.1 Erauzketa metodoak	15
1.5.1.1 Ultrasoinuen bidezko erauzketa teknikak	16
1.5.2 Analisi metodoak	18
1.5.2.1 Gas kromatografia (GC)	18
1.5.2.2 Bereizmen handiko likido kromatografia (HPLC)	19
2 HELBURUAK	21
3 LAN ESPERIMENTALA	23
3.1 Erreaktiboak	23
3.2 Kannabis-olioaren prestaketa	23
3.3 Instrumentazioa	24
3.4 Ultrasoinu fokatuaren bidezko erauzketa	25
3.5 HPLC-DAD-ren bidezko analisisia	26
4 EMAITZAK ETA EZTABAIDA	29
4.1 Kalibrazio kurba	29
4.2 Detekzio eta kuantifikazio mugak	31
4.3 Kannabis-olioaren kuantifikazioa	32

4.4 Erauzketa metodoaren optimizazioa	32
4.4.1 Esperimentuen diseinua (DoE)	32
4.4.1.1 Diseinu Konposatu Zentrala (CCD)	33
4.4.2 Ultrasoinu fokatuaren bidezko erauzketaren optimizazioa	33
4.4.3 Erauzketaren etekinaren estimazioa	39
4.5 Erauzketa metodoaren berrespena	41
4.5.1 Doitasuna	41
4.5.2 Zehaztasuna	43
4.5.3 Zuri metodologikoak	43
5 ONDORIOAK	45
6 BIBLIOGRAFIA	47

## 1 SARRERA

Historian zehar, kannabis landarearen laborantza munduan hedatu da erakusten dituen ezaugarri anitzengatik. Erabilpen ludikoaz gain, landare sendagarri gisa (digestio-languntzaileak, diuretikoak, espektoranteak, lasaigarriak); ehungintzan zuntz iturri moduan (arropa, hariak, sokak); papergintzan (kalamu zuntza); hazien ekoizpenean (olio, erregai, pintura eta laken produkzioan, industria kosmetikoan eta THC eduki gabeko elikagaietan); droga eta pizgarri espiritual bezala; edota olioaren ekoizpenean (aromaterapia, printzipio aktiboak industria farmazeutikoan) erabili da [1].

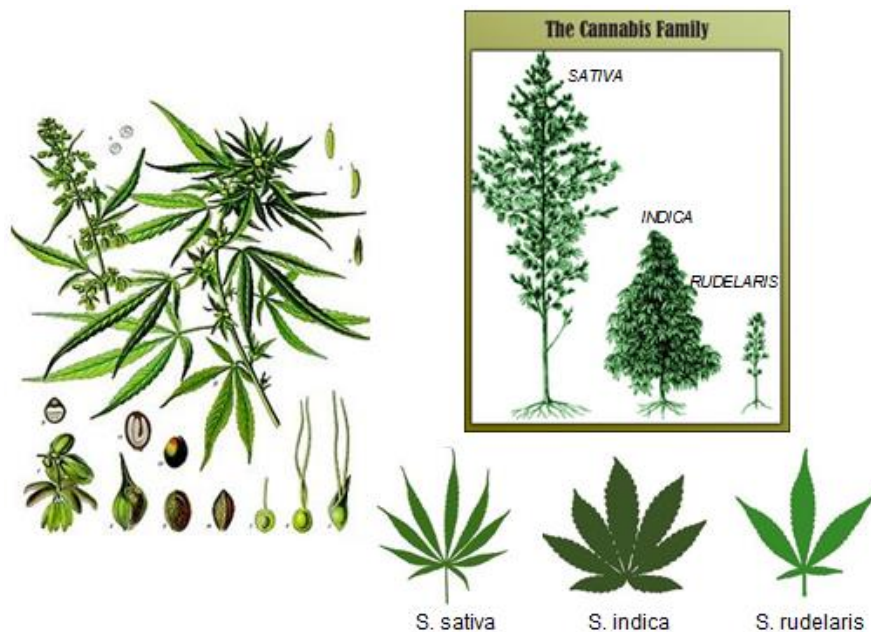
Azkenengo hamarkadetan, sistema endokannabinoidearen eta horrek organismoaren oinarrizko funtzio fisiologiko anitzetan duen parte-hartzearen aurkikuntzak, kannabinoideek gorputzeko organoetan eragiten dituzten efektuen ezagutza zientifikoak eta haien propietate terapeutikoen ikasketak medikuntzaren interesa berritu dute konposatu kannabinoideen eta haien eratorrien ikerkuntzan [2].

Kannabisaren erabilgarritasun terapeutikoari buruz hitz egiten denean, pentsatu behar da azken helburua ez dela landarea, bertan agertzen diren konposatuak baizik, terpenoak eta kannabinoideak zehazki [3]. Azken hauek ikerketa lan honen objektuak dira.

Gogoratu behar da ikertutako zenbait gaixotasunen sendaketan kannabisa ez dela guztiz eraginkorra, momentuz soilik sintomak arindu eta haien larriagotzea geldiarazi ditzake. Oinarrizko ikerketa berrien garapenak, aurre-klinikoak zein klinikoak, kannabinoideek eta haien eratorriek gizakiengan erakusten dituzten aplikazio terapeutikoen benetako aukerak eta haien eraginkortasuna zehaztu beharko ditu datozen urteetan [2].

## 1.1 JATORRIA, SAILKAPENA ETA LEGALTASUNA

Kannabisa urteroko landare belarkara da, *Cannabaceae* familiakoa, propietate psikoaktiboak dauzkana. Asia erdiko jatorrizkoa, gizakiak landatzen hasi zuen lehenengoetariko bat, aurkikuntza arkeologikoen arabera, Txinan Neolito arotik gutxienez ezaguna da, K.a. 4000. urtean [4]. Munduan aurkitzen den formarik ohikoena eta erabilpen altuena daukana *Cannabis sativa* L. (Linnaeus) da. Horren hiru subespezie bereizten dira: *Cannabis sativa sativa*, *Cannabis sativa indica* eta *Cannabis sativa ruderalis*. Hauek desberdintasun morfologikoak (tamaina, hostoak) eta erauzkinen konposizioan aldaerak aurkezten dituzte (ikusi 1. Irudia) [5].



**1. Irudia.** Landarearen atalak eta kannabis motak: *Cannabis sativa*, *indica* eta *ruderalis*.

Haren erabileraren arabera, hainbat izenez ezagutu daiteke. Horien artean, *marihuana* (*grifa*, *maría*, *hierba*), mexikar jatorrizko hitza, loreen, hostoen eta tamaina txikiko zurtoinen prestaketa lehorra eta birrindua da eta xede ludikoa duen landareari egiten dio erreferentzia, efektu negatiboekin eta inpaktu sozialarekin erlazionatzen delarik. *Hashish*, arabiar hitza, erretxinadun exudatua da eta landarearen printzipio aktibo garrantzitsuenen jatorria da, kannabinoideak hain zuzen. *Kannabis*, bere erabilpen sendagarriagatik, loreari zuzentzen zaio,



farmakologikoki aktiboa den landarearen aldea izanik [6]. *Kalamu*, kannabis industrialara da, nekazaritza eta industria ekintzetan (haziak eta zuntzak) aplikaturik.

Kannabis landarearen laborantza herri askotan mugatu edo debekatu da erakusten dituen propietate psikoaktiboengatik. Estatu bakoitzean kannabisaren erabilpenari buruzko legeak etengabe aldatzen joan dira, borroka urteen ostean, kannabisaren legalizazioaren nazioarteko egoera itxaropenerako arrazoi bat da. Zenbait hiritan (Holanda, Kanada eta Ameriketako Estatu Batuetako (AEB) 17 estatu) marihuanaren despenalizazioa eta medikuaren aginduzko erosketaren erregulazioa lortu da, kannabis eratorrien aurkikuntza terapeutiko berrietara egokitzen saiatuz. Uruguy-ek 2013an kannabisa legeztatu zuen munduko lehen hirian bilakatu zen. Colorado-k, Washington-ek eta Alaska-k (2015) marihuana legeztatu dute erabilpen ludikorako<sup>1</sup>.

Espanian, gobernuak, kannabisaren laborantzari, kontsumoari eta salerosketari buruzko indarreko legean (Herritarren Segurtasunaren Babesari buruzko Otsailaren 21eko 1/1992 Lege Organikoa) kannabis kontsumoarekin eta edukitzearekin erlazionaturiko zigorrak igo ditu. Autokontsumo pribatua ez dago penalizaturik, bai ordea salerosketa, ereintza, komertzioa eta horren kontsumo publikoa. Kannabisari buruzko nazio-politikak kannabis landarearen printzipio aktiboen komertzializazioa baimentzen du tratamendu terapeutikorako, beti administrazioaren kontrolpean egonik (erosketa farmazia eta kannabis elkarteetan mediku-errezetarekin)<sup>1</sup>.

Nahiz eta, estatuko gobernuak ezeztapena eman, zenbait autonomiek (Katalunia eta Kanariak) Kannabis elkarten existentziarako eta funtzionamendurako erregulazioaren aldeko aurrerapausoak eman dituzte. Eusko Jaurlaritzak behin betiko pausoa eman du Euskal Herrian kannabis kontsumoaren normalizazioa eta erregulazioa bultzatzeko. Mendekotasun-legea aurkeztu du, marihuanaren kontsumoa ahalbidetzen duten irabazi-asmorik gabeko entitateak (Kannabis elkarteak) erregulatzen dituen, lege hau Legebiltzarrean onartu beharko da.

---

<sup>1</sup> Interneten kontsultatu: Mano dura para la droga blanda, El País, 3 de Enero del 2014.

Nafarroak kannabis elkarrekin erregulatzen dituen legea onetsi zuen, baina estatuko gobernuak lege honen aurka helegitea aurkeztu du, hau geldiaraziz<sup>2</sup>.

## **1.2 CANNABIS SATIVA L.**

*Cannabis sativa* zurtoin luzeetan eta meheetan hazten da, lotuneetatik hedatzen den hosto sortarekin. Aldeko baldintzetan sei metroko altuera neurtzera ailegatu daitezke, klima epeleko eta lehorreko zonaldeetan lantzen dira, hala nola, Asian, Afrikan eta Ameriketako ipar eta hego erdiko zonaldeetan. Haizeagatik polinizaturiko landareak dira eta dioikoak (landare arrak eta emeak bereizirik sortzen dituztenak) dira [7].

Landarearen sexua loreen (farmakologikoki aktiboa den landarearen aldea) azterketan desberdintzen da; arren kasuan, begi-bistaz ikusgai diren mordoetan multzokaturik eta emeei dagokienez, orratz ia ikusezinetan elkarturik. Landare emeek erretxinadun begiak sortzen dituzte. Kannabisari buruz hitz egiten dutenean xede ludikorako, zientifikorako zein sendagarri moduan landare emeaz ari dira [8].

Erretxina landaretik datozen konposatuen nahaste konplexu bat da, non kannabisaren printzipio aktiboak aurkitzen diren, kannabinoideak hain zuzen, eta, loreetatik eta fruituetatik (kalamu-haziak, globulu-formakoak) lortzen da. Erretxina kristalino hau perretxiko formako guruin gardenen bidez jariatzen da, loreetan, hostoetan eta zurtoinetan kokaturik daudenak. Guruin hauek trikoma gisa ezagutzen dira (ikusi 2. Irudia). Puxika erraboilakara hauetatik terpenoak deritzen olioak ere igortzen dira [5-9].

---

<sup>2</sup> Interneten kontsultatu: El Gobierno central rechaza la regulación de los clubes de cannabis que propone Euskadi, El Diario, 3 de Mayo de 2015.



**2. Irudia.** Kannabisaren erretxina-guruinen (trikomak) irudi handitua (200  $\mu\text{m}$ ).

Erretxina, landarearen hostoetatik eta loreetatik abiatuta, metodo tradizionalak aplikatuz erauzi daiteke, hala nola, eskuz eginiko igurzketak eta lehorreko baheketa, anhidrido karbonikoarekin ( $\text{CO}_2$ ) edo izotz lehorrekin eginiko erauzketa, izozteko zorian dagoen ur bidezko erauzketa, lehorreko erauzketa Topzeef aparatuarekin, disolbatzaile polarren (alkoholak) zein ez-polarren (butanoa, hexanoa) bidezko erauzketa eta BHO-arekin (Butane Honey Oil) eginiko erauzketa [10]. Azken bi teknika hauekin kannabis-olioa edo kannabis likidoa eskuratzen da modu zuzenean. Kolore marroiko olio lodia eta lirdingatsu honetan osagai aktibo guztiak kontzentraturik aurkitzen dira. Uretan disolbagaitza da eta ezin da injektatu, ahozko administrazioa motela da eta emaitzak errepikakortasun baxukoak dira [11].

Terpenoen eta kannabinoideen erauzketaren eraginkortasuna frogaturik geratu da oliba olioak eta etanola (EtOH) bezalako disolbatzaileak erabiliz gero. Oliba olioak kannabis-olioak sendagai moduan prestatzeko aukerarik optimoena da. Izan ere, merkea da, ez sukoia, ez toxikoa eta uraren irakite puntura arte soilik berotu behar da (ur-bainuan), ondorioz olioaren gain-beroketa ekiditen da. Beroaren aplikazioak disolbatzailearen lurrunketa handituko du, baina, aldi berean, terpeno gehiago galduko dira. Beti ematen da terpenoen galera jakin bat disolbatzaile hondar kantitate gutxi baten ordean. Horren ondorioz, disolbatzaile ez toxikoen erabilpena gomendatu behar da, hondar-potentzialak osasunerako kaltegarriak ez izateko [11].

### 1.3 LANDAREAREN OSAGAIK: KANNABINOIDEAK ETA TERPENOAK

Kannabis landarea matrize konplexutzat hartu daiteke, 500 konposatu kimiko baino gehiago baitauka. Landare honen arreta-gunea bere edukia da, ezagutzen diren landareen artean bakarra da non kannabinoideak aurkitzen diren. Fitokannabinoideen banaketak eta haien arteko elkarrekintzek landare-erazkinaren konplexutasuna areagotzen dute [6,12-13].

Hazitik datorren landare bakoitzak kannabinoide eta usaimen- eta dastamen-molekula profil bakarra erakusten du, modu berean ez da inongo landaretan agertzen. Aldakortasuna ezberdintasun genetikoaren eta ingurune eta laborantza desberdintasunen ondorioa da eta aukera hauek marihuanaren zapora eta efektu barietate anitzak sortzen dituzte [14].

Kannabisaren konposatu guztietatik 80 baino gehiago **kannabinoideak** dira eta landarearen konposatu aktiboenak dira. Kannabinoide hauek C<sub>21</sub> motatako terpenofenolen familia bat dira. 21 karbonoko egitura karboziklikoa daukate eta normalean hiru eraztun osaturik daude: ziklohexanoa, tetrahidropiranoa eta bentzenoa. Osagai psikoaktibo nagusia Δ9-tetrahidrokannabinol (Δ9-THC edo THC) da. Beste konposatu batzuk hurrengoak dira: kannabinoide azidoak (THCA, CBDA, CBCA, CBGA), Δ8-tetrahidrokannabinol (Δ8-THC), kannabinol (CBN), kannabidiol (CBD), kannabiziklol (CBL), kannabikromeno (CBC), kannabielsoin (CBE), kannabinodiol (CBND), kannabitriol (CBT) eta kannabigerol (CBG). THC-rekin konparaturik konposatu hauek kontzentrazio baxuagotan agertzen dira eta ikerturiko *Cannabis sativa*-ren arabera kantitate desberdinetan aurki daitezke [15].

Kannabinoideak naturan ohikoak dira, baina molekula hauek soilik landarearen guruin-ileetan aurkitzen dira. Landarearen atal ezberdinei dagokienez, kannabinoideen espektroetan ez daude desberdintasun kualitatiborik, bai, ordea, aldaketa kuantitatiboak, kontzentrazio altuenak loreetan eta fruituetan ematen dira, hostoetan haien kontzentrazioa baxuagoa da eta are txikiagoa zurtoinetan eta sustraietan [16], orokorrean, landarearen atal guztiek kannabinoideak dituzte,

haziek, aldiz, ez. Bestalde, azpimarratu beharra dago kanpo hazkuntzako landareek barnekoak baino kannabinoide kontzentrazio baxuagoak erakusten dituztela [8].

Kannabinoideak landarearen metabolismotik sortzen dira azido karboxiliko gisa. Landareetan kannabinoideak modu azidoan eta neutroan aurkitzen dira, psikoaktibitate altuena modu neutroan ematen delarik [6].

Hurrengo hiru talde bereiz daitezke (ikusi 2. Taula) [6]:

- Landarearen metabolismotik sorturiko konposatuak (kannabinoide azidoak).
- Deskarboxilazioaren ondorioz landarean dauden konposatuak (kannabinoide neutroak). Kannabinoide azidoak bere analogo neutroetan bihur daitezke beroaren, argiaren zein biltegitratze luzearen eraginpean [11].
- Degradazioaren ondoriozko konposatuak (oxidazioa, foto-degradazioa, deskonposaketa termikoa).

**2. Taula.** Landareetan aurkitzen diren kannabinoide nagusien erlazioak metabolismoaren, deskonposaketa naturalaren eta degradazioaren arabera.

<b>BIOSINTESIA</b>	↓	<b>THCA</b>	↓	<b>CBDA</b>	↓	<b>CBGA</b>	↓	<b>CBCA</b>	↓
<b>DESKARBOXILAZIOA</b>	↓	<b>THC</b>	↓	<b>CBD</b>	↓	<b>CBG</b>	↓	<b>CBC</b>	↓
<b>DEGRADAZIOA</b>	↓	<b>CBNA</b> ⇒ <b>CBN</b> ← <b>Δ8-THC</b>	↓		↓		↓	<b>CBL</b> ← <b>CBLA</b>	↓

Molekula lipofilikoak dira eta ez dute ez lurrinik ez usainik. Kannabinoideak erakusten duten egituragatik konposatu ez-polarak dira, hala ere, haien egituran aurki daitezkeen funtzio-talde ionikoek izaera arinki polarra ematen diete. Uretan disolbagaitzak dira eta lipidoetan zein disolbatzaile organiko ez-polar zein polarretan (alkoholak) disolbagarriak dira.

Jarraian ikerketan identifikaturiko kannabinoideak deskribatuko dira:

- **$\Delta$ 9-tetrahidrokannabinol (THC)**, Gaoni-k eta Mechoulan-ek 1942. urtean isolatu zuten eta bere egitura zuzena 1964. urtean zehaztu zuten [17-18]. **Azido tetrahidrokannabinolikoaren (THCA)** deskarboxilaziotik lortzen da. THCA THC-ren aitzindari azidoa da, beroaren eta argiaren aurrean THC-ra deskonposatzen delarik. THCA kannabinoide ez-psikoaktiboa da.

THC potentzia psikoaktibo altuena duen kannabinoidea da. Kannabisan presente dauden konposatuek THC-ren jokaera alda dezakete organismoan, modu sinergiko, gehigarri edo antagoniko batean. Nagusiki CB<sub>1</sub> errezeptoreen gainean jarduten du eta terapeutikoki zenbait medikamentuetan agertzen da printzipio aktibo moduan. Ahalmen analgesikoa eta hantura-contrako gaitasuna dauka eta janguraren estimulatzailea da beste posibilitate terapeutikoen artean. Landarearen aireztapenean eta heltzean THC-ren degradazioa erraztasunez ematen da CBN-an bilakatuz. Bere banaketa landare motaren eta trataturiko atalaren arabera da: % 10-12 landare emetan; % 1-2 hostoetan; % 0.1-0.3 zurtoinetan; % 0.03 baino gutxiagoa sustraietan [10].

$\Delta$ 8-THC-k, THC-ren degradaziotik eraturiko azpiproduktua,  $\Delta$ 9-THC-ren profil farmakologiko antzekoa erakusten du, nahiz eta bere efektuak ahulagoak izan (%20 baino baxuagoko aktibitatea erakusten du) eta termikoki egonkorragoa izan. Kannabisaren zenbait barietatetan soilik aurki daiteke eta bere kontzentrazioa THC-rena baino askoz baxuagoa da [19].

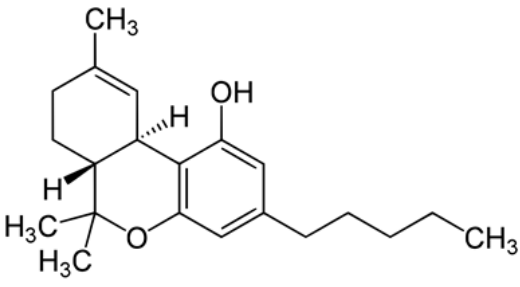
- **Kannabinol (CBN)**, Wood et al.-ek 1896. urtean isolatu zuten eta bere egitura zuzena 1940an zehaztu zuten. Konposatu fenolico bat da [20-21]; landare berrietan bere kontzentrazioa mugatua da eta THC-ren degradaziotik lortzen den produktu gisa ere eskuratu daiteke [22]. Laginak denbora luzez biltegitratuz gero, CBN maila altuak aurki daitezke. Bere propietate psikoaktiboak THC-k erakutsi dituenaren hamarrena dira eta haren aktibitatean eragiten du bere efektuak

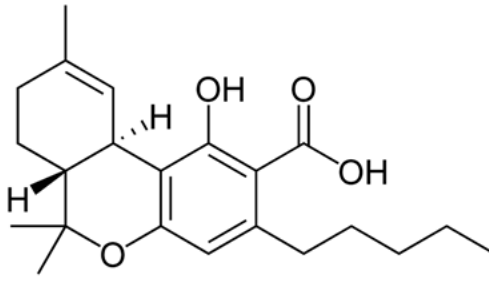
atzeratuz. Ahozko bidetik ez da batere psikoaktiboa. CB<sub>2</sub> errezeptoreekin erakusten duen afinitatea CB<sub>1</sub> errezeptoreekin erakusten duena baino askoz handiagoa da, horren ondorioz, lasaigarri, hipotermiko eta sistema immunologikoaren modulatzaile bezala aplikatzen da.

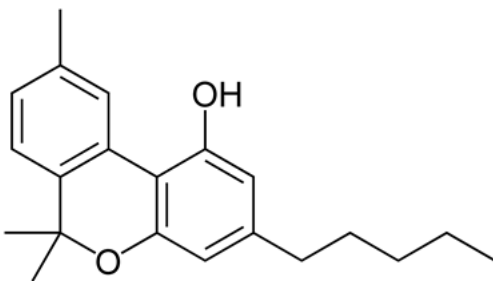
- **Kannabidiol (CBD)**, Mechoulan-ek and Shvo-k 1940. urtean isolatu zuten eta bere egitura zuzena 1963an zehaztu zuten. Konposatu bizikliko bat da, tetrahidropirano eraztuna ezabaturik baitago [23]. Kannabidiol azidoak (CBDA) aktibitate antibiotikoa erakusten du eta horrekin batera zuntz motatako kalamuaren osagai garrantzitsuak dira [22]. CBD-k gutxieneko propietate psikoaktiboak edukita THC-ren efektua murriztu dezake (bere efektu euforikoak modulatzeko edo aritzen ditu), aldi berean, bere efektua denboran zehar luzatu edo bere efektu analgesikoak indar ditzake. Ahalmen lasaigarria eta antioxidatzailea dauzka, antsietatea murrizten du eta hanturazko gaixotasun autoimmunetan efektu onuragarriak erakusten ditu. Antiepileptikoa, antipsikotikoa, neurobabeslea, antikantzerigenoa eta antidiabetikoa da eta erretzaileetan tabako-kontsumoa txikiagotzen laguntzen du. Artritisa zuten arratoiekin buruturiko esperimendu batean behatu da CBD-k gaixotasunaren aurreratzea blokeatzen duela. CBD eta CBDA THC-n eta THCA-n transformatu egiten dira kantitate txikietan [24].

Hurrengo taulan aztertutako kannabinoideen egitura, propietate fisiko-kimikoak eta ezaugarri farmakologikoak jasotzen dira (Ikusi 1. Taula) [10].

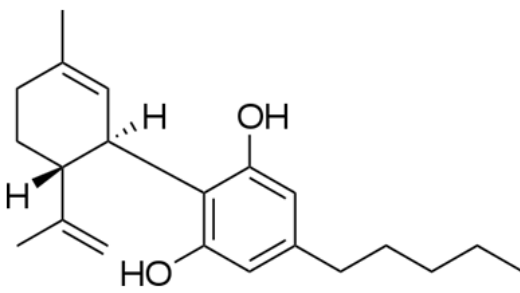
**1. Taula.** Aztertu diren kannabinoideen egitura, propietate fisiko-kimikoak eta ezaugarri farmakologikoak.

<b>THC</b>	
	<p>CAS: 1972-08-3            Formula enpirikoa: <math>C_{21}H_{30}O_2</math>            Pisu molekularra: 314.46 g/mol            Fusio puntua: Olio lirdingatsua            pKa: 10.6            logP: 6.99 (oktanol/ur)</p>
	<p>Disolbagarritasuna:            Ura: Disolbagaitza (2.8 mg/L 23 °C)            Etanola: Disolbakorra            Kloroformoa: Disolbakorra            Hexanoa: Disolbakorra</p>
<p>Ezaugarri farmakologikoak:            - Euforizatzaile                      - Anti-inflamatorio            - Analgesiko                              - Antiemetiko</p>	
<p>Kontzentrazioa: % 0.1-25</p>	

<b>THCA</b>	
	<p>CAS: 23978-85-0            Formula enpirikoa: <math>C_{22}H_{30}O_4</math>            Pisu molekularra: 358 g/mol            Fusio puntua: THCA-ren deskonposaketa/deskarboxilazioa THC-ra 125-150 °C</p>
	<p>Disolbagarritasuna:            Ura: Disolbagaitza            Etanola: Disolbakorra            Kloroformoa: Disolbakorra            Hexanoa: Disolbakorra</p>
<p>Ezaugarri farmakologikoak:            - Antibakteriano            - Antibiotiko</p>	

<b>CBN</b>	
	<p>CAS: 521-35-7            Formula enpirikoa: <math>C_{21}H_{26}O_2</math>            Pisu molekularra: 310.43 g/mol            Fusio puntua: 76-77 °C            logP: 6.23 (oktanol/ur)</p>
	<p>Disolbagarritasuna:            Ura: Disolbagaitza            Etanola: Disolbakorra            Kloroformoa: Disolbakorra            Hexanoa: Disolbakorra</p>
<p>Ezaugarri farmakologikoak:            - Sedatzaile                              - Antikonbultsibo            - Antibiotiko                              - Anti-inflamatorio</p>	
<p>Kontzentrazioa: % 0.0-1.6</p>	



CBD	
	CAS: 13956-29-1 Formula enpirikoa: $C_{21}H_{30}O_2$ Pisu molekularra: 314.46 g/mol Fusio puntua: 66-67 °C logP: 5.79 (oktanol/ur)
	Disolbagarritasuna: Ura: Disolbagaitza Etanola: Disolbakorra Kloroformoa: Disolbakorra Hexanoa: Disolbakorra
Ezaugarri farmakologikoak: - Antsiolitiko - Antipsikotiko - Analgesiko - Anti-inflamatorio - Antiespasmodiko	Kontzentrazioa: % 0.1-2.89

**Terpenoak** substantzia lipofilikoez eraturiko konposatu lurrunkorrek dira, kimikoki isoprenozko unitatez ( $C_5H_8$ ) osaturik daude, hauek kannabisaren erretxinan ekoizten dira eta landare bakoitzari bere usain karakteristikoa ematen diote. Aldi berean, usain horrek landareen babes-mekanismoetan parte hartzen du [25] eta informazio biokimiko handia gordetzen duen azkeneko metabolito gisa har daiteke. Kannabisaren lurrina 140 terpenoide ezberdin baino gehiagoren konbinaziotik dator (terpenoen karbono-egitura oxidatzen denean terpenoideak sortzen dira) [8].

Konposatu hauek kontuan hartu beharreko ezaugarri jakinak dituzte: ezin da kannabinoideen deskarboxilazioa burutu terpeno kopuru esanguratsua galdu barik [11]; beroak degradazioaren edo lurrunketaren ondoriozko terpenoen galera eragin dezake; eta terpenoek hainbat propietate terapeutiko dituzte, terpeno batzuk mediku-produktuetara gehitzen dira inhalagailu eta eztularen supresore moduan. Halaber, zenbait konbinaketek sinergikoki joka dezakete kannabinoideekin, izan ere, terpeno batzuk THC-ren asimilazioa areagotzen dute [26].

Kantitate txikiagoan dauden kannabisaren **beste osagai batzuk**: Hidrokarburoak, nitrogenodun konposatuak, karbohidratoak, flabonoideak, gantz azidoak, fenolak eta alkoholak, aldehidoak, zetonak, azidoak, esterrak eta laktona bakunak, besteak beste [15].

Orokorrean, aurreko molekula guztien kontzentrazioak zenbait aldagaien arabera aldatzen dira, hala nola, landare mota (droga, zuntza) eta polinizazioa; sexua, adina eta landarearen atala; landatze modua (barrukoa eta kanpokoa); uzta denbora eta baldintzak; lehorketa eta biltegirapena [15].

#### **1.4 KANNABISAREN POTENTZIAL TERAPEUTIKOA**

K.a 2737. urtean, Txinako Shen Nung enperadoreak idatzitako herbarioan kannabisa aipatu zuen lehen aldiz sendagai gisa [27]. Garai hartatik aurrera, kannabisa eta bere eratorriak beste alternatiba terapeutiko moduan erabiltzea bermatzen duten zenbait ikerketa zientifiko burutu dira, droga psikoaktibo bezala eragin ditzakeen kalteak alde batera utzita.

Kannabinoideen ezagutzak, hauen egituraren eta aktibitateen arteko ikerketak eta hauek organismoan erakusten duten mekanismoen ezaguerak aurrerapen kuantitatiboa (konposatu sintetiko berriak garatu dira) eta kualitatiboa (gero eta selektiboagoak diren konposatuak) suposatu dute izan ditzaketen erabilpen terapeutikoengatik. Kannabinoide naturalen egitura kimikotik konposatu sintetiko analogoak (agonistak edo antagonistak) garatu dira. Kasu batzuetan, kannabinoideen izaera hidrofobikoa aldatu dute uretan duten disolbagarritasuna hobetzeko eta beste batzuetan, errezeptorearekiko afinitatea handitu dute. Modu horretan, haien egituran pairatu duten hainbat aldaketek landare jatorrizko kannabinoideek eragindako zeharkako efektuak (zorabioak, muskulu mina eta dardarak) saihesten dituzten eratorrien prestaketa ahalbidetu dute [28-29].

THC-ren egituraren ezagutzak kannabinoideen farmakologia eta funtzioak aztertzen zituzten ikerketak bultzatu zituen. Duela 20 urte gutxi gora-behera, ezaguna da THC-k hainbat efektu eragiten dituela, bai nerbio sistema zentrolean bai kokaleku periferiko ezberdinetan, gure organismoak ekoizten duen molekula familia baten antzekoa baita (estekatzaile naturalak), eta ondorioz akzio bera mimetizatzen du.

Molekula hauek “kannabinoide endogeno” edo “endokannabinoide” izenez ezagunak dira, eta lipido-familia bat dira (besteak beste, anandamida [30], 2-arakidonil-glizerol [31] eta 2-arakidonil-glizerolaren eterra [32]). Organismoa modulatzeko duen sistema baten zati dira, zeinean landare kannabinoideek aktibatzen dituzten dianak aurkitzen diren. Dianek zelulen mintz-plasmatikoan lokalizaturik dauden errezeptoreak (mintz-proteinak) dituzte eta  $G_{i/o}$  proteinei akoplaturik daude. Neurotransmisioa erregulatzen dute eta garrantzi handiko zelula-barneko seinaleztapen-bideak modulatzeko dituzte [33].

Molekularki eta funtzionalki karakterizaturik dauden bi errezeptore mota aurki daitezke:  $CB_1$  errezeptorea (nerbio sistema zentralean) [34] eta  $CB_2$  errezeptorea (babes-erantzunaren eta hanturazko minaren modulazioan) [35]. Hala ere, posiblea da organismoan (endo)kannabinoideen akzioa erregulatzen duten beste errezeptore batzuk egotea.

Soilik kannabinoideetarako errezeptore espezifikoak dituzten organismoko ehunek pairatuko dituzte konposatu hauen akzioak. THC burmuinean dauden  $CB_1$  errezeptoretara lotzen da, aldiz, CBN-k gorputzean zehar barreiatutako  $CB_2$ -ekin afinitatea erakusten du. Kannabinoide aproposa errezeptore egokietara zuzenduz, erantzun mota ezberdinak lor daitezke.

Jarraian kannabinoideen zenbait potentzial terapeutiko erakusten dira (ikusi 3. Taula).

### 3. Taula. Kannabinoideen potentzial terapeutikoa.

---

#### POTENZIAL ANTIEMETIKOA

Minbizi aurreratuetan (kimioterapia) eta HIES-an (Hartutako Immuno Eskasiaren Sindromean) okak eta goragaleak murrizteko, THC-ren eta CBD-ren kasu [36].

---

#### ANALGESIA

Min neuropatikoan, min kronikoan eta hantura-kontrako tratamenduan, THC-ren eta CBD-ren kasu. Minak Esklerosis multiplean eta HIES-a birusez kutsutako gaixoen mina. Bizkarrezur-muineko lesioak, gorputz-adarreko anputazioak eta zefaleak [28].

---

#### GLAUKOMA

THC eta CBN barne begietako presioa jaisteko gai dira [37].

---

#### JANGURAREN ESTIMULATZAILEA

THC HIES-a eta minbizia duten gaixoetan eraginkorra da. Oraindik anorexia duten gaixoetan ez da arrakastatsua izan [38].

---

#### DIABETESA

CBD-k giza gorputzaren azukre-maila erregulatzen lagundu dezake [39].

---

#### GARUN ISKEMIARAKO TRATAMENDUAN (Iktusa)

Barne garezurreko odoljarioen osteko garuneko kalteen prebentziorako edo murrizketarako, CBD-ren kasu [28].

---

#### ASMA

Eztularen aurkako efektua eta efektu bronkio zabaltzailea, THC-ren kasu [28].

---

#### GAIXOTASUN ETA ENDEKAPEN NEUROLOGIKOAK

Krisien maiztasuna eta min kronikoa murrizteko (Epilepsia (CBD), eskizofrenia). Arazo motorren tratamenduan: eraginkortasun neuro-babesleak Parkinson gaixotasunean (CBD, THC, CBN); Alzheimer gaixotasunerako tratamenduan (THC); Esklerosis multiplerako tratamenduan (THC, CBD) espastizitatea hobetzeko [2,40-44].

---

#### ANTIBAKETRIANOIA

Infekzio nosokomialak aurre egiteko [45].

---

#### POTENZIAL ANTITUMORALA

Minbizi zelulen garapena inhibitu dezakete, apoptosia barne, THC-ren kasu (arratoietan frogatuta). Angiogenesiaren inhibizioa eta ziklo zelularraren geldipena ere eragin ditzakete [46].

---

#### DROGEKIKO MENPEKOTASUNAREN TRATAMENDUAN (tabakoa, kokaina, heroina) [47].

---

#### ANTSIETATE ETA DEPRESIO TRATAMENDUAN

CBD-ren kasu [48].

---

Kannabinoideek medikamendu moduan erabiltzeko erakusten duten zailtasun nagusia administrazio modua da, xurgatzen den konposatu bakoitzaren kantitatea eta hauen xurgatze-abiadura administrazio bidearen menpe daude [49].

Zientzialariek aerosol (asmaren tratamendurako), mihipeko-bide (*Sativex*<sup>®</sup> THC-z eta CDB-z osaturiko nahaste naturala), ahozko absortzio (*Epidiolex*<sup>®</sup> CBD-z eraturik, umeen epilepsian aplikatuta; *Dronabinol* (Marinol<sup>®</sup>) nagusiki THC-z osaturik; *Nabinola* (Cesamet<sup>®</sup>) THC-ren sintetikoa), supositorio, zain barneko injekzio edo aplikazio topikoen (txaplata termikoak edo glaukomarako kolirioak) bidezko administrazioa ahalbidetu dezaten konposatuen diseinuan dihardute [49-50]. Administrazio metodo hauek xurgapen altuagoa eta azkarragoa ziurtatuko dute gaur egun ahozko bidetik lortzen denarekin konparaturik, gainera, kannabisa erretzeak eragiten dituen efektu kaltegarriak saihestuko dituzte [3].

Kontuan hartu beharra dago, landare-material bera terapeutikoki erabiltzean, efektu eta iraupen ezberdinak behatuko direla, administrazio moduaren, degradazioaren, konposatuen lurrunketaren eta haien arteko elkarrekintzen menpe egonik.

## **1.5 KANNABINOIDEEN ANALISI KIMIKOA**

### **1.5.1. Erauzketa metodoak**

Tradizionalki, likido-likido erauzketa (LLE) edo disolbatzaileen bidezko erauzketa matrize likido batetik konposatu organikoak erauzteko metodo ohikoena da [51]. Ikerketa honetarako kannabis-olioaren konposatuak oliba oliotik erauzteko zein isolatzeko metodo egokiena da.

Haren arrakasta nahastezinak diren bi fase likido ezberdinetan (matrizea eta disolbatzailea) erauziko diren analitoen disolbagarritasun desberdintasunaren mende dago. Nahastea irabiatzean, konposatuak disolbatzailearekiko duen

afinitateagatik, masa transferentzia bat gertatzen da, konposatuak fase hauen artean banatuz. Hau banaketa koefizienteagatik ( $K_d$ ) kontrolaturik dago [51].

Likido-likido erauzketa azkartzeko, ohikoa da kanpoko energia-iturria aplikatzen duten tekniketara jotzea, hala nola, ultrasoinuen bidezko erauzketa [51].

### **1.5.1.1 Ultrasoinuen bidezko erauzketa teknikak**

Ultrasoinuen bidezko erauzketak giza entzumenerako entzunezinak diren frekuentzia altuko soinuak erabiltzen ditu (16 kHz baino altuagoak) intereseko konposatuak olio matrizek askatzeko xedearekin [52].

Erauzketa teknika hau kabitazio fenomenoan oinarritzen da. Ultrasoinu uhinek likidoa zeharkatzen dute, gasezko burbuila txiki ugari eratuz, elkarren artean oszilatzen eta eztanda egiten dituztenak. Kabitaziozko burbuilen leherketa dela eta, presio eta tenperatura oso altuak lortzen dira. Tenperaturaren handipenari esker, sonikazio prozesuak burbuilaren leherketa ematen den zonaldearen solugarritasuna faboratzen du, gainera, presioaren handipenak disolbatzailearen barneraketa hobetzen du matrizean eta lagina erasoko duen inguru errektibo bat eratzen du. Kabitaziozko burbuila bat laginaren gainazalarekin talka egitean, erauzlea abiadura handian hedatzen da horren gainazaletik, erosio mekanikoa eraginez. Modu horretan, partikulak hausten dira, tamaina txikiagoko beste batzuk sortuz, erauzlearekin kontaktuan dagoen azalera handitzea lortzen da. Horren eraginez, analitoa matrizek disolbatzailera azkar igarotzen da [52-54].

Ultrasoinu bainuaren kasu, errepikakortasun eta zehaztasun baxukoa da, ultrasoinu energiaren sakabanaketa uniforme ez baita. Izan ere, ultrasoinu uhinek ur-bainuan eta ontziaren paretetan zehar bidaiatzen dute, hortaz, laginera akoplaturik dagoen intentsitate ultrasonikoa (energia) nahiko baxua da, laginean zuzenean fokatzen ez baita. Eraginkortasun eta kontrol baxuagoak ditu, errektiboan eta denbora

kontsumoa handituz. Eragozpen hauek FUSE-rekin lan eginez konpondu daitezke [55].

FUSE beste erauzketa teknika batzuekin alderatuta, askoz azkarragoa da, errepikakortasun eta eraginkortasun altuko emaitzak ematen ditu disolbatzaile eta lagin kantitate txikiak erabilia, koste baxukoa da, temperatura baxuetan edo inguruneko tenperaturan erauzteko aukera ematen du, analito erdihegazkor eta hegazkorren erauzketarako egokia izanik, eta aldi bereko zenbait laginen sonikazioa ahalbidetzen du. Teknika honek konposatu barietate handia erauzteko aukera ematen du haien polaritatea edozein izanda ere, hainbat disolbatzaile motekin lan egin dezakeelako [54-55].

Aurki daitekeen eragozpen bat erauzketen osteko erauzkinen iragazketa da, galerak gertatzeko eta kutsadura maila handitzeko arriskua agertuz. Gainera, laginaren matrizearen konposizioaren eta horren partikulen tamainaren menpe dago. Ultrasoinu fokatuko erauzketarekin buruturiko entseguek ez dute terpenoen eta kannabinoideen arteko banaketa bermatu [54-55].

Ikerketan zeharkako sonikazioa erabili da, *cup booster*-arekin lan eginez, kannabinoideak bezalako konposatu termolabilen deskonposaketa termikoa ekiditeko. Ultrasoinu uhinak zeharka ailegatzen dira, ur-bainua eta lagina gordeta dagoen ontziaren paretak zeharkatuz.

Analitoen zein disolbatzailearen lurrunketaren ondoriozko galerak ontzi itxiekin eta erauzketa denbora motzetan lan eginez ekidin daitezke, azken horrekin prozesuan zehar ultrasoinu bainuaren tenperatura larregi berotzea saihesten da.

Prozesuan zehar, erauzketa parametro guztien kontrol bat dago. Optimizazioa aurrera eramateko, erauzketan eragina duten aldagaiak kontuan hartu behar dira. Kasu honetan, aparatuarekin erlazionaturikoak aztertu dira, aldagai instrumentalak hain zuzen. Horien artean, anplitudea, zikloak eta sonikazio denbora aurkitzen dira.

Aldagai instrumentalez gain, laginaren masa eta disolbatzailearen konposizioa optimizatzeko aukera dago [54].

### **1.5.2 Analisi metodoak**

Landareen matrize konplexutik konposatu kopuru altuena eta traza mailan aurkitzen diren elementuak erazteko metodo eraginkorren garapenez gain, esfortzu handia egin da nahaste konplexuak ebazteko gai diren metodo kromatografiko sendoak eta sentikorrek finkatzeko helburuarekin. Izan ere, beharrezkoa da landare-materialaren eduki errealaren analisia gauzatzea, tratamendu terapeutikoan erabiliko den kannabis sendagarriaren kalitate-kontrola ezartzeko. Ondorioz, kannabinoide neutroen zein azidoen determinazio kualitatiboa eta kuantitatiboa aurrera eramateko metodoak garatu eta zabaldu dira. Kannabinoideen analisiarekin erlazonaturiko ikerketa gehienetan bi banaketa metodo nagusi erabili dira, gas kromatografia (GC) eta bereizmen handiko likido kromatografia (HPLC) hain zuzen.

#### **1.5.2.1 Gas kromatografia (GC)**

Gas kromatografia (GC) kannabis produktuen analisirako metodo ohikoena da. Masa espektrometrora (GC-MS) akoplatuta, lurrunkorrak eta termikoki egonkorrek diren, eta, 1000 Da baino baxuagoko pisu molekularra duten konposatuen banaketarako metodo egokia eta eraginkorra da. Jariakin biologikoetan aurkitzen diren kannabinoideen determinaziorako ongi kokatuta dago. GC-k banaketa ahalmen izugarria dauka, masa espektrometro batekin elkartzean banaturiko konposatuen identifikaziorako eta kuantifikaziorako sentikortasun eta selektibitate altuak eskaintzen ditu [56].



Hala ere, kannabinoideen polartasun arinki polarra eta funtzio talde ionikoen (-OH taldeak eta azido karboxilikoa) presentzia direla bide, eta metodo honek laginaren beroketan oinarritzen den banaketan lan egiten duenez, konbertsio termikoa ematen da, kannabinoide azidoak deskarboxilatuz eta haien forma neutroan bihurtuz. Kannabinoide azidoen ezegonkortasun termikoagatik, denbora kontsumitzen duen aurretiko analitoen deribatizazioa behartzen du. Erreakzio hau giro-tenperaturan egiten da, iodometanoarekin metilazio erreakzio bat gauzatuz. Nahastea konplexua denean eta horren konposizio totala ezagutu nahi denean GC-ren bidezko analisia mugatua da, konposatu guztien deribatizazio kuantitatiboa aurrera eramatea zaila baita. Horrek likido kromatografia moduko beste teknika batzuekin lan egitea aukera ematen du, kannabinoideen talde azidoen deskarboxilazioa ekiditen baitu, hauen determinazioa posiblea izanik. Hortaz, HPLC-a GC-ren aurrean alternatiba interesgarria da [56].

#### **1.5.2.2 Bereizmen handiko likido kromatografia (HPLC)**

Gaur egun, HPLC-a banaketazko teknika analitiko erabiliena da, bere sentikortasun egokia, bere izaera kuantitatiboa, polartasun eta pisu molekular altuko eta ez-lurrunkorrak edo termolabilak diren espezieen banaketarako egokitasuna eta hainbat lagin motetan duen aplikazio zabala direla eta [8].

*Cannabis sativa* erauzkinen konplexutasuna oso handia da, konposatuen barietate altuagatik eta hauen kontzentrazio maila ezberdinengatik. Kontzentrazioaren eta konposizioaren aldagarritasun altua landare bakoitzaren desberdintasun genetikoaren eta ingurumen ezberdintasunen ondoriozkoa da. HPLC-k mota horretako nahaste hain konplexuak analizatzeko bereizmen eta sentikortasun egokiak ziurtatzen ditu. Landarean dauden kannabinoideen benetako konposizioaren determinazioa zuzenean analiza daitezke, konposatuen aldaketa kimikorik ez baita ematen. Metodo azkarra eta errepikakorra da. Gainera, kannabis laginen perfil kimiko oso bat lortzeko abantaila garrantzitsuan bilakatu da. Kannabinoide neutroa bere

analogo azidotik bereiztea ahalbidetzen du, hala nola, THC bere analogo azidotik (THCA) [56-58].

Teknika honetan, lagina presio handiko zutabe kromatografiko batera injektatzen da. Konposatuen bereizketa banaketazko zutabe baten barruan gauzatzen da, konposatu hauen distribuzio desberdintasuna zutabearen zehar doan fase mugikorraren eta zutabearen barruan paketaturik aurkitzen den fase geldikorraren arteko elkarrekintzen ondorioa da. Erabiltzen den fase geldikorraren eta fase mugikorraren arabera hainbat banaketa modu daude, horrek malgutasun handia ematen du teknika hau aplikatzean. Alderantzizko faseko zutabeak eta programaturiko disolbatzailezko gradiente-sistemak beharrezkoak dira kannabinoideen banaketa egoki bat lortzeko. Kannabinoideek haien egituran dituzten funtzio talde ionikoak direla eta, disoluzio indargetzaileen presentzia beharrezkoa da banaketa kromatografikoaren eraginkortasunean laguntzeko, horretarako konposatuen  $pK_a$  balioak kontuan hartzen dira. Fase geldikorraren eta analitoen arteko polaritate desberdintasuna zenbat eta baxuagoa izan, erretentzio denbora gero eta handiagoa izango da, haien arteko afinitatea dela eta.

Diodozko detektagailuari (DAD) akoplaturiko HPLC-k aukeratutako uhin-luzera tarte osoan aldibereko neurketa egitea ahalbidetzen du, ultramore-ikuskor zonaldean (100–800 nm) zentratutako Xurgapen-espektroan lortutako absorbantzia maximoak sentikortasun altuena erakusten duen uhin-luzera emango du, hau aukeratzen da intereseke kannabinoideen analisisa gauzatzeko.

Disolbatzailearen aukeraketa egiterako orduan, horrek eta analitoek irradiazioa xurgatzen duten zonaldea kontuan hartu behar da. Kannabinoideen determinazio egokia burutzeko disolbatzailearen cut-off puntua aintzat hartzen da, analitoen seinalean interferentziarik eragiten ez duela ziurtatuz. MeOH-k 205 nm-ko cut-off puntua dauka.

## 2 HELBURUAK

*Cannabis sativa* L. landarearen konposatuen garrantziak, helburu terapeutikoaren ikuspuntutik, hauen profilak eta kontzentrazioak determinatzeak duen beharra azpimarratzen darama. Landare bakoitzak osagai mota eta kontzentrazio ezberdinak dauzka, eta ondorioz gaixotasunen aurrean erantzun ezberdinak eragiten dituzte. Kontuan izanik kannabinoideak uretan disolbagaitzak direla, lipidoak zein alkoholak bezalako disolbatzaile organikoak erabili behar dira. Kannabinoideak landareetatik erauzteko eta gaixoek kontsumitzeko aukeretako bat oliotan erauzte da.

Analisiari dagokionez, nahiz eta likido kromatografiak hainbat kannabinoide kuantifikatzeko eta identifikatzeko ahalmena eduki, beharrezkoa da laginaren tratamendua burutzea kannabinoideak oliotik erauzteko. Hortaz, lan honen xedea erauzketa urrats hori garatzea eta optimizatzea da eta bere berrespena frogatzea.

Helburu hori lortzeko beharrezkoa izan da:

- Kannabinoideak oliotik erauzteko ultrasoinu fokatuko erauzketa (FUSE) metodoa garatzea.
- Garatutako metodoa optimizatzea eta berrestea; aldagai instrumentalen optimizazioa, erauzketa jarraituak, egun desberdinetako erauzketak, balioztatze-parametroak.
- Kannabinoide neutroen eta azidoen identifikazioa eta kuantifikazioa gauzatzea diodozko detektagailuari akoplaturiko bereizmen handiko likido kromatografiaren bidez (HPLC-DAD).



### **3 LAN ESPERIMENTALA**

#### **3.1 ERREAKTIBOAK**

Prozedura esperimentalean erabili genuen material eta erreaktibo ororen kalitatea analitikoa izan zen.

HPLC graduko metanol disolbatzailea (MeOH, % 99.9) Panreac etxetik (Bartzelona, Espainia) lortu genuen eta LC/MS graduko azido formikoa (HCOOH) Thermo Fisher Scientific-etik (Erembodegem, Belgika) eskuratu genuen. THCA estandarra Echo Pharmaceutical B.V.-tik (Weesp, Herbehereak) lortu genuen eta THC, CBD eta CBN erreferentziazko estandarrak Cerilliant-etik (Round Rock, Texas, AEB) eskuratu genituen, bakoitza 1000 mg/L-koa MeOH-tan prestatuak.

Ur desionizatua (H<sub>2</sub>O) Milli-Q ur purifikazio sistema batekin (Element 10 Millipore, 0.057  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  baino baxuago, Milli-Q modeloa, Millipore, Billerica, AEB) lortu genuen.

Carbonell markako (Kordoba, Espainia) "virgen-extra" kalitateko oliba olioia den produktu komertziala saltokitik erosi genuen.

Estandarrak -20 °C-tan gorde genituen eta HCOOH-a 4 °C-tan mantendu genuen.

#### **3.2 KANNABIS-OLIOAREN PRESTAKETA**

Kannabis landareak laborantza ekologikoa eta helburu terapeutikoaz aritzen den Renovatio fundazioaren bitartez (Donostia) eskuratu genuen.

*Cannabis Sativa* L. bariedade mota ezberdinak aukeratu genituen metodo analitikoa garatzeko eta berresteko, nagusiki helburu terapeutikorako aplikatzen diren bariedadeak, kannabinoide indize altuengatik, eta kalamu industrialak, CBD-ren edukiagatik, hautatu genituen. Aldaera hauen hostoak eta begiak (lore emeak)

aprobetxatu genituen, zip itxiera zuten plastikozko poltsetan, inguruneko tenperaturan, biltegituz haien tratamendura arte.

Kontuan hartu behar da zenbait analito, terpenoak kasu, oso lurrunkorrak direla eta beste batzuk, aldiz, degradaziorako sentikorrak, hala nola, kannabinoideak, hortaz, oso garrantzitsua zen laginaren tratamendua larregi ez atzeratzea.

Landare nahasteak 50 °C-tan 24 orduz lehortzen utzi genituen. Hauek garbitu eta ehotu genituen nahaste homogeneoa lortuz, jarraian ultrasoinuz EtOH-tan erauzi genuen. Nitrogenozko (N<sub>2</sub>) korrante batekin disolbatzailearen erabateko lurrunketa eman zen, hau traza txikietan egonik. Modu horretan, kannabis-olioa lortu genuen. Behin kannabis-olioko kannabinoideen kontzentrazioak neurtuta (HPLC-DAD-ren bidez) -20 °C-tan gorde genuen bere erabilpenera arte.

Oliba olioak kannabis-olio honekin dopatu genuen. Kontzentrazio ezaguneko kannabinoideekin aberastutako oliba olioak erauzketa metodoa garatzeko eta berresteko aplikatu genuen.

### **3.3 INSTRUMENTAZIOA**

Ultrasoinu fokatuaren bidezko erauzketa (FUZE) HD 3100 Sonopuls Ultrasonic (Bandelin, Alemania) homogeneizagailu bat erabiliz burutu genuen, GM 3100 sorgailuarekin, UW 3100 ultrasoinuzko bihurtzailearekin, SH 70G adarrarekin eta Cup Booster BR 30ekin ekipaturik (ikus 3. Irudia). Erauzketa etapa bakoitzean hiru erreplika burutzeko aukera genuen.



**3. Irudia.** FUSE-ren egitura *cup booster*-arekin.

Analisiak 1100 serieko HPLC Agilent 1260 Infinity sistema bat (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornia, AEB) erabiliz aurrera eramán genituen, ponpa kuartenarioan, disolbatzaile desgasifikatzailean eta injektore automatikoan oinarritzen zena. Espektró osoa 200–400 nm tartean erregistratu genuen, diodozko detektagailuarekin (DAD) lan eginez. Banaketa kromatografikoa Phenomenex C18 (150 x 4.60 mm, 4 µm, Synergi 4µ Hydro-RP 80A) (Torrance, Kalifornia, AEB) zutabe bat erabiliz lortu genuen. Ekipoaren kontrola, datuen eskurapena eta integrazioa Agilent Chemstation programarekin burutu genituen.

### **3.4 ULTRASOINU FOKATUEN BIDEZKO ERAUZKETA**

Lan honetan oliba oliotik kannabinoideak, zehazki THC, THCA, CBD eta CBN, erauzteko ultrasoinu fokatuén bidezko erauzketa teknika (ur-bainuan) aplikatu genuen, HD 3100 Sonopuls Ultrasonic ekipamenduarekin.

Kannabinoideekin aberastutako oliba oliotan zeuden intereseko konposatuén erauzketa burutzeko hurrengo prozedura jarraitu genuen: 2 mL oliba olio

(Eppendorf Research® plus mikropipetak, Alemania) 50-75 mg kannabis-olioez (Mettler AJ150 balantza analitikoa, zehaztasuna  $\pm$  0.0001 g, Espainia) dopatu genuen. Erauzketa bakoitzean, 20  $\mu$ L olio dopatu 300  $\mu$ L MeOH-z erazi genuen (Eppendorf mikrozentrifugaziozko anbarezko hodiak, 500  $\mu$ L). Termikoki ez-egonkorak ziren konposatuen degradazioa zein eraldaketa ekiditeko *cup booster*-arekin (H<sub>2</sub>O inguruneko tenperaturan) lan egin genuen. Jarraian, lortutako erauzkinak iragazi genituen (Acrodisc® iragazteko diskoak, 0.2  $\mu$ m-ko polipropileno hidrofilikozko (GHP) mintza), aparatuekin gerta zitezkeen arazoak edo interferentzien agerpena saihesteko.

Aurreko prozesuko kannabinoideen erauzketaren optimizazioa diseinu esperimentalean eta erantzun gainazalen analisisian oinarrituz burutu genuen. FUSE-n aztertutako aldagai instrumentalak erauzketa denbora, anplitudea eta zikloak izan ziren.

### **3.5 HPLC-DAD-REN BIDEZKO ANALISIA**

Erauzketa etapan jaso genituen kannabinoideekin aberastutako oliba olioko erauzkinak MeOH-tan diluitu genituen 1:20 (mL) erlazioan. Hauek HPLC-DAD-rekin analizatu genituen (Agilent anbarezko bialak, 2 mL, politetrafluoroetileno (PTFE)/silikonazko septekin).

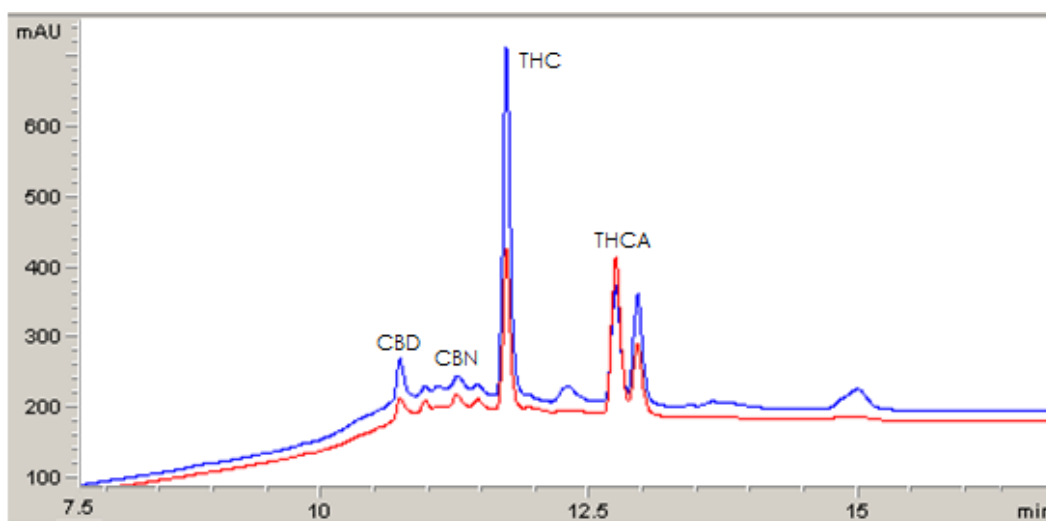
Kannabis-olioko kannabinoideen identifikazio kualitatiboa eta kuantifikazioa gauzatzeko 50–75 mg kannabis-olio 2 mL MeOH-tan disolbatu genituen. MeOH-tan 1:20 (mL) erlazioko diluzioa egin ostean, HPLC-DAD-n analizatu genituen. Horren 5 erreplika egin genituen.

Bi kasuetan jadanik balioztatuta zegoen analisi metodo bat jarraitu genuen, hurrengo ezaugarriak zituenak: banaketa kromatografikoa Phenomenex C18 (150 x 4.60 mm, 4  $\mu$ m) zutabe batekin eta A/B gradiente bitar batekin (A fase-mugikorra:



Milli Q ura % 0.1 azido formikotan eta B fase-mugikorra: MeOH % 0.1 azido formikotan) gauzatu genuen. Hurrengo gradiente-programa jarraitu genuen: hasierako baldintzak % 65 B izan ziren; B-a % 90eraino handitu zen lehengo 5 minututan; hau minutu batean % 100era areagotu zen eta % 100ean 6 minututan zehar mantendu zen; minutu batean B-a % 65era txikitu zen eta % 65ean eutsi zen 8 minututan zehar, sistema berrorekatzeko hurrengo injekzioa egin aurretik. Guztira 21 minutuko gauzatze denbora. Fluxuaren abiadura 1 mL/min-tan finkatu genuen, injekzio bolumena 20 µL-koa izan zelarik. Esperimentu guztiak 20 °C-ko zutabe-tenperatura batean aurrera eraman genituen. Detekzioa diodozko detektagailu batekin egin genuen.

Jarraian kannabis-olioaren kromatograma jaso da, THCA, THC, CBD eta CBN kannabinoideak identifikaturik agertuz (ikusi 4. Irudia).



**4. Irudia.** Kannabis-olioaren kromatograma. Lerro urdina 210 nm-ko uhin-luzerari dagokio, lerro gorria, aldiz, 222 nm-ko uhin luzerari.

Kannabinoideen detekzioko uhin-luzerak eta zehazturiko analisi baldintzetan aurkitutako konposatuen erretentzio denborak hurrengo taulan jaso dira (ikusi 4. Taula).

**4. Taula.** Detekzioko uhin-luzerak eta lorturiko kannabinoideen erretentzio denborak finkatutako baldintzetan.

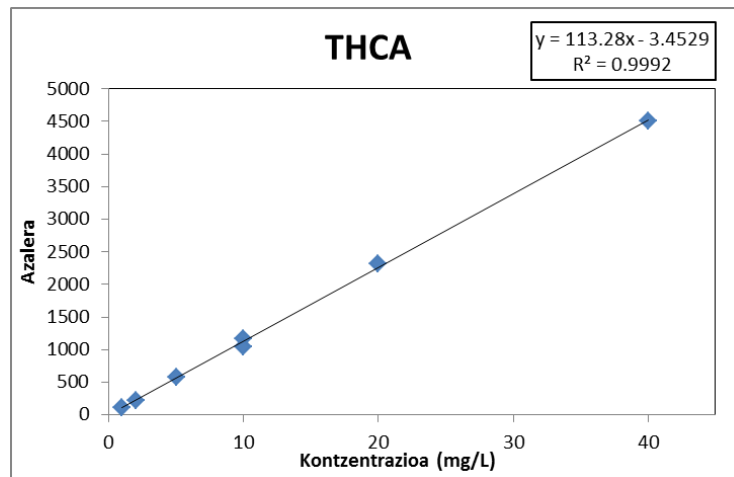
KANNABINOIDEAK	DETEKZIOKO UHIN-LUZERA (nm)	ERRETENTZIO DENBORA (min)
CBD	210	10.44
CBN	222	11.17
THC	210	11.40
THCA	222	12.40

HPLC-DAD-ren bitartezko kannabis-olioaren zein erauzkinen kuantifikazioa kanpo-kalibratzearen bidez burutu genuen. Konposatuaren estandarrekin osagai anitzeko 6 kalibratu disoluzio prestatu genituen MeOH-tan, 0.1–5 mg/L tarteko kontzentrazioetan CBN-ren eta CBD-ren kasu, eta 1–40 mg/L tartekoak THC-rako eta THCA-rako. Erdiko puntuko 2 erreplika (10 mg/L THCA eta THC; 1.25 mg/L CBN eta CBD) egin genituen.

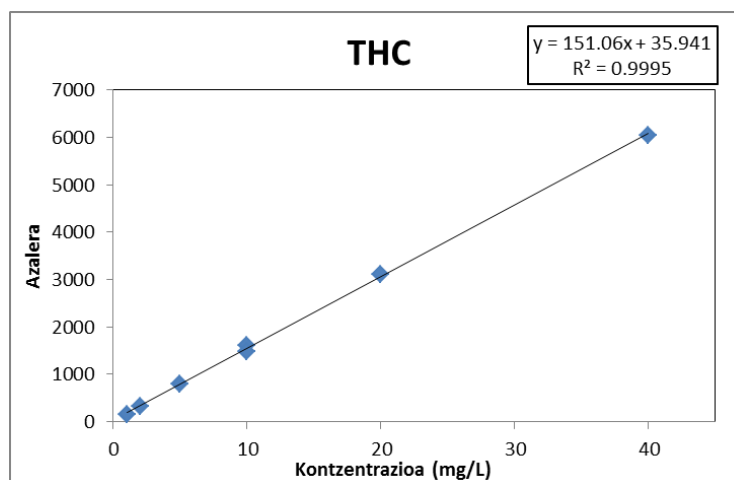
## 4 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

### 4.1 KALIBRAZIO KURBA

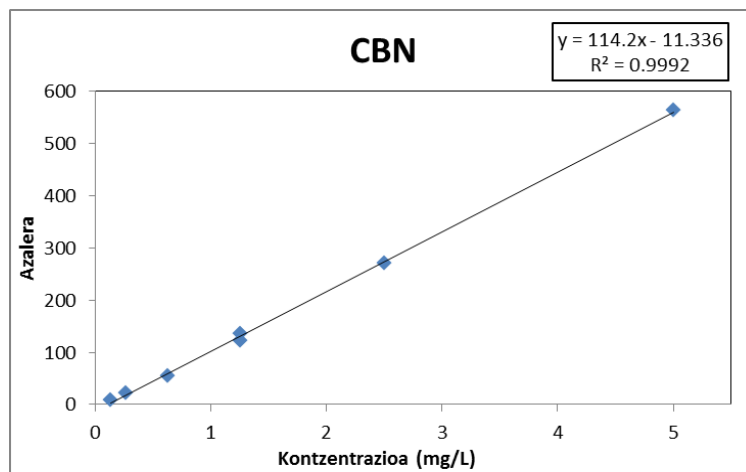
Kannabinoideen kalibratu ereduak, erregresio lineala aplikatuta ( $y=b_0+b_1x$ ), karratu txikien metodoa jarraituz lortu genituen. Kannabinoideen kontzentrazioak gailur kromatografikoen azalaren aurrean irudikatu genituen, jarraian erakusten diren kalibrazio kurbak lortuz (ikusi 5. Irudia – 8. Irudia).



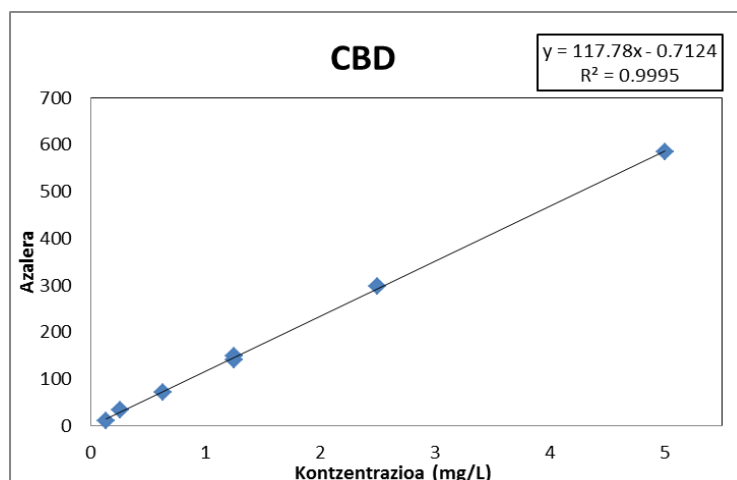
**5. Irudia.** THCA-ren errepresentazio lineala, gailur kromatografikoen azalera kontzentrazioaren aurrean (1-40 mg/L) irudikaturik.



**6. Irudia.** THC-ren errepresentazio lineala, gailur kromatografikoen azalera kontzentrazioaren aurrean (1-40 mg/L) irudikaturik.



**7. Irudia.** THCA-ren errepresentazio lineala, gailur kromatografikoen azalera kontzentrazioaren aurrean (0.13-5 mg/L) irudikaturik.



**8. Irudia.** CBD-ren errepresentazio lineala, gailur kromatografikoen azalera kontzentrazioaren aurrean (0.13-5 mg/L) irudikaturik.

**Linealtasuna** metodo analitikoak analitoaren kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionalak diren erantzunak lortzeko erakusten duen ahalmena da. Tarte jakin batean zehazturik dago, zeinean metodoak zehaztasun, doitasun eta linealtasun egokia aurkeztuko duen. Linealtasuna determinatzeko aplikatzen den onarpen-irizpidea korrelazio koefizientea da. Horrek kalibratu kurbaren iragarpen (X) eta erantzun (Y) aldagaien arteko erlazio maila adierazten du. Korrelazio koefizientearen karratuak ( $R^2$ ) X aldagaitik iragarritako Y aldagaiaren aldaketa-

proportzioa ematen du. Proportzioa zenbat eta 1etik hurbilago aurkitu, X aldagaiak Y aldagaiaren aldaketa handiagoa azalduko du, hau da, eredia egokia da Y aldagaiaren portaera zehazteko, iragarpenaren errorea txikituz. Lan honetan, lau kasuek 0.999 balioko determinazio koefizientea zeuzkaten, proposatutako tartean linealtasun egokia erakutsiz.

Erdiko puntuen errepikakortasuna onargarria da, konposatuaren arabera % 4-8 inguruan aurkituz. Hortaz, kalibratu puntuek doitasun egokia erakusten dute.

#### 4.2 DETEKZIO ETA KUANTIFIKAZIO MUGAK

Zehaztasunez eta doitasunez kuantitatiboki determinatu eta ziurtasunez detektatu daitekeen lagin bateko analitoaren kontzentrazioerik txikiena zehazteko, kuantifikazio muga (KM) eta detekzio muga (DM) aztertu genituen.

Horretarako, analisi-urratsa jasan zuten analitorik gabeko laginak prestatu genituen, zuri instrumentalen 3 erreplika eginez.

Seinale ezagatik, kuantifikazio eta detekzio mugak kalibratu ereduko parametroetatik lortu genituen, hurrengo ekuazioak kontuan hartuz (ikusi 1. Ekuazioak eta 5. Taula).

$$Y_{DM} = b_0 + 3 \cdot S_{b_0}$$

$$Y_{KM} = b_0 + 10 \cdot S_{b_0}$$

**1. Ekuazioak.** Detekzio eta kuantifikazio mugen kalkulurako ekuazioak, non  $b_0$  ordenatua eta  $S_{b_0}$  ordenatuaren desbiderapena diren.

**5. Taula.** Kannabinoideen detekzio eta kuantifikazio mugak.

	<b>THCA</b>	<b>THC</b>	<b>CBN</b>	<b>CBD</b>
<b>DM (mg/L)</b>	0.7	0.5	0.1	0.06
<b>KM (mg/L)</b>	2.2	1.8	0.3	0.22

### 4.3 KANNABIS-OLIOAREN KUANTIFIKAZIOA

Kannabis-oliotan zeuden THCA, THC, CBN eta CBD kannabinoideak identifikatzeko eta kuantifikatzeko horren 5 erreplika analizatu genituen, hurrengo emaitzak lortuz (ikusi 6. Taula).

**6. Taula.** Kannabis-olioaren analisisian lorturiko emaitzak.

<b>KANNABINOIDEAK</b>	<b>KONTZENTRAZIOA (%) ± DE*</b>
THCA	20.9 ± 1.1
THC	13.5 ± 0.7
CBD	2.2 ± 0.1
CBN	0.38 ± 0.03

\*DE: Desbideratze Estandarra.

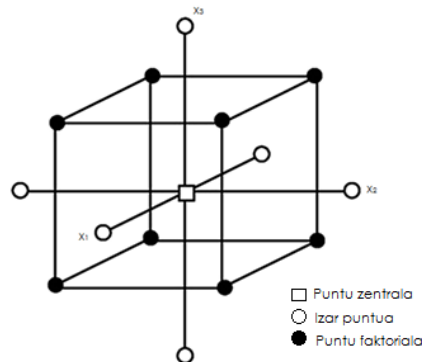
### 4.4 ERAUZKETA METODOAREN OPTIMIZAZIOA

#### 4.4.1 Esperimentuen diseinua (DoE)

Kannabinoideen erauzketaren optimizazioa FUSE-ren bidez esperimentuen diseinua aplikatuz aurrera eraman genuen. Esperimentuen diseinua teknika estatistiko bat da, hainbat esperimentuen organizazioan eta diseinuan oinarritzen dena. Proba kopuru minimoa eginez informazio erabilgarria erauztea eta prozesu baten konfigurazioa optimizatzen laguntzen duten ondorioak lortzea ahalbidetuko ditu [59].

#### 4.4.1.1 Diseinu Konposatu Zentrala (CCD)

Diseinu konposatu zentrala prozesu baten optimizazioa lortzeko kimiometrian aplikatzen den datuen analisirako metodo eraginkorra da. Sistemaren erantzunean gehien eragiten duten aldagaiak identifikatu eta haien efektuak eta interakzioak ikertzeaz gain, aldagai optimoen erantzun-gainazalak eraikitzen ditu. Metodo hau bigarren ordenako polinomio batean datuak doitzeko garatuta dago. CCD-k faktore-diseinu bat dauka, puntu zentralekin, ardatz-puntu talde bat erantsita daukana, kurbaduraren estimazioa ahalbidetzen duena. Diseinuaren puntu zentralaren eta faktore-puntu baten arteko distantzia faktore bakoitzerako  $\pm 1$ ekoa izatekotan, erdigunearen distantzia izar puntu batera  $\pm \alpha$  da,  $|\alpha| > 1$  izanik.  $\alpha$ -ren balioa diseinurako desiratzen diren propietate jakinen eta tartean sarturik dauden faktoreen menpe dago (Ikusi 9. Irudia) [59].



9. Irudia. Diseinu konposatu zentralaren eskema.

#### 4.4.2 Ultrasoinu fokatuaren bidezko erauzketaren optimizazioa

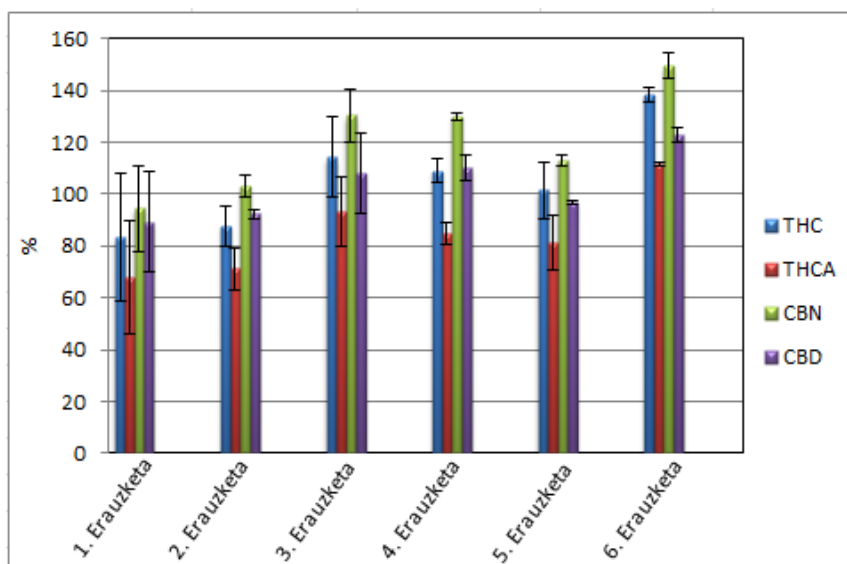
Diseinu konposatu zentralerako mugak finkatzeko asmoz, hots, izar puntuen hautaketarako, hainbat erauzketa proba gauzatu genituen FUSE-ri dagozkion aldagai instrumentalak muturreko eta erdiko balioetan ezarriz. Erauzketa denbora 1 eta 2 minututan eta anplitudea % 10, 55 eta 100tan azertu genituen eta zikloak 5–5  $s^{-1}$ -etan finkatu genituen (ikusi 7. Taula).

Hemendik aurrera zikloak modu horretan adieraziko dira, 5-5 edo 8-2, eta zera adieraziko du: segundo bakoitzeko, erradiazio ultrasonikoko 0.5 segundoko zikloak aplikatuko dira eta ziklo bakoitzaren artean 0.5 segundoko etenaldiak egingo dira, edo 0.8 eta 0.2 hurrenez hurren.

**7. Taula.** Izar puntuak aukeratzeko burututako erauzketa probak, zikloak 5–5 s<sup>-1</sup>-etan finko mantenduz.

ERAUZKETAK	ALDAGAIK	
	ANPLITUDEA (%)	DENBORA (min)
1. Erauzketa	10	1
2. Erauzketa	55	1
3. Erauzketa	100	1
4. Erauzketa	10	2
5. Erauzketa	55	2
6. Erauzketa	100	2

Izar puntuen hautaketarako gauzatu genituen erauzketa probetan lorturiko emaitzak hurrengo grafikoan ageri dira (ikusi 10. Irudia).



**10. Irudia.** Eginiko erauzketa probak erauzitako ehunekoaren aurrean, desbiderapen estandarrekin batera, aztertutako kannabinoide bakoitzerako.



Emaitzak aztertuta, kannabinoideen erauzketarako aldagai instrumentalen muturreko balioak bortitzegi zirela aintzat harturik, erauzketaren optimizazioa burutzeko diseinu konposatu zentralerako aldagaien izar puntuak finkatu genituen; erauzketa denbora 20–120 segundo, anplitudea % 10–90 eta zikloak 1–9 s<sup>-1</sup>.

Diseinu konposatu zentrala The Unscrambler® programa estatistikoarekin (v.9.7, Norvegia) burutu genuen. Aldagaiak eta haien aldakortasun-tarteak kontuan hartuta, programak zoriz 20 esperimentu ( $2n + 2^n + 6$ , non n aldagai kopurua den) proposatu zituen. Esperimentu horien artean, 6 puntu zentralak ziren.

Hurrengo taulan esperimentuetatik lorturiko datuak jaso dira (ikusi 8. Taula).

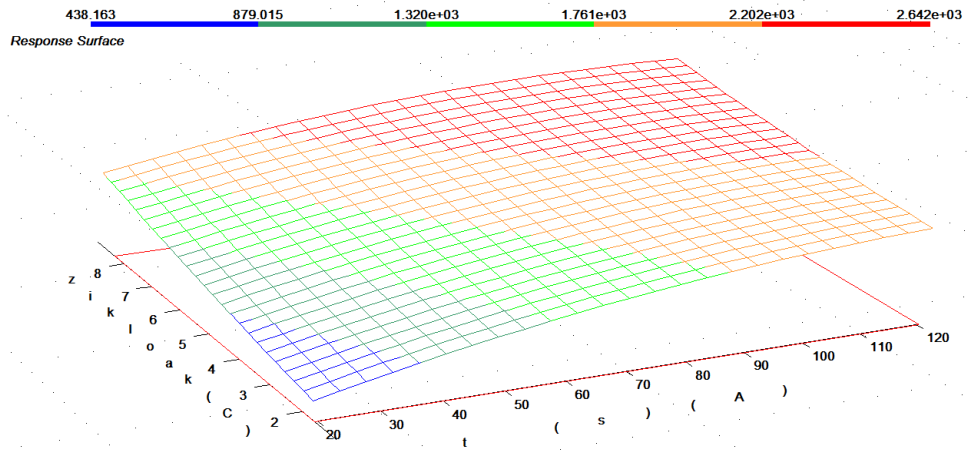
**8. Taula.** Gauzaturiko CCD-a eta lortutako emaitzak.

	ALDAGIAK			GAILUR KROMATOGRAFIKOEN AZALERA			
	Denbora (s)	Anplitudea (%)	Zikloak (s <sup>-1</sup> )	THCA	THC	CBN	CBD
ESPERIMENTUAK	19.5	50.0	5.0	429.8	975.9	27.7	123.9
	19.5	50.0	5.0	491.8	1.1E+03	25.2	123.9
	19.5	50.0	5.0	569.4	1.2E+03	24.3	123.3
	120.5	50.0	5.0	980.3	2.0E+03	40.0	215.7
	120.5	50.0	5.0	1.0E+03	2.0E+03	44.6	224.9
	120.5	50.0	5.0	1.2E+03	2.4E+03	45.1	233.7
	70.0	9.6	5.0	625.0	1.4E+03	29.9	165.3
	70.0	9.6	5.0	640.3	1.4E+03	28.7	154.2
	70.0	9.6	5.0	438.9	965.1	28.8	114.2
	70.0	90.4	5.0	999.4	2.1E+03	48.0	239.9
	70.0	90.4	5.0	927.0	1.9E+03	42.8	206.5
	70.0	90.4	5.0	1.1E+03	2.3E+03	50.8	251.6
	70.0	50.0	1.6	726.9	1.5E+03	31.6	183.3
	70.0	50.0	1.6	868.5	1.8E+03	38.9	204.1
	70.0	50.0	1.6	580.8	1.6E+03	29.5	177.5
	70.0	50.0	8.4	1.3E+03	2.8E+03	52.6	315.3
	70.0	50.0	8.4	956.3	2.2E+03	49.4	252.4
	70.0	50.0	8.4	918.4	1.9E+03	38.4	214.7
	40.0	26.0	3.0	615.8	1.3E+03	28.3	137.3
	40.0	26.0	3.0	441.8	950.3	25.4	123.7
	40.0	26.0	3.0	427.6	930.7	22.1	115.8
	100.0	26.0	3.0	939.5	1.9E+03	43.9	225.0
	100.0	26.0	3.0	1.0E+03	2.1E+03	49.3	247.6
	100.0	26.0	3.0	774.1	1.4E+03	32.5	175.4
40.0	74.0	3.0	470.9	997.0	28.2	141.9	

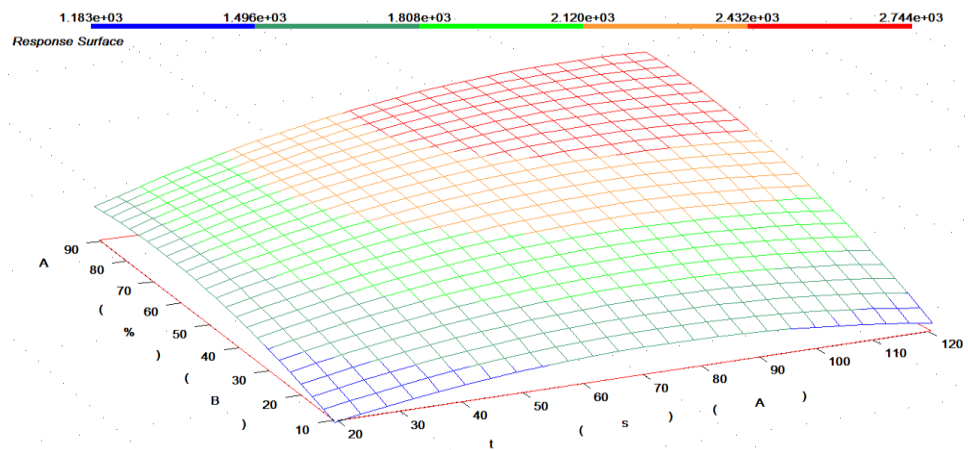
	40.0	74.0	3.0	557.1	1.2E+03	25.2	154.8
	40.0	74.0	3.0	670.6	1.4E+03	29.4	168.1
	100.0	74.0	3.0	832.9	1.7E+03	45.4	199.7
	100.0	74.0	3.0	911.0	1.9E+03	38.7	202.8
	100.0	74.0	3.0	776.0	1,6E+03	34.8	192.5
	40.0	26.0	7.0	1.3E+03	1.7E+03	55.1	272.2
	40.0	26.0	7.0	990.0	1.8E+03	40.8	217.9
	40.0	26.0	7.0	906.1	1.9E+03	48.6	254.9
	100.0	26.0	7.0	762.2	1.6E+03	42.8	199.0
	100.0	26.0	7.0	834.7	1.7E+03	43.1	200.3
	100.0	26.0	7.0	939.3	1.9E+03	46.4	222.9
	40.0	74.0	7.0	863.6	1.8E+03	44.9	206.1
	40.0	74.0	7.0	863.6	1.8E+03	45.9	219.9
	40.0	74.0	7.0	722.1	1.5E+03	37.8	191.2
	100.0	74.0	7.0	1.4E+03	2.7E+03	64.1	312.4
	100.0	74.0	7.0	1.3E+03	2.5E+03	56.5	278.3
	100.0	74.0	7.0	1.2E+03	2.3E+03	57.0	260.9
PUNTO ZENTRALAK	70.0	50.0	5.0	915.2	1.8E+03	47.0	212.5
	70.0	50.0	5.0	1.0E+03	2.0E+03	51.0	210.9
	70.0	50.0	5.0	850.4	2.1E+03	40.3	209.9
	70.0	50.0	5.0	828.9	1.7E+03	39.0	199.5
	70.0	50.0	5.0	816.0	1.7E+03	40.0	197.0
	70.0	50.0	5.0	937.5	2.0E+03	42.0	215.2

Lortutako datuen tratamendurako erregresio lineal anitza (MLR) aplikatu genuen, mendeko aldagaiaren (Y) eta aldagai askeen ( $X_i$ ) arteko erlazioa analizatzeaz aparte, iragarpeneko helburua duen ekuazio lineal bat garatu egiten du, esperimentalki lorturiko datuen eta erregresioak aurratsen dituenen artean distribuzio lineal bat emanez. Korrelazio koefizientea (R) aztertzeaz gain, aldagai bat eragina zuen ala ez jakiteko  $\beta$ -koefizienteen p-balioa kontuan hartu genuen. % 95eko konfiantza mailan, 0,05etik baino baxuagoko p-balioak zeuzkaten aldagaiak adierazgarritzat hartu genituen. Hortaz, hiru aldagaiek (erauzketa denbora, zikloak eta anplitudea) erauzitako kannabinoideen kopuruan eragina zuten, magnitude altuagoan denbora eta zikloak izanik. Aldagaiek bakarkako eragina izateaz gain, euren buruarekin eta beste aldagaiekin konbinaturik ere ahalmena erakusten zuten. Analizatutako konposatuen erantzun gainazalak bi aldagaien funtzioan aztertuz erantzun ezberdinak lortu ziren. THC-ren kasu, maximoa anplitudearen eta zikloen balio

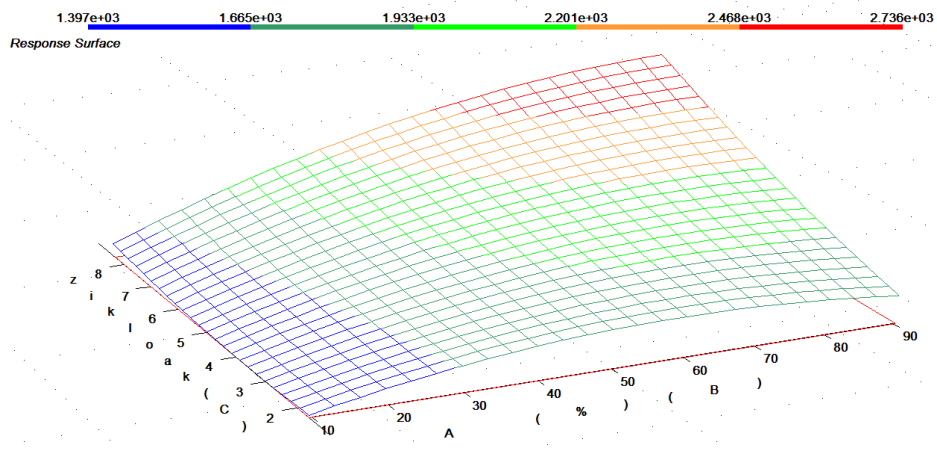
altuetan eta denboraren erdi eta goi balioetan aurkitu zen (ikusi 11. Irudia – 13. Irudia). Jokaera hau gainerako konposatuetan ere behatu zen.



**11. Irudia.** THC-ren erantzun gainazala, denbora zikloen aurrean irudikaturik. Anplitudea %70ean finkatu da.



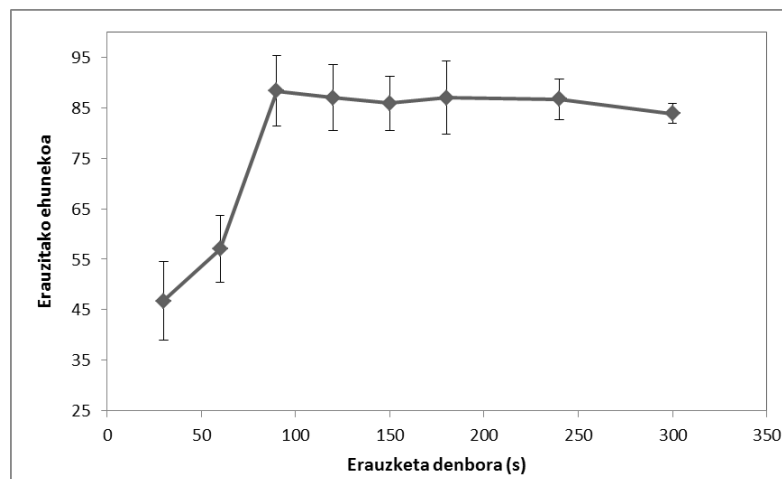
**12. Irudia.** THC-ren erantzun gainazala, denbora anplitudearen aurrean irudikaturik. Zikloak  $8 \cdot 2 \text{ s}^{-1}$ -ean finkatu da.



**13. Irudia.** THC-ren erantzun gainazala, anplitudea zikloen aurrean irudikaturik. Denbora 90 s-tan finkatu da.

Esperimentuetatik lortutako datuak tratatu ostean, erdietsitako aldagai instrumentalen balio optimoak espero zirenak baino altuagoak izanda eta erauzketa denbora tarte nahiko zabala aukeratu ez genuenez, zikloak  $8-2\text{ s}^{-1}$ -etan eta anplitudea % 70ean finkatu genituen eta erauzketa denbora zinetikaren azterketa burutuz optimizatzea erabaki genuen, aldagaien balio optimoen baliotasuna ziurtatzeko. Horretarako, iraupen ezberdineko hainbat erauzketa gauzatu genituen, horien artean aukeratutakoak 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240 eta 300 segundokoak izan ziren.

Jarraian erakusten den grafikoan THC kannabinoideari dagokion erauzketen zinetikaren azterketa ikus daiteke (ikusi 14. Irudia), gainerako konposatuekin lortzen diren grafikoak antzekoak izanik.



**14. Irudia.** THC kannabinoidearen erauzketen zinetikaren azterketa, desbiderapen estandarrekin batera.

Zinetika aztertuz, ikusi genuen 90 segundoko erauzketatik aurrera erauzitako kannabinoidearen ehunekoek meseta itxura hartzen zutela, jadanik konposatuaren kantitate gehiago erauzi ezinez. Jokaera hau gainerako kannabinoideetan ere behatu zen. Ondorioz, 90 eta 120 segundoko erauzketak konparagarriak izanik, erauzketak 90 segundokoak izatea erabaki genuen, lan-denbora murrizteko asmoz.

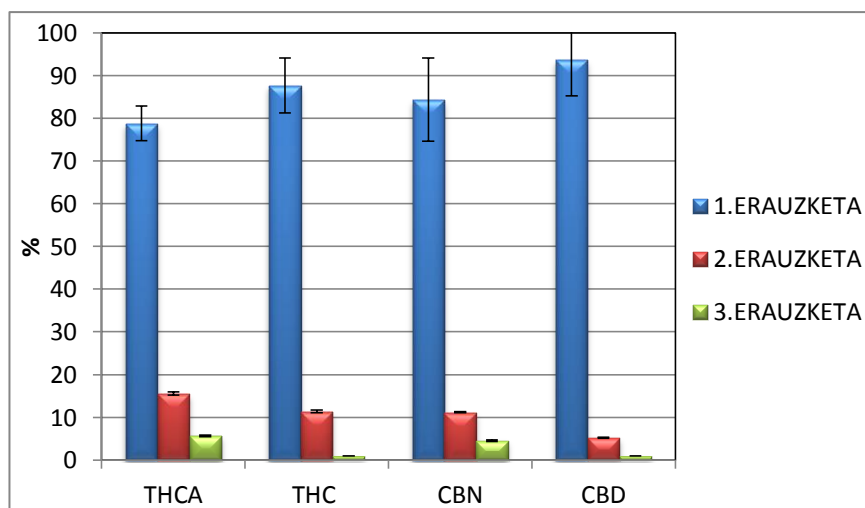
Hortaz, ultrasoinu fokatuaren bidezko kannabinoideen erauzketarako baldintza optimoak hurrengo moduan finkatu genituen; zikloak  $8-2 \text{ s}^{-1}$ -etan, anplitudea % 70ean eta erauzketa denbora 90 s-tan.

**4.4.3 Erauzketaren etekinaren estimazioa**

Oliba olioko kannabinoideen erauzketarako FUSE-ren aldagai optimoak ezarri ostean, garatutako erauzketa metodoaren eraginkortasuna frogatzeko, kannabinoideekin aberastutako oliba olioaren erauzketa jarraituak burutu genituen, kannabinoide kopuru posible altuena erauzi zela ziurtatu arte. Horretarako, hiru erauzketa jarraitu egin genituen hurrengo prozedura garatuz: 2 mL oliba olio 50-75 mg kannabis-olioez dopatu genuen. Lehen erauzketa etapan, 20  $\mu\text{L}$  olio dopatu 300

$\mu\text{L}$  MeOH-z erauzi genuen. Lortutako erauzkina jaso eta iragazi genuen. Frakzioa analisisira arte gorde genuen. Dopatutako olio hondarra 300  $\mu\text{L}$  MeOH-z berrerauzi genuen, aurreko prozesua bitan errepikatuz. Erauzketa jarraituak 3 errepliketan aplikatu genituen.

Hurrengo grafikoan hiru erauzketetan erauzitako kannabinoideen ehunekoa ageri da (ikusi 15. Irudia).



**15. Irudia.** FUSE-ren bidez gauzatutako kannabinoideen erauzketa jarraituak, desbiderapen estandarrekin batera.

Onartu dezakegu teknika honen erauzketa-ahalmen maximoa hiru erauzketa jarraituekin lortzen dela. Erauzketa-eraginkortasun altua erakusten du, lehenengo erauzketan erauzi daitekeen kannabinoide eduki osotik % 79 THCA, % 88 THC, % 84 CBN eta % 94 CBD eskuratzen baita. Gainera, erauzkinen arteko erauzketaren errepikakortasuna onargarria da, konposatuaren arabera % 5-10 inguruan aurkituz. Kasu honetan, erauzketa etapa batekin kuantitatiboa denez muga % 80ean jarrita, ez da beharrezkoa erauzketa jarraiturik burutzea, gure helburua ez delako erauzkinen kannabinoideen kontzentrazio totala ezagutzea.

## 4.5 ERAUZKETA METODOAREN BERRESPENA

Ikerketan dagoen metodo bat onartua izateko, hainbat berrespen proba gauzatu eta gainditu behar ditu aplikazio jakinerako bere zehaztasuna, doitasuna eta fidagarritasuna frogatuko dituztenak.

### 4.5.1 Doitasuna

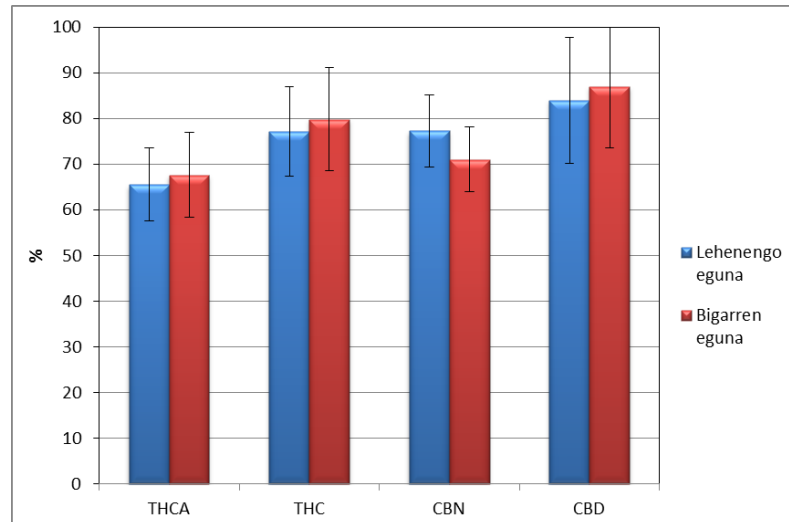
Doitasunak lagin baten neurketa errepikatueta lorturiko balioen barreiapena erakusten du, desbideratze estandar erlatiboaren (DEE) kalkulutik determinatzen dena. Doitasuna errepikakortasun eta erreproduzibilitate terminoetan finkatu daiteke.

**Errepikakortasuna.** Egun berean egindako hainbat erauzketen arteko hurbiltasuna zehazteko kannabinoideekin aberastutako oliba olioko 6 erreplika gauzatu genituen (ikusi 16. Irudian agertzen den lehenengo eguneko erauzketen datuak).

Tanda bateko eta tanden arteko datuak aztertu genituen, konparagarrik diren ala ez jakiteko bariantza-analisi bat (ANOVA) egin dugu. Analizatutako kannabinoide guztietarako lortutako erauzketen ehunekoak bat datoz % 95eko konfiantza mailan ( $F_{\text{kritikoa}} > F_{\text{kalkulatua}}$ ). Hori dela eta, tanda bateko erreplikak gauzatzearekin nahikoa izango litzateke geroko ikerketetan lana errazteko.

Aztertutako bi kasuetan DEE-a % 20aren azpitik aurkitzen da, konposatu organikoentzat onargarria izanik.

**Erreproduzibilitatea.** Elkarren segidako bi egunetan egindako hainbat erauzketen arteko hurbiltasuna zehazteko kannabinoideekin aberastutako oliba olioko 6 erreplika egin genituen. Hurrengo grafikoan bi eguneko erauzketetan erauzitako kannabinoideen ehunekoa behatu daiteke (ikusi 16. Irudia).



**16. Irudia.** FUSE-ren bidez bi egunetan gauzaturiko kannabinoideen erauzketen ehunekoak, desbiderapen estandarrekin batera.

Aztertutako bi kasuetan DEE-a % 20aren azpitik aurkitzen da, onargarritzat hartuz. Bi eguneko datuak konparagarriak diren ala ez jakiteko bariantza-analisi bat (ANOVA) egin dugu. Analizatutako kannabinoide guztietarako bi egunetan lortutako erauzketen ehunekoak bat datoz % 95eko konfiantza mailan ( $F_{\text{kritikoa}} > F_{\text{kalkulatua}}$ ). Ez da inolako degradaziorik hautematen.

Olioaren biskositateagatik, izan zitekeen pipeteatzerako orduan hartutako bolumena ez izatea zehazki ezarritakoa, ondorioz, errorearen handitzea suposatuko lukeen efektua edukiko genuke.

Aplikazio zuzeneko lanean eginiko geroko probeetan ikusi genuen olio dopatua pisatzeak eta horrekiko eginiko zuzenketak DEE-ak jaisten zituela % 6raino, aurreko arazoa minimizatuz.



#### **4.5.2. Zehaztasuna**

Zehaztasunak neurketa baten emaitzaren eta onartutako erreferentziako edo benetako balioaren arteko erlazio maila adierazten du. Azken hau, erreferentziako material egiaztatua, erreferentziako metodoa edota lagin dopatua izan daiteke. Kasu honetan, erreferentzien ezagatik ezinezko izan dugu metodo analitikoaren zehaztasuna determinatzea.

Aukera bat, kannabis-olioko kannabinoideen kontzentrazioa kontuan hartuta, kannabinoideekin aberastutako oliba oliotan eginiko erauzketen berreskurapenak determinatzea izango litzateke. Horren 6 erreplika gauzatu genituen (ikus 16. Irudian agertzen den lehenengo eguneko erauzketen datuak).

Lortutako emaitzat egokitzat har ditzakegu. Erauzketetan % 66 THCA, % 77 THC, % 77 CBN eta % 84 CBD eskuratzen dira.

#### **4.5.3 Zuri metodologikoak**

Metodoaren urratsean ager zitezkeen interferentzien eta kutsaduren presentzia detektatzeko zuri prozeduralen 2 erreplika prestatu genituen.

Ezinezkoa izan da zuri metodologikoak determinatzea, kromatogrametan seinalerik ez baitute eman, ondoriozta daitekeena kannabinoideen determinazioan matrizeak ez duela interferentziarik suposatzen edo HPLC-k sentikortasun nahikorik ez duela kontzentrazio baxuetan hauek detektatzeko.



## 5 ONDORIOAK

Lan honetan, ikusi da FUSE erauzketa teknika HPLC-DAD analisi teknikarekin batera, egokia dela oliba oliotan dauden *Cannabis sativa*-ko kannabinoide kopuru nagusia erauzteko eta haien identifikazioa zein kuantifikazioa gauzatzeko. Kasu honetan, lau kannabinoide aztertu ditugu, THC, THCA, CBD eta CBN hain zuzen.

Helburua oliba oliotik kannabinoideak erauzteko FUSE-ren bidezko erauzketa metodoa garatzea eta optimizatzea izan da. Aztertutako hiru aldagai instrumentalek, zehazki anplitudea, erauzketa denbora eta zikloak, kannabinoideen erauzketetan eragina dutela egiaztatu dugu. Erauzketarako baldintza optimoak hurrengo moduan ezarri ditugu: anplitudea % 70, erauzketa-denbora 90 s eta zikloak  $8-2\text{ s}^{-1}$ .

Erreferentziako materialen zein metodoen, eratorri deuteratuen eta estandarren gabeziak, baita hauek eskuratzeko eskatzen dituzten kontrolek ere, kannabinoideen inguruko ikerketak gauzatzeko oztopo handia suposatzen dute.

Oliba olioko kannabinoideen erauzketarako beste erauzketa metodo aplikatzen dituzten lanen ezagatik, ezin dugu gure metodoan lorturiko emaitzak beste batzuekin konparatu.

Aurrekoa bada ere, erauzketa metodoa optimizatuta, balioztatuta eta prest dago geroko ikerketetan aplikatu ahal izateko.

Oliba olioak kannabis-olioak sendagai moduan prestatzeko aukerarik optimoena da, osasuna kaltetzen ez duen disolbatzaile bat baita. Horren ondorioz, ikerketa hau lagungarria izan daiteke aplikazio terapeutikoak edukiko dituzten olioaren eta kannabinoideen inguruko proiektu berriak garatzeko, terpenoen eragina ahaztu barik, kannabinoideekin erlazio sinergikoa erakusten baitute.



## 6 BIBLIOGRAFIA

- [1] **Ramos Atance, JA., Fernandez Ruiz, JJ.** (2000) Uso de los cannabinoides a través de la historia. *Adicciones*. 12 (2): 19.
- [2] **Lastres-Becker, I., Cabranes, A., De Lago, E., Fernández-Ruiz, J.** (2013) Cannabis y Actividad Motora. *Guía Básica sobre los Cannabinoides*. Sociedad Española de investigación sobre cannabinoides. 83.
- [3] **Callado, LF.** (2012) Cuestiones de interés en torno a los usos terapéuticos del cannabis.  
[http://ararteko.net/RecursosWeb/Documentos/1/0\\_2561\\_1.pdf](http://ararteko.net/RecursosWeb/Documentos/1/0_2561_1.pdf) (18/06/2015 ikusgai)
- [4] **Robinson, R.** (1999) Historia Mundial del Cáñamo. *El gran libro del cannabis*. Inner Traditions/ Bear & Company. 106.
- [5] **Renobales, G., Sarrionandia, E.** (2013) Kalamua: Biologia eta dibertsitatea. *Kannabisaren hamar aurpegiak*. Ekaia. 31.
- [6] **Hazekamp, A.** (2007) A general introduction to cannabis as medicine. *Cannabis; extracting the medicine*. Thesis – Leiden University, Netherlands, Amsterdam.
- [7] **Ramos Atance, JA., Fernandez Ruiz, JJ.** (2000) Cannabinoides: propiedades químicas y aspectos metabólicos. *Adicciones*. 12 (2): 41.
- [8] **Aizpurua, O., Omar, J., Etxebarria, N.** (2013) Kannabis landarearen kimika. *Kannabisaren hamar aurpegiak*. Ekaia. 51.
- [9] **Rodríguez - Vicente, MC., Sanz, P., Reppeto, M.** (1995) Estado Actual de la Toxicología del Cannabis. *En Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos. 477.
- [10] Métodos recomendados para la identificación y el análisis del cannabis y los productos del cannabis. *United Nations Publications* (UNODC), 2010.  
[http://www.unodc.org/documents/scientific/Cannabis\\_manual-Sp.pdf](http://www.unodc.org/documents/scientific/Cannabis_manual-Sp.pdf) (10/06/2015 ikusgai)
- [11] **Romano, LL., Hazekamp, A.** (2013) Aceite de cannabis: evaluación química de un nuevo medicamento derivado del cannabis. *Cannabinoids*. 1 (1): 1.
- [12] **Ross, S., ElSohly, MA.** (1995) Constituents of Cannabis sativa L. XXVIII. A review of natural constituents 1980-1994. *Magazine journal of pharmaceutical sciences*. 4 (2): 1.
- [13] **ElSohly, MA.** (2005) Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*. 78: 539.
- [14] La diversidad genética de la marihuana (2012).  
<http://www.alchimiaweb.com/blog/terpenos-marihuana-efectos/> (14/06/2015 ikusgai)
- [15] **Brenneisen, R.** (2007) Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. M. Elsohly, *Forensic Science and Medicine: Marijuana and The Cannabinoids*. Humana Press Incorporation.
- [16] **Hemphill, JK., Turner, JC., Mahlberg, PG.** (1980) Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of cannabis sativa L.. *Journal of Natural Products*. 43: 112.

- [17] **Gaoni, Y., Mechoulam, R.** (1964) Isolation structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American Chemical Society.* 86: 1646.
- [18] **Mechoulam, R., Gaoni, Y.** (1967) The absolute configuration of  $\delta$ 1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron letters.* 8 (12): 1109.
- [19] **Mechoulam, R., Devane, WA., Glaser, R.** (1992) Cannabinoid geometry and biological activity. In *Marihuana/Cannabinoids Neurobiology and Neurophysiology.* A. Bartke, L. Murphy. Boca Raton: CRC Press.
- [20] **Wood, T., Spivey, W., Easterfield, T.** (1896) XL. Charas. The resin of Indian hemp. *Journal of the American Chemical Society.* 69: 539.
- [21] **Adams, R., Baker, B., Wearn, R.** (1940) Structure of cannabinol. III. Synthesis of cannabinol, 1-hidroxy-3-n-amyl-6, 6, 9-trimethyl-6-dibenzopyran. *Journal of the American Chemical Society.* 62: 2204.
- [22] **Turner, CE., Elsohly, MA., Boeren, EG.** (1980) Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of Natural Products.* 43 (2): 169.
- [23] **Mechoulam, R., Shov, Y.** (1963) Hashish-I. The structure of Cannabidiol. *Tetrahedron.* 19: 2073.
- [24] **Malfait, AM., Gallily, R., Sumariwalla, PF., Malik, M.** (2000) The nonpsychoactive cannabis constituent Cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 97: 9561.
- [25] **Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., García-Risco, MR., Reglero, G.** (2012) Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A.* 1250: 34.
- [26] **Russo, EB., McParland, JM.** (2003). Cannabis is more than simply  $\Delta$ 9-THC. *Psychopharmacology.* 165: 431.
- [27] **Li, HL.** (1974) An Archaeological and Historical Account of Cannabis China. *Economic Botany.* 28: 337.
- [28] **González, S., Sagredo, O., Gómez, M., Ramos, JA.** (2013) Química y metabolismo de los cannabinoides. Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides. Sociedad Española de investigación sobre cannabinoides. 15. <http://www.seic.es/wp-content/uploads/2013/10/actualización-potencial-terapéutico-cannabinoides> (18/06/2015 ikusgai)
- [29] **Hall, W., Solowij, N.** (1998) Adverse effects of cannabis. *The Lancet.* 352 (9140): 1611.
- [30] **Devane, WA., Hanus, L. et al.** (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258: 1946.
- [31] **Mechoulam, R., Ben-Shabat, S. et al.** (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochemical Pharmacology.* 50: 83.
- [32] **Hanus, L., Abu-Lafi, S. et al.** (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 98: 3662.

- [33] **Díaz-Laviada, I.** (2013) Mecanismos de transducción de señales de los cannabinoides. Actualización sobre el potencial terapéutico de los cannabinoides. Sociedad Española de investigación sobre cannabinoides. 44.  
<http://www.seic.es/wp-content/uploads/2013/10/actualización-potencial-terapéutico-cannbinoides> (18/06/2015 ikusgai)
- [34] **Devane, WA., Melvin, LS. et al.** (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946.
- [35] **Munro, S., Thomas, KL., Abu-Shaar, M.** (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365: 61.
- [36] **Duran, M., Laporte, JR. et al.** (2004) Novedades sobre las potencialidades terapéuticas del Cannabis y el sistema cannabinoide. *Medicina Clínica* (Barcelona). 122 (10): 390.
- [37] **Pinar-Sueiro, S., Rodríguez-Puertas, R., Vecino, E.** (2011) Cannabinoid applications in glaucoma. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 86 (1): 16.
- [38] **Martin, BR.** (2007) The endocannabinoid system and the therapeutic potential of cannabinoids. M. A. ElSohly. *Marijuana and the cannabinoids*. Totowa, New Jersey: Humana Press Incorporation.
- [39] **Ceballos, ML.** (2015) Los cannabinoides de la marihuana previenen el Alzheimer y ayudan a reducir sus síntomas.  
<http://elotroladodemaria.blogspot.com.es/2015/01/los-cannabinoides-de-la-marihuana.html> (17/06/2015 ikusgai)
- [40] **Fernández-Ruiz, JJ., Lastres- Becker, I., Cabranes, A., González, S., Ramos, JA.** (2002) Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 66: 263.
- [41] **Aso, E., Ferrer, I.** (2014) Cannabinoids for treatment of Alzheimer's disease: moving toward the clinic. *Frontiers in Pharmacology*. 5:37.
- [42] **Gowran, A., Noonan, J., Campbell, V.** (2011) The multiplicity of action of cannabinoids: Implications for treating neurodegeneration. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 17: 637.
- [43] **Pertwee R., G.** (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacology & Therapeutics*. 95 (2): 165.
- [44] **Müller-Vahl, K., Theloe, K. et al.** (2003) Treatment of Tourette syndrome with delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) no influence on neuropsychological performance. *Neuropsychopharmacology*. 28: 384.
- [45] **Nissen, L., Zatta, A. et al.** (2010) Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa L.*). *Fitoterapia*. 81 (5): 413.
- [46] **Sánchez, C.** (2015) Comprobado, las células del cáncer se suicidan con el THC de la Marihuana. <http://www.holosnatura.com/comprobado-las-celulas-del-cancer-se-suicidan-con-el-thc-de-la-marihuana/> (5/06/2015 ikusgai)
- [47] **Lindgren, JE., Hollister, L. et al.** (1981) Clinical effects and plasma levels of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) in heavy and light users of cannabis. *Psychopharmacology*. 74: 208.

- [48] **Izzo, A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., Mechoulam, R.** (2009) Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30 (10): 515.
- [49] **Fernández Ruiz, J., Lorenzo Fernández, P., Leza Cerro, JC.** (2009) Cannabis (I). Farmacología. *Drogodependencias*. 3ª edición. Panamericana. 312.
- [50] **Lorenzo, P., Leza, JC.** (2000) Utilidad terapéutica del cannabis y derivados. *Addiciones*. 12 (2): 149.
- [51] **Ridgway, K., Lalljie, SPD., Smith, RM.** (2007) Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. Review. *Journal of Chromatography A*. 1153: 36.
- [52] **Suslick, KS.** (1998) The Chemical and Physical Effects of Ultrasound. Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology. J. Wiley & Sons. 26 (4): 517.
- [53] **Capelo, JL., Galesio, MM., Felisberto, GM., Vaz, C., Costa Pessoa, J.** (2005) Micro-focused ultrasonic solid-liquid extraction (muFUSLE) combined with HPLC and fluorescence detection for PAHs determination in sediments: optimization and linking with the analytical minimalism concept. *Centro química estrutural*, Lisboa.
- [54] **García, S., Perez, RM., Sevillano, ML., García, FJ.** (2010) Método optimizado de extracción por ultrasonidos para la determinación de PAHs. *Informes técnicos Ciemat*.
- [55] **Azuola, R., Vargas, P.** (2007) Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*. 20: 4.
- [56] **De Backer, B., Debrus, B., Lebrun, P., Theunis, L., Dubois, N., Decock, L., Verstraete, A., Hubert, P., Charlier, C.** (2009) Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography*. 877 (32): 4115.
- [57] **Omar, J., Olivares, M., Alzaga, M., Etxebarria, N.** (2013) Optimisation and characterisation of marijuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *Journal of Separation Science*. 36: 1397.
- [58] **Aizpurua-Olaizola, O., Omar, J., Navarro, P., Olivares, M., Etxebarria, N., Usobiaga, A.** (2014) Identification and quantification of cannabinoids in cannabis sativa L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406 (29): 7549.
- [59] **Wsól, V., Fell, AF.** (2002) Central composite design as a powerful optimization technique for enantioresolution of the rac-11-dihydrooracin – the principal metabolite of the potential cytostatic drug oracin. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 54 (1-3): 377.



