Medicinska konoplja - regulatorni status i kontrola kakvoće

Mihalic, Ivana

Postgraduate specialist thesis / Završni specijalistički

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:721393

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ivana Mihalic

MEDICINSKA KONOPLJA – REGULATORNI STATUS I KONTROLA KAKVOĆE

Specijalistički rad

Zagreb, 2024.

Poslijediplomski specijalistički studij: Fitofarmacija s dijetoterapijom

Mentor rada: prof. dr. sc. Sanda Vladimir Knežević

Specijalistički rad obranjen je dana 27. rujna u 13:30 sati na Zavodu za farmakognoziju, Marulićev trg 20/II,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Renata Jurišić Grubešić , Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet
2. prof. dr. sc. Sanda Vladimir-Knežević, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. dr. sc. Josipa Cvek, znanstvena suradnica, HALMED

Rad ima 67 listova.

PREDGOVOR

Rad je izrađen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija Fitofarmacija s dijetoterapijom pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sande Vladimir-Knežević.

Zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević na prilici te na savjetima i pomoći prilikom odabira teme i pisanja završnog specijalističkog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci tijekom trajanja studija. Hvala Juditi, Oliveru, Viktoru i Adrianu na motivaciji da završim studij i Vladimiru bez kojeg bi ovo bilo gotovo nemoguće.

SAŽETAK

Cilj istraživanja

Cilj ovog specijalističkog rada je dati sveobuhvatan pregled recentnih podataka o regulativi i metodama ispitivanja kakvoće biljne droge i ljekovitih pripravaka na bazi medicinske konoplje te tako doprinijeti boljem razumijevanju važećih zakonskih propisa za stavljanje na tržište i osiguranje njihove kakvoće.

Materijal i metode

Istraživanje u okviru ovog rada je teorijskog karaktera i uključuje pregled dostupne znanstvene i stručne literature o predloženoj temi te odgovarajući zakonodavni akti i smjernice dostupne na stranicama nadležnih regulatornih tijela. Dostupni podaci su kritički razmotreni i sistematično prikazani u obliku preglednog rada.

Rezultati

Intenzivno se razvijaju različite analitičke metode pogodne za analizu sastava različitih pripravaka na bazi medicinske konoplje. Osnove za ujednačenu kontrolu kakvoće biljnih tvari, pripravaka i lijekova na bazi medicinske konoplje na razini EU postavljene su u farmakopejskoj monografiji Cannabis flos u Europskoj Farmakopeji koja je uspostavljena u srpnju 2024. godine. S regulatornog aspekta, svi lijekovi na bazi medicinske konoplje i kanabinoida moraju imati dozvolu za primjenu u liječenju, odnosno proći registracijski postupak pri nadležnim Europskim ili nacionalnim regulatornim tijelima. Svi trenutačno dostupni lijekovi na bazi kanabinoida u Europi odobreni su putem ocjene cjelovite dokumentacije u standardnom registracijskom postupku.

Zaključci

Zbog povijesnih okolnosti, dinamika odobravanja medicinske upotrebe konoplje značajno je različita u pojedinim državama Europe. U Republici Hrvatskoj dozvoljena je medicinska upotreba i uzgoj medicinske konoplje, uz poštivanje važećeg regulatornog okvira. Uvrštavanje monografije biljne droge konopljin cvijet (Cannabis flos) u Europsku farmakopeju predstavlja značajan iskorak u osiguranju kakvoće lijekova i pripravaka od medicinske konoplje.

SUMMARY

Objectives

The aim of this work was to provide a comprehensive overview of recent data on regulations and analytical methods for the quality control of herbal drug and medicinal products based on medical cannabis and to contribute to a better understanding of the current legal framework for placing them on the market and ensuring their quality.

Material and methods

The research conducted for this work is theoretical in nature and includes a review of the available scientific and professional literature on the proposed topic, as well as the relevant legislation and guidance on the websites of the relevant regulatory authorities. The data was critically reviewed and systematically presented in the form of a review paper.

Results

There has been intensive development of analytical methods specifically designed to analyze the composition of various medical cannabis-based preparations. The basis for uniform quality control of plant substances, preparations and medicinal products based on medical cannabis at EU level was created with the pharmacopoeial monograph Cannabis flos, published in July 2024. From a regulatory perspective, all cannabis-based medicinal products must be approved by the competent European or national regulatory authorities. All cannabinoid-based medicinal products currently available in Europe have been authorized through full documentation under the standard registration procedure.

Conclusion

Due to historical circumstances, the dynamics of authorizing the medicinal use of cannabis vary widely across different European countries. In the Republic of Croatia, the medicinal use and cultivation of medical cannabis are permitted in accordance with the applicable regulatory framework. The inclusion of the monograph Cannabis flos in the European Pharmacopoeia represents a significant step forward in ensuring the quality of medicinal products and preparations based on medical cannabis.

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1
1.1. Povijesni kontekst medicinske konoplje 1
1.2. Botanički podaci o vrsti Cannabis sativa L. 2
1.3. Fitokanabinoidi 5
1.4. Endokanabinoidni sustav 7
1.5. Terpeni 9
1.6. Primjena medicinske konoplje u liječenju 11
1.7. Izazovi u provedbi kontrole kakvoće medicinske konoplje 12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 13
3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI 14
3.1. Kontrola kakvoće medicinske konoplje 15
3.1.1. Analitičke tehnike u kontroli kakvoće medicinske konoplje 26
3.1.2. Glavna obilježja monografije droge Cannabis flos u Europskoj farmakopeji 23
3.2. Regulatorni status medicinske konoplje 38
3.2.1. Regulatorni status medicinske konoplje u europskim državama tijekom proteklog desetljeća 38
3.2.2. Odobrenje za stavljanje u promet lijekova na bazi medicinske konoplje 42
3.2.3. Regulatorni status medicinske konoplje i dostupnost pripravaka u Republici Hrvatskoj . 46
4. RASPRAVA 49
5. ZAKLJUČCI 52
6. LITERATURA 53
7. ŽIVOTOPIS 60

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Povijesni kontekst medicinske konoplje

Međunarodna konvencija o opijumu iz 1925. prvi je dokument koji regulira promet "indijske konoplje" kao biljke koja sadrži psihoaktivne tvari na način da zabranjuje promet između država koje su regulirale posjedovanje i predvidjele zakonske kazne za neovlašteno posjedovanje indijske konoplje (1). Najvažniji dokument koji je regulirao promet opojnih tvari na svjetskoj razini je Jedinstvena konvencija Ujedinjenih naroda o opojnim drogama iz 1961. godine. Prema toj konvenciji konoplja se svrstava u skupinu opojnih droga s rizikom zlouporabe. Stoga je ograničena proizvodnja, trgovina, korištenje i posjedovanje konoplje koja je definirana kao droga bez medicinske koristi. Zbog predmetne Konvencije status medicinske konoplje ni danas nije jedinstven niti usklađen među državama (2).

Interes za istraživanje konoplje u medicinske svrhe povećao se sedamdesetih godina prošlog stoljeća, a konačni uzlet doživljava devedesetih otkrićem endokanabinoidnog sustava odnosno kanabinoidnih receptora (3). Sa znanstvenog i regulatornog aspekta, puno se raspravlja o primjeni konoplje u liječenju. U posljednje vrijeme raste broj država koje zakonski odobravaju medicinsku primjenu konoplje. Osim toga, sve brojnija znanstvena istraživanja i stalan tehnološki napredak omogućuju nove spoznaje o njezinim farmakološkim svojstvima i terapijskom potencijalu (4).

1.2. Botanički podaci o vrsti *Cannabis sativa* L.

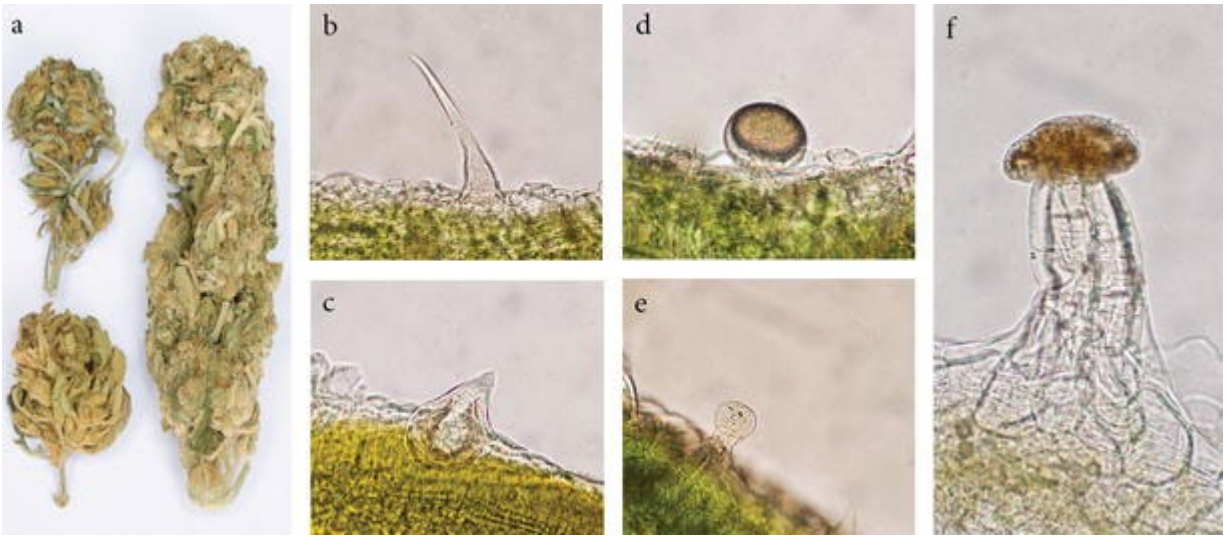
Vrsta *Cannabis sativa* L. (konoplja) pripada porodici Cannabaceae. To je jednogodišnja, zeljasta i pretežno dvodomna biljka. Visina (0,2-6 m) i stupanj razgranjenosti ovise o genetskim i okolišnim čimbenicima. Ženske biljke su niže i robusnije u odnosu na muške. Stabljika je izbrazdana, često šuplja i razgranjena. Listovi su dlanasti sa suličastim liskama pilasta ruba i ušiljena vrha. Broj liski je neparan, a može biti 3-13. Muški cvat je rahla metlica ili sastavljeni štitac kojeg grade žućkastozeleni cvjetovi s pet visećih prašnika. Ženski cvjetovi s tučkom su zeleni, ponekad ljubičasti do crveni, bez stapke. Oblikuju kratke i guste prividne klasove (slika 1). Muške biljke ranije cvjetaju od ženskih. Kad dosegnu zrelost njihovi lapovi se otvaraju kako bi se omogućilo rasprostiranje peludi vjetrom. Ubrzo nakon oprašivanja uvenu i ugibaju te na taj način osiguravaju dovoljno prostora, vode i hranjivih tvari ženskim biljkama da mogu stvoriti zdrave plodove, tvrde roške s jednom sjemenkom (5).

Slika 1. C*annabis sativa* L.

A - cvatuća muška grana; B - ženska grana s plodovima; C -muški cvjetovi; D - plod okružen perigonalnim lisićima; E, F - plod; G, H – tučak [Prilagođeno prema Small E. i sur. 2015 (6)]

Površina nadzemnih dijelova biljke prekrivena je dlakama, pokrovnim ili žljezdanim dlakama koji sadrže smolu. Pokrovne dlake su brojne, jednostanične, krute i zakrivljene, s vitkim šiljastim vrhom. Cistolitične dlake koji se nalaze na gornjoj površini listova imaju zadebljalu bazu zbog sadržaja cistolita kalcijevog karbonata, dok se dlake bez cistolita najčešće nalaze na donjoj strani listova, na braktejama i brakteolama, uglavnom na ženskim cvatovima, ali mogu biti prisutni i na donjoj strani listova te na stabljikama mladih biljaka. Glavičaste dlake nalaze se na svim dijelovima vegetativnih i cvjetnih izdanaka. Nasuprot tome, glavičaste dlake s višestaničnim stubastim drškom ograničeni su na područja cvata. Žljezdane dlake su sekretorne strukture koje proizvode i skladište smolu puna kanabinoida. Osim kanabinoida,

proizvode terpene koji su odgovorni za tipičnu biljnu aromu. Ekstremne varijacije u sadržaju kanabinoida u različitim tkivima posljedica su izrazito različite distribucije žljezdanih dlaka na površini biljke. Neoplođene cvatne glavice s pricvjetnim listovima ženske biljke primarni su izvor kanabinoida (7).

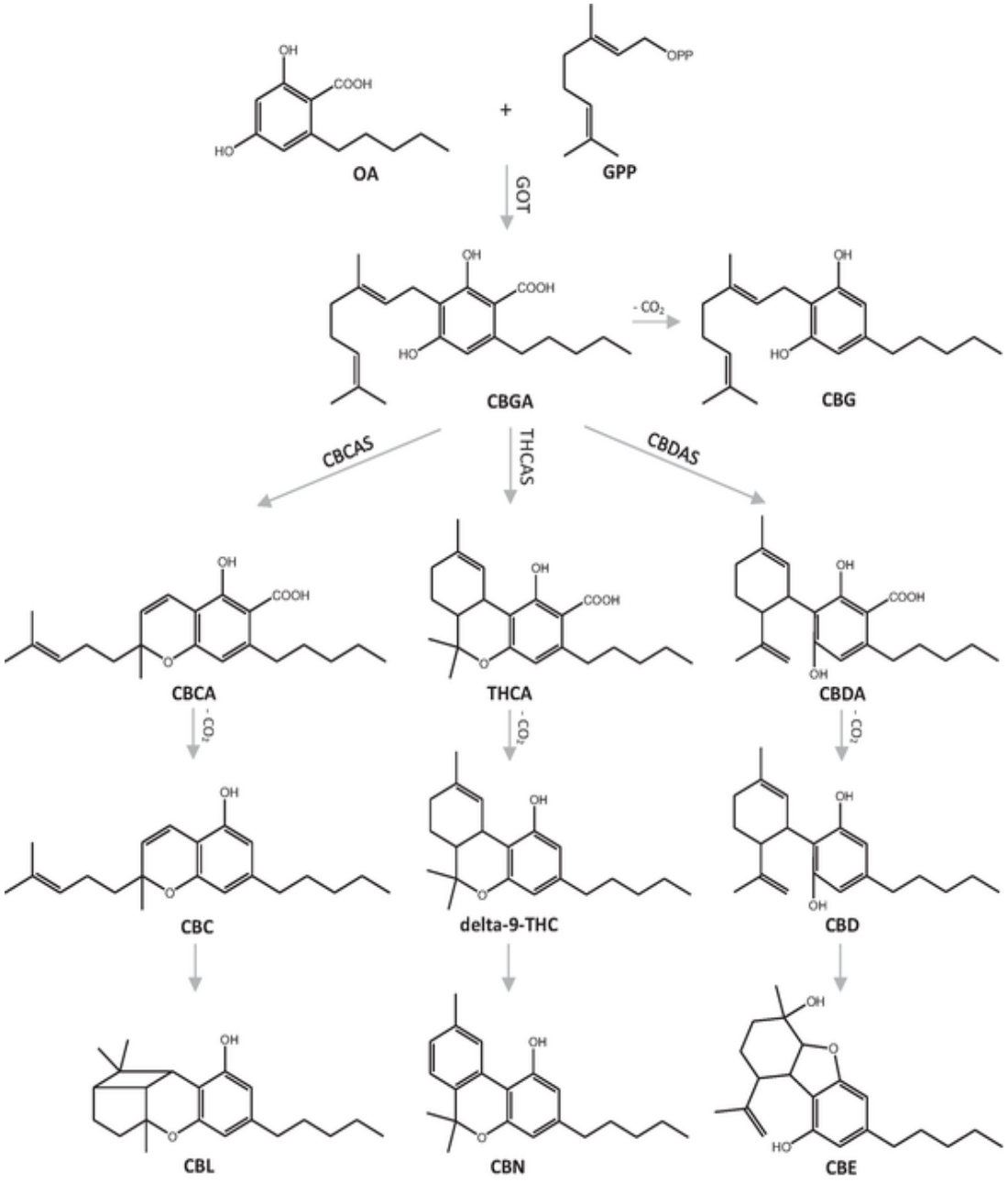


Slika 2. *Cannabis sativa* L. – osušeni ženski cvatovi i mikroskopski prikaz dlaka na njihovoj površini (7)

a – Cannabis flos; b – pokrovna dlaka bez cistolita; c – pokrovna dlaka s cistolitom, d i e – male glavičaste dlake, e – velika žljezdana dlaka s višestaničnim stubastim drškom i višestaničnom glavicom

1.3. Fitokanabinoidi

Fitokanabinoidi predstavljaju skupinu terpeno-fenolnih spojeva koji se primarno nalaze u biljci *Cannabis sativa* L. Biosintezu i strukturna obilježja fitokanabinoida prikazuje slika 2. Prekursori fitokanabinoida potječu iz dva različita biosintetska puta: poliketidni put u kojem nastaje olivetolna kiselina (OA) i izopentenil-difosfatni put u kojem se sintetizira geranil pirofosfat (GPP). Biogeneza fitokanabinoida koji sadrže n-pentil postranični lanac počinje kondenzacijom OA i GPP-a u kanabigerolnu kiselinu (CBGA), reakcijom koju katalizira enzim geranil-pirofosfat olivetolat geranil-transferaza (GOT). Iz CBGA stvaraju tri različite kiseline izoprenilacijom uz pomoć tri oksidativne ciklaze: tetrahidrokanabinolna (THCA), kanabidiolna (CBDA) i kanabikromenska kiselina (CBCA). Ove fitokanabinoidne kiseline se neenzimski dekarboksiliraju u kanabigerol (CBG), Δ^9-tetrahidrokanabinol (Δ^9-THC), kanabidiol (CBD) i kanabikromen (CBC). Poznato je više od 100 fitokanabinoida, međutim, mnogi su prisutni u tragovima i produkti su auto-oksidacijskih procesa (7).

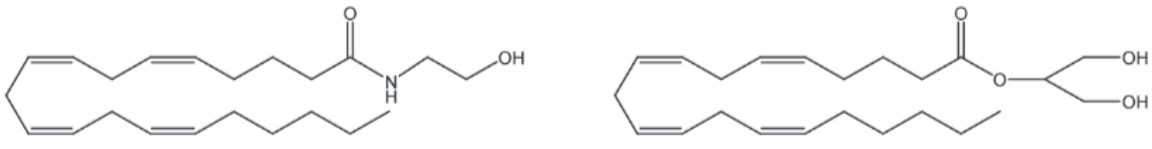


Slika 3. Prikaz biosinteze i strukture fitokanabinoida (7)

OA - olivetolna kiselina, GPP - geranil pirofofat, GOT - olivetolat geranil-transferaza, CBGA - kanabigerolna kiselina, CBG - kanabigerol, CBCA - kanabikromenska kiselina CBCAS - sintaza kanabikromenske kiseline, CBDA - kanabidiolna kiselina, CBDAS - sintaza kanabidiolne kiseline, THCA - tetrahidrokanabinolna kiselina, THCAS - sintaza tetrahidrokanabinolne kiseline, CBC- kanabikromen, THC- tetrahidrokanabinol, CBD- kanabidiol, CBE- kanabielzoin, CBN- kanabinol, CBL- kanabiciklol.

1.4. Endokanabinoidni sustav

Endokanabinoidni sustav sastoji se od endokanabinoida, kanabinoidnih receptora i enzima odgovornih za njihovu biosintezu, transport i razgradnju. Endokanabinoidi su lipofilni medijatori, a po kemijskom sastavu amidi, esteri i eteri dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina, a najviše arahidonske kiseline. Dva najviše istražena endokanabinoida su N-arahidonil-etanolamid (anandamid, AEA) I 2-arahidonoil-glicerol (2-AG) prikazani na slici 4. AEA i 2-AG nisu prethodno sintetizirani i pohranjeni u vezikule kao uobičajeni neurotransmiteri, već se sintetiziraju neposredno prije otpuštanja. Nakon odgovarajuće fiziološke ili patološke stimulacije sintetiziraju se iz fosfolipidnih prekursora u plazmatskoj membrani postsinaptičkih stanica. Nakon otpuštanja ponašaju se kao retrogradni glasnici stimulirajući receptore na presinaptičkoj membrani. Endokanabinoidi djeluju na receptore samo lokalno, najvjerojatnije zbog svoje visoke lipofilnosti te se ubrzo u fiziološkim uvjetima inaktiviraju.



Slika 4. Strukture anandamida i 2-arahidonoil-glicerola (7)

Najpoznatiji receptori za endokanabinoide su kanabinoidni receptori CB1 i CB2 iz porodice G-protein vezanih receptora. Otkriće CB1 receptora nastalo je kao posljedica proučavanja učinka THC-a iz konoplje na organizam. Stoga mu je dodijeljeno ime kanabinoidni receptor. Pokazalo se da metabolit arahidonske kiseline, N-arahidonetanolamid, aktivira CB1. Dobio je ime anandamid od riječi koja na sanskrtu znači blaženstvo. Nakon toga, uslijedila je identifikacija drugog metabolita 2-arahidonoil-glicerola. CB2 je drugi kanabinoidni receptor koji je izoliran

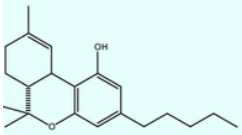
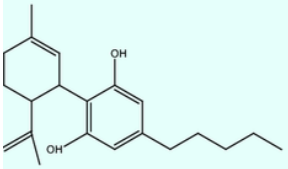
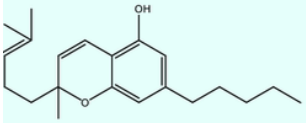
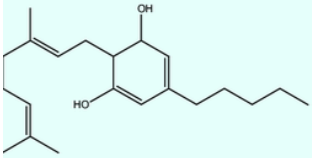
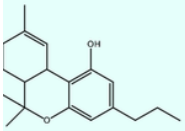
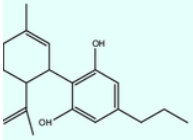
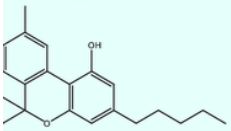
uz pomoć PCR tehnologije tijekom istraživanja i izolacije različitih receptora u diferenciranim mijeloidnim stanicama. Receptor CB2 dijeli 44 % homologije aminokiselina s CB1, te ima sličan profil vezanja (8).

CB1 receptori su uglavnom lokalizirani u središnjem živčanom sustavu u područjima koja su uključena u kontrolu koordinacije motorike i pokreta, pamćenja, učenja, emocija, osjetilne percepcije, autonomnih i endokrinih funkcija. Suprotno tome, CB2 receptori su najčešće vezani za stanice i tkiva imunosnog sustav te sudjeluju u regulaciji imunosnih funkcija (7, 8). Istraživanja pokazuju da se koncentracije endokanabinoida u tkivima, gustoća kanabinoidnih receptora i učinkovitost spajanja kanabinoidnih receptora povećavaju u nizu poremećaja, primjerice, kod multiple skleroze, određenih vrsta boli, karcinoma, shizofrenije, PTSP-a, nekih crijevnih i kardiovaskularnih bolesti, pa čak i traumatskih ozljeda glave. To upućuje na hipotezu da se djelovanjem na endokanabinoidini sustav mogu ublažiti simptomi ili usporiti progresija bolesti. Suprotno tome, smatra se da kod nekih stanja i bolesti kao što su smanjena plodnost u žena, pretilost, cerebralna ozljeda od moždanog udara, endotoksični šok te upala mjehura ili slijepog crijeva, simptome potiče upravo pojačana regulacija endokanabinoidnog sustava. Sve navedeno ukazuje na kompleksnost endokanabinoidnog sustava i potrebu istraživanja mogućnosti njegove modulacije (8-10).

1.5. Terpeni

Uz fitokanabinoide, terpeni također određuju organoleptička svojstva i farmakološke učinke konoplje, te imaju važnu ulogu u identifikaciji različitih varijeteta i kultivara. Fitokanabinoidi i terpeni se sintetiziraju u sekretornim stanicama unutar žljezdanih dlaka koje su najzastupljenije u neoplođenim ženskim cvjetovima (11). Dokazana je prisutnost više od 200 različitih terpena u konoplji, a neki od njih prikazani su na slici 5. Odgovorni su za aromu biljke, ali posjeduju i brojne biološke učinke (12). Najzastupljeniji su monoterpeni, no kako su lako hlapljivi, dio ih se izgubi tijekom sušenja i skladištenja, a zaostaje više seskviterpena (13). Terpeni su lipofilni spojevi koji djeluju na stanične membrane, ionske kanale u živčanom i mišićnom sustavu, receptorima neurotransmitera, G-protein vezanim receptorima, enzimima i dr. (14). Mnogi od prisutnih terpena istraživani su u zasebnim pretkliničkim i kliničkim studijama te su pokazali farmakološku aktivnost (11).

Sve navedeno potkrjepljuje hipotezu da se djelovanje konoplje temelji na sinergističkom učinku fitokanabinoida i terpena. Nadalje, postoje pretpostavke da bi ciljani uzgoj kemotipova bogatih određenim kanabinoidima i terpenima mogao izravno utjecati na njihov sinergistički farmakološki učinak u pripravcima na bazi konoplje, u literaturi spominjan pod nazivom *entourage effect*. Takvim pristupom mogla bi se usmjeriti klinička primjena medicinske konoplje. Pretpostavljeni sinergistički učinak najviše se ističe u psihofarmakološkim i dermatološkim indikacijama. Istraživanja upućuju da bi selektivna križanja specifičnih kemotipova u uzgoju mogla dovesti do inovativnih terapijskih rješenja u bolestima za koje konvencionalna liječenja nisu dovela do zadovoljavajućeg učinka, primjerice kod rezistentne depresije, ovisnosti o drogama, demencije ili dermatoloških poremećaja (11).

Fitokanabinoid	Potencijalni farmakološki učinak (referenca)	Pretpostavljeni terpen u sinergističkom učinku
 THC	Analgetski preko CB1 i CB2 Protuupalno/antioksidacijski učinci Bronhodilatacijski Smanjenje simptoma Alzheimerove bolesti Antiulkusno Miorelaksans	Razni Limonen Pinen Limonen, pinen, linalol Kariofilen, limonen Linalol
 CBD	Protiv osjećaja svrbeža, kolestatska žutica Protuupalno/antioksidacijski učinci Anksiolitički preko 5-HT1A Antikonvulzijski Citotoksični na stanicama raka dojke Pojačana signalizacija A2A- adenozina Efikasan u odnosu na MRSA Smanjuje sebum	Kariofilen Limonen Linalol, limonen Linalol Limonen Linalol Pinen Pinen, Limonen, linalol
 CBC	Protuupalni/analgetski Antifungalni Inhibitor razgradnje AEA Antidepresiv (model na glodavcima)	Razni Kariofilen Limonen
 CBG	TRPM8 antagonist kod raka prostate Inhibitor razgradnje GABA Antifungalni Antidepresiv (model na glodavcima) Antidepresiv, antagonist 5HT1A Analgetski, blokator alfa-2 adrenergičkih receptora Smanjenje keratinocita kod psorijaze Efikasan protiv MRSA	Razni Fitol, linalol Kariofilen Limonen Razni Pinen Kariofilen
 THCBV	Protuupalni/ analgetski Metabolički sindrom Antikonvulzivno Inhibira diacilglicerol lipazu	 Linalol
 CBDV	Antikonvulziv preko hipokampusa	Linalol
 CBN	Sedativan Efikasan u odnosu na MRSA TRPV2 agonist kod opeklina Smanjuje produkciju keratinocita kod psorijaze Smanjuje BCRP	Nerolidol, mircen Pinen Linalol Limonen

Slika 5. Sažeti prikaz ispitivanih kanabinoida koji su prisutni u konoplji i njihovog potencijalnog sinergističkog učinka s terpenima (Prilagođeno prema Russo i sur., 2011 [11])

THC- tetrahidrokanabinol; CBD-kanabidiol; CBC- kanabikromen; CBG- kanabigerol; THCBV- tetrahidrokanabiverin; CBDV- kanabidiverin; CBN- kanabinol

1.6. Primjena medicinske konoplje u liječenju

Konoplja se već tisućama godina koristi u tradicionalnoj medicini (15). Otkriće kanabinoidnih receptora ranih 1990-ih potaknulo je brojna klinička istraživanja koja su ukazala na mogućnost primjene medicinske konoplje i sintetskih kanabinoida u simptomatskom liječenju oboljelih od karcinoma, nekih neuroloških bolesti i AIDS-a, primjerice, za smanjenje mučnine i povraćanja, poboljšanje apetita ili ublažavanje boli (3, 4).

U Republici Hrvatskoj odobrene su određene indikacije za primjenu medicinske konoplje a njezino korištenje isključivo je pod nadzorom liječnika specijalista odgovarajuće specijalizacije. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske odobrilo je primjenu medicinske konoplje za:

- simptomatsko ublažavanje spasticiteta u osoba koje boluju od multiple skleroze, a kojima spasticitet nije adekvatno kontroliran konvencionalom terapijom;
- ublažavanje boli u bolesnika s uznapredovalom/terminalnom malignom bolešću i kroničnom umjerenom do srednje teškom boli;
- ublažavanje mučnine i povraćanja u bolesnika s malignim bolestima koji primaju emetogenu terapiju (antitumorski lijekovi, zračenje);
- u liječenju kaheksije/anoreksije u HV/AIDS bolesnika;
- u liječenju Dravetovog sindroma (dječjeg epileptičnog sindroma) – „kanabidiolski princip” (16).

1.7. Izazovi u provedbi kontrole kakvoće medicinske konoplje

Konoplja je nedvojbeno jedna od najkontroverznijih biljaka današnjice zbog duge povijesti korištenja u rekreacijske svrhe, što je potaknulo svijest društva o očuvanju javnog zdravlja i donošenje raznih propisa i zakona da se ograniči njezino korištenje. S druge strane, konoplja je stoljećima korištena u medicinske svrhe (17). Konoplja se sastoji, kao i druge biljke, od kompleksne matrice koju čine terpeni, flavonoidi, aminokiseline, alkaloidi i drugi. Glavne farmakološki aktivne sastavnice su kanabinoidi, od kojih je tetrahidrokanabinol najpoznatiji i najodgovorniji za psihoaktivno djelovanje biljke. S gledišta osiguranja kakvoće, kao preduvjeta sigurnosti medicinske primjene, potrebno je analizirati potencijalna onečišćenja koja nastaju prilikom uzgoja ili nepravilnog skladištenja droge. Osim toga, važno je uzeti u obzir i potencijalna krivotvorenja biljne droge (18, 19).

Različite svjetske organizacije i društva za kontrolu kakvoće biljnih droga prepoznala su važnost razvoja analitičkih metoda u fitokemijskoj analizi konoplje. Naglasak je na boljem uzorkovanju, analitičkim testovima, kriterijima za potvrdu identifikacije, kvantifikaciji glavnih sastavnica i određivanju granica onečišćenja. Usuglašeno je da postoje tri glavna kemotipa konoplje: THC dominantni, CBD dominantni i THC/CBD ujednačeni. Daljnje podgrupe mogu se podijeliti s obzirom na sadržaj ostalih kanabinoida i terpena (20).

Sveobuhvatan pregled kemijske raznolikosti i bolja klasifikacija kemotipova konoplje pridonijeli bi boljoj implementaciji proizvoda na bazi konoplje u klinička ispitivanja i moderni personalizirani pristup liječenju. Istovremeno bi se omogućila bolja kontrola i sigurnost proizvoda od konoplje u nemedicinske svrhe, primjerice u prehrani ili kozmetici (21).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog specijalističkog rada je dati sveobuhvatan pregled stručnih i znanstvenih spoznaja o kontroli kakvoće i regulatornim zahtjevima za biljnu drogu Cannabis flos i gotove proizvode na bazi medicinske konoplje u državama članicama Europske unije. U radu će se prikazati analitičke tehnike koje se mogu primijeniti u identifikaciji i određivanju fitokanabinoida te dati uvid u ostale metode ispitivanja kakvoće medicinske konoplje. Predloženi rad će pružiti recentne podatke o regulativi i metodama ispitivanja kakvoće biljne droge i ljekovitih pripravaka na bazi medicinske konoplje te tako doprinijeti boljem razumijevanju važećih zakonskih propisa za stavljanje na tržište i osiguranje njihove kakvoće.

3. MATERIJAL I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

Za potrebe pisanja specijalističkog rada pretražene su sljedeće elektroničke baze podataka: Scopus, PubMed i ScienceDirect. Baze su pretraživane uz pomoć ključnih riječi poput: *cannabis*, *quality assurance*, *quality control*, *analytical methods* i dr. Prikupljeni literaturni podaci kritički su proučeni s obzirom na temu rada te sistematično prikazani. Zahtjevi i zakonski okviri za primjenu medicinsku konoplje pronađeni su na mrežnim stranicama relevantnih institucija: Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske, Europska agencija za lijekove i medicinske proizvode te Europsko ravnateljstvo za kakvoću lijekova i zdravstvenu skrb.

3.1. Kontrola kakvoće medicinske konoplje

Kakvoća lijekova i sirovina za njihovu proizvodnju (biljne droge, biljni pripravci, pomoćne tvari), uključujući materijale za unutarnje pakiranje lijeka, mora biti u skladu s Hrvatskom farmakopejom, odnosno lijek mora biti proizveden i provjerene kakvoće u skladu s postupcima i zahtjevima važeće Europske farmakopeje. Farmakopeja je skup propisa koji utvrđuju zahtjeve i postupke za izradu i provjeru kakvoće lijekova. Da bi se osigurala kakvoća, svi sastojci lijekova i metode njihove analize moraju se standardizirati. Europsku farmakopeju objavljuje Europsko ravnateljstvo za kakvoću lijekova i zdravstvenu skrb (*European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care*, EDQM) koje djeluje pri Vijeću Europe u Strasbourgu (*Council of Europe*). Europska farmakopeja postavlja zajedničke i obvezne standarde kojima jamči kakvoću lijekova u svim državama potpisnicama Konvencije o izradi Europske farmakopeje. Republika Hrvatska je od 1994. potpisnica Konvencije i članica Europske farmakopeje. Pristupanjem Konvenciji, norme kakvoće za tvari iz monografijskog fonda Europske farmakopeje postale su obvezne za sve lijekove proizvedene ili uvezene u Republici Hrvatskoj. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) je hrvatsko nacionalno tijelo za pitanja farmakopeje. Ispitivanja opisana u farmakopejskim monografijama službene su metode na kojima su postavljeni standardi Europske farmakopeje. Alternativne metode analize mogu se koristiti u svrhu kontrole kakvoće u dogovoru s regulatornim tijelima, pod uvjetom da se dokaže kako njihova službena primjena osigurava prihvaćene standarde. Farmaceutska supstancija mora udovoljiti svim zahtjevima navedenima u monografiji da bi postigla farmaceutsku kakvoću koju propisuje farmakopeja. Zahtjev kakvoće za biljnu tvar je propisan općom monografijom za biljne droge te posebnom monografijom za biljnu tvar (22).

Predmetna serija biljnih droga mora biti prikladna za namjensku upotrebu, odnosno njihovu daljnju preradu u svrhu dobivanja gotovog proizvoda ili korištenje kao polaznog materijala za ekstrakciju određenih sastavnica. Farmaceutska kakvoća serije lijeka je osigurana ako je u skladu sa zahtjevima Europske farmakopeje ili nacionalnih farmakopeja država članica vijeća Europe. Ako u određenom slučaju ne postoje odgovarajući zahtjevi, proizvođač ili distributer lijekova mora sastaviti vlastite specifikacije kakvoće. Relevantne specifikacije mogu se naći u općoj monografiji pod nazivom *Herbal drugs* u Europskoj farmakopeji i u smjernici *Test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products* Europskog odbora za biljne lijekove (*Committee on Herbal Medicinal Products*, HMPC) (22, 23).

3.1.1. Analitičke tehnike u kontroli kakvoće medicinske konoplje

Pod utjecajem znanstvenog i tehnološkog razvoja u pogledu uzgoja i primjene biljne vrste *Cannabis sativa* L. tijekom posljednjih desetljeća, intenzivno su se razvijale metode za kvalitativnu i kvantitativnu analizu kanabinoida u konoplji i proizvodima na bazi konoplje, posebice metode plinske i tekućinske kromatografije. Razvijene metode plinske i tekućinske kromatografije koje se danas koriste u rutinskim analizama i znanstvenim istraživanjima zadovoljavaju uvjete usporedive točnosti, selektivnosti, linearnosti, osjetljivosti i preciznosti u fitokemijskoj analizi kanabinoida (24).

Plinska kromatografija (GC)

U prošlom desetljeću objavljen je čitav niz radova o uporabi plinske kromatografije kao jedne od najstarijih, ali i najviše korištenih tehnika kad je u pitanju analiza kanabinoida, uz primjenu različitih načina detekcije. U analizi kanabinoida plinskom kromatografijom kao detektori se

primjenjuju plameno-ionizacijski detektor (FID) i spektrometar masa (MS). GC-FID je tehnika izbora zbog svoje jednostavnosti i pouzdanosti u rutinskoj identifikaciji i određivanju glavnih kanabinoida u različitim uzorcima, međutim, GC-MS je prikladnija tehnika za pouzdanu identifikaciju različitih kanabinoida (24, 25). Tako se, zbog kvalitete i opsega strukturnih informacija koje se mogu dobiti korištenjem spektrometrije masa, spregnute tehnike GC-MS i GC-MS/MS opsežno koriste za analizu raznih vrsta tvari prirodnog porijekla, uključujući i kanabinoide u biljci *Cannabis sativa* L. (24, 26). Različiti tipovi kolona, uz primjenu pogodnog detektora, presudni su za uspjeh analize kanabinoida u plinskoj kromatografiji. Najčešće se koriste kapilarne kolone s umreženim i vezanim stacionarnim fazama različite polarnosti. Većina kolona koje se koriste u plinskoj kromatografiji malog su promjera i sa stacionarnom fazom koja je nepolarna (100 % dimetil-silikon) ili slabo polarna (5 % difenil- i 95 % dimetil-polisiloksan). No, nepolarne kolone nemaju mogućnost razdvajanja i razlikovanja kanabidiola od kanabikromena. Budući da je udio kanabidiola ključan podatak za određivanje kemotipa konoplje (omjer THC/CBD), za analizu je prikladnija kolona srednje polarnosti, primjerice, 35 % difenila u dimetil-silikonu (25).

Korištenje plinske kromatografije za određivanje kemotipa konoplje temelji se na određivanju koncentracije THC-a i CBD-a. Analiza plinskom kromatografijom najčešće traje do 20 minuta, uz postizanje temperature do 300 °C. Važno je naglasiti da je ukupan sadržaj kanabinoida iskazan kao zbroj kiselih i neutralnih komponenti (27). Zbog korištenja visokih temperatura, kanabinoidi u obliku kiselina dekarboksiliraju se tijekom prolaska kroz kolonu (27, 28) te se stoga ne mogu detektirati, osim ako se prije analize ne podvrgnu derivatizaciji (29, 30). Primjerice, tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA), kao prekursor THC-a, jedna je od glavnih sastavnica koja je termolabilna i ne može se direktno detektirati plinskom kromatografijom. Derivatizacijom se poboljšava hlapljiivost i stabilnost fitokanabinoida na visokim

temperaturama. Rezultati kvantifikacije nakon derivatizacije ponekad nisu vjerodostojni jer prinos reakcije derivatizacije fitokanabinoida ipak nije uvijek potpun. Najčešća metoda derivatizacije uključuje supstituciju atoma vodika koji je vezan na heteroatom funkcionalne skupine u molekuli (primjerice - OH, - COOH, - NH2, = NH, - SH) sililnom skupinom (trimetilsilil ili terc-butil-dimetilsilil). Nastali derivati su manje polarni i stabilniji su pri višim temperaturama te su stoga pogodniji za GC analizu (24).

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti jedna je od najpopularnijih tehnika kromatografske separacije koja se koristi za odjeljivanje, identifikaciju i određivanje sastavnica biljnih uzoraka. Metode temeljene na tekućinskoj kromatografiji postale su metode izbora za kvalitativnu i kvantitativnu analize fitokanabinoida. Jednostavna priprema uzorka, niže temperature analize i velike brzine protoka omogućuju analizu uzorka bez dekarboksilacije i razgradnje. Pouzdano se odjeljuju neutralni fitokanabinoidi i oni u obliku kiselina, pa se mogu izravno identificirati i kvantificirati, bez dodatne derivatizacije. Za razliku od plinske kromatografije, nema gubitka analita s obzirom na jednostavnu pripremu uzorka (24). U HPLC analizi kanabinoida najviše se koristi UV detektor. Pristupačan je i dovoljno osjetljiv kad je količina glavnih kanabinoida relativno visoka, međutim, slabe je osjetljivosti i specifičnosti. Više informacija može se dobiti primjenom detektora s nizom fotodioda (DAD detektor) budući da se apsorpcijski spektar kanabinoidnih kiselina razlikuje od spektra neutralnih kanabinoida. Rutinske metode za analizu biljne droge Cannabis flos temelje se na određivanju pet glavnih fitokanabinoida (CBDA, CBD, CBN, Δ^9-THC i Δ^9-THCA). Na valnoj duljini od 228 nm moguće je detektirati i kisele i neutralne kanabinoide, međutim, nije moguće razlikovati kanabigerol (CBG) i kanabidiol (CBD). U tom slučaju pogodnija je koristiti spektrometar masa koji pruža

višu razinu detekcije jer omogućuje razlikovanje kanabinoida temeljem njihovog masenog spektra. No, to ne vrijedi za izomere kanabnoida, kao što su 8-THC i 9-THC (24, 27).

U HPLC analizi koriste se kolone promjera 2-4,6 mm i duljine 20-250 mm. Najčešće se radi o reverzno-faznim kolonama poput C_{18}, s nepolarnim stacionarnim fazama. U većini slučajeva koriste se gradijentne metode, dok se u literaturi rijetko opisuju izokratne metode kojima se teško postiže željeno razlučivanje (27).

Nadalje, važno je istaknuti da su fitokanabinoidi u biljci prisutni u optički čistom obliku. Manji broj radova opisuje kiralno odvajanje kanabinoida (31). Poznato je da enantiomeri imaju različite farmakološke aktivnosti (27). Primjerice, dokazano je da (+)CBD, koji je neprirodni kanabinoid, ima THC-u sličan afinitet prema CB1 receptorima. S druge strane, prirodni enantiomer (−)CBD nije pokazao preferencijalni afinitet ni za CB1 ni za CB2 receptore (32). Stoga je za dizajn budućih analiza u procesu razvoja lijekova na bazi medicinske konoplje važno istražiti stereostabilnost kanabinoida u otapalima koja se koriste za ekstrakciju zbog moguće inverzije konfiguracije (33, 34). U literaturi su opisane HPLC metode u kojima se za odvajanje enantiomera glavnih kanabinoida koriste ili prilagođene kolone ili sustav 2D kromatografije (27).

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) je vrsta tekućinske kromatografije u kojoj se koriste kolone sa sitnijim česticama punila, zbog čega se stvara viši tlak (100 MPa ili 14,5 K psi) u odnosu na klasične kolone. Razvijeno je i opisano nekoliko metoda analize kanabinoida korištenjem UPLC kolona s česticama promjera manjeg od 2 mm (35, 36). Velika prednost u korištenju takvih kolona je u brzim analizama i visokoj učinkovitosti odjeljivanja. UPLC sustav omogućuje detekciju analita u vrlo niskim koncentracijama zahvaljujući poboljšanom omjeru signala i šuma, zahtijeva puno manji volumen uzorka, bez gubitka

osjetljivosti. Kao i svaki drugi moderni sustav tekućinske kromatografije, UPLC se može povezati s različitim detektorima kao što su UV, DAD i MS (37).

Ostale instrumentalne analitičke tehnike

Superkritična fluidna kromatografija (SFC) je tip tekućinske kromatografije u kojoj se kao mobilna faza koristi tzv. superkritični fluid, primjerice CO_2 (38). Unatoč visokoj učinkovitosti, još uvijek se slabo koristi u fitokemijskoj analizi kanabinoida. Ova tehnika je brza (vrijeme rada je 8-10 minuta), s visoko specifičnošću i snagom odjeljivanja u odnosu na HPLC, čime se postiže sigurnija identifikacija pojedinih kanabinoida. Prethodna dekarboksilacija fitokanabinoida nije potrebna kao u GC analizi (39-41). Važno je istaknuti da se u SFC koristi ekološki prihvatljivo otapalo. Detektori koje se primjenjuju u analizi konoplje uglavnom su UV ili MS detektori. Zbog brojnih prednosti, u budućnosti se očekuje opsežnije korištenje SFC-a, posebice u analizi šireg spektra strukturno različitih kanabinoida (24).

U kontroli kakvoće sve se više koriste tehnike vibracijske spektroskopije, kao što su infracrvena spektroskopija (IR), spektroskopija u bliskom infracrvenom području (NIR), spektroskopija u srednjem infracrvenom području (MIR-MID), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) i Ramanova spektroskopija. Pogodne su za farmaceutsku industriju jer omogućuju analizu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu, čime se značajno smanjuju pogreške pri uzorkovanju. Omogućuju brz i neinvazivan pristup u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi fitokanabinoida u biljnom materijalu i biljnim ekstraktima (24, 42, 43).

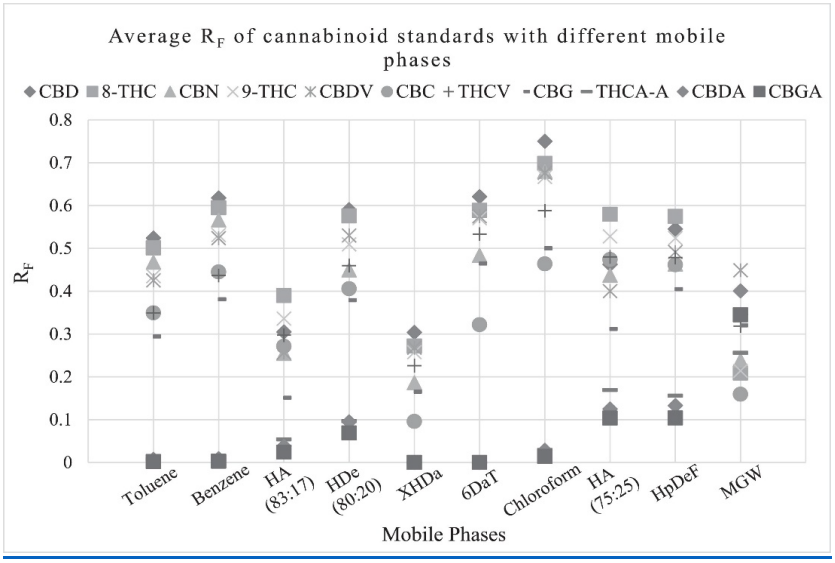
Metode temeljene na spektroskopiji nuklearne magnetske rezonancije (NMR) mogu se koristiti umjesto kromatografskih tehnika. Glavna prednost u odnosu na GC i HPLC analizu kanabinoida u biljnim uzorcima jest da NMR nije tehnika osjetljiva na nečistoće, poput klorofila ili lipida u biljnom uzorku (44). Rijetko se koristi za kvantifikaciju jer je uzorkovanje nešto

kompliciranije, a slabom potencijalu korištenja u praksi svakako doprinose i visoki troškovi rada te potreba za visoko specijaliziranim osobljem. Unatoč tome, NMR se smatra vrlo preciznom, ponovljivom i brzom tehnikom (27). U fitokemijskoj analizi kanabinoida NMR se koristiti kao polukvantitativna fitokemijska metoda ili u kvalitativnoj analizi glavnih sastavnica (24).

Tankoslojna kromtografija (TLC)

Tankoslojna kromatografija, kao vrlo popularna metoda u fitokemijskoj analizi biljnih droga, posebice je prikladna u svrhu preliminarne analize kanabinoida. Utvrđivanje prisutnosti određenih kanabinoida provodi se usporedbom retencijskih vrijednosti (R_F) odijeljenih zona analita i poredbenih supstancija nakon razvijanja kromatograma odgovarajućom pokretnom fazom, dok se vizualna procjena na danjem svjetlu ili UV području najčešće provodi nakon primjene prikladnih reagensa za detekciju. TLC se smatra ekološki prihvatljivijom tehnikom od HPLC-a jer se koriste značajno manje količine otapala (24, 45). TLC je jednostavna i korisna metoda u probiru zaplijenjene droge u forenzičkim laboratorijima, ali često rezultira lošom rezolucijom zbog sustavnih pogrešaka koje proizlaze iz ručnog rukovanja, kontrole temperature i vlage te mjerenja R_F vrijednosti. Tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (HPTLC) umanjuje sustavne pogreške i omogućuje bolje razlučivanje kanabinoida. Pogodna je za njihovu istovremenu analizu u većem broju uzoraka, čime se dodatno smanjuju troškovi i vrijeme analize. Automatiziranim načinom nanošenja uzorka na tanki sloj adsorbensa moguće je aplicirati velik broj uzoraka u puno kraćem vremenu nego što je to slučaj kod HPLC-a i GC-a (46). U literaturi opisanim HPTLC metodama postiže se dobro razdvajanje glavnih neutralnih kanabinoida (CBD, 9-THC, THCV, CBG i CBC). Takve analize najviše se koriste u forenzici, kontroli kakvoće biljnog materijala i proizvoda na bazi konoplje (47). Nastoje se pronaći parametri kojima će se postići najbolje razlučivanje glavnih

kanabinoida u identifikaciji biljne droge, primjerice ispitivanje učinkovitosti različitih pokretnih faza (slika 6). HPTLC se već dugo primjenjuje u fitokemijskoj karakterizaciji biljnih droga i proizvoda te je izabrana metoda za identifikaciju droge Cannabis flos u Europskoj farmakopeji (48).



Slika 6. Primjer usavršavanja HPTLC metode za analizu kanabinoida primjenom različitih pokretnih faza (45)

3.1.2. Glavna obilježja monografije droge Cannabis flos u Europskoj farmakopeji

Europska komisija za farmakopeju (EDQM) na svojoj 176. sjednici od 20.-21. lipnja 2023. usvojila 67 tekstova. U dodatku 11.5 Europske farmakopeje od siječnju 2024., s datumom provedbe od 1. srpnja 2024., uključeno je 11 novih monografija i tri nova opća poglavlja, među kojima su monografije droge Cannabis flos i prirodnog kanabidiola izoliranog iz biljke *Cannabis sativa* L. (49). Očekuje se da će zahtjevi monografije iz Europske farmakopeje ubuduće zamijeniti nacionalne monografije za drogu Cannabis flos i kanabidiol ukoliko one postoje. Prisutne su razlike u metodama analize između monografije europske farmakopeje i postojećih nacionalnih monografija. Primjerice, Njemačka farmakopeja propisuje tankoslojnu kromatografiju (TLC) za identifikaciju droge, dok je u Europskoj farmakopeji propisana metoda tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC). Nadalje, u monografiji Europske farmakopeje predložene su specifične granice udjela THC-a i CBD-a za postojeća tri kemotipa, dok iste u nacionalnim farmakopejama ne postoje. Uz to, postoji razlika u dozvoljenoj koncentraciji onečišćenja teškim metalima (50).

Monografija u Europskoj farmakopeji uzima u obzir informacije dobivene od brojnih nacionalnih tijela u vezi s uporabom ove biljne droge u njihovoj nadležnosti kako bi se mogla koristiti kao sirovina za proizvodnju ekstrakata ili propisivati pacijentima kao biljna droga za inhalaciju ili oralnu primjenu (48).

U nastavku su navedeni i obrazloženi osnovni dijelovi monografije droge Cannabis flos te istaknuti zahtjevi vezani za kontrolu kakvoće prema Europskoj farmakopeji (48).

DEFINICIJA DROGE

Europska farmakopeja definira drogu konopljin cvijet kao osušene, cijele ili fragmentirane potpuno razvijene cvatove ženske biljke *Cannabis sativa* L. U slučaju da će se biljna droga propisivati bolesnicima kao lijek, sadržaj ukupnog tetrahidrokanabinola (THC-a) odnosno ukupnog kanabidiola (CBD-a) ne bi smio odstupati više od ± 10 % od označenih vrijednosti na proizvodu. Farmakopeja definira tri različita kemotipa biljne droge ovisno o udjelima THC-a i CBD-a koji su izraženi na suhu biljnu drogu kao Δ^9 tetrahidrokanabinol ($C_{21}H_{30}O_2$; *Mr* 314,5), odnosno kanabidiol ($C_{21}H_{30}O_2$; *Mr* 314,5):

1. THC kemotip u kojem je dominantan udio THC-a (najmanje 5,0 %) u odnosu na CBD (najviše 1,0 %).
2. THC/CBD kemotip (intermedijarni tip) kojeg obilježavaju pojedinačni udjeli THC-a i CBD-a od najmanje 1,0 % te odnos udjela THC/CBD između 0,2 i 5,0.
3. CBD kemotip u kojem je dominantan CBD (najmanje 5,0 %) u odnosu na THC (najviše 1,0 %).

PROIZVODNJA

Ukoliko će se biljna droga propisivati bolesnicima kao lijek, cvat se mora rezati pri bazi da bude što manje ostataka cvatne osi.

IDENTIFIKACIJA

Identifikacija droge Cannabis flos provodi se prema morfološkim i mikroskopskim obilježjima te na temelju prisutnosti karakterističnih fitokanabinoida ispitanih HPTLC metodom.

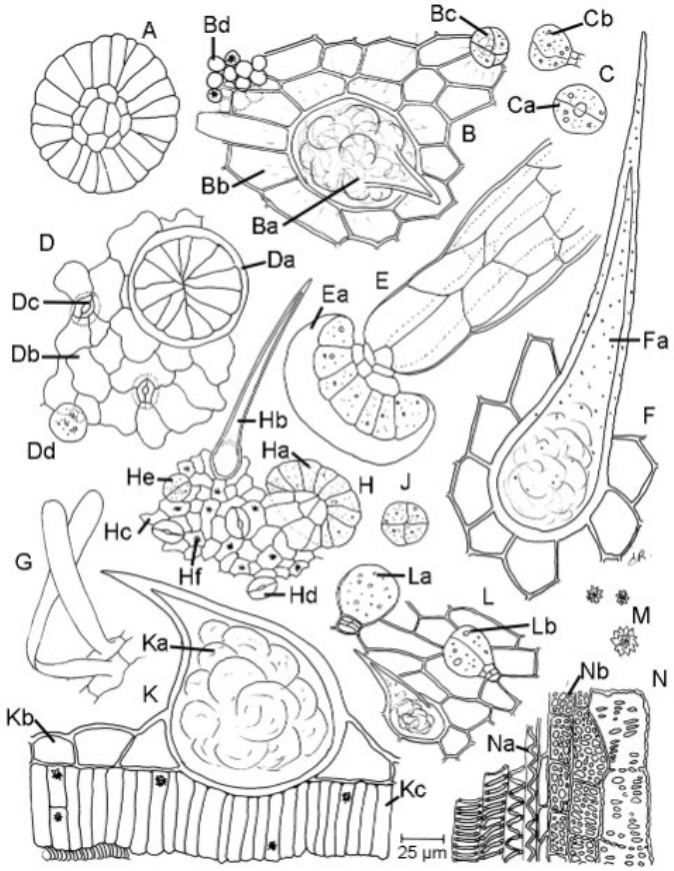
A) Među morfološkim obilježjima navodi se boja biljne droge koja može biti od tamnozelene do blijedožute ili od svijetlosmeđe do crvenkasto-smeđe boje, što ovisi o varijetetu kojem biljni

uzorak pripada. Ako droga dolazi kao cjeloviti cvat, onda se može opisati kao gusta ili više-manje rahla metlica u kojoj se među cvjetovima nalaze brakteje (pricvjetni listovi) koje su sjedeće ili gotovo sjedeće, izdužene (oko 10 cm duge) te imaju nazubljene rubove (slika 7). Kad se ispituje fragmentirana biljna droga, uočavaju se dijelovi cvatne osi, brakteja i metlice, zajedno s pojedinačnim cvjetovima ili njihovim dijelovima (organima). Navedeni ženski cvjetovi su vrlo mali (oko 2 mm) i s kratkim peteljkama. Ocvijeće je sulapno i bezlatično. Lap čaške uglavnom nazivaju brakteolom. Obavija jednogradnu plodnicu koja nosi dva pistila, a svaki završava finom narančasto-smeđom njuškom dužom od čaške. Cvat je više-manje gusto prekriven pokrovnim, ali i žljezdanim dlakama koje stvaraju ljepljivu aromatičnu smolu.

Slika 7. Cannabis flos (Preuzeto s https://www.istockphoto.com/)

B) U svrhu identifikacije provodi se i mikroskopska analiza samljevene droge koja se nakon mljevenja ne prosijava. Boja praška može biti tamnozelena do žućkastozelene ili svijetlosmeđa do crvenkasto-smeđa. Otopina kloral hidrata R koristi se kao sredstvo za uklapanje. U mikroskopskom preparatu mogu se uočiti brojne pokrovne i žljezdane dlake (slobodne ili vezane za stanice epiderme) koji pripadaju različitim tipovima dlaka, nakupine stanica gornje i donje epiderme brakteja, dijelovi palisadnog parenhima brakteja, fragmenti cvatne osi, stanice s kristalima kalcijevog oksalata te dijelovi narančasto-smeđih njuški tučka.

Karakteristični fragmenti praška droge Cannabis flos prema kojima se vrši identifikacija prikazani su na slici 8.



Slika 8. Karakteristični fragmenti praška droge Cannabis flos prema Europskoj farmakopeji (48)

A – višestanična glavica žljezdane dlake; **B** – fragment gornje epiderme brakteje s pokrovnom dlakom koja sadrži cistolit [Ba], blago ispruganom kutikulom [Bb] i malom žljezdanom dlakom [Bc]; **C** – male žljezdane dlake, pogled odozgo [Ca] i pogled sa strane [Cb]; **D** - fragment donje epiderme brakteje s velikom žljezdanom višestaničnom dlakom [Da], stanicama vijugavih stijenki [Db], anomocitičnim pučima [Dc] i malim žljezdanim dlakama [Dd]; **E** – velika žljezdana dlaka s višestaničnim drškom i višestaničnom glavicom [Ea]; **F** – fragment gornje epiderme brakteje s pokrovnom dlakom koja sadrži cistolit [Fa]; **G** – fragment njuške tučka; **H** – fragment donje epiderme brakteole sa žljezdanom dlakom kraćeg višestaničnog drška [Ha], pokrovnom dlakom bez cistolita [Hb], epidermskim stanicama valovitih stijenki [Hc], anomocitičnim pučima [Hd], malim žljezdanim dlakama [He] i stanicama s kmalim kristalima kalcijevog oksalata [Hf]; **J** – mala žljezdana dlaka gledana odozgo; **K** – fragment plojke brakteje (poprečni izgled) s pokrovnom dlakom koja sadrži cistolit [Ka], poligonalniim epidermskim stanicama [Kb] i slojem palisadnog parenhima [Kc]; **L** – fragment gornje epiderme brakteje s malim žljezdanim dlakama [La, Lb]; **M** – slobodni kristal kalcijevog oksalata; **N** – fragment cvatne stapke s prstenastim i spiralnim trahejama [Na], stanicama srčike s mrežastim stijenkama [Nb]

U prašku droge prisutne su brojne žljezdane i pokrovne dlake koje mogu biti slobodne ili vezane za epidermu. Razlikuje se nekoliko tipova dlaka, među kojima se ističu žljezdane dlake s dugim višestaničnim drškom (stanice u više redova) i višestaničnom glavicom prekrivene kupolastom kutikulom [E, Ea]. Pod mikroskopom se mogu uočiti i pojedini dijelovi tih dlaka poput dijelova drška ili odijeljenih glavica [A]. Neke višestanične glavičaste dlake mogu imati i mali držak [Ha], dok neke mogu biti i sjedeće (bez drška), a na njihovim glavicama se može uočiti kupolasta kutikula [Da] ili su glavice kutikulu izgubile [A].

Sljedeći tip dlaka koji se uočava u prašku ove droge su male žljezdane dlake s jednostaničnim ili dvostaničnim drškom i glavicom koja se sastoji od jedne, dvije ili četiri stanice, a koja sadrži narančasto-žute kapljice [Bc, C, J, La, Lb].

Treći tip dlaka se odnosi na jednostanične pokrovne dlake koje sadrže cistolit [Fa, Ka] ili su bez cistolita. Čunjaste dlake s cistolitom mogu imati zadebljale stijenke, široku bazu i zakrivljeni šiljasti vrh. U njima se jasno uočava kvrgava kuglasta nakupina kalcijevog oksalata [Ba, Ka]. Te cistolitične dlake mogu također imati užu bazu i stijenke koje su značajno točkasto udubljene [Fa]. Pokrovne dlake bez cistolita su više izdužene te imaju glatke zadebljale stijenke [Hb].

Gornja epiderma brakteja [B, F, L] građena je od poligonalnih stanica čvrstih stijenki s blago ispruganom kutikulom [Bb]. Na epidermi se mogu uočiti pokrovne dlake s cistolitima [Ba, Fa] i male žljezdane dlake [Bc, La, Lb]. Fragment gornje epiderme je često vezan za palisadni parenhim unutar kojeg se uočavaju stanice s kalcijevim oksalatom [Bd]. Stanice donje epiderme brakteja [D] imaju blago vijugave stijenke [Db]. Na donjoj epidermi se uočavaju anomocitične puči [Dc], male žljezdane dlake [Dd] i velike žljezdane dlake s višestaničnim drškom i višestaničnom glavicom [Da]. U fragmentu plojke brakteje [K] uočavaju se

poligonalne stanice epiderme prekrivene kutikulom [Kb], pokrovne dlake s cistolitima [Ka], sloj palisadnog parenhima s pokojom stanicom koja sadrži mali kristal kalcijevog oksalata [Kc].

U prašku droge se uočavaju i dijelovi brakteola [H]. Donja epiderma brakteole građena je od stanica s blago valovitim stijenkama [Hc]. Na epidermi se mogu uočiti žljezdane dlake s kratkim drškom [Ha], anomocitične puči [Hd], pokrovne dlake bez cistolita [Hb] i male žljezdane dlake [He]. U navedenom fragmentu se mogu uočiti i stanice s malim kristalima kalcijevog oksalata koje su prisutne u stanicama mezofila ispod epiderme [Hf].

Dijelovi narančasto-žutih njuški tučka su također vidljivi u prašku droge. Epidermske stanice s finim i slabo vidljivim stijenkama završavaju velikim papilama zaobljenog vrha [G].

Dijelovi cvatne stapke [N] grade celulozna vlakna, spiralne [Na] i prstenste traheje, stanice srčike s mrežastim stijenkama [Nb], od kojih neke sadrže kristalić kalcijevog oksalata s promjerom od 30 μm.

Slobodni kristali kalcijevog oksalata [M] se također mogu uočiti u prašku droge Cannabis flos (Slika 8).

C) Fitokemijska identifikacija biljne droge Cannabis flos provodi se primjenom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti (HPTLC). Ispitivana otopina priprema se ekstrakcijom 0,5 g samljevene i neprosijane biljne droge s 5,0 mL metanola R, najprije uz primjenu vrtložne mješalice (10 sekundi), zatim ultrazvuka (5 minuta) te ponovo vrtložne mješalice (10 sekundi). Nakon ponavljanja navedenog postupka, ekstrakt se centrifugira i supernatant se koristi za analizu.

Pripremaju se i tri poredbene otopine. Prvu poredbenu otopinu (a) predstavlja 5,0 mg kanabidiola R otopljenog u 1,0 mL otopine Δ^9-tetrahidrokanabinola R. Poredbena otopina (b)

se dobiva razrjeđivanjem 0,25 mL otopine (a) s metanolom R do 1,0 mL. Treća poredbena otopina (c) priprema se otapanjem 1 mg kanabidiola R i 1 mg kanabidiolne kiseline R u metanolu R te nadopunjavanjem do 1 mL istim otapalom. Kao biljeg intenziteta obojenja odijeljenih zona navodi se Δ^9-tetrahidrokanabinol iz poredbene otopine (a) i (b).

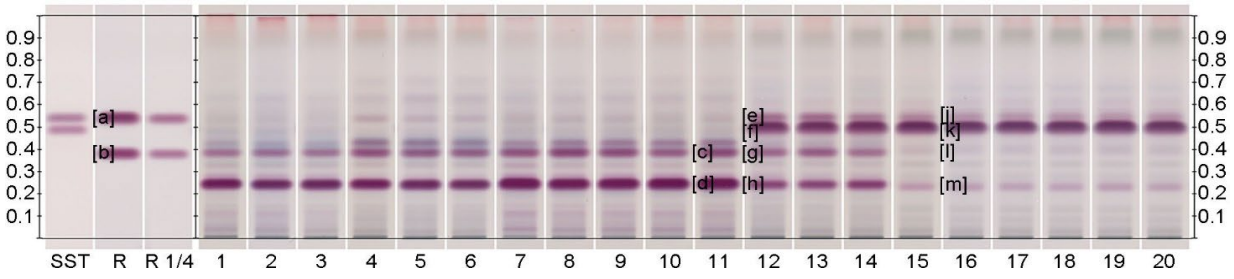
Po 2,0 μL ispitivane i poredbeniih otopina nanosi se u liniji od 8 mL na ploču s adsorbenom oktadecilsilil sillikagel F_{254}. Razvijanje kromatograma provodi se pokretnom fazom koja sadrži vodu R, ledenu octenu kiselinu R i metanol R u volumnim omjerima 10:10:80. Razvijena ploča suši se 5 minuta na zraku na sobnoj temperaturi. Zone kanabinoida detektiraju se prskanjem osušene ploče reagensom vanilin R i zagrijavanjem tri minute na 100 °C.

Poredbena otopina (c) se koristi za procjenu prikladnosti sustava. U srednjoj trećini kromatograma moraju biti prisutne dvije sive do crvenoljubičaste zone koje se mogu i dodirivati. Donja zona pripada kanabidiolnoj kiselini, dok gornja zona odgovara kanabidiolu.

Rezultati: Slika 9 prikazuje slijed zona prisutnih u kromatogramima koji su dobiveni analizom poredbene (a) i ispitivane otopine. U dobivenom kromatogramu s ispitivanom otopinom mogu biti prisutne druge vrlo blijede zone. Ako postoje, zona Δ^9-tetrahidrokanabinolne kiseline je intenzivnija od zone Δ^9-tetrahidrokanabinola, a zona kanabidiolne kiseline je intenzivnija od zone koja odgovara kanabidiolu. Na slici 9 prikazana je shema kromatograma glavnih fitokanabinoida prema Europskoj farmakopeji, dok slika 10 donosi primjer takvog kromatograma.

Vrh kromatografske ploče			
Kanabidiol: crvenoljubičasta zona		Crvenoljubičasta zona, blijeda do vrlo blijeda (kanabidiol) Crvenoljubičasta zona, intenzivna (kanabidiolna kiselina	Crvenoljubičasta zona, blijeda do vrlo blijeda (kanabidiol) Crvenoljubičasta zona, intenzivna (kanabidiolna kiselina)
Δ^9-Tetrahidrokanabinol: crveno-ljubičasta zona	Crvenoljubičasta zona, blijeda do jednaka (Δ^9-tetrahidrokanabinol)	Crvenoljubičasta zona, blijeda (Δ^9-tetrahidrokanabinol)	Siva do crvenoljubičasta zona, vrlo blijeda, može izostati (Δ^9-tetrahidrokanabinol)
	Crvenoljubičasta zona, intenzivna (Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina)	Crvenoljubičasta zona (Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina)	Crvenoljubičasta zona, vrlo blijeda (Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina)
Referentna otopina (a)	**Ispitivana otopina (THC tip)**	**Ispitivana otopina (THC/CBD tip)**	**Ispitivana otopina (CBD tip)**

Slika 9. Shematski prikaz kromatograma fitokanabinoida prema Europskoj farmakopeji



Slika 10. Primjer HPTLC kromatograma za identifikaciju droge Cannabis flos prema farmakopejskoj metodi (51)

a, e, i – kanabidiol; b, c, g, l – Δ^9-tetrahidrokanabinol; d, h, m - Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina; f, k – kanabidiolna kiselina

ISPITIVANJA

Farmakopeja propisuje određivanje udjela fitokanabinoida kanabinola (CBN) tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-om), a najvećom dozvoljenom vrijednošću od 1,0 %. Postupak predviđa izradu dviju ispitivanih otopina. Prva ispitivana otopina (a) priprema se na način da se 0,5 g izrezane ili samljevene, neprosijane biljne droge ekstrahira s 40 mL 96 %-tnog etanola R u odgovarajućoj epruveti za centrifugiranje s čepom na navoj, uz potresanje tijekom 15 minuta. Nakon toga se ekstrakt centrifugira na oko 1700 okretaja te supernatant izdvoji. Ekstrakcija se ponovi još dva puta sa 25 mL 96 %-tnog etanola R. Supernatanti se združe i razrijede do 100,0 mL 96 %-tnim etanolom R te profiltriraju kroz membranski filtar veličine čestica od 0,22 μm. Druga ispitivana otopina (b) pripremi se razrjeđenjem 1,0 mL ispitivane otopine (a) metanolom R do 10,0 mL.

Postupkom se propisuje izrada pet poredbenih otopina. Prva (a) se dobije otapanjem 20,0 mg kanabidiola za izradu *cannabis CRS* u metanolu i nadopunjavanjem do 100,0 mL istim otapalom. Druga poredbena otopina (b) priredi se razrjeđivanjem 5,0 mL poredbene otopine (a) do 20,0 mL metanolom R. Poredbena otopina (c) dobije se razrjeđivanjem 10,0 mL poredbene otopine (a) metanolom R do 20,0 mL. Poredbena otopina (d) pripremi se na sličan način kao i ispitivana otopina (a). Provodi se ekstrakcija 50 g referentnog uzorka droge Cannabis flos za procjenu prikladnosti sustava HRS (*Cannabis flower for system suitability HRS*) s 4 mL 96 %-tnog etanola R. Nakon centrifugiranja i odvajanja supernatanta, ekstrakcija se također ponavlja dva puta s 2,5 mL istog otapala. Združeni supernatanti se razrijede 96 %-tnim etanolom R do 10,0 mL i filtriraju kroz membranski filtar veličine čestica od 0,22 μm. Poredbena otopina (e) se dobije razrjeđivanjem 1 mL poredbene otopine (d) do 10 mL metanolom R.

Koristi se kolona duljine 0,15 m i promjera 4,6 mm u kojoj je stacionarna faza oktadecilsilil silikagel s ugrađenim polarnim skupinama na površini. Analiza se odvija pri temperaturi 35 °C. Koristi se pokretna faza sastavljena od 0,1 %-tne otopina trifluoroctene kiseline (V/V) i acetonitrila za kromatografiju R u volumnom omjeru 41:59, s brzinom protoka 2,0 mL u minuti. Detekcija se provodi na 228 nm. Injektira se po 5 μL ispitivane otopine (a) i poredbenih otopina (b) i (d). Vrijeme analize treba biti pet puta duže od vremena zadržavanja kanabidiola.

Za identifikaciju kanabidiola (t_R ~ 6,9 min) koristi se kromatogram dobiven s referentnom otopinom (b). Kromatogram referentnog uzorka droge Cannabis flos za procjenu prikladnosti sustava HRS i kromatogram poredbene otopine (d) služe u svrhu identifikacije Δ9-tetrahidrokanabinola (t_R ~ 1,76 min), Δ^9-tetrahidrokanabinolne kiseline (t_R ~ 2,48 min), kanabidiolnne kiseline (t_R ~ 1,0 min), kanabinola (t_R ~ 6,9 min), kanabinolne kiseline (t_R ~ 2,38 min), kanabikromena (t_R ~ 2,48 min), kanabigerola (t_R ~ 1,17 min) i kanabigerolne kiseline (t_R ~ 1,63 min).

Prikladnost sustava se procjenjuje na osnovi kromatograma referentne otopine (d). Razlučivanje između pikova kanabigerolne kiseline i Δ^9-tetrahidrokanabinola treba biti najmanje 2,0. Određuje se također omjer visine i doline pika (*peak-to-valley ratio*). Omjer visine pika (*Hp*) koji odgovara kanabigerolu i udaljenosti od bazne linije tog pika do najniže točke odjeljivanja od pika koji odgovara kanabidiolnoj kiselini (*Hv*) treba biti najmanje 1,5. Nadalje, odnos visine pika (*Hp*) koji odgovara kanabinolnoj kiselini i udaljenosti od bazne linije tog pika do najniže točke odjeljivanja od pika koji odgovara kanabikromenu (*Hv*) treba biti najmanje 5.

Udio kanabinola (CBN) u postocima računa se prema sljedećoj formuli koja uzima u obzir površine ispod pikova kanabinola, kanabidiola i kanabinolne kiseline, uz faktore korekcije:

$$\frac{[(A_1 \times 0.405) + (A_3 \times 0.901 \times 0.876)] \times m_2 \times p}{A_2 \times m_1 \times 4}$$

A_1 = površina ispod pika koji odgovara kanabinolu u ispitivanoj otopini (a)

A_2 = površina ispod pika koja odgovara kanabidiolu u poredbenoj otopini (b)

A_3 = površina ispod pika koja odgovara kanabinolnoj kiselini u poredbenoj otopini (a)

m_1 = masa biljne droge koja se koristi za izradu ispitivane otopine (a), u gramima

m_2 = masa poredbenog kanabidiola za izradu *cannabis CRS* , u gramima

p = postotak poredbenog kanabidiola u *cannnabis CRS*

0.405 = faktor korekcije za kanabinol u odnosu na kanabidiol

0.901 = faktor korekcije za kanabinolnu kiselinu u odnosu na kanabidiol

0.876 = omjer molekularnih masa kanabinola i kanabinolne kiseline.

Farmakopeja propisuje najviše 2 % stranih primjesa, a u ispitivanju se koristi 25-50 g droge. Ako se droga pripisuje pacijentima kao lijek, ne smije sadržavati sjemenke i cjelovita biljna droga ne smije sadržavati listove duže od 1 cm.

Propisani gubitak sušenjem iznosi najviše 12,0 %, a određuje se za 1,0000 g izrezane ili samljevene, neprosijane droge. Postupak se provodi sušenjem tijekom 24 sata na oko 100 g molekulskog sita R, pri tlaku 1,5-2,5 kPa i temperaturi 40 °C.

Za drogu Cannabis flos propisani su i udjeli teških metala. Propisan je najveći dozvoljeni udio žive (0,1 ppm), kadmija (1,0 ppm) i olova (5,0 ppm). Ako se biljna droga propisuje pacijentima kao lijek, propisano je i određivanje arsena kojeg može biti najviše 0,2 ppm. U tom slučaju pojedinačni udjeli kadmija i olova ne smiju biti veći od 0,3 ppm odnosno 0,5 ppm.

ODREĐIVANJE SADRŽAJA

Europska farmakopeja propisuje određivanje sadržaja tetrahidrokanabinola (THC) i kanabidiola (CBD) primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, a postupak je validiran za analitički raspon od 0,2 % do 32,0 % Δ^9-tetrahidrokanabinola, Δ^9-tetrahidrokanabinolske kiseline, kanabidiola i kanabidiolske kiseline.

Prethodno opisana metoda za određivanje kanabinola (CBN) primjenjuje se i za određivanje THC-a i CBD-a, uz određene preinake. Analizira se ispitivana otopina (a) te poredbene otopine (c) i (e). Prikladnost sustava se procjenjuje korištenjem poredbene otopine (e). Razlučivanje između pikova koji odgovaraju kanabidiolu i kanabidiolskoj kiselini treba biti najmanje 2,0.

Udio tetrahidrokanabinola, izražen kao Δ^9-tetrahidrokanabinol, računa se uz pomoć navedene formule:

$$\frac{[(A_1 \times 1.097) + (A_3 \times 0.901 \times 0.877)] \times m_2 \times p \times 4}{A_2 \times m_1}$$

A_1 = površina ispod pika koji odgovara Δ9-tetrahidrokanabinolu u ispitivanoj otopini (b)

A_2 = površina ispod pika koja odgovara kanabidiolu u poredbenoj otopini (c)

A_3 = površina ispod pika koja odgovara Δ9-tetrahidrokanabinolnoj kiselini u ispitivanoj otopini (b)

m_1 = masa biljne droge koja se koristi za izradu ispitivane otopine (a), u gramima

m_2 = masa poredbenog kanabidiola za izradu *cannabis CRS* , u gramima

p = postotak poredbenog kanabidiola u *cannnabis CRS*

1,097 = faktor korekcije za Δ9-tetrahidrokanabinol u odnosu na kanabidiol

0.691 = faktor korekcije za Δ9-tetrahidrokanabinolnu kiselinu u odnosu na kanabidiol

0.877 = omjer molekularnih masa Δ9-tetrahidrokanabinola i Δ9-tetrahidrokanabinolne kiseline.

Ukupni kanabidiola, izražen kao kanabidiol, računa se uz pomoć navedene formule:

$$\frac{[A_1 + (A_3 \times 0.596 \times 0.877)] \times m_2 \times p \times 4}{A_2 \times m_1}$$

A_1 = površina ispod pika koji odgovara kanabidiolu u ispitivanoj otopini (b)

A_2 = površina ispod pika koja odgovara kanabidiolu u poredbenoj otopini (c)

A_3 = površina ispod pika koja odgovara kanabidiolnoj kiselini u ispitivanoj otopini (b)

m_1 = masa biljne droge koja se koristi za izradu ispitivane otopine (a), u gramima

m_2 = masa poredbenog kanabidiola za izradu *cannabis CRS* , u gramima

p = postotak poredbenog kanabidiola u *cannnabis CRS*

0,596 = faktor korekcije za kanabidiolnu kiselinu u odnosu na kanabidiol

0.877 = omjer molekularnih masa kanabidiola i kanabidiolne kiseline.

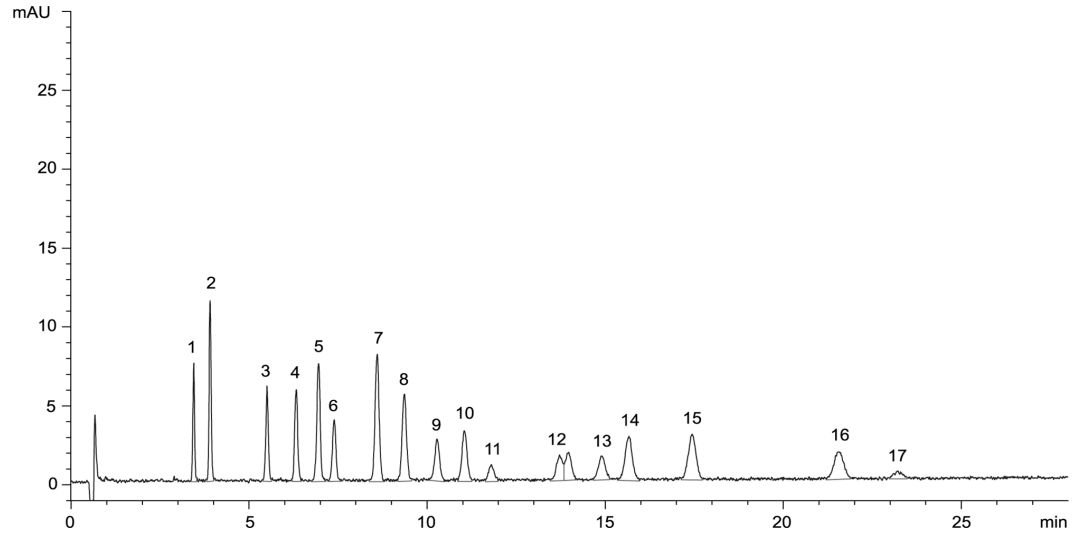
ČUVANJE

Biljna droga Cannabis flos se čuva u hermetički zatvorenoj posudi.

OZNAČAVANJE

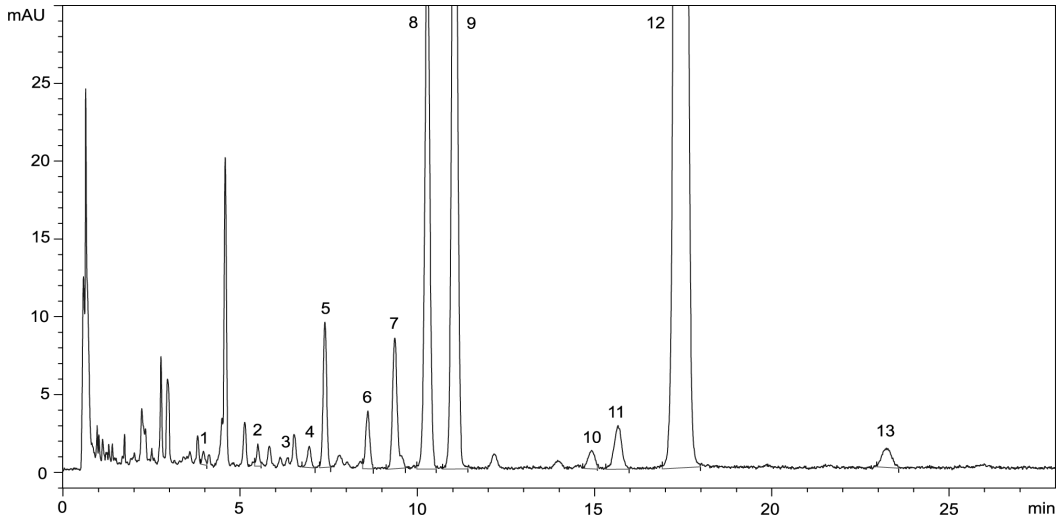
Farmakopeja propisuje da je potrebno navesti udio tetrahidrokanabinola i kanabidiola u postocima. Nadalje, potrebno je navesti propisuje li se biljna droga pacijentima kao lijek.

U nastavku su na slikama 11-14 prikazani primjeri HPLC kromatograma smjese poredbenih fitokanabinoida te uzoraka droge Cannabis flos koji pripadaju različitim kemotipovima, kao rezultat primjene farmakopejske metode (51).



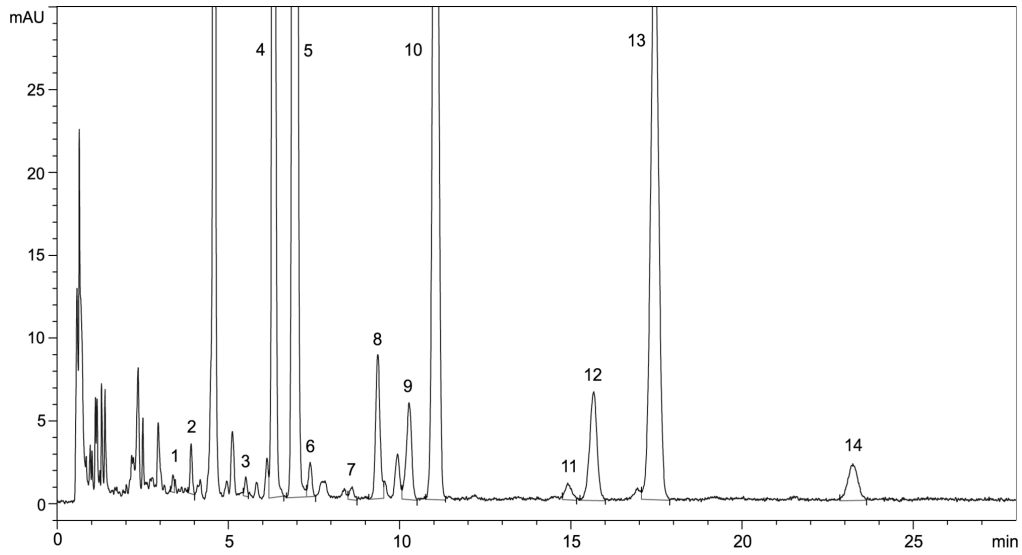
Slika 11. HPLC kromatogram poredbenih fitokanabinoida definiranih koncentracija

1 – CBDVA (kanabidivarinska kiselina); 2 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 3 – CBD (kanabidiol); 4 – CBDA (kanabidiolna kiselina); 5 – CBG (kanabigerol); 6 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 7 – CBN (kanabinol); 8 – CBGA (kanabigerolna kiselina); 9 - Δ^9-THC (Δ^9-tetrahidrokanabinol); 10 – CBNA (kanabinolna kiselina); 11 – CBD (kanabidiol); 12 – Δ^9-THCA (Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina); 13 –CBCA (kanabikromenska kiselina)



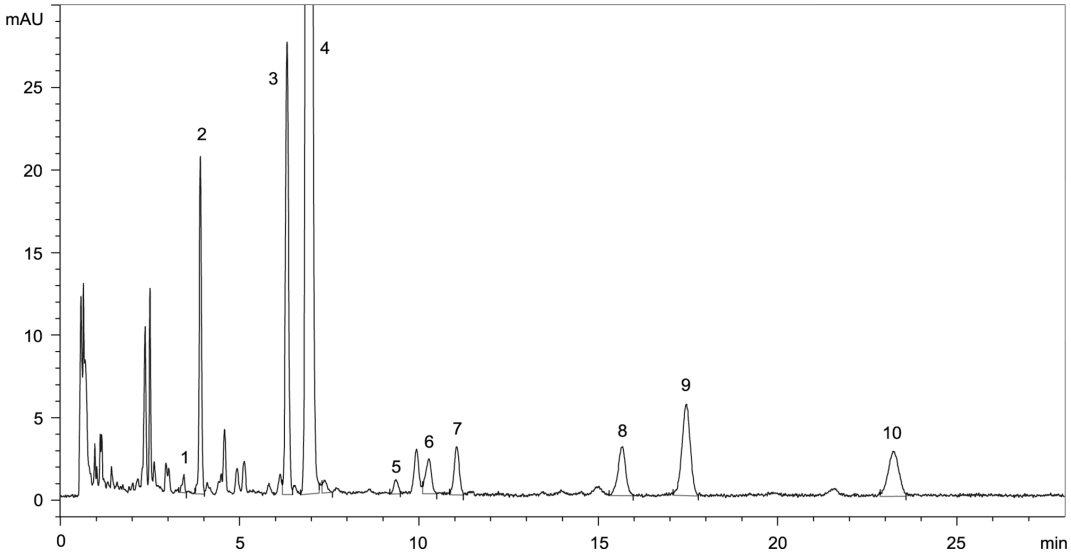
Slika 12. Primjer HPLC kromatograma za THC kemotip droge Cannabis flos

1 – CBDVA (kanabidivarinska kiselina); 2 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 3 – CBD (kanabidiol); 4 – CBDA (kanabidiolna kiselina); 5 – CBG (kanabigerol); 6 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 7 – CBN (kanabinol); 8 – CBGA (kanabigerolna kiselina); 9 - Δ^9-THC (Δ^9-tetrahidrokanabinol); 10 – CBNA (kanabinolna kiselina); 11 – CBD (kanabidiol); 12 – Δ^9-THCA (Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina); 13 – CBCA (kanabikromenska kiselina)



Slika 13. Primjer HPLC kromatograma za THC/CBD kemotip droge Cannabis flos

1 – CBDVA (kanabidivarinska kiselina); 2 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 3 – CBD (kanabidiol); 4 – CBDA (kanabidiolna kiselina); 5 – CBG (kanabigerol); 6 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 7 – CBN (kanabinol); 8 – CBGA (kanabigerolna kiselina); 9 - Δ^9-THC (Δ^9-tetrahidrokanabinol); 10 – CBNA (kanabinolna kiselina); 11 – CBD (kanabidiol); 12 – Δ^9-THCA (Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina); 13 – CBCA (kanabikromenska kiselina)



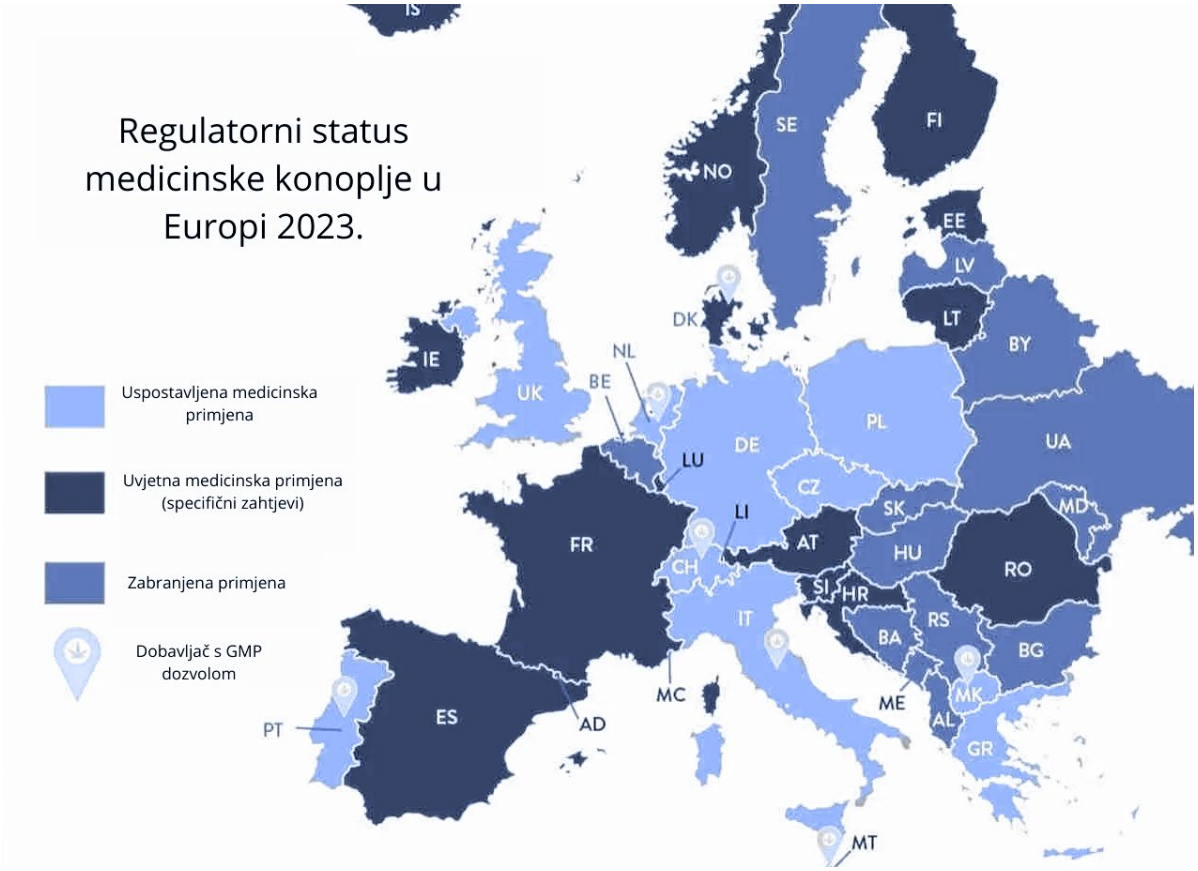
Slika 14. Primjer HPLC kromatograma za CBD kemotip droge Cannabis flos

1 – CBDVA (kanabidivarinska kiselina); 2 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 3 – CBD (kanabidiol); 4 – CBDA (kanabidiolna kiselina); 5 – CBG (kanabigerol); 6 – THCV (tetrahidrokanabivarin); 7 – CBN (kanabinol); 8 – CBGA (kanabigerolna kiselina); 9 - Δ^9-THC (Δ^9-tetrahidrokanabinol); 10 – CBNA (kanabinolna kiselina); 11 – CBD (kanabidiol); 12 – Δ^9-THCA (Δ^9-tetrahidrokanabinolna kiselina); 13 – CBCA (kanabikromenska kiselina)

3.2. REGULATORNI STATUS MEDICINSKE KONOPLJE

3.2.1. Regulatorni status medicinske konoplje u europskim državama tijekom proteklog desetljeća

U razdoblju između 2012. i 2021. godine, 41 država u svijetu (27 u Europi, 23 u Europskoj uniji), zakonski je regulirala primjenu konoplje i proizvoda na bazi konoplje za medicinsku uporabu. U 50 država diljem svijeta konoplja se koristi u industrijske svrhe. Europska regulativa dopušta uzgoj i industrijsku primjenu sorti konoplje s udjelom THC-a koji ne prelazi 0,2 %. Za osobnu uporabu nije dopušten uzgoj i korištenje konoplje s udjelom THC-a većim od 0,2 %, uz iznimku Nizozemske, međutim, njezina primjena je dekriminaliziran u 16 država Europske unije (1, 24, 52). Većina država članica Europske unije danas dopušta ili razmatra mogućnost uporabe konoplje ili kanabinoida u medicinske svrhe (53). No, pravni okvir koji regulira medicinsku primjenu konoplje je različit za svaku državu. Problem zakonske regulative i ujednačavanja na razini Europske unije prepoznalli su i zastupnici u Europskom parlamentu. Stoga je pitanje o usklađenosti primjene medicinske konoplje upućeno Europskoj komisiji 2018. godine (54). Slika 15 donosi prikaz iz 2023. godine na kojem je razvidna razlika u regulativi primjene konoplje u medicinske svrhe među zemljama Europske unije. Republika Hrvatska je označena kao zemlja koja dopušta medicinsku primjenu biljne droge Cannabis flos i odgovarajućih proizvoda prema specifičnim regulatornim zahtjevima (55).



Slika 15. Grafički prikaz regulatornog statusa medicinske konoplje u Europi 2023. (Prilagođeno prema [56]).

U nekim europskim državama medicinska konoplja aktivno se propisuje u obliku magistralnih lijekova kako bi se povećala dostupnost lijekova te personalizirala njihova primjena. Prva ih je počela primjenjivati Nizozemska, a zatim su je počele slijediti i druge članice, među kojima se danas ističe Njemačka. Regulatorni okvir za odobrenje medicinske konoplje i distribucija pacijentima u državama članicama Europske unije nije usklađena jer postoje različiti nacionalni propisi koji ograničavaju distribuciju medicinske konoplje (23). Slika 16 prikazuje lijekove na bazi medicinske konoplje i kanabinoida prisutni na tržištu Europske unije (2).

Slika 16. Podjela lijekova na bazi medicinske konoplje koji su prisutni u Europskoj uniji (Prilagođeno prema *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*)

Dana 13. veljače 2019. godine, Europski parlament usvojio je Rezoluciju o primjeni konoplje u medicinske svrhe koju je podnio Odbor za okoliš, javno zdravlje i sigurnost hrane. U rezoluciji se navodi da kanabinoidi iz medicinske konoplje mogu pomoći u smanjenju određenih simptoma kao što su kronična bol, upala ili bakterijske infekcije te da mogu potaknuti rast kostiju. Postoje dokazi da medicinska konoplja ili kanabinoidi mogu pozitivno djelovati na povećanje apetita i smanjenje gubitka tjelesne mase povezanog s HIV/AIDS-om, ublažiti simptome psihoze, Touretteovog sindroma, epilepsije, Alzheimerove bolesti, artritisa, astme, karcinoma i Crohnove bolesti. U Rezoluciji je istaknuto da se države članice razlikuju u pristupu zakonodavstvu o medicinskoj primjeni konoplje, kao što je najveća dozvoljena koncentracija THC-a i CBD-a ili indikacije za primjenu, pri čemu se legalizacija u rekreativne svrhe često neopravdano miješa s medicinskom primjenom u potrebitih bolesnika (57).

Europski parlament u Rezoluciji poziva Europsku komisiju i zemlje članice da razmotre regulatorne, financijske i kulturne prepreke koje opterećuju istraživanje konoplje i kanabinoida

te njihove mogućnosti primjene u medicinske svrhe. Od država članica zatraženo je da se liječnicima prepusti profesionalna prosudba pri propisivanju odobrenih lijekove na bazi medicinske konoplje za bolesnike s relevantnim stanjima te omogući ljekarnicima da zakonito izdaju lijekove na recept.

Kroz Rezoluciju, Europski parlament poziva Europsku komisiju da:

- u radu s nacionalnim tijelima donese pravno odgovarajuće definicije medicinske konoplje te postavi jasnu razliku između lijekova na bazi medicinske konoplje koje je odobrila Europska agencija za lijekove (EMA) ili druge regulatorne agencije i medicinske konoplje, čija uporaba nije utemeljena na kliničkim dokazima te druge primjene konoplje, primjerice u industriji ili u rekreativne svrhe;
- izradi sveobuhvatnu strategiju u svrhu osiguranja najviših standarda za neovisno istraživanje, razvoj, odobravanje, stavljanje na tržište i farmakovigilanciju te izbjegavanja zlouporabe proizvoda na bazi konoplje;
- uspostavi mrežu koja će objediniti EMA-u i Europski centar za praćenje droga i ovisnosti o drogama (EMCDDA) te nadležna nacionalna tijela, organizacije pacijenata, civilno društvo, socijalne partnere, organizacije potrošača, zdravstvene djelatnike, nevladine organizacije i ostale relevantne dionike, da bi se omogućila učinkovita implementacija strategije o primjeni medicinske konoplje;
- radi s državama članicama na omogućavanju jednakog pristupa lijekovima na bazi medicinske konoplje i da, gdje je to primjenjivo, lijekovi koji su učinkoviti u liječenju specifičnih stanja budu pokriveni programima zdravstvenog osiguranja na isti način kao i drugi lijekovi;

- radi s državama članicama na tome da samo siguran i kontroliran biljni materijal medicinske konoplje može biti u obliku proizvoda koji su prošli kroz klinička ispitivanja, regulatornu procjenu i odobrenje;
- osigura istraživanje i uporaba medicinske konoplje u Europskoj uniji na način koji ne pogoduje kriminalnim mrežama droga niti dovodi do njihova proširenja.

Kroz Rezoluciju, Europski parlament poziva zemlje članice da:

- preispitaju svoje relevantno zakonodavstvo o uporabi lijekova na bazi medicinske konoplje kada znanstvena istraživanja pokažu da se isti pozitivni učinak ne može postići korištenjem konvencionalnih lijekova koji ne izazivaju ovisnost;
- omoguće pacijentima siguran i ravnopravan izbor između različitih vrsta lijekova na bazi medicinske konoplje te da ih tijekom liječenja prate specijalizirani medicinski stručnjaci;
- osiguraju dostupnost lijekova na bazi medicinske konoplje koji zadovoljavaju stvarne potrebe, bilo proizvodnjom u skladu s nacionalnim medicinskim standardima ili uvozom koji je u skladu s nacionalnim zahtjevima za lijekove na bazi medicinske konoplje;
- omoguće medicinskim stručnjacima odgovarajuće medicinsko obrazovanje u svrhu stjecanja znanja o medicinskoj konoplji na temelju neovisnih i širokih znanstvenih istraživanja (57).

3.2.2. Odobrenje za stavljanje u promet lijekova na bazi medicinske konoplje

Lijekovi na bazi medicinske konoplje i kanabinoida moraju imati dozvolu za primjenu u liječenju i proći registracijski postupak pri nadležnim Europskim ili nacionalnim regulatornim tijelima. Posjedovanje odobrenja za stavljanje u promet znači da je zahtjev za lijek podnesen regulatornom tijelu i da je nakon ocjene prijave, regulatorno tijelo dodijelilo autorizaciju. Ovo

obično implicira da je lijek prošao opsežna klinička ispitivanja i da lijek ima dokaze o sigurnosti i učinkovitosti primjene. Regulatorna tijela također uzimaju u obzir može li se lijek proizvesti do tražene razine kvalitete (54).

U Europskoj uniji lijek za primjenu u ljudi može odobriti ili Europska komisija kroz centralizirani postupak ili nacionalna nadležna tijela kroz uzajamno priznavanje, decentralizirani ili nacionalni postupak. Prilikom podnošenja zahtjeva za odobrenje za stavljanje u promet, tvrtke moraju dostaviti dokumentaciju koja dokazuje da je proizvod odgovarajuće kvalitete, sigurnosti i učinkovitosti (58). Dokumentacija za odobrenje za stavljanje lijeka u promet mora biti pripremljena u skladu s Prilogom 1. Direktive 2001/83/EZ, uzimajući u obzir relevantne znanstvene smjernice i pravnu osnovu koju je odabrao podnositelj zahtjeva (59). Na ovaj način odobreni su svi trenutačno dostupni lijekovi na bazi kanabinoida u Europi, bili oni sintetskog porijekla ili ekstrahirani i pročišćeni iz biljnog materijala.

Biljni lijek može doći na tržište Europske unije putem ocjene cjelovite dokumentacije u standardnom registracijskom postupku ili putem pojednostavljenog registracijskog postupka, ako je zadovoljio zahtjeve provjerene medicinske uporabe odnosno dugotrajne tradicionalne primjene (59).

Biljni lijek s provjerenom medicinskom primjenom

Standardna dokumentacija zahtjeva za odobrenje za stavljanje lijeka u promet mora sadržavati rezultate nekliničkih i kliničkih ispitivanja za dokazivanje sigurnosti i učinkovitosti novog lijeka. Međutim, moguće je dokazati učinkovitost i sigurnost primjene lijeka putem objavljene znanstvene literature kao dijela zahtjeva za odobrenje za stavljanje u promet. Predmetna zakonska osnova za davanje odobrenja temelji se na članku 10.a Direktive 2001/83/EZ, a podrazumijeva da djelatna tvar ima provjerenu medicinsku uporabu u EU kroz

period od najmanje 10 godina. Nadležno regulatorno tijelo izdat će odobrenje za stavljanje u promet ako temeljitom procjenom priložene dokumentacije utvrdi da su ispunjeni svi zakonski uvjeti, odnosno da je kvaliteta, sigurnost i djelotvornost primjereno dokazana te da se omjer koristi i rizika dotičnog lijeka smatra pozitivnim u primijenjenoj terapijskoj indikaciji. Na taj način pojednostavljuje se postupak stavljanja gotovog lijeka u promet jer nije potrebno provoditi klinička ispitivanja te se na taj način povećava dostupnost određenih lijekova. Izrada monografija za lijekove provjerene medicinske primjene za tvari ili pripravke dobivene od medicinske konoplje moguća je ako su ispunjeni zahtjevi iz članka 10.a Direktive 2001/83/EZ. Rezultate nekliničkih ili kliničkih ispitivanja moguće je zamijeniti detaljnim referencama na objavljenu znanstvenu literaturu ako se može dokazati da su djelatne tvari lijeka bile u uporabi unutar EU, najmanje 10 godina, s priznatom učinkovitošću i prihvatljivom razinom sigurnosti.

Tradicionalni biljni lijek

Biljni lijekovi koji se koriste više od 30 godina (uključujući najmanje 15 godina u EU), a koji su namijenjeni za upotrebu bez nadzora liječnika i koji se ne daju injekcijom, mogu se odobriti u skladu sa zahtjevima navedenim u Direktivi o tradicionalnim biljnim lijekovima (Direktiva 2004/24/EZ) (60). Tradicionalni biljni lijekovi moraju opravdati dugu povijest medicinske uporabe i iskustva u EU kako bi pokazali uvjerljivu učinkovitost i prihvatljivu razinu sigurnosti umjesto provođenja novih kliničkih ispitivanja kao i indikacije primjerene samoliječenju jer se odobravaju u bezreceptnom statusu od strane nacionalnih nadležna tijela (55). Navedeni regulatorni zahtjevi kao i jedinstvena konvencija UN-a o opojnim drogama iz 1961. predstavljaju izazov u registraciji lijekova i pripravaka od medicinske konoplje kao tradicionalnih biljnih lijekova i uspostavi EU monografije tradicionalnog biljnog lijeka za tvari dobivene od konoplje ili njezine pripravke (55).

Monografije biljnih droga Europske agencije za lijekove

Monografija Europske agencije za lijekove (EMA) koja se odnosi na biljne droge sadrži znanstveno mišljenje Povjerenstva za biljne lijekove (*The Committee on Herbal Medicinal Products*, HMPC) o podacima o sigurnosti i učinkovitosti biljnih tvari i njezinih pripravaka namijenjenih medicinskoj uporabi. HMPC procjenjuje sve dostupne informacije, uključujući nekliničke i kliničke podatke, kao i dokumentiranu dugogodišnju uporabu i iskustvo u Europskoj uniji. EMA-ine monografije ne treba poistovjećivati s monografijama Europske farmakopeje koje pokrivaju zahtjeve kvalitete za širok spektar ljekovitih tvari, uključujući biljne tvari i pripravke. U zahtjevima za odobrenje za stavljanje biljnog lijeka u promet moguće je upućivanje na postojeće EMA-ine monografije. Za ostale lijekove biljnog podrijetla sa samostalnim kemijskim entitetom kao novom djelatnom tvari, izrada EU monografije za biljni lijek pri EMA-i nije primjenjiva (55, 61). Pri procjeni sigurnosti i učinkovitosti djelatne tvari od iznimne je važnosti da je tvar dobro definirana. Objavljene studije moraju sadržavati opis kvalitete određene ispitivane biljne tvari, konoplje ili njezinog pripravka. Nedovoljni podaci o kvaliteti ispitivanih biljnih tvari i sastavu proizvoda ne dopuštaju konačnu ocjenu njihove sigurnosti i učinkovitosti. Sve navedene aspekte treba procijeniti prije nego što HMPC donese zaključak o uključivanju specifičnih terapijskih indikacija za određene biljne tvari ili njihove pripravke u biljnu monografiju. HMPC je u veljači 2023. objavio poziv za dostavu odabranih specifičnih znanstvenih podataka koji se mogu koristiti u procjeni biljne droge Cannabis flos od biljne vrste *Cannabis sativa* L. (62).

3.2.3. Regulatorni status medicinske konoplje i dostupnost pripravaka u Republici Hrvatskoj

Republika Hrvatska je još 2015. godine, izmjenama Pravilnika o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova na recept (Narodne novine, br. 86/13, 90/13 - ispravak, 102/14, 107/15 i 72/16) omogućila legalnu primjenu i dostupnost gotovih lijekova i pripravaka na bazi medicinske konoplje pacijentima oboljelima od multiple skleroze, karcinoma, određenih najtežih oblika epilepsije i AIDS-a. Gotovi lijekovi i pripravci u obliku uljne otopine dostupni su od 2015. godine na hrvatskom tržištu i izdaju se u ljekarnama na recept izabranog liječnika u primarnoj zdravstvenoj zaštiti, temeljem preporuke liječnika specijalista (63).

Temeljem Pravilnika o izmjenama i dopunama pravilnika o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova na recept propisano je da se lijekovi koji sadrže THC, dronabinol i nabilon mogu propisivati za ublažavanje tegoba kod multiple skleroze, karcinoma, epilepsije i AIDS-a. Doktori medicine obvezni su na recept za magistralni pripravak propisati količinu THC-a za pojedinačnu dozu, vrstu biljne droge i biljnog pripravka iz kojeg će se izraditi magistralni pripravak, broj pojedinačnih doza, ljekoviti oblik, doziranje i način primjene. Nadalje, lijekovi koji sadrže THC mogu se propisivati na recept u količini potrebnoj za liječenje do najviše 30 dana. Ukupna količina propisanog THC-a za 30 dana liječenja ne smije biti veća od 7,5 g. Polazne supstance za izradu magistralnih i galenskih pripravaka trebaju biti standardizirani, odnosno imati utvrđenu količinu THC-a. Količinu biljnog pripravka potrebnu za izradu magistralnog pripravka odrediti će magistar farmacije prilikom izrade pripravka uzimajući u obzir utvrđenu količinu THC-a u biljnom pripravku i propisanu dozu THC-a (63). Magistralni pripravak se izrađuje u laboratoriju ljekarne prema standardnoj recepturi iz stručnih farmaceutskih priručnika ili farmakopeje poštujući smjernice dobre ljekarničke

prakse. Prije izradbe pripravka potrebno je kontrolirati dozu i kompatibilnost sastavnica. Supstancije koje se koriste u izradbi pripravka (ljekovite supstancije – remedia i pomoćne tvari – excipientia) te ambalaža (spremnici) moraju biti kakvoće propisane farmakopejskim i drugim stručnim propisima. Prilikom prijema ljekovitih supstancija i ambalaže, ljekarnik mora provesti potvrdu identiteta i ispitivanje ispravnosti i kakvoće. Prilikom izdavanja pripravaka, ljekarnik mora utvrditi prelazi li trajanje terapije rok ispravnosti i stabilnosti magistralnog pripravka (64).

Zakonom o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (Narodne novine, broj 39/19), koji je donesen na 11. sjednici Hrvatskoga sabora 5. travnja 2019. godine, omogućio se uzgoj i proizvodnja konoplje u medicinske svrhe. Odobrenje za uzgoj konoplje u medicinske svrhe Ministarstvo zdravstva izdaje pravnim osobama koje imaju proizvodnu dozvolu Agencije za lijekove i medicinske proizvode, za proizvodnju lijeka ili djelatne tvari sukladno Zakonu o lijekovima (Narodne novine, br. 76/13, 90/14 i 100/18). Navedenom odredbom, lijekove i pripravke na bazi medicinske konoplje namjerava se pacijentima u Republici Hrvatskoj učiniti dostupnijima. Prema navedenom zakonu očekuje se Pravilnik kojim će ministar nadležan za zdravstvo propisati način i mjerila za davanje odobrenja za uzgoj i proizvodnju konoplje u medicinske svrhe sukladno Zakonu o lijekovima uz suglasnost ministra nadležnog za poljoprivredu i ministra nadležnog za unutarnje poslove (65).

Uvidom u HALMED-ovu bazu lijekova vidljivo je da trenutačno nema odobrenih biljnih lijekova na bazi medicinske konoplje u Hrvatskoj, međutim postoji registriran lijek centraliziranim postupkom s kanabidiolom kao djelatnom tvari. Djelatna tvar se dobiva postupkom izolacije i pročišćavanja iz mljevenog biljnog materijala, a uklapa se u farmaceutski oblik oralne otopine koncentracije 100 mg/mL. Lijek je indiciran kao dodatna terapija napadaja povezanih s Lennox-

Gastautovim sindromom ili Dravetovim sindromom u kombinaciji s klobazamom u bolesnika u dobi od 2 ili više godina te kao dodatna terapija napadaja povezanih s kompleksom tuberozne skleroze u bolesnika u dobi od 2 ili više godina (66).

4. RASPRAVA

Pregledom znanstvene literature na temu kvalitativne i kvantitativne analize kanabinoida biljne vrste *Cannabis sativa L.* može se primijetiti intenzivan razvoj analitičkih metoda specifičnih za analizu sastava različitih pripravaka na bazi medicinske konoplje. Taj razvoj vremenski korelira sa sve većim brojem provedenih kliničkih studija, a time i kliničkih dokaza za terapijsku primjenu medicinske konoplje.

Fitokemijski sastav konoplje vrlo je složen, što predstavlja izazov u razvoju analitičkih metoda koje bi osiguravale potpunu karakterizaciju biljnih tvari i biljnih pripravaka na bazi medicinske konoplje. Da bi razvoj analitičkih metoda bio koristan i primjenjiv za farmaceutsku analizu, potrebno je identificirati terapijski važne sastavnice za koje imamo dokazan farmakološki učinak. Znanstvene publikacije opisuju analitičke metode koje možemo podijeliti s obzirom na svrhu analize i vrstu analita. Plinska kromatografija vrlo često koristi za utvrđivanje kromatografskog profila fitokanabinoida i terpena u biljnom materijalu. Nedostatak ove tehnike je u potrebnom koraku derivatizacije, što poskupljuje cijeli postupak te unosi potencijalne pogreške u određivanju sadržaja. Najviše upotrebljavane tehnike su tankoslojna i tekućinska kromatografija, što je očekivano zbog njihove nezamjenjive uloge u analizi biljnih uzoraka. Tankoslojna kromatografija (TLC) i tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (HPTLC) su pogodne su tehnike za brzu i jednostavnu kvalitativnu i polukvantitativnu analizu. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je najčešće korištena tehnika za identifikaciju i određivanje fitokanabinoida u neutralnom i kiselom obliku (24).

Osnove za ujednačenu kontrolu kakvoće biljnih tvari, pripravaka i lijekova na bazi medicinske konoplje na razini EU postavljene su u farmakopejskoj monografiji Cannabis flos u Europskoj Farmakopeji koja je uspostavljena u srpnju 2024. godine, a temelji se na dotadašnjim

nacionalnim monografijama droge Cannabis flos iz njemačke, švicarske i nizozemske farmakopeje, kao i mnogobrojnim objavljenim znanstvenim publikacijama.

Europska farmakopeja definira drogu „Konopljin cvijet“ kao osušene, cijele ili fragmentirane potpuno razvijene cvatove ženske biljke *Cannabis sativa L*. U monografiji su definirana tri različita kemotipa biljne droge ovisno o udjelima tetrahidrokanabinola i kanabidiola. Fitokemijska identifikacija biljne droge Cannabis flos provodi se primjenom tankoslojne kromatografije visoke djelotvornosti. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koristi se za određivanje sadržaja tetrahidrokanabinola i kanabidiola, te za ispitivanje čistoće ispitivanjem udjela kanabinola (48).

S regulatornog aspekta, svi lijekovi na bazi medicinske konoplje i kanabinoida moraju imati dozvolu za primjenu u liječenju, odnosno proći registracijski postupak pri nadležnim Europskim ili nacionalnim regulatornim tijelima, što podrazumijeva ocjenu potrebne dokumentacije kako bi se ustanovila djelotvornost, sigurnost i kakvoća lijeka (54).

Svi trenutačno dostupni lijekovi na bazi kanabinoida u Europi odobreni su putem ocjene cjelovite dokumentacije u standardnom registracijskom postupku. Na tržištu Europske unije postoji registriran biljni lijek na bazi medicinske konoplje u obliku spreja za usnu sluznicu. Registraciju biljnih lijekova na bazi medicinske konoplje bitno bi olakšala izrada biljne monografije Europske agencije za lijekove za koju je postupak prikupljanja relevantnih znanstvenih podataka u tijeku. Navedena monografija omogućit će bržu registraciju lijekova putem pojednostavljenih postupaka na temelju provjerene medicinske upotrebe ili tradicionalne primjene. Očekivano je da se uvjeti za tradicionalnu primjenu medicinske konoplje u skorije vrijeme neće moći ispuniti s obzirom na zahtijevano vrijeme tradicionalne upotrebe koji iznosi sveukupno 30 godina i najmanje 15 godina u EU te indikacije koje za

tradicionalnu primjenu moraju biti primjerene samoliječenju (60). Budući da se tradicionalni biljni lijekovi izdaju bez liječničkog recepta, potencijalna zloupotreba lijeka možebitno nadmašuje koristi od veće dostupnosti lijeka ukoliko bi se na tržištu pojavio lijek s navedenim režimom izdavanja.

Republika Hrvatska je 2015. godine omogućila legalnu primjenu gotovih lijekova i pripravaka na bazi medicinske konoplje za određene medicinske indikacije. Temeljem Pravilnika o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju i izdavanju lijekova na recept propisano je da lijekovi koji sadrže THC, dronabinol i nabilon mogu propisivati na recept za izradu magistralnog pripravka (63). U ovom trenutku u Republici Hrvatskoj nije dostupna polazna supstanca od koje bi se mogao izraditi magistralni pripravak, ali je dostupan gotovi lijek s kanabidiolom u obliku oralne otopine čija je koncentracija 100 mg/mL.

5. ZAKLJUČCI

Bez obzira na velik broj postojećih metoda za analizu fitokanabinoida i terpena u medicinskoj konoplji, postoji potreba za razvojem novih. Te bi metode trebale biti brze, jednostavne, robusne i isplative da ih mogu koristiti istraživački laboratoriji i male tvrtke u svrhu kontrole kvalitete. Naglasak bi trebao biti na razvoju metoda s ciljem određivanja što većeg broja različitih sastavnica u biljnom materijalu. Na taj bi se način unaprijedila kontrola uzgoja konoplje, osiguranje kvalitete biljne droge i razlikovanje sorti konoplje.

Uvrštavanje monografije biljne droge konopljin cvijet (Cannabis flos) u Europsku farmakopeju predstavlja značajan iskorak u osiguranju kakvoće lijekova i pripravaka od medicinske konoplje. Time se usklađuje provođenje kontrole kakvoće između država članica EU i svih onih koji koriste Europsku farmakopeju kao skup važećih propisa za osiguranje kvalitete lijekova. Zbog povijesnih okolnosti, dinamika odobravanja medicinske upotrebe konoplje značajno je različita u pojedinim državama Europe. Donošenje Rezolucije o upotrebi konoplje u medicinske svrhe Europskog parlamenta iz 2019. godine predstavlja napredak u postizanju usklađenosti regulatornog statusa na razini Europe.

U Republici Hrvatskoj dozvoljena je upotreba konoplje za određene medicinske indikacije. Dozvoljen je uzgoj medicinske konoplje, uz dozvolu Agencije za lijekove i medicinske proizvode. Regulatorni okvir za uzgoj i upotrebu medicinske konoplje u Hrvatskoj je dostatan i u velikoj mjeri usklađen s ostalim državama članicama EU. Može se unaprijediti donošenjem dodatnih provedbenih propisa. Dostupnost lijekova i pripravaka na bazi konoplje u RH je mala. Pitanje dostupnosti lijekova i pripravaka na bazi konoplje kompleksnije je naravi jer ovisi o čimbenicima koji nisu izravno vezani uz regulatorni okvir.

6. LITERATURA

1. United Nations Office on Drugs and Crime. Single convention on narcotic drugs, 1961. Dostupno na: https://www.unodc.org/pdf/convention_1961_en.pdf. Pristupljeno: 25. srpnja 2024.
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction 2018. Cannabis legislation in Europe: an overview. Dostupno na: https://www.euda.europa.eu/publications/adhoc/cannabis-legislation-europe_en. Pristupljeno 15. srpnja 2023.
3. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. Pharmacother 2013;33(2):195-209.
4. Leinen ZJ, Mohan R, Premadasa LS, Acharya A, Mohan M, Byrareddy SN. Therapeutic potential of cannabis: a comprehensive review of current and future applications. Biomedicines 2023; 11(10):2630.
5. American Herbal Pharmacopeia. Cannabis inflorescence (Revision 2014). Dostupno na: https://herbal-ahp.org/online-ordering-cannabis-inflorescence-qc-monograph/. Pristupljeno: 18. srpnja 2023.
6. Small E. Evolution and classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in relation to human utilization. Bot Rev 2015;81(3):189-294.
7. Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Kindl M. Phytochemical aspects and therapeutic perspective of cannabinoids in cancer treatment. U: Badria FA, ur. Natural products and cancer drug discovery. Rijeka: InTech, 2017;111-139.
8. Howlett AC, Abood ME. CB_1 and CB_2 receptor pharmacology. Adv Pharmacol 2017;80:169-206.
9. Hazekamp A, Fischedick JT. Cannabis - from cultivar to chemovar. Drug Test Anal 2012;4(7-8):660-667.
10. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. Br J Pharmacol 2006;147 (1):163-171.
11. Russo EB. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. Br J Pharmacol 2011;163(7):1344-1364.
12. Elzinga S, Fischedick J, Podkolinski R and Raber JC. Cannabinoids and terpenes as chemotaxonomic markers in cannabis. Nat Prod Chem Res 2015;3(4):1-9.

13. Hood LV, Dames ME, Barry GT. Headspace volatiles of marijuana. Nature 1973;242:402-403.
14. Buchbauer G. Biological activities of essential oils. U: Hüsnü Can Baser K, Buchbauer G, ur. Handbook of essential oils: Science, technology, and applications. Boca Raton: CRC Press, 2010;235-280.
15. Russo E. History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. Chem Biodivers 2007;4(8):1614-1648.
16. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske. Primjena indijske konoplje u liječenju-zaključci povjerenstva. Dostupno na: https://zdravstvo.gov.hr/istaknute-teme/primjena-indijske-konoplje-u-lijecenju/zakljuccipovjerenstva/1990. Pristupljeno: 12. kolovoza 2023.
17. Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S i sur. Cannabinoids for medical use: A systematic review and meta analysis. JAMA 205;313(24):2456 73.16. McPartland J, Russo E. Cannabis and Cannabis extracts: Greater than the sum of their parts? J Cannabis Therapeutics 2001;1(3):103-132.
18. Hädener M, König S, Weinmann W. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. Forensic Sci Int 2019;299:142-150.
19. Jambo H, Dispas A, Avohou HT i sur. Implementation of a generic SFC-MS method for the quality control of potentially counterfeited medicinal cannabis with synthetic cannabinoids. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2018;1092:332-342.
20. Hädener M, König S, Weinmann W. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. Forensic Sci Int 2019;299:142-150.
21. Nahar L, Guo M, Sarker SD. Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. Phytochem Anal 2020;31(2):135-146.
22. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Hrvatska farmakopeja 2007 s komentarima. Dostupno na: https://farmakopeja.halmed.hr Pristupljeno 20. kolovoza 2024.
23. European Medicines Agency. Quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products - scientific guideline. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/quality-herbal-medicinal-products-traditional-herbal-

medicinal-products-scientific-guideline#document-history-revision-3-8120. Pristupljeno: 25. srpnja 2024.

24. Stefkov G, Cvetkovikj Karanfilova I, Stoilkovska Gjorgievska V, Trajkovska A, Geskovski N, Karapandzova M, Kulevanova S. Analytical techniques for phytocannabinoid profiling of Cannabis and Cannabis-based products - A comprehensive review. Molecules 2022;27(3):975.
25. Nahar L, Guo M, Sarker SD. Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade. Phytochem Anal 2020;31(2):135-146.
26. Franchina FA, Dubois LM, Focant JF. In-depth Cannabis multiclass metabolite profiling using sorptive extraction and multidimensional gas chromatography with low- and high-resolution mass spectrometry. Anal Chem 2020;92(15):10512-10520.
27. Citti C, Braghiroli D, Vandelli MA, Cannazza G. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. J Pharm Biomed Anal 2018;147:565-579.
28. Welling MT, Liu L, Hazekamp A, Dowell A, King GJ. Developing robust standardised analytical procedures for cannabinoid quantification: Laying the foundations for an emerging cannabis-based pharmaceutical industry. Med Cannabis Cannabinoids 2019;2(1):1-13.
29. Pourseyed Lazarjani M, Torres S, Hooker T, Fowlie C, Young O, Seyfoddin A. Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. J Cannabis Res 2020;2(1):35.
30. Cardenia V, Gallina Toschi T, Scappini S, Rubino RC, Rodriguez-Estrada MT. Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. J Food Drug Anal 2018;26(4):1283-1292.
31. Levin S, Abulafi S, Zahalka J, Mechoulam R. Resolution of chiral cannabinoids on amylose tris(3, 5-Dimethylphenylcarbamate) chiral stationary-phase − effects of structural features and mobile-phase additives. J Chromatogr A 1993;654(1):53-64.
32. Hanus LO, Tchilibon S, Ponde DE, Breuer A, Fride E, Mechoulam R. Enantiomeric cannabidiol derivatives: synthesis and binding to cannabinoid receptors. Org Biomol Chem 2005;3:1116-1123.
33. Cannazza G, Carrozzo MM, Battisti U, Braghiroli D, Parenti C. On-line racemization by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 2009;1216(30):5655-5659.

34. Cannazza G, Carrozzo MM, Braghiroli D, Parenti C. Enantiomerization of chiral 2,3,3a,4-tetrahydro-1H-pyrrolo[2,1-c][1,2,4]benzothiadiazine 5,5-dioxide by stopped-flow multidimensional HPLC. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci 2008;875(1):192-199.
35. Giese MW, Lewis MA, Giese L, Smith KM. Development and validation of a reliable and robust method for the analysis of cannabinoids and terpenes in cannabis. J AOAC Int 2015;98:1503-1522.
36. Tose LV, Santos NA, Rodrigues RRT i sur. Isomeric separation of cannabinoids by UPLC combined with ionic mobility mass spectrometry (TWIM-MS)-Part I. Int J Mass Spectrometry 2017;418:112-121.
37. Nahar L, Sarker SD. Guest editorial: UPLC in phytochemical analysis. Trends Phytochem Res 2019;3:1-2.
38. Chen M, Wen SS, Wang R i sur. Advanced development of supercritical fluid chromatography in herbal medicine analysis. Molecules 2022;27(13):4159.
39. Wang M, Wang YH, Avula B i sur. Decarboxylation study of acidic cannabinoids: A novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry. Cannabis Cannabinoid Res 2016;1:262-271.
40. Bäckström B, Cole MD, Carrott MJ, Jones DC, Davidson G, Coleman K. A preliminary study of the analysis of cannabis by supercritical fluid chromatography with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectroscopic detection. Sci Justice 1997;37:91-97.
41. Wang M, Wang YH, Avula B i sur. Quantitative determination of cannabinoids in cannabis and cannabis products using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography and diode array/mass spectrometric detection. J Forensic Sci 2017;62:602-611.
42. Deidda R, Coppey F, Damergi D i sur. New perspective for the in-field analysis of cannabis samples using handheld near-infrared spectroscopy: A case study focusing on the determination of Δ9-tetrahydrocannabinol. J Pharm Biomed Anal 2021;202:114150.
43. Callado CS, Núñez-Sánchez N, Casano S, Ferreiro-Vera C. The potential of near infrared spectroscopy to estimate the content of cannabinoids in Cannabis sativa L.: A comparative study. Talanta 2018;190:147-157.
44. Hazekamp A, Choi YH, Verpoorte R. Quantitative analysis of cannabinoids from *Cannabis sativa* using 1H-NMR. Chem Pharm Bull 2014;52(6):718-21.

45. Liu Y, Brettell TA, Victoria J, Wood MR, Staretz ME. High performance thin layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts. Forensic Chemistry 2020;19:100249.
46. Perlego. Handbook of thin-layer chromatography. Dostupno na: https://www.perlego.com/book/1828851/handbook-of-thinlayer-chromatography-pdf. Pristupljeno 20. kolovoza 2024.
47. Fischedick JT, Glas R, Hazekamp A, Verpoorte R. A qualitative and quantitative HPTLC densitometry method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. Phytochem Anal 2009;20(5):421-426.
48. European Pharmacopoeia online. Supplement 11.5. The monograph on Cannabis flower (3028). Dostupno na: https://pheur.edqm.eu/subhome/11-5. Pristupljeno: 20. kolovoza 2024.
49. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. Outcome of the 176th session of the European Pharmacopoeia Commission. Dostupno na: https://www.edqm.eu/en/-/outcome-of-the-176th-session-of-the-european-pharmacopoeia-commission-june-2023-2. Pristupljeno: 10. srpnja 2024.
50. European Compliance Academy. Ph. Eur. Monographs for Cannabis Flower and CBD adopted. Dostupno na: https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/ph-eur-monographs-for-cannabis-flower-and-cbd-adopted. Pristupljeno: 10. srpnja 2024.
51. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare. Ph. Eur. Pre-publishes Cannabis flower monograph on the EDQM website. Dostupno na: https://extranet.edqm.eu/4DLink1/pdfs/chromatos/3028.pdf. Pristupljeno: 10. srpnja 2024.
52. Abuhasira R, Shbiro L, Landschaft Y. Medical use of cannabis and cannabinoids containing products - Regulations in Europe and North America. Eur J Intern Med 2018;49:2-6.
53. Knöss W, van de Velde M, Sandvos C, Cremer-Schaeffer P. Schlüsselelemente der rechtlichen Rahmenbedingungen für die medizinische nutzung von cannabis in verschiedenen Ländern. Bundesgesundheitsbla. 2019;62(7):855-860.
54. European parliament. Use of cannabis for medicinal purposes - Question for oral answear O-000122/2018. Dostupno na:

https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/O-8-2018-000122_EN.html. Pristupljeno: 19. srpnja 2023.

55. European Medicines Agency: Herbal medicinal products. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/herbal-medicinal-products Pristupljeno: 10. srpnja 2024.
56. 3rd Conference Medical Cannabis Europe. Dostupno na: https://medicalcannabiseurope.pt/en/. Pristupljeno: 25. srpnja 2024.
57. European parliament. Resolution on use of cannabis for medicinal purposes. Dostupno na: https://oeil.secure.europarl.europa.eu/oeil/popups/ficheprocedure.do?lang=en&reference=2018/2775(RSP). Pristupljeno: 19. srpnja 2023.
58. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Postupak odobravanja lijeka. Dostupno na: https://www.halmed.hr/Lijekovi/Informacije-o-lijekovima/Postupak-odobravanja-lijeka. Pristupljeno: 19. srpnja 2023.
59. Službeni list Europske Unije L 311/67. Direktiva 2001/83/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. studenoga 2001. o zakoniku Zajednice o lijekovima za humanu primjenu Dostupno na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0083&from=LV. Pristupljeno 20. kolovoza 2024.
60. Službeni list Europske unije L 136/85. Direktiva 2004/24/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 31. ožujka 2004. o izmjeni Direktive 2001/83/EZ o zakoniku Zajednice koji se odnosi na lijekove za humanu primjenu u pogledu tradicionalnih biljnih lijekova Dostupno na: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=CELEX:32004L0024. Pristupljeno 20. kolovoza 2024.
61. European Commision Public Health. EU Union Register of Medicinal Products - Frequently Asked Questions. Svibanj 2019. Dostupno na: https://health.ec.europa.eu/index_en. Pristupljeno: 26. srpnja 2024.
62. European Medicines Agency. Call for scientific data for use in HMPC assessment work on Cannabis sativa L. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-call-data/call-scientific-data-use-hmpc-assessment-work-cannabis-sativa-l-flos-cannabis-sativa-flowering-tops_en.pdf. Pristupljeno: 25. kolovoza 2023.
63. Narodne novine, br. 107/15. Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravlinika o mjerilima za razvrstavanje lijekova te o propisivanju lijekova na recept Dostupno na:

https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_10_107_2092.html. Pristupljeno: 20. kolovoza 2024.

64. Hrvatska ljekarnička komora. Pročišćeni tekst Pravila dobre ljekarničke prakse. Dostupno na: https://www.hljk.hr/storage/upload/reading_articles/Pravila_dobre_ljekarnicke_prakse_-_procisceni_tekst_14251.pdf. Pristupljeno: 25. kolovoza 2023.
65. Narodne novine, br. 39/19. Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_04_39_799.html. Pristupljeno 20. kolovoza 2024.
66. European Medicines Agency. Sažetak opisa svojstava lijeka Epidyolex. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/epidyolex. Pristupljeno: 3. kolovoza 2023.