



РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА
УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВОСКОПЈЕ
УНИВЕРЗИТЕТСКА ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ
СТУДИИ

ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
СТУДЕНТСКА ПРАШАЊА

ОП-ГК

Број:
Датум: 21.10.2021 година
Скопје

До
Фармацевтски факултет во Скопје
Совет на студиската програма по фармација

ПРИЈАВА

за учество на годишна конференција во IV (четврти) семестар во академска 2021/2022 година

Студент	Тијана Серафимовска
Број на индекс	70
Ментор	Проф. д-р Јасмина Тониќ Рибарска
Студиска програма	ФАРМАЦИЈА
Студиска подпрограма	/
Поле на истражување	Фармацевтски анализи
Тема	Дали екстрактот од канабис добиен од сув цвет од канабис со максимално дозволено ниво на афлатоксини и охратоксин А има влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето
Година на запишување на докторски студии	2019/2020
Број на остварени кредити	62
Забелешка	

Скопје, 21.10.2021 година.

Студент

Ментор

- во прилог апстракт

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ
Студиска програма: ФАРМАЦИЈА

Кандидат: Тијана Серафимовска

Број на индекс: 70/др

Вработен во: Реплек Фарм АД Скопје

Ментор: Проф. д-р Јасмина Тониќ Рибарска

Рецензенти: Проф. д-р Јасмина Тониќ Рибарска

Проф. д-р Ѓоше Стефков

Проф. д-р Катерина Брезовска

Студиска година: втора

ДАЛИ ЕКСТРАКТОТ ОД КАНАБИС ДОБИЕН ОД СУВ ЦВЕТ ОД КАНАБИС СО МАКСИМАЛНО ДОЗВОЛЕНО НИВО НА АФЛАТОКСИНИ И ОХРАТОКСИН А ИМА ВЛИЈАНИЕ ВРЗ БЕЗБЕДНОСТА И ЗДРАВЈЕТО НА ЛУЃЕТО

Тијана Серафимовска¹, Сашо Стефановски², Joachim Erler³, Златко Кесковски², Ѓоше Стефков¹, Марија Митевска², Марија Дарковска Серафимовска⁴, Трајан Балканов⁵,
Јасмина Тониќ Рибарска¹

¹УКИМ-Фармацевтски факултет, Скопје

²NYSK Холдингс, Компанија за одгледување на канабис, екстракција и производство на фармацевтски дозирани форми на база на медицински канабис, Скопје

³Diapharm GmbH & Co. KG, Münster, Germany

⁴Факултет за медицински науки, Универзитет Гоце Делчев, Штип

⁵УКИМ-Медицински факултет, Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија, Скопје

КУСА СОДРЖИНА

Цел: Целта на оваа студија беше да се испита дали екстрактот добиен од сув цвет од канабис, кој содржи максимално дозволено ниво на микотоксини, ќе има влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето. За таа цел, беше воспоставен и валидиран нов LC/MS/MS метод за одредување на афлатоксини и охратоксин А во сув цвет и во екстракти од канабис како би покажале дека аналитички метод е погоден за планираниот експериментален дизајн.

Методи: Експерименталниот дизајн е направен со додавање на максимално дозволена концентрација на афлатоксини (B1, B2, G1, G2) и охратоксин А според Европската фармакопеја во суви цветови од канабис пред екстракција. Концентрацијата на афлатоксини и охратоксин А беше одредена со користење на валидираниот LC/MS/MS аналитички метод во почетниот материјал (сув цвет) пред да се додадат микотоксините и во декарбоксилираното масло после екстракција со 96% етанол.

Резултати: Добиените резултати покажуваат дека афлатоксините и охратоксинот А, додадени во сувите цветови од канабис, се присутни во добиеното декарбоксилирано масло после процесот на екстракција во концентрации многу повисоки (m/m) од оние што се пропишани како дозволени според фармакопејата.

Заклучок: Со овој експеримент покажавме дека микотоксините, особено афлатоксините, кои се екстремно токсични секундарни метаболити, можат да достигнат критични вредности во екстрактите од канабис добиени од суви цветови од канабис со максимално дозволено количество микотоксини. Ова може да претставува голем ризик за пациентите и нивното здравје, особено за оние со компромитиран имунолошки систем.

Клучни зборови: микотоксини, афлатоксини, охратоксин А, токсичност, екстракти од канабис

DOES CANNABIS EXTRACT OBTAINED FROM CANNABIS FLOWERS WITH MAXIMUM ALLOWED RESIDUAL LEVEL OF AFLATOXINS AND OCHRATOXIN A HAVE AN IMPACT ON HUMAN SAFETY AND HEALTH

Tijana Serafimovska¹, Sasho Stefanovski², Joachim Erler³, Zlatko Keskovski², Gjoshe Stefkov¹, Marija Mitevska², Marija Darkovska Serafimovska⁴, Trajan Balkanov⁵, Jasmina Tonic Ribarska¹

¹University Ss. Cyril and Methodius, Faculty of Pharmacy, Skopje

²NYSK Holdings, Company for growing of cannabis, extraction and producing of pharmaceutical dosage forms of medical cannabis, Skopje

³Diapharm GmbH & Co. KG, Münster, Germany

⁴Faculty of Medical sciences, University Goce Delcev, Shtip, Republic of North Macedonia

⁵ University Ss. Cyril and Methodius, Faculty of Medicine, Institute for Preclinical and Clinical Pharmacology and Toxicology, Skopje

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate whether the cannabis extract obtained from cannabis flowers that contains the maximum allowed level of mycotoxins affects human safety and health. For that purpose, a novel LC/MS/MS method was developed and validated for determination of aflatoxins and ochratoxin A in cannabis flowers and extracts to demonstrate that this analytical method is suitable for intended experimental design.

Methods: Experimental design was done by adding maximum allowed concentration of aflatoxins (B1, B2, G1, G2) and ochratoxin A according to the European Pharmacopoeia in cannabis dry flowers before extraction. The concentration of aflatoxins and ochratoxin A was determined using the same LC/MS/MS analytical method in the starting material (dry flower) before preparing the spike sample and after obtaining decarboxylated extract with ethanol 96%.

Results: The results obtained indicate that aflatoxins and ochratoxin A, primarily added to the cannabis dried flowers, were also determined into the obtained final extract, in amounts much higher (m/m) than those prescribed as permitted by the pharmacopoeia.

Conclusion: With this experiment we have shown that mycotoxins, especially aflatoxins which are extremely toxic secondary metabolites, can reach critical values in cannabis extracts obtained from dry cannabis flowers with maximum allowed quantity of mycotoxins. This can pose a great risk to consumers and their health especially to those with compromised immune systems.

Keywords: mycotoxins, aflatoxins, ochratoxin A, toxicity, cannabis extracts

1. ВОВЕД

Медицинските производи на база на канабис (*Cannabis sativa*, L. Cannabaceae) во традиционалната медицина, се користат илјадници години во третманот на разни болести (1). Иако, недостасуваат медицински податоци засновани на докази кои можат да ја потврдат потенцијалната корист од терапијата со препарати на база на канабис, се поголем број фармацевти во аптеките издаваат препарати на база на канабис на индивидуални пациенти пропишани од нивните лекари (2).

За добивање на препарати на база на канабис, се користат стандардизирани екстракти од канабиноиди, произведени со соодветен процес на екстракција на канабиноидите од суви цветови на канабис (2). Квалитетот на цветовите како почетен материјал за добивање на екстрактите, од безбедносен аспект е најзначаен за здравјето на луѓето. Бидејќи, не постои монографија во Европската фармакопеја (Ph.Eur.) за цвет од канабис, квалитетот на сувите цветови од канабис моментално се проверува според ревидираната монографија за цвет од канабис објавена во Германската фармакопеја во 2018 (3), од страна на Федералниот институт за лекови и медицински помагала (BfArM) која е и единствено прифатена како задолжителна постапка за контрола на квалитетот на суви цветови од канабис во Европската унија (4). Меѓутоа, неколку различни монографии кои се однесуваат на хербални препарати се наведени во општите прописи на Ph.Eur. и тоа: хербални лекови, екстракти од лековити билки, препарати од лековити билки. Овие општи монографии се насоки за проверка на поедини параметри врзани за квалитетот на хербалните производи, кои не се споменати во поединечните монографии. Затоа, при проверка на квалитетот на хербалните производи, неопходно е да се користи индивидуалната монографија секогаш во комбинација со овие општи барања за квалитет (5).

Според водичите за изработка на спецификација: Процедури за тестирање и критериуми за прифаќање на супстанции од хербално потекло (6), микотоксините (афлатоксини, охратоксин А) се сметаат за онечистувања кои можат да се појават во финалните екстракти, а потекнуваат од почетниот материјал (сув цвет). Во врска со ова, Ph.Eur. ги дава максимално дозволените граници на овие онечистувања (афлатоксини, според Ph.Eur. 2.8.18 и охратоксин А, според Ph.Eur. 2.8.22) во хербални препарати.

Импакт на микотоксините врз безбедноста и здравјето на луѓето

Микотоксините (афлатоксини и охратоксин А) се секундарни токсични метаболити, кои потекнуваат првенствено од габите *Пеницилиум* и *Аспергилус*. Мувлите и нивните метаболити ги загадуваат сировините кои се користат како почетен материјал за добивање на производи од хербално потекло наменети за хумана употреба (7). Присуството на овие онечистувања во препаратите за хумана употреба, може да предизвика разни акутни и хронични труења кои имаат влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето (8).

Афлатоксините се екстремно токсични секундарни метаболити. Според нивната хемиска структура, тие генерално се категоризираат во две групи: дифурокумароциклопентенонска група (афлатоксин В1 и В2) и дифурокумаролактонска група (афлатоксин G1 и G2). Најтоксичен, канцероген и мутаген од сите афлатоксини е афлатоксин В1 (AfB1). Луѓето се претежно изложени на него со директно внесување (конзумирање) на контаминирани хербални лекови, храна или хербални препарати (9).

Микотоксините се метаболизираат во црниот дроб (10-11). Самиот AfB1 не е канцероген, но во човечкото тело се метаболизира во канцерогени метаболити. Моноксигеназниот систем во микрозомите го трансформира AfB1 во ехо-AfB1-8,9-epoxide кој може да се врзе за деоксирибонуклеинска киселина (ДНК) и на тој начин да предизвика цитотоксичност, оштетување на ДНК, хромозомски аномалии и мутации во гените (9).

Канцерогеноста, хепатотоксичноста, нефротоксичноста и ендокрините пореметувања се поврзани со хронична изложеност на ниско ниво на микотоксини (12-13). Во некои случаи, алергиските реакции, имунолошките болести, па и смртноста, исто така, се поврзани со хронична изложеност на микотоксини (14). Ризикот за појава на некое заболување како резултат на хронична изложеност на микотоксини зависи од видот на токсинот, неговиот

метаболизам, имунолошкиот одговор и временскиот период на изложеност на индивидуата (15). Според канцерогеноста Меѓународната агенција за истражување на ракот (IARC) микотоксините ги има класифицирано во неколку групи врз основа на доволно експериментални податоци и тоа: микотоксини канцерогени за луѓето (Група 1), евентуално канцерогени за луѓето (Група 2Б) или неможност да се класифицираат (Група 3) (16). Главниот целен орган за токсичност, мутагеност и канцерогеност на микотоксините е црниот дроб (17).

Охратоксин А (OchA) е моќен микотоксин, одговорен за хронична токсичност, како што се нефротоксичност, хепатотоксичност, тератогеност и имунотоксичност кај луѓето (18). Постојат неколку *in vivo* и *in vitro* студии објавени во врска со нефротоксичноста и хепатотоксичноста на OchA, но точниот механизам на токсичност се уште не е јасен (19-20).

2. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Постојат повеќе неодамна објавени трудови поврзани со квантификациски техники за одредување на микотоксини во цветови и екстракти од канабис (21-23), но истите не беа применливи за опремата што ја користевме ние. Од таа причина, беше воспоставен и валидиран нов LC/MS/MS метод за одредување на афлатоксини и охратоксин А во сув цвет од канабис и во екстракти од канабис како би покажале дека аналитички метод е погоден за планираниот експериментален дизајн.

Реагенси

Течните стандарди на AfB1 Cat.No.TSL-104-10, афлатоксин B2 (AfB2) Cat. No. TSL-105-10, афлатоксин G1 (AfG1) Cat. No. TSL-106-10, афлатоксин G2 (AfG2) Cat. No. TSL-107-10 и OchA Cat.No.TSL-504-5 беа набавени од производителот R-biopharm (Германија). Другите реагенси што се користеа беа LC/MS квалитет од производителот Fisher Chemicals (Велика Британија). Имуноафинитетните колони Cat. No. RBRP112B се набавени од производителот R-biopharm (Германија).

Апарат

LC/MS/MS систем (серија LC - 30AD) со MS/MS детектор (серија 8045) од Shimadzu.

Хроматографски услови

Хроматографските услови и транзициите на аналитите се дадени во Табела 1 и Табела 2.

Табела 1. Хроматографски услови за анализа на микотоксини (метод на градиент)

Колона	Raptor Biphenyl 100 mm x 2.1 mm, particle size 2.7 µm, (Cat.No.980-18088)		
Претколона	Raptor Biphenyl EXP Guard Column Cartridge 2.7 µm, 5 x 2.1 mm (Cat.No.9309A0252)		
Мобилна фаза А	5 mM ammonium formate во вода со 0.1% formic acid		
Мобилна фаза В	5 mM ammonium formate во метанол со 0.1% formic acid		
Програм	Време (min.)	Проток (mL/min.)	%В
	2.20	0.45	30
	2.40	0.45	50
	8.20	0.45	70
	11.20	0.45	75
	12.20	0.45	90
	12.60	0.45	90
	12.61	0.45	75
	13.20	0.45	75
	13.21	0.45	30
	16	0.45	30
Темпер. на печка	40°C		
Темп. на примерок	15°C		
Волумен на инјект.	10 µL		
MS/MS	Shimadzu LCMS-8045		
Ion Mode	ESI+		

Табела 2. Јонски транзиции на аналитите

Аналит	Прекурсор јон	Продукт јон (Quantifier)	Продукт јон (Qualifier)
Aflatoxin G2	331.0	189.2	313.2
Aflatoxin G1	329.0	200.2	243.2
Aflatoxin B2	315.1	287.2	243.2
Aflatoxin B1	312.9	285.2	241.2
Ochratoxin A	404.1	239.1	358.2

Подготовка на примерокот

2 g примерок (мелен сув цвет или екстракт) се мери во центрифугална туба од 50 ml. Се додава 15 ml смеша од метанол и вода (80:20). Смешата енергично се меша 60 минути со помош на шејкер за ротација (70 вртежи во минута), а потоа се центрифугира 15 минути со 4000 вртежи во минута. 6 ml од супернатантот се префрлаат во нова центрифугална туба која содржи 20 ml 2% Tween Buffer во PBS (Phosphate-buffered saline) и добро се промешува. Сите 26 ml од разредениот екстракт се поминуваат низ имуноафинитетната колона (IAC AOZON) со брзина на проток од 1 капка во секунда, се додека не се појави воздух во колоната (важно е протокот низ колоната да не надминува 1 капка во секунда). Колоната потоа се измива со 3 порции од по 15 ml вода (MS квалитет). На крајота, колоната се промива со 1 ml метанол. Тој 1 ml метанол се разредува со 1 ml 0,2% мравја киселина. Примероците пред инјектирање во системот се филтрираат со мембрански филтер со големина на пори од 0,2 μ m.

Стандардни раствори и калибрациони криви

Работните раствори за калибрација кои содржат AfB1, AfB2, AfG1 и AfG2 беа подготвени во концентрациско подрачје од 0,1 - 5 μ g/L, додека за OchA во концентрациско подрачје од 1 - 50 μ g/L. Како растворувач користевме смеша од вода со додаток на 0,1% мравја киселина и метанол со додаток на 0,1% мравја киселина во однос 50:50.

Поради влијанието на матрицата врз крајниот резултат (разлика во наклонот на кривата помеѓу стандардниот раствор во смеша од метанол и вода со додаток на 0,1% мравја киселина и стандардниот раствор додаден во матрицата), за пресметка на резултатите ја користевме калибрационата крива на стандардни раствори во матрица.

Валидација на методот

Предложениот метод беше валидиран согласно смерниците од Меѓународната конференција за хармонизација за валидација на аналитички метод и Директивата 96/23/EC која ги зема во предвид перформансите на аналитичкиот метод и толкувањето на резултатите (24-25).

Точност на методот

За да се утврди точноста на предложениот метод, беа направени експерименти со спајкување, односно додавање на точно познати количини од комбинираниот стандарден раствор на AfB1, AfB2, AfG1, AfG2 и OchA во декарбоксилирано масло.

Експериментален дизајн

На почетокот на експериментот беше одредена концентрацијата на AfB1, AfB2, AfG1, AfG2 и Och A во сувите цветови од канабис (вариетет Herijana), пред да се спајкуваат со микотоксините. На 250 g сув цвет од канабис беа додадени AfB1, AfB2, AfG1, AfG2 (2 μ g/kg) и Och A (20 μ g/kg) во максимално дозволени концентрации. После 2 часа смешата од 250 g суви цветовите со додадени микотоксини беше поделена на три еднакви дела. Секој дел беше поединечно мацеран со 415 ml 96% етанол како растворувач, 10 минути (вкупно за мацерација на 250 g цвет се користеа 1,25 L 96% етанол). Мацерацијата беше изведена во ладна комора (фрижидер на -20°C). Времетраењето на мацерацијата беше вкупно 30 минути, со повремено мешање со лажица од нерѓосувачки челик на секои 2 минути. Откако мацерацијата беше завршена, мацерираниот материјал беше рачно исцеден со цедалка од нерѓосувачки

челик. Добиениот мацерат го филтриравме. Етанолот го испаривме до суво. По испарувањето на етанолот, добиената сурова смола ја декарбоксилиравме со загревање на чашата до достигнување на температура помеѓу 125-130°C. Експериментот беше повторен 3 пати (серија бр. RS0221/1, серија бр. RS0221/2, серија бр. RS0221/3).

3. РЕЗУЛТАТИ

Валидација на методот

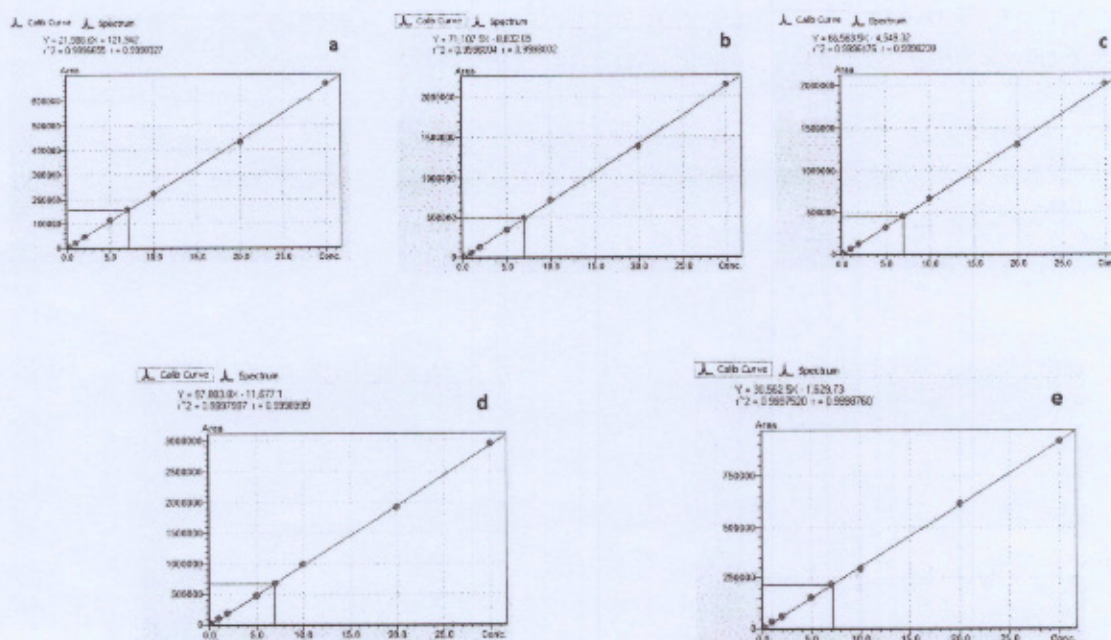
Калибрационите карактеристики и параметрите за валидација на предложениот метод се прикажани во Табела 3 и Слика 1. Линеарноста на одговорот е пресметана како сооднос на површините на AflB1, AflB2, AflG1, AflG2 и OchA во однос на концентрацијата на примероците во концентрациски опсег од 0.1 - 5 µg/ за AflB1, AflB2, AflG1 и AflG2 и во концентрациски опсег од 1 - 50 µg/L за OchA. Коефициентот на корелација беше поголем од 0,999 за сите микотоксини.

Табела 3. Карактеристики од линеарната регресиона анализа

	AflG2	AflG1	AflB2	AflB1	OchA
Linearity range (µg/L)	0.1 – 5	0.1 – 5	0.1 – 5	0.1 – 5	1 – 50
Determination coefficient (r ²)	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998
CCα	4.32%	3.84%	4.55%	3.95%	3.87%

CCα – Decision limit (max. дозволено 5%)

Слика 1 ја покажува калибрационата крива на AflG2 (4-a), калибрационата крива на AflG1 (4-b), калибрационата крива на AflB2 (4-c), калибрационата крива на AflB1 (4-d) и калибрационата крива на OchA (4-e).



Слика 1. Калибрациони криви на AflG2 (a), AflG1 (b), AflB2 (c), AflB1 (d), OchA (e)

Резултатите од прецизност, точност и репродуктивност на методот се прикажани во Табела 4. Тие покажуваат добра прецизност определена како релативна стандардна девијација (%RSD).

Лимитот на детекција (DL) / лимитот на квантификација (QL) ги определуваме врз основа на формулите: $DL = 3,3 \times \sigma / S$ и $QL = 10 \times \sigma / S$, каде σ е стандардна девијација на одговорот, а S е наклон на калибрационата кривата. Лимитот на детекција (DL) / лимитот на квантификација (QL) за секој микотоксин посебно е прикажано во Табела 5.

Табела 4. Прецизност и точност на методот

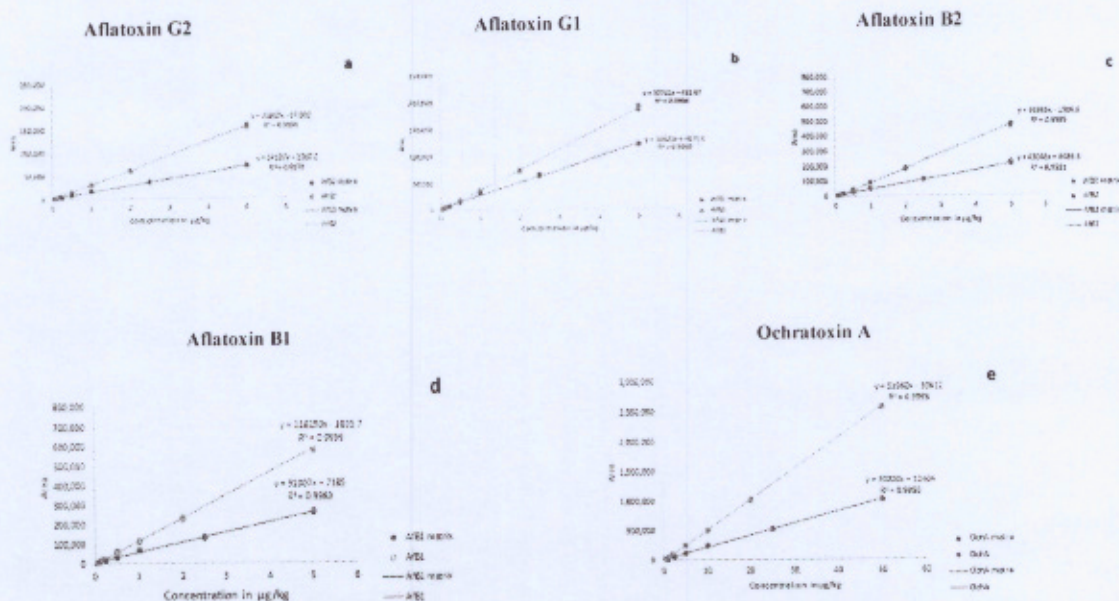
Додадена конц. (µg/L)	Измерена концентрација (µg/L) ^a			
	AflG2		AflG1	
	Средна (µg/L) ± RSD (%)	Точност (%)	Средна (µg/L) ± RSD (%)	Точност (%)
1.5	1.215 ± 0.96	81.0	1.214 ± 0.58	80.9
2.0	1.892 ± 0.82	94.6	1.940 ± 0.82	97.0
5.0	4.321 ± 0.78	86.42	4.696 ± 0.85	93.9
Додадена конц. (µg/L)	Измерена концентрација (µg/L) ^a			
	AflB2		AflB1	
	Средна (µg/L) ± RSD (%)	Точност (%)	Средна (µg/L) ± RSD (%)	Точност (%)
1.5	1.228 ± 0.87	81.86	1.334 ± 0.71	88.93
2.0	1.927 ± 0.58	96.35	1.938 ± 0.49	96.9
5.0	4.283 ± 0.72	85.66	4.900 ± 0.57	98.0
Додадена конц. (µg/L)	Измерена концентрација (µg/L) ^a			
	OchA			
	Средна (µg/L) ± RSD (%)	Точност (%)		
15	14.09 ± 0.86	93.93		
20	20.93 ± 0.93	104.6		
50	50.59 ± 1.03	101.18		

^a средна вредност од пет одредувања

Табела 5. Лимит на детекција / Лимит на квантификација за AflB1, AflB2, AflG1, AflG2 и OchA

Микотоксин	Лимит на детекција (µg/kg)	Лимит на квантификација (µg/kg)
AflG2	0.023	0.069
AflG1	0.017	0.053
AflB2	0.034	0.105
AflB1	0.027	0.082
OchA	0.329	0.997

Ефектот на матрицата беше проценет со помош на методот на пост-екстракција, односно со додавање на стандардни раствори на микотоксини во матрицата по екстракција. Проценети се калибрационите криви на стандардните раствори на микотоксини во растворувач и на стандардните раствори на микотоксини во матрицата. Се покажа дека матрицата влијае на ефикасноста на јонизацијата и репродукцибилноста во изворот на јонизација (Слика 2). Затоа, сите анализи и пресметки беа направени со користење на калибрационите криви на стандардните раствори во матрица.



Слика 2. Споредба на ефектот на матрицата врз резултатите за AfG2 (5-a), AfG1 (5-b), AfB2 (5-c), AfB1 (5-d) и Och (5-e). Калибрациони криви на стандарден раствор на микотоксини во растворувач (црвена линија) и калибрациони криви на стандарден раствор на микотоксини во матрикс (плава линија)

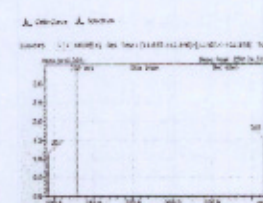
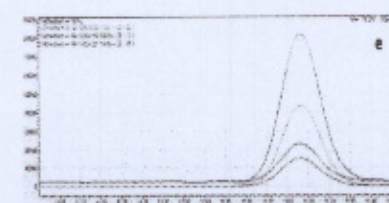
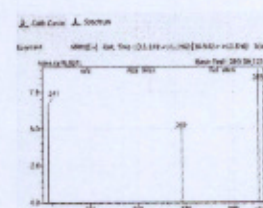
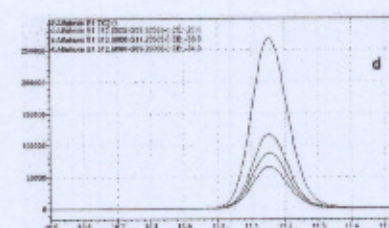
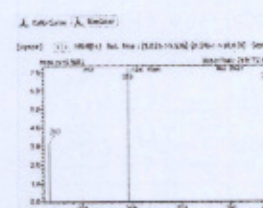
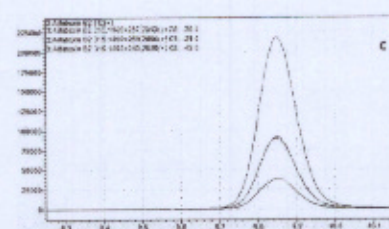
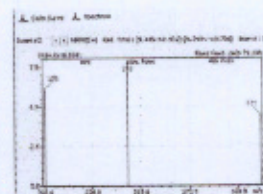
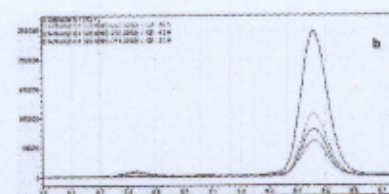
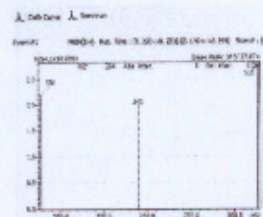
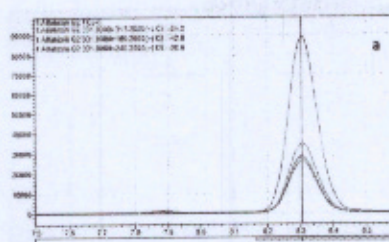
Слика 3 ги прикажува типичните хроматограми и транзиции на аналитите на AfG2 (5-a), AfG1 (5-b), AfB2 (5-в), AfB1 (5-d) и на OchA (5-e).

Пресметка на AfB1, AfB2, AfG1, AfG2 и OchA во експерименталниот дизајн

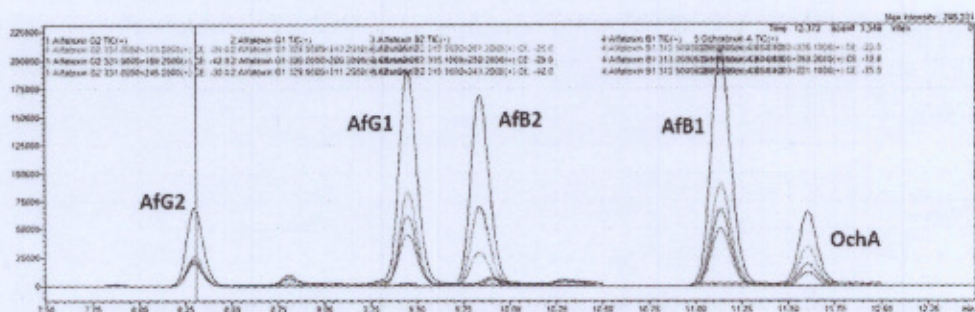
Концентрацијата на афлатоксини и охратоксин A беа утврдени со користење на истиот аналитички метод (LC/MS/MS) во почетниот материјал (сув цвет) пред спајкување и во добиениот декарбоксилиран екстракт после екстракција со 96% етанол. Содржината на AfB1, AfB2, AfG1, AfG2 и OchA во $\mu\text{g/kg}$ во сув цвет (вариетет Herijuana) се прикажани во Табела 6. Резултатите од содржината на AfB1, AfB2, AfG1, AfG2 и OchA во $\mu\text{g/kg}$ во декарбоксилираното масло од канабис се прикажани во Табела 7.

Резултатите од анализата на микотоксини во сувиот цвет пред спајкување (Табела 6) покажуваат дека нема значителни количини на микотоксини што би можеле да влијаат на валидноста на експериментот. Од резултатите презентирани во Табела 7, можеме да заклучиме дека во декарбоксилираното масло, концентрацијата на афлатоксини и охратоксинот A се многу повисоки од оние кои се дозволени според фармакопејата.

Слика 4 го прикажува хроматограмот на екстракт од канабис добиен од цвет од канабис спајкуван со MRL (maximum residual level) за афлатоксини (2 $\mu\text{g/kg}$) и OchA (20 $\mu\text{g/kg}$).



Слика 3. Типични хроматограми и транзиција на анализи за AflG2 (a), AflG1 (b), AflB2 (c), AflB1 (d), OchA (e)



Слика 4. Хроматограм од декарбоксилирано масло од канабис добиено од сув цвет спајкуван со MRL за афлатоксини (2µg/kg) и ochratoxin A (20µg/kg)

Табела 6. Содржина на афлатоксин B1, B2, G1, G2 и Ochratoxin A во сув цвет од канабис (вариетет Herijuana Batch No. 01012101) пред спајување

Содржина на микотоксини во сув цвет од канабис Batch No. 01012101 (µg/kg)				
AfG2	AfG1	AfB2	AfB1	OchA
Не е детектирано	Не е детектирано	Не е детектирано	Не е детектирано	Не е детектирано

Табела 7. Содржина на афлатоксин B1, B2, G1, G2 и Ochratoxin A во декарбоксилано масло од канабис добиено со спајување со MRL за афлатоксини и ochratoxin A

AfG2	RS0221/1		RS0221/2		RS0221/3	
Додалено во цвет 2µg/kg	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)
	6.91	3	6.02	3	6.122	30
		45.5		01.0		6.1
AfG1	RS0221/1		RS0221/2		RS0221/3	
Додалено во цвет 2µg/kg	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*
	6.90	3	6.32	3	6.42	32
		45.0		16.0		1.0
AfB2	RS0221/1		RS0221/2		RS0221/3	
Додалено во цвет 2µg/kg	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*
	5.1	2	4.86	2	4.90	24
		55.0		43.0		5.0
AfB1	RS0221/1		RS0221/2		RS0221/3	
Додалено во цвет 2µg/kg	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*
	5.06	2	4.59	2	4.62	23
		53.0		29.5		1.0
OchA	RS0221/1		RS0221/2		RS0221/3	
Додалено во цвет 20µg/kg	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*	Одредено во екстракт (µg/kg)	(%)*
	141.6	7	119.9	5	121.9	60
		08.0		99.5		9.5

* процент од максимално дозволената концентрација

4. ДИСКУСИЈА

Медицинската употреба на канабис сега е легална во повеќе земји низ целиот свет. Овој зголемен интерес за препаратите на база на канабис, наметнува и итна потреба да се разберат можните контаминанти кои може да се најдат во овие препарати и како тие може да влијаат на безбедноста и здравјето на луѓето (26-27). Ова е особено важно за оние пациенти кои имаат нарушен имунолошки систем, а користат канабис за медицински цели (27). Овде ја анализираме врската помеѓу одгледувањето на канабисот и исходите кои можат да се случат од употребата на цвет од канабис во кој има присуство на микотоксини. Афлатоксините стануваат особено проблематични ако процесот на сушење на растението е несоодветен (28).

Препаратите на база на канабис се широко распространети производи кои се користат за лекување на разни болни и патогени состојби. Употребата на овие препарати е особено

зголемена во последните десет години. Афлатоксините (особено AfB1) се главен извор на болест, па затоа екстремните нивоа на афлатоксини во хербалните препарати од канабис се загрижувачки. По бербата, третманите на цветот за отстранување на афлатоксините како што се алкализација, амонизација и топлина или гама зрачење генерално не се користат и не се препорачуваат. Метаболичките деривати на AfB1 и AfB2, може да се излачуваат преку млекото (9) и на тој начин да имаат штетен ефект врз доенчињата. Од тие причини, концентрацијата на афлатоксините (Ph.Eur. 2.8.18) се ограничени на $\leq 2 \mu\text{g/kg}$ за AfB1 и вкупните афлатоксини (AfB1, AfB2, AfG1, AfG2) $\leq 4 \mu\text{g/kg}$. OchA (Ph.Eur 2.8.22) е ограничен на $\leq 20 \mu\text{g/kg}$ (5).

Стандардизираниите екстракти од канабис, добиени од сув цвет од канабис, се користат како појдовна сировина за подготовка на различни фармацевтски дозирани форми на база на канабис за хумана употреба. Процесот на екстракција најчесто се прави со суперкритичен CO₂ или етанол (29-30).

Етанолот, според Ph.Eur, е класифициран како растворувач од класа 3 со низок ризик за акутна или хронична токсичност. Дозволено ниво во фармацевтски дозирани форми е помалку од 5.000 ppm (0,5%) (5). Етанолот е многу добар растворувач за екстракција на канабиноиди и терпени, но во исто време многу и за микотоксини. Екстракцијата може да се спроведе на собна температура или во фрижидер на минусни температури. Разликата е во тоа што ако екстракцијата се одвива на собна температура се екстрахираат и восоци и пигменти, што резултира со потреба од превземање на дополнителни чекори за прочистување на екстрактот. За да се екстрахираат активните компоненти од сувиот цвет, етанолот мора целосно да ги покрие цветовите. Затоа, потребен е значителен волумен на етанол за екстракција (25). Во нашиот случај ние користиме 96% етанол во сооднос сув цвет: етанол = 1: 5.

Воспоставивме и валидиравме нов LC/MS/MS метод за одредување на афлатоксини и OchA во сув цвет и во екстракти од канабис.

Цветовите што се користеа за екстракција ги спајкувавме со максимално дозволено ниво на микотоксини според Ph.Eur (2.8.18 и 2.8.22) (5). Имајќи предвид дека AfB1 е ограничен на $\leq 2 \mu\text{g/kg}$, тоа значи дека секој друг микотоксин (AfB2, AfG1, AfG2), поединечно, може да се најде во цветот во концентрација $\leq 2 \mu\text{g/kg}$ (под претпоставка дека нема да има присуство на друг афлатоксин), што значи дека нема да се надмине границата на вкупно дозволените микотоксини $\leq 4 \mu\text{g/kg}$. По испарувањето на етанолот и завршувањето на процесот на декарбоксилација, содржината на микотоксините е одредена со LC/MS/MS методот.

Добиените резултати покажуваат дека афлатоксините и OchA, иако добро растворливи во етанол, по испарувањето на растворувачот, остануваат во конечниот екстракт во количина многу повисока од количината во која ги додадовме, поради концентрацијата на примерокот (од 250 g сув цвет добивме 16 g декарбоксилано масло). Тоа значи дека нивото на афлатоксини и OchA во финалниот екстракт е многу повисоко од максимално дозволеното ниво на микотоксини според Ph.Eur. (5), а со тоа овие препарати претставуваат ризик за безбедноста и здравјето на луѓето (утврден процент од максималната дозволена концентрација 301-345,5% за AfG2, 316-345% за AfG1, 243-255% за AfB2, 229,5-253% за AfB1, 599,5- 708% за OchA).

Затоа, многу е важно одгледувањето на канабис и неговиот третман после бербата, вклучително и неговото пакување и складирање, да се изведуваат под контролирани услови за да се избегне раст на мувли, а со тоа и создавање на микотоксини. На овој начин здравјето на луѓето може да се заштити и добро да се зачува (26).

5. ЗАКЛУЧОК

Микотоксините лесно можат да поминат од контаминираниот растителен материјал како почетна сировина во финалниот екстракт и на тој начин да имаат влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето. За да го провериме ова, беше воспоставен и валидиран нов LC/MS/MS метод за одредување на афлатоксини и охратоксин A во сув цвет од канабис и во екстракти од канабис. Резултатите добиени од експерименталниот дизајн укажуваат на тоа дека афлатоксините и охратоксинот A, се присутни во финалното декарбоксилано масло добиено со екстракција на цветови со максимално дозволена концентрација на микотоксини во количини

повисоки (m/m) од оние дозволени според фармакопејата. Со овој експеримент покажавме дека афлатоксините како екстремно токсични секундарни метаболити, можат да достигнат критични вредности во екстрактите од канабис. Ова може да претставува голем ризик за здравјето на пациентите, особено за оние со компрометиран имунолошки систем.

6. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

1. Russo EB. (2007). History of cannabis and its preparations in saga, science, and sobriquet. *Chem Biodivers* 4(8):1614-48.
2. A. Casiraghi, G. Roda, E. Casagni, C. Cristina, U.M. Musazzi, S. Franzè, P. Rocco, C. Giuliani, G. Fico, P. Minghetti, V. Gambaro. (2018). Extraction Method and Analysis of Cannabinoids in Cannabis Olive Oil Preparations. *PLANTA MEDICA*. 84:4, 242-249.
3. German Pharmacopoeia 2018 (DAB 2018). Monograph Cannabisblüten and Monograph Eingestellter Cannabisextrakt.
4. EU-Guideline 2001/83 consolidated Version, Annex I EG, <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001L0083:20110721:EN:PDF>, last access: 04.06.2021.
5. European Pharmacopoeia (2020). 10th Edition of the European Pharmacopoeia, applicable from January 2020.
6. Guideline on specifications (2018): Test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products /traditional herbal medicinal products, EMA/HMPC/162241/20051 3 Rev. 3.
7. Arce-López B, Lizarraga E, Vettorazzi A, González-Peñas E. (2020). Human Biomonitoring of Mycotoxins in Blood, Plasma and Serum in Recent Years: A Review. *Toxins*. 12(3):147.
8. Jyoti Singh, Alka Mehta. (2020). Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods: A review. *Food Sci Nutr*. 8, 2183–2204.
9. Syeda Mona Hassan, Shahzad Sharif Mughal, Syed Khurram Hassan, Asif Ibrahim, Huma Hassan, Nageena Shabbir, Sumaira Pervez, Ali Raza Ayub, Saqib Shafiq. (2020). Cellular Interactions, Metabolism, Assessment and Control of Aflatoxins: An Update. *Computational Biology and Bioinformatics*. 8(2), 62-71.
10. Manal M. Zaki, S. A. El-Midany, H. M. Shaheen and Laura Rizzi. (2012). Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*. 4(1), 13-28.
11. Zhiqi Zhang, Dongxia Nie, Kai Fan, Junhua Yang, Wenbo Guo, Jiajia Meng, Zhihui Zhao & Zheng Han. (2020). A systematic review of plant-conjugated masked mycotoxins: Occurrence, toxicology, and metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60(9):1523-37.
12. International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins; IARC: Lyon, France. Volume 56, ISBN 978-92-832-1256-0.
13. World Health Organization & Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (2017). Evaluation of certain contaminants in food: Eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. In World Health Organization Technical Report Series; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1–182. ISBN 9789241210027.
14. Norbäck, D.; Hashim, J.H.; Cai, G.-H.; Hashim, Z.; Ali, F.; Bloom, E.; Larsson, L. (2016). Rhinitis, Ocular, Throat and Dermal Symptoms, Headache and Tiredness among Students in Schools from Johor Bahru, Malaysia: Associations with Fungal DNA and Mycotoxins in Classroom Dust. *PLoS ONE*, 11, e0147996.
15. Al-Jaal, B.A.; Jaganjac, M.; Barcaru, A.; Horvatovich, P.; Latiff, A. (2019). Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic literature review, 2001–2018. *Food Chem. Toxicol.*, 129, 211–228.
16. International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). Improving Public Health through Mycotoxin Control; Pitt, J.I., Wild, C.P., Baan, R.A., Gelderblom, W.C.A., Miller, J., Riley, R.T., Wu, F., Eds.; IARC: Lyon, France.; ISBN 978-92-832-2214-9
17. Li, S.; Zhou, J.; Xu, S.; Li, J.; Liu, J.; Lu, Y.; Shi, J.; Zhou, S.; Wu, Q. (2019). Induction of Nrf2 pathway by *Dendrobium nobile* Lindl. Alkaloids protects against carbon tetrachloride induced acute liver injury. *Biomed. Pharmacother.*, 117, 109073.
18. Damiano S, Longobardi C, Andretta E, Prisco F, Piegari G, Squillacioti C, Montagnaro S, Pagnini F, Badino P, Florio S, Ciarcia R. (2021). Antioxidative Effects of Curcumin on the Hepatotoxicity Induced by Ochratoxin A in Rats. *Antioxidants*, 10(1):125.
19. Damiano, S.; Iovane, V.; Squillacioti, C.; Mirabella, N.; Prisco, F.; Ariano, A.; Amenta, M.; Giordano, A.; Florio, S.; Ciarcia, R. (2020). Red orange and lemon extract prevents the renal toxicity induced by ochratoxin A in rats. *J. Cell. Physiol.*, 235, 5386–5393.
20. Zhu, L.; Yu, T.; Qi, X.; Gao, J.; Huang, K.; He, X.; Luo, H.; Xu, W. (2016). Limited link between oxidative stress and ochratoxin A—Induced renal injury in an acute toxicity rat model. *Toxins*, 8, 373.
21. Wilcox J, Pazdanska M, Milligan C, Chan D, MacDonald SJ, Donnelly C. (2020). Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Cannabis and Cannabis Products by LC-Fluorescence Detection Using Cleanup with Either Multiantibody Immunoaffinity Columns or an Automated System with In-Line Reusable Immunoaffinity Cartridges. *J AOAC Int.*, 103(2):494-503.

22. López-Ruiz, R., Marín-Sáez, J., Garrido Frenich, A. and Romero-González, R. (2021), Recent applications of chromatography for analysis of contaminants in cannabis products: a review. *Pest Manag Sci.* doi.org/10.1002/ps.6599.
23. Wilcox, Joyce & Pazdanska, Monika & Milligan, Claire & Chan, Danny & MacDonald, Susan & Donnelly, Carol. (2019). Analysis of Aflatoxins and Ochratoxin A in Cannabis and Cannabis Products by LC-Fluorescence Detection Using Cleanup with Either Multiantibody Immunoaffinity Columns or an Automated System with In-Line Reusable Immunoaffinity Cartridges. *Journal of AOAC International*. 103. 10.5740/jaoacint.19-0176.
24. 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C 3044).
25. ICH (2002) Guideline on Analytical Method Validation, Proceeding of International Convention on Quality for the Pharmaceutical Industry, Toronto, Canada.
26. Ariani C. Wartenberg, Patricia A. Holden, Hekia Bodwitch, Phoebe Parker-Shames, Thomas Novotny, Thomas C. Harmon, Stephen C. Hart, Marc Beutel, Michelle Gilmore, Eunha Hoh, and Van Butsic. (2021). Cannabis and the Environment: What Science Tells Us and What We Still Need to Know. *Environ. Sci. Technol. Lett.*, 8(2), 98–107.
27. Montoya Zackary, Conroy Matthieu, Vanden Heuvel Brian D., Pauli Christopher S., Park Sang-Hyuck. (2020). Cannabis Contaminants Limit Pharmacological Use of Cannabidiol. *Frontiers in Pharmacology*. 11:1439.
28. Mcpartland, J. M., Mckernan, K. J. (2017). Contaminants of Concern in Cannabis: Microbes, Heavy Metals and Pesticides in Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology. Eds. Chandra, S., Lata, H., Elsohly, M. A. (Cham: Springer International Publishing), 457–474.
29. Grijo, Daniel & Vieitez, Ignacio & Filho, Lucio. (2019). Supercritical Extraction Strategies Using CO₂ and Ethanol to Obtain Cannabinoid Compounds from Cannabis Hybrid Flowers. *Journal of CO₂ Utilization*. 30, 10.1016/j.jcou.2018.12.014.
30. Mark June-Wells. Your Guide to Ethanol Extraction in Cannabis. (2018). Cannabis Business Times, <https://www.cannabisbusinesstimes.com/article/your-guide-to-ethanol-extraction/>, last access 04.06.2021

Примено:	25-10-2021		
Орг. Едини:	Број:	Прилог:	Вредност:

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: Трет циклус за докторски студии од областа фармација

РЕЦЕНЗИЈА

на семинарски труд од III семестар под наслов „ДАЛИ ЕКСТРАКТОТ ОД СУВ ЦВЕТ
ОД КАНАБИС СО МАКСИМАЛНО ДОЗВОЛЕНО НИВО НА АФЛАТОКСИНИ И
ОХРАТОКСИН А ИМА ВЛИЈАНИЕ ВРЗ БЕЗБЕДНОСТА И ЗДРАВЈЕТО НА ЛУЃЕТО“
на докторантот, магистер по фармација Тијана Серафимовска

Со одлука на Советот на докторски студии на Фармацевтскиот факултет во Скопје, определена е рецензентска комисија за оцена на семинарскиот труд од трет циклус на докторски студии во состав: проф. д-р Јасмина Тониќ Рибарска, проф. д-р Ѓоше Стефков и проф. д-р Катерина Брезовска. По прегледот на доставениот семинарски труд, Рецензентската комисија го доставува следниот

ИЗВЕШТАЈ

Семинарскиот труд под наслов: „Дали екстрактот од сув цвет од канабис со максимално дозволено ниво на афлатоксини и охратоксин А има влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето“ претставува самостојно изработен труд, структуриран во следните поглавја: вовед, цели, материјали и методи, резултати, дискусија и заклучок. Систематизацијата на деловите во наслови и поднаслови обезбедува соодветно следење на материјата која е обработена во трудот.

Во „Воведот“, докторантот го истакнува импактот на микотоксините (секундарни токсични метаболити), врз безбедноста и здравјето на луѓето. Притоа, докторантот се осврнува на канцерогеноста, хепатотоксичноста, нефротоксичноста и ендокрините пореметувања кои се поврзани со хронична изложеност на ниско ниво на микотоксини. Со тоа, докторантот ја нагласува потребата од проверка на квалитетот на хербалните производи, особено на препаратите на база на канабис за кои не постои индивидуална монографија во Европската фармакопеја, па препораките за проверка на квалитетот се следење на ревидираните монографии за цвет од канабис и екстракти од канабис објавени во Германската фармакопеја во 2018 и 2020 година соодветно, секогаш во комбинација со општите барања за квалитет на хербални препарати наведени во Европската фармакопеја. Во продолжение, докторантот дава кус осврт на водичот за изработка на спецификација (ЕМА/НМРС/162241/20051 3 Rev. 3.) во кој микотоксините (афлатоксини, охратоксин А) се наведени како онечистувања кои можат да се појават во финалните екстракти, а потекнуваат од почетниот материјал (сув цвет). Поради зголемениот интерес за препарати на база на канабис на глобално ниво, докторантот ја истакнува важноста од итна потреба да се разберат можните контаминенти кои може да се најдат во овие препарати и како тие може да влијаат на безбедноста и здравјето на луѓето.

Во делот „Материјали и методи“, дадени се податоци за LC/MS/MS методот за одредување на микотоксини во цвет и екстракти од канабис. При тоа, докторантот систематично дава податоци за спроведената постапка за воспоставување и валидација на методот со цитирање на смерниците од Меѓународната конференција за хармонизација за валидација на аналитички метод и Директивата 96/23/ЕС која ги зема во предвид перформансите на аналитичкиот метод и толкувањето на резултатите. Во продолжение, докторантот ја потенцира важноста на овој чекор за потврда на аналитички метод како подобен за спроведување на планираниот експериментален дизајн. Понатаму, докторантот дава точни насоки за подготовка на примерокот, подготовка на стандардните раствори и калибрационите криви, како и детален опис на експерименталниот дизајн што е предмет на ова истражување.

Во делот „Резултати“, на почетокот е презентирана постапката за валидација на методот.

Докторантот, ги прикажува параметрите за валидација на предложениот метод и резултатите добиени при валидацијата, со што потврдува дека методот е подобен за спроведувањето на планираниот експериментален дизајн и дека добиените резултати ја отсликуваат реалната слика. Наведено е дека коефициентот на корелација за линеарноста на одговорот е поголем од 0,999 за сите микотоксини поединечно во концентрациски опсег од 0.1 - 5 µg/ за афлатоксин B1, B2, G1 и G2 и во концентрациски опсег од 1 - 50 µg/L за Ochratoxin A. Карактеристиките од линеарната регресиона анализа се прикажани табеларно и графички со слики од калибрационите криви за секој микотоксин поединечно во наведеното концентрациско подрачје. Во продолжение, докторантот табеларно ги прикажува резултатите од определувањето на параметрите лимит на детекција и лимит на квантификација и наведува дека истите се определени со пресметка по формулите наведени во ICH водичот - Guideline on Analytical Method Validation, Proceeding of International Convention on Quality for the Pharmaceutical Industry. Резултатите од прецизност, точност и репродукцибилност на методот се прикажани табеларно. Тие покажуваат добра прецизност определена како релативна стандардна девијација (%RSD). Во делот валидација на методот, докторантот графички ги прикажува и резултатите од испитувањето на ефектот на матрицата кој бил проценет со помош на метод на пост-екстракција, односно со додавање на стандардни раствори на микотоксини во матрицата после екстракција. Докторантот ги споредува калибрационите криви на стандардните раствори на микотоксини во растворувач и на стандардните раствори на микотоксини во матрицата. При тоа, докторантот укажува на влијанието на матрицата на ефикасноста на јонизацијата и репродукцибилноста во изворот на јонизација во масениот детектор, што директно се рефлектира на крајниот резултат. Од тие причини, докторантот истакнува дека сите анализи и пресметки ги направил со користење на калибрационите криви на стандардните раствори во матрица. За да се испита дали екстрактот од сув цвет од канабис со максимално дозволено ниво на афлатоксини и охратоксин А има влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето, докторантот на почетокот на експериментот ја одредил концентрацијата на микотоксини во сувите цветови од канабис (вариетет Herijuana), а потоа пред екстракција истите ги спајкувал со додавање на максимално дозволени концентрации на микотоксини, согласно фармакопејата. Експерименталниот дизајн го повторил 3 пати (серија бр. RS0221/1, серија бр. RS0221/2, серија бр. RS0221/3) за да ги потврди добиените резултати. Резултатите се прикажани табеларно, а во прилог има дадено и типични хроматограми и транзиции на аналитите за секој микотоксин поединечно. Од резултатите презентирани во табелата, може да се заклучи дека во сувиот цвет пред спајкување нема значителни количини на микотоксини што би можеле да влијаат на валидноста на експериментот, додека во декарбоксилираното масло добиено со екстракција на цветови оптеретени со максимално дозволена концентрација на микотоксини, концентрациите на афлатоксини и охратоксин А се многу повисоки од оние кои се дозволени според фармакопејата.

Во делот „Дискусија“, докторантот се осврнува на значењето на се поголемата медицинска употреба на препаратите на база на канабис. При тоа, докторантот нагласува дека зголемен интерес за препаратите на база на канабис, наметнува и итна потреба да се разберат можните контаминенти кои може да се најдат во овие препарати и како тие може да влијаат на безбедноста и здравјето на луѓето. Имајќи ги наодите во предвид, докторантот укажува на важноста од употреба на стандардизирани екстракти од канабис како појдовна суровина за подготовка на различни фармацевтски дозирани форми на база на канабис за хумана употреба. Понатаму, со експерименталниот дизајн докторантот покажува дека етанолот кој според Ph.Eur, е класифициран како растворувач од класа 3 со низок ризик за акутна или хронична токсичност е многу добар растворувач за екстракција на канабиноидите и терпените, но во исто време и за микотоксините. Елаборирајќи ги добиените резултати од експерименталниот дизајн, докторантот издвојува дека микотоксините при процесот на екстракција не се уништуваат, туку во целост преоѓаат во финалниот екстракт во концентрации многу повисоки од максимално дозволеното ниво, поради концентрирање на примерокот (од 250 g сув цвет докторантот добил 16 g декарбоксилирано масло). Со тоа, овие препарати претставуваат ризик за безбедноста и здравјето на луѓето (утврден процент од максималната дозволена концентрација од 301-345,5% за Афлатоксин G2, 316-345% за Афлатоксин G1, 243-255% за Афлатоксин B2, 229,5-253% за Афлатоксин B1 и 599,5- 708% за Ochratoxin A). Дополнително, докторантот се осврнува на важноста за одгледување на канабисот под контролирани услови за да се избегне раст на муви, а со тоа и

создавање на микотоксини.

Во делот „Заклучок“, докторантот потенцира дека со експерименталниот дизајн е покажано дека афлатоксините како екстремно токсични секундарни метаболити, можат да достигнат критични вредности во екстрактите од канабис, а тоа може да претставува голем ризик за здравјето на пациентите, особено за оние со компромитиран имунолошки систем. И во овој дел, за валидноста на резултатите докторантот се повикува на воспоставениот и валидиран нов LC/MS/MS метод за одредување на афлатоксини и охратоксин А во сув цвет од канабис и во екстракти од канабис.

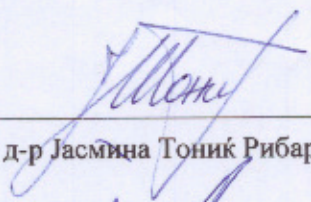
ЗАКЛУЧОК

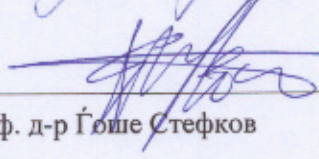
По прегледот на семинарскиот труд под наслов „Дали екстрактот од сув цвет од канабис со максимално дозволено ниво на афлатоксини и охратоксин А има влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето“ на докторантот Тијана Серафимовска, Рецензентската комисија констатира дека станува збор за значаен научен труд кој обработува проблематика за токсичноста на микотоксините како секундарни метаболити, кои можат да достигнат критични вредности во екстрактите од канабис, а тоа да претставува ризик за здравјето на пациентите.

ОЦЕНКА И ПРЕДЛОГ

Врз основа на горенаведеното, Рецензентската комисија позитивно го оценува доставениот семинарски труд под наслов „Дали екстрактот од сув цвет од канабис со максимално дозволено ниво на афлатоксини и охратоксин А има влијание врз безбедноста и здравјето на луѓето“ на докторантот Тијана Серафимовска и му предлага на Советот на докторски студии на Фармацевтскиот факултет при УКИМ во Скопје да го прифати и закаже негова презентација.

Рецензентска комисија:


Проф. д-р Јасмина Тониќ Рибарска


Проф. д-р Ѓорѓе Стефков


Проф. д-р Катерина Брезовска