



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS / GEOMOKSLŲ INSTITUTAS
ANALIZINĖS IR APLINKOS CHEMIJOS KATEDRA

Miglė Bartkutė

Pagrindinių studijų programa Farmacinė chemija – 2 kursas
Magistro studijų baigiamasis darbas

**SKYSČIŲ CHROMATOGRAFIJOS METODO VALIDAVIMAS BEI
TAIKYMAS KANABINOIDŲ NUSTATYMOI PLUOŠTINIŲ
KANAPIŲ PRODUKTUOSE**

Darbo vadovas:
Doc. dr. Evaldas Naujalis

Vilnius, 2021

TURINYS

SANTRUMPOS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1. Pluoštinės kanapės (<i>Cannabis sativa</i> L.)	7
1.1.1. Fitocheminė pluoštinių kanapių sudėtis	8
1.1.2. Pluoštinės kanapės medicinoje	10
1.2. Analitiniai kanabinoidų nustatymo metodai	12
1.3. Tyrimo metodų validavimas	13
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	15
2.1. Naudotos medžiagos	15
2.1.1. Tyrimo objektas	15
2.1.2. Sertifikuotos pamatinės medžiagos ir tirpikliai	15
2.2. Naudota įranga ir sąnaudinės medžiagos	16
2.3. Metodai	17
2.3.1. Kanabinoidų ekstrakcija	17
2.3.2. Kanabinoidų analizė skysčių chromatografijos metodu	17
2.3.3. Mėginių stabilumo tyrimas	18
2.3.4. Metodo validavimas (patvirtinimas)	19
2.3.5. Matavimo rezultato neapibrėžties įvertinimas	22
2.3.6. Kanabinoidų identifikavimas ir koncentracijos nustatymas kanapių produktuose	23
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	25
3.1. Metodas, skirtas kanabinoidų nustatymui <i>Cannabis sativa</i> L. produktuose	25
3.2. Mėginių stabilumo tyrimas	25
3.3. Metodo validavimas	28
3.3.1. Tiesiškumas	29
3.3.2. Aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos	31
3.3.3. Išgava (teisingumas)	32
3.3.4. Metodo rezultatų glaudumas	33
3.4. HPLC metodo taikymas kanabinoidų identifikacijai ir koncentracijos nustatymui <i>Cannabis sativa</i> L. produktuose	34
IŠVADOS	38

LITERATŪROS SĀRAŠAS	39
SANTRAUKA	46
SUMMARY	47
PADĒKA	48

SANTRUMPOS

- $\Delta 8$ -THC - $\Delta 8$ -tetrahidrokanabinolis
- $\Delta 9$ -THC - $\Delta 9$ -tetrahidrokanabinolis
- CBC – kanabichromenas
- CBD – kanabidiolis
- CBDA – kanabidiolio rūgštis
- CBDV – kanabidivarinas
- CBG – kanabigerolis
- CBGA – kanabigerolio rūgštis
- CBL – kanabiciklolis
- CBN – kanabinolis
- CNS – centrinė nervų sistema
- COVID – 19 – koronavirusinė liga 19
- CRM – sertifikuota pamatinė medžiaga
- DAD – diodų matricos detektorius
- ECS – endokanabinoidinė sistema
- ES – Europos Sąjunga
- GC-MS– dujų chromatografija - masių spektrometrija
- HPLC – efektyvioji skysčių chromatografija
- LC – skysčių chromatografija
- LoD – aptikimo riba
- LoQ – kiekybinio nustatymo riba
- MeOH - metanolis
- PSO – Pasaulinė sveikatos organizacija
- RSD – santykinis standartinis nuokrypis
- RSD_{Pooled} – jungtinis santykinis standartinis nuokrypis
- SARS-CoV-2 – sunkus ūminio respiracinio sindromo koronavirusas 2
- THC – tetrahidrokanabinolis
- THCA – tetrahidrokanabinolio rūgštis
- THCV – tetrahidrokanabivarinas

IVADAS

Pluoštinės kanapės (*Cannabis sativa* L.) – tai vienas iš populiariausių augalų šiuolaikinėje visuomenėje, sukėlęs įvairias diskusijas dėl savo terapinio poveikio žmogaus sveikatai ir tapęs labiausiai studijuojamu augalu pasaulyje (Pellati ir kt., 2018). Pluoštinė kanapė yra labai kompleksiška savo sudėtimi - turi daugiau nei 500 skirtingų junginių, kurių koncentracija augale priklauso nuo daugelio išorinių ir vidinių veiksnių. Visgi, šis augalas sulaukė didelio susidomėjimo ne dėl savo kompleksiskumo, o dėl tik šiam augalui būdingų meroterpenoidinių junginių – kanabinoidų (Appendino ir kt., 2011). Kanabidiolis (CBD) bei tetrahidrokanabinolis (THC) – tai labiausiai paplitę ir didžiausią farmakologinį poveikį turintys kanabinoidai, atsakingi už priešuždegiminį, priešvėžinį, antikonvulsinį, antiemetinį, neuroprotekcinį bei analgetinį pluoštinių kanapių poveikį (Alexander, 2016). Remiantis šių kanabinoidų koncentracijomis kanapėse yra išskiriami du tipai – pluoštinės kanapės, kurios naudojamos pramoniniams tikslams bei kuriose vyrauja CBD ir medicininės kanapės, kurių sudėtyje yra daugiau THC. Medicininių kanapių arba marihuanos auginimas bei vartojimas yra griežtai kontroliuojamas visoje Europos Sąjungoje (ES), todėl kanapių augintojai turi laikytis griežtų reikalavimų bei kultivuoti tik tas rūšis, kuriose yra mažiau nei 0,2 % THC (EMCDDA, 2020).

Remiantis 2019 metų duomenimis, Lietuva yra antroji šalis po Prancūzijos, kuri augina didžiausius plotus pluoštinių kanapių visoje Europos Sąjungoje (Agroeta, 2020). Lietuvoje kaip ir Europoje galioja tie patys įstatymai, kurie apibrėžia, kad galima kultivuoti ir gaminti produktus tik iš tų pluoštinių kanapių rūšių, kuriose nėra daugiau nei 0,2 % THC (Lankauskas, 2020). Dėl šios priežasties, yra reikalingi tikslūs bei kokybiški metodai, kanabinoidų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose. Verta paminėti, kad pluoštinėse kanapėse kanabinoidai yra sintetinami rūgštinėmis formomis, kurios veikiant šviesai ar šilumai, dekarboksilinimo reakcijos metu virsta į savo neutralias formas. Dėl šios priežasties, yra reikalingi metodai, kurie gebėtų nustatyti ne tik neutralių kanabinoidų koncentracijas, bet ir rūgštinių jų formų, kadangi tai turi įtakos bendrai kanabinoidų koncentracijai pluoštinėse kanapėse. Vienas iš jų – efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC), kuri leidžia per trumpą laiką identifikuoti visas kanabinoidų formas bei įvertinti tikslią jų koncentraciją mėginiuose. Visgi, dar nėra jokio standartizuoto HPLC metodo, kuris būtų naudojamas kanabinoidų detekcijai ir koncentracijos nustatymui kanapių produktuose. Dėl šios priežasties, pagrindinis baigiamojo magistrinio darbo tikslas buvo validuoti laboratorijoje sukurtą ir optimizuotą efektyviosios skysčių chromatografijos metodą, skirtą kanabinoidų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose.

Darbo tikslas: Validuoti laboratorijoje sukurtą ir optimizuotą efektyviosios skysčių chromatografijos metodą ir jį pritaikyti pagrindinių 8 kanabinoidų identifikavimui bei koncentracijos nustatymui pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa* L.) produktuose.

• **Darbo uždaviniai:**

- Įsisavinti laboratorijoje sukurtą ir optimizuotą efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodą, skirtą 8 kanabinoidų kiekybiniam nustatymui;
- Atlikti *Cannabis sativa* L. mėginių stabilumo studijas bei parinkti tinkamiausias sąlygas mėginių saugojimui;
- Atlikti HPLC metodo, skirto kanabinoidų nustatymui pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa* L.) produktuose, validavimą;
- Atlikti kanabinoidų analizę pasirinktuose 6 *Cannabis sativa* L. produktuose (biomasėje, arbatose, maisto papilduose ir aliejuje).

1. LITERATŪROS APŽVALGA

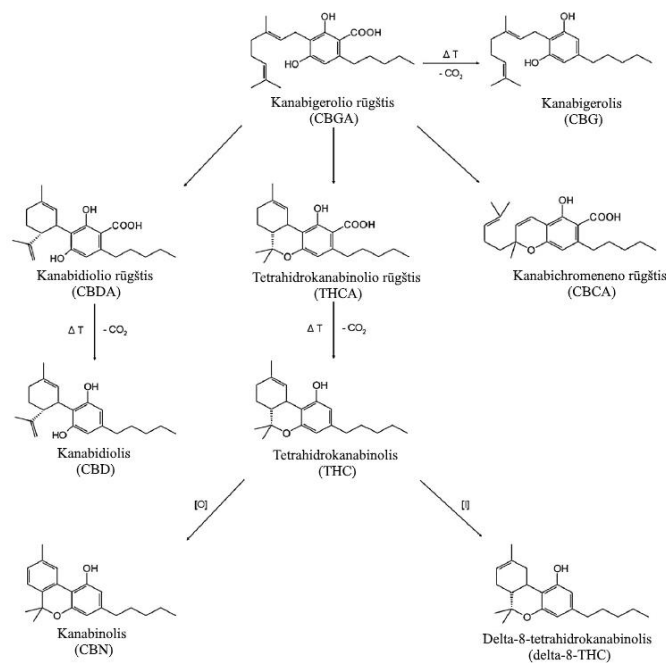
1.1. Pluoštinės kanapės (*Cannabis sativa* L.)

Pluoštinės kanapės (*Cannabis sativa* L.) – tai viena iš seniausiai auginamų augalinių kultūrų, kilusių iš Azijos, kuri pramoniniams tikslams buvo pradėta naudoti daugiau nei prieš 6000 metų (Burgel ir kt., 2020; Atakan, 2012). Šis žolinis augalas priklauso magnolijonų šeimai – *Cannabaceae*, kuri pagal genetinius, botaninius bei cheminės sudėties skirtumus gali būti skirstoma į tris pagrindines kanapių rūšis – *Cannabis sativa* L., *Cannabis ruderalis* bei *Cannabis indica*. Remiantis šiuolaikine pluoštinių kanapių klasifikacija yra priimta naudoti bendrinį pavadinimą visoms trimis augalų rūšims apibūdinti – *Cannabis sativa* L. – bei skirstyti jas tik pagal chemotipą, kuris priklauso nuo pagrindinių kanapes sudarančių cheminių junginių – kanabinoidų – koncentracijos (Thomas ir ElSohly, 2016; Mandrioli ir kt., 2019).

Nors žinoma daugiau nei 50 000 galimų pluoštinių kanapių panaudojimo būdų, didžiausią susidomėjimą jos kelia dėl savo gydomojo poveikio (Open Access Government, 2020). Būtent dėl jo, *C.sativa* L. gali būti traktuojama kaip vienas iš kontroversiškesnių augalų šiuolaikinėje visuomenėje (De Backer ir kt., 2009). Medicinoje *Cannabis sativa* L. gali būti naudojama dviejų tipų – kaip medicininė kanapė arba marihuana (McRae ir Melanson, 2020). Medicininė kanapė – tai *C.sativa* L. veislė, kuri turi priešingą fitocheminę sudėtį nei narkotinė medžiaga – marihuana. Šis tipas turi mažą kiekį psichoaktyvios medžiagos tetrahidrokanabinolio (THC) bei didelę koncentraciją kanabidiolio (CBD), kuris pasižymi antipsichoziniu, priešvėžiniu bei neuroprotekciniu poveikiu (Zivovinic ir kt., 2018). Kaip jau minėta, kita *C. sativa* L. veislė, kuri remiantis Pasaulinės sveikatos organizacijos (PSO) duomenimis, yra daugiausiai pasaulyje suvartojama narkotinė medžiaga - marihuana (Bridgeman ir Abazia, 2017). Priešingai nei medicininė kanapė, marihuana turi mažesnę kanabidiolio bei didesnę tetrahidrokanabinolio koncentraciją, kuris atsakingas už šio augalo psichoaktyvų poveikį. Dažniausiai kanapėse yra randama iki 0,3 % THC, tačiau marihuanoje šis kiekis gali siekti daugiau nei 20 % ir būtent dėl šios priežasties daugelyje pasaulio šalių, šio *C.sativa* L. tipo vartojimas yra griežtai reguliuojamas arba išvis draudžiamas (Ifeluva ir kt., 2020). Europos Sąjungoje yra leidžiama tik tų pluoštinių kanapių rūšių kultivacija, kuri turi mažesnę kiekį nei 0,2 % THC (Hadener ir kt, 2019). Lietuvoje 2019 metais įsigaliojo įstatymas, kuriame numatyta, kad pacientai sergantys sunkia epilepsijos forma, ŽIV/AIDS arba vėžiu, gali vartoti medicininės kanapes simptomų palengvinimui (Cannabis business plan, 2020).

1.1.1. Fitocheminė pluoštinių kanapių sudėtis

Pluoštinė kanapė yra kompleksiškas augalas, kuriame randama daugiau nei 500 skirtingų junginių, iš kurių didžiausią dalį sudaro terpenai, kurie atsakingi už unikalų kanapių aromatą. Nors šie fitochemikalai užima pirmąją vietą pagal paplitimą, *Cannabis sativa* L. sulaukė didelio susidomėjimo ne dėl jų, o dėl junginių, kurie yra paplitę tik kanapėse ir yra atsakingi už jos biologinius aktyvumus – kanabinoidų (Mudge ir kt., 2017). Fitokanabinoidai - tai meroterpenoidų klasė, kurią sudaro daugiau nei 100 narių. Šie junginiai yra sintetinami *C. sativa* L. augalo liaukinių trichomų sekretorinėse ląstelėse iš poliketidų ir monoterpenų fragmentų, kuriems susijungus susidaro visų kanabinoidų pirmtakas – kanabigerolio rūgštis (CBGA) (Ramawat ir Merillon, 2013). Visi fitokanabinoidai gali būti skirstomi į dvi grupes – pagrindinius ir antrinius (angl. *minor*). Pirmajai grupei priklauso kanabidiolis (CBD), tetrahidrokanabinolis (THC), kanabigerolis (CBG) bei kanabichromenas (CBC), o antrajai – Δ -8-tetrahidrokanabinolis (Δ 8-THC), kanabinolis (CBN), kanabiciklolis (CBL), kanabidivarinas (CBDV) bei kiti. Nors tiksliai nėra išsiaiškintas šis skirstymas, manoma, kad vadinamieji antriniai kanabinoidai yra pagrindinių fitokanabinoidų dariniai (Thomas ir Kayser, 2019). Verta paminėti, kad visi fermentiniu keliu gaunami kanabinoidai yra produkuojami savo rūgštine forma (Nachnani ir kt., 2020). Kadangi rūgštiniai kanabinoidai nėra stabilūs, dekarboksilinimo reakcijos metu, veikiant šviesai ar šilumai, jie yra paverčiami į savo neutralias būsenas arba pakeičiami į antrinių kanabinoidų formas (1.1 pav.) (Wang ir kt., 2016).



1.1 pav. Kanabinoidų biosintezės kelias (De Backer ir kt., 2009).

Fitokanabinoidų gamyba ir koncentracija pluoštinėse kanapėse priklauso nuo įvairių išorinių – drėgmės, šviesos, temperatūros – bei vidinių – augalo rūšies, dalies, hormonų lygio – faktorių (Goncalves ir kt., 2020). Vienas iš pagrindinių kanabinoidų randamų *C.sativa* L. žieduose bei lapuose yra Δ 9-tetrahidrokanabinolis (Δ 9-THC) (Vučkovič ir kt., 2018). Tetrahidrokanabinolis – tai psichoaktyvi medžiaga, kuri atsakinga už didžiąją dalį pluoštinės kanapės biologinių savybių. Organizme THC veikia kaip dalinis agonistas endokanabinoidų sistemos (ECS) receptoriams CB1 ir CB2, sukeldamas psichoaktyvius pokyčius žmogaus smegenyse (Paronis CA ir kt., 2012). Šis kanabinoidas taip pat atsakingas už *C.sativa* L. priešūždegiminį, imunomoduliacinį, apetitą stimuliuojantį bei priešvėžinį poveikį ir dėl šios priežasties, sulaukusį didelio susidomėjimo dėl potencialaus terapinio panaudojimo medicinoje (Russo ir Guy, 2006). Pluoštinėse kanapėse Δ 9-THC egzistuoja kaip dviejų THCA-A bei THCA-B rūgštinių formų junginys. Pirminis tetrahidrokanabinolio junginys yra THCA-A, kuris yra tapęs daugelio farmakologinių tyrimų objektu, kuomet THCA-B izomeras naudojamas kanabinoidų receptorių veikimo modelio projektavimui (McPartland ir kt., 2017). Dekarboksilinimo reakcijos metu pirminis Δ 9-THC junginys gali būti paverčiamas į savo Δ 8-THC izomerą arba į aromatizuotą darinį – kanabinolį. Kadangi CBN yra labai atsparus oksidacijos procesui, jis dažnai yra naudojamas narkotinių kanapių identifikavimui arba *C.sativa* L. augalo amžiaus nustatymui, remiantis THC:CBN koncentracija (Hanus ir kt., 2016; Ross ir ElSohly, 1997). Antrasis pagal paplitimą pluoštinėse kanapėse randamas kanabinoidas – CBD (Shannon ir kt., 2019). Kanabidiolis – tai fitokanabinoidas, kuris didelio susidomėjimo sulaukė dėl savo nepsichoaktyvaus poveikio (Larsen ir Shahinas, 2020). Žmogaus organizme CBD veikia kaip endokanabinoidų sistemos receptorių CB1 bei CB2 antagonistas, sukeldamas priešūždegiminį, imunomoduliacinį, antipsichozinį, analgetinį, antiepileptinį, neuroprotekcinį bei priešvėžinį poveikį (Huestis ir kt., 2019; Aizpurua-Olaizola ir kt., 2014). CBD yra gaunamas dekarboksilinimo reakcijos metu iš kanabidiolio rūgšties (CBDA), kuri pasižymi antimikrobinu poveikiu (Martinenghi ir kt., 2020). Be pagrindinių dviejų kanabinoidų THC bei CBD, pluoštinėse kanapėse taip pat randama nemažai kanabichromeno (CBC), kuris atsakingas už *C.sativa* L. priešūždegiminį, antimikrobinį, analgetinį bei antidepresinį poveikį (Izzo ir kt., 2012). Visų šių pirminių – THC, CBD, CBN bei CBC – junginių poveikis gali būti padidintas veikiant sinergijai su antriniais kanabinoidais (McPartland ir Russo, 2001).

Tarp didelės gausos terpenų bei kanabinoidų, pluoštinėse kanapėse taip pat galima rasti įvairių riebalų rūgščių, fenolių ir flavonoidų, kurie pasižymi priešūždegiminiu, antimikrobinu, neuroprotekcinu ir antiproliferaciniu poveikiu, aminorūgščių bei mineralinių medžiagų (Lewis ir kt., 2017; Andre ir kt., 2016).

1.1.1.1. Endokanabinoidinė sistema

Dauguma biologinių pluoštinių kanapių savybių, susijusių su kanabinoidais, priklauso nuo šių fitochemikalų sąveikos su žmogaus endokanabinoidų sistema (Osnat ir Reuven, 2020). Tai dalis centrinės nervų sistemos (CNS), turinti didelę įtaką atsakant į endogeninius ir egzogeninius dirgiklius (Lu ir Mackie, 2016). ECS sudaro endokanabinoidai, kanabinoidų receptoriai bei fermentai, kurie atsakingi už endokanabinoidų biosintezę ir degradaciją (Wu, 2019). Atlikti tyrimai parodė, kad farmakologinis pluoštinių kanapių poveikis yra išgaunamas fitokanabinoidams prisijungus prie specifinių su plazminės membranos G baltymu surištų kanabinoidų receptorių - CB1 bei CB2 (Berman ir kt., 2018). Daugiausiai paplitęs žmogaus organizme, randamas CNS, pamatiniame ganglyje, smegenėlėse bei hipokampe, yra kanabinoidų receptoriai CB1, priešingai nei šio, didžiausias CB2 receptoriaus kiekis yra randamas imuninėje sistemoje (Reggio, 2010). Šių receptorių aktyvacija slopina ne tik lokomotorikos aktyvumą bei uždegiminį limfocitų atsaką, bet reguliuoja ir atmintį, emocijas bei hormonų homeostazę. Dėl šios priežasties, yra išaugęs didelis susidomėjimas į kanabinoidų receptoriaus nukreiptų taikinių kūrimu, kadangi jie gali būti panaudojami įvairių ligų gydymui (Zagzoog ir kt., 2020).

1.1.2. Pluoštinės kanapės medicinoje

Pluoštinės kanapės pasižymi įvairia gausa biologinių savybių, naudingų žmogaus sveikatai. Kanabinoidų sąveikos su specifiniais endokanabinoidinės sistemos receptoriais ir jų sukeltų procesų tyrimų bei analizės dėka, buvo suteikta galimybė sukurti įvairius terapinius preparatus, kurie padėtų sumažinti įvairių ligų sukeltus šalutinius simptomus arba juos naudoti kaip alternatyvą, kai pagrindinis vaistas nėra efektyvus.

Epilepsija – tai neurologinė liga, sukianti pasikartojančius, neišprovokuotus priepuolius ir apsunkinanti žmogaus gyvenimą. Ši patofiziologinė būklė yra viena iš daugiausiai paplitusių visame pasaulyje, kuri nustatoma 50 iš 100 000 gyventojų (Stafstrom ir Carmant, 2015). Žmonės sergantys epilepsija ir siekiantys išvengti priepuolių, vartoja antiepilepsinius vaistus, tačiau pacientų, kurie yra atsparūs šiems medikamentams vis daugėja, dėl to medikai ieško alternatyvių gydymo būdų. Vienas iš jų – kanabinoidų Δ^9 -THC bei CBD naudojimas. Nustatyta, jog šie fitochemikalai gali padėti išvengti pasikartojančių priepuolių ir sumažinti mirtingumą, nesukeldami pašalinių efektų *in vivo* (Rosenberg ir kt., 2015).

Vėžys – tai daugiau nei 100 ligų sudaranti grupė, pasireiškianti nekontroliuojamu ląstelių dalijimusi įvairiuose kūno audiniuose (National Institute of Health, 2007). Pagrindine terapine priemone

taikoma vėžio gydyme išlieka chemoterapija, kuri sukelia įvairius šalutinius poveikius žmogaus organizmui – nuo skausmo iki pykinimo bei vėmimo. Siekiant sumažinti skausmą, onkologai dažnai skiria opioidus – vaistus, kurie veikdami opioidų receptorių sukelia analgetinį efektą (Bruera ir Paicic, 2015). Deja, vartojant ilgesnį laiką, šie preparatai praranda skausmą mažinantį poveikį bei sukelia šalutinius simptomus – apetito netekimą, pykinimą bei vidurių užkietėjimą. Dėl šios priežasties, mokslininkai ir medikai ieško alternatyvių gydymo būdų sumažinti skausmą pacientams, kurie serga vėžiu. Vienas iš jų – kanabinoidų vartojimas (Elikottil ir kt., 2009). Šiuo metu ypatingai yra išaugęs susidomėjimas priešvėžiniu ir chemoterapijos sukeltų šalutinių simptomų lengvinančiu kanabinoidų efektyvumu. Vienas iš pirmųjų tyrimų, kuomet nustatytas antineoplastinis fitokanabinoidų poveikis, buvo atliktas dar 1975 metais. Nuo to laiko, įvairūs tyrimai su ląstelių kultūromis bei modeliniais organizmais tik patvirtino faktą, kad kanabinoidai sąveikaudami su endokanabinoidine sistema, sugeba slopinti vėžinių ląstelių daljimąsi, augimą, angiogenezę bei inicijuoja apoptozę. Dėl šios priežasties, įvairūs preparatai su kanabinoidais yra tapę potencialia priemone vėžio gydyme (Dariš ir kt., 2019). Kaip jau minėta, fitokanabinoidai gali būti panaudoti ir chemoterapijos sukeltam skausmo ir kitų šalutinių poveikių slopinimui. Nustatyta, kad kanabinoidai palengvina pykinimą ir vėmimą bei stimuliuoja apetitą. Remiantis šiais tyrimais ir nustatytu analgetiniu poveikiu, buvo sukurti bei patvirtinti keli preparatai – *Marinol*® (*Abbvie, JAV*), *Cesamet*® (*Eli Lilly and Company, JAV*) bei *Sativex*® (*GW Pharmaceuticals, JK*) - kurių sudėtyje yra kanabinoidų arba juos imituojančių komponentų, kurie naudojami pacientams pasireiškiančių šalutinių simptomų po chemoterapijos mažinimui (Velasco ir kt., 2016).

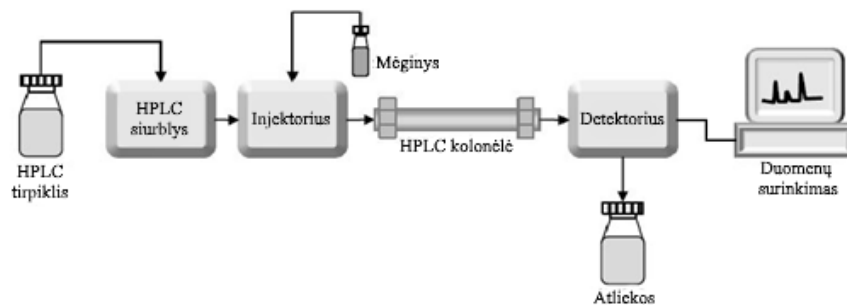
Kaip jau minėta, endokanabinoidinės sistemos CB2 receptorių daugiausiai randama imuninių ląstelių paviršiuje, o jų aktyvacija gali slopinti uždegiminį atsaką į įvairius dirgiklius – tai ypač svarbu, jeigu imuninė sistema sukelia per stiprų uždegimą ir dėl to kyla įvairios komplikacijos. Vienas iš tokių atvejų – pasaulinę pandemiją sukėlusio sunkaus ūminio respiracinio sindromo koronaviruso - 2 (angl. *SARS-CoV-2*) koronavirusinė liga -19 (angl. *COVID-19*), kurios metu yra pažeidžiami plaučių audiniai ir ląstelės bei pasireiškia pneumonija. Ši ūminė infekcija yra asocijuojama su citokinų audra – procesu, kuomet uždegiminis atsakas yra nevaldomas ir sukeliama įvairios komplikacijos, grėsmingos žmogaus gyvybei (Byrareddy ir Mohan, 2020; Tisoncik ir kt., 2012). Manoma, kad kanabinoidai galėtų būti panaudojami kaip imuninės sistemos modulatoriai, kurie valdytų balansą tarp uždegimą skatinančių ir slopinančių citokinų bei taip palengvintų *COVID-19* ligos sukeltas komplikacijas (Anil ir kt., 2021).

1.2. Analitiniai kanabinoidų nustatymo metodai

Pluoštinės kanapės – kompleksiniai augalai, turintys daugiau nei kelis šimtus skirtingų junginių, dėl kurių *C.sativa* L. komponentų analizė tampa sudėtinga (Pollastro ir kt., 2018). Dėl šios priežasties, reikalingi tikslūs bei jautrūs metodai, gebantys identifikuoti tikslines analites tarp junginių gausos. Kanabinoidų nustatymas kanapių mėginiuose dažniausiai yra atliekamas pasitelkiant skysčių chromatografijos (LC) metodą, kiek rečiau tyrimuose yra naudojama dujų chromatografija-masių spektrometrija (GC-MS) (Sigma Aldrich, 2017).

Dujų chromatografija – tai analitinis metodas, skirtas junginių, kurie gali būti paverčiami į dujas, nustatymui mėginiuose. Metodo principas paremtas tuo, kad identifikavimui skirtos analitės kartu su nešančiosiomis dujomis yra pernešamos per kolonėlę (Gutch, 2012). Kadangi tiriamos medžiagos turi būti paverčiamos į dujas, GC naudojama kolonėlė yra įdedama į termiškai reguliuojamą krosnį, kurioje junginiai yra išgarinami (Bukhaiti ir kt., 2017). Analčių atskyrimas vykdomas pagal jų giminingumą stacionariai fazei, kuria užpildyta naudojama kolonėlė (Kusch, 2018). Kuo mažesnis junginio giminingumas, tuo trumpesnis sulaikymo laikas chromatografinėje kolonėleje (Forgacs ir Cserhati, 2003). Vienas iš šio metodo privalumų yra tas, jog jį sujungus su masių spektrometru, lengvai galima identifikuoti nežinomas analites mėginyje, tačiau šios medžiagos turi būti lakios ir nedegraduoti aukštoje temperatūroje (Akash ir Rehman, 2020). Tai yra viena iš priežasčių, kodėl dujų chromatografija yra retai naudojama kanabinoidų nustatymui kanapių produktuose. Fitokanabinoidai *Cannabis sativa* L. augale daugiausiai yra randami rūgštinės formos, o tai lemia, kad aukštose temperatūrose jie yra dekarboksilinami. Dėl šios priežasties, naudojant dujų chromatografijos metodą nėra nustatomos rūgštinės kanabinoidų formos bei jų esamos koncentracijos mėginiuose (Zekič ir Križman, 2020). Ši problema galėtų būti išsprędžiama panaudojant mėginių derivatizacijos metodą. Reakcijos metu, tiriamų analčių funkcinės grupės yra modifikuojamos taip, kad junginiai tampa pakankamai lakūs ir atsparūs skilimui veikiant aukštomis temperatūroms (Orata, 2012). Tokie junginiai vėliau gali būti toliau analizuojami dujų chromatografijos metodu, tačiau šis papildomas žingsnis užima daugiau laiko ir padidėja klaidingų rezultatų gavimo tikimybė (Campanella ir kt., 2020).

Populiariausias kanabinoidų identifikavimo kanapių produktuose metodas, nereikalaujantis derivatizacijos bei gebantis nustatyti ir rūgštines fitokanabinoidų formas – efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC) (ElSohly, 2007). Pagrindiniai komponentai, kurie sudaro HPLC prietaisą yra kolonėlė, kuri užpildyta stacionaria faze, siurblys, kurio dėka judrioji fazė juda per kolonėlę bei detektorius, kuris leidžia identifikuoti analites pagal jų sulaikymo laiką (1.2 pav.) (Malviya ir kt., 2010).



1.2 pav. Skysčių chromatografinės sistemos sudedamosios dalys (Laboratoryinfo.com, 2021).

Efektyvios skysčių chromatografijos principas paremtas tuo, kad tiriamos analitės yra ištirpinamos tirpiklyje bei toks paruoštas mėginys yra perkeliamas į HPLC prietaisą. Judriajai fazei kartu su tiriamaisiais junginiais judant per kolonėlę, analitės sąveikauja su stacionaria faze. Kuo didesnė tarpusavio sąveika – tuo lėčiau analitės išeina per kolonėlę ir jų sulaikymo laikas būna ilgesnis (Petrova ir Sauer, 2017). Judriajai fazei pratekėjus pro kolonėlę, ji sąveikauja su detektoriumi, kurio pasirinkimas ypač svarbus, siekiant optimizuoti HPLC metodo jautrumą. Detektoriaus dėka yra nustatoma individualių analitės komponentų koncentracija, kuri yra proporcinga išeinančiam elektriniam signalui. Yra išskiriami du pagrindiniai detektorių tipai – didmenos savybių (angl. *bulk property*) bei tirpiklių savybių (angl. *solute property*). Pirmojo tipo - elektrinio laidumo, refrakcinio indekso, elektrocheminiai bei šviesos sklaidos - detektoriai matuoja judančiosios fazės ir ištirpusios medžiagos pokyčius, o antrojo tipo – ultravioletinės šviesos, fiksuoto bangos ilgio, kintamo bangos ilgio bei diodų matricos - detektoriai nustato fizikinius ir cheminius pokyčius komponentų, esančių judriojoje fazėje (Sunil ir kt., 2018; Vare ir kt., 2019). Lyginant skysčių chromatografiją su dujų chromatografija, šis metodas yra plačiau pritaikomas, kadangi nėra reikalaujama, kad analitė būtų laki medžiaga bei išliktų stabili esant aukštomis temperatūroms, vienintelė sąlyga, kad tiriamą medžiagą būtų tirpi pasirinktoje judriojoje fazėje (Nielsen, 2010). Visgi, jeigu siekiama išanalizuoti mėginį, kurio analitės yra nežinomos, HPLC nėra tinkamas metodas junginių struktūrinei informacijai gauti (Pang ir kt., 2016).

1.3. Tyrimo metodų validavimas

Kuriant naujus ar tobulinant esamus analitinius metodus yra reikalingas jų validavimas – procesas, kurio metu pasitelkiant laboratorinius tyrimus yra nustatoma, ar sukurtos procedūros parametrai atitinka keliamus reikalavimus (Gupta ir kt., 2012). Metodo patvirtinimo procesas leidžia patikrinti ar sukurtu metodu gaunami rezultatai yra patikimi ir kokybiški bei ar jie bus atkartojami tarp tos pačios ar skirtingų

laboratorijų (Deshmukh ir kt., 2019). Visi metodai prieš juos pradedant naudoti kasdienėms analizėms turi būti validuoti, o patvirtinimui skirtos charakteristikos atitikti keliamus reikalavimus (Garcia ir kt., 2011). Pagrindiniai parametrai, kurie turi būti įvertinti yra metodo specifiškumas (angl. *specificity*), tiesiškumas (angl. *linearity*), glaudumas (angl. *precision*), tikslumas (angl. *accuracy*), aptikimo riba (angl. *Limit of Detection* – LoD), kiekybinio nustatymo riba (angl. *Limit of Quantitation* – LoQ) bei tvirtumas (angl. *robustness*) (Ravisankar ir kt., 2015).

- Specifiškumas / atrankumas – tai metodo gebėjimas identifikuoti tiriamąją analizę kompleksiniame mišinyje (Chowdary ir kt., 2020).
- Tiesiškumas – tai analitinio proceso gebėjimas gauti rezultatus, kurie būtų tiesiogiai proporcingi analizės koncentracijai mėginyje (European Medicines Agency, 1995).
- Glaudumas – parametras, apibūdinantis gautų rezultatų artumą, kartojant matavimus to paties arba panašaus mėginio (Raposo ir Ibelli-Bianco, 2020).
- Tikslumas – tai įvertis, kuris apibūdina gauto rezultato artumą tikrajai vertei (University of Tartu, 2021).
- Aptikimo riba (LoD) – tai parametras, skirtas nustatyti kokią mažiausią koncentraciją tiriamos analizės mėginyje galima identifikuoti panaudojant sukurtą metodą (Rao, 2018).
- Kiekybinio nustatymo riba (LoQ) – tai mažiausias analizės kiekis, kurį galima kiekybiškai įvertinti mėginyje, esant tinkamoms glaudumo bei tikslumo vertėms (Shabir, 2004).
- Metodo atsparumas – metodo gebėjimas išlikti nepaveiktam, atsiradus nedideliems parametru pokyčiams (Andreasson ir kt., 2015).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudotos medžiagos

2.1.1. Tyrimo objektas

Metodo validavimui ir mėginių stabilumo tyrimams naudotų pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa* L.) biomasė gauta iš Lietuvoje auginančių kanapes ūkių, o viso spektro kanapių žiedų aliejus iš *CannaMama.eu* elektroninės parduotuvės. Metodo pritaikymo tyrimams naudoti produktai – pluoštinių kanapių arbatos (A-C) gautos iš elektroninių parduotuvių *naturallineshop.com*, *urbanfood.lt* ir *barbora.lt*, maisto papildas D iš *eurovaistinė.lt* elektroninės parduotuvės, o kanapių aliejus iš *esaltalankis.lt* elektroninės parduotuvės.

2.1.2. Sertifikuotos pamatinės medžiagos ir tirpikliai

- Naudoti tirpikliai:
 - Dejonizuotas vanduo, 18,2 MΩ·cm;
 - 0,10 % skruzdžių rūgšties tirpalas: 10 ml skruzdžių rūgšties, 100 % (*Scharlab*, Ispanija) ištirpinta 990 ml dejonizuotame vandenyje;
 - 0,05 % skruzdžių rūgšties tirpalas: 5 ml skruzdžių rūgšties, 100 % (*Scharlab*, Ispanija) ištirpinta 995 ml metanolio (MeOH), 100% (*Honeywell*, JAV).
- Sertifikuotos pamatinės medžiagos (CRM) naudotos kalibraciniams grafikams:
 - Kanabidivarinas (CBDV) 1,000 mg/ml (1261,03 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,006 mg/ml (*Ceriliant*, JAV);
 - Kanabidiolis (CBD) 0,950 – 1,050 mg/ml (1264,81 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,006 mg/ml (*Sigma-Aldrich*, JAV);
 - Kanabigerolis (CBG) 0,998 mg/ml (1258,39 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,0054 mg/ml (*Dr. Ehrenstorfer*, UK);
 - Kanabidiolio rūgštis (CBDA) 1,000 mg/ml (1277,14 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,006 mg/ml (*Ceriliant*, JAV);
 - Kanabigerolio rūgštis (CBGA) 1,000 mg/ml (1277,14 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,006 mg/ml (*Supelco*, JAV);

- Kanabinolis (CBN) 1,000 mg/ml (1261,03 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,006 mg/ml (*Supelco*, JAV);
- Kanabichromenas (CBC) 1,000 mg/ml (1261,03 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,006 mg/ml (*Ceriliant*, JAV);
- Tetrahidrokanabinolio rūgštis (THCA) 1,000 mg/ml (1277,14 ppm), išplėstinis neapibrėžtumas (U) 0,006 mg/ml (*Ceriliant*, JAV).

2.1.3. Pluoštinių kanapių produktai

- Kanabinoidų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui naudoti kanapių produktai (A - F):
 - **A** – Smulkinta kanapių gėlių ir lapų arbata, gamintojo nurodyta, kad sudėtyje yra iki 2-3 % CBD;
 - **B** – Pluoštinių kanapių lapų bei žiedų arbata, gamintojo nurodyta, kad arbata sudaryta iš 100 % kanapių;
 - **C** – 100 % kanapių lapų arbata;
 - **D** – Maisto papildas, kurio sudėtyje yra 59,3 % šalto spaudimo rafinuoto pluoštinių kanapių (*Cannabis sativa* L.) sėklų aliejaus. Vienoje maisto papildų kapsulėje yra 145,2 mg pluoštinių kanapių sėklų aliejaus;
 - **E** – Koncentruotas CBD aliejus, gamintojo nurodyta, kad sudėtyje yra 5 % CBD;
 - **F** – Maisto papildas, kurio sudėtyje yra 99,5 % nerafinuoto kanapių sėklų aliejaus.

2.2. Naudota įranga ir sąnaudinės medžiagos

- Dejonizuoto vandens paruošimo *Sistema Arium Mini* (*Sartorius*, Vokietija);
- Žaliavos smulkinimo malūnėlis (*Standard*, Latvija);
- Analitinės svarstyklės *KERN 770* (*Kern*, Vokietija);
- Drėgmės analizatorius *KERN DBS-A02* (*Kern*, Vokietija);
- Automatinės pipetės 500 – 5000 µl ir 100 – 1000 µl (*Eppendorf*, Vokietija);
- Analitinis švirkštas 50 µl (*Hamilton*, JAV);
- Centrifuginiai mėgintuvėliai 50 ml;
- Ultragarso bangų vonelė *Sonorex* (*Bandelin*, Vokietija);
- Vienkartiniai švirkštai 5 ml (*B.Braun*, Vokietija);

- Švirkštiniai filtrai, porų dydis 0,45 mm (*Agilent Technologies*, JAV);
- Chromatografiniai 2 ml buteliukai (*Agilent Technologies*, JAV);
- Skysčių chromatografinė sistema *Agilent 1100* su fotodiodų matricos detektoriumi (DAD) (*Agilent Technologies*, JAV);
- Chromatografinė kolonėlė *InfinityLab Poroshell 120 EC-C18*, 3,0 x 50 mm, 2,7 μm (*Agilent Technologies*, JAV).

2.3. Metodai

2.3.1. Kanabinoidų ekstrakcija

Kanabinoidų ekstrakcijos procedūra šiame tyrime buvo vykdoma priklausomai nuo naudojamo pluoštinių kanapių produkto tipo:

- Jeigu analizei naudota pluoštinių kanapių biomasė, ji pirmiausiai buvo susmulkinama žaliavos smulkinimo aparatu, tuomet drėgmės analizatoriumi nustatomas nuodžiūvis (%) bei apskaičiuojamas sausos medžiagos kiekis esantis žaliavoje (%). Ekstrakcijai atlikti, buvo atsveriamas 0,2 g (0,00001 g tikslumu) pluoštinių kanapių biomasės, suberiama į 50 ml centrifuginį mėgintuvėlį bei užpilama 20 ml MeOH. Tirpiklio įpiltas kiekis pasvertas svarstyklėmis (0,00001 g tikslumu). Gautas mišinys sumaišytas bei įdėtas į ultragarso bangų vonelę 15 minučių, ekstrakcija vykdyta kambario temperatūroje. Po sonifikacijos, ekstraktas dar kartą sumaišytas bei panaudojant vienkartinį švirkštą su švirkštiniu filtru, po 1 ml išpilstytas į chromatografinius buteliukus bei perduotas analizei HPLC prietaisu.
- Jeigu ekstrakcijai naudotas pluoštinių kanapių aliejus, 50 ml centrifuginiame mėgintuvėlyje buvo atsveriamas 0,1 g (0,00001 g tikslumu) aliejaus bei užpilama 20 ml MeOH, įpiltą tirpiklio kiekį pasveriant (0,00001 g tikslumu). Tolimesnė kanabinoidų ekstrakcijos eiga vykdyta kaip pluoštinių kanapių biomasės.

2.3.2. Kanabinoidų analizė skysčių chromatografijos metodu

Efektyviosios skysčių chromatografijos analizei naudota skysčių chromatografinė sistema *Agilent 1100*. Metodo parametrai optimizuoti atsižvelgiant į gamintojo *Agilent* nurodytas kanabinoidų detekcijos

sąlygas. Kanabinoidų identifikavimas ir kiekybinis nustatymas atliktas injekuojant 5 µl paruošto ekstrakto bei panaudojant gradientinę eliuaciją. Eliuentui A naudotas vanduo su 0,10 % skruzdžių rūgštimi, o eliuentui B – metanolis su 0,05 % skruzdžių rūgštimi. Judriosios fazės paruoštos kaip nurodyta 2.1.2. skyrelyje. Vykstant analizei, skirtingu laiku buvo keičiami santykiai tarp A ir B eliuentų, palaikant 1 ml/min tirpiklio tėkmės greitį:

- 0 min A 40 % - B 60 %,
- 1 min A 40 % - B 60 %,
- 8 min A 23 % - B 77 %,
- 9,2 min A 5 % - B 95 %.

Visos analizės metu, naudotoje *InfinityLab Poroshell 120 EC-C18*, 3,0 x 50 mm, 2,7 µm kolonėlėje buvo palaikoma 50 °C temperatūra, o diodų matricos detektoriaus (DAD) spektras nustatytas ties 228 nm. Rezultatų analizė atlikta panaudojant gautus spektrinius duomenis (analičių sulaikymo laikus) bei smailių plotus *Chemstation (Agilent Technologies, JAV)* programa. Kanabinoidų sulaikymo laikas nurodytas 2.1. lentelėje.

2.1 lentelė. Kanabinoidų sulaikymo laikas naudojant gamintojo *Agilent* metodiką.

Kanabinoidas (analitė)	Sulaikymo trukmė
CBDV	3,9 min
CBD	6,5 min
CBG	6,7 min
CBDA	7,0 min
CBGA	7,9 min
CBN	8,2 min
CBC	9,8 min
THCA	10,2 min

2.3.3. Mėginių stabilumo tyrimas

Mėginių stabilumo tyrimui įvykdyti, atlikta kanabinoidų ekstrakcija iš *Cannabis sativa* L. biomasės, kaip aprašyta 2.3.1. skyrelyje. Po sonifikacijos, gautas ekstraktas perfiltruotas į naują mėgintuvėlį iš kurio buvo paimta 2 ml mišinio, pasverta (0,00001 g tikslumu) bei supilta į centrifuginį mėgintuvėlį. Į ekstraktą įpilta 6 ml MeOH, o gautas tūris pasvertas (0,00001 g tikslumu). Toks skiestas ekstraktas po 1 ml išpilstytas į 4 chromatografinius buteliukus – 3 tamsaus ir 1 skaidraus stiklo. Atlikta HPLC analizė, kaip nurodyta 2.3.2. skyrelyje, kiekvieną mėginį pamatuoju bent 5 kartus – gautos pradinio taško (T_0) vertės. Po analizės, 1 tamsus buteliukas buvo įdėtas į šarądytuvą +4 °C, 1 tamsus

buteliukas padėtas tamsioje vietoje, kambario temperatūroje bei 1 tamsus ir 1 šviesus buteliukai padėti šviesioje vietoje, kambario temperatūroje. Po savaitės, mėnesio bei 3 mėnesių laikymo skirtingose sąlygose, matavimai pakartoti – stebėta, kaip keičiasi identifikuotų analičių smailių ploto vertės.

2.3.4. Metodo validavimas (patvirtinimas)

HPLC metodo, skirto kanabinoidų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. mėginiuose, validavimas atliktas pagal laboratorijoje nustatytus parametrus bei jų priimtino vertes (2.2 lentelė). Visiems skaičiavimams atlikti naudota *Microsoft Excel (Microsoft, JAV)* programinė įranga.

2.2 lentelė. Metodo validavimo parametrai bei priimtinos vertės (kriterijai).

Parametras	Priimtino kriterijus
Tiesiškumas	Tiesiškumo intervalas: 6 - 400 ppm; R^2 vertė $\geq 0,9900$
LoD	$\leq 1,0$ ppm
LoQ	$\leq 3,50$ ppm
Išgava (teisingumas)	80,0 – 120,0 %
Glaudumas	$\leq 5,0$ %

2.3.4.1. Tiesiškumas

Metodo tiesiškumui įvertinti, sudaryti kiekvienos sertifikuotos pamatinės medžiagos (CRM) kalibraciniai grafikai, panaudojant vieną kontrolinį mėginį bei ≥ 5 skirtingas CRM koncentracijas. CBDV, CBC, CBN, CBG, CBGA bei THCA analičių kalibraciniams grafikams sudaryti buvo pasirinkti 6 taškai, panaudojant CRM koncentracijas mėginyje nuo 0,15 % iki 20,00 %. CBD kalibraciniam grafikui sudaryti pasirinkti 7 taškai, panaudojant standartų koncentracijas mėginyje nuo 0,50 % iki 35,00 %, o CBDA – panaudotos 7 skirtingos CRM koncentracijos intervale nuo 0,30 % iki 50,00 %. Visos sertifikuotos pamatinės medžiagos tirpintos metanolyje, o įdėtų medžiagų tūriai pasverti svarstyklėmis 0,00001 g tikslumu.

Mėginių analizė atlikta kaip nurodyta 2.3.2. skyrelyje, kiekvieną mėginį pamatuojant bent 3 kartus. Sertifikuotų pamatinių medžiagų koncentracijos mėginiuose, kalibracinių grafikų sudarymui, išreikštos ppm. Skaičiavimai atlikti pagal nurodytą formulę:

$$A \text{ (ppm)} = \frac{B}{m_{(x+y)}} \times y \quad (2.1)$$

Čia A – sertifikuotos pamatinės medžiagos koncentracija (ppm) mėginyje, B – sertifikuotos pamatinės medžiagos pradinė koncentracija (ppm) nurodyta sertifikate, $m_{(x+y)}$ - bendra metanolio ir sertifikuotos pamatinės medžiagos masė (g) mėginyje, x – metanolio masė (g) mėginyje, y – CRM masė (g) mėginyje.

Kiekvienos koncentracijos vertei gautos 3 HPLC-DAD signalų reikšmės (plotas po smaile) iš kurių išvestas vidurkis bei nubraižytas kalibracinis grafikas. Metodo tiesiškumo (ppm) intervalas įvertintas pagal gautų kalibracinių grafikų apatinę ir viršutinę ribas. Kalibracinių grafikų sudarymui ir skaičiavimams atlikti naudota *Microsoft Excel* (*Microsoft, JAV*) programinė įranga.

2.3.4.2. Aptikimo riba (LoD) ir kiekybinio nustatymo riba (LoQ)

Aptikimo (LoD) ir kiekybinio nustatymo (LoQ) ribos nustatytos įvertinant signalo ir triukšmo santykį (S/N) chromatogramose. LoD vertė gauta, S/N ekstrapoliuojant iki taško, kuriame analitės smailės reikšmė būtų 3,3 kartų didesnė nei triukšmo lygis. LoQ įvertinta tuo pačiu principu, ekstrapoliuojant S/N iki 10 kartų. Kiekvienos analitės S/N vertės gautos atliekant mėginių analizę HPLC prietaisu. Matavimams atlikti buvo paruošti kiekvienos analitės mėginiai, panaudojant žemiausią kalibracinio grafiko taško CRM koncentraciją. Standarto ir MeOH įdėti tūriai pasverti 0,00001 g tikslumu. Mėginių analizė HPLC atlikta kaip nurodyta 2.3.2. skyrelyje, kiekvieną mėginį pamatuojant 1 kartą. Po analizės, iš kiekvienos analitės chromatogramų gautos S/N vertės panaudotos LoD bei LoQ apskaičiavimui. Skaičiavimams atlikti naudota *Microsoft Excel* (*Microsoft, JAV*) programinė įranga, panaudojant 2.2 ir 2.3 formules.

$$\text{LoQ (ppm)} = \frac{A \text{ (ppm)} \times 10}{S/N} \quad (2.2)$$

$$\text{LoD (ppm)} = \frac{A \text{ (ppm)} \times 3,3}{S/N} \quad (2.3)$$

Čia A – sertifikuotos pamatinės medžiagos koncentracija (ppm) mėginyje, S/N – signalo ir triukšmo santykis gautas iš kiekvienos analitės chromatogramų.

2.3.4.3. Išgava (teisingumas)

Metodo teisingumas nustatytas, apskaičiuojant analičių išgavą. Išgavai įvertinti buvo naudojami du mėginiai – 1 kontrolinis mėginys bei 1 mėginys į kurį papildomai buvo įdėta 20 μl sertifikuotos

pamatinės medžiagos (tiriamos analitės), tuomet vykdyta ekstrakcija bei HPLC analizė pagal 2.3.1. ir 2.3.2. skyrelius. Kiekvienas mėginys matuotas 3 kartus. Skaičiavimams atlikti naudota *Microsoft Excel* (*Microsoft*, JAV) programinė įranga, panaudojant 2.4 formulę.

$$\text{Išgava (\%)} = \frac{m_x}{m_{sp} - m_{std}} \times 100 \quad (2.4)$$

Čia m_x – analitės masė (ppm) mėginyje, m_{sp} – analitės masė (ppm) mėginyje, kuriame buvo įdėta papildomai CRM, m_{std} – CRM masė (ppm), kuri buvo pridėta į mėginį.

2.3.4.4. Glaudumas

Metodo glaudumas įvertintas atkuriamumo (angl. *reproducibility*) sąlygomis, apskaičiuojant jungtinį santykinį standartinį nuokrypį RSD_{Pooled} (%). Atkuriamumo sąlygos yra įvardijamos kaip rezultatų gavimas, keičiant matavimų sąlygas – matavimo principą, metodą, operatorių, pamatinį etaloną ar laiką. Šio darbo metu buvo pasirinkta pakeisti laiką – matavimus atlikti pradiniam taške, po 2 savaitių ir 1 mėnesio. Glaudumo įvertinimui paruoštas 1 visų sertifikuotų pamatinių medžiagų mišinys, kuriam naudoti mėginiai, kurie buvo skirti LoD bei LoQ įvertinimui (2.3.4.2 skyrelis). Iš kiekvienos analitės mėginio paimta po 250 μl ir supilta į chromatografinį buteliuką. Atlikta HPLC analizė, kaip nurodyta 2.3.2 skyrelyje, pamatuojant mėginį 5 kartus – gautas T_0 taškas. Matavimai pakartoti po 2 savaitių bei 1 mėnesio. Jungtinio santykinio standartinio nuokrypio (RSD_{Pooled}) skaičiavimai atlikti *Microsoft Excel* (*Microsoft*, JAV) programine įranga, panaudojant 2.5 – 2.7 formules.

$$RSD (\%) = \left(\frac{SD}{\bar{c}_x} \right) \times 100 \quad (2.5)$$

$$SD (\%) = \sqrt{\frac{\sum (\bar{c}_x - c_{xi})^2}{(n - 1)}} \quad (2.6)$$

$$RSD_{\text{Pooled}} (\%) = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)RSD_1^2 + (n_2 - 1)RSD_2^2 + \dots + (n_k - 1)RSD_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}} \quad (2.7)$$

Čia RSD – santykinis standartinis nuokrypis (%), SD – standartinis nuokrypis (%), \bar{c}_x – vidutinė analitės koncentracija mėginyje (%), c_{xi} – x analitės koncentracija (%), mėginyje i , i – mėginio numeris 1,2,3,...,n, n – matavimų skaičius serijoje, RSD_{Pooled} – jungtinis santykinis standartinis nuokrypis (%), k – rezultatų serijų skaičius.

2.3.5. Matavimo rezultato neapibrėžties įvertinimas

Atliekant įvairius analičių matavimus mėginiuose yra nustatoma metodo išplėstinė neapibrėžtis, kuri parodo matavimo tikslumą ir užtikrina rezultato patikimumą su 95 % tikimybe. Matavimo rezultato neapibrėžtis yra apskaičiuojama, taikant atskirų sandų sumavimo taisyklę. Įvertinant neapibrėžtį buvo susumuoti 3 pagrindiniai sandai: 1.) mėginio matavimo santykinė standartinė neapibrėžtis $u(r)$, apibūdinanti atsitiktines paklaidas, 2.) sertifikuotos pamatinės medžiagos (naudotos matavimų kalibravimui) santykinė standartinė neapibrėžtis $u(C_z)$ bei 3.) bandinio svėrimo santykinė standartinė neapibrėžtis $u(W)$. Metodo išplėstinė neapibrėžtis U yra apskaičiuojama pasinaudojant 2.8 formule:

$$U (\%) = k \times c_x \times \sqrt{u^2(r) + u^2(C_z) + u^2(W)} \quad (2.8)$$

Čia U – metodo matavimų išplėstinė neapibrėžtis (%), k – aprėpties daugiklis, kuris lygus 2, esant normaliojo skirstinio pasiklovimo tikimybei 95 %, c_x – analitės koncentracija mėginyje (%), $u(r)$ – mėginio matavimo santykinė standartinė neapibrėžtis, $u(C_z)$ – sertifikuotos pamatinės medžiagos (naudotos matavimų kalibravimui) santykinė standartinė neapibrėžtis, $u(W)$ – bandinio svėrimo santykinė standartinė neapibrėžtis.

Mėginio matavimų santykinė standartinė neapibrėžtis išreiškiamą 2.9 formule:

$$u(r)(\%) = \frac{RSD_{\text{Pooled}}}{100 \%} \quad (2.9)$$

Čia $u(r)$ – mėginio matavimo santykinė standartinė neapibrėžtis (%), RSD_{Pooled} – jungtinis santykinis standartinis nuokrypis (%), kuris apskaičiuojamas remiantis 2.7 formule.

Sertifikuotų pamatinių medžiagų (naudotų matavimų kalibravimui) santykinė standartinė neapibrėžtis $u(C_z)$ apskaičiuojama remiantis 2.10 formule:

$$u(C_z) (\%) = \frac{U_{\text{CRM}}}{c_{\text{CRM}} \times k_{\text{CRM}}} \quad (2.10)$$

Čia U_{CRM} – sertifikuotos pamatinės medžiagos (naudotos matavimų kalibravimui) išplėstinė neapibrėžtis (mg/ml), gauta iš sertifikato, c_{CRM} – sertifikuotos pamatinės medžiagos koncentracija (mg/ml), gauta iš sertifikato, k_{CRM} – aprėpties daugiklis, gautas iš sertifikuotos pamatinės medžiagos sertifikato.

Bandinio svėrimo santykinė standartinė neapibrėžtis $u(W)$ yra apskaičiuojama remiantis svarstyklių kalibracija, kuri yra atliekama kas dvejus metus. Laboratorijoje yra nustatyta, kad $u(W)$ yra lygus 0,000000238 %. Kadangi šis skaičius yra labai mažas, jis nėra įtraukiamas į metodo išplėstinės neapibrėžties (U) skaičiavimą, dėl šios priežasties metodo matavimų išplėstinės neapibrėžties įvertinimui yra naudojama sutrumpinta formulė:

$$U (\%) = k \times c_x \times \sqrt{u^2(r) + u^2(C_z)} \quad (2.11)$$

Čia U – metodo matavimų išplėstinė neapibrėžtis (%), k – aprėpties daugiklis, kuris lygus 2, esant normaliojo skirstinio pasiklivimo tikimybei 95 %, c_x – analitės koncentracija mėginyje (%), $u(r)$ – mėginio matavimo santykinė standartinė neapibrėžtis, $u(C_z)$ – sertifikuotos pamatinės medžiagos (naudotos matavimų kalibravimui) santykinė standartinė neapibrėžtis.

2.3.6. Kanabinoidų identifikavimas ir koncentracijos nustatymas kanapių produktuose

Kanabinoidų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui skirtinguose *Cannabis sativa* L. produktuose A - F, mėginių ekstraktai paruošti pagal 2.3.1 skyrelį, remiantis produkto tipu (biomasė ar aliejus). Tolimesnė analizė HPLC metodu atlikta, kaip nurodyta 2.3.2. skyrelyje, kiekvieną mėginį pamatuojant 3 kartus. Kanabinoidų nustatymas gautose chromatogramose atliktas pagal analičių sulaikymo laiką (2.1 lentelė). Identifikuotų kanabinoidų koncentracija mėginyje apskaičiuota pagal produkto tipą. Skaičiavimai atlikti *Microsoft Excel (Microsoft, JAV)* programine įranga, panaudojant 2.12 - 2.15 formules.

- Biomassė:

1. Remiantis kalibracinio grafiko regresijos lygtimi $y=ax+b$, apskaičiuojamas analitės kiekis (ppm) mėginyje (A):

$$A (\text{ppm}) = \frac{\overline{AUC}-b}{a} \quad (2.12)$$

Čia A – analitės kiekis mėginyje (ppm), \overline{AUC} – smailės plotų vidurkis, a ir b – kalibracinio grafiko regresinės lygties vertės.

2. Apskaičiuojama analitės masė (g) mėginyje (B):

$$B \text{ (g)} = \frac{A \times C}{1000000} \quad (2.13)$$

Čia B – analizės masės mėginyje (g), A – analizės kiekis mėginyje (ppm), C – ekstrakcijos metu įdėto tirpiklio (MeOH) masė (g).

3. Apskaičiuojama analizės koncentracija (%) mėginyje (D):

$$D \text{ (\%)} = \frac{B}{E \times F} \times 100 \quad (2.14)$$

Čia D – analizės koncentracija (%) mėginyje, E – ekstrakcijos metu nustatyta bendra mėginio masė (g), F – drėgmės analizatoriumi nustatytas žaliavoje esantis sausos medžiagos kiekis (%).

- Aliejus:

1-2. Veiksmai atliekami tokie patys kaip ir nustatant analičių koncentraciją biomasės produktuose.

3. Apskaičiuojama analizės koncentracija (%) mėginyje (D):

$$D \text{ (\%)} = \frac{B}{E} \times 100 \quad (2.15)$$

Čia D – analizės koncentracija (%) mėginyje, B – analizės masė (g) mėginyje, E – ekstrakcijos metu nustatyta bendra mėginio masė (g).

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Metodas, skirtas kanabinoidų nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose

HPLC metodas, skirtas kanabinoidų detekcijai ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. mėginiuose, buvo sukurtas ir optimizuotas laboratorijoje, remiantis skysčių chromatografinės sistemos gamintojo *Agilent* nurodymais. Pateikta metodika buvo skirta dešimties kanabinoidų identifikacijai kanapių mėginiuose. Laboratorijoje šis metodas buvo pritaikytas 8 kanabinoidų (CBDV, CBD, CBG, THCA, CBDA, CBN, CBGA, CBC) detekcijai, kadangi tetrahidrokanabivarino (THCV) ir trans- Δ^9 -tetrahidrokanabinolio (THC) nustatymui yra reikalingos sertifikuotos pamatinės medžiagos, kurių gavimą apriboja Lietuvos įstatymai.

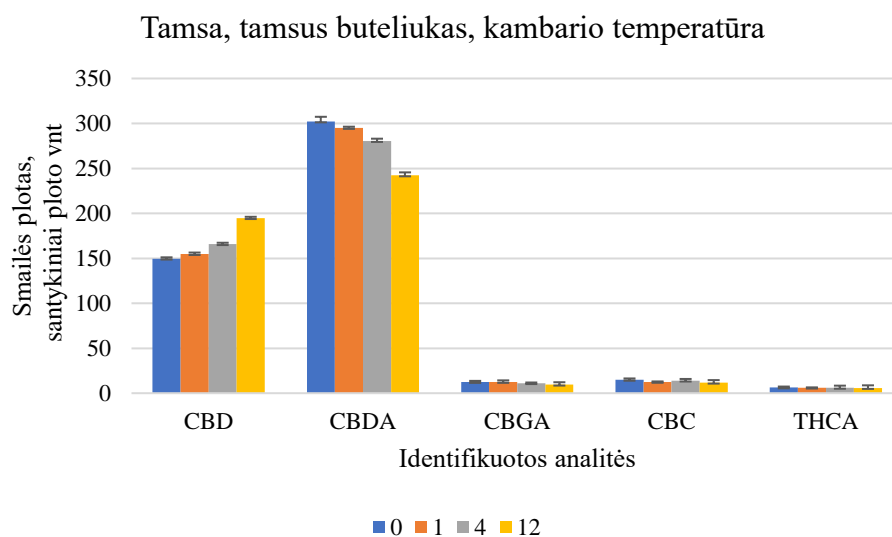
Gamintojas *Agilent* siūlė naudoti dvi judriąsias fazes: A – vandeninę fazę su 0,10 % skruzdžių rūgštimi ir B – organinę fazę su 0,05 % skruzdžių rūgštimi bei taikant B judriosios fazės gradientą atskirti tiriamąsias analites per 11 minučių. Ši judriųjų fazių sudėtis bei gradiento sąlygos, nurodytos 2.3.2. skyrelyje, pritaikytos ir laboratorijoje sukurtam HPLC metodui. Kolonėlės temperatūra 50 °C, tekėjimo greitis 1 ml/min bei injekcijos tūris 5 μ l pasirinkti pagal gamintojo nurodytus parametrus. *Agilent* pateiktoje metodikoje, naudojant *Agilent1100* skysčių chromatografinę sistemą buvo siūloma naudoti 230 nm bangos ilgį kanabinoidų detekcijai, tačiau optimizuojant metodą bei tiriant kelis spektrus, laboratorijos darbuotojai nusprendė tolimesniems tyrimams naudoti 228 nm bangos ilgį, kadangi analičių spektrai buvo geriausiai atskirti bei identifikuoti.

Šiame darbe metodo validavimo parametrai ir gautos vertės nebus lyginamos su kitų autorių darbais, kadangi laboratorijoje sukurtas analitinis metodas buvo pritaikytas tik VMTI Fizinių ir technologijos mokslų, Metrologijos skyriaus, Cheminės metrologijos laboratorijai.

3.2. Mėginių stabilumo tyrimas

Cannabis sativa L. biomasės mėginių stabilumo tyrimai atlikti siekiant nustatyti optimaliausias mėginių saugojimo sąlygas. Tyrimui atlikti buvo paruoštas kanapių biomasės ekstraktas, kaip nurodyta 2.3.1. skyrelyje, kuris vėliau buvo padalintas į 4 chromatografinius buteliukus lygiomis dalimis. Stabilumo studijoms atlikti pasirinkti 3 tamsaus bei 1 šviesaus stiklo chromatografiniai buteliukai, siekiant išsiaiškinti šviesos poveikį analičių kiekio kitimui tyrimo eigoje. Atlikus kanabinoidų ekstrakciją iš kanapių biomasės, atlikta HPLC analizė, kaip nurodyta 2.3.2. skyrelyje, pamatuojant kiekvieną mėginį

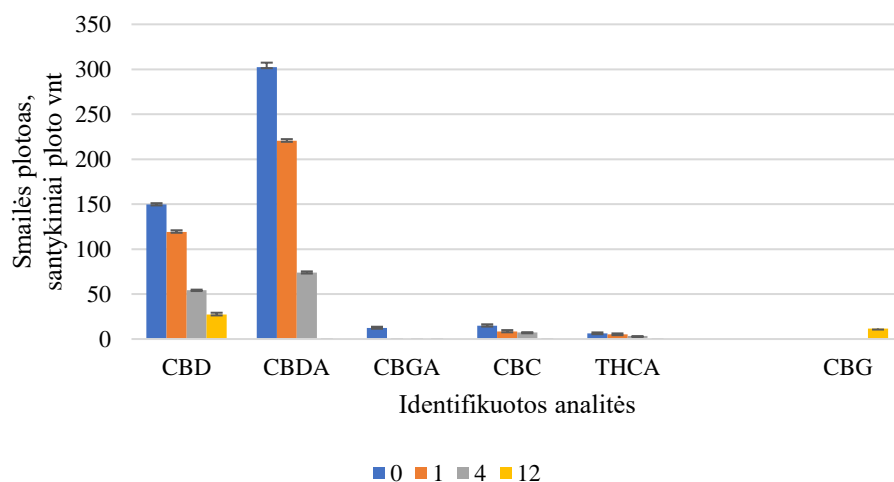
5 kartus. Iš gautų chromatogramų, pagal sulaikymo laikus (2.1 lentelė), identifikuoti 5 kanabinoidai – CBD, CBDA, CBGA, CBC, THCA - esantys tiriamojame *Cannabis sativa* L. biomassėje. Šių kanabinoidų kiekio kitimai stabilumo studijų metu ir buvo stebėti. Pradinio taško vertės gautos pamatuojant 1 mėginį iš 4 ir jas pritaikius visai imčiai. Po analizės, 1 tamsaus stiklo chromatografinis buteliukas padėtas į tamsią vietą, kambario temperatūroje, 1 tamsaus stiklo ir 1 skaidraus stiklo buteliukai padėti į šviesią vietą, kambario temperatūroje bei 1 tamsaus stiklo buteliukas padėtas į šaldytuvą, +4 °C temperatūroje. Visų mėginių analizė HPLC metodu pakartota po 1 savaitės, 4 bei 12 savaičių, kiekvieną mėginį pamatuojant 5 kartus. Stebėta, kaip keičiasi analičių smaيليų plotai laiko eigoje. Iš gautų kiekvieno taško duomenų išvestas kiekvienos analitės smaيليų ploto vidurkis, kuris pavaizduotas grafiškai 3.1. – 3.4. paveiksluose.



3.1 pav. Mėginių stabilumo tyrimų rezultatai, gauti *Cannabis sativa* L. ekstraktą laikant tamsiame buteliuke, tamsioje vietoje, kambario temperatūroje 12 savaičių.

Laikant tamsaus stiklo chromatografinį buteliuką tamsioje vietoje, kambario temperatūroje, didžiausias poveikis buvo matomas CBD bei CBDA analičių kiekiui. Kanabidiolio rūgšties kiekis, laikui einant mažėjo, o neutralaus kanabidiolio – didėjo. Manoma, kad taip galėjo atsitikti dėl to, kad CBDA degradavo į CBD, kas lėmė jo kiekio padidėjimą.

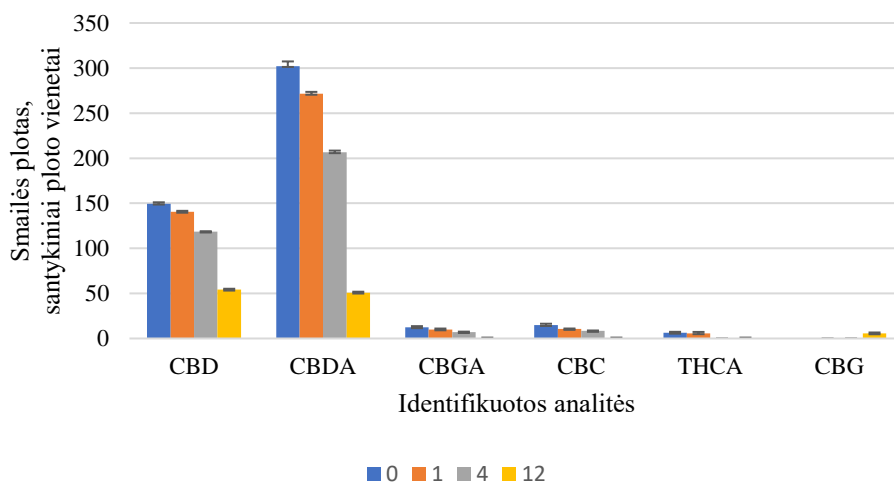
Šviesa, skaidrus buteliukas, kambario temperatūra



3.2 pav. Mėginių stabilumo tyrimų rezultatai, gauti *Cannabis sativa* L. ekstraktą laikant skaidriame buteliuke, šviesioje vietoje, kambario temperatūroje 12 savaitių.

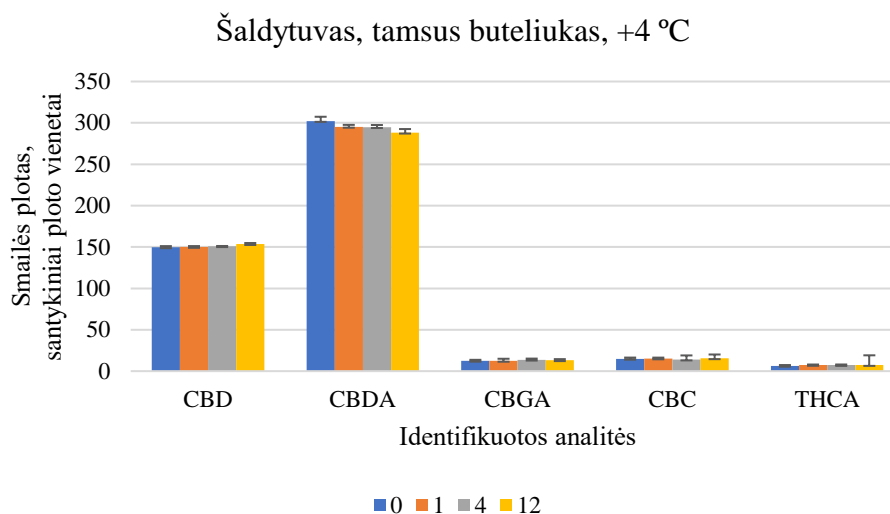
Atliekant analizę su *Cannabis sativa* L. ekstraktu, kuris buvo laikomas skaidriame chromatografiniame buteliuke, šviesioje vietoje ir kambario temperatūroje, pastebėtas visų analičių kiekio sumažėjimas. Matuojant mėginį 12 savaitę, identifikuotas CBG kanabinoidas, kuris galėjo atsirasti dėl CBGA degradacijos.

Šviesa, tamsus buteliukas, kambario temperatūra



3.3 pav. Mėginių stabilumo tyrimų rezultatai, gauti *Cannabis sativa* L. ekstraktą laikant tamsiame buteliuke, šviesioje vietoje, kambario temperatūroje 12 savaitių.

Laikant kanapių biomasės ekstrakto mėginį tamsiame buteliuke, šviesioje vietoje, kambario temperatūroje, CBD bei CBDA analičių kiekis nuosekliai mažėjo viso mėginių stabilumo tyrimų laikotarpiu. CBGA, CBC bei THCA analičių po 12 savaičių nebuvo identifikuota. Taip pat, kaip ir laikant mėginius skaidraus stiklo chromatografiniame buteliuke, 12-ąją savaitę buvo identifikuotas CBG, kuris, manoma, atsirado dėl kanabigerolio rūgšties degradacijos šviesioje.



3.4 pav. Mėginių stabilumo tyrimų rezultatai, gauti *Cannabis sativa* L. ekstraktą laikant tamsiame buteliuke, šaldytuve, +4 °C temperatūroje 12 savaičių.

Cannabis sativa L. ekstraktas, kuris buvo laikytas 12 savaičių tamsiame buteliuke, šaldytuve, +4 °C temperatūroje, išliko stabiliausias, atsižvelgiant į analičių kiekio kitimą. CBDA nedegradavo, dėl to CBD kiekis išliko stabilus, taip pat išliko stabilūs ir kiti kanabinoidai – CBGA, CBC bei THCA. Kanabigerolio rūgštis nedegradavo, dėl to nebuvo identifikuota CBG analitė. Šis mėginio saugojimo būdas ir buvo pasirinktas, nes atsižvelgiant į visus atliktus tyrimus, analičių kiekis šiuo atveju išliko stabiliausias.

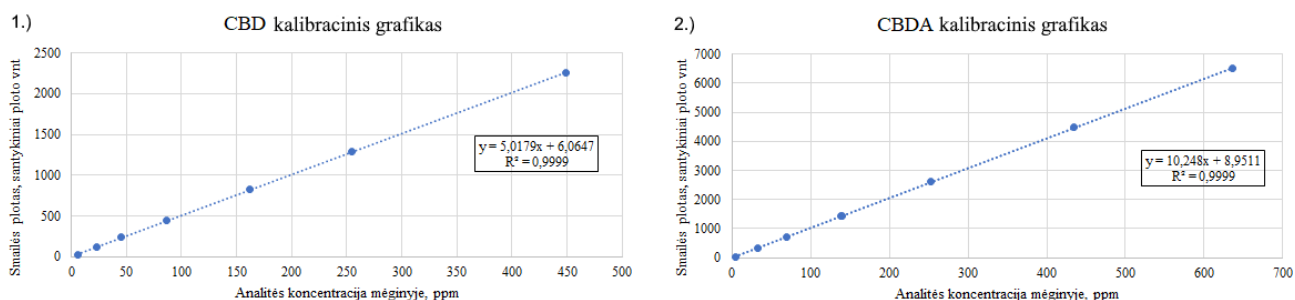
3.3. Metodo validavimas

Kuriant naujus metodus ar pakeičiant laboratorijoje naudojamo metodo sąlygas yra reikalingas metodo validavimas – patvirtinimas, kad naudojama procedūra atitinka visas specifikacijas ir yra tinkama numatytiems rezultatams gauti. Šiame tyrime, sukurtas ir optimizuotas HPLC metodas kanabinoidų

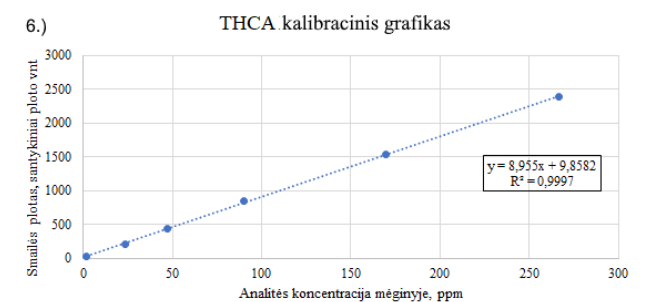
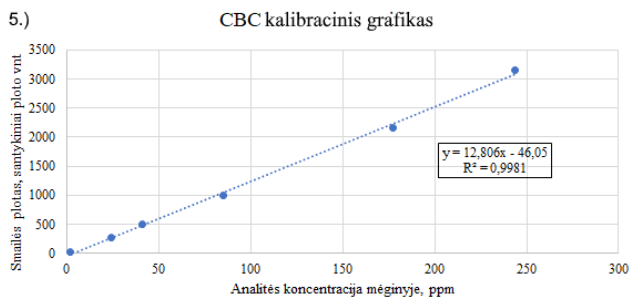
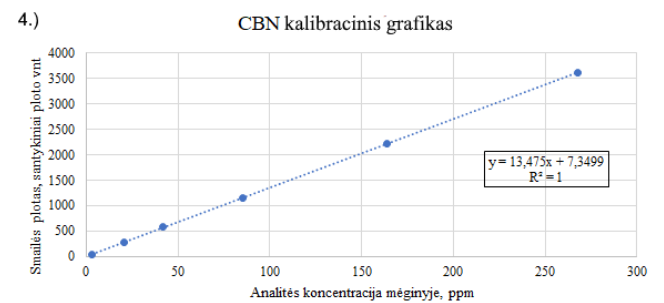
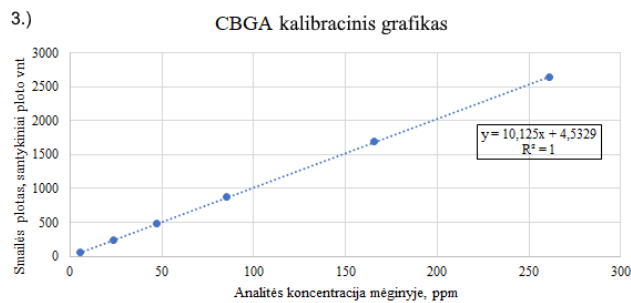
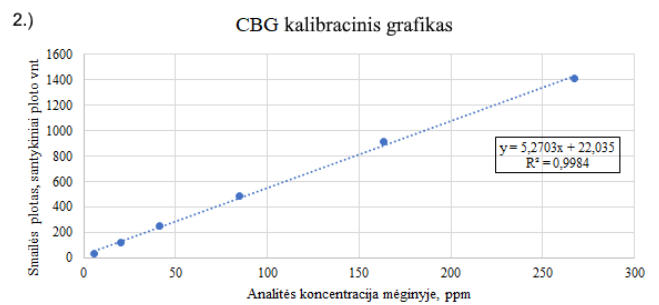
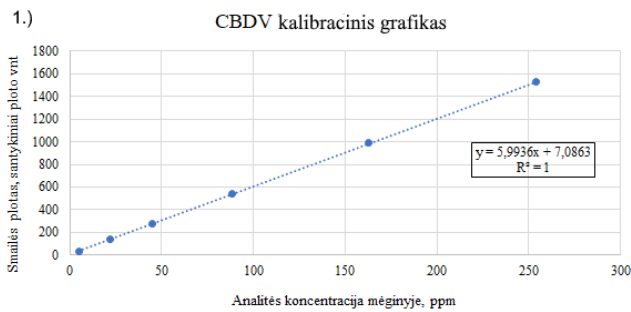
identifikacijai ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose buvo validuotas pagal laboratorijoje nustatytus parametrus bei jų priimtino vertes, kurios nurodytos 2.2 lentelėje.

3.3.1. Tiesiškumas

Metodo tiesiškumas – tai parametras, kuriuo siekiama įvertinti ar naudojama procedūra yra tinkama gauti rezultatus, kurie būtų tiesiogiai proporcingi analitės koncentracijai mėginyje. Tiesiškumo įvertinimui buvo sudaryti kiekvienos tiriamosios analitės kalibraciniai grafikai, kaip aprašyta 2.3.4.1. skyrelyje. CBDV, CBG, CBG, CBGA, CBN, CBC ir THCA analizių kalibraciniams grafikams buvo naudojamos 5 skirtingos sertifikuotų pamatinių medžiagų koncentracijos, išreikštos masės dalies koncentracijomis (ppm). CBD bei CBDA analitėms buvo parinktas didesnis koncentracijų intervalas, kadangi šių kanabinoidų koncentracijos *Cannabis sativa* L. realiuose mėginiuose būna didesnės. Gauti kalibraciniai grafikai pavaizduoti 3.5 ir 3.6. paveiksluose.



3.5 pav. 1.) Kanabidiolio (CBD) ir 2.) Kanabidiolio rūgšties (CBDA) kalibraciniai grafikai, gauti įvertinant metodo tiesiškumą.



3.6 pav. 1.) Kanabidivarino (CBDV), 2.) Kanabigerolio (CBG), 3.) Kanabigerolio rūgštis (CBGA), 4.) Kanabinolio (CBN), 5.) Kanabichromeno (CBC) ir 6.) Tetrahydrokanabinolio rūgštis (THCA) kalibraciniai grafikai, gauti įvertinant metodo tiesiškumą.

Remiantis gautomis regresinėmis lygtimis, nustatyti kiekvienos analitės kalibracinių grafikų koreliacijos koeficientai, kurie visi atitiko priimtino metodo tiesiškumui. Taip pat, pagal kalibracinius grafikus nustatyti ir metodo tiesiškumo intervalai, apimantys žemiausias ir didžiausias analičių koncentracijas mėginiuose, kuriose vis dar yra išlaikomas kalibracinių grafikų tiesiškumas. Gauti koreliacijos koeficientai, tiesiškumo intervalai bei jų priimtino kriterijai nurodyti 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Metodo tiesiškumo vertinimo parametrai ir jų priimtimumo kriterijų vertės.

Analitė	Eksperimentinė R^2 reikšmė	Priimtina vertė	Atitinka reikalavimus	Tiesiškumo intervalas	Priimtinas intervalas	Atitinka reikalavimus
CBDV	1,0000	≥ 0,9900	+	5 - 254 ppm	6 - 200 ppm	+
CBD	0,9999		+	5 - 449 ppm	6 - 400 ppm	+
CBG	0,9984		+	6 - 267 ppm	6 - 200 ppm	+
CBDA	0,9999		+	4 - 637 ppm	6 - 400 ppm	+
CBGA	1,0000		+	5 - 261 ppm	6 - 200 ppm	+
CBN	1,0000		+	3 - 268 ppm		+
CBC	0,9981		+	2 - 244 ppm		+
THCA	0,9997		+	2 - 266 ppm		+

3.3.2. Aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos

Įvertinant analičių aptikimo ribą (LoD) buvo siekiama nustatyti, kokią mažiausią koncentraciją analitės mėginyje gali detektuoti sukurtas HPLC metodas. Remiantis įvairiais literatūros šaltiniais, LoD galima įvertinti keliais būdais – vizualiai, apskaičiuojant nuolydžio (angl. *slope*) standartinį nuokrypį arba signalo ir triukšmo santykį (3:1). Šiam parametru validacijos metu nustatyti buvo pasirinkta įvertinti signalo ir triukšmo lygį (S/N), kaip nurodyta 2.3.4.2. skyrelyje. Nustatytos analičių S/N vertės ekstrapoliuotos iki tokių taškų, kuriuose analitės smailės reikšmės būtų 3,3 kartų didesnės nei triukšmo lygis. Visos gautos LoD vertės atitiko laboratorijos priimtimumo kriterijus aptikimo ribai. Gauti rezultatai pateikti 3.2 lentelėje.

3.2. lentelė. Analičių aptikimo ribos (LoD) vertinimo rezultatai.

Analitė	Nustatyta LoD vertė	Priimtimumo kriterijus	Atitinka reikalavimus
CBDV	0,34 ppm	≤ 1,00 ppm	+
CBD	0,78 ppm		+
CBG	0,49 ppm		+
CBDA	0,24 ppm		+
CBGA	0,23 ppm		+
CBN	0,23 ppm		+
CBC	0,07 ppm		+
THCA	0,15 ppm		+

Nustatant analičių LoQ vertes, siekiama parodyti, kokį mažiausią analitės kiekį mėginyje galima kiekybiškai patikimai įvertinti pasirinktu metodu. Šis parametras kaip ir LoD buvo nustatytas remiantis kiekvienos analitės S/N verte ir ją ekstrapoliuojant iki taško, kuriame analitės piko reikšmė būtų 10 kartų

didesnė nei triukšmo lygis. Visos gautos LoQ vertės atitiko laboratorijos priimtumo kriterijus analičių kiekybinio nustatymo ribai. Gauti rezultatai ir parametro priimtumo kriterijai pateikti 3.3 lentelėje.

3.3. lentelė. Analčių kiekybinio nustatymo ribos (LoQ) vertinimo rezultatai.

Analitė	Nustatyta LoQ vertė	Priimtumo kriterijus	Atitinka reikalavimus
CBDV	1,03 ppm	$\leq 3,50$ ppm	+
CBD	2,37 ppm		+
CBG	1,51 ppm		+
CBDA	0,71 ppm		+
CBGA	0,71 ppm		+
CBN	0,70 ppm		+
CBC	0,23 ppm		+
THCA	0,44 ppm		+

3.3.3. Išgava (teisingumas)

Analitinio metodo teisingumas parodo, kaip gaunami rezultatai yra artimi tikrajai vertei. Šis parametras gali būti įvertinamas apskaičiuojant poslinkį (angl. *bias*), jei turima matricos CRM atitinkanti realų mėginį arba tiriant analčių priedo išgavą iš realaus mėginio, jei nėra tam tinkamos matricos CRM. Sukurto laboratorijoje HPLC metodo teisingumo nustatymui pasirinkta įvertinti kiekvienos analitės išgavą, panaudojant žinomos koncentracijos analčių priedo metodą, kaip nurodyta 2.3.4.3 skyrelyje. Tyrimams buvo naudota *Cannabis sativa* L. biomasė ir kanapių aliejus, kuriame buvo įvertinama CBD bei CBDA analčių išgava, kadangi rinkoje dažnai pasitaiko ir kanapių koncentruotas aliejus, kuriame deklaruojama, kad yra šių kanabinoidų. Teisingumo parametro įvertinimui paruošti dviejų produktų – biomasės bei aliejaus standartiniai mėginiai be sertifikuotų pamatinių medžiagų bei 10 skirtingų analčių mėginių su sertifikuotomis pamatinėmis medžiagomis. Atlikta visų mėginių HPLC analizė, įvertinant kiekvienos analitės koncentraciją mėginyje ir ją palyginant su standartiniu mėginiu, kaip nurodyta 2.3.4.3. skyrelyje. Gauti rezultatai pateikti 3.4 lentelėje.

3.4 lentelė. Metodo išgavos vertinimo rezultatai.

Analitė	Apskaičiuota išgavos vertė	Priimtimumo kriterijus	Atitinka reikalavimus
CBDV	85,8 %	Nuo 80,0 % iki 120,0 %	+
CBD biomasė	119,5 %		+
CBD aliejus	110,0 %		+
CBG	99,6 %		+
CBDA biomasė	99,5 %		+
CBDA aliejus	80,0 %		+
CBGA	101,3 %		+
CBN	88,5 %		+
CBC	92,1 %		+
THCA	91,0 %		+

Gauti analičių išgavos rezultatai atitiko keliamus laboratorijos reikalavimus, o sukurtas HPLC metodas yra tinkamas kanabinoidų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. mėginiuose.

3.3.4. Metodo rezultatų glaudumas

Atliekant analitinio metodo glaudumo įvertinimą, siekiama parodyti, kad panaudojant sukurtą procedūrą gaunami rezultatai yra atsikartojantys. Dažniausiai glaudumo parametro nustatymui yra pasirenkamos pakartojamumo sąlygos – naudojamas tas pats metodas, įranga, matuojamas tas pats mėginys, o eksperimentą atlieka vienas operatorius per trumpą laiko tarpą. Siekiant įvertinti analitinio metodo rezultatų glaudumą tiksliau, yra pasirenkama tyrimus atlikti ilgesnį laikotarpį, panaudojant atkuriamumo (angl. *reproducibility*) sąlygas. Šis parametro nustatymo būdas ir buvo pasirinktas HPLC metodo rezultatų glaudumo įvertinimui. Parametro įvertinimui paruoštas vienas mėginys su visų tiriamųjų analičių sertifikuotomis pamatinėmis medžiagomis, kaip nurodyta 2.3.4.4. skyrelyje. Atlikta gauto mišinio HPLC analizė, mėginį pamatuojant 5 kartus kas dvi savaites, vieno mėnesio laikotarpiu. Iš gautų analičių smailių plotų išvestas vidurkis, kuris panaudotas jungtinio santykinio standartinio nuokrypio skaičiavimui. Gauti rezultatai pateikti 3.5 lentelėje.

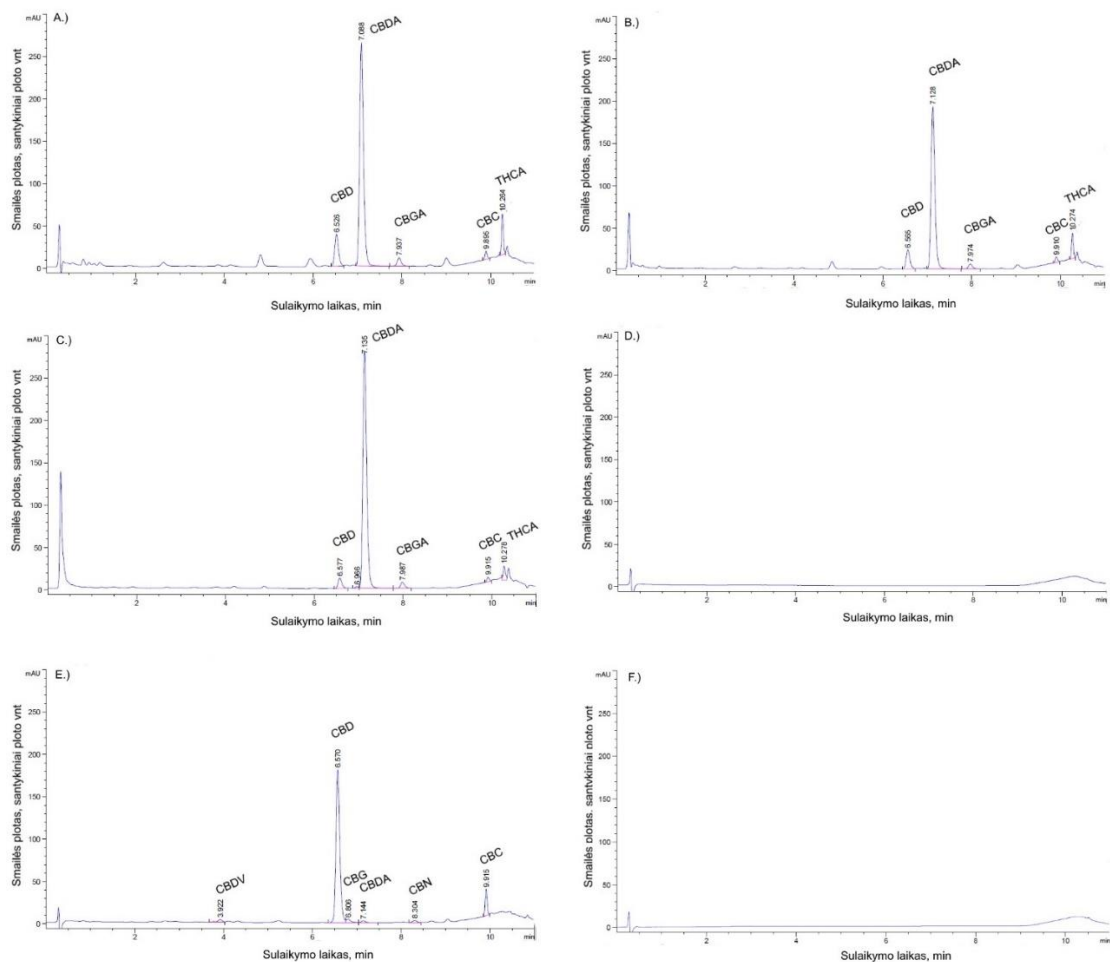
3.5. lentelė. Metodo rezultatų glaudumo vertinimo rezultatai.

Analitė	Apskaičiuota vertė	Priimtimumo kriterijus	Atitinka reikalavimus
CBDV	2,5 %	≤ 5,0 %	+
CBD	0,9 %		+
CBG	3,2 %		+
CBDA	4,1 %		+
CBGA	2,1 %		+
CBN	1,3 %		+
CBC	1,5 %		+
THCA	2,2 %		+

Įvertinus rezultatus, galima teigti, kad gautos analičių matavimų rezultatų vertės yra artimos jų vidurkiui ir sukurtas HPLC metodas kanabinoidų detekcijai ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. mėginiuose yra tinkamas naudojimui.

3.4. HPLC metodo taikymas kanabinoidų identifikacijai ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose

Optimizuotas ir validuotas metodas, paremtas efektyviaja skysčių chromatografija buvo pritaikytas praktiškai kanabinoidų identifikacijai ir koncentracijos nustatymui pluoštinių kanapių produktuose. Parinkti skirtingų gamintojų, įvairių tipų, 6 produktai (A - F) iš kurių atlikta kanabinoidų ekstrakcija ir jų HPLC analizė, kaip nurodyta 2.3.1. ir 2.3.2. skyreliuose. Gautos produktų A - F chromatogramos ir identifikuoti kanabinoidai pavaizduoti 3.7 paveiksle. Kanabinoidai nustatyti pagal analičių sulaikymo laiką, kuris nurodytas 2.1 lentelėje.



3.7 pav. Identifikuoti kanabinoidai *Cannabis sativa* L. produktuose (A - F), atliekant HPLC analizę.

Atlikus A, B ir C produktų – pluoštinių kanapių arbatų – HPLC analizę, identifikuoti 5 kanabinoidai, iš kurių didžiausią dalį sudarė CBDA. Maisto papildų, kurių gamyboje naudotas pluoštinių kanapių sėklų aliejus – D ir F – analizės metu, neidentifikuotas nei vienas kanabinoidas. Koncentruotame CBD aliejuje – E produkte – identifikuoti 7 kanabinoidai, iš kurių didžiausią dalį sudarė CBD. Pagal gautas analičių smailės plotų vertes, apskaičiuotos identifikuotų kanabinoidų koncentracijos A - F produktuose, kaip nurodyta 2.3.6. skyrelyje. Nustatytos koncentracijos palygintos su gamintojų deklaruotomis kanabinoidų vertėmis pluoštinių kanapių produktuose. Gauti rezultatai pateikti 3.6 lentelėje.

3.6. lentelė. HPLC analizės metu identifikuotų kanabinoidų koncentracijos *Cannabis sativa* L. produktuose (A - F), pateikiant metodo išplėstinės neapibrėžties vertes.

Analitė	Nustatytos analizių koncentracijos produktuose, %					
	A	B	C	D	E	F
CBDV	$(1,2\pm 0,06)\times 10^{-2}$	$(0,4\pm 0,02)\times 10^{-2}$	$(2,2\pm 0,11)\times 10^{-2}$	-	$(0,4\pm 0,02)\times 10^{-2}$	-
CBD	$(37,4\pm 2,21)\times 10^{-2}$	$(21,6\pm 1,27)\times 10^{-2}$	$(10,9\pm 0,64)\times 10^{-2}$	-	$(319,5\pm 0,02)\times 10^{-2}$	-
CBG	-	-	-	-	$(0,5\pm 0,03)\times 10^{-2}$	-
CBDA	$(133,8\pm 10,97)\times 10^{-2}$	$(92,7\pm 7,60)\times 10^{-2}$	$(135,3\pm 11,09)\times 10^{-2}$	-	$(0,9\pm 0,07)\times 10^{-2}$	-
CBGA	$(5,2\pm 0,21)\times 10^{-2}$	$(2,6\pm 0,11)\times 10^{-2}$	$(3,5\pm 0,14)\times 10^{-2}$	-	-	-
CBN	-	-	-	-	$(0,6\pm 0,02)\times 10^{-2}$	-
CBC	$(5,4\pm 0,17)\times 10^{-2}$	$(4,4\pm 0,14)\times 10^{-2}$	$(4,2\pm 0,13)\times 10^{-2}$	-	$(26,6\pm 0,82)\times 10^{-2}$	-
THCA	$(15,1\pm 0,69)\times 10^{-2}$	$(11,6\pm 0,53)\times 10^{-2}$	$(4,9\pm 0,23)\times 10^{-2}$	-	$(8,3\pm 0,38)\times 10^{-2}$	-

A produkto gamintojas pakuotėje nurodė, kad smulkintoje kanapių gėlių ir lapų arbatoje galima rasti iki 2 – 3 % CBD bei kitų kanabinoidų. Atlikus šio produkto kanabinoidų ekstrakciją ir HPLC analizę, nustatyta $0,3740\pm 0,0221$ % CBD bei identifikuoti CBDV, CBDA, CBGA, CBC ir THCA kanabinoidai. Nustatyta kanabidiolio koncentracija produkte, atitiko gamintojo nurodytas CBD vertes. B ir C produktai yra sudaryti iš 100 % kanapių lapų arbatos, gamintojai nenurodė, kokie kanabinoidai ir kokios koncentracijos gali būti randamos produktuose, tačiau atlikus analizę, abiejuose mėginiuose identifikuoti 6 kanabinoidai, kurių koncentracijos buvo panašios, didžiausia koncentracija produktuose nustatyta CBD kanabinoido. Remiantis kitų autorių duomenimis, HPLC metodu, kanapių lapų arbatose galima rasti nuo 0,47 % iki 1,35 % CBD, o kanapių žiedų arbatoje – 1,30 % - 1,67 % CBD kanabinoido (Oppermann ir kt., 2019). Šie rezultatai sutampa su mūsų nustatytais CBD kanabinoido koncentracijomis pluoštinių kanapių arbatose, tad galima patvirtinti, jog sukurtas HPLC metodas yra tinkamas kanabidiolio identifikavimui ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose. D produkto gamintojas nurodė, kad maisto papildas sudėtyje yra 59,3 % šalto spaudimo rafinuoto pluoštinių kanapių sėklų aliejaus. Remiantis literatūros šaltiniais, pluoštinių kanapių sėklų aliejuje retais atvejais yra randamas CBD, tačiau atlikus šio produkto HPLC analizę, neidentifikuotas nei vienas kanabinoidas. E produkto – koncentruoto CBD aliejaus – gamintojas pateikė informaciją, kurioje nurodyta, kad pluoštinių kanapių aliejuje galima rasti 5 % CBD. Atlikus E produkto kanabinoidų ekstrakciją ir HPLC analizę, identifikuotas didžiausias skaičius kanabinoidų tarp visų testuotų mėginių. Apskaičiavus CBD analitės koncentraciją E produkte, nustatyta $3,1950\pm 0,0002$ %, o tai yra 1,5 karto mažesnė koncentracija nei nurodė gamintojas. Maisto papildas F gamintojas nurodė, kad jo sudėtyje yra 99,5 % nerafinuoto kanapių sėklų aliejaus, tačiau atlikus HPLC analizę, kaip ir D produkto atveju, neidentifikuotas nei vienas kanabinoidas. Atlikus visų pluoštinių kanapių produktų HPLC analizę, galima teigti, kad sukurtas,

optimizuotas ir validuotas metodas, skirtas kanabinoidų identifikavimui ir koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose, yra tinkamas naudojimui.

IŠVADOS

1. Atliekant magistro baigiamąjį darbą buvo įsisavintas laboratorijoje sukurtas ir optimizuotas efektyviosios skysčių chromatografijos (HPLC) metodas, kanabinoidų identifikavimui ir jų koncentracijos nustatymui *Cannabis sativa* L. produktuose.
2. Atlikus stabilumo tyrimus, parinktos tinkamiausios sąlygos pluoštinių kanapių mėginių saugojimui. Nustatyta, kad tinkamiausias mėginių saugojimui yra tamsaus stiklo buteliukas, kuris yra laikomas šaldytuve +4 °C temperatūroje, kadangi analičių kiekiai išliko stabiliausi 3 mėnesių laikotarpiu.
3. Atliktas HPLC metodo, skirto kanabinoidų nustatymui pluoštinių kanapių produktuose, validavimas. Visos gautos parametrų vertės atitiko laboratorijos keliamus priimtino kriterijus.
4. Atlikta kanabinoidų analizė pasirinktuose 6 skirtinguose *Cannabis sativa* L. produktuose (biomasėje, arbatose, maisto papilduose ir aliejuje). Gauti rezultatai patvirtino, kad sukurtas, optimizuotas ir validuotas HPLC metodas yra tinkamas naudojimui.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. F. Pellati, V. Brighenti, J. Sperlea, L. Marchetti, D. Bertelli ir S. Benvenuti, New methods for the comprehensive analysis of bioactive compounds in *Cannabis sativa L.* (hemp), *Molecules*, 23(2018) 2639. doi: 10.3390/molecules23102639.
2. G. Appendino, G. Chianese ir Tagliatalata-Scafati, Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry, *Current Medicinal Chemistry*, 18 (2011) 1085-99.
3. S. Alexander, Therapeutic potential of cannabis- related drugs, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 64 (2016) 157-66. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.07.001
4. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Low- THC cannabis products in Europe [interaktyvus], Liuksemburgas, 2020. [žiūrėta 2021 m. gegužės 9 d.]. Prieiga per internetą:
<https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13471/TD0320749ENN01.pdf>.
5. S. Pranaitienė, Pluoštinių kanapių augintojus žlugdo įstrigęs įstatymas [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 m. gegužės 9 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.agroeta.lt/pluostiniu-kanapiu-augintojus-zlugdo-istriges-istatymas>.
6. M. Lankauskas, Kanapių naudojimas medicininiais tikslais: Lietuvos ir užsienio valstybių teisinio reguliavimo ypatumai, iššūkiai ir perspektyvos [interaktyvus], Vilnius: Lietuvos teisės institutas, 2020. [žiūrėta 2021 m. gegužės 9d.]. Prieiga per internetą: https://teise.org/wp-content/uploads/2021/02/Kanapiu_naudojimas_medicininiais_tikslais.pdf.
7. L. Burgel, J. Hartung, A. Pflugfelder ir S. Graeff-Honninger, Impact of growth stage and biomass fractions on cannabinoid content and yield of different hemp (*Cannabis sativa L.*) genotypes, *Agronomy*, 10 (2020) 372. doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy10030372>.
8. Z. Atakan, Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals, *Ther Adv Psychopharmacol*, 2 (2012) 41-254. doi: 10.1177/2045125312457586.
9. B.F. Thomas ir M.A. ElSohly, The analytical chemistry of cannabis, *Elsevier*, 2016. <https://www.sciencedirect.com/book/9780128046463/the-analytical-chemistry-of-cannabis>.
10. M. Mandrioli, M. Tura, S. Scotti ir kt., Fast detection of 10 cannabinoids by RP-HPLC-UV method in *Cannabis sativa L.*, *Molecules*, 24 (2019) 2113. doi: 10.3390/molecules24112113.
11. Open Access Government, Have you heard about the uses of hemp?, (2020). <https://www.openaccessgovernment.org/uses-of-hemp/82337/> (žiūrėta 2021 m. vasario 28 d.).

12. B. De Backer, B. Debrus, P. Lebrun, L. Theunis, N. Dubois, L. Decock, A. Verstraete, P. Hubert ir C. Charlier, Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material, *J Chromatogr*, 877 (2009) 4115-24. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.11.004.
13. G. McRae ir J.E. Melanson, Quantitative determination and validation of 17 cannabinoids in cannabis and hemp using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 412 (2020) 7381-93.
14. S. Zivovinic, R. Alder, M.D. Allenspach ir C. Steuer, Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic purposes by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection, *J Anal Sci Technol*, 9 (2018) 27.
15. M.B. Bridgeman ir D.T. Abazia, Medical *Cannabis*: history, pharmacology, and implications for the acute care setting, *PT*, 42 (2017) 180-8.
16. A. Ifeoluwa, B. Arnab, S. Harmandeep ir S. Abolghasem, A review of the current state of knowledge of growing conditions, agronomic soil health practices and utilities of hemp in the United States, *Agriculture*, 20 (2020) 129.
17. M. Hadener, S. Konig ir W. Weinmann, Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD, *Forensic Sci Int*, 299 (2019) 142-50. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.03.046.
18. Cannabis business plan, Legal Cannabis in Europe [interaktyvus], (2020). [žiūrėta 2021 m. kovo 1 d.]. Prieiga per internetą: <https://cannabusinessplans.com/legal-cannabis-europe/>.
19. E.M. Mudge, S.J. Murch ir P.N. Brown, Leaner and greener analysis of cannabinoids, *Anal Bioanal Chem*, 409 (2017) 3153-63.
20. K.G. Ramawat ir J.M. Merillon, Natural Products. *Springer-Verlag*, Berlin, 2013. <https://www.springer.com/gp/book/9783642221439>.
21. F. Thomas F ir O. Kayser, Minor cannabinoids of *Cannabis sativa* L., *J Med Sci*, 88 (2019). doi: <https://doi.org/10.20883/jms.367>.
22. R. Nachnani, W.M. Raup-Konsavage ir K.E. Vrana, The pharmacological case for cannabigerol (CBG), *J Pharmacol Exp Ther*, 376 (2021) 204-12. doi: 10.1124/jpet.120.000340.
23. M. Wang, Y.H. Wang, B. Avula, M.M. Radwan, A.S. Wanas, J. Van Antwerp, J.F. Parcher, M.A. ElSohly ir I.A. Khan, Decarboxylation study of acidic cannabinoids: a novel approach using ultra-high-performance supercritical fluid chromatography/photodiode array-mass spectrometry, *Cannabis Cannabinoid Res*, 1 (2016) 262-71. doi: 10.1089/can.2016.0020.

24. E.C.D. Goncalves, G.M. Baldasso, M.A. Bicca, R.S. Paes, R. Capasso, R.C. Dutra, Terpenoids, cannabimimetic ligands, beyond the *Cannabis* plant, *Molecules*, 25 (2020) 1567. doi: 10.3390/molecules25071567.
25. E. Russo ir G.W. Guy, A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol, *Med Hypotheses*, 66 (2006) 234-46. doi: 10.1016/j.mehy.2005.08.026.
26. S. Vučkovič, D. Srebro, K.S. Vujović, Č. Vučetić ir M. Prostran, Cannabinoids and pain: New insights from old molecules, *Frint Pharmacol*, 9 (2018) 1259. doi: 10.3389/fphar.2018.01259.
27. C.A. Paronis, S.P. Nikas, V.G. Shukla ir A. Makriyannis, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol acts as a partial agonist/antagonist in mice, *Behav Pharmacol*, 23 (2012) 802-5. doi: 10.1097/FBP.0b013e32835a7c4d.
28. J.M. McPartland, C. MacDonald, M. Young, P.S. Grant, D.P. Furkert ir M. Glass, Affinity and efficacy studies of tetrahydrocannabinolic acid A at cannabinoid receptor types one and two, *Cannabis Cannabinoid Res*, 2 (2017) 87-95. doi: 10.1089/can.2016.0032.
29. L.O. Hanuš, S.M. Meyer, E. Munoz, O. Tagliabue-Scafati ir G. Appendino, Phytocannabinoids: a unified critical inventory, *Nat Prod Rep*, 33 (2016) 1357. doi: 10.1039/c6np00074f.
30. S. Ross ir M. ElSohly, CBN and D9-THC concentration ratio as an indicator of the age of stored marijuana samples, *Bulletin on Narcotics*, XLIX, 1997.
31. S. Shannon, N. Lewis, H. Lee ir S. Hughes, Cannabidiol in anxiety and sleep: a large case series, *Perm J*, 23 (2019) 18-41. doi: 10.7812/TPP/18-041.
32. C. Larsen ir J. Shahinas, Dosage, efficacy and safety of cannabidiol administration in adults: a systematic review of human trials, *J Clin Med Res*, 12 (2020) 129-41. doi: 10.14740/jocmr4090.
33. M.A. Huestis, R. Solimini, S. Pichini, R. Pacifici, J. Carlier ir F.P. Busardo, Cannabidiol adverse effects and toxicity, *Curr Neuropharmacol*, 17 (2019) 974-89. doi: 10.2174/1570159X17666190603171901.
34. O. Aizpurua-Olaizola, J. Omar, P. Navarro, M. Olivares, N. Etxebarria ir A. Usobiaga, Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography- mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem*, 406 (2014) 7549-60. doi: 10.1007/s00216-014-8177-x.
35. L.D. Martinenghi, R. Jonsson, T. Lund ir H. Jenssen, Isolation, purification, and antimicrobial characterization of cannabidiolic acid and cannabidiol from *Cannabis sativa* L, *Biomolecules*, 10 (2020) 900. doi: 10.3390/biom10060900.

36. A.A. Izzo, R. Capasso, G. Aviello, F. Borrelli, B. Romano, F. Piscitelli, L. Gallo, F. Capasso, P. Orlando ir V. Di Marzo, Inhibitory effect of cannabichromene, a major non-psychoactive cannabinoid extracted from *Cannabis sativa*, on inflammation-induced hypermotility in mice, *Br J Pharmacol*, 166 (2012) 1444-60. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01879.x.
37. J. McPartland ir E.T. Russo, Cannabis and cannabis extracts: greater than the sum of their parts?, *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1 (2008) 103-32.
38. M.M. Lewis, Y. Yang, E. Wasilewski, H.A. Clarke ir L.P. Kotra, Chemical profiling of medical cannabis extracts, *ACS Omega*, 2 (2017) 6091-103. doi: 10.1021/acsomega.7b00996.
39. C.M. Andre, JF. Hausman ir G. Guerriero, *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules, *Front Plant Sci*, 7 (2016). doi: 10.3389/fpls.2016.00019.
40. A.H. Osnat ir O. Reuven, Cannabis, the endocannabinoid system and immunity – the journey from the bedside to the bench and back, *Int J Mol Sci*, 21 (2020) 4448. doi: 10.3390/ijms21124448.
41. H.C. Lu ir K. Mackie, An introduction to the endogenous cannabinoid system, *Biol Psychiatry*, 79 (2016) 516-25. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.028.
42. J. Wu, Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system: yesterday, today, and tomorrow, *Acta Pharmacol Sin*, 40 (2019) 297-9. doi: 10.1038/s41401-019-0210-3.
43. P. Berman, K. Futoran, G.M. Lewitus, D. Mukha, M. Benami, T. Shlomi ir D. Meiri, A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in *Cannabis*, *Sci Rep*, 8 (2018).
44. P.H. Reggio, Endocannabinoid binding to the cannabinoid receptors: what is known and what remains unknown, *Curr Med Chem*, 17 (2010) 1468-86.
45. A. Zagzoog, K.A. Mohamed, H.J. Kim, E.D. Kim, C.S. Frank, T. Black, P.D. Jadhay, L. Holbrook ir R.B. Laprairie, *In vitro* and *in vivo* pharmacological activity of minor cannabinoids isolated from *Cannabis sativa*, *Sci Rep*, 10:20405 (2020).
46. C.E. Stafstrom ir L. Carmant, Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5 (2015). doi: 10.1101/cshperspect.a022426.
47. E.C. Rosenberg, R.W. Tsien, B.J. Whalley ir O. Devinsky, Cannabinoids and epilepsy, *Neurotherapeutics*, 12 (2015) 747-68. doi: 10.1007/s13311-015-0375-5.
48. National Institute of Health, NHI Curriculum Supplement Series [interaktyvus], US, 2007. [žiūrėta 2021 m. kovo 29 d.]. Prieiga per internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>.
49. E. Bruera ir J.A. Paice, Cancer pain management: safe and effective use of opioids, *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, (2015) 593-9. doi: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.e593.

50. J. Elikottil, P. Gupta ir K. Gupta, The analgesic potential of cannabinoids, *J Opioid Manag*, 5 (2009) 341-57.
51. B. Dariš, M.T. Verboten, Ž. Knez ir P. Ferik, Cannabinoids in cancer treatment: therapeutic potential and legislation, *Bosn J Basic Med Sci*, 19 (2019) 14-23. doi: 10.17305/bjbms.2018.3532.
52. G. Velasco, S. Hernandez-Tiedra, D. Davila ir M. Lorente, The use of cannabinoids as anticancer agents, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 64 (2016) 259-66.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.05.010>.
53. S.N. Byrareddy ir M. Mohan, SARS-CoV2 induced respiratory distress: Can cannabinoids be added to anti-viral therapies to reduce lung inflammation?, *Brain Behav Immun*, 87 (2020) 120-1. doi: 10.1016/j.bbi.2020.04.079.
54. J.R. Tisoncik, M.J. Korth, C.P. Simmons, J. Farrar, T.R. Martin ir M.G. Katze, Into the eye of the cytokine storm, *Microbiol Mol Biol Rev*, 76 (2012) 16-32. doi: 10.1128/MMBR.05015-11.
55. S.M. Anil, N. Shalev, A.C. Vinayaka, S. Nadarajan, D. Namdar, E. Belausov, I. Shoval, K.A. Mani, G. Mechrez ir H. Koltai, *Cannabis* compounds exhibit anti-inflammatory activity *in vitro* in COVID-19 related inflammation in lung epithelial cells and pro-inflammatory activity in macrophages, *Sci Rep*, 11 (2021) 1462.
56. F. Pollastro, A. Minassi ir LG. Fresu, *Cannabis* phenolics and their bioactivities, *Curr Med Chem*, 25 (2018) 1160-85. doi: 10.2174/0929867324666170810164636.
57. Sigma Aldrich, Cannabis Testing [interaktyvus], (2017). [žiūrėta 2021 m. kovo 22 d.]. Prieiga per internetą: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/cannabis-testing.pdf.
58. P.K. Gutch, Application of gas chromatography in monitoring or organic and decontamination reactions, *IntechOpen*, 2012. doi: 10.5772/33154.
59. W.Q. Bukhaiti, A. Noman, AS. Qasim ir A. AL-Farga, Gas chromatography: principles, advantages and applications in food analysis, *IJAIR*, 6 (2017) 123-8.
60. P. Kusch, Introductory chapter: gas chromatography the most versatile analytical technique, *IntechOpen*, 2018. doi: 10.5772/intechopen.81693.
61. E. Forgacs ir T. Cserhati, Food authenticity and Traceability [interaktyvus], *Elsevier*, 2003. [žiūrėta 2021 m. kovo 29 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855735262500145>.

62. M.S.H. Akash ir K. Rehman, Essential of pharmaceutical analysis [interaktyvus], *Springer Nature*, Singapore, 2020. [žiūrėta 2021 m. kovo 29 d.]. Prieiga per internetą: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-981-15-1547-7.pdf>.
63. J. Zekič ir M. Križman, Development of gas-chromatographic method for simultaneous determination of cannabinoids and terpenes in hemp, *Molecules*, 25 (2020) 5872. doi: 10.3390/molecules25245872.
64. F. Orata, Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis, *IntechOpen*, 2012. doi: 10.5772/33098.
65. B. Campanella, T. Lomonaco, E. Benedetti, M. Onor, R. Nieri ir E. Bramanti, Validation and application of a derivatization-free RP-HPLC-DAD method for the determination of low molecular weight salivary metabolites, *Int J Environ Res Public Health*, 17 (2020) 6158. doi: 10.3390/ijerph17176158.
66. M.A. Elsohly, Marijuana and the cannabinoids [interaktyvus], *Humana Press*, 2007. [žiūrėta 2021 m. kovo 29 d.]. Prieiga per internetą: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-59259-947-9#about>.
67. R. Malviya, V. Bansal, O.P. Pal ir P.K. Sharma, High performance liquid chromatography: a short review, *JGPT*, 2 (2010) 22-6.
68. Laboratoryinfo.com, High performance liquid chromatography (HPLC): principle, types, instrumentation and applications [interaktyvus], 2021. [žiūrėta 2021 m. kovo 27 d.]. Prieiga per internetą: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>.
69. O.E. Petrova ir K. Sauer, High-performance liquid chromatography (HPLC)-based detection and quantitation of cellular c-di-GMP, *Methods Mol Biol*, 1657 (2017) 33-43.
70. A. Sunil, G. Anju ir V. Rajat, HPLC detectors, their types and use: a review, *Organic&Medicinal Chem IJ*, 6 (2018).
71. S.R. Vare, M.M. Shelke, J.S. Bidkar ir G.Y. Dama, HPLC: a simple and advance methods of separation and validation, *WJPR*, 8 (2019) 478-96.
72. S.S. Nielsen, Food analysis [interaktyvus], *Springer Science*, 2010. [žiūrėta 2021 m. kovo 29 d.]. Prieiga per internetą: http://anuragaja.staff.ipb.ac.id/files/2017/05/2_HPLC.pdf.
73. B. Pang, Y. Zhu, L. Longging, F. Gu ir H. Chen, The applications and features of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of traditional chinese medicine, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016:3837270 (2016). doi: 10.1155/2016/3837270.

74. V. Gupta, A.D.K. Jain, N.S. Gill ir K. Gupta, Development and validation of HPLC method – a review, *Int Res J Pharm*, 2 (2012) 17-25.
75. S. Deshmukh, G. Chavan, S. Vanjari ir R. Patil, A review on analytical method development and validation by high performance liquid chromatography technique, *J Pharm Sci & Res*, 11 (2019) 3599-605.
76. P.L. Garcia, E. Buffoni, F.P. Gomes ir J.L. Vilchez Quero, Analytical method validation, *IntechOpen*, 2011. doi: 10.5772/21187.
77. P. Ravisankar, C.N. Navya, D. Pravallika ir D. Navya Sri, A review on step-by-step analytical method validation, *IOSRPHR*, 5 (2015) 7-19.
78. L. Chowdary, P. Ravisankar, A. Kumar, K. Mounika ir B.P. Srinivasa, Analytical method validation parameters: an updated review, *Int J Pharm Sci Rev Res*, 61 (2020) 1-7.
79. European Medicines Agency, ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [interaktyvus], (1995). [žiūrėta 2021 m. kovo 27 d] Prieiga per internetą: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf.
80. F. Raposo ir C. Ibello-Bianco, Performance parameters for analytical method validation: controversies and discrepancies among numerous guidelines, *TRAC*, 129 (2020) 115913.
81. University of Tartu, LC-MS method validation [interaktyvus]. [žiūrėta 2021 m. kovo 29 d.]. Prieiga per internetą: https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/7-accuracy.
82. T.N. Rao, Validation of analytical methods, *IntechOpen*, 2018. doi: 10.5772/intechopen.72087.
83. G.A. Shabir, Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry, *JVT*, 10 (2004) 314-24.
84. U. Andreasson, A. Perret-Liaudet, L. Waalwijk van Doorn, K. Blennow, D. Chiasserini, S. Engelborghs, T. Fladby, S. Genc, N. Kruse, H.B. Kuiperij, L. Kulic, P. Lewczuk, B. Mollenhauer, B. Mroczko, L. Parnetti, E. Vanmechelen, M.M. Verbeek, B. Winblad, H. Zetterberg, M. Koel-Simmeling ir C.E. Teunissen, A practical guide to immunoassay method validation, *Front Neurol*, 6 (2015). doi: 10.3389/fneur.2015.00179.
85. U. Opperman, G.J. Schad, P. Jochems, R. Ludwig ir V. Kraft, Determination of cannabidiol and additional cannabinoid content in hemp tea [interaktyvus], Vokietija, 2019. [žiūrėta 2021 m. gegužės 8 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.ssi.shimadzu.com/sites/ssi.shimadzu.com/files/Industry/Literature/Determination-of-CBD-Additional-Cannabinoids-in-Hemp-Tea.pdf>.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

MIGLĖ BARTKUTĖ

Skysčių chromatografijos metodo validavimas bei taikymas kanabinoidų nustatymui pluoštinių kanapių produktuose

Pluoštinės kanapės (*Cannabis sativa* L.) – tai vienas iš labiausiai studijuojamų augalų, sulaukęs didelio susidomėjimo dėl savo ypatingo terapinio poveikio žmogaus sveikatai. Kanabinoidai – tai specifiniai *Cannabis sativa* L. junginiai, kurie atsakingi už jos biologinį poveikį. Išskiriami du pagrindiniai kanabinoidai, kurių yra daugiausiai randama pluoštinėse kanapėse bei kurie turi didžiausią įtaką jos farmakologiniam aktyvumui – tai kanabidiolis (CBD) ir tetrahidrokanabinolis (THC). Visgi, Europoje galioja griežti įstatymai, kurie draudžia kultivuoti tam tikras kanapių rūšis bei gaminti produktus, kuriuose THC kiekis viršija 0,2 %. Dėl šios priežasties, būtina naudoti jautrius bei patikimus metodus kanabinoidų identifikavimui bei kiekybiniam įvertinimui *Cannabis sativa* L. produktuose.

Šio darbo tikslas buvo validuoti laboratorijoje sukurtą ir optimizuotą metodą, paremtą efektyviaja skysčių chromatografija (HPLC), aštuonių kanabinoidų identifikavimui ir kiekybiniam įvertinimui *Cannabis sativa* L. produktuose. Siekiant įgyvendinti išsikeltą tikslą, buvo parinktos tinkamiausios pluoštinių kanapių mėginių laikymo sąlygos, validuoti laboratorijos nustatyti parametrai, kurie visi atitiko nustatytus priimtino kriterijus. Validuotas metodas buvo pritaikytas praktiškai kanabinoidų identifikavimui ir kiekybiniam nustatymui šešiuose skirtinguose pluoštinių kanapių produktuose, o gauti rezultatai palyginti su gamintojų pateiktomis vertėmis.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

MIGLĖ BARTKUTĖ

Validation and Application of the Liquid Chromatographic Method for the Determination of Cannabinoids in Hemp Products

Hemp (*Cannabis sativa L.*) is one of the most study plant nowadays, due to its extraordinary therapeutic effects on human health. Cannabinoids are specific *Cannabis sativa L.* compounds which are responsible for its therapeutic impact. There are two cannabinoids which are mainly found in hemp and plays the major role in *Cannabis* pharmacological effects – Cannabidiol (CBD) and Tetrahydrocannabinol (THC). However, there are strict laws in Europe which are not allowed to cultivate some *Cannabis* species and produce hemp products which contains higher than 0,2 % THC. For this reason it is crucial to have a sensitive and reliable method for cannabinoids identification and quantification in *Cannabis sativa L.* products.

The aim of this work was to validate a method created and optimized in laboratory based on high performance liquid chromatography (HPLC) for eight cannabinoids identification and quantification in *Cannabis sativa L.* products. To achieve this goal, the best storage conditions for *Cannabis* samples were selected, method was validated according to laboratories held parameters – all obtained results were within the specified acceptance criteria. Validated HPLC method was applied practically for cannabinoids identification and quantification in six different hemp products and received results were compared to the amounts specified by manufacturers.

PADĖKA

Dėkoju VMTI Fizinių ir technologijos mokslų centro, Metrologijos skyriaus vadovui Doc.dr. Evaldui Naujaliui už suteiktą galimybę atlikti mokslinį baigiamąjį darbą Cheminės metrologijos laboratorijoje bei konsultacijas. Taip pat, nuoširdi padėka VMTI Fizinių ir technologijos mokslų centro, Cheminės metrologijos laboratorijos inžinieriui Audriui Sadaunykiui už pagalbą ir konsultacijas HPLC metodikos bei analitinių metodų validavimo klausimais.