



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

Katažina Platonova

Pagrindinių studijų programa Farmacinė chemija – 2 kursas

Magistro studijų baigiamasis darbas

***CANNABIS SATIVA* L. TERPENŲ ANALIZĖ DUJŲ
CHROMATOGRAFIJOS - MASIŲ SPEKTROMETRIJOS
METODU BEI BENDRO ANTIOKSIDACINIO AKTYVUMO
TYRIMAS**

Darbo vadovas:
Doc. dr. Evaldas Naujalis

Vilnius, 2021

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

15-LOX	–	15-lipoksigenazė
ABTS	–	2, 2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis)
ASE	–	pagreitinta ekstrakcija tirpikliais
BCP	–	β-kariofilenas
BCPO	–	kariofileno oksidas
Br	–	taurėlapis
CB2	–	2 tipo kanabinoidų receptorių
CBC	–	kanabichromenas
CBD	–	kanabidiolis
CBG	–	kanabigerolis
CO ₂	–	anglies dioksidas
DNR	–	deoksiribonukleazės
DPPH	–	2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo laisvasis radikalas
EA	–	eteriniai aliejai
FDA	–	Maisto ir vaistų administracija
FID	–	liepsnos jonizacijos detektorius
FRAP	–	geležies redukcijos antioksidacinė galia
GC-MS	–	dujų chromatografija – masių spektrometrija
GPx	–	glutathiono peroksidazė
Gt	–	liaukinės trichomos
HPLC	–	efektyvioji skysčių chromatografija
HUM	–	α-humulenas
IS	–	vidinis standartas
Lf	–	lapai
MAE	–	mikrobangų ekstrakcija
MeOH	–	metanolis
MS	–	masių spektrometrija
Ngt	–	neliaukinės trichomos
ORAC	–	deguonies radikalų absorbcijos pajėgumo nustatymas
RNS	–	reaktyviosios azoto formos
ROS	–	reaktyviosios deguonies formos
RSD	–	santykinis standartinis nuokrypis
SC-CO ₂	–	superkritinis anglies dioksidas
SEM	–	skenuojančioji elektroninė mikroskopija
SF	–	superkritinis skystis
SFE	–	superkritinio skysčio ekstrakcija
St	–	žiotelės
THC	–	(–)- <i>Trans</i> -Δ ⁹ -tetrahidrokanabinolis
THCV	–	tetrahidrokanabivarinas
UAE	–	ekstrakcija ultragarsu

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS.....	2
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	7
1.1 Oksidacinis stresas ir antioksidantai	7
1.2 Pluoštinių kanapių morfologija bei cheminis profilis	8
1.3 Pluoštinių kanapių terpenai.....	12
1.4 Terpenų terapinis poveikis	16
1.5 Terpenų iš pluoštinių kanapių žaliavos išgavimo metodai	20
1.6 Terpenų iš pluoštinių kanapių žaliavos analizės metodai	23
1.7 Terpenų antioksidacinis aktyvumas ir jo nustatymo metodai.....	24
1.8 Kitų <i>C. sativa</i> L. junginių antioksidacinis aktyvumas ir sinerginis efektas.....	26
2. TYRIMO METODIKA.....	28
2.1 Tyrimo objektas	28
2.2 Aparatūra, įrenginiai ir sąnaudinės medžiagos	28
2.3 Medžiagos ir tirpikliai.....	29
2.4 Etaloninių tirpalų, eliuentų ir ekstraktų paruošimo procedūros.....	29
2.5 Dujų chromatografijos - masių spektrometrijos metodo sąlygos	30
2.6 Efektyviosios skysčių chromatografijos metodo sąlygos	31
2.7 <i>Cannabis sativa</i> L. žaliavų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimai	31
2.7.1 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu	31
2.7.2 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu	33
2.8 Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymas pluoštinėje kanapėje	34
2.9 Statistinis duomenų įvertinimas	35
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	36
3.1 Terpenų ekstrakcijos iš pluoštinės kanapės tyrimas	36
3.1.1 Ekstrakcijos išgavos priklausomybė nuo ekstrahuojančio tirpiklio ir jo tūrio	36
3.1.2 Ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo temperatūros.....	37
3.1.3 Ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės.....	38
3.2 Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodo validavimas	39
3.2.1 Metodo tiesiškumas	40

3.2.2	Metodo selektyvumas	41
3.2.3	Metodo glaudumas	43
3.2.4	Metodo aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos	44
3.2.5	Metodo išgava.....	45
3.3	Terpenų ir kitų junginių įvertinimas pluoštinėje kanapėje GC-MS metodu.....	45
3.3.1	Terpenų ir kitų junginių pluoštinėse kanapėse kokybinis įvertinimas	46
3.3.2	Santykinis kiekybinis terpenų pluoštinėse kanapėse įvertinimas	48
3.4	Kanabinoidų pluoštinėse kanapėse įvertinimas skysčių chromatografijos metodu	49
3.5	Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pluoštinės kanapės augalinėje žaliavoje DPPH bei ABTS metodais	50
3.6	Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymas pluoštinėje kanapėje	54
IŠVADOS		55
SANTRAUKA.....		56
SUMMARY.....		57
LITERATŪROS SĄRAŠAS		58
PADĖKOS.....		63

IVADAS

Pastaraisiais metais stebimas vis populiarėjantis pacientų gydymas augalinės kilmės preparatais, ypatingai jų veiksmingumas pastebimas sergant uždegiminėmis ligomis. Oksidacinis stresas vaidina pagrindinį vaidmenį uždegiminiuose procesuose, senėjimo patogenezėje ir esant degeneracinėms ligoms, tokioms kaip aterosklerozė, širdies ir kraujagyslių ligos, diabetas ir vėžys. Sutrikus pusiausvyrai tarp laisvųjų radikalų susidarymo organizme ir ten veikiančių antioksidantų, nebelieka organizmo apsaugos ir pasireiškia oksidacinis stresas. Antioksidacinėje apsaugoje svarbų vaidmenį atlieka nefermentiniai antioksidantai, kurie dažnai pagal šaltinį dar skirstomi į metabolinius (endogeninius) bei gaunamus su maistu (egzogeninius). Tarp nefermentinių antioksidantų nemažai yra iširta eterinių augalų aliejų (EA), kurie pasižymi stipriu antioksidaciniu poveikiu. Nustatyta, jog gebėjimą, pašalinti laisvuosius radikalus turi ne tik fenoliniai junginiai, bet ir terpenai bei kiti junginiai, kurių gausiai aptinkama EA [1].

Augaluose yra aptikta tūkstančiai terpenų, tačiau kokybiškai nustatyta tik nedidelė visų terpenų dalis. Nepaisant žinomų terpenų įvairovės, kai kurie yra susitelkę tik tam tikruose tipuose ar šeimose, pavyzdžiui, tokiose kaip *Cannabaceae* [2]. Vienas daugiausiai dėmesio sulaukiantis šios šeimos narys yra *Cannabis sativa* L. Tai svarbi žolinė rūšis, kilusi iš Vidurinės Azijos ir nuo seniausių laikų naudojama liaudies medicinoje. Šis augalas labai populiarus farmacijos sektoriuose, nes jo metabolitai pasižymi stipriu bioaktyvumu, kuris svarbus žmogaus sveikatai [3]. Terpenai, randami *Cannabis sativa* L., tiksliau, jų eteriniuose aliejuose, didžiąją jų dalį sudaro mono- ir seskviterpenai: iki 98% visų terpenų, randamų kanapių EA [2].

Terpenai yra vienas iš vaistinių augalų eterinių aliejų komponentų, kuris galėtų būti naudojamas kaip maisto papildų priedas, siekiant užkirsti kelią oksidaciniam stresui, kuris prisideda prie degeneracinių ligų formavimosi [1]. Įrodyta, kad dėl savo antioksidacinio aktyvumo terpenai teikia tinkamą apsaugą esant oksidaciniam stresui įvairių ligų metu, įskaitant kepenų, inkstų, neurodegeneracines ir širdies bei kraujagyslių ligas, vėžį, diabetą, taip pat esant senėjimo procesams. Šis antioksidacinis aktyvumas gali paaiškinti jų gebėjimą moduluoti nervinio signalo perdavimą, uždegimo procesą ir imunologinį poveikį [4].

Nepaisant plataus terpenų profilio, esančio *Cannabis sativa* L. EA, jo antioksidacinio aktyvumo savybės dar nėra pilnai išanalizuotos [1]. Šis darbas buvo atliktas tiriant lakiuosius junginius išskirtus iš *Cannabis sativa* L. organinių tirpiklių pagalba. Įvertinus bendrą terpenų bei kitų junginių kiekį bei ekstrakto antioksidacinį aktyvumą, buvo nustatytas galimas ryšys tarp *Cannabis sativa* L. ekstrakto bei jo sudėtyje esančių komponentų antioksidacinio aktyvumo.

Šio magistro studijų baigiamojo darbo tikslas buvo išskirti ir kokybiškai bei kiekybiškai įvertinti pluoštinės kanapės *C. sativa* L. Futura 75 veislės sudėtyje esančius terpenus dujų chromatografijos - masių spektrometrijos metodu, bei ištirti pluoštinių kanapių ekstrakto antioksidacinį aktyvumą ir įvertinti, kaip jis susijęs su terpenų ar kitų junginių kiekiu.

Šiam tikslui įgyvendinti buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Parinkti optimalias ekstrakcijos sąlygas terpenų ekstrahavimui iš pluoštinės kanapės *Cannabis sativa* L. biožaliavos;
2. Sukurti, optimizuoti ir validuoti dujų chromatografijos-masių spektrometrijos (GC-MS) metodą terpenams nustatyti;
3. Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu įvertinti kokybinę ir kiekybinę terpenų sudėtį *Cannabis sativa* L. žaliavų mėginiuose;
4. Nustatyti *Cannabis sativa* L. žaliavų ekstraktų antioksidacinį aktyvumą DPPH ir ABTS metodais;
5. Įvertinti *Cannabis sativa* L. žaliavų kokybinės ir kiekybinės sudėties bei jų antioksidacinio aktyvumo ryšius.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Oksidacinis stresas ir antioksidantai

Žmogaus kūne vyksta įvairūs oksidaciniai procesai. Reaktyviosios deguonies formos (ROS) ir reaktyviosios azoto formos (RNS) fiziologiniais tikslais nuolat generuojamos *in vivo*, jei šis procesas suintensyvėja ir jų koncentracija padidėja, sukeliamas oksidacinis stresas. Ultravioletiniai spinduliai, tabako dūmai ir aplinkos toksinai yra egzogeniniai veiksniai, kurie skatina *in vivo* ROS gamybos procesą. Oksidacinis stresas padidina laisvųjų radikalų gamybą arba sutrikdo jų neutralizavimą, dėl kurio pažeidžiamos biomolekulės (baltymai, lipidai, DNR), ląstelės ir audiniai, o tai sukelia daugybę lėtinių ligų, tokių kaip aterosklerozė, vėžys, diabetas, reumatoidinis artritas, postischeminė perfuzijos trauma, miokardo infarktas, širdies ir kraujagyslių ligos, lėtinis uždegimas, insultas ir septinis šokas, senėjimas ir kitos žmogaus degeneracinės ligos.

Antioksidacinių savybių turinčios medžiagos - antioksidantai - padeda apsisaugoti nuo žalingo oksidacinio streso poveikio. Kaip minėta anksčiau, antioksidantai klasifikuojami į egzogeninius (natūralūs ar sintetiniai) arba endogeninius junginius, kurie atsakingi už laisvųjų radikalų neutralizavimą. Gamtoje yra begalė natūralių antioksidantų, jų aptinkama daugelyje maisto produktų, įskaitant vaisius ir daržoves. Šiais laikais didelis dėmesys skiriamas augalinėms žaliavoms, kuriose kaupiami antioksidacinių savybių turintys junginiai, tokie kaip karotenoidai, terpenai ir polifenoliai [5-6]. Terpenai yra vieni iš plačiausiai gamtoje pasitaikančių struktūrinių junginių, kurie pasižymi įvairiapusiu biologiniu ir farmakologiniu aktyvumu. Dėka terpenų antioksidacinių savybių, organizmui suteikiama tinkama apsauga tuo metu, kai pasireiškia oksidacinis stresas.

Kanapės yra vienas iš seniausių augalų žemėje, kuris naudojamas medicinos reikmėms, pluoštui, pašarams gaminti, degalams ir kosmetikai. *Cannabis sativa* L. sudėtyje yra įvairių klasių cheminių junginių, pavyzdžiui, kanabinoidų, terpenų, cukrų, angliavandenilių, steroidų, flavonoidų, azoto junginių ir amino rūgščių. Tarp lakiųjų terpenų dažniausiai dominuoja monoterpenai, bet taip pat nemažai kanapių ekstraktuose pasitaiko seskviterpenų. Kanapės pasižymi teigiama nauda sveikatai, įskaitant vidurių užkietėjimo gydymą, cholesterolio kiekio mažinimą, širdies ir kraujagyslių sistemos gerinimą, imunomoduliuojantį poveikį ir dermatologinių ligų palengvėjimą. Be to, ne viename moksliniame tyrime yra aprašyta kaip kanapės demonstruoja stiprų antioksidacinį poveikį ir galimybę pagerinti mokymosi ir atminties sutrikimus [5, 7].

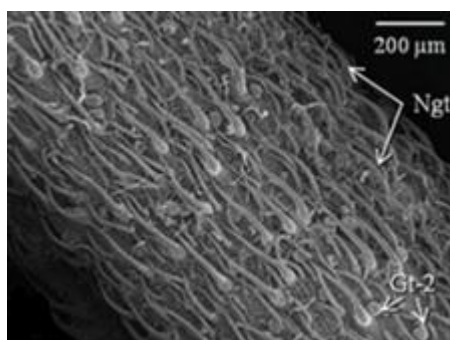
Mokslo duomenų bazėse yra daug straipsnių apie kanapių aliejaus tyrimus, o *Cannabis sativa* L. augalinių žaliavų ekstraktų antioksidacinis poveikis dar nėra plačiai iširtas. Todėl šio tyrimo metu bus ne tik iširtas pluoštinės kanapės antioksidacinis aktyvumas ABTS ir DPPH metodais, bet ir bus

išanalizuotas terpenų ir kitų junginių kiekybinės sudėties bei *Cannabis sativa* L. ekstraktų antioksidacinio aktyvumo ryšys.

1.2 Pluoštinių kanapių morfologija bei cheminis profilis

Cannabis L. gentis priklauso žydinčių augalų *Cannabaceae* šeimai. Dėl kanapių genties rūšių skaičiaus kyla ginčų. Kai kurie autoriai mano, kad gentis yra specifinė, susidedanti iš dviejų ar trijų rūšių, t.y. *Cannabis Sativa* Linnaeus (*C. Sativa* L.), *Cannabis Indica* Lamarck (*C. Indica*) ir *Cannabis Ruderalis* Janisch (*C. Ruderalis*), o kai kurie kiti yra atpažinę skirtingas *C. sativa* rūšies veisles, tokias kaip var. *mexicana*, var. *Americana*, var. *sativa* ir var. *indica*. Iki šių dienų nėra prieita bendros nuomonės, ar kanapių gentis yra monotipinė ir susideda tik iš vienos rūšies (*C. sativa*), ar iš daugelio tipų rūšių, kurias galima būtų suklasifikuoti į septynis tariamus taksonus, remiantis morfologinėmis, geografinėmis ir genetinėmis savybėmis. Žvelgiant iš morfologinės perspektyvos, *sativa*, *indica* ir *ruderalis* dažniausiai aprašomos kaip trys pagrindinės kanapių rūšys. Paprastai *C. sativa* augalai apibūdinami kaip aukštesni ir laisvai išsišakoję, pagrindinis jų geografinis pasiskirstymas yra Europoje, *C. indika* paprastai yra trumpesni, tankiau šakoti ir kūgio formos, daugiausiai aptinkami Pietų Azijoje-Afrikoje, o *C. ruderalis* subrendę būna trumpi ir negausiai arba apskritai ne išsišakoję, geografiškai pasiskirstę centrinėje Azijoje. Tačiau didžioji dalis autorių mano, kad gentis atstovauja tik vieną labai polimorfinę *Cannabis sativa* L. rūšį [8-10].

Cannabis sativa L. augalai yra statūs, vienmečiai augalai, kurie dažniausiai yra dvilyčiai, retai vienalyčiai, užaugantys iki 1–6 m aukščio. Stiebai yra žali, tuščiaviduriai, cilindriniai ir išilgai išvogti. Lapkočiai yra iki 7 cm ilgio, cilindro formos su viduriniu grioveliu išilgai viršutinės pusės ir padengti neliaukinėmis ir liaukinėmis trichomomis (1 pav.), lapkočiai yra 0,5–1,5 cm ilgio.



1 pav. Lapkočio paviršius padengtas neliaukinėmis (Ngt – angl. Non-glandular trichomes) ir liaukinėmis (Gt – angl. Glandular trichomes) trichomomis¹

¹ Chandra, S., Lata, H., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa* L. - botany and biotechnology. *Cannabis Sativa L. - Botany and Biotechnology*, 1–474. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6>

Lapai (2 pav.) yra delniškai 3–9 dalim skiautėti, jauniausi lapai kartais būna neskiautėti. Skiltys yra siaurai pailgos, lancetiškos, 3–20 cm ilgio, iki 1,8 cm pločio, tamsiai žalios viršuje, apačioje blyškesnės, prie pagrindo susiaurėja, viršūnėje smailėjančios ir dantytos išilgai pakraščių.



2 pav. *Cannabis sativa* L. morfologija. Lapai, turintys skilčių skaičiaus kitimą¹

Vyriškos lyties lapai (3 pav) yra šviesiai žali, gėlės žiedynuose atsiranda pavieniui, grupėmis arba iš 3 žiedų. Kiekvieną gėlę sudaro penki žiedai, penki kuokeliai ir siauras žiedelis. Žiedai yra ovaliai pailgi, 2–4 cm ilgio, gelsvai arba balkšvai žali, išsiskleidę ir smulkiai plaukuoti. Kuokeliai yra nukarę ir susideda iš plonų gijų ir žalsvų dulkių². Žiedadulkių grūdai išsiskiria per dulkių galines poras .



3 pav. *Cannabis sativa* L. morfologija. Vyriško augalo šakelė¹

Moteriškos lyties augalas (4 pav., a – c) yra tamsiai žalias ir žemas. Žiedai glaudžiai auga trumpų stiebų žiedynų viršūnėje, tankiai susiformavusiose viršutinėse šakų pažastyse. Kiekviena gėlė susideda iš kiaušidės, kurios baigiasi ilgomis lieknomis plunksninėmis žiotelėmis viršūnėje (4 pav., c), kiaušidę supa membraninis periantas ir taurėlapis. Periantas yra skaidrus, lygus, šiek tiek su kutais palei kraštą, subrendęs užima apie du trečdalius kiaušidės. Taurėlapiai yra žalios spalvos,

² Dulkės - tai gėlių struktūra, esanti kuokelio ar vyro reprodukcinio organo galinėje dalyje.

persidengiančiais kraštais bei apgaubiantys žiedą. Tiek vyriškos, tiek moteriškos lyties žiedai paprastai žydi liepos-rugpjūčio mėnesiais.



4 pav. *Cannabis sativa* L. morfologija. A ir B – šakelės su moteriškais žiedynais, C - moteriškos lyties žiedynai (kur: Lf – lapai (angl. Leaf), Br – taurėlapis (angl. Bract), St – žiotelės (angl. Stomata))¹

Vaisius yra maždaug 4–6 mm ilgio ir 3–4 mm skersmens, gyslotas, elipsoidinis arba subglobulinis, lygus, šiek tiek suspaustas, rusvai pilkas ir margas, turintis vieną sėklą su kietu apvalkalu (5 pav.).



5 pav. *Cannabis sativa* L. sėklos¹

Vyriškos lyties augalai paprastai yra aukštesni, o moteriškos - tvirtesni. Auginant pasitaiko keletas skirtingų veislių. Morfologinėms kanapių augalų savybėms įtakos turi sėklų padermė, taip pat aplinkos veiksniai, tokie kaip dirvožemio tipas, šviesa, vanduo, maistinės medžiagos ir erdvė [8]. Taip pat visi šie veiksniai turi įtakos *Cannabis sativa* L. cheminiam profiliui, todėl pluoštinių kanapių augintojams yra svarbus nuoseklaus derliaus ir kokybės vienodumo palaikymas tarp gamybos ciklų. Dėl to dauguma pluoštinių kanapių augintojų dirba kontroliuojamos aplinkos objektuose, kuriuose galima kontroliuoti temperatūrą, drėgmę, šviesos intensyvumą, šviesos spektrą ir anglies dioksido (CO₂) lygį. Stabiliomis aplinkos sąlygomis augintojai gali išauginti iki šešių derlių per metus, tai padidina produktyvumą 15–30 kartų lyginant su lauko kultivavimu [11].

C. sativa L. pagamina daugiau kaip 750 skirtingų cheminių klasių natūralių junginių. Kanabinoidai yra sugrupuoti į vieną klasę, susidedančią iš 86 antrinių terpenofenolinių metabolitų, kurie yra identifikuoti *C. sativa* L. augale. Kita svarbi *C. sativa* L. gaminamų junginių klasė apima

iki 140 nustatytų terpenų. Be kvapo, kurį suteikia terpenai, taip pat yra įrodymų, leidžiančių manyti, kad jie yra lemiamas komponentas modifikuojant tam tikrą padermės fiziologinį poveikį. Kitos junginių klasės apima 50 identifikuotų angliavandenilių ir kitų junginių, kurie apibendrinti 1 lentelėje [12].

1 lentelė.

Cheminės sudedamosios dalys, nustatytos *C. sativa* L. pagal cheminę klasę³

Cheminė klasė	Identifikuota junginių
Terpenai	140
Kanabinoidai	86
Angliavandeniliai	50
Cukrūs ir panašūs junginiai	34
Azoto junginiai	27
Nekanabinoidiniai fenoliai	25
Riebalų rūgštys	23
Flavonoidai	23
Paprastos rūgštys	20
Paprasti ketonai	13
Paprasti esteriai ir laktonai	13
Paprasti aldehydai	12
Baltymai, fermentai ir glikoproteinai	11
Steroidai	11
Elementai	9
Paprasti alkoholiai	7
Vitaminai	3

Kanabinoidai yra terpenofenolio junginių grupė, randama kanapėse. Šiuo metu pluoštinėse kanapėse yra aptikta ir apibūdinta daugiau nei 100 kanabinoidų. (-)-*Trans*- Δ^9 -tetrahidrokanabinolis (THC) yra laikomas pagrindine veikliąja medžiaga, atsakinga už svaiginamąjį ir medicininį poveikį, priskiriamą kanapėms. THC pasižymi antiemetiniu, neuroprotekciniu ir priešūždegiminiu poveikiu, taip pat geba sumažinti tam tikras neuropatinio ir lėtinio skausmo formas. Kitas svarbus kanabinoidas – kanabidiolis (CBD) - turi neuroprotekcinį, priešūždegiminių, antipsichozinių ir prieštraukulinių savybių (be THC svaiginančio poveikio). Kiti nedideli kanabinoidai, tokie kaip kanabigerolis (CBG), kanabichromenas (CBC) ir tetrahidrokanabivarinas (THCV), taip pat pasižymi farmakologinėmis savybėmis.

Terpenai yra dar viena įdomi biologiškai aktyvių junginių, randamų kanapėse, grupė. Dėl lakios prigimties kanapėse esantys terpenai prisideda prie augalų aromato ir skonio. Įvairiose kanapių veislėse buvo nustatyta apie 100-150 terpenų, kurių didelis kiekis aptinkamas ir kituose augaluose. Kanabinoidai ir terpenai gaminami kanapių trichomose, kurių didžiausias tankis yra moterų

³ Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., & Makriyannis, A. (2016). *Cannabis sativa* and Hemp. In *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>.

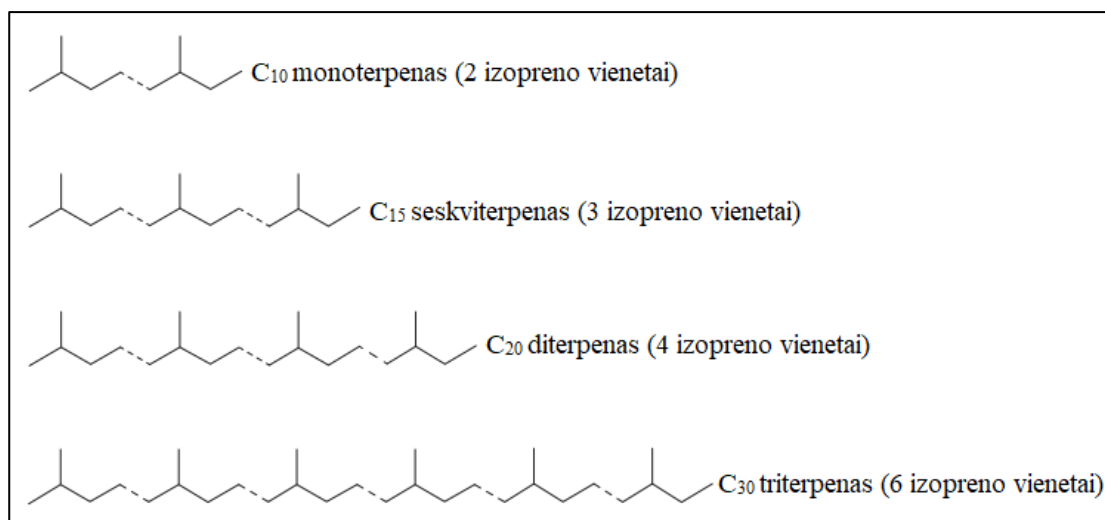
žiedpumpuriuose [2, 9-10]. Terpenų kanapių žiedpumpuriuose paprastai būna 0,5–3,5 %. Nors bendras terpenų kiekis, gautas iš *C. Sativa* L., sudaro tik dešimtąją dalį to paties augalo kanabinoidų kiekio, net nedidelis terpenų kiekis reikšmingai veikia kanabinoidų aktyvumą. *C. sativa* L. yra identifikuotos dvi pagrindinės terpeno grupės – monoterpenai ir seskviterpenai, be kurių dar aptinkama ir diterpenų ir triterpenų [9, 13]. Monoterpenai yra labai lakūs, o seskviterpenai yra jautrūs skilimui ir nestabilūs veikiami tokių degradacijos poveikių kaip oras/deguonis ir aukštos temperatūros [14]. Monoterpenai ir kiti lakieji junginiai pirmiausia lemia kanapių padermių kvapų skirtumus. Seskviterpenai yra mažiau lakūs nei monoterpenai, o ryškus kvapas paprastai pastebimas tik dariniuose, kuriuose yra paprastų pakaitalų, tokių kaip alkoholiai ar ketonai. Dar 1996 metais mokslininkai nustatė, kad džiovinant šviežius moteriškos lyties pluoštinių kanapių žiedynus, monoterpenai prarandami žymiai labiau nei seskviterpenai, tačiau nė vienas iš pagrindinių eterinio aliejaus komponentų visiškai neišnyksta. 1997 metais buvo pranešta, kad terpenų derlius ir gėlių aromatas skiriasi atsižvelgiant į žiedynų brandos laipsnį ir į tai, ar žiedynai apdulkinami. Kai kurie pluoštinių kanapių eteriniame aliejuje esantys terpenai yra farmakologiškai aktyvūs ir gali sinergizuoti kanabinoidų poveikį [15]. Terpenai, būdami biologiškai aktyvūs junginiai, gali vaidinti svarbų vaidmenį bendrame pluoštinių kanapių poveikyje [9].

1.3 Pluoštinių kanapių terpenai

Terminas terpenai yra kilęs iš terpentino (lot. *Balsamum terebinthinae*). Terpentinas, kuris dar verčiamas „pušų sakai“, yra klampus maloniai kvėpiantis balzamas, tekantis pjaunant pušies medieną. Terpentine yra „dervos rūgščių“ ir kai kurių angliavandenilių, kurie iš pradžių buvo vadinami terpenais. Tradiciškai visi šie natūralūs junginiai, sudaryti iš izopreno subvienetų ir didžiaja dalimi kilę iš augalų, yra vadinami terpenais [16]. Dar literatūroje dažnai galime pamatyti terminą „terpenoidai“. Terpenoidai yra antrinių metabolitų klasė, gaunama iš terpenų, turinčių daug ciklinių grupių ir deguonies. Abu jie gaunami iš izopentenilo ir dimetilalilo difosfatų [17].

Terpenai sudaro didžiausią fitocheminių medžiagų grupę, kaip minėta anksčiau, pluoštinėse kanapėse jų identifikuojama daugiau nei 100 junginių, kurie yra atsakingi už skirtingų kanapių padermių kvapą ir skonį. Terpenai skirstomi į įvairias šeimas pagal besikartojančių 5 anglies atomų (izopreno vienetų) skaičių, pvz., monoterpenus su C-10, seskviterpenus su C-15, diterpenus su C-20 ir triterpenus, sudarytus iš 30-ies anglies atomų (6 pav.) [3, 13]. Terpenų išėiga ir pasiskirstymas augale skiriasi priklausomai nuo daugybės parametru, tokių kaip eterinio aliejaus gavimo procesai, aplinkos sąlygos ar augalo branda. Mono- ir seskviterpenai aptinkami kanapių žieduose, šaknyse ir lapuose, kurių pagrindinė gamybos vieta yra sekreciniai liaukų plaukeliai. Monoterpenai paprastai

dominuoja lakiame terpeno profilyje (nuo 3,1 iki 28,3 mg g⁻¹ žiedų sausos masės) ir apima daugiausia D-limoneną, β-mirceną, α- ir β-pineną, terpinoleną ir linalolį. Taip pat kanapių ekstraktuose aptinkama daug seskviterpenų (nuo 0,5 iki 10,1 mg g⁻¹ žiedų sausos masės), ypač β-kariofileno ir α-humuleno. Triterpenų aptinkama kanapių šaknyse – friedelinas ir epifriedelanolis, kanapių pluoštuose – β-amirinas ir kanapių sėklų aliejuje – cikloartenolis, β-amirinas ir damaradienolis [3].

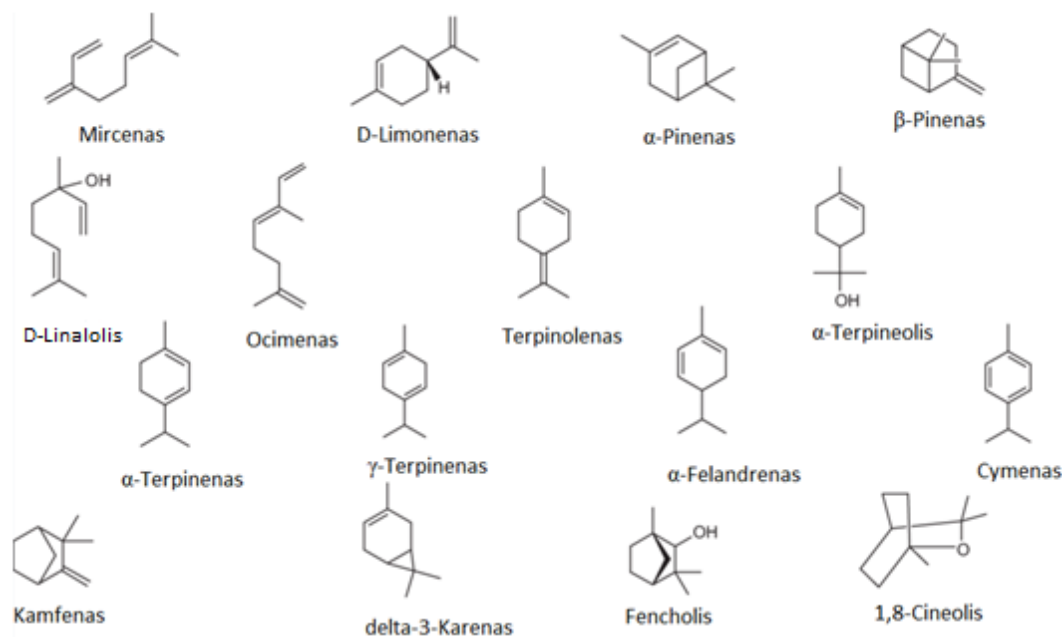


6 pav. Izopreno vienetų susijungimas į terpenus⁴

Augaliniai EA paprastai susideda iš lakiųjų aromatinių terpenų ir fenilpropanoidų. Šios lipofilinės lakiosios medžiagos laisvai kerta ląstelių membranas ir atlieka įvairius ekologinius vaidmenis, pavyzdžiui, augalų ir vabzdžių sąveikos funkciją.

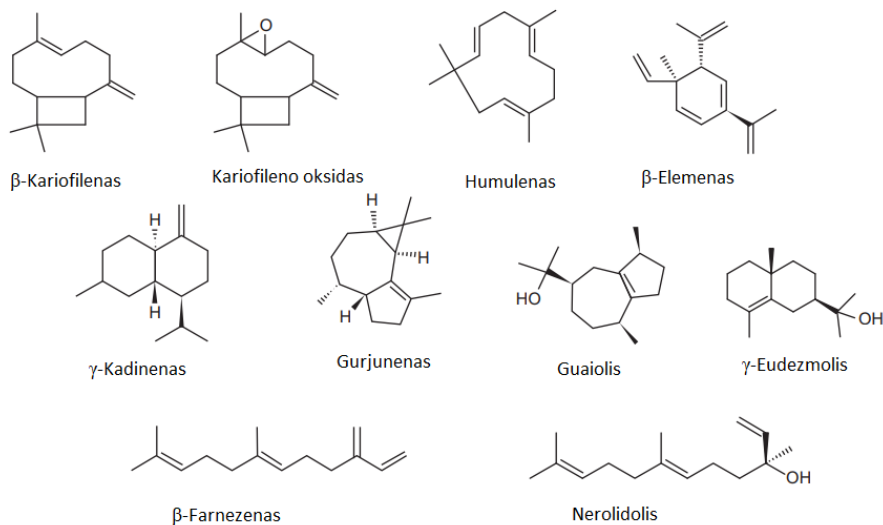
Monoterpenai (7 pav.) yra izopreno dimerai; jų molekulinė formulė yra C₁₀H₁₆. Tai yra lengvai lakūs ir malonaus kvapo junginiai, kurie sudaro augalų eterinių aliejų pagrindą. Pagal struktūrą monoterpenai yra suskirstyti į dvi dideles grupes: aciklinius, turinčius atvirą anglies grandinę (pavyzdžiui, mirceną, ocimeną) ir ciklinius, kuriuose gali būti ir vienas ciklas (limonenas), ir keli (pinenai) [18].

⁴ Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Medical Cannabis and Cannabinoids*, 3(1), 25–60. <https://doi.org/10.1159/000509733>



7 pav. Monoterpenų pavyzdžiai⁵

Seskviterpenai (8 pav.) yra C₁₅-terpenai, sudaryti iš trijų izopreno vienetų. Paprastai seskviterpenai yra angliavandeniliai arba sudaro deguonies formas, įskaitant laktonus, alkoholius, rūgštis, aldehydus ir ketonus [18].

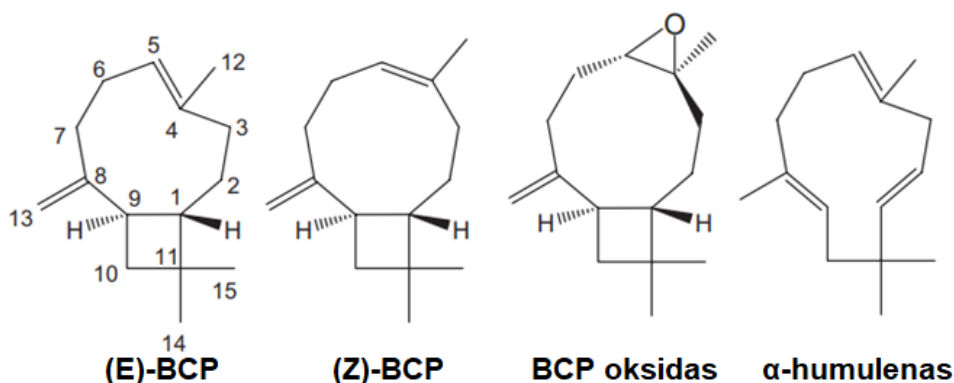


8 pav. Seskviterpenų pavyzdžiai⁵

Seskviterpenas (E)- β -kariofilenas [(E)-BCP] yra pagrindinis lakus terpenas, kurio dideliais kiekiais randama daugelyje įvairių prieskoninių ir maistinių augalų eteriniuose aliejuose, tokių kaip raudonėlis (*Origanum vulgare* L.), cinamonas (*Cinnamomum* spp.) ir juodieji pipirai (*Piper nigrum*

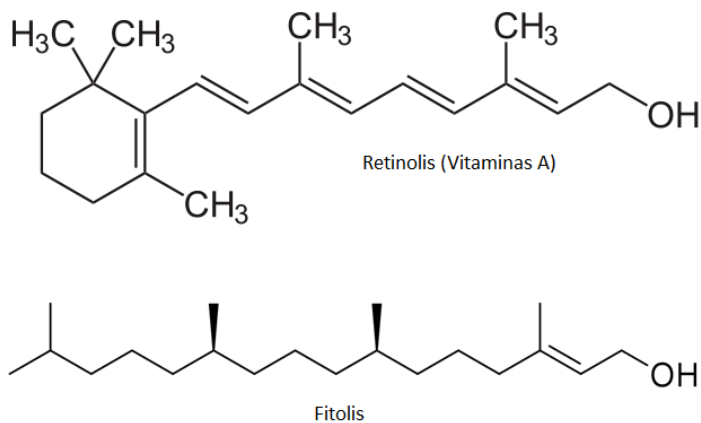
⁵ Russo, E. B., & Marcu, J. (2017). Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. In *Advances in Pharmacology* (1st ed., Vol. 80, Issue September). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.004>.

L.). Gamtoje (E)- β -BCP paprastai randamas kartu su nedideliais jo izomerų (Z)- β -kariofileno [(Z)- β -BCP arba izokariofileno] ir α -humuleno (HUM) kiekiais arba mišinyje su jo oksidacijos produktu, β -kariofileno oksidu (BCPO) (9 pav.) [19].



9 pav. Kariofilano ir humulano tipo seskviterpenai, randami *C. sativa* L. ir daugelyje kitų augalų. Parodytos biciklinių seskviterpenų (E)- β -kariofileno, (Z)- β -kariofileno, kariofileno oksido ir izomero α -humuleno (α -kariofileno) cheminės struktūros⁶

Diterpenai (10 pav) yra C₂₀-terpenai, pagaminti iš keturių izopreno jungčių, kurių bendra molekulinė formulė – C₂₀H₃₂. Diterpenai gali turėti linijinę, bi-, tri-, tetra- ir penta- arba makrociklinę struktūrą, atsižvelgiant į jų griaučių šerdį. Gamtoje diterpenai paprastai būna oksiduotoje formoje su keto ir hidroksilo grupėmis. Diterpenai yra biologiškai svarbių junginių, tokių kaip retinolis, retinalis ir fitolis, pagrindas [18].

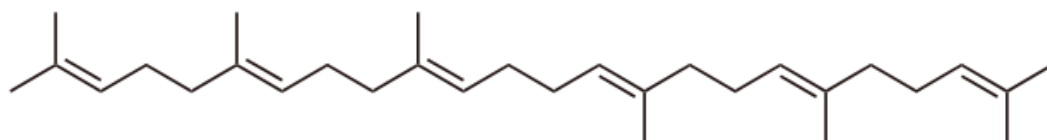


10 pav. Diterpenų pavyzdžiai⁷

⁶ Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J. Z., Xie, X. Q., Altmann, K. H., Karsak, M., & Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26), 9099–9104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>

⁷ „Diterpene“ iš wikipedia. [žiūrėta 2021 m. balandžio 11 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.wikiwand.com/en/Diterpene>

Triterpenai gaunami iš C30 pirmtako skvaleno (11 pav.), kurį sudaro šeši C5 izopreno vienetai, po kurių seka ciklizacija ir palaipsniui susidaro triterpenoidų struktūros, tokios kaip steroidai, steroliai, saponinai (glikozidai) ir kt. Triterpenai vaidina svarbų fiziologinį vaidmenį ląstelėje ir organizme. Šie junginiai yra būtini ląstelių membranų formavimuisi ir funkcijai ir yra pagrindas formuojant signalines molekules, tokias kaip steroidiniai hormonai ir receptoriai [18].



Skvalenas

11 pav. Triterpenų pavyzdys⁸

1.4 Terpenų terapinis poveikis

Šiuo metu yra ištirta labai nedidelė terpenų dalis. Pluoštinės kanapės yra vienas iš labiausiai paplitusių terpenų šaltinių. Terpenai/terpenoidai turi platų biologinį ir farmakologinį aktyvumą, pavyzdžiui, priešgrybelinį, antivirusinį, priešvėžinį, priešūždegiminį, antihiperglikeminį, antiparazitinį, antioksidacinį ir antimikrobinį aktyvumą. Toliau pateiktoje 2 lentelėje išvardytos vienos svarbiausių šio augalo terpenų savybių pavyzdžių.

2 lentelė.

Terpenų/terpenoidų farmakologinės savybės^{4,9}

Terpenas/terpenoidas	Farmakologinės savybės
Mircenas	Antipsichozinės, antioksidacinės, analgetinės, priešūždegiminės, raminamosios, raumenis atpalaiduojančios, priešvėžinės savybės. Taip pat apsaugo smegenis, širdies ir odos audinius nuo uždegimo ir oksidacinės žalos.
β-kariofilenas	Gastroprotekcinės, nuskausminamosios, priešvėžinės, priešgrybelinės, antibakterinės, antidepresantinės, priešūždegiminės, antiproliferacinės, antioksidacinės, anksiolitinės, analgetinės ir neuroprotekcinės savybės.

⁸ „Triterpene“ iš wikipedia. [žiūrėta 2021 m. balandžio 11 d.]. Prieiga per internetą: <https://www.wikiwand.com/en/Triterpene>

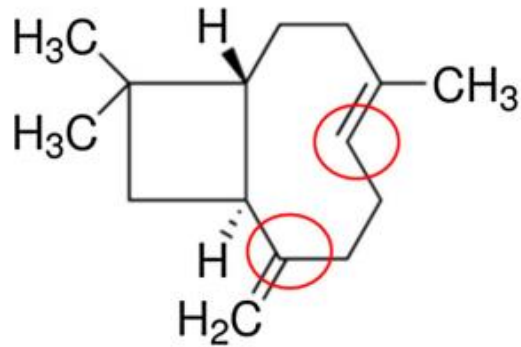
⁹ Nuutinen, T. (2018). Medicinal properties of terpenes found in Cannabis sativa and Humulus lupulus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 157, 198–228. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.076>

Terpenas/terpenoidas	Farmakologinės savybės
α-pinenas	Antibakterinės, antioksidacinės, priešuždegiminės, bronchus plečiančios, antiseptinės ir skrandį apsaugančios savybės.
β-pinenas	Antiseptinės, antidepresantinės, raminamosios savybės. Pasižymi antivirusiniu aktyvumu prieš paprastąjį herpeso virusą.
Limonenas	Antibakterinės, gastroprotekcinės, antiproliferacinės, priešgrybelinės, anksiolitinės, antidepresantinės, antimikrobinės, antispazminės arba imunostimuliuojančios savybės. Gali sumažinti stresą, depresiją, uždegimą, oksidacinį stresą, spazmus ir virusines infekcijas.
Linalolis	Raminamosios, antipsichozinės, prieštraukulinės, anksiolitinės, anestetinės, antidepresantinės, analgetinės, antioksidacinės, antimikrobinės, priešnavikinės, antiepilepsinės ir antineoplastinės savybės.
Terpineolis	Antioksidacinės, kraujagysles plečiančios, antibiotinės ir atpalaiduojančios savybės.
Karofileno oksidas	Analgetinės, antioksidacinės, priešvėžinės, priešgrybelinės ir priešuždegiminės savybės.
Fentandrenas	Priešgrybelinės ir virškinimo gerinamosios savybės.
Ocimenas	Priešgrybelinės savybės.
Kamfenas	Širdies ir kraujagyslių ligoms. Taip pat padidina antioksidacinių fermentų aktyvumą.
Guaiolis	Priešnavikinės, antibakterinės savybės.
α-humulenas	Antibakterinės, priešuždegiminės, priešalerginės ir priešnavikinės savybės. Vartojamas nemigai, depresijai, nerimui ir virškinimo sutrikimams gydyti.
γ-terpinenas	Nuskausminamosios, priešuždegiminės, priešgrybelinės, antimikrobinės, priešvėžinės ir antioksidacinės savybės.
β-elemenas	Priešvėžinės, priešuždegiminės savybės.
Nerolidolis	Priešparazitinės ir antileishmanialinio, antioksidacinio, antibakterinio aktyvumo, priešgrybelinės ir priešuždegiminės savybės.
Citralis	Priešgrybelinės, antimikrobinės, antiproliferacinės, citotoksinės, priešvėžinės ir raminamosios savybės.

Kovojant su oksidaciniu stresu svarbiausios savybės yra antioksidacinės ir priešuždegiminės. Ypatingai literatūroje, kaip priešuždegiminėmis bei antioksidacinėmis savybėmis pasižymintys junginiai, dėmesio sulaukia seskviterpenų klasė.

Seskviterpenai, turintys cheminę formulę $C_{15}H_{24}$, yra daug didesni junginiai nei monoterpenai ir yra daug stabilesni, palyginti su jais. Seskviterpenai yra natūraliai randami augaluose, grybuose ir vabzdžiuose, jie veikia kaip gynybinis mechanizmas arba pritraukia vabzdžių porininkus su feromonais. Seskviterpenai taip pat atlieka svarbų vaidmenį tradicinėje bei vakarietiškoje medicinoje, nes pasižymi priešvėžinėmis, antiplazminėmis ir priešuždegiminėmis savybėmis. Seskviterpenų laktonai gali padėti gydant skrandžio opas, taip pat yra aptinkami stiprių vaistų nuo maliarijos sudėtyje [20].

Pastaruoju metu keli seskviterpenai susilaukė didelio susidomėjimo dėl savo stiprių farmakologinių savybių, įskaitant priešuždegiminį ir antioksidacinį aktyvumą. Tarp kelių seskviterpenų būtent β -kariofilenas yra laikomas perspektyviu dėka savo terapinio potencialo sergant daugeliu lėtinių degeneracinių ligų. Cheminiu požiūriu BCP yra biciklinis seskviterpenas (12 pav.) Šis seskviterpenas yra farmakologiškai selektyvus CB2 receptorių agonistas, gausiai randamas įvairiuose žydinčiuose augaluose ir prieskoniuose. BCP turi palankias fizikines, chemines bei farmakokinetines savybes praskverbimui pro smegenis. Neseniai BCP buvo patvirtintas reguliavimo agentūrų, įskaitant JAV maisto ir vaistų administracijos (FDA), kurios reikalavimuose nurodyta β -kariofileno paskirtis – komerciniam naudojimui (kaip maisto priedas ir kvapiosios medžiagos) [21]. Dėl daugybės terapinių pranašumų ir psichotropinio poveikio nebuvimo, BCP atkreipia dėmesį į galimą terapinį panaudojimą. Pranešama, kad BCP pasižymi stiprių farmakologiniu poveikiu, įskaitant priešuždegiminį, antioksidacinį ir analgezinį poveikius [22-23]. Yra įrodyta, kad BCP pasižymi terapine nauda sergant endometrioze, opiniu kolitu, hepatotoksiškumu ir lipotoksiškumu. Be šių veiksmų, taip pat buvo pranešta apie BCP neuroprotekinį poveikį smegenų išemijai, epilepsijai, hipoksiniam-neurouždegimui, Alzheimerio ligai, depresijai ir nerimui [23-24]. β -kariofilenas pasižymi antioksidacinėmis savybėmis, užkerta kelią lipidiniams oksidaciniams pažeidimams ir pagerina GPx aktyvumą, kuris yra svarbus fermentas, susijęs su aterosklerozės prevencija [2, 25].



12 pav. BCP cheminė struktūra (raudoni apskritimai rodo antioksidacinio poveikio vietas)⁹

HUM taip pat yra plačiai gamtoje paplitęs seskviterpenas. Šis junginys pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis, kurios gali būti naudingos žmogaus sveikatai [26]. Tradiciškai HUM turintys augalai buvo naudojami nemigai, depresijai, kliesdeiui, nerimui ir virškinimo sutrikimams gydyti. Šiuolaikinio mokslo tyrimo rezultatai rodo, jog HUM ir jo dariniai pasižymi antialerginiu, priešūždegiminiu ir priešvėžiniu poveikiu [2]. Taip pat įrodyta, kad HUM slopina ląstelių augimą krūties ir storosios žarnos vėžio ląstelių linijose. Kitas tyrimas parodė, kad HUM sukėlė vėžinių ląstelių apoptozę ir kartu sumažino ląstelių glutationo kiekį, taip pat padidino ROS gamybą. Šie rezultatai rodo, kad HUM prooksidacinis poveikis gali būti susijęs su HUM citotoksiškumu vėžio ląstelėse [26].

BCP oksiduota forma yra β -kariofileno oksidas (BCPO). Šio seskviterpeno aptinkama tokiuose augaluose kaip: melisa, kmynai, gvazdikėliai, apyniai, bazilikai, raudonėlis, levandos, rozmarinas, cinamonas ir kt. [26]. Skirtingai nuo BCP, BCPO, taip pat kaip ir HUM, neturi afiniškumo CB2 receptoriams; bet šis junginys žinomas dėl savo priešvėžinių ir analgetinių savybių, tai yra ir antioksidantas ir baktericidas. Be to, jis gali turėti įtakos kontroliuojant 1 ir 2 tipo diabetą, širdies ir kraujagyslių ligas, hipertenziją, inkstų ligas ir neurologines sąlygas, tokias kaip Alzheimerio ir Parkinsono, slopinant 15-LOX [2]. Su BCPO atlikti tyrimai demonstruoja stiprų priešgrybelinį ir insekticidinį aktyvumą. Be to, literatūroje BCPO apibūdinamas kaip potencialus kandidatas tiek vėžio prevencijai, tiek gydymui. BCPO slopina ląstelių migraciją, generuodamas reaktyvias deguonies rūšis bei sukeldamas vėžinių ląstelių apoptozę. Tyrimuose su laboratoriniais gyvūnais nustatyta, kad BCPO yra reikšmingas centrinis ir periferinis analgetikas, kuris pasižymi priešūždegiminiu poveikiu.

Kartu BCP, BCPO ir HUM pasižymi daug žadančiomis biologinėmis savybėmis, kurios ateityje gali būti panaudotos gydant įvairias ligas. Be to, žmogaus organizmas dažnai kontaktuoja su šiais seskviterpenais, nes jų yra prieskoniuose, gėrimuose ir kosmetikoje. Jie lengvai patenka į žmogaus kūną per burną, taip pat prasiskverbiant per odą ar įkvėpus, kiekvienu būdu nustatant išmatuojamą koncentraciją kraujyje [26].

1.5 Terpenų iš pluoštinių kanapių žaliavos išgavimo metodai

Pradinis vaistinių augalų tyrimo etapas yra augalų mėginių paruošimas. Siekiant kiek įmanoma labiau išsaugoti biomolekules augale, svarbu pasirinkti tinkamą ekstrakcijos būdą [10]. Dėl neįtikėtino struktūrų, kurias gali sudaryti terpenai, asortimento, gryninimo metodai gali skirtis. Žaliavos išgavimas priklauso nuo terpeno cheminių savybių, pradinės augalinės medžiagos kiekio ir fizinių savybių, taip pat nuo naudojamų priemonių ir reagentų [27]. Fitocheminių ir antioksidacinių medžiagų ekstrahavimui iš augalinės medžiagos įtakos turi įvairūs veiksniai, įskaitant laiką, temperatūrą, tirpiklio koncentraciją ir tirpiklio poliškumą [28]. Tokie išankstiniai augalinių medžiagų paruošimai, kaip malimas ir džiovinimas, taip pat turi įtakos fitocheminių medžiagų išsaugojimui galutiniuose ekstraktuose. Ekstrakcija yra farmakologiškai aktyvių junginių išskyrimas iš augalo, kurio metu svarbu pasirinkti tinkamas procedūras ir selektyvius tirpiklius. Ekstrakcijos tikslas yra atskirti tirpius augalų metabolitus, paliekant netirpius likučius. Vieni pagrindinių terpenų ekstrakcijos metodų yra ekstrakcija organiniais tirpikliais, maceracija, soksleto ekstrakcija, mikrobangų ekstrakcija, taip pat ekstrakcija ultragarsu ir kt.

Tradicinis terpenų augalinėse medžiagose tyrimo metodas apima ekstrahavimą tirpikliais, tačiau mėginių paruošimo metodų poveikis, ypač naudojamų ekstrahentų poliškumas, dažniausiai turi įtakos galutinei skirtingų kanapių ekstraktų sudėčiai (3 lentelė) [10].

3 lentelė.

Fitocheminių medžiagų, ekstrahuotų įvairiais tirpikliais, tipai¹⁰

Poliškumas	Tirpiklis	Išekstrahuota cheminė klasė			
Žemas	n-Heksanas	Vaškai	Riebalai	Nelakieji junginiai	Lakieji junginiai
	Chloroformas	Alkaloidai	Aglikonai		Lakieji junginiai
Vidutinis	Dichlormetanas	Alkaloidai	Aglikonai		Lakieji junginiai
	Dietileteris	Alkaloidai	Aglikonai		
	Etilacetatas	Alkaloidai	Aglikonai	Glikozidai	
	Acetonas	Alkaloidai	Aglikonai	Glikozidai	

¹⁰ Masoko, P. (2007). *Chapter 2 Extraction of plant material*. 40–57.

3 lentelės tęsinys.

Poliškumas	Tirpiklis	Išekstrahuota cheminė klasė			
Vidutinis	Etanolis			Glikozidai	
	Metanolis	Cukrai	Aminorūgštys	Glikozidai	
Aukštas	Vanduo	Cukrai	Aminorūgštys	Glikozidai	
	Vandeninis rūgštis tirpalas	Cukrai	Aminorūgštys		Šarmai
	Vandeninis rūgštis tirpalas	Cukrai	Aminorūgštys		Rūgštys

Daugumą pirminių terpenų (linijinius ir ciklizuotus terpenus) sudaro tik angliavandeniliai, todėl šios molekulės yra nepolinės. Terpenai, turintys 15 arba mažiau anglies atomų, gali būti lakūs dėl savo mažo dydžio ir mažo poliškumo. Lakūs terpenai gali būti ekstrahuojami naudojant labai nepolinį organinį tirpiklį, pavyzdžiui, heksaną [27]. Iš naftos gautas n-heksanas šiuo metu yra labai dažnai pasirenkamas lakiųjų junginių ekstrahavimui. Jo cheminės savybės suteikia idealų aliejaus ekstrahavimo funkcionalumą. n-heksanas yra lengva parafininė naftos frakcija, kuri, atsižvelgiant į tirpumą aliejuje ir lengvą regeneravimą, pasižymi puikiomis tirpiklio savybėmis. Tačiau šis tirpiklis turi ir didelį trūkumą, jis buvo identifikuotas kaip oro teršalas, nes išsiskirdamas ekstrahavimo metu, jis gali reaguoti su kitais teršalais, gamindamas ozoną ir fotocheminius oksidatorius [29].

Maceracijos metu augalinės medžiagos mirkamos užkimštuose konteineriuose su tirpikliu ir palaikant dažną maišymą laikomos kambario temperatūroje mažiausiai 3 dienas. Šio proceso tikslas yra suminkštinti ir suardyti augalo ląstelių sienelę, kad išsiskirtų tirpi fitocheminė medžiaga. Po 3 dienų mišinys spaudžiamas arba perkošiamas filtruojant. Taikant šį įprastą metodą, šiluma perduodama konvekcijos ir laidumo būdu, o tirpiklių pasirinkimas lemia kokie junginiai iš mėginio bus išskirti. Ši technika yra viena lengviausių ir paprasčiausių, tačiau išlieka organinių atliekų problema, nes naudojamas didelis tirpiklių kiekis, kurį po procedūrus reikia tinkamai utilizuoti.

Taikant Soksleto ekstrakcijos metodą, smulkiai sumaltas mėginys suberiamas į specialų porėtą ekstrakcijos indelį, pagamintą iš storesnio filtrinio popieriaus arba celiuliozės, kuris patalpinamas tam skirtoje Soksleto aparato kameroje. Ekstrahentai kaitinami apatinėje kolboje, garuoja į mėginio antgalį, kondensatoriuje kondensuojasi ir laša atgal. Kai skysčio kiekis pasiekia sifono svirtį, skysčio turinys vėl ištuštinamas į apatinę kolbą ir procesas tęsiasi. Šis metodas reikalauja mažesnio tirpiklio kiekio, palyginti su maceracija. Tačiau Soksleto ekstrakcijos metodas turi ir savų trūkumų, tai pavojingų ir degių skystų organinių tirpiklių toksinis poveikis. Ekstrakcijos

sistemoje naudojami tirpikliai turi būti labai grynai, o tai gali padidinti išlaidas. Ši procedūra yra laikoma kenksminga aplinkai ir gali sukelti taršos problemą. Idealus Soksleto ekstrakcijos mėginys turi pasižymėti sausomis ir smulkiai suskaidytais kietosiomis medžiagų savybėmis, todėl taikant šį metodą reikia atsižvelgti į daugelį veiksnių, tokių kaip temperatūra, tirpiklio ir mėginio santykis bei maišymo greitis.

Mikrobangų ekstrakcijos (MAE) metu yra naudojama mikrobangų energija, ko tikslas yra pagerinti analitės judėjimą iš mėginio matricos į tirpiklį. Mikrobangų spinduliuotė sąveikauja su polinių ir poliarizuojamų medžiagų (pvz., tirpiklio ir mėginio) dipoliais, ko pasekoje medžiagų paviršius įkaista ir šiluma perduodama laidumo būdu. Molekulių dipolio sukimas, kurį sukelia mikrobangų elektromagnetiniai spinduliai, suardo vandenilinę ryšį; kas padidina ištirpusių jonų išsiskyrimą ir skatina tirpiklio įsiskverbimą į matricą. Napoliniuose tirpikliuose pastebimas silpnas kaitinimas, nes energija perduodama tik dielektrinės absorbcijos dėka. Šios technikos privalumas yra trumpesnis ekstrakcijos laikas ir tirpiklio tūris, lyginant su įprastais maceravimo ir Soksleto ekstrakcijos metodais.

Ekstrakcija ultragarsu (UAE) apima ultragarso naudojimą nuo 20 iki 2000 kHz. Mechaninis ultragarso akustinės kavitacijos poveikis padidina tirpiklių ir mėginių paviršiaus kontaktą ir ląstelių sienelių pralaidumą. Ultragarsu veikiamų medžiagų fizinės ir cheminės savybės pakinta ir pažeidžia augalų ląstelių sieneles; palengvinant junginių išsiskyrimą ir didinant tirpiklių masinį pernešimą į augalų ląsteles. Procedūra yra paprasta, o technologija nebrangi, ją galima pritaikyti tiek mažoje, tiek didesnėje fitocheminės ekstrakcijos skalėje. UAE pranašumai daugiausia susiję su ekstrakcijos laiko ir tirpiklio suvartojimo sumažėjimu. Tačiau naudojant ultragarso energiją, didesnę nei 20 kHz, gali susidaryti laisvieji radikalai, veikiantys aktyvius fitocheminius junginius.

Augalinėms medžiagoms ekstrahuoti taip pat naudojami kiti metodai, tokie kaip pagreitinta ekstrakcija tirpikliais (ASE) ir superkritinio skysčio ekstrakcija (SFE). Nepaisant metodų didelio efektyvumo, šie metodai yra mažiau populiarūs dėl didelių kaštų. ASE lyginant su maceracija ir Soksleto ekstrakcija, yra efektyvi skystų tirpiklių ekstrakcijos forma, nes metodas naudoja minimalų tirpiklio kiekį. Nerūdijančio plieno ištraukimo kameroje mėginys supakuotas su inertine medžiaga, pavyzdžiui, smėliu, kad mėginys nesikaupytų ir neužblokuotų sistemos vamzdelių. Sumontuotoje ASE kameroje yra smėlio ir mėginio mišinio sluoksniai tarp celiuliozės filtro popieriaus ir smėlio sluoksnių. Ši automatizuota ekstrakcijos technologija gali kontroliuoti kiekvieno atskiro mėginio temperatūrą ir slėgį, o ekstrakcijai reikia mažiau nei valandos, tačiau ASE kritiškai priklauso nuo tirpiklio tipo. Kitas metodas yra superkritinio skysčio ekstrakcija (SFE). Superkritinis skystis (SF) yra medžiaga, kuri kritiniame taške pasižymi fizinių dujų ir skysčio savybėmis. Šiuose taškuose skystis yra mažo klampumo ir pasižymi didelėmis difuzinėmis savybėmis, kad ištirtų chemines molekules iš augalų

matricos. Tokie veiksniai kaip temperatūra ir slėgis stumia medžiagą į jos kritinį tašką. SF elgiasi labiau kaip dujos, tačiau turi ir skysčio savybių. SF pavyzdys yra CO₂, kuris tampa SF esant aukštesnei nei 31,1 °C ir 7380 kPa. CO₂ paprastai naudojamas, nes jis yra nedegus, palyginti nebrangus ir netoksiškas. Nors SC-CO₂ blogai tirpina polinius junginius, tokios modifikacijos, kaip nedidelis papildomas etanolio ir metanolio kiekis, leidžia išgauti polinius junginius. SC tirpiklių stiprumą galima lengvai pakeisti keičiant temperatūrą, slėgį arba pridėdant modifikatorių, kurie sumažina ekstrakcijos laiką. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra tai, kad pradinė įrangos kaina yra labai didelė. Nepaisant šių trūkumų, mokslinėje literatūroje yra pateikiama informacija, kad taikant šį metodą buvo gautas didelis terpeno ingredientų kiekis (t.y. lyginant su įprastais metodais, kariofileno, humuleno ir limoneno gauta išgava siekia atitinkamai iki 50%, 20% ir 10%) [30-31].

1.6 Terpenų iš pluoštinių kanapių žaliavos analizės metodai

Po ekstrakcijos atliekama išskirtų terpenų analizė. Dėl didelio lakumo terpenai paprastai analizuojami dujų chromatografijos (GC) metodu, kuris būna sujungtas su tam tikrais detektoriais, dažniausiai su liepsnos jonizacijos detektoriumi (FID) arba masių spektrometru (MS) [32-33]. Tradicinis terpenų analizės metodas yra dujų chromatografija naudojant liepsnos jonizacijos detektorius. Šiuo metodu pirmiausia reikia atlikti ekstrakciją tirpiklių pagrindu, paprastai kanapių augalinę medžiagą dedant į tam tikrą skysto tirpiklio formą (paprastai metanolį ar etanolį), kad išskirti dominančius junginius į tirpiklį. Šis ekstraktas įpurškiamas į dujų chromatografijos aparatą, kur terpenai, esantys ekstrahentiniame tirpiklyje, yra atskiriami judant chromatografine kolonėle. Galiausiai atskirti junginiai išeina iš kolonėlės ir pasiekia liepsnos jonizacijos detektorius, kur jie yra sudeginami virš karštos vandenilio-oro liepsnos, kad susidarytų organiniai jonai. Tada FID esantys elektrodai matuoja srovę iš jonų, kurie, naudojant junginio sulaikymo laiką dujų chromatografe, gali būti naudojami terpenų kokybiniam ir kiekybiniam įvertinimui. Daugybėje straipsnių terpenų sudėtis *Cannabis sativa* L. mėginiuose aprašoma kaip santykinė procentinė sudėtis pagal vidinės smailės ploto normalizavimą. Kiekybinė analizė taip pat atliekama sudarant kalibravimo kreives, kai tiriamos analizės yra prieinamos kaip standartai. Remiantis šia analize, literatūroje yra pateikiamas pavyzdys kaip naudojamas tik vienas terpeno standartas - γ -terpinenas. Šio parinkto standarto dėka buvo kiekybiškai įvertinti visi 20 mėginio komponentai, nes gaunamas labai panašus monoterpenų ir seskviterpenų FID atsakas. Tačiau autoriai pareiškė, kad pateiktas metodas gali turėti nedidelių nukrypimų nuo realios analizių koncentracijos. Todėl atliekant kiekybinį įvertinimą, rekomenduojama sudaryti kalibracinį grafiką kiekvienai analizei atskirai, tačiau tai reikalauja daugiau išlaidų. Analizė su GC-FID dažnai naudojama dėl mažų sąnaudų ir paprastumo [10].

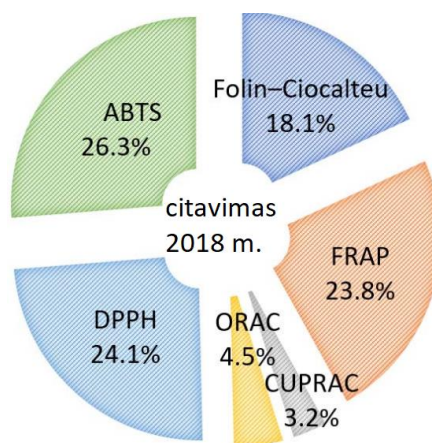
Kitas kanapėse esančių terpenų analizės metodas yra GC-MS, ši technika suteikia papildomą spektro smailės autentifikavimo naudą, kad būtų galima garantuoti, jog identifikavimas yra tikslus. MS yra brangesnis ir sudėtingesnis nei FID, tačiau suteikia daug gerų kiekybinių galimybių. Pavyzdžiui, yra galimybė pateikti kiekvieno junginio masės spektrą taip jį charakterizuojant. Tačiau norint atlikti terpenų analizę, jis vis dar gali būti ne pats geriausias detektorius. To priežastis yra terpenų klasės molekulėms būdingi struktūriniai ir funkciniai panašumai, net jų fragmentacija ir nuoseklus identifikavimas MS gali sukelti nenusėjamus rezultatus ir turėtų būti paremti kitais chromatografijos identifikavimo metodais. Nepaisant galimo sudėtingo rezultatų interpretavimo, MS yra laikoma geresnė kokybinės analizės priemonė nei FID, ypač išskirinant ne izobarinius terpenus [34]. Taip pat jis pagerina metodo atrankumą ir jautrį [35].

1.7 Terpenų antioksidacinis aktyvumas ir jo nustatymo metodai

Augalų lakiosios medžiagos sudaro įvairių metabolitų grupę, kuri pasižymi įvairiomis biologinėmis savybėmis. Deja, šiandieną ši grupė nėra pilnai išnaudojama kaip potencialių vaistinių medžiagų šaltinis. Yra įrodyta, kad lakieji junginiai, įskaitant terpenus, atlieka įvairias biologines funkcijas: antioksidacines, antimikrobines, citotoksiškumo, tam tikrų fermentų slopinimo ir kitas. Natūralūs antioksidantai yra objektas daugelio mokslinių tyrimų, kuriais siekiama nustatyti saugius ir efektyvius laisvųjų radikalų neutralizatorius, kurie gali būti naudojami kaip maisto ir kosmetikos priedai ar netgi nauji vaistiniai preparatai. Laisvieji radikalai, kurių susidaro perteklius, gali atakuoti beveik visas biologines molekules, įskaitant RNR, DNR, fermentus ir nesočiuosius ląstelių membranų lipidus. Organizmas sukūrė įvairias apsaugines sistemas, neutralizuojančias oksidaciją ir žalingą oksidacinio streso poveikį. Nepaisant to, daugeliu atvejų ši apsauga yra nepakankama, todėl reikalinga papildoma išorinė apsauga. Gyvosiose sistemose laisvųjų radikalų neutralizatoriai gali atlikti potencialų vaidmenį užkertant kelią neurodegeneracinėms ligoms, vėžiui, DNR mutacijoms ar priešlaikiniam senėjimui. Todėl stengiamasi nustatyti naujus natūralius antioksidantus, kurie daugeliu atvejų taip pat atskleidžia kitas reikšmingas funkcijas, tokias kaip priešgrybelinis, antimikrobinis, fermentų slopinamasis ar priešuždegiminis poveikis. Daugybėje mokslinių šaltinių rašoma, kad eteriniai aliejai gali būti natūralių antioksidantų šaltinis. Remiantis turimais duomenimis, galima teigti, kad eteriniai aliejai pasižymi pakankamu laisvųjų radikalų neutralizavimo aktyvumu, kad juos būtų galima laikyti potencialiais maisto priedu ar vaistų šaltiniais [36].

Šiuo metu augalinių ekstraktų antioksidaciniam aktyvumui įvertinti yra naudojami keli tyrimai. Nepaisant neseniai atliktų daugybės antioksidacinio aktyvumo matavimo apžvalgų bei sistemingai

pateiktos šių metodikų literatūros, išlieka klausimas kaip tinkamai pasirinkti metodą savo analizei, nes nė vienas iš sukurtų metodų nėra pripažįstamas universaliu. Tačiau visgi atlikti tyrimai rodo, kad vienas dažniausiai pasirenkamų metodų yra 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonrūgštis) (ABTS) radikalų – katijonų surišimo metodas. Remiantis Igor R. Ilyasov 2020 metų straipsnio ir 2018 metų surinktais citavimo duomenimis, ABTS metodas yra tarp trijų populiariausių metodų kartu su fotometriniu laisvojo radikalo 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilo (DPPH) sujungimo metodu ir geležies antioksidacinės gebos (FRAP) nustatymo metodu (13 pav.)



13 pav. Labiausiai naudojamų antioksidacinio aktyvumo metodų pagrindinių publikacijų citavimo rodikliai. Duomenys yra iš „Scopus“ duomenų bazės¹¹

Visi trys metodai yra labiausiai pripažįstami ir praktikuojami mokslinių tyrimų laboratorijose visame pasaulyje [37].

ABTS radikalų – katijonų surišimo metodas pagrįstas ABTS•+ reagento žalios spalvos pasikeitimu dėl antioksidaciniu aktyvumu pasižyminčių junginių sudėties. Absorbcijos pokyčiai matuojami esant 734 nm bangos ilgiui. Terpenų antioksidacinis aktyvumas išreiškiamas inaktyvuoto ABTS•+ kiekio procentais. Mokslinėje literatūroje pateikiama, kad dažniausiai šiame metode naudojami tirpikliai yra metanolis ir etanolis.

DPPH yra stabilus violetinės spalvos laisvasis radikalas, kurio absorbcijos pokyčiai stebimi ties 515 nm. Jei laisvuosius radikalus neutralizuoja antiradikalinis junginys, DPPH spalva pasikeičia į geltoną spalvą arba net tampa bespalviu ir jo absorbcija sumažėja. DPPH tyrimo naudojimas suteikia lengvą ir greitą būdą įvertinti antioksidantus taikant specialią tropotometriją, todėl gali būti naudinga įvertinti įvairius produktus vienu metu [38]. DPPH dažniausiai taikomi parametrai: tirpikliai –

¹¹ Ilyasov, I. R., Beloborodov, V. L., Selivanova, I. A., & Terekhov, R. P. (2020). ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>.

metanolis ir etanolis, laikas – 20 arba 30 min, matuojama – 517, 515 nm bangos ilgyje, naudojami standartai: askorbo rūgštis, troloksas ir α -tokoferolis [39].

Svarbu atkreipti dėmesį į terpenų, antioksidacinį aktyvumą, naudojant DPPH• metodą. K. A. Wojtunik-Kulesza ir bendra autorių pateikti rezultatai rodo didelį terpenų su konjuguotais dvigubais ryšiais antioksidacinį aktyvumą. Gautų terpenų rezultatų palyginimas su DPPH• radikalų ir ABTS•+ laisvųjų radikalų katijonais vienodoje koncentracijoje (1 mM) parodė panašų tiriamų medžiagų antioksidacinį aktyvumą abiem metodais. Tik keliais atvejais buvo pastebėtas nedidelis neatitikimas, nes ABTS•+ atveju rodė didesnę laisvųjų radikalų neutralizavimo gebėjimą nei DPPH• metodu. Tokie skirtingi rezultatai gauti naudojant ABTS•+ ir DPPH• metodus gali būti paaiškinami tuo, kad skirtingi radikalai ir įvairi reakcijos aplinka gali lemti nevienodą natūralių metabolitų elgesį. Tai yra terpeno antioksidacinio aktyvumo pokyčiai gali atsirasti dėl DPPH• ir ABTS•+ struktūrų skirtumų, kurie yra katijoninio pobūdžio. Šiam klausimui reikalingi papildomi, pažangesni tyrimai, skirti paaiškinti pastebėtus gautų išvadų skirtumus [36]. Taip pat literatūroje yra pateikiama daugiau pavyzdžių kaip bendras pluoštinės kanapės ekstrakto AOA su ABTS yra aukštesnis negu su DPPH ar FRAP radikalų surišimo metodais [40].

1.8 Kitų *C. sativa* L. junginių antioksidacinis aktyvumas ir sinerginis efektas

Vaistinių augalų ir jų produktų bioaktyvi nauda siejama su antioksidacinių savybių turinčių fitocheminių junginių, tokių kaip fenoliai ir alkaloidai, buvimu. Šios augalinės kilmės natūralios fitocheminės medžiagos sugeba kontroliuoti oksidacinį stresą, atsirandantį dėl pernelyg didelės laisvųjų radikalų gamybos. Antioksidacinis polifenolių poveikis pasireiškia skirtingais mechanizmais. Jie sugeba redukuoti radikalų junginius ar jonus, neutralizuoti laisvuosius radikalus ir chelato metalo jonus. Augalinių fenolinių junginių kiekis įvairiose augalų rūšyse skiriasi atsižvelgiant į aplinkos sąlygas ir tų pačių augalų skirtingus tirpiklių ekstraktus. Įrodyta, kad vaistiniai augalai, pasižymintys geru antioksidaciniu poveikiu *in vitro*, yra geri natūralių antioksidantų šaltiniai. *Cannabis sativa* L. yra populiarus komercinio ir medicininio naudojimo augalas visame pasaulyje. Šiame augale yra virš 86 kanabinoidų, iš kurių antioksidaciniu aktyvumu labiausiai pasižymi tetrahidrokanabinolis ir kanabidiolis [41]. Literatūroje minima, kad CBD veikia redokso pusiausvyrą, modifikuodamas tiek oksidantų, tiek antioksidantų lygį ir aktyvumą. CBD, kaip ir kiti antioksidantai, nutraukia laisvųjų radikalų grandinės reakcijas, gaudydamas laisvuosius radikalus arba paversdamas juos mažiau aktyviomis formomis, taip pat jis pasižymi didesniu antioksidaciniu poveikiu nei tokie antioksidantai, kaip α -tokoferolis ar vitaminas C [42-44]. Taip pat buvo įrodyta, kad dėl polifenolinio CBD pobūdžio

jis tampa galingu antioksidantu [45]. Tačiau literatūroje ir buvo tokių pavyzdžių, kuriuose teigiama, jog pats CBD nepasižymi antioksidaciniu aktyvumu, minima, kad CBD neapsaugo riebalų rūgščių nuo oksidacijos, todėl galimybę, kad CBD tiesiogiai dalyvauja antioksidaciniuose mechanizmuose C. Cantele ir kiti jos kolegos (2020) atmeta. Jie mini, kad yra tikimybė, jog CBD padidina būtent terpenų ir (arba) polifenolių antioksidacinį aktyvumą dėl sinerginio efekto, nes pranešta apie kanapių ekstraktų antioksidacinio aktyvumo sustiprėjimą, kai kartu su kanabinoidais buvo didelis polifenolių kiekis [46].

Be to, pluoštinės kanapės yra turtingas daugelio kitų veikliųjų medžiagų šaltinis. Didelė junginių grupė yra anksčiau minėti terpenai, kurie yra atsakingi už būdingą kanapių kvapą. Be to, dar viename literatūros šaltinyje minima, kad kanapių terpeno komponentai gali turėti sinerginių savybių su fitokanabinoidais ir sustiprinti jų sveikata stiprinantį poveikį. Na o polifenoliniai junginiai, tarp kurių yra flavonoidų (flavonų ir flavonolių), stilbenai ir lignanai, iš esmės ir yra atsakingi už augalinės medžiagos antioksidacinį aktyvumą [45].

2. TYRIMO METODIKA

2.1 Tyrimo objektas

Tyrimo metu buvo analizuojamos pluoštinės kanapės (*Cannabis sativa* L.) įvairių augalinių dalių mišiniai, kurie buvo surinkti iš Šiaulių rajono ūkininko trijų skirtingų pasėlių laukų. Augalinė žaliava (biomasa) buvo gauta jau išdžiovinta, prieš tyrimus susmulkinta elektriniu malūnėliu ir laikoma maišeliuose, kambario temperatūroje. Prieš atliekant ekstrakciją buvo ištirta pluoštinės kanapės žaliavų drėgmė (%) (4 lentelė).

4 lentelė.

Tyrimo objektai ir jų drėgmė

Bandinio vidinis žymuo	Rajonas	Pasėlių laukas	Veislė	Dregmė (%)
B_1	Šiaulių	Baltoji I	Futura 75	3,5
B_2	Šiaulių	Beržynė II	Futura 75	8,6
N_1	Šiaulių	Nuklonas I	Futura 75	8,4

2.2 Aparatūra, įrenginiai ir sąnaudinės medžiagos

Tiriamąjį darbą buvo naudotos šios matavimo priemonės ir įrenginiai:

- 1) Perkin Elmer Autosystem XL dujų chromatografinė sistema su Perkin Elmer TurboMass Upgrade masių spektrometru (*Perkin Elmer, JAV*);
- 2) Agilent DB-5MS 30m x 0,250 mm, 0,25 μm kolonėlė (*Agilent Techn., JAV*);
- 3) Drėgmės analizatorius KERN DBS (*KERN, Vokietija*);
- 4) Mėginių homogenizavimo malūnas;
- 5) Agilent Series 1100 skysčių chromatografinė sistema (*Agilent Techn., JAV*);
- 6) Agilent PoroShell 120 EC-C18 5cm, 2,7 μm kolonėlė (*Agilent Techn., JAV*);
- 7) Analitinės svarstyklės Kern Sohn 770-60, Nr. 18302850, svėrimo ribos 0,00001 g - 210 g, (*KERN, Vokietija*);
- 8) Automatinės pipetės 1) 500 – 5000 μl, 2) 100 – 1000 μl, 3) 50 – 200 μl, 4) 2 – 20 μl su vienkartiniais antgaliais (*Eppendorf, Vokietija*);
- 9) Chromatografiniai buteliukai (2 ml);

- 10) Švirkštiniai filtrai;
- 11) Plastikiniai švirkštai (5ml);
- 12) 50 ml plastikiniai užsukami buteliukai;
- 13) Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometras Lambda 25 (*Perkin Elmer, JAV*);
- 14) Analitinės svarstyklės GR -200 – EC (*A&D instruments LTD, Japonija*).

2.3 Medžiagos ir tirpikliai

Tiriamąjį darbą metu buvo naudotos šios etaloninės medžiagos ir tirpikliai:

- 1) n-Heksanas, $\geq 97\%$ (*Honeywell, Vokietija*);
- 2) Metanolis (MeOH), $\geq 99,9\%$ (*Sigma-Aldrich, Prancūzija*);
- 3) Metanolis, $\geq 99,9\%$ (*Honeywell, Vokietija*);
- 4) Etilacetatas, $\geq 99,9\%$ (*Carl Roth, Vokietija*);
- 5) Acetonas, $\geq 99,8\%$ (*Sigma-Aldrich, Izraelis*);
- 6) Acetonitrilas, $\geq 100\%$ (*VWR BDH Prolabo Chemicals, Prancūzija*);
- 7) (\pm)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchromano-2-karboksilinė rūgštis (Trolox), 97% grynumo, (*Sigma-Aldrich, Rusija*);
- 8) 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazilas (DPPH), (*Sigma-Aldrich, Vokietija*);
- 9) 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfono rūgštis) (ABTS) ($\geq 98\%$, *Sigma-Aldrich, Vokietija*);
- 10) Kanabidiolis (CBD), koncentracija $1000\ \mu\text{g/mL}$ metanolyje (*Dr. Ehrenstorfer, JAV*);
- 11) Kanabidiolio rūgštis (CBDA), koncentracija $1000\ \mu\text{g/mL}$ acetonitrile (*Dr. Ehrenstorfer, JAV*);
- 12) β -Kariofilenas, $\geq 80\%$ (*Sigma-Aldrich, JAV*);
- 13) (+)- α -Pinenas, $\geq 99\%$ (*Sigma-Aldrich, JAV*).

2.4 Etaloninių tirpalų, eliuentų ir ekstraktų paruošimo procedūros

Pradinis etaloninis kariofileno tirpalas buvo ruošiamas atsveriant tiksliai etaloninės medžiagos masę ir tirpinant ją gryname n-heksane. Pasigaminto tirpalo tiksli perskaičiuota koncentracija buvo: 2841 ppm.

Ekperimentuose tirti ekstraktai buvo gaminami iš pluoštinės kanapės įvairių augalinių dalių mišinių, kurie buvo gauti iš Šiaulių rajono ūkininko. Šie ekstraktai buvo ruošiami:

Pluoštinės kanapės žaliavos ekstraktas tyrimams ruoštas atsveriant $1,00 \pm 0,03$ g kanapės žaliavos ir užpilant $10,00 \pm 0,30$ ml ekstrahuojančio tirpiklio, ekstrakcija buvo tirta esant skirtingai tirpiklių sudėčiai, tūriui, temperatūrai bei ekstrakcijos trukmei.

Ekstrakcijos buvo atliekamos vienkartinuose 50 ml talpos plastikiniuose mėgintuvėliuose ultragarsinėje vonelėje. Po ekstrakcijos mišiniai buvo nufiltruoti per vienkartinius $0,45 \mu\text{m}$ PTFE filtrus, ir analizuojami GC-MS sistema.

Kalibravimo grafikas sudarytas iš kariofileno standarto 6-ių taškų, gautų pagaminus seriją tirpalų, skiedžiant pradinį etaloninį tirpalą koncentracijų intervale nuo 33 iki 750 ppm, vidinis standartas (IS) buvo (+)- α -pinenas (266 ppm).

2.5 Dujų chromatografijos - masių spektrometrijos metodo sąlygos

Terpenų identifikavimas ir kiekybinė analizė buvo atliekama naudojant *Perkin Elmer Austosystem XL* dujų chromatografinę sistemą su *Perkin Elmer TurboMass Upgrade* masių spektrometru - kolonėlė – *Agilent DB-5MS* 30 m x 0,250 mm, 0,25 μm . Kaip dujos nešėjos buvo naudojamas helis.

Analizės sąlygos: injektoriaus temperatūra 300 °C, kolonėlės temperatūra 60 °C, injekuojamojo bandinio kiekis – 2 μl . Temperatūra dujų chromatografe programuojant buvo keliama palaipsniui: nuo 60 °C (1 min) iki 300 °C, 10 °C/min greičiu. Bendras analizės laikas 30 min. Masių spektrometrijos detektoriaus sąlygos pateiktos 5 lentelėje:

5 lentelė.

Masių spektrometrijos detektoriaus sąlygos

Jonizacijos šaltinio temperatūra (°C)	Pernašos linijos temperatūra (°C)	Analizės laikas (min)	Skenavimo greitis (s)	Pradžia (m/z)	Pabaiga (m/z)
300	300	30	0,1	50	350

Gautų bandinių chromatogramos buvo analizuojamos MassLynx programa. Identifikuojant pluoštinės kanapės ekstrakto chromatogramose rastus junginius, chromatogramų smailių duomenys buvo lyginami su junginių masių spektrų bibliotekos NIST 2008 duomenimis.

2.6 Efektyviosios skysčių chromatografijos metodo sąlygos

Analizei atlikti naudojama *Agilent 1100* skysčių chromatografinė sistema su diodų matricos detektoriumi. Naudota chromatografinė *Agilent PoroShell 120 EC-C18* 5 cm, 2,7 μm kolonėlė. Eksperimento metu naudojamas mobilios fazės gradientas:

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 %

Kolonėlės temperatūra – 50 °C, mobilios fazės greitis – 1ml/min, injekcijos tūris – 5 μl, detekcija – 228 nm.

Kanabidiolis ir kanabidiolio rūgštis kiekybiškai įvertintos kalibracinio grafiko metodu ir kokybiškai nustatytas pagal sulaikymo laiką kolonėlėje bei spektrinius duomenis, gautos tiesinės regresijos lygtys:

$$\text{CBD} - y = 5,009 + 8,729 (R^2 = 0,9999);$$

$$\text{CBDA} - y = 10,241 + 11,760 (R^2 = 0,9999).$$

Šis metodas buvo sukurtas ir optimizuotas laboratorijoje.

2.7 *Cannabis sativa* L. žaliavų ekstraktų antioksidacinio aktyvumo tyrimai

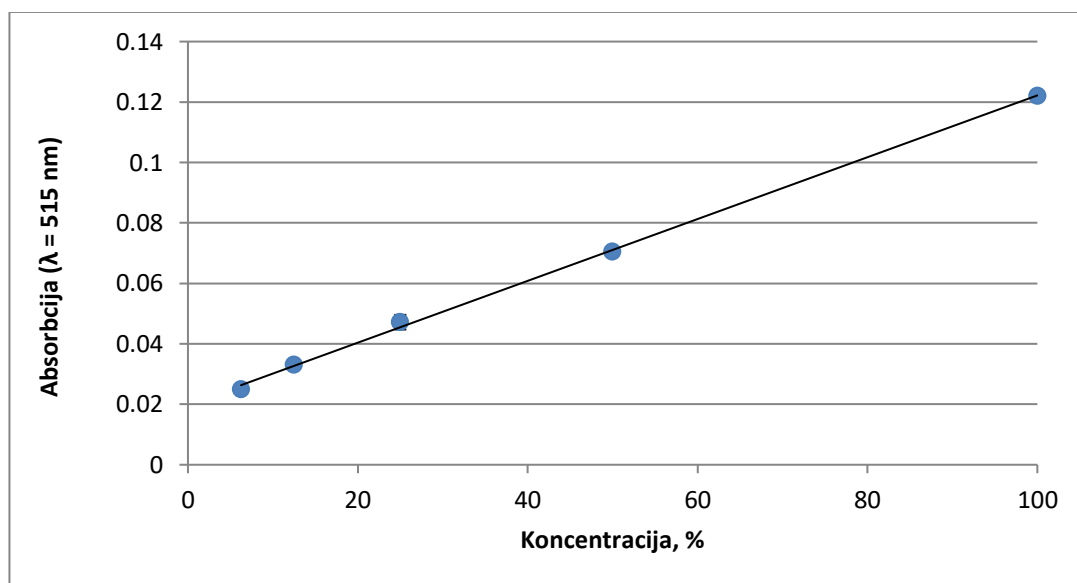
2.7.1 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas DPPH metodu

DPPH• radikalo paruošimui buvo atsverta 0,0235 g DPPH reagento, tirpinama ir skiedžiama iki 100 ml 100 % MeOH. Kolbutė izoliuojama nuo šviesos ir 30 min laikoma ultragarsinėje vonelėje. Darbinis DPPH• tirpalas paruošiamas, skiedžiant pirminį DPPH• tirpalą 100 % MeOH. Darbinio tirpalo absorbcija išmatuojama spektrofotometru prie 515 nm turi būti lygi $0,73 \pm 0,02$ santykinų absorbcijos vienetų. Tiriamasis tirpalas ruošiamas į kiuvetę pilant 100 μl mėginio ir 3,9 ml šviežiai paruošto DPPH• darbinio tirpalo, mišinys iki matavimų paliekamas stovėti 30 min tamsoje. Absorbcija matuojama 515 nm bangos ilgyje. AOA nustatomas pagal trolokso kalibracinės tiesės lygtį, koncentracijų 6,25–100 % intervale (14 pav.). Matavimai buvo kartojami tris kartus.

Trolokso kalibracinė tiesė nustatoma tokia seka: paruošiamas pirminis trolokso etaloninis tirpalas – ištirpiname 5 mg Trolokso reagento 100 ml MeOH/H₂O (70/30, % v/v) mišinyje. Skiedimo

būdu pagaminame penkis kalibracinius tirpalus (100, 50, 25, 12,5, 6,25 % trolokso). Į matavimo kiuvetes įnešama 100 µl kiekvieno kalibracinio tirpalo, pridedama 3,9 ml darbinio DPPH• tirpalo. Absorbcija matuojama kiekvienam kalibracinės tiesės taškui 515 nm bangos ilgiuje su spektrofotometru. Remiantis matavimais, gaunama kalibracinė tiesė, kuri naudojama tolimesniuose AOA skaičiavimuose. Visi mėginiai matuojami po tris kartus, palyginamasis tirpalas 70% (V/V) metanolis, o tuščias bandinys ruošiamas į kiuvetę pilant 4 ml darbinio DPPH• tirpalo.

AOA yra išreiškiamas standartinio antioksidanto trolokso procentine dalimi, remiantis trolokso kalibracinio grafiko tiesinės regresijos lygtimi: $y = 0,001x + 0,0199$, ($a = 0,001$, $b = 0,0184$), nustatyta gera koreliacija – $R^2 = 0,9991$ (14 pav.).



14 pav. Trolokso kalibracinė tiesė DPPH• radikalų surišimo metodui (n=3)

Tiriamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį pilant 100 µl mėginio, 3,9 ml šviežiai paruošto DPPH• etaloninio tirpalo. Sumaišoma ir laikoma tamsioje vietoje 30 min. Tiriamųjų tirpalų absorbcijos dydis matuojamas spektrofotometriniu metodu esant 515 nm bangos ilgiui.

Antioksidacinis pluoštinės kanapės ekstraktų aktyvumas skaičiuojamas pagal formulę ir išreiškiamas inaktyvuoto DPPH procentais:

$$TE_{(DPPH)} = \frac{\text{Mėginio absorbcija} \pm b}{a}, (\%) \quad (1)$$

čia: $TE_{(DPPH)}$ – AOA išreikštas procentine trolokso dalimi, %

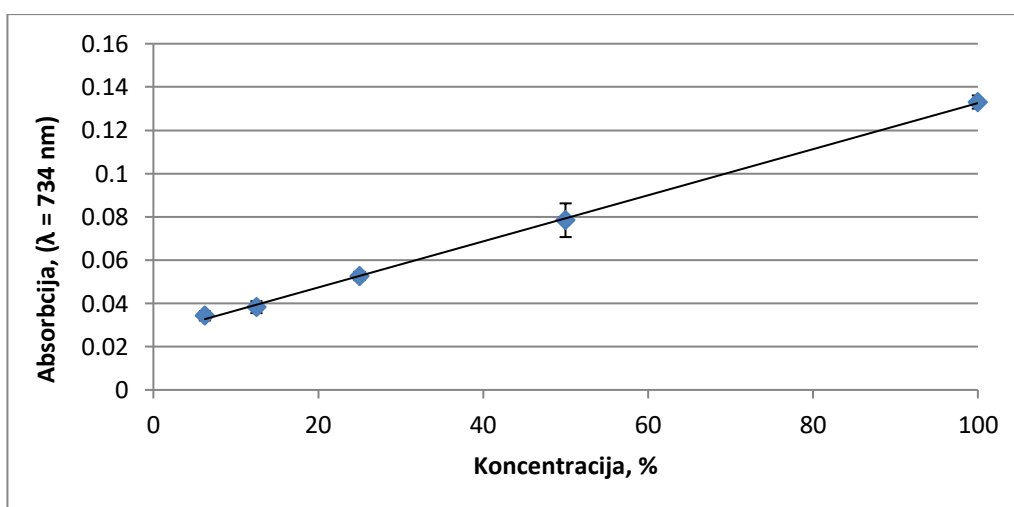
a ir b yra iš trolokso kalibracinės tiesinės lygties ($y = ax + b$).

2.7.2 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas ABTS metodu

Paruošiamas ABTS•+ reagentas: analitinėmis svarstyklėmis atsveriami 0,0676 g $K_2S_2O_8$ ir 0,3602 g ABTS reagento ir ištirpinama kolboje 100 ml metanoliu (100 %). Gautas ABTS•+ tirpalas laikomas tamsoje apie 24 valandas. Darbinis ABTS•+ tirpalas paruošiamas, skiedžiant pirminį ABTS•+ tirpalą 100 % MeOH. Darbinio tirpalo absorbcija išmatuojama spektrofotometru prie 734 nm turi būti lygi $0,73 \pm 0,02$ santykinų absorbcijos vienetų. Tiriamasis tirpalas ruošiamas į kiuvetę pilant 100 μ l mėginio ir 3,9 ml ABTS•+ darbinio tirpalo, mišinys iki matavimų paliekamas stovėti 15 min tamsoje. Absorbcija matuojama 734 nm bangos ilgyje. AOA nustatomas pagal Trolokso kalibracinės tiesės lygtį, koncentracijų 6,25–100 % intervale (2 pav.). Matavimai buvo kartojami tris kartus.

Trolokso kalibracinė tiesė nustatoma tokia seka: paruošiamas pirminis trolokso etaloninis tirpalas – ištirpiname 5 mg trolokso reagento 100 ml MeOH/H₂O (70/30, % v/v) mišinyje. Skiedimo būdu pagaminame penkis kalibracinius tirpalus (100, 50, 25, 12,5, 6,25 % trolokso). Į matavimo kiuvetes įnešama 100 μ l kiekvieno kalibracinio tirpalo, pridedama 3,9 ml darbinio ABTS•+ tirpalo. Absorbcija matuojama kiekvienam kalibracinės tiesės taškui 734 nm bangos ilgyje su spektrofotometru. Remiantis matavimais, gaunama kalibracinė tiesė, kuri naudojama tolimesniuose AOA skaičiavimuose. Visi mėginiai matuojami po tris kartus, palyginamasis tirpalas 70% (V/V) metanolis, o tuščias bandinys ruošiamas į kiuvetę pilant 4 ml darbinio ABTS•+ tirpalo.

AOA yra išreiškiamas standartinio antioksidanto trolokso procentine dalimi, remiantis trolokso kalibracinio grafiko tiesinės regresijos lygtimi: $y = 0,0011 x + 0,0261$, ($a = 0,0011$, $b = 0.025$), nustatyta gera koreliacija – $R^2 = 0,9993$ (15 pav.).



15 pav. Trolokso kalibracinė tiesė ABTS radikalų-katijonų surišimo metodui (n=3)

Tiriamasis tirpalas ruošiamas į mėgintuvėlį pilant 100 µl mėginio, 3,9 ml ABTS•+ etaloninio tirpalo. Sumaišoma ir laikoma tamsioje vietoje 15 min. Tiriamųjų tirpalų absorbcijos dydis matuojamas spektrofotometriniu metodu esant 734 nm bangos ilgiui.

Antioksidacinis pluoštinės kanapės ekstraktų aktyvumas skaičiuojamas pagal formulę ir išreiškiamas inaktyvuoto ABTS procentais:

$$TE_{(ABTS)} = \frac{\text{Mėginio absorbcija} \pm b}{a}, (\%) \quad (2)$$

čia: $TE_{(ABTS)}$ - AOA išreikštas procentine trolokso dalimi, %

a ir b yra iš trolokso kalibracinės tiesinės lygties ($y = ax + b$).

2.8 Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymas pluoštinėje kanapėje

Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymas augaluose paremtas šviesos sugerties nustatymu esant atitinkamiems bangos ilgiams: chlorofilui a – 662 nm, chlorofilui b – 644 nm, karotenoidams – 441 nm.

Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymui buvo naudojami anksčiau aprašyti pluoštinės kanapės ekstraktai (1,00±0,03 g susmulkintos *Cannabis sativa* L. užpilta 10,00±0,30 ml tirpiklio, 5 min ekstrahuota ultragarso vonelėje ir perfiltruota per švirkštinį filtrą), palyginimui buvo naudojami 100 % metanolio ir n-heksano tirpikliai. Optinis tankis matuotas esant 662 nm bangos ilgiui, jei jis viršijo 0,8 mišinys skiestas ekstrakcijoje naudotu tirpikliu.

Pigmentų koncentracijos (mg/l) apskaičiuotos pagal formules¹²:

$$C_{(\text{chlorofilas a } (\frac{mg}{l}))} = 9,784 \times D_{662} - 0,99 \times D_{644} \quad (3)$$

$$C_{(\text{chlorofilas b } (\frac{mg}{l}))} = 21,426 \times D_{644} - 4,65 \times D_{622} \quad (4)$$

$$C_{(\text{chlorofilas a+chlorofilas b})} = 5,134 \times D_{662} + 20,436 \times D_{644} \quad (5)$$

$$C_{(\text{karotinoidai } (\frac{mg}{l}))} = 4,695 \times D_{441} - C_{(\text{chlorofilas a+chlorofilas b})} \quad (6)$$

¹² Malinauskienė R. (2015). Šarminio jonizuoto vandens įtaka paprastojo lęšio "SMĖLINUKAI" augalų morfofiziologiniams rodikliams II ontogenezėsetape. 1000(5), 1822–1824.

Apskaičiuotas pigmentų kiekis mg/100 g:

$$X = \frac{C \times V \times V_2 \times 100}{n \times V_1 \times 1000} \quad (7)$$

čia: X – pigmentų kiekis, mg/100 g;

C – pigmentų koncentracija, mg/l;

V – pradinis ekstrakto tūris, ml;

V₂ – praskiesto ekstrakto tūris, ml;

n – augalinė masė, g;

V₁ – pradinis ekstrakto tūris, ml, paimtas praskiedimui.

2.9 Statistinis duomenų įvertinimas

Atlikus chromatografinę analizę, remiantis chromatogramose užfiksuotomis smailėmis, jų plotais ir sulaikymo laikais, naudojant MS Excell (Microsoft, JAV) programinę įrangą, sudarytos diagramos, apskaičiuoti nuokrypių dydžiai. Kiekvienas vykdytas eksperimentas pakartotas tris kartus, iš kiekvieno mėginio tyrimų pakartojimų išvestas vidurkis, apskaičiuoti standartiniai nuokrypiai ir procentiniai variacijos koeficientai. Rezultatai pateikti remiantis 95 % statistiniu patikimumu.

3. REZULTATAI IR JŲ APITARIMAS

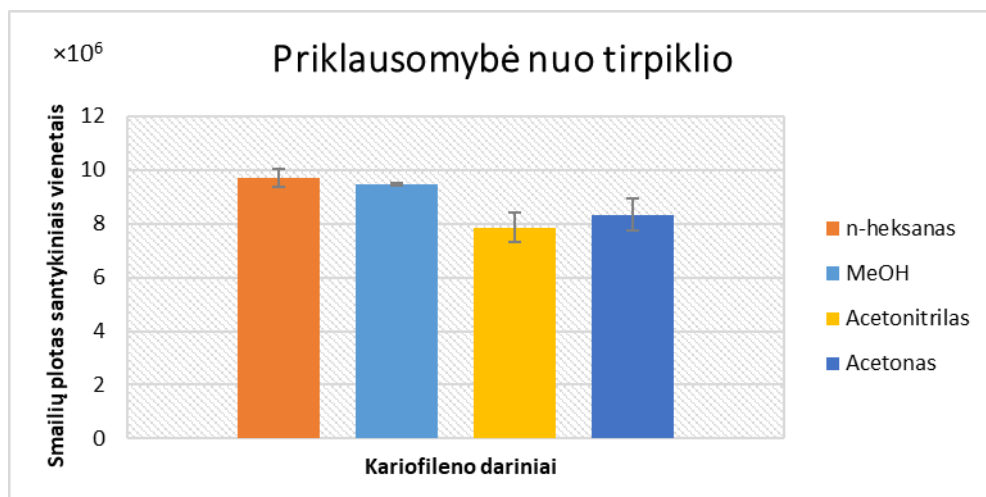
3.1 Terpenų ekstrakcijos iš pluoštinės kanapės tyrimas

Terpenų nustatymas pluoštinėje kanapėje buvo atliktas naudojantis dujų chromatografijos metodu. Remdamiesi apžvelgta literatūra, ekstraktams iš natūralių objektų gauti parinkome keturis tirpiklius: MeOH, n-heksaną, acetoną ir acetonitrilą.

3.1.1 Ekstrakcijos išgavos priklausomybė nuo ekstrahuojančio tirpiklio ir jo tūrio

Kad galėtume gautų ekstraktų chromatogramose identifikuoti terpenų smailes ir patvirtinti šių junginių buvimą, išnagrinėjome skirtingų mėginių chromatogramose aptiktų fragmentų sulaikymo laikus bei palyginome chromatogramų smailių duomenis su junginių masių spektrų biblioteka.

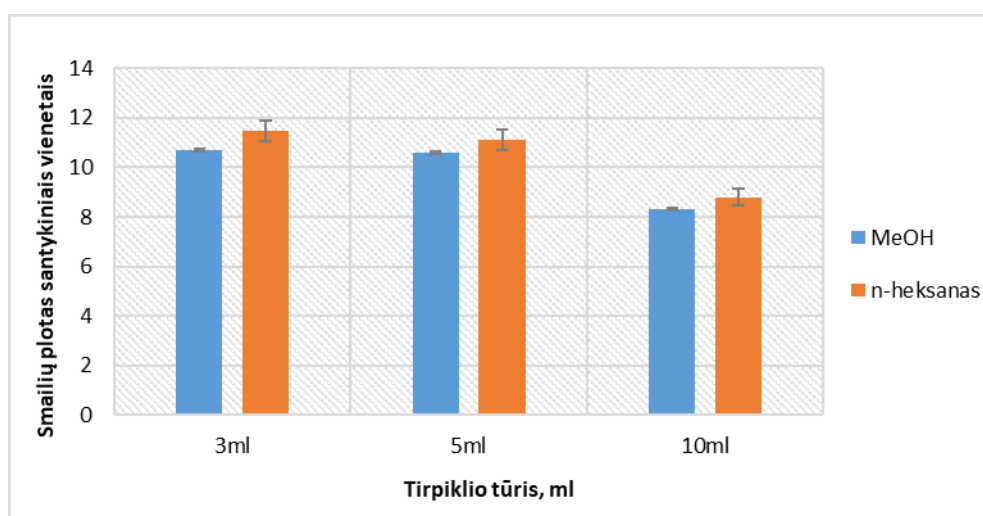
Identifikavę kariofileno darinius: β -kariofileną, α -humuleną bei kariofileno oksidą pluoštinių kanapių ekstraktoje, atlikome tyrimą, kuriuo siekėme nustatyti, kaip šių junginių išgava priklauso nuo ekstrahuojančio tirpiklio prigimties. Ekstrakcija iš pluoštinių kanapių vykdyta 15 min ultragarso vonelėje su tokiais tirpikliais: MeOH, n-heksanas, acetonas ir acetonitrilas, 30 ± 1 °C temperatūroje. Iš junginių smailių plotų, pateiktų 16 paveiksle matyti, kad su n-heksanu buvo gautas didžiausias kariofileno darinių smailių plotas.



16 pav. Kariofileno darinių smailių plotas, gautas pluoštinių kanapių ekstrakciją vykdant skirtingais tirpikliais ($1,00 \pm 0,03$ g sausos pluoštinės kanapės, $10,00 \pm 0,30$ ml ekstrahuojančio tirpiklio, 15 min ekstrakcija, 30 ± 1 °C temperatūra) ($n=3$)

Atlikus chromatogramų analizę, nebuvo pastebėtas žymus skirtumas tarp išgauto terpeninio profilio naudojant polinius ir nepolinius ekstrakcijos tirpiklius. Literatūroje minima, kad nepoliniai tirpikliai (pvz., n-heksanas) geriau išekstrahuoja nepolinius junginius, šiuo atveju seskviterpenus, o poliniai tirpikliai (pvz., metanolis) išekstrahuoja geriau polinius junginius – monoterenus [37]. Tyrimo metu šie rezultatai pasitvirtino, su n-heksanu išsiekstrahavo daugiau seskviterpenų negu su metanolium, tačiau monoterenų tirtame pluoštinės kanapės mėginyje nebuvo aptikta nei su n-heksanu, nei su metanolium.

Taip pat buvo patikrinta ar tirpiklio kiekis turi įtakos ekstrakcijai. Buvo pasirinkti du tirpikliai – metanolis, kuris pasižymi polinėmis savybėmis ir n-heksanas, kuris pasižymi savybe labiau išekstrahuoti nepolines medžiagas, patikrinti 3, 5 ir 10 ml tūriai. Rezultatai pateikti 17 paveiksle.



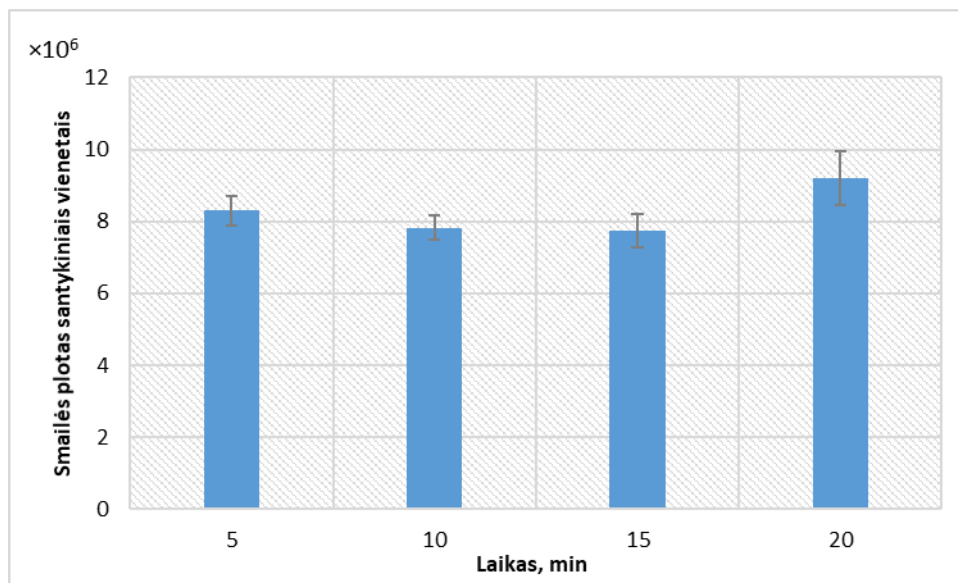
17 pav. Kariofileno darinių smalių plotas, gautas pluoštinių kanapių ekstrakciją vykdant su skirtingais n-heksano ir metanolio tirpiklių tūriais ($1\pm 0,03$ g sausos pluoštinės kanapės, 15 min ekstrakcija, 30 ± 1 °C temperatūra) ($n=3$)

Rezultatai pateikti įvertinus skiedimą. Atsižvelgus į patogumą matuoti ir tai, kad žymaus skirtumo tarp tiriamų tūrių nematoma, tolimesniems matavimams buvo pasirinktas – 10 ml tirpiklio tūris. Taip pat šie rezultatai atitiko literatūroje pateiktą informaciją, kad nepoliniams junginiams labiau tinkamas yra nepolinis tirpiklis ir dažniausiai naudojant ekstrakciją organiniais tirpikliais pasirenkamas būtent – n-heksanas [47].

3.1.2 Ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo temperatūros

Pasirinkus ekstrahuojantį tirpiklį, buvo atliekami temperatūros įtakos tyrimai, kurių tikslas buvo patikrinti, kokioje temperatūroje būtų optimaliausia vykdyti ekstrakciją, norint gauti didžiausią

kariofileno darinių išgavą. Šią įtaką įvertinome ekstrakcijos mišinį inkubuodami 30 ± 1 °C, 40 ± 1 °C, 50 ± 1 °C ir 60 ± 1 °C temperatūrose 15 minučių. Rezultatai pateikti 18 paveiksle.

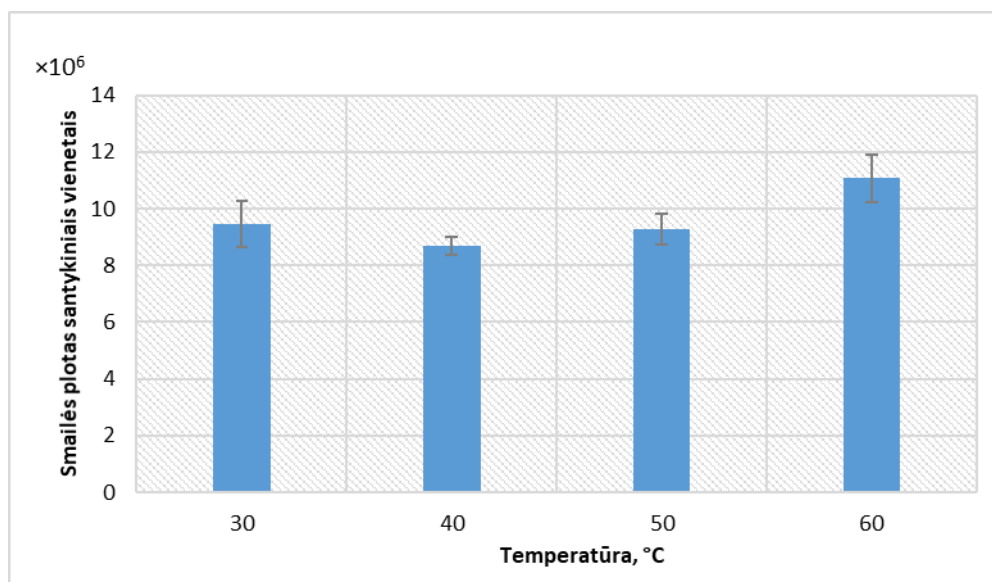


18 pav. Kariofileno darinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos temperatūros ($1\pm 0,03$ g sausų pluoštinių kanapių, $10,00\pm 0,30$ ml n-heksano, 15 min ekstrakcija) ($n=3$)

Iš 18 paveiksle pateiktos stulpelinės diagramos matome, kad kariofileno darinių kiekiai pluoštinių kanapių ekstrakto didėjant temperatūrai, kinta nežymiai, todėl galime rinktis ekstrakciją atlikti 30 °C temperatūroje. Taip pat buvo atlikti papildomi tyrimai, kuriais buvo siekiama patikrinti kodėl gaunami didesni smailių plotai prie 60 °C temperatūros. Atlikus papildomus svėrimo matavimus, buvo pastebėta, jog tirpiklis nugaravo.

3.1.3 Ekstrakcijos efektyvumo priklausomybė nuo ekstrakcijos trukmės

Sekančiame žingsnyje buvo atliktas tyrimas, kuriuo siekėme palyginti 5, 10, 15 ir 20 minučių ekstrakcijų metu gautus kariofileno darinių kiekius. Rezultatai pateikti 19 paveiksle.



19 pav. Kariofileno darinių smailių plotų priklausomybė nuo ekstrakcijos temperatūros (1±0,03 g sausų pluoštinių kanapių, 10,00±0,30 ml n-heksano, 15 min ekstrakcija) (n=3)

Kaip matyti iš 19 paveiksle pateiktos stulpelinės diagramos, išekstrahuojami kariofileno darinių kiekiai taip pat ryškiai nesiskiria. Be to buvo atlikti papildomi tyrimai, kuriais buvo siekiama patikrinti kodėl gaunami didesni smailių plotai ties 20 min laiku. Atlikus svėrimo matavimus, buvo pastebėta, jog tirpiklis nugaravo. Todėl tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas 5-ių minučių trukmės ekstrakcijos laikas.

Toliau visose analizėse naudojamos ekstrakcijos sąlygos pateikiamos 6 lentelėje.

6 lentelė.

Terpenų ekstrakcijos optimizuotos sąlygos

Ekstrakcijos sąlygos	Parametro rezultatas
Tirpiklis	n-heksanas
Tirpiklio tūris, ml	10,00±0,30
Temperatūra, °C	30±1
Laikas, min	5

3.2 Dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodo validavimas

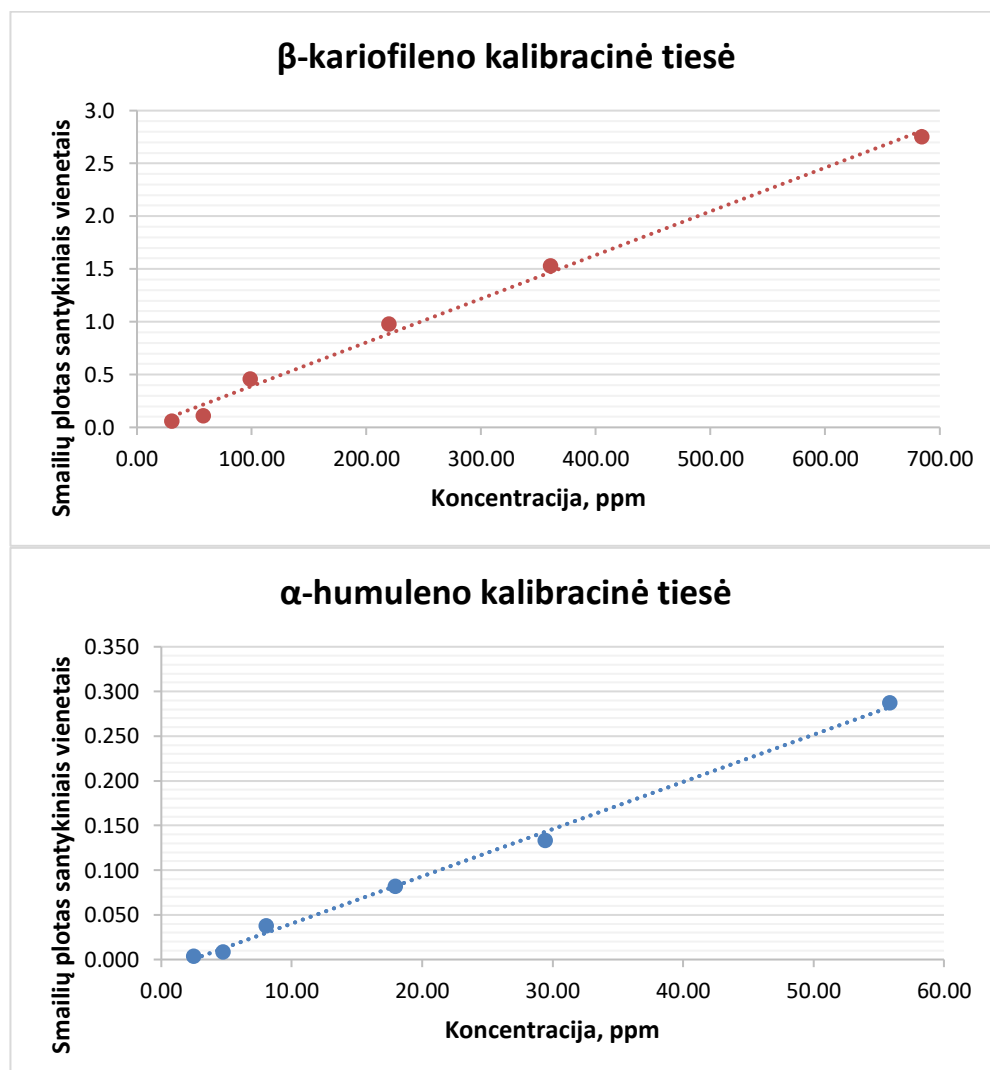
Standartinis β-kariofileno etaloninis tirpalas buvo paruoštas n-heksane. Visų pirma buvo atlikta GC-MS analizė, kad nustatyti kokią procentinę dalį standarto sudaro β-kariofilenas ir galimi kiti jo dariniai. Iš jo buvo daromi nuoseklūs skiedimai, kad būtų paruošti atskiri kalibravimo grafikų taškai.

Vidinio standarto paruošimas: (+)- α -pinenas buvo pasirinktas kaip IS, o jo koncentracija buvo 266 ppm, kuri buvo pridėta prie visų kalibravimo tirpalų.

Iš anksčiau paminėtų standartinio pradinio tirpalo ir IS buvo paruošti šeši kalibravimo taškai, svyruojantys nuo 33 iki 750 ppm. IS koncentracija kiekviename kalibravimo taške buvo 266 ppm. Kalibravimo kreivė pateikiama 20 paveiksle.

3.2.1 Metodo tiesiškumas

Metodo tiesiškumui įvertinti buvo paruošti kariofileno standarto mėginiai su šiomis žinomomis koncentracijomis: β -kariofileno koncentracijos buvo pasiskirsčiusios 31,0 – 684,0 ppm intervale, o α -humuleno: 2,5-56,0 ppm intervale, iš gautų rezultatų buvo sudarytos kalibracinės tiesės. X ašyje buvo atidėta analizės koncentracija C (ppm), o Y ašyje atidėtas standarto ir IS smailės plotų santykis. Gautos kalibracinės tiesės pateiktos 20 pav., kalibracinių tiesių parametrai apibendrinti 9 lentelėje.



20 pav. β -kariofileno ir α -humuleno kalibracinės tiesės (n=3)

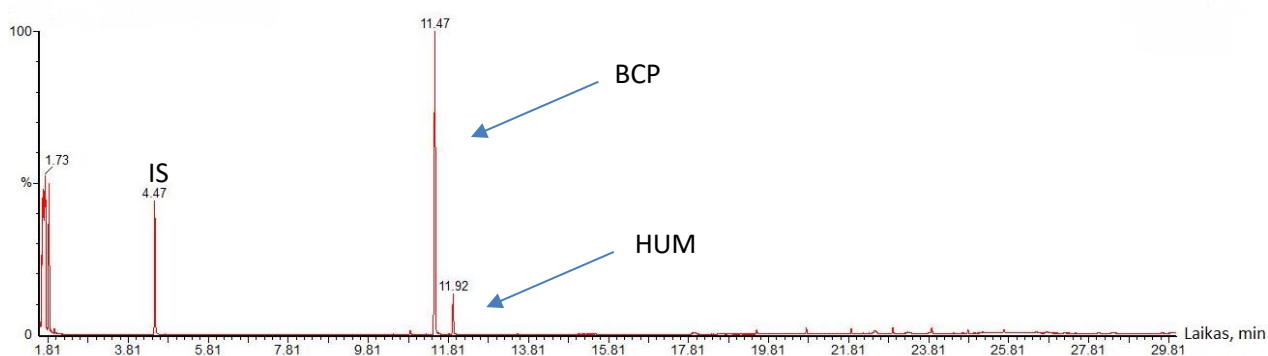
β -kariofileno ir α -humuleno koreliacijos koeficientai ir tiesinės regresijos lygtys

Junginiai	Koreliacijos koeficientas (R^2)	Tiesinės regresijos lygtis
Reikalavimas	> 0,9500	-
β -kariofilenas	0,9936	$y = 0,0041x - 0,0228$
α -humulenas	0,9965	$y = 0,0053x - 0,0126$

Koreliacijos koeficientai yra artimi vienetui, kas atitinka keliamus reikalavimus ($R^2 > 0,95$) ir rodo stiprią koreliaciją tarp kintamųjų. Todėl galima teigti, kad dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu galima tiksliai nustatyti β -kariofileno ir α -humuleno koncentracijas pluoštinėse kanapėse. Taip pat buvo pasitelktas Tanimoto cheminių struktūrų panašumo įvertis, kad pasirinkti pagal kurio junginio tiesinės regresijos lygtį vertinti pluoštinėse kanapėse aptikto kariofileno oksido koncentraciją. Ivertinus struktūrų panašumus: BCP ir BCPO panašumas - 72,4 % bei HUM ir BCPO – 62,1 %, buvo pasirinkta vertinti kariofileno oksido koncentraciją pagal β -kariofileno tiesinės regresijos lygtį.

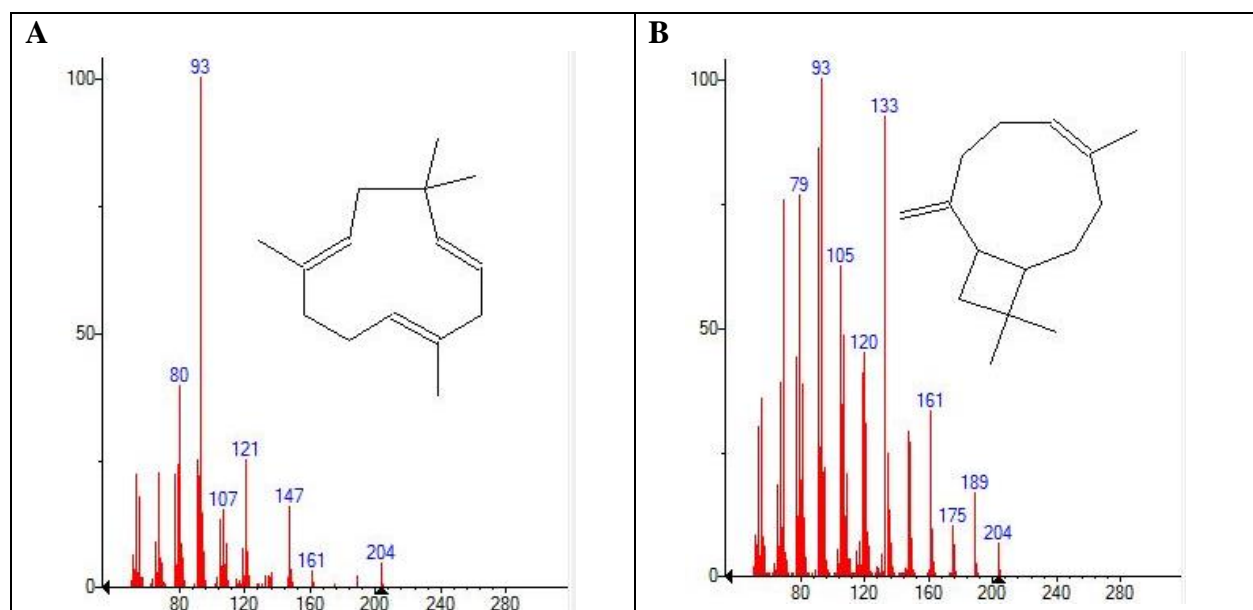
3.2.2 Metodo selektyvumas

Analizė atlikta su kariofileno standarto 750 ppm koncentracijos kontroliniu mėginiu, pilna standarto jonų chromatograma (TIC) pateikta 21 pav.



21 pav. β -kariofileno ir α -humuleno bei vidinio standarto (+)- α -pineno chromatograma

Pateiktoje chromatogramoje tiriamieji junginiai vienas nuo kito atsiskiria (β -kariofileno sulaikymo laikas – 11,47 min, α -humuleno sulaikymo laikas – 11,92 min). Taip pat buvo įvertinti tiriamųjų junginių masių spektrai (žr. pav. 22.)



22 pav. α -humuleno (A) ir β -kariofileno (B) - masės spektrų palyginimas

Seskviterpeno struktūrą sudaro trys izopreno vienetai, dėl kurių susidaro m/z 204 molekulinė masė iš monoterpenų (t. y. $136 + 58 = 204$ masės vienetai). 22 paveiksle parodyti dviejų svarbių pluoštinės kanapės seskviterpenų, tai yra izomerų HUM (A) ir BCP (B), masės spektrai.

Peržvelgus 22 paveiksle pateiktus spektrus, matyti, kad jie yra gana skirtingi. Humulenas (A) turi gana paprastą masės spektrą, kurio pagrindinis smailės jonas yra m/z 93, ir tai dažnas fragmento jonas, matomas visuose monoterpenuose. Unikalus humuleno fragmentas yra m/z 80 jonas, kurio intensyvumas yra maždaug 40 % bazinio smailės jono. Moksliniuose šaltiniuose yra minima, kad šis fragmentas – m/z 80 yra laikomas diagnostiniu humuleno struktūrai, todėl toliau buvo naudojamas identifikuojant HUM pluoštinės kanapės ekstraktuose.

BCP masės spektras parodytas 22 B paveiksle, jo molekulinis jonas – m/z 204, yra maždaug tokio pat intensyvumo kaip jo izomero – humuleno, tai svarbus jonas abiem šiems seskviterpeno izomerams identifiukuoti. Bazinis smailės jonas yra m/z 93, tačiau BCP taip pat turi didelį 95% intensyvumo joną – m/z 133. Šis jonas susidaro praradus izopreno radikalą, kurio masė 71 masės vienetas. Tai taip pat yra unikalus fragmentas, diagnozuojantis BCP, ir kuris toliau buvo naudojamas identifiukuoti BCP [48].

NIST bibliotekos bei mokslinės literatūros pagalba buvo nustatyti jonų masių ir krūvių santykiai, kurie padeda dar tiksliau identifiukuoti α -humulena ir β -kariofilena. Apibendrinant, dujų chromatografijos-masių spektrometrijos (GC-MS) metodas yra selektyvus.

3.2.3 Metodo glaudumas

Pagal LR sveikatos apsaugos ministerijos įsakyme Nr. V-735 apibrėžtą sąvoką, „Glaudumas - nepriklausomų tyrimų rezultatų, gautų pagal iš anksto nustatytas sąlygas, panašumas. Glaudumas paprastai apskaičiuojamas kaip standartinis nuokrypis, įskaitant pakartojamumą ir atkuriamumą, ir parodantis kelis kartus nurodytomis sąlygomis vykdytų nepriklausomų tyrimų rezultatų artumą.“ Jis nustatomas naudojant tuos pačius tiriamuosius mėginius ir atliekant ne mažiau kaip 6 matavimus. Glaudumas gali būti vertinamas rezultatų pakartojamumu (patikrinant tiek prietaiso kintamumo procentą matavimų metu (6 ir daugiau vieno mėginio pakartojimai), tiek operatoriaus darbo tikslumą (atliekant 6 ir daugiau vienos koncentracijos mėginių pakartojimus)). Glaudumas nustatomas skaičiuojant santykinį standartinį nuokrypį RSD % (standartinio nuokrypio ir vidurkio reikšmės santykis), kitaip dar vadinamu variacijos koeficientu.

Pakartojamumo vertinimui atliekami matavimai, esant toms pačioms matavimo sąlygoms, per trumpą laiko tarpą. Todėl pakartojamumo įvertinimui buvo atlikta analizė su 53,64 ppm standarto koncentracijos 1 kontroliniu mėginiu, atliekant 6 pakartojimus. Tinkamumo kriterijus yra glaudumas, kuris neturėtų viršyti 4,5 %. Atkuriamumo tyrimas buvo atliktas su 6 pluoštinės kanapės kontroliniais mėginiais, kurie buvo paruošti pagal optimalias ekstrakcijos sąlygas. Taip pat buvo įvertintas atkuriamumas, pasirinkus 6-ių dienų skirtumą tarp matavimų (analizei naudoti *Cannabis sativa* L. ekstraktai, paruošti optimaliomis ekstrakcijos sąlygomis). Šių parametų tinkamumo kriterijumi buvo pasirinktas variacijos koeficientas, kuris neturėtų viršyti 15 %. Rezultatai pateikti 8 lentelėje.

8 lentelė.

β -kariofileno, α -humuleno ir kariofileno oksido pakartojamumo ir atkuriamumo santykinis standartinis nuokrypis (RSD, %)

Parametras	RSD (%) reikalavimai	RSD (%) rezultatai		
		β -kariofilenas	α -humulenas	Kariofileno oksidas
Pakartojamumas*	< 4,5	2,2	3,8	-
Atkuriamumas**	< 15,0	5,8	5,4	7,7
Atkuriamumas**	< 15,0	5,7	1,0	3,3

* - apskaičiuotas pagal kariofileno darinių standarto mišinį (BCP ir HUM);

** - apskaičiuotas pagal tiriamą pluoštinės kanapės ekstrakto mėginį.

Visų trijų junginių RSD (%) rezultatai atitinka glaudumui keliamus reikalavimus, nes pakartojamumo atveju, RSD (%) neviršija 4,5 %, o atkuriamumo atveju – 15,0 %. Pakartojamumo tyrimo BCP rezultatai atitiko leidžiamas ribas – 2,2 %, HUM rezultatų glaudumas buvo mažesnis nei

β -kariofileno – 3,8 %. Vertinant atkuriamumą BCP RSD (%) rezultatai taip pat atitiko leidžiamas ribas – < 15,0 % ir buvo 1,0–7,7 % ribose.

3.2.4 Metodo aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos

Atliekant bet kokį kiekybinio įvertinimo procesą, kurio vertė yra mažesnė už LOD ir LOQ lygį, gaunama didelė matavimo neapibrėžtis; kas lemia nepatikimą matavimą. LOD lygiu galima įvertinti tik kokybinę analizę, o LOQ lygiu - tiek kiekybinę, tiek kokybinę. Tačiau LOQ lygiu atliekant kiekybinę analizę galima gauti netikslų rezultatą, o tai lemia didelį neapibrėžtumą dėl galutinių analizės rezultatų [49]. Aptikimo ir kiekybinio nustatymo ribos įvertintos lyginant smailės aukštį su bazinės linijos triukšmu. Smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykis, skaičiuojant aptikimo ribą yra 3:1, o nustatymo ribą – 10:1. Skaičiavimai atlikti pagal žemiau nurodytas formules¹³, o LOD ir LOQ vertės pateiktos 9 lentelėje.

$$LOD = 3,3 \times S/N, ppm; \quad (8)$$

$$LOQ = 10 \times S/N, ppm. \quad (9)$$

čia: S – tiriamojo junginio smailės aukštis;

N – bazinės linijos triukšmo aukštis.

9 lentelė.

β -kariofileno ir α -humuleno junginių S/N vertės (ppm), aptikimo (LOD) bei kiekybinio nustatymo (LOQ) ribos

Parametrai	β -kariofilenas	α -humulenas
LOD, ppm	0,30	0,28
LOQ, ppm	0,91	0,83

LOD ir LOQ reikšmės buvo nustatytos pasirinkus žemiausią kalibracinės tašką – 33,52 ppm (kur β -kariofileno koncentracija – 30,59 ppm, o α -humuleno – 2,50). Kaip matyti iš 10 lentelės, tiek β -kariofileno (LOD – 0,30, LOQ – 0,91), tiek α -humuleno (LOD – 0,28, LOQ – 0,83) LOD ir LOQ reikšmės yra labai panašios.

¹³ Ibrahim, E. A., Wang, M., Radwan, M. M., Wanas, A. S., Majumdar, C. G., Avula, B., Wang, Y. H., Khan, I. A., Chandra, S., Lata, H., Hadad, G. M., Abdel Salam, R. A., Ibrahim, A. K., Ahmed, S. A., & Elsohly, M. A. (2019). Analysis of Terpenes in *Cannabis sativa* L. using GC/MS: Method Development, Validation, and Application. *Planta Medica*, 85(5), 431–438. <https://doi.org/10.1055/a-0828-8387>.

3.2.5 Metodo išgava

Išgavos vertinimui ekstrakcija buvo atlikta optimizuotomis sąlygomis ($1\pm 0,03$ g sausų pluoštinių kanapių, $10,00\pm 0,30$ ml n-heksano, 30 ± 1 °C temperatūra), o išgavos apskaičiavimui (10 formulė) buvo pridėdama 100 µl pradinio 3120 ppm kariofileno standarto (kas mėginyje atitinka 24,44 ppm (β -kariofileno – 22,30 ppm ir α -humuleno – 1,82 ppm).

Kiekvieno terpeno išgava procentais buvo paskaičiuota pagal formulę¹³:

$$\frac{C_{su\ priedu}(ppm) - C_{be\ priedo}(ppm)}{C_{priedo}(ppm)} \times 100\% \quad (10)$$

Gauti rezultatai pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė.

β -kariofileno ir α -humuleno junginių išgavos vertinimo rezultatai

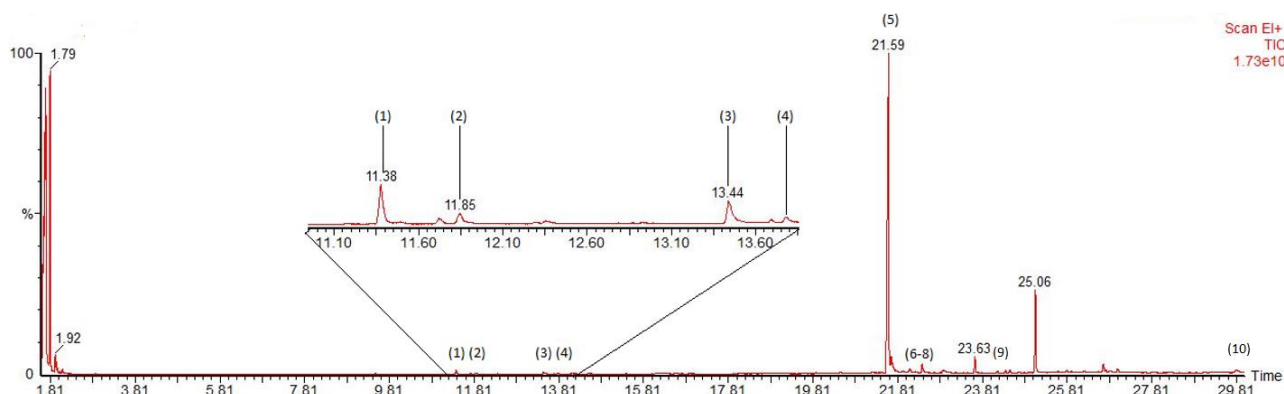
Junginys	Išgava, %	Reikalavimai, %
β -kariofilenas	116	80-120
α -humulenas	91	

Iš 10 lentelėje pateiktų rezultatų matome, jog tiek β -kariofileno (116 %), tiek α -humuleno (91 %) apskaičiuota išgava atitinka keliamus reikalavimus.

3.3 Terpenų ir kitų junginių įvertinimas pluoštinėje kanapėje GC-MS metodu

Terpeninių komponentų analizė buvo atliekama dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu. Identifikuojant chromatogramose rastus junginius, chromatogramų smailių duomenys buvo lyginami su junginių masių spektrų bibliotekos NIST 2008 duomenimis. Pluoštinių kanapių terpenus, ypač seskviterpenus, yra sunku atpažinti dėl standartų, duomenų trūkumo, o tuo pačiu ir dėl jų struktūrų labai didelio panašumo (pvz.: pagal Tanimoto cheminių struktūrų panašumo įvertį β -kariofilenas, α -humulenas ir kariofileno oksidas tarpusavy panašūs 62,1–85,7 % ribose), dėl to gali atsirasti tam tikrų netikslumų. Dėl šių priežasčių, jie buvo laikomi atpažintais esant ganėtinai žemoms riboms 14–56 %, todėl jų tolimesniam kokybiniam ir kiekybiniam įvertinimui buvo naudotas β -kariofileno standartas. Kanabinoidai buvo identifikuojami tik NIST 2008 bibliotekos pagalba ir buvo laikomi atpažintais esant 75 % ir didesniai fragmentų masių spektrų atitikimui su duomenų baze.

Atliktų GC–MS metodo analizių metu buvo gautos mėginių chromatogramos, pagal kurių smaيليų sulaikymo laikus, buvo nustatinėjami kelių skirtingų pluoštinių kanapių mėginių terpenų ir kitų junginių profiliai. Tyrimo metu išanalizuoti 3 skirtinguose laukuose augančių pluoštinių kanapių Futura 75 veislės mėginiai. Pluoštinių kanapių ekstraktų terpeninių junginių analizės chromatograma pateikta 23 pav. Chromatogramoje pavaizduoti pluoštinės kanapės Futura 75 antžeminės dalies terpeninių ir kitų junginių analizės rezultatai, kurie gauti atlikus pluoštinių kanapių ekstrakciją organiniu tirpikliu GC–MS metodu ir išanalizavus rezultatus MassLynx programa.



23 pav. *Cannabis sativa* L. Futura 75 veislės „B_1“ ekstrakto bendra chromatograma (1 – β -kariofilenas, 2 – α -humulenenas, 3 – kariofileno oksidas, 4 – Humuleno epoksidas II, 5 – Resorcinolis (CBD analogas), 6 – Dronabinolis (THC enantiomeras), 7 - (\pm)-Kanabiciklolis (CBL), 8 – Kanabigerolis (CBG), 9 – Skvalenas, 10 – Lupeolis)

Pluoštinės kanapės (B_1 mėginyje) Futura 75 veislės chromatogramoje yra aptikta 10 smaيليų, kurios žymi šešis skirtingus terpenų darinius (kituose junginiuose buvo aptiktas dar 7 terpenas – fitolis ties 18,84 min), pažymėtus skaičiais 1–4, 9–10 ir keturis skirtingus kanabinoidus, pažymėtus 5–8 skaičiais.

3.3.1 Terpenų ir kitų junginių pluoštinėse kanapėse kokybinis įvertinimas

Pagal identifikuotas chromatogramų smailes buvo kokybiškai vertinami pluoštinėse kanapėse aptikti terpenai bei kiti junginiai. Iš viso buvo aptikti 7 skirtingi terpenai, kurių pasiskirstymas tarp skirtinguose laukuose auginamų pluoštinių kanapių buvo ganėtinai siauras. 26 paveiksle smailė pažymėta skaičiumi 1 yra β -kariofilenas, 2 – α -humulenenas, o 3 – kariofileno oksidas (taip pat yra aptiktas tos pačios seskviterpenų grupės junginys - humuleno epoksidas II bei du triterpenai – skvalenas ir lupeolis), kituose kultivuojamuose laukuose užaugintose Futura 75 veislės pluoštinėse kanapėse terpenų ir kanabinoidų įvairovė buvo panaši, tik kultivuojame lauke – „Baltoji I“ nebuvo aptikta diterpeno –fitolio smailės piko, o kanabinoidų įvairovė visuose laukuose buvo tokia pati

(bendrus rezultatus žr. 12 lentelėje). Kaip matoma iš chromatogramos (26 pav.) terpenų profilyje β -kariofilenas (9,4 %) bei kariofileno oksidas (10,6 %) sudaro panašų terpenų smailių plotą, o α -humulenas (3,1 %) mažiausią iš kariofileno darinių vertinant visus terpenus, kurie buvo identifikuoti Futura 75 veislės ekstrakto. Kanabinoidų profilyje didžiausią dalį užima CBDA – 90,4 %. Išanalizavus visą chromatogramą NIST 2008 programa, buvo nustatyta, kad terpenai sudaro vos apie – 2,1 % visų junginių, kanabinoidai – 41,1 %, o likusi dalis yra tokie junginiai kaip cetrandiolis (12,37 min), taip pat linolo rūgštis (16,34 min), dar žinoma kaip omega-6 riebalų rūgštis, vitaminas E (26,99 min) ir kiti junginiai. Visose trijose tirtose pluoštinėse kanapėse buvo aptikta seskviterpenų ir nedidelė dalis diterpenų/triterpenų, tačiau nebuvo identifikuota monoterpenų, kurie literatūroje minima, sudaro didžiausią terpenų dalį pluoštinėse kanapėse [5]. 11 lentelėje matomi visi terpeniniai junginiai, kurie nustatyti skirtinguose laukuose auginamų pluoštinių kanapių Futura 75 veislėje. 11 lentelės stulpeliuose esantys pliuso ženklai reiškia, jog pluoštinių kanapių veislėje junginys buvo identifikuotas, minusas – nebuvo identifikuotas.

11 lentelė.

Tiriamose pluoštinėse kanapėse identifikuoti terpenai ir kiti junginiai

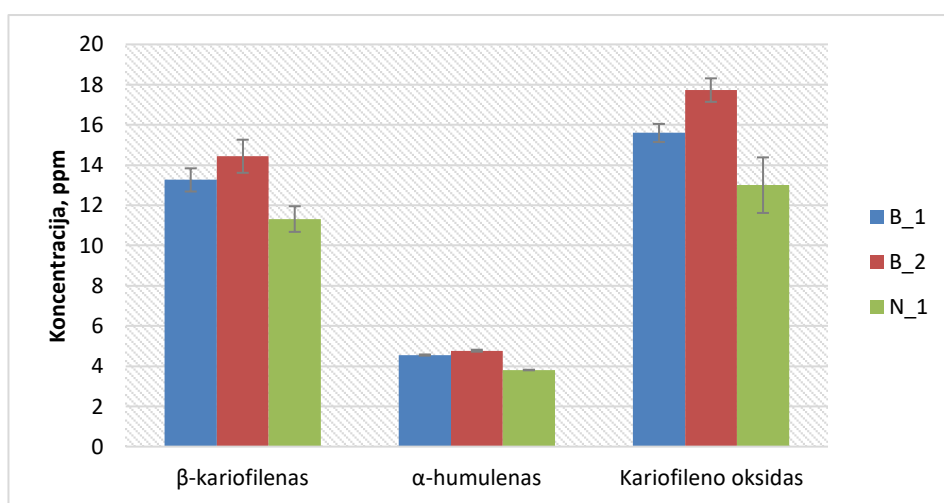
Terpenai	B_1	B_2	N_1
β-kariofilenas	(+)	(+)	(+)
α-humulenas	(+)	(+)	(+)
Kariofileno oksidas	(+)	(+)	(+)
Fitolis	(-)	(+)	(+)
Skvalenas	(+)	(+)	(+)
Humuleno epoksidai II	(+)	(+)	(+)
Lupeolis	(+)	(+)	(+)
Kanabinoidai			
Resorcinolis	(+)	(+)	(+)
Dronabinolis	(+)	(+)	(+)
(\pm)-Kanabiciklolis	(+)	(+)	(+)
Kanabigerolis	(+)	(+)	(+)
Kiti junginiai			
Cetrandiolis	(+)	(-)	(-)
Linolo rūgštis	(+)	(-)	(-)
Vitaminas E	(+)	(+)	(+)

Tirtose pluoštinėse kanapėse buvo identifikuotas ganėtinai siauras bendrų terpenų spektras, kuriuos sudarė vos keli seskviterpenai: β -kariofilenas, α -humulenas, kariofileno oksidas ir humuleno epoksidai II, taip pat vienas diterpenas – fitolis bei du triterpenai – lupeolis ir skvalenas, kai kituose moksliniuose šaltiniuose nurodoma, kad iš *Cannabis sativa* L. Futura 75 veislės išgaunama 94 terpenai/terpenoidai [13]. Tokį santykinai žemą mėginių terpenų kiekį galima sieti su džiovavimo sąlygomis ar net transportavimo į laboratoriją sąlygomis [50]. Terpeno profiliai taip pat gali iš esmės

pasikeisti dėl skirtingos kanapių terpeno sintazės geno ekspresijos augalų vystymosi metu arba reaguojant į aplinkos veiksnius [51].

3.3.2 Santykinis kiekybinis terpenų pluoštinėse kanapėse įvertinimas

Analizuojant tirtus pluoštinių kanapių mėginius yra svarbus ne tik kokybinis, bet ir kiekybinis mėginių palyginimas. Vertinant terpeninių komponentų santykinį kiekybinį pasiskirstymą tarp tiriamųjų skirtinguose laukuose užaugintų pluoštinių kanapių Futura 75 veislių, buvo atliekami santykiniai kiekybiniai kariofileno darinių palyginimai (24 pav.).

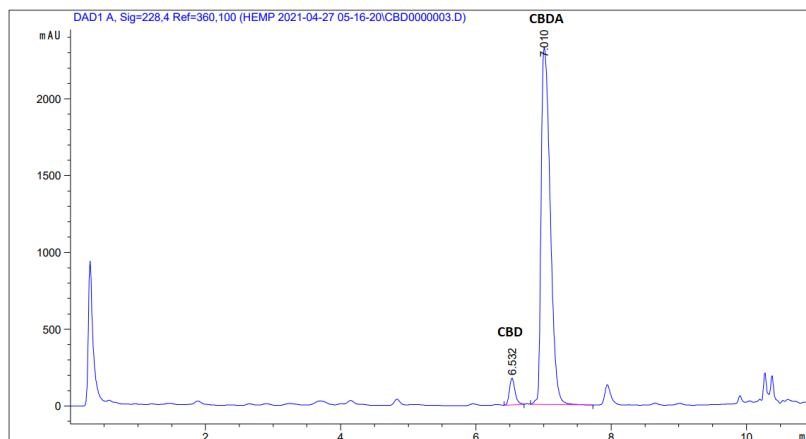


24 pav. β-kariofileno, α-humuleno ir kariofileno oksido pasiskirstymas skirtingų pasėlių laukuose (B_1, B_2 ir N_1) užaugintose pluoštinėse kanapėse (n=3)

Lyginant bendras kariofileno darinių kiekybines išraiškas buvo pastebėta, kad B_2 laukuose užaugintose pluoštinėse kanapėse randamas didžiausias santykinis kiekis šių seskviterpenų, aptikta $14,2 \pm 1,2$ ppm β-kariofileno, $4,7 \pm 0,1$ ppm α-humuleno ir $17,4 \pm 1,1$ ppm kariofileno oksido. N_1 laukuose užaugintose pluoštinėse kanapėse buvo nustatytas mažiausias santykinis kiekis iš visų pluoštinių kanapių mėginių, aptikta $11,3 \pm 0,6$ ppm β-kariofileno, $3,8 \pm 0,1$ ppm α-humuleno ir $13,0 \pm 1,4$ ppm kariofileno oksido.

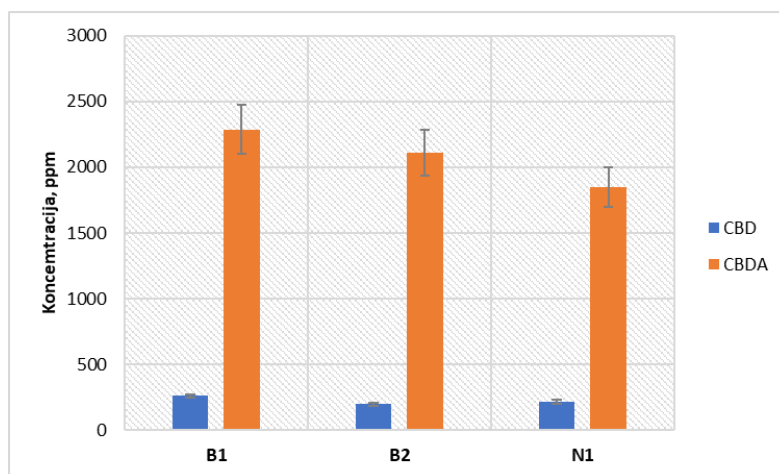
3.4 Kanabinoidų pluoštinėse kanapėse įvertinimas skysčių chromatografijos metodu

Kanabinoidų kokybinis nustatymas atliktas naudojant pasirinktą HPLC metodiką, kuri buvo sukurta, optimizuota ir validuota laboratorijoje, identifikuoti du kanabinoidai (CBDA ir CBD). Kanabinoidų nustatymo chromatograma pavaizduota 25 paveiksle. Chromatogramoje identifikuotas kanabidiolis ir kanabidiolio rūgštis.



25 pav. Kanabidiolio (CBD) ir kanabidiolio rūgšties (CBDA) chromatograma, gauta naudojant HPLC

CBD ir CBDA nustatyti ir kiekybiškai įvertinti visuose trijuose mėginiuose, kurie buvo auginti skirtinguose kultivuojamuose Šiaulių ūkininko laukuose. Gauti analizės rezultatai pavaizduoti 26 paveiksle.



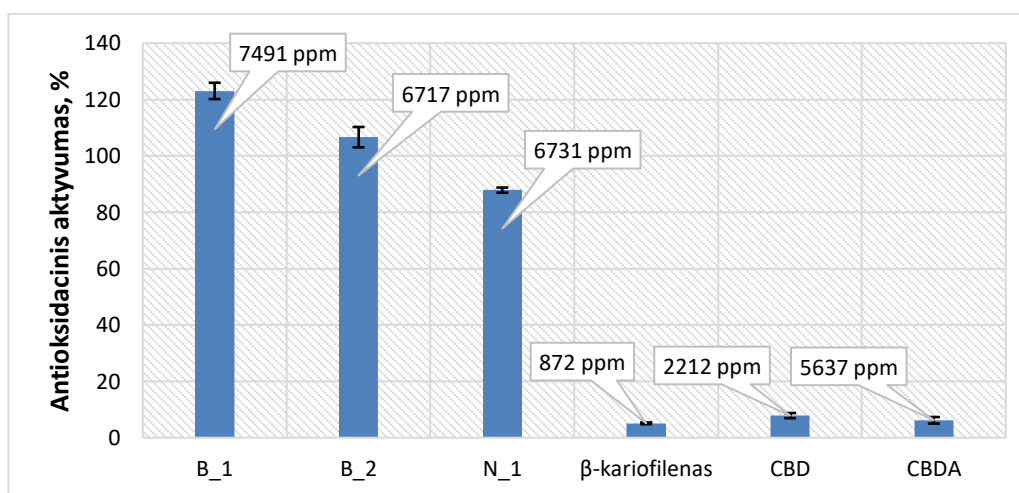
26 pav. CBD ir CBDA kiekis (ppm) skirtingų pasėlių laukuose

Didžiausias CBD ir CBDA kiekis nustatytas B_1 mėginyje: 261 ± 15 ppm ir 2286 ± 187 ppm atitinkamai, o mažiausias CBD kiekis nustatytas – B_2 mėginyje – 200 ± 12 ppm, o CBDA mažiausias kiekis N_1 mėginyje – 1847 ± 151 ppm.

3.5 Antioksidacinio aktyvumo nustatymas pluoštinės kanapės augalinėje žaliavoje DPPH bei ABTS metodais

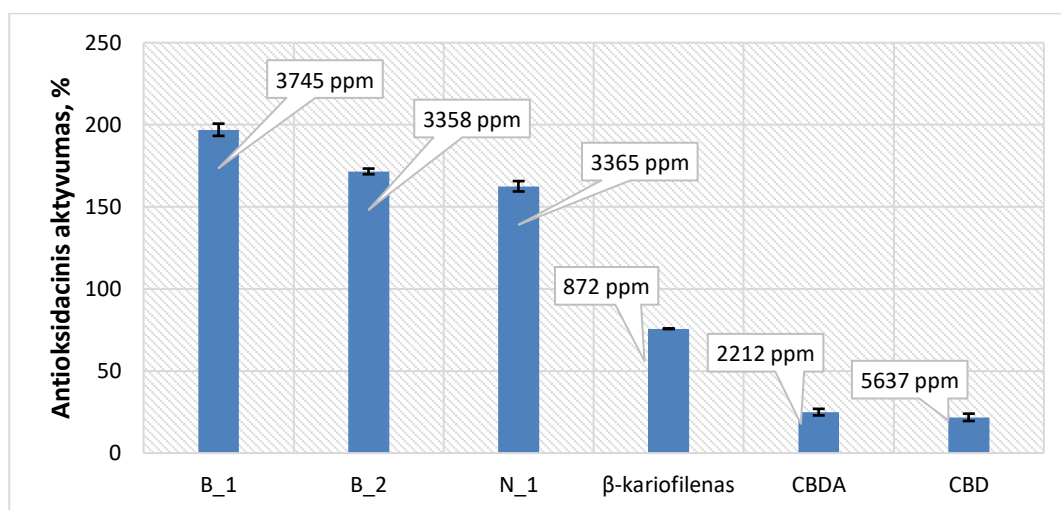
Cannabis sativa L. genties augalai sukaupia reikšmingus biologiškai aktyvių medžiagų kiekius, todėl didėja susidomėjimas augaluose aptinkamų natūralių antioksidantų apsauginėmis savybėmis ir jų pritaikymu medicininiais tikslams. Pluoštinė kanapė yra vienas iš svarbesnių šios genties augalų, sukaupiantis didelius terpeninių ir kitų junginių kiekius, kurie turi įtakos antioksidaciniam aktyvumui. Todėl preliminarūs *Cannabis sativa* L. augalinių žaliavų AOA nustatymai atliekami *in vitro* analitiniais metodais. Populiariausi taikomi metodai, kurie pagrįsti elektronų perdavimo reakcijomis yra DPPH radikalų ir ABTS radikalų-katijonų surišimo metodai [37], kurie ir buvo naudojami šiame darbe. Tyrimas buvo atliekamas spektrofotometriniu metodu, naudojant DPPH ir ABTS reagentus. Šiame skyriuje pateikiami ir analizuojami nustatyto AOA skirtumai. Įvertinta pluoštinės kanapės AOA priklausomybė nuo ekstrakcijos tirpiklio ir patikrinta kokie junginiai gali lemti ekstrakto antioksidacines savybes. AOA įvertintas sudarius trolokso kalibracinį grafiką. Pluoštinių kanapių AOA palyginimui sudarytos stulpelinės diagramos.

Vertinant *Cannabis sativa* L. mėginių, rinktų skirtinguose kultivuojamuose Šiaulių rajono ūkininko laukuose, DPPH tyrimo rezultatus, pradiniai pagaminti ekstraktai buvo skiesti metanolio 20 kartų, nustatytas AOA svyravo nuo 87,85 iki 123,05 %. Didžiausia reikšmė ($123,05 \pm 2,90$ %) nustatyta B_1 žaliavoje, rinktoje „Baltoji I“ laukuose, mažiausia – $87,85 \pm 0,92$ % nustatyta N_1 žaliavoje, rinktoje „Nuklonas I“ laukuose. Taip pat rezultatų palyginimui, buvo išmatuotas β -kariofileno standarto AOA (pasirinkta koncentracija – 872 ppm) bei kanabinoidų CBD (2212 ppm) ir CBDA (5637 ppm) standartų AOA reikšmės (27 pav.).



27 pav. DPPH radikalų surišimo įvertinimas *Cannabis sativa* L. žaliavų bei β -kariofileno, CBD ir CBDA standartų mėginiuose (n=3)

Cannabis sativa L. žaliavų antioksidacinėmis savybėmis pasižyminčios medžiagos sujungia susidariusius ABTS katijoninius radikalus. Šis AOA išreikštas standartinio antioksidanto trolokso ekvivalentų procentine dalimi. Atliktas pluoštinės kanapės ekstraktų AOA tyrimas spektrofotometriškai, naudojant ABTS testą. Vertinant tyrimo rezultatus, pateiktus 28 paveiksle, matome analogiškus rezultatus kaip su DPPH metodu, didžiausia laisvųjų radikalų surišimo geba ($196,95 \pm 6,88$ %) taip pat pasižymėjo mėginys – B_1, rinktas „Baltoji I“ kultivuojamuose laukuose, mažiausias ($162,55 \pm 7,33$ %) AOA taip pat kaip su DPPH nustatytas mėginyje – N_1, rinktame „Nuklonas I“ kultivuojamuose laukuose. Taip pat rezultatų palyginimui, buvo išmatuotas β -kariofileno, CBDA ir CBD standartų antioksidacinis aktyvumas (28 pav.).



28 pav. ABTS radikalų surišimo įvertinimas *Cannabis sativa* L. žaliavų bei β -kariofileno, CBD ir CBDA standartų mėginiuose (n=3)

Įvertinus pluoštinės kanapės *Cannabis sativa* L. žaliavų antioksidacinį aktyvumą ABTS ir DPPH metodais gauti rezultatų panašumai. Tiriant tiek DPPH, tiek ABTS metodu, didžiausias AOA nustatytas B_1, o mažiausias N_1 mėginyje. Bet matomas ir didelis rezultatų skirtumas, kuris gautas vertinat AOA procentines reikšmes. DPPH mėginiai buvo skiedžiami tik 20 kartų, o ABTS metodui ekstraktams buvo atliktas 40-ties kartų skiedimas, o rezultatai rodo priešingą variantą, su ABTS gautos procentinės reikšmės buvo 1,60-1,85 karto didesnės negu su DPPH metodu, o β -kariofileno standartas su ABTS ($75,68 \pm 0,06$ %) rodė net 15 kartų didesnę AOA lyginant su DPPH ($5,10 \pm 0,30$ %) metodu gautais rezultatais, kanabinoidų rezultatai su ABTS metodu buvo 3,2 – 3,5 karto didesni. Todėl galime teigti, jog AOA nustatymui didelę įtaką daro metodo jautrumas.

Toliau buvo palyginta pluoštinės kanapės sudėtyje esančių kariofileno darinių bei kanabinoidų kiekybinė sudėtis su standartų bei bendru mėginio antioksidaciniu aktyvumu. Rezultatai pateikiami 12-13 lentelėse.

12 lentelė.

Cannabis sativa L. ekstraktų ir standartų koncentracijos bei antioksidacinis aktyvumas (ekstraktų ir standartų skiedimai atlikti metanolio tirpiklyje)

Bandinio vidinis žymuo	Ekstraktai, standartai	Koncentracija, ppm	Standartų ir ekstrakto AOA, %	
			DPPH	ABTS
B_1	Pradinis ekstraktas	149818	-	-
	1:20 ekstraktas	7491	123,05±2,90	-
	1:40 ekstraktas	3745	-	196,95±3,73
B_2	Pradinis ekstraktas	134340	-	-
	1:20 ekstraktas	6717	106,65±3,61	-
	1:40 ekstraktas	3359	-	171,59±1,74
N_1	Pradinis ekstraktas	134610	-	-
	1:20 ekstraktas	6731	87,85±0,92	-
	1:40 ekstraktas	3365	-	162,55±3,15
Standartai	β-kariofileno standartas	872	5,10±0,30	75,68±0,06
	CBD standartas	2212	6,17±1,17	21,79±2,23
	CBDA standartas	5637	7,83±0,91	24,95±1,99

13 lentelė.

Cannabis sativa L. mėginiuose apskaičiuota kariofileno darinių* ir kanabinoidų** koncentracija

Bandinio vidinis žymuo	Standartai/ekstraktas	Koncentracija, ppm
B_1	Kariofileno dariniai***	16,99
	CBD	261,00
	CBDA	2286,41
B_2	Kariofileno dariniai	18,18
	CBD	200,10
	CBDA	2110,10
N_1	Kariofileno dariniai	17,72
	CBD	217,92
	CBDA	1847,34

* - nustatyti GC-MS metodu;

** - nustatyti HPLC metodu;

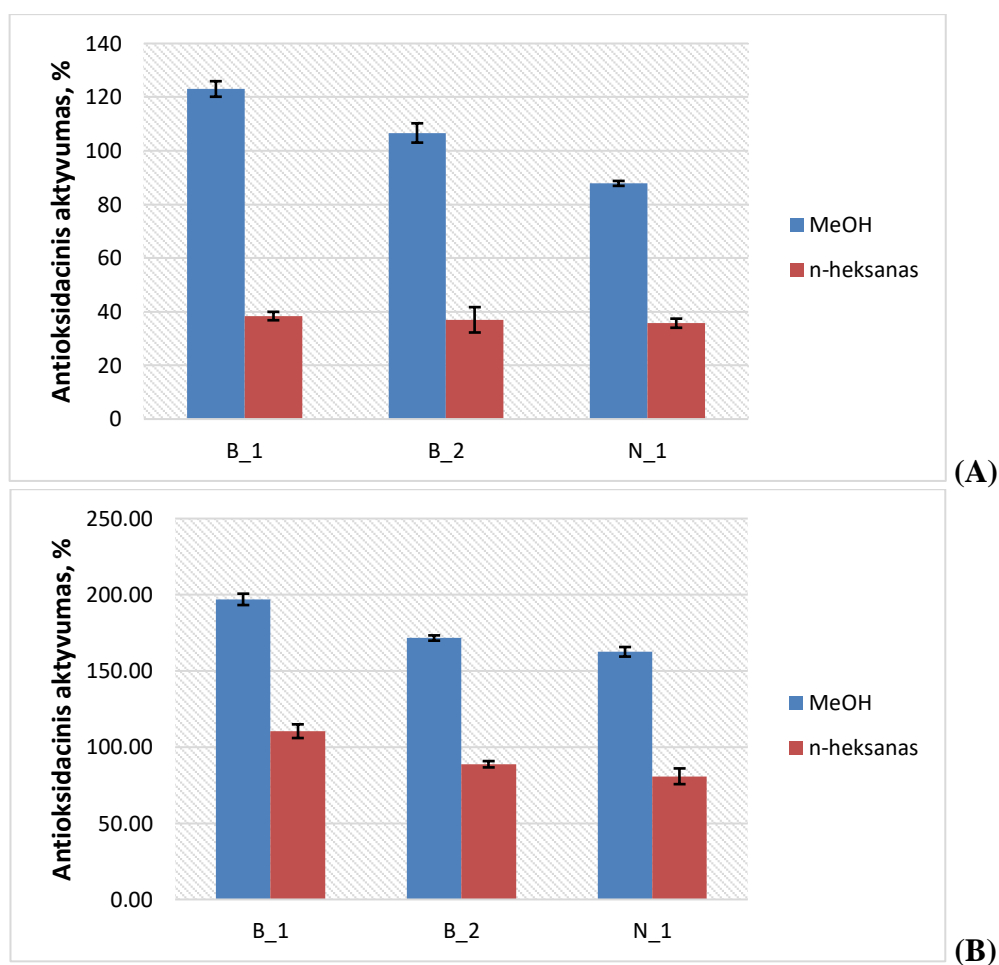
*** - kariofileno dariniai: β-kariofilenas, α-humuleninas ir kariofileno oksidas.

Įvertinus pluoštines kanapes aptinkamą kariofileno darinių bei kanabinoidų kiekį ir palyginus standartų AOA, galima pastebėti, jog lyginant su bendru ekstrakto AOA, šių junginių antioksidacinis aktyvumas yra mažas. Tačiau teigti, jog šie junginiai prisideda prie bendro AOA labai mažai (vertinat gautas standartų AOA), būtų neteisinga, nes tarp šių medžiagų yra galimas sinerginis efektas, dėka kurio ir yra matomas toks aukštas ekstrakto AOA.

Įvertinus tyrime naudotas standartų koncentracijas, galime teigti, kad kanabinoidų standartų AOA buvo žymiai mažesnis nei β-kariofileno, tačiau norint įvertinti jų vaidmenį bendrame ekstrakto

AOA reiktų atlikti papildomus tyrimus, kurie parodytų ar šie junginiai lemią sinerginį, antagonistinį ar papildomąjį poveikį. Tokie tyrimai tik įrodo, kad lyginant su grynu augalu, ar iš jo gautu ekstraktu, joks išgrynintas ar tuo labiau susintetintas junginys nebus efektingesnis kovojant su oksidaciniu stresu.

Atlikus galimą kariofileno darinių bei kanabinoidų AOA indelio analizę bendram ekstrakto antioksidaciniam aktyvumui buvo nuspręsta patikrinti kokią įtaką ekstrakto AOA gali turėti pasirinktas ekstrakcijos tirpiklis, buvo palyginti metanolio bei n-heksano tirpiklių ekstraktai. n-heksano ekstraktas prieš AOA anlizę buvo paruoštas išgarinant n-heksaną azoto dujomis bei užpilant 100% MeOH. Rezultatai pateikti 29 pav.



29 pav. Metanolinių ir n-heksaninių *Cannabis sativa* L. žaliavų ekstraktų DPPH (A) ir ABTS (B) radikalų surišimo rezultatų palyginimas (n=3)

Iš 29 paveikslo matome, jog didesniu AOA pasižymėjo metanolio ekstraktas, to priežastis gali būti didesnis junginių, pasižyminčių antioksidacinėmis savybėmis tirpumas poliniame metanolio tirpiklyje nei nepoliniame n-heksano tirpiklyje. Vieni iš junginių, kurie taip pat pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis yra pigmentai, todėl tolimesniuose tyrimuose buvo palyginti chlorofilo a ir b bei karotenoidų kiekiai skirtinguose ekstrakcijos tirpikliuose.

3.6 Chlorofilo a ir b bei karotenoidų nustatymas pluoštinėje kanapėje

Yra įrodyta, kad chlorofilas taip pat gali sustiprinti antioksidacinį poveikį [45]. O karotenoidai greičiausiai yra susiję su pavienių deguonies ir peroksilo radikalų pašalinimu. Be to, jie sugeba deaktyvuoti sensibilizatorių molekules, kurios dalyvauja ROS generavime [52]. UV/VIS spektrofotometro „Perkin Elmer Lambda 25“ ir „LAMBDA25“ programos pagalba buvo išmatuotos ekstraktų sugertys ties 662 nm (chlorofilas a), 644 nm (chlorofilas b) ir 441 nm (karotenoidai) bangos ilgiais ir apskaičiuotos pigmentų koncentracijos. Rezultatai pateikti 14 lentelėje.

14 lentelė.

Cannabis sativa L. žaliavų ekstraktuose apskaičiuota pigmentų koncentracija (mg/100g) (n=3)

Bandinio vidinis žymuo	Pigmentų koncentracija, (mg/100g)			
	Chlorofilai a ir b		Karotenoidai	
	MeOH	n-heksanas	MeOH	n-heksanas
B_1	160,37±2,94	13,17±0,25	35,91±0,66	9,01±0,16
B_2	146,58±2,81	10,54±0,20	30,56±0,57	7,39±0,14
N_1	176,85±3,25	9,73±0,18	39,51±0,75	6,67±0,12

Iš 14 lentelės matome, jog žymiai didesnė koncentracija yra gauta metanolio ekstrakto todėl galima daryti prielaidą, jog viena iš priežasčių kodėl matomas toks didelis AOA skirtumas tarp šių dviejų tirpiklių ekstraktų yra būtent jame esantis pigmentų kiekis.

Teigti, kad pigmentiniai junginiai turi didžiausią įtaką ekstraktų AOA, lyginant su terpenais ir kanabonoidais, būtų neteisinga, tam reikalingi papildomi tyrimai, kurie parodytų ar yra sinerginis efektas tarp tam tikrų junginių. Nes skirtingi ekstraktų, terpenų/terpenoidų, kanabinoidų ir kitų junginių, komponentai gali sąveikauti ir sumažinti, arba padidinti antioksidacinį veiksmingumą. Sąveika tarp šių komponentų gali sukelti antagonistinį, papildomąjį ar sinerginį poveikį. Papildomas poveikis pastebimas, kai bendras poveikis yra lygus atskirų efektų sumai. Antagonizmas pastebimas, kai vieno ar abiejų junginių poveikis yra mažesnis, kai jie naudojami kartu, nei atskirai. Sinerginis efektas pastebimas, kai kombinuotų medžiagų poveikis yra didesnis už atskirų poveikių sumą, o sąveikos nebuvimas apibrėžiamas kaip nedarantis įtakos. Taigi pluoštinių kanapių ekstraktų terpenų bei kitų junginių antioksidacinį poveikį labai veikia jų cheminis pobūdis ir sąveika [53]. Todėl reikėtų atlikti papildomus tyrimus pluoštinės kanapės cheminiam profiliui iširti bei atlikti analizę, kuri parodytų ar joje esančiuose junginiuose veikia sinerginis efektas.

IŠVADOS

1. Tiriomojo darbo metu buvo parinktos optimalios ekstrakcijos sąlygos terpenų ekstrahavimui iš pluoštinės kanapės biožaliavos;
2. Sukurtas, optimizuotas ir validuotas dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodas terpenams nustatyti. Siūlomas metodas tenkina laboratorijos validavimo kriterijus ir gali būti taikomas realių mėginių tyrimams;
3. *Cannabis sativa* L. žaliavose, rinktose skirtinguose Šiaulių ūkio laukuose, dujų chromatografijos – masių spektrometrijos metodu identifikuoti 7 terpenai ir 4 kanabinoidai, iš kurių trys seskviterpenai: β -kariofilenas, α -humulenas ir kariofileno oksidas, kiekybiškai įvertinti GC-MS metodu, o 2 kanabinoidai (CBD ir CBDA) nustatyti skysčių chromatografijos metodu.
4. Ištyrus ir palyginus antioksidacinį aktyvumą ABTS ir DPPH metodais, nustatyta, kad *Cannabis sativa* L. ekstraktai bei β -kariofileno, CBD ir CBDA standartai pasižymi aukštesniu antioksidaciniu aktyvumu naudojant ABTS radikalų surišimo metodą. Taip pat nustatyta, kad didesnis antioksidacinis aktyvumas gautas naudojant metanolio, o ne n-heksano ekstrakcijos tirpiklį.
5. Įvertintas *Cannabis sativa* L. žaliavų kokybinės ir kiekybinės sudėties bei jų antioksidacinio aktyvumo ryšys parodė, kad bendras pluoštinės kanapės biožaliavos ekstrakto antioksidacinis aktyvumas yra žymiai didesnis negu jos sudėtyje identifikuotų, atitinkančių standartus, junginių antioksidacinis aktyvumas.

SANTRAUKA

VILNIAUS UNIVERSITETAS CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS

KATAŽINA PLATONOVA

CANNABIS SATIVA L. TERPENŲ ANALIZĖ DUJŲ CHROMATOGRAFIJOS - MASIŲ SPEKTROMETRIJOS METODU BEI BENDRO ANTIOKSIDACINIO AKTYVUMO TYRIMAS

Šiame tyrime kanapių (*Cannabis sativa* L.) ekstraktuose terpenai buvo nustatyti dujų chromatografijos-masių spektrometrijos metodu. GC-MS metodas buvo sukurtas ir patvirtintas terpenų kiekybiniam nustatymui pluoštinių kanapių biožaliavoje. GC-MS metodas buvo optimizuotas ir patvirtintas pagal etaloninį standartą. Ekstrakcijos optimizavimo metu buvo pasirinktas 10 ml n-heksano tirpiklio tūris, 5 minučių trukmė ir 30 ° C temperatūra. Mėginiai buvo paruošti ekstrahuojant augalinę medžiagą n-heksanu, kurio vidinis standartas buvo (+)- α -pinenas. Koncentracijos ir atsako santykis visiems analizuojamiems terpenams, naudojant sukurtą metodą, buvo tiesinis, R^2 vertės buvo > 0,99. α -humuleno ir β -kariofileno gauta išgava 91 ir 116 % atitinkamai. Išmatuotas glaudumas visuose mėginiuose svyravo nuo 1,0 iki 7,7 %. Nustatyta, kad abiejų seskviterpenų aptikimo riba ir kiekybinė riba yra atitinkamai 0,28–0,30 ppm ir 0,83–0,91 ppm. Siūlomas metodas yra selektyvus, patikimas ir tikslus.

Naudojant šį patvirtintą GC-MS metodą, buvo identifikuoti 7 terpenai ir 4 kanabinoidai. Visuose *Cannabis sativa* L. ekstraktuose buvo kiekybiškai nustatyti 3 seskviterpenai: BCP (11,3–14,2 ppm), HUM (3,8–4,7 ppm) ir BCPO (13,0–17,4 ppm). Naudojant didelio efektyvumo skysčių chromatografijos analizę, buvo nustatyti ir kiekybiškai įvertinti du kanabinoidai: CBD (200,1–261,0 ppm) ir CBDA (1847,3–2286,4 ppm).

Bendras antioksidacinis aktyvumas *Cannabis sativa* L. ekstraktuose, naudojant DPPH metodą, svyravo nuo 87,9 iki 123,1 %, o naudojant ABTS metodą - nuo 162,6 iki 197,0 %, o standartai: β -kariofilenas (su DPPH: 5,1 % ir su ABTS: 75,7 %), CBD (su DPPH: 6,2 % ir su ABTS: 21,8 %) ir CBDA (su DPPH: 7,8 % ir su ABTS: 25,0 %). Geresnis *C. sativa* L. biožaliavų antioksidacinis aktyvumas buvo tada, kai ekstrahavimui buvo naudojamas metanolis. Toliau buvo patikrintas *Cannabis sativa* L pigmentų, kurie gali turėti antioksidacinių savybių, kiekis. Spektrofotometrinė analizė parodė, kad bendras visų chlorofilo a ir b bei karotenoidų kiekis visuose *Cannabis sativa* L. ekstraktuose buvo gautas naudojant metanolio ekstrakcijos tirpiklį.

SUMMARY

VILNIUS UNIVERSITY
FACULTY OF CHEMISTRY AND GEOSCIENCES

KATAŽINA PLATONOVA

ANALYSIS OF TERPENES IN *CANNABIS SATIVA* L. BY GAS CHROMATOGRAPHY - MASS SPECTROMETRY AND INVESTIGATION OF TOTAL ANTIOXIDANT ACTIVITY

In this study terpenes in extracts of hemp (*Cannabis sativa* L.) were determined by gas chromatography and mass spectrometry techniques. GC-MS method has been developed and validated for the quantification of terpenes in cannabis plant material, mainly of β -caryophyllene, α -humulene, and caryophyllene oxide. The extraction method was optimized and the GC-MS method validated against reference standards of selected terpenes. During extraction optimization, 10 ml of n-hexane solvent, 5 min time, and 30 °C temperature were chosen. Samples were prepared by extraction of the plant material with n-hexane containing (+)- α -pinene solution as the internal standard. The concentration-response relationship for all analyzed terpenes using the developed method was linear with R^2 values > 0.99 . The average recoveries for α -humulene and β -caryophyllene in spiked indoor cultivated samples were between 91–116 %. The measured precisions (% relative standard deviation) in all varieties ranged from 1.0 to 7.7 %. The limit of detection and limit of quantitation for both sesquiterpenes were determined to be 0.28–0.30 ppm and 0.83–0.91 ppm, respectively. The proposed method is highly selective, reliable, and accurate and has been applied to the simultaneous determination of these major terpenes in the *C. sativa* L. biomass.

Using this validated GC-MS method 7 terpenes and 4 cannabinoids were identified and 3 sesquiterpenes in all *Cannabis sativa* L. extracts quantitated: BCP (11.3–14.2 ppm), HUM (3.8–4.7 ppm), and BCPO (13.0–17.4 ppm). Using high-performance liquid chromatography analysis two cannabinoids were identified and quantitated: CBD (200.1–261.0 ppm) and CBDA (1847.3–2286.4 ppm).

Total radical scavenging activity in *Cannabis sativa* L. extracts with DPPH method ranged from 87.9 to 123.1 %, and with ABTS method ranged from 162.6 to 197.0 %, and standards: β -caryophyllene (with DPPH: 5.1 % and with ABTS: 75.7 %), CBD (with DPPH: 6.2 % and with ABTS: 21.8 %) and CBDA (with DPPH: 7.8 % and with ABTS: 25.0 %). Better antioxidant activity of *C. sativa* L. extracts was get when it was used methanol for extracts, not n-hexane. For this reason, we checked the amount of pigments in *Cannabis sativa* L., which can give antioxidant activity too. Spectrophotometric analysis revealed, that the total amount of chlorophyll a and b, and carotenoids in all *Cannabis sativa* L. extracts was higher in extract with methanol.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Rafiqi U. N., Gul I., Saifi M., Nasrullah N., Ahmad J., Dash P. ir Zainul Abdin M. Cloning, identification, and in silico analysis of terpene synthases involved in the competing pathway of artemisinin biosynthesis pathway in *Artemisia annua* L. *Pharmacognosy Magazine*, **15**(62), (2019) S38-46.
2. Nuutinen T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **157** (2018) 198–228.
3. Andre C. M., Hausman J. F. ir Guerriero G. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, **7**(FEB2016) (2016) 1–17.
4. Gonzalez-Burgos E. ir Gomez-Serranillos M. P. Terpene Compounds in Nature: A Review of Their Potential Antioxidant Activity. *Current Medicinal Chemistry*, **19**(31) (2012) 5319–5341.
5. Kubilienė A., Marksa M., Baranauskaitė J., Ragažinskienė O. ir Ivanauskas L. Comparative evaluation of antioxidant activity of *Cannabis sativa* L. using FRAP and CUPRAC assays. *Chemija*, **31**(3) (2020) 156–161.
6. Stagos D. Antioxidant activity of polyphenolic plant extracts. *Antioxidants*, **9**(19). (2020) 1-7.
7. Burggren A. C., Shirazi A., Ginder N. ir London E. D. Cannabis effects on brain structure, function, and cognition: considerations for medical uses of cannabis and its derivatives. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, **45**(6) (2019) 563–579.
8. Chandra S., Lata H. ir ElSohly M. A. Morpho-Anatomy of Marijuana (*Cannabis sativa* L.). In *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology (pp.). *Springer International Publishing* (2017) 123–136.
9. Fishedick J. T. Identification of Terpenoid Chemotypes Among High (-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol-Producing *Cannabis sativa* L. Cultivars. *Cannabis and Cannabinoid Research*, **2**(1) (2017) 34–47.
10. Micalizzi G., Vento F., Alibrando F., Donnarumma D., Dugo P. ir Mondello L. *Cannabis sativa* L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*, **1637** (2021) 461864.
11. Magagnini G., Grassi G. ir Kotiranta S. The Effect of Light Spectrum on the Morphology and Cannabinoid Content of *Cannabis sativa* L. *Medical Cannabis and Cannabinoids*, **1**(1), (2018) 19–27.
12. Hartsel J. A., Eades J., Hickory B. ir Makriyannis A. Cannabis sativa and Hemp. In *Nutraceuticals*. *Elsevier Inc* (2016) 735–754.

13. Hanuš L. O. ir Hod Y. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Medical Cannabis and Cannabinoids*, **3**(1) (2020) 25–60.
14. Namdar D., Mazuz M., Ion A. ir Koltai H. Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in Cannabis sativa derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, **113** (2018) 376–382.
15. Hillig K. W. A chemotaxonomic analysis of terpenoid variation in Cannabis. *Biochemical Systematics and Ecology*, **32**(10) (2004) 875–891.
16. Breitmaier E. 1 Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis 1.2 General Structure: The Isoprene Rule. 1 p. ISBN: 3527317864.
17. Louie K. B., Kosina S. M., Hu Y., Otani H., de Raad M., Kuftin A. N., Mouncey N. J., Bowen B. P. ir Northen T. R. Mass Spectrometry for Natural Product Discovery. In *Comprehensive Natural Products III (3rd ed.)*. Elsevier Ltd (2020).
18. Proshkina E., Plyusnin S., Babak T., Lashmanova E., Maganova F., Koval L., Platonova E., Shaposhnikov M. ir Moskalev A. Terpenoids as potential geroprotectors. *Antioxidants*, **9**(6) (2020) 1–51.
19. Gertsch J., Leonti M., Raduner S., Racz I., Chen J. Z., Xie X. Q., Altman, K. H., Karsak M. ir Zimmer, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(26) (2008) 9099–9104.
20. Joshee N., Dhekney S. A. ir Parajuli, P. Medicinal plants: From farm to pharmacy. In *Medicinal Plants: From Farm to Pharmacy*. (2019).
21. Fidyk K., Fiedorowicz A., Strzdała L. ir Szumny A. B-Caryophyllene and B-Caryophyllene Oxide—Natural Compounds of Anticancer and Analgesic Properties. *Cancer Medicine*, **5**(10) (2016) 3007–3017.
22. Assis L. C., Straliozzo M. R., Engel D., Hort M. A., Dutra R. C. ir de Bem A. F. β -Caryophyllene protects the C6 glioma cells against glutamate-induced excitotoxicity through the Nrf2 pathway. *Neuroscience*, **279** (2014) 220–231.
23. Ojha S., Javed H., Azimullah S. ir Haque M. E. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **418**(1–2), (2016) 59–70.
24. Zhang Q., An R., Tian X., Yang M., Li M., Lou J., Xu L. ir Dong Z. β -Caryophyllene Pretreatment Alleviates Focal Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Activating PI3K/Akt Signaling Pathway. *Neurochemical Research*, **42**(5), (2017) 1459–1469.
25. Baldissera M. D., Souza C. F., Grando T. H., Stefani, L. M. ir Monteiro S. G. β -caryophyllene

- reduces atherogenic index and coronary risk index in hypercholesterolemic rats: The involvement of cardiac oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, **270** (2017) 9–14.
26. Nguyen L. T., Myslivečková Z., Szotáková B., Špičáková A., Lněničková K., Ambrož M., Kubiček V., Krasulová K., Anzenbacher P. ir Skálová L. The inhibitory effects of β -caryophyllene, β -caryophyllene oxide and α -humulene on the activities of the main drug-metabolizing enzymes in rat and human liver *in vitro*. *Chemico-Biological Interactions*, **278**(May), (2017) 123–128.
 27. Jiang Z., Kempinski C. ir Chappell J. Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, **1**(2) (2016) 345–358.
 28. Nawaz H., Shad M. A., Rehman N., Andaleeb H. ir Ullah N. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **56** (2020).
 29. Tanzi C. D., Vian M. A., Ginies C., Elmaataoui M. ir Chemat F. Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. *Molecules*, **17**(7) (2012) 8196–8205.
 30. Nn A. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, **04**(03) (2015) 3–8.
 31. Sommano S. R., Chittasupho C., Ruksiriwanich W. ir Jantrawut P. The Cannabis Terpenes. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **25**(24) (2020) 1–16.
 32. Delgado-Povedano M. M., Sánchez-Carnerero Callado C., Priego-Capote F. ir Ferreira-Vera C. Untargeted characterization of extracts from *Cannabis sativa* L. cultivars by gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry in high resolution mode. *Talanta*, *July* (2019) 120384.
 33. Gaggiotti S., Palmieri S., Della Pelle F., Sergi, M., Cichelli A., Mascini M. ir Compagnone D. Piezoelectric peptide-hpDNA based electronic nose for the detection of terpenes; Evaluation of the aroma profile in different *Cannabis sativa* L. (hemp) samples. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, **308**(January), (2020) 127697.
 34. Rodney T., Viswanath L. C. K., Dumancas G. ir Subong B. J. *Challenges and Opportunities for the Analysis of Terpenes in Cannabis*. *January* (2021) [žiūrėta 2021 m. balandžio 11 d.] Prieiga per internetą: <https://www.researchgate.net/publication/348751931>
 35. Shapira A., Berman P., Futoran K., Guberman O. ir Meiri D. Tandem Mass Spectrometric Quantification of 93 Terpenoids in Cannabis Using Static Headspace Injections [Research-article]. *Analytical Chemistry*, **91**(17) (2019) 11425–11432.
 36. Wojtunik-Kulesza K. A., Cieśla L. M. ir Waksmundzka-Hajnos M. Approach to determination a structure – antioxidant activity relationship of selected common terpenoids

- evaluated by abts•+ radical cation assay. *Natural Product Communications*, **13**(3) (2018) 295–298.
37. Ilyasov I. R., Beloborodov V. L., Selivanova I. A. ir Terekhov R. P. ABTS/PP decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(3) (2020).
 38. Maimulyant A. ir Prihadi A. R. Chemical composition of essential oil and hexane extract and antioxidant activity of various extracts of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass flowers from Indonesia. *Agriculture and Natural Resources*, **50**(4) (2016) 264–269.
 39. Marinova G. ir Batchvarov V. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **17**(1) (2011) 11–24.
 40. Pellegrini M., Palmieri S., Ricci A., Serio A., Paparella, A. ir Lo Sterzo C. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activity of *Cannabis sativa* L. cv ‘Futura 75’ essential oil. *Natural Product Research*, (2020) 1–5.
 41. Ojezele M. O., Lawrence E., Adeosun A. M. ir Ojezele O. J. Phytochemical Content of *Cannabis Sativa* Methanol Extract and *in vitro* Antioxidant Activities of Its Solvent Fractions. *Journal of Phytomedicine and Therapeutic*, **18**(2) (2019) 328–337.
 42. Tura M., Mandrioli M. ir Toschi T. G. Preliminary study: Comparison of antioxidant activity of cannabidiol (CBD) and α -tocopherol added to refined olive and sunflower oils. *Molecules*, **24**(19) (2019) 1–15.
 43. Atalay S., Jarocka-karpowicz I. ir Skrzydlewska E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. *Antioxidants*, **9**(1) (2020) 1–20.
 44. Gruschow A. A Comparison of Antioxidant Potential, Total Phenolic Content , and Cannabidiol (CBD) Content of Cannabis Infused Hemp , MCT , and Olive Oils. Montclair State University, Montclair, NJ (2020).
 45. Zagórska-Dziok M., Bujak T., Ziemlewska A. ir Nizioł-Łukaszewska Z. Positive Effect of *Cannabis sativa* L. Herb Extracts on Skin Cells and Assessment of Cannabinoid-Based Hydrogels Properties. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **26**(4) (2021).
 46. Cantele C., Bertolino M., Bakro F., Giordano M., Jędryczka M. ir Cardenia V. Antioxidant effects of hemp (*Cannabis sativa* L.) inflorescence extract in stripped linseed oil. *Antioxidants*, **9**(11) (2020) 1–18.
 47. Sousa J. P. B., Brancalion A. P. S., Souza A. B., Turatti, I. C. C., Ambrósio S. R., Furtado N. A. J. C., Lopes N. P. ir Bastos J. K. Validation of a gas chromatographic method to quantify sesquiterpenes in copaiba oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **54**(4)

- (2011) 653–659.
48. Thurman E. Analysis of terpenes in hemp (*Cannabis sativa*) by gas chromatography/mass spectrometry: Isomer identification analysis, *Elsevier* (2020) 211-213.
 49. Zuas O., Budiman H. ir Mulyana M. R. Analytical method validation of GC-FID for the simultaneous measurement of hydrocarbons (C2-C4) in their gas mixture. *Revista Colombiana de Química*, **45**(3), (2016) 22.
 50. Rocha E. D., Silva V. E. A., Pereira F. C. S., Jean V. M., Costa Souza F. L., Baratto L. C., Vieira A. C. M. ir Carvalho V. M. Qualitative terpene profiling of Cannabis varieties cultivated for medical purposes. *Rodriguesia*, **7** (2020).
 51. Booth, J. K., & Bohlmann, J. Terpenes in Cannabis sativa – From plant genome to humans. *Plant Science*, **284**(April), (2019) 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.022>
 52. Graßmann, J. Terpenoids as Plant Antioxidants. *Vitamins and Hormones*, **72**(05) (2005) 505–535.
 53. Bassolé I. H. N. ir Juliani H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, **17**(4) (2012) 3989–4006.

PADĖKOS

Dėkoju VMTI Fizinių ir technologijos mokslų centro Cheminės metrologijos laboratorijai už suteiktas galimybes tiriamojo darbo metu naudotis sąnaudinėmis medžiagomis, reagentais ir įranga.

Esu dėkinga dr. Evaldui Naujaliui bei jo kolegai doktorantūros studentui Audriui Sadaunykui už pagalbą ir patarimus atliekant dujų chromatografijos- masių spektrometrijos tyrimus bei Jurgai Būdienei ir Aušrai Linkevičiūtei už pagalbą atliekant spektrofotometrinę analizę bei patarimus rašant baigiamąjį darbą.