

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

HPLC stanovení nízkých koncentrací Δ^9 -THC

Rigorózní práce

Vypracovala:

Mgr. Hana Štumpoltová

Konzultant:

RNDr. Michaela Hamerníková Ph.D.

Hradec Králové 2008

Prohlašuji, že jsem rigorózní práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Michaely Hamerníkové, Ph.D. s použitím uvedené literatury.

V Hradci Králové, listopad 2008

.....

Děkuji RNDr. Michaele Hamerníkové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a věčný optimismus.

Abstrakt:

Název: HPLC stanovení nízkých koncentrací Δ^9 -THC

Autor: Mgr. Hana Štumpoltová

Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Teoretická část rigorózní práce se věnuje stanovení Δ^9 -THC chromatografickými metodami s důrazem na toxikologicko-právní stránku stanovení nízkých koncentrací Δ^9 -THC v technickém konopí a konopných potravinách. Experimentální část práce si dává za cíl validaci HPLC-FLD metody pro stanovení nízkých koncentrací Δ^9 -THC. V rámci validace jsou provedena validační měření pro 3 různá nastavení citlivosti fluorescenčního detektoru. Na základě získaných dat je zvolena nejvhodnější citlivost, která je následně využita pro HPLC stanovení Δ^9 -THC v technickém konopí, konopném vláknu, konopné tkanině a konopném semenu. Výsledky těchto stanovení potvrzují, že výše zmíněné vzorky pocházejí z technického konopí, neboť obsah Δ^9 -THC je ve všech případech výrazně nižší než platné limity.

Abstract:

Title: HPLC determination of low concentrations of Δ^9 -THC

Author: Mgr. Hana Štumpoltová

Department of Biophysics and Physical Chemistry, Charles University in Prague, Pharmaceutical Faculty in Hradci Králové

Theoretical part of this work focuses on chromatographic determination of Δ^9 -THC, especially the toxicology-forensic problematics of determination of low concentrations of Δ^9 -THC present in fibre hemp and hemp food. Objective of experimental part is to validate the HPLC-FLD method for determination of low concentrations of Δ^9 -THC. The validation involves validation tests that are performed for 3 various settings of fluorescent detector sensitivity. Obtained validation data enable to select the most suitable sensitivity under which HPLC determinations of Δ^9 -THC in industrial hemp, hemp fibre, hemp cloth and hemp seed is performed. Results of these determinations prove that the above mentioned samples originate from industrial hemp as Δ^9 -THC content is in all cases significantly lower than the applicable limits.

Seznam zkratek

Δ^9 -THC	Δ^9 - tetrahydrokanabinol
CBD	kanabidiol
CBN	kanabinol
Δ^9 -THCA-A	kyselina Δ^9 -tetrahydrokanabinolová A
THV	tetrahydrokanabivarin
11-OH-THC	11-hydroxy-tetrahydrokanabinol
THC-COOH	11-karboxy-tetrahydrokanabinol
GC-MS	plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	vysokoúčinná kapalinová chromatografie – UV detekce
HPLC-FLD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie – fluorescenční detekce
TLC	tenkovrstvá chromatografie
SD	směrodatná odchylka
RSD	relativní směrodatná odchylka
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl	8
3. Teoretická část	9
3.1. Konopě setá	9
3.2. Rozlišení konopí	10
3.3. Δ^9 -THC	10
3.4. Toxikologické aspekty	11
3.5. Legislativa týkající se konopí	11
3.6. Limity pro obsah Δ^9 -THC v potravinách	12
3.7. Identifikace a stanovení Δ^9 -THC	12
3.7.1. Plynová chromatografie-hmotnostní spektrometrie (GC-MS)	12
3.7.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	13
3.7.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	15
3.8. Obsah Δ^9 -THC v konopí	15
3.8.1. Drogové konopí	15
3.8.2. Technické konopí	16
3.8.3. Konopná semena	17
3.9. Obsah Δ^9 -THC v potravinách	17
4. Experimentální část	19
4.1. Podmínky experimentální části	19
4.1.1. Přístroje a ostatní vybavení	19
4.1.2. Podmínky HPLC analýzy	20
4.1.3. Příprava mobilní fáze	20
4.1.4. Nastavení citlivosti detektoru	20
4.1.5. Postup při validaci metody a její praktické aplikaci	21
4.2. Validace metody	22
4.2.1. Příprava vzorků standardu	22
4.2.2. Kalibrační křivka Δ^9 -THC	22
4.2.3. Opakovatelnost nástřiku	22
4.2.4. Přesnost	22
4.2.5. Správnost	23
4.2.6. Mez stanovitelnosti a mez detekce	23
4.2.7. Validací měření pro jednotlivé citlivosti	26
4.3. Praktická aplikace na reálné vzorky	28
4.3.1. Příprava extraktu a vzorku	28
4.3.2. Výpočet obsahu Δ^9 -THC v reálném vzorku	29
4.3.3. Reálné vzorky	29
5. Výsledky a diskuze	32
5.1. Testování způsobilosti metody	32
5.1.1. Citlivost V	32
5.1.2. Citlivost S	37
5.1.3. Citlivost N	45
5.1.4. Srovnání zvolených citlivostí fluorescenčního detektoru	49
5.2. Stanovení obsahu Δ^9 -THC v reálných vzorcích konopí a konopných produktů	51
6. Závěr	53
7. Seznam použité literatury	54
8. Přílohy	56

1. Úvod

Konopí je jednou z nejstarších kulturních rostlin. Její vlákna byla již v druhém tisíciletí před naším letopočtem používána v Číně k výrobě papíru. Význam konopí jako zdroje přírodních vláken přetrval až do současnosti. Konopná vlákna slouží k výrobě lan, oděvních i průmyslových textilií a v posledních letech se o konopné biomase hovoří rovněž v souvislosti s obnovitelnými zdroji energie.

Konopná semena jsou tradičním krmivem pro ptactvo a ryby. Stále častěji se s nimi můžeme setkat také na pultech tzv. Bio obchodů, které nabízí široký sortiment konopných potravin jako například konopný olej, konopnou mouku či konopný čaj. Konopný olej uvedený na trh EU v roce 1995 byl vůbec první legálně dostupnou konopnou potravinou. Za zmínku stojí rovněž využití konopného oleje v kosmetice.

V neposlední řadě je konopí významné toxikologicky. Rostlina produkuje pryskyřici obsahující psychoaktivní látky. Hlavní farmakologické psychoaktivní účinky jsou přitom přičítány Δ^9 -THC, neboli Δ^9 -tetrahydrokanabinolu. Z konopných drog je rozšířená zejména marihuana, což jsou mladé kvetoucí výhonky obalené pryskyřicí a dále pak hašiš, což je označení pro vlastní pryskyřičnou hmotu.

2. Cíl

Cílem teoretické části této práce je popsat :

1. základní chemotypy konopných rostlin vč. nejdůležitějších obsahových látek
2. hlavní účinky Δ^9 -THC na lidský organismus
3. limity pro obsah Δ^9 -THC v technickém konopí a konopných produktech
4. identifikaci a stanovení Δ^9 -THC chromatografickými metodami
5. obsahy Δ^9 -THC běžně přítomné v konopí a konopných produktech

Cílem experimentální části této práce je:

A. Provést validaci HPLC metody s využitím roztoku standardu Δ^9 -THC v metanolu

1. zvolit tři potenciálně nejvhodnější nastavení citlivosti fluorescenčního detektoru pro stanovení koncentrací Δ^9 -THC v řádu $\mu\text{g/ml}$
2. pro tyto citlivosti provést validační měření s cílem určit opakovatelnost, přesnost a správnost měření
3. na základě výsledků validačních měření zvolit jednu nejvhodnější citlivost

B. Metodu prakticky aplikovat na stanovení koncentrace Δ^9 -THC v reálných vzorcích

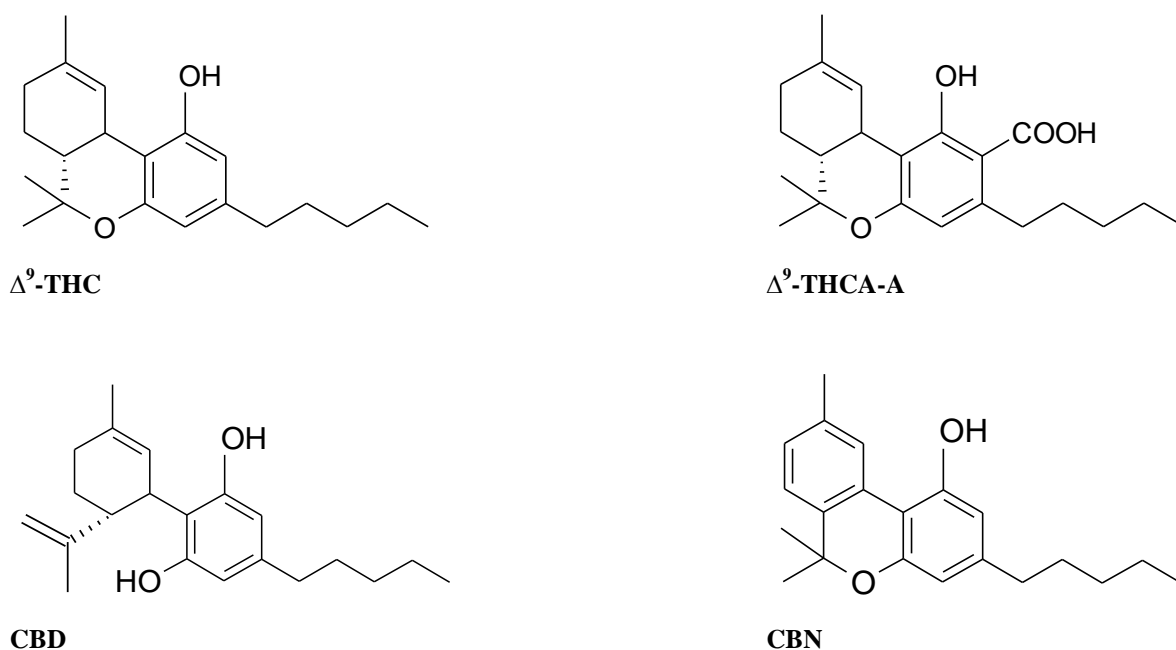
1. s nejvhodnější citlivostí fluorescenčního detektoru provést stanovení Δ^9 -THC v rostlině technického konopí, konopném vláknu, konopné tkanině a konopných semenech
2. zhodnotit, zda vzorky skutečně pocházejí z technického konopí a zda nejsou překročeny limity pro obsah Δ^9 -THC

3. Teoretická část

3.1. Konopě setá

Konopě setá (*Cannabis sativa L.*) je statná jednoletá dvoudomá bylina. S výjimkou kořene a semen můžeme na celé rostlině najít glandulární trichomy vylučující pryskyřici, která je z 80 až 90 % tvořena tzv. kanabinoidy, dále pak vysoce polymerními fenoly, terpeny a vosky¹. Pod pojmem kanabinoidy se rozumí terpenofenolické sloučeniny, které se vyskytují pouze v rostlinách konopí. V současnosti je známo více než 60 kanabinoidů, přičemž nejvýznamnější je psychoaktivní Δ^9 -tetrahydrokanabinol (Δ^9 -THC). Dalšími významnými kanabinoidy jsou kanabidiol (CBD) a kanabinol (CBN). Za zmínku stojí rovněž tetrahydrokanabinolová kyselina (Δ^9 -THCA-A), která je hlavním prekurzorem Δ^9 -THC. Nej hustěji je glandulárními trichomy pokryto samičí květenství s listeny, kde jsou trichomy zároveň největší a pryskyřice nejbohatší na Δ^9 -THC¹.

Plody konopí jsou jednosemenné nažky, které obsahují 25-30 % oleje. Ve srovnání s ostatními rostlinnými oleji má konopný olej vůbec největší podíl nenasycených mastných kyselin (přibližně 75%). V největším množství jsou přitom zastoupeny kyseliny linolová (50-60%) a linolenová (20-25%). Celkový poměr všech 8 esenciálních aminokyselin je považován za nutričně optimální².



Obrázek č.1: Chemická struktura významných kanabinoidů

3.2. Rozlišení konopí

Obecně lze rozlišit dva základní fenotypy, tzv. technické a drogové konopí. Rozhodující je přitom poměr obsahu Δ^9 -THC a dalších kanabinoidů určený dle následujícího vzorce $(\Delta^9\text{-THC} + \text{CBN}) / \text{CBD}$. Pokud je výsledná hodnota > 1 , jedná se o drogové konopí, pokud je výsledná hodnota < 1 , jde o technické konopí^{3,4}.

Rozšířená je rovněž klasifikace dle chemotypů. Chemotyp I (drogový typ) obsahuje vysoké koncentrace Δ^9 -THC a je psychoaktivní. Chemotyp II (intermediární typ) obsahuje 0,3-1,0% Δ^9 -THC a má pouze malý drogový potenciál v závislosti na poměru Δ^9 -THC/CBD. Chemotyp III (technické konopí) je bez psychoaktivních účinků, obsahuje zejména CBD a má obsah Δ^9 -THC $< 0,3\%$ ^{4,5}. Lehmann⁶ dále popisuje Chemotyp IV, který má kromě vysokého obsahu Δ^9 -THC rovněž vysoký obsah THV. Jedná se o nejméně častý chemotyp původem z jižní Afriky, který rovněž působí psychoaktivně. Poměr jednotlivých kanabinoidů je dán geneticky a je poměrně stabilní⁵. Absolutní obsah se však může měnit v závislosti na klimatu a vnějších faktorech³.

Tabulka č. 1: Rozlišení chemotypů konopí

Chemotyp	Hlavní kanabinoidy	Obsah Δ^9 -THC	Poměr Δ^9 -THC/CBD	Psychoaktivita
Drogový	Δ^9 -THC	> 1 -20 %	2,3-7,4	ano
Intermediární	Δ^9 -THC, CBD	$> 0,3$ -1.0 %	0,5-2,0	ano
Technický	CBD	$< 0,3$ %	0,06-0,5	ne

3.3. Δ^9 -THC

Hlavní farmakologické a psychoaktivní účinky konopí jsou přičítány Δ^9 -THC (trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabinolu). Jeho hlavním prekurzorem v rostlině je Δ^9 -THCA-A (trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabinolová kyselina A), která není psychoaktivní, ale za zvýšené teploty dekarboxyluje na Δ^9 -THC. Farmakologické působení Δ^9 -THC je stereoselektivní. V přírodě se vyskytuje pouze (-)-izomer, který je biologicky mnohem aktivnější než jeho zrcadlový (+)-izomer⁹.

V organismu se Δ^9 -THC rychle hydroxyluje na 11-OH-THC (11-hydroxy-tetrahydrokanabinol), který je dále metabolizován převážně na THC-COOH (11-karboxy-tetrahydrokanabinol). Tato karboxylová kyselina je vyloučena močí v přibližně stejném

množství jako volná a ve formě glukuronidu. Δ^9 -THC a 11-OH-THC jsou psychoaktivní, zatímco THC-COOH nevykazuje žádnou farmakologickou aktivitu¹⁰.

3.4. Toxikologické aspekty

Mezi hlavní účinky Δ^9 -THC na organismus patří navození pocitu pohody a relaxace a prohloubení smyslového vnímání. S předávkováním souvisí zvýšená nervozita a záchvaty úzkosti doprovázené somatickými efekty jako je zvýšení tepové frekvence a zvýšení krevního tlaku¹¹.

Farmakokinetika Δ^9 -THC závisí na způsobu podání. Při inhalaci je maximální plazmatické koncentrace Δ^9 -THC dosaženo do několika minut. Psychotropní účinky se začínají projevovat během sekund až minut, přičemž maxima je dosaženo po 15 až 30 minutách. Účinky odezní v průběhu 2 až 3 hodin. Při orálním podání nastupuje účinek až po 30 až 90 minutách, maxima dosahuje za 2 až 3 hodiny a trvá 4 až 12 hodin v závislosti na dávce¹¹.

Na způsobu užití závisí rovněž minimální dávka Δ^9 -THC nutná pro vyvolání psychotropních účinků. Při inhalaci se za efektivní intoxikační dávku považuje 10 až 20 mg Δ^9 -THC. Pro představu, jedna cigareta marihuany obsahuje 30-50 mg Δ^9 -THC. Orální podání vykazuje větší interindividuální rozdíly v dávce. Obvykle je pro vyvolání účinku nutná dávka 15 až 20 mg Δ^9 -THC⁸. Ovšem přibližně u každého pátého jedince postačí množství 5 mg Δ^9 -THC⁸.

3.5. Legislativa týkající se konopí

V České republice se smí konopí pro technické účely pěstovat od roku 1999 a podléhá Zákonu 167/1998 Sb. o návykových látkách, který zakazuje pěstování druhů a odrůd rostlin konopí, které mohou obsahovat více než 0,3% látek ze skupiny tetrahydrokanabinoidů. Konopí s obsahem nižším než 0,3% je považováno za konopí bez Δ^9 -THC¹⁸. Pěstování konopí na celkové ploše větší než 100 metrů čtverečných přitom podléhá ohlašovací povinnosti.

Pěstování konopí pro technické účely je upraveno rovněž direktivou EU. Maximální povolený obsah Δ^9 -THC v konopí (horní třetině rostliny) byl rozhodnutím Evropské komise snížen z původních 0,5% (1984) na 0,2% (2002)⁷. Například ve Švýcarsku však není pěstování konopí nijak právně regulováno a trestné je pouze zneužívání jeho psychoaktivních účinků⁸.

3.6. Limity pro obsah Δ^9 -THC v potravinách

V souvislosti s rostoucí oblibou tzv. konopných potravin jsou v jednotlivých evropských zemích postupně zaváděny také limity pro obsah Δ^9 -THC v potravinách. Nejdéle se této problematice věnují ve Švýcarsku. V roce 1995 stanovil tamní Bundesamt für Gesundheit tolerovaný příjem Δ^9 -THC na 7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}^8$. Následně byly v letech 1996-1997 stanoveny maximální povolené koncentrace Δ^9 -THC v potravinách. Například: konopný olej 50 mg/kg, konopná semena 20 mg/kg, těstoviny a pečivo 5 mg/kg, lihoviny 5 mg/kg, pivo 0,2 mg/kg a čaje (nálev) 0,2 mg/kg⁸.

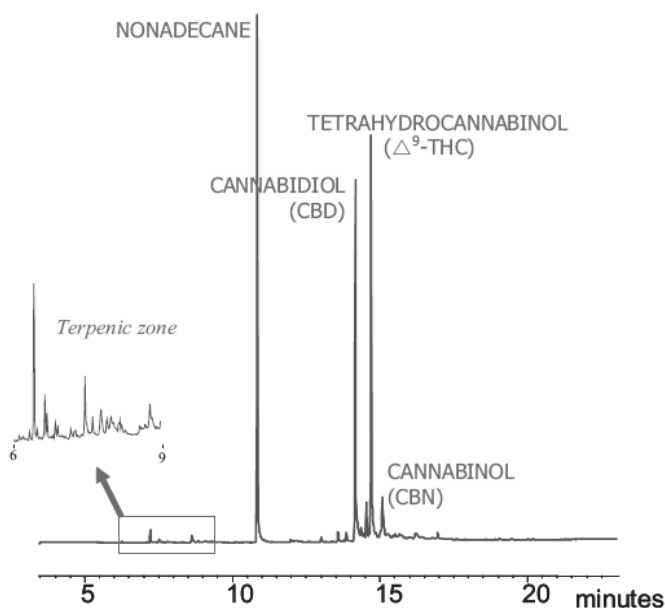
Německý Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin stanovil v roce 1997 tolerovaný příjem Δ^9 -THC na 1-2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{den}^8$. V roce 2000 následovalo doporučení pro obsah Δ^9 -THC v konopných potravinách: alkoholické a nealkoholické nápoje 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, jedlé oleje 5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a ostatní potraviny 150 $\mu\text{g}/\text{kg}^8$.

V České republice lze do oběhu uvádět pouze potraviny obsahující tzv. konopí bez THC (obsah THC < 0,3%) a to se souhlasem a za podmínek Ministerstva zdravotnictví¹⁸.

3.7. Identifikace a stanovení Δ^9 -THC

3.7.1. Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC-MS)

V Evropě je GC-MS jednoznačně nejpoužívanější metodou stanovení Δ^9 -THC a dalších kanabinoidů. Hmotnostní spektra získaná pomocí GC-MS jsou velmi podobná pro kyseliny a jejich odpovídající neutrální kanabinoidy, neboť vysoká teplota přítomná při GC způsobí dekarboxylaci kyselých kanabinoidů na jejich odpovídající neutrální formu. To platí i pro konverzi THCA-A na Δ^9 -THC. Protože konopí obsahuje hlavně kyselé formy kanabinoidů, není GC-MS analýza metodou, kterou by se stanovil metabolický profil kanabinoidního vzorku. Aby se předešlo dekarboxylaci, musí být kyseliny derivatizovány např. pomocí silylace nebo vytvořením alkylboronátu. Přesto je velmi obtížné dosáhnout 100% výtěžnosti. Kromě toho může docházet také k tepelné degradaci (oxidaci, izomerizaci) kanabinoidů v injektorovém portu a na koloně. Výhodou této metody je, že na rozdíl od ostatních chromatografických metod (HPLC, TLC) jsou na GC chromatogramu detekována i významná množství Δ^8 -THC a CBN, které patří mezi degradační produkty Δ^9 -THC¹⁰. GC-MS profil organického extraktu marihuany je znázorněn na obrázku č. 2 na následující straně.



Obrázek č. 2: GC-MS profil organického extraktu marihuany

Výsledkem GC-MS stanovení je tzv. “celkové Δ^9 -THC“, tedy množství původního Δ^9 -THC navýšené o množství Δ^9 -THC vzniklé dodatečně během analýzy z Δ^9 -THCA-A⁸. Direktiva EU z roku 1999 uvádí GC-MS jako oficiální metodu pro stanovení Δ^9 -THC. Právní normy většiny “starých“ členských zemí EU posuzují konopí právě podle obsahu “celkového Δ^9 -THC“. V ČR je však pro hodnocení konopí určující “volné Δ^9 -THC“, z čehož vyplývá nutnost eliminovat vliv Δ^9 -THCA-A na stanovení obsahu Δ^9 -THC¹².

3.7.2. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Tato metoda byla původně vyvinuta ke sledování kompletního kanabinoidního profilu konopí a k identifikaci různých kultivarů. Lehmann⁶ popsal HPLC-DAD stanovení kanabinoidů ve vzorcích marihuany na koloně ODS s využitím gradientové eluce. Mobilní fázi A byla voda obsahující orthofosforečnou kyselinu (8,64 g/l, 85%), fázi B byl acetonitril. UV spektra byla proměřena při 192-350 nm. Kvantifikace Δ^9 -THC byla provedena při 210 nm.

Na výše zmíněný článek navázal Zoller⁸ s cílem nalézt jednoduchou analytickou metodu pro stanovení Δ^9 -THC a Δ^9 -THCA-A v konopných potravinách. Kolonu C18 použil za stejných chromatografických podmínek jako Lehmann⁶. Nově ke kvantifikaci Δ^9 -THC využil za stejných podmínek i fluorescenční detekci s excitační vlnovou délkou 210 nm a

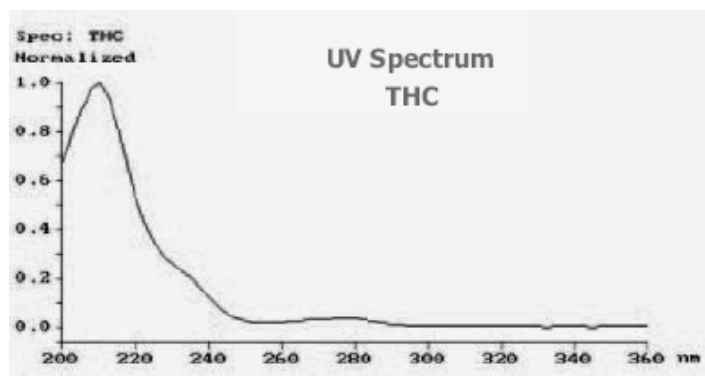
emisní vlnovou délku 305 nm. Použitá excitační vlnová délka byla nižší než optimální excitační vlnová délka (cca 230 nm), ale podle autora vyhovovala požadavkům na citlivost fluorescenční detekce.

Stanovený detekční limit Δ^9 -THC byl 0,01 ng při UV detekci a 0,1 ng při fluorescenční detekci. V kontrastu s UV detekcí se fluorescenční detekce ukázala být méně citlivá, ale velmi selektivní. Ve třech ze čtyřech případů byl pík Δ^9 -THC jediným signálem v časovém okně 5 minut. HPLC-UV a HPLC-FLD výsledky byly porovnány s výsledky získanými GC-MS. Pro všechny testované matrice byly odchylky výsledků třech analytických metod nižší než 15%.

Hazekamp¹⁰ později ověřil dostupná chromatografická data standardů 16 hlavních kanabinoidů s použitím kolony C18. UV spektra byla proměřena v rozsahu 195-400 nm. Fluorescenční spektra byla zaznamenána v rozsahu 280-650 nm po excitaci při 222 nm. Pro kyselé prostředí byla mobilní fází směs methanol-voda obsahující 25 mM kyseliny mravenčí (pH=3) v gradientovém režimu. Pro alkalické prostředí byla mobilní fází směs pufru acetonitrilu a fosforečnanu (10 mM, pH 7,5) rovněž v gradientovém režimu.

Zmíněná studie potvrdila, že relativní eluční časy kyselých kanabinoidů mohou být ovlivněny změnou pH eluentu, zatímco retenční časy neutrálních kanabinoidů zůstávají neměnné. Změna elučního pH tedy může snížit překrývání se píků kyselých a neutrálních kanabinoidů.

Zatímco UV spektra analyzovaných kanabinoidů se s měnícím se pH (3,0-7,5) nemění, fluorescenční spektra některých kanabinoidů se mění velmi výrazně. Kyselé kanabinoidy kompletně ztrácí svoji fluorescenci v kyselém prostředí. CBN nemá vůbec žádné fluorescenční vlastnosti. Fluorescenční vlastnosti Δ^9 -THC však zůstávají v závislosti na pH neměnné. V některých případech však nelze píky identifikovat. Například Δ^8 -THC a Δ^9 -THC mají velmi blízké retenční časy a identická UV i fluorescenční spektra.



Obrázek č. 3: UV spektrum Δ^9 -THC

V případě překrývání HPLC píků může lepší údaje o struktuře a identitě kanabinoidů poskytnout spojení HPLC s MS detekcí (LC-MS) nebo v ideálním případě LC-MS-MS. Kompatibilitu eluentu s MS v kyselém systému (pH=3) zajistí kyselina mravenčí. Vlivem vysoké teploty však může u LC-MS docházet k částečnému termálnímu rozkladu kyselých kanabinoidů¹⁰.

Vlastní HPLC probíhá za pokojové teploty, nedochází proto k termální dekarboxylaci a výsledkem stanovení je "volné Δ^9 -THC". "Celkové Δ^9 -THC" je určeno, pokud je nejprve provedena termální dekarboxylace, která kvantitativně transformuje Δ^9 -THCA-A na neutrální Δ^9 -THC. Druhou možností je simultánní HPLC stanovení Δ^9 -THC a Δ^9 -THCA-A.

3.7.3. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Použitím dvou TLC systémů (polárního a nepolárního) v kombinaci s vhodným detekčním činidlem je možné odlišit a detekovat všechny testované složky. Nedostatek v selektivitě může být překonán použitím selektivního detekčního činidla. Je však téměř nemožné získat dobrou separaci a pozitivní identifikaci všech kanabinoidů, pokud je analyzována komplexní směs tj. rostlinný extrakt. TLC je proto vhodná jako rychlá screeningová metoda pro zjištění přítomnosti kanabinoidů ve vzorku. Identita kanabinoidů vyžaduje ověření další metodou.

Např. Hazekamp¹⁰ používal C18 vrstvu v kombinaci s elučními činidly metanol : 5% kyselina mravenčí (19:1) pro nepolární systém a silikagel s elučními činidly chloroform: metanol (19:1) pro polární systém. Selektivní vizualizace docílil pomocí činidla fast blue B (Sigma).

3.8. Obsah Δ^9 -THC v konopí

3.8.1. Drogové konopí

Podle údajů zveřejněných European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction se v letech 2001 – 2002 se ve zkonfiskovaném konopí pohyboval obsah Δ^9 -THC mezi 1,6 až 15,2 % v marihuaně a 2,0 až 20,6 % v hašiši. Zpráva přitom vycházela z dat poskytnutých jednotlivými členskými zeměmi EU. Ne všechny členské země však používají pro stanovení stejnou metodiku⁴.

Doposud nejrozsáhlejší evropská studie sledující obsah Δ^9 -THC proběhla mezi lety 1993 – 2000 ve Francii⁴. Bylo analyzováno celkem 5 152 vzorků zabavených celníky a policisty. Z tohoto počtu mělo 18% vzorků obsah Δ^9 -THC < 2%. Do roku 1995 mělo 75% marihuany obsah Δ^9 -THC < 5,5% a 47% hašiše obsahovalo 5 – 10% Δ^9 -THC. Od roku 1996 se začal obsah Δ^9 -THC výrazně zvyšovat. V roce 2000 už měla 3% marihuany obsah Δ^9 -THC > 15% a 18% hašiše obsah Δ^9 -THC > 15%. Tento nárůst úzce souvisí s rostoucí profesionalizací pěstitelů konopí.

Výše zmíněné stanovení proběhlo s využitím GC-MS analýzy. Systém se skládal z kolony HP-5 s heliem jako hnacím plynem. Extrakt byl ve směsi metanol:chloroform (9:1). Interním standardem byl Δ^9 -THC⁴.

3.8.2. Technické konopí

V rámci EU se mohou pěstovat pouze schválené kultivary s velmi nízkým obsahem Δ^9 -THC (max. 0,2%). U většiny pěstitelů je obsah Δ^9 -THC v konopí každoročně kontrolován. Pro rutinní analýzy je většinou vyžadováno alespoň 50 vzorků konopí¹³.

Mechtlerova¹³ studie realizovaná v Rakousku prokázala, že analýza jedné rostliny obvykle neposkytuje přesné informace o chemotypu rostliny či varietě. Bylo vybráno 30 – 61 rostlin od každé z pěti legálních variet technického konopí. Jednalo se o moderní jednodomé kultivary, pěstované za stejných podmínek. Před koncem kvetení byly sklizeny horní třetiny rostlin, usušeny a zbaveny semen a stonků. Následovala analýza podle rakouské národní metodiky pro screening Δ^9 -THC.

Bylo prokázáno, že v každé zdánlivě homogenní konopné populaci se může vyskytovat nezanedbatelné množství rostlin, které se svým obsahem Δ^9 -THC výrazně vymykají. Hodnoty obsahu Δ^9 -THC v jednotlivých rostlinách se většinou pohybovaly v intervalu 0,02% až 0,15%. Nejednalo se však o gausovské rozdělení. U třech z pěti variet se vyskytlo určité procento vzorků (3%, 6% a 7%), které mělo obsah Δ^9 -THC výrazně vyšší (0,24-0,62%).

Obsah Δ^9 -THC byl určen metodou GC-MS s využitím kolony HP-5MS s heliem jako mobilní fází. Analyzován byl hexanový rostlinný extrakt s interním standardem 4-androsten-3,17-dionem¹³.

Avico³ uvádí, že obsah Δ^9 -THC v technickém konopí významně závisí na klimatických podmínkách v místě kultivace. Analyzoval celkem 50 vzorků samčích a 50 vzorků samičích rostlin (horní třetina rostliny) kultivaru pěstovaného v přímořské oblasti Itálie. Obsah Δ^9 -THC se jak u samčích tak u samičích rostlin pohyboval mezi 0-0,04%. U stejného množství vzorků této odrůdy pocházející z vnitrozemí severní Itálie byl obsah Δ^9 -THC 0,12-0,16% u samčích rostlin a 0,20-0,24% u samičích rostlin.

Použitý GC-MS systém se skládal z kolony OV 17 a helia jako nosného plynu. Analyzován byl chloroformový rostlinný extrakt.

3.8.3. Konopná semena

Stopy kanabinoidů jsou výsledkem kontaminace semen kanabinoidními látkami, které pocházejí z jiných, na kanabinoidy bohatých částí rostliny. Množství Δ^9 -THC v semenech proto záleží na fenotypu rostliny (drogová, technická) a na stupni kontaminace při sklizni. Největší množství Δ^9 -THC se nachází na povrchu semen a pouze velmi malé koncentrace pak uvnitř semen^{14, 15}.

Metodou GC-MS bylo v Rossově studii¹⁴ zjištěno, že semena drogového konopí mají výrazně vyšší obsah Δ^9 -THC (35,6-124 mg/kg) než semena technického konopí (0,12 mg/kg). Přibližně 90% celkového obsahu Δ^9 -THC bylo odstraněno promytím chloroformem. Omytá semena drogového typu obsahovala méně než 10 mg/kg Δ^9 -THC. Oddělení vnějšího obalu semene a vlastního semene ukázalo, že většina Δ^9 -THC je ve vnějším obalu. Obsah Δ^9 -THC na povrchu vlastních semen byl méně než 2 mg/kg u drogového a méně než 0,5 mg/kg u technického konopí¹⁴.

3.9. Obsah Δ^9 -THC v potravinách

Jednotná analytická metodika pro rutinní stanovení Δ^9 -THC v potravinách není doposud k dispozici. Většina popsaných metod je založena na GC-MS analýze, která byla vyvinuta pro potřeby forensního stanovení Δ^9 -THC v marihuaně a hašiši. Výsledkem těchto metod je obvykle “celkové Δ^9 -THC“.

Zejména v prvních letech po uvedení konopných potravin na evropský trh byly hlášeny intoxikace po požití konopného oleje. Švýcarské laboratoře zaznamenaly v polovině 90. let případy, kdy konopný olej obsahoval dokonce 1500 mg/kg a 3568 mg/kg Δ^9 -THC, zatímco tamní limit je 50 mg/kg. Byly překračovány limity i pro další potraviny. Zmíněné

produkty zjevně pocházely z drogového konopí. Používání pouze v EU schválených odrůd semen a zvýšené kontroly u výrobců vedly k významnému snížení obsahu Δ^9 -THC v konopných potravinách¹⁶.

Německý Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt¹⁶ analyzoval v roce 2004 nejprve 19 konopných potravin. V 15 výrobcích bylo detekováno Δ^9 -THC, zatímco ve zbylých 4 výrobcích nebylo Δ^9 -THC přítomno. Obsah Δ^9 -THC přitom převýšil doporučený limit 0,15 mg/kg pro tzv. ostatní potraviny v případě konopných semen a konopné mouky (0,29-1,07 mg/kg). Jeden vzorek konopného oleje s 11,48 mg/kg Δ^9 -THC rovněž překročil limit 5 mg/kg. Převážná většina vzorků však vykazovala podlimitní hodnoty Δ^9 -THC v rozsahu 0,01-4,44 mg/kg.

Tyto výsledky byly potvrzeny i další studií zmíněného úřadu¹⁶. Z celkového množství 30 vzorků byl doporučený limit Δ^9 -THC překročen jen v ojedinělých případech. Konkrétně obsah Δ^9 -THC ve vzorcích konopného čaje byl 4,37-15,53 mg/kg v konopných listech a 0,04 až 0,23 mg/kg v čajovém nálevu překračující německou normu pro nápoje.

Podle Lachenmeiera¹⁶, který v roce 2005 analyzoval více než 100 vzorků, je v současnosti maximální obsah Δ^9 -THC v potravinách 10-100 krát nižší než v 90. letech. Uvádí významný lineární pokles koncentrace Δ^9 -THC v konopném čaji a konopném oleji. V případě konopných semen však nebyl tento pokles prokázán¹⁶.

4. Experimentální část

4.1. Podmínky experimentální části

4.1.1 Přístroje a ostatní vybavení

a) Přístrojové vybavení

Fluorescenční detektor RF-A_{XL}, Shimadzu

Vysokotlaké čerpadlo LC-10AD_{VP}, Shimadzu

Stanice CSW 1.7, DataApex

Injektor, Rheodyne

Dávkovací smyčka 20 μ l, Supelco

Kolona Discovery C18 HS (250 mm \times 4,6 mm, 5 μ m), Supelco

Analytické váhy, Helago

Magnetická míchačka, Laboratorní přístroje Praha

Horkovzdušná sušárna

b) Chemikálie

Ultračistá voda, FaF UK

Metanol pro HPLC, Lach-Ner

n-hexan pro organickou stopovou analýzu, Chromservis

Standard Δ^9 -THC, Alltech – Applied Science

Stlačené helium, Linde Technoplyn

Stačený dusík, Linde Technoplyn

c) Pomůcky

Hamiltonova stříkačka

Laboratorní teploměr

PTFE filtr 0,22 μ m

Mikropipeta 100-1000 μ l, Biohit

Mikropipeta 20-100 μ l, Biohit

Laboratorní sklo

4.1.2. Podmínky HPLC analýzy

Kalibrační roztoky, roztoky standardů a vzorky jsem proměřovala za následujících podmínek: kolona **Discovery C18 HS (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) Supelco**, **mobilní fáze MeOH:H₂O 9:1**, **průtok mobilní fáze 1 ml/min**, **detekce fluorescenčním detektorem 222/317 nm**. Pomocí Hamiltonovy stříkačky jsem nastříkovala kalibrační roztoky, roztoky standardů a vzorky na kolonu a podrobila je HPLC analýze. Teplota v laboratoři se pohybovala mezi 20°C až 31,5°C.

4.1.3. Příprava mobilní fáze

V průběhu všech měření byla používána mobilní fáze MeOH:H₂O 9:1 vzniklá smísením metanolu pro HPLC a ultračisté vody v uvedeném poměru. Před a v celém průběhu analýzy byla mobilní fáze probublávána heliem s cílem odstranit v ní rozpuštěné plyny. Vzhledem k vysokým teplotám v laboratoři byla obava, že se toto rozpouštědlo postupně odpařuje, proto s cílem zamezit změnám poměrů mobilní fáze byla pro každou testovanou úroveň citlivosti připravena nová mobilní fáze, která byla následně používána pro všechny analýzy při dané citlivosti (obvykle 2 dny).

4.1.4 Nastavení citlivosti detektoru

Fluorescenční detektor Shimadzu RF-A_{XL} nabízí rozsáhlé možnosti volby citlivosti pomocí nastavení parametrů SENS (citlivost) a GAIN (zesílení) jak je uvedeno v tabulce č. 2.

SENS	GAIN	Zvýšení citlivosti
3 (nízká)	1 (×1)	× 1
3 (nízká)	2 (×4)	× 4
3 (nízká)	3 (×16)	× 16
2 (střední)	1 (×1)	× 32
2 (střední)	2 (×4)	× 128
2 (střední)	3 (×16)	× 512
1 (vysoká)	1 (×1)	× 1024
1 (vysoká)	2 (×4)	× 4096
1 (vysoká)	3 (×16)	× 16384

Tabulka č. 2: Možnosti nastavení citlivosti fluorescenčního detektoru Shimadzu RF-A_{XL}

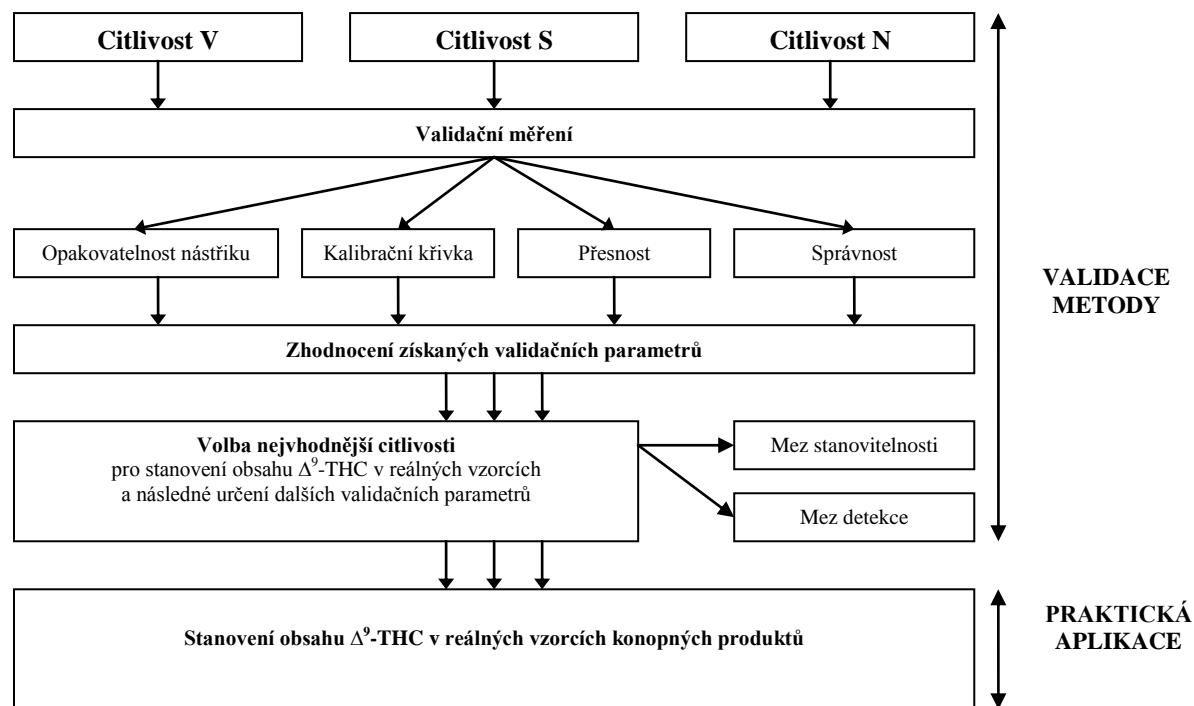
Orientačním nástřikem vzorků standardu Δ^9 -THC v metanolu o známé koncentraci jsem hledala takové nastavení citlivosti fluorescenčního detektoru, které by umožnilo stanovení Δ^9 -THC o koncentracích řádově v jednotkách $\mu\text{g/ml}$ a nižších. Podmínkou byla rovněž co možná nejstabilnější základní linie bez přílišného šumu.

Jako nejlepší se jevila střední úroveň citlivosti. Zvolila jsem proto tři nevhodnější nastavení citlivosti a při každém z nich provedla validační měření se vzorky standardu Δ^9 -THC. Jednalo se o následující nastavení citlivosti:

1. **SENS 2, GAIN 3**, v dalším textu uváděnou jako vysokou citlivost, **citlivost V**
2. **SENS 2, GAIN 2**, v dalším textu uváděnou jako střední citlivost, **citlivost S**
3. **SENS 2, GAIN 1**, v dalším textu uváděnou jako nízkou citlivost, **citlivost N**

4.1.5. Postup při validaci metody a její praktické aplikaci

Pro zvolené citlivosti (citlivost V, S, N) jsem provedla validační měření a na základě výsledků těchto měření jsem zvolila tu citlivost, která se jevila nejpřesnější a nejsprávnější pro stanovení obsahu Δ^9 -THC v reálných vzorcích konopných produktů. Schematický postup při validaci metody a následné aplikaci na reálné vzorky je znázorněn na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Schematický postup při validaci metody a následné praktické aplikaci na reálné vzorky

4.2. Validace metody

4.2.1. Příprava vzorků standardu

Ze zásobního roztoku standardu Δ^9 -THC v metanolu (1000 $\mu\text{g/ml}$) jsem nejprve připravila metanoličtý roztok Δ^9 -THC o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ tak, že jsem odpipetovala 50 μl standardu Δ^9 -THC a doplnila 950 μl metanolu na celkový objem 1000 μl . Ze zásobního roztoku Δ^9 -THC o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ a jeho postupným ředěním metanolem jsem připravila další roztoky o požadovaných koncentracích. Všechny vzorky byly uchovávány v chladničce.

4.2.2. Kalibrační křivka Δ^9 -THC

Kalibrační křivka vyjadřuje závislost odezvy detektoru na známé koncentraci standardu Δ^9 -THC (v $\mu\text{g/ml}$). Pro každou úroveň citlivosti detektoru jsem sestavila kalibrační křivku na základě proměření série pěti kalibračních roztoků standardu Δ^9 -THC v metanolu. Koncentrace roztoků byly voleny tak, aby rovnoměrně pokryly celý detekční rozsah při dané citlivosti detekce.

4.2.3. Opakovatelnost nástřiku

Pro každou úroveň citlivosti byla testována opakovatelnost nástřiku. Roztok o známé koncentraci standardu Δ^9 -THC připravený postupným ředěním zásobního roztoku standardu Δ^9 -THC v metanolu (50 $\mu\text{g/ml}$) byl celkem desetkrát po sobě nastříknut na HPLC kolonu a zaznamenán retenční čas a plocha chromatografického píku. Série deseti nástřiků byla s tímž roztokem zopakována rovněž následující den.

4.2.4. Přesnost

Pro každou úroveň citlivosti byla na základě proměření série pěti roztoků o téže koncentraci standardu Δ^9 -THC stanovena přesnost měření pro tři koncentrační hladiny. Koncentrace roztoků byly voleny tak, aby přibližně pokryly horní limit stanovitelnosti, střed

a dolní limit stanovitelnosti při dané citlivosti detekce. Ze získaných hodnot byla určena přesnost jako směrodatná odchylka měření retenčního času a plochy píku.

4.2.5. Správnost

Pro každou úroveň citlivosti byla určena správnost měření pro oblast horního limitu stanovitelnosti, středu a dolního limitu stanovitelnosti. Pomocí kalibrační křivky pro danou úroveň citlivosti byla každému ze vzorků standardu Δ^9 -THC, které byly analyzovány dle bodu 4.2.4. přiřazena hodnota koncentrace Δ^9 -THC. Následně byla porovnána skutečná koncentrace vzorku a koncentrace vzorku určená pomocí kalibrační křivky. Správnost jako odchylku naměřené koncentrace vzorku od jeho správné koncentrace jsem vypočítala podle následujícího vzorce:

$$\text{Správnost (\%)} = \frac{\text{odchylka od skutečné koncentrace}}{\text{skutečná koncentrace}} \times 100$$

4.2.6. Mez stanovitelnosti a mez detekce

Pro citlivost S byly určeny mez stanovitelnosti a mez detekce Δ^9 -THC v metanolu. Na HPLC kolonu byl pomocí Hamiltonovy stříkačky pětkrát po sobě nastříknut vzorek čistého metanolu a analyzován. Na každém chromatografickém záznamu byla v intervalu od 4. minuty do 15. minuty nalezena maximální výška šumu a minimální výška šumu a jejich hodnota v mV zaznamenána. Uvedený časový interval byl volen s ohledem na retenční čas standardu Δ^9 -THC v metanolu, který se v závislosti na vnějších podmínkách pohyboval mezi 9.-10. minutou. Z daných hodnot byla určena průměrná hodnota šumu chromatografického záznamu v mV podle následujícího vzorce:

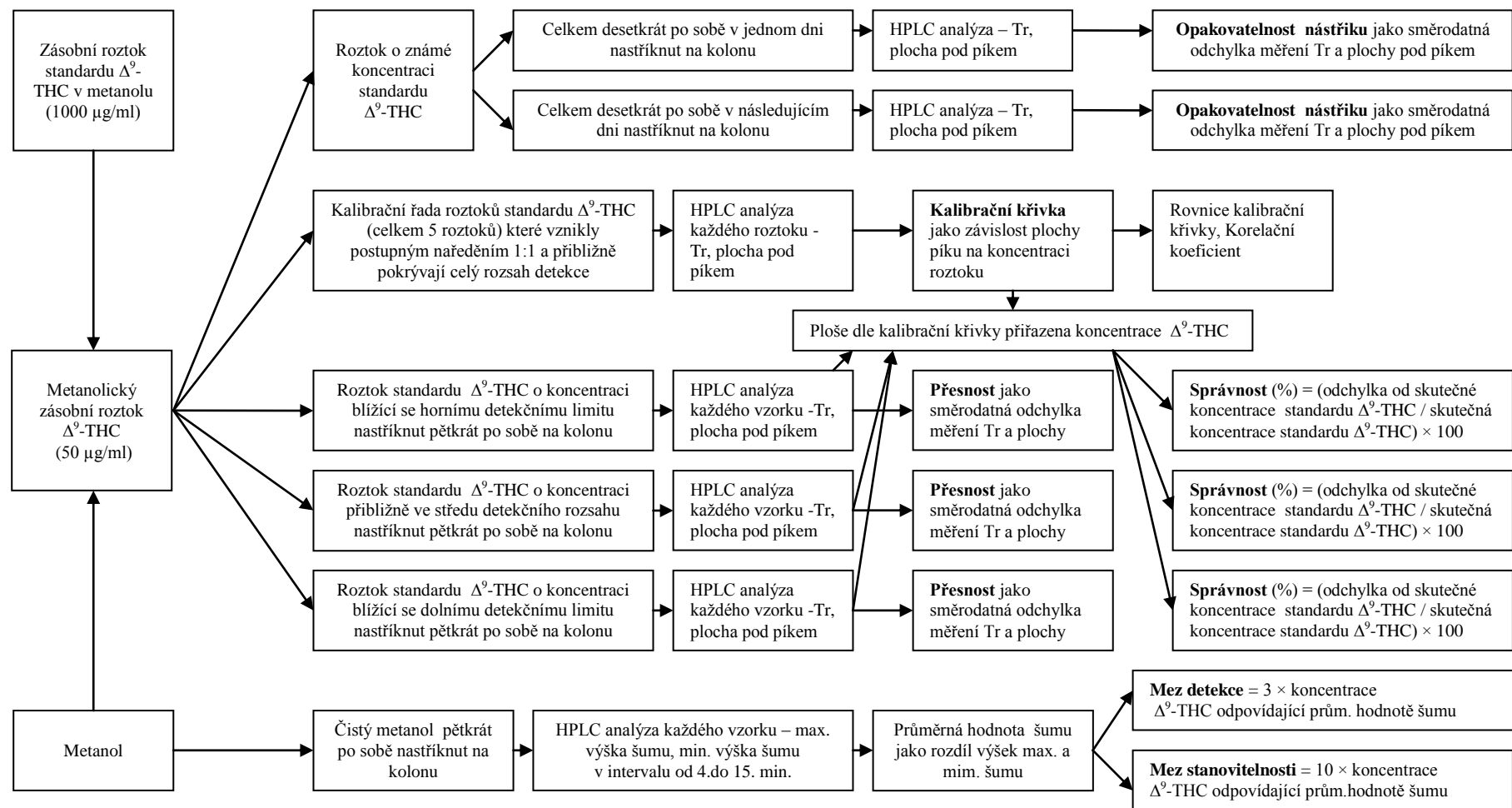
$$\text{Průměrná hodnota šumu} = \frac{\sum (\text{max. výška šumu} - \text{min. výška šumu})}{\text{počet měření}}$$

Této hodnotě byla pomocí kalibrační křivky pro citlivost S přidělena přesná koncentrace Δ^9 -THC. **Mez detekce Δ^9 -THC** v metanolu (v $\mu\text{g/ml}$) je definována jako trojnásobek koncentrace Δ^9 -THC, která odpovídá průměrné hodnotě šumu. **Mez stanovitelnosti Δ^9 -THC**

v metanolu (v $\mu\text{g/ml}$) je definována jako desetinásobek koncentrace $\Delta^9\text{-THC}$, která odpovídá průměrné hodnotě šumu.

Pro potřeby tohoto stanovení musely být upraveny parametry kalibrační křivky. Na místo původní závislosti plochy chromatografického píku (mV.s) na koncentraci kalibračního roztoku byla zvolena závislost výšky chromatografického píku (mV) na koncentraci kalibračního roztoku. Schematický postup stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti i ostatních validačních parametrů je znázorněn na obrázku č. 5 na následující straně.

Obrázek č. 5: Schematický postup při validačních měřeních pro zvolenou citlivost



4.2.7. Validační měření pro jednotlivé citlivosti

Citlivost V

Nejprve jsem nastříkala vzorky o různých koncentracích s cílem orientačně určit horní limit stanovitelnosti. Následně jsem z roztoku standardu Δ^9 -THC o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ (viz. 4.2.1.) připravila zkušební roztoky. Odebrala jsem 80 μl vzorku a přidala 920 μl metanolu. Takto vzniklo 1000 μl roztoku standardu Δ^9 -THC o koncentraci 4 $\mu\text{g/ml}$. Jeho následným ředěním metanolem v poměru 1:1 byla připravena koncentrační řada 2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ a 0,25 $\mu\text{g/ml}$.

Tyto roztoky byly použity jako roztoky kalibrační pro přípravu kalibrační křivky Δ^9 -THC a koncentrace 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$ rovněž jako roztoky pro validační měření přesnosti a správnosti. Opakovatelnost nástřiku byla prováděna se vzorkem 1 $\mu\text{g/ml}$.

Nejprve byla proměřena celá kalibrační řada, následovalo měření sérií roztoků pro validaci. Ve dvou po sobě jdoucích dnech byla testována opakovatelnost nástřiku. Teplota v laboratoři nebyla sledována.

Citlivost S

Ze zásobního roztoku standardu Δ^9 -THC o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, který byl připraven v pro předchozí měření, jsem odpipetovala 250 μl a doplnila 750 μl metanolu. Vzniklo tak 1000 μl roztoku Δ^9 -THC o koncentraci 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Jeho naředěním metanolem v odpovídajícím poměru byly připraveny roztoky o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a 8 $\mu\text{g/ml}$, z kterého vznikla následným ředěním metanolem v poměru 1:1 koncentrační řada 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$.

Výše zmíněné roztoky byly použity jako roztoky kalibrační pro přípravu kalibrační křivky Δ^9 -THC a koncentrace 10 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$ rovněž jako roztoky pro validační měření přesnosti a správnosti. Opakovatelnost nástřiku byla prováděna se vzorkem o koncentraci 2 $\mu\text{g/ml}$.

Nejprve byla proměřena celá kalibrační řada, následovalo měření sérií roztoků pro validaci. Ve dvou po sobě jdoucích dnech byla testována opakovatelnost nástřiku. Průběžně byla sledována laboratorní teplota.

Vzhledem k tomu, že kalibrační roztoky byly měřeny při teplotách 24-25,5°C, zatímco při validačních měřeních dosahovala teplota v laboratoři až 31°C, byla obava, zda tento fakt neovlivní výsledky měření. Připravila jsem proto novou řadu roztoků Δ^9 -THC o koncentracích

12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,5625 µg/ml a 0,78125 µg/ml. Roztok o koncentraci 12,5 µg/ml vznikl odpipetováním 250 µl zásobního roztoku standardu Δ^9 -THC o koncentraci 50 µg/ml a doplněním 750 µl metanolu na objem 1000 µl. Ředěním metanolem v poměru 1:1 vznikly ostatní roztoky.

Tyto roztoky byly použity jako roztoky kalibrační pro přípravu nové kalibrační křivky Δ^9 -THC a koncentrace 12,5 µg/ml, 3,125 µg/ml a 1,5625 µg/ml rovněž jako roztoky pro nové validační měření přesnosti a správnosti. Snažila jsem se, aby kalibrační roztoky a roztoky pro validační měření byly měřeny při stejné teplotě. Laboratorní teplota se stabilně pohybovala mezi 23,5-24,5°C. Opakovatelnost nástřiku nebyla zopakována.

Citlivost N

Z testovaných hladin citlivosti se jedná o tu nejméně citlivou. Nejprve jsem se snažila zjistit přibližný rozsah při této citlivosti, tedy horní a spodní hranici detekce.

Na základě těchto orientačních nástřiků jsem si ze zásobního roztoku standardu Δ^9 -THC (1000 µg/ml) připravila metanolický roztok Δ^9 -THC o koncentraci 50 µg/ml. Odpipetovala jsem 50 µl standardu Δ^9 -THC doplnila 950 µl metanolu. Následným ředěním v poměru 1:1 vznikla řada roztoků: 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml a 1,5625 µg/ml.

Tyto roztoky byly použity jako roztoky kalibrační pro přípravu kalibrační křivky Δ^9 -THC a koncentrace 50 µg/ml, 12,5 µg/ml a 3,125 µg/ml rovněž jako roztoky pro validační měření přesnosti a správnosti. Opakovatelnost nástřiku byla prováděna se vzorkem 3,125 µg/ml.

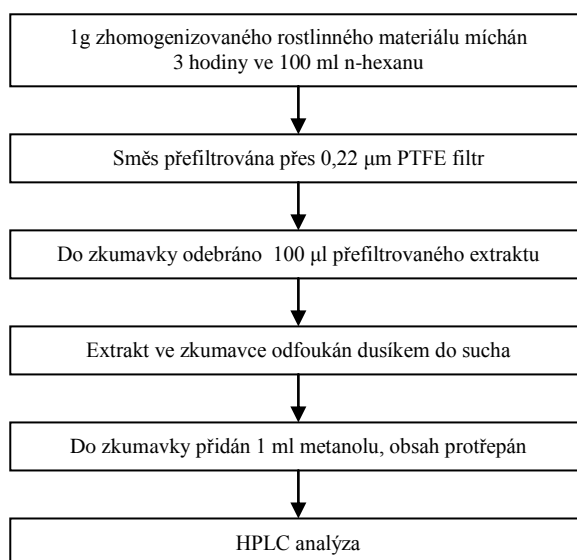
Snažila jsem se, aby kalibrační roztoky a roztoky pro validační měření byly měřeny při stejné teplotě. Opakovatelnost nástřiku byla provedena ve dvou po sobě následujících dnech. Laboratorní teplota se pohybovala stabilně mezi 23-24°C.

4.3. Praktická aplikace na reálné vzorky

4.3.1. Příprava extraktu a vzorku

Po nezbytném zhomogenizování materiálu: (rozdrcení semen, rozstříhání tkaniny, viz. jednotlivá měření) jsem vycházela z metodiky, která se osvědčila v diplomové práci J. Myšíkové¹², která stanovovala obsah kanabinoidů v drogovém konopí. Odvážila jsem 1g materiálu a vsypala do 100 ml n-hexanu. Vzniklá směs byla v uzavřené Erlenmayerově baňce 3 hodiny promíchávána na magnetické míchačce. Směs jsem následně přefiltrovala přes PTFE filtr o velikosti pórů 0,22 μm . V případě většího množství nečistot tomuto kroku předcházela filtrace pomocí papírového skládaného filtru.

Z přefiltrovaného n-hexanového extraktu jsem do zkumavky mikropipetou odpipetovala 100 μl a toto množství odfoukla do sucha pomocí dusíku. Přidala jsem 1 ml metanolu a obsah zkumavky jsem protřepala. Tímto jsem získala vzorek, který jsem následně nastříkla na HPLC kolonu pomocí Hamiltonovy stříkačky. Postup přípravy extraktu a vzorku je schematicky znázorněn na obrázku č. 6. Přípravovala jsem vždy dvě zkumavky se vzorkem. V případě, že jsem se o tohoto postupu jakkoli odchýlila, tzn. použila jinou navážku nebo jiný objem přefiltrovaného n-hexanového extraktu, vše jsem v textu uvedla.



Obrázek č. 6: Schematický postup přípravy extraktu a vzorku

4.3.2. Výpočet obsahu Δ^9 -THC v reálném vzorku

Při stanovení obsahu Δ^9 -THC konopí, které jsem prováděla dle výše uvedeného postupu, jsem obsah Δ^9 -THC v konopí vyjádřený v hmotnostních procentech vypočítávala dle následujícího vzorce:

$$\% = \frac{c \cdot zř \cdot 100}{n}$$

zř.....zředění, tj. poměr objemu n-hexanu použitého na přípravu extraktu z konopí ku objemu extraktu použitého na přípravu vzorku. Tento podíl se následně vynásobí objemem metanolu použitým na rozpuštění odparku vzorku

n..... navážka konopí v μg

c.....koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$) odečtená z kalibrační křivky

4.3.3. Reálné vzorky

Čerstvá rostlina

Z čerstvě utržené natě byla využita vrcholová část tvořená drobnými listy, květními šišticemi a částečně semeny. Vzorek byl rozstříhán nadrobno a dále rozmělněn v třecí misce. Navážka čerstvé drogy 4,608 g byla zpracována postupem dle bodu 4.3.1. a vzorky podrobeny HPLC analýze.

Pro úplnost dodávám, že zmiňovaná rostlina byla vypěstovaná ze semena technické odrůdy konopí, které jsem zakoupila v prodejně zdravé výživy (Konopná semena BIO 200g, syrová, nepražená, datum spotřeby do 31.12. 2008, země původu Rakousko, distributor pro ČR Liveon s.r.o.)

Sušená rostlina A

Vzorek drogy pocházel ze stejné rostliny jako čerstvá rostlina a zastoupení drobných listů, květních šištic a semen bylo obdobné. Navážka 4,683 g čerstvé rostliny byla umístěna 90 minut v sušárně při teplotě 55°C. Hmotnost drogy po usušení byla 2,292 g. Droga byla rozmělněna v třecí misce a navážka 1,004 g následně zpracována postupem dle bodu 4.3.1. Odpipetovala jsem však 200 μl extraktu a toto množství odfoukla do sucha pomocí dusíku. Přidala jsem 1 ml metanolu a vzorky byly podrobeny HPLC analýze.

Sušená rostlina B

Vzorek drogy pocházel z téže čerstvé rostliny jako čerstvá rostlina a sušená rostlina A a byl zpracován obdobně. Dále byl dva dny umístěn na světle při teplotách do 27°C a následně sušen 20 minut v sušárně při teplotě 100°C. Vzorek byl rozdrobňen v třecí misce. Navážka 0,750 g byla použita pro přípravu extraktu dle bodu 4.3.1., odfoukla jsem však 500 µl extraktu a připravené vzorky podrobila HPLC analýze.

Konopná vlákna

Bylo použito instalatérské konopí, výrobce VAF Přerov s.r.o., Přerov. Vlákna jsem rozstříhala na co nejmenší kousky, aby nedocházelo k jejich zacuchání, které by znemožňovalo míchání v n-hexanu. Následně jsem připravila extrakt postupem dle bodu 4.3.1. s tím rozdílem, že navážka činila 2,009 g.

Z přefiltrovaného n-hexanového extraktu jsem do dvou zkumavek mikropipetou odpipetovala 100 µl a toto množství odfoukla do sucha pomocí dusíku. Přidala jsem 1 ml metanolu, obsah zkumavek jsem protřepala a analyzovala. Vzhledem k tomu, že koncentrace se ukázala být pod hranicí detekce, odebrala jsem následně z n-hexanového extraktu do dvou zkumavek po 800 µl. Tento objem jsem odfoukla dusíkem do sucha, přidala 1 ml metanolu, zkumavky protřepala a podrobila HPLC analýze.

Konopná tkanina

Ke stanovení obsahu Δ^9 -THC v tkanině byla zakoupena konopná peněženka z přírodní, nebarvené hrubě tkané látky Pure Hemp, země původu Nepál, distributor pro ČR Orient s.r.o.

Tkaninu jsem nadrobno rozstříhala a 3,018 g jsem použila pro přípravu extraktu dle bodu 4.3.1.. Z přefiltrovaného n-hexanového extraktu jsem do dvou zkumavek odpipetovala po 300 µl a po odfoukání a doplnění metanolem na 1 ml jsem vzorky podrobila HPLC analýze.

Konopná semena

Ke stanovení obsahu Δ^9 -THC byla použita Konopná semena BIO 200g, syrová, nepražená, datum spotřeby do 31.12. 2008, země původu Rakousko, distributor pro ČR Liveon s.r.o..

Semena jsem nadrobno rozmělnila v třecí misce a 20,004 g homogenního vzorku jsem míchala v 50 ml n-hexanu. Po 3 hodinách míchání se jasně oddělila vrstva pevných zbytků semen, n-hexanová vrstva a vrstva konopného oleje. Vzhledem k velkému množství balastů jsem před použitím PTFE filtru směs nejprve přefiltrovala přes skládaný filtr. Do dvou zkumavek jsem mikropipetou nanesla po 500 μ l filtrátu. Vzorek se nepodařilo odfouknout dusíkem do sucha. Na dně zkumavek zůstalo přibližně 100 μ l oleje, ke kterému jsem přidala 1 ml metanolu a zkumavku protřepala. Následovala HPLC analýza.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Testování způsobilosti metody

5.1.1. Citlivost V

Opakovatelnost nástřiku

Cílem bylo zjistit, jak se při **citlivosti S** liší hodnoty retenčních časů a ploch chromatografických píků ve 2 sériích HPLC analýz 10 vzorků standardu Δ^9 -THC v metanolu o koncentraci **1 $\mu\text{g/ml}$** . Výsledky HPLC analýz obou sérií vzorků jsou uvedeny v tabulkách č. 3 a 4.

Tabulka č. 3: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **1 $\mu\text{g/ml}$**

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
1	9,63	7053,7
2	9,63	7884,9
3	9,68	6645,4
4	9,55	7311,9
5	9,59	7682,5
6	9,60	7590,9
7	9,57	7105,8
8	9,62	7637,5
9	9,62	7186,4
10	9,58	7553,1
Průměr	9,61	7365,2
SD	0,04	372,43
RSD (%)	0,41	5,06

Tabulka č. 4: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **1 $\mu\text{g/ml}$**

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
1	9,39	7136,3
2	9,38	7013,2
3	9,41	7653,1
4	9,41	7492,4
5	9,39	6996,3
6	9,45	7548,2
7	9,65	7906,6
8	9,57	7561,0
9	9,40	7587,6
10	9,41	7779,6
Průměr	9,45	7467,4
SD	0,09	314,99
RSD (%)	0,95	4,22

Obě série měření poskytly obdobné výsledky. Δ^9 -THC je charakterizován stabilním retenčním časem se zanedbatelnými odchylkami. Relativní směrodatné odchylky ploch píků do 5% představovali rovněž dobrý předpoklad pro další validační měření.

Kalibrační křivka č. 1

Pro potřeby validačních měření stejně jako pro určení množství Δ^9 -THC v reálných vzorcích bylo nutné pro **citlivost V** sestavit kalibrační křivku Δ^9 -THC. Jako kalibrační roztoky byly použity roztoky standardu Δ^9 -THC v metanolu o koncentracích **4 $\mu\text{g/ml}$** , **2 $\mu\text{g/ml}$** , **1 $\mu\text{g/ml}$** , **0,5 $\mu\text{g/ml}$** , a **0,25 $\mu\text{g/ml}$** .

Kalibrační křivka č. 1 (viz. obrázek č. 7 v Přílohách) vystihuje závislost plochy chromatografického píku (mV.s) na koncentraci roztoku standardu Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$). **Rovnice kalibrační křivky č. 1 je: $y = 6983,06x - 812,419$ s hodnotou korelačního koeficientu 0,997642.** Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků pro kalibrační křivku č. 1 jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků Δ^9 -THC pro kalibrační křivku č.1

Koncentrace Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
4	9,59	27519,0
2	9,45	12696,3
1	9,43	5129,9
0,5	9,43	3016,2
0,25	9,60	1695,3

Přesnost a správnost

Cílem bylo u 3 sérií roztoků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ a 0,25 $\mu\text{g/ml}$** zjistit při **citlivosti V** odchylky plochy píku a odchylky naměřené koncentrace od skutečné koncentrace Δ^9 -THC. K plochám chromatografických píků byla přiřazena koncentrace Δ^9 -THC pomocí **kalibrační křivky č. 1**. Výsledky HPLC analýz vzorků včetně statistického vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách č. 6,7,8,9.

Tabulka č. 6: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **4 $\mu\text{g/ml}$** a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,34	24784,1	3,67	8,36
2	9,35	25528,7	3,77	5,70
3	9,35	25740,4	3,80	4,94
4	9,39	25564,4	3,78	5,57
5	9,38	25909,7	3,83	4,33
Průměr	9,36	25505,5	-	5,78
SD	0,02	430,96	-	-
RSD (%)	0,21	1,69	-	-

Tabulka č. 7: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **2 $\mu\text{g/ml}$** a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,45	13128,9	1,99	0,18
2	9,64	14934,1	2,26	12,75
3	9,49	14329,0	2,17	8,42
4	9,46	14275,5	2,16	8,03
5	9,45	14179,6	2,15	7,35
Průměr	9,50	14169,4	-	7,35
SD	0,08	652,72	-	-
RSD (%)	0,84	4,61	-	-

Tabulka č. 8: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **1 $\mu\text{g/ml}$** a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,46	6084,9	0,99	1,23
2	9,41	5644,8	0,92	7,53
3	9,42	5718,3	0,94	6,48
4	9,37	6655,3	1,07	6,94
5	9,45	55578,9	0,92	8,47
Průměr	9,42	5936,4	-	6,13
SD	0,04	446,99	-	-
RSD (%)	0,42	7,53	-	-

Tabulka č. 9: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **0,25 $\mu\text{g/ml}$** a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,87	2000,8	0,40	61,16
2	9,71	1875,6	0,38	53,96
3	9,67	2039,8	0,41	63,40
4	9,62	2059,2	0,41	64,48
5	9,53	1871,0	0,38	53,72
Průměr	9,68	1969,3	-	59,34
SD	0,12	90,11	-	-
RSD (%)	1,24	4,58	-	-

Pro tuto citlivost měření se hodnoty relativní směrodatné odchylky plochy píku a stejně tak hodnoty průměrné odchylky naměřené koncentrace od skutečné koncentrace Δ^9 -THC pro koncentrace 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, a 1 $\mu\text{g/ml}$ pohybují mezi 4,5% až 7,5%. Jsou tak splněny požadavky na přesnost i správnost metody, neboť maximální přípustná odchylka pro tyto validační parametry je podle Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation (2001)¹⁷ 15%. Z tabulky č. 9 je však patrné, že stanovení koncentrace 0,25 $\mu\text{g/ml}$ již není při této citlivosti spolehlivé, protože správnost je jen 59%.

5.1.2. Citlivost S

Opakovatelnost nástřiku

Cílem bylo při **citlivosti S** zjistit, jak se liší hodnoty retenčních časů a ploch píků ve 2 sériích 10 HPLC analýz vzorků standardu Δ^9 -THC v metanolu o koncentraci **2 $\mu\text{g/ml}$** . Výsledky HPLC analýz obou sérií vzorků jsou uvedeny v tabulkách č. 10, 11.

Tabulka č. 10: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **2 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 26-28°C

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
1	10,02	4448,7
2	9,80	4721,6
3	9,78	4151,1
4	9,83	3839,7
5	9,71	3946,6
6	9,68	3624,6
7	9,63	4033,1
8	9,65	3849,2
9	9,61	3960,2
10	9,59	4248,2
Průměr	9,73	4082,3
SD	0,13	322,11
RSD (%)	1,34	7,89

Tabulka č. 11: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **2 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 30-30,5°C

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
1	9,34	3744,0
2	9,36	3641,9
3	9,35	4042,3
4	9,30	4244,1
5	9,37	3763,8
6	9,33	4250,6
7	9,37	4035,6
8	9,36	3797,4
9	9,33	4017,1
10	9,33	3998,3
Průměr	9,35	3953,5
SD	0,03	209,43
RSD (%)	0,32	5,30

Relativní směrodatné odchylky retenčního času i plochy píku se u obou sérií poměrně liší. Přesto však můžeme retenční čas Δ^9 -THC považovat za stabilní, neboť i hodnota RSD 1,34% je velmi nízká. Rovněž odchylky plochy, řádově v jednotkách procent, nepředstavují vážnější komplikaci pro další validační měření.

Kalibrační křivka č. 2A

Pro potřeby validačních měření při **citlivosti S** bylo nutné sestavit kalibrační křivku Δ^9 -THC. Jako kalibrační roztoky byly použity roztoky standardu Δ^9 -THC v metanolu o koncentracích **12,5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$ a 1 $\mu\text{g/ml}$.**

Kalibrační křivka č. 2A (viz. obrázek č. 8 v Přílohách) vystihuje závislost plochy chromatografického píku (mV.s) na koncentraci roztoku standardu Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$). **Rovnice kalibrační křivky č. 2A je: $y = 1802,95x + 434,799$ s hodnotou korelačního koeficientu 0,997591.** Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků pro kalibrační křivku č. 2A jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka č. 12: Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků Δ^9 -THC pro **kalibrační křivku č.2A** při vnější teplotě 24-25,5°C

Koncentrace Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
12,5	10,00	22963
10	9,71	17676
8	9,96	15754
4	9,91	8022
2	9,99	3840
1	10,01	743

Přesnost a správnost A

Cílem bylo na sériích roztoků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **10 $\mu\text{g/ml}$, 4 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$** zjistit, zda při **citlivosti S** odchylky plochy píku a odchylky naměřené koncentrace od skutečné koncentrace splňují validační kritéria. K plochám chromatografických píků byla přiřazena koncentrace Δ^9 -THC pomocí **kalibrační křivky č. 2A**. Výsledky HPLC analýz vzorků včetně statistického vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách č. 13, 14, 15.

Tabulka č. 13: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **10 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 27°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,72	16471,3	8,89	11,06
2	9,72	15991,2	8,93	13,72
3	9,77	16333,9	8,82	11,82
4	9,67	16045,2	8,66	13,41
5	9,63	16102,3	8,70	13,02
Průměr	9,70	16188,8	-	12,61
SD	0,05	204,92	-	-
RSD (%)	0,52	1,27	-	-

Tabulka č. 14: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **4 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 24-26°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	10,07	7056,0	3,67	8,19
2	10,05	7019,4	3,65	8,70
3	9,97	6317,0	3,26	18,44
4	9,93	7056,8	3,67	8,18
5	9,73	6496,2	3,36	15,95
Průměr	9,95	6789,1	-	11,89
SD	0,14	355,18	-	-
RSD (%)	1,41	5,23	-	-

Tabulka č. 15: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **2 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 27-30,5°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,71	3725,8	1,83	8,74
2	9,59	3418,4	1,65	17,50
3	9,55	3368,1	1,63	18,66
4	9,48	4159,6	2,01	3,30
5	9,45	4165,4	2,07	3,45
Průměr	9,56	3767,5	-	10,33
SD	0,10	385,77	-	-
RSD (%)	1,05	10,24	-	-

Z výsledků měření je patrné, že čím více se koncentrace Δ^9 -THC blíží mezi stanovitelnosti, tím větší je RSD plochy píku, a tím nižší je proto přesnost měření. Správnost měření se pro jednotlivé koncentrace, na rozdíl od přesnosti, příliš neliší. Kupodivu zde nelze vysledovat výraznější tendenci k nižší správnosti měření u analýz nízkých koncentrací. Odchytky od správné koncentrace jsou v případě všech koncentrací poměrně vysoké. Protože ale nepřevýšily 15%, jsou požadavky na správnost metody splněny.

Zdá se, že na plochu chromatografického píku by mohla mít vliv teplota v laboratoři. Např. v průběhu měření série vzorků uvedených v tabulce č. 15 vzrostla teplota z 27°C na 30,5°C. Na vysoké odchytky od správnosti pak mohlo mít vliv i to, že kalibrační křivka byla proměřena při jiné teplotě než jednotlivé série vzorků.

Kalibrační křivka č. 2B

Protože kalibrační křivka č. 2A neměla vhodný korelační koeficient a teploty, při kterých byla tato křivka naměřena, se výrazně lišily od teplot při analýze vzorků, **byla pro citlivost S připravena nová kalibrační křivka č. 2B**. Snažila jsem se, aby kalibrační roztoky a roztoky pro validační měření byly měřeny při stejné teplotě.

Jako kalibrační roztoky byly použity roztoky standardu Δ^9 -THC v metanolu o koncentracích: **12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml, 1,5625 µg/ml a 0,78125 µg/ml**. HPLC analýzy vzorků probíhaly za vnější teploty 23-24,5 °C.

Rovnice kalibrační křivky č. 2B je: $y = 2313,8x - 451,055$ s hodnotou korelačního koeficientu 0,999930. Tento koeficient je podstatně příznivější než u křivky č. 2A. Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků pro kalibrační křivku č. 2B jsou uvedeny v tabulce č. 16. a tato kalibrační křivka je rovněž zobrazena v příloze (viz. obrázek č. 9 v Přílohách).

Tabulka č. 16: Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků Δ^9 -THC pro **kalibrační křivku č. 2B** při vnější teplotě 23-24,5°C

Koncentrace Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
12,5	9,56	2844
6,25	9,53	14053
3,125	9,48	6752
1,5625	9,67	3349
0,78125	9,65	1183

Přesnost a správnost B

Z důvodu nepřilíš přesvědčivých výsledků předchozích validačních měření pro tuto citlivost (viz. Přesnost a správnost A) byla měření přesnosti a správnosti pro **citlivost S** zopakována s roztoky standardu Δ^9 -THC o koncentraci **12,5 $\mu\text{g/ml}$, 3,125 $\mu\text{g/ml}$ a 1,5625 $\mu\text{g/ml}$** . K plochám chromatografických píků byla přiřazena koncentrace Δ^9 -THC pomocí **kalibrační křivky č. 2B**. Výsledky HPLC analýz vzorků včetně statistického vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách č. 17, 18, 19.

Tabulka č. 17: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **12,5 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 23,5-24°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,54	28451,2	12,49	0,07
2	9,55	28791,7	12,64	1,11
3	9,57	27900,7	12,25	1,97
4	9,56	28005,7	12,30	1,61
5	9,53	29340,6	12,86	3,00
Průměr	9,55	28497,9	-	1,55
SD	0,02	591,09	-	-
RSD (%)	0,21	2,07	-	-

Tabulka č. 18: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **3,125 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 24-24,5°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,53	7768,1	3,55	13,67
2	9,50	6968,0	3,21	2,65
3	9,50	6359,8	2,94	5,80
4	9,61	6234,4	2,89	7,54
5	9,58	6744,0	3,11	0,49
Průměr	9,54	6814,9	-	6,03
SD	0,05	608,52	-	-
RSD (%)	0,52	8,93	-	-

Tabulka č. 19: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **1,5625 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 23°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,57	3481,5	1,70	8,77
2	9,63	3214,3	1,58	1,38
3	9,65	3638,1	1,77	13,11
4	9,64	3502,4	1,71	9,35
5	9,65	3572,8	1,74	11,30
Průměr	9,63	3481,8	-	8,78
SD	0,03	161,77	-	-
RSD (%)	0,31	4,66	-	-

Je zřejmé, že v případě těchto měření bylo dosaženo podstatně lepších výsledků. V průběhu měření byla mnohem stabilnější teplota. Maximální RSD plochy píku byla 8,93% a maximální odchylka od správné koncentrace 8,78%. Uvedené hodnoty jsou do 15%, a proto bez problémů splňují požadavky na přesnost a správnost metody. Lze zde vysledovat tendenci ke zvyšování se odchylek správnosti s klesající koncentrací analytu ve vzorku. U přesnosti měření ale tato tendence patrná není.

Mez stanovitelnosti, mez detekce

Cílem bylo pro **citlivost S** nejprve určit průměrnou hodnotu šumu v mV jako průměr rozdílů výšek maximálního a minimálního šumu každého chromatografického záznamu, k této hodnotě přiřadit pomocí upravené **kalibrační křivky č. 2B** odpovídající koncentraci Δ^9 -THC v $\mu\text{g/ml}$ a následně určit mez detekce a mez stanovitelnosti Δ^9 -THC (viz 4.2.7.).

Tabulka č. 20: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků čistého **metanolu** v intervalu od 4. minuty do 15. minuty při vnější teplotě 25°C.

Vzorek č.	Max. výška šumu (mV)	Min. výška šumu (mV)	Rozdíl (mV)
1	141,44	136,89	4,55
2	138,22	131,48	6,74
3	141,25	135,24	6,01
4	137,24	132,96	4,28
5	141,36	137,58	3,79
Průměr	-	-	5,074

Průměrná hodnota šumu chromatografického záznamu je 5,074 mV, což odpovídá koncentraci Δ^9 -THC 0,123 $\mu\text{g/ml}$. **Mez detekce Δ^9 -THC** odpovídá koncentraci **0,369 $\mu\text{g/ml}$** . **Mez stanovitelnosti Δ^9 -THC** odpovídá koncentraci **0,959 $\mu\text{g/ml}$** .

Hodnotě šumu byla přiřazena odpovídající koncentrace Δ^9 -THC pomocí **kalibrační křivky č. 4**. Kalibrační křivka č. 4 (viz. obrázek č. 11 v Přílohách) vystihuje závislost výšky chromatografického píku (mV) na koncentraci roztoku standardu Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$). Rovnice kalibrační křivky je č. 4 je: $y = 60,1952x - 7,02341$ s hodnotou korelačního koeficientu **0,999967**.

5.1.3. Citlivost N

Opakovatelnost nástřiku

Cílem bylo zjistit, jak se při **citlivosti N** liší hodnoty retenčních časů a ploch píků ve 2 sériích 10 HPLC analýz vzorků standardu Δ^9 -THC v metanolu o koncentraci **3,125 $\mu\text{g/ml}$** . Výsledky HPLC analýz obou sérií vzorků jsou uvedeny v tabulkách č. 21, 22.

Tabulka č. 21: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **3,125 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 26-27°C

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
1	9,05	1750,7
2	9,07	1857,7
3	9,09	1757,9
4	9,01	1779,2
5	8,93	1869,6
6	8,96	1749,9
7	8,89	1849,2
8	8,93	1813,5
9	8,93	1781,2
10	8,93	1728,5
Průměr	8,98	1793,7
SD	0,07	50,55
RSD (%)	0,78	2,82

Tabulka č. 22: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **3,125 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 25-26°C

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
1	9,15	1938,9
2	9,12	1849,7
3	9,17	1897,8
4	9,17	1967,3
5	9,15	1936,8
6	9,11	1964,8
7	9,11	1976,9
8	9,11	2157,5
9	9,08	2094,2
10	9,07	2181,4
Průměr	9,12	1996,5
SD	0,03	110,60
RSD (%)	0,33	5,54

Relativní směrodatné odchylky retenčního času Δ^9 -THC jsou u obou sérií velmi nízké, retenční čas Δ^9 -THC proto můžeme považovat za velmi stabilní. Rovněž odchylky plochy řádově v jednotkách procent jsou dobrým předpokladem pro další validační měření.

Kalibrační křivka č. 3

Pro potřeby validačních měření stejně jako pro určení množství Δ^9 -THC ve vzorcích bylo nutné pro **citlivost N** sestavit kalibrační křivku Δ^9 -THC. Jako kalibrační roztoky byly použity roztoky standardu Δ^9 -THC v metanolu o koncentracích **50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$, 6,25 $\mu\text{g/ml}$ a 3,125 $\mu\text{g/ml}$** . Snažila jsem se, aby kalibrační roztoky a roztoky pro validační měření byly měřeny při stejné teplotě.

Kalibrační křivka č. 3 (viz. obrázek č. 10 v Přílohách) vystihuje závislost plochy chromatografického píku (mV.s) na koncentraci roztoku standardu Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$). **Rovnice kalibrační křivky č. 3 je: $y = 595,769x - 100,38$ s hodnotou korelačního koeficientu 0,999975.** Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků pro kalibrační křivku č. 3 jsou uvedeny v tabulce č. 23.

Tabulka č. 23: Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků Δ^9 -THC pro **kalibrační křivku č. 3** při vnější teplotě 23-24°C

Koncentrace Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
50	9,48	29636,2
25	9,55	14893,6
12,5	9,44	7359,7
6,25	9,57	3664,3
3,125	9,55	1659,4

Přesnost a správnost

Cílem bylo při **citlivosti N** u sérií roztoků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **50 $\mu\text{g/ml}$, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ a 3,125 $\mu\text{g/ml}$** zjistit odchylky plochy píku a odchylky naměřené koncentrace od skutečné koncentrace Δ^9 -THC. K plochám chromatografických píků byla přiřazena koncentrace Δ^9 -THC pomocí **kalibrační křivky č. 3**. Výsledky HPLC analýz vzorků včetně statistického vyhodnocení jsou uvedeny v tabulkách č. 24, 25, 26.

Tabulka č. 24: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **50 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 24°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,49	29317,6	49,39	1,24
2	9,57	29632,3	49,91	0,19
3	9,50	29964,1	50,62	0,92
4	9,51	30206,8	50,87	1,74
5	9,53	30401,6	51,20	2,4
Průměr	9,52	29904,5	-	1,30
SD	0,03	436,06	-	-
RSD (%)	0,32	1,46	-	-

Tabulka č. 25: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **12,5 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 23,5°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,45	7296,2	12,42	0,68
2	9,45	7169,0	12,20	2,39
3	9,43	7271,9	12,37	1,00
4	9,42	7156,5	12,18	2,55
5	9,44	7098,2	12,08	3,34
Průměr	9,44	7198,4	-	1,99
SD	0,01	83,10	-	-
RSD (%)	0,11	1,16	-	-

Tabulka č. 26: Výsledky HPLC analýzy 5 vzorků standardu Δ^9 -THC o koncentraci **3,125 $\mu\text{g/ml}$** při vnější teplotě 24-24,5°C a jejich statistické vyhodnocení

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Vypočtená koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku ($\mu\text{g/ml}$)	Správnost (%)
1	9,55	1685,8	3,00	4,06
2	9,67	1729,4	3,07	1,72
3	9,62	1825,0	3,23	3,42
4	9,55	1589,2	2,84	9,25
5	9,55	1666,1	2,96	5,12
Průměr	9,59	1699,1	-	4,71
SD	0,05	86,78	-	-
RSD (%)	0,52	5,12	-	-

Hodnoty RSD plochy píku do 5,12% a odchylky koncentrace od skutečné koncentrace do 4,71% jsou hluboko pod hranicí 15% a ukazují, že tato měření jsou velmi přesná a správná. Je však patrné, že čím je koncentrace Δ^9 -THC nižší a čím více se blíží mezi stanovitelnosti, tím menší je jak přesnost tak správnost měření.

5.1.4. Srovnání zvolených citlivostí fluorescenčního detektoru

Podle očekávání byla validační měření **nejpřesnější a nejsprávnější při nejnižší zvolené citlivosti, tzn. citlivosti N**. Je to způsobeno tím, že při nižší citlivosti je stabilnější základní linie a na chromatografickém záznamu je méně šumu. Proto je integrování plochy píku snadnější a méně závislé na subjektivním hodnocení.

Cílem experimentální části této práce je stanovit obsah Δ^9 -THC v technickém konopí a produktech z něj. **Proto je nutné pro další měření zvolit tu citlivost, která se jeví být nejpreciznější a nejsprávnější pro určení koncentrací Δ^9 -THC nižších než 3 $\mu\text{g/ml}$.** V případě, že se při přípravě vzorku postupuje přesně dle metodiky popsané v 4.3.1., tak koncentrace 3 $\mu\text{g/ml}$ odpovídá obsahu 0,3% Δ^9 -THC, což je v ČR maximální přípustný obsah Δ^9 -THC v technickém konopí.

Pro hodnoty blízké koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ platí, že přesnost a správnost měření jsou téměř shodné u všech třech citlivostí. To souvisí s tím, že tato koncentrace je blízko meze stanovitelnosti u nejnižší citlivosti (citlivost N), zatímco u nejvyšší citlivosti (citlivost V) se blíží hornímu detekčnímu limitu. Výsledky měření přesnosti a správnosti pro citlivost V, citlivost S a citlivost N uvádím souhrnně v tabulce č. 27 na následující straně.

Jako nejvhodnější pro stanovení Δ^9 -THC v reálných vzorcích konopí a konopných produktech jsem nakonec zvolila střední citlivost, tzn. citlivost S, která dovoluje dostatečně přesné a správné stanovení koncentrací Δ^9 -THC nižších než 3 $\mu\text{g/ml}$ a narozdíl od vysoké citlivosti, tzn. citlivosti V, má stabilnější základní linii. Pro zvolenou citlivost, citlivost S, jsem provedla ještě další validační měření, na jejichž základě byla stanovena mez detekce a mez stanovitelnosti Δ^9 -THC v metanolu (viz. tabulka č. 20).

Tabulka č. 27: Souhrnné výsledky měření přesnosti a správnosti pro citlivost V, citlivost S a citlivost N

Koncentrace standardu Δ^9 -THC ($\mu\text{g/ml}$)	Citlivost V			Citlivost S (A)			Citlivost S (B) LOD = 0,369 $\mu\text{g/ml}$ LOQ = 0,959 $\mu\text{g/ml}$			Citlivost N		
	Přesnost Tr (%)	Přesnost plochy (%)	Správnost (%)	Přesnost Tr (%)	Přesnost plochy (%)	Správnost (%)	Přesnost Tr (%)	Přesnost plochy (%)	Správnost (%)	Přesnost Tr (%)	Přesnost plochy (%)	Správnost (%)
10				0,54	1,27	12,61						
4	0,22	1,69	5,78	1,39	5,23	11,89						
2	0,86	4,61	7,35	1,05	10,24	10,33						
1	0,39	7,53	6,13									
50										0,36	1,46	1,30
12,5							0,17	2,07	1,55	0,15	1,16	1,99
3,125							0,53	8,93	6,03	0,58	5,12	4,71
1,5625							0,32	4,66	8,78			

Přesnost Tr je přesnost retenčního času standardu Δ^9 -THC vyjádřená jako RSD.

Přesnost plochy je přesnost plochy chromatografického píku standardu Δ^9 -THC vyjádřená jako RSD.

LOD je mez detekce Δ^9 -THC

LOQ je mez stanovitelnosti Δ^9 -THC

5.2. Stanovení obsahu Δ^9 -THC v reálných vzorcích konopí a konopných produktů

Cílem této části rigorózní práce bylo pomocí HPLC stanovit obsah Δ^9 -THC v **technickém konopí, konopných vláknech, konopné tkanině a konopných semenech**. Na základě předchozí validace byla pro následující měření nastavena **citlivost S** fluorescenčního detektoru.

Vzorky byly připraveny postupem dle bodu 4.3.1. Výsledky HPLC analýzy jednotlivých vzorků včetně stanovení obsahu Δ^9 -THC jsou uvedeny v tabulce č. 28. Koncentraci Δ^9 -THC v nastříknutých vzorcích jsem určila pomocí **kalibrační křivky č. 2B**. Pro úplnost v tabulce uvádím rovněž navážku vzorku a objem extraktu použitý k analýze.

Tabulka č. 28: Výsledky HPLC analýzy vzorků technického konopí při **citlivosti S** a při teplotách 24 - 29°C.

	Vzorek č.	Navážka (g)	Objem extraktu odebraný k analýze (μl)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace Δ^9 -THC v nastříknutém vzorku (μg/ml)	Obsah Δ^9 -THC ve vzorku (%)
Čerstvá rostlina	1	4,608	100	8,71	3028,4	1,50	0,016
	2	4,608	100	8,93	3158,0	1,56	0,017
Sušená rostlina A	1	1,004	200	8,90	2418,1	1,24	0,031
	2	1,004	200	8,92	2701,9	1,36	0,034
Sušená rostlina B	1	0,750	500	9,29	17807,0	7,89	0,079
	2	0,750	500	9,21	18611,1	8,24	0,082
Konopná vlákna	1	2,009	800	9,33	19173,7	8,48	0,026
	2	2,009	800	9,40	21146,3	9,33	0,029
Konopná tkanina	1	3,018	300	9,31	9014,1	4,09	0,014
	2	3,018	300	9,09	7549,9	3,46	0,011
Konopná semena	1	20,004	500	9,17	2741,1	1,38	0,00069
	2	20,004	500	9,23	28371	1,42	0,00071

Vzorky Čerstvá rostlina, Sušená rostlina A a Sušená rostlina B pocházejí ze stejné konopné rostliny. Sušená rostlina A byla sušena 90 minut při teplotě 55°C. Sušená rostlina B byla sušena 20 minut při teplotě 100°C.

Výše uvedené výsledky potvrdily, že testované vzorky skutečně pocházejí z technického konopí. Obsah Δ^9 -THC byl mnohonásobně nižší než jsou České a Evropské limity. Obsah Δ^9 -THC v sušené rostlině A (sušena při max. 55°C) byl přibližně desetinásobně nižší než je český limit a rovněž obsah Δ^9 -THC v sušené rostlině B (sušena při 100°C) byl výrazně podlimitní. K nárůstu obsahu Δ^9 -THC u sušené rostliny B došlo vlivem vysoké teploty a tepelné dekarboxylace kanabinolových kyselin. Jedná se proto o “celkové Δ^9 -THC“. Obsah Δ^9 -THC v čerstvé rostlině je spíše orientační, neboť čerstvá rostlina obsahuje značné množství vody a není možné srovnávat hmotnost čerstvé rostliny a sušiny.

Δ^9 -THC bylo stanoveno také v konopných vláknech, konopné tkanině a konopných semenech. Obsah Δ^9 -THC je však velmi nízký. V těchto případech se jedná o “volné Δ^9 -THC“. Tyto produkty, které samy o sobě kanabinoidy neobsahují, byly kontaminovány na Δ^9 -THC bohatou pryskyřicí nejspíše během sklizně. Konopná semena bez problémů splnila švýcarskou potravinářskou normu. Zajímavé je, že konopná vlákna měla obsah Δ^9 -THC skoro stejný jako sušená rostlina A. Zřejmě to hodně závisí na způsobu sklizně.

V průběhu měření se ukázalo, že pokud bych při přípravě extraktu a vzorku přesně dodržovala objemy a navážky, které se osvědčily v diplomové práci J. Myšíkové¹² při určování obsahu Δ^9 -THC v drogovém konopí, tak by příliš nízké koncentrace Δ^9 -THC v takto připravených vzorcích neumožňovaly jeho stanovení. Obvykle bylo nutné několiknásobně zvýšit navážku nebo odfoukat větší objem extraktu v závislosti na předpokládaném obsahu Δ^9 -THC.

6. Závěr

V teoretické části této práce jsem se zaměřila na současný stav konopné problematiky s důrazem na toxikologicko-právní stránku. V rámci legislativy jednotlivých evropských zemí je na technické konopí a produkty z něj nahlíženo odlišně. Český limit pro obsah Δ^9 -THC v technickém konopí daný Zákonem 167/1998 Sb. o návykových látkách je mírnější než direktiva EU. Rovněž metodika pro stanovení obsahu Δ^9 -THC není jednotná. Zatímco ve většině zemí je stanovováno “celkové Δ^9 -THC“, tedy množství původního Δ^9 -THC navýšené o množství Δ^9 -THC vzniklé dodatečně tepelnou přeměnou svých prekurzorů, v ČR je konopí hodnoceno podle obsahu “volného Δ^9 -THC“. V ČR také, na rozdíl od Německa nebo Švýcarska, doposud chybí přesné normy pro obsah Δ^9 -THC v jednotlivých potravinách.

V experimentální části jsem orientačním nástřikem roztoku standardu Δ^9 -THC v metanolu o známé koncentraci našla celkem tři nastavení citlivosti fluorescenčního detektoru, které umožňovaly stanovení koncentrací Δ^9 -THC řádově v jednotkách $\mu\text{g/ml}$. Jednalo se o nastavení SENS 2, GAIN 3 (citlivost V), SENS 2, GAIN 2 (citlivost S) a SENS 2, GAIN 1 (citlivost N).

Pro citlivosti V, S a N jsem provedla validaci metody s využitím roztoku standardu Δ^9 -THC v metanolu. Pro každou citlivost jsem stanovila opakovatelnost nástřiku, přesnost a správnost měření. Na základě výsledků těchto validačních měření se jako nejvhodnější pro stanovení nízkých koncentrací Δ^9 -THC přítomných v technickém konopí jevila citlivost S. Pro citlivost S jsem následně určila další dva validační parametry, tj. mez stanovitelnosti a mez detekce.

Při citlivosti S jsem stanovila obsah Δ^9 -THC v reálných vzorcích technického konopí, konopných vláken, konopné tkaniny a konopných semen.

Na základě výsledků získaných za použití validované metody jsem potvrdila, že vzorky konopí, konopných vláken, konopné tkaniny a konopných semen skutečně pocházejí z technického konopí. Obsah THC v nich byl výrazně nižší než limit daný Zákonem 167/1998 Sb. o návykových látkách.

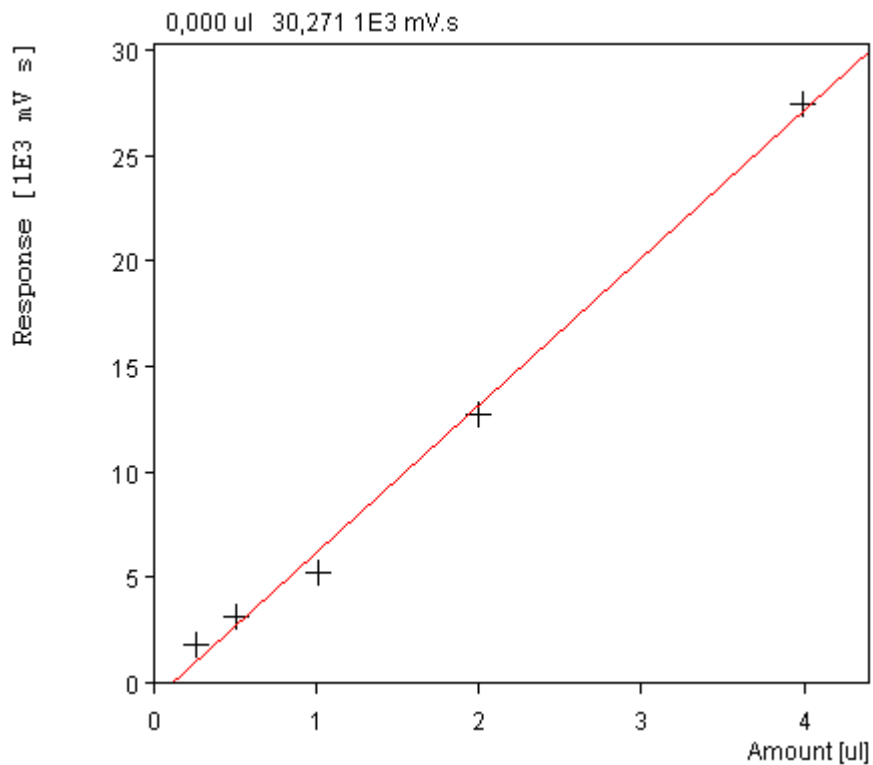
Tato metoda je vhodná pro stanovení nízkých koncentrací Δ^9 -THC pro farmaceutické, potravinářské nebo forenzní účely.

7. Seznam použité literatury

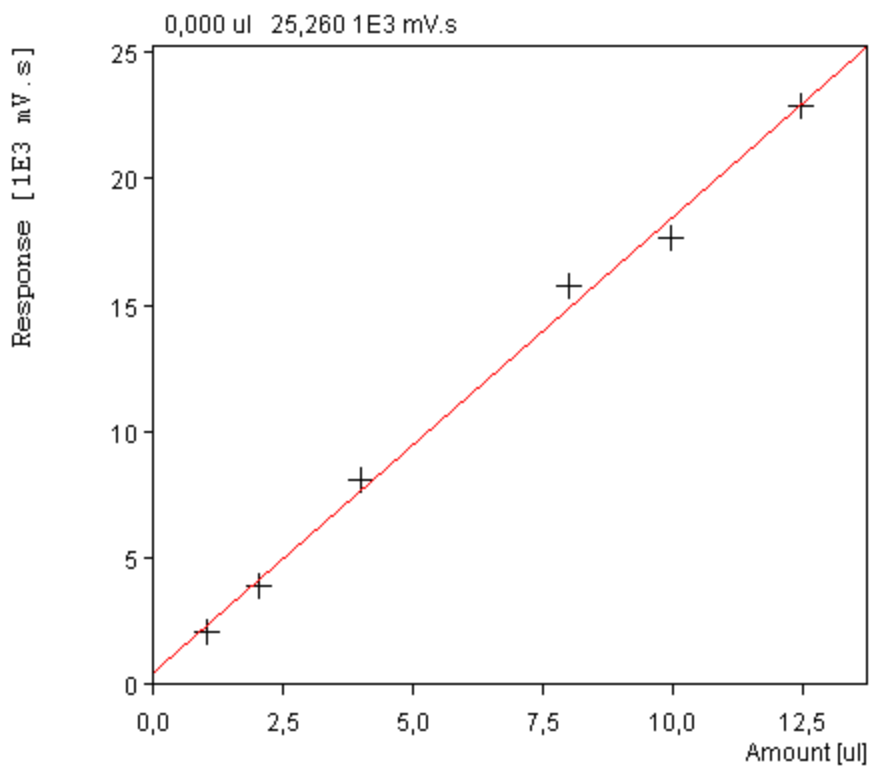
1. Mahlberg P.G., Kim E.S.: THC accumulation in glands of Cannabis; Hemp Report 3 (2001).
2. Vogl Ch.R., Mölleken H., Lissek-Wolf G., Surböck A., Kobert J.: Hemp as a resource of green cosmetics. Yield of seed and fatty acid compositions of 20 varieties under the growing conditions of organic farming in Austria; J. Industr. Hemp 9 (2004); 51-68.
3. Avico U. Pacifici R., Zuccaro P.: Variations of tetrahydrocannabinol content in cannabis plants to distinguish the fibre type from the drug type plants; Bull. Narc. 37 (1985); 61-64.
4. Stamboili H., El Bouhri A., Bellimam M.A., Bouazoun T., El Karni N.: Cultivation of Cannabis sativa in northern Morocco; Bull. Narc. 57 (2005); 79-128.
5. Grotenhermen F., Karus J.: Industrial hemp is not marijuana: comments on the drug potential of fibre Cannabis; J. Intern. Hemp Assoc. 5 (1998); 96-101.
6. Lehmann T., Brenneisen R.: High performance liquid chromatographic profilig of cannabis products; J. Liq. Chromatogr. 18 (1995); 689-700.
7. Council of the European Communities. Council Regulation No 1420/98 amending Regulation No 619/71 laying down general rules for frantiny aid for flax and hemp; Official Journal of the European Communities L190 (1998); 7-8.
8. Zoller O., Rhyn P., Zimmerli B.: HPLC determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of delta-9-tetrahydrocannabinol; J. Chromatogr. A 872 (2000); 101-110.
9. Fišar Z.: Fytokanabinoidy; Chemické listy 100 (2006); 233-242.
10. Hazekamp A., Peltenburg A., Verpoorte R.: Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from Cannabis sativa L.; J. Liq. Chromatogr. 28 (2005); 2361-2382.
11. Grotenhermen F.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids; Clin. Pharmacokinet. 42 (2003); 327-360.
12. Myšíková J.: Analytické vlastnosti vybraných fytokanabinoidů; diplomová práce, FAF 2007.
13. Mechtler K., Bailer J., Hueber K.: Variations of Δ^9 - THC content in single plants of hemp varieties; J. Industr. Crops and Prod. 19 (2004); 19-24.
14. Ross S.A., Mehmedic, Murphz T.P., Elsohlz M.A.: GC-MS analysis of total Δ^9 - THC content of both drug- and fibre-type cannabis seeds; J. Anal. Toxicol. 24 (2000); 715-717.

15. Lawi-Berger C., Miede M.N., Kapetanidis I, Miede J.: Systematique vegetable – Contribution a l'etude chimiotaxonomique de *Cannabis sativa*; L.C.R. Acad. Sci. Paris 295 (1982);397-404.
16. Lachenmeier D., Walch G.: Analysis and toxicological evaluation of cannabinoids in hemp food products; Electron. J. Environ. Agric. Food Chem. 4 (2005); 812-826.
17. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (2001); 4-6.
18. Ing. Irena Suková, Ústřední zemědělská a potravinářská inspekce, Praha, ústní sdělení

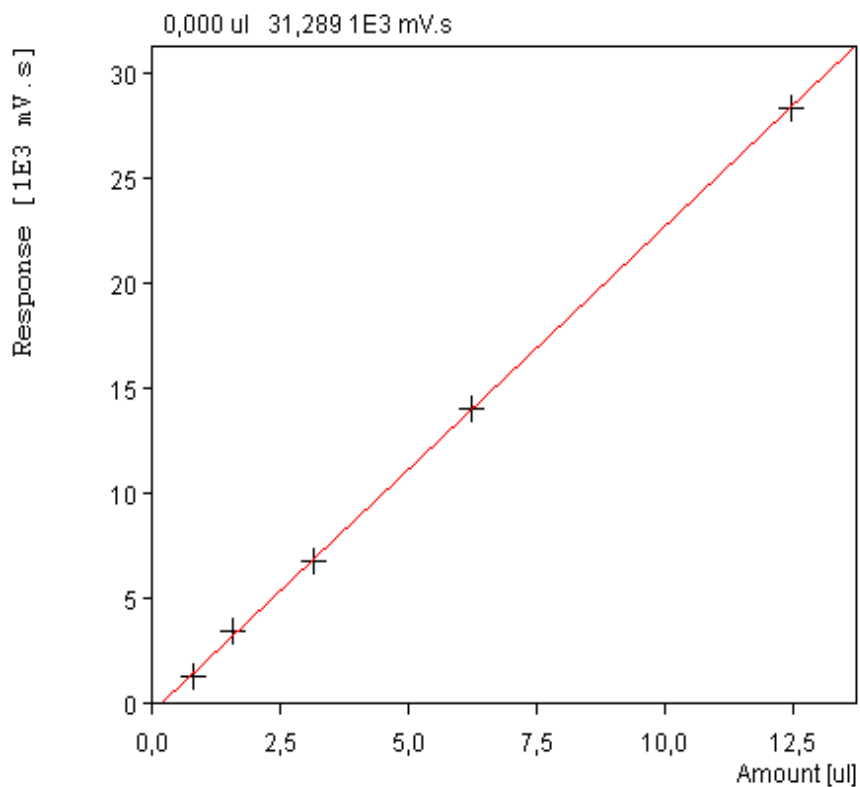
8. Přílohy



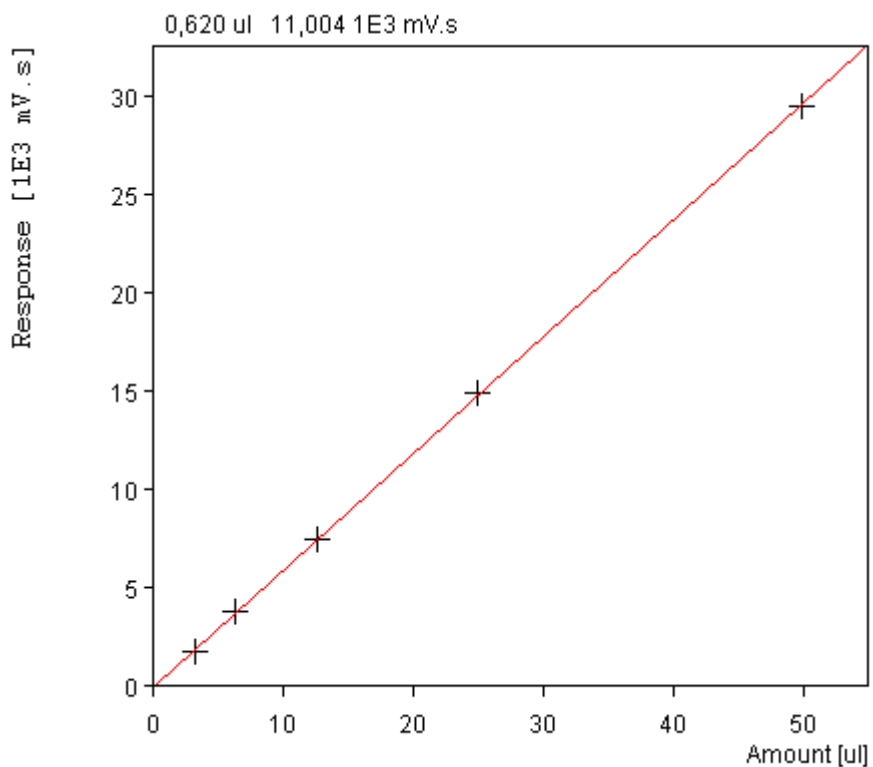
Obrázek č. 7: Kalibrační křivka č. 1 pro citlivost V. Rovnice křivky je $y = 6983,06x - 812,419$ a korelační koeficient je 0,997642.



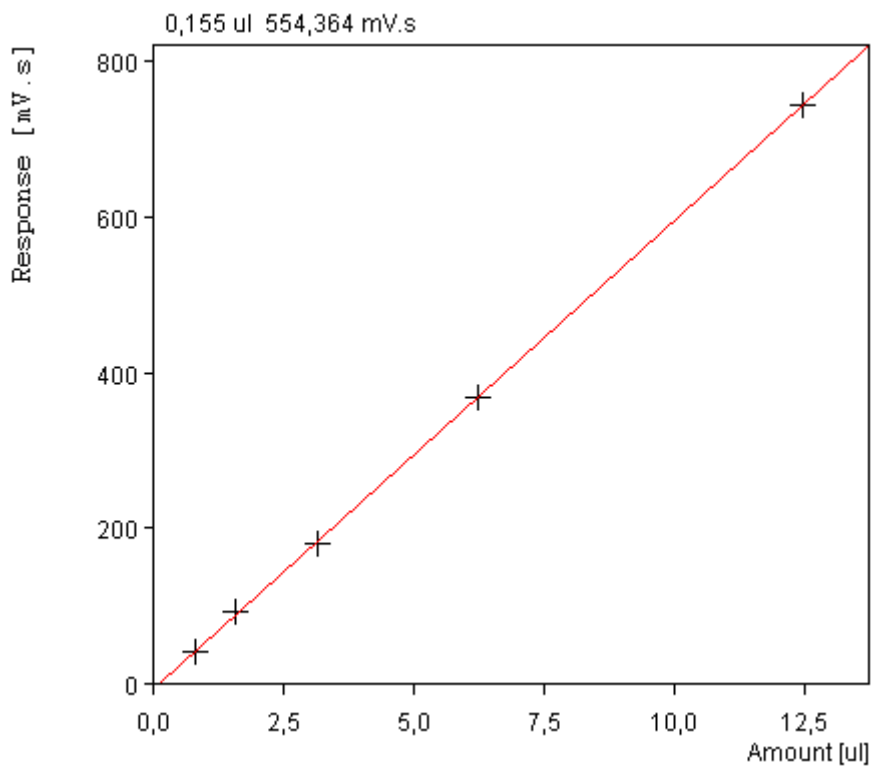
Obrázek č. 8: Kalibrační křivka č. 2A pro citlivost S. Rovnice křivky je $y = 1802,95x - 434,799$ a korelační koeficient je 0,997591.



Obrázek č. 9: Kalibrační křivka č. 2B pro citlivost S. Rovnice křivky je $y = 2313,8x - 451,055$ a korelační koeficient je 0,999930.

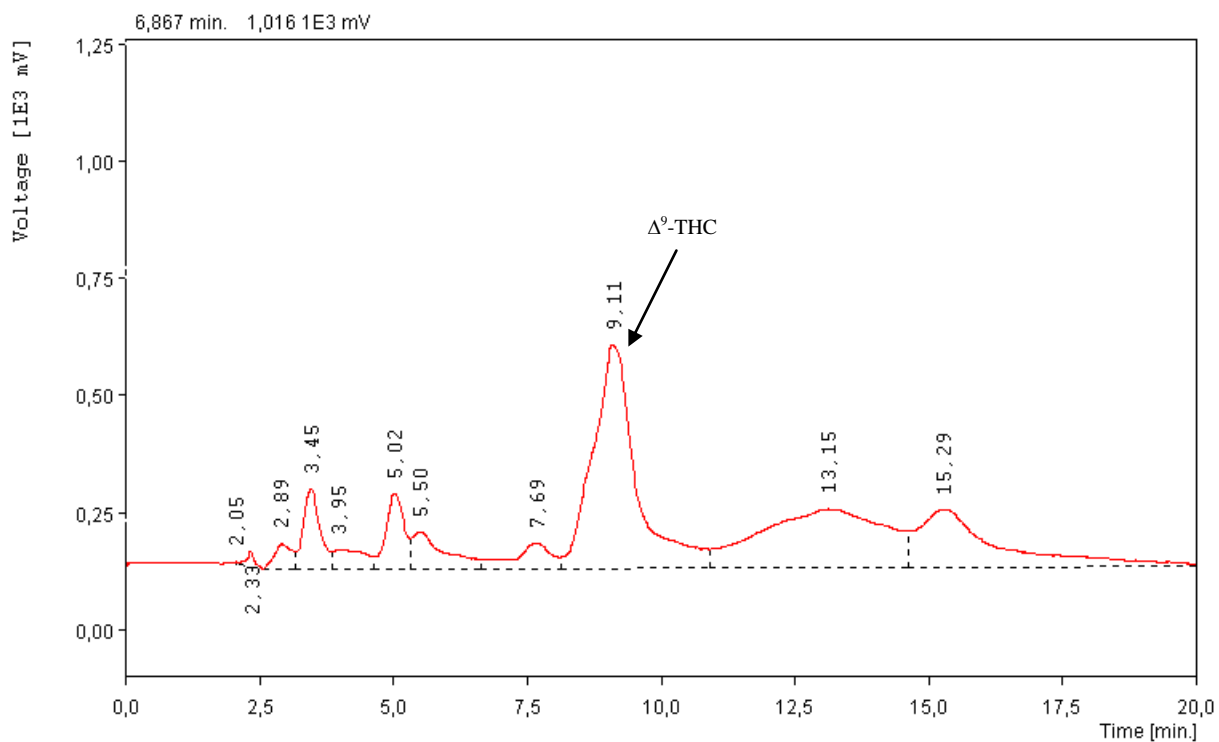


Obrázek č. 10: Kalibrační křivka č. 3 pro citlivost N. Rovnice křivky je $y = 595,769x - 100,38$ a korelační koeficient je 0,999975.



Obrázek č. 11: Kalibrační křivka č. 4 pro citlivost S(A).

Rovnice křivky je $y = 60,1952x - 7,02341$ a korelační koeficient je 0,999967.



Obrázek č. 12: Chromatogram vzorku konopné rostliny sušené při 100°C (sušená rostlina B)