

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

**Analytické vlastnosti vybraných fytoKANABINOIDŮ**  
(Diplomová práce)

*Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michaela Hamerníková, Ph.D.*

Hradec Králové, 2007

Jitka Myšíková

Dovoluji si poděkovat RNDr. Michaele Hamerníkové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a pomoc při vypracování této diplomové práce, Ing. Ivu Vykydalovi z Policie ČR za dodání vzorků marihuany a pomoc při měření na GC a též všem ostatním, kteří mi byli jakkoliv nápomocni.

## **Abstrakt:**

Název: Analytické vlastnosti vybraných fytoKANabinoidů

Autor: Jitka Myšíková

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michaela Hamerníková, Ph.D.

Katedra: Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Zabývala jsem se problematikou stanovení delta-9-tetrahydrokanabinolu ( $\Delta^9$ -THC) a tetrahydrokanabinolových kyselin (THCA) pomocí HPLC a GC. THCA, prekurzory  $\Delta^9$ -THC přítomné v Cannabis sativa, jsou nestabilní a za zvýšené teploty snadno dekarboxylují za vzniku  $\Delta^9$ -THC. Ověřovala jsem nestabilitu THCA za zvýšené teploty v marihuaně a v extraktu z marihuany. Teplotní přeměna THCA na  $\Delta^9$ -THC byla při mých pokusech nejvyšší při teplotách cca 100°C-120°C. Při teplotách vyšších než 120°C se množství  $\Delta^9$ -THC snižovalo. Posuzovala jsem vliv různých podnětů (např. světla, UV záření, varu marihuany v n-hexanu, různé teploty, způsobu skladování) na obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně v průběhu sušení rostliny a v průběhu zpracování vzorku před analýzou. Navýšení obsahu  $\Delta^9$ -THC nastalo kromě působení vyšší teploty také působením UV záření, ale v podstatně menším rozsahu. Vliv UV záření je nutné ale ještě dále prozkoumat. Porovnávala jsem hodnoty obsahu  $\Delta^9$ -THC stanovené pomocí HPLC a GC. Obsah  $\Delta^9$ -THC stanovený pomocí GC byl vyšší než při stanovení pomocí HPLC. Jeden z hlavních cílů bylo najít vhodný způsob odstranění THCA ze vzorků před analýzou, aby nedocházelo při použití GC k přeměně THCA na  $\Delta^9$ -THC vlivem vyšší teploty, a tím by došlo k navýšení obsahu  $\Delta^9$ -THC ve vzorku. Naše legislativa vyžaduje pouze měření obsahu volného  $\Delta^9$ -THC bez přeměny THCA na  $\Delta^9$ -THC. K odstranění THCA jsem se pokusila využít SPE a LL extrakci. Odstranění THCA jsem docílila LL extrakcí n-hexanového extraktu z marihuany s 0,2M roztokem NaOH.

## **Abstract ( English version )**

Title: Analytical Properties of Selected Phytocannabinoids

Author: Jitka Myšíková

Supervisor: RNDr. Michaela Hamerníková, Ph.D.

Department: Department of Biophysics and Physical Chemistry

I investigated the issue how to determine the delta-9-tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) and tetrahydrocannabinol acids (THCAs) by HPLC and GC. THCAs, the precursors of  $\Delta^9$ -THC, are the compounds of *Cannabis sativa*. They are unstable, decarboxylate easily and convert into  $\Delta^9$ -THC at higher temperature. I examined the THCAs instability both in marihuana and in extracts from marihuana at the higher temperature. During my experiments the temperature conversion of THCA into  $\Delta^9$ -THC was the highest at temperatures of approx. 100°C-120°C and the  $\Delta^9$ -THC content decreased at temperatures over 120°C. I evaluated the influence of various stimuli (e.g. light, UV radiation, boiling of marihuana in n-hexane, various temperatures, ways of storage) on the  $\Delta^9$ -THC content in marihuana both during drying and preparation of samples before the analysis. The increased  $\Delta^9$ -THC content was not only the result of higher temperature but also the UV radiation, however, to a smaller extent. The influence of the UV radiation should be further investigated. I compared the values of the  $\Delta^9$ -THC content determined by HPLC and GC. The  $\Delta^9$ -THC content determined by GC was higher than the content determined by HPLC. One of the main objectives was to find a suitable method how to remove THCAs from samples before the analysis to prevent THCAs from converting into  $\Delta^9$ -THC during the GC analysis due to higher temperature, which would cause an increase of  $\Delta^9$ -THC content in the sample. Our legislation requires only the measurement of the free  $\Delta^9$ -THC content without the THCAs conversion into  $\Delta^9$ -THC. I tried using the SPE and LL extraction to remove THCAs. I managed to remove THCAs by the LL extraction of the n-hexane extract from marihuana with 0.2M NaOH solution.

## Obsah:

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY</b> .....	<b>11</b>
2.1. KONOPÍ.....	12
2.1.1. <i>Definice pojmů</i> .....	12
2.1.2. <i>Rozlišení konopí</i> .....	12
2.1.3. <i>Chemické složky konopí</i> .....	13
2.1.4. <i>Účinky kanabinoidů</i> .....	16
2.1.5. <i>Potenciální terapeutické účinky</i> .....	17
2.2. ZKOUMÁNÍ DEKARBOXYLAČNÍ REAKCE $\Delta^9$ -THCA-A K TOXICKY AKTIVNÍMU $\Delta^9$ -THC PŘI ROZDÍLNÝCH ANALYTICKÝCH PODMÍNKÁCH A PŘI SIMULACI PODMÍNEK KOUŘENÍ .....	19
2.2.1. <i>Extrakce <math>\Delta^9</math>-THCA-A a čištění surového extraktu sloupcovou chromatografií</i> .....	20
2.2.2. <i>Simulace kouření</i> .....	20
2.2.3. <i>Optimalizace GC systému pro určení celkového množství <math>\Delta^9</math>-THC</i> .....	21
2.2.4. <i>Optimalizace dekarboxylační teploty pro určení celkového <math>\Delta^9</math>-THC pomocí HPLC</i> .....	21
2.2.5. <i>Analýzy marihuanových produktů</i> .....	22
2.2.6. <i>Využití v praxi</i> .....	22
2.3. STABILITA KANABINOIDŮ .....	23
2.4. STANOVENÍ A IDENTIFIKACE KANABINOIDŮ .....	23
2.4.1. <i>Tenkovrstvá chromatografie (TLC)</i> .....	23
2.4.2. <i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i> .....	23
2.4.3. <i>Plynová chromatografie (GC)</i> .....	24
2.4.4. <i>Spektrometrie v UV oblasti</i> .....	25
2.4.5. <i>Infračervená spektrometrie (IČ)</i> .....	25
2.4.6. <i>Závěr</i> .....	25
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>26</b>
3.1. PŘÍSTROJE, CHEMIKÁLIE A OSTATNÍ POMŮCKY .....	27
3.2. PODMÍNKY HPLC ANALÝZY .....	28
3.3. PŘÍPRAVA MOBILNÍ FÁZE .....	28
3.4. KALIBRAČNÍ KŘIVKA $\Delta^9$ -THC .....	28
3.5. PŘÍPRAVA EXTRAKTU Z MARIHUANY A VZORKU.....	29
3.6. VÝPOČET OBSAHU $\Delta^9$ -THC V MARIHUANĚ .....	29
3.7. POROVNÁNÍ STABILITY EXTRAKTU A SMĚSI N-HEXANU S ROSTLINNOU DRTÍ SKLADOVANÝCH ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK PO DOBU 24 HODIN.....	30
3.8. PODROBNĚNÍ MARIHUANY PŮSOBENÍ TEPLoty 80°C, UV ZÁŘENÍ, VARU V N-HEXANU .....	31
3.9. PŘÍPRAVA VZORKŮ O RŮZNÉ KONCENTRACI A SOUČASNÉ VYSTAVENÍ ODOFOUKANÉHO EXTRAKTU 2 RŮZNÝM TEPLOTÁM .....	32
3.10. Vliv teploty sušení marihuany na koncentraci $\Delta^9$ -THC a THCA.....	35
3.11. <i>Extrakce na pevnou fázi</i> .....	36
3.12. <i>Vytřepávání extraktu z marihuany roztokem hydroxidu sodného</i> .	37
3.13. <i>Určení opakovatelnosti měření</i> .....	39

<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>42</b>
4.1. KALIBRAČNÍ KŘIVKA $\Delta^9$ -THC .....	43
4.2. POROVNÁNÍ STABILITY EXTRAKTU A SMĚSI N-HEXANU S ROSTLINNOU DRTÍ SKLADOVANÝCH ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK PO DOBU 24 HODIN .....	44
4.3. PODROBENÍ VZORKŮ MARIHUANY VARU V N-HEXANU, PŮSOBENÍ UV ZÁŘENÍ A TEPLoty 80°C.....	46
4.4. PŘÍPRAVA VZORKŮ O RŮZNÉ KONCENTRACI A SOUČASNÉ VYSTAVENÍ ODFOUKANÉHO EXTRAKTU 2 RŮZNÝM TEPLOTÁM .....	47
4.5. VLIV TEPLoty SUŠENÍ MARIHUANY NA KONCENTRACI $\Delta^9$ -THC A THCA .....	49
4.6. EXTRAKCE NA PEVNou FÁZI .....	51
4.7. VYTŘEPÁVÁNÍ EXTRAKTU Z MARIHUANY ROZTOKEM HYDROXIDU SODNÉHO ....	52
4.8. URČENÍ OPAKOVATELNOSTI MĚŘENÍ .....	52
<b>5. ZÁVĚR</b> .....	<b>61</b>
<b>6. PŘÍLOHY</b> .....	<b>64</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>69</b>

## Seznam zkratek:

$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol
$\Delta^8$ -THC	$\Delta^8$ -tetrahydrokanabinol
THCA	deriváty $\Delta^9$ -THC, které nesou karboxylovou skupinu
$\Delta^9$ -THCA-A	kyselina $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolová A
$\Delta^9$ -THCA-B	kyselina $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolová B
CBN	kanabinol
CBNA	kanabinolová kyselina
CBD	kanabidiol
CBDA	kanabidiolová kyselina
THV	tetrahydrokanabivarin
THVA	tetrahydrokanabivarinová kyselina
SPE	extrakce na pevnou fázi
SD	směrodatná odchylka
RSD	relativní směrodatná odchylka

# 1. ÚVOD



V posledních letech se stále více diskutuje o možném terapeutickém využití marihuany, ale také o jejím zneužívání. S tímto problémem velmi úzce souvisí otázka legalizace marihuany. Existuje mnoho odpůrců ale i příznivců těchto kroků. Obě skupiny mají pádné argumenty hovořící pro i proti legalizaci. Je veřejným tajemstvím, že mnoho obyvatel nelegálně užívá různé výrobky z marihuany, a doufá ve zlepšení svého zdravotního stavu např. u různých kožních exémů či Parkinsonovy choroby. Případné postihy ze strany státu se odvíjí od obsahu  $\Delta^9$ -THC v nalezené marihuaně.

Ve forenzní praxi je pro stanovení  $\Delta^9$ -THC v marihuaně v Evropě nejčastěji používána plynová chromatografie. V průběhu analýzy je vzorek vystaven vysokým teplotám.<sup>1,2,3</sup> V čerstvé rostlině konopí setého (*Cannabis sativa*) je ale většina kanabinoidů přítomna ve formě svých karboxylových kyselin, které působením vyšší teploty v průběhu GC analýzy přecházejí na odpovídající neutrální kanabinoidy.<sup>4</sup> Vzhledem k dekarboxylaci THCA vlivem vyšší teploty je výsledkem stanovení tzv. „celkové  $\Delta^9$ -THC“, to znamená množství původního  $\Delta^9$ -THC navýšené o množství  $\Delta^9$ -THC vzniklé dodatečně během analýzy z THCA.<sup>5</sup> Ukázalo se však, že vzhledem k ne zcela kvantitativní konverzi a některým bočním reakcím je výsledná hodnota „celkového  $\Delta^9$ -THC“ nižší než odpovídá skutečnosti. Toto bylo prokázáno pro přeměnu  $\Delta^9$ -THCA-A na  $\Delta^9$ -THC. Jedinou možností, jak změřit nyní celkové  $\Delta^9$ -THC (neaktivní prekurzor + aktivní látka) je tedy změřit odděleně  $\Delta^9$ -THC a  $\Delta^9$ -THCA-A a sečíst obsahy.<sup>3</sup> Konopí ale obsahuje také různá množství jiných derivátů  $\Delta^9$ -THC nesoucích karboxylovou skupinu, které po zahřátí rovněž přecházejí na  $\Delta^9$ -THC.<sup>6</sup> Kromě již zmíněné majoritní  $\Delta^9$ -THCA-A je v konopí v minoritním množství přítomna  $\Delta^9$ -THCA-B.<sup>5</sup> Kromě toho dochází při termické degradaci kanabinoidů také k oxidaci a izomerizaci.<sup>4</sup>

Právní normy v ČR (viz příloha č. 1) v současné době posuzují marihuanu dle obsahu volného  $\Delta^9$ -THC, proto je nutné eliminovat vliv THCA na stanovení obsahu  $\Delta^9$ -THC.

THCA sice nejsou psychoaktivní látky, ale snadno přechází na aktivní  $\Delta^9$ -THC při kouření nebo vaření.<sup>6</sup> Vyvstává tedy otázka, zda by v právních normách platných v ČR neměla být stanovena hranice rovněž pro "celkové  $\Delta^9$ -THC", tj.  $\Delta^9$ -THC + THCA.

Tato problematika je tedy velmi praktického rázu s dopadem na širokou společensko-soudně-právní oblast.

## Cíl práce:

Cílem rešeršní části bylo shrnout:

1. základní informace o konopí – chemické složení, účinky na lidský organismus a potenciální terapeutické využití
2. poznatky o dekarboxylační přeměně  $\Delta^9$ -THCA-A na  $\Delta^9$ -THC
3. údaje o stabilitě kanabinoidů
4. nejpoužívanější metody pro stanovení a identifikaci kanabinoidů

Cílem experimentální části bylo:

1. prozkoumat vliv působení teploty, světla a UV záření na přeměnu THCA →  $\Delta^9$ -THC
  - a) v průběhu sušení rostliny
  - b) v průběhu zpracování vzorku před analýzou
2. odstranit THCA před analýzou
3. stanovit obsah  $\Delta^9$ -THC ve vybraných vzorcích
4. porovnat různé způsoby přípravy vzorků
5. porovnat stanovení pomocí HPLC a GC

## 2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

## 2.1. Konopí

### 2.1.1. Definice pojmů

Termínem „kanabinoidy“ se rozumí typická třída sloučenin vyskytující se v konopí setém (přírodní fytoKANABINOIDY), v širším smyslu potom všechny látky, které jsou specificky rozpoznávány kanabinoidním systémem, tj. kanabinoidními receptory.

Tetrahydrokanabinolem (THC) se obvykle rozumí izomer  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC, dříve  $\Delta^1$ -3,4-trans-tetrahydrokanabinol). Chemicky se jedná o (6aR,10aR)-6a,7,8,10a-tetrahydro-6,6,9-trimetyl-3-pentyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-1-ol.

Marihuana (bhang, dagga, kif) je hovorové označení sušených listů a malých stonků, případně i květů této rostliny. Hašiš (charas) je arabské (indické) označení pro pryskyřici z této rostliny. Neopylené horní květy samičích rostlin bohaté na pryskyřici jsou po usušení a slisování známy jako ganja. Hašišový olej je alkoholový extrakt z konopné pryskyřice.<sup>6</sup>

### 2.1.2. Rozlišení konopí

Rostlina konopí setého (*Cannabis sativa*) se vyskytuje po celém světě ve dvou základních kultivarech tj. technickém a drogovém konopí. O tom, zda rostlina produkuje především vlákno nebo omamnou pryskyřici, rozhodují jak genetické, tak klimatické vlivy.<sup>7</sup>

Lehmann<sup>8</sup> popisuje čtyři chemotypy konopí podle obsahu jednotlivých kanabinoidů.

- A) Chemotyp I, drogový typ, obsahuje především  $\Delta^9$ -THC a  $\Delta^9$ -THCA-A.
- B) Chemotyp II, střední typ, obsahuje vysoké koncentrace  $\Delta^9$ -THC/ $\Delta^9$ -THCA-A a rovněž CBD/CBDA. CBD je rovněž psychoaktivní.
- C) Chemotyp III, technické konopí, obsahuje CBD/CBDA, kdežto obsah  $\Delta^9$ -THC/ $\Delta^9$ -THCA-A je nižší než 0,5%.
- D) Chemotyp IV původem z jižní části Afriky se vyskytuje zřídka a typicky obsahuje tetrahydrokanabivarin (THV) a odpovídající kyselinu (THVA) a rovněž nezanedbatelné množství  $\Delta^9$ -THC/ $\Delta^9$ -THCA-A. THV je psychoaktivní.

Podle dosud známých výzkumů  $\Delta^9$ -THCA-A ani další kyselá kanabinoidy nejsou psychoaktivní při perorálním užití.<sup>3</sup>

Choi<sup>9</sup> et al. rozlišují jednotlivé kultivary na základě <sup>1</sup>H-NMR měření extraktu.

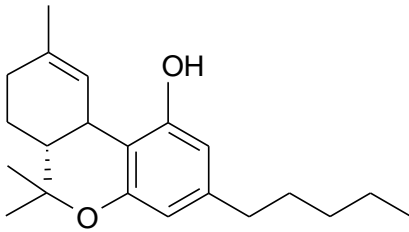
### 2.1.3. Chemické složky konopí

Konopí obsahuje alespoň 483 chemických složek, z nichž 66 jsou kanabinoidy<sup>6</sup> a stále se objevují nové.<sup>4</sup>

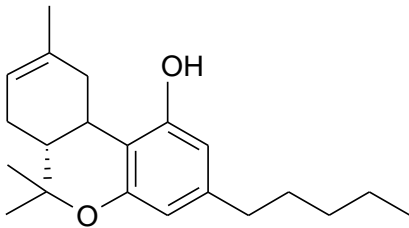
Hlavní kanabinoidy jsou:

a) Neutrální kanabinoidy:

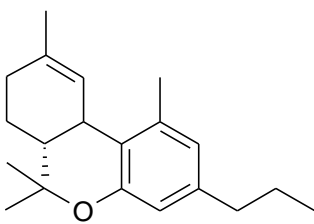
$\Delta^9$ -THC      trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabinol



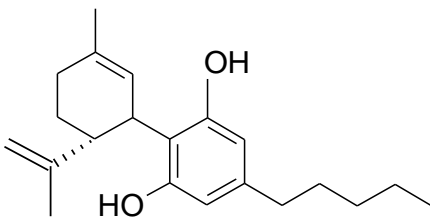
$\Delta^8$ -THC      trans-(-)-delta-8-tetrahydrokanabinol



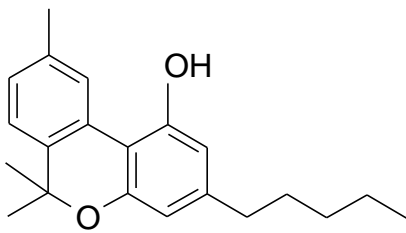
THV      trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabivarin (C3-izomer  $\Delta^9$ -THC)



CBD      kanabidiol

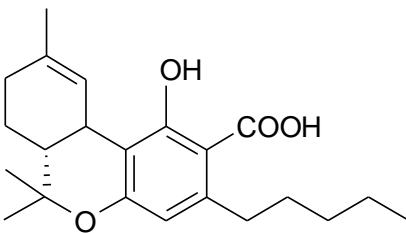


CBN            kanabinol

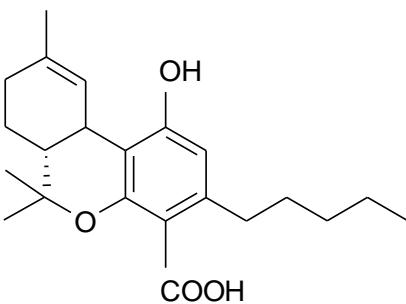


b) kyselé kanabinoidy:

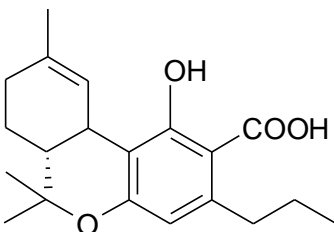
$\Delta^9$ -THCA-A            trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabinolová kyselina A



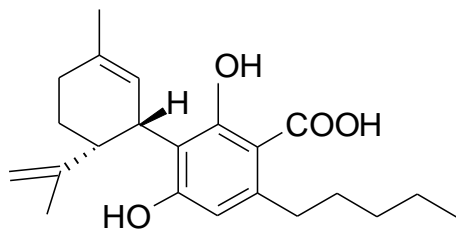
$\Delta^9$ -THCA-B            trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabinolová kyselina B



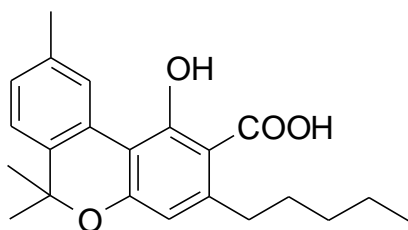
THVA            trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabivarinová kyselina  
(C3 izomer  $\Delta^9$ -THCA-A)



CBDA kanabidiolová kyselina



CBNA kanabinolová kyselina



Byly identifikovány různé podtřídy kanabinoidů:

- typu kanabigerolu (CBG)
- typu kanabichromenu (CBC)
- typu kanabidiolu (CBD)
- typu  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu ( $\Delta^9$ -THC)
- typu  $\Delta^8$ -tetrahydrokanabinolu ( $\Delta^8$ -THC)
- typu kanabinolu (CBN)
- jiné kanabinoidy <sup>6</sup>

Velikost účinků marihuany je vztažena k obsahu  $\Delta^9$ -THC, což je farmakologicky i toxikologicky nejvýznamnější složka konopí. Farmakologické působení  $\Delta^9$ -THC je stereoselektivní. Přírodně se vyskytuje pouze (-)-izomer, který je biologicky mnohem aktivnější než jeho zrcadlový (+)-izomer. Konopí obsahuje také různá množství derivátů  $\Delta^9$ -THC nesoucích karboxylovou skupinu, jejichž význam spočívá ve skutečnosti, že po zahřátí (při kouření nebo vaření) přecházejí na aktivní formu  $\Delta^9$ -THC. Naopak při skladování konopné pryskyřice může docházet k oxidaci  $\Delta^9$ -THC na neaktivní složky.<sup>6</sup>

CBD nemá psychoaktivní účinky, zato vykazuje sedativní, analgetické a také antibiotické vlastnosti. Působí proti povzbudivým účinkům  $\Delta^9$ -THC a posouvá počátek působení marihuany. Naproti tomu může její vliv až dvakrát prodloužit (CBD je prekurzorem  $\Delta^9$ -THC).

CBN je degradačním (oxidačním) produktem  $\Delta^9$ -THC, není tedy produkován rostlinou a přirozeně se v pryskyřici nevyskytuje. Vzniká při špatném skladování nebo při výrobě hašiše a má nejvýše 10% psychoaktivity  $\Delta^9$ -THC, přičemž účinky se projeví rychle, avšak bez pocitu dosažení vrcholu a následně s pocity ospalosti a únavy. Rovněž způsobuje pocit závratě a vnitřní rozpolcenosti.<sup>10</sup> Je produktem oxidace  $\Delta^9$ -THC pravděpodobně působením rostlinných enzymů a může tak být považován za přibližný marker stáří drogy.<sup>11</sup>

Tetrahydrokanabivarin (THV) je propylderivát  $\Delta^9$ -THC. Údajů o jeho působení není mnoho, ale podle pokusů na zvířatech se zdá, že vyvolává rychlejší a kratší účinek než  $\Delta^9$ -THC.

U kanabichromenu (CBC) se předpokládá, že nemá psychotropní účinky na člověka, avšak je možné, že působí synergisticky s  $\Delta^9$ -THC.<sup>10</sup>

#### 2.1.4. Účinky kanabinoidů

Účinky kanabinoidů na psychiku, vědomí a psychomotorické funkce mohou být rozdílné podle zkušenosti uživatele a podle jeho stavu v době použití drogy.

Pozorovatelné a předpokládané účinky konopných drog jsou:

*Psychika a vnímání:* euforie, zvýšená pohoda, únava, dysforie, úzkost, snížení úzkosti, depersonalizace, zvýšené sensorické vnímání, zvýšené sexuální zážitky, halucinace, změna vnímání času, psychotické stavy

*Vědomí a psychomotorický výkon:* fragmentované myšlení, zvýšená tvořivost, narušená paměť, vratká chůze, porucha koordinace pohybů, splývavá řeč, zhoršování nebo zlepšování pohybové koordinace

*Nervový systém:* analgezie, svalová relaxace, stimulace chuti k jídlu, zvracení, antiemetické účinky, neuroprotektivní účinky při ischemii a hypoxii

*Tělesná teplota:* snížení tělesné teploty

*Kardiovaskulární systém:* tachykardie, zvýšená potřeba kyslíku, vasodilatace, ortostatická nebo posturální hypotenze (snížená schopnost upravit krevní tlak při změně polohy), hypertenze (u nezkušených uživatelů), inhibice agregace trombocytů

*Oči:* zarudlé oči (v důsledku dilatace cév ve spojivkách), snížený tok slz, snížení nitroočního tlaku

*Respirační systém:* bronchodilatace, hyposalivace, sucho v ústech



*Genetický materiál a rakovina:* protinádorová aktivita, inhibice syntézy DNA, RNA a proteinů

*Gastrointestinální trakt:* snížený pohyb střev a zpožděné vyprazdňování žaludku

*Hormonální systém:* vliv na luteinizační hormon, folikulostimulační hormon, testosteron, prolaktin, somatotropin, thyreostimulační hormon, glukosový metabolismus; snížený počet a pohyblivost spermií, narušený menstruační cyklus a potlačená ovulace

*Imunitní systém:* narušená buněčná a humorální imunita, protizánětlivé a stimulační účinky

*Vývoj plodu:* malformace, růstová retardace, narušený fetální a postnatální vývoj mozku, narušené kognitivní funkce

Také některé fyziologické účinky (např. vliv na krevní tlak) mohou být odlišné u zkušených a nezkušených uživatelů marihuany. Zvýšení klidového pulzu až o 60%, ke kterému dochází v první půlhodině po vykouření marihuanové cigarety, může být nebezpečné pro osoby se srdeční chorobou. Účinky  $\Delta^9$ -THC na kardiovaskulární systém jsou tedy dost výrazné.

Bylo zjištěno, že kanabinoidy mění funkci řady buněk imunitního systému. Většina těchto změn je relativně malých, zcela reverzibilních po odstranění kanabinoidů, a vznikajících pouze při vyšších koncentracích.

V závislosti na způsobu požití marihuany existují výrazné rozdíly v resorpci a metabolismu  $\Delta^9$ -THC a v jeho průvodních projevech. Kouření je zvláště účinný způsob, jak dostat  $\Delta^9$ -THC do mozku. Do tělního oběhu se dostane 15-50%  $\Delta^9$ -THC z marihuanové cigarety, přičemž ztráty u zkušených kuřáků jsou až poloviční proti náhodným kuřákům. Při kouření marihuany jsou subjektivní pocity vnímány již během vteřin až minut, dosahují maxima po 30 minutách a trvají 2 až 3 hodiny. Po orálním použití se účinky dostavují až po 0,5-2 hodinách, jsou stálejší a trvají 5 až 8 hodin a resorpce  $\Delta^9$ -THC lepší, pokud je současně požíván nějaký tuk. Intravenózní aplikace  $\Delta^9$ -THC je obtížná vzhledem k jeho nerozpustnosti ve vodě.<sup>6</sup>

### **2.1.5. Potenciální terapeutické účinky**

V polovině 90. let minulého století se opět otevřela otázka možného lékařského využití kanabinoidů. Příčinou byly výsledky řady studií, které ukázaly, že kouření marihuany často umožňuje pacientům vyrovnat se lépe s bolestí a nauzeou při léčbě

rakoviny, a že dochází ke snížení nitroočního tlaku u pacientů s glaukomem. Protože se farmaceutickým firmám stále nepodařilo vyvinout účinné deriváty  $\Delta^9$ -THC bez psychotropních účinků, některé státy povolily lékařské využití psychotropně působících kanabinoidů, což ale vedlo k obavám o možném zneužití této péče ze strany rekreačních uživatelů marihuany. V současné době je ve většině západních států marihuana zařazena mezi nezákonné drogy bez lékařského využití. Skutečností je, že s nadějí na zlepšení svého stavu kouří marihuanu ilegálně mnoho pacientů s AIDS, roztroušenou sklerózou, rakovinou nebo glaukomem.

Za prokázané lze považovat příznivé účinky kanabinoidů na nevolnost a zvracení (jako vedlejších účinků protinádorové terapie), anorexii a kachexii. Relativně dobře potvrzené jsou i účinky na elasticitu (způsobenou roztroušenou sklerózou nebo poraněním míchy), neurogenní bolest, poruchy pohybu (Touretteův syndrom, dystonie, Parkinsonova choroba, třes, tardivní dyskineza), astma (pouze p.o.) a glaukom. Méně potvrzené jsou účinky na alergie, záněty, infekce, epilepsii, závislost a abstinční syndrom (při závislosti na benzodiazepinech, opiátech nebo alkoholu). Z psychiatrických symptomů je to vliv na reaktivní depresi, poruchy spánku, úzkostné poruchy a bipolární poruchy. Ve stádiu výzkumu jsou i neuroprotektivní účinky  $\Delta^9$ -THC a jeho působení na autoimunitní nemoci, rakovinu a poruchy krevního tlaku.

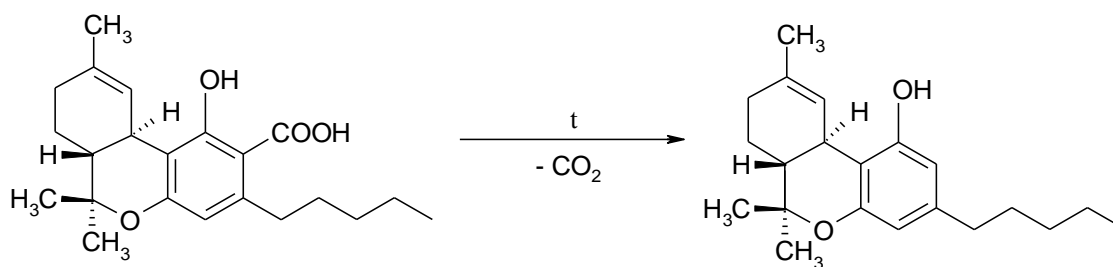
V některých státech jsou dostupné léky, které jsou syntetickými kanabinoidy: dronabinol a nabilon. Dronabinol (Marinol<sup>®</sup>) je generický název, který byl dán  $\Delta^9$ -THC. Čistá substance je světle žlutá pryskyřice, která je prakticky nerozpustná ve vodě. Marinol<sup>®</sup> se proto připravuje rozpuštěním dronabinolu v sezamovém oleji. V USA je cca 80% Marinolu<sup>®</sup> předepisováno pacientům s AIDS (pro stimulaci chuti k jídlu), 10% při chemoterapii rakoviny (proti nevolnosti a zvracení) a 10% při jiných indikacích. Nabilon (Cesamet<sup>®</sup>) je keto-kanabinoid. Je jedinou klasickou syntetickou obdovou  $\Delta^9$ -THC, která může být předepisována v některých státech (v Kanadě, Švýcarsku, Velké Británii). Čistá substance je pevná krystalická látka a pro užití se Cesamet<sup>®</sup> připravuje v pevné podobě. Klinické zkoušky tohoto léku se zaměřují na jeho použití při léčbě nevolnosti a zvracení při chemoterapii rakoviny.<sup>6</sup>

Levonantradol je další homolog  $\Delta^9$ -THC, který je využitelný jako analgetikum, pro uvolnění svalových spasmů. Je však potřeba prokázat výhody těchto preparátů před standardní léčbou.<sup>10</sup>

## 2.2. Zkoumání dekarboxylační reakce $\Delta^9$ -THCA-A k toxicky aktivnímu $\Delta^9$ -THC při rozdílných analytických podmínkách a při simulaci podmínek kouření<sup>3</sup>

Právní normy ve většině evropských zemí požadují měření celkového obsahu  $\Delta^9$ -THC ve srovnání s celkovým množstvím volného  $\Delta^9$ -THC a jeho prekurzoru  $\Delta^9$ -THCA-A. Důvodem je, že  $\Delta^9$ -THCA-A se při zahřívání přeměňuje na psychotropně aktivní  $\Delta^9$ -THC. K tomu dochází, když se produkty z marihuany kouří - viz rovnice č. 1.

Rovnice č. 1: Dekarboxylační reakce  $\Delta^9$ -THCA-A na  $\Delta^9$ -THC



Autoři této studie brali v potaz především skutečnost, že rostlinný materiál obsahuje vedle volného  $\Delta^9$ -THC hlavně  $\Delta^9$ -THCA-A. Proto prozkoumávali teplotní přeměnu  $\Delta^9$ -THCA-A na  $\Delta^9$ -THC.

Dlouho nebyl standard  $\Delta^9$ -THCA-A dostupný. V literatuře je popisována metoda pro izolaci  $\Delta^9$ -THCA-A z rostlinného materiálu extrakcí a následným čištěním na reverzní fázi MPLC (medium pressure liquid chromatography). Tato metoda čištění je ale drahá. Proto autoři studie vyvinuli novou čistící metodu založenou na konvenčně připraveném chromatografickém sloupci, aby získali  $\Delta^9$ -THCA-A v množství několika miligramů.

### 2.2.1. Extrakce $\Delta^9$ -THCA-A a čištění surového extraktu sloupcovou chromatografií

Extrakti Dussy et al. provedli dle procedury popsané Lehmanem a Brenneisenem.<sup>12</sup>

Ve zkratce: Rostlinný materiál v práškovém stavu extrahovali petroleterem okyseleným kyselinou octovou. Filtrovaný extrakt znovu 3krát extrahovali vodným roztokem NaOH a Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. Tyto kombinované extrakty okyselili ledovou kyselinou sírovou až pH dosáhlo 3 a okamžitě extrahovali 3krát s TBME (terciární butyl-metyleter). Tyto kombinované organické extrakty vysušili s Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, zfiltrovali a zkoncentrovali v rotačních odparkách při 25-30°C pomocí kryostatického chlazení par. Koncentrát vysušili při vakuu a získali hnědý amorfni materiál.

Surový extrakt chromatografovali na sloupci naplněném silikagelem. Eluční roztok se skládal ze směsi n-hexanu, toluenu, acetonu a kyseliny octové. Frakce kontrolovali pomocí TLC a ty, jež obsahovaly  $\Delta^9$ -THCA-A, zkoncentrovali v rotačních odparkách. Koncentrát vysušili pod vakuem a získali bledě žlutý amorfni materiál. Čistota tohoto materiálu byla 96 %  $\Delta^9$ -THCA-A, hlavní nečistoty byly marihuanové analogy  $\Delta^9$ -THCA-A. Hlavní nečistota, která se tam nacházela, byla kyselina kanabinolová, produkt oxidace  $\Delta^9$ -THCA-A.

### 2.2.2. Simulace kouření

Komerčně dostupné cigarety bez filtru Dussy et al. obohatili nejprve  $\Delta^9$ -THCA-A a pak  $\Delta^9$ -THC v methanolu a usušili pomocí odsávání jemného proudu vzduchu. Aby opět získali  $\Delta^9$ -THC a zjistili, kolik  $\Delta^9$ -THC přibližně může kuřák získat z cigarety, použili sestavu, kdy cigarety připojili do dvou sériově zapojených lahví pomocí krátkého potrubí. Láhve naplnili etylacetátem a připojili na vakuovou pumpu. Po zapálení cigaret nasávali lehký proud vzniklého plynu skrz lahve a vzniklé plyny se zachytávaly v rozpouštědle uvnitř lahví. Rozpouštědla odděleně zkoncentrovali a analyzovali pomocí GC podobně jako extrakty z konopí.

GC analýzy zkoncentrovaných rozpouštědel ukázaly, že žádný  $\Delta^9$ -THC nebyl přítomen v druhé lahvi, což dokazuje, že veškerý  $\Delta^9$ -THC se rozpustil v 1. lahvi. Pouze asi 30%  $\Delta^9$ -THC při přidání  $\Delta^9$ -THCA-A a asi 24%  $\Delta^9$ -THC při přidání  $\Delta^9$ -THC se získalo z 1. lahve a vždy asi 8%  $\Delta^9$ -THC z cigaretového oharku. Velká většina  $\Delta^9$ -THC byla zničena. Protože cigaretu odsávali jemným proudem vzduchu vytvářeným

vakuovou pumpou, lze očekávat, že pouze zanedbatelné množství  $\Delta^9$ -THC se nacházelo ve vedlejším kouři.

V literatuře je popisováno, že v kouři z jointa je k dispozici asi 15-50%  $\Delta^9$ -THC.<sup>13</sup>

### **2.2.3. Optimalizace GC systému pro určení celkového množství $\Delta^9$ -THC**

Pro optimalizaci konverze  $\Delta^9$ -THCA-A na  $\Delta^9$ -THC, srovnávali Dussy et al. tři typy skleněného GC lineru s rozdílnou geometrií.

- otevřený skleněný liner
- otevřený skleněný liner naplněný silanizovanou skleněnou vatou
- cup splitter

Prokázali, že otevřený skleněný liner naplněný skleněnou vatou dával nejlepší výsledky co se týče opakovatelnosti a konverze. Prázdný otevřený skleněný liner vykazoval určité nedostatky v opakovatelnosti, zatímco cup splitter dával trochu horší výsledky při přeměně. Množství skleněné vaty vložené do otevřeného lineru měl pouze zanedbatelný účinek na konverzi. Daleko důležitější je fakt, že skleněná vata musela být stlačená místo toho, aby byla jenom volně naplněná. Maximální konverze bylo dosaženo při teplotě injektoru 220°C. Množství kanabinolu, který byl vyprodukován další oxidací  $\Delta^9$ -THC, bylo neměřitelné. Hodnota maximální konverze byla asi 67%. V tom samém rozsahu je popsána i Lehmanem a Brenneisem.

### **2.2.4. Optimalizace dekarboxylační teploty pro určení celkového $\Delta^9$ -THC pomocí HPLC**

THCA-A je komerčně dostupná pouze od cca poloviny roku 2004, kdy firma Lipomed AG ([www.lipomed.com](http://www.lipomed.com)) oznámila, že obchoduje s komerčním  $\Delta^9$ -THCA-A jako standardem. Proto většina laboratoří, které měřily celkové množství  $\Delta^9$ -THC pomocí HPLC (metoda bez tepelného šoku) potřebovali přeměnu  $\Delta^9$ -THCA-A, která předcházela analýze. Optimální přeměny dle Dussy et al. je dosaženo asi při 150°C s asi 70% výtěžností při vystavení dané teplotě po dobu 15 minut. Při vyšší teplotě je  $\Delta^9$ -THC oxidován na kanabinol. Mezi teplotami 140°C a 160°C, kdy je vzorek vystaven těmto teplotám po dobu 15 minut, není sledována žádná podstatná teplotní

závislost, takže přesné nastavení teploty není v tomto rozsahu důležité. Při vystavení vzorku jiné teplotě než z intervalu 140°C až 160°C je nutné pro dosažení maximální konverze adekvátně upravit čas expozice.

### 2.2.5. Analýzy marihuanových produktů

S těmito optimalizovanými metodami zkoumal Dussy et al. konopné rostliny, marihuanové květy a vzorky hašiše. Po extrakci etylacetátem je analyzovali na GC a HPLC bez toho, že by provedli dekarboxylaci. Podle očekávání množství  $\Delta^9$ -THCA-A a  $\Delta^9$ -THC měřené pomocí HPLC bylo vyšší než celkové množství  $\Delta^9$ -THC měřené pomocí GC ve všech případech.

Celkové očekávané množství  $\Delta^9$ -THC spočítali z dat HPLC založených na dekarboxylační konverzi ze 70%. Korelace, která byla mezi spočítaným a měřeným celkovým  $\Delta^9$ -THC, byla odpovídající pro všechny vzorky zhotovené z rostliny konopí, částečně horší byla pro marihuanové květy a nevhodná pro hašiš.

Jak se zdá, s vyšší koncentrací  $\Delta^9$ -THCA-A je dekarboxylační metoda výhodnější než jiné reakční metody, protože naměřené množství  $\Delta^9$ -THC může být vyšší než očekávané.

### 2.2.6. Využití v praxi

Jak se ukázalo, termální konverze  $\Delta^9$ -THCA-A na  $\Delta^9$ -THC v použitých analytických zařízeních je pouze částečná a výnos dosahuje maximálně 70%. Proto laboratoře mohou kvantifikovat celkové množství  $\Delta^9$ -THC tak, že sečtou množství  $\Delta^9$ -THCA-A a již přítomného  $\Delta^9$ -THC ve rostlině, a tak dostanou vyšší hodnotu než v případě, že se provede dekarboxylace před analýzou.

Autoři studie navrhli, aby každá laboratoř, která analyzuje celkové množství  $\Delta^9$ -THC u konopných produktů, zhodnotila výnos konverze. Jediný způsob, jak exaktně určit úhrnné množství  $\Delta^9$ -THC, je měřit  $\Delta^9$ -THCA-A a  $\Delta^9$ -THC odděleně a spočítat celkové množství  $\Delta^9$ -THC založené na těchto hodnotách. Každá celková hodnota  $\Delta^9$ -THC určená po dekarboxylaci dává spíše minimální obsah než přesnou hodnotu. Nicméně měření celkového úhrnu  $\Delta^9$ -THC pomocí GC bez derivatizace je procedura navržená úřady ve Švýcarsku a dalších evropských zemích. Během kouření jointa je stejně většina  $\Delta^9$ -THC zničeno a pouze asi 30% aktivní substance může být přijato kuřákem.

Rozlišení  $\Delta^9$ -THC a THCA při GC analýze je jinak možné pouze po předchozí methylaci, silylaci<sup>14</sup> nebo vytvořením alkylboronátu.<sup>4</sup>

## **2.3. Stabilita kanabinoidů**

Kanabinoidy i THCA vykazují stabilitu po dobu alespoň několika měsíců při skladování v etanolu při  $-20^{\circ}\text{C}$ .<sup>5,9</sup> Metanolický roztok  $\Delta^9$ -THC uchovávaný při  $5^{\circ}\text{C}$  byl stabilní nejméně 1 měsíc a vzorky skladované ve tmě za normální teploty byly stabilní alespoň 5 dní. THCA byla v roztocích o něco méně stabilní. Produktem oxidace  $\Delta^9$ -THC, pravděpodobně působením rostlinných enzymů, je CBN a může tak být považován za přibližný marker stáří drogy.<sup>11</sup>

## **2.4. Stanovení a identifikace kanabinoidů**

### **2.4.1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)**

Pro předběžnou identifikaci kanabinoidů lze použít TLC. Metoda TLC je velmi užitečná při rychlém prověřování vzorků, zda jsou přítomny kanabinoidy v surovém extraktu z rostlin, nebo při TLC frakcí sebraných při preparativní chromatografii. Nedostatek v selektivitě může být někdy překonán použitím selektivních detekčních činidel. Samozřejmě reprodukovatelnost TLC záleží na několika parametrech např. relativní vlhkosti. Ve srovnání s jinými separačními metodami je účinnost TLC velmi nízká. Pro jednoznačnou následnou identifikaci kanabinoidních skvrn jsou nutné jiné metody.<sup>4</sup>

### **2.4.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Zoller<sup>15</sup> popisuje stanovení kanabinoidů na C18 koloně s mobilní fází acetonitril-vodný roztok kyseliny fosforečné s gradientovou elucí s UV detekcí, resp. fluorescenční detekcí. Dussy<sup>3</sup> popisuje HPLC analýzu na koloně C18 s mobilní fází acetonitril-methanol-vodný roztok kyseliny octové (pH 4,75).

Hazekamp<sup>4</sup> popisuje použití kolony C18 s mobilní fází methanol-voda obsahující 25 mM kyseliny mravenčí (pH 3) v gradientovém režimu, DAD a fluorescenční detekce v porovnání s použitím mobilní fáze skládající se ze směsi pufru acetonitrilu a fosforečnanu (10 mM, pH 7,5) taktéž na koloně C18 s DAD a FLD.

Retenční čas kyselých kanabinoidů lze ovlivnit změnou pH elučního rozpouštědla, zatímco pořadí eluce pro neutrální kanabiniody zůstává stejné. Pomocí změny elučního pH může být tedy snížen přesah mezi chromatografickými píky kyselých a neutrálních kanabinoidů, pokud k němu dochází.

V případě, že dochází k překrývání píků u HPLC, může informace o struktuře kanabinoidu a jeho totožnosti poskytnout též detekce pomocí MS spojená s HPLC (LC-MS) a dále ještě lepších výsledků lze dosáhnout s detekcí LC-MS-MS. V kyselém systému (pH = 3) lze použít kyselinu mravenčí, která je jako eluční činidlo slučitelná s hmotnostní spektrometrií. Na rozdíl od HPLC-DAD nebo HPLC s fluorescenční detekcí, jež jsou prováděny při pokojové teplotě, může u LC-MS docházet vlivem vysoké teploty k termálnímu rozkladu kyselých kanabinoidů.<sup>4</sup>

### 2.4.3. Plynová chromatografie (GC)

Jestliže se nepoužije žádná derivatizace, hmotnostní spektra získaná pomocí GC-MS jsou podobná pro kyseliny a jejich odpovídající neutrální kanabiniody (např. THCA-A a  $\Delta^9$ -THC). Ačkoliv CBD je svojí strukturou docela vzdálené od CBC a CBL, tyto tři kanabiniody vykazují podobné hmotnostní spektrum a jsou rozlišitelné.

Při absenci derivatizace vysoká teplota, která se používá při GC, způsobuje dekarboxylaci kyselých kanabinoidů na jejich odpovídající neutrální formu. Protože konopí obsahuje hlavně kyselé formy kanabinoidů, analýza GC není metodou výběru, kterou by se stanovil metabolický profil kanabinoidního vzorku. Aby se předešlo dekarboxylaci, musí být kyseliny derivatizovány např. pomocí silylace nebo vytvořením alkylboronátu. Při derivatizaci je samozřejmě obtížné dosáhnout 100% výtěžnosti. Kromě toho Hazekamp et al. předpokládá, že termická degradace (oxidace, izomerizace) kanabinoidů se může také objevit ve vstřikovacím portu a sloupci. V případě analýzy standardu  $\Delta^9$ -THC bylo v chromatografu GC detekováno podstatné množství  $\Delta^8$ -THC a CBN, zatímco jiné analýzy (HPLC, NMR, TLC) neukázaly tyto sloučeniny, které jsou známé jako degradační produkty  $\Delta^9$ -THC. Navzdory těmto problémům spojených s GC zůstává tato metoda jako velmi užitečná metoda pro analýzy kanabinoidů.<sup>4</sup>



#### **2.4.4. Spektrometrie v UV oblasti**

Pouze několik UV absorpčních spekter kalibrovaných kanabinoidů je uvedeno ve vědecké literatuře. Jsou všeobecně charakterizovány několika parametry (maximum a minimum, úbočí UV spektra). Molární absorpční koeficienty jsou velmi zřídka uváděny. Protože většina kanabinoidů se liší ve svých UV spektrech s několika absorpčními maximy, může být vybráno pro kvantifikaci mnoho vlnových délek. Absorpce všeobecně klesá se vzrůstající vlnovou délkou. Lepší citlivosti je dosaženo při rozsahu 200-210 nm, zatímco při výběru vyšší vlnové délky pro měření se zvýší selektivnost důsledku snížení rizika interference jiných sloučenin.

#### **2.4.5. Infračervená spektrometrie (IČ)**

Infračervená spektroskopie je při experimentech běžný způsob pro identifikaci a objasnění struktury kanabinoidů a derivátů při izolaci a syntéze. Stejně jako UV spektra jsou obvykle spektra IČ uváděna udáním pouze několika absorpčních maxim. Dále je zřejmé, že uváděná spektra IČ v literatuře byla měřena velkou škálou IČ spektrometrů.

#### **2.4.6. Závěr**

Během posledních několika let vzrostl zájem o konopí jako zdroje sloučenin využitelných v medicíně. Ve vývoji nebo klinickém zkoušení je několik přípravků ze surového materiálu ale i syntetických léků odvozených z konopí. Pro tyto výzkumy je nutné, aby byly dostupné ve velkém množství farmakologicky čisté kanabinoidy. Chromatografické a spektroskopické údaje jsou tedy nezbytný předpoklad pro jejich určení a identifikaci.

Při jednoznačné identifikaci kanabinoidů se nemůže úplně spoléhat na pouze jednu z testovaných metod, protože vždy může dojít ke záměně některých běžných kanabinoidů.<sup>4</sup>

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Přístroje, chemikálie a ostatní pomůcky

#### a) Přístroje a ostatní materiál

UV detektor LCD 2040, Laboratorní přístroje Praha  
Vysokotlaké čerpadlo HPP 5001, Laboratorní přístroje Praha  
Stanice CSW 1.7, DataApex  
Kolona SUPELCOSIL™LC-18-DB (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), Supelco  
Dávkovací smyčka (20 μl), Supelco  
Laboratorní magnetická míchačka, Laboratorní přístroje Praha  
Analytické váhy, Helago s.r.o.  
pH-metr OP 211/1, standardní pH elektroda typu HC 113, Radelkis Budapešť  
Horkovzdušná sušárna  
UV lampa  
Kolonka SPE Zorbax Silica Cart, Agilent Technologies

#### b) Chemikálie

Ultračistá voda, FaF UK  
Metanol pro HPLC, Lach-Ner, s.r.o.  
Hydroxid sodný, p. a., Lachema  
n-hexan pro HPLC, Sigma-Aldrich  
Standard  $\Delta^9$ -THC, Alltech – Applied Science  
Standard CBN, Alltech – Applied Science  
Standard CBD, Alltech – Applied Science  
Standard  $\Delta^8$ -THC, Alltech – Applied Science  
Dietyleter, p.a., Jan Kulich Hradec Králové  
Tetrahydrofuran Chromasolv pro HPLC, Sigma-Aldrich  
Dichlormetan pro HPLC, Merck  
Petroleter p.a., Riedel-de Haën  
Chloroform p.a., Lach-Ner, s.r.o.  
Etylester kyseliny octové p.a., Lachema  
Kyselina octová p.a., Lachema  
Octan sodný, Lachema  
Stlačený dusík, helium, Linde Technoplyn a.s.

### c) Pomůcky

Injekční stříkačka  
Laboratorní sklo  
Automatická pipeta  
PTFE filtr 0,22  $\mu\text{m}$   
Hamiltonova stříkačka

## 3.2. Podmínky HPLC analýzy

Kalibrační roztoky, roztoky standardů a vzorky jsem proměřovala za následujících podmínek:

- kolona: SUPELCOSIL™ LC-18-DB (250 mm  $\times$  4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )
- mobilní fáze: metanol pro HPLC – ultračistá voda (85:15)
- průtoková rychlost: 2 ml/min
- vlnová délka detekce: 220 nm
- dávkovací smyčka 20  $\mu\text{l}$

Pomocí Hamiltonovy stříkačky jsem nastříkala kalibrační roztoky, roztoky standardů a vzorky na kolonu a podrobila je HPLC analýze.

Jestliže jsem změnila jakkoliv podmínky analýzy, výslovně jsem to uvedla.

## 3.3. Příprava mobilní fáze

Mobilní fázi, kterou jsem použila pro HPLC, jsem vytvořila smísením metanolu a ultračisté vody v poměru 85:15. Před vlastní HPLC analýzou jsem mobilní fázi odplynila heliem a nasála do pumpy. Hlavním účelem tohoto kroku bylo odstranění rozpuštěných plynů, které by mohly negativně ovlivnit průběh analýzy.

## 3.4. Kalibrační křivka $\Delta^9$ -THC

Připravila jsem sadu kalibračních roztoků  $\Delta^9$ -THC v metanolu o koncentraci 3,1  $\mu\text{g/ml}$ , 6,3  $\mu\text{g/ml}$ , 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , 25,0  $\mu\text{g/ml}$ , 50,0  $\mu\text{g/ml}$ , 100,0  $\mu\text{g/ml}$  a 150,0  $\mu\text{g/ml}$ . Standard  $\Delta^9$ -THC byl metanolický roztok (1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

Odpipetovala jsem 200  $\mu\text{l}$  standardu  $\Delta^9$ -THC o koncentraci 1000  $\mu\text{g/ml}$  a doplnila jsem 800  $\mu\text{l}$  metanolu. Vznikl roztok o koncentraci 200  $\mu\text{g/ml}$ . Z tohoto

roztoku jsem postupným ředěním s metanolem (1:1) připravila další kalibrační roztoky kromě roztoku o koncentraci 150 µg/ml, který jsem připravila z 400 µl roztoku o koncentraci 200 µg/ml, 70 µl roztoku o koncentraci 1000 µg/ml a 530 µl metanolu.

Pozn. Původně jsem zamýšlela logicky zahrnout do kalibrační křivky také roztok o koncentraci 200 µg/ml, ale byl, jak se později ukázalo, příliš koncentrovaný a přesahoval rozsah stupnice možné detekce. Proto jsem následně připravila roztok o nižší koncentraci, tj. 150 µg/ml.

Kalibrační roztoky jsem nastříkovala pomocí Hamiltonovy stříkačky na HPLC kolonu.

### 3.5. Příprava extraktu z marihuany a vzorku

Odvážila jsem 1 g sušené marihuany a vsypala do 100 ml n-hexanu. Vzniklou směs jsem promíchávala cca 3 hodiny na magnetické míchače.

Směs jsem následně přefiltrovala přes PTFE filtr o velikosti pórů 0,22 µm, aby nedocházelo zanášení předkolony, případně samotné HPLC kolony.

Odpipetovala jsem do zkumavky 100 µl přefiltrovaného extraktu a odfoukala jsem n-hexan pomocí dusíku do sucha. Přidala jsem 1 ml metanolu a obsah zkumavky jsem protřepala. Tímto jsem získala vzorek, který jsem následně nastříkla na HPLC kolonu pomocí Hamiltonovy stříkačky.

Tam, kde jsem použila pro přípravu vzorku např. jiné množství přefiltrovaného extraktu nebo jsem směs n-hexanu s marihuanou promíchávala po jiný časový úsek, jsem to výslovně v dalším textu uvedla.

### 3.6. Výpočet obsahu $\Delta^9$ -THC v marihuaně

Při stanovení obsahu  $\Delta^9$ -THC v marihuaně, které jsem prováděla dle výše uvedeného postupu, jsem obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně 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 marihuany ku objemu extraktu použitého na přípravu vzorku. Tento podíl se následně vynásobí objemem metanolu použitým na rozpuštění odparku vzorku  
n.....navážka marihuany v  $\mu\text{g}$   
c.....koncentrace  $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) odečtená z kalibrační přímky

### **3.7. Porovnání stability extraktu a směsi n-hexanu s rostlinnou drtí skladovaných za různých podmínek po dobu 24 hodin**

Připravila jsem extrakt z marihuany a vzorek dle bodu 3.5 a podrobila HPLC analýze. K přípravě extraktu jsem použila 1,000 g marihuany.

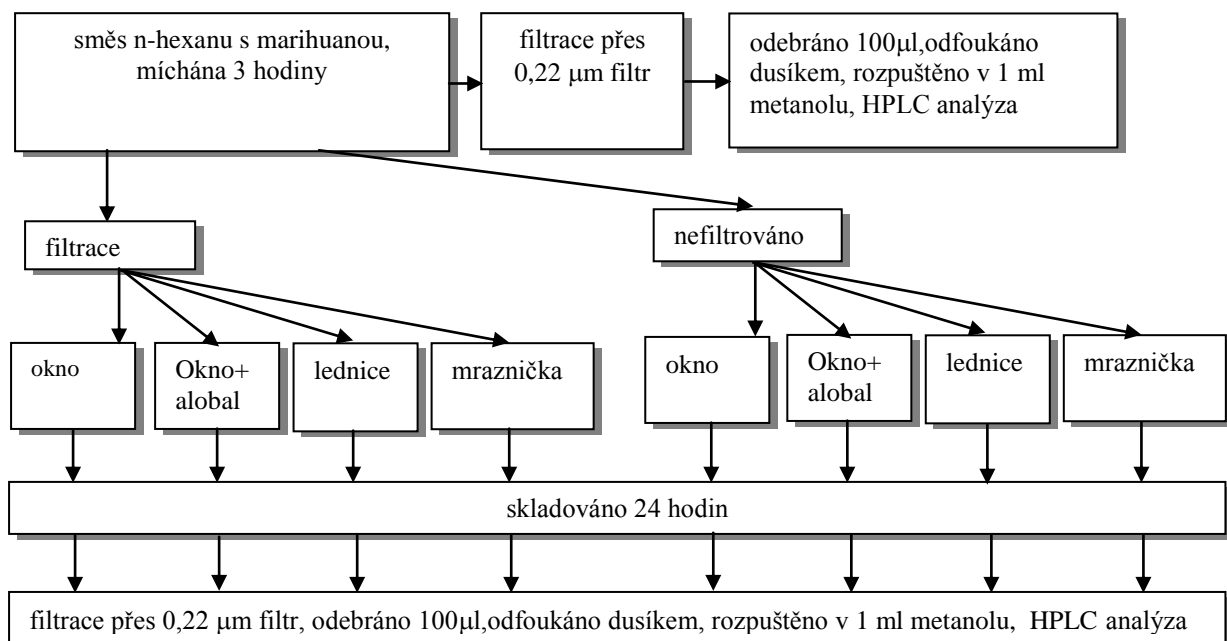
Zbytek směsi n-hexanu s rostlinnou drtí jsem rozdělila na 8 dílů, 4 díly jsem přefiltrovala přes filtrační papír, aby vznikl čirý extrakt. Extrakty i směsi n-hexanu s rostlinným materiálem jsem umístila na 4 stanoviště. Na jedno stanoviště jsem umístila vždy 1 extrakt a 1 směs a ponechala jsem je tam 24 hodin. Stanoviště byla:

- 1) za oknem s volným přístupem světla (cca 26°C)
- 2) za oknem, kdy je extrakt a směs zabalena do alobalu (cca 26°C)
- 3) lednice (cca 5°C)
- 4) mraznička (cca - 18°C)

Následně jsem přefiltrovala vždy část extraktu nebo směsi přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr, zhotovila jsem vzorky a podrobila je jsem HPLC analýze za výše uvedených podmínek.

Pro lepší orientaci uvádím zjednodušené schéma postupu při tomto pokusu - viz schéma č. 1.

Schéma č. 1: Zjednodušené schéma postupu při porovnávání stability extraktu a směsi n-hexanu s marihuanou:



### 3.8. Podrobení marihuany působení teploty 80°C, UV záření, varu v n-hexanu

Marihuanu jsem rozdělila na 4 části. Jeden díl jsem umístila na 1 hodinu do horkovzdušné sušárny vytemperované na 80°C. Před tím jsem však musela zajistit, aby nebyla marihuana rozfoukána. Toho jsem docílila zabalením rostlinného materiálu do filtračního papíru a vložením do kádinky pro snadnější manipulaci. Druhý díl jsem nechala ozařovat pod UV lampou při 254 nm také 1 hodinu. Následně jsem navážila z prvního dílu 1,000 g marihuany a z druhého 1,003 g marihuany. Každý jsem vsypala do 100 ml n-hexanu a nechala jsem je míchat cca 3 hodiny na magnetické míchače. Z třetího dílu jsme navážila 1,001 g marihuany, vsypala ji do 100 ml n-hexanu a vařila jsem marihuanu s varnými kamínky 3 hodiny pod zpětným chladičem. Bod varu n-hexanu je 69°C.

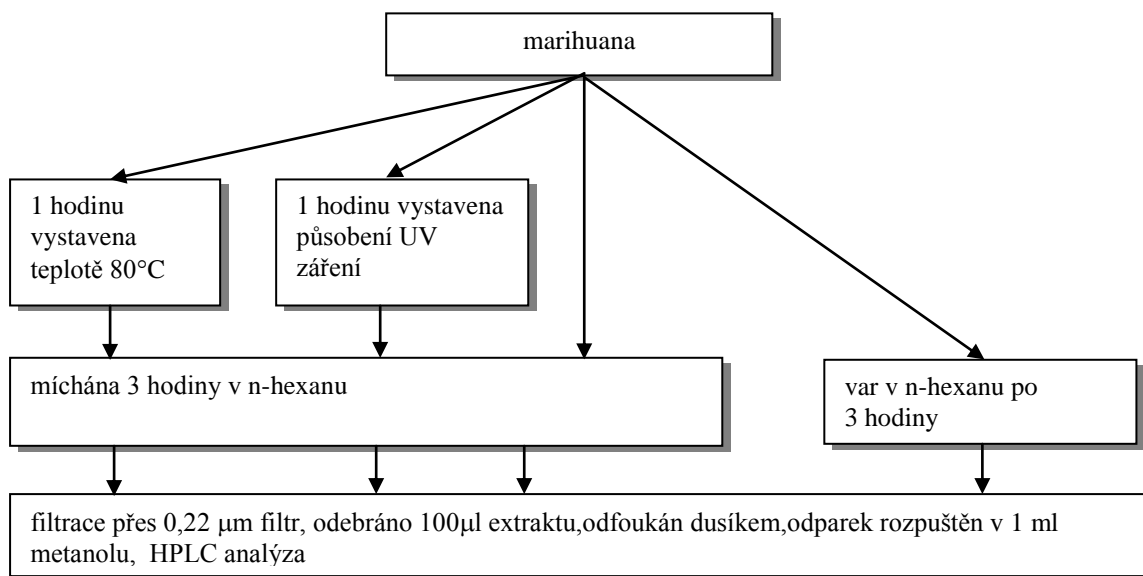
Místo zhotovení čtvrtého extraktu a vzorku dle bodu 3.5, aby byla možnost srovnání, jsem použila výsledky měření vzorku zhotoveného dle bodu 3.5 z předešlého pokusu, protože se jednalo o tentýž druh marihuany, ze kterého jsem zhotovovala vzorky pro tento pokus.

Pro možnost sledování závislosti obsahu  $\Delta^9$ -THC na délce umístění marihuany v n-hexanu jsem odebrala minimální část extraktu z každého připravovaného extraktu

již po 1 hodině míchání nebo varu v n-hexanu, přefiltrovala přes 0,22 µm filtr a připravila vzorek pro HPLC analýzu.

Pro lepší orientaci uvádím zjednodušené schéma postupu při tomto pokusu - viz schéma č. 2, kde neuvádím pro zjednodušení odebrání části extraktu po 1 hodině a následnou přípravu vzorku.

Schéma č. 2: Zjednodušené schéma postupu při porovnávání vlivu působení teploty 80°C, UV záření a varu v n-hexanu na marihuanu



### 3.9. Příprava vzorků o různé koncentraci a současně vystavení odfoukaného extraktu 2 různým teplotám

Použila jsem extrakt, který jsem připravila již dříve dle bodu 3.5, a byl pro zamýšlené použití vhodný, tj. obsahoval jak  $\Delta^9$ -THC, tak THCA. Na přípravu extraktu jsem tehdy navázila 1,001 g marihuany.

Extrakt jsem přefiltrovala přes 0,22 µm filtr a následně jsem odpipetovala do různých zkumavek čtyřikrát po 100 µl, osmkrát po 2 ml extraktu a obsah zkumavek jsem odfoukala dusíkem.

Následně jsem 1 zkumavku, která obsahovala před odfoukáním dusíkem 100 µl extraktu, a 2 zkumavky, které obsahovaly před odfoukáním dusíkem 2 ml extraktu, vystavila teplotě 100°C v horkovzdušné sušárně po dobu 30 minut a 1 zkumavku, která obsahovala před odfoukáním dusíkem 100 µl extraktu, a 2 zkumavky, které obsahovaly



před odfoukáním dusíkem 2 ml extraktu, jsem vystavila teplotě 100°C v horkovzdušné sušárně po dobu 60 minut.

Analogicky jsem postupovala se zbývajícími zkumavkami. Rozdílem oproti výše zmíněnému byla teplota, které jsem vystavila vzorky. Tato teplota byla 120°C.

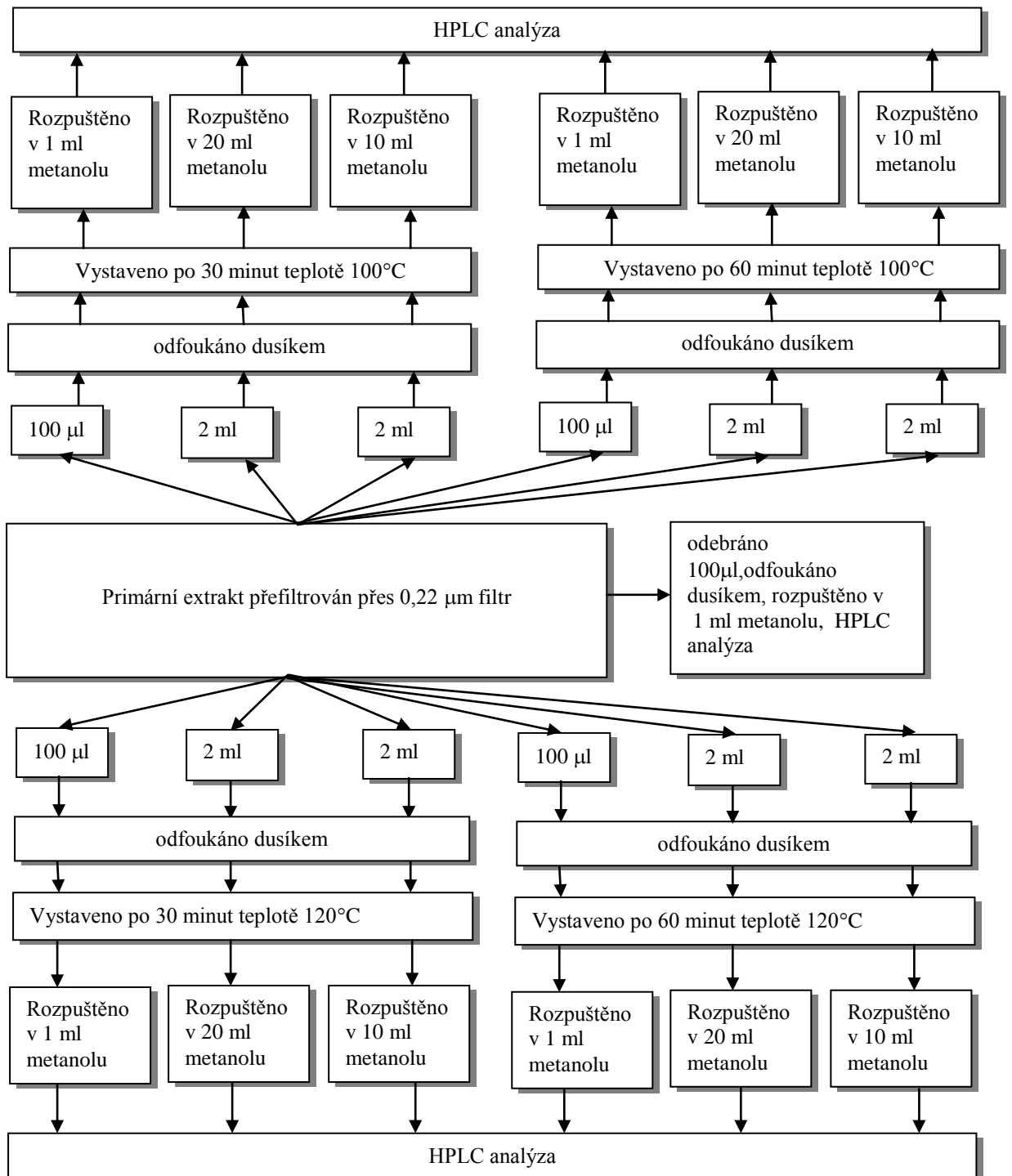
Vznikly tedy 4 skupiny vzorků, které obsahovaly vždy 1 zkumavku s původním obsahem 100  $\mu$ l a 2 zkumavky s původním obsahem 2 ml extraktu. Tyto skupiny vzorků se navzájem lišily teplotou, které byly vystaveny, a dobou, po kterou byly vystaveny určité teplotě.

Následně jsem rozpustila odparek ve zkumavkách vystavený různým teplotám po rozdílný čas, abych mohla nastříkovat vzorky na kolonu, přičemž v každé skupině jsem přidala do zkumavky s původním obsahem 100  $\mu$ l 1 ml metanolu, do 1. zkumavky s původním obsahem 2 ml jsem přidala 20 ml metanolu (tyto dva roztoky měly tedy stejnou koncentraci). Do 2. zkumavky s původním obsahem 2 ml jsem přidala 10 ml metanolu (vznikl roztok o dvojnásobné koncentraci oproti dvěma výše zmíněným). Vzorky jsem podrobila HPLC analýze.

Pro možnost porovnání, zda nastalo zvýšení obsahu  $\Delta^9$ -THC na úkor THCA vlivem působení zvýšené teploty, jsem připravila z extraktu i vzorek, který jsem nevystavila působení zvýšené teploty.

Pro lepší orientaci uvádím zjednodušené schéma postupu při tomto pokusu - viz schéma č. 3.

Schéma č. 3: Zjednodušené schéma postupu přípravy vzorků o různé koncentraci a současné vystavení odfoukaného extraktu 2 různým teplotám



### 3.10. Vliv teploty sušení marihuany na koncentraci $\Delta^9$ -THC a THCA

Marihuanu zabavenou Policií ČR, která pocházela z jedné sklizně, pracovník Policie ČR sušil při postupně se zvyšujících teplotách (55°C, 70°C, 85°C, 100°C, 115°C, 170°C) v horkovzdušné sušárně cca 30 minut a z takto sušené marihuany připravil extrakty a vzorky dle bodu 3.5, které analyzoval na HPLC a GC. Navážka byla vždy 1,000 g. Podmínky HPLC a GC analýzy u Policie ČR (stručně):

#### HPLC

- kolona C18
- teplota kolony 50°C
- průtok 0,5 ml/min
- mobilní fáze metanol : voda, 85:15
- detekce UV 220 nm
- retenční čas  $\Delta^9$ -THC 23,8 min

#### GC

- kolona HP-5, 530  $\mu$ m ID
- nástřik cool on column
- detekce FID, teplota 300°C
- nosný plyn helium

I já jsem připravila z takto sušeného rostlinného materiálu extrakty a vzorky dle bodu 3.5 a podrobila je HPLC analýze. Pro orientaci, zda je nutné rostlinný materiál míchat v n-hexanu 3 hodiny, jsem odebrala vzorky i po 1 hodině míchání. Nemohla jsem zhotovit vzorek z marihuany sušené při 100°C, protože byl spotřebován Policií ČR k jiným pokusům.

Cílem měření je test vlivu teploty sušení a typu analytické techniky na koncentraci  $\Delta^9$ -THC, což je zásadní pro trestní řízení, a porovnat výsledky dvou laboratoří.

### 3.11. Extrakce na pevnou fázi

Pro extrakci na pevnou fázi jsem použila kolonku Zorbax SPE Silica Cart s náplní 100 mg od firmy Agilent Technologies.

Tento typ sorbentu patří mezi normální fáze. Je tvořen oxidem křemičitým. Všechny funkční skupiny účastníci se adsorpce analytu z matrice jsou volné hydroxylové skupiny. Základním typem interakcí působících mezi analytem a sorbentem jsou vodíkové vazby, případně dipól-dipól interakce a interakce indukovaný dipól-dipól.

Extrakce na pevnou fázi zahrnuje několik hlavních kroků. Aktivace sorbentu - zajišťuje maximální kontakt kapalně a pevně fáze. Tento proces je nesmírně důležitý, protože zajišťuje dobrý kontakt mezi analytem a pevnou fází a tudíž dobrou adsorpci. Pokud by tento krok nebyl proveden nebo byl proveden nedostatečně, došlo by k omezené adsorpci a díky tomu i k nižší výtěžnosti.

Aplikace vzorku - roztok vzorku je pipetou aplikován na kolonku a začíná postupovat sorbentem. Analyt a mnoho dalších sloučenin obsažených ve vzorku je zadrženo na pevné fázi. Velice důležitou roli má charakter rozpouštědla.

Při průtoku rozpouštědla SPE kolonkou dochází k průběžnému ustalování rovnováhy mezi analytem a stacionární fází. Tento proces probíhá při adsorpčním i elučním kroku a může být narušen příliš vysokým průtokem rozpouštědla sorbentem. Zvýšení průtoku nad určitou hodnotu má nejčastěji za následek snížení výtěžku, snížení zlomového objemu a zvýšení elučního objemu. Průtok rozpouštědla kolonkou by obecně neměl přesahovat 2 ml/min. Záleží však na typu nosiče pevné fáze.

Závěrečným krokem extrakce na pevné fázi je eluce analytu ze sorbentu. K tomuto účelu se používá rozpouštědlo, jehož eluční síla není příliš velká, aby nedošlo k uvolnění nežádoucích součástí vzorku zachycených na sorbentu, ale zároveň dostatečně silné, aby eluovalo analyt. Někdy je velice obtížné nalézt vhodné rozpouštědlo s optimální eluční silou, a proto se velmi často kromě jednotlivých rozpouštědel používají jejich směsi.

Případným krokem extrakce na pevné fázi je regenerace sorbentu. Tento krok vede ke zlevnění celého procesu, protože díky regeneraci lze jeden sorbent použít opakovaně. Nebezpečí tohoto procesu spočívá v tzv. paměťovém efektu, který má za následek zvýšení výtěžnosti analytu. Z tohoto důvodu se nedoporučuje používat sorbent více než jedenkrát.

Kapacita kolonky, která obsahuje normální nebo reverzní stacionární fázi, se pohybuje v rozmezí 1-3% z celkového objemu sorbentu. Jinými slovy, 100 mg kolonka zachytí 1-3 mg analytu. Analyt je na sorbentu zadržován do té doby, než dojde k obsazení aktivních míst na jeho povrchu. Pokud jsou všechna aktivní místa obsazena, analyt se již nezadržuje a vytéká ven z kolonky spolu s ostatními součástmi vzorku. Maximální množství vzorku, které může být naneseno na kolonku než dojde k nasycení sorbentu analytem, se nazývá zlomový objem. Ten může být určen experimentálně nebo z křivky.<sup>16</sup>

Způsob provedení extrakce na pevné fázi tedy byl následující. Na kolonku jsem nanesla pomocí mikropipety 1 ml n-hexanu a nechala jsem jej protéci průtokovou rychlostí cca 1,5 ml/minutu. Tímto jsem kolonku aktivovala. Tuto průtokovou rychlost jsem se snažila udržet i při aplikaci vzorku a následné eluci. Poté jsem aplikovala na kolonku 1 ml přefiltrovaného n-hexanového extraktu z marihuany a analyzovala jsem vzniklý eluát pomocí HPLC analýzy. Následně jsem promyla kolonku 1 ml rozpouštědla a tento eluát jsem též podrobila HPLC analýze. Jako rozpouštědla jsem použila: metanol, petroleter, dietyleter, chloroform a etylacetát. Před použitím vždy dalšího rozpouštědla k eluci jsem kolonku regenerovat v rámci finanční úspory promytím metanolem a n-hexanem a opakovala postup s nanesením vzorku.

### **3.12. Vytřepávání extraktu z marihuany roztokem hydroxidu sodného**

Připravila jsem extrakt z marihuany dle bodu 3.5. Navážka marihuany na přípravu extraktu byla 1,004 g.

Do dělicí nálevky jsem odměřila 3 ml 0,1M roztoku NaOH, přidala jsem 3 ml přefiltrovaného extraktu a směs jsem protřepávala po dobu cca 1 minuty. Poté jsem oddělila spodní vodnou vrstvu od n-hexanové. Nakonec jsem n-hexanovou část vytřepala 3 ml vody, abych odstranila případné zbytky zásaditého roztoku NaOH.

Na kolonu HPLC jsem nastříkla n-hexanový výtřepok. HPLC analýze jsem podrobila i nevytřepaný n-hexanový extrakt, abych zjistila retenční časy sledovaných analytů, jestliže jsou nastříkovány n-hexanové extrakty.

Cílem bylo potvrdit předpoklad, že THCA přejdou jako vzniklé soli THCA do vodné fáze, zatímco  $\Delta^9$ -THC zůstane v n-hexanu, což se potvrdilo.

Protože se potvrdil tento předpoklad, začala jsem myšlenku dále rozpracovávat. Zvýšila jsem množství extraktu, který jsem vytřepávala, na 10 ml, abych zmírnila zkreslení, které vzniká manipulací se vzorkem (např. z důvodu odpařování). Na vytřepání jsem postupně použila dvakrát 5 ml 0,1M roztoku NaOH, protože účinek opakovaného vytřepávání je vyšší než účinek jednoho vytřepávání celkovým množstvím rozpouštědla. Nakonec jsem použila k vytřepání 10 ml vody.

Odpipetovala jsem 100  $\mu$ l vytřepaného extraktu, odfoukala jsem n-hexan dusíkem a odparek jsem rozpustila v 1 ml metanolu a podrobila HPLC analýze. Na chromatogramu se však ukázaly i THCA, i když v minimálním množství. Tuto skutečnost jsem při hodnocení HPLC analýzy pouze n-hexanového vytřepaného extraktu s 0,1M roztokem NaOH nepostřehla, protože píky reziduálního množství THCA byly v retenčním čase n-hexanu. Proto jsem pro další analýzu použila k vytřepání n-hexanového extraktu koncentrovanější roztok NaOH, a to 0,2M, při stejném pracovním postupu. Z vytřepaného extraktu jsem připravila vzorek výše uvedeným způsobem.

Na chromatografickém záznamu vzorku, který jsem vytřepávala s 0,2M NaOH, nebyly již žádné THCA, byl zde pík  $\Delta^9$ -THC. Objevil se však pík, který měl retenční čas nižší než THCA. Bylo tedy nutné pokusit se zjistit, jakého původu je tento pík. Vyvstala otázka, zda se jedná o kyselinu, a v případě, že je to kyselina, proč se nepřevvedla na sůl.

Proto jsem zvolila jako mobilní fázi pro HPLC analýzu směs metanolu a octanového pufru o pH 4 (85 : 15) při jinak stejných podmínkách analýzy. Záměnou vody za octanový pufr v mobilní fázi jsem chtěla docílit skutečnosti, že kyselým prostředím potlačím disociaci kyselin, které tím pádem budou mít jiný retenční čas, v tomto případě delší.

Pufr jsem připravila smísením 41,0 ml 0,2M roztoku kyseliny octové (1,155 ml / 100 ml) a 9,0 ml 0,2M octanu sodného (2,72 g  $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$  / 100 ml) a zředěním na 100 ml. Jeho pH jsem ještě ověřila pomocí pH metru a mírně upravila roztokem NaOH. Příliš nízké pH by mohlo mít negativní vliv na HPLC kolonu.

Na kolonu jsem nastříkla vzorek připravený ze 100  $\mu$ l nevytřepaného extraktu, který jsem odfoukala dusíkem a odparek jsem rozpustila v 1 ml metanolu. Totéž jsem udělala s extraktem vytřepaným s 0,2M roztokem NaOH.

U vzorku, kde jsem použila nevytřepaný extrakt, se píky THCA oddělily a opravdu změnilo svůj retenční čas, který se prodloužil. Dále zde byl negativní pík

náležící mobilní fázi a pík  $\Delta^9$ -THC. Totožnost píku  $\Delta^9$ -THC jsem ověřila obohacením vzorku o standard  $\Delta^9$ -THC.

Pro částečné ověření, zda se jedná o píky THCA, jsem zhotovila vzorek z 200  $\mu$ l toho samého nevytřepaného extraktu. Předpokladem bylo, že pokud píky přísluší sloučeninám, které jsou součástí biologického materiálu, budou plochy píků úměrně větší dvojnásobné koncentraci připraveného vzorku, což se potvrdilo.

U vzorku, kde jsem pro přípravu použila vytřepaný extrakt s 0,2M NaOH, se na chromatogramu neobjevily žádné píky THCA, byl zde jen pík  $\Delta^9$ -THC a negativní pík, který odpovídal svým retenčním časem mobilní fázi. Tento negativní pík se vyskytoval v retenčním čase píku, jehož totožnost jsem chtěla zjistit.

Proto jsem zaměnila mobilní fázi opět za směs metanolu a vody (85:15) a připravila jsem vzorky z 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l a 400  $\mu$ l vytřepaného extraktu, odfoukala jsem n - hexan, rozpustila jsem odparek v metanolu a podrobila jsem vzorky HPLC analýze. Jelikož pík o neznámé totožnosti nezvětšil svoji plochu pod píkem, nejednalo se o nic z biologického materiálu. Tento fakt potvrzovala i skutečnost, že pík měl nyní nižší retenční čas než je mrtvý čas kolony.

Proto jsem dekontaminovala předkolonu HPLC tím, že jsem jí nechala postupně protéci 30 ml metanolu, 30 ml tetrahydrofuranu, 30 ml dichlormetanu, 30 ml tetrahydrofuranu a nakonec 30 ml metanolu.

Úspěšnost dekontaminace jsem poté ověřila nastříknutím vzorku, který jsem zhotovila z 100  $\mu$ l vytřepaného extraktu s 0,2M roztokem NaOH, odfoukala jsem n-hexan dusíkem a rozpustila odparek v 1 ml metanolu. Na chromatogramu tohoto vzorku byl pouze pík náležící  $\Delta^9$ -THC. Pro možnost porovnání obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití vytřepaného a nevytřepaného extraktu na přípravu vzorku jsem podrobila HPLC analýze i vzorek z nevytřepaného extraktu.

### **3.13. Určení opakovatelnosti měření**

Účelem je posoudit opakovatelnost měření při různém zpracování extraktu. Pro určení opakovatelnosti jsem připravila extrakty A, B a C s přihlédnutím k bodu 3.5.

A) Pro určení opakovatelnosti měření při použití rozdílného množství extraktu jsem připravila 2 skupiny vzorků. Pro přípravu první skupiny 10 vzorků jsem použila vždy 100  $\mu$ l extraktu, který jsem následně odfoukala dusíkem a rozpustila v 1ml metanolu. Pro přípravu druhé skupiny 10 vzorků jsem použila vždy 200  $\mu$ l extraktu, který jsem

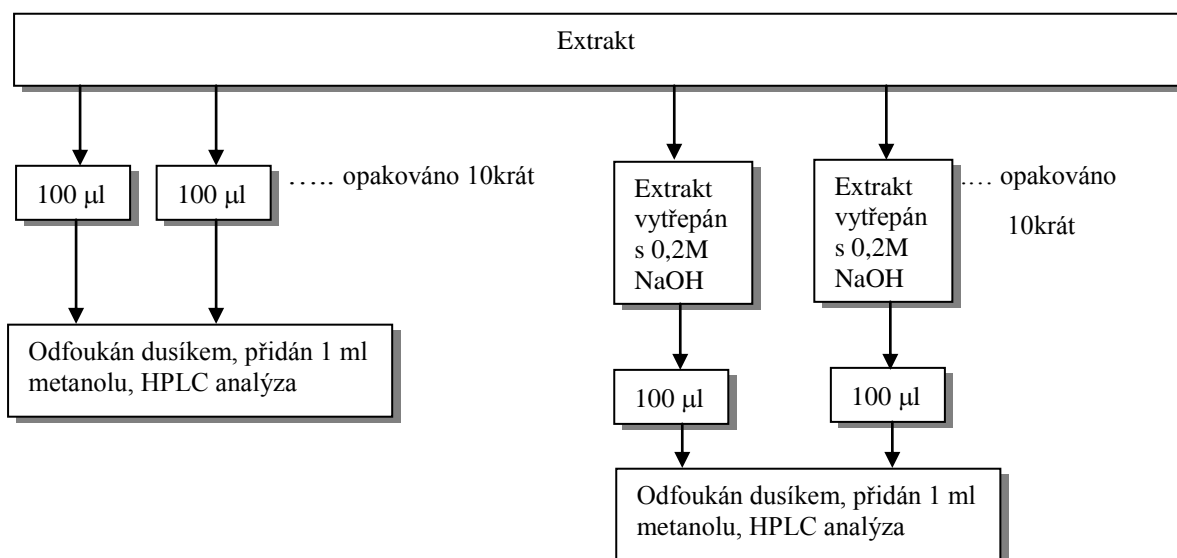
následně odfoukala dusíkem a rozpustila v 1ml metanolu. Ve druhé skupině byly tedy roztoky o dvojnásobné koncentraci oproti první skupině. Vzorke jsem podrobila HPLC analýze. Navážka marihuany byla 1,001g.

Cílem bylo porovnat opakovatelnost při použití různého množství extraktu.

**B)** Pro určení opakovatelnosti a možnost porovnání stanovení obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití nevytřepaných a vytřepaných extraktů na přípravu vzorku jsem podrobila HPLC analýze dvě skupiny po 10 vzorcích. Vzorke jsem vždy připravila z 100  $\mu$ l extraktu, který jsem následně odfoukala dusíkem a rozpustila odparek v 1ml metanolu. Pro přípravu první skupiny vzorků jsem použila nevytřepaný extrakt a pro druhou skupinu vytřepané extrakty s 0,2M roztokem NaOH. Při použití vytřepaného extraktu na přípravu vzorku jsem tedy extrakt vytřepávala s 0,2M NaOH před přípravou každého vzorku. Množství marihuany, které jsem použila pro přípravu extraktu, bylo 1,002 g. Pro lepší orientaci uvádím zjednodušené schéma postupu při tomto pokusu - viz schéma č. 4.

Cílem bylo porovnat vzorky připravené z nevytřepaných a vytřepaných extraktů, přičemž na rozdíl od bodu C byl při použití vytřepaného extraktu na přípravu vzorku každý extrakt separátně vytřepáván.

Schéma č. 4: Zjednodušené schéma postupu při určení opakovatelnosti za použití vytřepaných a nevytřepaných extraktů

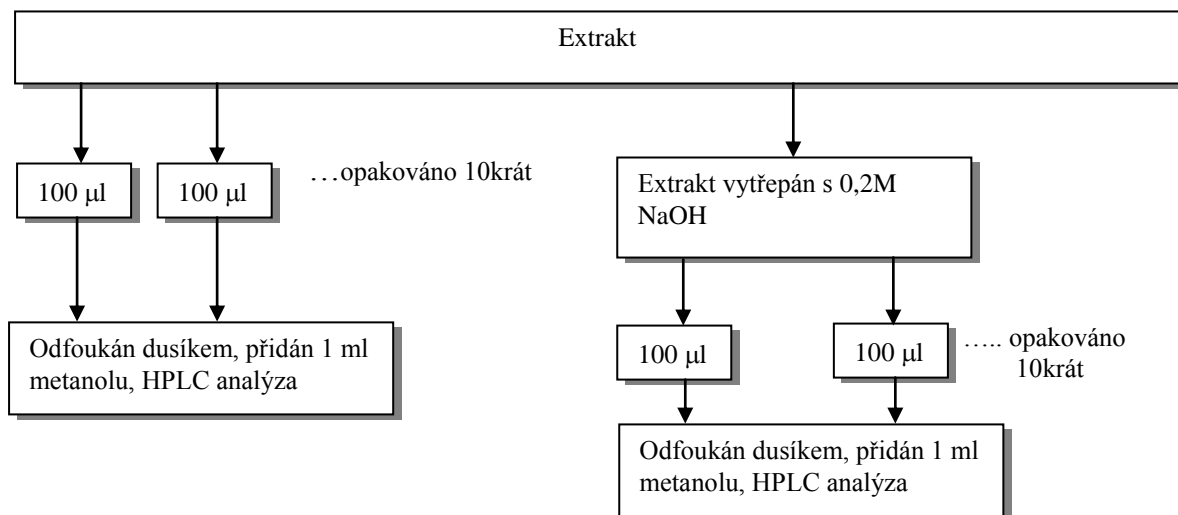




C) Pro určení opakovatelnosti a možnost porovnání stanovení obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití nevytřepaného a vytřepaného extraktu na přípravu vzorku jsem podrobila HPLC analýze dvě skupiny po 10 vzorcích. Pro přípravu první skupiny vzorků jsem použila nevytřepaný extrakt, ze kterého jsem odebrala 10krát po 100  $\mu$ l, a připravila vzorky odfoukáním extraktu dusíkem a rozpuštěním odparku v 1ml metanolu. Pro druhou skupinu jsem vytřepala extrakt s 0,2M roztokem NaOH najednou, a pak jsem z takto upraveného extraktu odebrala 10krát po 100  $\mu$ l a připravila vzorky odfoukáním extraktu dusíkem a rozpuštěním odparku v 1ml metanolu. Množství marihuany, které jsem použila pro přípravu extraktu, bylo 1,003 g. Pro lepší orientaci uvádím zjednodušené schéma postupu při tomto pokusu - viz schéma č. 5.

Cílem bylo porovnat vzorky připravené z nevytřepaného a vytřepaného extraktu, přičemž na rozdíl od bodu B byl při použití vytřepaného extraktu na přípravu vzorků použit vždy ten stejný vytřepaný extrakt.

Schéma č. 5: Zjednodušené schéma postupu při určení opakovatelnosti za použití vytřepaného a nevytřepaného extraktu



## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

## 4.1. Kalibrační křivka $\Delta^9$ -THC

Abych mohla vyhodnotit množství  $\Delta^9$ -THC v marihuaně, bylo nutné, abych sestrojila kalibrační křivku  $\Delta^9$ -THC. Pro tento účel jsem zhotovila roztoky  $\Delta^9$ -THC v metanolu o koncentraci 3,1  $\mu\text{g/ml}$ , 6,3  $\mu\text{g/ml}$ , 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , 25,0  $\mu\text{g/ml}$ , 50,0  $\mu\text{g/ml}$ , 100,0  $\mu\text{g/ml}$ , 150,0  $\mu\text{g/ml}$  při použití standardu  $\Delta^9$ -THC v metanolu (1000  $\mu\text{g/ml}$ ).

Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků pro kalibrační křivku č. 1 jsem uvedla v tabulce č. 1.

Kalibrační křivku jsem vynesla jako závislost plochy píku na koncentraci roztoku. Rovnice kalibrační křivky č. 1 je  $y = 79,5x + 100,7$  s korelačním koeficientem 0,99778.

Tabulka č. 1: Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků  $\Delta^9$ -THC pro kalibrační přímkou č. 1

Koncentrace $\Delta^9$ -THC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
3,1	7,98	352
6,3	7,73	500
12,5	7,62	1016
25,0	7,57	2095
50,0	7,71	4007
100,0	7,64	8661
150,0	7,61	11661

Protože ale zhotovená kalibrační křivka č. 1 neměla výhodný korelační koeficient, vytvořila jsem po určité době novou kalibrační křivku (č. 2) stejným postupem, aby hodnocení obsahu  $\Delta^9$ -THC bylo přesnější. Část své práce jsem ale vyhodnotila dle kalibrační přímkou č. 1. V diplomové práci jsem vždy uvedla, dle které kalibrační křivky jsem hodnotila.

Rovnice této 2. kalibrační křivky je  $y = 89,3x - 37,7$  s korelačním koeficientem 0,99954. Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků jsem uvedla v tabulce č. 2. V příloze č. 2 uvádím pouze kalibrační přímkou č. 2, protože vizuálně jsou křivky velmi obdobné.

Tabulka č. 2 Výsledky HPLC analýzy kalibračních roztoků  $\Delta^9$ -THC pro kalibrační přímku č. 2

Koncentrace $\Delta^9$ -THC ( $\mu\text{g/ml}$ )	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)
3,1	7,65	276
6,3	7,49	544
12,5	7,48	935
25,0	7,42	2111
50,0	7,38	4512
100,0	7,37	9151
150,0	7,35	13178

## 4.2. Porovnání stability extraktu a směsi n-hexanu s rostlinnou drtí skladovaných za různých podmínek po dobu 24 hodin

Cílem experimentu bylo zjistit, zda různé skladovací podmínky primárního extraktu z marihuany mají vliv na množství  $\Delta^9$ -THC, potažmo na THCA.

Výsledky HPLC analýzy vzorku, zhotoveného ihned po přípravě extraktu, dle kalibrační křivky č. 1 byly:  $R_t = 7,84$  min, plocha pod píkem = 140 mV.s, koncentrace  $\Delta^9$ -THC v nastříkovaném vzorku byla 0,50  $\mu\text{g/ml}$ , obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně byl 0,05 % .

Výsledky HPLC analýzy vzorků zhotovených z extraktů a směsí n-hexanu s rostlinným materiálem skladovaných 24 hodin za různých podmínek jsem uvedla v tabulce č. 3. Koncentrace  $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku jsem odečetla z kalibrační křivky č. 1.

Tabulka č. 3: Výsledky HPLC analýzy stabilitního experimentu při uchovávání extraktu a směsi n-hexanu s marihuanou za různých podmínek po dobu 24 hodin

Umístění	Před uskladněním přefiltrován	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
Za oknem s volným přístupem světla	Ano	7,84	131	0,39	0,04
	Ne	7,53	145	0,56	0,06
Za oknem bez přístupu světla	Ano	7,66	187	1,09	0,11
	Ne	7,77	237	1,71	0,17
V lednici	Ano	7,70	182	1,03	0,10
	Ne	7,68	201	1,26	0,13
V mrazáku	Ano	7,59	191	1,14	0,11
	Ne	7,65	160	0,76	0,08

Protože se obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně pohyboval v oblasti desetiny procenta, nelze vysledovat žádnou tendenci. Plochy píků  $\Delta^9$ -THC byly srovnatelné a pohybovaly se na hranici detekce. Proto jsem od dalšího sledování množství  $\Delta^9$ -THC upustila. Zřejmě se jednalo o vzorek technického konopí nebo byla marihuana před analýzou dlouho skladována, protože obsah  $\Delta^9$ -THC i THCA byl velmi nízký. V té době jsem však neměla k dispozici jiný vzorek marihuany.

V případě, že obsah  $\Delta^9$ -THC a THCA je nízký, je nutné rozlišit, zda se jedná opravdu o technické nebo drogové konopí. Rozlišení mezi těmito dvěma druhy konopí musí provést botanik, který pozná druh konopí dle botanické stavby.<sup>17</sup>

### 4.3. Podrobení vzorků marihuany varu v n-hexanu, působení UV záření a teploty 80°C

Tímto pokusem jsem chtěla zjistit, zda má na obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně vliv var marihuany v n-hexanu při přípravě extraktu, UV záření, a působení teploty 80°C. Zároveň jsem se snažila o sledování závislosti obsahu  $\Delta^9$ -THC na délce umístění marihuany v n-hexanu.

Výsledky měření a stanovení obsahu jsem uvedla souhrnně v tabulce č. 4. Koncentraci  $\Delta^9$ -THC v nastříknutých vzorcích jsem hodnotila dle kalibrační křivky č. 1.

Tabulka č. 4: Výsledky HPLC analýzy vzorků z marihuany podrobené působení varu v n-hexanu, UV záření, sušení při 80°C a pouze míchané v n-hexanu

Umístění vzorku:	Navážka (mg)	Odebrání extraktu po: (hodiny)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
Var v n-hexanu	1000	1	8,40	270	2,38	0,24
		3	8,40	370	3,25	0,32
UV záření	1003	1	8,52	146	1,29	0,13
		3	8,36	271	2,38	0,24
Sušení při 80°C	1001	1	8,52	384	3,38	0,34
		3	8,20	572	5,03	0,50
Míchání v n-hexanu	1000	1	8,25	145	0,56	0,06
		3	7,84	140	0,50	0,05

U všech 4 vzorků došlo k zvýšení obsahu  $\Delta^9$ -THC při delším umístění marihuany v n-hexanu. Při vystavení marihuany varu v n-hexanu, působení UV záření i teplotě 80°C obsah  $\Delta^9$ -THC také vzrostl, nejmarkantněji se to projevilo při sušení marihuany při teplotě 80°C. Zanedbatelný nebyl ani vliv varu v n-hexanu. Ke zvýšení obsahu  $\Delta^9$ -THC tedy došlo hlavně působením vyšší teploty.

Lze si také povšimnout, že relativně stejné ploše pod píkem při měření vzorku extraktu odebraného po 1 hodině, kdy byla marihuana předtím umístěna pod UV lampu,

a při pouhém míchání marihuany v n-hexanu, je v prvním případě přiřazeno k ploše větší množství  $\Delta^9$ -THC než v druhém. Je to dáno skutečností, že kalibrační přímka je naměřena při určité citlivosti detektoru. Citlivost měření však může v průběhu času mírně kolísat, a proto se může stát, že obdobné ploše pod píkem je integračním programem přiřazena jiná koncentrace  $\Delta^9$ -THC.

#### 4.4. Příprava vzorků o různé koncentraci a současné vystavení odfoukaného extraktu 2 různým teplotám

Cílem bylo potvrdit předpoklad, že THCA přechází vlivem působení vyšší teploty na  $\Delta^9$ -THC i v odparku, který vznikne odfoukáním rozpouštědla použitého pro přípravu extraktu z marihuany. A zároveň nastínit možný vliv koncentrace vzorku a způsobu přípravy vzorku na stanovení obsahu  $\Delta^9$ -THC v marihuaně.

Výsledky HPLC analýzy vzorku připraveného standardním způsobem dle kalibrační křivky  $\Delta^9$ -THC č. 1 byly:  $R_t = 9,13$  min, plocha pod píkem byla 437 mV.s, koncentrace  $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku byla 3,85  $\mu\text{g/ml}$  a obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně byl 0,38 %.

Výsledky HPLC analýzy vzorků vystavených působení teploty jsem shrnula do tabulek č. 5 a č. 6. Množství  $\Delta^9$ -THC jsem hodnotila dle kalibrační křivky  $\Delta^9$ -THC č. 1.

Tabulka č. 5: Výsledky HPLC analýzy vzorků zhotovených z odfoukaných extraktů, sušených při 100°C

Čas sušení (minuty)	Vzorek (odfouk. extrakt / metanol)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
30	100 $\mu\text{l}$ / 1 ml	9,01	728	6,41	0,64
	2 ml / 20 ml	8,95	709	6,24	0,62
	2 ml / 10 ml	8,96	1516	13,34	0,66

## Pokračování tabulky č. 5

Čas sušení (minuty)	Vzorek (odfouk. extrakt / metanol)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
60	100 $\mu\text{l}$ / 1 ml	8,93	668	5,88	0,58
	2 ml / 20 ml	9,07	631	5,55	0,56
	2 ml / 10 ml	9,04	1319	11,60	0,58

Tabulka č. 6: Výsledky HPLC analýzy vzorků zhotovených z odfoukaných extraktů, sušených při 120°C

Čas sušení (minuty)	Vzorek (odfouk. extrakt / metanol)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
30	100 $\mu\text{l}$ / 1 ml	8,98	557	4,90	0,49
	2 ml / 20 ml	8,79	537	4,73	0,47
	2 ml / 10 ml	8,68	1147	10,09	0,50
60	100 $\mu\text{l}$ / 1 ml	8,74	562	4,94	0,49
	2 ml / 20 ml	8,95	528	4,64	0,46
	2 ml / 10 ml	9,20	1039	9,15	0,46

Množství  $\Delta^9$ -THC působením vyšší teploty na odparek extraktu marihuany vzrostlo v každém vzorku. Jestliže porovnám výsledky HPLC analýzy v rámci každé skupiny (tj. stejná teplota, stejná doba působení na vzorky) je obsah  $\Delta^9$ -THC srovnatelný. Nedošlo tedy k výrazným výkyvům v množství  $\Delta^9$ -THC v závislosti na použitém množství extraktu marihuany a koncentraci vzorku. Obsah  $\Delta^9$ -THC je však nepatrně nižší u vzorků zhotovených z extraktů sušených 60 minut při 100°C při porovnání s extrakty vystavenými této teplotě pouze 30 minut. U odparek extraktu sušených při 120°C je obsah  $\Delta^9$ -THC nižší než u odparek sušených při 100°C.



Pro zjištění, zda při příliš zvýšené teplotě dochází ke snížení obsahu  $\Delta^9$ -THC, jsem vyzkoušela vystavit teplotě 150°C po dobu 30 minut odparek z původně 100  $\mu$ l extraktu a následně odparek rozpustila v 1 ml metanolu a podrobila HPLC analýze. Na chromatogramu bylo minimum THCA i  $\Delta^9$ -THC. Tento experiment tedy naznačuje, že příliš vysoká teplota má na množství  $\Delta^9$ -THC negativní vliv.

Tato skutečnost by mohla mít 2 hlavní důvody. Vzniklý  $\Delta^9$ -THC mohl částečně sublimovat nebo se rozkládat. Nebo už samotné THCA mohou být příliš vysokou teplotou degradovány. Medicínská databáze Archeus, sekce rostliny uvádí, že pokud se zahřátí (zde samotné rostliny marihuany při teplotě 100°C po dobu 75 minut) neprovede v ochranné atmosféře (dusík, CO<sub>2</sub>, vzácné plyny) nebo v oleji, tuku nebo tekutině bude se zvýšení výtěžku  $\Delta^9$ -THC na úkor THCA rovnat ztrátě způsobené rozkladem.<sup>18</sup>

## **4.5. Vliv teploty sušení marihuany na koncentraci $\Delta^9$ -THC a THCA**

Cílem měření byl test vlivu teploty sušení marihuany a typu analytické techniky na koncentraci  $\Delta^9$ -THC, což je zásadní pro trestní řízení, a potvrdit přeměnu THCA na  $\Delta^9$ -THC. Standard THCA nebyl k dispozici. A zároveň porovnat výsledky analýz provedených jinou osobou v jiné laboratoři s použitím jiné analytické techniky.

Výsledky HPLC analýz, které jsem uskutečnila na FaF UK, jsem uvedla v tabulce č. 7. V příloze č. 3 uvádím chromatografické záznamy. Zjištění obsahu  $\Delta^9$ -THC v marihuaně jsem vyhodnotila dle kalibrační křivky č. 2. Výsledky jsem také porovnávala s analýzami Policie ČR. Srovnání jsem uvedla v tabulce č. 8.

Tabulka č. 7: Výsledky HPLC analýzy FaF UK vzorků připravených z marihuany sušené při různých teplotách.

Extrakt odebrán po:	Teplota sušení (°C)	Navážka (mg)	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
1 hodině	55	1003	6,11	580	6,92	0,69
	70	1001	6,12	1138	13,17	1,32
	85	1002	5,99	1921	21,94	2,19
	115	1000	6,19	3706	41,93	4,19
	170	1004	6,04	130	1,88	0,18
3 hodinách	55	1003	6,11	675	7,98	0,80
	70	1001	6,03	1123	13,01	1,30
	85	1002	6,05	2030	23,16	2,31
	115	1000	6,16	3962	44,80	4,48
	170	1004	6,13	137	1,96	0,19

Tabulka č. 8: Výsledky HPLC a GC analýzy od Policie ČR a jejich srovnání s HPLC analýzou, kterou jsem provedla na FAF UK

Teplota sušení (°C)	GC- FID, (obs. $\Delta^9$ -THC v % hmot.) Policie ČR	HPLC-UV (obs. $\Delta^9$ -THC v % hmot.) Policie ČR	HPLC-UV (obs. $\Delta^9$ -THC v % hmot.) FAF UK
55	2,1	0,8	0,80
70	3,2	1,4	1,30
85	3,9	2,4	2,31
100	3,4	3,7	Ø*
115	3,4	3,9	4,48
170	0,08	0,1	0,19

\*Marihuanu sušenou při 100°C jsem nemohla hodnotit, protože byla spotřebována pracovníkem Policie ČR.

Při porovnání výsledků HPLC analýz jsem došla k závěru, že stanovené obsahy  $\Delta^9$ -THC byly srovnatelné. Výjimkou byl stanovený obsah  $\Delta^9$ -THC z extraktu připraveného z marihuany sušené při 115 °C. Tento rozdíl byl nejspíše způsoben tím, že jsme každý použily pro zhotovení extraktu rostlinný materiál s rozdílným zastoupením květů apod., tj. částí rostliny, které obsahují větší množství  $\Delta^9$ -THC. U marihuany sušené při 170 °C došlo nejspíše pod vlivem až příliš vysoké teploty k rozkladu všech obsahových látek.

Vliv doby míchání marihuany v n-hexanu na obsah  $\Delta^9$ -THC není v tomto případě zcela jednoznačný. Výše popsané experimenty však vykazovaly tendenci, že při delším umístění marihuany v n-hexanu je obsah  $\Delta^9$ -THC vyšší.

Závěrem lze říci, že výsledky měření obsahu  $\Delta^9$ -THC silně závisí na druhu použité analytické techniky a teplotě sušení marihuany.

## 4.6. Extrakce na pevnou fázi

Cílem bylo oddělit  $\Delta^9$ -THC od THCA, přičemž jsem předpokládala, že THCA se na kolonce zachytí. Konkrétně jsem vyzkoušela kolonku SPE naplněnou silikagelem.

Při nanesení n-hexanového extraktu z marihuany jako vzorku na sorbent a při následné HPLC analýze eluátu byly na chromatografickém záznamu pouze píky, které náležely n-hexanu. Z uvedeného vyplývá, že se na kolonce zachytil jak  $\Delta^9$ -THC, tak THCA. Proto jsem se pokusila eluovat obsah kolonky 1 ml metanolu. Docílila jsem ale pouze toho, že do eluátu přešel  $\Delta^9$ -THC i THCA. Tuto skutečnost jsem zjistila podrobením eluátu HPLC analýze.

Při použití petroleteru k eluci do eluátu nepřešel  $\Delta^9$ -THC ani THCA. Dokázala jsem to pomocí HPLC analýzy eluátu.

Dále jsem postupně použila jako eluční činidlo dietyleter, chloroform a etylacetát, ale vždy se stejným výsledkem. Vždy došlo k uvolnění ze sorbentu  $\Delta^9$ -THC i THCA. V případě použití etylacetátu byly navíc píky etylacetátu v retenčním čase THCA při chromatografické analýze, proto nelze přesně říci, zda došlo k eluci kyselin či nikoliv, je to ale velmi pravděpodobné.

Z uvedeného vyplývá, že snaha využít SPE k separaci  $\Delta^9$ -THC od THCA nebyla úspěšná.

## 4.7. Vytřepávání extraktu z marihuany roztokem hydroxidu sodného

Cílem bylo odstranit THCA pomocí vytřepávání extraktu z marihuany s roztokem hydroxidu sodného. Mým záměrem bylo THCA neutralizovat a tím je odstranit. Úspěšně se mi to zdařilo s 0,2M roztokem NaOH.

Výsledky HPLC analýzy vzorků připravených z nevytřepaného a vytřepaného extraktu s 0,2M roztokem NaOH jsem uvedla v tabulce č. 9. Koncentrace  $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku jsem odečetla z kalibrační křivky č. 2.

Ukázka chromatogramů vzorků zhotovených z vytřepaného a nevytřepaného extraktu jsem uvedla v příloze č. 4.

Tabulka č. 9: Výsledky HPLC analýzy vzorků zhotovených z nevytřepaného a vytřepaného extraktu s 0,2M roztokem NaOH

Extrakt vytřepán s 0,2M roztokem NaOH	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
ne	6,12	700	8,27	0,82
ano	6,10	726	8,56	0,85

## 4.8. Určení opakovatelnosti měření

Účelem je posoudit opakovatelnost měření při různém zpracování extraktu. Při určování opakovatelnosti měření jsem použila pro jednotlivá stanovení A, B a C různé extrakty, proto je obsah  $\Delta^9$ -THC mezi skupinami vzorků A, B a C rozdílný. Přípravu všech vzorků jsem provedla dle bodu 3.13.

A) Cílem bylo porovnat opakovatelnost při použití různého množství extraktu. Koncentraci  $\Delta^9$ -THC v nastříknutých vzorcích jsem hodnotila dle kalibrační křivky č. 2. Výsledky HPLC analýzy jsem uvedla v tabulce č. 10 a č. 11.

Tabulka č. 10: Výsledky HPLC analýzy vzorků, při které bylo použito 100  $\mu$ l extraktu a statistické vyhodnocení (průměr, SD, RSD)

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu$ g/ml)	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
1	8,55	448	3,95	0,39
2	8,74	428	3,77	0,38
3	8,68	419	3,69	0,37
4	8,65	438	3,86	0,39
5	8,67	410	3,61	0,36
6	8,65	450	3,96	0,40
7	8,60	433	3,80	0,38
8	8,63	439	3,86	0,39
9	8,60	442	3,89	0,39
10	8,53	417	3,67	0,37
<b>Průměr</b>	<b>8,63</b>	<b>432</b>	<b>3,81</b>	<b>0,38</b>
<b>SD</b>	<b>0,06</b>	<b>13,6</b>	<b>0,12</b>	<b>0,01</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,72</b>	<b>3,15</b>	<b>3,14</b>	<b>3,14</b>

Tabulka č. 11: Výsledky HPLC analýzy vzorků, na které bylo použito 200  $\mu$ l extraktu a statistické vyhodnocení (průměr, SD, RSD)

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu$ g/ml)	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
1	8,90	924	8,13	0,41
2	8,54	900	7,91	0,40
3	8,60	930	8,18	0,41
4	8,85	910	8,01	0,40
5	8,55	869	7,65	0,38
6	8,71	887	7,80	0,39
7	8,65	901	7,92	0,40
8	8,62	896	7,88	0,39
9	8,63	909	7,99	0,40
10	8,50	903	7,94	0,40
<b>Průměr</b>	<b>8,66</b>	<b>903</b>	<b>7,94</b>	<b>0,40</b>
<b>SD</b>	<b>0,13</b>	<b>17,4</b>	<b>0,15</b>	<b>0,01</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>1,51</b>	<b>1,93</b>	<b>1,93</b>	<b>1,93</b>

Při srovnání skupiny 10 vzorků, na jejichž přípravu jsem použila vždy 100  $\mu$ l extraktu a skupiny 10 vzorků, na které jsem použila vždy 200  $\mu$ l extraktu, jsou srovnatelné směrodatné odchylky. Přičemž při použití vyššího množství extraktu na přípravu vzorků (tj. 200  $\mu$ l) je nižší relativní směrodatná odchylka. Hodnoty kolem 2% představují dobrý předpoklad pro použití metody.

**B)** Cílem bylo porovnat vzorky připravené z nevytřepaných a vytřepaných extraktů. Koncentraci  $\Delta^9$ -THC v nastříknutých vzorcích jsem hodnotila dle kalibrační křivky č. 2. Výsledky jsem uvedla do tabulky č. 12 a č. 13.

Tabulka č. 12: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků zhotovených z nevytřepaného extraktu. Na přípravu vzorku bylo použito 100  $\mu$ l extraktu.

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu$ g/ml)	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
1	8,39	2184	24,88	2,48
2	8,42	2454	27,91	2,79
3	8,23	2619	29,76	2,97
4	8,27	2692	30,58	3,05
5	8,45	2676	30,39	3,03
6	8,12	2575	29,26	2,92
7	8,05	2527	28,73	2,87
8	7,95	2498	28,39	2,83
9	8,11	2613	29,69	2,96
10	7,93	2795	31,73	3,17
<b>Průměr</b>	<b>8,19</b>	<b>2563</b>	<b>29,13</b>	<b>2,91</b>
<b>SD</b>	<b>0,19</b>	<b>154,2</b>	<b>1,86</b>	<b>0,18</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>2,32</b>	<b>6,02</b>	<b>6,41</b>	<b>6,44</b>

Tabulka č. 13: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků zhotovených z 10 vytřepaných extraktů. Na přípravu vzorku bylo použito 100  $\mu$ l extraktu.

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu$ g/ml)	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
1	8,39	2960	33,58	3,35
2	8,38	1805	20,64	2,06
3	8,26	2898	32,89	3,28
4	8,26	2151	24,52	2,48
5	8,11	3048	34,57	3,45
6	8,04	3541	40,09	4,0
7	8,00	2917	33,10	3,30
8	8,03	2680	30,44	3,04
9	8,00	3195	36,21	3,61
10	7,84	3455	39,12	3,91
<b>Průměr</b>	<b>8,13</b>	<b>2865</b>	<b>32,52</b>	<b>3,25</b>
<b>SD</b>	<b>0,17</b>	<b>540,4</b>	<b>6,05</b>	<b>0,60</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>2,13</b>	<b>18,86</b>	<b>18,61</b>	<b>18,47</b>

Při porovnání dvou skupin vzorků, pro jejichž přípravu jsem použila vždy 100  $\mu$ l extraktu, a to u 1. skupiny nevytřepaného a u 2. skupiny vytřepaného (při použití vytřepaného extraktu jsem extrakt vytřepávala s 0,2M NaOH před přípravou každého vzorku) je relativní směrodatná odchylka při použití nevytřepaného extraktu okolo 6%. A při použití vytřepaného extraktu dokonce až okolo 18%, což je nepřijatelné.

Zajímavá je skutečnost, že při použití nevytřepaného extraktu s vyšším obsahem  $\Delta^9$ -THC na přípravu vzorku, je relativní směrodatná odchylka vyšší než při použití extraktu s nižším obsahem  $\Delta^9$ -THC jako tomu bylo v bodě A.

Výsledky měření obsahu  $\Delta^9$ -THC v marihuaně za použití vytřepaných a nevytřepaných extraktů dle bodu B jsem statisticky zhodnotila pomocí t-testu.

Cílem t-testu bylo zjistit, zda je vyšší zjištěný průměr obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití vytřepaného extraktu než nevytřepaného náhodný jev nebo lze vysledovat tendenci. Zvolila jsem spolehlivost 0,95. Část výsledků jsem uvedla do tabulky č. 14.



Tabulka č.14: Výsledky t-testu pro dvě skupiny vzorků po 10 vzorcích zhotovených z nevytřepaného extraktu a vytřepaných extraktů.

Soubor představující:	Vytřepané extrakty	Nevytřepané extrakty
Průměr obsahu $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)	3,25	2,91
SD	0,60	0,19
SD průměru	0,19	0,059

Rozdíl průměrů je 0,34 a intervalový odhad rozdílu středních hodnot je (-0,10; 0,78).

Nebyla prokázána hypotéza, že střední hodnota průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití vytřepaných extraktů se nerovná střední hodnotě průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití nevytřepaných extraktů. Stejně tak nebyla prokázána hypotéza, že střední hodnota průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití vytřepaných extraktů je větší než střední hodnota průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití nevytřepaných extraktů.

Hodnoty RSD tohoto pokusu vypadají nepříjemně, ale rozdíl ve stanovených průměrech je statisticky nevýznamný dle t-testu. Proto je nutné provést důkladnou validaci metody a pokusit se zároveň lépe optimalizovat LLE.

C) Cílem bylo porovnat vzorky připravené z nevytřepaného a vytřepaného extraktu, přičemž na rozdíl od bodu B byl při použití vytřepaného extraktu na přípravu vzorků použit vždy ten stejný vytřepaný extrakt. Koncentraci  $\Delta^9$ -THC v nastříknutých vzorcích jsem hodnotila dle kalibrační křivky č. 2. Výsledky jsem uvedla do tabulky č. 15 a č. 16.

Tabulka č.15 Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků z nevytřepaného extraktu

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
1	8,58	1755	20,08	2,00
2	8,60	2021	23,06	2,30
3	8,53	2085	23,78	2,37
4	8,49	2057	23,46	2,34
5	8,51	2130	24,28	2,42
6	8,54	2125	24,23	2,42
7	8,57	1766	20,20	2,02
8	8,63	2022	23,07	2,30
9	8,43	1963	22,42	2,24
10	8,47	2056	23,46	2,34
<b>Průměr</b>	<b>8,54</b>	<b>1998</b>	<b>22,80</b>	<b>2,28</b>
<b>SD</b>	<b>0,06</b>	<b>134,65</b>	<b>1,51</b>	<b>0,15</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>0,72</b>	<b>6,74</b>	<b>6,61</b>	<b>6,60</b>

Tabulka č. 16: Výsledky HPLC analýzy 10 vzorků z vytřepaného extraktu

Vzorek č.	Retenční čas (min)	Plocha pod píkem (mV.s)	Koncentrace $\Delta^9$ -THC v nastříknutém vzorku ( $\mu\text{g/ml}$ )	Obsah $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)
1	8,60	1821	20,83	2,08
2	8,60	1874	21,41	2,14
3	8,60	2102	23,97	2,39
4	8,35	1930	22,04	2,20
5	8,42	1966	22,45	2,24
6	8,42	2145	24,45	2,44
7	8,36	2169	24,72	2,46
8	8,43	2052	23,41	2,33
9	8,40	2393	27,23	2,71
10	8,43	2239	25,46	2,54
<b>Průměr</b>	<b>8,46</b>	<b>2069</b>	<b>23,60</b>	<b>2,35</b>
<b>SD</b>	<b>0,10</b>	<b>176</b>	<b>1,97</b>	<b>0,19</b>
<b>RSD(%)</b>	<b>1,18</b>	<b>8,53</b>	<b>8,36</b>	<b>8,25</b>

Hodnota RSD při použití vytřepaného extraktu na přípravu 10 vzorků je také již příliš vysoká. Je tedy nutná optimalizace LLE.

Výsledky měření obsahu  $\Delta^9$ -THC v marihuaně za použití vytřepaných a nevytřepaných extraktů jsem opět statisticky zhodnotila pomocí t-testu.

t-test: Pro t-test jsem zvolila spolehlivost 0,95. Výsledky t-testu jsou uvedeny v tabulce č. 17.

Tabulka č. 17: Výsledky t-testu

Soubor představující:	Vytřepané extrakty	Nevytřepané extrakty
Průměr obsahu $\Delta^9$ -THC v marihuaně (%)	2,35	2,27
SD	0,19	0,15
SD průměru	0,061	0,047

Rozdíl průměrů je 0,078 a intervalový odhad rozdílu středních hodnot je (-0,085; 0,241).

Nebyla prokázána hypotéza, že střední hodnota průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití vytřepaného extraktu se nerovná střední hodnotě průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití nevytřepaného extraktu. Stejně tak nebyla prokázána hypotéza, že střední hodnota průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití vytřepaných extraktů je větší než střední hodnota průměru obsahu  $\Delta^9$ -THC při použití nevytřepaných extraktů.

## 5. ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zabývala problematikou stanovení  $\Delta^9$ -THC THCA a analytickými vlastnostmi vybraných fytoKANABINOIDŮ.

Práci jsem rozdělila na část rešeršní zabývající se publikovanou problematikou a část experimentální, ve které jsem na některé publikované poznatky navazovala prakticky.

Rešeršní práce:

- 1) Shrnula jsem různé způsoby rozlišení konopí, chemické složení konopí, účinky KANABINOIDŮ a potenciální terapeutické využití KANABINOIDŮ.
- 2) Zabývala jsem se převážně dekarboxylací  $\Delta^9$ -THCA-A na  $\Delta^9$ -THC, izolací  $\Delta^9$ -THCA-A, optimalizací GC pro určení celkového množství  $\Delta^9$ -THC a optimalizací dekarboxylační teploty pro určení celkového množství  $\Delta^9$ -THC pomocí HPLC a důsledky pro praxi. Věnovala jsem pozornost i experimentům, kde autoři simulovali podmínky kouření.
- 3) Zabývala jsem se stanovením a identifikací KANABINOIDŮ a jejich stabilitou. Porovnávala jsem různé druhy stanovení, jejich výhody a nevýhody, ale převážně jejich praktický dopad.

Praktická část:

- 1) Posuzovala jsem stabilitu extraktu po dobu 24 hodin, který jsem skladovala za různých podmínek. Nemohla jsem ale hodnotit případný vliv na obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně, protože použitá marihuana obsahovala minimum  $\Delta^9$ -THC.
- 2) Zkoumala jsem vliv teploty, UV záření a varu v n-hexanu na marihuanu. Nedopracovala jsem se ale k použitelným výsledkům, protože marihuana obsahovala málo  $\Delta^9$ -THC, a tak nešlo přesně zhodnotit případné vlivy na obsah  $\Delta^9$ -THC. Šlo vysledovat pouze určitou tendenci vzrůstu obsahu  $\Delta^9$ -THC vlivem teploty a UV záření na sušenou marihuanu.
- 3) Podařilo se mi potvrdit předpoklad, že obsah  $\Delta^9$ -THC vzrůstá působením zvýšené teploty jak v samotné rostlině marihuany, tak v extraktu z marihuany. Nejvyšší zvýšení obsahu  $\Delta^9$ -THC nastalo v teplotním rozmezí 100°C - 120°C při působení teploty po dobu 30 minut. Při vyšších teplotách dochází k destrukci  $\Delta^9$ -THC. Toto měření je rozdílné oproti výsledkům měření Dussy et al.<sup>3</sup>, který udává maximální přeměnu při 140°C - 160°C, ale při době působení 15 minut.

- 4) Při zjišťování vlivu doby míchání marihuany v n-hexanu na obsah  $\Delta^9$ -THC jsem porovnávala 1 hodinu a 3 hodiny. Při delším umístění marihuany v n-hexanu byl obsah  $\Delta^9$ -THC většinou jen mírně vyšší.
- 5) Zabývala jsem se též vlivem koncentrace vzorku a způsobu přípravy vzorku na stanovení obsahu  $\Delta^9$ -THC (tj. použití různého množství primárního extraktu a množství metanolu na přípravu vzorku). Stanovený obsah  $\Delta^9$ -THC byl srovnatelný, když obsah  $\Delta^9$ -THC v marihuaně byl cca 0,5%. Při stanovení opakovatelnosti se prokázalo, že mírně lepších výsledků se dosáhne, když se na přípravu vzorku použije větší objem primárního extraktu, zejména když je obsah  $\Delta^9$ -THC v primárním extraktu nižší (cca 0,3%). Konkrétně jsem zkoušela porovnat použití 100  $\mu$ l a 200  $\mu$ l extraktu při stanovení opakovatelnosti.
- 6) Porovnávala jsem stanovení obsahu  $\Delta^9$ -THC mezi GC-FID a HPLC-UV. Při stanovení pomocí GC se projevila na obsahu  $\Delta^9$ -THC vyšší teplota, které je vzorek vystaven během stanovení. Stanovený obsah  $\Delta^9$ -THC byl vyšší, protože byl navýšen o  $\Delta^9$ -THC, které vzniklo z THCA během analýzy. Výsledky HPLC analýzy vzorků byly obdobné, pokud se porovnají měření provedené mnou a pracovníkem Policie ČR.
- 7) Jedním z hlavních cílů bylo odstranění THCA ze vzorku před analýzou, aby bylo možno vzorek analyzovat bez vlivu THCA na množství  $\Delta^9$ -THC. Toto je důležité zejména ve vztahu k základním právním normám – viz. příloha č. 1. Využitím SPE jsem bohužel nedocílila oddělení THCA od  $\Delta^9$ -THC. Oddělení THCA od  $\Delta^9$ -THC se zdařilo LL extrakcí extraktu z marihuany s 0,2M roztokem NaOH. Je ale nutné provést validaci metody a pokusit se ji optimalizovat pro zpřesnění stanovení.

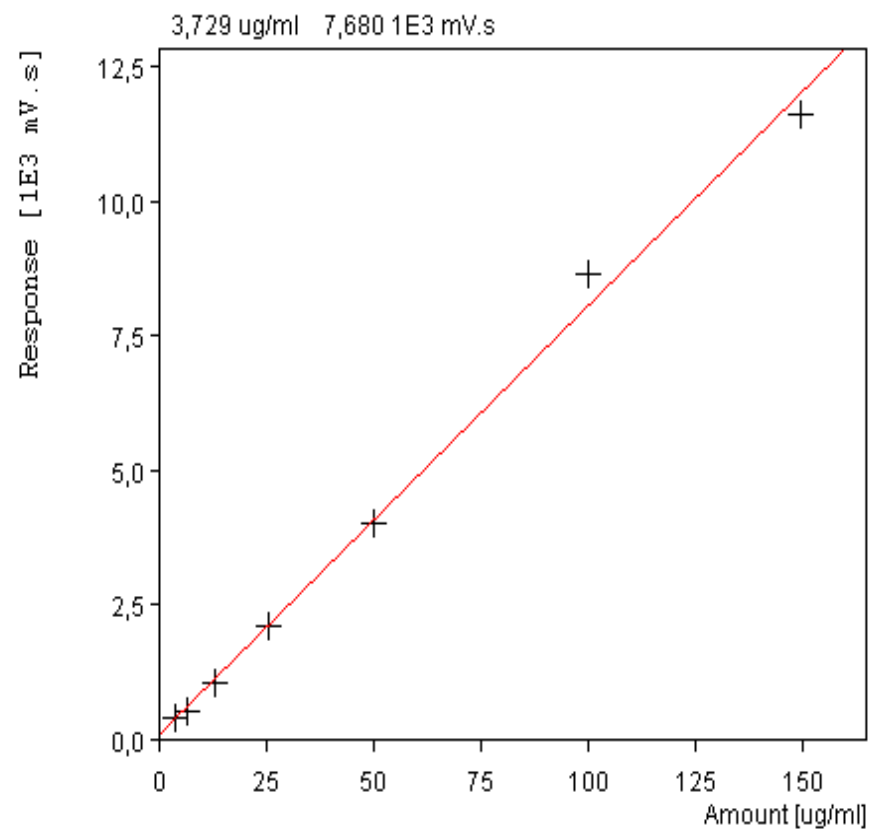
## 6. PŘÍLOHY



Příloha č. 1: Základní právní normy, které upravují drogovou problematiku konopí v ČR

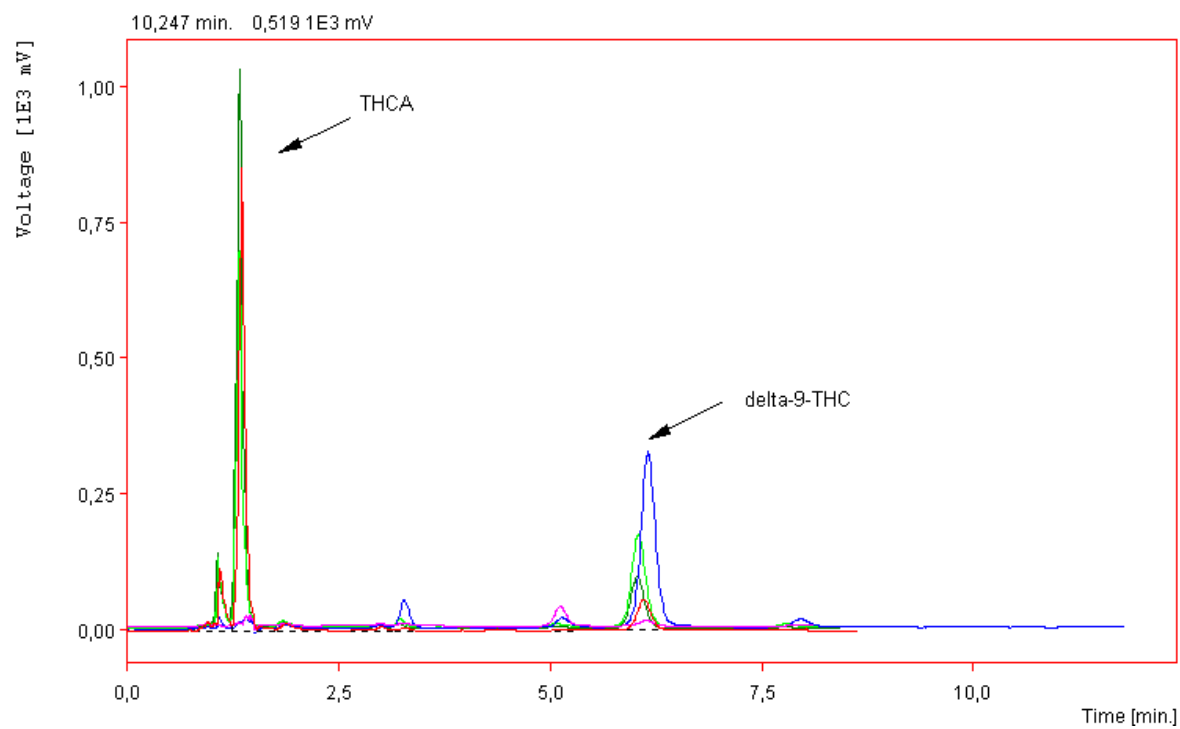
- 1) Trestní zákon (140/1961 Sb.)
- 2) Přestupkový zákon (200/1990 Sb.)
- 3) Zákon o ochraně před alkoholismem a jinými toxikomaniemi (37/1987 Sb.)
- 4) Příloha k Závaznému pokynu policejního prezidenta č. 39/1998, kde jsou uvedeny mj. orientační hodnoty malého množství omamných a psychotropních látek, přičemž pro  $\Delta^9$ -THC to je maximálně 0,3 g. Maximálnímu množství, které je uvedeno, zpravidla odpovídá 20 cigaret - jointů (u konopí pěstovaného v našich podmínkách s koncentrací okolo 1,5 % v sušině použitelné části konopí, při váze jointu cca 1 gram).
- 5) Závazný pokyn policejního prezidenta č. 12/1999, kterým se upravuje postup příslušníků Policie České republiky při odhalování protiprávních jednání souvisejících s toxikomanií
- 6) Příloha č. 1 k Závaznému pokynu policejního prezidenta č. 12/1999 - sazebník pokut za nález drogy s obsahem  $\Delta^9$ -THC.
- 7) zákon č. 466/2004Sb – úplné znění zákona č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, kde Hlava V, zakazuje pěstování konopí s obsahem  $\Delta^9$ -THC > 0,3%.<sup>19, 20</sup> K rozhodnutí o trestním stíhání osoby, u níž bylo konopí nalezeno, dochází na základě výsledku CG analýzy.<sup>17</sup>

Příloha č. 2: Kalibrační přímka  $\Delta^9$ -THC č. 2



Příloha č. 3: Chromatogramy vzorků marihuany sušené při 55°C, 70°C, 85°C, 115°C a 170°C

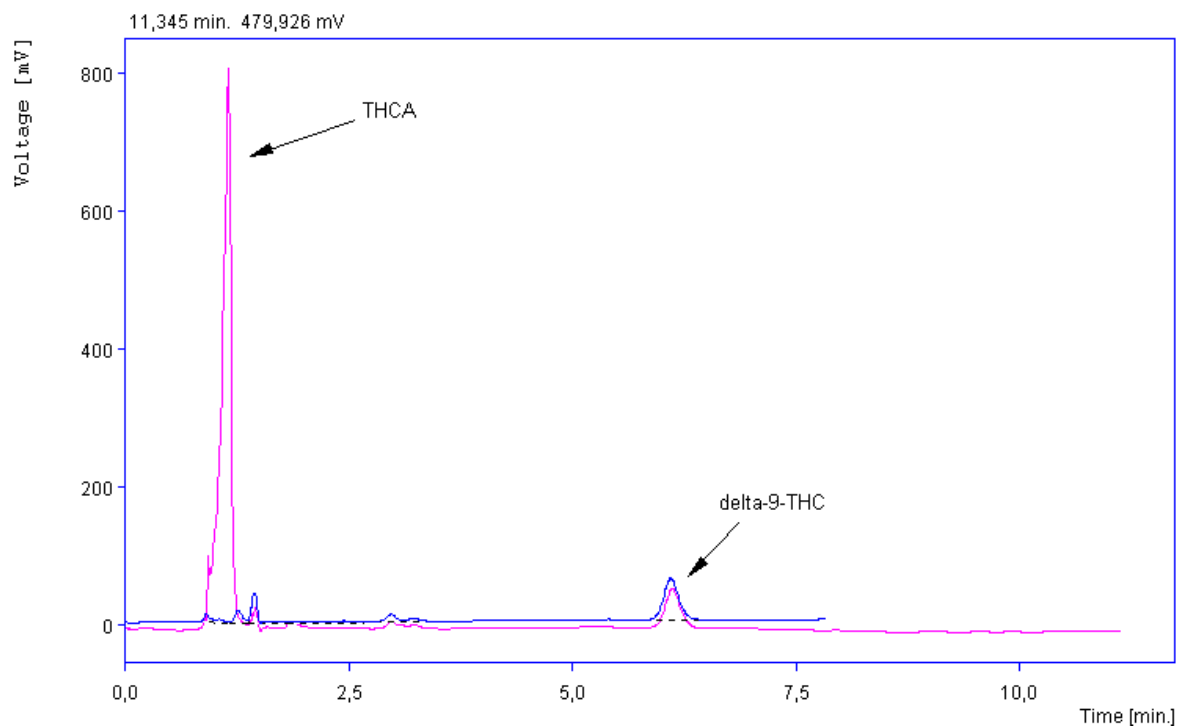
- marihuana sušená při 55°C
- marihuana sušená při 70°C
- marihuana sušená při 85°C
- marihuana sušená při 115°C
- marihuana sušená při 170°C



Příloha č. 4: Chromatogramy vzorků připravených z vytřepaného a nevytřepaného n-hexanového extraktu z marihuany

■ na přípravu vzorku použit nevytřepaný extrakt

■ na přípravu vzorku použit vytřepaný extrakt s 0,2M roztokem NaOH



## 7. LITERATURA

- 
- <sup>1</sup> Commission Regulation (EEC) No. 1164/89 laying down detailed rules concerning the aid for fibre flax and hemp, Annex C, Off. J. Eur. Comun. L 121, 29. April 1989, 4-10.
- <sup>2</sup> Comparini I.B., Centimu F.: Packed column chromatography, high-resolution gas-chromatography and high pressure liquid chromatography in comparison for the analysis of cannabis constituents. *Forensic Sci. Int.* 1983, 21, 129-137
- <sup>3</sup> Dussy F.E., Hamberg C., Luginbühl M., Schwerzmann T., Briellmann T.A.: Isolation of delta-9-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of delta-9-THC in cannabis products. *Forensic Sci. Int.* 2005, 149, 3-10
- <sup>4</sup> Hazekamp A., Peltenburg A., Verpoorte R.: Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *J. Liq. Chromatogr.* 2005, 28, 2361-2382
- <sup>5</sup> Gaoni Y., Mechoulam R.: The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from Hashish, *J. AM. Chem. Soc.* 1971, 93 (1), 217-224
- <sup>6</sup> Fišar Z.: Fytokanabinoidy, *Chemické listy* 100, 2006, 233-242
- <sup>7</sup> Turner C.E., Elsohly M.A., Boeren E.G.: Constituents of *Cannabis sativa* L., XVII. A review of natural constituents. *J. Nat. Prod.* 1980, 43(2), 169-234.
- <sup>8</sup> Lehmann T., Brenneisen R.: High performance liquid chromatographic profiling of cannabis products. *J. Liq. Chromatogr.* 1995, 18(4), 689-700.
- <sup>9</sup> Choi Y. H., Kim H. K., Hazekamp A., Erkelens C., Lefeber A. W. M., Verpoorte R.: Metabolomic Differentiation of *Cannabis sativa* Cultivars Using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy and principal component analysis, *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 953-957.
- <sup>10</sup> Fendrich Z. a kol., *Farmakologie pro farmaceuty I.*, Nakladatelství Karolinum 2002, 177-179
- <sup>11</sup> Harvey D.J.: Stability of cannabinoids in dried samples of cannabis dating from around 1896-1905. *Journal of ethnopharmacology* 1990, 28, 117-128.
- <sup>12</sup> Lehmann T., Brenneisen R., A new chromatographic Method for the isolation of (-)- $\Delta^9$ -(trans)-tetrahydrocannabinolic acid A, *Phytochem. Anal.*, 1992, 3, 88-90
- <sup>13</sup> Schmidt S.: Cannabis, *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, 5. vydání, svazek 4, Springer, Berlin, 1992, 640-655
- <sup>14</sup> Brenneisen R., El Sohly M.A.: Chromatographic and spectroscopic profiles of Cannabis of different origins: part I., *J. Forensic Sci. Int.* 1988, 33, 1385-1404
- <sup>15</sup> Zoller O., Rhyh 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, 2000, 872, 101-110.

<sup>16</sup> Košíková V., SPE a HPLC metabolitů melatoninu, diplomová práce, FAF UK 2006

<sup>17</sup> Vykydal I., ústní podání, 2006

<sup>18</sup> [www.darius.cz/archeus](http://www.darius.cz/archeus)

<sup>19</sup> [www.biotox.cz](http://www.biotox.cz)

<sup>20</sup> [www.drogovaporadna.cz](http://www.drogovaporadna.cz)