



A COMPARISON OF DEVELOPED AND VALIDATED CHROMATOGRAPHIC METHODS (HPLC, GC-MS) FOR DETERMINATION OF DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOL (⁹-THC) AND DELTA-9-TETRAHYDROCANNABINOLIC ACID (⁹-THCA-A) IN HEMP

Roman STANASZEK, Dariusz ZUBA

Institute of Forensic Research, Cracow, Poland

Abstract

The aim of this study was to develop and validate chromatographic methods for determination of ⁹-THC and ⁹-THCA-A in hemp and to compare the quantitative results obtained by GC-MS with the quantification results obtained by HPLC. 0.5 g samples of dry plant material were extracted with 5 ml methanol overnight (16 h). The separation of the sample components was performed by HPLC on an RP-18e Chromolith column (5 μm, 100 mm) at 40°C with isocratic elution. The mobile phase consisted of a mixture of water containing 100 μl phosphoric acid per 1 litre (pH 3) and acetonitrile (70:30). GC-MS separation of sample components was carried out on an HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) column. Acquisition was performed in the full scan mode. The limits of detection (LOD) for HPLC were 0.00030% (converted to dry hemp matter) for ⁹-THC and 0.00068% for ⁹-THCA-A. The calibration curves were linear both for ⁹-THC and THCA-A ($r = 0.999$) in the tested range: 0.05% (2.5 μg/ml) up to 2.0% (100 μg/ml). The intra-assay and inter-assay precision, expressed as the percentage coefficient of variation (CV), were 3.5% and 8.2% for ⁹-THC, and 3.4% and 8.4% for ⁹-THCA-A, respectively. The limit of detection (LOD) for ⁹-THC obtained by GC-MS was 0.015%. The calibration curve was linear ($r = 0.998$) in the range from 0.1% up to 0.8%. The GC-MS intra-assay precision expressed as CV was 15.3% and the inter-assay precision was 21.3%. Comparison of the ⁹-THC quantitative results obtained for the real hemp samples by the two methods shows that there is a good correlation between them ($r = 0.99$) and proves that it is possible to apply them when measuring the total ⁹-THC concentration in cannabis hemp and other cannabis products e.g. cannabis resin (hashish). The results of the study show that both developed methods can be used in routine analysis for distinguishing drug type from fibre type cannabis.

Key words

Hemp; Fibre cannabis; Delta-9-tetrahydrocannabinol; Delta-9-tetrahydrocannabinolic acid.

Received 2 October 2007; accepted 22 October 2007

1. Introduction

Among the several hundred chemical compounds found in cannabis products, the main are dibenzofuran derivatives and compounds containing dihydroxybenzene structures [1]. The main psychoactive ingredient

of cannabis is the hallucinogenic delta-9-tetrahydrocannabinol (⁹-THC – Figure 1). This compound is found in cannabis together with cannabinol (CBN) and cannabidiol (CBD) as well as delta-8-tetrahydrocannabinol (⁸-THC). The main precursor of ⁹-THC in cannabis is delta-9-tetrahydrocannabinolic acid

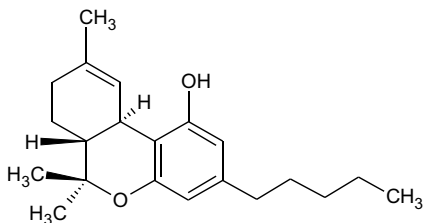


Fig. 1. Delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC).

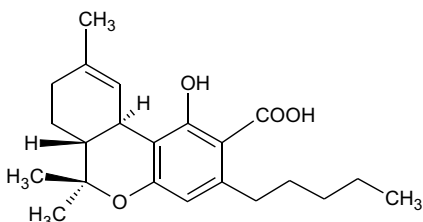


Fig. 2. Delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A).

(Δ^9 -THCA-A – Figure 2), which decomposes to form Δ^9 -THC at high temperatures. This takes place both in the course of smoking cannabis products and during their analyses performed by gas chromatographic methods at the high temperature of the injection port. Other cannabinoids which are found in cannabis are: cannabinolic acid (CBNA), cannabidiolic acid (CBDA), cannabichromen (CBC), cannabigerol (CBG), cannabigerolic acid (CBGA), cannabivarin (CBV) and tetrahydrocannabivarin (THV). Concentrations of particular compounds in cannabis plants depend mainly on their genetic properties as well as the age of the plant, climate and cultivation conditions. Cultivation of cannabis is prohibited except fibre type cannabis which may be grown upon receiving appropriate permission from the local authorities.

In 2006, the appearance of genetically modified cannabis on the drug scene was noted. This type of cannabis contains small amounts of delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, 9-THC) (less than 0.20%), and large amounts of delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA-A, delta-9-THC-2-carboxylic acid, 9-THCA-A). This was one of the factors leading to the introduction of legislative steps aimed at amendment of the existing Act of 29 July 2005 on Counteracting Drug Addiction, which (the amendment) came into force on 1 February 2007. The amendment concerned the definition of fibre type cannabis, which was phrased as follows: “plants belonging to the species *Cannabis sativa* L., in which the total content of delta-9-tetrahydrocannabinol and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (delta-9-THC-2-carboxylic acid) in flowering and fruiting tops of the plants from which the resin has not been removed is less than 0.20 per cent when converted to dry matter”. Under the un-

amended act, only the content of Δ^9 -THC determined whether a given sample of cannabis constituted an illegal substance of abuse. Most of the methods used for determination of Δ^9 -THC in cannabis described in the scientific literature are based on gas chromatography and its application for judicial purposes. These procedures usually measure the so-called total Δ^9 -THC content, which is the sum of the natural Δ^9 -THC itself and the additional Δ^9 -THC, which is produced by decarboxylation of Δ^9 -THCA-A in the high temperature of the gas chromatograph injection port.

The aim of the study was to develop and validate chromatographic methods for determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A in hemp and to compare the total Δ^9 -THC content measured by GC-MS and HPLC, in which the concentrations of the two compounds are determined separately. In this paper analytical procedures were adapted to meet the requirements of the act in the above mentioned area.

2. Materials and methods

2.1. Drug samples

Study materials were hemp samples seized by the Police.

2.2. Standards

Delta-9-tetrahydrocannabinol (5 mg/ml solution) and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (10 mg, in substantia) were purchased from Lipomed AG (Switzerland), and 1,3-chlorophenylpiperazine – mCPP (5 g) from Sigma-Aldrich (Poland).

2.3. Chemicals

Acetonitrile and methanol (HPLC gradient grade) was purchased from Merck (Germany).

2.4. Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid in hemp by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)

0.5 g hemp samples, after pulverising in a homogenizer (IKA-Werke, Germany) were extracted with 5 ml methanol overnight (16 h). The extract was centrifuged, diluted 20 times (50 μ l extract + 950 μ l mobile phase), and analysed by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-

DAD). Analysis was performed by an HPLC Elite LaChrom L-2000 System (VWR Merck-Hitachi, Japan). Chromatographic separation was carried out on a Chromolith RP-18e (5 μ m, 100 mm, Merck), using the isocratic composition of the mobile phase. The mobile phase consisted of water containing 100 μ l phosphoric acid per 1 litre (pH 3) and acetonitrile (70:30, v:v). The mobile phase flow rate was 1 ml/min. The injection volume was 20 μ l. The diode array detector operated in the range 200–400 nm. The acquisition time was 11 minutes. Quantitative analysis was based on $\lambda = 210$ nm for Δ^9 -THC and 220 nm for Δ^9 -THCA-A [2].

2.5. Determination of delta-9-tetrahydrocannabinol in hemp by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)

For the purposes of analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), the hemp methanolic extracts were diluted 20 times with methanol after addition of 10 μ l of internal standard – mCPP (1000 μ g/ml). Analysis was performed using an HP 6890 series gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (Agilent 5973 Network Quadrupole MSD, Agilent Technologies, USA). The gas chromatograph was equipped with a split/spitless injector which was maintained at 250°C. Injection (1 μ l) was performed automatically in the splitless mode. Chromatographic separation was performed on an HP-5MS (Agilent Technologies, USA; length: 30 m, inner diameter 0.25 mm, film thickness 0.25 μ m) capillary column. The flow of the carrier gas (helium) was 1.0 ml/min. The column temperature programme consisted of 3 segments. The temperature of the column was maintained at 75°C for 1 min, then ramped at 25°C/min to 275°C, and maintained for 9 min. The mass spectrometer was operated in positive ionisation mode (EI) and the energy beam was 70 eV. The detector operated in full scan mode 40–600 m/z. Acquisition time was 17 minutes. Quantitative analysis was based on the intensity of the analytical signal for m/z = 299 (Δ^9 -THC) and m/z = 154 (internal standard – mCPP).

3. Results and discussion

3.1. Development of procedure for determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A by means of HPLC

The first stage in the development of a procedure for determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A by

means of HPLC was application of initial chromatographic parameters which had previously been used to measure Δ^9 -THC in hemp and cannabis resin under the Act on Counteracting Drug Addiction that was in force before the last amendment. The parameters are shown in Table I.

TABLE I. INITIAL HPLC METHOD PARAMETERS

Column	RP-8 LiChrospher – 100 mm, 5 μ m
Mobile phase	AcCN:H ₂ O (70:30, v/v)
Column temperature	30°C
Acquisition time	11 min

In these conditions, there was tailing of the chromatographic peak corresponding to the Δ^9 -THCA-A standard in the obtained chromatogram (Figure 3). So, the chromatographic column was replaced with a monolithic RP-18e Chromolith column (100 mm, 4.6 mm, Merck, Germany).

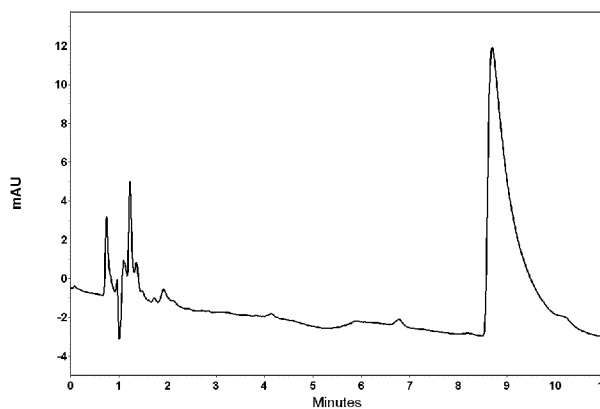


Fig. 3. HPLC chromatogram of Δ^9 -THCA-A standard on an RP-8 LiChrospher column.

On the new column, tailing of the Δ^9 -THCA-A peak was got rid of, but the acquisition time (11 min) appeared to be shorter than the retention time of the analyte. Since analysis time is one of the key factors in efficiency of routine laboratory analyses, the temperature of the column oven was raised up to 40°C in order to shorten it. The obtained chromatograms are shown in Figure 4. The shape of the Δ^9 -THCA-A peak was symmetrical and its retention time was less than 11 minutes, as required.

Table II shows the summarised final optimal chromatographic parameters obtained during the development of the HPLC method, which were subsequently

used for determination of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A in hemp and cannabis resin.

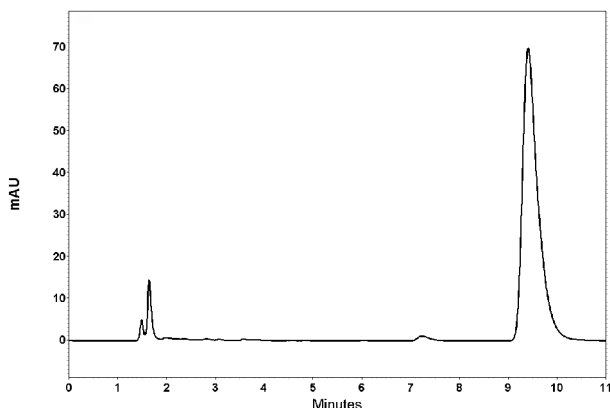


Fig. 4. HPLC chromatogram of Δ^9 -THCA-A standard on an RP-18e Chromolith column at 40°C.

TABLE II. FINAL HPLC PARAMETERS

Column	RP-18e Chromolith – 100 mm, 6 mm
Mobile phase	AcCN:H ₂ O (70:30, v/v)
Column temperature	40°C
Acquisition time	11 min

3.2. Validation of HPLC method

3.2.1. Specificity and selectivity

Figure 5 shows chromatographic separation of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A performed on an RP-18e Chromolith column at 40°C. In these conditions good separation of the two compounds was achieved as well as symmetrical peak shapes.

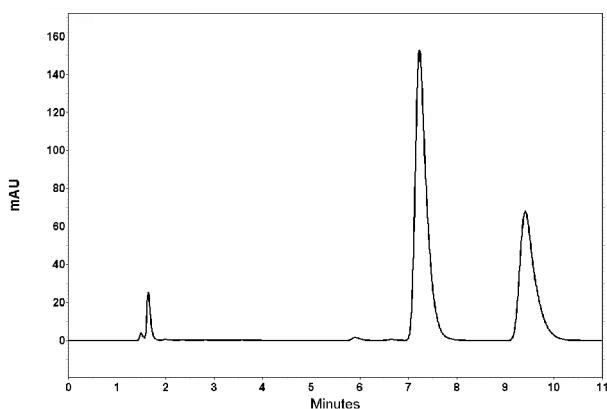


Fig. 5. Chromatographic separation of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A on an RP-18e Chromolith column at 40°C.

Figures 6 and 7 show HPLC chromatograms obtained during the analyses of oregano and tobacco respectively, which are sometimes added to marijuana. No interfering peaks were observed in the range of the retention times of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A, which might influence determination of the analytes. Figure 8 shows typical chromatograms obtained by the analysis of real hemp samples (marijuana) at wave-

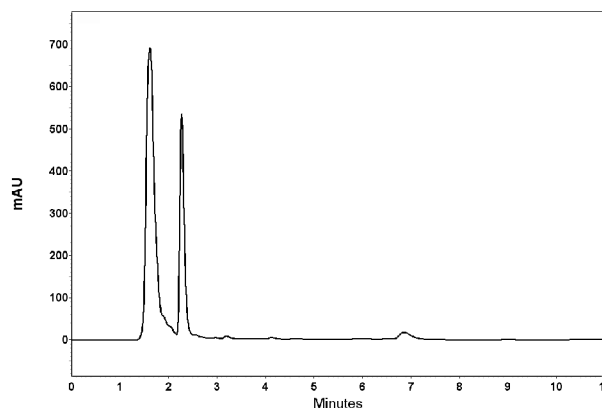


Fig. 6. HPLC chromatogram of oregano.

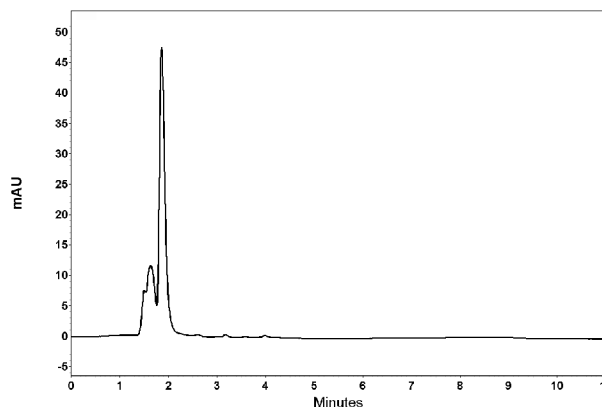


Fig. 7. HPLC chromatogram of tobacco.

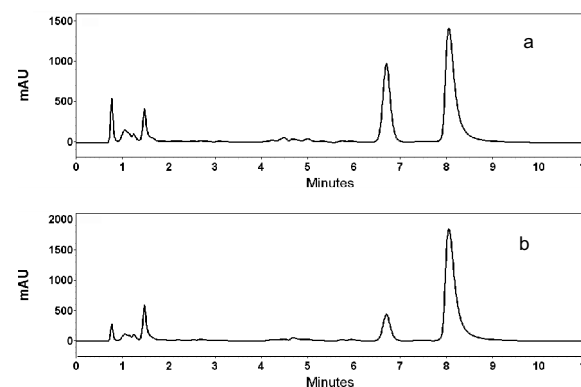


Fig. 8. Real hemp sample chromatogram a) at 210 nm, and b) at 220 nm.

lengths of 210 and 220 nm, which were used to determine Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A, respectively. Figure 9 shows UV spectra of the two analytes in the 200–400 nm wavelength range. In the presented conditions, the components of the extracted matrix of the real hemp samples did not interfere with chromatographic peaks of the target compounds.

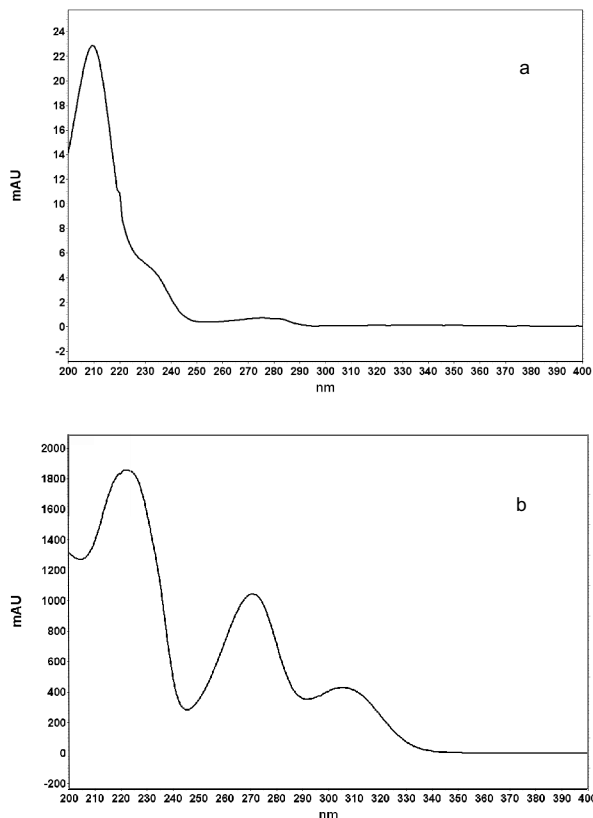


Fig. 9. a) Δ^9 -THC UV spectrum in 200–400 nm and b) Δ^9 -THCA-A UV spectrum in 200–400 nm.

3.2.2. Limits of detection and quantification (LOD, LOQ)

Limits of detection and quantification for both compounds were determined based on calibration curves in a low concentration range from 0.02% to 0.2% of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A, in which the LOD and LOQ were expected to lie. Validation calculations were performed with Merck's Valistat software. The limit of detection (LOD) obtained by the HPLC method was 0.0003% (converted to dry hemp matter) for Δ^9 -THC and 0.0007% for Δ^9 -THCA-A. The limit of quantification (LOQ) obtained by the same method was 0.0027% for Δ^9 -THC and 0.006% for Δ^9 -THCA-A.

3.2.3. Linearity

Linearity was checked for Δ^9 -THC as well as for Δ^9 -THCA-A in the range: 0.05% (2.5 g/ml) – 2.0% (100 g/ml). Correlation coefficients (r^2) of the calibration curves were higher than 0.999 for both compounds.

3.2.4. Precision

Inter-assay and intra-assay precision was evaluated by analysing 5 replicates of homogenised hemp performed on 6 different days. Intra-assay and inter-assay precision expressed as correlation of variation (CV) was 3.5% and 8.2% for Δ^9 -THC and 3.4% and 8.4% for Δ^9 -THCA-A, respectively.

3.3. Validation of the GC-MS method

During the analysis of hemp by GC-MS, at the high temperature of the GC injector, Δ^9 -THCA-A is decarboxylated to Δ^9 -THC, therefore only one compound was determined in this procedure. The obtained results of determination of Δ^9 -THC in fact corresponded to the sum of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A concentrations. The limits of detection and quantification were determined based on the calibration curve drawn up in the narrow range from 0.025% to 0.2% (Δ^9 -THC content in dry hemp matter). The limit of detection (LOD) of Δ^9 -THC achieved by GC-MS was 0.015%, and the limit of quantification (LOQ) was 0.113%. The calibration curve was linear ($r = 0.998$, equation of the curve $y = 0.0931x - 0.0984$) in the range from 0.1% to 0.8%. The intra-assay precision achieved for GC-MS expressed by correlation of variation CV was 15.3% and the inter-assay precision was 21.3%. Precision was measured in the same way as it was for the HPLC method.

3.4. Comparison of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA-A determination results obtained by means of HPLC and GC-MS

In order to compare HPLC and GC-MS methods and their applicability in the determination of the main psychoactive components of cannabis, parallel analyses of 64 real marijuana samples were performed by the two methods using previously developed and validated procedures. The results of Δ^9 -THC and Δ^9 -THCA determinations by HPLC were added and total values were compared with the results achieved by GC-MS. The correlation between them was studied (Figure 10).

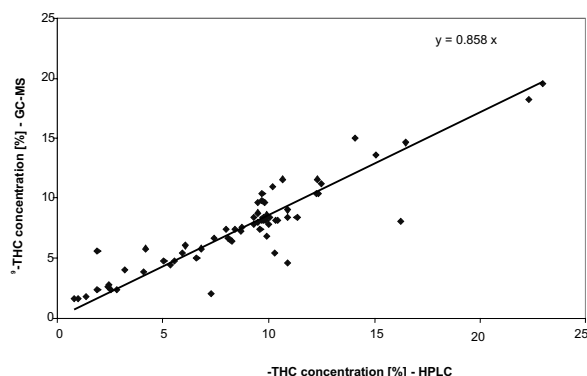


Fig. 10. Correlation of total ⁹-THC determination results achieved by GC-MS and HPLC.

⁹-THC concentrations determined by GC-MS were in the range 1.6–19.6% (mean 7.4%) in dry hemp matter. ⁹-THC concentrations determined by HPLC were in the range 0.1–9.6% (mean 1.0%) in dry hemp matter. ⁹-THCA-A concentrations measured by HPLC were in the range 0.7–13.7% (mean 7.4%) in dry hemp matter. Total ⁹-THC content (sum of ⁹-THC and ⁹-THCA-A) determined by HPLC was in the range 0.8–23.0% (mean 8.4%) in dry cannabis matter. Comparison of the ⁹-THC determination results in real hemp samples achieved by the two methods showed a good correlation between them ($r = 0.93$), which shows that they can be applied to determination of the total concentration of both target compounds in hemp and other cannabis products e.g. cannabis resin (hashish). The linear correlation line going through the point (0,0); (the equation of the curve $y = 0.8581x$) shows that GC-MS concentration results are about 86% of the results obtained by the HPLC method. Lower ⁹-THC concentrations obtained by GC-MS analysis in comparison with total ⁹-THC content results obtained by HPLC may be due to the incomplete thermal decarboxylation process of ⁹-THCA-A to ⁹-THC [3]. This is due to the fact that the only way to accurately determine the total ⁹-THC concentration is to measure the two target compounds separately and then add them to each other. Determination of the total ⁹-THC content by gas chromatography after decarboxylation enables only measurement of the minimal content rather than the exact total concentration of ⁹-THC. Determination of total ⁹-THC is a more accurate measure of the potential psychoactive properties of the analysed cannabis, hemp or resin sample [3].

4. Conclusions

1. The results of the study show that both developed GC-MS and HPLC methods can be used in routine analysis for distinguishing drug type from fibre type cannabis.
2. The HPLC method allows determination of both compounds mentioned in the legal definition of hemp, i.e. delta-9-tetrahydrocannabinol (⁹-THC, 9-THC) and delta-9-tetrahydrocannabinolic acid (⁹-THCA-A, delta-9-THC-2-carboxylic acid, 9-THCA-A).
3. The precision of the HPLC method is better than that of GC-MS. The HPLC method is also more sensitive than GC-MS (lower *LOD* and *LOQ*).

References

1. Błachut D., Bykas M., Szukalski B., Zastosowanie chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią masową (GC/MS) do analizy złożonych mieszanin kanabinoidów, *Alkoholizm i narkomania* 2001, 14, 261–276.
2. Zoller O., Rhyn P., Zimmerli B., High-performance liquid chromatographic determination of ⁹-tetrahydrocannabinol and the corresponding acid in hemp containing foods with special regard to the fluorescence properties of ⁹-tetrahydrocannabinol, *Journal of Chromatography A*, 2000, 872, 101–110.
3. Dussy F. E., Hamberg C., Luginbuhl M. [et al.], Isolation of ⁹-THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of ⁹-THC in cannabis products, *Forensic Science International* 2005, 149, 3–10.

Corresponding author

Roman Stanaszek
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: rstanaszek@ies.krakow.pl

PORÓWNANIE OPRACOWANYCH I ZWALIDOWANYCH CHROMATOGRAFICZNYCH METOD (HPLC, GC-MS) OZNACZANIA DELTA-9-TETRAHYDROKANNABINOLU (Δ^9 -THC) I KWASU DELTA-9-TETRAHYDROKANNABINOLOWEGO (Δ^9 -THCA-A) W ZIELU KONOPI

1. Wprowadzenie

Spośród kilkuset związków chemicznych wykrytych w produktach otrzymanych z konopi do najważniejszych należą pochodne dibenzofuranu oraz związki zawierające układy dihydroksybenzenu [1]. Głównym psychoaktywnym składnikiem konopi jest halucynogeny delta-9-tetrahydrokannabinol (Δ^9 -THC – rycina 1). Występuje on najczęściej z kannabinolem (CBN) i kanabidiolem (CBD) oraz z delta-8-tetrahydrokannabinolem (Δ^8 -THC). Najważniejszym prekursorem Δ^9 -THC w roślinach konopi jest kwas tetrahydrokannabinolowy (Δ^9 -THCA-A – rycina 2), który rozkłada się do Δ^9 -THC w podwyższonej temperaturze. Ma to miejsce zarówno w trakcie palenia produktów konopi, jak i w toku ich analizy metodami chromatografii gazowej w porcie nastrzykowym, gdzie panuje wysoka temperatura. Innymi kannabinoidami występującymi w konopiach są: kwas kannabinolowy (CBNA), kwas kannabidiolowy (CBDA), kannabichromen (CBC), kannabigerol (CBG), kwas kannabigerolowy (CBGA), kannabiwaryna (CBV) i tetrahydrokannabiwaryna (THV). Zawartość poszczególnych związków w roślinach zależy przede wszystkim od ich uwarunkowań genetycznych, lecz także od wieku roślin, warunków klimatycznych i sposobów uprawy. Uprawa konopi jest zabroniona z wyjątkiem uprawy konopi włóknistych, która może się odbywać po uzyskaniu odpowiednich zezwoleń.

Fakt pojawienia się na rynku narkotykowym konopi modyfikowanych genetycznie zawierających niewielkie ilości delta-9-tetrahydrokannabinolu (poniżej 0,20%), a posiadających dużą zawartość kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ^9 -THCA-A, kwas delta-9-THC-2-karboksyłowy), wpłynął na podjęcie kroków legislacyjnych w celu nowelizacji Ustawy z dnia 29 lipca 2005 roku o przeciwdziałaniu narkomanii, która weszła w życie w dniu 1 lutego 2007 roku. Zmiana dotyczyła definicji konopi włóknistych, która otrzymała brzmienie: „rośliny z gatunku konopie siewne (*Cannabis sativa* L.), w których suma zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu oraz kwasu tetrahydrokannabinolowego (kwas delta-9-THC-2-karboksyłowy) w kwiatowych lub owocujących wierzchołkach roślin, z których nie usunięto żywy, wynosi poniżej 0,20% w przeliczeniu na suchą masę”. Poprzednia wersja tej ustawy definiowała konopie włók-

niste jako rośliny, w których tylko zawartość Δ^9 -THC determinowała, czy dana próbka ziela konopi stanowić będzie w świetle ustawy środek odurzający.

Większość opisywanych w literaturze metod oznaczania zawartości Δ^9 -THC w produktach konopi bazuje na chromatografii gazowej i jej zastosowaniu w analizie produktów konopi dla celów sądowych. Procedury te zazwyczaj wyznaczają stężenie tzw. całkowitego Δ^9 -THC, na które składają się naturalna zawartości Δ^9 -THC oraz dodatkowo Δ^9 -THC, tworzący się w wyniku dekarboksylacji Δ^9 -THCA-A w wysokiej temperaturze iniektora chromatografu gazowego. Analityczne rozróżnienie Δ^9 -THC od jego prekursora jest możliwe przy zastosowaniu metody GC po uprzedniej derywatywacji analitów. Celem pracy było opracowanie i walidacja chromatograficznych metod oznaczania Δ^9 -THC i Δ^9 -THCA-A w ziele konopi oraz porównanie wyników analizy ilościowej całkowitego Δ^9 -THC metodą GC-MS oraz metodą HPLC, gdzie osobnemu oznaczeniu podlegają oba związki niezależnie. Niniejsza praca dostosowała praktykę analityczną do wymogów ustawy w wyżej omawianym zakresie.

2. Materiały i metody

2.1. Próbkki narkotyków

Materiał badany stanowiły próbki narkotyków w postaci suszu roślinnego będącego ziele konopi, zabezpieczone przez policję.

2.2. Substancje wzorcowe

Delta-9-tetrahydrokannabinol (roztwór 5 mg/ml) i kwas delta-9-tetrahydrokannabinolowy Δ^9 -THCA-A (w formie substancji, 10 mg) zostały zakupione w firmie Lipomed AG (Szwajcaria), a 1,3-chlorofenylopiiperazyne – mCPP (5 g) w firmie Sigma-Aldrich (Polska).

2.3. Podstawowe odczynniki chemiczne

Acetonitryl oraz metanol (o czystości gradientowej HPLC) zakupiono w firmie Merck (Niemcy).

2.4. Wyznaczanie zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu oraz kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego w ziele konopi metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową (HPLC-DAD)

Próbki suszu roślinnego o masie 0,5 g po rozdrobieniu w homogenizatorze (IKA-Werke, Staufen, Niemcy) ekstrahowano 5 ml metanolu przez noc (16 godzin). Ekstrakt odwirowano, rozcieńczono 20-krotnie (50 l ekstraktu + 950 l fazy ruchomej), a następnie poddawano analizie metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową (HPLC-DAD). Do analizy używano aparatu HPLC Elite LaChrom L-2000 System (VWR Merck-Hitachi, Tokio, Japonia). Rozdział składników próbki dokonywano na kolumnie Chromolith RP-18e (Merck, 5 m, 100 mm) przy izokratycznym składzie fazy ruchomej, którą stanowiła mieszanina wody z dodatkiem 100 l 85% kwasu fosforowego na litr wody (pH 3) oraz acetonitrylu w stosunku objętościowym 70:30. Przepływ fazy ruchomej był stały i wynosił 1 ml/min. Kolumna była termostatowana w temperaturze 40°C. Nastrzyk odbywał się poprzez automatyczny podajnik próbek, a jego objętość wynosiła 20 l.

Detektor zbierał widmo spektrofotometryczne w zakresie długości fal 200–400 nm. Czas akwizycji wynosił 11 minut. Analizę ilościową przeprowadzono dla długości fali $\lambda = 210$ nm dla 9 -THC i 220 nm dla 9 -THCA-A [2].

2.5. Wyznaczanie zawartości delta-9-tetrahydrokannabinolu w ziele konopi metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS)

Do analizy metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) ekstrakt rozcieńczono 20-krotnie metanolem po dodaniu 10 l roztworu mCPP o stężeniu 1 mg/ml jako wzorca wewnętrznego. Próbki poddawano analizie, wykorzystując chromatograf gazowy serii HP 6890 GC System sprzężony ze spektrometrem mas (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector będący kwadrupolowym analizatorem mas) firmy Agilent Technologies (Stany Zjednoczone). Chromatograf gazowy wyposażony był w dozownik typu z podziałem/bez podziału utrzymywany w temperaturze 250°C. Nastrzyku próbki (1 l) dokonywano automatycznie systemem bez podziału. Chromatograficzny rozdział składników próbki następował na kolumnie kapilarnej HP-5MS (Agilent Technologies, Stany Zjednoczone; długość: 30 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu 0,25 m). Gazem nośnym był hel, którego przepływ przez kolumnę wynosił 1,0 ml/min. Program temperaturowy kolumny składał się z 3 segmentów. Temperatura początkowa kolumny (75°C) była utrzymywana przez 1 min, następnie wzrastała liniowo z szybko-

ścią 25°C/min do 275°C i przez 9 min nie zmieniała swojej wartości. Detektor masowy pracował w trybie pozytywnej jonizacji elektronowej (EI), a energia wiązki bombardujących elektronów wynosiła 70 eV. Detektor masowy pracował w trybie skanowania całego zakresu mas od 40 do 600 m/z. Czas akwizycji wynosił 17 minut. Analiza ilościowa oparta była na intensywności sygnału analitycznego dla jonów m/z = 299 (THC) i m/z = 154 (wzorec wewnętrzny mCPP).

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Opracowanie procedury oznaczania 9 -THC i 9 -THCA-A metodą HPLC

Opracowanie procedury oznaczania 9 -THC i 9 -THCA-A metodą HPLC rozpoczęto od zastosowania początkowych parametrów chromatograficznych w warunkach, w których wykonywane były uprzednio oznaczenia 9 -THC w ziele i żywicy konopi w czasie obowiązywania Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii sprzed nowelizacji. Parametry te umieszczono w tabeli I.

Przeprowadzając analizę wzorca 9 -THCA-A w tych warunkach, uzyskano chromatogram przedstawiony na rycinie 3, który charakteryzował się „ogonowaniem” piku pochodzącego od analitu. W związku z tym zmieniony został rodzaj kolumny chromatograficznej na kolumnę monolityczną firmy Merck typu RP-18e Chromolith (100 mm, 4,6 mm). Na nowej kolumnie pozbyto się efektu „ogonowania” piku, natomiast okazało się, że czas akwizycji danych (11 min) był krótszy niż czas retencji wzorca 9 -THCA-A. Ponieważ czas analizy jest jednym z kluczowych czynników jeśli chodzi o wydajność przeprowadzanych analiz w rutynowych badaniach laboratoryjnych, to w celu skrócenia go temperatura termostatowania kolumny została podniesiona do 40°C. Uzyskany chromatogram przedstawiono na rycinie 4. Uzyskano symetryczny pik chromatograficzny dla tego związku, a jego czas retencji mieścił się w żądanym zakresie 11 minut.

W tabeli II przedstawiono sumarycznie finalne parametry chromatograficzne uzyskane w czasie opracowywania metody, a następnie wykorzystywane w czasie oznaczania 9 -THC i 9 -THCA-A w ziele i żywicy konopi.

3.2. Walidacja metody HPLC

3.2.1. Specyficzność i selektywność

Na rycinie 5 przedstawiony został rozdział chromatograficzny 9 -THC i 9 -THCA-A uzyskany na kolumnie RP-18e Chromolith przy temperaturze 40°C. W zastosowanych warunkach uzyskano dobry rozdział tych dwóch

związków i symetryczne ich kształty. Ryciny 6 i 7 przedstawiają odpowiednio chromatogramy uzyskane w trakcie analizy zioła oregano i tytoniu, które bywają dodawane do marihuany. Nie zaobserwowano żadnych pików w zakresie czasów retencji 9 -THC i 9 -THCA-A, które by mogłyby mieć wpływ na oznaczenie analitów. Rycina 8 przedstawia typowe chromatogramy uzyskane w trakcie analizy rzeczywistych próbek ziela konopi (marihuany) wykresione dla długości fali 210 i 220 nm, przy których oznaczany był odpowiednio 9 -THC i 9 -THCA-A. Rycina 9 przedstawia widma spektrofotometryczne obu analitów w zakresie 200–400 nm. W przedstawionych warunkach składniki ekstrahowanej matrycy próbek rzeczywistych ziela konopi nie interferowały z pikami chromatograficznymi oznaczanych związków.

3.2.2. Granica wykrywalności i oznaczalności (LOD, LOQ)

Granice wykrywalności i oznaczalności dla obu związków wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej w niskim zakresie od 0,02% do 0,2% 9 -THC i 9 -THCA-A, w którym spodziewano się LOD i LOQ. Obliczeń walidacyjnych dokonywano przy użyciu oprogramowania Valistat firmy Merck. Granica wykrywalności (LOD) uzyskana metodą HPLC wynosiła 0,0003% (w przeliczeniu na suchą masę ziela konopi) dla 9 -THC i 0,0007% dla 9 -THCA-A. Granica oznaczalności (LOQ) uzyskana tą metodą wynosiła 0,0027% dla 9 -THC i 0,006 % dla 9 -THCA-A.

3.2.3. Liniowość

Liniowość metody sprawdzono zarówno dla 9 -THC, jak i dla 9 -THCA-A w zakresie stężeń od 0,05% (2,5 µg/ml) do 2,0% (100 g/ml). Dla uzyskanych krzywych kalibracyjnych obliczono współczynnik korelacji (r^2), który miał wartość powyżej 0,999.

3.2.4. Precyzja

Precyzję wewnątrzgrupową i zewnątrzgrupową określano poprzez analizę każdorazowo 5 próbek zhomogenizowanego materiału roślinnego (ziela konopi) w okresie 6 dni. Precyzja wewnątrzgrupowa i zewnątrzgrupowa wyrażona w jako procentowy współczynnik zmienności (CV) wynosiła odpowiednio 3,5% i 8,2% dla 9 -THC, oraz 3,4% i 8,4% dla 9 -THCA-A.

3.3. Walidacja metody GC-MS

W trakcie analizy ziela konopi metodą GC-MS w wysokiej temperaturze iniektora dochodzi do dekarboksylacji 9 -THCA-A do 9 -THC, stąd oznaczanie obejmowało tylko jeden związek. Uzyskane wyniki oznaczeń

9 -THC odpowiadały w rzeczywistości sumie zawartości 9 -THC i 9 -THCA-A. Granice wykrywalności i oznaczalności wyznaczono na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej w wąskim zakresie od 0,025% do 0,2% (zawartość 9 -THC w suchej masie ziela konopi). Granica wykrywalności (LOD) 9 -THC uzyskana metodą GC-MS wynosiła 0,015%, a granica oznaczalności (LOQ) 0,113%. Krzywa kalibracyjna była liniowa ($r = 0,998$, równanie krzywej $y = 0,0931x - 0,0984$) w zakresie od 0,1% do 0,8%. Precyzja wewnątrzgrupowa uzyskana dla metody GC-MS wyrażona współczynnikiem zmienności CV wyniosła 15,3% a precyzja zewnątrzgrupowa 21,3%. Precyzję wyznaczano analogicznie jak dla metody HPLC.

3.4. Porównanie wyników oznaczania 9 -THC i 9 -THCA-A metodami HPLC i GC-MS

W celu porównania metody HPLC z GC-MS i ich przydatności w oznaczaniu głównych psychoaktywnych składników konopi, przeprowadzono równoległe analizy 64 rzeczywistych próbek marihuany tymi dwiema metodami, stosując opracowane i zwalidowane wcześniej procedury. Wyniki oznaczeń 9 -THC i 9 -THCA metodą HPLC zsumowano i porównano z wynikami otrzymanymi metodą GC-MS, badając, jaka jest korelacja między nimi (rycina 10).

Stężenia 9 -THC wyznaczone metodą GC-MS mieściły się w zakresie 1,6–19,6% (średnia 7,4%) w suchej masie ziela. Stężenia 9 -THC wyznaczone metodą HPLC mieściły się w zakresie 0,1–9,6% (średnia 1,0%) w suchej masie ziela. Stężenia 9 -THCA-A wyznaczone metodą HPLC mieściły się w zakresie 0,7–13,7% (średnia 7,4%) w suchej masie ziela. Całkowita zawartość 9 -THC (suma 9 -THC i 9 -THCA-A) wyznaczona metodą HPLC mieściła się w zakresie 0,8–23,0% (średnia 8,4%) w suchej masie ziela. Porównanie wyników oznaczenia zawartości 9 -THC w próbkach rzeczywistych uzyskanych tymi dwiema metodami wykazało dobrą korelację między nimi ($r = 0,93$), co wskazuje, że można je stosować do oznaczania całkowitego stężenia tego związku w ziele i innych produktach konopi, np. haszyszu. Równanie prostej przechodzącej przez punkt (0,0); $y = 0,8581x$ wskazuje, że stężenia otrzymane metodą GC-MS mają średnio wartość około 86% wartości stężeń otrzymanych metodą HPLC. Zaniżone wartości stężeń 9 -THC wyznaczone metodą GC-MS w porównaniu z całkowitym stężeniem 9 -THC mogą być związane z niecałkowitym termicznym procesem dekarboksylacji 9 -THCA-A do 9 -THC [3]. Wynika z tego, że jedynym sposobem dokładnego wyznaczenia całkowitego stężenia 9 -THC jest oznaczenie dwóch składników oddzielnie, a następnie ich zsumowanie. Wyznaczenie całkowitej zawartości 9 -THC metodami chromatografii gazowej po dekarboksylacji pozwala uzyskać co najwyżej

minimalną zawartość niż dokładne stężenie całkowitego Δ^9 -THC. Wyznaczenie całkowitej zawartości Δ^9 -THC jest bardziej dokładną miarą określenia potencjalnych psychoaktywnych właściwości badanej próbki produktów konopi, czy też ziela konopi lub żywicy [3].

4. Wnioski

1. Wyniki wskazują, że obie metody nadają się do rutynowych analiz i można je wykorzystać w celu różniczenia konopi włóknistych od konopi innych niż włókniste.
2. Metoda HPLC pozwala na wyznaczenie zawartości obu związków wymienionych w ustawowej definicji ziela konopi włóknistych, tj. delta-9-tetrahydrokannabinolu (Δ^9 -THC, 9-THC) oraz kwasu delta-9-tetrahydrokannabinolowego (Δ^9 -THCA-A, kwas delta-9-THC-2-karboksylowy, 9-THCA-A).
3. Precyzja metody HPLC jest lepsza niż metody GC-MS. Metoda HPLC jest czulsza niż GC-MS (niższe wartości *LOD* i *LOQ*).