



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas

Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Skirtingų chromatografijos metodų palyginimas bioaktyvių fitokanabinoidų analizei

Baigiamasis magistro projektas

Lina Burlėgaitė

Projekto autorė

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

Vadovas

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Farmacijos fakultetas

Skirtingų chromatografijos metodų palyginimas bioaktyvių fitokanabinoidų analizei

Baigiamasis magistro projektas
Medicininė chemija (6281CX001)

Lina Burlėgaitė

Projekto autorė

Prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis

Vadovas

Doc. dr. Michail Syrpas

Recenzentas

Kaunas, 2020



Kauno technologijos universitetas
Cheminės technologijos fakultetas



Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas
Farmacijos fakultetas

Lina Burlėgaitė

Skirtingų chromatografijos metodų palyginimas bioaktyvių fitokanabinoidų analizei

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Linos Burlėgaitės, baigiamasis projektas tema „Skirtingų chromatografijos metodų palyginimas bioaktyvių fitokanabinoidų analizei“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

Lina Burlėgaitė

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Burlėgaitė, Lina. Skirtingų chromatografijos metodų palyginimas bioaktyvių fitokanabinoidų analizei. Baigiamasis magistro projektas / vadovas prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas; Lietuvos sveikatos mokslų fakultetas, Farmacijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): chemija, fiziniai mokslai.

Reikšminiai žodžiai: pluoštinė kanapė, fitokanabinoidai, skysčių chromatografija, dujų chromatografija.

Kauas, 2020. 72 p.

Santrauka

Pluoštinė kanapė (*Cannabis sativa* L.) – tai augalas kaupiantis daugybę žmogaus sveikatai naudingų junginių. Jau nuo seno šis augalas buvo naudojamas pluoštui ir medicininėje chemijoje. Šiuo metu didelio mokslininkų dėmesio pluoštinės kanapės susilaukia dėl lapų trichomose kaupiamų terpenofenolinių junginių – fitokanabinoidų. Moksliniais tyrimais patvirtinta, kad fitokanabinoidai gali būti pritaikomi medicininėje chemijoje dėl plataus farmakologinio poveikio, kuris dažniausiai yra susijęs su endokanabinoidų sistema žmogaus organizme. Dėl augančios paklausos produktams, kurių sudedamoji dalis yra pluoštinių kanapių ekstraktai, aktualu kurti naujus chromatografinės analizės metodus, tiksliai fitokanabinoidų sudėčiai nustatyti. Šio darbo tikslas buvo optimizuoti ir validuoti dujų ir skysčių chromatografijos metodus, tinkamus pluoštinių kanapių bioaktyvių fitokanabinoidų analizei, bei atlikti *Cannabis sativa* L. ekstraktų kokybinę ir kiekybinę analizę optimizuotomis metodikomis.

Šiame tyrime buvo optimizuotos fitokanabinoidų analizės sąlygos su trimis chromatografinėmis sistemomis: išsamiosios dujų chromatografijos sistema su skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi, dujų chromatografijos sistema su liepsnos jonizacijos detektoriumi ir efektyviaja skysčių chromatografija su diodų matricos detektoriumi. Optimizuoti metodai buvo validuoti remiantis ICH gairėse nurodytais parametrais, įvertinant metodų specifiškumą, preciziškumą, tiesiškumą, aptikimo ribas ir nustatymo ribas. Išsamiosios dujų chromatografijos su skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi metodas validuotas kanabidioliui, kanabigeroliui, kanabinoliui, kanabichromeniui ir kanabidivarinui, dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodas – kanabidioliui, kanabigeroliui, kanabinoliui ir kanabidivarinui, o efektyviosios skysčių chromatografijos metodo validacija atlikta kanabidioliui, kanabigeroliui, kanabinoliui, kanabichromeniui, kanabidivarinui, kanabigerolio ir kanabidiolio rūgštims. Kiekybiniam junginių nustatymui pasirinktas gradavimo grafiko metodas, todėl visiems validuotiems fitokanabinoidams sudarytos kalibracinės kreivės. Tarpusavyje lyginant metodus, geriausios validacijos parametų vertės buvo nustatytos efektyviosios skysčių chromatografijos metodui. Buvo nustatyta, kad efektyviosios skysčių chromatografijos metodo aptikimo ribų vertės tarp fitokanabinoidų pasiskirstę 1,36–2,96 µg/ml intervale, o nustatymo ribų vertės 4,13–8,86 µg/ml intervale. Dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodo fitokanabinoidų aptikimo ribos išsidėstę 1,71–2,71 µg/ml intervale, o nustatymo ribos 5,19–8,20 µg/ml. Išsamiosios dujų chromatografijos su skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi metodo ribos auksčiausios iš visų trijų metodų, aptikimo ribos pasiskirstę 5,00–8,15 µg/ml, o nustatymo ribos 15,15–24,69 µg/ml.

Optimizuoti metodai pritaikyti pluoštinių kanapių ekstraktų fitokanabinoidų sudėties analizei. Visuose ekstraktuose didžiausiais kiekiais aptiktas kanabidiolis, sekantis gausiausias komponentas buvo kanabidivarinas. Ekstraktuose taip pat identifikuoti ir kiekybiškai įvertinti buvo kanabinolis, kanabigerolis, kanabichromenas, kanabigerolio rūgštis, tačiau šių fitokanabinoidų kiekiai ekstraktuose buvo labai maži.

Burlėgaitė, Lina. Comparison of Different Chromatographic Methods for the Analysis of Bioactive Phytocannabinoids. Master's Final Degree Project / supervisor prof. dr. Petras Rimantas Venskutonis; Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology; Faculty of Pharmacy, Lithuanian Health Science University.

Study field and area (study field group): Chemistry, Physical Sciences.

Keywords: hemp, phytocannabinoids, liquid chromatography, gas chromatography .

Kaunas, 2020. 72 pages.

Summary

Hemp (*Cannabis sativa* L.) accumulates plenty of chemical compounds which are beneficial for human health. For centuries it has been used for textile fiber production and in medicinal chemistry. Recently, more scientists got interested in hemp because of terpenophenolic compounds, called phytocannabinoids which are produced in trichomes of leaves. Pharmacological activity of phytocannabinoids has been proven by many studies and it is related to endocannabinoid system in humans. Due to growing demand of products with hemp it is important to create new analytical methods to determine the exact composition of phytocannabinoids in *Cannabis sativa* L. extracts and other products. The aim of this study is to optimize gas chromatography and liquid chromatography conditions for phytocannabinoid analysis and validate them, as well as perform *Cannabis sativa* L. extract analysis with validated methods and determine composition of phytocannabinoids.

In this study conditions of phytocannabinoid analysis was optimized with three chromatographic systems: gas chromatography with time of flight mass spectrometry, gas chromatography with flame ionization detector and high performance liquid chromatography with diode array detector. Methods were validated according to ICH guidelines by evaluating specificity, precision, linearity, Limit of Detection and Limit of Quantification for each phytocannabinoid in each method. Gas chromatography with time of flight mass spectrometry method was validated for cannabidiol, cannabigerol, cannabinol, cannabichromene and cannabidivarin, gas chromatography with flame ionization detector method was validated for cannabidiol, cannabigerol, cannabinol and cannabidivarin, high performance liquid chromatography with diode array detector method was validated for cannabidiol, cannabigerol, cannabinol, cannabichromene, cannabigerolic acid and cannabidiolic acid. For quantitative analysis calibration curves were made for each validated cannabinoid in each method. From all three methods liquid chromatography method had the best values of validation parameters. It was found that limit of detection and limit of quantification values for high performance liquid chromatography method respectively were distributed in 1,36–2,96 µg/ml and 4,13–8,86 µg/ml intervals. For gas chromatography with flame ionization detector method limit of detection values were within the range of 1,71–2,71 µg/ml and limit of quantification values within the range of 5,19–8,20 µg/ml. Limit of detection and limit of quantification values for gas chromatography with time of flight mass spectrometry method were highest from all three methods, respectively they are within the ranges of 5,00–8,15 µg/ml and 15,15–24,69 µg/ml.

Each method was applied for the phytocannabinoid analysis of *Cannabis sativa* L. extracts. It was found that the most abundant phytocannabinoid in all extracts is cannabidiol, followed by

cannabidivarin. However, the amount of cannabidivarin was significantly lower. Cannabinol, canabigerol, cannabichromene and cannabigerolic acid were also identified and quantified in these extracts, yet in very small quantities.

Turinys

Santrumpų ir terminų sąrašas	10
Įvadas	13
1. Literatūros apžvalga	15
1.1 Kanapės taksonomija ir morfologiniai požymiai.....	15
1.2 <i>Cannabis sativa</i> cheminė sudėtis ir veikliųjų medžiagų biosintezė.....	16
1.3 Fitokanabinoidai ir jų biosintezė.....	18
1.4 Endokanabinoidų sistema.....	20
1.5 Fitokanabinoidų farmakologinis poveikis	22
1.6 Fitokanabinoidų farmakokinetika	25
1.6.1 Absorbicija	26
1.6.2 Pasiskirstymas.....	26
1.6.3 Metabolizmas.....	26
1.6.4 Galimos sąveikos	27
1.7 Bioaktyvių junginių išskyrimas iš <i>Cannabis sativa</i> L. žaliavos.....	28
1.8 <i>Cannabis sativa</i> fitokanabinoidų analizė	29
1.9 Fitokanabinoidų dujų chromatografijos analizės metodai.....	30
1.10 Fitokanabinoidų analizė skysčių chromatografijos metodais	33
1.11 Literatūros apžvalgos apibendrinimas.....	34
2. Medžiagos ir tyrimų metodai	36
2.1 Tyrimo objektas	36
2.2 Naudotos medžiagos	36
2.3 Mėginių paruošimas.....	37
2.3.1 Mėginiai kalibracinėms kreivėms	37
2.3.2 Mėginiai iš <i>Cannabis Sativa</i> L. ekstraktų.....	38
2.4. Instrumentinė analizė	39
2.4.1 Dujų chromatografija su liepsnos jonizacijos detektoriumi	39
2.4.2 Išsamiosios dujų chromatografijos sistema su skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi.....	41
2.4.3 Efektyvioji skysčių chromatografija su diodų matricos detektoriumi	43
2.5 Validacijos parametrų nustatymas	44
2.5.1 Specifiškumas	44
2.5.2 Tiesiškumas	44
2.5.3 Preciziškumas	45
2.5.4 Aptikimo riba ir nustatymo riba.....	45
2.6 Tyrimo duomenų įvertinimas	45
3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	46
3.1 Metodų sąlygų optimizavimas.....	46
3.2 Fitokanabinoidų analizės metodo validacija su išmaniosios dujų chromatografijos ir skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi sistema	46
3.2 Fitokanabinoidų analizės metodo validacija dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi sistema	51
3.3 Fitokanabinoidų analizės metodo validacija efektyviosios skysčių chromatografijos su diodų matricos detektoriumi sistema.....	53

3.4 Kokybinė ir kiekybinė <i>Cannabis Sativa</i> L. ekstraktų analizė	56
3.5 Chromatografinių metodų palyginimas.....	60
3.5.1 Specifiškumas	60
3.5.2 Preciziškumas	60
3.5.3 Tiesiškumas	60
3.5.4 Aptikimo ribos ir nustatymo ribos	60
Išvados	62
Literatūros sąrašas	63
Padėka	72

Santrumpų ir terminų sąrašas

Santrumpos:

2-AG – 2-arachidonilglicerolis

5-HT_{1A} – seratonino 1A receptorius

CB1 – pirmojo tipo kanbinoidų receptoriai

CB2 – antrojo tipo kanbinoidų receptoriai

CBC – kanabichromenas

CBCAS – kanabichromeno rūgšties sintazė

CBD – kanabidiolis

CBDA – kanabidiolio rūgštis

CBDAS – kanabidiolio rūgšties sintazė

CBDV – kanabidivarinas

CBDVA – kanabidivarino rūgšties sintazė

CBE – kanabielsoinas

CBG – kanabigerolis

CBGA – kanabigerolio rūgštis

CBGV – kanabigerovarinas

CBL – kanabiciklolis

CBLA – kanabiciklolio rūgštis

CBN – kanabinolis

CBNA – kanabinolio rūgštis

CBND – kanabinodiolis

CBT – kanabicitranas

CYP450 – citochromas P450

CNS – centrinė nervų sistema

SFE-CO₂ – superkrizinė skysčių ekstrakcija anglies dvideginium

COX – ciklooksigenazė

DAD – diodų matricos detektorius

DAGL – diacilglicerolio lipazė

FAAH – riebalų rūgščių amidų hidrolazė

GABA – γ -amino sviesto rūgštis

GC – dujų chromatografija (angl. *Gas Chromatography*)

GC \times GC-TOF/Ms – išsamiosios dujų chromatografijos sistema su skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi (angl. *Gas Chromatography with Time of Flight Mass Spectrometry*)

HPLC – efektyvioji skysčių chromatografija (angl. *High Performance Liquid Chromatography*)

LC – skysčių chromatografija (angl. *Liquid Chromatography*)

LOD – aptikimo riba (angl. *Limit of Detection*)

LOQ – nustatymo riba (angl. *Limit of Quantification*)

MAGL – monoacilglicerolio lipazė

MS – masių spektrometrija

mTOR – žinduolių rapamicino taikynys

NAAA – *N*-aciletanolaminą hidrolizuojančių rūgščių amidazė

NAPE-PLD – *N*-acilfosfatidiletanolaminui specifinė fosfolipazė D

NF-kb – branduolio faktorius *Kappa B*

PPAR γ – peroksisomos proliferatoriaus aktyvuotas receptorių

SN – standartinis nuokrypis

SSN% – santykinis standartinis nuokrypis

THCAS – tetrahidrokanabinolio rūgšties sintazė

TMS – tetrametilsilanas

TRP – laikinas receptoriaus potencialo kanalas

TRPA1 – pereinamasis receptoriaus potencialo kanalas priklausantis A subšeimai, pirmasis subšeimos narys

TRPM8 – pereinamasis receptoriaus potencialo kanalas priklausantis M subšeimai, aštuntasis subšeimos narys

TRPV1 – pereinamasis receptoriaus potencialo kanalas priklausantis V subšeimai, pirmasis subšeimos narys

UGT – gliukuroniltransferazė

UPLC – ultra aukšto našumo skysčių chromatografija (angl. *Ultra Performance Liquid Chromatography*)

UV/Vis – ultravioletinė ir regimoji šviesa

VCAM-1 – kraujagyslių adhezijos baltymas 1

Δ^8 -THC – Δ^8 -tetrahidrokanabinolis

Δ^8 -THCA – Δ^8 -tetrahidrokanabinolio rūgštis

Δ^9 -THC – Δ^9 - tetrahidrokanabinolis

Δ^9 -THCA – Δ^9 - tetrahidrokanabinolio rūgštis

Δ^9 -THCV – Δ^9 -tetrahidrokanabivarinas

Įvadas

Pluoštinė kanapė (lot. *Cannabis sativa* L.) – tai kanapinių (Cannabaceae) šeimos žolinis augalas, kurio sėklose yra daug mitybai vertingo aliejaus ir baltymų, o lapai bei žiedynai sukaupia daug įvairios struktūros bioaktyvių sveikatai naudingų junginių. Šio augalo teigiamas poveikis žmogaus sveikatai buvo žinomas jau nuo seno – daugelis kultūrų vartojo pluoštines kanapes gydymo tikslais [1]. Šiuo metu kanapėje yra identifikuoti daugiau kaip 550 sveikatai naudingų poveikiu pasižymintys komponentai: terpenai, fitokanabinoidai, flavanoidai, lignanai, kumarinai, fenoliai ir t.t. [2]. Dėl didelio kiekio žmogaus sveikatai naudingų junginių pastaruoju metu su pluoštinėmis kanapėmis atliekama vis daugiau mokslinių tyrimų siekiant sukurti naujus preparatus įvairių ligų gydymui, o taip pat didesnės mitybinės vertės maisto produktų ir maisto papildų sukūrimui [3].

Daugiausia mokslininkų dėmesio susilaukia kaip antriniai metabolitai sintetinami unikalūs terpenofenoliniai junginiai – fitokanabinoidai. Moksliniais tyrimais įrodyta, kad fitokanabinoidai yra potencialūs kandidatai įvairių ligų gydymui ir/ar jų sukeltamų neigiamų simptomų mažinimui [4]. Pavyzdžiui, fitokanabinoidai gali stimuliuoti apetitą anoreksija sergantiems pacientams, slopina vėžinių ląstelių proliferaciją, mažina pykinimą ir vėmimą, slopina chronišką neuropatinį skausmą vėžiu, ŽIV/AIDS, fibromialgija, reumatoidiniu artritu ar įvairiomis sklerozėmis sergantiems pacientams. Taip pat nustatyta, kad fitokanabinoidai yra potencialūs vaistų junginiai gydant epilepsiją, Alzheimerio ligą, Huningtono ligą, diabetą, šizofreniją, depresiją ir nuotaikos sutrikimus [1].

Farmacijos, maisto ir kosmetikos pramonėje nuolatos kuriami nauji vaistiniai preparatai, maisto papildai, kremai ir kiti produktai, kurių sudėtyje siekiama panaudoti daugiau natūralių komponentų. Pastaruoju metu vis daugiau vartotojų atkreipia dėmesį į natūralumą, o dėl savo daugybės gydomųjų savybių *C. sativa* preparatai (dažniausiai ekstraktai) galėtų būti gydomųjų produktų sudedamoji dalis bei natūrali ir efektyvi alternatyva daugybės ligų gydymui sintetiniais vaistais. Pluoštinių kanapių ekstraktuose dažniausiai aptinkama nuo kelių iki keliolikos skirtingų fitokanabinoidų, kurių farmakologinės savybės jau buvo tirtos eksperimentiškai. Prieš įtraukiant ekstraktą į preparatą itin svarbu tiksliai išanalizuoti jo sudėtį, ypač veikliųjų medžiagų koncentracijas. Norint kurti preparatus tikslingai, apibrėžti tikslų farmakologinį poveikį, galimas sąveikas su kitais pacientų vartojamais vaistais ir įsitikinti, kad produktuose nėra kenksmingų medžiagų, pvz.: psichoaktyvumu pasižymintio kanabinoido tetrahidrokanabinolio, svarbu atlikti išsamią chromatografinę analizę. Dėl šios priežasties aktualu kurti efektyvius, selektyvius, jautrius, rutininei fitokanabinoidų kokybinei ir kiekybinei analizei tinkamus chromatografinius metodus, o taip pat nustatyti kokybinius ir kiekybinius ryšius tarp šiuo metu taikomų skirtingų metodų.

Darbo tikslas – optimizuoti ir validuoti dujų ir skysčių chromatografijos metodus, tinkamus pluoštinių kanapių bioaktyvių fitokanabinoidų analizei bei atlikti *C. sativa* ekstraktų kokybinę ir kiekybinę analizę optimizuotomis metodikomis.

Darbo uždaviniai:

1. palyginti dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos (FID) bei skriejimo laiko masių spektrometrijos (TOF/Ms) detektoriais metodus fitokanabinoidų CBD, CBG, CBC, CBN ir CBDV analizei ir įvertinti jų efektyvumą bei ypatumus;

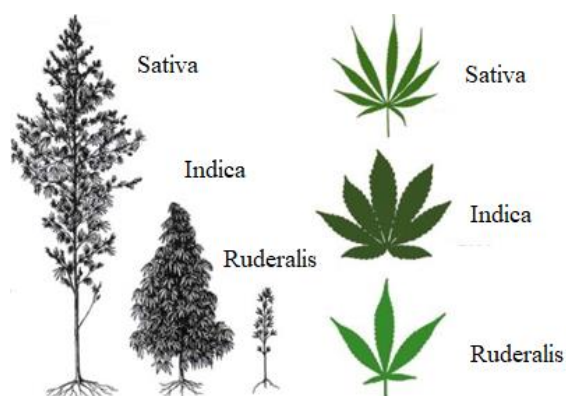
2. įvertinti įvairias fitokanabinoidų analizės efektyviosios skysčių chromatografijos su diodų matricos detektoriumi (HPLC-DAD) metodų sąlygas ir sudaryti patikimai analizei tinkamą analizės protokolą;
3. validuoti sėkmingiausias dujų ir skysčių chromatografijos metodikas *C. sativa* bioaktyvių fitokanabinoidų analizei;
4. sudarytas metodikas išbandyti pluoštinių kanapių ekstraktų kokybinei ir kiekybinei analizei.

1. Literatūros apžvalga

1.1 Kanapės taksonomija ir morfologiniai požymiai

Kanapė (lot. *Cannabis*) – svarbus žolinis augalas, kilęs iš centrinės Azijos ir jau nuo neatmenamų laikų naudotas pluoštui ir tradicinėje medicinoje [5]. Nors gana ilgai šio augalo nauda buvo užmiršta, pastaraisiais metais susidomėjimas juo vėl ženkliai išaugo dėl kanapėse natūraliai kaupiamų junginių ir jų plataus pritaikymo įvairiose srityse galimybių. Išoriniai ir vidiniai kanapės stiebo audiniai gali būti naudojami bioplastikų ir į betoną panašių darinių gamyboje, sėklos svarbios maistui, nes jose yra vidutiniškai 30 % daugiausia iš polinesočių riebalų rūgščių sudaryto aliejaus, vertingų baltymų ir kitų žmogaus sveikatai svarbių komponentų [6], o lapuose esantys fitocheminiai junginiai pasižymi plataus spektro biologiniu aktyvumu ir tikimasi, jog ateityje jie gali būti panaudojami įvairių vaistų sudėtyje [5].

Kanapė yra priskiriama magnolijūnų (lot. *Magnoliophyta*) skyriui, kuriam priklauso kanapinių (lot. *Cannabaceae*) šeima [7]. *Cannabaceae* šeimai yra priskiriamos dvi gentys - *Cannabis* ir *Humulus* [8]. Mokslininkai sutaria, jog yra viena *Humulus* rūšis – *Humulus lupulus*. Tačiau mokslininkai iki šiol diskutuoja, kaip teisingai suklasifikuoti kanapių rūšis ir porūšius. Dažnai išskiriamos dvi nuomonės apie *Cannabis* genties taksonomiją. Viena iš jų teigia, kad *Cannabis* yra viena, stipriai kintanti monotipinė rūšis – *C. sativa* [9]. Kiti teigia, kad gentis yra politipinė ir yra skiria tris rūšis: sėjamosi kanapė (lot. *C. sativa*), indinė kanapė (lot. *C. indica*) ir šiukšlyninė kanapė (lot. *C. ruderalis*) (žr. 1 pav.). Tačiau literatūroje galima surasti darbų, kuriuose išskiriama ir ketvirtoji rūšis – afganinė kanapė (lot. *C. afghanica*), o kai kurie mokslininkai siūlo *Cannabis* genčiai priskirti tik dvi rūšis – *C. sativa* ir *C. indica* [10, 11]. Kol kas nėra sutarta dėl tikslaus klasifikavimo, todėl mokslinėje literatūroje kanapės dažniausiai yra įvardinamos kaip viena *C. sativa* rūšis ir šalia nurodoma jų veislė [7].



1 pav. Kanapės rūšys: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica*, *Cannabis ruderalis* [12]

C. sativa – tai vienmetis augalas, kurio morfologinės savybės dažnai yra varijuojančios, nes jos priklauso nuo augalo kultyvavimo sąlygų [13]. Augalo stiebas status ir tiesus, šakotas, stiebo aukštis dažniausiai yra 50–180 cm [14], bet gali išaugti iki 5 m [15]. Visas augalas yra apaugęs plaukeliais. Lapai priešiniai, ilgais, vagotais, aštriai plaukuotais lapkočiais. Lapkočiai pirštiškai suskaidyti, suskaidymas būna trilapis arba penkialapis, rečiau devynių dalių. Skiltys pailgos, lancetiškos, pleištišku pagrindu, stambiai dantytomis kraštais. Lapai – liaukingi. Viršutiniai lapai pražanginiai, trilapiai arba sveiki. Prielapiai maži, poriniai, lancetiški arba linijiški, lygiakraščiai,

nusmailėję. Kuokeliniai žiedai turi trumpus žiedkočius, jie susitelkę į ilgus, šakotus, apatinėje dalyje lapuotus šluotelinius žiedynus. Jų apžiedis balsvai žalias, 7–8 mm skersmens, sudarytas iš 5 bukų lapelių. Piesteliniai žiedai auga tankiais, varpiškais žiedynais, susitelkę viršutinių lapų pažastyse. Jų pažiedės kiaušiniškos, nusmailėjusia viršūne. Apžiedis trumpas, lygiakraštis, apsupa tik mezginės pagrindą. Vaisius – plikas, 3–6 mm ilgio ir 2 mm pločio riešutėlis, apgaubtas pažiedės [14].

Pluoštinės kanapės žydi birželio-liepos mėnesiais skleidamos stiprų ir tik šiems augalams būdingą kvapą. Kanapės apdulkina vėjas, o sėklos sunoksta rūgpjūčio mėnesį [14]. Vyriškieji ir moteriškieji reprodukciniai organai yra skirtinguose augaluose, išskyrus tuos atvejus, kai yra specialiai kultivuojami, jog augtų tame pačiame augale [13]. Vyriškieji augalai dažnai vadinami tiesiog pleiskanėmis, jų lapai yra smulkesni ir retesni, tačiau stiebai aukštesni nei moteriškųjų augalų (žr. 2 pav.). Jų vegetacija trunka trumpiau, pluoštas yra plonesnis, jų derlius nuimamas keliomis savaitėmis anksčiau [16].



2 pav. Moteriški (kairėje) ir vyriški (dešinėje) augalai [17, 18]

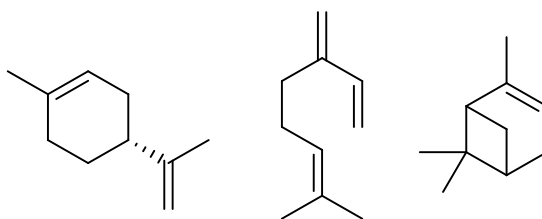
Kanapėms augti yra tinkami priemolio ar priemolio dirvožemiai [14]. Kanapės dauginasi sėklomis, kurias geriausia sėti rudenį ar pavasarį. Tačiau nors dažnai kanapės yra kultivuojamos kaip sėtinės kultūros, šie augalai auga geriau, kai dauginasi savaimine sėja [5, 14].

1.2 *Cannabis sativa* cheminė sudėtis ir veikliųjų medžiagų biosintezė

C. sativa galima rasti daugiau kaip 750 skirtingoms klasėms priskiriamų, junginių. Viena iš svarbiausių grupių lapuose ir žiedynuose yra fitokanabinoidai – šiai grupei yra priskiriama daugiau nei 100 iki šiol identifikuotų terpenofenolinių antrinių šio augalo metabolitų [15]. Dar viena svarbi klasė – terpenai, kurių kanapėse iki šiol identifikuota 140 junginių. Be šių junginių klasių, *C. sativa* yra identifikuota 50 skirtingų angliavandenilių, 34 angliavandeniai ir panašūs į juos junginiai, 27 azoto junginiai, 25 nekanabinoidinių fenolinių junginiai, 23 riebalų rūgštys, 23 flavanoidai, 20 paprastų rūgščių, 13 ketonų, 13 esterių ir laktonų, 12 aldehydų, 11 baltymų, 11 steroidų, 3 vitaminai ir 2 pigmentai. Verta paminėti, kad augale nėra identifikuota laisvų flavanoidų, tačiau jie aptinkami kaip glikozidai [19].

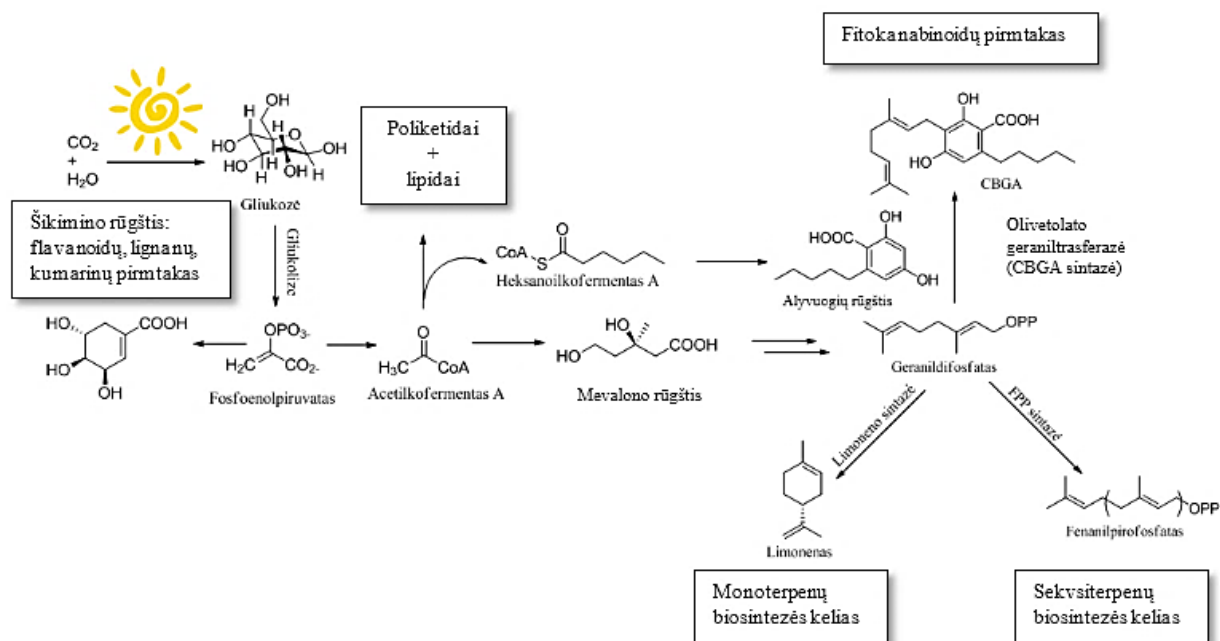
Specifinį kvapą pluoštinėms kanapėms suteikia terpenoidai: tarp monoterpenų vyrauja D-limonenas, β -mircenas ir α -pinenas (žr. 3 pav.). Nemažiau svarbūs ir seksiterpenai, tarp kurių vyrauja kariofilenas ir jo oksidas. Šie junginiai yra labai lakūs ir atlieka apsauginį vaidmenį – atbaido vabzdžius ir maisto ieškančius gyvūnus. Mokslininkai įrodė, kad *C. sativa* esantys

terpenoidai ir fitokanabinoidų rūgštys pasižymi sinerginiu veikimu ir yra augalo apsauginė sistema nuo daugelio vabzdžių ir gyvūnų [15].



3 pav. Kiekybiškai svarbiausi kanapių monoterpenai (iš kairės į dešinę): D-limonenas, β -mircenas ir α -pinenas.

Terpenų, fitokanabinoidų, flavanoidų, lignanų, kumarinų, poliketidų ir lipidų biosintezės keliai yra labai glaudžiai susiję, kadangi augalai naudoja saulės energiją, CO₂ ir H₂O daugelio naudingų junginių biosintezei (žr. 4 pav.). Fotosintezės metu susidariusi gliukozė glikolizės metu yra verčiama fosfoenolpiruvatu, kuris gali metabolizuotis dviem biosintezės būdais. Viename, jis yra konvertuojamas į šikimino rūgštį, kuri yra flavanoidų, lignanų ir kumarinų pirmtakas. Kitame – yra katabolizuojama į acetilkofermentą A, iš kurio yra sintetinami augaliniai lipidai ir poliketidai. *C. sativa* yra aptinkami specifiški fermentai: III tipo poliketidų sintazė ir oleino rūgšties ciklazė, kurie konvertuoja acetilkofermentą A į oleino rūgštį. Acetilkofermentas A taip pat svarbus biosintezės būdu pasigaminant geranildifosfatui, kuris yra pagrindinis kitų terpenų biosintezės tarpinis produktas. Šis tarpinis produktas taip pat panaudojamas fitokanabinoidų biosintezei. Geranildifosfatas gali būti veikiamas keliais skirtingais fermentais ir yra konvertuojamas į skirtingus junginius. Priklausomai nuo veikiančių fermentų, jis dalyvauja fitokanabinoidų ir terpenų susidaryme. Šio junginio konversija skirtingais keliais lemia CBGA, monoterpenų ir seksiveterpenų susidarymą. Veikiant fermentui olivetolato geraniltransferazės, geranildifosfatas jungiasi su oleino rūgštimi ir gaunama CBGA. Geranildifosfatas veikiamas fermento limoneno sintazės, dalyvauja monoterpenų biosintezės kelyje, o veikiamas fermento farnesilpirofosfato (FPP) sintazės – seksiveterpenų biosintezės kelyje. Fitokanabinoidų ir terpenų gausa augale priklauso nuo tarpusavyje konkuruojančių šiuose keliuose dalyvaujančių fermentų. *C. sativa* terpenų susintetinama gerokai mažiau negu fitokanabinoidų [19].



4 pav. Bioaktyvių *C. Sativa* junginių biosintezės schema [19]

1.3 Fitokanabinoidai ir jų biosintezė

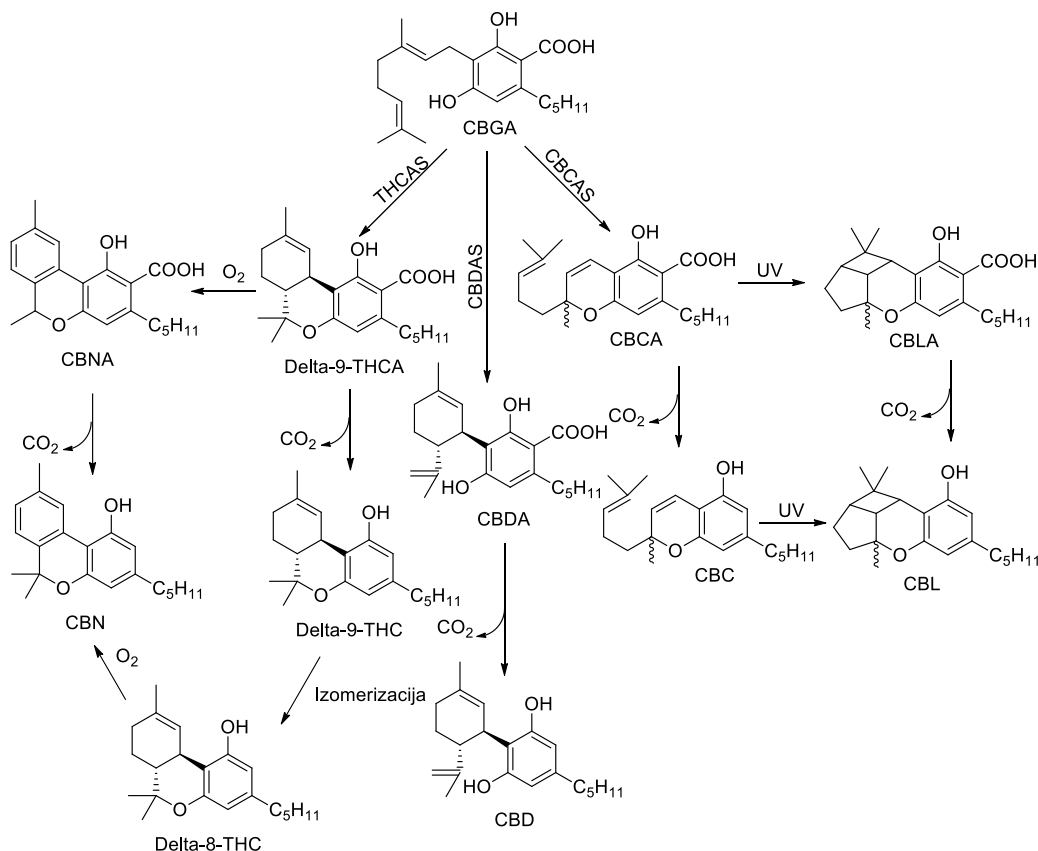
Fitokanabinoidai – tai natūralios kilmės produktai, sintetinami *C. sativa*, kurių pagrindą sudaro C_{21} terpenofenolinis skeletas [20]. Literatūros šaltiniuose šie junginiai dar kitaip apibūdinami, kaip izoprenilo rezorcinilo poliketidai [21]. Šiuo metu yra identifikuota 120 fitokanabinoidų, kurie yra suskirstyti į 11 grupių: (-)- Δ^9 -*trans*-tetrahydrokanabinolio (Δ^9 -THC), (-)- Δ^8 -*trans*-tetrahydrokanabinolio (Δ^8 -THC), kanabigerolio (CBG), kanabichromeno (CBC), kanabidiolio (CBD), kanabinodiolio (CBND), kanabielsoino (CBE), kanabiciklolio (CBL), kanabinolio (CBN), kanabitriolio (CBT) ir miršri grupė (žr. 1 lentelė) [20].

1 lentelė. Fitokanabinoidų klasifikacija [22]

Grupė	Kiekis
Δ^9 -THC	23
Δ^8 -THC	5
CBG	16
CBC	9
CBD	7
CBND	2
CBE	5
CBL	3
CBN	11
CBT	9
Mišri grupė	30
Iš viso:	120

Fitokanabinoidų pirmtakas pluoštinėse kanapėse yra CBGA. CBGA į kitus fitokanabinoidus yra konvertuojamas fermentinių reakcijų metu. Šiose konversijose dalyvauja 3 fermentai: tetrahydrokanabinolio rūgšties sintazė (THCAS), kanabidiolio rūgšties sintazė (CBDAS) ir

kanabichromeno rūgšties sintazė (CBCAS). Šie fermentai naudoja CBGA kaip substratą ir stereoselektyviai katalizuoja oksidacinę terpeninės CBGA dalies ciklizaciją. THCAS ir CBDAS katalizuojamoms reakcijoms reikalingas deguonis, vykstant šioms reakcijoms susidaro šalutinis produktas – vandenilio peroksidas. CBCAS katalizuojamai konversijai deguonis nėra reikalingas, tačiau kitų reakcijų metu susidaręs vandenilio peroksidas gali CBCAS inhibuoti. Visi trys fermentai vykdo ir CBGA *cis*-izomero CBNRA konversiją į atitinkamus fitokanabinoidus, tačiau šio izomero *C. sativa* yra ženkliai mažiau. Tiriant fermentų aktyvumą buvo nustatyta, kad kaip substratą naudojant dekarboksilintą CBG, nebuvo pastebėtas fermentinis aktyvumas. Tai įrodo, kad karboksirūgšties grupė yra būtina fermentiniam veikimui. Po fermentinės biosintezės THCA, CBDA ir CBCA dalyvauja nefermentinėse degradacijos reakcijose: junginiai yra dekarboksilinami, oksiduojami ir kt. taip gaunami kiti neutralių formų fitokanabinoidai. Fitokanabinoidai su C₃ šonine grandine (pvz.: CBDV) yra gaunami veikiant tokiems patiems fermentams, kaip ir C₅ [23]. Daugiausia fitokanabinoidų yra sintetinama klampiam skystyje, kuris yra išskiriamas iš lapų trichomų moteriškos lyties augaluose. Tuo tarpu, vyriškos lyties augalai turi tik keletą trichomų ir gali sintetinti fitokanabinoidus mažais kiekiais (žr. 5 pav.) [15].



5 pav. Fitokanabinoidų biosintezės schema [23]

Svarbu paminėti, kad *C. sativa* savaime nesintetina Δ^9 -THC, CBD, CBG ar CBC, bet karboksirūgšties grupę turinčius jų prekursorius Δ^9 -THCA, CBDA, CBGA ir CBCA. Kanapių ekstraktai, kuriuose yra THCA, nepasižymi psichoaktyviu veikimu, tol kol yra paveikiami tam tikra temperatūra, kuri sukelia rūgščių dekarboksilinimą. Dekarboksilinimo metu išskiriama CO₂ molekulė. Fitokanabinoidų rūgščių dekarboksilinimas įvyksta pakankamai greitai esant 105 °C ir aukštesnei temperatūrai. Aplinkos sąlygomis dekarboksilinimas vyksta lėtai, tačiau greitėja keliant temperatūrą. Dideli dekarboksilintų fitokanabinoidų kiekiai žaliavoje parodo, kad ji buvo laikoma

netinkamai arba yra pasenusi. Oksidacijos metu vyksta Δ^9 -THC konversija į CBN, taigi didelė CBN koncentracija taip pat parodo, kad žaliava buvo laikoma netinkamomis sąlygomis [19].

THC tipo fitokanabinoidų kiekis *C. sativa* žaliavoje lemia jos klasifikavimą. Išskiriami du tipai: narkotinės kanapės ir pluoštinės kanapės. Pagrindinis šių tipų skirtumas yra pagrindinio psichoaktyvaus fitokanabinoido Δ^9 -THC kiekis. Žaliava, kurioje Δ^9 -THC kiekis yra didesnis nei 0,2 % (kai kuriose valstybėse, pvz. JAV 0,3 %) priskiriama narkotiniam tipui. Žaliava, kurioje Δ^9 -THC kiekis yra mažesnis nei 0,2 % priskiriama pluoštiniam tipui [24].

1.4 Endokanabinoidų sistema

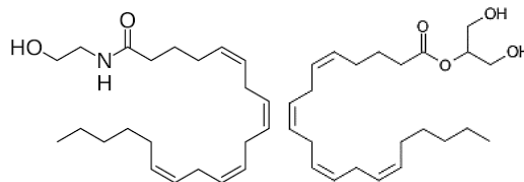
Iki 20 a. paskutinių dviejų dešimtmečių pluoštinės kanapės buvo mažiau tiriamos, jomis domėjosi nedaug mokslininkų [25]. Dėl ypač lipofilinės fitokanabinoidų prigimties ilgai buvo klaidingai manoma, kad jų farmakologinis poveikis pasireiškia, nes lipofilinės molekulės nespecifiškai kerta ląstelių membraną lipidinį sluoksnį. Tačiau 1988 metais tiriant sintetinių kanabinoidų poveikį buvo nustatyta, kad jie veikia labiau specifiniu mechanizmu. Pirmojo tyrimo, parodančio, kad fitokanabinoidai galėtų jungtis su tam tikrais receptoriais, metu buvo nustatyta, kad fitokanabinoidai slopina fermento adenilciklazės sintezę, o vėliau buvo nustatyta, kad kanabinoidų jungimosi centrų yra ir smegenyse – taip buvo atrastas receptorių CB1. 1993 metais dar vienas endokanabinoidų receptorių CB2 buvo rastas blužnyje. Abu CB1 ir CB2 receptoriai tai dviejų 7 kartus membraną kertančių domenų receptoriai, kurie priklauso su G baltymu susijusių receptorių superšeimai. Genetiškai šie receptoriai turi 48 % identiškų aminorūgščių sekų. Abu receptoriai per G baltymą yra sujungti su adenililo ciklaze ir mitogenų aktyvinama proteinų kinaze (MAPK3) [26].

Iš pradžių buvo manoma, kad CB1 receptoriai lokalizuoti tik centrinėje nervų sistemoje, dėl to jie buvo laikomi smegenų kanabinoidų receptoriais. Šiuo metu jau yra žinoma, kad šių receptorių yra daugelyje periferinių organų, tačiau kai kuriuose iš jų šių receptorių kiekis labai mažas. Endokanabinoidų pasiskirstymas ir nuo to priklausantis poveikis apibendrintas 2 lentelėje [27].

2 lentelė. Endokanabinoidų receptorių pasiskirstymas organizme ir nuo vietos priklausantis aktyvumas [27].

Endokanabinoidų receptorių vieta organizme	Receptorių valdomos organizmo funkcijos	Potencialus fitokanabinoidų efektas
Smegenų žievė, hipokamas, limbinė sistema	Suvokimas, atmintis, budrumas, nuotaika ir elgesys, laiko/garso/vaizdo suvokimas	Sutrikęs suvokimas, atmintis, budrumas, nuotaikos ir elgesio pokyčiai, ryškiau ar silpniau sovikiamas garsas/vaizdas.
Bazinės ganglijos, smegenėlės	Koordinacija, judėjimas	Sutrikusi koordinacija
Pagumburys	Apetitas	Apetito padidėjimas
Pailgosios smegenys	Pykinimas ir vėmimas	Pykinimo ir vėmimo sumažinimas
Nugaros smegenys ir periferiniai nociceptoriai	Skausmo suvokimas	Skausmo suvokimo sumažinimas
Regos sistema	Akispūdis	Akispūdžio sumažinimas
Širdies ir kraujagyslių sistema	Širdies ritmas, kraujo spaudimas	Ūminis širdies ritmo ir kraujo spaudimo padidėjimas
Virškinimo trakto sistema	Virškinamojo trakto motorika	Virškinimo trakto motorikos sumažėjimas
Imuninė sistema	Imunitetas	Imuninės sistemos stimuliacija arba slopinimas

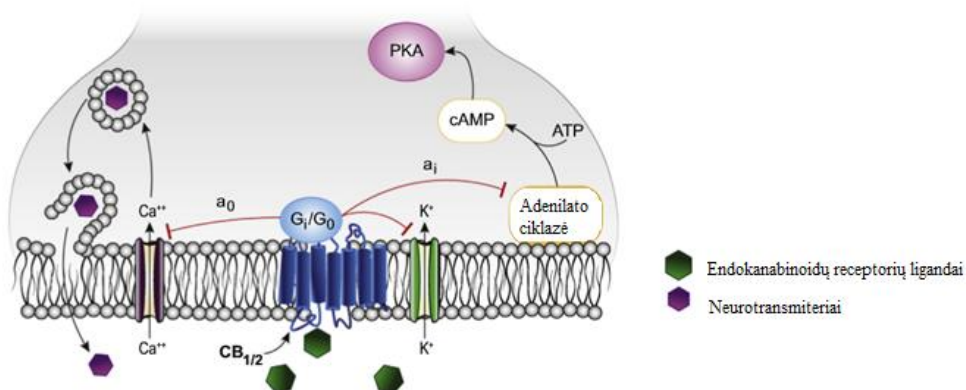
Endokanabinoidų sistemai yra priskiriami ne tik receptoriai, tačiau ir jų ligandai – „endokanabinoidai“. Du labiausiai mokslininkų ištyrinėti endogeniniai ligandai – tai *N*-arachidonoiletanolaminas (anandamidas), kuris yra šių receptorių dalinis agonistas ir 2-arachidonoilglicerolis (2-AG), kuris yra visiškasis šių receptorių agonistas (žr. 6 pav.).



6 pav. Anandamido ir 2-AG struktūros

Be šių dviejų pagrindinių endogeninių ligandų endokanabinoidų sistemai priskiriami dar trys ligandai: *N*-arachidonoildopaminas (NADA) – jungiasi prie CB1 receptorių [28], *O*-arachidonoiletanolaminas (OAE) – CB1 receptorių antagonistas [29], 2-arachidonoilglicerilo eteris (noladino eteris) – jungiasi prie CB1 receptorių, tačiau mokslininkai nesutaria dėl tikslaus jo priskyrimo endokanabinoidų sistemai, kadangi šio junginio kiekis išskirtas iš smegenų labai nedidelis [30]. Endokanabinoidų sistemai taip pat priskiriami 5 fermentai, kurie atsakingi už endogeninių ligandų biosintezę: NAPE-PLD, α -DAGL, β -DAGL, FAAH, MAGL [31].

CB1 receptorių aktyvacija endogeniniais ligandais lemia adenililciklazės inhibiciją ir įtampos valdomų kalcio kanalų blokadą, dėl kurios sumažėja neurotransmiterių judėjimas, taip pat vykdoma ir kalio kanalų blokada (žr. 7 pav.) [32]. Dideli šių receptorių kiekiai presinapsiniuose ir postsinapsiniuose terminaluose reiškia, kad CB1 receptorių aktyvavimas endokanabinoidais sumažina neuronų jautrumą ir neurotransmiterių judėjimą. Toks poveikis leido pradėti fitokanabinoidų tyrimus dėl epilepsijos gydymo. Keletas farmacijos kompanijų bando susintetinti CB1 antagonistus ir agonistus diabeto, metabolinio sindromo ir priklausomybės nuo vaistų gydymui. CB2 receptorių CNS yra nedaug, šie receptoriai daugiausia išsidėstę už imuninių ląstelių produkciją ir reguliaciją atsakinguose audiniuose: blužnyje, tonzilėse ir užkrūčio liaukoje. Šie audiniai reguliuoja B ir T limfocitus, monocitus, makrofagus, putliąsias ląsteles [33].



7 pav. CB1 ir CB2 receptoriai postsinapsinėje membranoje [34]

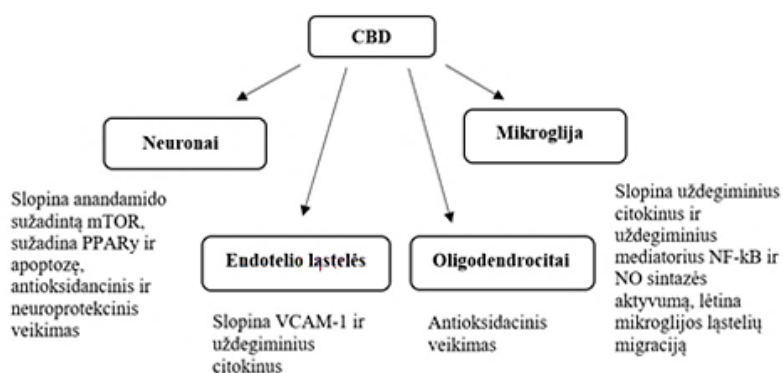
1.5 Fitokanabinoidų farmakologinis poveikis

Fitokanabinoidų farmakologinio poveikio tyrinėjimas prasidėjo dar 1940 metais, praėjus keliems dešimtmečiams po to, kai fitokanabinoidai buvo pirmą kartą identifikuoti pluoštinėse kanapėse [35]. Ilgą laiką jie buvo naudojami skausmui malšinti, tačiau atradus endokanabinoidų sistemą paaiškėjo, kad šie junginiai galėtų būti vartojami ir daugelio kitų negalavimų gydymui: nuotaikos ir nerimo sutrikimų, Parkinsono ir Huntingtono ligoms, neuropatinio skausmo, išsėtinės sklerozės, stuburo smegenų pažeidimams, aterosklerozei, miokardo infarktui, insultui, hipertenzijai, glaukomi, nutukimui ir osteroparozėi ir kt. [36].

Stipriausiai iš šiuo metu identifikuotų fitokanabinoidų endokanabinoidų sistemą dirgina Δ^9 -THC. Tai *C. Sativa* komponentas, kuris pasižymi psichoaktyvumu. Δ^9 -THC gali aktyvuoti tiek CB1, tiek CB2 receptorius. Tačiau abiems receptoriams jis yra dalinis agonistas, kadangi jis negali visiškai aktyvuoti šių receptorių, kad sukeltų maksimalų jų atsaką. Lyginant su endogeniniais ligandais anandamidu ir 2-AG, receptorių sužadavimo stiprumas yra panašus. Δ^9 -THC savo funkcinėmis savybėmis labiau panašus į anandamidą, kuris taip pat yra dalinis agonistas. Tačiau skiriasi nuo 2-AG, kuris yra visiškas agonistas ir gali sukelti maksimalų receptorių atsaką. Atlikus bandymus su sveikomis pelėmis buvo nustatyta, kad jis slopina judesių koordinaciją, mažina kūno temperatūrą, sukelia katalepsiją ir pasižymi stipriu skausmą malšinančiu veikimu. Visi šie poveikiai yra susiję su CB1 receptoriu. Taip pat nustatyta, kad Δ^9 -THC turi priešuždegiminių ir imunomoduliacinių savybių, kurios susijusios su CB2 receptorių aktyvacija [15]. Keliais tyrimais buvo patvirtinta, kad CB2 receptorių stimuliacija inhibuoja uždegiminius citokinus, kurie suaktyvėja esant uždegiminiams agentams, pvz.: lipopolisacharidui (LPS) – gramneigiamų bakterijų išorinės sienelės membranos komponentui [37]. Δ^9 -THC taip pat parodė efektyvumą gydant nervinę anoreksiją [38], tap pat mažina pykinimą ir vėmimą, mažina neuropatinį, vėžio sukeltą, skausmą. Šiuo metu peroraliai skiriamas grynas sintetinis Δ^9 -THC (dronabinolis) yra vartojamas vėžio gydymo chemoterapijos sukeltam pykinimui ir vėmimui bei apetito sužadimui anoreksija sergantiems ŽIV/AIDS pacientams. Nustatyta, kad Δ^9 -THC padeda ne tik sužadinti ŽIV/AIDS pacientų apetitą, tačiau ir kovoja prieš virusą dar neištirtu mechanizmu. 2012 metais atlikto tyrimo metu nustatyta, kad Δ^9 -THC padeda šio viruso gydymui dėl CB2 receptorių aktyvacijos [39]. Taip pat medikamentas (Sativex), kurio sudėtyje yra iš pluoštinių kanapių išskirtas Δ^9 -THC ir CBD yra naudojamas stipraus vėžio ir sklerozių skausmui mažinti [40]. Priešvėžiniai tyrimai atlikti su Δ^9 -THC parodė daug žadančių rezultatų, nustatyta, kad jis mažina vėžinių ląstelių proliferaciją, metastazę ir angiogenezę [41].

CBD yra pluoštinių kanapių komponentas, kuris šiuo metu sulaukia daugiausiai dėmesio dėl savo farmakologinių savybių. Skirtingai nei Δ^9 -THC, CBD psichoaktyvumu nepasižymi. CBD yra CB1 receptorių antagonistas, todėl mažina sukeltą neigiamą Δ^9 -THC poveikį ir kaikurių sintetinių vaistų, CB1 receptorių agonistų, poveikį. CBD taip pat aktyvina CB2 receptorius, tačiau šiuos receptorius aktyvina mažiau ir pasižymi priešuždegiminiu, prieštraukuliniu poveikiu [42]. Taip pat, manoma, kad tai tinkamas kandidatas Alzheimerio ligai gydyti [43]. Mokslininkai nustatė, kad CBD farmakologinį poveikį lemia ne tik endokanabinoidų sistemos receptorių aktyvavimas, tačiau taip pat jis gali reguliuoti pereinamuosius receptorių potencialo kanalus (TRP), daugiausiai TRPV1, TRPA1 ir TRPM8. Tačiau ši veikimo sistema mokslinėje literatūroje dar nėra iki galo išnagrinėta. Nemažiau yra svarbios CBD stiprios antioksidacinės savybės, dėl kurių jis suriša reaktyvias deguonies formas, kurios gali pažeisti įvairias ląsteles ir sukelti uždegimą. CBD antioksidacinės

savybės prilyginamos vitaminui E. Taip pat CBD pasižymi patikimesniu prieštraukuliniu poveikiu iš visų fitokanabinoidų. Pastaruoju metu atliekami tyrimai su pacientais sergančiais epilepsija, o tyrimų rezultatai daug žadantys [15]. Dar daugiau, įrodyta, kad CBD mažina nerimą, o jo 300 mg dozės poveikis yra prilyginamas benzodiazepinui diazepamui [44]. Mokslininkai ištyrė įvairių fitokanabinoidų priešvėžinį veikimą. Tyrimo metu CBD pasižymėjo geriausiu rezultatu iš visų kanabinoidų, o jo rūgštinė forma CBDA – prasčiausiu. Toks CBD aktyvumas aiškinamas kanabinoido savybe sukelti apoptozę dėl CB2 ir TRPV1 receptorių aktyvavimo [45]. Taip pat buvo atlikti tyrimai su įvairių formų glioblastoma gyvūnuose ir žmonėse, kurie parodė, kad Δ^9 -THC ir CBD, naudojami kartu ar atskirai slopina glioblastomos ląstelių augimą [33]. Mokslininkai nustatė, kad fenilo žiedą turintys fitokanabinoidai yra efektyvūs antimikrobiniai agentai prieš meticilinui atsparų *Staphylococcus aureus*, o CBD iš visų kanabinoidų pasižymi geriausiu antimikrobinu veikimu [46]. Taip pat CBD pasižymi itin naudingomis savybėmis CNS (žr. 8 pav.) [33].



8 pav. CBD poveikis CNS [33]

Magvairas su mokslininkų grupe atliko tyrimą su šizofrenija sergančiais pacientais. 6 savaites pacientai vartojo CBD ir lyginant su placebo grupe, buvo pastebėtas pagerėjimas. Rezultatai parodė, kad CBD teigiamai veikia šizofrenija sergančius pacientus, o jo veikimo mechanizmas nepagrįstas dopamino receptorių antagonizmu, kaip daugelio antipsichotinių vaistų. Manoma, kad CBD veikia nauju veikimo mechanizmu, kuris mokslinėje literatūroje nėra iširtas ir platesnių klinikinių tyrimų kolkas nėra atlikta [47].

Δ^9 -THCV yra C₃ šoninę grandinę turintis Δ^9 -THC homologas. Nustatyta, kad tai daug silpnesnis receptorių agonistas nei Δ^9 -THC. Kaip ir Δ^9 -THC jis pasižymi skausmą mažinančiu poveikiu. Tačiau taip pat pasireiškia ir jo katalepsinis poveikis [40], kurį galima sumažinti vartojant CB1 antagonistus [15]. Silpnesnis receptorių aktyvavimas aiškinamas trumpesne šonine anglies grandine, kadangi maksimalus receptorių aktyvavimas pasireiškia šoninėje grandinėje esant C₈ grandinei [48]. CB2 receptorių Δ^9 -THCV veikia kaip dalinis agonistas – gali šį receptorių aktyvuoti, tačiau tik iki tam tikro lygio [15]. Nustatyta, kad THCV ir CBD tinktūra gali padėti diabetu sergantiems pacientams mažinti šios ligos sukeltą svorio augimą, šis poveikis pasireiškia dėl CB1 receptorių aktyvavimo [49]. Δ^9 -THCV pasižymi neuroprotektiniu poveikiu, jis mažina motorinį slopinimą, kurį sukelia 6-hidroksidopaminas, todėl slopina Parkinsono ligos simptomus ir atitolina neurodegradaciją [50].

CBG yra nepsichoaktyvus kanabinoidas, o CB1 ir CB2 receptorių veikia kaip dalinis agonistas. CBG gali antagonizuoti neigiamą Δ^9 -THC poveikį. CBG aktyvuoja α_2 -adrenoreceptorių, blokuoja ir 5-HT_{1A} receptorių [51], mažina akispūdį ir yra potencialus vaistas glaukomai gydyti [15]. Taip

pat, pasižymi antioksidaciniu ir uždegimą mažinančiu poveikiu, tinkamas kandidatas gydyti uždegiminėms žarnyno ligoms, taip pat storosios žarnos vėžiui gydyti [45]. Pastaraisiais metais atlikto tyrimo metu iširta, kad ekstraktai turintys CBD/CBDA ir CBG/CBGA inhibuoja aldazės reduktazės aktyvumą, todėl gali būti naudojamas diabeto komplikacijų prevencijai ir gydymui [52]. CBG reguliuoja kaikurių fermentų aktyvumą: monoacilglicerolio lipazę (MAGL), N-acitetanolamido rūgšties amino (NAAA) hidrolazę, ciklooksigenazę (COX). Reguliuoja prostaglandino-E2 produkciją, ihibuoja dopaminą, norepinefriną, GABA ir serotoniną, pasižymi proliferacijos slopinimu, tinkamas gydyti kai kuriems nuotaikos sutrikimams, ypač depresijai [53]. Taip pat tyrimų metu pasižymėjo stipriu priešgrybeliniu veikimu [54].

CBC – yra vienas iš dažnai aptinkamų fitokanabinoidų, tačiau yra tik keletas darbų, kuriuose tiriamas jo farmakologinis poveikis [55]. Yra žinoma, kad tai nepsichoaktyvus fitokanabinoidas, kuris pasižymi priešuždegiminiu [56], raminančiu, nuotaiką stabilizuojančiu [57], analgetiniu [58], antibakteriniu bei priešgrybeliniu poveikiu [59]. CBC aktyvuoja TRPA1 uždegiminio proceso metu [60]. Jis stiprina bradikardiją, sukeltą Δ^9 -THC, tačiau pats bradikardijos nesukelia [37]. Dar vieno atlikto tyrimo metu nustatyta, kad CBC skatina kaulų augimą. Kadangi neurogeniniu poveikiu pasižymintis junginiai yra gana reti, atlikus daugiau tyrimų, CBC galėtų tapti svarbus gydant Alzheimerio ir kitas neurodegradacines ligas [61].

Δ^9 -THCA ir CBDA – nepsichoaktyvūs Δ^9 -THC ir CBD pirmtakai, kurie pasižymi kitokiu veikimo mechanizmu nei kiti fitokanabinoidai. Δ^9 -THCA ir CBDA neaktyvuoja CB1 ir CB2 receptorių. *In vitro* THCA gali reguliuoti dviejų TRP kanalų aktyvumą, veikdamas kaip TRPA1 agonistas ir TRM8 antagonistas. THCA taip pat inhibuoja ciklooksigenazes COX1 ir COX2. CBDA ir THCA laikomi geresne alternatyva chemoterapijos sukeltam pykinimui ir vėmimui gydyti negu Δ^9 -THC, kadangi šie kanabinoidai veikia kitokiu mechanizmu, nesukeldami psichoaktyvių ir motoriką slopinančių šalutinių poveikiu [62]. CBDA yra selektyvus COX2 inhibitorius, dėl ko pasižymi priešuždegiminiu poveikiu [63]. CBDA, kaip ir CBD gali padidinti 5-HT_{1A} receptoriaus aktyvumą *in vivo* ir *in vitro*, dėl ko ir pasireiškia vėmimą ir pykinimą slopinantis veikimas [55, 64]. CBDA taip pat pasižymi priešvėžiniu veikimu, tačiau kitaip nei CBD jis taip stipriai neveikia ląstelių proliferacijos. CBDA priešvėžinis veikimas pagrįstas kitokiu mechanizmu. Iširta, kad CBDA vienintelis iš fitokanabinoidų stabdo ne vėžinių ląstelių proliferaciją, tačiau slopina jų migraciją į kitus audinius, šis slopinimas pasireiškia ir agresyvioms krūties vėžio formoms [65].

CBDV ir CBGV blokuoja TRMP8 katijonų kanalą, taip pat gali ir aktyvuoti, ir desensibilizuoti TRPA1, TRPV1, TRPV2, TRPV3 ir TRPV4 katijonų kanalus. CBDV, tačiau ne CBGV, gali inhibuoti NAAA fermentą, kuris katalizuoja metabolinį palmitoiletanolamido degradaciją, inhibuoja DAGL α enzimą ir esant didelėms koncentracijoms inhibuoja anandamido pasisavinimą ląstelėse [55]. CBDV potencialiai gali būti naudojamas epilepsijos gydymui, pasižymi prieštraukuliniu veikimu [66].

CBN yra Δ^9 -THC nefermentinės oksidacijos produktas, galintis jungtis prie CB1 ir CB2 receptorių, kurio aktyvumas dešimt kartų mažesnis už Δ^9 -THC [67]. CBN pasižymi sedaciniu, antikonvulsiniu poveikiu tyrimuose su gyvūnais ir žmonėmis, taip pat priešuždegiminiu, antibakteriniu poveikiais. CBN laikomas potencialiu paviršinio naudojimo medikamentu, kuris slopina keratinocitų proliferaciją ir veikia nuo CBR nepriklausomu veikimo mechanizmu, todėl galėtų būti naudingas pacientams sergantiems žvyneline ar gydant nudegimus. Mokslinėje literatūroje yra pateikta

įrodymų, kad CBN gali inhibuoti nemažai fermentų: COX1 ir COX2, lipooksigenazę, ir citochromo P450 izozimus CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4, CYP3A5, CYP2A6, CYP2D6, CYP1B1 ir CYP3A7. Taip pat CBN stimuliuoja fosfolipazes, gali slopinti krūties vėžį [54]. Taip pat kaip ir Δ^9 -THC stimuliuoją apetitą anoreksija sergantiems pacientams, tačiau šis CBN poveikis daug silpnesnis nei Δ^9 -THC [68].

Apibendrinus, pagrindinis fitokanabinoidų farmakologinis poveikis ir jų sužadunami receptoriai pateikti 3 lentelėje.

3 lentelė. Fitokanabinoidų farmakologinis poveikis [15, 69].

Sutrikimas	Sutrikimą, lengvinantys fitokanabinoidai	Veikimo kelias
Skausmas	Δ^9 -THC, CBD, CBC	Periferiniai CB1 receptoriai, CB2 receptoriai, TRPV1, GPR55 ir PPARs
Išsėtinė sklerozė	Δ^9 -THC, CBD	CB1 ir CB2 receptoriai
Anoreksija	Δ^9 -THC, CBG	CB1 ir CB2 receptoriai
Pykinimas ir vėmimas	Δ^9 -THC	CB1 ir CB2 receptoriai
Opinis kolitas	CBD, CBG, CBC, Δ^9 -THCA	CB2 receptoriai
Miego sutrikimai	Δ^9 -THC, CBD	CB1 ir CB2 receptoriai
Tureto sindromas	Δ^9 -THC, CBD	CB1 ir CB2 receptoriai
Nerimas	CBD	CB2 receptoriai
Epilepsija	Δ^9 -THC, CBD, Δ^9 -THCV	CB1 ir CB2 receptoriai
Šizofrenija	CBD	CB2 receptoriai, dopamino ir serotonino receptoriai
Alzheimerio liga	Δ^9 -THC, CBD	CB1 ir CB2 receptoriai, GPR3, GPR6 ir GPR12
Parkinsono liga	Δ^9 -THC, CBD, Δ^9 -THCV	CB1 ir CB2 receptoriai
Diabetas	CBD, THCV	CB1 receptoriai
Uždegimas	CBDA, CBD, CBCA, CBC, CBGA	CB2 receptoriai,
Vėžinių ląstelių proliferacija	THCA, CBD, CBC, CBG	CB2 receptoriai ir TrpV1

1.6 Fitokanabinoidų farmakokinetika

Nors dėl nemažo teigiamo poveikio žmogaus sveikatai, medikų ir pacientų susidomėjimas fitokanabinoidais vis didėja, tačiau šiuo metu vis dar nėra atlikta užtektinai tyrimų, kad gydytojai galėtų saugiai skirti juos pacientams [70]. Tyrimus komplikuoja ir tai, kad didžioji dalis kanabinoidų medikamentų yra sudaryta ne iš vieno, bet kelių bioaktyviųjų fitokanabinoidų. Didžiausią nerimą mokslininkams kelia pluoštinėse kanapėse esantis pagrindinis psichoaktyvus kanabinoidas – Δ^9 -THC, kuris sukelia daugiausiai žinomų šalutinių poveikių fitokanabinoidus vartojantiems pacientams. Dažnai medikamentų formulotėse yra nemažas kiekis CBD – kanabinoido, kuris neturi psichoaktyvaus poveikio, gali blokuoti Δ^9 -THC organizme ir kaip jau minėta, gali būti naudojamas daugeliui ligų gydyti. Atlikta tyrimų, kad CBD organizme gali jungtis ne tik prie endokanabinoidų sistemoje esančių CB1 ir CB2 receptorių, tačiau ir prie kitų nekanabinoidų receptorių [71], todėl prieš skiriant gydymą labai svarbu išsiaiškinti tikslus šių junginių veikimo būdus. Kadangi vis dar neaiškūs tikslūs veikimo mechanizmai organizme ir jų

sąveikos su kitais medikamentaisis, norint tikslingai skirti fitokanabinoidų turinčius medikamentus pacientams, svarbu atlikti išsamesnius farmakokinetikos tyrimus.

1.6.1 Absorbcija

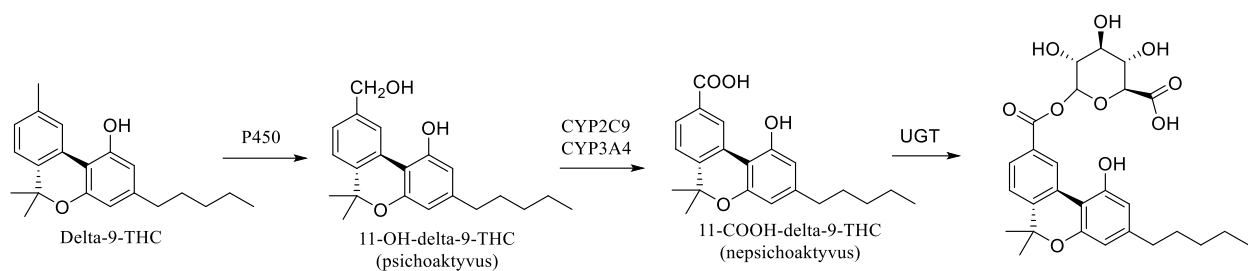
Fitoanabinoidai vartojami inhaliacijos būdu pasižymi panašia kinetika, kaip ir vartojami intraveniniu būdu [72]. Po inhaliacijos Δ^9 -THC ir CBD maksimalios koncentracijos kraujo plazmoje yra pasiekiamos greitai – po 3–10 min. Jos yra didesnės nei vartojant per burną. Δ^9 -THC biologinis prieinamumas po inhaliacijos varijuoja tarp 10 % ir 35 %, priklausomai nuo inhaliacijos charakteristikų (inhaliacijų skaičiaus, trukmės, intervalo tarp inhaliacijų, kvėpavimo sulaikymo, inhaliuojamo tūrio), pačio inhaliatoriaus ir inhaliuojamų dalelių dydžio [73]. Nustatytas CBD biologinis prieinamumas yra apie 31 % [72]. Tiek Δ^9 -THC, tiek CBD yra lipofilinės molekulės, todėl turi mažą biologinį prieinamumą vartojant per burną – apie 6 % [74]. Geriamos Δ^9 -THC ir CBD kompozicijos yra stipriai metabolizuojamos kepenyse pirminio metabolizmo metu, taip pat šie kanabinoidai dažnai degraduoja dar skrandyje [75]. Dėl šių priežasčių pasiekama mažesnė maksimali koncentracija plazmoje, lyginant su inhaliacija. Maksimali koncentracija pasiekama ir ženkliai lėčiau – per 120 min [72]. Remiantis šiais duomenimis, Δ^9 -THC ir CBD geriamosios kompozicijos galėtų būti vartojamos pacientams, kuriems reikalingas simptomų sumažinimas per ilgesnį laikotarpį [70]. Nustatyta, kad Δ^9 -THC absorbciją gerina sezamų aliejus, todėl geriamosiose kapsulėse įmaišoma jo, norint padidinti absorbciją [76]. Fitokanabinoidus į organizmą įvedant transderminiu būdu yra išvengiama pirminio metabolizmo kepenyse, tačiau kadangi fitokanabinoidai yra labai hidrofobiški jie negali difunduoti per vandens turinčius odos sluoksnius [77]. Norint išvengti pirminio metabolizmo kepenyse, buvo sukurtą keletas formuluočių Δ^9 -THC turinčių supozitorijų rektaliniam administravimui. Didžiausiu biologiniu prieinamumu pasižymėjo Δ^9 -THC ir hemisukcinato supozitorijos, kurių biologinis prieinamumas siekė 13,5 %, o tai yra du kartus daugiau negu administruojant per burną [76].

1.6.2 Pasiskirstymas

Δ^9 -THC koncentracija plazmoje po suvartojimo greitai sumažėja dėl metabolizmo kepenyse ir greito pasiskirstymo organuose. Nustatyta, kad šio fitokanabinoido koncentracija reikalinga pasiekti farmakologinį efektą yra 0,2–4,4 mg [76]. Kanabinoidai greitai pasiskirsto organuose, turinčiuose gerai išvystytą kraujagyslių sistemą – plaučius, širdį, smegenis, kepenis [78]. Nuolat vartojant, gali prasidėti fitokanabinoidų akumuliacija riebaliniuose audiniuose [70]. Manoma, kad taip galėtų būti dėl to, kad Δ^9 -THC ir jo metabolitas 11-OH-THC formuoja konjugatus su riebiosiomis rūgštimis, dėl ko padidėja Δ^9 -THC stabilumas riebaluose [76].

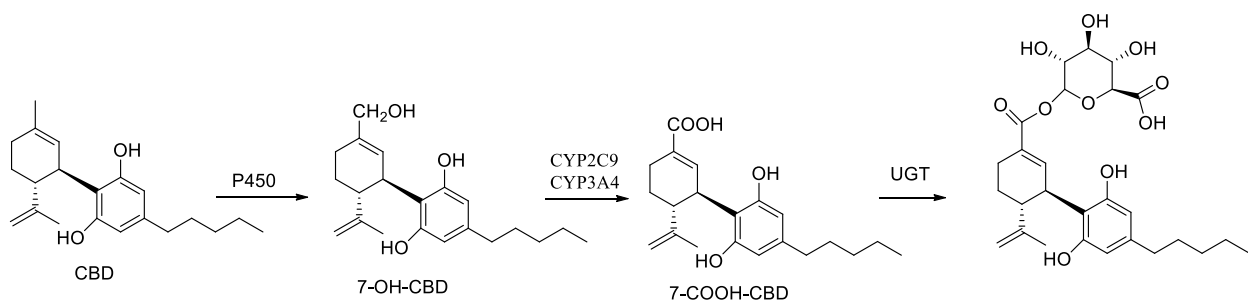
1.6.3 Metabolizmas

Literatūroje galima rasti kelių fitokanabinoidų metabolizmo organizme kelius. Δ^9 -THC metabolizmas daugiausiai vyksta kepenyse, katalizuojant citochromo P450 (CYP 450) izosimams CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4. Δ^9 -THC metabolizuojamas į 11-OH-THC ir 11-COOH-THC, paskui vyksta jo gliukouronizacija katalizuojant fermentui gliukuroniltransferazei (UGT) ir metabolitas pašalinamas su išmatomis ir šlapimu (žr. 9 pav.) [74]. Δ^9 -THC metabolizmas taip pat vyksta audiniuose, kuriuose vyksta CYP450 raiška: plonojoje žarnoje ir smegenyse. Δ^9 -THC metabolitas 11-OH-THC taip pat yra psichoaktyvus [70].



9 pav. Δ^9 -THC metabolizmo žmogaus organizme schema

CBD taip pat yra metabolizuojamas kepenyse, katalizuojant CYP 450 izosimams CYP2C19, CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 ir CYP2D6 [79]. Po hidroksilinimo gaunamas 7-OH-CBD, toliau CBD metabolizmo mechanizmas vyksta kaip ir Δ^9 -THC: 7-OH-CBD metabolizuojamas į 7-COOH-CBD, kuris konjuguojasi su glukurono rūgštimi, katalizuojant UGT (žr. 10 pav.). Metabolitai išskiriami su išmatomis, mažiau su šlapimu. Tačiau nepaisant to, kad CBD metabolizmo kelias organizme yra išnagrinėtas, labai mažai informacijos yra žinoma apie CBD metabolitų poveikį žmogaus organizmui [72].



10 pav. CBD metabolizmo žmogaus organizme schema

Kiti audiniai, tokie kaip smegenys, virškinimo sistema ir plaučiai taip pat gali metabolizuoti fitokanabinoidus Δ^9 -THC ir CBD, nors pagrindinis metabolizmas vyksta kepenyse. Metabolizmas ne kepenyse pastebimas tada, kai dėl ligų ar kitų priežasčių susilpnėja kepenų funkcija ir jos nebefunkcionuoja tinkamai [76].

1.6.4 Galimos sąveikos

Galimos sąveikos tarp abiejų Δ^9 -THC ir CBD, ir kiekvieno jų su kitais vaistais, vykstant fermentų inhibicijai ir indukcijai. Taip pat galimos farmakodinaminės vaisto-vaisto sąveikos [80]. Kadangi Δ^9 -THC yra endokanabinoidų receptorių agonistas, o CBD – antagonistas, CBD slopina neigiamą psichoaktyvų Δ^9 -THC poveikį, konkuruodamas su juo ir taip neleisdamas jam aktyvuoti receptorių. Δ^9 -THC inhibicijos CBD laipsnis priklauso nuo abiejų fitokanabinoidų kiekio organizme. Fitokanabinoidai skatina fermento CYP1A2 veiklą, todėl tai galėtų būti reikšminga pacientams, vartojantiems vaistus, kurie yra metabolizuojami CYP1A2, pvz.: paracetamolį ar olanzapiną [81]. Yra žinoma atvejų, kai fitokanabinoidai vartojami kartu su Fluoksatinu sukelia maniją, o vartojami kartu su vaistu Disulframu – kliesesius ir hipomaniją, tačiau šių sąveikų mechanizmai nėra aiškūs [70]. *In vitro* tyrimai parodė, kad CBD inhibuoja *P*-glikoproteinų reguliuojamą vaistų transportą. Į tai reiktų atkreipti dėmesį kartu su CBD skiriant vaistus [82]. Taip pat *in vitro* tyrimuose paaiškėjo, kad CBD yra fermento CYP2C19 inhibitorius [83]. Šis fermentas verčia vaisto klobazamo aktyvumą

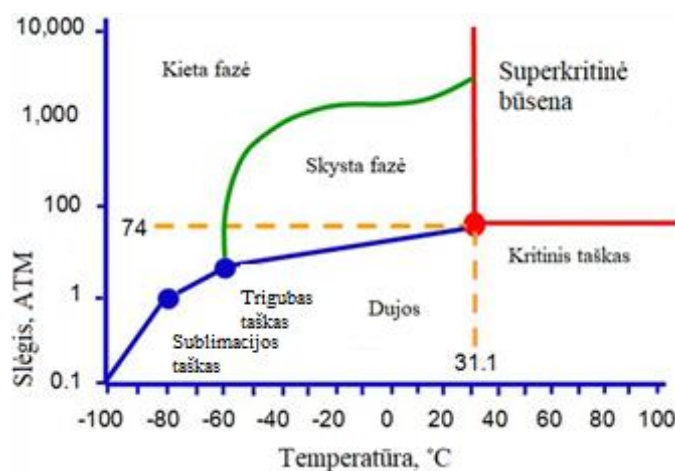
metabolitą į neaktyvų, todėl vartojant klobazamą ir CBD kartu, klobazamo aktyviojo metabolito koncentracija kraujo plazmoje gali padidėti, o dėl to gali didėti ir vaisto aktyvumas, gali atsirasti papildomų šalutinių poveikių [84].

1.7 Bioaktyvių junginių išskyrimas iš *Cannabis sativa* L. žaliavos

Bioaktyviems junginiams išskirti iš *C. sativa* augalinės žaliavos šiuo metu dažniausiai naudojama ekstrakcija superkritiniu anglies dvideginiu. Superkritinės ekstrakcijos (SFE) panaudojimas maisto, kosmetikos ir farmacijos pramonėje ženkliai išaugo pastaraisiais metais. Šiuo būdu išskiriant bioaktyvias medžiagas gaunamos ekstraktų išeigos, kurios prilygsta nepoliškais organiniais tirpikliais gaunamoms išeigoms. Tačiau SFE, lyginant su ekstrakcija organiniais tirpikliais, turi keletą pranašumų. Ekstrakcijai naudojamas tirpiklis yra netoksiškos, nedegus, nesukelia korozijos, pigus, kadangi lengvai pagaminamas pramoniniu mastu [85]. SFE-CO₂ laikoma ekologiška („žaliąja“) technologija, kuri galėtų reikšmingai pakeisti lipofiliškų bioaktyvių junginių ekstrakciją organiniais tirpikliais. Taip pat abu ekstrakcijos metodus galima derinti tarpusavyje, siekiant geriau išekstrahuoti įvairių savybių medžiagas. Kadangi ekstrakcijų metu yra naudojamos neaukštos temperatūros, išvengiama karščiui neatsparių junginių skilimo, todėl gaunamas kokybiškesnis ekstraktas. Taip pat dėl žemų temperatūrų sumažėja energijos sąnaudos [86].

Ekstrakcija paremta superkritinio CO₂ savybėmis. Superkritinė būseną pasiekama viršijus medžiagos kritinio slėgio ir temperatūros tašką. Kritine temperatūra yra vadinama tokia temperatūra, kurioje dujos nebegali pereiti į skystą fazę jų papildomai nesuslėgus. Kritiniu slėgiu vadinamas minimalus slėgis, kuriame dujos pereina į skystą fazę, jų kritinėje temperatūroje. Superkritiniai skysčiai pasižymi tiek dujinės tiek ir skystosios fazės fizikinėmis savybėmis, t.y. vienu metu elgiasi ir kaip dujos ir kaip skysčiai. Superkritinis skystis pasižymi dujinėmis savybėmis, kadangi jis užpildo ir įgauna celės, kurioje yra patalpintas formą, molekulių judėjimas šioje būsenoje yra panašus į judėjimą dujinėje būsenoje. Kita vertus, superkritinio skysčio tankis panašus į skystoje būsenoje esančios medžiagos, todėl jame gali ištirpti įvairūs augaluose esantys junginiai. Taigi, savo dujas primenančiomis savybėmis superkritinis CO₂ užpildo celę su žaliava ir po ją pasiskirsto, o dėl skystos fazės savybių geba išekstrahuoti junginius iš žaliavos [87].

Superkritinė būseną geriau paaiškinama idealių fazių diagrama (žr. 11 pav.). Diagramoje matyti, kad esant tam tikram slėgiui ir temperatūrai medžiaga gali būti kietoje, skystoje ir dujinėje fazėje. Kreivės, kuriose dvi fazės egzistuoja kartu (kieta-dujinė, kieta-skysta ir skysta-dujinė) riboja fazių regionų plotus. Taip pat kreivėse atidėti taškai, kurie žymi pokytį iš vienos fazės į kitą: kietos fazės sublimacijos taškas, kietos medžiagos lydimosi taškas ir trigubas taškas, kuriame visos trys fazės yra pusiausvyroje. Tam tikroje temperatūroje ir slėgyje egzistuoja kritinis taškas. Po šio taško nesvarbu kiek didinsime temperatūrą ar slėgį medžiaga nebegali iš skystos fazės pereiti į dujinę ir atvirkščiai, tai jau yra superkritinis skystis [87]. CO₂ dujoms šis kritinis taškas yra esant 31,1 °C temperatūrai ir 74 atm slėgiui.



11 pav. CO₂ būsenos priklausomybė nuo slėgio ir temperatūros [87]

Atlikus ekstrakciją, pagrindiniai fitokanabinoidai yra savo rūgštinėse formose, kurios pasižymi ne taip stipriai išreikštu farmakologiniu aktyvumu, kaip neutralūs fitokanabinoidai. Dėl šios priežasties reikia atlikti dekarboksilinimo procesą. Jį lemia trys veiksniai: kaitinimas, sandeliavimo trukmė ir šarminė aplinka, iš kurių dažniausiai naudojama terminė degradacija. Galima vykdyti ir pačios žaliavos dekarboksilinimą, tačiau tada eteriniai aliejai taip pat pašalinami iš žaliavos. Tada atliktus SFE-CO₂, ekstrakto fitokanabinoidai bus nebe rūgštinėse, o neutraliose formose, jie yra nepoliniai ir juos taip pat galima išekstrahuoti naudojant CO₂. Ekstrakte taip pat lieka didelis kiekis vašku, kuriuos pašalinti galima atlikus taip vadinamą vinterizavimo procesą. Procesas vykdomas ekstraktą ištirpinus organiniame tirpiklyje, dažniausiai *n*-heksane, etanolyje ar metanolyje ir patalpinus į žemą temperatūrą (žemiau 0 °C), tada sustingę vaškai yra lengvai nufiltruojami ar kitaip pašalinami iš ekstrakto, o organinis tirpiklis nugarinamas. Dalis fitokanabinoidų iš ekstrakto yra pašalinami kartu su vaškais, tačiau pašalinus vaškus padidėja fitokanabinoidų išeiga ekstrakto [88].

1.8 *Cannabis sativa* fitokanabinoidų analizė

Fitokanabinoidų kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui dažniausiai yra naudojami instrumentinės analizės metodai. Dujų chromatografija (GC), efektyvioji skysčių chromatografija (HPLC), ultra efektyvioji skysčių chromatografija (UPLC) – tai dažniausiai naudojamos instrumentinės analizės sistemos taikomos fitokanabinoidų analizei [89].

GC yra junginių, kurie nesuyra garavimo metu, mišinio komponentų išskirstymo į individualius junginius metodas. Kolonėlėje, kurioje yra poringa stacionari fazė, mišinio komponentai juda dujų sraute. Mišinio analites nešančiosios dujos turi būti inertinės, dažniausiai yra naudojamas helis. Analizių atskyrimas vyksta dėl nevienodo mišinio komponentų giminingumo kolonėlėje esančiai stacionariai fazei. Skirtingu giminingumu pasižymintys komponentai yra sulaikomi stacionarioje fazėje. Kuo didesnis giminingumas, tuo mišinio komponentai yra ilgiau joje užlaikomi. Mažiau giminingi mišinio komponentai iš analitinės kolonėlės pašalinami greičiau. Taip vyksta mišinio komponentų chromatografinis išskirstymas [90]. GC su liepsnos jonizacijos detektoriumi (FID) ar masių spektrometrija (Ms) dažnai naudojami analizuoti pluoštinėms kanapėms ir jų produktams [91]. Tai greitas, paprastas ir jautrus metodas nustatyti bendram kanabinoidų kiekiui (neutralios ir rūgštinės formos suma), tačiau šiuo metodu negalima analizuoti natūraliai žaliavoje esančių rūgštinių fitokanabinoidų formų. Analizuoti fitokanabinoidus rūgštinėse formose galima jeigu yra atliekama derivatizacija, kadangi GC analizės metu dėl mėginio išgarinimo naudojamos aukštos

temperatūros ir vyksta šių rūgščių dekarboksilinimas [89]. Derivatizacija – tai yra cheminis junginių modifikavimas, kurio metu gaunami junginiai tinkami GC tyrimui [90], pvz.: norint išvengti rūgščių dekarboksilinimo fitokanabinoidų derivatizacijos metu ruošiami trimetilsililo (TMS) esteriai [89]. Derivatizacija taip pat gali būti atliekama ir fitokanabinoidams neutraliose formose, taip norint padidinti jų lakumą. Tačiau tai yra papildomas analizės etapas, kuris prailgina analizę ir reikalauja daugiau sąnaudų.

LC – tai yra nelakių arba didelės molekulinės masės junginių skirstymo technologija, kurioje judrioji fazė yra ne dujos, o skystis, o stacionari fazė skystoji arba kietoji [90]. Dažnai stacionari fazė yra kietoji – stipriai porėta medžiaga, kurioje dėl giminingumo užsilaiko mišinio komponentai. Dažniausiai naudojamos sistemos fitokanabinoidų analizei: HPLC ir UPLC. HPLC ir UPLC leidžia analizuoti fitokanabinoidus tiek rūgštinėse, tiek neutraliose formose be derivatizacijos [91], kadangi analizės metu nereikalinga aukšta temperatūra, todėl nepakinta šių junginių struktūra. Vienas iš didžiausių HPLC minusų – nepakankamas fitokanabinoidų atskyrimas, dėl sudėtingos *C. sativa* cheminės sudėties ir dėl fitokanabinoidų panašios cheminės prigimties, smailės dažnai persidengia [89]. Dažniausiai analizei naudojamos atvirkščių fazių kolonėlės. Paprastai detekcijai naudojami DAD arba Ms/Ms detektoriai [91]. UPLC analizės privalumai – didesnis jautrumas ir atskyrimas, trumpesnis analizės laikas dėl naudojamų kolonėlių, kurių dalelių dydis 2 μm ir mažesnis. Dėl didesnio jautrumo ir geresnio atskyrimo UPLC sistemos dažnai naudojamos kriminalinėje chemijoje, fitokanabinoidų ir jų metabolitų nustatymui biologiniuose skysčiuose (šlapime, kraujyje, seilėse) [89].

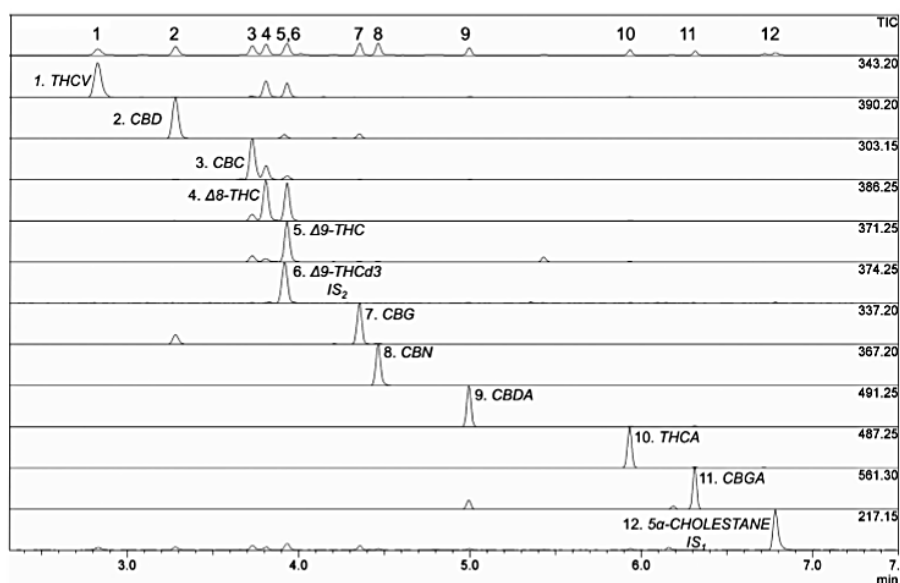
Skysčių chromatografijos metodų vystymas susideda iš optimalių sąlygų (tinkama stacionari fazė, mobili fazė, temperatūra, pH, mobilios fazės gradientas ir t.t.) paieškos, kurioms esant fitokanabinoidų mišinį pavyktų išskirstyti į individualius junginius. Dėl fitokanabinoidų panašios cheminės prigimties, dažnas reiškinys LC ir GC yra pikų persidengimas, todėl metodo vystymas yra varginantis ir reikalaujantis daug laiko [92].

Didėjant fitokanabinoidų paklausai rinkoje ir vis dar esant daug neaiškių klausimų šioje srityje, yra reikalingi plačiai pritaikomi, jautrūs, kokybinei ir kiekybinei analizei tinkami chromatografiniai metodai, kurie galėtų būti pritaikomi tiek produktų, savo sudėtyje turinčių fitokanabinoidų, tiek įvairiems moksliniams tyrimams šioje srityje. Šiuo metu mokslinėje literatūroje galima rasti keletą tokių metodų, tačiau taip pat dalis šių metodų dažnai yra nepakankamai jautrūs ir/arba jas negalima pilnai atskirti fitokanabinoidų, taip pat kai kurie yra sunkiai pritaikomi dėl naudojamų sudėtingų analizės instrumentų.

1.9 Fitokanabinoidų dujų chromatografijos analizės metodai

Literatūroje yra aprašyta keletas GC metodų fitokanabinoidų analizei. Kardenija su bendraautorium [93] siekė sukurti naują metodą pagrindinių pluoštinėse kanapėse esančių fitokanabinoidų tyrimams su GC-MS sistema. Kad būtų išvengiama rūgščių dekarboksilinimo ir jas būtų galima aptikti su dujų chromatografija, pirmiausia buvo atlikta jų derivatizacija. Buvo atliktos dvi derivatizacijos reakcijos: metilinimas ir sililinimas. Tyrimui buvo naudojama Restek RTX 5 kolonėlė (10 m ilgio × 0,1 mm vidinio skersmens × 0,1 μm stacionarios fazės sluoksnio storio), nešančiosios dujos – helis. Termostato temperatūrinė programa: nuo 180 °C iki 250 °C temperatūra keliama 10 °C/min greičiu, tada keliama iki 350 °C temperatūros, 60 °C/min greičiu, ši temperatūra laikoma pastovia 5 min. Mėginio įleidimo temperatūra – 300 °C. Bendras analizės laikas apie 14 min. Apačioje pateiktoje

chromatogramoje matyti, kad šiuo metodu nepavyko pasiekti 5 ir 6 numeriu pažymėtų fitokanabinoidų atskyrimo (žr. 12 pav.).



12 pav. Fitokanabinoidų GC-MS chromatograma [93]

Kiekybiniam pagrindinių kanabinoidų, *C. sativa* aptinkamų didžiausiomis koncentracijomis (Δ^9 -THC, CBD ir CBN) nustatymui įvairiuose produktuose: aluje, pastilėse, aliejuje ir t.t. buvo validuotas GC-MS metodas. Chromatografinis mišinio komponentų atskyrimas pasiektas su HP-5MS kolonėle (30 m ilgio \times 0,25 mm vidinio skersmens \times 0,25 μ m stacionarios fazės sluoksnio storio). Inžektoriaus temperatūra – 260 $^{\circ}$ C, jonų šaltinio temperatūra – 230 $^{\circ}$ C, kvadrupolio temperatūra – 150 $^{\circ}$ C. Termostato temperatūrinė programa: pradinė temperatūra 120 $^{\circ}$ C, šioje temperatūroje sulaikoma 2 min, temperatūra keliama 20 $^{\circ}$ C/min greičiu iki 290 $^{\circ}$ C, šioje temperatūroje sulaikoma 10 min. Mėginio įpurškimo srauto pasiskirstymas – 1/15, spektras buvo fiksuojamas masės intervale 40 – 550 M. Δ^8 -THC buvo naudojamas kaip vidinis standartas. Bandiniai derivatizuoti su MSTFA-2 % TMCS. Δ^9 -THC LOQ – 1.0 ng/g, CBD LOQ – 2 ng/g [94].

Hazekampas su mokslininkų grupe [95] taip pat aprašė metodą 9 fitokanabinoidams analizuoti su GC-MS sistema. Chromatografiškai buvo atskirti šie fitokanabinoidai: Δ^9 -THC, Δ^9 -THC-C₄, Δ^8 -THC, THCV, CBD, CBN, CBG, CBC ir CBL. Analizė atlikta lyginant dvi kolonėles – pusiau polinę HP-50+ ir nepolinę DB-1. Fitokanabinoidus pavyko atskirti su abiejomis kolonėlėmis. Naudota termostato temperatūrinė programa: nuo 100 $^{\circ}$ C iki 280 $^{\circ}$ C temperatūra keliama 10 $^{\circ}$ C/min greičiu ir laikoma pastovia 30 min. Δ^9 -THC buvo naudojamas kaip vidinis standartas nustatyti kanabinoidų elucijos laikus. Kadangi prieš mėginio injekciją derivatizacija neatlikta, negalima aptikti fitokanabinoidų rūgštinių formų.

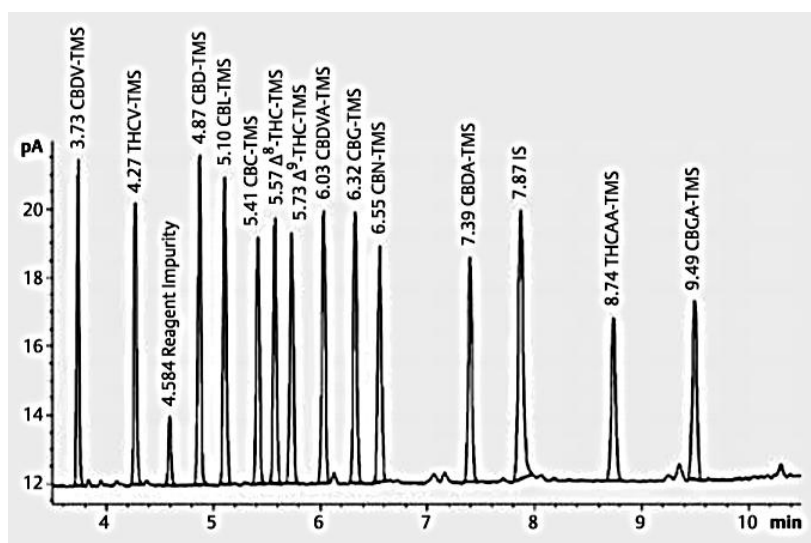
2016 metais dar viena mokslininkų grupė publikavo metodą su GC-FID sistema, kuris buvo skirtas nelegaliems *C. sativa* produktams analizuoti. Chromatografinis atskyrimas buvo pasiektas su DB-1MS kolonėle (15 m ilgio \times 0,25 mm vidinio skersmens \times 0,25 μ m stacionarios fazės sluoksnio storio), inžektoriaus temperatūra – 240 $^{\circ}$ C, detektoriaus temperatūra – 270 $^{\circ}$ C, įleidžiamo mėginio tūris – 1 μ l, termostato temperatūrinė programa: pradinė temperatūra – 170 $^{\circ}$ C, ši temperatūra laikoma pastovia 1 min, tada temperatūra iki 250 $^{\circ}$ C keliama 10 $^{\circ}$ C/min greičiu, ir laikoma pastovia 3 min. Visos analizės trukmė – 12 min. 4-androsteno-3,17-dionas buvo naudojamas kaip vidinis

standartas. Metodas tinkamas identifikuoti ir kokybiškai nustatyti 7 fitokanabinoidus: Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBD, CBC, CBG, CBN ir CBL [89].

Dar vienas GC-FID metodas buvo validuotas Brazilijoje, Δ^9 -THC, CBD ir CBN kiekybiniam nustatymui. Chromatografinis atskyrimas buvo pasiektas su HP-5 lydyto silikagelio kolonėle (30 m ilgio \times 0,32 mm vidinio skersmens \times 0,25 μ m stacionarios fazės sluoksnio storio), inžektoriaus temperatūra – 270 $^{\circ}$ C, detektoriaus temperatūra – 280 $^{\circ}$ C, termostato temperatūrinė programa: 150 $^{\circ}$ C temperatūra laikoma pastovia 1 min, tada temperatūra keliami 15 $^{\circ}$ C/min greičiu iki 250 $^{\circ}$ C, ši temperatūra laikoma pastovia 13 min. Šis gana paprastas GC-FID metodas yra skirtas nustatyti, kuriam *Cannabis Sativa L.* fenotipui priskiriama žaliava t.y. pluoštinei ar narkotinei [96].

Vatanabė su mokslininkų grupe [97] sukūrė GC-FID metodą Δ^9 -THC, CBD, CBC ir CBN analizuoti. Chromatografinis atskyrimas pasiektas su HP-5MS kolonėle (30 m ilgio \times 0,25 mm vidinio skersmens \times 0,25 μ m stacionarios fazės sluoksnio storio). Termostato temperatūrinė programa: temperatūra keliami nuo 50 $^{\circ}$ C iki 250 $^{\circ}$ C, 6,5 $^{\circ}$ C/min greičiu. Įleidžiamo mėginio tūris – 1 μ l, mėginio įleidimo srauto pasiskirstymas prieš kolonėlę – 1/50, analizės trukmė – 30 min. Analizuojant tokiu metodu, negalima atskirti visų minėtų kanabinoidų, chromatogramose persidengia CBC ir CBD smailės.

Mokslininkų komanda validavo dar vieną GC-FID metodą, skirtą 10 fitokanabinoidų, THCV, CBD, CBC, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBG, CBN, CBDA, CBGA ir THCA-A, kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui. Chromatogramoje (žr. 13 pav.) pateiktos ir CBDV, CBL, CBDVA smailės tik kokybiniam nustatymui pagal sulaikymo trukmę, šioms fitokanabinoidams metodas nevaliduotas. Visiems kanabinoidams prieš analizę buvo atlikta TMS derivatizacija. Atskyrimas buvo pasiektas naudojant Agilent Technologies DB-1MS (15 m ilgio \times 0,25 mm vidinio skersmens \times 0,25 μ m stacionarios fazės sluoksnio storio) kolonėlę, mėginio įleidimo srauto pasiskirstymas – 1/20, inžektoriaus temperatūra – 275 $^{\circ}$ C, detektoriaus temperatūra – 300 $^{\circ}$ C, termostato temperatūrinė programa: pradinė temperatūra – 190 $^{\circ}$ C, ji išlaikoma pastovia 1 min, tada temperatūra keliami 30 $^{\circ}$ C/min greičiu iki 230 $^{\circ}$ C, temperatūra laikoma pastovia 2 min, tada temperatūra keliami 5 $^{\circ}$ C/min greičiu iki 250 $^{\circ}$ C, ši temperatūra laikoma pastovia 1 min, toliau 20 $^{\circ}$ C/min greičiu temperatūra keliami iki 300 $^{\circ}$ C, ši temperatūra laikoma pastovia 2,75 min. Metodo trukmė – 17,5 min [98].

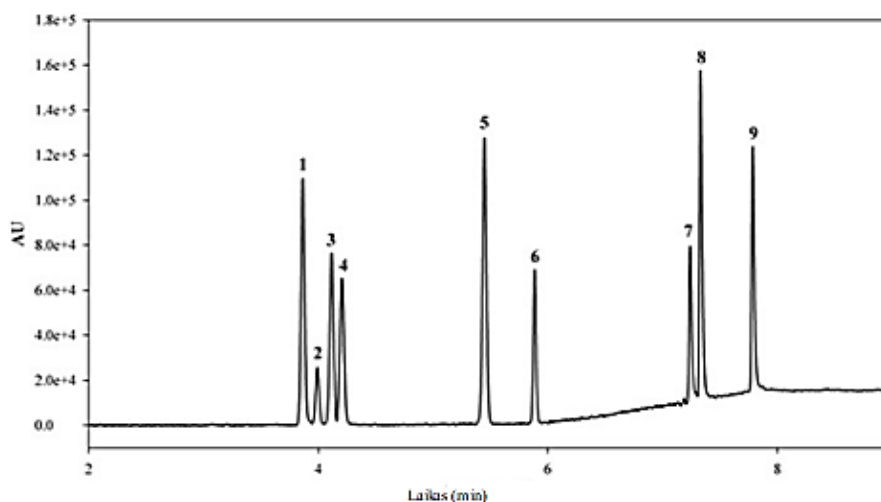


13 pav. Fitokanabinoidų GC-FID chromatograma [98]

1.10 Fitokanabinoidų analizė skysčių chromatografijos metodais

Noestedenas su mokslininkų grupe [99] atliko 11 fitokanabinoidų analizę, kurio tikslas buvo sukurti greitą, jautrų ir plačiai pritaikomą LC analitinį metodą, skirtą 11 kanapėse esančių fitokanabinoidų, tiek rūgštinėse, tiek neutraliose formose. Darbe buvo analizuojami šie fitokanabinoidai: CBGA, CBG, CBCA, CBC, Δ^9 -THCA, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBDA, CBD, CBL, CBN. Eksperimentai buvo atlikti atskirai su UPLC-DAD ir UPLC-MS/MS sistemomis. Chromatografinis atskyrimas buvo pasiektas naudojant Kintex (1,3 μm dalelių dydžio \times 50 mm ilgio \times 2,1 mm vidinio skersmens \times 100 \AA porų dydžio) kolonėlę. Geriausias atskyrimas buvo pasiektas izokratinėmis eliuicijos sąlygomis, kaip mobilią fazę naudojant 55 % acetonitrilo ir 0,1 % skruzdžių rūgšties mišinį [99].

Mei Vangas atliko 9 fitokanabinoidų, CBD, Δ^8 -THC, THCV, Δ^9 -THC, CBN, CBG, THCA-A, CBDA, CBGA analizę su ultra aukšto našumo superkritine skysčių chromatografija ir fotodiodų matricos detektoriumi ir masių spektrometrija sistema. Fitokanabinoidų atskyrimui buvo naudotas šis metodas: mobili fazė buvo sudaryta iš CO_2 (A), izopropanolio ir acetonitrilo mišinio santykiu 80:20 su 1 % vandens (B). Mobilios fazės gradientas: B nuo 4 % iki 9 % keliamas per 4,5 min, tada per 2,5 min B gradientas keliamas iki 30 % ir ši koncentracija laikoma pastovia 3 min. Tėkmės greitis – 1,4 ml/min. Kolonėlės temperatūra – 30 $^{\circ}\text{C}$. Šiuo metodu pavyko pilnai atskirti 9 fitokanabinoidus, apačioje pateikta gauta chromatograma (žr. 14 pav.) [100].

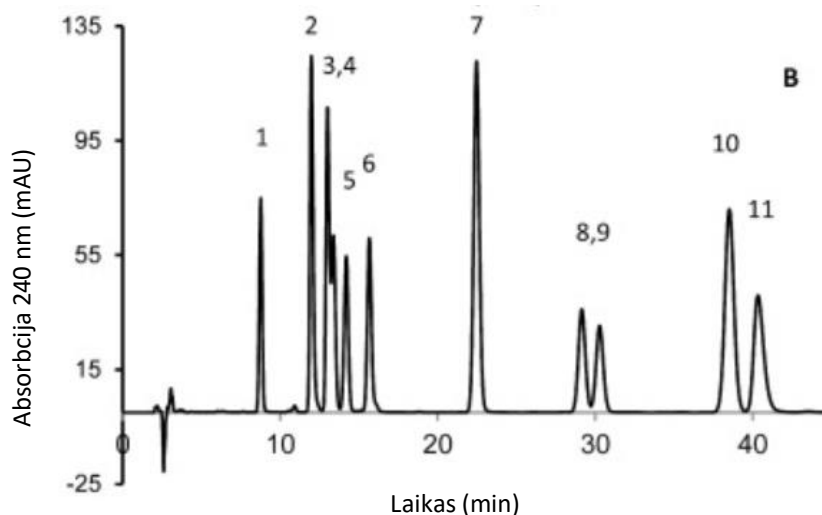


14 pav. UHPSFC/PDA (220 nm) 9 kanabinoidų standartų chromatograma: 1. CBD 2. Δ^8 -THC 3. THCV 4. Δ^9 -THC 5. CBN 6. CBG 7. THCA-A 8. CBDA 9. CBGA [100]

Dar vienas metodas buvo sukurtas su HPLC-MS/MS sistema šešiams pagrindiniams augale aptinkamiems fitokanabinoidams analizuoti: Δ^9 -THC, Δ^9 -THCA, CBD, THCV, CBG ir CBN. Chromatografinis atskyrimas buvo pasiektas su Kinetex C18 kolonėle (2,6 μm dalelių dydžio \times 30 mm ilgio \times 3 mm vidinio skersmens \times 100 \AA porų dydžio), ir apsaugine kolonėle (0,5 μm gylio filtras \times 0,1 mm). Mobilios fazės A/B gradientas (A – Milli Q vanduo su 0,1 % skruzdžių rūgštimi, B – MeOH su 0,1 % skruzdžių rūgštimi): pradžioje tirpiklio B koncentracija – 50 %, per pirmąją minutę koncentracija keliamas iki 80 %, šioje koncentracija laikoma pastovia, kol pasiekiamas 11 min, per kitas 2 min, koncentracija keliamas iki 95 % ir laikoma pastovia iki 16 min, per 2 min B koncentracija sumažinama iki 50 % ir ši koncentracija palaikoma iki 28 min. Tėkmės greitis – 0,25 ml/min, kolonėlės temperatūra – 30 $^{\circ}\text{C}$, įleidžiamo mėginio tūris – 10 μl , metodo trukmė – 28 min [101].

Dar viena mokslininkų grupė validavo metodą penkių kanabinoidų CBD, CBDA, THC, THCA ir CBN kokybiniam ir kiekybiniam nustatymui su skysčių chromatografija masių spektrometrija ir jonų gaudyklės sistema. Chromatografinis atskyrimas buvo pasiektas su Hypersil BDS kolonėle (150 mm ilgio × 2,1 mm vidinio skersmens × 3 μm dalelių dydžio). Mobilioji fazė buvo sudaryta iš tirpiklių A ir B. Tirpiklis A sudėties – 10 mM amonio acetato ir 0,2 % skruzdžių rūgšties metanolyje, tirpiklio B – 10 mM amonio acetato ir 0,2 % skruzdžių rūgšties vandenyje. Mobilios fazės A/B gradientas: 0 min – 0,5 min intervale tirpiklio A koncentracija – 60 %, 0,5 min – 1 min intervale A koncentracija keliama iki 80 %, ir laikoma pastovia iki 21 min, 21 min – 21,5 min A koncentracija keliama iki 95 %, ši koncentracija laikoma pastovia 7 min, 28 min koncentracija mažinama iki 60 %, tada 6 min skiriamos instrumento stabilizacijai iki kito mėginio įleidimo. Srauto tekės greitis – 0,2 ml/min, įleidžiamo mėginio tūris – 10 μl, kolonėlės temperatūra – 30 °C, automatinio bandynių įleidimo mechanizmo temperatūra – 10 °C [102].

Laura A. Čiolino sukūrė HPLC-DAD metodą vienuolikai kanabinoidų: CBD, CBDA, Δ⁹-THC, Δ⁹-THCA, CBN, Δ⁸-THC, Δ⁸-THCA, CBG, CBGA, CBDV, THCV. Atskyrimas buvo komplikotas tarp dviejų kanabinoidų porų: CBD ir CBG (junginiai skiriasi šoniniu fenilo radikalu, CBG – atvira fenilo žiedo šoninė grandinė, CBD – uždaras fenilo žiedas), Δ⁹-THC ir Δ⁸-THC (dvigubojo ryšio pozicijos izomerai). Atskyrimas buvo pasiektas su MacMod ACE 5 C18-AR analitine kolonėle (250 mm ilgio × 4,6 mm vidinio skersmens × 5 μm dalelių dydžio), mobilios fazės sudėtis: A – 66:34 ACN su 0,5 % acto rūgštimi (pH 2,9), B – 83:17 MeOH su 50 mM citrato (pH 4,2). Įleidžiamo mėginio tūris – 25 μl, srauto tekės greitis – 1 mL/min, metodo trukmė – 50 min, kanabinoidų chromatograma gali būti registruojama keliuose bangos ilgiuose: 220 nm, 240 nm, 270 nm ir 307 nm. Pateikta chromatograma registruota 240 nm (žr. 15 pav.). Matyti, kad nors ir pavyko atskirti prieš tai minėtas problemines poras, yra matomas kitos poros smailių persidengimas – CBG ir CBGA [103].



15 pav. Kanabinoidų chromatograma su HPLC-DAD: 1 – CBDV, 2 – CBDA, 3 – CBGA, 4 – CBG, 5 – CBD, 6 – THC, 7 – CBN, 8 - Δ⁹-THC, 9 - Δ⁸-THC, 10 – CBC, 11 - Δ⁹-THCA [103]

1.11 Literatūros apžvalgos apibendrinimas

C. sativa – žolinis augalas, jau nuo senų laikų vertinamas dėl savo farmakologinių savybių ir plataus panaudojimo medicinoje. Kanapių sėklos vertinamos dėl savo maistingumo, o lapuose ir

žieduose kaupiami įvairūs sveikatai naudingi junginiai – flavanoidai, terpenoidai, kumarinai ir t.t. Šiuo metu bene didžiausio dėmesio sulaukia lapų trichomose kaupiami fitokanabinoidai. Dažniausiai įvardijami fitokanabinoidų farmakologiniai poveikiai yra skausmo malšinimas, nerimo slopinimas, miego sutrikimų gydymas, pykinimo ir vėmimo slopinimas, sedacija, traukulių slopinimas, priešūždegiminės ir imunomoduliacinės savybės, kanabinoidai potencialiai gali gydyti Alzheimerio ligą, šizofreniją, Tureto sindromą. Visi šie poveikiai yra susiję su 20 a. pabaigoje atrasta endokanabinoidų sistema organizme, kurią sudaro CB1 ir CB2 receptoriai ir šių receptorių endogeniniai ligandai. Prie šių receptorių jungdamiesi fitokanabinoidai gali reguliuoti atitinkamas organizmo funkcijas ir taip sukelti farmakologinį poveikį. Dėl pluoštinėse kanapėse esančių psichoaktyvių junginių labai svarbu išanalizuoti *C. sativa* ekstraktų ar produktų sudėtį, tokiai analizei plačiausiai naudojama GC ir LC. GC metodais negalima analizuoti fitokanabinoidų rūgštinėse formose, kadangi aukštoje temperatūroje vyksta rūgščių dekarboksilinimas. Dujų chromatografija nustatomas suminis kanabinoidų kiekis. LC nereikalauja aukštos temperatūros, todėl kokybiškai ir kiekybiškai galime nustatyti ir rūgštis. Atlikus literatūros analizę rasti iki šiol sukurti ir validuoti fitokanabinoidų GC ir LC analizės metodai. Pastebėta, kad dalis šių metodų turi trūkumų. Tai patvirtina, kad šiuo metu vis dar yra aktualu ieškoti naujų efektyvių ir selektyvių rutininės kokybinės ir kiekybinės fitokanabinoidų analizės metodų.

2. Medžiagos ir tyrimų metodai

2.1 Tyrimo objektas

Tyrimo objektas – pluoštinės kanapės ir jose kaupiami fitocheminiai bioaktyvūs junginiai – fitokanabinoidai. Atliekamas fitokanabinoidų chromatografinių metodų optimizavimas ir jų palyginimas tarpusavyje. Analizuojami individualių fitokanabinoidų analitiniai standartai ir ekstraktai išskirti iš *C. sativa* žaliavos SFE-CO₂. Analizei naudoti trys SFE-CO₂ *C. sativa* ekstraktai, kuriuos tyrimams perdavė UAB „Borela“, kuri šiuo metu pakeitė pavadinimą į Aurora Hemp (žr. 16 pav.). Ekstraktai iki analizės buvo laikomi šaldytuve, sandariai uždarytose talpyklėse.



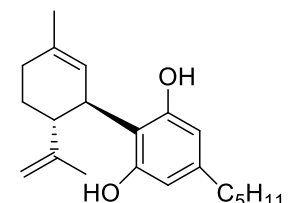
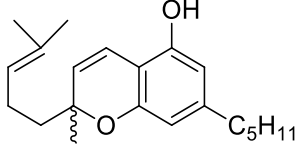
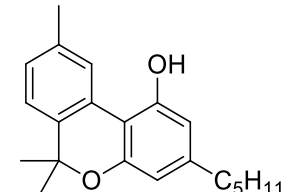
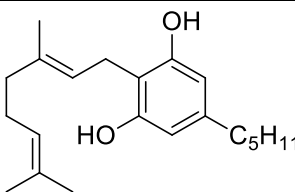
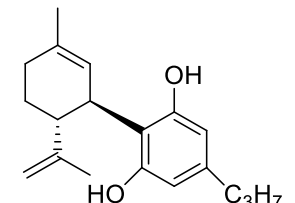
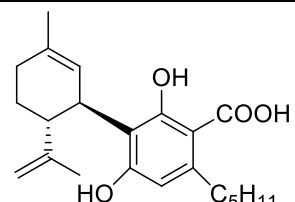
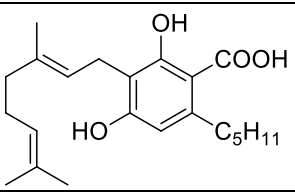
16 pav. Darbe analizuoti ekstraktai gauti SFE-CO₂ būdu iš *C. sativa* augalinės žaliavos

2.2 Naudotos medžiagos

Visi tirpikliai, analitiniai standartai ir kitos naudotos medžiagos, jeigu nenurodyta kitaip, buvo įsigytos iš komercinių tiekėjų ir papildomai negrynintos:

- >99,9 % grynumo acetonitrilas, HPLC analizei įsigytas iš HoneyWell (JAV),
- >99,9 % grynumo metanolis, HPLC analizei įsigytas iš Sigma Aldrich (JAV),
- išgrynintas H₂O, HPLC analizei išsigytas iš Sigma Aldrich (JAV),
- aukšto švarumo helio dujos, GC analizei išsigytos iš AGA GAS AB (Švedija),
- metanolis vašku pašalinimui iš ekstraktų išsigytas iš Eurochemicals (Lietuva),
- izopropanolis balastinių medžiagų pašalinimui iš ekstraktų išsigytas iš Eurochemicals (Lietuva),
- skystas azotas GC sistemos šaldymui, išsigytas iš AGA GAS AB (Švedija),
- ortofosforo rūgštis 85 % HPLC mobiliai fazei įsigyta iš Sigma Aldrich (JAV),
- >99,9 % grynumo analitiniai fitokanabinoidų standartai: CBD, CBG, CBDV, CBC, CBN 1 mg/ml koncentracijos metanolyje ir CBDA, CBGA 1 mg/ml koncentracijos acetonitrile, įsigyti iš Sigma Aldrich (JAV) (žr. 4 lentelė).

4 lentelė. Darbe analizuoti fitokanabinoidai

	Empirinė formulė	Molinė masė	Struktūrinė formulė
CBD	$C_{21}H_{30}O_2$	314,464 g/mol	
CBC	$C_{21}H_{30}O_2$	314,46 g/mol	
CBN	$C_{21}H_{26}O_2$	310,4319 g/mol	
CBG	$C_{21}H_{32}O_2$	316,48 g/mol	
CBDV	$C_{19}H_{26}O_2$	286,4 g/mol	
CBDA	$C_{21}H_{30}O_2$	314,464 g/mol	
CBGA	$C_{22}H_{32}O_4$	360,49 g/mol	

2.3 Mėginių paruošimas

2.3.1 Mėginiai kalibracinėms kreivėms

GC-FID kalibracinėms kreivėms sudaryti, individualūs CBDV, CBD, CBN analitiniai standartai buvo skiedžiami >99,9% analitinio grynumo acetonitrilu, 0,005 mg/ml – 0,1 mg/ml koncentracijų intervale: iš kiekvieno 1 mg/ml fitokanabinoido analitinio standarto tirpalo gaminami šių koncentracijų skiediniai: 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,005 mg/ml. CBG kalibracinė kreivė buvo ruošiama 0,025 mg/ml – 0,1 mg/ml koncentracijų intervale: ruošiami 0,1 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml koncentracijų skiediniai.

GC × GC-TOF/Ms kalibracinėms kreivėms sudaryti, individualūs standartai buvo skiedžiami >99,9 % analitinio grynumo acetonitrilu, 0,0125 mg/ml – 0,1 mg/ml koncentracijų intervale. Iš CBD ir CBG 1 mg/ml analitinių standartų gaminami šių koncentracijų skiediniai: 0,1 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,0125 mg/ml. Iš CBC ir CBN 1 mg/ml analitinių standartų gaminami šių koncentracijų skiediniai: 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,0125 mg/ml. Iš CBDV 1 mg/ml analitinio standarto gaminami šių koncentracijų skiediniai: 0,1 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,025 mg/ml; 0,0125 mg/ml.

HPLC-DAD kalibracinėms kreivėms sudaryti CBC, CBN, CBDV, CBDA analitiniai standartai buvo skiedžiami >99,9 % analitinio grynumo acetonitrilu, 0,0005 mg/ml – 0,1 mg/ml koncentracijų intervale. Iš kiekvieno 1 mg/ml fitokanabinoido analitinio standarto tirpalo gaminami šių koncentracijų skiediniai: 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,001 mg/ml; 0,0005 mg/ml. Individualūs CBD, CBG ir CBGA analitiniai standartai buvo skiedžiami 0,001 mg/ml – 0,1 mg/ml koncentracijų intervale. Iš kiekvieno 1 mg/ml fitokanabinoido analitinio standarto tirpalo gaminami šių koncentracijų skiediniai: 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,005 mg/ml; 0,001 mg/ml.

Kalibracinių kreivių žemiausio taško koncentracija kiekvienam individualiam fitokanabinoido standartui nustatoma eksperimentiškai, nustatius žemiausią koncentraciją, kurioje kiekvienas fitokanabinoidas yra vis dar aptinkamas detektoriaus.

CBD, CBG, CBGA, CBN ir CBC fitokanabinoidų analitiniai standartai ir visi iš jų paruošti darbiniai tirpalai bei iš *C. sativa* ekstraktų paruošti mėginiai analizuojami iš karto arba laikomi ne aukštesnėje kaip -18 °C temperatūroje ir saugomi nuo šviesos. CBDV ir CBDA fitokanabinoidų analitiniai standartai ir visi iš jų pasiruošti darbiniai tirpalai laikomi ne aukštesnėje kaip -70 °C temperatūroje ir saugomi nuo šviesos.

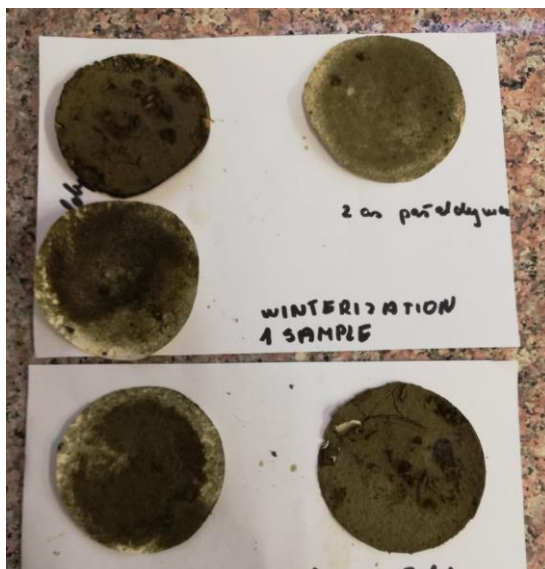
2.3.2 Mėginiai iš *Cannabis Sativa L.* ekstraktų

2.3.2.1 Ekstrakto valymas nuo balastinių medžiagų

Norint iš ekstraktų pašalinti balastines medžiagas, baltymus ir riebalus, 5 g ekstrakto tirpinama 50 ml polinio tirpiklio – izopropilo alkoholio. Gautas tirpalas filtruojamas per Biuchnerio piltuvą padengtą popieriniu filtru. Filtratas surenkamas, tirpiklis nugarinamas, gautas ekstraktas toliau naudojamas kitame valymo etape.

2.3.2.2 Vaškų pašalinimas

Vaškai iš ekstrakto pašalinami taip vadinamu vinterizavimo būdu (žr. 17 pav.). 10 g *C. sativa* ekstrakto tirpinama 100 g metanolio (santykiu 1:10) ir uždaroje stiklinėje kaitinama 50 °C temperatūroje ant magnetinės maišyklės, kol tirpiklyje ištirpsta kiek įmanoma daugiau ekstrakto. Ekstraktas šaldomas šaldymo kameroje -18 °C temperatūroje 24 valandas. Po 24 valandų mėginys nufiltruojamas per Biuchnerio piltuvą, padengtą popieriniu filtru. Filtratas surenkamas, tirpiklis nugarinamas, gaunama tamsiai žalios spalvos klampi derva.



17 pav. Vaškai, pašalinti iš *Cannabis Sativa L* ekstrakto

2.3.2.3 Vandens pašalinimas

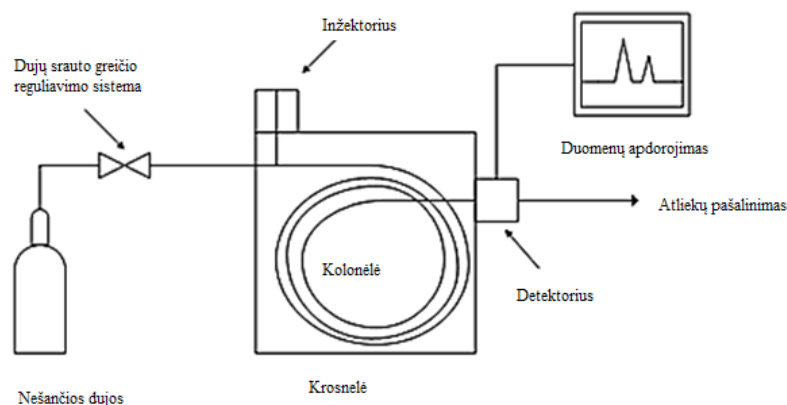
Vanduo iš ekstraktų pašalinamas liofilizuojant. Liofilizacija atliekama su MAXI Dry Lyo (Danija) liofilizatoriumi, mėginys sušaldomas skystu azotu ir tada liofilizuojamas. Proceso trukmė – 24 valandos.

Atlikus visus valymo etapus, gaminami darbiniai tirpalai ištirpinant 10 mg ekstrakto 1 ml >99,9 % acetonitrilo. Iš šių tirpalų ruošiami tirpalai analizei: GC-FID ir GC × GC-TOF/Ms analizuojami 1 mg/ml koncentracijos mėginiai, HPLC-DAD analizuojami 0,1 mg/ml koncentracijos mėginiai. Atlikus skiedimus, mėginiai gerai sumaišomi ir filtruojami per švirkštinius filtrus.

2.4. Instrumentinė analizė

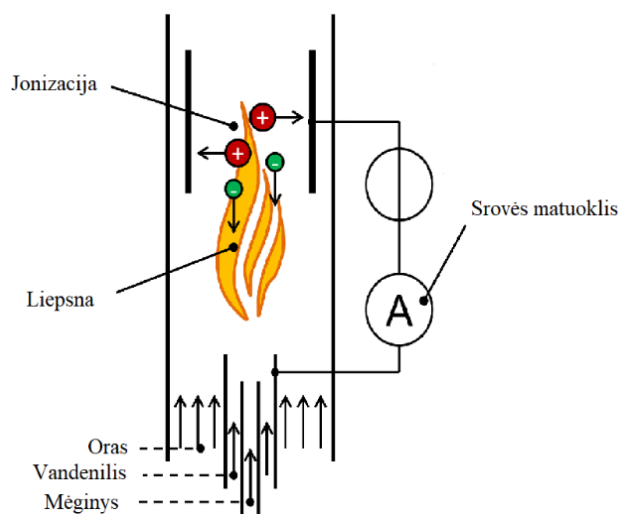
2.4.1 Dujų chromatografija su liepsnos jonizacijos detektoriumi

Individualių analitinių standartų kalibracinės kreivės ir ekstraktų kiekybinė ir kokybinė analizė atlikta Perkin Elmer Clarus500 dujų chromatografu (Shelton, USA) su liepsnos jonizacijos detektoriumi (FID). >99,9 % grynumo vandenilio dujos į GC sistemą tiekiamos iš Perkin Elmer PGXH₂ 100, 250 ml/min vandenilio dujų generatoriaus (Shelton, USA). GC sistemą sudaro nešančiųjų dujų rezervuaras su inertinėmis dujomis, dujų srauto greičio reguliavimo sistema, rankinė mėginių įleidimo sistema, termostatas su užprogramuota temperatūrine programa ir detektorius. Krosnelėje patalpinta analitinė kolonėlė, kurioje vyksta mišinio analitinių chromatografinis atskyrimas (žr. 18 pav.)



18 pav. Principinė GC schema [104]

FID viduje dažniausiai yra vandenilio ir oro pagalba sukuriama liepsna, į kurią išėję iš kolonėlės patenka mišinio komponentai. Patekę į liepsną šie mišinio komponentai oksiduojasi ir sudaro elektros krūvį turinčias daleles – jonus [84]. Norint identifikuoti šiuos jonus, detektoriuje yra įmontuoti du elektrodai, katodas ir anodas, kurie sukuria potencialų skirtumą. Teigiamas elektrodas yra įmontuotas prie purkštuko galvutės, kurioje yra sukuriama liepsna, o neigiamas elektrodas įmontuotas virš liepsnos. Judantys jonai yra surenkami, o jų sukurtas elektrinis signalas yra išmatuojamas (žr. 19 pav.) [105].



19 pav. Principinė FID schema [105]

Mišinio analičių chromatografinis atskyrimas pasiektas su Elite-5 lydyto silicio kapiliarine kolonėle, kurios stacionari fazė sudaryta iš 5 % difenilo ir 95 % dimetilpolisiloksano (30 m ilgio × 0,25 mm vidinio skersmens × 0,25 μm stacionarios fazės sluoksnio storio) (Perkin Elmer, Shelton, USA). Nešančiosios dujos – helis, įleidimo slėgis 15 psi, dujų srauto greitis – 1,3 ml/min. Detektoriaus temperatūra – 300 °C, inžektoriaus temperatūra – 260 °C, bandinio įleidimo srauto paskirstymas (*Split*) – 1/10. Įleidžiamo mėginio bandinio tūris – 1 μl. Metodo trukmė – 40 min. Optimizuota termostato temperatūrinė programa pateikta 4 lentelėje.

4 lentelė. GC-FID temperatūrinė programa

Temperatūra, °C	Temperatūros kėlimo greitis, °C/min	Pastovios temperatūros palaikymas, min
50	12	0
200	4	0
280	0	7,5

Individualių etaloninių standartų kalibracinių kreivių tiesinių priklausomybių ir kiekviena ekstraktų analizė atlikta trimis pakartojimais, ruošiant tris vienas nuo kito nepriklausomus skiedinius. Iš gautų rezultatų paskaičiuotas standartinis nuokrypis (1) ir santykinis standartinis nuokrypis (2).

$$SN = \sqrt{\frac{\sum |x - \bar{x}|^2}{n}} \quad (1)$$

$$SSN = \frac{SN}{\bar{x}} \times 100\% \quad (2)$$

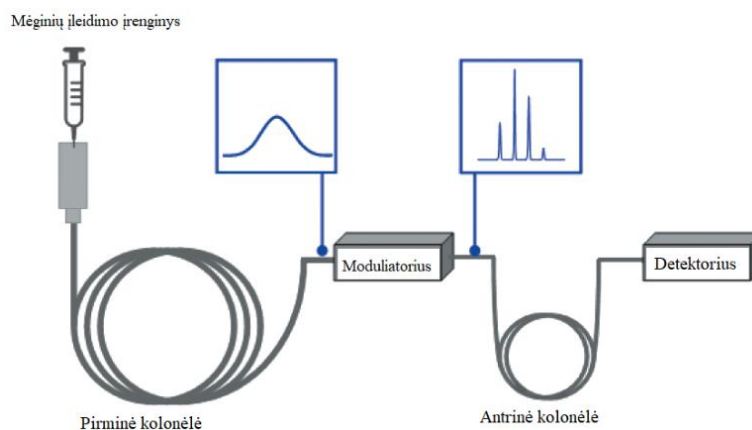
x – apibrėžia kiekvieną imties vertę ($x_1, x_2 \dots x_n$); \bar{x} – vidurkis, n – reikšmių kiekis.

Suminis CBD kiekis apskaičiuotas pagal (3) formulę.

$$CBD_{\text{suminis}} = CBD_{\text{konc.}} + (CBDA_{\text{konc.}} \times 0,877) \quad (3)$$

2.4.2 Išsamiosios dujų chromatografijos sistema su skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi

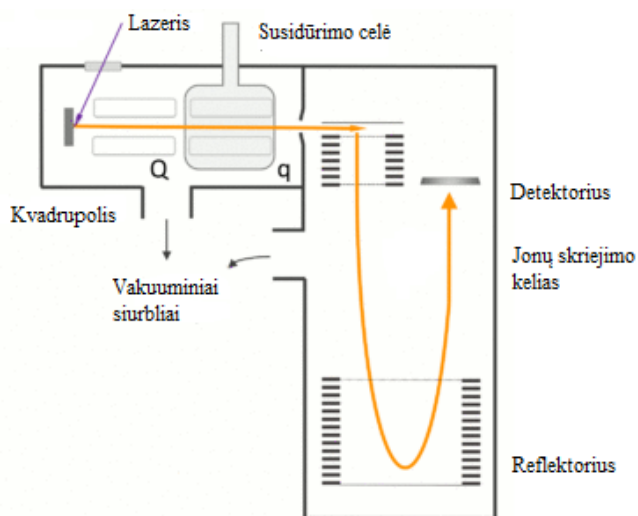
Individualių analitinių standartų kalibracinės kreivės ir ekstraktų kiekybinė ir kokybinė analizė atlikta su išsamiąja GC × GC-TOF/Ms LECO Pegasus 4D sistema, kurią sudaro Agilent 7890A GC dujų chromatografas, Gerstel MPS automatinis mėginių įleidimo įrenginys (Gerstel GmbH, Mulheim an der Ruhr, Germany), TOF/Ms detektorius (LECO, St. Joseph, MI, USA) dviejų srautų modulatorius (Zoex, Houston, TX, USA), kuris įmontuotas tarp pirminės ir antrosios kolonėlių (žr. 20 pav.).



20 pav. Principinė GC × GC schema [106]

Prie GC × GC sistemos įmontuotas TOF/Ms detektorius, kuris sudarytas iš lazerio, jonizuojančios srovės šaltinio – kvadrupolio, vakuuminių siurblių, sudarančių vakuumą sistemoje, susidūrimo su

inertinėmis dujomis celės ir jonų laisvo skiejimo kelio celės, kuriuo dėl kinetinės energijos judėdami jonai atsimuša į reflektorių ir juda link Ms detektoriaus (žr. 21 pav.).



21 pav. Principinė TOF/MS detektoriaus schema [107]

Agilent 7890A GC kameroje instaliuotos dvi analitinės kapiliarinės kolonėlės: nepolinė BPX-5 (30 m ilgio \times 0,25 mm vidinio skersmens \times 0,25 μ m stacionarios fazės sluoksnio storio) (SGE Analytical Science, Australia), kurios stacionari fazė sudaryta iš 5 % fenilo polisilfenileno-siloksano ir polinė BPX-50 (2 m ilgio \times 0,10 mm vidinio skersmens \times 0,1 μ m stacionarios fazės sluoksnio storio), kurios stacionari fazė sudaryta iš 50 % fenilo polisilfenileno-siloksano. Nešančios dujos – helis, inžektoriaus temperatūrinė programa: nuo 120 $^{\circ}$ C iki 270 $^{\circ}$ C temperatūra keliami 10 $^{\circ}$ C/min greičiu, ši temperatūra išlaikoma pastoviai 5 min; įpurškiamo bandinio kiekis – 1 μ l. TOF/MS registravimo greitis 10 spektrų per s. Identifikuojant junginius masių diapazonas – 30550 m/z vienetų. Detektoriaus įtampa – 1550 V, jonų šaltinio temperatūra – 250 $^{\circ}$ C, mėginiai įleidžiami be srauto pasiskirstymo (*Splitless*). Dvidimencinė GC \times GC analizė buvo atliekama pasirinkus optimalų 15 s moduliacijos periodą, karštos srovės laikas – 1,25 s, atšaldymas tarp ciklų – 6,25 s, sistema šaldoma -80 $^{\circ}$ C temperatūroje su skysto azoto Therm Scientific EK90/GE šaldymo sistema. Duomenys iš GC \times GC-TOF/MS sistemos apdorojami su ChromaTOF v.4.22 programine įranga (LECO). Metodo trukmė – 40 min. Pirmosios ir antrosios kolonėlių temperatūrinės programos pateiktos 5 ir 6 lentelėse.

5 lentelė. GC \times GC-TOF/MS pagrindinės BPX-5 kolonėlės temperatūrinė programa

Temperatūra, $^{\circ}$ C	Temperatūros kėlimo greitis, $^{\circ}$ C/min	Pastovios temperatūros palaikymas, min
50	12,5	0
200	4	0
280	0	7,5

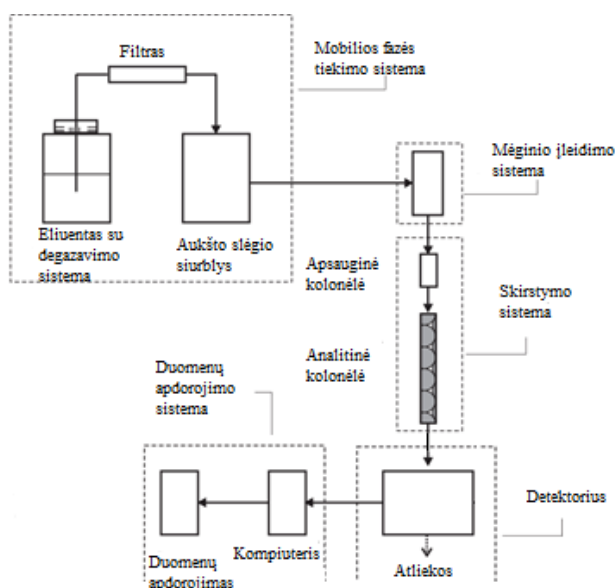
6 lentelė. GC \times GC-TOF/MS antrosios BPX-50 kolonėlės temperatūrinė programa

Temperatūra, $^{\circ}$ C	Temperatūros kėlimo greitis, $^{\circ}$ C/min	Pastovios temperatūros palaikymas, min
55	12,5	0
205	4	0
285	0	7,5

Individualių etaloninių standartų kalibracinių kreivių tiesinių priklausomybių ir kiekviena ekstraktų analizė atlikta trimis pakartojimais, ruošiant tris vienas nuo kito nepriklausomus skiedinius. Iš gautų rezultatų paskaičiuotas standartinis nuokrypis (1) ir santykinis standartinis nuokrypis (2).

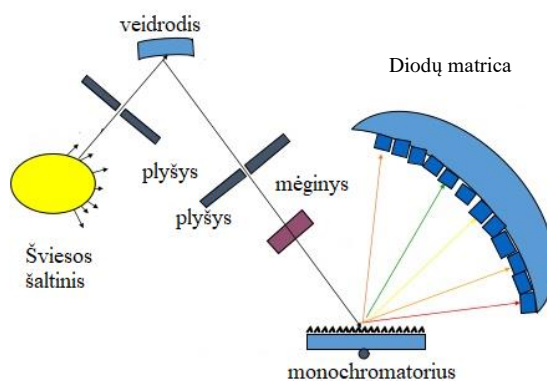
2.4.3 Efektyvioji skysčių chromatografija su diodų matricos detektoriumi

Individualių analitinių standartų kalibracinės kreivės ir ekstraktų kiekybinė ir kokybinė analizė atlikta su HPLC sistema Prominence-i LC-2030C (Shimadzu, Japonija), kurią sudaro mobilios fazės tiekimo sistema, kurioje filtruojamas ir degazuojamas eliuentas, automatinis mėginių įleidimo mechanizmas su termostatu, skirstymo sistema, kurią sudaro apsauginė ir chromatografinio skirstymo analitinė kolonėlės bei kolonėlių termostatas, kuriame atliekamos kolonėlės šildymo ir aušinimo funkcijos (žr. 22 pav.).



22 pav. Principinė HPLC sistemos schema [108]

Prie šios HPLC sistemos prijungtas ultravioletinės ir regimosios šviesos (UV-Vis) diodų matricos detektorius (DAD), kurį sudaro šviesos šaltinis, veidrodis, monochromatorius, išskleidantis šviesą į skirtingų bangos ilgių spinduliuotes ir diodų matrica (žr. 23 pav.).



23 pav. Principinė DAD schema

Chromatograma fiksuojama 220 nm bangos ilgyje. Chromatografinis fitokanabinoidų atskyrimas pasiektas su NexLeaf CBX C18 (nepolinė stacionari fazė sudaryta iš 18 anglies atomų turinčių molekulių) atvirkčių fazių analitine kolonėle (150 mm ilgio × 4,6 mm vidinio skermens × 2,1 μm porų dydžio) (Shimadzu, Japonija) ir NexLeaf CBX 2,7 μm porų dydžio apsaugine prieškolonėle (Shimadzu, Japonija). Mobilioji fazė sudaryta iš tirpiklių A ir B: A – 0,085 % ortofosforo rūgšties vandenyje, B – 0,085 % ortofosforo rūgšties acetonitrile, šis tirpiklis naudojamas ir sistemos praplovimui. Srauto tekės greitis – 1 ml/min, įleidžiamo mėginio tūris – 10 μl, kolonėlės temperatūra – 50 °C, automatinio mėginių įleidimo mechanizmo temperatūra – 10 °C. Duomenys gauti iš Prominence-i LC-2030C sistemos apdorojami LabSolutions ver. 5.84 kompiuterine programine įranga (Shimadzu, Japonija). Metodo trukmė – 10 min. Naudota mobilios fazės gradientinė programa pateikta 7 lentelėje.

7 lentelė. HPLC-DAD metode naudota mobilios fazės gradientinė programa

Laikas, min	A, proc.	B, proc.
0–3	30	70
3–7	30–15	70–85
7–7,01	15–5	85–95
7,01–8	5	95
8–8,01	5–30	95–70
8,01–10	30	70

Individualių etaloninių standartų kalibracinių kreivių tiesinių priklausomybių ir kiekviena ekstraktų analizė atlikta trimis pakartojimais, ruošiant tris vienas nuo kito nepriklausomus skiedinius. Iš gautų rezultatų paskaičiuotas standartinis nuokrypis (1) ir santykinis standartinis nuokrypis (2).

2.5 Validacijos parametrų nustatymas

Validacija – tai procesas, kurio metu patvirtinama, kad kiekvieną kartą analizuojant mėginį nustatytomis sąlygomis bus gaunami teisingi rezultatai. Chromatografinių metodų įvertinimas ir palyginimas atliktas pagal ICH gairėse pateiktus analitinių procedūrų validacijos parametrus [109]: specifiškumas, tiesiškumas, preciziškumas (pakartojamumas ir tarpinis preciziškumas), aptikimo riba (LOD) ir nustatymo riba (LOQ), kiekvienam kanabinoidui: CBD, CBG, CBC, CBN ir CBDV dujų chromatografijos metoduose ir CBD, CBG, CBC, CBN, CBDV, CBGA, CBDA skysčių chromatografijos metode.

2.5.1 Specifiškumas

Metodikos specifiškumas – tai yra sistemos gebėjimas identifikuoti norimos analitės buvimą mėginyje tarp kitų mėginio komponentų. Idealus variantas, kai kiekviena chromatografinė smailė atitinka atskirą junginį mišinyje [109]. Kiekvieno metodo specifiškumas buvo įvertinamas indentifikavimo testu eksperimentiškai analizuojant individualius analitinius fitokanabinoidų standartus ir įvairius šių analitinių standartų mišinius, identifikuojant visus žinomos sudėties standartų mišinio komponentus.

2.5.2 Tiesiškumas

Tiesiškumas – tai sistemos gebėjimas gauti tokius rezultatus, kurie yra tiesiogiai proporcingi analitės koncentracijai analizuojamame mėginyje [109]. Kiekvieno metodo tiesiškumas vertinamas sudarius kiekvieno individualaus fitokanabinoido standarto kalibracines kreives, kurias sudaro 4–6

taškai. Kiekvieno fitokanabinoido kalibracinės kreivės sudarymui, kiekvienai koncentracijai sudaromi trys nepriklausomi mėginiai ir vedamas rezultatų vidurkis. Kiekvienai kreivei apskaičiuotos tiesės lygtys ir determinacijos koeficientas R^2 , kurie neturėtų būti mažesni kaip 0,99 [110].

2.5.3 Preciziškumas

Preciziškumas – parodo rezultatų, gautų po daukartinės to pačio homogeniško mėginio analizės nustatytomis sąlygomis, glaudumą [109]. Kiekvieno metodo preciziškumo įvertinimui apskaičiuotas analitinių standartų po analizės gaunamų rezultatų pakartojamumas ir tarpinis preciziškumas. Pakartojamumas – parodo rezultatų tikslumą atliekant analitinę procedūrą tokiomis pačiomis nustatytomis sąlygomis, per trumpą laiko tarpą – tą pačią dieną. Tarpinis preciziškumas – įvertina, kaip rezultatų tikslumą koreguoja atsitiktiniai įvykiai. Analitinė procedūra atliekama esant toms pačioms nustatytomis analizės sąlygoms per ilgesnį laiko tarpą – skirtingomis dienomis [109, 110].

Pakartojamumo ir tarpinio preciziškumo analizės atliktos vertinant smailių plotų variacijas. Pakartojamumo tyrimui atliktos trys to paties pavyzdžio injekcijos tą pačią dieną tokiomis pačiomis sąlygomis, tarpinio preciziškumo – to paties pavyzdžio injekcijos tokiomis pačiomis sąlygomis atliekamos tris skirtingas dienas. Gautų rezultatų glaudumas įvertintas pagal SSN% (2). Nuspręsta, kad SSN vertė, vertinant smailės ploto rezultatų variacijas, kiekybinio tyrimo atveju chromatografinėmis sistemomis turėtų būti ≤ 5 proc.

2.5.4 Aptikimo riba ir nustatymo riba

LOD – tai mažiausias analitės kiekis mėginyje, kuris yra aptinkamas detektoriaus, tačiau nebūtinai tiksliai nustatomas kiekybiškai. LOQ – tai mažiausias analitės kiekis, kuris gali būti tiksliai nustatomas kiekybiškai [109]. Nustatyti LOD ir LOQ galima keliais skirtingais būdais, tačiau šiame darbe jie buvo nustatyti iš kalibracinių kreivių regresijos lygties statistinių duomenų.

LOD ir LOQ buvo apskaičiuoti pagal (4) ir (5) formules:

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{\sigma}{a} \quad (4)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{\sigma}{a} \quad (5)$$

σ – tiriamo junginio kalibracinės kreivės regresijos lygties nuokrypio standartinis nuokrypis;

a – tiriamo junginio kalibracinės kreivės regresijos lygties nuolydis.

2.6 Tyrimo duomenų įvertinimas

Eksperimentiniai duomenys apdoroti naudojant statistinių duomenų analizės paketą Microsoft Office Excel (Microsoft, JAV). Microsoft Office Excel programa naudota duomenų susistemimui, tiesinių priklausomybių braižymui, SN ir SSN% apskaičiavimui, LOD ir LOQ skaičiavimams. Statistinis rezultatų reikšmingumas buvo nustatytas naudojant statistinių duomenų analizės paketą Statgraphics 18 (Statgraphics Technologies, JAV). Statistinis patikimumas įvertintas Fišerio LSD testu ($p < 0,05$). Visi kiekybinio nustatymo rezultatai išreikšti vidurkiais \pm standartiniu nuokrypiu.

3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Atlikus literatūros analizę ir išanalizavus literatūroje rastus fitokanabinoidų chromatografinės analizės metodus, pirmiausia dalis jų buvo išbandoma naudojant universitete turimas sistemas. Tačiau dėl skirtingų instrumentų parametrų, literatūroje nurodytomis analizės sąlygomis nepavyko pasiekti efektyvaus junginių atskyrimo ir chromatogramose buvo stebimi analičių smailių persidengimai. Dėl šios priežasties nuspręsta parinkti skirtingas fitokanabinoidų analizės sąlygas ir patvirtinti jų efektyvumą validuojant metodikas pagal pasirinktus parametrus ir palyginant jas tarpusavyje.

3.1 Metodų sąlygų optimizavimas

Analizei nuspręsta palyginti tiek dujų, tiek skysčių chromatografinės sistemas, kadangi šios abi sistemos turi privalumų ir trūkumų analizuojant fitokanabinoidus. Darbe buvo optimizuojamos ir lyginamos GC-FID, GC × GC-TOF/MS ir HPLC-DAD metodikos.

Analitinės kolonėlės GC pasirinktos atsižvelgiant į literatūroje pateiktas metodikas. GC dažniausiai naudojamos 15 m arba 30 m ilgio kolonėlės, beveik visuose pateiktuose metoduose jų vidinis skersmuo 0,25 mm, o stacionarios fazės sluoksnio storis – 0,25 μm. Todėl abiejuose GC metoduose pasirinktos 30 m ilgio, 0,25 mm vidinio skersmens ir 0,25 μm stacionarios fazės sluoksnio storio kapiliarinės analitinės kolonėlės. Literatūroje rastuose LC metoduose pateikiamos kolonėlės skirtingos, todėl pasirinkta instrumento gamintojo rekomenduota kolonėlė – nepolinė C18, atvirkščių fazių, 150 mm ilgio; 4,6 mm vidinio skersmens ir 2,1 μm porų dydžio analitinė kolonėlė.

Nenorint per daug apkrauti ir net užteršti kolonėlės įpurškiamo į ją mėginio tūris GC analizėje dažniausiai būna 1 μl, todėl toks mėginio tūris pasirinktas ir mano darbe. Įpurškiamo mėginio srauto pasiskirstymo prieš kolonėlę (angl. *Split*) santykis buvo parinktas eksperimentiškai. Pasirinktas LC įleidimo tūris – 10 μl, toks tūris nurodytas beveik visuose pateiktuose fitokanabinoidų analizės metoduose, todėl toliau nebuvo keičiamas. LC mobilios fazės sudėtis ir mobilios fazės gradientinė programa rekomenduoti instrumento gamintojo. Visos krosnelių temperatūrinės programos, inžektoriaus, detektoriaus temperatūros, moduliacijos periodas optimizuoti eksperimentiškai.

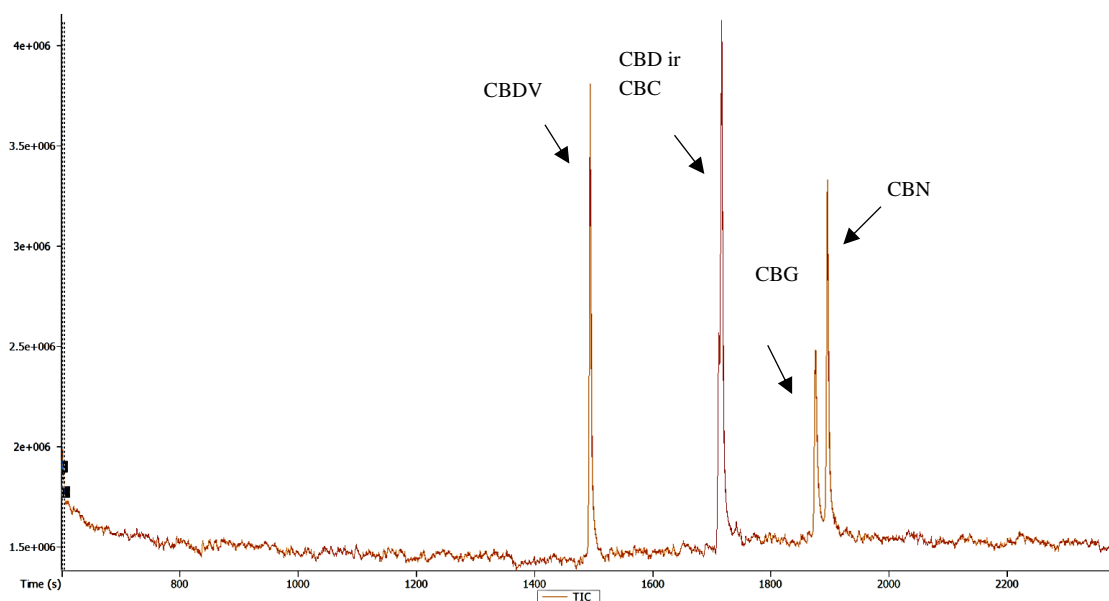
3.2 Fitokanabinoidų analizės metodo validacija su išmaniosios dujų chromatografijos ir skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi sistema

Analizei naudota GC × GC-TOF/MS yra aprūpinta į mėginio viršerdvę išsiskyrusių junginių analizės riedais, todėl ja galima išskirstyti, identifikuoti ir kokybiškai nustatyti ne tik tirpale esančius lakiuosius junginius (skystame mėginyje) bet ir jo viršerdvėje. Sistemoje naudojama viena iš efektyviausių ir paprasčiausių masių spektrometrijos formų. Šios sistemos veikimo principas yra paremtas atskirtų kolonėlėje mišinio komponentų jonizavimu ir skriejimo laiko detektoriuje išmatavimu. Dalelių judėjimo greitis ir tuo pačiu skriejimo laikas priklauso nuo masės ir krūvio santykio (m/Q) – didesnės masės to paties krūvio jonai judės lėčiau nei to paties krūvio mažesnės masės jonai. Tuo tarpu lyginant tos pačios masės jonus, greičiau judės didesnį krūvį turinčios dalelės [81, 82]. Žinant jonų skriejimo nuo jonizacijos šaltinio iki detektoriaus laiką, jų masės ir krūvio santykį, eksperimento parametrus ir naudojantis masių spektrų duomenų bibliotekomis galima identifikuoti beveik visus mišinio komponentus [83].

Eksperimentiškai išbandžius įvairius GC × GC-TOF/Ms sistemos termostato ir mėginio įpurškimo parametrus, buvo optimizuotas metodas, kuris iš visų išbandytų metodų pasižymėjo geriausiu fitokanabinoidų skirstymu. Pirmosios kolonėlės termostato temperatūrinė programa: nuo 50 °C iki 200 °C, temperatūra keliama 12,5 °C/min greičiu, tada 4 °C/min greičiu temperatūra keliama iki 280 °C temperatūros, ši temperatūra laikoma pastovia 7,5 min. Antrosios kolonėlės termostato temperatūrinė programa: nuo 55 °C iki 205 °C, temperatūra keliama 12,5 °C/min greičiu, tada 4 °C/min greičiu keliama iki 285 °C, ši temperatūra laikoma pastovia 7,5 min; inžektoriaus temperatūrinė programa: nuo 120 °C iki 270 °C temperatūra keliama 10 °C/min greičiu, ši temperatūra sulaukiama 5 min; įpurškiamo mėginio kiekis – 1 µl, įpurškimas atliekamas be srauto pasiskirstymo prieš kolonėlę (angl. *Splitless*), norint aptikti mažesnes junginių koncentracijas.

Kadangi rūgščių derivatizacija prieš analizę nebuvo atlikta, šiuo būdu galima nustatyti tik neutralios formos fitokanabinoidus: CBD, CBC, CBN, CBG ir CBDV. Pastebėta, kad su GC × GC-TOF/MS sistema nepavyksta atskirti kanabinoidų CBD ir CBC. To priežastis galėtų būti labai artimas junginių giminingumas ir vienoda junginių molekulinė masė – 314,464 g/mol. Dėl smailių persidengimo metodas buvo validuotas keturiems kanabinoidams CBD, CBG, CBN ir CBDV kartu, o CBC validacijos parametrai nustatyti atskirai. Kadangi pluošinėse kanapėse CBD visada aptinkamas didžiausiais kiekiais, o CBC labai mažais arba dažnai iš vis neaptinkamas, šis fitokanabinoidas neturėtų trukdyti tiksliai CBD nustatymui. Tačiau kadangi kiekviena smailė chromatogramoje neatitinka individualios mišinio analizės, šis metodas nėra specifiškas visiems norimiems fitokanabinoidams, o geresnio fitokanabinoidų atskyrimo viendimensine GC analize pasiekti nepavyko. Toks CBD ir CBC smailių persidengimas buvo pateikiamas ir literatūros šaltiniuose [97].

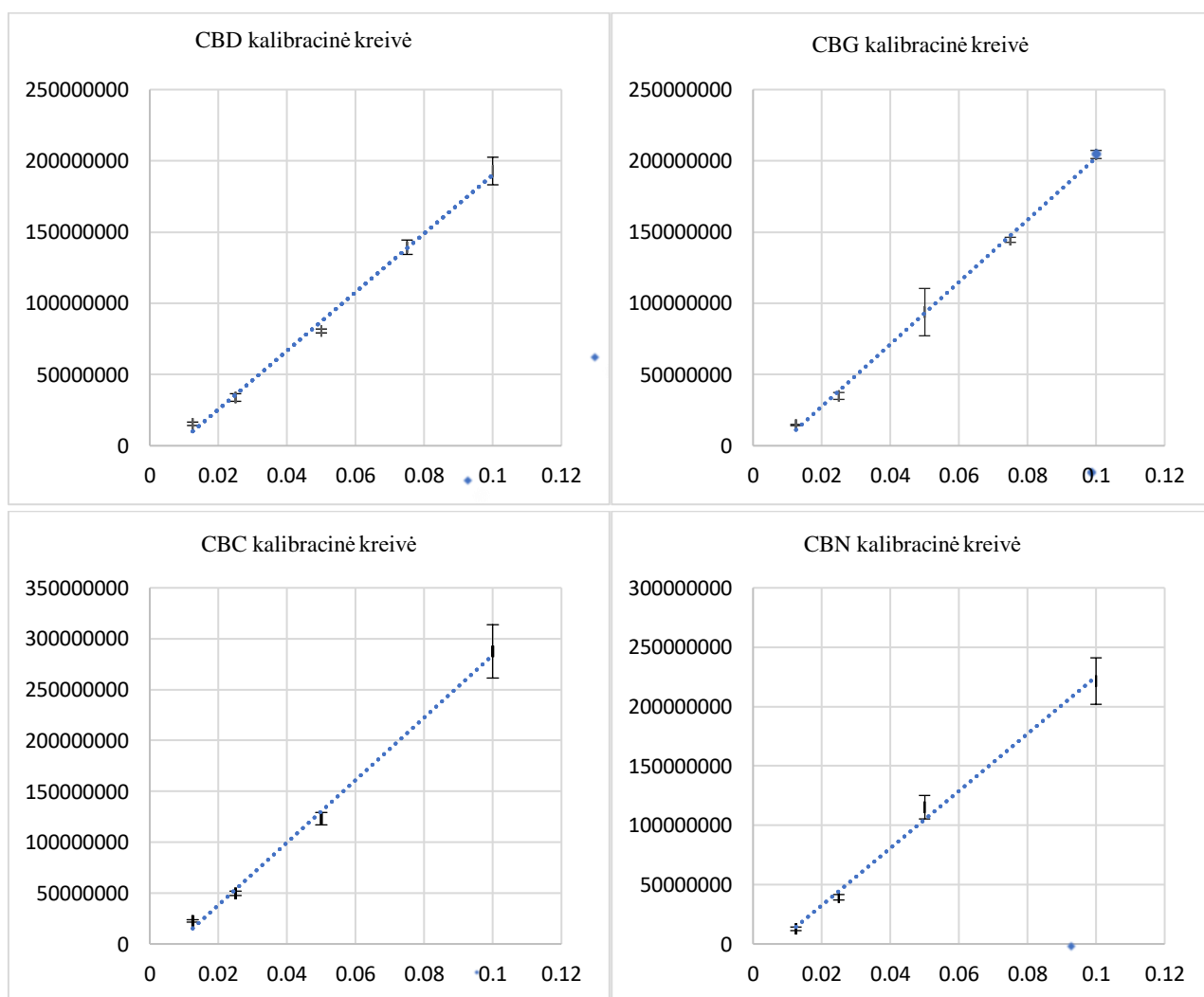
CBDV, CBD, CBC, CBG ir CBN 0,05 mg/ml koncentracijos mišinio chromatogramos fragmentas pateiktas 24 pav. Fitokanabinoidų elucijos laikai atitinkamai yra - 1492,9 s; 1713,8 s ;1717,6 s; 1875,6 s; 1879,6 s.



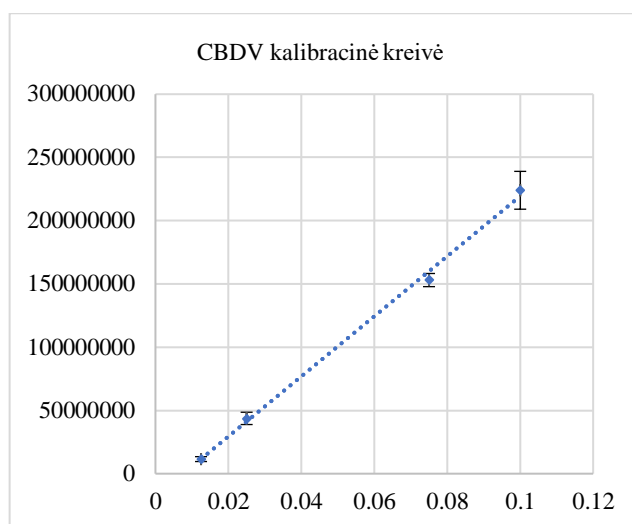
24 pav. 0,05 mg/ml CBDV, CBD, CBC, CBG ir CBN mišinio, GC × GC-TOF/Ms chromatogramos fragmentas

Taip pat buvo įvertintas metodo preciziškumas t.y. nustatytos metodo pakartojamumo ir tarpinio preciziškumo smailės plotui vertės, kurios išreikštos SSN% (žr. 8 lentelė). Pakartojamumo vertės yra gana stipriai varijuojančios tarp fitokanabinoidų nuo 1,29 % iki 7,91 %. Nustatyta, kad geriausiu pakartojamumu pasižymi CBC, o prasčiausiu – CBG. Tarpinio preciziškumo rezultatų variacijos tarp fitokanabinoidų yra šiek tiek mažesnės, nuo 5,16 % iki 8,90 %. Beveik visų fitokanabinoidų, išskyrus CBG, pakartojamumo vertės neviršija nustatytą 5 % ribos, tačiau visų fitokanabinoidų tarpinio preciziškumo vertės viršija 5 %. Toks rezultatų glaudumas yra laikomas nepriimtinu, kadangi visų fitokanabinoidų tiek pakartojamumo, tiek tarpinio preciziškumo vertės kiekybinei analizei turėtų būti nedaugiau, kaip 5 %.

Vertinant LOD ir LOQ reikšmes, žemiausios koncentracijos šiame metode buvo nustatytos CBD: LOD – 5,00 µg/ml, LOQ – 15,15 µg/ml, o aukščiausios CBN: LOD – 8,15 µg/ml, LOQ – 24,69 µg/ml (žr. 8 lentelė). Taip pat buvo sudarytos visų fitokanabinoidų CBD, CBG, CBN, CBC ir CBDV kalibracinės kreivės, apskaičiuotos tiesės lygtys ir determinacijos koeficientai R^2 , kurie yra aukštesni už 0,99. CBG determinacijos koeficiento R^2 vertė aukščiausia – 0,998414, o žemiausia CBN – 0,994168. Taigi, tokie rezultatai patvirtina šio metodo tiesiškumą (žr. 25 ir 26 pav).



25 pav. Kanabinoidų CBD, CBG, CBC, CBN kalibracinės kreivės, x ašyje – koncentracija mg/ml, y ašyje – detektoriaus atsakas.



26 pav. CBDV kalibracinė kreivė, x ašyje – koncentracija mg/ml, y ašyje – detektoriaus atsakas.

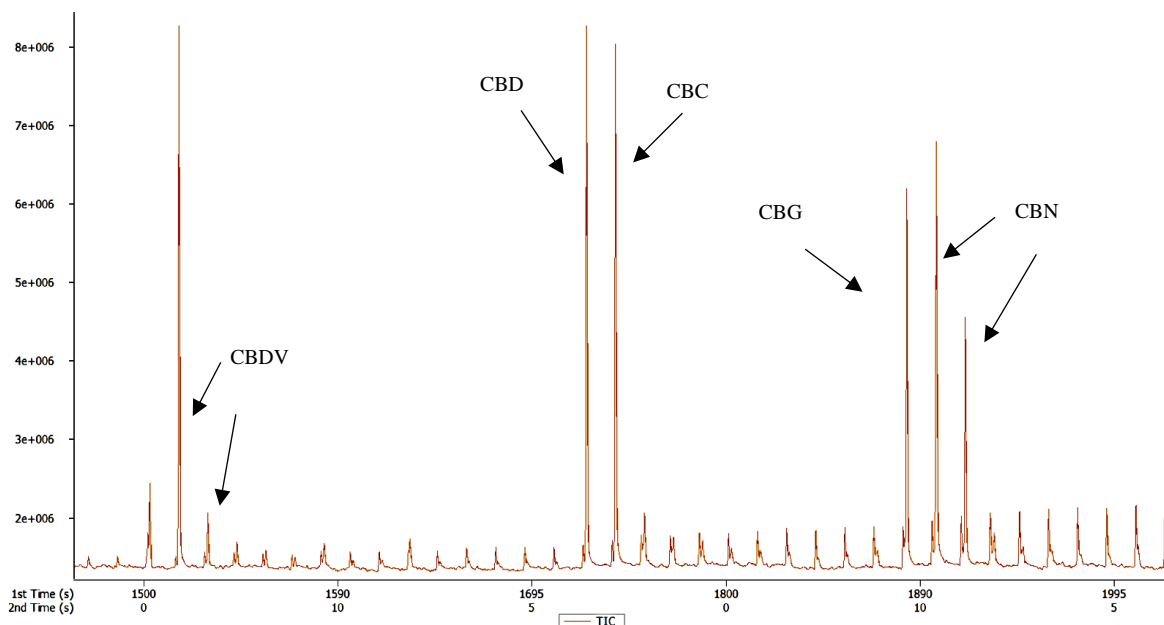
Visi GC × GC-TOF/MS metodo validacijos rezultatai pateikti 8 lentelėje.

8 lentelė. GC × GC-TOF/MS validacijos rezultatai

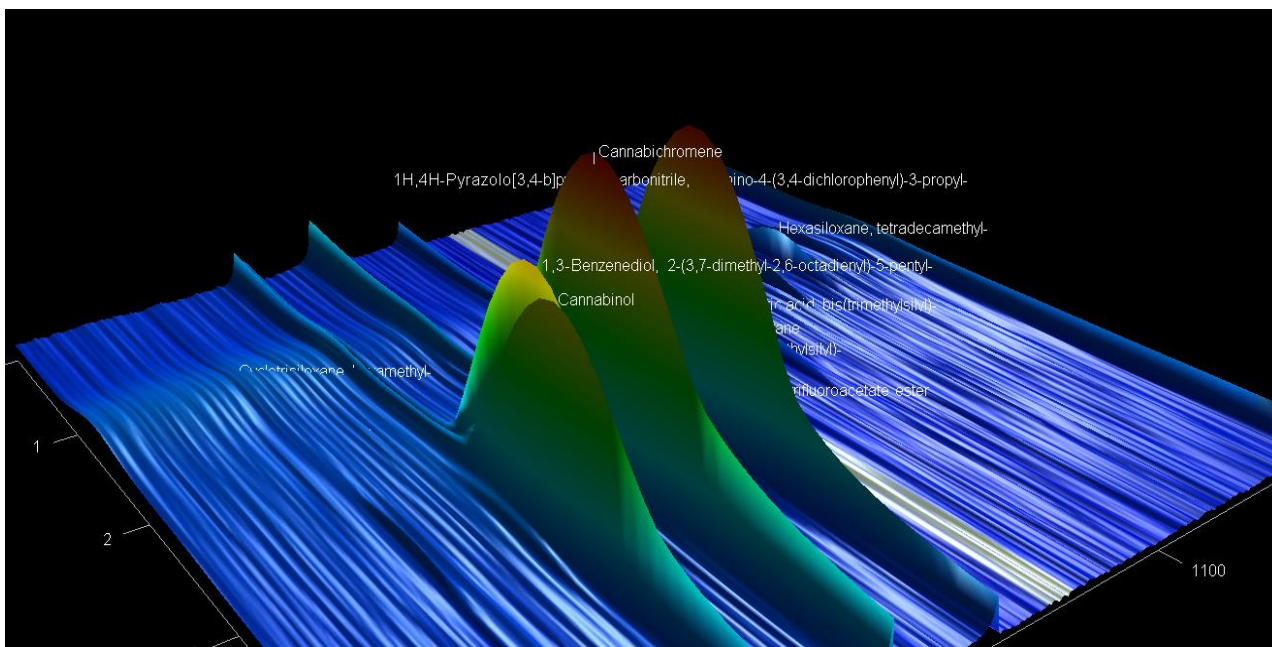
	CBD	CBG	CBC	CBN	CBDV
Sulaikymo trukmė, s	1713,8	1875,6	1717,6	1879,6	1492,9
LOD, µg/ml	5,00	5,52	7,29	8,15	6,62
LOQ, µg/ml	15,15	16,72	22,09	24,69	20,06
Pakartojamumas, proc.	4,53	7,91	1,29	3,92	3,01
Tarpinis preciziškumas, proc.	5,40	8,90	7,22	5,16	5,41
Kalibracinės kreivės intervalas, mg/ml	0,0125 – 0,1	0,0125 – 0,1	0,0125 – 0,1	0,0125 – 0,1	0,0125 – 0,1
Kalibracinės kreivės lygtis	$y = 2057970755,95x - 15639128,43$	$y = 2182871666,39x - 16136691,81$	$y = 3070690403,55x - 23145897,19$	$y = 2409989938,78x - 15775242,13$	$y = 2375010394,71x - 18093511,22$
R ²	0,996126	0,998414	0,996806	0,994168	0,997370

Kadangi norimo atskyrimo viendimensiniu metodu nepavyko pasiekti, buvo pasitelkta dvidimensinė (2D) GC × GC-TOF/MS. Dažniausiai 2D chromatografija yra naudojama labai kompleksiškiems mišiniam analizuoti arba norint atskirti giminingų struktūrų junginių persidengiančias mišinio komponentų smailes. GC × GC-TOF/MS yra naudojamos dvi kolonėlės, abi jos dažniausiai yra skirtingos prigimties, pvz.: nepolinė ir polinė, ir skirtingų ilgių – antroji kolonėlė yra trumpesnė. Tokiam atskyrimui yra naudojama terminė moduliacija – tai procesas, kurio metu skystas azotas yra naudojamas iš pirmosios dimensijos kolonėlės išeinančių mišinio komponentų imobilizavimui. Po tam tikro nustatyto laiko, šilumos srovė vėl paverčia daleles mobiliomis. Tuo metu, kai dalelės vėl tampa mobiliomis, jos patenka į antrosios dimensijos kolonėlę. Laikas, kurio metu dalelės yra imobilizuotos, t.y. kol iš pirmosios dimensijos kolonėlės patenka į antrosios dimensijos kolonėlę, vadinamas moduliacijos periodu [79].

Norint nustatyti optimaliausią moduliacijos periodą fitokanabinoidų atskyrimui buvo išbandyti keturi periodai: 5 s, 10 s, 15 s ir 20 s. Esant 5 s, 10 s ir 15 s periodams, CBD ir CBC smailės atskirti pavyko, tačiau kaip pašalinis efektas buvo pastebėtas kitų fitokanabinoidų smailių išsiskaldymas. Toks poveikis komplikuoja analizę, todėl siekama, kad smailių išsiskaldymas būtų kiek įmanoma mažesnis. Nustatyta, kad optimaliausias moduliacijos periodas yra 15 s, todėl kad esant šiam periodui nustatytas mažiausias kitų smailių išsiskaldymas, tačiau taip pat pasiekiamas CBD ir CBC atskyrimas (žr. 27 pav.). Trimatis chromatogramos vaizdas pateiktas 28 pav.

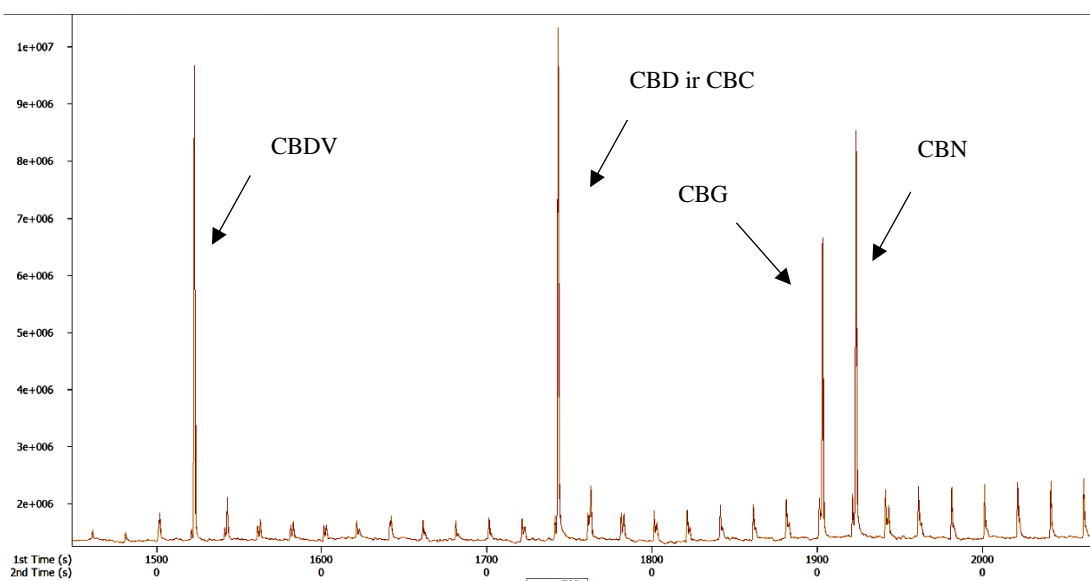


27 pav. 0,05 mg/ml CBDV, CBD, CBC, CBG ir CBN GC × GC-TOF/Ms chromatogramos fragmentas, kai moduliacijos periodas – 15 s



28 pav. 0,05 mg/ml CBDV, CBD, CBC, CBG ir CBN GC × GC-TOF/Ms trimatnio vaizdo chromatogramos fragmentas, kai moduliacijos periodas – 15 s

Ilginant moduliacijos periodą iki 20 s, chromatogramoje vėl stebimas CBD ir CBC smailių persidengimas (žr. 29 pav.).



29 pav. 0,05 mg/ml CBDV, CBD, CBC, CBG ir CBN GC × GC-TOF/Ms chromatogramos fragmentas, kai moduliacijos periodas – 20 s

Tačiau dvidimensiniam metodui validacija nėra atlikta, todėl juo galima tik identifikuoti ar CBC yra tiriamajame mėginyje ir įvertinti jo reikšmingumą analizei pagal smailės intensyvumą.

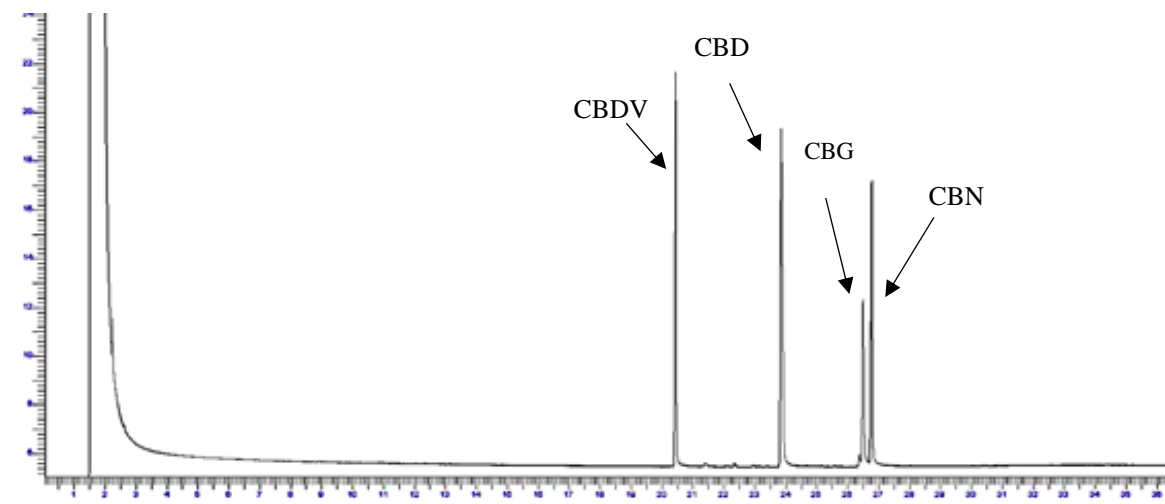
3.2 Fitokanabinoidų analizės metodo validacija dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi sistema

GC-FID – tai sistema, skirta nustatyti lakiems nesuoksidintos anglies turintiems junginiams, kurie sudega detektoriuje esančioje liepsnoje, sudarydami jonus. GC-FID yra jautri sistema, kuria galima tiksliai nustatyti labai mažą organinių junginių kiekį, tačiau taip pat turinti ir keletą trūkumų: šiuo detektoriumi galima nustatyti analitės buvimą mėginyje, tačiau, skirtingai nei Ms detektorius, FID neturi duomenų bibliotekos, todėl analizių negalime identifikuoti, jei nežinome tikslaus jų eliuacijos laiko. FID nevisada gali identifikuoti neorganinius lakius junginius, o analizuojant halogenintus angliavandenilius gaunamas prastas detektoriaus atsakas [85].

GC-FID metodo analizė buvo atlikta naudojantis 5 % difenilo ir 95 % dimetilpolisiloksano lydyto silicio stacionarios fazės kapiliarine kolonėle. Detektoriaus temperatūra – 300 °C. Bandinio įleidimo srauto paskirstymas (angl. *Split*) – 1/10. Įleidžiamo bandinio tūris – 1 μl. Injektoriaus temperatūra – 260 °C. Termostato temperatūrinė programa: nuo 50 °C keliant temperatūrą 12 °C/min greičiu iki 200 °C, toliau nuo 200°C temperatūra keliami 4°C/min greičiu iki 280°C, ši temperatūra laikoma pastovia 7,5 min.

GC-FID metodo analizė buvo atlikta keturiems fitokanabinoidams: CBD, CBG, CBDV ir CBN. Analizuojant individualų CBC analitinį standartą pastebėta, kad chromatogramoje gaunamos kelios smailės vietoje vienos. Dėl šios priežasties, būtų sunku atlikti CBC tikslią kiekybinę analizę. Taigi, šis metodas nėra specifiškas CBC, kadangi detektoriaus atsakas šiam junginiui nėra individuali smailė.

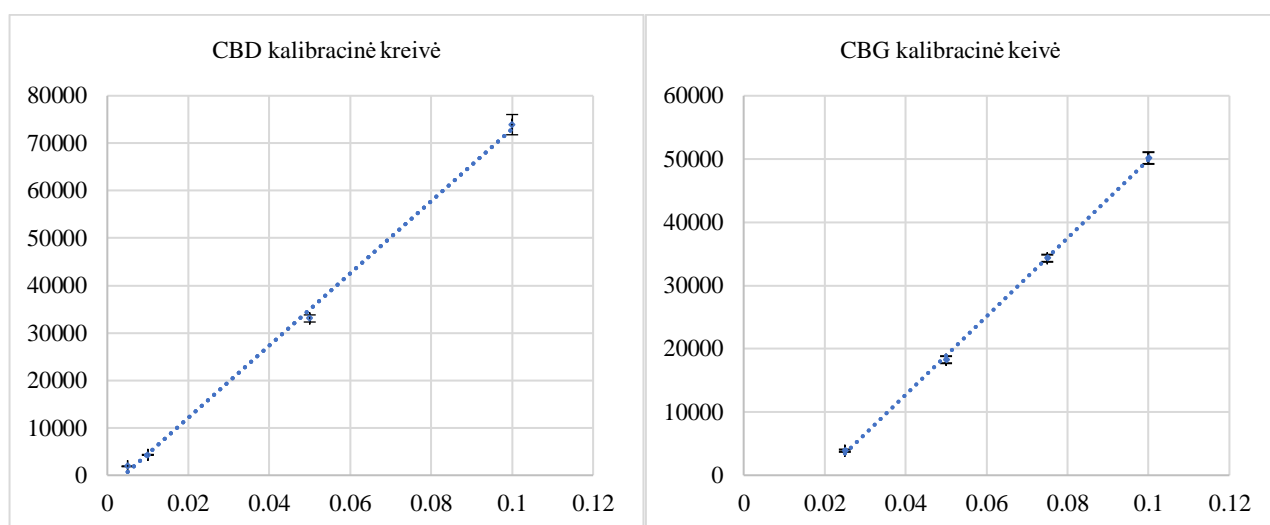
CBD, CBG, CBN ir CBDV 0,05 mg/ml koncentracijos mišinio chromatograma pateikta 30 pav. CBDV smailę matome ties 20,50 min, CBD ties 23,77 min, CBG sulaikymo trukmė 26,41 min, o CBN – 26,66 min.



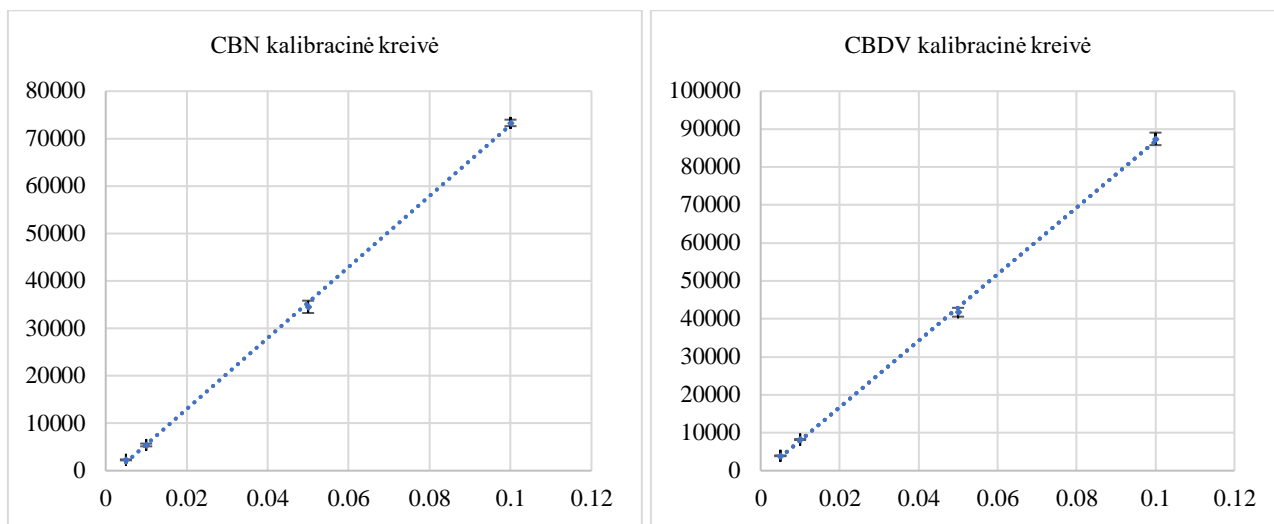
30 pav. CBD, CBG, CBN ir CBDV 0,05 mg/ml koncentracijos mišinio chromatograma su GC-FID sistema.

Įvertinus GC-FID metodo preciziškumą, nustatyta, kad visos pakartojamumo ir tarpinio preciziškumo SSN% vertės neviršija 5 %. Lyginant su viršuje aptartu GC × GC-TOF/MS metodu, verčių variacijos tarp fitokanabinoidų yra daug mažesnės. Pakartojamumo vertės yra intervale nuo 0,94 % iki 2,44 %. Tarpinio preciziškumo vertės yra intervale nuo 2,15 % iki 4,07 %. Mažiausiomis SNN% vertėmis pasižymėjo CBN, o didžiausiomis CBD.

Lyginant LOD ir LOQ vertes, žemiausios ribos nustatytos CBN, atitinkamai LOD – 1,71 µg/ml, LOQ – 5,19 µg/ml, aukščiausios CBG – 2,71 µg/ml ir 8,20 µg/ml. CBDV ribos 1,93 µg/ml ir 5,85 µg/ml, o CBD 2,36 µg/ml ir 7,16 µg/ml. Sudarytos visų fitokanabinoidų kalibracinės kreivės ir apskaičiuotos tiesės lygtys ir R^2 , kurie visais atvejais yra aukštesni už 0,99. CBN determinacijos koeficientas R^2 aukščiausias – 0,999604, o žemiausias CBD – 0,999142. Taigi, tokie rezultatai patvirtina šio metodo tiesiškumą (žr. 31 ir 32 pav.).



31 pav. CBD ir CBG kalibracinės kreivės, x ašyje – koncentracija mg/ml, y ašyje – detektoriaus atsakas.



32 pav. CBN, CBDV kalibracinės kreivės, x ašyje – koncentracija mg/ml, y ašyje – detektoriaus atsakas.

Visi GC-FID metodo analizės rezultatai pateikti 9 lentelėje.

9 lentelė. GC-FID validacijos rezultatai

	CBD	CBG	CBN	CBDV
Sulaikymo trukmė, min	23,77	26,41	26,66	20,34
LOD, µg/ml	2,36	2,71	1,71	1,93
LOQ, µg/ml	7,16	8,20	5,19	5,85
Pakartojamumas, proc.	2,89	1,85	0,94	1,89
Tarpinis preciziškumas, proc.	3,42	3,60	4,07	2,15
Kalibracinės kreivės intervalas, mg/ml	0,005 – 0,1	0,025 – 0,1	0,005 – 0,1	0,005 – 0,1
Kalibracinės kreivės lygtis	$y = 761150x - 3111$	$y = 619411x - 12059$	$y = 748867x - 2001,5$	$y = 877115,34x - 852,05$
R ²	0,998264	0,999418	0,999604	0,999524

Lyginant gautus rezultatus su GC × GC-TOF/Ms metodo validacijos rezultatais, nustatyta kad GC-FID metodas pasižymi geresniu preciziškumu, kadangi visos vertės neviršijo nustatytų ribų, taip pat gerokai žemesnės ir LOD ir LOQ vertės, o tai reiškia, kad GC-FID metodu galima identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti mažesnes fitokanabinoidų koncentracijas.

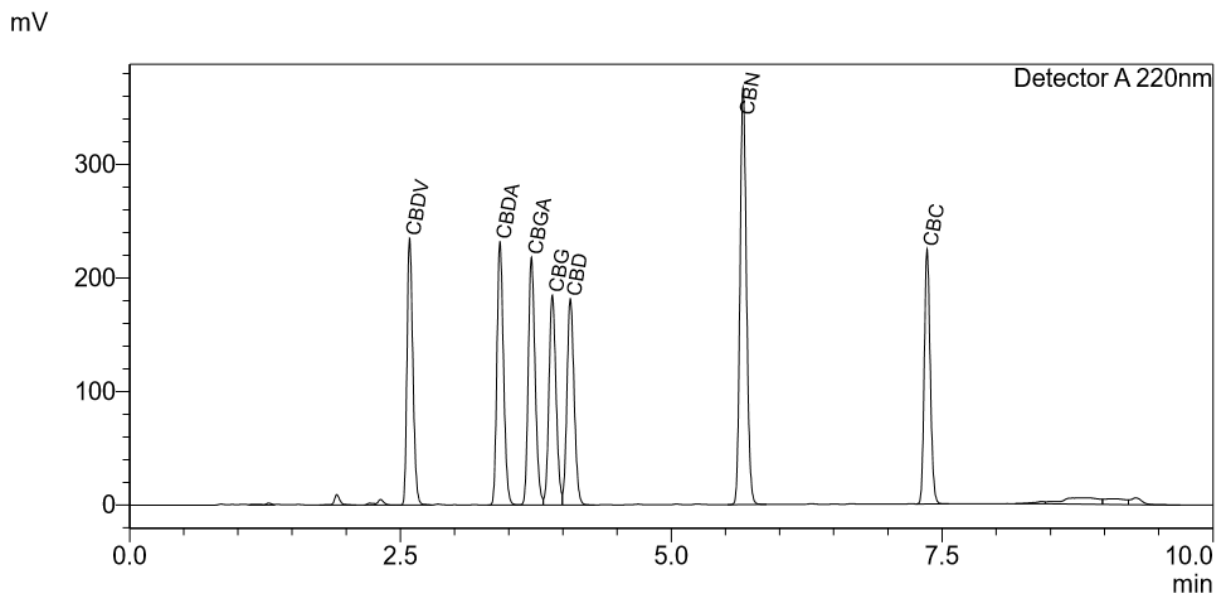
3.3 Fitokanabinoidų analizės metodo validacija efektyviosios skysčių chromatografijos su diodų matricos detektoriumi sistema

HPLC-DAD – tai universali sistema tinkama didelės molekulinės masės ir/ar nelakiems junginiams analizuoti. Judri fazė čia yra skysta, todėl nereikalingos aukštos temperatūros mėginio išgarinimui. DAD analizei yra tinkamas tuomet kai analičių struktūrose yra žiedų arba dvigubųjų jungčių, kurie absorbuoja UV/Vis spinduliuotę. Taigi, tai ganėtinai paprasta sistema, tačiau tinkama fitokanabinoidų analizei, dėl fitokanabinoidų cheminės struktūros. Ši sistema suteikia galimybę analizuoti fitokanabinoidus rūgštinėse formose be derivatizacijos.

Chromatografinis fitokanabinoidų atskyrimas pasiektas su NexLeaf CBX C18 atvirkščių fazių analitine (150 mm ilgio × 4,6 mm vidinio skersmens × 2,1 µm porų dydžio) kolonėle. Mobili fazė

sudaryta iš tirpiklio A – 0,085% ortofosforo rūgšties vandenyje ir tirpiklio B – 0,085% ortofosforo rūgšties acetonitrile. Mobilios fazės gradientinė programa: nuo 0 min iki 3 min, tirpiklio A koncentracija – 30 %, B – 70 %, nuo 3 min iki 7 min, A koncentracija mažinama iki 15 %, o B didinama iki 85 %, nuo 7 min iki 7,01 min A koncentracija mažinama iki 5 %, o B didinama iki 95 %, intervale nuo 7,01 min iki 8 min mobilios fazės gradientas išlaikomas pastovus, A – 5 %, o B – 95 %, nuo 8 min iki 8,01 min gradientinė programa sugražinama į pradinę būseną, A koncentracija didinama iki 30 %, o B mažinama iki 70 %. Intervale nuo 8,01 min iki 10 min šis koncentracijų gradientas išlaikomas pastovus iki analizės pabaigos. Įleidžiamo mėginio tūris – 10 µl. Chromatograma užfiksuota 220 nm bangos ilgyje.

CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN ir CBC 0,05 mg/ml koncentracijos mišinio chromatograma pateikta 33 pav. Junginių sulaikymo trukmės atitinkamai yra – 2,61 min; 3,47 min; 3,96 min; 3,96 min; 4,12 min; 5,71 min; 7,41 min. Taigi, vertinant šio metodo specifiskumą, kiekvienas fitokanabinoidas mišinyje, chromatogramoje atitinka individualią smailę. Nors fitokanabinoidų CBG ir CBD smailės yra labai arti, tačiau toks smailių atskyrimas dar laikomas pakankamu. Lyginant su aprašytais dujų chromatografijos metodais, šis metodas pasižymi geriausiu specifiskumu.

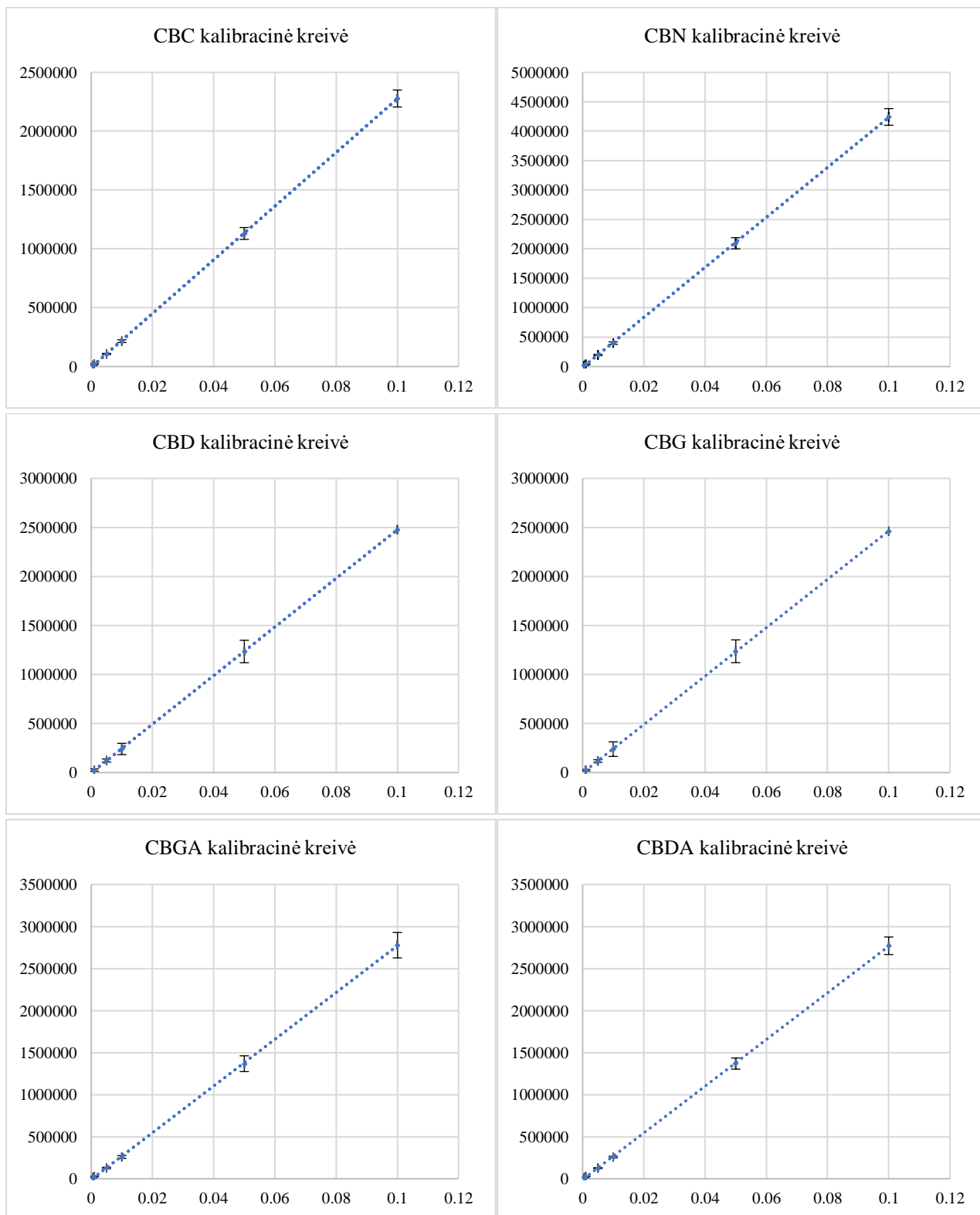


33 pav. CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, CBN ir CBC 0,05 mg/ml koncentracijos mišinio chromatograma su HPLC-DAD sistema

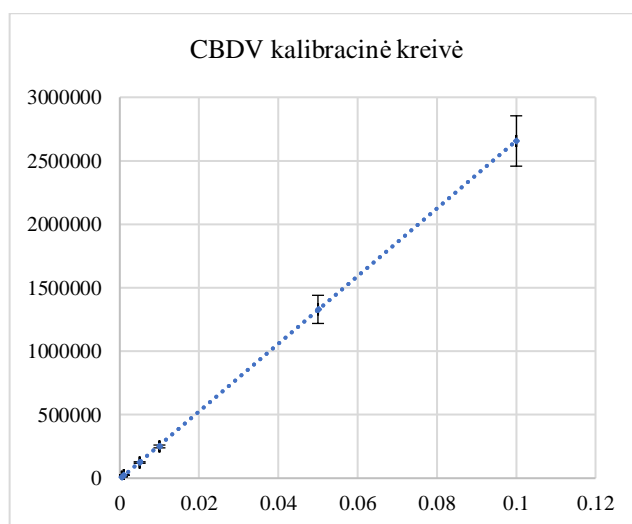
Įvertinus metodo preciziškumą, fitokanabinoidų pakartojamumo reikšmės yra labai mažos ir varijuoja siaurame intervale nuo 0,06 % iki 0,17 %, mažiausia reikšmė – CBDV, didžiausios – CBD ir CBG. Tarpinio preciziškumo vertės tarp fitokanabinoidų taip pat varijuoja siaurame intervale nuo 0,93 % iki 1,30 %. Toks rezultatų glaudumas yra laikomas priimtiniu ir lyginant su viršuje aprašytais metodais šios variacijos yra mažiausios, taigi galima daryti prielaidą, kad analizuojant mėginius šiuo metodu, rezultatai turėtų būti labiau patikimi.

Apskaičiuotos HPLC-DAD metodo LOD reikšmės varijuoja 1,36–2,96 µg/ml koncentracijų intervale, LOQ reikšmės varijuoja 4,13–8,96 µg/ml intervale. Žemiausios vertės – CBC, o aukščiausios – CBDV. Sudarytos visų fitokanabinoidų kalibracinės kreivės, apskaičiuotos tiesės lygtys ir R^2 , kurie visais atvejais yra aukštesni už 0,99. Taip pat šios vertės yra aukščiausios iš visų

trijų metodų, jos yra intervale nuo 0,999929 iki 0,999990, žemiausia vertė – CBGA, o aukščiausia – CBD. Tokie rezultatai patvirtina HPLC-DAD metodo tiesiškumą (žr. 34 ir 35 pav).



34 pav. CBC, CBN, CBD, CBG, CBGA ir CBDA kalibracinės kreivės; x ašyje – koncentracija, mg/ml; y ašyje – detektoriaus atsakas.



35 pav. CBDV kalibracinės kreivės; x ašyje – koncentracija, mg/ml; y ašyje - detektoriaus atsakas.

Visi HPLC-DAD metodo validacijos rezultatai pateikti 10 lentelėje.

10 lentelė. HPLC-DAD validacijos rezultatai

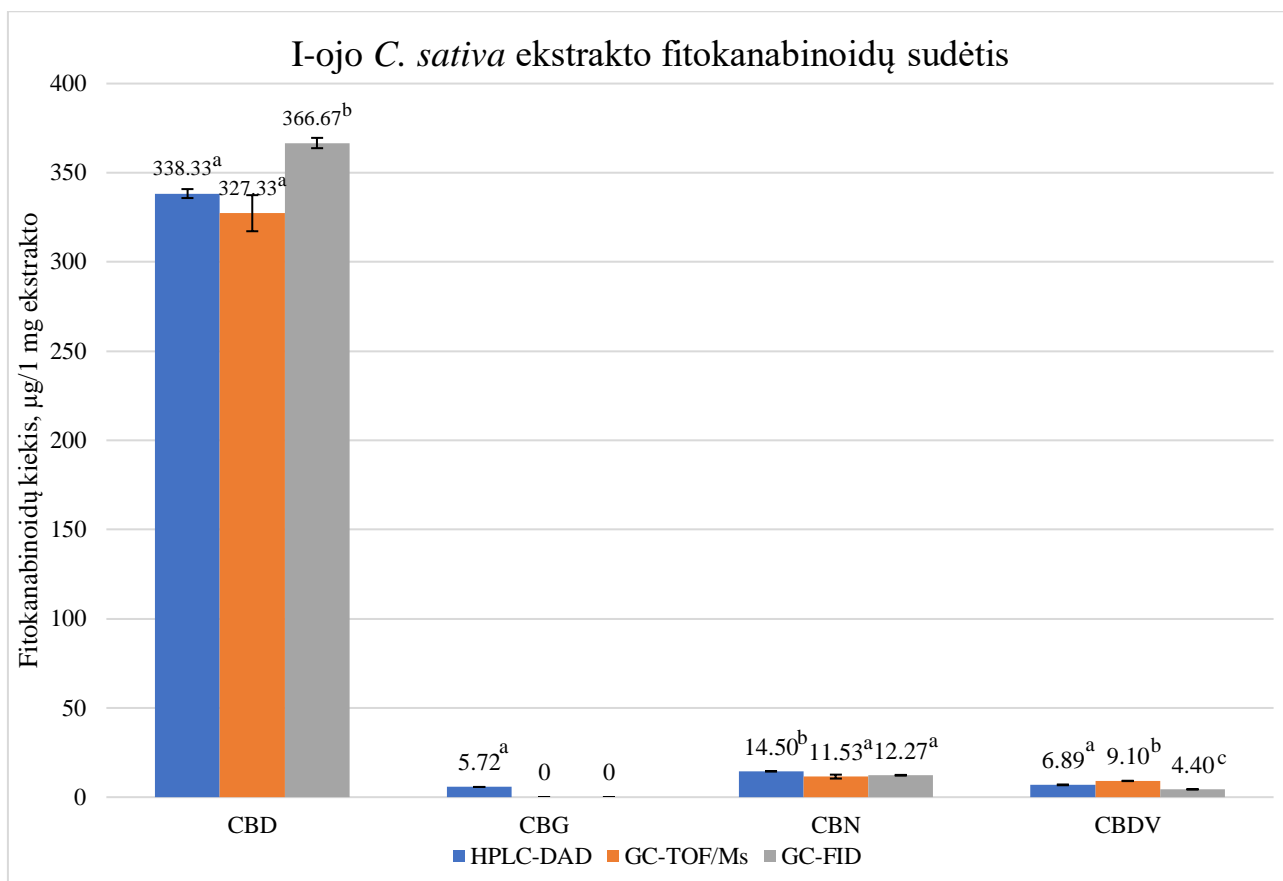
	CBD	CBG	CBC	CBN	CBDV	CBDA	CBGA
Sulaikymo trukmė, Min	4,12	3,96	7,41	5,71	2,61	3,47	3,96
LOD, $\mu\text{g/ml}$	2,33	1,95	1,36	1,43	2,96	1,57	2,25
LOQ, $\mu\text{g/ml}$	7,05	5,91	4,13	4,32	8,96	4,76	6,80
Pakartojamumas, proc.	0,17	0,17	0,10	0,08	0,06	0,08	0,09
Tarpinis preciziškumas, proc.	1,30	1,27	1,10	1,13	0,93	1,21	1,16
Kalibracinės kreivės intervalas, mg/ml	0,001 – 0,1	0,001 – 0,1	0,0005 – 0,1	0,0005 – 0,1	0,0005 – 0,1	0,0005 – 0,1	0,001 – 0,1
Kalibracinės kreivės lygtis	$y = 24787054,65x - 2272,05$	$y = 24669978,33x - 2637,27$	$y = 22808961,60x - 5973,08$	$y = 42464630,69x - 13523,72$	$y = 26637699,32x - 6704,98$	$y = 27760948,17x - 10330,52$	$y = 27802604,28x - 9778,11$
R ²	0,999990	0,999980	0,999975	0,999952	0,999971	0,999948	0,999929

3.4 Kokybinė ir kiekybinė *Cannabis Sativa L.* ekstraktų analizė

Nustačius visų trijų metodų validacijos parametrų vertes, toliau optimizuoti metodai buvo pritaikyti iš *C. sativa* žaliavos SFE-CO₂ būdu gautų ekstraktų analizei. Buvo analizuojami trys nežinomos sudėties ekstraktų prototipai, kuriuos pagamino ir perdavė tyrimams UAB Borela.

Pirmajame *C. sativa* ekstrakto identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti fitokanabinoidai CBD, CBG, CBN ir CBDV (žr. 36 pav.). Kaip ir nurodyta literatūroje šaltiniuose, daugumoje šiuo metu sertifikuotose pluoštinių kanapių veislių ekstraktuose vyrauja CBD. Analizuojant trimis metodais gauta, kad šio fitokanabinoido kiekis 1 mg ekstrakto yra $338,33 \pm 2,52 \mu\text{g}$; $327,33 \pm 10,12 \mu\text{g}$ ir

0,367 ± 2,89 µg. HPLC-DAD ir GC-TOF/Ms vertės yra gana artimos, įvertinus statistiškai, nustatyta, kad šios reikšmės statistiškai nesiskiria. Tačiau analizuojant GC-FID metodu, šio junginio kiekis buvo didesnis, o statistinis vertinimas parodė, kad šis skirtumas yra reikšmingas. Tačiau įvertinant tai, kad kiekvienoje metodikoje buvo naudojami skirtingi detektoriai, kurių jautrumas fitokanabinoidams gali skirtis, ir kolonėlės, kurių stacionarios fazės taip pat yra skirtingos, tokie skirtumai kiekybiniame nustatyme yra galimi. Taip pat svarbu paminėti, kad jei ekstraktuose yra rūgščių GC analizės metu jos dekarboksilinasi. CBG pavyko identifikuoti tik su HPLC-DAD, jo nustatyta labai nedaug – 5,72 ± 0,016 µg. Kitais metodais dėl mažo kiekio, šio fitokanabinoido aptikti nepavyko. Fitokanabinoidai CBN ir CBDV buvo aptikti visais trimis metodais. CBN kiekiai gana artimi: 14,50 ± 0,10 µg; 11,53 ± 1,10 µg ir 12,27 ± 0,21 µg. CBDV kiekiai tarp metodų varijuoja stipriau – 6,89 ± 0,22 µg; 9,10 ± 0,10 µg ir 4,40 ± 0,17 µg, tačiau visi šie kiekiai yra mažesni už visų metodų LOQ vertes šiam fitokanabinoidui, todėl galima teigti, kad žemiau šių ribų fitokanabinoidų kiekių nustatymas yra netikslus ir variacijos tarp metodų gali būti didesnės. Šiame ekstrakto neaptikta fitokanabinoidų rūgštinėse formose, todėl galima daryti prielaidą, kad ekstraktas pasenęs, buvo laikomas netinkamomis sąlygomis arba šiam ekstraktui buvo atliktas dekarboksilinimo procesas.

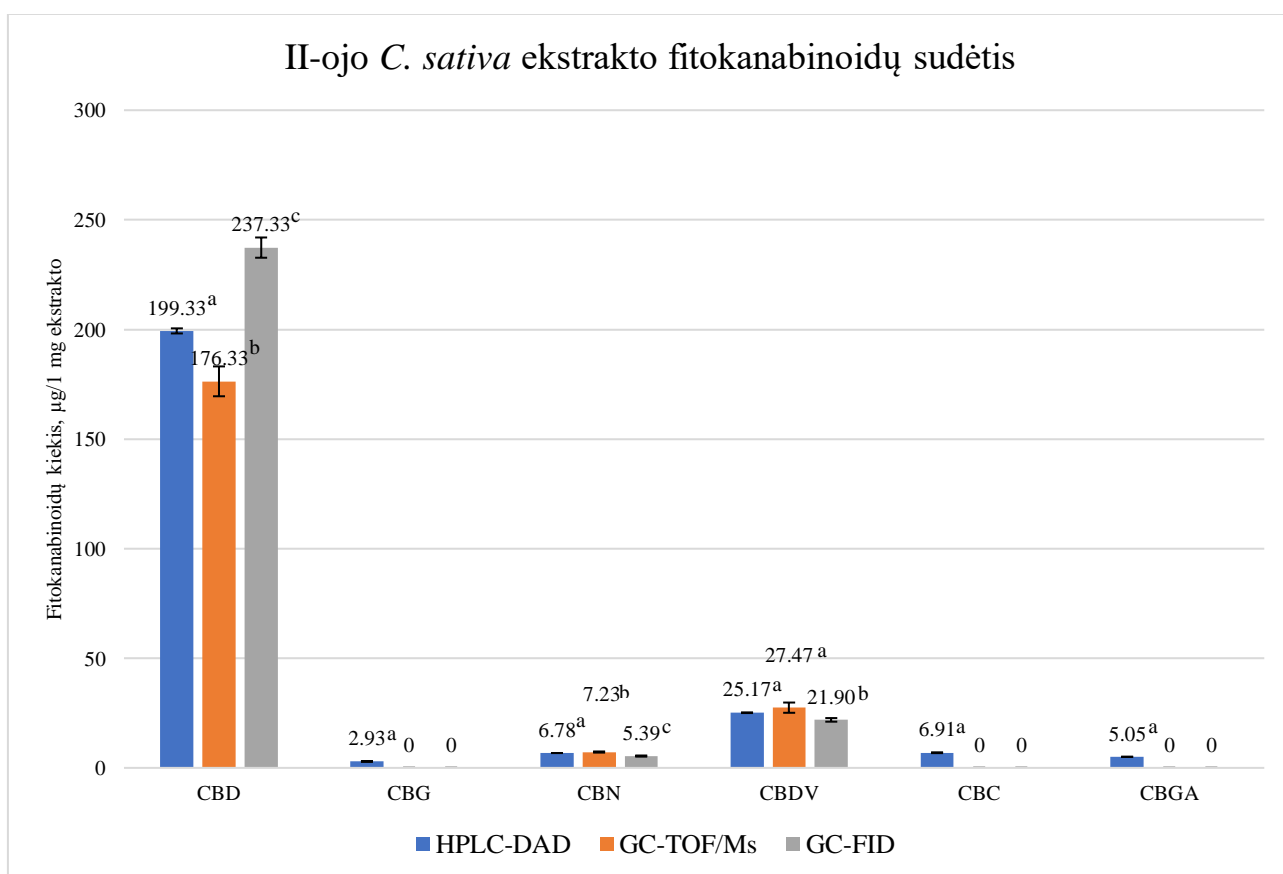


36 pav. Pirmojo ekstrakto fitokanabinoidų sudėties diagrama

a-c – mažosios raidės prie kiekvienos vertės reiškia, kad tomis pačiomis raidėmis pažymėtos individualaus junginio reikšmės pagal Fišerio LSD testą ($P < 0,05$) statistiškai nesiskiria.

Antrajame ekstrakto identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti fitokanabinoidai CBD, CBG, CBN, CBDV, CBC ir CBGA (žr. 37 pav.). CBD kiekis didžiausias iš visų fitokanabinoidų, tačiau šiuo atveju variacijos tarp metodų yra šiek tiek didesnės. Nustatyta, kad šie skirtumai yra reikšmingi

statistiškai. CBD kiekiai 1 mg ekstrakto yra $199,33 \pm 1,15 \mu\text{g}$; $176,33 \pm 6,81 \mu\text{g}$ ir $237,33 \pm 4,62 \mu\text{g}$. Šiame ekstrakte antrasis pagal gausumą fitokanabinoidas yra CBDV, kurio nustatyti kiekiai yra $25,17 \pm 0,15 \mu\text{g}$; $27,47 \pm 2,34 \mu\text{g}$ ir $21,90 \pm 0,82 \mu\text{g}$. Šiuo atveju šiam fitokanabinoidui variacijos tarp metodų yra mažesnės nei aukščiau minėtame ekstrakto, kadangi jo kiekis didesnis už apskaičiuotas kiekvieno metodo LOQ ribas. Nustatyta, kad tarp rezultatų, gautų HPLC-DAD ir GC \times GC-TOF/MS statistinio reikšmingumo nėra, tačiau po GC-FID analizės gautas didesnis šio fitokanabinoido kiekis ir šis skirtumas yra statistiškai reikšmingas. Galima teigti, kad didėjant junginio koncentracijai, kiekybinis nustatymas yra tikslesnis. CBN aptiktas visais trimis metodais, jo kiekiai nors ir labai maži, tačiau gana panašūs – $6,78 \pm 0,02 \mu\text{g}$; $7,23 \pm 0,25 \mu\text{g}$ ir $5,39 \pm 0,26 \mu\text{g}$. CBG, CBGA ir CBC buvo identifikuoti tik su HPLC-DAD ir labai mažais kiekiais. CBGA yra rūgštis, todėl ją identifikuoti galime tik su skysčių chromatografija. GC-FID metodas buvo nevaliduotas CBC, o jo nustatytas kiekis su HPLC-DAD yra mažesnis nei GC-TOF/MS metodo LOD. Todėl šiuos fitokanabinoidus pavyko aptikti tik su HPLC-DAD sistema. Šiame ekstrakto aptikta tik CBGA, kurios kiekis labai mažas, todėl taip pat galima daryti prielaidą, kad ekstraktas buvo laikomas netinkamomis sąlygomis, pasenęs arba jam atliktas dekarboksilinimo procesas.

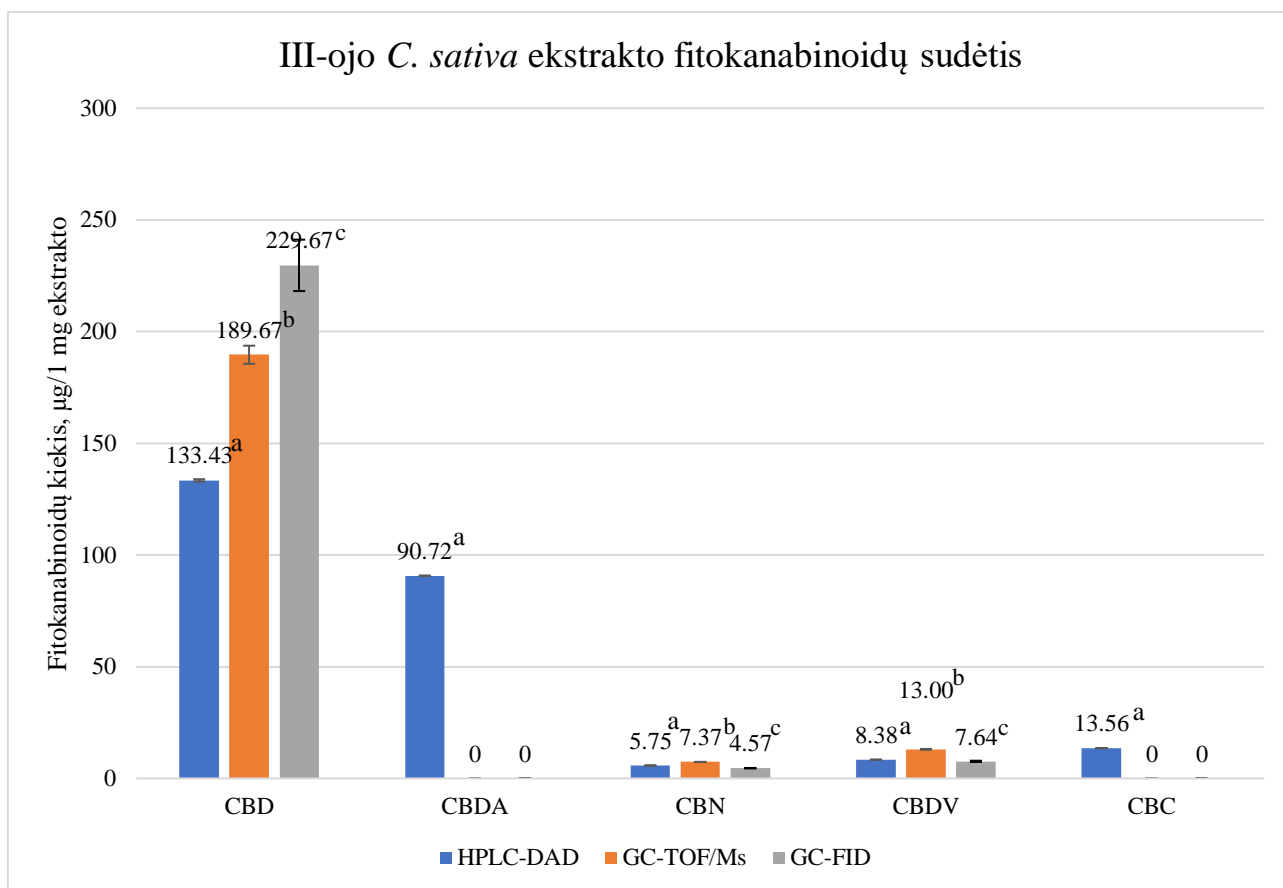


37 pav. Antrojo ekstrakto fitokanabinoidų sudėties diagrama

a-c – mažosios raidės prie kiekvienos vertės reiškia, kad tomis pačiomis raidėmis pažymėtos individualaus junginio reikšmės pagal Fišerio LSD testą ($P < 0,05$) statistiškai nesiskiria.

Trečiajame ekstrakto identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti fitokanabinoidai CBD, CBDA, CBN, CBDV ir CBC (žr. 38 pav.). Skysčių chromatografijos pagalba nustatyta, kad šiame ekstrakto yra CBDA, kurios kiekis – $90,72 \pm 0,04 \mu\text{g}$. Tačiau kadangi dujų chromatografinės analizės metu įvyksta šios rūgšties dekarboksilinimas, todėl ja galime nustatyti tik suminį CBD kiekį ekstrakto.

Vykstant CBDA dekarboksilinimui ir atskylant CO₂ molekulei, šios rūgšties masė sumažėja 44 atominiais masės vienetais. Remiantis šiomis žiniomis, pagal formulę apskaičiuotas suminis CBD kiekis HPLC-DAD yra 212,99 µg. Suminis CBD kiekis nustatytas dujų chromatografijos metodais yra 189,67 ± 4,04 µg ir 229,67 ± 11,50 µg. Taigi, CBD kiekio variacijos tarp metodų nėra itin didelės, tačiau vis dėlto jos yra statistiškai reikšmingos. Visais trimis metodais identifikuoti CBN ir CBDV fitokanabinoidai, kurių kiekiai ekstrakto maži. CBC nustatytas tik su HPLC-DAD sistema, o apskaičiuotas jo kiekis 13,56 ± 0,02 µg 1 mg ekstrakto. Kadangi ekstrakto aptiktas nemažas CBDA kiekis, galima daryti prielaidą, kad šis ekstraktas, priešingai nei aukščiau aptarti ekstraktai, nebuvo pilnai dekarboksilintas.



37 pav. Trečiojo ekstrakto fitokanabinoidų sudėties diagrama

a-c – mažosios raidės prie kiekvienos vertės reiškia, kad tomis pačiomis raidėmis pažymėtos individualaus junginio reikšmės pagal Fišerio LSD testą ($P < 0,05$) statistiškai nesiskiria.

Atlikus *C. sativa* ekstraktų kokybinę ir kiekybinę analizę, pastebėta, kad apskaičiuoti fitokanabinoidų kiekiai varijuoja tarp metodų. Šios variacijos gali atsirasti dėl kelių priežasčių. Labiausiai tikėtina, kad kiekybinio nustatymo skirtumai atsirado dėl naudojamos įrangos ypatumų. Visuose metoduose naudojamos kolonėlės su skirtingomis stacionariomis fazėmis. Fitokanabinoidai gali būti labiau giminingi vienoms stacionarioms fazėms negu kitoms, taigi nuo vienos stacionarios fazės gali būti sunkiau pašalinami negu nuo kitos. Dalis jų gali užsilikti kolonėlėse. Taip pat analizei buvo naudojami trys skirtingi detektoriai, kurių jautrumas fitokanabinoidams irgi gali būti skirtingas. Tačiau lyginant apskaičiuotus junginių kiekius, skirtumai tarp jų nėra labai dideli. Didesnėse koncentracijose variacijos tarp kiekių yra mažesnės negu mažesnėse, taigi pagrindinius fitokanabinoidus galima pakankamai tiksliai nustatyti visais trimis metodais.

3.5 Chromatografinių metodų palyginimas

3.5.1 Specifiškumas

Lyginant visų trijų metodų specifiškumą, HPLC-DAD metodas pasižymėjo geriausiu specifiškumu analizuotiems fitokanabinoidams, taip pat su šiuo metodu galime analizuoti daugiausiai fitokanabinoidų, kadangi jis nekeičia (nedekarboksilina) natūraliai pluoštinėse kanapėse esančių rūgščių. Kiekviena smailė septynių fitokanabinoidų (CBD, CBG, CBN, CBC, CBDV, CBDA ir CBGA) mišinio chromatogramoje atitiko individualų junginį. GC × GC-TOF/MS nepavyko atskirti CBD ir CBC viendimensiniu metodu. Todėl metodas buvo validuotas keturiems fitokanabinoidams CBD, CBG, CBN ir CBDV mišinyje kartu, o individualaus CBC analitinio standarto validacija atlikta atskirai. Šiuos junginius pavyko atskirti tik pasinaudojus dvidimencine dujų chromatografija. Tačiau, kaip jau buvo minėta, tai komplikuoja analizę, kadangi mišinio analizių smailės išsiskaldo. Tokia analizė gali būti ne tokia tiksli. Tačiau šis metodas nebuvo validuotas ir juo galime tik identifikuoti ar CBC yra tiriamajame mėginyje. GC-FID metodu pavyko gerai atskirti keturis fitokanabinoidams: CBD, CBG, CBN ir CBDV. CBC analitinio standarto analizės metu, chromatogramoje stebimos kelios smailės vietoje vienos, todėl nuspręsta, kad tiksliai kokybiškai įvertinti šį junginį būtų sudėtinga.

3.5.2 Preciziškumas

Vertinant visų metodų preciziškumą, buvo apskaičiuotos pakartojamumo ir tarpinio preciziškumo vertės. Mažiausiomis SSN% vertėmis pasižymėjo HPLC-DAD metodas. Visų tos pačios dienos mėginių pakartojamumo vertės varijuoja siaurame intervale 0,06–0,17 %, o tarpinio preciziškumo 0,93–1,30 %. GC-FID smailės plotų pakartojamumo ir atkartojamumo variacijos koeficientai buvo aukštesni, tačiau rezultatų glaudumas laikomas priimtiniu, kadangi nei viena reikšmė neviršijo nustatytos 5 % ribos. Mažiausiu preciziškumu pasižymėjo GC × GC-TOF/MS metodas. Nustatyta, kad SSN% reikšmės tarp fitokanabinoidų varijuoja plačiame intervale nuo 1,29 % iki 7,91 %, taip pat visų fitokanabinoidų tarpinio preciziškumo SNN% vertės viršijo 5 %. Toks rezultatų glaudumas yra per mažas, todėl kiekybinė analizė šiuo metodu gali būti mažiau tiksli.

3.5.3 Tiesiškumas

Visi trys metodai atitiko tiesiškumo reikalavimus, t.y. galima gauti rezultatus, kurie yra tiesiogiai proporcingi tiriamo junginio koncentracijai analizuojamame mėginyje. Tai patvirtina visų metodų kalibracinių kreivių determinacijos koeficientai R^2 , kurie visais atvejais yra aukštesni nei 0,99. Lyginant metodus tarpusavyje, HPLC-DAD metodo R^2 reikšmės yra labai aukštos, t.y. R^2 vertės nemažesnės kaip 0,9999. GC × GC-TOF/MS metodo R^2 yra žemiausios.

3.5.4 Aptikimo ribos ir nustatymo ribos

Apskaičiavus visų trijų metodų LOD ir LOQ vertes, galima teigti, kad žemiausiomis ribomis pasižymėjo HPLC-DAD metodas. Šio metodo LOD reikšmės varijuoja 1,36–2,96 µg/ml koncentracijų intervale, o LOQ pasiskirsčiusios nuo 4,13 µg/ml iki 8,96 µg/ml. Šioms riboms pakankamai artimos yra ir GC-FID metodo ribos: LOD vertės yra 1,71–2,71 µg/ml koncentracijų intervale, o LOQ 5,19–8,20 µg/ml intervale. GC × GC-TOF/MS ribos yra aukščiausios iš metodų: LOD pasiskirsto intervale nuo 5,00 µg/ml iki 8,15 µg/ml, o LOQ – intervale nuo 15,15 µg/ml iki 24,69 µg/ml. Atlikta ekstraktų analizė patvirtina, apskaičiuotus rezultatus, kadangi kaikuriuos

fitokanabinoidus pavyko identifikuoti tik su HPLC-DAD metodu, kuriame jų LOD ir LOQ reikšmės buvo žemiausios.

Išvados

1. Buvo sėkmingai parinkti efektyviosios skysčių chromatografijos parametrai visų septynių tyrimams atrinktų fitokanabinoidų (kanabidiolio, kanabigerolio, kanabinolio, kanabichromeno, kanabidivarinu, kanabigerolio rūgšties ir kanabidiolio rūgšties) kokybinei ir kiekybinei analizei.
2. Nustatyta, kad optimizuotomis išsamiosios dujų chromatografijos su skriejimo laiko masių spektrometrijos detektoriumi sistema metodo sąlygomis, mišinyje galima identifikuoti ir kiekybiškai nustatyti fitokanabinoidus: kanabidiolį, kanabigerolį, kanabinolį ir kanabidivariną. Kanabichromenas gali būti atskirtas ir identifikuotas mišinyje tik dvidimensinės chromatografinės analizės būdu papildomai prieš skirstymą antroje kolonėlėje panaudojus mišinio eliuentų moduliatorių taikant 15 s moduliacijos periodą.
3. Išbandžius įvairius analizės dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi parametrus, buvo parengtas analizės protokolas keturių pasirinktų fitokanabinoidų kanabidiolio, kanabigerolio, kanabinolio ir kanabidivarino identifikavimui ir kiekybinei analizei.
4. Nustatyta, kad žemiausiomis aptikimo ir nustatymo ribomis pasižymėjo efektyvioji skysčių chromatografija: jų reikšmės atitinkamai yra 1,36–2,96 µg/ml ir 4,13–8,96 µg/ml intervaluose. Analogiškos dujų chromatografijos su liepsnos jonizacijos detektoriumi metodo vertės buvo tik neženkliai didesnės - atitinkamai 1,71–2,71 µg/ml ir 5,19–8,20 µg/ml. Išmaniosios dujų chromatografijos ribos yra aukščiausios iš trijų metodų: aptikimo ribos pasiskirsčiusios 5,00–8,15 µg/ml, o nustatymo ribos 15,15–24,69 µg/ml.
5. Palyginus visų trijų metodų specifiškumą, preciziškumą, tiesiškumą, aptikimo ir nustatymo ribas, nustatyta, kad geriausiomis validacijos parametru vertėmis pasižymėjo efektyviosios skysčių chromatografijos metodas.
6. Pritaikius optimizuotus metodus *Cannabis sativa* L. superkrizinės ekstrakcijos anglies dvideginiu būdu gautų ekstraktų kokybinei ir kiekybinei analizei nustatyta, kad visuose ekstraktuose kanabidiolio koncentracija buvo didžiausia (176,33–366,67 µg 1 mg ekstrakto). Kitų fitokanabinoidų - kanabinolio (4,57–14,50 µg), kanabidivarino (4,40–27,47 µg), kanabigerolio (2,93–5,72 µg), kanabichromeno (6,91–13,56 µg), kanabigerolio rūgšties (5,05 µg) buvo daug mažiau. Kanabichromenas, kanabigerolis, kanabigerolio rūgštis ir kanabidiolio rūgštis aptikti tik efektyviosios skysčių chromatografijos metodu.

Literatūros sąrašas

1. CASSANO, T., et al. From Cannabis Sativa to Cannabidiol: Promising Therapeutic Candidate for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 20200306, Mar 6, 2020, vol. 11. pp. 124 ISSN 1663-9812; 1663-9812.
2. AIZPURUA-OLAIZOLA, O., et al. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis Sativa Plants from Different Chemotypes. *Journal of Natural Products*, 20160202, Feb 26, 2016, vol. 79, no. 2. pp. 324-331 ISSN 1520-6025; 0163-3864.
3. WANG, M., et al. Quantitative Determination of Cannabinoids in Cannabis and Cannabis Products using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography and Diode Array/Mass Spectrometric Detection. *Journal of Forensic Sciences*, 20161213, May, 2017, vol. 62, no. 3. pp. 602-611 ISSN 1556-4029; 0022-1198.
4. WHITING, P.F., et al. Cannabinoids for Medical use: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Jama*, Jun 23-30, 2015, vol. 313, no. 24. pp. 2456-2473 ISSN 1538-3598; 0098-7484.
5. ANDRE, C.M., HAUSMAN, J.F. and GUERRIERO, G. Cannabis Sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 20160204, Feb 4, 2016, vol. 7. pp. 19 ISSN 1664-462X; 1664-462X.
6. OOMAH, B.D., BUSSON, M., GODFREY, D.V. and DROVER, J.C.G. Characteristics of Hemp (Cannabis Sativa L.) Seed Oil. , January 2002, 2002 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460100245X> ISBN 0308-8146. DOI [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00245-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00245-X).
7. GONÇALVES, J., et al. Cannabis and its Secondary Metabolites: Their use as Therapeutic Drugs, Toxicological Aspects, and Analytical Determination. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 02/23, 2019, vol. 6, no. 1. pp. 31 PubMed. ISSN 2305-6320; 2305-6320.
8. MCPARTLAND, J.M. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 10/01, 2018, vol. 3, no. 1. pp. 203-212 PubMed. ISSN 2378-8763; 2378-8763.
9. BENÁCS-BÁRDI, G. Taxonomy and Morphology of Uncultivated Hemp (Cannabis Sativa L.) as Weed in Hungary. *Acta Botanica Hungarica*, 03/01, 2002, vol. 44. pp. 31-47.
10. CLARKE, R.C. and WATSON, D.P. Marijuana and the Cannabinoids M.A. ELSOHLY ed., Totowa, NJ: Humana Press, 2007 Cannabis and Natural Cannabis Medicines, pp. 1-15 ISBN 978-1-59259-947-9.
11. MCPARTLAND, J.M. and GUY, G.W. Models of Cannabis Taxonomy, Cultural Bias, and Conflicts between Scientific and Vernacular Names. *The Botanical Review*, 12/01, 2017, vol. 83, no. 4. pp. 327-381 ISSN 1874-9372. 12. Three Types of Cannabis. Prieiga per: <https://azarius.net/encyclopedia/85/cannabis-types-sativa-indica-ruderalis/>. [žiūrėta 2019-12-12]
13. Ernest Small. Top 100 Exotic Food Plants. 1st Edition ed. JAV: CRC Press, Published June 7, 2017.

14. Obelevičius. Kęstutis-Petkevičiūtė. Silvija-Šeinauskienė. Erika. Prieskoninių augalų ir jų vartojimo žinynas. Kaunas: Lututė, 2011.
15. BONINI, S.A., et al. Cannabis Sativa: A Comprehensive Ethnopharmacological Review of a Medicinal Plant with a Long History. *Journal of Ethnopharmacology*, 20180908, Dec 5, 2018, vol. 227. pp. 300-315 ISSN 1872-7573; 0378-8741.
16. MOLITERNI, V.M.C., CATTIVELLI, L., RANALLI, P. and MANDOLINO, G. The Sexual Differentiation of Cannabis Sativa L.: A Morphological and Molecular Study. *Euphytica*, 01/01, 2004, vol. 140, no. 1. pp. 95-106 ISSN 1573-5060.
17. Abby Hutmatcher. How to Predetermine the Sex of Cannabis Plant. , 2019-10-28 Prieiga per: <https://potguide.com/blog/article/how-to-predetermine-the-sex-of-cannabis-plants/>.
18. Melissa Sherard. How to Tell the Difference between Male and Female Marijuana Plants. Prieiga per : <https://www.civilized.life/articles/difference-between-male-and-female-marijuana-plants/>. [žiūrėtas 2020-12-12]
19. HARTSEL, J.A., EADES, J., HICKORY, B. and MAKRIYANNIS, A. Chapter 53 - Cannabis Sativa and Hemp. GUPTA, Ramesh C. ed., Boston: Academic Press, 2016, 2016 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012802147700053X> ISBN 9780128021477. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00053-X>.
20. ELSOHLY, M., et al., 01/25, 2017 *Phytochemistry of Cannabis Sativa L*, pp. 1-36 ISBN 978-3-319-45539-6.
21. HANUS, L.O., et al. Phytocannabinoids: A Unified Critical Inventory. *Natural Product Reports*, Nov 23, 2016, vol. 33, no. 12. pp. 1357-1392 ISSN 1460-4752; 0265-0568.
22. ELSOHLY, M.A., et al. *Phytochemistry of Cannabis Sativa L. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 2017, vol. 103. pp. 1-36 ISSN 2191-7043; 0071-7886.
23. DEGENHARDT, F., STEHLE, F. and KAYSER, O. Chapter 2 - the Biosynthesis of Cannabinoids. PREEDY, V. R. ed., San Diego: Academic Press, 2017, 2017 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128007563000028> ISBN 9780128007563. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00002-8>.
24. ROVETTO, L.J. and AIETA, N.V. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. , November 2017, 2017 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844617301900> ISBN 0896-8446. DOI <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.014>.
25. PACHER, P., BATKAI, S. and KUNOS, G. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews*, Sep, 2006, vol. 58, no. 3. pp. 389-462 ISSN 0031-6997; 0031-6997.
26. MECHOULAM, R. and PARKER, L.A. The Endocannabinoid System and the Brain. *Annual Review of Psychology*, 20120712, 2013, vol. 64. pp. 21-47 ISSN 1545-2085; 0066-4308.
27. SCHROT, R.J. and HUBBARD, J.R. Cannabinoids: Medical Implications. *Annals of Medicine*, 20160225, 2016, vol. 48, no. 3. pp. 128-141 ISSN 1365-2060; 0785-3890.

28. BISOGNO, T., LIGRESTI, A. and DI MARZO, V. The Endocannabinoid Signalling System: Biochemical Aspects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 07/01, 2005, vol. 81. pp. 224-38.
29. PORTER, A.C., et al. Characterization of a Novel Endocannabinoid, Virodhamine, with Antagonist Activity at the CB1 Receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Jun, 2002, vol. 301, no. 3. pp. 1020-1024 ISSN 0022-3565; 0022-3565.
30. GROTENHERMEN, F. Cannabinoids. *Current Drug Targets.CNS and Neurological Disorders*, Oct, 2005, vol. 4, no. 5. pp. 507-530 ISSN 1568-007X; 1568-007X.
31. DI MARZO, V. and PISCITELLI, F. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, Oct, 2015, vol. 12, no. 4. pp. 692-698 ISSN 1878-7479; 1878-7479.
32. COX, E.J., et al. A Marijuana-Drug Interaction Primer: Precipitants, Pharmacology, and Pharmacokinetics. , September 2019, 2019 Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725819300750> ISBN 0163-7258. DOI <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.001>.
33. MAROON, J. and BOST, J. Review of the Neurological Benefits of Phytocannabinoids. *Surgical Neurology International*, 20180426, Apr 26, 2018, vol. 9. pp. 91 ISSN 2229-5097; 2152-7806.
34. COX, E.J., et al. A Marijuana-Drug Interaction Primer: Precipitants, Pharmacology, and Pharmacokinetics. *Pharmacology & Therapeutics*, 20190507, Sep, 2019, vol. 201. pp. 25-38 ISSN 1879-016X; 0163-7258.
35. PERTWEE, R.G. Cannabinoid Pharmacology: The First 66 Years. *British Journal of Pharmacology*, Jan, 2006, vol. 147 Suppl 1. pp. S163-71 ISSN 0007-1188; 0007-1188.
36. JAVID, F.A., et al. Cannabinoid Pharmacology in Cancer Research: A New Hope for Cancer Patients?. *European Journal of Pharmacology*, 20160205, Mar 15, 2016, vol. 775. pp. 1-14 ISSN 1879-0712; 0014-2999.
37. DELONG, G.T., WOLF, C.E., POKLIS, A. and LICHTMAN, A.H. Pharmacological Evaluation of the Natural Constituent of Cannabis Sativa, Cannabichromene and its Modulation by Delta(9)-Tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence*, Nov 1, 2010, vol. 112, no. 1-2. pp. 126-133 ISSN 1879-0046; 0376-8716.
38. VERTY, A.N., et al. The Cannabinoid Receptor Agonist THC Attenuates Weight Loss in a Rodent Model of Activity-Based Anorexia. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 20110316, Jun, 2011, vol. 36, no. 7. pp. 1349-1358 ISSN 1740-634X; 0893-133X.
39. COSTANTINO, C.M., et al. Cannabinoid Receptor 2-Mediated Attenuation of CXCR4-Tropic HIV Infection in Primary CD4+ T Cells. *PloS One*, 20120320, 2012, vol. 7, no. 3. pp. e33961 ISSN 1932-6203; 1932-6203.
40. HILL, A.J., WILLIAMS, C.M., WHALLEY, B.J. and STEPHENS, G.J. Phytocannabinoids as Novel Therapeutic Agents in CNS Disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 20110906, Jan, 2012, vol. 133, no. 1. pp. 79-97 ISSN 1879-016X; 0163-7258.

41. SLEDZINSKI, P., ZEYLAND, J., SLOMSKI, R. and NOWAK, A. The Current State and Future Perspectives of Cannabinoids in Cancer Biology. *Cancer Medicine*, 20180223, Mar, 2018, vol. 7, no. 3. pp. 765-775 ISSN 2045-7634; 2045-7634.
42. DEVINSKY, O., et al. Cannabidiol: Pharmacology and Potential Therapeutic Role in Epilepsy and Other Neuropsychiatric Disorders. *Epilepsia*, 20140522, Jun, 2014, vol. 55, no. 6. pp. 791-802 ISSN 1528-1167; 0013-9580.
43. WATT, G. and KARL, T. In Vivo Evidence for Therapeutic Properties of Cannabidiol (CBD) for Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 20170203, Feb 3, 2017, vol. 8. pp. 20 ISSN 1663-9812; 1663-9812.
44. ZUARDI, A.W., GUIMARAES, F.S. and MOREIRA, A.C. Effect of Cannabidiol on Plasma Prolactin, Growth Hormone and Cortisol in Human Volunteers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, Feb, 1993, vol. 26, no. 2. pp. 213-217 ISSN 0100-879X; 0100-879X.
45. LIGRESTI, A., et al. Antitumor Activity of Plant Cannabinoids with Emphasis on the Effect of Cannabidiol on Human Breast Carcinoma. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20060525, Sep, 2006, vol. 318, no. 3. pp. 1375-1387 ISSN 0022-3565; 0022-3565.
46. APPENDINO, G., et al. Antibacterial Cannabinoids from Cannabis Sativa: A Structure-Activity Study. *Journal of Natural Products*, 20080806, Aug, 2008, vol. 71, no. 8. pp. 1427-1430 ISSN 1520-6025; 0163-3864.
47. MCGUIRE, P., et al. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *The American Journal of Psychiatry*, 20171215, Mar 1, 2018, vol. 175, no. 3. pp. 225-231 ISSN 1535-7228; 0002-953X.
48. MAKRIYANNIS, A. 2012 Division of Medicinal Chemistry Award Address. Trekking the Cannabinoid Road: A Personal Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 20140501, May 22, 2014, vol. 57, no. 10. pp. 3891-3911 ISSN 1520-4804; 0022-2623.
49. WARGENT, E.T., et al. The Cannabinoid Delta(9)-Tetrahydrocannabivarin (THCV) Ameliorates Insulin Sensitivity in Two Mouse Models of Obesity. *Nutrition & Diabetes*, 20130527, May 27, 2013, vol. 3. pp. e68 ISSN 2044-4052; 2044-4052.
50. GARCIA, C., et al. Symptom-Relieving and Neuroprotective Effects of the Phytocannabinoid Delta(9)-THCV in Animal Models of Parkinson's Disease. *British Journal of Pharmacology*, Aug, 2011, vol. 163, no. 7. pp. 1495-1506 ISSN 1476-5381; 0007-1188.
51. CASCIO, M.G., et al. Evidence that the Plant Cannabinoid Cannabigerol is a Highly Potent Alpha2-Adrenoceptor Agonist and Moderately Potent 5HT1A Receptor Antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 20091204, Jan, 2010, vol. 159, no. 1. pp. 129-141 ISSN 1476-5381; 0007-1188.
52. SMERIGLIO, A., et al. Inhibition of Aldose Reductase Activity by Cannabis Sativa Chemotypes Extracts with High Content of Cannabidiol Or Cannabigerol. *Fitoterapia*, 20180207, Jun, 2018, vol. 127. pp. 101-108 ISSN 1873-6971; 0367-326X.
53. DEIANA, S. Chapter 99 - Potential Medical Uses of Cannabigerol: A Brief Overview. PREEDY, V. R. ed., San Diego: Academic Press, 2017, 2017 Prieiga per:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128007563001150> ISBN 9780128007563.
DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00115-0>.

54. RUSSO, E.B. and MARCU, J. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. *Advances in Pharmacology* (San Diego, Calif.), 20170605, 2017, vol. 80. pp. 67-134 ISSN 1557-8925; 1054-3589.

55. LAFAYE, G., KARILA, L., BLECHA, L. and BENYAMINA, A. Cannabis, Cannabinoids, and Health. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 09, 2017, vol. 19, no. 3. pp. 309-316 PubMed. ISSN 1958-5969; 1294-8322.

56. DELONG, G.T., WOLF, C.E., POKLIS, A. and LICHTMAN, A.H. Pharmacological Evaluation of the Natural Constituent of Cannabis Sativa, Cannabichromene and its Modulation by Delta(9)-Tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence*, Nov 1, 2010, vol. 112, no. 1-2. pp. 126-133 ISSN 1879-0046; 0376-8716.

57. EL-ALFY, A.T., et al. Antidepressant-Like Effect of Delta9-Tetrahydrocannabinol and Other Cannabinoids Isolated from Cannabis Sativa L. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 20100321, Jun, 2010, vol. 95, no. 4. pp. 434-442 ISSN 1873-5177; 0091-3057.

58. MAIONE, S., et al. Non-Psychoactive Cannabinoids Modulate the Descending Pathway of Antinociception in Anaesthetized Rats through several Mechanisms of Action. *British Journal of Pharmacology*, Feb, 2011, vol. 162, no. 3. pp. 584-596 ISSN 1476-5381; 0007-1188.

59. POLLASTRO, F., et al. Cannabichromene. *Natural Product Communications*, 01/01, 2018, vol. 13. pp. 1189-1194.

60. DE PETROCELLIS, L., et al. Plant-Derived Cannabinoids Modulate the Activity of Transient Receptor Potential Channels of Ankyrin Type-1 and Melastatin Type-8. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20080319, Jun, 2008, vol. 325, no. 3. pp. 1007-1015 ISSN 1521-0103; 0022-3565.

61. SHINJYO, N. and DI MARZO, V. The Effect of Cannabichromene on Adult Neural Stem/Progenitor Cells. , November 2013, 2013 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018613002106> ISBN 0197-0186. DOI <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.08.002>.

62. ROCK, E.M., et al. A Comparison of Cannabidiolic Acid with Other Treatments for Anticipatory Nausea using a Rat Model of Contextually Elicited Conditioned Gaping. *Psychopharmacology*, 20140305, Aug, 2014, vol. 231, no. 16. pp. 3207-3215 ISSN 1432-2072; 0033-3158.

63. TAKEDA, S., MISAWA, K., YAMAMOTO, I. and WATANABE, K. Cannabidiolic Acid as a Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitory Component in Cannabis. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 20080612, Sep, 2008, vol. 36, no. 9. pp. 1917-1921 ISSN 1521-009X; 0090-9556.

64. BOLOGNINI, D., et al. Cannabidiolic Acid Prevents Vomiting in Suncus Murinus and Nausea-Induced Behaviour in Rats by Enhancing 5-HT1A Receptor Activation. *British Journal of Pharmacology*, 03, 2013, vol. 168, no. 6. pp. 1456-1470 PubMed. ISSN 1476-5381; 0007-1188.

65. TAKEDA, S., et al. Cannabidiolic Acid, a Major Cannabinoid in Fiber-Type Cannabis, is an Inhibitor of MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration. *Toxicology Letters*, 20120908, Nov 15, 2012, vol. 214, no. 3. pp. 314-319 ISSN 1879-3169; 0378-4274.
66. HILL, T.D., et al. Cannabidiol-Rich Cannabis Extracts are Anticonvulsant in Mouse and Rat Via a CB1 Receptor-Independent Mechanism. *British Journal of Pharmacology*, Oct, 2013, vol. 170, no. 3. pp. 679-692 ISSN 1476-5381; 0007-1188.
67. IZZO, A.A., et al. Non-Psychotropic Plant Cannabinoids: New Therapeutic Opportunities from an Ancient Herb. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20090902, Oct, 2009, vol. 30, no. 10. pp. 515-527 ISSN 1873-3735; 0165-6147.
68. FARRIMOND, J.A., WHALLEY, B.J. and WILLIAMS, C.M. Cannabinol and Cannabidiol Exert Opposing Effects on Rat Feeding Patterns. *Psychopharmacology*, 20120428, Sep, 2012, vol. 223, no. 1. pp. 117-129 ISSN 1432-2072; 0033-3158.
69. Mitchell Colbert. Cannabinoid Profile: Cannabigerolic Acid (CBGa). Prieiga per :<http://theleafonline.com/c/science/2014/08/cannabinoid-profiles-crash-course-cbga/>.
70. LUCAS, C.J., GALETTIS, P. and SCHNEIDER, J. The Pharmacokinetics and the Pharmacodynamics of Cannabinoids. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 20180807, Nov, 2018, vol. 84, no. 11. pp. 2477-2482 ISSN 1365-2125; 0306-5251.
71. LAPRAIRIE, R.B., BAGHER, A.M., KELLY, M.E. and DENOVA-WRIGHT, E.M. Cannabidiol is a Negative Allosteric Modulator of the Cannabinoid CB1 Receptor. *British Journal of Pharmacology*, 20151013, Oct, 2015, vol. 172, no. 20. pp. 4790-4805 ISSN 1476-5381; 0007-1188.
72. GROTENHERMEN, F. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 2003, vol. 42, no. 4. pp. 327-360 ISSN 0312-5963; 0312-5963.
73. SOLOWIJ, N., BROYD, S.J., VAN HELL, H.H. and HAZEKAMP, A. A Protocol for the Delivery of Cannabidiol (CBD) and Combined CBD and 9-Tetrahydrocannabinol (THC) by Vaporisation. *BMC Pharmacology & Toxicology*, 20141016, Oct 16, 2014, vol. 15. pp. 58-6511-15-58 ISSN 2050-6511; 2050-6511.
74. GASTON, T.E. and FRIEDMAN, D. Pharmacology of Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 20170110, May, 2017, vol. 70, no. Pt B. pp. 313-318 ISSN 1525-5069; 1525-5050.
75. DEGENHARDT, F., STEHLE, F. and KAYSER, O. Chapter 2 - the Biosynthesis of Cannabinoids. PREEDY, V. R. ed., San Diego: Academic Press, 2017, 2017 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128007563000028> ISBN 9780128007563. DOI <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00002-8>.
76. HUESTIS, M.A. Pharmacokinetics and Metabolism of the Plant Cannabinoids, Delta9-Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 2005, vol. (168):657-90. doi, no. 168. pp. 657-690 ISSN 0171-2004; 0171-2004.

77. LODZKI, M., et al. Cannabidiol-Transdermal Delivery and Anti-Inflammatory Effect in a Murine Model. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, Dec 12, 2003, vol. 93, no. 3. pp. 377-387 ISSN 0168-3659; 0168-3659.
78. DINIS-OLIVEIRA, R.J. Metabolomics of Delta9-Tetrahydrocannabinol: Implications in Toxicity. *Drug Metabolism Reviews*, 20160201, 2016, vol. 48, no. 1. pp. 80-87 ISSN 1097-9883; 0360-2532.
79. UJVARY, I. and HANUS, L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 20160301, Mar 1, 2016, vol. 1, no. 1. pp. 90-101 ISSN 2378-8763; 2378-8763.
80. IBEAS BIH, C., et al. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, Oct, 2015, vol. 12, no. 4. pp. 699-730 ISSN 1878-7479; 1878-7479.
81. ANDERSON, G.D. and CHAN, L.N. Pharmacokinetic Drug Interactions with Tobacco, Cannabinoids and Smoking Cessation Products. *Clinical Pharmacokinetics*, Nov, 2016, vol. 55, no. 11. pp. 1353-1368 ISSN 1179-1926; 0312-5963.
82. ZHU, H.J., et al. Characterization of P-Glycoprotein Inhibition by Major Cannabinoids from Marijuana. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20060126, May, 2006, vol. 317, no. 2. pp. 850-857 ISSN 0022-3565; 0022-3565.
83. JIANG, R., et al. Cannabidiol is a Potent Inhibitor of the Catalytic Activity of Cytochrome P450 2C19. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 20130115, 2013, vol. 28, no. 4. pp. 332-338 ISSN 1880-0920; 1347-4367.
84. LANDMARK, C.J. and BRANDL, U. Pharmacology and Drug Interactions of Cannabinoids. *Epileptic Disorders : International Epilepsy Journal with Videotape*, Jan 1, 2020, vol. 22, no. S1. pp. 16-22 ISSN 1950-6945; 1294-9361.
85. MOLERO GÓMEZ, A., PEREYRA LÓPEZ, C. and MARTINEZ DE LA OSSA, E. Recovery of Grape Seed Oil by Liquid and Supercritical Carbon Dioxide Extraction: A Comparison with Conventional Solvent Extraction. , March 1996, 1996 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923046795030409> ISBN 0923-0467. DOI [https://doi.org/10.1016/0923-0467\(95\)03040-9](https://doi.org/10.1016/0923-0467(95)03040-9).
86. ALADIĆ, K., et al. Supercritical CO₂ Extraction of Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Seed Oil. , 15 December 2015, 2015 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015302405> ISBN 0926-6690. DOI <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.016>.
87. Pavan M. V. Raja & Andrew R. Barron. *Basic Principles of Supercritical Fluid Chromatography and Supercritical Fluid Extraction*. , Jan 10, 2020 Prieiga per:57. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_\(Barron\)/03%3A_Principles_of_Gas_Chromatography/3.03%3A_Basic_Principles_of_Supercritical_Fluid_Chromatography_and_Supercritical_Fluid_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Book%3A_Physical_Methods_in_Chemistry_and_Nano_Science_(Barron)/03%3A_Principles_of_Gas_Chromatography/3.03%3A_Basic_Principles_of_Supercritical_Fluid_Chromatography_and_Supercritical_Fluid_Extraction). [žiūrėta 2020-01-20]

88. GRIJÓ, D.R., VIEITEZ OSORIO, I.A. and CARDOZO-FILHO, L. Supercritical Extraction Strategies using CO₂ and Ethanol to Obtain Cannabinoid Compounds from Cannabis Hybrid Flowers. , December 2018, 2018 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212982018304220> ISBN 2212-9820. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.09.022>.
89. RADWAN, M.M., WANAS, A.S., CHANDRA, S. and ELSOHLY, M.A. Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology S. CHANDRA, H. LATA and M.A. ELSOHLY eds., Cham: Springer International Publishing, 2017 Natural Cannabinoids of Cannabis and Methods of Analysis, pp. 161-182 ISBN 978-3-319-54564-6.
90. JOLANTA LIESIENĖ, G.B. Skysčių Ir Dujų Chromatografijos Pagrindai. Kaunas: Vitae Litera, 2007.
91. BRENNEISEN, R. Marijuana and the Cannabinoids M.A. ELSOHLY ed., Totowa, NJ: Humana Press, 2007 Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents, pp. 17-49 ISBN 978-1-59259-947-9.
92. FEKETE, S., et al. Implementation of a Generic Liquid Chromatographic Method Development Workflow: Application to the Analysis of Phytocannabinoids and Cannabis Sativa Extracts. , 5 June 2018, 2018 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708518304540> ISBN 0731-7085. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.059>.
93. CARDENIA, V., et al. Development and Validation of a Fast Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for the Determination of Cannabinoids in Cannabis Sativa L. , October 2018, 2018 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949818301066> ISBN 1021-9498. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.001>.
94. PELLEGRINI, M., MARCHEI, E., PACIFICI, R. and PICHINI, S. A Rapid and Simple Procedure for the Determination of Cannabinoids in Hemp Food Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Jan 4, 2005, vol. 36, no. 5. pp. 939-946 ISSN 0731-7085; 0731-7085.
95. HAZEKAMP, A., PELTENBURG, A., VERPOORTE, R. and GIROUD, C. Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies - J LIQ CHROMATOGR RELAT TECHNO, 09/01, 2005, vol. 28. pp. 2361-2382.
96. DE OLIVEIRA, G.L., et al. Cannabinoid Contents in Cannabis Products Seized in SÃO Paulo, Brazil, 2006, 2007. Forensic Toxicology, 06/01, 2008, vol. 26, no. 1. pp. 31-35 ISSN 1860-8973.
97. WATANABE, K. Drugs and Poisons in Humans: A Handbook of Practical Analysis O. SUZUKI and K. WATANABE eds., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005 Cannabinoids and their Metabolites, pp. 187-194 ISBN 978-3-540-27579-4.
98. IBRAHIM, E.A., et al. Determination of Acid and Neutral Cannabinoids in Extracts of Different Strains of Cannabis Sativa using GC-FID. Planta Medica, 20171213, Mar, 2018, vol. 84, no. 4. pp. 250-259 ISSN 1439-0221; 0032-0943.
99. NOESTHEDEN, M., et al. Chromatographic Characterisation of 11 Phytocannabinoids: Quantitative and Fit-to-Purpose Performance as a Function of Extra-Column Variance.

Phytochemical Analysis : PCA, 20180330, Sep, 2018, vol. 29, no. 5. pp. 507-515 ISSN 1099-1565; 0958-0344.

100. WANG, M., et al. Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry.

Cannabis and Cannabinoid Research, 20161201, Dec 1, 2016, vol. 1, no. 1. pp. 262-271 ISSN 2378-8763; 2378-8763.

101. AIZPURUA-OLAIZOLA, O., et al. Identification and Quantification of Cannabinoids in Cannabis Sativa L. Plants by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 20141023, Nov, 2014, vol. 406, no. 29. pp. 7549-7560 ISSN 1618-2650; 1618-2642.

102. STOLKER, A.A., et al. Determination of Cannabinoids in Cannabis Products using Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry. Journal of Chromatography.A, Nov 26, 2004, vol. 1058, no. 1-2. pp. 143-151 ISSN 0021-9673; 0021-9673.

103. CIOLINO, L.A., RANIERI, T.L. and TAYLOR, A.M. Commercial Cannabis Consumer Products Part 2: HPLC-DAD Quantitative Analysis of Cannabis Cannabinoids. , August 2018, 2018 Prieiga per: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073818302858> ISBN 0379-0738. DOI <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.05.033>.

104. Dynamic Headspace Gas Chromotography Analysis. Prieiga per:<https://www.jobilize.com/physics4/test/physical-components-of-a-gc-system-by-openstax>. [žiūrėta 2020-02-18]

105. FÄRSTER, J., et al. An Autonomous Flame Ionization Detector for Emission Monitoring. Journal of Sensors and Sensor Systems, 01/24, 2019, vol. 8. pp. 67-73.

106. LAURA MCGREGOR, D.B. A Guide to Modern Copenhensive Two-Dimensional Gas Chromotography, 2017-07-11, vol. 13, no. 10. pp. 2019-12-08.

107. CHERNUSHEVICH, I.V., LOBODA, A.V. and THOMSON, B.A. An Introduction to Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Mass Spectrometry : JMS, Aug, 2001, vol. 36, no. 8. pp. 849-865 ISSN 1076-5174; 1076-5174.

108. VERMA, S. and SANTOYO, E. High Performance Liquid and Ion Chromatography: Separation and Quantification Analytical Techniques for Rare Earth Elements. Geostandards and Geoanalytical Research, 09/01, 2007, vol. 31. pp. 161-184.

109. European Medicines Agency. ICH Topic Q2 (R1). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (CPMP/ICH/381/95). London, UK: ICH Guidelines, June 1995.

110. MOOSAVI, M. and GHASSABIAN, S., 04/25, 2018 Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability ISBN 978-1-78923-084-0.

Padėka

Dėkoju magistro baigiamojo darbo vadovui prof. dr. Petriui Rimantui Venskutoniui už parinktos temos aktualumą ir šiuolaikiškumą, idėjas, pastabas ir pagalbą rengiant baigiamąjį darbą. Taip pat dėkoju j. m. d. Renatai Baranauskienei už pagalbą atliekant tyrimus bei dokt. Laurai Tamkutei ir p. indž. Jovitai Mackelienei.