



KICK STARTING METHOD DEVELOPMENT FOR HEMP ANALYSIS USING CANNABIS AS EQUIVALENT MATERIAL

Kar-Weng CHAN

Department of Chemistry Malaysia, Ministry of Science, Technology and Innovation, Petaling Jaya, Malaysia

Abstract

Cannabis (or marijuana) is detrimental to humans because of its psychoactive effects. The plant materials of this genus have however been credited with its vast nutritional values. As its benefits outweigh harmful effects, some countries have legalized the use of fiber-type cannabis – a plant product called hemp. Hemp is deemed to contain delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) below the legal limit (e.g. <0.3% THC) and thus less psychoactive. It is safe to use hemp if it contains no or little THC. So the enforcement bodies must check its level to assure safety prior to sales. Notwithstanding this, hemp cultivation as well as consumption is not lawful in Malaysia. But recently, federal government has shown interest in growing and commercializing hemp. In this regard, an analytical method for identifying hemp must be developed. In the absence of hemp, a liquid chromatographic method was developed using cannabis plants as equivalent materials to mimic the target plant matrix. The validation procedure demonstrated that the method was able to achieve good selectivity with a detection limit =0.0005 mg/mL (or 0.008%) THC. It was precise (imprecision <3%) and accurate (recovery =98.76%) to quantify THC. The detector response was linear up to 0.05 mg/mL (0.8%) THC. This method is cheap and simple for routine application.

Keywords

Hemp; THC; HPLC; Fiber-type cannabis.

Received 10 October 2022; accepted 9 January 2023

Introduction

Cannabinoids extracted from *Cannabis sativa L.* have long been associated with both recreational and medical applications. Of 120 phytocannabinoids reported (Hanus, Meyer, Muñoz, Tagliatalata-Scafati, Appendino, 2016), delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) is primarily responsible for the psychoactive effects (especially euphoria and tachycardia) in human (Ameri, 1999). Consuming THC causes a feeling of ‘high’. Some people may experience heightened sensory perception, altered perception of time and appetite (NIDA, 2021). Owing to these desired effects by some users, cannabis is being rampantly abused throughout the world. To combat this drug, almost all

countries make it unlawful to grow, consume and distribute cannabis. Cannabis seized by the enforcement bodies in some countries such as Malaysia is highly likely brought in by smugglers through the black market. Profiling of cannabis can, to some extent, help to trace the scale of cannabis being smuggled into a country (Chan, 2014).

In the United States, cannabis is considered legal when this product is sold as hemp. Hemp contains less than 0.3% THC and the plant materials have been identified to have high nutritional values. For example, healthy fats from hemp seeds can reduce the risks of cardiovascular diseases (Prociuk et al., 2008; Richard, Ganguly, Steigerwald, Al-Khalifa, Pierce, 2007; WebMD, 2020). Other benefits have also been

discussed in the literature (Burton, Andres, Cole, Cowley, Augustin, 2022; Iftikhar et al., 2021; Rupasinghe, Davis, Kumar, Murray, Zheljzkov, 2020; Vonapartis, Aubin, Seguin, Mustafa, Charron, 2015). Hemp is considered safe because the low level of THC is believed to exert no psychoactive effects in users since this active compound is only effective at a higher therapeutic dosage.

To be widely sold as a commercial product, there is a need to establish an analytical method to test the THC level in hemp prior to sales. Bosa and Cole (2000) employed gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) to compare THC extracted from hemp oils. The findings showed that the THC concentrations ranged from 11.5 to 117.5 mg/g. On the other hand, Leizer, Ribnicki, Poulev, Dushenkov and Raskin (2000) found no THC but only traces of cannabidiol (CBD) in hemp seed oil. Lehmann, Sager and Brenneisen (1997) reported that 88% of the hemp oils analyzed using GCMS contained less than 50 µg/g THC. According to research, different plant parts can show different cannabinoid profiles, both quantitative and qualitative, based on its degree of maturity and the sex of the plant (Hemphill, Turner, Mahlberg, 1980).

Analysis utilizing gas phase techniques has heat associated limitations. Heating can decarboxylate and somehow oxidize or isomerize phytocannabinoids (Fodor, Molnár-Perl, 2017; Hazekamp, Peltenburg, Verpoorte, Giroud, 2005; Raharjo, Verpoorte, 2004). The measured amounts are thus less reliable. Alternatively, Berman et al. (2018) recommend employing liquid chromatography to quantify thermally labile compounds such as cannabinoids.

Recently, Malaysia plans to cultivate hemp as a commercial commodity. The legal limit for THC is tentatively set at 0.5%. At this juncture, lab analysis is necessary to complement this plan since the purity level of hemp must be verified before it is marketed and sold. However, the country has no hemp product for this analytical initiative, because hemp cultivation is prohibited altogether. Alternatively, the enforcement lab uses cannabis materials as a starting matrix to kick start the analytical work. To resolve heat related problems in analysis, high performance liquid chromatography (HPLC) is chosen for method development. Also, to ensure that the quantified THC amount is not the summed content of its acid form, a method that either can segregate or obviate the latter is preferred since the local government will use THC as a legal yardstick to approve the hemp products for sale.

Materials and method

Chemicals and solvents

(-)-Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) and cannabinol (CBN) were procured from Cerilliant (USA). THC carboxylic acid A solution (THCA) was obtained from Lipomed (Switzerland). Methanol and acetonitrile were respectively purchased from Merck and Fisher Scientific. Ultrapure water was generated from an ultrapure water system at a specific resistance of 18.2 MΩcm.

Instrumentation

Analysis was accomplished using a Waters e2695 Separations Module coupled with a Waters 2998 photodiode array detector. The system was preinstalled with a Kinetex 5 µm C18 100A (150 × 4.6 mm) column which was maintained at 35±5°C. Separation was achieved by flowing constantly 1 mL/min of 20 : 80 ultrapure water : acetonitrile in an isocratic manner. Data were acquired from 190 to 400 nm within a 9-min analysis time window. The UV max = 210 nm was set for quantitation for every 25 µL-aliquot injected.

Preparation of standard

Four ampules of 1 mg/mL THC in methanol were transferred into an amber bottle for storage. After mixing well, this stock solution was kept at 5±3°C. For calibration, 0.3 mL of the stock solution was pipetted into a 10 mL flask to which methanol was added to the mark to obtain 0.03 mg/mL THC.

Preparation of sample

Cannabis plant materials were broken down manually into smaller pieces (the smallest possible) and were mixed well by shaking the pieces in a plastic bag. Then, 60–100 mg of the materials were weighed out into a 10 mL flask before methanol was added to dissolve the sample. The entire sample solution was sonicated for 10 min prior to filtration through a nylon membrane. The resulting filtrate was transferred into a vial for analysis.

Partial method validation

A new method was developed and optimized beforehand using certified reference materials/standards of THC, CBD, CBN and THCA. After all parameters

(e.g. flow rate, column temperature, etc.) were optimized, the method was subjected to validation. Selectivity testing was accomplished using three samples from different sources containing all the above-mentioned cannabinoids to ensure good resolution was achieved. Consistency of quantitative data of the THC peak was tested on the intraday and inter-day basis using cannabis samples from two different sources and a 0.03 mg/mL THC standard. For linearity, ten levels ranging from 0.005 to 0.05 mg/mL were prepared in a series. The series was analyzed seven times on the same day and the data were utilized to evaluate linearity over the specified range. Next, a series of six low concentrations covering 0.0005 to 0.005 mg/mL THC was prepared in methanol to estimate the limit of detection (LOD). After that, three levels (0.0005, 0.001 and 0.002 mg/mL) were chosen to determine the limit of quantification (LOQ) based on how precise and accurate the obtained data were. Finally, three different cannabis samples were extracted and the extracts were spiked with 5, 15 and 22 μ L of 1 mg/mL THC for recovery testing.

Results

An initial study was conducted to check the THC level in cannabis using approximately 3 mg materials in 10 mL methanol. Flowering parts of cannabis samples

were analyzed. Table 1 summarizes the %THC content estimated using a 0.02 mg/mL calibrator at 25 μ L injection volume. After the weight for analysis and active range were determined, all quantitative work was then performed at 0.03 mg/mL as the calibration point.

Analysis of CBD, CBN, THC and THCA in a mixture prepared from standards as well as extracted from cannabis plants from three different sources was accomplished to check their separation. THCA was usually absent with the chosen mobile phase. Some amount of acid might be required in the mobile phase to visualize THCA. The addition of acid did not significantly disturb the retention time of THC. Figure 1 shows the chromatographic separation of these four compounds using acidic mobile phase. All major compounds eluted at specific retention times and THC was well separated from other peaks. Acid was then dismissed because THCA was not of interest.

For precision study, consistency of the THC peak was tested using a 0.03 mg/mL standard and two samples respectively containing 0.005 and 0.026 mg/mL THC. As such, the samples covered low and high levels below the calibration point. The samples were analyzed on the same day for ten times for intraday precision and once per day over ten days for interday precision. The gathered data were used to compute the relative standard deviation (RSD) value (Table 2) to infer imprecision. In this study, the highest RSD value obtained was 2.65%.

Table 1
%THC found in three samples of cannabis flowering parts

Sample	Weight taken (mg) A	HPLC reading (mg/mL) B	Total THC in 10 mL extract (mg/mL) C = B \times 10 mL	%THC C/A \times 100
A	3.0	0.007	0.070	2.3%
B	2.8	0.028	0.280	10%
C	3.3	0.048	0.480	14.5%

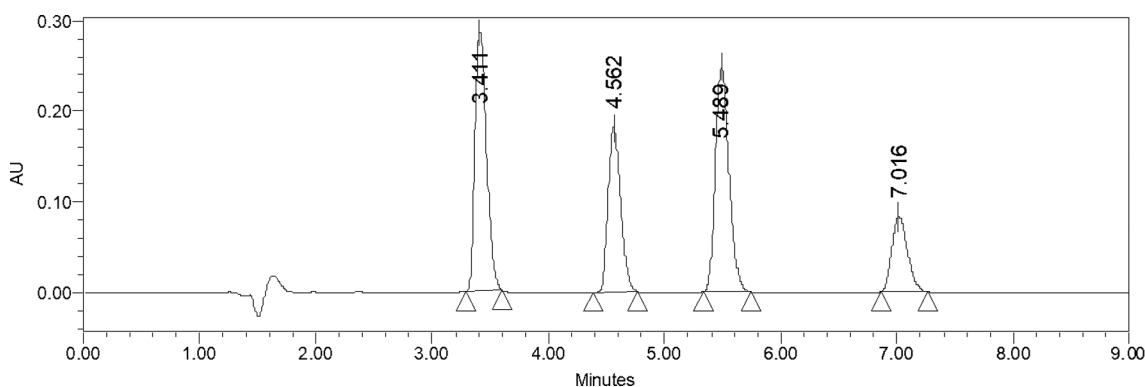


Figure 1. Resolution of CBD (3.41 min), CBN (4.56 min), THC (5.48 min) and THCA (7.01 min) within 9 minutes.

Table 2
Precision data (concentration in mg/mL) obtained with 10 injections

	Standard (0.030 mg/mL)		Sample 1		Sample 2	
	Mean	%RSD	Mean	%RSD	Mean	%RSD
Intraday (n = 10)	0.030	0.16	0.005	0.14	0.026	0.08
Interday (n = 10)	0.030	0.73	0.005	1.19	0.026	2.65

A series of standard solutions containing ten levels between 0.005 and 0.05 mg/mL THC was prepared for linearity study. All data (peak area) obtained from seven injections made at each level were used to plot a linear curve (Figure 2). Subsequently, the linear

equation and R² value were computed. In addition, another curve was plotted (Figure 3) using the same range but forced through the zero origin (0, 0). Both curves exhibited good linearity with a good R² value, whether or not they passed through the zero origin.

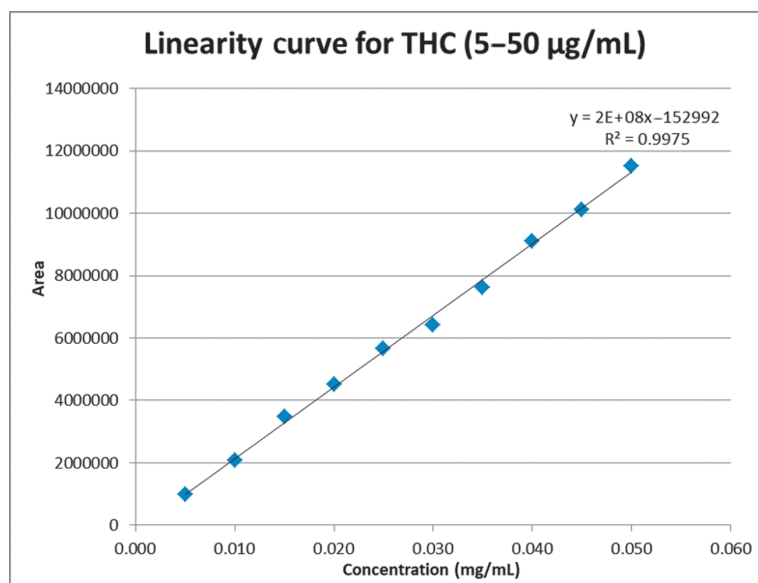


Figure 2. Linearity curve of THC.

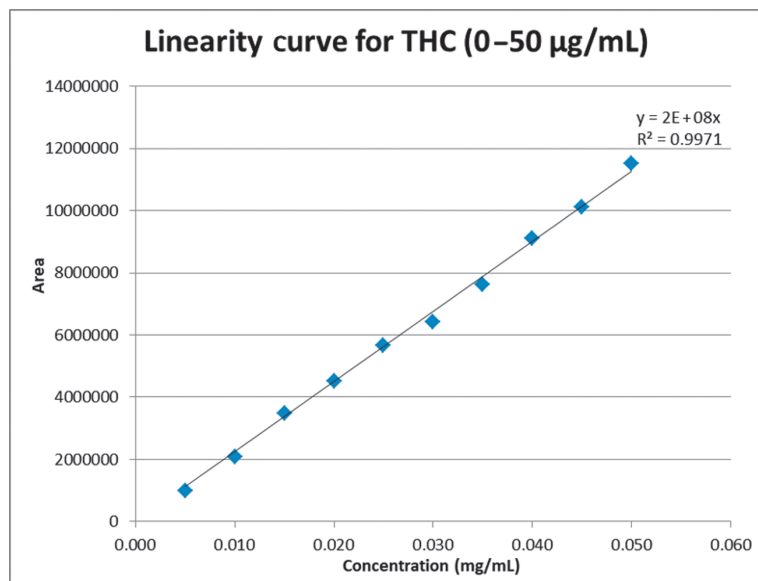


Figure 3. Linearity curve of THC going through zero origin.

Six low levels of THC covering 0.0005 to 0.005 mg/mL were tested to determine the lowest amount that exhibits at least 3 signal-to-noise (S/N) ratio. The THC peak at the lowest level tested, 0.0005 mg/mL is illustrated in Figure 4. Apparently, this amount achieved a much higher S/N ratio (significantly more than 3 S/N).

Subsequently, THC standards were prepared at 0.0005, 0.001 and 0.002 mg/mL to find the most reliable level for quantitation (or limit of quantification, LOQ). Table 3 summarizes the data obtained from 10 injections made at each level. The level at 0.0005 mg/mL (or the detection limit) showed good precision but its accuracy suffered. In contrast, 0.002 mg/mL was very promising in terms of precision and accuracy. Notwithstanding this, 0.001 mg/mL on average, should suffice since it fulfilled the minimum requirements of what the lab could tolerate for LOQ.

Table 3
Precision and accuracy data for LOQ testing

	Concentration (mg/mL)		
	0.0005	0.001	0.002
Mean	0.00032	0.00087	0.00183
RSD (%)	0.60	0.55	0.36
Accuracy (%)	64.76 ± 0.39	86.48 ± 0.48	91.55 ± 0.33

Accuracy/bias was checked via recovery study with spiked samples. Three levels of standards (5, 15 and 22 µL of 1 mg/mL THC) were spiked into the extracts of cannabis from three different sources (A–C) that contained a low amount of THC. These samples were analyzed over three days to obtain recovery data. Table 4 shows the %recovery calculated from three injections made at each level prepared from three different extracts. All data recorded >94% recovery.

Table 4
Recovery data of three extracts spiked with low, medium and high levels of THC

	Sample A	Sample B	Sample C
Low (n = 3)	98.04 ± 1.67%	94.85 ± 3.20%	94.29 ± 4.50%
Medium (n = 3)	99.39 ± 1.56%	103.44 ± 1.17%	99.11 ± 1.73%
High (n = 3)	99.60 ± 1.55%	99.68 ± 2.75%	100.41 ± 1.49%

Discussion

Setting calibration point and target analysis weight

Hemp is not available because Malaysia has not legalized hemp cultivation. However, the government has shown intentions to make hemp and its related products lawful; hence the enforcement lab must ensure that analytical methods for hemp analysis are available. To kick start method development without hemp, our lab opted for cannabis as an alternative material to mimic the hemp matrix.

Flowering parts of three cannabis sources were used to establish the best concentration range for analysis. These samples were bound to show a high level of THC and thus a relatively smaller weight should be used. So three samples weighing approximately 3 mg were prepared in 10 mL methanol respectively and filtered before analysis. According to Table 1, all the three samples contained >0.3% THC which indicates that they were drug-type cannabis.

For quantitative work below 0.5% in approximately 3 mg material, the concentration range should be around 0.0014 mg/mL. However, the range is rather too low and may not be accurate. So, it was decided to employ 0.03 mg/mL as the highest concentration

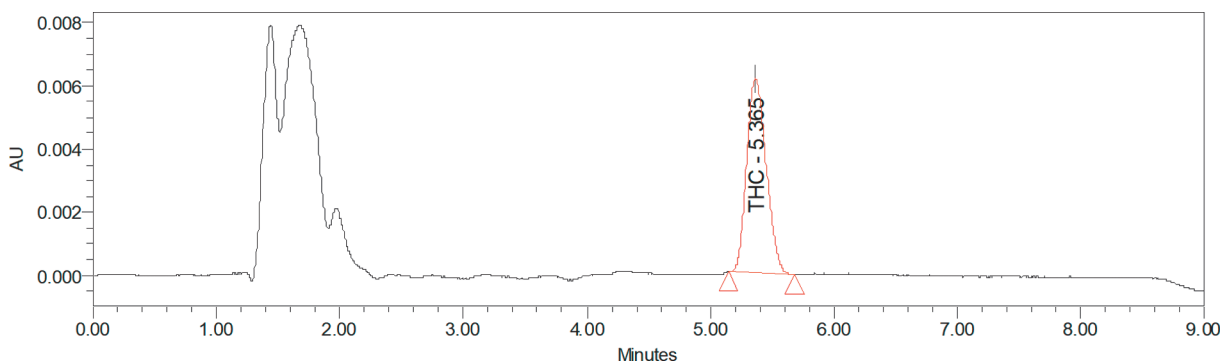


Figure 4. Chromatogram showing 0.0005 mg/mL THC.

point for quantitation. When the concentration was increased, the sample weight must also be manipulated in such a way that the measured THC level can fit into the target calibration range. For genuine hemp materials, it is deemed to contain a very low amount of THC. So the ideal weight of hemp material was tentatively set at 60 mg. Theoretically, an HPLC reading showing 0.03 mg/mL THC for a 60 mg material implies that the material contains $(0.03 \times 10/60) \times 100 = 0.5\%$ THC.

Selectivity

Selectivity testing is indispensable to ensure that the method is able to single out the target compound. To do this, the target peak must be free of interference. For this task, blank samples were not available as there is no real blank cannabis/hemp matrix. Alternatively, cannabis extracts were used to mimic the matrix background of hemp.

In cannabis, CBD, CBN and THC are present in measurable amounts because they serve as markers for the identification of the cannabis genus. Specifically in hemp, THCA is inevitably present in a quantifiable amount but it is often absent in cannabis due to rapid decomposition. As such, it is vital to separate THCA from THC to ensure that the THC peak is pure for accurate measurement. With the chosen mobile phase, THCA was hidden as it was better visualized when some acid was used in the eluting solvents. The chromatographic separation shown in Figure 1 confirms that THC is completely resolved from its neighbouring peaks including the visualized THCA. It grants a higher degree of assurance to quantify THC using the chosen mobile phase because THCA can be obviated. Chromatographic separation was again verified with samples from three different sources. The final results were likewise promising; there was no interference around the THC peak.

Precision

Precision is another crucial aspect in validation to ensure the data obtained are repeatable and reproducible. Imprecision is better expressed as relative standard deviation (RSD). Based on experience, our lab desires an RSD less than 5%. According to the data obtained from the three levels of THC (Table 2), the method showed an $RSD \leq 0.16\%$ on an intraday basis and $\leq 2.65\%$ on an interday basis. The overall consistency recorded an $RSD < 3\%$ which is considered excellent for accurate analysis.

Linearity

Linearity serves to check if the detector responds linearly within the specified range of concentrations. Practically, our lab aims to obtain a linear curve with an R^2 value > 0.995 . As illustrated in Figure 2, the method showed a linear relationship between the peak area and concentration (mg/mL) with an R^2 value = 0.9975. The findings signify that accurate quantitation is feasible for THC within the target range between 0.005 and 0.05 mg/mL.

Since one-point calibration is more convenient for routine analysis. Hence, it is necessary to check if any point along the linear line is reliable for this purpose. As indicated by the curve through the zero (0, 0) origin (Figure 3), the R^2 value was not significantly affected by the zero origin. This means that any point along the curve can be used to facilitate one-point calibration. As a result, it is decided to use 0.03 mg/mL as the routine calibration point for analysis. This point together with the origin should suffice to approximate similar linearity for quantitative analysis.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

It is imperative to know how low the method (as well as the instrument) can go to detect and measure the target analyte. For detection and quantitation, the S/N ratio must be at least 3 and 10 respectively.

From the series covering 0.0005 to 0.005 mg/mL THC, the lowest level was able to show a S/N ratio more than 3 (Figure 4). Certainly, the instrument was able to detect a much lower level but further testing was dismissed since anything below 0.0005 mg/mL (equivalent to 0.008% THC) was not of interest and therefore treated as traces. As such, LOD was set at 0.0005 mg/mL for this method.

Further analysis was carried out to determine LOQ at which level, the quantified amount is deemed reliable. In this sense, reliability lies in precision and accuracy of the level tested. This means, a level that exhibits the lowest RSD value with acceptable accuracy (estimation of the known concentration) will be treated as LOQ. In this regard, each level (0.0005, 0.001 and 0.002 mg/mL) was injected ten times consecutively and the precision data were computed. The obtained data in Table 3 display that the three levels were able to achieve a good level of consistency with an $RSD < 1\%$. However, when the accuracy was checked, the lowest level, 0.0005 mg/mL did not show promising results. Acceptable accuracy (which is $> 80\%$) was attained at 0.001 mg/mL and this was then set as the

LOQ for this method because this level met the minimum requirements to fit the need of the method.

Recovery

The last performance characteristic in this validation study was recovery. This characteristic can reflect the overall performance of the method with the presence of sample matrix, calibration curve and other environmental factors. To obtain THC at low levels for spiking, the sample matrix was first extracted from a very small amount of cannabis samples. Dilution was performed if the THC was still high. Then, the extracts from each source were spiked with appropriate amounts of THC to cover low, medium and high levels of THC below the 0.03 mg/mL calibration point. After that, the estimated amount and the spiked amount were compared to compute the percentage recovery. Table 4 shows that the recovery is excellent irrespective of the source of sample and its level. Overall, the method was able to achieve recovery = 98.76±3.35%. Such a recovery performance is ideal, indicating little matrix effects on the readings.

Further research

Further work should employ genuine hemp samples for analysis to ensure the method can work well for fresh plant materials. Besides, method verification must be performed with hemp samples to verify selectivity, precision and recovery. The genuine matrix is more practical to provide an overview of a list of cannabinoids to be included for selectivity testing.

Conclusion

Hemp analysis may be traditional to some countries but this type of analysis is certainly novel to Malaysia. It is because the local law does not allow people within the country to grow and use hemp (as well as cannabis). A turnaround emerged when the local government expressed interest in growing and commercializing hemp on the condition that the THC must be less than 0.5% – the legal limit. To heed this call, the enforcement lab has a role to play to ensure the ‘would-be’ hemp can meet the legal limit. As a result, the lab was urged to develop an analytical method to cater for this purpose. Unfortunately, hemp is not commonly available in Malaysia. Alternatively, an HPLC method was developed using cannabis to mimic hemp. The method proved to be accurate for THC

quantitation and easy for routine use. However, it has to be verified using hemp materials once the relevant matrices are available.

References

1. Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58(4), 315–348.
2. Berman, P., Futoran, K., Lewitus, G. M., Mukha, D., Benami, M., Shlomi, T., Meiri, D. (2018). A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis. *Scientific Reports*, 8, 14280. doi: 10.1038/s41598-018-32651-4. PMID: 30250104; PMCID: PMC6155167.
3. Bosy, T. Z., Cole, K. A. (2000). Consumption and quantitation of delta9-tetrahydrocannabinol in commercially available hemp seed oil products. *Journal of Analytical Toxicology*, 24(7), 562–566.
4. Burton, R. A., Andres, M., Cole, M., Cowley, J. M., Augustin, M. A. (2022). Industrial hemp seed: from the field to value-added food ingredients. *Journal of Cannabis Research*, 4, 45. doi: 10.1186/s42238-022-00156-7.
5. Chan, K. W. (2014). Validating a gas chromatography-mass spectrometric method and sample classification procedure for cannabis profiling using cannabinoids from case samples. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 46(4), 424–432.
6. Fodor, B., Molnár-Perl, I. (2017). The role of derivatization techniques in the analysis of plant cannabinoids by gas chromatography mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 95, 149–158.
7. Hanuš, L. O., Meyer, S. M., Muñoz, E., Tagliabue, S., Scalfati, O., Appendino, G. (2016). Phytocannabinoids: A unified critical inventory. *Natural Product Reports*, 33, 1357–1392.
8. Hazekamp, A., Peltenburg, A., Verpoorte, R., Giroud, C. (2005). Chromatographic and spectroscopic data of cannabinoids from Cannabis sativa L. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 2361–2382.
9. Hemphill, J. K., Turner, J. C., Mahlberg, P. G. (1980). Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of Cannabis sativa L. *Journal of Natural Products*, 43(1), 112–122.
10. Iftikhar, A., Zafar, U., Ahmed, W., Shabbir, M. A., Sameen, A., Sahar, A., Bhat, Z. F., Kowalczewski, P. Ł., Jarzębski, M., Aadil, R. M. (2021). Applications of Cannabis sativa L. in food and its therapeutic potential: From a prohibited drug to a nutritional supplement. *Molecules*, 26(24), 7699. doi: 10.3390/molecules26247699.
11. Lehmann, T., Sager, F., Brenneisen, R. (1997). Excretion of cannabinoids in urine after ingestion of cannabis seed oil. *Journal of Analytical Toxicology*, 21, 373–375.

12. Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, S., Raskin, I. (2000). The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, 2, 35–53.
13. NIDA (2021). What are marijuana's effects? Retrieved 2022, May 5 from <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/marijuana/what-are-marijuana-effects>.
14. Prociuk, M. A., Edel, A. L., Richard, M. N., Gavel, N. T., Ander, B. P., Dupasquier, C. M., Pierce, G. N. (2008). Cholesterol-induced stimulation of platelet aggregation is prevented by a hempseed-enriched diet. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 86, 153–159.
15. Raharjo, T. J., Verpoorte, R. (2004). Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: A review. *Phytochemical Analysis*, 15, 79–94.
16. Richard, M. N., Ganguly, R., Steigerwald, S. N., Al-Khalifa, A., Pierce, G. N. (2007). Dietary hemp seed reduces platelet aggregation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 424–425.
17. Rupasinghe, H. P. V., Davis, A., Kumar, S. K., Murray, B., Zheljzkov, V. D. (2020). Industrial hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an emerging source for value-added functional food ingredients and nutraceuticals. *Molecules*, 25(18), 4078. doi: 10.3390/molecules25184078.
18. Vonapartis, E., Aubin, M. P., Seguin, P., Mustafa, A. F., Charron, J. B. (2015). Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 8–12.
19. WebMD (2020). Hemp: Health benefits, nutrition, and uses. Retrieved 2022, May 5 from <https://www.webmd.com/diet/hemp-health-benefits-nutrition-uses#1>.

Corresponding author

Dr. Kar-Weng Chan
Department of Chemistry Malaysia
Ministry of Science, Technology and Innovation
Petaling Jaya 46661 Malaysia
e-mail: chankarweng@yahoo.com

OPRACOWANIE METODY ANALIZY KONOPI PRZEMYSŁOWYCH WYKORZYSTUJĄCEJ MARIHUANĘ JAKO ZAMIENNIK

Wstęp

Kannabinoidy, których nazwa wywodzi się od *Cannabis sativa L.*, od dawna mają zastosowanie zarówno rekreacyjne, jak i medyczne. Spośród 120 fitokannabinoidów opisywanych w pracach naukowych (Hanuš, Meyer, Muñoz, Taglialatela-Scafati, Appendino, 2016) delta-9-tetrahydrokannabinol (THC) jest głównym źródłem efektów psychoaktywnych (zwłaszcza euforii i tachykardii) u ludzi (Ameri, 1999). Spożycie THC powoduje tzw. „haj”. Niektóre osoby doświadczają wyczerlenia zmysłów oraz zaburzeń postrzegania czasu i apetytu (NIDA, 2021). Właśnie te wrażenia są powodem powszechności spożycia marihuany na świecie, w odpowiedzi na co prawie wszystkie kraje zdelegalizowały jej uprawę, spożycie i rozpowszechnianie. W niektórych krajach, takich jak Malesja, marihuana konfiskowana przez służby policyjne najczęściej pochodzi z przemytu. Profilowanie konopi może do pewnego stopnia pomóc w ocenie skali nielegalnego importu do danego kraju (Chan, 2014).

W Stanach Zjednoczonych prawo dopuszcza sprzedaż marihuany, o ile jest ona zaklasyfikowana jako przemysłowa odmiana konopi, która zawiera poniżej 0,3% THC, a badania naukowe wykazały jej dużą wartość odżywczą. Przykładowo – zdrowe tłuszcze zawarte w nasionach konopi przemysłowych zmniejszają ryzyko chorób sercowo-naczyniowych (Prociuk i in., 2008; Richard, Ganguly, Steigerwald, Al-Khalifa, Pierce, 2007; WebMD, 2020). Literatura naukowa omawia też inne korzyści z jej spożycia (Burton, Andres, Cole, Cowley, Augustin, 2022; Iftikhar i in., 2021; Rupasinghe, Davis, Kumar, Murray, Zheljazkov, 2020; Vonapartis, Aubin, Seguin, Mustafa, Charron, 2015). Konopie przemysłowe uznaje się za bezpieczne dla zdrowia, ponieważ uważa się, że niska zawartość THC nie wywołuje skutków psychoaktywnych, jako że efekty terapeutyczne tego związku uzyskuje się dopiero przy większych dawkach.

Przed dopuszczeniem konopi przemysłowych do powszechnej sprzedaży należy opracować metodę analizy zawartości THC w tej roślinie. Bosy i Cole (2000) wykorzystali technikę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (*gas chromatography-mass spectrometry*, GCMS) do porównania zawartości THC wyekstrahowanego z oleju konopi. Stwierdzone stężenia THC wahały się między 11,5 a 117,5 mg/g. Natomiast Leizer, Ribnicki, Poulev, Dushenkov i Raskin (2000) nie stwierdzili w oleju z nasion konopi żadnej zawartości THC, a jedynie śladowe ilości kannabidiolu (CBD). Lehmann, Sager i Brenneisen (1997) zaobserwowali, że 88% olejów konopnych analizowanych za pomocą GCMS zawierało

poniżej 50 µg/g THC. Badania dowodzą różnic w profilu kannabinoidowym zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym, w zależności od dojrzałości i płci danej rośliny (Hemphill, Turner, Mahlberg, 1980).

Metoda GCMS ma jednak ograniczenia związane z temperaturą. Wysoka temperatura prowadzi do dekarboksylacji fitokannabinoidów, a także do ich oksydacji lub izomeryzacji (Fodor, Molnár-Perl, 2017; Hazekamp, Peltenburg, Verpoorte, Giroud, 2005; Raharjo, Verpoorte, 2004), co zmniejsza wiarygodność odnotowywanych stężeń. Berman i in. (2018) zalecają stosowanie chromatografii cieczowej jako alternatywnej metody pomiaru zawartości związków podatnych na działanie temperatury, w tym kannabinoidów.

Rząd Malesji od niedawna rozważa wprowadzenie uprawy konopi siewnej i powszechnej sprzedaży jej produktów. Limit zawartości THC ustalono wstępnie na poziomie 0,5%. Tym samym zachodzi potrzeba przeprowadzenia badań laboratoryjnych dotyczących czystości konopi przed jej wprowadzeniem na rynek. Ponieważ jednak uprawa konopi przemysłowych jest w Malesji całkowicie zakazana, w kraju brakuje materiału niezbędnego do tej analizy, dlatego też zamiast konopi przemysłowych reprezentowane przez autorów niniejszej pracy laboratorium wykorzystuje próbki marihuany jako matrycę do analizy. Do tego celu wykorzystuje się wysokosprawną chromatografię cieczową (*high performance liquid chromatography*, HPLC), którą wybrano, żeby uniknąć problemów związanych z wysoką temperaturą. Dodatkowo aby mieć pewność, że zmierzony poziom THC nie jest sumą zawartości jego kwasowej pochodnej, zaistniała potrzeba znalezienia metody, która pozwoliłaby pochodną tę odseparować bądź usunąć, jako że to THC ma być planowo miarą do legalizacji sprzedaży produktów konopnych.

Materiały i metody

(-)-Delta-9-tetrahydrokannabinol (THC), kannabidiol (CBD) i kannabinol (CBN) pozyskano od firmy Ceriliant (USA). Roztwór A kwasu tetrahydrokannabinolowego (THCA) pozyskano od firmy Lipomed (Szwajcaria). Metanol i acetonitryl zakupiono odpowiednio od firm Merck i Fisher Scientific. Wodę ultraczystą wytworzono w systemie wody ultraczystej przy oporności właściwej 18,2 MΩcm.

Sprzęt badawczy

Do analizy wykorzystano moduł separacji Waters e2695 połączony z detektorem diodowym Waters 2998. Układ ten był wyposażony w kolumnę Kinetex 5 μm C18 100A (150 \times 4,6 mm), którą utrzymywano w temperaturze 35°C \pm 5°C. Separację wywołano za pomocą izokratycznej mieszaniny wody ultraczystej i acetonitrylu w stosunku 20 : 80 przepływającej ze stałą prędkością 1 mL/min. Dane pozyskano w zakresie 190–400 nm w 9-minutowych przedziałach pomiarowych. Pomiarów dokonano przy UV max = 210 nm na każde 25 μL wprowadzonej próbki.

Przygotowanie wzorca

Cztery ampułki zawierające 1 mg/mL THC w metanolu umieszczono w butli ze szkła bursztynowego. Po dokładnym wymieszaniu uzyskany roztwór wzorcowy przechowywano w temperaturze 5 \pm 3°C. W celu skalibrowania urządzenia odmierzone 0,3 mL roztworu wzorcowego do naczynia o pojemności 10 mL zawierającego metanol nalany do podziałki, uzyskując w ten sposób 0,03 mg/mL roztwór THC.

Przygotowanie próbek

Materiał roślinny pochodzący z konopi rozdrobniono ręcznie na jak najmniejsze części i dokładnie wymieszano, potrząsając je w plastikowej torbie. Następnie odmierzone porcje materiału o wadze 60–100 mg i wprowadzono do naczynia o pojemności 10 mL, po czym dodano metanol w celu rozpuszczenia próbki. Cały roztwór poddawano sonikacji przez 10 minut, a następnie przefiltrowano go przez nylonową membranę. Uzyskany filtrat przeniesiono do fiolki i poddano analizie.

Częściowa walidacja metody

Przed rozpoczęciem analizy opracowano i zoptymalizowano nową metodę badawczą na podstawie atestowanych materiałów i wzorców THC, CBD, CBN i THCA. Po zoptymalizowaniu wszystkich parametrów (szybkości przepływu, temperatury kolumny, itd.) rozpoczęto walidację metody. Selektywność zbadano na podstawie trzech próbek pobranych z różnych źródeł zawierających wszystkie wyżej wymienione kannabinoidy w celu zagwarantowania dobrej rozdzielczości. Spójność danych ilościowych odnoszących się do piku THC zbadano na podstawie próbek konopi pozyskanych z dwóch różnych źródeł i 0,03 mg/mL wzorca THC porównywanych w tym samym dniu oraz pomiędzy różnymi dniami. Liniowość zbadano serią pomiarów w zakresie od 0,005 do 0,05 mg/mL podzielonym na 10 stężeń. Serię powtórzono siedem razy tego samego dnia, a uzyskane dane

posłużyły do oceny liniowości w badanym zakresie. Granicę wykrywalności (*limit of detection*, LOD) oszacowano na podstawie sześciu roztworów THC w metanolu o niskim stężeniu, od 0,0005 do 0,005 mg/mL. Następnie wybrano trzy stężenia (0,0005, 0,001 i 0,002 mg/mL), które posłużyły do oceny granicy oznaczalności (*limit of quantification*, LOQ) w zależności od precyzji i dokładności otrzymanych wyników. Na koniec wyekstrahowano trzy różne próbki marihuany, a do ekstraktów dodano 5, 15 i 22 μL 1 mg/mL roztworu THC w celu zbadania odzysku.

Wyniki

Przeprowadzono wstępne badania mające na celu zmierzenie poziomu THC w konopi na podstawie próbek roślin o wadze 3 mg rozpuszczonych w 10 mL metanolu. Analizie poddano kwiatostany konopi. W tabeli 1 przedstawiono zawartość procentową THC oszacowaną za pomocą kalibratora o stężeniu 0,02 mg/mL wprowadzanego dawką o objętości 25 μL . Po ustaleniu wagi i zakresu aktywnego do analizy przeprowadzono analizę ilościową, dla której punktem kalibracji było zawsze 0,03 mg/mL.

Zmierzono zawartość CBD, CBN, THC oraz THCA w mieszaninie przygotowanej z materiałów referencyjnych oraz w próbkach marihuany uzyskanych z trzech różnych źródeł w celu zbadania separacji tych związków. THCA zazwyczaj nie występował w użytej fazie ruchomej. Pewna zawartość THCA w fazie ruchomej może być jednak potrzebna do jego wizualizacji. Dodatek THCA nie wpłynął istotnie na czas retencji THC. Na rycinie 1 pokazano separację chromatograficzną czterech wyżej wymienionych związków, wykonaną przy użyciu kwasowej fazy ruchomej. Elucja wszystkich najważniejszych związków następowała po określonych czasach retencji, a pik THC silnie wyróżniał się spośród pozostałych pików. THCA nie analizowano już dalej, ponieważ związek ten nie był celem badań.

W celu ustalenia precyzji pomiarów zbadano spójność piku THC za pomocą standardu o stężeniu 0,03 mg/mL oraz dwóch próbek zawierających odpowiednio 0,005 i 0,026 mg/mL THC, czyli próbek odpowiadających małej i dużej zawartości THC poniżej punktu kalibracji. Próbki analizowano dziesięciokrotnie w ciągu tego samego dnia oraz porównywano je raz dziennie z wynikami osiągniętymi w innych dniach przez okres 10 dni. Na podstawie uzyskanych danych obliczono względne odchylenie standardowe (RSD) w celu ustalenia nieścisłości pomiarów (Tabela 2). Największa uzyskana w badaniach wartość RSD wynosiła 2,65%.

Do zbadania liniowości wykorzystano próbki zawierające dziesięć różnych stężeń THC w przedziale od 0,005 do 0,05 mg/mL. Na podstawie wszystkich danych (powierzchni pików) uzyskanych z siedmiu iniekcji na każde stężenie sporządzono wykres krzywej liniowej

(Rycina 2), po czym obliczono równanie liniowe i R^2 . Dodatkowo sporządzono wykres innej krzywej (Rycina 3) w tym samym zakresie, ale przeprowadzonej przez początek układu współrzędnych (0, 0). Obie krzywe charakteryzowały się dobrą liniowością i dobrą wartością R^2 niezależnie od tego, czy przechodziły przez początek układu współrzędnych.

Zbadano sześć niskich stężeń THC w zakresie od 0,0005 do 0,005 mg/mL w celu ustalenia najmniejszego stężenia charakteryzującego się stosunkiem sygnału do szumu (*signal-to-noise*, S/N) wynoszącym co najmniej 3. Na rycinie 4 pokazano pik THC uzyskany dla najniższego z badanych stężeń, czyli 0,0005 mg/mL. Z ryciny wynika, że stężenie to dało bardzo duży stosunek S/N (znacząco większy niż 3).

Następnie przygotowano standardy THC o stężeniach 0,0005, 0,001 oraz 0,002 mg/mL w celu znalezienia najbardziej wiarygodnego poziomu do oznaczeń ilościowych (czyli do oceny LOQ). W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy 10 iniekcji 10 wspomnianych stężeń THC. Stężenie 0,0005 mg/mL (czyli LOD) wykazało się dobrą precyzją, ale małą dokładnością, podczas gdy stężenie 0,002 mg/mL okazało się obiecujące zarówno pod względem precyzji, jak i dokładności. Niemniej jednak stężenie 0,001 mg/mL powinno w większości przypadków wystarczyć, jako że odpowiada ono minimalnej LOQ dopuszczalnej przez laboratorium.

Dokładność i obciążenie metody ustalono, oznaczając próbki o znanej zawartości THC. Do ekstraktów z konopi o niskiej zawartości THC pochodzących z trzech różnych źródeł (A–C) dodano znane ilości standardów (5, 15 oraz 22 μ L THC o stężeniu 1 mg/mL). Próbki te oznaczano przez następne trzy dni, aby uzyskać dane o odzysku. W tabeli 4 przedstawiono wartości procentowe odzysku obliczone na podstawie iniekcji zawierających ww. znane stężenia THC (po trzy iniekcje na każde stężenie) sporządzone z trzech różnych ekstraktów. Wszystkie wyniki charakteryzowały się odzyskiem na poziomie >94%.

Dyskusja

Ustalenie punktu kalibracji i wagi do analizy

Konopie przemysłowe nie są dostępne w Malezji, ponieważ ich uprawa jest nielegalna. Rząd Malezji wykazuje jednak wolę legalizacji tej rośliny i produktów z niej pochodzących, stąd potrzeba opracowania metody analizy konopi przez laboratorium reprezentowane przez autorów niniejszej pracy. Aby rozpocząć prace nad opracowaniem takiej metody bez dostępu do konopi przemysłowych, laboratorium zdecydowało się zamiast nich zastosować marihuanę.

Na podstawie analizy kwiatostanów pochodzących z trzech źródeł ustalono optymalny zakres stężeń do oznaczeń. Ponieważ można było spodziewać się wysokiej zawartości THC w próbkach, do oznaczeń odważono niewielkie ilości. Trzy próbki o wadze około 3 mg rozpuszczono w 10 mL metanolu i przefiltrowano przed oznaczeniem. Jak pokazuje tabela 1, wszystkie trzy próbki zawierały >0,3% THC, co wskazuje, że rośliny były marihuaną.

Dla oznaczenia zawartości poniżej 0,5% w ok. 3 mg materiału stężenie powinno oscylować wokół wartości 0,0014 mg/mL. Ponieważ jednak zakres taki jest bardzo niski, przez co obniża się dokładność pomiaru, zdecydowano, że wartość 0,03 mg/mL będzie najwyższym stężeniem wykorzystywanym do oznaczeń ilościowych. Przy wzroście stężenia należy również zmodyfikować wagę próbki, tak żeby oznaczana zawartość THC mieściła się w docelowym zakresie kalibracji. Ponieważ produkty pochodzące z konopi przemysłowych zawierają bardzo niewielkie ilości THC, optymalną wagę próbek ustalono wstępnie na 60 mg. Wynik HPLC wynoszący 0,03 mg/mL, uzyskany dla próbki o wadze 60 mg, teoretycznie oznacza, że próbka zawiera $(0,03 \times 10/60) \times 100 = 0,5\%$ THC.

Selektywność

Aby dana metoda pozwalała wykryć konkretny związek, musi mieć ona znaną selektywność. Oznacza to, że pik oznaczanego związku musi być wolny od interferencji. W przypadku niniejszych badań puste próbki nie były dostępne, jako że w praktyce nie istnieje matryca konopi przemysłowej. Jako substytut takiej matrycy zastosowano więc ekstrakty z marihuany.

Marihuana zawiera mierzalne ilości CBD, CBN i THC, związki te stosuje się jako markery do identyfikacji roślin z rodzaju konopi. W szczególności THCA występuje w konopi przemysłowej w wykrywalnej ilości, ale często nie występuje on w marihuanie, w której ulega szybkiemu rozkładowi. Tym samym niezbędne jest wyizolowanie THCA od THC, żeby uzyskać czysty pik THC pozwalający na dokładne oznaczenie. Zastosowana faza mobilna nie pozwalała na wykrycie THCA. Dodanie kwasu do eluentu poprawiało wizualizację. Jak pokazano na rycinie 1, separacja chromatograficzna potwierdziła, że THC mocno wyróżnia się spośród sąsiadujących pików, w tym piku wizualizowanego THCA. Metoda ta daje większą pewność prawidłowego oznaczenia zawartości THC przy zastosowaniu wyżej wskazanej fazy mobilnej, ponieważ pozwala ona na usunięcie THCA. Skuteczność przeprowadzonych badań chromatograficznych potwierdzono ponownie na podstawie próbek pochodzących z trzech różnych źródeł. Także i w tym przypadku wyniki końcowe były obiecujące – nie stwierdzono interferencji wokół piku THC.

Precyzja

Innym bardzo ważnym aspektem walidacji jest zapewnienie powtarzalności i odtwarzalności uzyskanych wyników. Nieścisłość dobrze jest wyrazić w postaci RSD. Na podstawie własnego doświadczenia laboratorium, w którym pracują autorzy niniejszego artykułu, dąży do uzyskania RSD na poziomie poniżej 5%. Dane otrzymane na podstawie wspomnianych trzech stężeń THC (Tabela 2) pokazują, że metoda charakteryzowała się $RSD \leq 0,16\%$ dla pomiarów wykonywanych tego samego dnia oraz $RSD \leq 2,65\%$ dla pomiarów porównywanych między różnymi dniami. Pod względem ogólnej spójności stwierdzono RSD na poziomie $<3\%$, co jest znakomitym wynikiem pozwalającym na bardzo dokładne oznaczenia.

Liniowość

Liniowość to inaczej miara tego, czy detektor daje wyniki liniowe w obrębie danego zakresu stężeń. W praktyce badawczej w naszym laboratorium dąży się do osiągnięcia krzywej o wartości $R^2 > 0,995$. Jak pokazuje rycina 2, zastosowana metoda charakteryzuje się liniowym związkiem pomiędzy polem powierzchni pików a stężeniem (mg/mL), osiągając wartość $R^2 = 0,9975$. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że dokładna analiza ilościowa THC jest możliwa w docelowym zakresie wynoszącym między 0,005 a 0,05 mg/mL.

Ponieważ wygodnym rozwiązaniem w przypadku rutynowych oznaczeń jest kalibracja jednopunktowa, należy sprawdzić, czy któryś z punktów na linii prostej może wiarygodnie posłużyć do tego celu. Krzywa przeprowadzona przez początek układu współrzędnych (0, 0) (Rycina 3) pokazuje, że początek układu nie wpłynął znacząco na wartość R^2 , co oznacza, że każdy punkt na krzywej można wykorzystać do kalibracji jednopunktowej. Postanowiono więc wykonać rutynowo kalibrację do badań na podstawie punktu 0,03 mg/mL. Punkt ten oraz początek układu współrzędnych powinny wystarczyć do osiągnięcia zbliżonej liniowości do celów analizy ilościowej.

Granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ)

Znajomość dolnych granic przydatności metody (i narzędzia pomiarowego) do wykrywania danego analitu jest niezwykle ważna. Stosunek S/N musi wynosić co najmniej 3 i 10, aby możliwe było odpowiednio wykrycie i oznaczenie analitu.

Najniższe stężenie THC z zakresu od 0,0005 do 0,005 mg/mL charakteryzowało się stosunkiem S/N > 3 (Ryc. 4). Nie ulega wątpliwości, że użyte urządzenie było w stanie wykryć znacznie mniejsze ilości, ale takich

pomiarów nie wykonano, gdyż stężenia poniżej 0,0005 mg/mL (co odpowiada zawartości THC wynoszącej 0,008%) nie były tematem niniejszych badań i uznawano je za ilości śladowe. Tym samym przyjęto wartość LOD dla tej metody równą 0,0005 mg/mL.

Przeprowadzono dalszą analizę w celu określenia wartości LOQ, dla której wyniki byłyby wiarygodne. Wiarygodność w tym wypadku zależy od precyzji i dokładności analizowanych stężeń. Tak więc stężenie charakteryzujące się najmniejszą wartością RDS i dopuszczalną dokładnością (pomiar znanego stężenia) przyjmuje się za LOQ. Każde z trzech stężeń (0,0005, 0,001 oraz 0,002 mg/mL) zanalizowano po kolei 10 razy i obliczono precyzję. Jak wynika z tabeli 3, wszystkie trzy stężenia osiągnęły dobrą spójność ($RSD < 1\%$). Natomiast w pomiarze dokładności najmniejsze stężenie (0,0005 mg/mL) nie przyniosło obiecujących wyników. Dopuszczalną dokładność ($>80\%$) osiągnięto dla stężenia 0,001 mg/mL – wartość tę przyjęto następnie jako LOQ, jako że właśnie to stężenie spełniło minimalne wymagania stawiane omawianej metodzie.

Odzysk

Ostatnią cechą badaną w celu walidacji metody był odzysk. Odzysk odzwierciedla ogólną skuteczność metody w odniesieniu do matrycy próbek, krzywej kalibracyjnej i innych czynników środowiskowych. Aby otrzymać niskie stężenia THC potrzebne do sporządzenia roztworów o znanym stężeniu, wyekstrahowano matrycę próbki z bardzo niewielkiej ilości marihuany. Jeśli otrzymane stężenie THC było zbyt wysokie, roztwór rozcieńczano. Do ekstraktów z poszczególnych źródeł dodano znane ilości THC, otrzymując próbki o niskim, średnim i wysokim stężeniu THC niższym od punktu kalibracji, który wynosił 0,03 mg/mL. Następnie na podstawie oznaczonych i znanych stężeń obliczono procent odzysku. Wyniki przedstawione w tabeli 4 dowodzą, że poziom odzysku był bardzo wysoki niezależnie od źródła próbki i stężenia. Ogólna wartość odzysku uzyskana badaną metodą wynosiła $98,76 \pm 3,35\%$. Ten prawie perfekcyjny odzysk świadczy, że matryca miała niewielki wpływ na wyniki.

Przyszłe badania

W przyszłości warto przeprowadzić badania na autentycznych konopiach przemysłowych w celu ustalenia skuteczności metody w przypadku świeżego materiału roślinnego. Dodatkowo na podstawie próbek konopi przemysłowych należy zbadać selektywność, precyzję i odzysk metody. Matryca uzyskana z autentycznej konopi przemysłowej byłaby bardziej praktycznym środkiem służącym do stworzenia listy kannabinoidów przeznaczonych do badań selektywności.

Wnioski

O ile analiza konopi przemysłowych to powszechna praktyka w niektórych krajach, w Malezji jest ona nowością. Powodem jest obowiązujący w kraju zakaz ich uprawy i użytkowania (także marihuany). Punkt zwrotny nastąpił, gdy rząd Malezji wyraził zainteresowanie ich uprawą i komercjalizacją pod warunkiem, że zawartość THC nie przekroczy prawnie dopuszczalnej granicy 0,5%. Ponieważ jednym z zadań laboratorium, którego pracownikami są autorzy niniejszej pracy, jest zapewnienie zgodności przyszłych upraw z tą granicą, rząd zwrócił się doń z prośbą o opracowanie metody pozwalającej na taką właśnie analizę. Niestety, konopie przemysłowe nie są powszechnie dostępne w Malezji, dlatego też opracowano metodę, w której jako ich substytutu użyto marihuany. Metoda ta daje dokładne wyniki zawartości THC i jest łatwa w rutynowym zastosowaniu. Musi jednak zostać zweryfikowana na podstawie próbek konopi przemysłowych, kiedy już odpowiednie matryce staną się dostępne.