

Određivanje odabranih kanabinoida UHPLC-MS/MS tehnikom

Adžić, David

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:522007>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE ODABRANIH KANABINOIDA
UHPLC-MS/MS TEHNIKOM

DIPLOMSKI RAD

DAVID ADŽIĆ

Matični broj: 149

Split, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJA
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ODREĐIVANJE ODABRANIH KANABINOIDA
UHPLC-MS/MS TEHNIKOM

DIPLOMSKI RAD

DAVID ADŽIĆ

Matični broj: 149

Split, srpanj 2022.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

DETERMINATION OF SELECTED CANNABINOIDS
USING UHPLC-MS/MS TECHNIQUE

MASTER THESIS

DAVID ADŽIĆ

Parent number: 149

Split, July 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

Mentor: doc. dr. sc. Franko Burčul

ODREĐIVANJE ODABRANIH KANABINOIDA UHPLC-MS/MS TEHNIKOM

David Adžić, 149

Sažetak:

Kanabinoidi su spojevi koji se u posljednje vrijeme sve više istražuju radi svojih ljekovitih svojstava. Od osobite su važnosti nepsihoaktivni spojevi poput kanabidiola te njegovi derivati i metaboliti. Tekućinska kromatografija je jedna od najnaprednijih separacijskih tehnika u analitičkoj kemiji. U sprezi s detektorom masa u tandemu predstavlja i moćnu identifikacijsku i kvantifikacijsku tehniku. U radu je korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s detektorom masa s trostrukim četveropolom kao analizatorom u svrhu kvantitativnog i kvalitativnog određivanja kanabidiola, njegovog kiselinskog derivata – kanabidiolne kiseline te dva najznačajnija metabolita: 7-hidroksikanabidiola i 7-karboksikanabidiola.

Ključne riječi: kanabidiol, kanabidiolna kiselina, 7-hidroksikanabidiol, 7-karboksikanabidiol, tekućinska kromatografija, validacija, spektrometrija masa s trostrukim četveropolom

Rad sadrži: 38 stranica, 12 slika, 8 tablica i 20 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---------------------------------------|----------------------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević | - predsjednik povjerenstva |
| 2. dr. sc. Sanja Radman, znanstv. sur | - član |
| 3. doc. dr. sc. Franko Burčul | - član-mentor |

Datum obrane: 19. srpnja 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog Fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

MASTER THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 25.

Mentor: Assistant Professor Franko Burčul, PhD

DETERMINATION OF SELECTED CANNABINOIDS USING UHPLC-MS/MS TECHNIQUE

David Adžić, 149

Abstract:

In the recent times cannabinoids have been increasingly researched for their medicinal properties. Non-psychoactive compounds such as cannabidiol and its derivatives and metabolites are of particular importance. Liquid chromatography is one of the most advanced separation techniques in analytical chemistry. When coupled with a tandem mass detector it represents a powerful identification and quantification technique. In this diploma thesis a high-performance liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass detector was used for the quantitative and qualitative determination of cannabidiol, its acid derivative - cannabidiolic acid, and the two most important metabolites: 7-hydroxycannabidiol and 7-carboxycannabidiol.

Keywords: cannabidiol, cannabidiolic acid, 7-hydroxycannabidiol, 7-carboxycannabidiol, liquid chromatography, validation, triple quadrupole mass spectrometry

Thesis contains: 38 pages, 12 pictures, 8 tables and 20 literature references

Original in Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|----------------|
| 1. Associate Professor Ivica Blažević, PhD | - chair person |
| 2. Sanja Radman, PhD, Research Associate | - member |
| 3. Assistant Professor Franko Burčul, PhD | - supervisor |

Defense date: July 19, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula u razdoblju od veljače 2022. do srpnja 2022. godine.

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem mentoru doc. dr. sc. Franku Burčulu na savjetima, pomoći i objašnjenjima prilikom izrade završnog rada. Također, zahvaljujem dr. sc. Sanji Radman na srdačnosti, strpljenju i odvojenom vremenu za svako moje pitanje. Na koncu zahvaljujem prijateljima, ali posebno roditeljima na strpljenju, razumijevanju i potpori tijekom studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Razviti metodu koja omogućava razdvajanje i kvantitativno određivanje četiri kanabinoide: kanabidiol, kanabidiolna kiselina, 7-hidroksikanabidiol i 7-karboksikanabidiol pomoću UHPLC-MS/MS tehnike.
2. Optimizirati metodu u svrhu kvantitativne analize četiri prethodno navedena kanabinoide koristeći tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti spregnutu sa spektrometrom masa.
3. Pronaći kvantifikacijske i potvrdne pikove za svaki spoj te protumačiti spektar masa.
4. Izvršiti validaciju metode kako bi se utvrdila mogućnost kvalitativne i kvantitativne analize.

SAŽETAK

Kanabinoidi su spojevi koji se u posljednje vrijeme sve više istražuju radi svojih ljekovitih svojstava. Od osobite su važnosti nepsihoaktivni spojevi poput kanabidiola te njegovi derivati i metaboliti. Tekućinska kromatografija je jedna od najnaprednijih separacijskih tehnika u analitičkoj kemiji. U sprezi s detektorom masa u tandemu predstavlja i moćnu identifikacijsku i kvantifikacijsku tehniku. U radu je korištena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti spregnuta s detektorom masa s trostrukim četveropolom kao analizatorom u svrhu kvantitativnog i kvalitativnog određivanja kanabidiola, njegovog kiselinskog derivata – kanabidiolne kiseline te dva najznačajnija metabolita: 7-hidroksikanabidiola i 7-karboksikanabidiola.

Ključne riječi: kanabidiol, kanabidiolna kiselina, 7-hidroksikanabidiol, 7-karboksikanabidiol, tekućinska kromatografija, validacija, spektrometrija masa s trostrukim četveropolom

ABSTRACT

In the recent time cannabinoids have been increasingly researched for their medicinal properties. Non-psychoactive compounds such as cannabidiol and its derivatives and metabolites are of particular importance. Liquid chromatography is one of the most advanced separation techniques in analytical chemistry. When coupled with a tandem mass detector it represents a powerful identification and quantification technique. In this diploma thesis a high-performance liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass detector was used for the quantitative and qualitative determination of cannabidiol, its acid derivative - cannabidiolic acid, and the two most important metabolites: 7-hydroxycannabidiol and 7-carboxycannabidiol.

Keywords: cannabidiol, cannabidiolic acid, 7-hydroxycannabidiol, 7-carboxycannabidiol, liquid chromatography, validation, triple quadrupole mass spectrometry

SADRŽAJ

UVOD	1
1. OPĆI DIO.....	2
1.1. Kanabidiol i njegovi derivati	2
1.2. Kromatografija	3
1.2.1. Tekućinska kromatografija	4
1.2.2. Princip rada.....	5
1.3. Spektrometrija masa	6
1.3.1. Princip rada.....	6
1.3.2. Vrste ionizacije	7
1.3.3. Vrste analizatora masa.....	8
1.4. Validacija.....	10
2. EKSPERIMENTALNI DIO	12
2.1. Korištene kemikalije i oprema.....	12
2.2. Odabir otapala	12
2.3. Priprema otopina	13
2.3.1. Priprema otopina za optimizaciju MS/MS fragmentacije	13
2.3.2. Priprema standardnih otopina za UHPLC analizu.....	13
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	14
3.1. Optimizacija UHPLC metode.....	14
3.2. Optimizacija parametara spektrometrije masa	15
3.3. Optimizacija MS/MS parametara i rješavanje spektara masa/fragmentacije kanabinoida od interesa u svrhu kvantifikacije	19
3.3.1. Rješavanje spektara masa izabranih kanabinoida.....	20
3.4. Validacija metode.....	27
3.4.1. Selektivnost	27
3.4.2. Linearnost.....	27
3.4.3. Preciznost i točnost.....	29
3.4.4. Granica dokazivanja i određivanja	30
3.4.5. Robusnost	31
4. ZAKLJUČAK.....	33
5. LITERATURA	34

UVOD

Kanabinoidi su najpoznatiji spojevi koji se nalaze u biljci *Cannabis sativa* L. Znanost se za njih počinje zanimati u ranim devedesetim godinama zbog potencijalnih ljekovitih svojstava, osobito u liječenju psihičkih, ali i drugih oboljenja. Napretkom znanosti i tehnologije ovi se spojevi povremeno počinju izolirati iz biljnog materijala. Kromatografske tehnike se u ovom području pokazuju kao ključan faktor. [1]

Najpoznatiji spoj, koji je ujedno i najzastupljeniji u samoj biljci je kanabidiol. Kanabidiol se u ljudskom organizmu metabolizira u 7-hidroskikanabidiol i 7-karboksikanabidiol. [2] Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti predstavlja jednu od najmoćnijih tehnika koje se koriste u svrhu odvajanja komponenti smjese uzorka, ali i u svrhu kvantifikacije tih komponenti. Odvajanje se vrši na osnovu mnogih kemijskih i fizikalnih svojstava (ovisno od odabira kolone), a najčešće se vrši odvajanje na temelju razlike u polarnosti komponenti u smjesi. Ova tehnika je gotovo uvijek sparena sa UV-Vis detektorom, a često je spregnuta s nekom vrstom spektrometrije masa. [3]

Postoje mnoge izvedbe spektrometra masa, ali najznačajnije su tehnike koje kombiniraju više analizatora masa. Ovakve kombinacije uključuju trostruki četveropol (engl. *Quadrupole, Q*), ali i kombinacije poput četveropol-analizator vremena leta (engl. *Quadrupole-Time of Flight Analyser, QTOF*). Spregnuti višestruki analizatori povećavaju specifičnost. Ovakve izvedbe predstavljaju unaprjeđenje u odnosu na klasične, a danas najraširenije analitičke tehnike u farmaceutici. [3, 4]

Cilj diplomskog rada bio je razviti analitičku metodu za određivanje prethodno spomenutog kanabidiola i njegovih derivata uz naglasak na rješavanje spektra masa i razmatranje selektivne moći UHPLC-MS/MS tehnike.

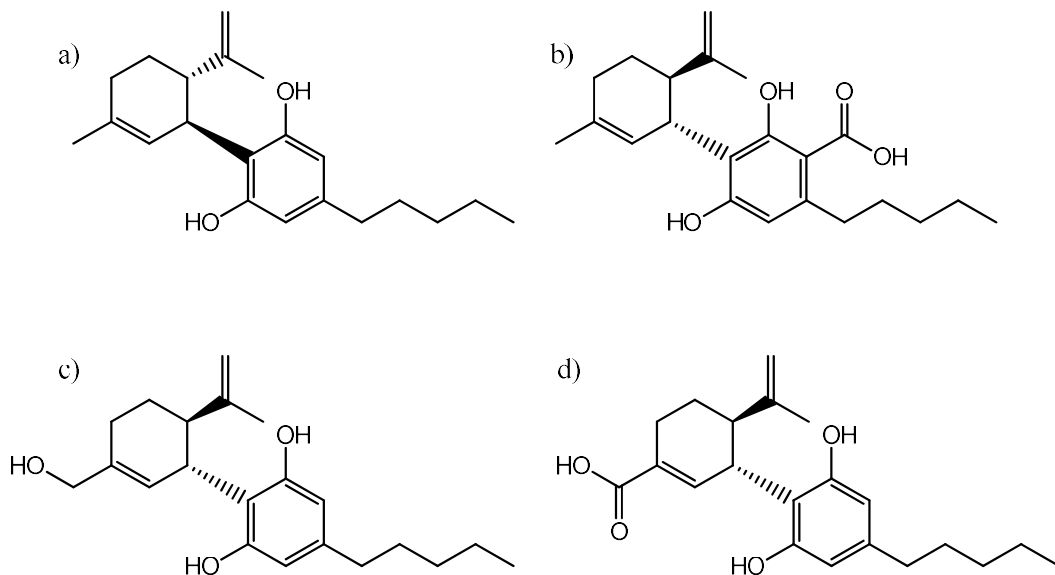
1. OPĆI DIO

1.1. Kanabidiol i njegovi derivati

Kanabidiol (engl. *Cannabidiol*, *CBD*) je udjelom najzastupljeniji kanabinoid u biljci *Cannabis sativa* L. To je nepsihotropna komponenta zanimljiva zbog svojih neuroprotektivnih, analgetičkih, protuepileptičnih, protuupalnih, protutumorskih i mnogih drugih djelovanja [1]. Najbolja metoda ekstrakcije kanabidiola iz biljnog materijala se pokazala ekstrakcija pomoću superkritičnog ugljikovog dioksida (CO_2), a ekstrakcija se vrši pri nižim tlakovima (200-500 bara) radi povećanja iscrpka ovog spoja [2]. Kada je u pitanju sinteza navedenog spoja postoje mnogi pristupi, a najpoznatiji su oni koji uključuju Friedel-Craftsovo alkiliranje gdje nastaje racemat, koji je nepoželjan pa se vrše razne modifikacije. [3]

Kanabidiolna kiselina (engl. *Cannabidiolic acid*, *CBDA*) je najzastupljeniji derivat kanabidiola, a riječ je o kiselinskom (karboksilnom) derivatu kanabidiola. Istraživanja su pokazala da ima inhibitorско djelovanje na migraciju agresivnog raka dojke. [1]

Kada su u pitanju metaboliti kanabidiola u ljudskom organizmu najznačajniji su 7-hidroksikanabidiol (koji je manje zastupljen u ljudskom organizmu) i 7-karboksikanabidiol (koji je najzastupljeniji metabolit). Farmakološka industrija sve više istražuje navedene spojeve u svrhu pronalaženja upotrebe istih u poboljšanju ljudskog zdravlja [1]. Strukture navedenih spojeva nalaze se na slici 1.1.



Slika 1.1 Strukturne formule: a) kanabidiola, b) kanabidiolne kiseline, c) 7-hidroksikanabidiola, d) 7-karboksikanabidiola.

1.2. Kromatografija

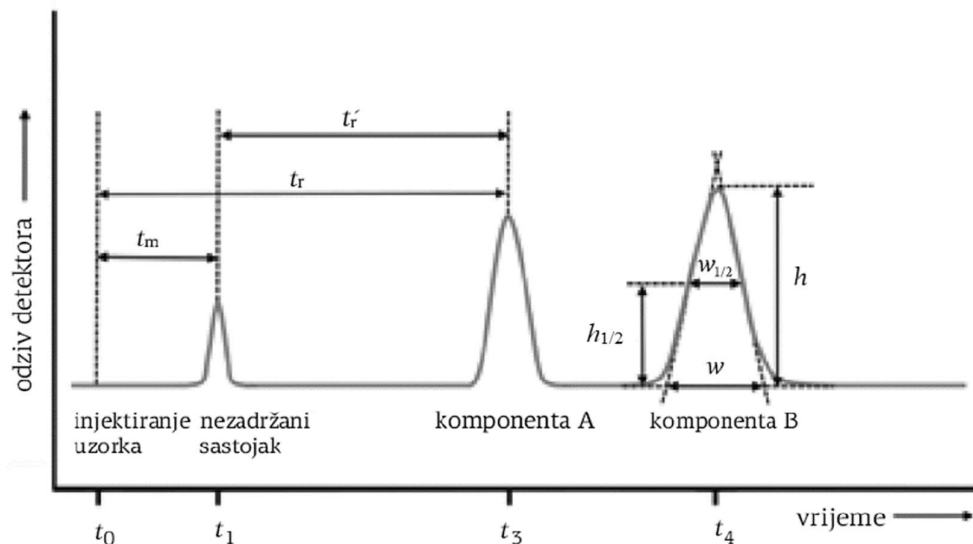
Kromatografija je analitička tehnika odjeljivanja komponenti smjese na temelju različite raspodjele komponenata uzorka između nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Naziv dolazi od dvaju grčkih riječi – *chroma* (boja) i *graphein* (pisati), a prvi put se spominje početkom 20. stoljeća u radu ruskog botaničara i biokemičara Mihaila Semjonoviča Cveta. Današnja teorija kromatografije je utemeljena sredinom 20. stoljeća te je vremenom postala jedna od najrasprostranjenijih analitičkih tehnika u svim granama kemije. [4]

Kromatografija se može podijeliti prema načinu na koji se ostvaruje kontakt između nepokretne i pokretne faze na plošnu (kretanje pokretne faze se temelji na kapilarnim silama) i kolonsku kromatografiju (pokretna faza se kreće u cjevčici kroz nepokretnu fazu pod utjecajem gravitacije ili primijenjenog tlaka). Kolonska kromatografija se dalje dijeli prema agregatnom stanju pokretne faze na tekućinsku (pokretna faza je tekućina niske viskoznosti), plinsku (pokretna faza je inertni plin, najčešće helij, dušik ili argon) te tekućinsku kromatografiju pri superkričnim uvjetima. [4, 5]

Kada je riječ o kolonskoj kromatografiji uspostavlja se i podjela prema vrsti međudjelovanja pokretne faze i komponenti uzorka. Tako se razlikuju:

- a) Adsorpcijska kromatografija – koriste se čvrsta nepokretna faza i tekuća ili plinovita pokretna faza. Komponente se adsorbiraju na površini čvrstih čestica. Što je pojedinačna komponenta jače adsorbirana, to sporije putuje kroz kolonu.
- b) Razdjelna kromatografija – tekuća nepokretna faza je vezana na čvrstu površinu, kroz koju se kreće, ali s kojom se ne miješa pokretna (tekuća ili plinovita) faza. Komponente u uzorku se uravnotežuju između nepokretne tekuće i pokretne faze, najčešće na temelju polarnosti.
- c) Kromatografija ionske izmjene – ioni unutar uzorka se razdjeljuju na suprotno nabijenoj nepokretnoj fazi.
- d) Kromatografija isključenjem – razdjeljivanje se temelji na veličini komponenti uzorka. Idealno ne postoje privlačne sile između komponenti i nepokretne faze koja je u obliku gela.
- e) Afinitetna kromatografija – najselektivnija vrsta kromatografije koja koristi specifične interakcije između komponenti uzorka i nekog liganda koji je kovalentno vezan (imobiliziran) u nepokretnoj fazi. [6, 7]

Grafički prikaz rezultata detektiranih pomoću detektora kod kolonske kromatografije je kromatogram prikazan na slici 1.2 gdje su opisane osnovne kromatografske značajke.



Slika 1.2 Prikaz kromatograma s kromatografskim parametrima; t_m – zadržano vrijeme, t_r – vrijeme zadržavanja, prilagođeno vrijeme zadržavanja je t_r' – prilagođeno vrijeme zadržavanja, h – visina kromatografske krivulje, $h_{1/2}$ – polovina širine kromatografske krivulje, w – širina kromatografske krivulje u osnovici, $w_{1/2}$ – širina kromatografske krivulje na polovini visine. [4]

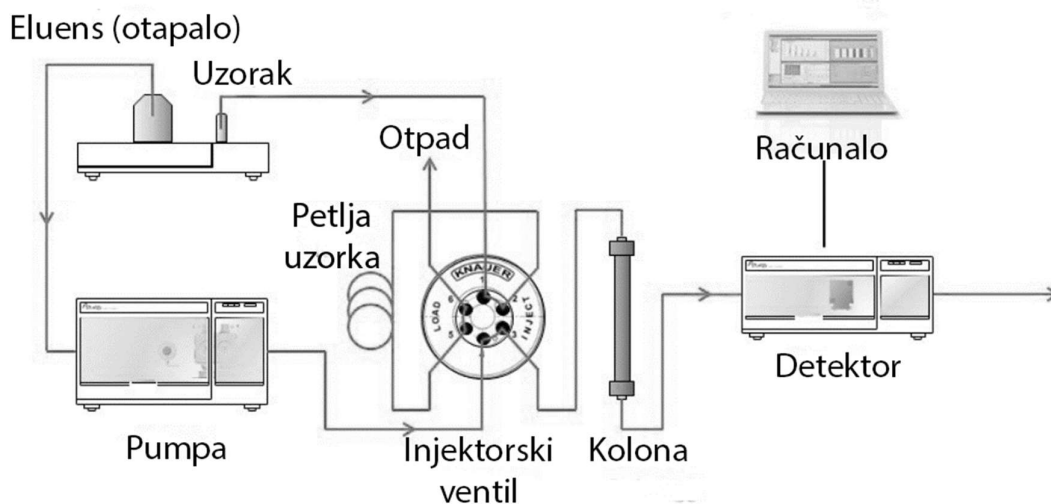
1.2.1. Tekućinska kromatografija

Tekućinska kromatografija je važna kromatografska tehnika s obzirom na to da često nije moguće sve komponente uzorka prevesti u plinovitu fazu. Osnovni pristup ove tehnike temelji se na kolonama velikog promjera i tekućoj pokretnoj fazi koja se kreće kroz kolonu (nepokretnu fazu) pomoću gravitacije ili pomoću povećanog tlaka.

Općenito difuzija je sporija kod tekućina nego kod plinova te je radi dugotrajnosti klasične tekućinske kromatografije razvijena tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, *HPLC*) koja je znatno brža od kromatografije na stupcu, a frakcije se ne skupljaju odvojeno nego je kromatografija spregnuta s nekom vrstom detektora. Poboljšanje tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti je u tome što se otapalo uvodi pod visokim tlakom u kolonu koja je punjena sitnim česticama. [4]

1.2.2. Princip rada

Općenito, sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti sadrži sljedeće dijelove: spremnik sa otapalima, pumpu, injektorski ventil, kolonu, detektorsku jedinicu i jedinicu za obradu podataka (slika 1.3). Pumpa isporučuje otapalo (eluens) pod visokim tlakom i konstantnom brzinom kroz sustav (kako bi smicanje i šum signala detektora bili što manji). Uzorak se uvodi u tok eluensa pomoću ventila za ubrizgavanje (injektorski ventil). Ventil rotiranjem omogućava uvođenje uzorka u petlju uzorka štrcaljkom (unos se precizna količina uzorka) koji se dalje unosi u kolonu pomoću eluensa. Ovisno o kemijskoj strukturi analita, molekule se zadržavaju dok prolaze kroz nepokretnu fazu. Specifične međumolekulske interakcije između molekula uzorka i punila kolone definiraju njihovo zadržavanje „na stupcu“. Tako dolazi do razdvajanja komponenti uzorka, odnosno njihovog eluiranja u različitom vremenu. Detektor prepoznaje komponente nakon izlaska iz kolone. Signali se pretvaraju i bilježe pomoću sustava za obradu podataka (računalnog programa), a zatim se prikazuju kao kromatogram. Nakon prolaska detektorske jedinice, eluat može biti podvrgnut dodatnim detektorskim jedinicama ili se skupljati kao frakcije (preparativna kromatografija) odnosno usmjeriti prema otpadu. [8, 4]



Slika 1.3 Shematski prikaz sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. [8]

1.3. Spektrometrija masa

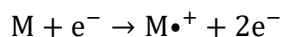
Spektrometrija masa je jedna od najraširenijih analitičkih tehnika, a ono što je izdvaja od drugih je: neusporediva osjetljivost, granica detekcije, brzina i raznolikost njezinih primjena. Koristi se prvenstveno u analitičkoj kemiji, ali je rasprostranjena i u farmakologiji, forenzici, rutinskom određivanju onečišćenja u okolišu itd. [9]

Spektrometrija masa je destruktivna tehnika koja, suprotno nazivu, određuje odnos mase i naboja neke vrste (m/z). Spektar masa je dijagram zastupljenosti iona u odnosu na m/z . Međutim, često se na apscisi nalazi samo oznaka za masu sugerirajući jedinicu mase na istoj, ali spektar je prikazan u daltonima (Da; dvanaestina mase nezvanog neutralnog atoma ugljika ^{12}C u svom nuklearnom i elektroničkom osnovnom stanju i u mirovanju) po jedinici naboja. Tehnika omogućava raspoznavanje molekula prema specifičnim fragmentacijama do kojih dolazi u postupku ionizacije. [10, 7]

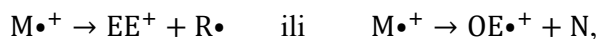
Spektar masa daje informaciju o relativnom omjeru komponenti uzorka te je tehnika gotovo uvijek spregnuta s kromatografskim tehnikama za odjeljivanje komponenti smjesa uzorka, što omogućuje analizu složenih matrica. [6]

1.3.1. Princip rada

Temeljni princip u analizi pomoću spektrometrije masa je prevođenje komponente uzorka u ion koji se nalazi u plinskoj fazi, što se može prikazati na primjeru elektronske ionizacije:



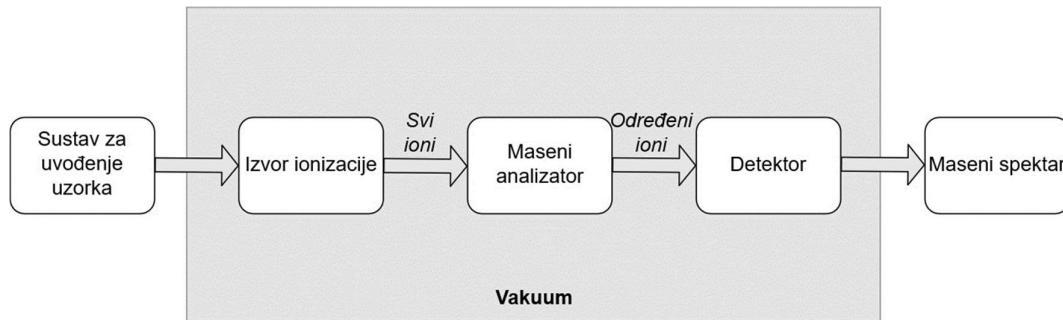
Tako nastaje molekularni ion ($\text{M}^{\bullet+}$) koji gotovo uvijek podliježe daljnjoj fragmentaciji jer je riječ o radikalnom ionu. Tako mogu nastati ion s parnim brojem elektrona i radikal ili molekula i novi radikalni kation što se može zapisati na sljedeći način:



gdje EE^+ predstavlja kation s parnim brojem elektrona, R^{\bullet} radikal, $\text{OE}^{\bullet+}$ kation s neparnim brojem elektrona te N nastalu neutralnu molekulu. Nastali kationi imaju različita kemijska svojstva, a svaki primarni produkt molekularnog iona može stupiti u daljnju fragmentaciju. [9]

U praktičnom pogledu, spektrometar masa čine sustav za uvođenje uzorka koji dovodi uzorak do izvora ionizacije, gdje se komponenta ili komponente ioniziraju te se tako nabijene čestice ubrzavaju prema detektoru pomoću električnih i magnetskih polja

(ovisno o izvedbi) u analizatoru masa. Zatim se detektirani signal pojačava kako bi računalo na osnovu podataka prikazalo spektar masa (slika 1.4). Analizator masa i detektor se uvijek nalaze u vakuumu kako bi se postiglo odvajanje iona u plinskoj fazi. Tijekom prolaska kroz analizator masa samo određeni ioni dolaze do detektora. [11]



Slika 1.4 Shematski prikaz spektrometra masa. [12]

1.3.2. Vrste ionizacije

Ionizacija komponenti uzorka predstavlja najvažniji dio spektrometra masa. Podjela se vrši prema izvorima iona te su u spregnutim sustavima s kromatografijom najvažniji:

- a) Ionizacija strujom elektrona (engl. *Electron Impact Ionisation, EI*) – ionizacija se temelji na sudaru elektrona koji dolaze sa zagrijanog filameta izvan ionizacijske komore (ubrzani razlikom potencijala filameta i komore) i hlapljivih komponenti u zagrijanoj komori gdje prevladava vakuum. Jedan od glavnih zahtjeva ove ionizacije je da komponente uzorka moraju biti stabilne na povišenoj temperaturi.
- b) Kemijska ionizacija (engl. *Chemical Ionisation, CI*) – temelji se na reakcijama između komponenti uzorka i plina (najčešće amonijak) uvedenog odvojeno pod povećanim tlakom, a koji je prethodno ioniziran elektronima te takav ima sposobnost reakcije s komponentama uzorka. Povećani pritisak povoljno utječe na ionizaciju komponenti uzorka te na njihovu fragmentaciju.
- c) Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation, APCI*) – tekući uzorak se zagrijava i miješa s reakcijskim plinom (dušik) te se uzorak raspršuje (engl. *Nebulisation*), odnosno stvara se fina maglica koja je nošena reakcijskim plinom. Takva maglica i reakcijski plin izlažu se električnom pražnjenju te reakcijski plin reagira s otapalom i komponentama uzorka pri atmosferskom tlaku. Ova vrsta ionizacije slična je tradicionalnoj

kemijskoj ionizaciji, ali reakcijski plin se ionizira u smjesi s komponentama uzorka i otapalom za razliku od ionizacije u odvojenoj komori.

- d) Ionizacija elektroraspršenjem (engl. *Electrospray Ionisation, ESI*) – komponente u tekućoj fazi prolaze kroz usku kapilaru na koju je primijenjen visoki potencijal te kapljice putuju prema suprotno nabijenoj elektrodi. Prilikom kretanja kapljica prema protuelektrodi dolazi do isparavanja otapala i smanjenja istoznačno nabijenih kapljica koje se dodatno smanjuju radi Columbovih odbojnih sila. Rezultat je nastajanje iona u plinskoj fazi koji se dalje kreću prema detektoru. Danas je ovo jedna od najčešće korištenih ionizacijskih tehnika.
- e) Ionizacija termoraspršenjem (engl. *Thermospray Ionisation, TSI*) – preteča ionizacije elektroraspršenjem i kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku. Kroz grijanu kapilaru se kreće tekući uzorak te ubrzava u nadzvučni mlaz malih kapljica od kojih neke bivaju nabijene u prisustvu hlapljivog pufera. Dalje u ovom procesu nastali ioni se odbijaju uz pomoć nabijene elektrode i ulaze u analizator masa.
- f) Maticom potpomognuta laserska desorpcija/ionizacija (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI*) – ionizacija se događa s laserskom ablacijom koja dolazi od otopine velike količine matice koja apsorbira svjetlost u kojoj je otopljen uzorak. Matica isparava, a uzorak biva ioniziran pomoću lasera. Ovako ioniziran uzorak se ubrzava električnim poljem do detektora. *MALDI* je najčešće korištena za ionizaciju velikih organskih molekula i uparen s analizatorom vremena leta. [7]

1.3.3. Vrste analizatora masa

Prije samog detektora, ioni putuju kroz analizator masa. Ovo je najvažnija komponenta spektrometra masa jer dozvoljava odjeljivanje iona na osnovu odnosa m/z . Analizatori se razlikuju po samom načinu na koji nastaje analitički signal te se dijele na:

- a) Analizatori vremena leta (engl. *Time of Flight, TOF*) – najjednostavnija izvedba analizatora masa. Ioni se ubrzavaju kroz polje poznatog potencijala, a mjeri se vrijeme leta od početne točke do detektora. Što je manji m/z veća je brzina leta, a manje vrijeme preleta te obrnuto, što je veći m/z to je manja brzina leta i veće potrebno vrijeme preleta. Iako je među prvima otkriven i razvijen, prije razvoja

MALDI nije bio posebno popularan jer zahtjeva točno određeno početno vrijeme leta (u obliku pulsa analita).

- b) Četveropolni analizator (engl. *Quadrupole, Q*) – danas jedan od najraširenijih analizatora radi niske cijene. Razdvajanje je rezultat gibanja iona u dinamičkom (radiofrekvencijskom) električnom polju i izravno ovisi o m/z komponente. Rezultat analize je funkcija radiofrekvencije napona i istosmjernih napona primijenjenih na četiri cilindrične elektrode. Samo ioni koji su stabilni (imaju zadovoljavajući m/z) u putanji kroz ovo dinamičko područje stižu do detektora.
- c) Analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije s Fourierovim transformacijama (engl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR*) – koristi magnetsko polje za određivanje m/z . Kinetička energija iona je niska (par desetina elektron volti, eV). Ioni kruže unutar centralne ćelije u ravnini magnetskog polja, a frekvencija tog kruženja je proporcionalna m/z .
- d) Elektrostatska zamka (engl. *The Electrostatic Trap* ili *Orbitrap*) – jedan od najnovijih analizatora mase. Vanjski dio uređaja je elektroda u obliku cijevi poprijeko presječena na dva jednaka dijela s malim razmakom. U sredini se nalazi elektroda u obliku vretena. Ioni u analizator ulaze tangencijalno kroz šupljinu između dva odvojena dijela vanjske elektrode. Unutarnja elektroda je suprotnog naboja od naboja iona. Vanjska elektroda je nultog naboja. Ioni određene kinetičke energije kruže oko vretenaste elektrode pod utjecajem elektrostatskog polja koje je raspoređeno na specifičan način radi geometrije zamke i u konačnici ioni dolaze do detektora.

Često se osim pojedinačnih analizatora u praksi koriste njihove kombinacije. Najčešće su tandemski spektrometrija (MS/MS) koja uključuje dvije faze spektrometrije masa. U prvom koraku izoliraju se ioni željenog m/z . Tada određeni ioni (roditeljski ioni) u drugom koraku podliježu fragmentaciji, najčešće u interakciji (sudaru) s inertnim plinom, koja uzrokuje promjenu mase ili naboja te nastaje ion (ion kćer) i neutralni fragment. Ovo je osobito korisno pri analizi složenih matrica i u povećanju selektivnosti, osobito jer su parametri prve i druge faze potpuno nezavisni. Ovakvi sustavi mogu biti sastavljeni od trostrukog četveropola (*QQQ*) ili četveropol-analizator vremena leta (*QTOF*). [10, 9] Detektori koji se nalaze na samom kraju analizatora za svrhu imaju pretvaranje iona koji prolaze kroz analizator masa u signal koji je koristan i razumljiv korisniku. Najčešće se tu radi o fotografskoj ploči (upotreba je danas napuštena), Faradayevoj čaši (ioni ulaze u

cilindar i neutraliziraju se udarom u stijenke, a detektira se promjena naboja), elektronskom multiplikatoru (ioni se sudaraju s nizom dinoda te se signal pojačava do detektora) i elektrooptičkom detektoru iona (ioni se pretvaraju u elektrone, a dalje se pomoću fosforescentnog zaslona ioni pretvaraju u fotone, pojačavaju i takvi detektiraju). [9]

1.4. Validacija

Validacija predstavlja dokumentirani proces određivanja pogodnosti nekog mjernog sustava za dobivanje korisnih i pouzdanih analitičkih podataka, a procjenjuje se prikladnost neke metode u određenu svrhu. Validacija zahtijeva pomno planiranje i organiziranje prilikom rada. Ovo uključuje poznavanje validacijskih pojmova, koncentracijskog opsega validacije, poznavanje uređaja i kemikalija koje laboratorij posjeduje. Zahtjeva se i objektivno postupanje kada je u pitanju omjer troškova, potrebnog vremena, rizika i tehničkih mogućnosti. Kriteriji koje neka metoda mora zadovoljiti su dati smjernicama od kojih su najpoznatije one Međunarodne konferencije o harmonizaciji (engl. *International Conference on Harmonization, ICH*, validacija metoda u farmaceutskoj industriji), Međunarodne zajednice čiste i primijenjene kemije (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC*, općenite smjernice validacije u jednolaboratorijskoj validaciji), *Eurachem* smjernice (općenite europske smjernice validacije) i dr. [13, 14]

Prije pristupa validaciji potrebno je definirati sve pojmove koji se koriste u postupku. Definicije se blago razlikuju među smjernicama. U nastavku su definirani svi pojmovi prema Međunarodnom rječniku mjeriteljstva (engl. *International Vocabulary of Metrology, VIM*). [15]

Selektivnost (engl. *Selectivity*) predstavlja mjeru u kojoj druge tvari ometaju određivanje tvari od interesa prema danom postupku. Često se u smjernicama naziva i specifičnost (engl. *Specificity*).

Linearnost (engl. *Linearity*) je mogućnost metode da zabilježi signale koji su direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Uz ovaj pojam često se definira i pojam **linearno dinamičko područje** (engl. *Linear Dynamic Range, LDR*), a predstavlja raspon koncentracija analita u uzorku kod kojeg je linearnost osigurana. Također, **osjetljivost** (engl. *Sensitivity*) predstavlja količinu promjene u odzivu uređaja s promjenom koncentracije.

Preciznost (engl. *Precision*) karakterizira bliskost slaganja između izmjerenih vrijednosti dobivenih ponovljenim mjerenjima na istim ili sličnim analitima pod određenim uvjetima. Ona je rezultat slučajne pogreške koja dolazi od mjernog sustava. U praksi preciznost se definira kao ponovljivosti, srednja preciznost i obnovljivost.

Ponovljivost mjerenja (engl. *Repeatability*) predstavlja blizinu rezultata dobivenih od istog uzorka (ili njegovih poduzoraka) koristeći istu mjernu proceduru, iste vanjske faktore, isti sustav, iste uvjete i istu lokaciju u malom vremenskom intervalu (jedan dan ili jedna serijska analiza). Varijacija među rezultatima mora biti što manja. **Srednja preciznost** (unutarlaboratorijska obnovljivost) je preciznost dobivena u istom laboratoriju u dužem vremenskom periodu (par mjeseci) i uzima u obzir više promjena nego ponovljivost. To su: drugi analitičar, kalibranti, serija mjerenja i dr. Srednja preciznost je općenitija nego ponovljivost, a standardna devijacija podataka je veća nego kod ponovljivosti. **Obnovljivost** (engl. *Reproducibility*) predstavlja preciznost između mjerenja u različitim laboratorijima.

Istinitost (engl. *Trueness*) predstavlja bliskost slaganja između srednje vrijednosti beskonačnog broja ponovljenih mjerenja mjerene veličine i vrijednosti referentne veličine. Ona se odnosi na sustavnu pogrešku prilikom mjerenja i njena kvantitativnost je izražena pomoću pristranosti (engl. *Bias*).

Točnost (engl. *Accuracy*) analitičkog postupka predstavlja blizinu dobivenih rezultata stvarnim ili referentnim vrijednostima. U praksi se predstavlja mjernom nesigurnosti (interval oko mjerene vrijednosti u kojoj leži stvarna vrijednost).

Granica dokazivanja (engl. *Limit of Detection, LoD*) – najmanja količina ili koncentracija analita u ispitnom uzorku koja se može pouzdano razlikovati od nule.

Granica određivanja (engl. *Limit of Quantitation, LoQ*) – najniža koncentracija analita koja se može odrediti s prihvatljivom ponovljivošću i istinitošću.

Robusnost (engl. *Robustness*) predstavlja otpornost metode na promjene mjernih i drugih parametara. To je sposobnost metode da prikaže ispravne rezultate pri promjeni parametara metode i vanjskih utjecaja.

Stabilnost (engl. *Stability*) karakterizira promjenu koncentracije analita u uzorku u određenom vremenskom intervalu. Ovaj pojam nije definiran u mnogim smjernicama, ali važno je da analitičar treba donijeti odluku shodno situaciji i uzorku od interesa. [14, 15]

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Korištene kemikalije i oprema

Popis korištenih certificiranih referentnih otopina (standarda):

- a) Kanabidiol – 1 mg/mL u metanolu (Cerilliant[®], Round Rock, Texas, SAD);
- b) Kanabidiolna kiselina – 1 mg/mL u acetonitrilu (Lipomed, Arlesheim, Švicarska);
- c) 7-hidroksikanabidiol - 1 mg/mL u metanolu (Cerilliant[®], Round Rock, Texas, SAD);
- d) 7-karboksikanabidiol - 1 mg/mL u metanolu (Cerilliant[®], Round Rock, Texas, SAD);

Popis korištenih kemikalija:

- a) Acetonitril - za LC-MS LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany
- b) Metanol - za LC-MS LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Germany
- c) Mravlja kiselina - za LC-MS LiChropur, Merck, Darmstadt, Germany

Popis korištene opreme:

- a) pipete - Tacta (Sartorius, Göttingen, Njemačka);
- b) uređaj za pročišćavanje vode - Purelab Flex 3 (18.2 MΩ, UV 185/254 nm, TOC <5 ppb, Tip 1, Elga, Pariz, Francuska);
- c) tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti - UltiMate 3000RS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- d) spektrometar masa s trostrukim četveropolom - TSQ Quantis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD);
- e) pumpa sa špricom - F100T2 (Chemyx, Stafford, Teksas, SAD).

2.2. Odabir otapala

Prije početka mjerenja i optimizacije metode potrebno je izabrati otapalo u kojem su svi standardi topivi i/ili se s istim potpuno miješaju. S obzirom na to da su svi osim jednog standarda već otopljeni u metanolu, a metanol i acetonitril se miješaju u svim omjerima, korišten je metanol.

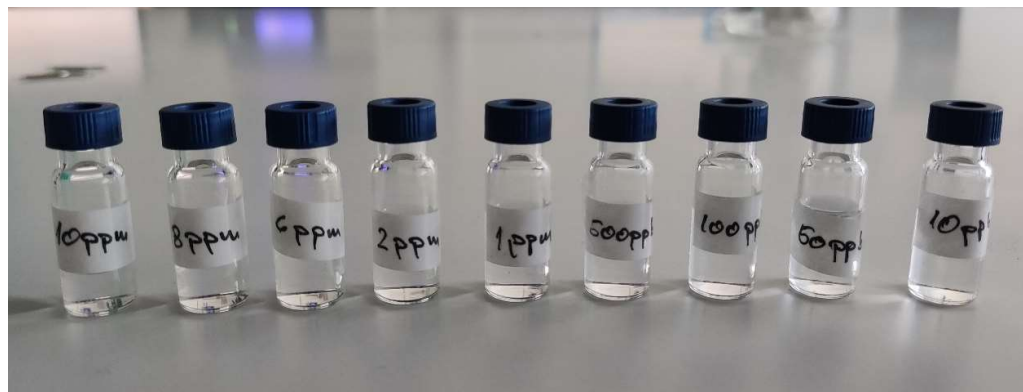
2.3. Priprema otopina

2.3.1. Priprema otopina za optimizaciju MS/MS fragmentacije

Uzeto je 300 μL svakog standarda i preneseno u zasebne odmjerne tikvice volumena 10 mL. Sve su nadopunjene do oznake koristeći metanol te snažno promiješane. Dobivene su otopine konačne koncentracije 0,03 mg/mL, odnosno 30 $\mu\text{g/mL}$ (30 ppm). Ove otopine su korištene za optimizaciju MS/MS fragmentacije.

2.3.2. Priprema standardnih otopina za UHPLC analizu

Prilikom pripreme standardne otopine uzeto je 100 μL svakog standarda i preneseno u jednu odmjernu tikvicu od 10 mL te je do oznake dopunjeno metanolom. Dobivena je otopina u kojoj su svi standardi koncentracije 10 ppm. Razrjeđivanjem ove otopine pripravljene su otopine sljedećih koncentracija: 8 ppm, 6 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0,5 ppm (500 ppb), 0,1 ppm (100 ppb), 0,05 ppm (50 ppb), 0,01 ppm (10 ppb) i prenesene u bočice od 1 mL (slika 2.1).



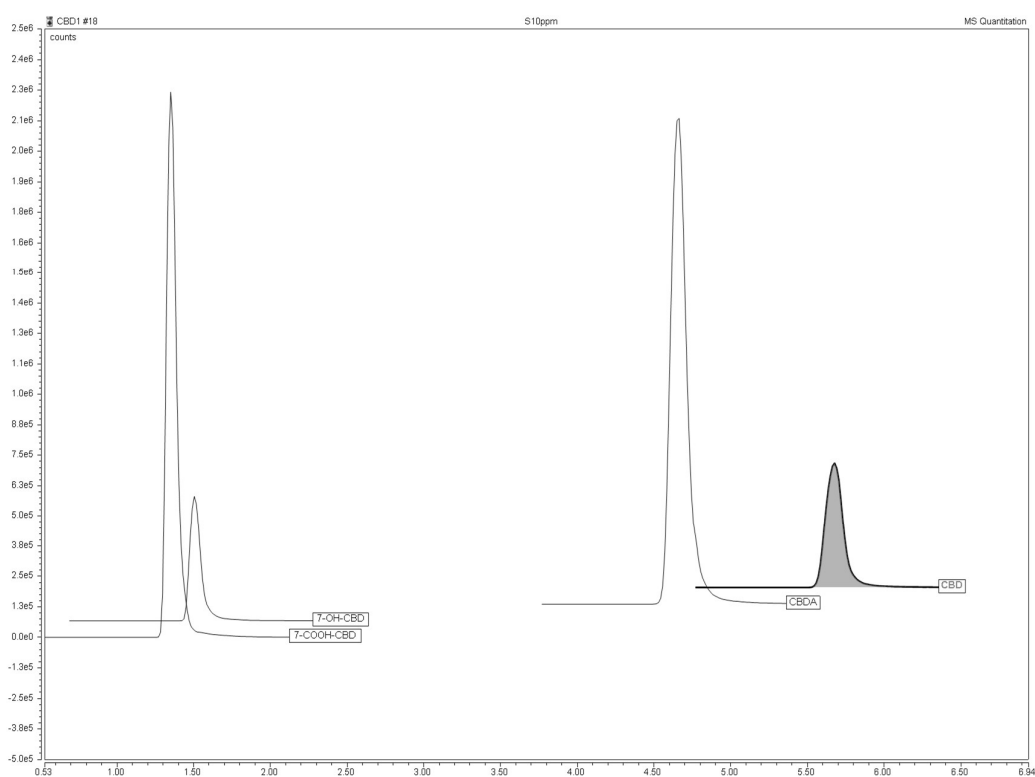
Slika 2.1 Standardne otopine pripravljene za UHPLC-MS/MS analizu.

3. REZULTATI I RASPRAVA

3.1. Optimizacija UHPLC metode

Optimizacija UHPLC metode odnosi se na odabir pogodne nepokretne i pokretne faze te modifikatora koji poboljšavaju ionizaciju u spektrometru masa. U slučaju analize smjese odabranih kanabinoida, prethodni parametri su određeni pregledom literature McRae 2021. [16]

Nakon injektiranja smjese četiri kanabinoida metoda je skraćena s 18 minuta na 14 minuta radi uštede otapala i vremena pri višestrukim injektiranjima u daljnjim mjerenjima. Na slici 3.1 prikazan je kvantifikacijski kromatogram na kojim je vidljivo da sve četiri komponente eluiraju u prvih 6 minuta.



Slika 3.1 Kvantifikacijski kromatogram kanabinoida
(*7-COOH-CBD* – 7-karboksikanabidiol, *7-OH-CBD* - 7-hidroksikanabidiol,
CBDA – kanabidiolna kiselina, *CBD* – kanabidiol)

Konačni parametri UHPLC metode prokazani su u tablici 1.

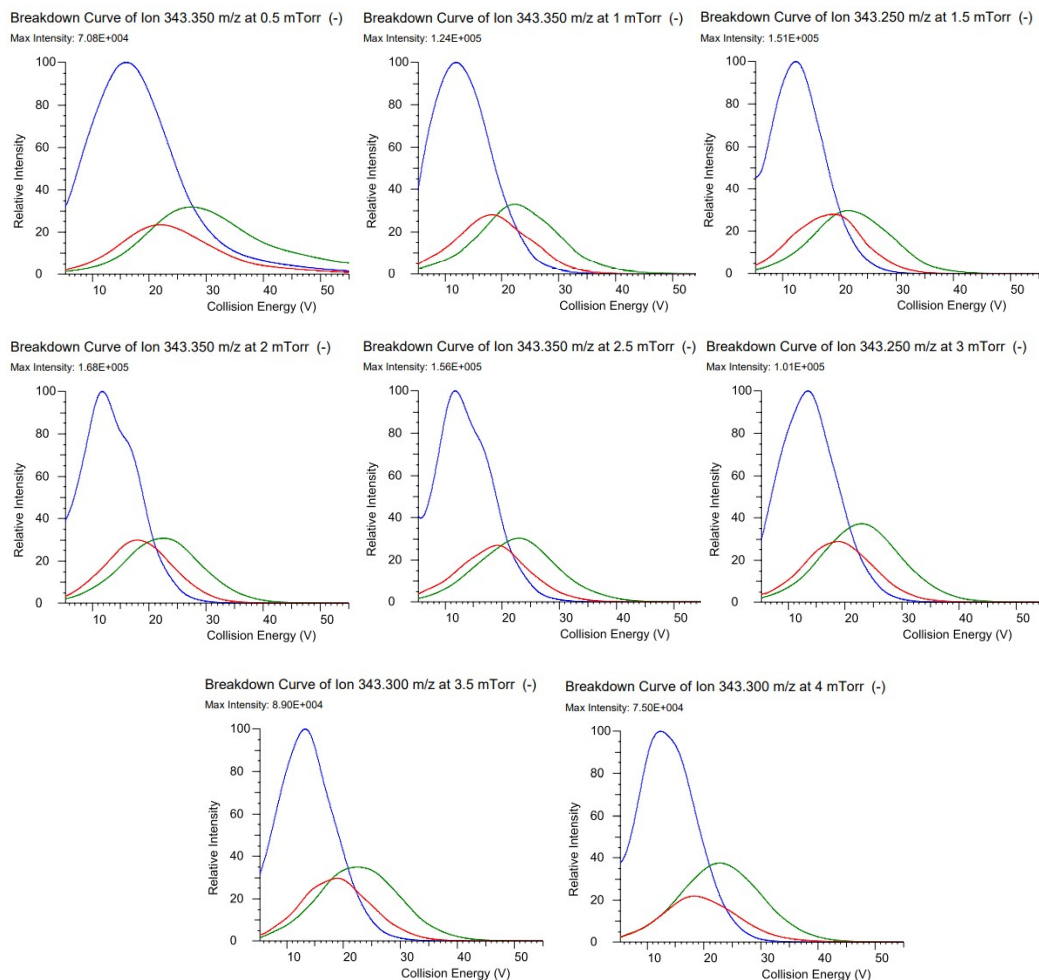
Tablica 1. Optimalni uvjeti za određivanje odabranih kanabinoida.

Kolona i pakiranje	Accucore C18, 150 × 2.1 mm, 2.6 μm		
Eluens A	0.1% mravlja kiselina u vodi		
Eluens B	0.1% mravlja kiselina u acetonitrilu		
Gradijent	Vrijeme (min)	% eluens A	% eluens B
	0,0	40,0	60,0
	8,0	32,0	68,0
	10,5	32,0	68,0
	10,6	5,0	95,0
	12,0	5,0	95,0
	12,1	40,0	60,0
	14,0	40,0	60,0
Volumen injektiranja	5 μL		
Protok	0,5 mL min ⁻¹		
Temperatura kolone	40 °C		
Temperatura automatskog uzorkivača	15 °C		

3.2. Optimizacija parametara spektrometrije masa

U svrhu uspješne identifikacije izabranih kanabinoida izvršena je optimizacija parametara spektrometrije masa.

Otopine koncentracije 30 ppm su pojedinačno unošene u spektrometar masa te je prvenstveno izvršena optimizacija ulaznog tlaka argona u kolizijsku ćeliju (engl. *Collision-induced dissociation gas, CID Gas*). Optimizacija je provedena u negativnom načinu rada u rasponu tlaka argona od 0,5 mTorr do 4 mTorr. Nakon analize krivulja fragmentacije za sve spojeve, općenito je utvrđeno da je signal najjači i krivulje najpravilnije na tlaku 1,5 mTorr (slika 3.2).



Slika 3.2 Prikaz krivulja fragmentacije kanabidiolne kiseline.

Nakon određivanja tlaka argona u kolizijskoj ćeliji, koristeći iste otopine (koncentracije 30 ppm) optimizirani su sljedeći parametri:

- Napon na kapilari (napon elektrospreja, engl. *Spray Voltage*);
- Protok plina za stvaranje fine maglice (engl. *Sheath Gas*);
- Protok pomoćnog plina za stvaranje fine maglice (engl. *Auxiliary Gas*);
- Protok plina koji poboljšava stvaranje fine maglice (engl. *Sweep Gas*).

Optimizacija je načinjena za pozitivni i za negativni način rada uređaja uz uključen protok s UHPLC-DAD uređaja (0,450 mL/min voda i acetonitril s dodatkom 0,1% mravlje kiseline u omjeru 40:60). Uzorci koncentracije 30 ppm su injektirani špricom uz protok od 50 μ L/min. Ostali parametri (temperatura kapilare za prijenos iona i

temperatura plina za formiranje fine maglice) preuzeti su iz pregleda literature McRae 2021. [16].

Nakon izvršene optimizacije izabran je pozitivni način rada jer je za sve spojeve kod roditeljskog iona postignut veći odziv u pozitivnom načinu rada (kao roditeljski ion je uzet glavni pik spektra masa, tj. pik s najvećim intenzitetom, tablica 2). Ovo je uzeto u obzir jer će kasnije omogućiti što nižu granicu određivanja, a optimizacija protoka plinova u spektrometru masa, energija sraza za sve prijelaze te napon na kapilari i napon fokusirajućih leća u nastavku će biti raspravljani samo za pozitivni način rada.

Optimizacijom protoka plinova utvrđeno je sljedeće:

- a) Protok plina za stvaranje fine maglice najbolju ionizaciju daje u rasponu 40 do 50 proizvoljnih (arbitrarnih) jedinica;
- b) Protok pomoćnog plina za stvaranje fine maglice najbolju ionizaciju daje u rasponu 15 do 20 proizvoljnih jedinica;
- c) Protok plina koji poboljšava stvaranje fine maglice najbolju ionizaciju daje u rasponu 0 do 3 proizvoljnih jedinica.

Kada je u pitanju napon na kapilari iz rezultata optimizacije je uočeno da je ionizacija najveća iznad 4500 V, ali već i napon od 4000 V daje zadovoljavajuće rezultate.

Tablica 2. Optimalne mase roditeljskog iona i njegovih fragmenata za sve komponente uz njihove maksimalne intenzitete.

Način rada	Komponenta	Optimalna masa roditeljskog iona/iona kćeri	Maksimalni intenzitet
Pozitivni	CBD	315,500	41 174 557
		193,137	1 709 546
		259,220	886 812
		135,137	757 501
	CBDA	341,450	35 254 069
		219,155	3 561 338
		261,238	1 107 675
		285,292	458 207
	7-OH-CBD	313,450	38 268 806
		201,083	1 000 169
		193,155	639 545
		271,220	465 780
	7-COOH-CBD	345,450	36 535 390
		327,238	4 855 605
		299,321	2 560 728
		193,137	927 048
Negativni	CBD	313,400	316 468
		311,387	42 842
		245,250	44 584
		179,208	23 815
	CBDA	357,450	38 693 453
		339,387	3 558 837
		245,238	1 963 579
		311,387	1 258 154
	7-OH-CBD	329,400	12 238 733
		311,387	1 590 604
		299,387	731 451
		261,238	452 651
	7-COOH-CBD	343,350	13 214 277
		299,375	3 092 213
		297,375	915 249
		231,167	828 181

Konačni parametri spektrometrije masa prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Parametri spektrometra masa.

Parametar	Postavka
Ionizator	HESI
Način rada	Pozitivni
Napon na kapilari	4000 V
Plin za stvaranje fine maglice	50
Pomoćni plin za stvaranje fine maglice	25
Plin za poboljšavanje stvaranja fine maglice	2
CID	1,5 mTorr
Temperatura kapilare za prijenos iona	325°C
Temperatura plina za formiranje fine maglice	280°C

3.3. Optimizacija MS/MS parametara i rješavanje spektara masa/fragmentacije kanabinoida od interesa u svrhu kvantifikacije

Kako bi se svi spojevi (izabrani kanabinoidi) uspješno identificirali, prilikom optimizacije parametara spektrometrije masa pored glavnog iona uzeta su i tri najjača potvrdna iona. Kako bi se omogućilo analiziranje ovih iona uređaj mora pratiti pojedinačne prijelaze iona (engl. *Single Reaction Monitoring, SRM*).

Prilikom optimizacije parametara spektrometrije masa uređaj skenira spektre fragmentacije i vrši optimizaciju napona fokusirajućih leća (radiofrekventne leće, engl. *RF Lens*) za roditeljski ion i energije sraza (engl. *Collision Energy*) za sve prijelaze. Konačni parametri su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. MS/MS parametri.

Komponenta	Vrsta iona	Roditeljski ion/Ion kćer	Energija sraza (eV)	Napon fokusirajućih leća (V)
CBD	Kvantifikacijski	315,500/193,137	21	145
	Potvrđni	315,500/259,220	18	
	Potvrđni	315,500/135,137	19	
CBDA	Kvantifikacijski	341,450/219,155	25	141
	Potvrđni	341,450/261,238	18	
	Potvrđni	341,450/285,292	21	
7-OH-CBD	Kvantifikacijski	313,450/201,083	22	134
	Potvrđni	313,450/193,155	22	
	Potvrđni	313,450/271,220	18	
7-COOH-CBD	Kvantifikacijski	345,450/327,238	14	109
	Potvrđni	345,450/299,321	18	
	Potvrđni	345,450/193,137	25	

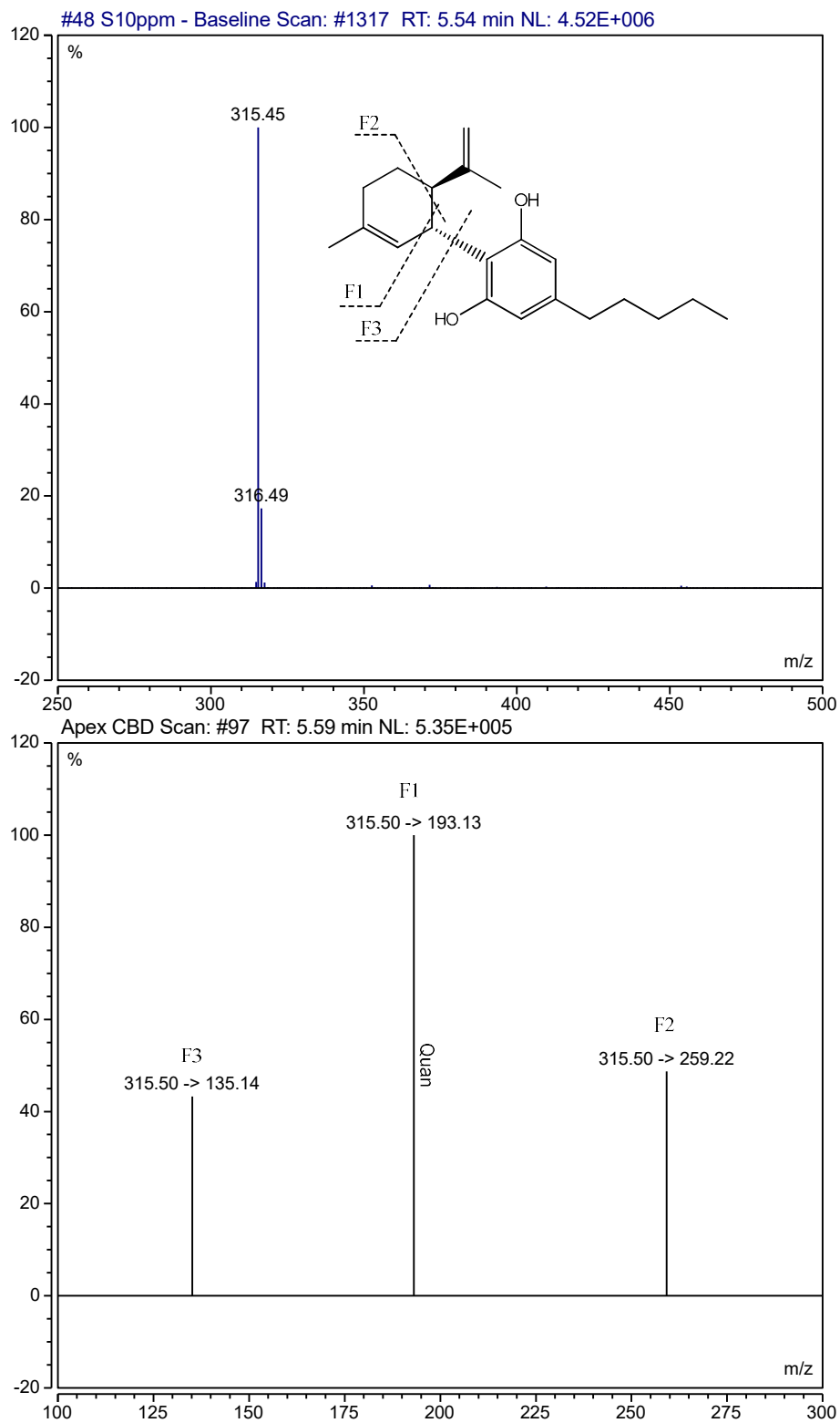
3.3.1. Rješavanje spektara masa izabranih kanabinoida

U nastavku će biti prikazana pretpostavljena mjesta cijepanja svih molekula u cilju razjašnjavanja spektra masa istih.

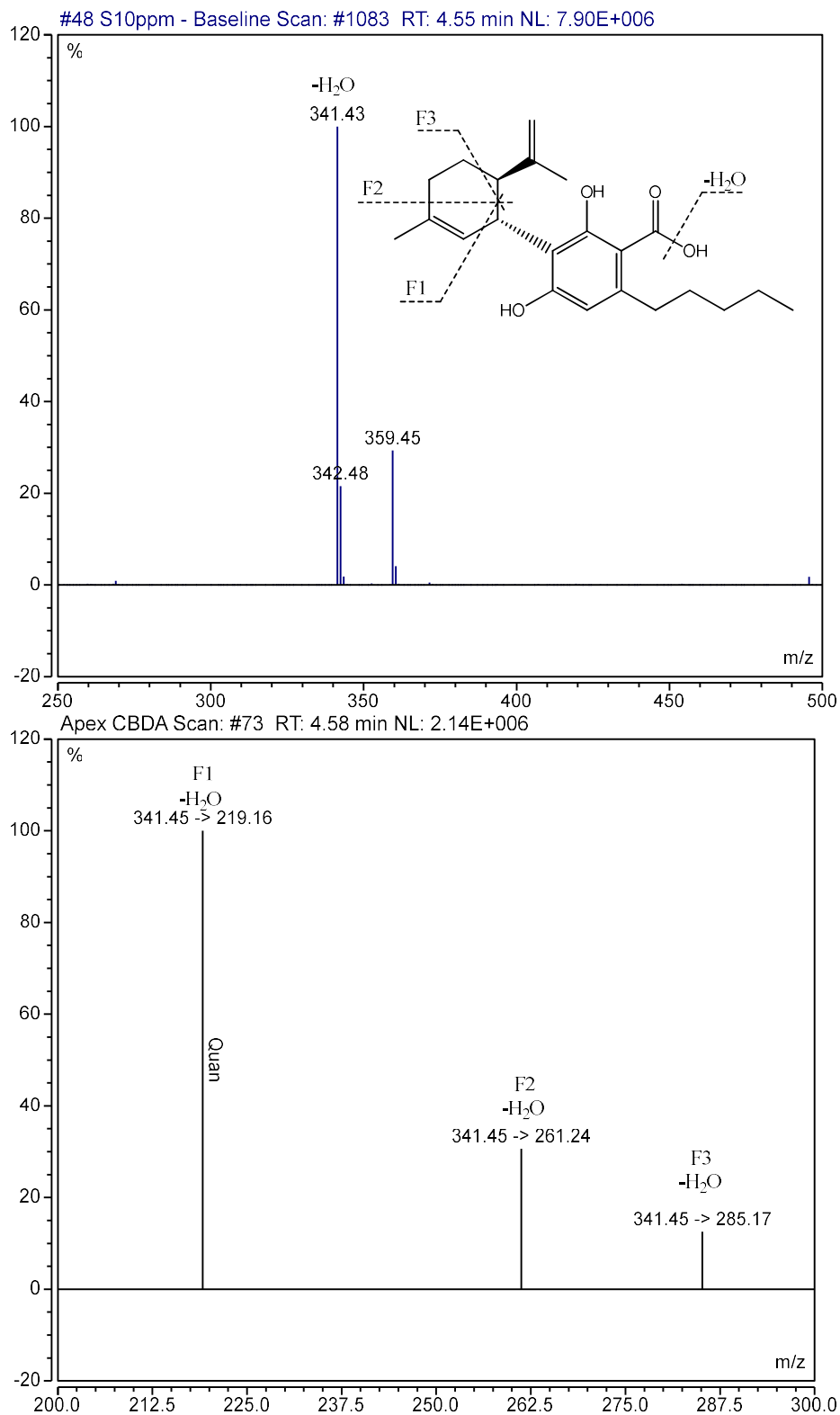
Na slici 3.3 prikazan je spektar masa kanabidiola (molekulska masa 314,44 g/mol). Molekulski pik dolazi od $[M+H]^+$ je vidljiv s 315 m/z . Najviše izražen fragment (prijelaz 315 $m/z \rightarrow$ 193 m/z) dolazi od pucanja veze između olivtola i terpenskog dijela, a metilna skupina ostaje vezana za olivtol (F1). Tako nastaje stabilni benzilni karbokation. Kod drugog fragmenta (prijelaz 315 $m/z \rightarrow$ 259 m/z) s terpenskog dijela eliminira izopropenilna skupina (F2). Kod trećeg fragmenta (prijelaz 315 $m/z \rightarrow$ 135 m/z) puca veza između terpenskog dijela i olivtola, a fragment od interesa je terpenski dio (F3). Ovakva fragmentacija naknadno je potvrđena literaturno [17].

Kada je u pitanju kanabidiolna kiselina (molekulska masa 358,47 g/mol) očekivani molekulski pik $[M+H]^+$ 359 m/z je slabog intenziteta te je kao roditeljski ion uzet glavni pik (341 m/z , slika 3.4) koji nastaje eliminacijom vode s karboksilne skupine dajući

rezonancijom stabiliziran acilni karbokation. Daljnji prijelazi se gledaju od ovog kationa. Najznačajniji fragment (prijelaz $341\ m/z \rightarrow 219\ m/z$) nastaje pucanjem veze između olivtola i terpenskog dijela (F1) na isti način kao za najizraženiji fragment kod kanabidiola. Drugi fragment (prijelaz $341\ m/z \rightarrow 261\ m/z$) nastaje pucanjem terpenskog dijela (F2) te u konačnici treći fragment (prijelaz $341\ m/z \rightarrow 285\ m/z$) nastaje eliminacijom izopropenilne skupine (F3). Fragmentacija je naknadno potvrđena literaturno [18].



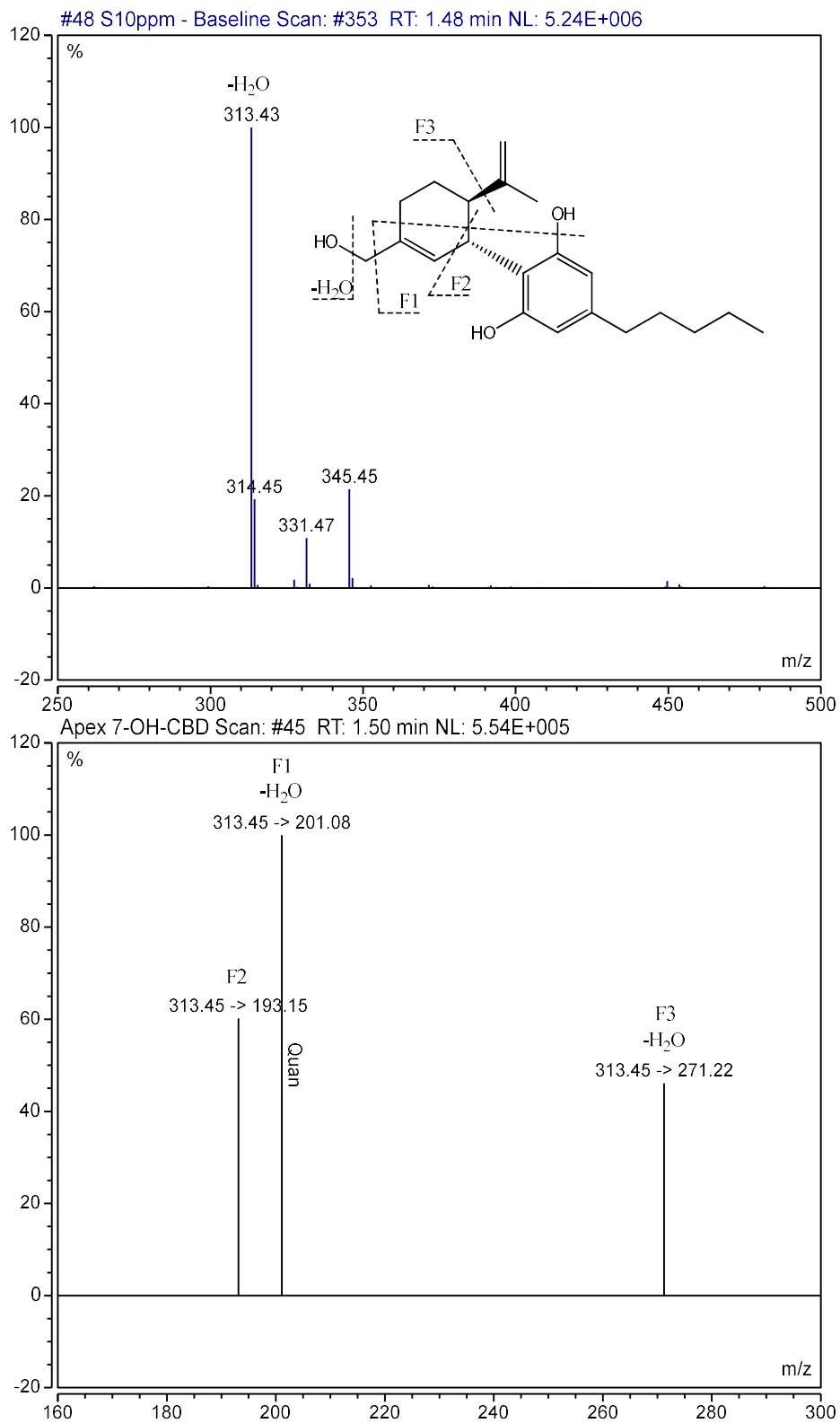
Slika 3.3 Spektar masa roditeljskog iona sa strukturom i mjestima pucanja molekule (gore) i spektar masa iona kćeri (dolje) za kanabidiol.



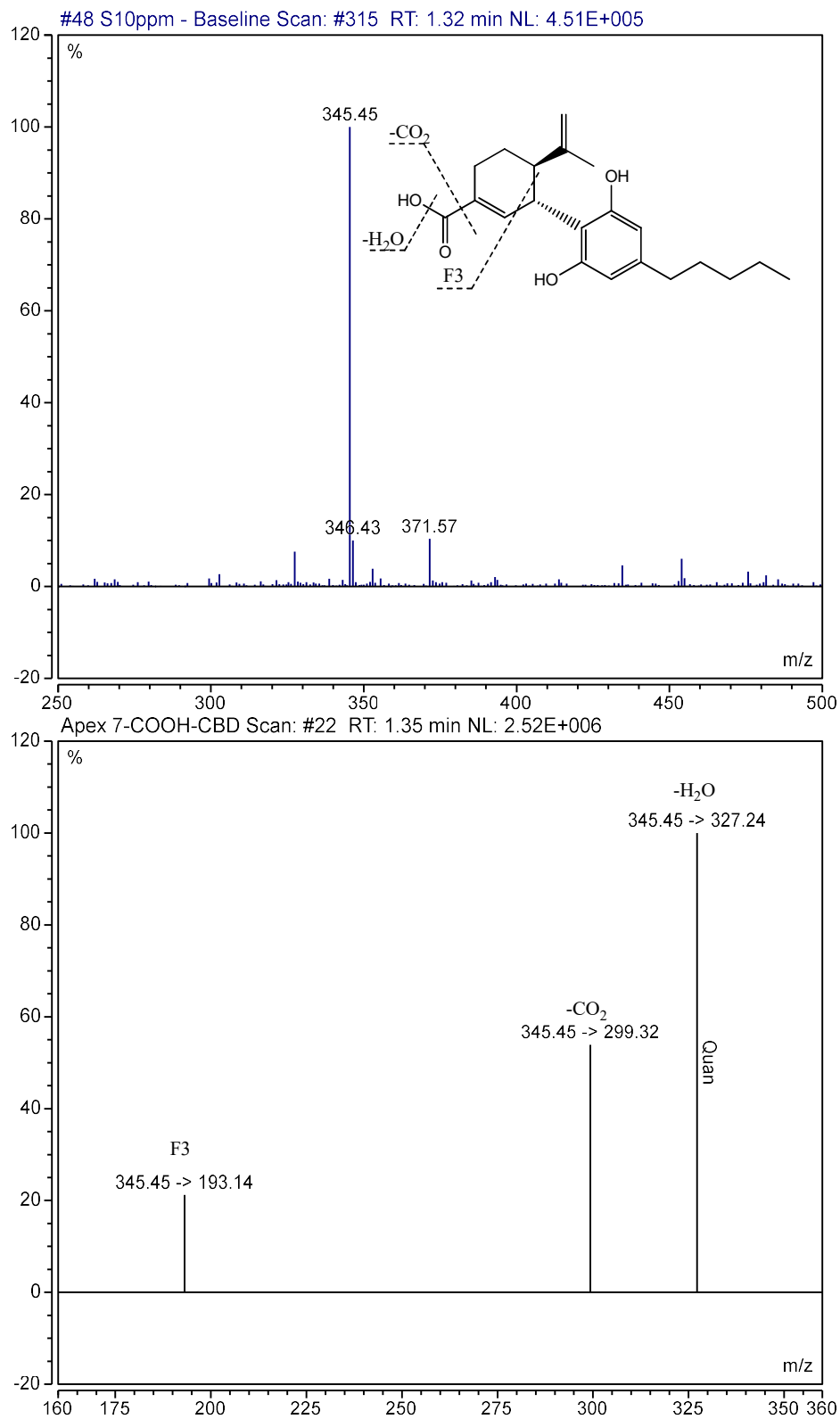
Slika 3.4 Spektar masa roditeljskog iona sa strukturom i mjestima pucanja molekule (gore) i spektar masa iona kćeri (dolje) za kanabidiolnu kiselinu.

Kod 7-hidroksikanabidiola (molekulska masa 330,46 g/mol) molekularni pik (331 m/z) je vidljiv ali jako niskog intenziteta (slika 3.5). Zbog toga je kao roditeljski ion uzet fragment koji nastaje eliminacijom vode, a tako nastaje alilni karbokation (313 m/z). Također, vidljiv je i pik na 345 m/z koji dolazi od metiliranja hidroksilne skupine zbog korištenog otapala. Najizraženiji fragment (prijelaz 313 $m/z \rightarrow 201 m/z$) nastaje eliminacijom molekule vode s benzenskog prstena, a terpeni dio puca na specifičan način (F1). Drugi fragment (prijelaz 313 $m/z \rightarrow 193 m/z$) je prethodno objašnjen (F2). Posljednji značajni fragment (prijelaz 313 $m/z \rightarrow 271 m/z$) nastaje eliminacijom izopropenilne skupine (F3)

Što se tiče 7-karboksikanabidiola (molekulska masa 344,44 g/mol) spektar je poprilično jasan. Molekularni pik $[M+H]^+$ je i glavni pik (345 m/z , slika 3.6). Prvi potvrdni pik (prijelaz 345 $m/z \rightarrow 327 m/z$) nastaje eliminacijom vode s karboksilne skupine te nastaje acilni karbokation. Drugi pik (prijelaz 345 $m/z \rightarrow 299 m/z$) odnosi se na razliku od 45 m/z te ukazuje na dekarboksilaciju. Treći pik (prijelaz 345 $m/z \rightarrow 193 m/z$) prethodno je opisan (F3).



Slika 3.5 Spektar masa roditeljskog iona sa strukturom i mjestima pucanja molekule (gore) i spektar masa iona kćeri (dolje) za 7-hidroksikanabidiol.



Slika 3.6 Spektar masa roditeljskog iona sa strukturom i mjestima pucanja molekule (gore) i spektar masa iona kćeri (dolje) za 7-karboksikanabidiol.

3.4. Validacija metode

Prilikom validacije metode korištene su općenite smjernice validacije kod unutarlaboratorijske validacije.

3.4.1. Selektivnost

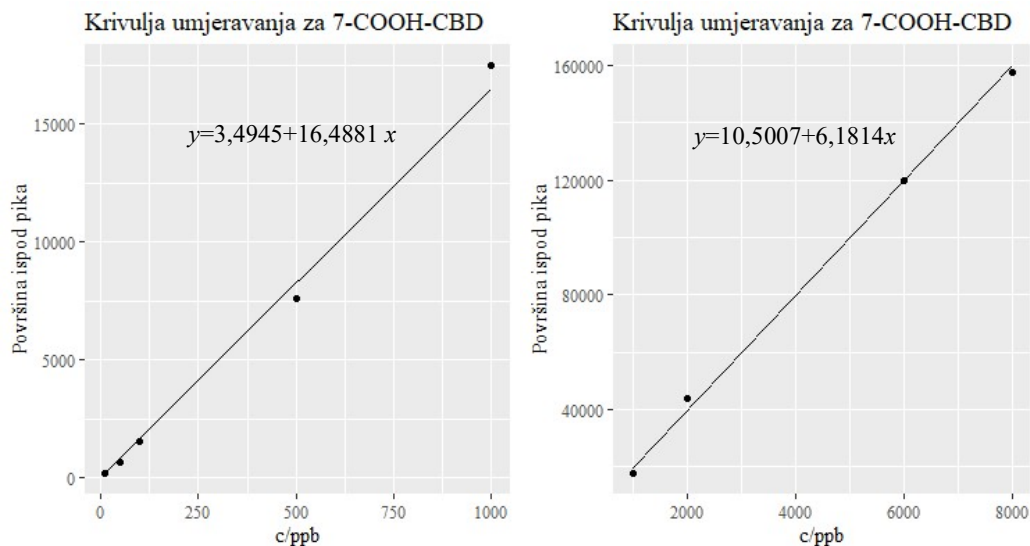
Kada je u pitanju korišteni detektor (spektrometar masa s trostrukim četveropolom) na prvom četveropolu sniman je molekularni ili glavni ion koji je u drugom dalje fragmentiran, a na trećem je potvrđen s tri dodatna iona fragmenta glavnog iona. Ovo je omogućilo visoku selektivnost u analizi izabranih kanabinoida. Zbog prethodno navedenih razloga ova tehnika se smatra specifičnom (potpuno selektivnom za određenu komponentu).

3.4.2. Linearnost

Linearnost je ispitana korelacijskim faktorom (R^2). Zatim je izvršena provjera homoskedastičnosti koristeći programsku podršku *RStudio*. Korišten je statistički *Breusch-Pagan test* čija je nulta hipoteza homoskedastičnost (varijance pogreški su jednake kroz raspon mjerenja) [19].

Nakon razmatranja rezultata linearno dinamičko područje je podijeljeno na dva dijela, dio koji uključuje niže koncentracije (od 10 ppb do 1000 ppb) i dio koji uključuje više koncentracije (od 1000 ppb do 8000 ppb). Rezultati za koncentraciju od 10000 ppb su zanemareni zbog gubitka linearnosti. U nastavku bit će prikazane krivulje umjeravanje za 7-hidroksikanabidiol (slika 3.7) uz odgovarajuće korelacijske faktore te vrijednosti vjerojatnosti (engl. *Probability Value, p-value*) koja govori kolika je vjerojatnost da će statistika testa biti ekstremna ili ekstremnija od one izračunate statističkim testom ako je nulta hipoteza tog testa istinita [20].

Za ostale spojeve bit će samo navedene pripadajuće formule krivulja umjeravanja, faktori i vrijednosti vjerojatnosti radi vizualne sličnosti krivulja podataka dobivenih s uređaja.



Slika 3.7 Krivulje umjeravanja za 7-karbonsikanabidiol na nižim koncentracijama (lijevo) i višim koncentracijama (desno).

Kod 7-hidroksikanabidiola na nižim koncentracijama je korištena ponderirana linearna regresija, a konačna jednadžba je: $y = 3,4945 + 16,4881x$. Korelacijski faktor je $R^2 = 0,9892$, a statistika testa potvrđuje homoskedastičnost (vrijednost vjerojatnosti je 0,3761). Ostale vrijednosti se nalaze u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz vrijednosti linearne regresije za izabrane kanabinoide.

Niže koncentracije (od 10 ppb do 1000 ppb)			
Spoj	Jednadžba krivulje umjeravanja	R^2	p
7-COOH-CBD	$y=3,4945+16,4881x$	0,9892	0,3761
7-OH-CBD	$y=18,9876+4,3910x$	0,9941	0,3865
CBDA	$y=17,7640+24,2920x$	0,9906	0,3812
CBD	$y=10,5007+6,1814x$	0,9926	0,3750
Više koncentracije (od 1000 ppb do 8000 ppb)			
	Jednadžba krivulje umjeravanja	R^2	p
7-COOH-CBD	$y=-663,7733+20,1031x$	0,9936	0,0633
7-OH-CBD	$y=-35,471+5,1000x$	0,9946	0,0574
CBDA	$y=1562,3190+27,804x$	0,9889	0,0542
CBD	$y=-282,0305+7,6876x$	0,9985	0,0686

U konačnici je vidljivo da je korelacijski faktor zadovoljavajući, ali je moguće i njegovo poboljšanje. Također, ovakvi podaci upućuju sustavnu pogrešku prilikom pripreme uzoraka koja dolazi od: analitičara, mikro-pipeta i dr.

3.4.3. Preciznost i točnost

Pri određivanju preciznosti uređaja izrađeno je 8 mjerenja otopine od 8000 ppb u dva različita dana te je izračunata spregnuta relativna standardna devijacija koja je iznosila za sve uzorke skupa $RSD \% = 2,96 \%$ što je zadovoljavajuće s obzirom na to da se relativna standardna devijacija može tolerirati do 5 %.

Točnost je određena uspoređivanjem mjerenih vrijednosti s onim koje predviđa linearna regresija. U tablici 6 su prikazana odstupanja od teorijskih rezultata. Neka odstupanja su veća od 20 % što ponovno ukazuje na moguću pogrešku pri samoj pripremi uzorka.

Tablica 6. Prikaz točnosti metode.

7-COOH-CBD				7-OH-CBD		
Teorijska koncentracija	Površina	Stvarna koncentracija	Odstupanje	Površina	Stvarna koncentracija	Odstupanje
10	211	12,6	25,9%	63	10,0	0,2%
50	647	39,0	-21,9%	194	39,9	-20,3%
100	1522	92,1	-7,9%	416	90,4	-9,6%
500	7581	459,6	-8,1%	2098	473,5	-5,3%
1000	17512	1061,9	6,2%	4613	1046,2	4,6%
2000	43922	2217,9	10,9%	11164	2196,0	9,8%
6000	120023	6003,4	0,1%	30721	6030,7	0,5%
8000	157641	7874,6	-1,6%	40061	7862,1	-1,7%
CBDA				CBD		
Teorijska koncentracija	Površina	Stvarna koncentracija	Odstupanje	Površina	Stvarna koncentracija	Odstupanje
10	308	11,9	19,5%	78	10,9	9,2%
50	946	38,2	-23,6%	253	39,2	-21,5%
100	2273	92,8	-7,2%	596	94,7	-5,3%
500	11309	464,8	-7,0%	2889	465,7	-6,9%
1000	25672	1056,1	5,6%	6509	1051,3	5,1%
2000	64937	2279,3	14,0%	16131	2135,2	6,8%
6000	170211	6065,6	1,1%	45868	6003,6	0,1%
8000	218103	7788,1	-2,6%	61053	7979,1	-0,3%

3.4.4. Granica dokazivanja i određivanja

U tablici 7 se nalaze podaci o granicama dokazivanja i određivanja za pojedine spojeve određeni na osnovu omjera signala i šuma. Vidljivo je da za 7-karboksikanabidiol i kanabidiolnu kiselinu kvantitativno određivanje ne predstavlja problem pri nižim koncentracijama. Isto ne vrijedi za 7-hidroksikanabidiol i kanabidiol gdje su ove granice nešto veće. Ovo potvrđuje i omjer signala i šuma na višoj koncentraciji te daje pesimističnije podatke. U konačnici 7-karboksikanabidiol i kanabidiolna kiselina imaju

jako niske granice određivanja i dokazivanja, ali kvantitativno određivanje 7-hiroksikanabidiola i kanabidiola za koncentracije ispod 10 ppb bi moglo predstavljati problem.

Tablica 7. Granica dokazivanja i određivanja prema omjeru signala i šuma na 10 ppb i 50 ppb.

Spoj	S/N (10 ppb)	LoQ (ppb)	LoD (ppb)
7-COOH-CBD	77	1,30	0,43
7-OH-CBD	16	6,25	2,06
CBDA	83	1,20	0,40
CBD	7,2	13,89	4,58
S/N (50 ppb)			
7-COOH-CBD	228	2,19	0,72
7-OH-CBD	68	7,35	2,43
CBDA	239	2,09	0,69
CBD	24	20,83	6,88

3.4.5. Robusnost

Metoda je dosta otporna na promjenu protoka od 0,05 mL/min i promjenu temperature od 5 °C. Dokaz ovome se nalazi u tablici 8. Srednja vrijednost pri uobičajenim uvjetima je uzeta iz ponovljenih mjerenja tijekom određivanja preciznosti.

Tablica 8. Prikaz robusnosti metode.

Parametar	7-COOH-CBD		7-OH-CBD	
	Površina	Iskorištenje	Površina	Iskorištenje
Protok + 0,05 mL/min	130818	91,1%	32433	91,1%
Protok - 0,05 mL/min	153142	106,7%	37224	104,5%
Temperatura kolone + 5 °C	144621	100,8%	35294	99,1%
Temperatura kolone - 5 °C	142932	99,6%	35467	99,6%
	CBDA		CBD	
	Površina	Iskorištenje	Površina	Iskorištenje
Protok + 0,05 mL/min	182693	91,9%	49981	90,7%
Protok - 0,05 mL/min	200122	100,7%	56199	101,9%
Temperatura kolone + 5 °C	194361	97,8%	53119	96,4%
Temperatura kolone - 5 °C	189360	95,2%	54034	98,0%

4. ZAKLJUČAK

Uzimajući u obzir prethodno navedene rezultate i raspravu diplomskog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Razvijena je metoda za razdvajanje i kvantitativno određivanje četiri kanabinoida: kanabidiol, kanabidiolna kiselina, 7-hidroksikanabidiol i 7-karboksikanabidiol UHPLC-MS/MS tehnikom .
2. Provedbom optimizacije metode izabrana je pokretna faza koja uključuje miješanje acetonitrila i vode s 0,1% volumnog udjela mravlje kiseline. Kao otapalo u kojem su uzorci otapani je uzet metanol. Odabrana je kolona Accucore C18 nepokretnom fazom promjera 2.6 μm . Spektrometar masa je optimiziran na sljedeći način: napon na kapilari je za sve spojeve bio 4000 V, RF za kanabidiol 145 V, za kanabidiolnu kiselinu 141 V, 7-hidroksikanabidiol 134 V i 7-karboksikanabidiol 109 V. Temperatura kapilare za prijenos iona je 325 °C, temperatura plina za formiranje fine maglice 280 °C. Kao način rada uređaja je izabran pozitivni način.
3. Kvantifikacijski prijelazi redom su: 315,500 \rightarrow 193,137 m/z za CBD, 341,450 \rightarrow 219,155 m/z , za 7-OH-CBD 313,450 \rightarrow 261,238 m/z , za 7-COOH-CBD 345,450 \rightarrow 327,238 m/z . Potvrdni ioni: 315,500 \rightarrow 259,220 m/z , 315,500 \rightarrow 135,137 m/z za CBD, 341,450 \rightarrow 261,238 m/z , 341,450 \rightarrow 285,292 m/z za CBDA, 313,450 \rightarrow 193,155 m/z , 313,450 \rightarrow 271,220 m/z , za 7-OH-CBD, 345,450 \rightarrow 299,321 m/z , 345,450 \rightarrow 193,137 m/z za 7-COOH-CBD.
4. Validacijom je utvrđeno da je uređaj jako precizan u mjerenjima, ali usporedbom mjerenih vrijednosti i vrijednosti pretpostavljenih linearnom regresijom ukazano je na relativni problem s točnosti. Kada je u pitanju granica određivanja i dokazivanja 7-karboksikanabidiol i kanabidiolna kiselina imaju zadovoljavajuću vrijednost; granica dokazivanja 0,43 ppb i 0,40 ppb i granica određivanja 1,30 ppb i 1,20 ppb redom. Ođivanje 7-hidroksikanabidiola, a osobito kanabidiola moglo predstavljati problem pri koncentracijama nižim od 10 ppb; granica dokazivanja 2,06 ppb i 4,58 ppb i granica određivanja 6,25 ppb i 13,89 ppb redom. Metoda se pokazala poprilično robusna na promjenu protoka i temperature kolone

5. LITERATURA

- [1] P. Morales, P. H. Reggio i N. Jagerovic, »An Overview on Medicinal Chemistry of Synthetic and Natural Derivatives of Cannabidiol,« *Front. Pharmacol.*, 28 lipanj 2017..
- [2] C. Citti, F. Palazzoli, M. Licata, A. Vilella, G. Leo, M. Zoli, M. A. Vandelli, F. Forni, B. Pacchetti i G. Cannazza, »Untargeted rat brain metabolomics after oral administration of a single high dose of cannabidiol,« *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Kolovoz 2018..
- [3] C. F. Poole, *The essence of chromatography*, Amsterdam: Elsevier, 2003.
- [4] G. L. Glish i R. W. Vachet, »The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-first Century,« Department of Chemistry, North Carolina, USA, 2003..
- [5] T. Moreno, F. Montanes, S. J. Tallon, T. Fenton i J. W. King, »Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents: An overview of different processing options,« *The Journal of Supercritical Fluids*, 1 srpanj 2020..
- [6] A. Lago-Fernandez, V. Redondo, L. Hernandez-Folgado, L. Figuerola-Asencio i N. Jagerovic, »New Methods for the Synthesis of Cannabidiol Derivatives,« *Methods Enzymol*, pp. 237-257, 3 srpanj 2017..
- [7] N. Radić i L. Kukoč Modun, *Uvod u analitičku kemiju*, Zagerb: Školska knjiga, 2016..
- [8] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler i S. R. Crouch, *Fundamentals of analytical chemistry*, 9th Edition, Belmont, SAD: Books/Cole, Cengage Learning, 2014..
- [9] D. C. Harris i C. A. Lucy, *Quantitative Chemical Analysis*, 9th Edition, New York, SAD: W. H. Freeman and Company, 2016..

- [10] J. Böttcher, M. Margraf i K. Monks, HPLC Basics – principles and parameters, Berlin: KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH.
- [11] E. de Hoffmann i V. Stroobant, Mass Spectrometry, Principles and Applications, 3rd Edition, Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2007..
- [12] D. C. Lee i M. L. Webb, Pharmaceutical Analysis, Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2003..
- [13] T. Marković, »Kvalitativno i kvantitativno određivanje zolmitriptana u tabletama uporabom kromatografije ultravisoke djelotvornosti vezane sa spektrometrijom masa,« Diplomski rad, Split, 2019..
- [14] N. Toomula, A. Kumar i S. Kumar D, »Development and Validation of Analytical Methods for Pharmaceuticals,« *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 2011..
- [15] »MOOC: Validation of liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) methods (analytical chemistry) course,« [Mrežno]. Available: https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/course-introduction. [Pokušaj pristupa ožujak 2022.].
- [16] JCGM 200:2008, International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edition, BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, 2008..
- [17] G. McRae i J. E. Melanson, »Quantitation of seventeen cannabinoids in dried cannabis, hemp and vape oils by LC-MS/MS,« National Research Council of Canada, Canada, 2021..
- [18] C. Citti, P. Linciano, S. Panseri, F. Vezzalini, F. Forni, M. A. Vandelli i G. Cannazza, »Cannabinoid Profiling of Hemp Seed Oil by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry,« *Frontiers in Plant Science*, 13 Veljača 2019..

- [19] Zach, »Statology,« 31 prosinac 2020.. [Mrežno]. Available: <https://www.statology.org/breusch-pagan-test/>. [Pokušaj pristupa 28. lipanj 2022.].
- [20] R. Bevans, »Scibbr,« 16. srpanj 2020.. [Mrežno]. Available: <https://www.scribbr.com/statistics/p-value/>. [Pokušaj pristupa 1. srpanj 2022.].