

VALIDACIJA PLINSKO KROMATOGRFSKE METODE ZA DOLOČANJE SESTAVE ETERIČNIH OLJ KONOPLJE

Miha OCVIRK¹, Karin GOLE², Ksenija RUTNIK³ in Iztok Jože KOŠIR⁴

Original scientific article / Izvirni znanstveni članek

Prispelo / Received: 16. 10. 2023

Sprejeto / Accepted: 26. 10. 2023

Izvleček

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je znana predvsem zaradi psihoaktivne spojine delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) in kanabidiola (CBD). Poleg omenjenih spojin je konoplja bogata tudi z drugimi zdravilnimi in koristnimi snovmi, ki se nahajajo v eteričnem olju, med katere sodijo tudi terpeni. Področje raziskav terpenov je v zadnjem času naraslo predvsem zaradi njihovih pozitivnih učinkov na človeški organizem in njihovo uporabo v agronomiji. Kemotip konoplje določa sestavo komponent eteričnega olja in je odvisen od sorte in rastišča. Na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije smo optimizirali in validirali metodo za določanje sestave eteričnih olj konoplje. Validacijski postopek je zajemal preverjanje selektivnosti, linearnosti, točnosti, natančnosti, določitev meje zaznavnosti in meje določanja, na novem plinskem kromatografu Agilent GC8890. S tem smo skrajšali čas, potreben za kvantitativno analizo določanja sestave eteričnih olj konoplje.

Ključne besede: terpeni, LOD, LOQ, plinska kromatografija

VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF HOP ESSENTIAL OIL COMPOSITION BY GAS CHROMATOGRAPHY

Abstract

Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) is known mainly for the psychoactive compound delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). In addition to the mentioned compounds, hemp is also rich in other medicinal and useful substances found in the essential oil, including terpenes. Terpenes are compounds found in plants, herbs, fruits and vegetables and are responsible for their taste and smell. The field of terpene research has recently grown mainly due to their positive effects on the human organism and their use in agronomy. The chemotype of cannabis determines the composition of essential oil components and depends on the variety and the growing area. At the Slovenian Institute of Hop Research and

¹ Dr., Univ. dipl. inž. kem. tehnol., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), e-naslov: miha.ocvirk@ihps.si

² Dipl. inž. kem. tehnol, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

³ Mag. inž.kem, IHPS, e-naslov: ksenija.rutnik@ihps.si

⁴ Dr. univ. dipl. kem., IHPS, e-naslov: iztok.kosir@ihps.si

Brewing, we optimized and validated a method for determining the composition of hemp essential oils. The validation process included checking the selectivity, linearity, accuracy, precision, determination of the limit of detection and the limit of determination on a new Agilent 8890 GC. With this, we have reduced time, needed for the analyses.

Key words: Terpenes, LOD, LOQ, gas chromatography

1 UVOD

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je dvodomna rastlina, ki spada v družino Cannabaceae in je najbolj prepoznana zaradi proizvodnje delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) (Chacon in sod., 2022a). V družino Cannabaceae spada tudi hmelj (*Hummulus Lupulus* L.). Na splošno obstajata dva tipa konoplje: vlaknasti in kanabinoidni tip. Vlaknasti tip konoplje ima visoko rast in se uporablja predvsem za vlakna in semena, medtem ko je kanabinoidni tip konoplje nižje rast in bogatejši s samimi kanabinoidi. Nadalje se konoplja deli na industrijsko konopljo in marihuano (Chen in sod., 2021). V večini evropskih držav vsebuje marihuana do 20 % THC glede na suho maso, medtem ko ima industrijska konoplja vsebnost THC nižjo od 0,3 % (Isidore in sod., 2021). Zaradi različnih spojin v konoplji, poskušajo raziskovalci karakterizirati posamezno spojino v kultivarje z vzpostavitvijo petih razredov kemotipov konoplje (Chacon in sod., 2022b). Kemotipi so rastline enakega rodu in po videzu enake, vendar imajo različno sestavo komponent v eteričnem olju. Danes je znanih več tisoč različnih kemotipov s podobnim imenom, vendar vsaka uspeva v različnih pogojih (Hanus in sod., 2020). Kemotipi se ločijo glede na vsebnost kanabinoidov; od tipa (I), ki ima najvišje razmerje med THC in kanabidiolom (CBD) do tipa (V), ki vsebuje zelo malo kanabinoidov (Chacon in sod., 2022b). Najbolj raziskana skupina so kanabinoidi, ki so produkt kondenzacije fenolnih spojin in terpenov. Vzrok, da so kanabinoidi najbolj raziskani, sta molekuli THC in CBD, zaradi svojih učinkov (Isidore in sod., 2021). Spojine, ki so odgovorne za vonj in okus zeliščnih in lesnatih rastlin, so terpeni. Terpeni so aromatične spojine, ki sestavljajo eterično olje in imajo široko uporabo v proizvodnji hrane in kozmetike, kjer jih dodajajo kot aromo (Bakro in sod., 2020). Terpene najdemo tudi v sadju in zelenjavi. Do sedaj so v konoplji identificirali več kot 120 terpenov, ki se nahajajo v socvetju konoplje, natančneje v tako imenovanih glandularnih trihomih (Chen in sod., 2021). Kemijsko gledano so terpeni 5-ogljikne enote, ki so med sabo povezane v verige (Chen in sod., 2021). Med sabo se ločijo glede na ponavljajočo enoto verig, imenovanih izoprenske enote. Ločimo tri vrste terpenov: monoterpene z desetimi ogljikovimi atomi, seskviterpene s petnajstimi ogljikovimi atomi in triterpene s tridesetimi ogljikovimi atomi (Andre in sod., 2016). Zaradi nepolarnega značaja so slabo topni v vodnem mediju. Temperatura vrelišča je od 119 °C do 198 °C. Na splošno so to zelo hlapne komponente in termično nestabilne, ki z oksidacijo preidejo v terpenoide (Chen in sod., 2021). Razlika med terpeni in terpenoidi je ta, da so terpenoidi terpeni, ki vsebujejo kisik (Hanus in sod., 2020). Koncentracija terpenov v eteričnem olju je odvisna od samega procesa pridobivanja, okoljskih

pogojev in zrelosti rastline. Monoterpeni imajo antioksidativno delovanje, delujejo tudi proti stresu, tesnobi in rakastim obolenjem. Po drugi strani imajo seskviterpeni protivnetno, protiglivično, protibolečinsko, protibakterijsko, protirakasto, proti depresivno, antioksidativno, antiproliferativno in nevroprotektično delovanje (Sommano in sod., 2020).

S separacijsko tehniko, imenovano plinska kromatografija, je bilo zaznanih in identificiranih že več kot 120 različnih komponent eteričnega olja. Analiza se izvaja na aparatu, imenovanem plinski kromatograf, in temelji na ločbi komponent zaradi različne hlapnosti in polarnosti preiskovanih spojin. Vzorec injiciramo v zato predvideno mesto, ki je ogreto na določeno temperaturo, pri tem pa se vzorec upari. Nosilni plin, ki mora biti inerten, ponese uparjen vzorec skozi kolono v termostatisirani pečici do detektorja. Najpogosteje uporabljen detektor je plamensko ionizacijski detektor (FID). Ob prihodu iona na detektor naraste tok sorazmerno s koncentracijo analita v vzorcu. Detektor torej ne samo zazna komponente, ki se izločajo iz kolone in jih pretvarja v električni signal, ampak izmeri tudi intenziteto signala, ki je sorazmerna z množino neke spojine. Električni signal pretvorimo in vodimo na rekorder oz. integrator. Rezultati analize so podani v grafični obliki in se imenujejo kromatogrami. Vsak kromatografski vrh predstavlja določen analit oz. komponento iz preiskovanega vzorca.

Namen raziskave je predstavitev analizne metode iz starejšega plinskega kromatografa Agilent GC 6890, na novejšo napravo Agilent GC 8890. Metoda je bila na tej napravi uporabljena prvič, zato je bilo potrebno izvesti celoten postopek validacije analizne metode.

Validacija je postopek, ki temelji na določanju različnih parametrov, s katerimi zagotovimo zanesljivost metode. Parametri, ki jih pri validaciji določamo, so selektivnost, natančnost, točnost, linearnost, meja zaznavnosti in meja določljivosti (Zupan, 2009). Validacijo smo izvedli na petih pomembnejših komponentah eteričnega olja konoplje: α -pinen, mircen, limonen, linalol in β -kariofilen.

2 METODE DELA

Pri delu smo uporabili predpripravljene vzorce eteričnega olja konoplje sorte Fedora in Uso, pridobljenega z destilacijo z vodno paro, ki smo jih pripravili na Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Pred kromatografsko analizo na GC aparaturi je bilo potrebno eterično olje konoplje (0,1 mL) redčiti s heksanom (2 mL) analitske čistosti (Honeywell, Poljska). 1 μ L razredčenega vzorca eteričnega olja smo pod specifičnimi pogoji (European Brewery Convention, 2006) injicirali v injektor, segret na 180°C. Uporabili smo nepolarno kapilarno kromatografsko kolono HP-1 (25 m \times 0,2 mm \times 0,11 μ m) (Hewlett Packard, ZDA), prevlečeno z dimetilpolisiloksanom. Temperaturni program termostatisirane pečice je bil nastavljen na: 1 min pri 60 °C, 2,5 °C/min do 190 °C, 1 min pri 190 °C, 70 °C/min do 240 °C in 11 min pri 240 °C 11 min pri 240 °C. Pretok nosilnega plina je bil nastavljen na 14,35 mL/min.

Za obdelavo kromatogramov smo uporabili računalniško opremo OpenLab CDS (Agilent Technologies, ZDA). Osnovna statistika, opravljena na šestih ponovitvah, s katero smo obdelovali dobljene rezultate, je bila narejena s programom MS Excel (Microsoft, ZDA). Standardi eteričnih olj, uporabljeni v validaciji, so bili kupljeni pri podjetju Sigma-Aldrich (Švica) in so bili vsi analitske čistosti, razen mircena, ki je bil tehniške čistosti $\geq 95\%$.

3 REZULTATI Z RAZPRAVO

3.1 Selektivnost

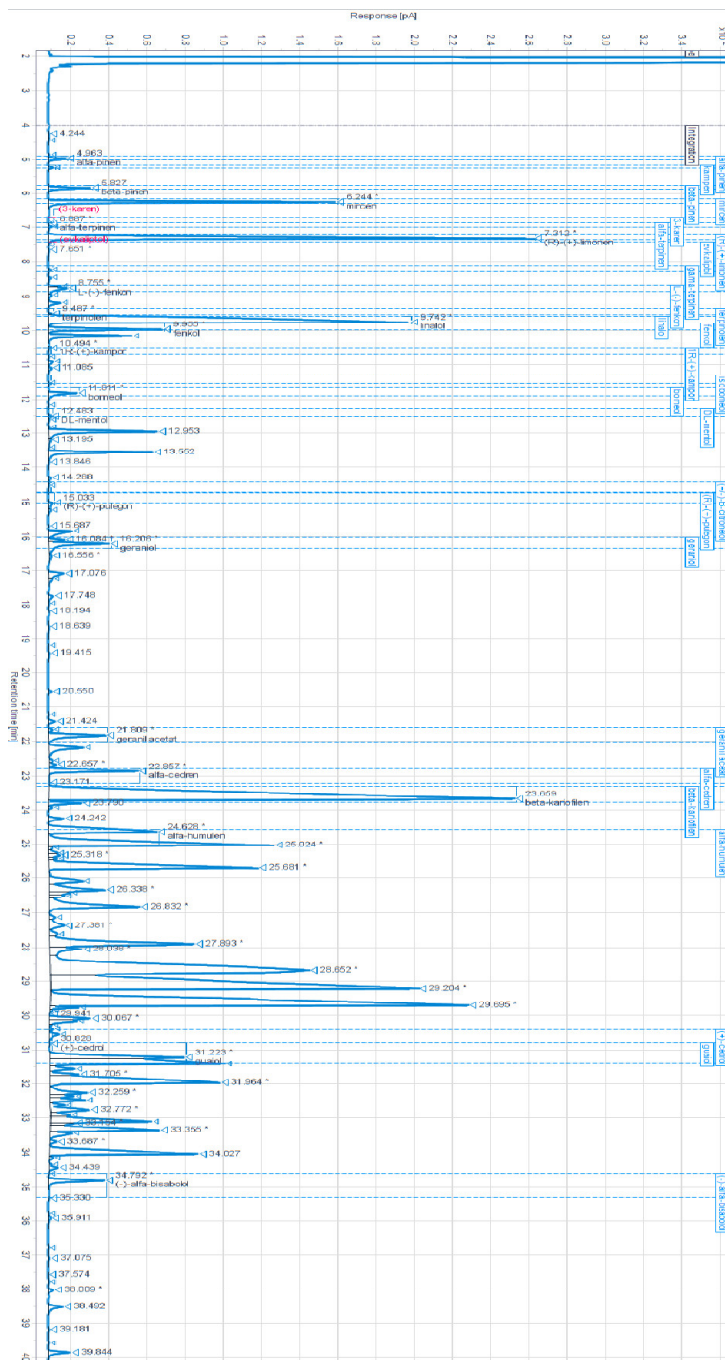
Da lahko metodo označimo za selektivno, mora biti izpolnjen pogoj, da so kromatografski vrhovi pri določenih retencijskih časih dobro ločeni. Če ta pogoj ni izpolnjen, je metoda neselektivna (Aslanyan in sod., 2016). Kromatografski vrhovi so bili simetrični in na kromatogramu dobro ločeni (slika 1), zato smo metodo opredelili za selektivno.

3.2 Natančnost

Vsaka izmerjena meritev se od prave vrednosti navadno vsaj malo razlikuje ali navzgor ali navzdol. Nihanje rezultatov oz. odklon podatkov od povprečne vrednosti podajamo s standardnim odklikom s oz. relativnim standardnim odklikom RSD, ki je izražen v odstotkih in je merilo natančnosti pri analizi podatkov. Relativni standardni odklon se izračuna z deljenjem standardnega odklika s povprečjem vrednosti. Natančnost meritve je obratno sorazmerna s standardnim odklikom. Rečemo lahko tudi, da manjši kot je RSD, bolj natančna je analizna metoda. Natančnost je povezana z naravo meritve, lastnostmi aparature in sposobnostmi analitika, homogenostjo vzorca ter ponovljivimi parametri v okolju (Rutnik, 2017; Zupan, 2009). Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri enakih pogojih opisuje ponovljivost. Kakovost ujemanja rezultatov dobljenih pri različnih pogojih opisuje obnovljivost.

Izvedli smo sedem zaporednih kvantitativnih in kvalitativnih analiz pripravljenega eteričnega olja. Definirali smo, da je metoda natančna, če je RSD manjši od 20 %. zato potrjujemo, da je naša metoda pri pogojih obnovljivosti natančna tudi za mircen (preglednica 1). RSD za ostale analite so bili med 3,54 in 4,85 %, kar je sprejemljivo.

Z vidika vsakodnevne uporabe analizne metode, je natančnost metode potrebno preverili še s t.i. obnovljivostjo, saj lahko analizo opravljamo v različnih dneh, letnih časih in različni analitiki. Enak postopek analize smo izvedli pri obnovljivosti metode s to razliko, da smo vzorce pripravili naslednji dan in opravili meritve.



Slika 1: Kromatogram preiskovanega eteričnega olja vzorca konoplje sorte Fedora, posnet na novem plinskem kromatografu Agilent 8890.

Pri vseh meritvah smo preverili morebitno prisotnost mimobežnikov z Dixonovim Q-testom, pri čemer ni nobena meritev izstopala. V obeh primerih je tako ponovljivosti kot tudi obnovljivosti pri vseh komponentah $RSD < 5 \%$, kar pomeni, da je metoda natančna (podatki niso prikazani). V primeru, da bi bil $RSD > 20 \%$, bi bila metoda nenatančna. Natančnost smo preverili tudi s t-testom z enačbo,

$$t_{izrač.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

kjer je:

- $t_{izrač.}$ izračunana vrednost t,
 \bar{x}_1 povprečna vrednost prve skupine meritev-ponovljivost,
 \bar{x}_2 povprečna vrednost druge skupine meritev-obnovljivost,
s skupni standardni odmik,
 n_1 število meritev po metodi A,
 n_2 število meritev po metodi B.

Pri vseh standardih je t-test pokazal, da med meritvami ni signifikantnih razlik (Evropska komisija, 2021).

Preglednica 1: Povprečna koncentracija analita v vzorcu, standardni odmik in relativni standardni odmik, izračunani na sedmih ponovitvah istega vzorca.

Ime komponente	y_1 [g/L]	y_2 [g/L]	y_3 [g/L]	y_4 [g/L]	y_5 [g/L]	y_6 [g/L]	y_7 [g/L]	Povpreč-na vrednost y [g/L]	s [g/L]	RSD [%]
α-pinen	1,11	1,07	1,06	1,03	1,00	0,99	1,01	1,04	$\pm 0,04$	4,25
Mircen	1,98	1,91	1,88	1,82	1,77	1,76	1,80	1,84	$\pm 0,08$	4,35
Limonen	0,46	0,44	0,44	0,42	0,41	0,41	0,42	0,43	$\pm 0,02$	4,42
Linalol	0,23	0,22	0,22	0,22	0,21	0,21	0,21	0,22	$\pm 0,01$	3,56
β-kariofilen	1,37	1,31	1,29	1,25	1,22	1,21	1,23	1,27	$\pm 0,06$	4,47

Kjer je:

y - masna koncentracija

s - standardni odmik

RSD – relativni standardni odmik

3.3 Točnost

Točnost smo podali kot izkoristek, ki je povprečna vrednost šestih paralelk, pri katerih smo vzorcu eteričnega olja dodali znano koncentracijo standardov. Iz površine pikov smo za vsako komponento izračunali koncentracijo in nato iz razlike koncentracij med vzorcem in vzorcem z dodanim standardom izračunali izkoristek za vsako komponento posebej. Sprejemljiv kriterij za točnost metode je bil, da so vsi

izkoristki med 70 % in 120 %. Rezultati izkoristka metode za posamezne komponente so predstavljeni v preglednici 2. Vsi izkoristki so med 80,5 % in 107,6 %, zato lahko zaključimo, da je metoda točna.

Preglednica 2: Izkoristek metode in standardni odmik za preiskovane analite

Ime komponente	Izkoristek [%]	s [%]
α-pinen	85,58	4,14
Mircen	106,12	5,33
Limonen	107,62	6,33
Linalol	102,26	6,83
β-kariofilen	106,73	7,14

Kjer je:

s - standardni odmik

3.4 Linearnost

Linearnost metode je sposobnost, da v določenim območju dobimo linearno proporcionalne odzive detektorja v odvisnosti od koncentracije vzorca (Rutnik, 2017; Zupan, 2009). V praksi se lahko zgodi, da umeritvena krivulja ni linearna v celotnem koncentracijskem območju. Takrat jo lahko razdelimo na več manjših in tam preizkusimo linearnost, če je korelacijski faktor premice večji ali enak 0,99.

Preglednica 3: Različne koncentracije standardnih raztopin preiskovanih komponent

Ime komponente	a [pA·s]	b [pA·s·L/g]	R ²	Koncentracijsko območje
α-pinen	-1,48	606,36	0,9999	0,03 – 1,15
Mircen	-2,27	476,50	0,9997	0,71 – 6,17
Limonen	-1,49	640,11	0,9997	0,16 – 1,43
Linalol	-34,51	513,50	0,9995	0,10 – 2,41
β-kariofilen	-33,31	667,42	0,9996	0,08 – 7,95

Kjer je:

a – odsek premice na ordinatni osi

b – naklon premice

R - korelacijski faktor

Za določanje linearnosti metode smo pripravili mešanico petih standardov različnih koncentracij v pričakovanem koncentracijskem območju. Pričakovana koncentracijska območja smo določili iz objavljene literature (Bakru in sod., 2020, Hacan in sod. 2022a, Sommano in sod. 2020). Pričakovane masne koncentracije smo izračunali iz podatkov o relativnem deležu (%) komponent v eteričnem olju. Iz rezultatov linearnosti (preglednica 3) vidimo, da so korelacijski faktorji vseh

komponent večji od 0,99, kar potrjuje linearnost metode v območju predvidenih koncentracij.

3.5 Meja zaznavnosti in meja določljivosti

Najnižjo koncentracijo analita v vzorcu, ki jo še lahko zaznamo, ne moremo pa je kvantitativno ovrednotiti, imenujemo meja zaznavnosti (Limit of detection - LOD). Določimo jo iz odseka in napake umeritvene krivulje (Rutnik, 2017; Tevž, 2014). Meje zaznavnosti so predstavljene v preglednici 5 in so bile izračunane iz pripravljene mešanice analitskih standardov. Najmanjša možna koncentracija analita, ki jo še lahko kvantitativno določimo, imenujemo meja določljivosti (Limit of quantification - LOQ). Izračuna se iz umeritvene krivulje in standardnega odmika (Rutnik, 2017; Tevž, 2014). Meje detekcije so predstavljene v preglednici 5 in so bile izračunane iz pripravljene mešanice analitskih standardov.

Preglednica 5: Meja zaznavnosti in meja detekcije preiskovanih komponent

Ime komponente	LOD [g/L]	LOQ [g/L]
α-pinen	0,01	0,04
Mircen	0,11	0,37
Limonen	0,029	0,096
Linalol	0,062	0,205
β-kariofilen	0,18	0,60

Kjer je:

LOD – meja zaznavnosti

LOQ – meja določljivosti

4 ZAKLJUČEK

S tem, ko je bila metoda ponovno uvedena na novejšem instrumentu, smo prepolovili čas, potreben za interpretacijo rezultatov. Na novo smo določili vrednosti validacijskih parametrov, ki so izpolnjevali predhodno postavljene zahteve. Rezultati le teh dokazujejo, da je metoda v posodobljeni različici lahko uporabna za nadaljnje analize različnih eteričnih olj konoplje. Ugotovili smo, da ima vsaka preiskovana komponenta eteričnega olja drugačno mejo zaznavnosti in določljivosti zaradi različne polarosti.

5 VIRI

- Andre, C. M., Hausman, J. F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7, str. 78–89
- Aslanyan, M. A., Bobritskaya, L. A., Nazarova, E. S., Mirnaya, T. A., & Zborovskaya, T. V. (2016). Development and Validation of a Gas Chromatography Method for Quantitative Determination of Lavendar Oil in Lavaflam Preparation. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 50(3), str. 200–204.

- Bakro, F., Jedryczka, M., Wielgusz, K., Sgorbini, B., Inchingolo, R., & Cardenia, V. (2020). Simultaneous determination of terpenes and cannabidiol in hemp (*Cannabis sativa* L.) by fast gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*, 43(14), str. 2817–2826.
- Chacon, F. T., Raup-Konsavage, W. M., Vrana, K. E., & Kellogg, J. J. (2022a). Secondary Terpenes in *Cannabis sativa* L.: Synthesis and Synergy. *Biomedicines* 2022, Vol. 10, str. 3142.
- Chacon, F. T., Raup-Konsavage, W. M., Vrana, K. E., & Kellogg, J. J. (2022b). Secondary Terpenes in *Cannabis sativa* L.: Synthesis and Synergy. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 12, str. 289-295).
- Chen, C., & Pan, Z. (2021). Cannabidiol and terpenes from hemp – ingredients for future foods and processing technologies. In *Journal of Future Foods* Vol. 1, Issue 2, str. 113–127
- European Brewery Convention. (2006). *EBC Analytica, 7.12 - Hop Essential Oils by Capillary Gas Chromatography Flame Ionization Detection*.
- Evropska komisija. (2021). *Guidance Document on Pesticide Analytical Methods for Risk Assessment and Post-approval Control and Monitoring Purposes 1*.
- Hanuš, L. O., & Hod, Y. (2020). Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? In *Medical Cannabis and Cannabinoids*, Vol. 3, Issue 1, str. 61–73 S. Karger AG.
- Isidore, E., Karim, H., & Ioannou, I. (2021). Extraction of phenolic compounds and terpenes from cannabis sativa L. By-products: From conventional to intensified processes. In *Antioxidants*, Vol. 10, Issue 6, str. 115-124
- Rutnik, K. (2017). Optimizacija in validacija metode za določanje sestave eteričnih olj hmelja s plinsko kromatografijo, Diplomsko delo, FKKT MB.
- Sommano, S. R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., & Jantrawut, P. (2020). The Cannabis Terpenes. In *Molecules*, Vol. 25, Issue 24 Str. 65-76
- Tevž, D. (2014). Validacija plinsko kromatografske metode za določanje vsebnosti ogljikovodikov (c 10 -c 40) v tleh in odpadkih. Diplomsko delo, FKKT MB
- Zupan, J. (2009). *Kemometrija in obdelava eksperimentalnih podatkov*. Ljubljana: Kemijski inštitut. Str. 51-96