

ZASTOSOWANIE CHROMATOGRAFII GAZOWEJ POŁĄCZONEJ ZE SPEKTROMETRIĄ MASOWĄ (GC/MS) DO ANALIZY ZŁOŻONYCH MIESZANIN KANABINOIDÓW

Dariusz Blachut¹, Marta Bykas¹, Bogdan Szukalski²

¹Zakład Kryminalistyki i Chemii Specjalnej Urzędu Ochrony Państwa

²Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

APPLICATION OF GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS) TO THE ANALYSIS OF COMPOSITE MIXTURES OF CANNABINOIDS

ABSTRACT – Conditions for the separation and identification by gas chromatography/mass spectrometry method of a cannabinoid mixture consisting of: cannabinol (CBN), cannabidiol (CBD), Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, 9-carboxy-THC and their trimethylsilyl derivatives are described. This method was used to analyze cannabinoid content of the volatile fraction of marihuana (26 components were identified), as well as samples of hashish from Greece (15 components), and hashish samples from Africa, India and Afghanistan. Separation and identification of cannabinoids in extracts of fresh marihuana plants grown in Poland, and in marihuana seeds from Spain were achieved. The proposed conditions for analysis of cannabinoids and their derivatization products may also be used for the analysis of cannabinoids in biological fluids.

Key words: cannabinoids, marihuana, hashish, gas chromatography, mass spectrometry, derivatization.

WSTĘP

Znaleziska archeologów dowodzą, że historia włókien konopnych sięga ok. 4000 lat p.n.e., nie można jednak jednoznacznie określić daty, kiedy człowiek po raz pierwszy rozpoczął uprawę konopi, odkrył ich właściwości odurzające i zaczął je wykorzystywać w praktykach religijnych i w leczeniu. Nie ulega jednak wątpliwości, że konopie uprawiano dość powszechnie, gdyż dostarczały włókna do produkcji odzieży, lin i papieru, a z nasion otrzymywano olej i paszę dla zwierząt. Dość powszechnie również stosowano konopie w medycynie ludowej.

W ciągu ostatnich 200 lat plantatorzy konopi stworzyli wiele krzyżówek starając się uzyskać rośliny o pożądanym cechach np. wzmożonej produkcji żywicy lub mocnych i odpornych włóknach. Wśród istniejących odmian konopi możemy wyróżnić trzy zasadnicze rodzaje: Cannabis indica pochodząca z Półwyspu Indyjskiego, rozpo-

wszechniona w Afryce przez arabskich kupców. Charakteryzuje się bogatym kwiatostanem i obfitym wytwarzaniem żywicy o własnościach psychoaktywnych.

Cannabis sativa, pochodząca z centralnej Azji, wykorzystywano dawniej głównie do produkcji ubrań ze względu na możliwość pozyskiwania długich i dobrej jakości włókien.

Cannabis ruderalis, rosnąca wyłącznie na południowo-wschodnich obszarach byłego Związku Sowieckiego, odznaczająca się małą zawartością żywicy.

Z *Cannabis indica* otrzymuje się szereg psychoaktywnych produktów stosowanych przez narkomanów, z których najważniejsze – marihuana, haszysz i olej haszyszowy zawdzięczają swe efekty psychotropowe obecności Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC).

Marihuana – z portugalskiego „maraguango” (trujący), to odpowiednio wysuszone kwitnąca, szczytowe części oraz liście rośliny *Cannabis*.

Przyjęty powszechnie sposób zażywania marihuany polega na paleniu w fajce, za-roodpornej lufce lub w postaci tzw. „skręta” (joint) niekiedy zmieszanego z tytoniem i inhalacji powstającego dymu.

Zaawansowani palacze preferują fajki wodne, w celu uniknięcia kontaktu z drażniącym dymem. Opcją oszczędnościową jest palenie z balonikiem: wydychany dym po pierwszym zaciągnięciu jest wdmuchiwany do balonika, z którego następuje kolejne zaciągnięcie. Tym sposobem odurzające działanie składników dymu jest bardziej efektywne i trwa dłużej.

Haszysz (czaras) jest surową żywicą otrzymywaną z kwitnących szczytów żeńskich roślin, które nie uległy zapyleniu. Haszysz otrzymuje się z zebranych i wysuszonych roślin, miesza z tłuszczem zwierzęcym, miodem i małą ilością wody a następnie formuje w bloki i suszy.

Znacznie rzadziej czubki roślin oraz haszysz bywa przyjmowany doustnie, jako dodatek do produktów spożywczych np. sałatek. Sporządza się z nich także napoje poprzez zalanie gorącą wodą lub gotowanie z mlekiem.

Charakterystykę produktów otrzymywanych z konopi w różnych regionach świata przedstawia Tabela 1.

Olej konopny: (hasz-olej) jest produktem destylacji liści i ma postać lepkiej cieczy. Zawiera średnio ok. 16% Δ^9 -THC. Ciemna barwa oleju świadczy o nieprawidłowej rafinacji i gorszych właściwościach.

Jednym ze sposobów zażywania oleju konopnego jest przypalanie w specjalnych szklanych fajkach, rozprowadzenie kilku kropel na bibułce papierosa albo na skręcie z marihuany, w celu wzbogacenia ich w składnik odurzający.

Cannabis i jego przetwory są w środowiskach szkolnych, akademickich i kręgach towarzyskich najbardziej popularną używką ze względu na łatwą dostępność oraz niewysoką cenę. Na imprezach, spotkaniach i dyskotekach stanowią one często substytut alkoholu.

Wpływ kryminogenny zażywania konopi i jej przetworów przejawia się tym, iż notoryczni przestępcy często realizują zaplanowane czyny (napady, gwałty, zbrodnie) pod wpływem świadomie użytego środka odurzającego, który obniża samokrytycyzm, zwiększa pewność siebie i pomaga przełamać hamujące bariery psychiczne.

TABELA 1

Charakterystyka produktów otrzymywanych z konopi, w różnych regionach świata.

PRODUKTY CANNABIS			
MARIHUANA: Średnia zawartość Δ^9 -THC wynosi 3%.		HASZYSZ: Średnia zawartość Δ^9 -THC wynosi: 3,6 %.	
POCHODZENIE	CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU	POCHODZENIE	CHARAKTERYSTYKA MATERIAŁU
INDIE	Trzy zasadnicze odmiany: 1. brązowy materiał w postaci zbrylonych, żywicyjnych szczytów kwiatostanów; 2. pocięte fragmenty roślinne koloru brązo-zielonego; 3. materiał, koloru zielonego, składający się głównie z niedojrzałego kwiatostanu żeńskiego.	INDIE	Ciemnobrązowy materiał o nieregularnych kształtach w postaci pałek, gałek lub w formie wafli o błyszczącej powierzchni.
GHANA	Skompresowane w bloki lub płytki, fragmenty liści oraz owocujących i kwitających szczytów kwiatostanu.	LIBAN	Pakowane w białe woreczki bloki (300 g), z brązowo-czerwonego, pylistego materiału. Na opakowaniach znajdują się różnorodne atramentowe stemple.
NIGERIA	Charakterystyczne małe, brązowe skręty zawierające fragmenty łodyg, owocujących szczytów kwiatostanu oraz ciemne ziarna.	TURCJA	Zielonkawo-brązowy proszek lub niewielkie kruche tabliczki opakowane w cienką folię.
MAROKO	Jasnozielony lub żółto-zielony, bardzo drobno zmielony materiał. Brak rozpoznawalnych fragmentów kwiatostanu, ziaren i łodyg.	MAROKO	Kostki o ciemnobrązowej powierzchni i żółto-brązowym lub ciemno-zielonym wnętrzu, opakowane w cienką, przezroczystą folię.
ZAMBIA	Materiał koloru brązowego lub zielonego, uformowany na kształt kolby kukurydzianej i owinięty szorstkim włóknem pochodzenia roślinnego.	AFGANISTAN	Biały luskowaty materiał o konsystencji iłu.
AFRYKA POŁUDNIOWA	1. Uformowany w niewielkie rolki zielony materiał roślinny, owinięty w papier; 2. Brązowy materiał składający się z owocujących szczytów kwiatostanu.	Regiony byłego ZSSR	Jasnobrązowy materiał, sprzedawany na szklanki.

Spośród kilkuset związków chemicznych wykrytych w produktach otrzymanych z konopi indyjskich do najważniejszych należą pochodne dibenzofuranu: Δ^9 -tetrahydrokanabinol, kwas Δ^9 -tetrahydrokanabinolowy, kanabinol, oraz układy dihydroksybenzenu: np. kanabidiol i jego pochodne kwasowe. Do tej pory wyodrębniono i ustalono strukturę ponad sześćdziesięciu związków tej grupy. W konopiach oprócz kanabinoidów występują terpeny, seskwiterpeny, diterpeny oraz ich tlenowe pochodne (alkohole, ketony i tlenki).

Związki te nadają materiałowi roślinnemu charakterystyczny, słodkawy zapach, którego intensywność, wbrew obiegowym opiniom nie może być traktowana jako miernik jakości marihuany lub haszyszu. O tym decyduje bowiem przede wszystkim zawartość Δ^9 -tetrahydrokanabinolu.

METODY ANALITYCZNE

Stwierdzenie, czy badany materiał jest produktem konopi indyjskich, nie wymaga stosowania drogiej i złożonych technik analitycznych, jak GC, HPLC oraz GC-MS, gdyż wystarczą do tego testy barwne wykazujące obecność kanabinoidów (odczynnik Fast Blue B salt), analiza mikroskopowa identyfikująca charakterystyczne cechy morfologiczne rodzaju Cannabis oraz chromatografia cienkowarstwowa (TLC).

Rozdział trzech głównych kanabinoidów: CBD, Δ^9 -THC i CBN można uzyskać na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym stosując układ rozwijający mieszaninę heksanu i eteru dietylowego w stosunku 4:1. Odczynniki wywołujące – roztwór soli Fast Blue B lub p-dimetyloaminobenzaldehydu – pozwalają rozróżnić kanabinoidy na podstawie zabarwienia plam (CBN – fioletowe, Δ^9 -THC – barwa purpurowo-czerwona, CBD – barwa ceglastoczerwona).

Chromatografia gazowa z detekcją niespecyficzną FID (Flame Ionization Detektor) oraz z detekcją masową GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) są technikami z wyboru, gdy konieczne jest uzyskanie większej ilości informacji o badanej próbce a w szczególności:

- udzielenie odpowiedzi, czy zabezpieczone ślady materiału (w ilościach uniemożliwiających wykonanie analizy TLC i testów barwnych) są produktem przerobu surowca odurzającego;
- stwierdzenie, czy skonfiskowane w kilku miejscach próbki narkotyku pochodzą z jednej partii narkotyku (tzw. analiza porównawcza, profilująca);
- wytypowanie geograficznego miejsca pochodzenia narkotyku;
- wykonanie analizy ilościowej wybranych składników produktu, najczęściej psychoaktywnego Δ^9 -THC.

Pierwszym etapem analizy chemicznej jest wybór odpowiedniej techniki ekstrakcji próbki. Klasyczna ekstrakcja w aparacie Soxleta jest czasochłonna, wymaga użycia znacznych ilości rozpuszczalników i dlatego nie nadaje się raczej do rutynowej analizy dużej liczby próbek. Znacznie szybsza i bardziej ekonomiczna jest metoda ekstrakcji z użyciem łaźni ultradźwiękowej. Do ekstrakcji najczęściej stosuje się aceton, etanol, cykloheksan, benzynę lekką, chloroform oraz kombinacje tych rozpuszczalników (3), jednak niektórzy autorzy przestrzegają przed stosowaniem chloroformu i benzyny lekkiej, gdyż THC ulega dość szybkiemu rozkładowi (m.in. do CBN). Dlatego eks-

trakty, uzyskiwane za pomocą tych rozpuszczalników, nie nadają się do dłuższego przechowywania. Znaczną trwałością odznaczają się natomiast roztwory kanabinoidów w etanolu lub metanolu w temperaturze poniżej 0 °C.

Analiza kannabinoidów metodą chromatografii gazowej nie nastęrcza zbytnich trudności (z wyjątkiem pochodnych kwasowych) ze względu na ich trwałość termiczną oraz nieznaczną adsorpcję na kolumnie. Aktualnie stosuje się kolumny kapilarnie z fazami niepolarnymi (fazy dimetylosilikonowe SE-30, SPB-1), fazami słabo polarnymi (fenylometylosilikony SE-52, SPB-5) oraz fazami średnio polarnymi (cyjanoalkilosilikony OV-17). Nie poleca się natomiast stosowania kolumn z fazą polarną opartą na poliglikolach (Carbowax) ze względu na ich zbyt mały temperaturowy zakres pracy (60 °C – 260 °C). Bardzo dobry rozdział trzech podstawowych kanabinoidów – CBN, THC i CBD można uzyskać na kolumnach kapilarnych o długości 10 m. Tzw. kolumny „ultra-narrow bore” (0,05 i 0,1 mm średnicy wewnętrznej) umożliwiają pełny rozdział trzech pochodnych w ciągu niespełna 2 min, co pozwala na szybkie potwierdzenie obecności kannabinoidów w badanym materiale.

Kolumny kapilarnie o większej długości (od 15 do 30 m) znajdują zastosowanie w analizie porównawczej (profilowej) próbek marihuany i haszyszu. Bardzo złożony skład ekstraktów, zawierających kilkadziesiąt składników w różnych proporcjach ilościowych, wymaga starannego doboru rodzaju fazy, długości kolumny oraz warunków analizy w celu uzyskania efektywnego rozdziału. Im lepsza separacja składników ekstraktu, tym chromatogram (profil) posiada więcej cech różnicujących i analiza jest bardziej wiarygodna. Porównywanie próbek w oparciu o względną zawartość trzech głównych kannabinoidów – THC, CBD i CBN jest, jak wykazał Novotny i współ. (7), niewystarczające i prowadzić może do mylnych wniosków. Pełniejszy wynik analizy porównawczej można uzyskać posługując się względną zawartością innych kannabinoidów oraz monitorując frakcję związków lotnych za pomocą tzw. techniki „head space” (5). Polega ona na analizie lotnych frakcji pozostających w równowadze termodynamicznej w układzie zamkniętym. Pary substancji pobiera się z nad termostatuwanej próbki znajdującej się w szczelnym naczyniu i wprowadza bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną. Gdy stężenie analizowanych składników w fazie gazowej jest zbyt małe (niedostateczna ilość w próbce lub zbyt niska lotność), można je zwiększyć poprzez adsorpcję na fazie stałej, a następnie desorpcję odpowiednim układem rozpuszczalników. Przykład zastosowania tej techniki przedstawiono w części doświadczalnej.

Potwierdzenie stosowania marihuany lub haszyszu uzyskuje się na podstawie detekcji Δ^9 -THC i jego metabolitów w materiale biologicznym. Metabolizm Δ^9 -THC polega m.in. na hydroksylacji allilowego ugrupowania tetrahydrobenzenu (C-8 i C-11) oraz łańcucha n-pentyłowego (C-3). Pochodne hydroksylowe ulegają dalszemu utlenianiu do aldehydów i kwasów (C-11 i C-3) a następnie sprzęganiu z kwasem glukuronowym. Technika GC-MS z użyciem jonizacji chemicznej (CI), ujemnej jonizacji chemicznej (NICI) w połączeniu z opcją SIM (Single Ion Monitoring) pozwala oznaczać z dużą precyzją i dokładnością główny metabolit Δ^9 -THC - kwas 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksylowy w stężeniach rzędu 10^{-12} g/ml po przeprowadzeniu go w pochodne siliłowe lub metylowe. Ze względu na niską zawartość w materiale biologicznym oznaczanych metabolitów i wysokie stężenie licznych związków towarzyszą-

cych, metodyka przygotowania próbki jest dość złożona i wymaga rygorystycznego przestrzegania. Czynnikiem dodatkowo utrudniającym procedurę jest możliwość interferencji innych substancji obecnych w próbce, np. obecność w moczu ibuprofenu powoduje znaczne obniżenie wydajności metylacji metabolitów oraz standardu wewnętrznego – deuterowanego kwasu Δ^9 -THC-9-karboksyowego (1).

MATERIAŁ I METODY

Wzorce kanabinolu (CBN), kanabidiolu (CBD), Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC) zakupiono w firmie Sigma Chemicals (ST. Louis, MO, USA). Wzorce kwasu 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksyowego [9-Karboksy-THC] i Δ^8 -tetrahydrokanabinolu (Δ^8 -THC) otrzymano z Division of Narcotic Drugs, Vienna International Centre, ONZ. Odczynniki do derywatywacji N,O-bis-trimetylosililoacetamid (BSA) i N,O-bis-trimetylosililotrifluoroacetamid (BSTFA) oraz odczynnik metylujący, N,N-dimetyloformamid-dimetyloacetal (DMF-DMA) i wodorotlenek trójmetyloanilinowy (TMAH) są produktami firmy Machery-Nagel. Próbki haszyszu i marihuany pochodziły ze zbiorów własnych Zakładu Kryminalistyki i Chemii Specjalnej. Odczynniki i rozpuszczalniki (z wyjątkiem pirydyny) zakupiono w renomowanych firmach i stosowano bez dodatkowego oczyszczania. Pirydynę do derywatywacji suszono i destylowano z nad wodorotlenku potasu.

Do rozdziału wzorców kanabinoidów oraz analizy ekstraktów marihuany i haszyszu zastosowano chromatograf gazowy HP 5890 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). Temperatura komory nastrzykowej wynosiła 250°C, a detektora 280°C. Jako gaz nośny stosowano hel. Warunki analizy, w zależności od rodzaju użytej kolumny kapilarnej, przedstawiono w opisie Tabeli 3.

Do analizy składu ekstraktów haszyszu i marihuany użyto chromatograf gazowy HP 6890 połączony z detektorem masowym HP 5973.

Stosowano kolumnę kapilarną BP-1 o długości 25 m, średnicy wewnętrznej 0,22 mm i grubości filmu 0,25 μm . Temperatura portu nastrzykowego wynosiła 240°C, temperatura źródła jonów 230°C, przepływ gazu nośnego (helu) 0,6 cm^3/min . Temperaturę pieca zaprogramowano następująco: początkowa temperatura 130°C utrzymywała się przez 1 minutę, następnie wzrastała o 15°C/min do temperatury 250°C, po czym następował ponowny wzrost temperatury o 8°C/min do temperatury 295°C, którą utrzymywano przez 4 min. Czas trwania analizy wynosił 19 min.

Analiza ekstraktów marihuany i haszyszu oraz frakcji lotnej z suszu roślinnego wymagała modyfikacji programów temperaturowych, które podano w opisie poszczególnych chromatogramów.

Używano roztwory robocze kanabinolu, kanabidiolu, Δ^9 -THC, Δ^8 -THC i kwasu 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksyowego w etanolu o stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

DERYWATYZACJA

Pochodne trimetylosililowe: 300 μl każdego roztworu roboczego odparowano do sucha w temperaturze 40°C w strumieniu argonu, a do pozostałości dodawano 300 μl pirydyny, 300 μl odczynnika BSA i ogrzewano w temperaturze 70°C przez 20 min. Roztwór po ochłodzeniu używano do badania metodą GC-FID.

Stosowano również inny wariant silanizacji, w którym układ BSA/pirydyna zastąpiono układem BSTFA/acetonyltryl.

Pochodne metylowe: do 100 µl odparowanego roztworu roboczego dodano odczynnik metylujący, N,N-dimetyloformamid-dimetyloacetal (DMF-DMA), w ilości 100 µl. Na kolumnę chromatograficzną podano 1 µl otrzymanego roztworu stosując opcję nastrzyku splitless. Prowadzono również metylację, przy użyciu wodorotlenku trójmetyloanilinowego (TMAH).

Analiza psychoaktywnych produktów konopi:

Do rozdrobionych próbek (100 mg) marihuany i haszyszu dodano 2 ml mieszaniny chloroform-metanol (1:1), ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej, sączono przez filtry Chromafin® 0,45 µm i w zależności od potrzeby, zateżano w strumieniu gazu obojętnego.

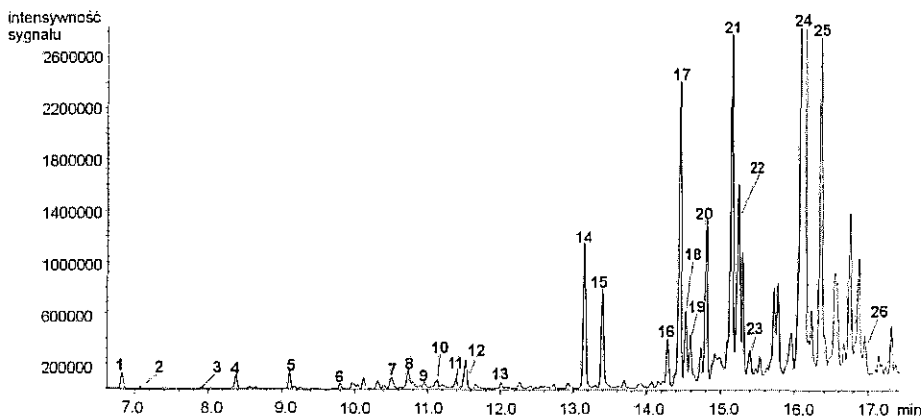
Analiza lotnych frakcji marihuany:

Do badania frakcji lotnej marihuany, nadającej charakterystyczny zapach zielu konopi, zastosowano ekstrakcję w fazie stałej (Solid Phase Extraction – SPE), przy użyciu bloku ekstrakcyjnego Backer SPE-126 z regulowaną próżnią.

1 g rozdrobionego suszu roślinnego umieszczono w kolbie szklanej, termostawianej w temperaturze 50°C. Frakcję, gazową pobieraną za pomocą pompki wodnej przepuszczano przez kolumnę ekstrakcyjną firmy Bakerbond (3 ml) z sorbentem krzemionkowym (40 µm APD, 60 Å), którą uprzednio kondycjonowano mieszaniną metanol-chloroform (5:1). Szybkość przepływu frakcji gazowej przez kolumnę wynosiła ok. 50 ml/min a czas trwania procesu – 6 godzin. Zaadsorbowane związki wymyło dwukrotnie 1 ml mieszaniny metanol – chloroform (5:1) i ekstrakt przed analizą GC/MS zateżono w strumieniu argonu do ok. 30 µl.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Chromatogram ilustrujący skład lotnej frakcji marihuany przedstawiono na Ryc.1.



Ryc. 1. Chromatogram lotnej frakcji marihuany.

Warunki analizy oraz czasy retencji zidentyfikowanych składników podano w Tabeli 2.

Poszczególne związki zidentyfikowano porównując zarejestrowane widma masowe z widmami związków referencyjnych, z komputerowej bazy danych. Zidentyfikowane związki przedstawiono w Tabeli 2.

TABELA 2

Czasy retencji, nazwy, masy cząsteczkowe oraz wzory stechiometryczne składników lotnej frakcji marihuany. Warunki analizy: detekcja MS, kolumna kapilarna BP-1; 25 m × 0,22 mm × 0,25 μm, program temp: 130°C (1 min) – 250°C (0 min), przyrost 15°C/min, 250°C (0 min) – 295°C (4 min), przyrost 8°C/min, split 5:1.

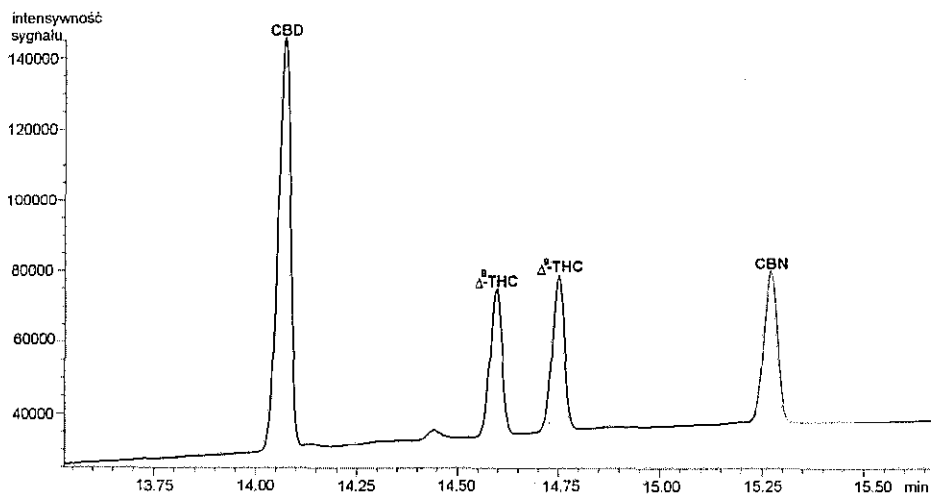
oznaczenie piku	nazwa związku	masa cząsteczkowa	wzór stechiometryczny	czas retencji
1	cykloheksanol	100	C ₆ H ₁₂ O	6,85
2	n-heptanal	114	C ₇ H ₁₄ O	7,09
3	benzaldehyd	106	C ₇ H ₆ O	7,92
4	6-metylhepten-5-on-2	126	C ₈ H ₁₄ O	8,40
5	2-etyloheksanol-1	130	C ₈ H ₁₈ O	9,13
6	tlenek linalolu	170	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	9,82
7	norpinanon	138	C ₉ H ₁₄ O	10,56
8	kamfora	152	C ₁₀ H ₁₆ O	10,76
9	β-pinanon	152	C ₁₀ H ₁₆ O	10,97
10	3-borneol cis-3-pinanon} <small>nie rozdzielone piki</small>	154 152	C ₁₀ H ₁₈ O C ₁₀ H ₁₆ O	11,15
11	alkohol β-fendrylowy	154	C ₁₀ H ₁₈ O	11,41
12	verbenon	150	C ₁₀ H ₁₄ O	11,55
13	5-oksokamfora	166	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	12,03
14	piperytenon	150	C ₁₀ H ₁₄ O	13,18
15	tlenek piperytonu	166	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	13,42
16	α-kariofylen	204	C ₁₅ H ₂₄	14,31
17	β-kariofylen	204	C ₁₅ H ₂₄	14,47
18	trans-α-bergamoten	204	C ₁₅ H ₂₄	14,55
19	α-gujanen	204	C ₁₅ H ₂₄	14,61
20	α-humulen	204	C ₁₅ H ₂₄	14,83
21	β-selinen	204	C ₁₅ H ₂₄	15,17
22	α-selinen	204	C ₁₅ H ₂₄	15,26
23	kalamen	202	C ₁₅ H ₂₂	15,42
24	tlenek kariofylenu	220	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	16,13
25	tlenek kumulenu	220	C ₁₅ H ₂₄ O	16,36
26	α-bisabolol	222	C ₁₅ H ₂₆ O	16,96

Wg Hood i współprac. (5) w lotnej frakcji ziela marihuany można wyróżnić trzy podfrakcje. Podfrakcja I – niskocząsteczkowe związki zawierające tlen – etanol, aceton. Ze względu na duże rozpowszechnienie w produktach roślinnych, podfrakcja ta

posiada niską wartość diagnostyczną. Podfrakcja II – dominująca, zawierająca związki o charakterze monoterenów, a także ich pochodne tlenowe np. α i β -pinen, myrcen, limonen. Podfrakcja III to węglowodory seskwiterpenowe i ich pochodne tlenowe.

W badanym materiale zidentyfikowano część związków tworzących podfrakcję II i III. Związki podfrakcji I w zastosowanych warunkach nie mogły być oddzielone od rozpuszczalnika. Analiza niskocząsteczkowych związków wysokiej lotności wymaga zastosowania kolumn kapilarnych o długości minimum 30 m i grubości fazy stacjonarnej powyżej 0,5 μm . Stosunkowo niewielka liczba związków podfrakcji II (czas retencji od 8 do ok. 12,5 min) może świadczyć o tym, że badana próbka pochodziła ze starego materiału roślinnego lub adsorpcja na fazie stałej przebiegała nieoptymalnie (zbyt szybki przepływ gazu przez złożę lub nieodpowiedni adsorbent). Lepsze rezultaty analizy można by uzyskać stosując specjalną przystawkę do analizy „head space”, sprzężoną z komorą nastrzykową chromatografu. Wzajemne relacje związków podfrakcji II i III, które mogłyby stanowić podstawę porównywania próbek marihuany, w zbyt dużym stopniu zależą od wieku próbki oraz trudnych do odtworzenia parametrów przygotowania analizy. Ponadto istnieje duże prawdopodobieństwo zmian składu frakcji w wyniku utraty związków o najwyższej lotności oraz utleniania węglowodórów terpenowych i seskwiterpenowych do ich tlenków.

Analizę chromatograficzną wzorców kanabinoidów oraz ekstraktów marihuany i haszyszu wykonano na trzech różnych kolumnach kapilarnych. Dwie kolumny z fazą niepolarną SPB-1 i OV-1; kolumny różniły się długością, średnicą przekroju wewnętrznego i grubością fazy. Trzecia kolumna zawierała fazę słabo polarną SE-54. We wszystkich trzech kolumnach uzyskano bardzo dobry rozdział czterech kanabinoidów - Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBD i CBN, zarówno w postaci wolnej, jak i w postaci pochodnych silylowych i metylowych (Ryc.2).



Ryc. 2. Chromatogram mieszaniny wzorców kanabinoidów. Warunki analizy GC: detekcja FID, kolumna kapilarna OV-1; 25 m \times 0,32 mm \times 0,5 μm , program temp.: 120°C (0 min) – 295°C (3 min), przyrost 12°C/min, split 20:1.

Wyniki analizy siliolowych i metylowych pochodnych kwasu 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksyłowego przedstawiono w Tabeli 3.

TABELA 3

Czasy retencji kanabinoidów na kolumnach kapilarnych o różnej polarności (w min).

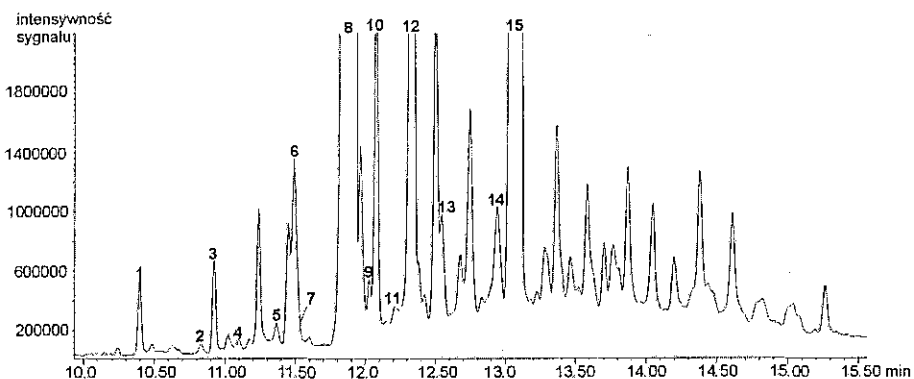
związek chemiczny	typ kolumny				
	OV-1 ^{a)}		BP-1 ^{b)}		SE-54 ^{c)}
	bez derywatywacji	pochodne silanowe	bez derywatywacji ^{c)}	pochodne metylowe	bez derywatywacji
CBD	14,07	13,01	12,65	10,57 ^{d)}	15,59
Δ^8 -THC	14,60	13,69	12,98	11,38	15,86
Δ^9 -THC	14,75	13,80	13,34	11,60	16,08
CBN	15,27	14,47	13,90	12,09	16,76
kwas 11-nor- Δ^9 -THC-9-karboksyłowy [9-karboksy-THC]	—	16,80	—	14,05	—

^{a)} – detekcja FID, kolumna kapilarna OV-1; 25 m × 0,32 mm × 0,5 μ m, program temp: 120°C (0 min) – 295°C (3 min), przyrost 12°C/min, split 1:20, ^{b)} – detekcja MS, kolumna kapilarna BP-1; 25 m × 0,22 mm × 0,25 μ m, program temp: 130 °C (1 min) – 250°C (0 min), przyrost 15°C/min, 250°C (0 min) – 295°C (4 min), przyrost 8°C/min, splitless, ^{c)} – dane jak w [^{b)}] z wyjątkiem: split 6:1), ^{d)} – czas retencji dotyczy eteru dimetylowego CBD, stwierdzono także obecność eteru metylowego CBD o czasie retencji 11,09 min, ^{e)} – detekcja FID, kolumna kapilarna SE-54; 25 m × 0,32 mm × 0,5 μ m, program temp: 100°C (1 min) – 295°C (3 min), przyrost 12°C/min, split 20:1.

Do otrzymania pochodnych siliolowych zastosowano dwie procedury. Pierwsza z nich, wykorzystująca BSA i pirydynę jako rozpuszczalnik, okazała się niezadowalająca. Obserwowano tzw. „multipeak efekt” wywołany niską wydajnością reakcji, tworzeniem się niepożądanych produktów ubocznych oraz szybkim rozkładem pochodnych. Zadowalające wyniki dał drugi wariant postępowania, w którym do reakcji użyto BSTFA w acetonitrylu.

Do otrzymania pochodnych metylowych zastosowano technikę derywatywacji na kolumnie („on-column derivatization”), polegającej na podaniu do komory nastrzykowej chromatografu roztworu substancji oznaczanej w reagenście. Reakcja derywatywacji w temperaturze komory nastrzykowej (240° – 300° C) zachodzi w ciągu kilku sekund, a wydajność procesu metylacji jest zbliżona do 100 %. W niniejszej pracy uzyskano podobną wydajność metylacji dla wszystkich związków z wyjątkiem CBD, który daje dwa produkty: eter dimetyłowy i eter monometyłowy z wydajnością, odpowiednio 90 % i 10 %.

Ryc. 3 przedstawia chromatogram ekstraktu haszyszu pochodzącego z Grecji, na którym uzyskano 29 pików odpowiadającym składnikom ekstraktu.



Ryc. 3. Chromatogram ekstraktu haszyszu pochodzącego z Grecji. Warunki analizy oraz czasy retencji zidentyfikowanych składników podano w Tabeli 4.

Przedział czasu retencji do 9,5 min obejmuje n-alkany, kwasy tłuszczowe oraz składniki olejku eterycznego, których identyfikacje omówiono wcześniej. W przedziale od ok. 10 do 16 min następuje elucja pochodnych kannabinoidów, których w badanym ekstrakcie zidentyfikowano piętnaście (Tabela 4).

TABELA 4

Czasy retencji związków wykrytych w ekstrakcie otrzymanym z materiału roślinnego pochodzącego z Grecji (haszysz grecki). Warunki analizy: detekcja MS, kolumna kapilarna BP-1; 25 m × 0,22 mm × 0,25 μm, program temp: 130°C (1 min) – 250°C (0 min), przyrost 15°C/min, 250°C (0 min) – 295°C (4 min), przyrost 8°C/min, split 6:1.

nr. piku	nazwa związku	masa cząsteczkowa	wzór stechiometryczny	czas retencji
1	kannabidivarin ^(b)	286	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	10,40
2	n-propyl kannabielsoin ^(b)	302	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	10,83
3	kannabicyclol	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	10,93
4	n-butyl CBD ^(c)	300	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	11,10
5	n-butyl Δ ⁹ -THC ^(c)	300	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	11,37
6	kannabichromen ^(b)	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	11,49
7	kannabivarin ^(d)	282	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	11,55
8	kannabidiol CBD	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	11,92
9	kannabikumason	328	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	11,03
10	kannabikumaron	328	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	12,08
11	Δ ⁹ -THC	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	12,22
12	α-kannabielsoin	330	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	12,34
13	Δ ⁹ -THC	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	12,55
14	kannabigerol ^(b)	316	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	12,94
15	kannabinol CBN	310	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	13,11

Odsyłacz literaturowy: (a)-(9); (b)-(4); (c)-(8);(d)-(2,7).

Ze względu na złożony skład ekstraktu, nie uzyskano pełnego rozdzielania wszystkich składników. Poprawę warunków rozdzielania udaje się niekiedy osiągać zmieniając ilość ekstraktu wprowadzonego na kolumnę, modyfikując program temperaturowy lub parametry kolumny kapilarnej.

W przedziale czasów retencji od ok. 13,2 do 16 min. stwierdzono obecność grupy związków, które na podstawie widm masowych można uznać za kanabinoidy o masie cząsteczkowej powyżej 310. Jednakże nie udało się ich zidentyfikować.

Część związków zidentyfikowanych występuje w ekstrakcie w ilościach śladowych w stosunku do głównych składników THC, CBD i CBN (np. pochodne *n*-butylowe) (7) i ich widma MS są często zakłócone przez główne piki widma masowego związków dominujących. Elektroniczna obróbka widm pozwala zminimalizować te zakłócenia, jednak najlepsze efekty daje w tej sytuacji przygotowanie ekstraktu pozbawionego głównych składników np. przez selektywną ekstrakcję odpowiednio dobranym układem rozpuszczalników. Można również zastosować preparatywną HPLC lub TLC.

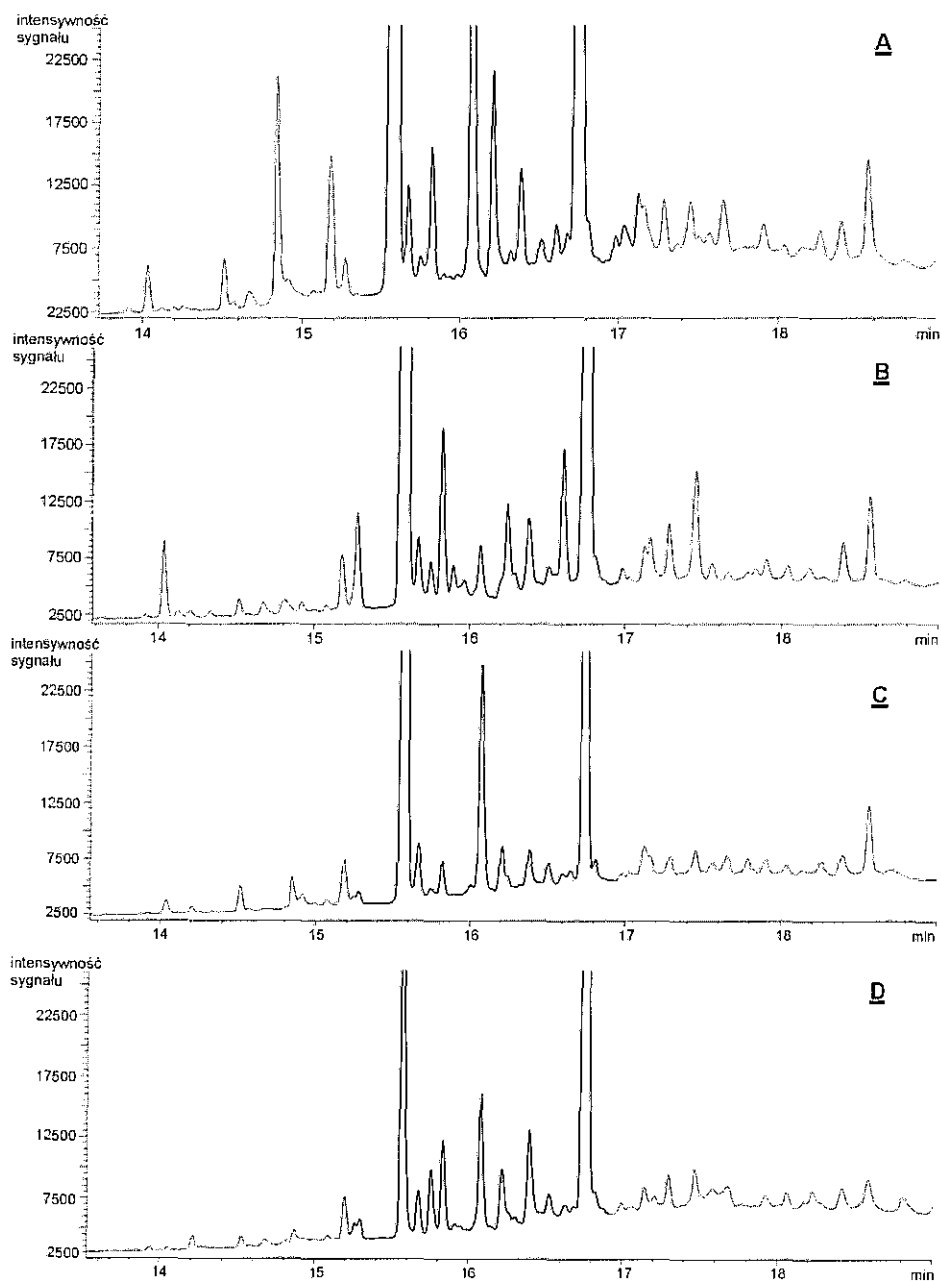
Na Ryc. 4. przedstawiono wyniki analizy porównawczej czterech próbek haszyszu pochodzących z różnych rejonów geograficznych.

Niewielka zawartość Δ^9 -THC i relatywnie duża CBN świadczy o tym, że badany materiał jest stary, tj. długo przechowywany. Cennym źródłem informacji, umożliwiającym porównanie próbek, jest różna zawartość pozostałych kanabinoidów, a w szczególności ich relacje z CBD. Można je ustalić porównując powierzchnie pików, gdyż współczynniki korekcyjne dla reakcji detektora FID dla kanabinoidów są bliskie jedności. Porównywać można jednak wyłącznie próbki świeże lub o jednakowym okresie przechowywania (równe wiekiem).

Ryc. 5. przedstawia chromatogramy: A – ekstraktu próbki marihuany zakwestionowanej u osoby zatrzymanej, B – ekstraktu uzyskanego ze świeżego materiału roślinnego w Polsce (tzw. samosiejka), C – ekstraktu ziarna konopi indyjskich.

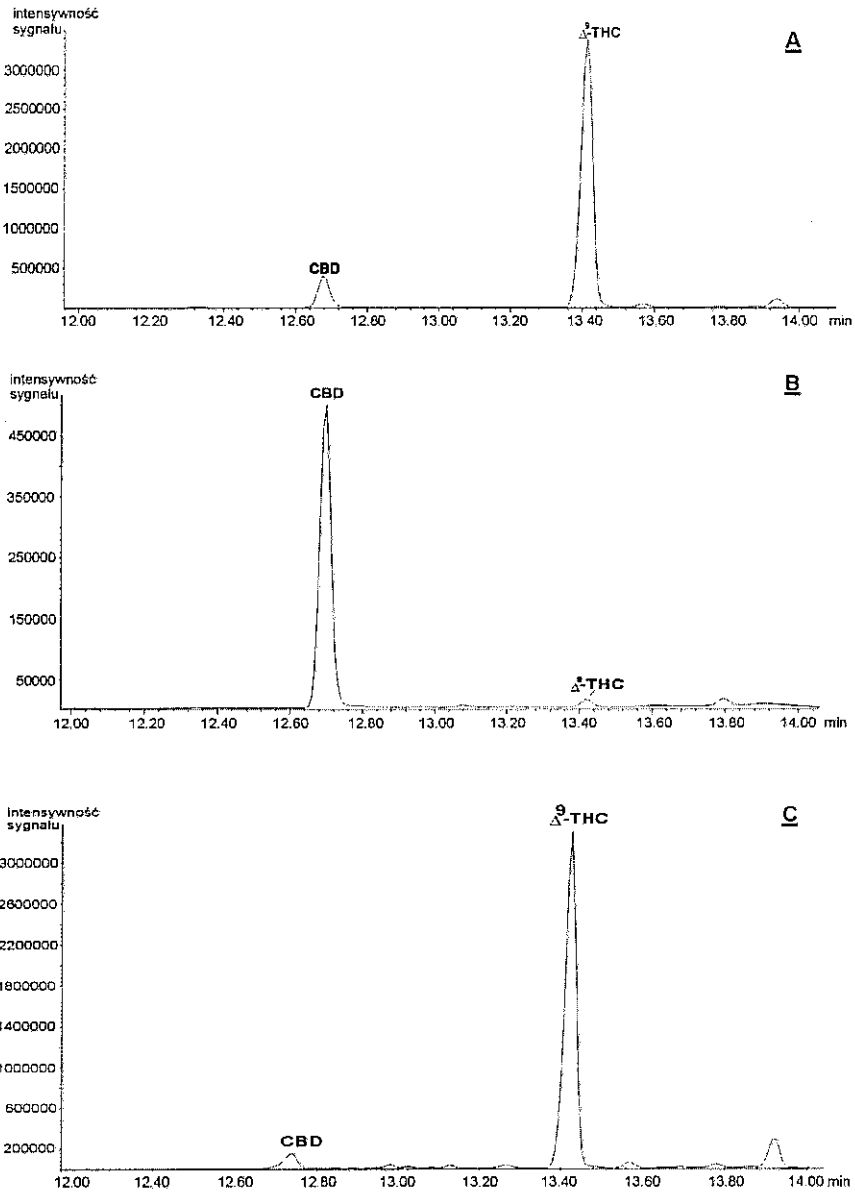
Marihuana zakwestionowana (chromatogram A) zawiera relatywnie dużo Δ^9 -THC (jako suma THC i odpowiedniego kwasu) i niewielką ilość CBN. Dowodzi to, że materiał jest świeży i wywoływać może silny efekt odurzający. Natomiast chromatogram B wykazuje, że badany materiał ma bardzo słabe działanie odurzające.

Największe stężenie kanabinoidów obserwuje się w szczytach kwiatostanów, znacznie mniej w łodygach i liściach. Chromatogram C pokazuje, że przy zastosowaniu odpowiedniej techniki ekstrakcji, można również w innych partiach rośliny, m. in. w nasionach, wykryć szerokie spektrum pochodnych kanabinoidów.



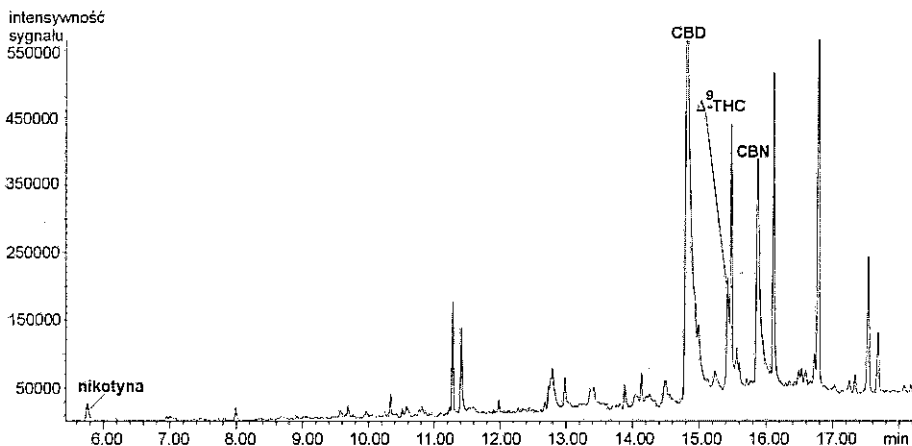
Ryc. 4. Chromatogramy ekstraktów haszyszu z różnych regionów geograficznych: A – haszysz pochodzenia afrykańskiego (nieznana część Afryki), B – haszysz grecki, C – haszysz indyjski, D – haszysz, tzw. „Czarny Afgan”.

Warunki analizy GC: detekcja FID, kolumna kapilarna SE-54; 25 m × 0,32 mm × 0,5 μm, program temp: 100°C (1 min) – 295°C (3 min), przyrost 12°C/min, split 20:1.



Ryc. 5. Chromatogramy ekstraktów różnych próbek rośliny Cannabis. A – świeże konopie siewne, B – tzw. samosiejka wyhodowana w Polsce, C – nasiona konopi pochodzących z Hiszpanii. Warunki analizy GC/MS: detekcja MS, kolumna kapilarna BP-1; 25 m \times 0,22 mm \times 0,25 μ m, program temp.: 130°C (1 min) – 250°C (0 min), przyrost 15°C/min, 250°C (0 min) – 295°C (4 min), przyrost 8°C/min, split 6:1.

Pod adresem toksykologów i analityków kierowane są często pytania czy zakwestionowane przedmioty, np. fajka, fifka szklana, mogły służyć do stosowania marihuany lub haszyszu. Nawet jeśli tego typu dowód rzeczowy jest oczyszczony z resztek materiału pozostałego po paleniu, dość łatwo jest uzyskać ekstrakt zawierający specyficzne związki i jednoznacznie ustalić, czy użyto go do palenia marihuany, haszyszu lub tylko tytoniu. Przykład analizy GC-MS ilustrujący ten problem przedstawia Ryc. 6. W ekstrakcie chloroformowym, otrzymanym po przemyciu ścianek fajki do zażywania tabaki wykryto nikotynę, Δ^9 -THC, CBN i CBD.



Ryc. 6. Chromatogram ekstraktu otrzymanego przez przemycie chloroformem ścianek fajki do zażywania tabaki.

Warunki analizy GC/MS: detekcja MS, kolumna kapilarna BP-1; 25 m × 0,22 mm × 0,25 μm, program temp.: 120°C (1 min) – 245°C (0 min), przyrost 12°C/min, 245°C (1 min) – 295°C (4 min), przyrost 6°C/min, split 6:1.

WNIOSKI

1. Chromatografia gazowa w zastosowanych warunkach pozwala rozdzielać złożone mieszaniny kanabinoidów występujące w różnych produktach Cannabis sativa.
2. Derytawyzacja kanabinoidów przed analizą chromatograficzną poprawia znacznie rozdział poszczególnych składników marihuany i haszyszu.
3. Zastosowanie spektrometrii masowej pozwala zidentyfikować kilkadziesiąt rozdzielonych chromatograficznie składników marihuany i haszyszu.
4. Opisana metodyka jest wystarczająco czuła aby ustalić, czy fajka lub tzw.: „fifka” były używane do palenia marihuany.

STRESZCZENIE

Opracowano warunki rozdziału i identyfikacji metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC/MS) mieszaniny kannabinoidów: kannabinolu (CBN), kannabidiolu (CBD), Δ^9 -THC, Δ^8 -THC i 9-karboksy-THC oraz ich pochodnych trimetylosililowych. Metodę tę zastosowano do analizy kannabinoidów w lotnej frakcji marihuany, w której zidentyfikowano 26 składników, haszyszu pochodzącego z Grecji zawierającego 15 składników oraz próbek haszyszu z Afryki, Indii i Afganistanu. Rozdzielono i zidentyfikowano kannabinoidy w ekstraktach świeżych konopi siewnych wyhodowanych w Polsce oraz nasion konopi z Hiszpanii.

Zaproponowane warunki analizy kannabinoidów i produktów ich derywatywacji mogą być zastosowane również do analizy kannabinoidów w płynach biologicznych.

Słowa kluczowe: kannabinoidy, marihuana, haszysz, chromatografia gazowa, spektrometria masowa, derywatywacja.

PIŚMIENNICTWO

1. Brunk S.D.: *False negative GC/MS assay for carboxy THC due to ibuprofen interference*. J. Anal. Toxicol., 12, 290 (1988).
2. De Zeeuw R.A., Wijsbeek J., Breimer D.D., Vree T.B., van Ginneken C.A.M., van Rossum J.M.: *Cannabinoids with a propyl side chain in Cannabis; Occurrence and chromatographic behavior*. Science, 175, 778-779 (1972).
3. Gough T.A., Baker P.B.: *Identification of Major Drugs of Abuse Using Chromatography*. J. Chrom. Sci., 20, 289-329, (1982).
4. Grote H., Spitteller G.: *Neue Cannabinoide II*. J. Chromatogr., 154, 13-23 (1978).
5. Hood L.V.S., Barry G.T.: *Headspace volatiles of marihuana and hashish: gas chromatographic analysis of samples of different geographic origin*. 166, 499-506 (1978).
6. Merkus F.W.H.M.: *Cannabivarin and tetrahydrocannabivarin: Two new constituents of hashish*. Nature, 232, 579-580 (1971).
7. Novotny M., Lee M.L., Chow-Eng Low, Raymond A.: *Analysis of Marijuana Samples from Different Origins by High-Resolution Gas-Liquid Chromatography for Forensic Application*. Anal. Chem., 48, 24-29, (1976).
8. Smith R.M.: *Identification of Butyl Cannabinoids in Marijuana*. J. Forensic Sci., 42, 610-618 (1997).
9. Vree T.B., Breimer D.D., van Ginneken C.A.M., van Rossum J.M.: *Identification in hashish of tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol analogues with a methyl side chain*. J. Pharm. Pharmacology, 24, 712 (1972).