 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Analýza rostlinného materiálu 40280.1 – Stanovení obsahu kanabinoidů metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

STANOVENÍ OBSAHU KANABINOIDŮ METODOU GC

1 Účel a rozsah

Postup je určen pro kvantitativní stanovení Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 -THC), případně dalších kanabinoidů v odrůdách konopí setého.

Poznámky

1 Při stanovení kanabinoidů metodou GC jsou vzhledem k vysoké teplotě injektoru všechny kyselé kanabinoidy dekarboxylovány a výsledek odpovídá součtu jejich neutrálních a kyselých forem.

2 Princip

Kanabinoidy se ze vzorku konopí extrahují hexanem a následně se stanoví metodou plynové chromatografie (GC) s využitím plamenově-ionizačního detektoru (FID). Vyhodnocení se provede metodou vnitřního standardu.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Skvalan (2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosan) – vnitřní standard.
- 2 n-Hexan, pro GC.
- 3 Extrakční roztok.
Příprava: 35 mg skvalanu (1) se rozpustí ve 100 ml hexanu (2).
- 4 Δ^9 -Tetrahydrokanabinol, 1 mg/ml v methanolu.
- 5 Kanabinol, 1 mg/ml v methanolu.
- 6 Kanabidiol, 1 mg/ml v methanolu.

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Plynový chromatograf s detektorem FID.
- 2 Analytické váhy s přesností 0,0001 g.
- 3 Tříštivý kávomlýnek (např. ETA 062).
- 4 Ultrazvuková lázeň.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Analýza rostlinného materiálu 40280.1 – Stanovení obsahu kanabinoidů metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

- 5 Automatická pipeta s nastavitelným objemem, (100 – 1000) µl.
- 6 Zkumavky, asi 10 ml.
- 7 Odstředivka laboratorní (3000 ot/min).
- 8 Vialky se šroubovacím uzávěrem, 2 ml.

5 Postup

5.1 Příprava vzorku

Vzorek se připraví podle JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 4.5, postup 60080.1 Úprava vzorků konopí pro stanovení THC. Vzorek konopí musí být nejdéle do 48 h po odběru vysušen při teplotě do 70 °C do konstantní hmotnosti (obsah vlhkosti 8 % – 13 %). Po vysušení se uchovává bez drcení při teplotě do 25 °C v papírových pytlích na tmavém místě.

5.2 Příprava zkušebního vzorku

Ze vzorku se odstraní velké části stonků. Poté se vzorek důkladně promíchá a kvartací se připraví reprezentativní část vzorku, která se dále zpracovává tak, že se odstraní zbylé stonky a semena větší než 2 mm. Takto upravený vzorek se pomele na tříštivém kávomlýnku. Celková doba mletí 60 s se rozdělí do tří částí, aby nedocházelo k zahřívání vzorku během mletí a zároveň byl získán polojemný prášek (veškeré částice musejí projít sítím 1 mm). Mezi mletím jednotlivých vzorků je potřeba všechny části mlýnku důkladně očistit ethanolem.

Poznámky


- 2 *Typ mlýnku se volí tak, aby při mletí nedocházelo k zahřívání vzorku a zároveň k ulpívání konopné pryskyřice na jeho součástech.*
- 3 *Takto namletý vzorek může být skladován ve vhodné uzavíratelné nádobce na suchém tmavém místě při teplotě do 25 °C po dobu nejdéle deseti týdnů.*

5.3 Extrakce

Do zkumavky se naváží 100 mg zkušebního vzorku s přesností na 0,1 mg, přidá se 5 ml extrakčního roztoku (3), obsahujícího vnitřní standard. Zkumavka se vloží do ultrazvukové lázně, kde se vzorek extrahuje po dobu 20 min. Poté se vzorek odstředí 5 min při asi 3000 ot/min. Připravený supernatant se převede pomocí automatické pipety do 2ml vialky a analyzuje se na GC.

5.4 Stanovení plynovou chromatografií

Vlastní analýza se provádí na plynovém chromatografu s plamenově-ionizačním detektorem. Pro separaci kanabinoidů se použije kapilární kolona s chemicky vázanou nepolární fází na bázi dimethylpolysiloxanu s 5 % fenylu. Měření se provede izotermálně při teplotě 260 °C. Při průtoku He 1,5 ml/min opouští všechny sledované látky kolonu mezi 3. až 8. minutou. Následně

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Analýza rostlinného materiálu 40280.1 – Stanovení obsahu kanabinoidů metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

se zvýší teplota pece tak, aby se odstranily z kolony veškeré nečistoty. Tabulka č. 1 shrnuje možné nastavení chromatografických podmínek.

Tabulka č. 1. Příklad nastavení chromatografických podmínek.

Plynový chromatograf	GC Agilent 7890B - MSD 5977B
Kapilární kolona	DB-5 (30 m × 0,25 mm, film 0,25 μm)
Nosný plyn	Helium
Průtok nosného plynu	1,5 ml/min
Teplota injektoru	300 °C
Teplota detektoru	300 °C
Teplotní program	260 °C (8 min) → 30 °C/min → 290 °C (17 min)
Objem nástřiku, dávkování	1 μl, split 1 : 40

6 Vyhodnocení a vyjádření výsledků


6.1 Kvalitativní analýza

Píky kanabinoidů v analyzovaném vzorku se identifikují na základě jejich retenčních časů, porovnáním s referenčním vzorkem o známém složení.

V tabulce č. 2 jsou uvedeny retenční časy t_R jednotlivých kanabinoidů a jejich relativní retenční časy R_{tR} vzhledem k vnitřnímu standardu pro výše uvedený teplotní program a kolonu. Kanabinol je zde uveden z důvodu, že jeho přítomnost může být indikátorem nesprávného skladování vzorku.

Tabulka č. 2. Retenční časy a relativní retenční časy stanovovaných látek

Analyt	Zkratka	Retenční čas (min)	Relativní retenční čas
Kanabidiol	CBD	4,056	0,69
Δ^9 -Tetrahydrokanabinol	Δ^9 -THC	4,825	0,82
Kanabinol	CBN	5,463	0,93
Skvalan		5,863	1,00

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – Analýza rostlinného materiálu 40280.1 – Stanovení obsahu kanabinoidů metodou GC	Vydání	1
		Revize	2

6.2 Kvantitativní analýza

Vyhodnocení se provede metodou vnitřního standardu z kalibrační přímky. Provede se tříbodová případně pětibodová kalibrace (podle toho, zda se jedná pouze o kontrolu ploch osetých technickým konopím nebo o proces uznávání dané odrůdy) v rozsahu (0,002 – 0,5) mg/ml Δ^9 -THC v extrakčním roztoku, což pro výše popsanou metodu odpovídá obsahu (0,01 – 2,5) % Δ^9 -THC v reálném vzorku. Kalibrace pro stanovení CBD se provede ve stejném rozsahu, tzn. (0,002 – 0,5) mg/ml CBD v extrakčním roztoku. Obsahy jednotlivých látek jsou automaticky vypočítávány z kalibračních závislostí pomocí řídicího softwaru.

Výsledky stanovení obsahu Δ^9 -THC a CBD se získávají jako průměr ze dvou paralelních stanovení. Uvádí se v % a jsou vyjádřeny na dvě desetinná místa.

7 Literatura

- 1 Regulation (EC) No 2316/1999, Article 7b, Annex XIII, Community method for the quantitative determination of Δ^9 -THC (tetrahydrocannabinol) content in hemp varieties.