

Regulativni, teoretski i praktični aspekti analitičke metode za određivanje sastava ulja Cannabis Sativa L.

Perković, Zvonimir

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:014951>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-27**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački
smjer

Zvonimir Perković

Regulativni, teoretski i praktični aspekti analitičke
metode za određivanje sastava ulja *Cannabis Sativa L.*

Diplomski rad

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački
smjer

Zvonimir Perković

Regulativni, teoretski i praktični aspekti analitičke
metode za određivanje sastava ulja *Cannabis Sativa L.*

Diplomski rad

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Neposredni voditelj: Pavo Živković, asistent

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija; istraživački smjer

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

**Regulativni, teoretski i praktični aspekti analitičke metode za određivanje sastava
ulja *Cannabis Sativa L.***

Zvonimir Perković

Rad je izrađen na: Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Mentor: Aleksandar Sečenji, doc. dr. sc.

Sažetak:

Cannabis Sativa L. je biljka iznimno bogatog kemijskog profila. Farmaceutska industrija koristi spojeve tetrahidrokanabinol (THC) i kanabidiol (CBD) iz kanabisa u lijekovima kao što su Dronabinol i Sativex kao terapiju za razne bolesti. Rekreativno korištenje kanabisa postalo je sve više popularno u zadnjih nekoliko godina, a posljedica toga je povećanje broja proizvoda na bazi kanabisa i povećanje tržišta takvih proizvoda u svijetu. Ovaj rad opisuje zakonsku problematiku vezanu za kategorizaciju i kontrolu proizvoda na bazi kanabisa, daje kratak prikaz analitičkih tehnika korištenih u analizi kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa i na kraju koristi teoretske kalkulacije na osnovi Hansenovih parametara topljivosti u svrhu predviđanja retencijskog vremena molekula u kromatografskoj analizi. Rezultati kalkulacija pokazali su korelacije između različitih parametara izračunatih softwareom HSPiP.

Diplomski rad obuhvaća: 51 stranicu, 22 slike, 7 tablica, 47 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Cannabis sativa L.*, CBD, Hansenovi parametri topljivosti, kanabinoidi, modeliranje HPLC metode, THC

Rad prihvaćen: 04. listopada 2021.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. izv. prof. dr. sc. Mirela Samardžić, predsjednica
2. doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji, mentor i član
3. doc. dr. sc. Olivera Galović, članica
4. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, zamjenski član povjerenstva

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za Kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate University Study of Chemistry; Research study

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Chemistry

**Regulatory, theoretical and practical aspects of the analytical method for determining
the composition of *Cannabis Sativa L.* oil**

Zvonimir Perković

Thesis completed at: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of
Osijek

Supervisor: Aleksandar Sečenji, PhD, assistant prof.

Abstract:

Cannabis Sativa L. is a plant with an extremely rich chemical profile. The pharmaceutical industry uses tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD) compounds from cannabis in drugs such as Dronabinol and Sativex as a therapy for various diseases. Recreational cannabis use has become increasingly popular in recent years, resulting in an increase in the number of cannabis-based products and an increase in the market for such products worldwide. This thesis describes the legal issues related to the categorization and control of cannabis-based products, gives a brief overview of analytical techniques used in the analysis of cannabis and cannabis-based products and finally uses theoretical calculations based on Hansen solubility parameters to predict retention time of molecules in chromatographic analysis. The results of the calculations showed correlations between different parameters calculated by the HSPiP software.

Thesis includes: 51 pages, 22 figures, 7 tables, 47 references

Original in: Croatian

Keywords: *Cannabis sativa L.*, cannabinoids, CBD, Hansen Solubility Parameters, modeling of HPLC method, THC

Thesis accepted: 04. October 2021.

Reviewers:

1. Mirela Samardžić, PhD, associate prof.
2. Aleksandar Sečenji, PhD, assistant prof.
3. Olivera Galović, PhD, assistant prof.
4. Martina Šrajer Gajdošik, PhD, assistant prof., alternate member of the committee

Thesis deposited in: Library of Department of Chemistry, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. Uvod..... | 6 |
| 2. Literaturni pregled..... | 7 |
| 2.1. Zakonski i pravni aspekti za regulaciju proizvoda na bazi <i>Cannabis Sativa L.</i> | 7 |
| 2.1.1. Vrste regulacija - farmaceutske regulacije, medicinske regulacije, regulacije za suplemente (dodatke prehrani), regulacije za kozmetičke pripravke | 8 |
| 2.1.1.1. Regulacijski kontekst za proizvode s niskom razinom THC-a | 9 |
| 2.1.1.2. Kategoriziranje i reguliranje kozmetičkih proizvoda | 11 |
| 2.2. Botanički opis <i>Cannabis Sativa L.</i> | 11 |
| 2.3. Aktivne tvari u <i>Cannabis Sativa L.</i> | 13 |
| 2.3.1. Primjeri kanabinoida i kemijski opis..... | 14 |
| 2.3.1.1. (-)- Δ^9 -trans-tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC)..... | 14 |
| 2.3.1.2. Kanabidiol (CBD) | 15 |
| 2.3.1.3. Kanabigerol (CBG) | 16 |
| 2.3.1.4. Kanabinol (CBN) | 17 |
| 2.3.1.5. Tetrahidrokanabivarin (THCV)..... | 17 |
| 2.4. Proizvodi na bazi <i>Cannabis Sativa L.</i> prisutni na tržištu | 18 |
| 2.4.1. Nedosljednost podataka sastava proizvoda s rezultatima analize | 21 |
| 2.5. Analitičke metode za određivanje sastava proizvoda na bazi <i>Cannabis Sativa L.</i> | 22 |
| 2.5.1. HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti | 23 |
| 2.6. Hansenovi parametri topljivosti (<i>Hansen Solubility Parameters, HSP</i>) | 31 |
| 2.6.1. HSPiP (<i>Hansen Solubility Parameters in Practice</i>) | 34 |
| 2.6.2. Teorija kalkulacije za određivanje retencijskog vremena | 35 |
| 3. Eksperimentalni dio | 38 |
| 3.1. HSPiP kalkulacije..... | 38 |
| 3.2. Korelacija retencijskog faktora s kalkuliranim molekularnim deskriptorima | 40 |
| 4. Rezultati i rasprava..... | 43 |
| 4.1. HSPiP kalkulacije..... | 43 |
| 4.2. Rezultati korelacija retencijskog faktora s kalkuliranim molekularnim deskriptorima..... | 43 |
| 5. Zaključak..... | 45 |
| 6. Literaturni izvori | 46 |
| 7. Popis kratica i simbola | 50 |
| 8. Životopis autora | 52 |

1. Uvod

Razvojem industrijskih trendova prirodnih proizvoda došlo je do povećanja popularnosti kanabisa. Sve više kompanija razvija proizvode na bazi kanabisa koji je do prije nekoliko godina bio ilegalan u većini država. Dolazi do pojave sve većeg broja proizvoda koji mogu biti svrstani u mnogo različitih kategorija, a pri tome se javljaju određene zakonske prepreke. Ovaj rad će opisati i prikazati zakonski aspekt vezan za proizvode na bazi kanabisa gdje će se ukazati na spomenute prepreke. Ukratko će biti opisana biljka iz botaničkog aspekta te će se opisati kemijski sastav uz nekoliko primjera kanabinoida s potencijalnom primjenom u medicini. Nadalje, spomenuti će se nekoliko metoda korištenih u analiziranju kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa te će se provesti teoretske kalkulacije korištenjem Hansenovih parametara topljivosti u svrhu predviđanja redosljeda elucije, tj. retencijskog vremena kanabinoida pri kromatografskoj analizi. Dobiveni rezultati će se usporediti s literaturnim rezultatima kromatografske analize 11 kanabinoida.

2. Literaturni pregled

2.1. Zakonski i pravni aspekti za regulaciju proizvoda na bazi *Cannabis Sativa L.*

U posljednjih nekoliko godina došlo je do velikog razvoja industrije kanabisa. Sve više država radi na legalizaciji kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa, počevši od lijekova pa sve do raznih dodataka prehrani. U državama Europe (izvan i unutar Europske Unije) postoje određena ograničenja za koncentracije aktivnih tvari ili potpune zabrane određenih proizvoda. U prvom redu ta ograničenja odnose se na tetrahidrokanabinol (THC). Prema nedavnoj odluci Europskog parlamenta, legalna razina THC-a u proizvodima na bazi kanabisa podignuta je s 0,2% na 0,3% i tako se prilagodila standardima SAD-a [1].

Europska komisija je u siječnju 2019. promijenila zakon za kanabinoide kao „novu hranu“ (*Novel foods*), prema kojem se svi ekstrakti kanabisa smatraju „novom hranom“ uz poštivanje ranije spomenutih ograničenja koncentracije. Promijenjen je i zakon vezan za biljku *Cannabis sativa L.* koji sada nalaže da se samo ekstrakti sjemenki smatraju hranom, a listovi i cvjetovi ostavljeni su u „sivoj zoni“. Zakoni u vezi proizvoda na bazi kanabisa u EU i dalje variraju od države do države. Švicarska je jedna od država Europe kod koje se vrlo rano počelo formirati tržište proizvoda s niskom razinom THC-a. 2011. godine se prema aktu o kontroli narkotika legalna razina THC-a povećala s 0,3% na 1% kako bi se u obzir uzela biološka varijabilnost i nesigurnost kod mjerenja ispitivanih uzoraka industrijske konoplje. Spomenuta odluka u prvo vrijeme nije imala veliki utjecaj na tržište proizvoda s niskom razinom THC-a. U 2016. godini proizvodi s niskom razinom THC-a počeli su izlaziti na tržište u velikom broju, a kategorizirani su i regulirani kao zamjena za duhan uz prateća zdravstvena upozorenja i adekvatne zakone vezane za oporezivanje. Posljedica toga bila je povećanje broja proizvoda na bazi kanabisa s niskom razinom THC-a na Švicarskom tržištu, a uskoro se isto proširilo i na ostale države Europe (Austrija 2017.; Italija 2017.; Francuska, Njemačka i Belgija 2018., itd.) [2].

Primjerice, određene talijanske kompanije izbjegle su ranije spomenutu „sivu zonu“ vezanu za zakone o lišću i cvjetovima kanabisa na način da su ih počeli registrirati kao hranu za životinje, ali s druge strane čiste ekstrakte kanabinoida zabranjeno je registrirati na takav način. Austrijska kompanija CannHelp je svoje ekstrakte kanabinoida registrirala kao aromatske proizvode. U Njemačkoj su u ožujku 2019. zabranjeni proizvodi koji sadrže kanabidiol (CBD), osim ako nisu ranije registrirani kao medicinski proizvodi ili „nova hrana“. Španjolska ima liberalnije zakone u vezi kanabisa pa se od travnja 2019. svi proizvodi na bazi kanabisa, prirodni ili sintetički, kao i cijela biljka *Cannabis sativa L.*

smatraju „novom hranom“. Jedan od rigoroznijih primjera može se vidjeti u Švedskoj koja je klasificirala CBD ulja s niskim razinama THC-a kao narkotike te je odbijen prijedlog da se proizvodi sa CBD-om za inhalacijsku ili oralnu upotrebu reguliraju farmaceutskim regulacijama. S druge strane, dobar primjer liberalnosti je Belgija koja je proizvode na bazi biljke *Cannabis Sativa L.* kategorizirala u skupinu ostalih duhana za pušenje pod uvjetom da sadrže dozvoljeni postotak THC-a. Nizozemska je primjer države koja ima zabranu proizvodnje ekstrakta biljke, a najveći su proizvođač industrijske konoplje pa se uzgojena biljka obrađuje u inozemstvu. CBD nije legalan, ali je uvršten u „lake droge“, a CBD proizvodi ne smiju sadržavati više od 0,05% THC-a. S druge strane zakonom je omogućena konzumacija cvjetova biljke pušenjem pod određenim uvjetima, točnije u tzv. „coffeeshop-ovima“ [3].

2.1.1. Vrste regulacija - farmaceutske regulacije, medicinske regulacije, regulacije za suplemente (dodatke prehrani), regulacije za kozmetičke pripravke

Zakonske regulative različite su za farmaceutske proizvode, tj. lijekove i za dodatke prehrani. Lijekovi su rigorozno regulirani od strane farmaceutske industrije te prema zakonima svake pojedine države u kojoj se određeni farmaceutski pripravak koristi. Farmaceutske regulacije donose se na temelju detaljnih kemijskih analiza u kojima se koriste vrlo precizni instrumenti koji imaju nisku toleranciju na pogreške, a rezultat toga su detaljni i precizni rezultati analitičkog sastava ispitivanog proizvoda. S druge strane, dodaci prehrani se ne ubrajaju u skupinu strogo reguliranih proizvoda, a posljedica toga je lošija kvaliteta proizvoda, nerijetko netočni podaci vezani za kemijski sastav proizvoda, a u nekim slučajevima čak i nedozvoljene količine zakonski reguliranih tvari u proizvodima (npr. više od 0,3% THC-a), kao što će se moći vidjeti dalje u tekstu. Takav pristup prema kontroli sastava i kvalitete proizvoda koji se ubrajaju u dodatke prehrani povećava rizik narušavanja zdravlja kod pojedinaca koji ih koriste.

Još jedan problem pojavljuje se kod reklamiranja proizvoda na bazi kanabisa, pogotovo kod proizvoda reklamiranih kao "CBD proizvodi", a to je navođenje pozitivnih utjecaja na zdravlje kao što su izlječenje ili olakšanje simptoma različitih bolesti, npr. nesanicе, migrene, anksioznosti, gubitka apetita, itd. Također se navode farmakološki učinci kao npr. antidepressivno ili analgetsko djelovanje. Spomenuti pozitivni utjecaji uglavnom su navedeni u promotivnim materijalima ili na web-stranicama kompanija koje prodaju CBD proizvode. Takve tvrdnje su u pravilu autorizirane regulacijama prehrane i zdravlja za hranu ((EC) No 1924/2006), ali kod ovog primjera to nije slučaj. Potrebno je napomenuti da se ova tvrdnja

ne odnosi na lijekove koji sadrže ili su na bazi CBD-a zato što za njih vrijede drugačije regulacije. Lijekovi koji su na bazi CBD-a ili sadrže CBD su dozvoljeni i koriste se za određeni broj medicinskih slučajeva [2, 4].

Primjer je oralna otopina koja sadrži CBD ekstrahiran iz biljnog materijala odobrena 2018. u SAD-u od strane Agencije za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration, FDA*) pod nazivom "Epidiolex", a u Europi od strane Europske Medicinske Agencije 2019. pod nazivom "Epidyolex" kao terapija za napadaje uzrokovane Dravet sindromom i Lennox-Gaustaut sindromom [2,5].

Kao što se može pročitati iz svih ranije navedenih podataka, postoje mnoge prepreke u zakonskoj regulaciji, regulaciji proizvodnje, reklamiranju i promociji proizvoda na bazi kanabisa. Neki od tih problema su: nedosljednost u sastavu, neadekvatno deklariranje, loša kvaliteta proizvoda, prisutnost potencijalno kancerogenih onečišćenja, manjak informacija o sigurnosti korištenja kao što su kontraindikacije ili interakcije s lijekovima, manjak dokaza o efektivnosti proizvoda u terapijske svrhe, itd. S druge strane potrebno je naglasiti da bez obzira na navedene podatke o nedostatku regulacije, do danas u Europi nije zabilježen slučaj štetnog djelovanja spomenutih proizvoda na zdravlje korisnika. Razlog tomu može biti trenutni slabi nadzor korištenja, a samim time i teško utvrđivanje potencijalnih štetnih utjecaja vezanih za dugoročno korištenje navedenih proizvoda [2].

2.1.1.1. Regulacijski kontekst za proizvode s niskom razinom THC-a

UN-ove konvencije za kontrolu droga izdaju zakone vezane za nacionalnu kontrolu droga koji navode da je neautorizirana prodaja cvjetova i ekstrakta kanabisa kriminalno djelo, ali to se ne odnosi na uzgoj biljaka kanabisa za industrijske svrhe kao što su sjemenke i uzgajanje industrijske konoplje za proizvodnju tkanine. U spomenutim konvencijama ne navodi se CBD što je potaknulo pitanje treba li se CBD ekstrahiran iz biljke svrstavati u ekstrakte kanabisa ili kao supstancu male vjerojatnosti zloupotrebljavanja koju nije potrebno kontrolirati. Uz sve navedeno potrebno je napomenuti da postoje laboratorijski sintetizirani oblici CBD-a koji se ne svrstavaju u ovu skupinu [2].

Europska Unija ima različite regulacije koje se mogu staviti u kontekst proizvoda s niskom razinom THC-a koje omogućuju njihovu kategorizaciju kao hranu, lijekove ili dodatke prehrani. Određene regulacije vrijede za sve države članice EU dok su neke od regulacija ostavljene na autonomiju svakoj pojedinoj državi.

Kao što je ranije spomenuto postoje mnoge tvrdnje o pozitivnim utjecajima proizvoda s niskom razinom THC-a na zdravlje pa se u tom slučaju može primijeniti EU regulativa vezana za lijekove. Regulativa 2001/83/EC nalaže sljedeće:

"Medicinski proizvod je svaki proizvod koji vraća, popravlja ili modificira fiziološke funkcije vršenjem farmakološkog djelovanja ili se prezentira da ima svojstva namijenjena liječenju ili prevenciji bolesti." [2].

Ova regulativa uključuje medicinske proizvode na bazi kanabisa namijenjene za ljudsku upotrebu te je za njih potrebna adekvatna autorizacija kvalitete, sigurnosti i efikasnosti. U ovom slučaju ponovno se može kao primjer dati Epydiolex/Epidiolex.

Regulacije vezane za hranu su drugačije te se pomoću njih može tumačiti proizvode na bazi kanabisa kao što su pića, gotova jela, brašno, itd. Regulativa (EC) No 178/2002 daje smjernice i generalne zahtjeve vezane za zakone o hrani koji nalažu da se kozmetika, medicinski proizvodi, narkotici ili psihoaktivne supstance ne smiju kategorizirati kao hrana.

U zasebnu kategoriju stavlja se tzv. "nova hrana" koja se definira kao: "hrana koja nije konzumirana u značajnom udjelu od strane ljudi u EU prije 15. svibnja 1997." kada je donešen zakon. EU katalog "nove hrane" nije formalni dio EU legislacije za hranu nego služi kao orijentacija pri odlučivanju potrebe za autorizacijom proizvoda pod regulativom "nove hrane" [2].

Katalog sadrži sljedeće smjernice vezane za *Cannabis sativa L.*:

"U Europskoj Uniji, uzgoj podvrsta *Cannabis sativa L.* je dozvoljen pod uvjetom da su iste registrirane u Katalogu agrokulturalnih biljnih vrsta te da sadržaj THC-a ne prelazi 0,2 tj. 0,3%. Neki proizvodi dobiveni od biljke *Cannabis sativa* kao što su dijelovi biljke, sjemenke, ulje i brašno ne spadaju u kategoriju "nove hrane" zbog povijesti konzumacije i korištenja u prehrambene svrhe. Nacionalno zakonodavstvo u nekim državama može zabraniti stavljanje ovih proizvoda na tržište pod kategorijom hrane. Stoga se preporuča provjera zakona vezanih za određenu državu." - (Europska komisija, 2019c) [2].

Katalog nove hrane za kanabidiol i kanabinoide nalaže sljedeće:

"Prema informacijama dostupnim nadležnim tijelima država članica, ovaj proizvod nije korišten kao hrana prije 15. svibnja 1997. Stoga je prije stavljanja na tržište EU pod kategoriju hrane potrebno provesti procjenu sigurnosti pod regulativom nove hrane." [2].

2.1.1.2. Kategoriziranje i reguliranje kozmetičkih proizvoda

Određeni proizvodi na bazi kanabisa mogu se svrstati u kategoriju kozmetičkih pripravaka. Iz tog razloga potrebno je spomenuti regulacije takvih proizvoda. Svaka pojedina država EU ima nadležne službe koje propisuju regulacije vezane za kozmetičke proizvode te donose odluke o kategoriziranju svakog pojedinačnog proizvoda. Iz razloga što svaka država donosi svoje zakone i odluke vezane za ovakve proizvode, određeni proizvod u jednoj državi može biti svrstan u kategoriju medicinskih proizvoda, a u drugoj državi u kategoriju kozmetičkih proizvoda.

Baza podataka Europske komisije o sastojcima kozmetike (*European Commission's Cosmetic Ingredients (CosIng) database*) nalaže sljedeće:

"Ako određeni proizvod zbog sastojaka koje sadržava, vraća, modificira ili popravlja fiziološke funkcije vršenjem farmakološkog, imunološkog ili metaboličkog djelovanja, taj proizvod se kategorizira kao medicinski proizvod. S druge strane, proizvodi koji ne utječu značajno na metabolizam i stoga ne modificiraju način na koji metabolizam funkcionira mogu biti kategorizirani kao kozmetički proizvodi. Kategorizacija ovih proizvoda ostavlja se na razmatranje nacionalnim nadležnim tijelima svake pojedine države..." - (European Commission, 2019a) [2].

Katalog "nove hrane" u EU 2019. godine izmijenio je smjernice vezane za CBD ubacivanjem termina "kanabinoidi" u svrhu obuhvaćanja šireg spektra proizvoda. Nove smjernice nalažu sljedeće:

"...ekstrakti biljke *Cannabis sativa L.* i proizvodi koji sadržavaju kanabinoide smatraju se "novom hranom" iz razloga što ne postoji duža povijest konzumacije. Ovo se primjenjuje na ekstrakte i bilo koji proizvod koji kao sastojak ima neku vrstu ekstrakta biljke. U ovo su obuhvaćeni i ekstrakti drugih biljaka koje sadržavaju kanabinoide. Sintetički dobiveni kanabinoidi također se smatraju "novima"..." - (European Commission, 2019c) [2].

2.2. Botanički opis *Cannabis Sativa L.*

Kroz povijest ova biljka je opisana i klasificirana od strane mnogo različitih znanstvenika, prema različitim kriterijima i zbog te činjenice je već dugo vremena predmet rasprava i debata između taksonoma. Najčešće se prema ovoj biljci odnosi kao prema jednoj vrsti koju je opisao Carl Linnaeus 1753. godine – *Cannabis sativa L.*, koja ima više različitih podvrsta, a to su: *var. sativa*, *var. indica*, *var. ruderalis*. S druge strane postojali su znanstvenici koji su zastupali teoriju da je riječ o različitim vrstama. Jedan od njih je Lamarck koji je 1785.

taksonomski klasificirao i opisao „Indijsku vrstu“ konoplje različitom od „Europske konoplje“ te joj dao ime *Cannabis indica*. U ovom radu odnosit će se prema biljci kao jednoj vrsti s više podvrsta [6-8].

Cannabis sativa L. je jednogodišnja biljka koja se ubraja u porodicu *Cannabaceae*. Većinom je dvodomna biljka, odvojenih muških i ženskih jedinki, ali ponekad može biti jednodomna. Visinom se proteže od 1 m do 6 m, a u prosijeku je visine 2,5-3,5 m. Stabljika biljke je šuplja i uzdužno izbočena, a raspored lišća je varijabilan ovisno o kojem dijelu stabljike se radi. Broj režnjeva kod listova varira od 3 do 9. Oblik režnjeva je duguljast i uzak, oštih i nazubljenih rubova. Duljina listova iznosi 3-20 cm i širine do 1,8 cm [6]. Na slici 1. prikazan je izgled muške i ženske biljke kanabisa, a na slici 2. prikazan je izgled različitih fenotipova biljke.



Slika 1. Prikaz muške (lijevo) i ženske (desno) biljke *Cannabis sativa L.* [7].



Slika 2. Prikaz industrijske konoplje (desno) i kanabisa korištenog za proizvodnju droge (lijevo) [7].

2.3. Aktivne tvari u *Cannabis Sativa L.*

Cannabis sativa L. je po svom kemijskom sastavu iznimno kompleksna biljka. Analizira se kvalitativno i kvantitativno u svrhu karakterizacije fitokanabinoidnog profila biljke ili karakterizacije fenotipa [9].

Prema fenotipu *Cannabis sativa L.* dijeli se u tri različite skupine: fenotip 1, koji se smatra drogom, ima koncentraciju Δ^9 -THC-a veću od 0,5% te koncentraciju CBD-a manju od 0,5% (Δ^9 -THC /CBD \gg 1), fenotip 2 (tzv. srednji tip), prema sastavu u većinskom dijelu sadrži CBD dok koncentracije Δ^9 -THC-a variraju (Δ^9 -THC/CBD \sim 1), fenotip 3 (industrijska konoplja), u svom sastavu sadrži iznimno niske koncentracije Δ^9 -THC-a (Δ^9 -THC/CBD \ll 1). Bez obzira na mnogo faktora koji mogu utjecati na kemijski sastav pojedinog dijela biljke (podvrsta, način uzgoja, vremenski uvjeti, itd.), vrijednosti omjera Δ^9 -THC/CBD su u većini slučajeva kod nabrojanih fenotipa kao što je prikazano ranije u tekstu [7].

Do danas se izoliralo i uvrstilo u kemijski profil biljke *Cannabis sativa L.* ukupno 565 tvari. Od 565 molekula, njih 120 je kanabinoidnog, a 445 su nekanabinoidnog podrijetla. Detaljniji podaci prikazani su u tablici 1. Ovaj rad fokusirati će se na molekule kategorizirane kao kanabinoidi pa ih je prvo potrebno generalno definirati.

Kanabinoidi su prirodne tvari izolirane iz biljke *Cannabis sativa L.* koje u svojoj strukturi sadrže terpenoidni kostur formiran od 21 atoma ugljika. Ova skupina također sadrži i spojeve koji su derivati nekih od glavnih skupina kanabinoida, ali se i dalje smatraju kanabinoidima. Do danas je ukupno izolirano 120 kanabinoida koji se kategoriziraju u 11 glavnih skupina, a to su: (-)- Δ^9 -trans-tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC), (-)- Δ^8 -trans-tetrahidrokanabinol (Δ^8 -THC), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabikromen (CBC), kanabinodiol (CBND), kanabiciklol (CBL), kanabielsoin (CBE), kanabitriol (CBT), kanabinol (CBN) i ostale vrste (Tablica 1.) [7, 10, 11].

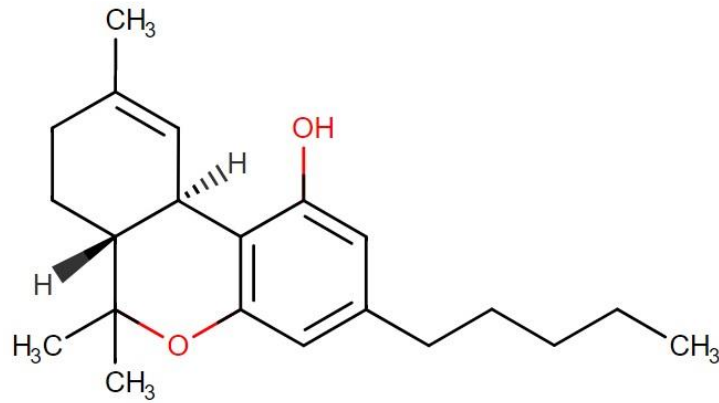
Tablica 1. Kemijski profil biljke *Cannabis sativa L.* [7].

| Kemijska kategorija | 2005. | 2015. |
|--|-------|-------|
| Δ^9 -THC | 9 | 23 |
| Δ^8 -THC | 2 | 5 |
| CBG | 8 | 16 |
| CBC | 6 | 9 |
| CBD | 7 | 7 |
| CBND | 2 | 2 |
| CBE | 5 | 5 |
| CBL | 3 | 3 |
| CBN | 7 | 11 |
| CBT | 9 | 9 |
| Ostali kanabinoidi | 14 | 30 |
| Ukupan broj kanabinoidnih tvari | 72 | 120 |
| Ukupan broj nekanabinoidnih tvari | 419 | 445 |
| Ukupan broj tvari | 491 | 565 |

2.3.1. Primjeri kanabinoida i kemijski opis

2.3.1.1. (-)- Δ^9 -trans-tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC)

THC je mala molekula, molekulske mase 314,4617 g/mol, molekulske formule $C_{21}H_{30}O_2$. Topljivost THC-a u vodi je iznimno niska te iznosi 0,0028 mg/mL pri 23 °C, pKa molekule iznosi 10,6. Na slici 3. prikazana je struktura THC-a.



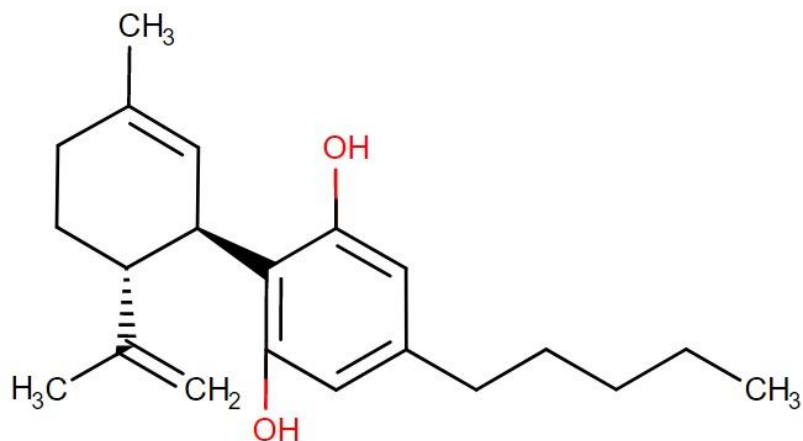
Slika 3. Strukturna formula Δ^9 -THC-a [12].

Osim CBD-a, THC je kanabinoid s najvećom koncentracijom u *Cannabis sativa L.* THC je glavna psihoaktivna tvar u *Cannabis sativa L.* Djelovanje THC-a ispoljava se kroz kanabinoidne receptore CB1R i CB2R. Fiziološki izaziva simptome kao što su povećanje apetita, promjene raspoloženja, promjene u kognitivnim funkcijama, smanjenje boli, itd.

Sintetski oblik THC-a ima primjenu u medicini pod nazivom "Dronabinol/Marinol", a primjenjuje se kao terapija za povećanje apetita kod pacijenata oboljelih od AIDS-a, liječenje povraćanja i mučnine izazvane kemoterapijom kod pacijenata oboljelih od karcinoma, itd. [12].

2.3.1.2. Kanabidiol (CBD)

Kanabidiol je mala molekula, molekulske mase 314,469 g/mol, molekulske formule $C_{21}H_{30}O_2$. Topljivost CBD-a u vodi iznosi 0,0126 mg/mL. Strukturna formula kanabidiola prikazana je na slici 4.



Slika 4. Strukturna formula CBD-a [13].

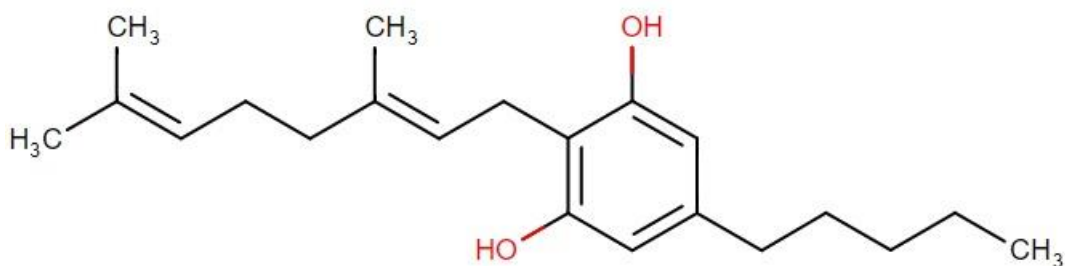
Osim THC-a, kanabidiol je glavna aktivna tvar u *Cannabis sativa L.* Udio CBD-a u neobrađenom ekstraktu biljke može iznositi do 40%. Istraživanja su pokazala potencijal korištenja CBD-a kao analgetika, antipsihotika, antikonvulziva, anksiolitika, a pokazao je i antioksidativna i protuupalna svojstva. Trenutno se u medicini koristi kao komponenta lijeka Epidiolex/Epydiolex. CBD se također nalazi u sastavu lijeka Sativex koji se koristi kao terapija za liječenje neuropatske boli i spastičnosti mišića kod pacijenata oboljelih od multiple skleroze (MS) [13,14].

2.3.1.3. Kanabigerol (CBG)

Kanabigerol je kanabinoidna molekula koja se nalazi u sastavu *Cannabis sativa L.*, ali može se pronaći i kod vrsta *Helichrysum* (smilje) [15]. U kanabisu služi kao prekursorska molekula za sintezu THC-a, CBD-a i CBC-a. Takva uloga objašnjava nisku koncentraciju ove molekule u biljci [16].

CBG je mala molekula, molekulske mase 316,485 g/mol i molekulske formule $C_{21}H_{32}O_2$. Kao i prethodne molekule ima iznimno malu vrijednost topljivosti u vodi koja iznosi 0,00512 mg/mL. Istraživanja na CBG-u su pokazala da bi se mogao koristiti u liječenju neuroloških bolesti kao što su Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest i MS [17].

CBG bi mogao imati potencijalnu primjenu kao terapija za liječenje upalne bolesti crijeva, a posjeduje i antibakterijska svojstva. Antiproliferativna svojstva CBG-a čine ga dobrim za potencijalnu primjenu u liječenju karcinoma, a predložen je i za liječenje kožnih bolesti, regulaciju spolnih hormona, poremećaja apetita, itd. [16]. Na slici 5. prikazana je strukturna formula CBG-a.



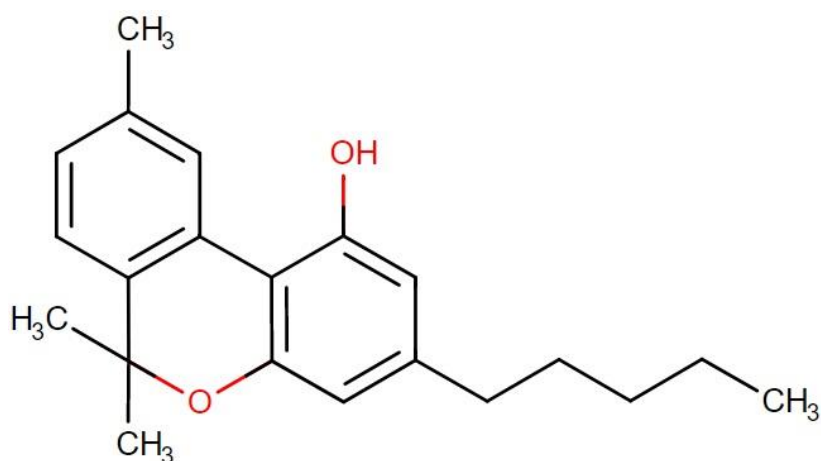
Slika 5. Strukturna formula CBG-a [15].

2.3.1.4. Kanabinol (CBN)

Kanabinol je mala molekula, molekulske mase 310,437 g/mol i molekulske formule $C_{21}H_{26}O_2$. Kao i svi ostali spomenuti kanabinoidi ima iznimno nisku topljivost u vodi, a ona iznosi 0,000339 mg/mL. Strukturna formula kanabinola prikazana je na slici 6. [18].

Kanabinol je prvi kanabinoid kojeg su Wood, Spivey i Esterfield izolirali iz biljke *Cannabis sativa* L. 1899. godine. CBN je neenzimatski produkt oksidacije THC-a [19, 20]. U usporedbi sa THC-om, kanabinol ima potencijal djelovanja od samo 25% [21].

Istraživanja su pokazala da se CBN može koristiti kao antikonvulziv i sedativ, a pokazao je i protuupalna i antibiotska svojstva [22]. Još jedna od potencijalnih primjena CBN-a je u liječenju psorijaze [23]. Također može inhibirati aktivnost velikog broja enzima kao što su, lipooksigenaze, ciklooksigenaze te cijeli niz CYP enzima [24].



Slika 6. Strukturna formula kanabinola [18].

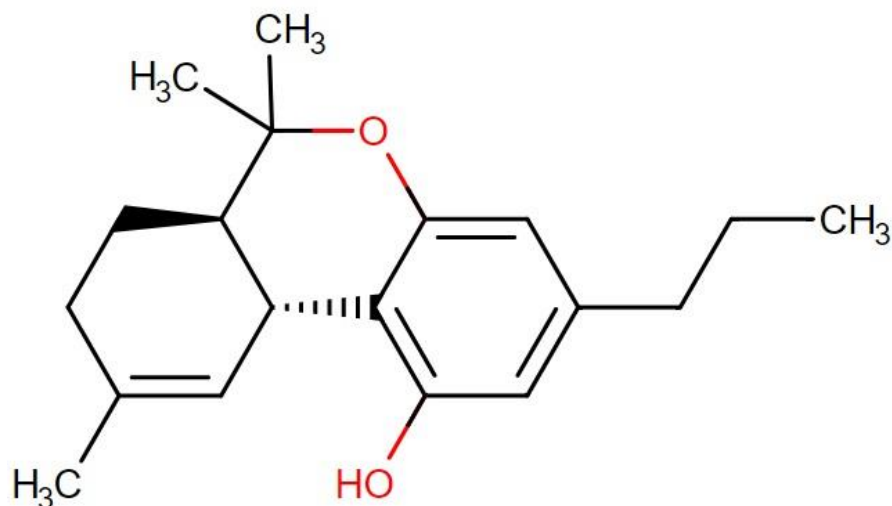
2.3.1.5. Tetrahidrokanabivarin (THCV)

Tetrahidrokanabivarin je propilni analog Δ^9 -THC-a i jedan je od četiri kanabinoida koji bi mogao služiti kao antikonvulziv (ostali su kanabidiol, kanabivarin i Δ^9 -tetrahidrokanabinolična kiselina). THCV je strukturno gotovo identičan THC-u, a jedina razlika u strukturi je duljina lipofilnog alkilnog lanca. Bitna razlika između THCV-a i THC-a je ta što THCV ne posjeduje psihoaktivna svojstva [25].

Za razliku od THC-a koji djelovanje ispoljava kao parcijalni agonist kanabinoidnih receptora 1 i 2 (CB1R i CB2R), THCV djeluje antagonistički na CB1R, te parcijalno agonistički na CB2R receptore [26]. THCV pokazuje antipsihotičko djelovanje koje postiže aktivacijom 5HT1A receptora u organizmu pa može imati potencijalnu primjenu u liječenju simptoma shizofrenije [27].

Istraživanja su pokazala da THCv ima utjecaj na organizam na način da smanjuje apetit, povećava sitost te regulira metabolizam energije tj. posjeduje svojstvo glikemijske kontrole. Nabrojana svojstva čine ovu molekulu potencijalno korisnom u terapiji pacijenata koji boluju od pretilosti i dijabetesa tipa 2 [28].

THCV je mala molekula, molekulske mase 286,415 g/mol i molekulske formule $C_{19}H_{26}O_2$. Topljivost THCv-a u vodi iznosi 0,0089 mg/mL. Struktura THCv-a prikazana je na slici 7.



Slika 7. Strukturna formula THCv-a [25].

2.4. Proizvodi na bazi *Cannabis Sativa L.* prisutni na tržištu

Nakon što su u poglavlju 2.1. prikazane razlike u zakonima, koji variraju kod svake pojedine Europske države, potrebno je više reći o samim proizvodima na bazi kanabisa. Proizvodi na bazi kanabisa mogu se kategorizirati na više načina. Prema vrsti proizvoda kategoriziraju se kao farmaceutski pripravci (lijekovi), dodatci prehrani, kozmetički pripravci, hrana, „nova hrana“, itd. Kategorizacija se također može napraviti prema razini THC-a, na proizvode koji sadrže do 0,3% THC-a i proizvode koji sadrže veći postotak, npr. lijek Dronabinol. U ovom radu naglasak će biti na proizvodima s niskom razinom THC-a. Za početak je potrebno definirati proizvode kanabisa s niskom razinom THC-a. Prema dokumentu, kojeg je izdao Europski centar za nadzor droga i ovisnosti o drogama (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA*), iz prosinca 2020. proizvodi s niskom razinom THC-a su:

"Biljka ili proizvod koji sadrži biljku, ekstrakte, smolu ili ulje kanabisa za koje je navedeno da imaju nisku razinu THC-a i time imaju vrlo malu vjerojatnost izazivanja psihoaktivnog učinka" [2].

Spomenute proizvode moguće je reklamirati s naglaskom na nisku razinu THC-a ili visoku razinu CBD-a, a iz toga su isključeni ranije spomenuti farmaceutski pripravci i konoplja koja se koristi za proizvodnju tkanine. Također, proizvode je moguće registrirati kao kozmetičke pripravke ili hranu, a to ovisi o zakonima svake pojedine države, kao što je navedeno u poglavlju 2.1..

Postoji veliki broj različitih proizvoda s niskom razinom THC-a koji se mogu podijeliti na: biljne pripravke, ulja i smole, e-tekućine, kristale, jestive proizvode (gotova hrana, piće, sastojci za pripravu hrane kao što su brašno i tjestenina) te ranije spomenute kozmetičke pripravke kao što su kreme, balzami, masti, itd. Navedeni proizvodi dostupni su u državama EU, ali zbog činjenice da svaka država donosi vlastite zakone oko reguliranja takvih proizvoda dostupnost određenog proizvoda nije jednaka u svakoj pojedinoj državi EU. U tablici 2. prikazani su podaci dostupnosti proizvoda na bazi kanabisa za države EU iz 2019. godine [2].

Tablica 2. Dostupnost proizvoda na bazi kanabisa u državama EU (2019. godina) [2]:

| Država | Biljka | Smola | Ulje | E-tekućina | Jestivi proizvodi | Kristali |
|------------------------|--------|-------|------|------------|-------------------|----------|
| Austrija | + | + | + | + | + | + |
| Belgija | + | + | + | + | + | - |
| Bugarska | - | - | + | - | - | - |
| Hrvatska | + | - | + | + | + | + |
| Cipar | + | - | - | + | - | - |
| Češka | + | + | + | - | + | - |
| Danska | - | - | + | - | - | - |
| Estonija | - | - | - | - | - | - |
| Finska | - | - | - | - | - | - |
| Francuska | + | + | + | + | - | + |
| Njemačka | + | + | - | + | - | + |
| Grčka | + | + | + | + | + | + |
| Mađarska | - | - | + | - | + | - |
| Irska | + | + | + | + | - | + |
| Italija | + | + | + | - | + | + |
| Latvija | - | - | - | - | - | - |
| Litva | + | - | + | + | - | - |
| Luksemburg | + | - | + | - | + | - |
| Malta | - | - | + | + | - | - |
| Nizozemska | - | + | + | + | + | - |
| Poljska | + | - | + | + | - | - |
| Portugal | - | - | + | | - | - |
| Rumunjska | + | - | + | + | - | - |
| Slovačka | - | - | - | - | + | - |
| Slovenija | + | + | + | + | + | - |
| Španjolska | + | + | + | - | - | - |
| Švedska | + | - | + | + | + | - |
| Norveška | - | - | - | - | - | - |
| Ujedinjeno Kraljevstvo | + | - | + | + | + | - |

Osim ranije spomenutog lijeka Epidiolex/Epydiolex, postoji još farmaceutskih pripravaka namijenjenih liječenju raznih bolesti ili simptoma bolesti. Prvi primjer je lijek koji dolazi pod nazivom Dronabinol ili Marinol. Djelatna tvar ovog lijeka je sintetski proizveden Δ^9 -THC. Dronabinol/Marinol se propisuje za liječenje mučnine i povraćanja kod onkoloških bolesnika, koristi se kao stimulan apetita kod osoba oboljelih od AIDS-a te ima analgetski učinak kod neuropatske boli pacijenata oboljelih od MS-a [29,30].

Još jedan primjer lijeka na bazi kanabisa je Sativex, proizvod kompanije GW Pharmaceuticals. Djelatne tvari ovog lijeka su Δ^9 -THC i CBD [31].

Potrebno je spomenuti primjer proizvoda s niskom razinom THC-a. Najbolji primjer je CBD ulje. CBD ulje proizvodi se ekstrakcijom kanabidiola iz biljke koji se zatim razrjeđuje nekom vrstom ulja koje služi kao otapalo. Ulja koja se koriste kao otapala u ovom slučaju su najčešće ulje sjemenki konoplje ili kokosovo ulje. Popularna primjena CBD ulja iznimno je široka. CBD ulja dolaze u velikom broju različitih koncentracija i od velikog broja različitih proizvođača. Na slici 8. prikazan je primjer CBD ulja, proizvođača GreenLab u koncentraciji od 3%.



Slika 8. CBD ulje (GreenLab) koncentracije 3% [32].

Kao što je već nekoliko puta spomenuto, postoji još mnogo različitih proizvoda na bazi kanabisa, a neke od tih kategorija mogu se pronaći u Tablici 2., ali na njih se neće stavljati naglasak u ovom radu.

2.4.1. Nedosljednost podataka sastava proizvoda s rezultatima analize

Analitički izvještaji nakon analiza proizvoda na bazi kanabisa potvrdili su velike varijacije u njihovoj kvaliteti, što stvara nove potencijalne probleme. U to je uključeno nepodudaranje rezultata analize s podacima na deklaracijama proizvoda i potvrđivanje prisutnosti raznih nečistoća u proizvodima, a te nečistoće nakon konzumacije mogu potencijalno izazvati zdravstvene probleme [2].

Nekoliko država, uključujući Češku, Finsku, Austriju, Italiju, Švedsku, Sloveniju, itd. provelo je nezavisna istraživanja na uzorcima proizvoda na bazi kanabisa. Primjerice, analizom proizvoda u Italiji, Austriji i Luksemburgu pokazalo se da su razine THC-a

generalno niske, ali razine CBD-a visoke. Neki od analiziranih uzoraka imali su koncentraciju CBD-a u razini 50-60%. Nadalje, 49 od otprilike 200 analiziranih uzoraka proizvoda u Austriji, sadržavalo je razine THC-a preko dozvoljene granice od 0,3%, koje su varirale u rasponu od 0,4% do 1,1% [2].

Analizom 29 uzoraka CBD ulja u Češkoj utvrđeno je da jedna trećina proizvoda nije sadržavala razine CBD-a navedene na deklaraciji, a na nekima od njih THC nije ni bio naveden bez obzira što bi kod četvrtine analiziranih proizvoda korisnici nakon konzumacije mogli biti pozitivni na testovima za THC, pod uvjetom da su konzumirali preporučenu dozu [2].

Još jedan bitan problem utvrđen analizom CBD ulja je prisutnost raznih kancerogenih tvari kao što su benzo(a)piren i policiklički aromatski ugljikovodici (*polycyclic aromatic hydrocarbons*, PAHs). Razine spomenutih tvari za 50% testiranih uzoraka bile su iznad dozvoljenih granica propisanih u regulacijama Europske komisije (EU) No 835/2011 i (EU) 2015/1933, za ulja i dodatke prehrani na uljnoj bazi. Jedan od analiziranih proizvoda imao je sedam puta više razine benzo(a)pirena i 20 puta više razine policikličkih aromatskih ugljikovodika od dozvoljenih, a kod jednog uzorka koji je nosio oznaku organskog podrijetla utvrđena je prisutnost zakonski zabranjenog pesticida, ali u literaturi nije navedeno o kojem je pesticidu riječ [2, 33].

2.5. Analitičke metode za određivanje sastava proizvoda na bazi *Cannabis Sativa L.*
Kao što se moglo vidjeti u prethodnim poglavljima, postoje brojne regulative vezane za proizvode na bazi kanabisa. Svaka regulativa vezana za kontrolu koncentracije određenog spoja u nekom proizvodu na bazi kanabisa temelji se na analizama provedenim na tom proizvodu. Kvantitativna analiza proizvoda na bazi kanabisa može se provoditi pomoću mnogo različitih analitičkih tehnika, kao što su kapilarna plinska kromatografija visoke rezolucije s plameno-ionizirajućim detektorom (*High Resolution Capillary Gas Chromatography Flame Ionization Detection, GC-FID*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography, HPLC*), tankoslojna kromatografija (*Thin-layer Chromatography, TLC*), plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektroskopijom (*Gas Chromatography – Mass Spectroscopy, GC-MS*), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u kombinaciji s masenom spektroskopijom (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy, HPLC-MS*), protonska nuklearna magnetska rezonanca (*Proton Nuclear Magnetic Resonance, ¹H-NMR*), itd.

Najpopularnije tehnike za analizu kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa su HPLC i GC-MS ili neka od inačica tih dviju tehnika.

GC-MS je najčešće korištena zato što ima najniži limit detekcije i limit kvantifikacije, ali treba naglasiti da ova metoda ima jedan bitan nedostatak, a to je termalna dekarboksilacija kiselih kanabinoida. Termalna dekarboksilacija može se izbjeći derivatizacijom ispitivanog ekstrakta [7].

Najveći naglasak kod kvantitativne analize uglavnom se stavlja na spojeve za koje je propisana zakonska regulacija zbog psihoaktivnog djelovanja koje posjeduju. Takva analiza je prikazana u istraživanju koje su proveli Hewavitharana i suradnici u svrhu određivanja koncentracije Δ^9 -THC u uzorcima industrijske konoplje. Analiza je provedena koristeći GC-MS analitičku tehniku [34].

Druga svrha kvantitativne analize je određivanje koncentracije spojeva s potencijalnom primjenom u medicini kao što su Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBD, CBG, CBN, THCv, CBC, itd. Potencijalna medicinska primjena za neke od ovih spojeva prikazana je u poglavlju o kemijskom sastavu *Cannabis sativa L.*

Proizvode kanabisa potrebno je analizirati i na potencijalna onečišćenja. Ranije u tekstu je spomenuto da se analizom određenih proizvoda detektirali pesticidi i kancerogene tvari kao što su benzo(a)piren i policiklički aromatski ugljikovodici u koncentracijama daleko iznad dopuštenih. Atapattu i Johnson u preglednom radu daju uvid u metode koje se koriste za analizu pesticida u kanabisu i proizvodima na bazi kanabisa. Najčešće korištene metode za takvu analizu su GC-MS, tekućinska kromatografija (*Liquid Chromatography, LC*), u kombinaciji sa UV detekcijom i LC-MS/MS [35].

Morita i Ando su proveli analizu nekoliko kanabinoida u uzorku ulja kanabisa pomoću GC-MS tehnike. Analizu su proveli za ukupno 11 spojeva, uključujući Δ^9 -THC, CBC, CBD i CBN [7,36].

2.5.1. HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

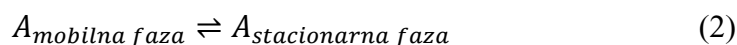
Druga najkorištenija metoda je HPLC. Ova metoda ne utječe na promjenu strukture kanabinoida pa se s njom mogu analizirati tvari bez prethodne derivatizacije, ali i ova tehnika ima potencijalan nedostatak, a to je slaba rezolucija u nizu kanabinoida koja je posljedica strukturnih sličnosti analiziranih kanabinoida [7].

HPLC je tehnika koja se u analitičkoj kemiji koristi za separaciju komponenata u analiziranoj smjesi na temelju razlike u topljivosti tvari, tj. na temelju razlike analiziranih tvari u afinitetu prema mobilnoj ili stacionarnoj fazi. Važno je odmah na početku naglasiti da se kod HPLC-a primjenjuju svi osnovni principi kromatografije. Razlika između klasične tekućinske kromatografije i HPLC-a je primjena visokog tlaka koja omogućava efektivniju separaciju u kraćem vremenu s manjom količinom uzorka [37].

Svaka analizirana tvar reagira karakteristično s nekom drugom tvari, točnije ima određeni kemijski afinitet, u ovom slučaju, za mobilnu i stacionarnu fazu. Jednadžba 1 prikazuje kemijski afinitet te glasi:



Jednadžba 2 prikazuje ravnotežu tvari A između mobilne i stacionarne faze. Jednadžba 3 prikazuje konstantu ravnoteže K_{eq} koja tumači koja količina, tj. postotak tvari A će biti u otopini, a koja količina će biti vezana za stacionarnu fazu B. Takav odnos postoji i između tvari A i mobilne faze (otapala), C. Ravnoteža između stacionarne i mobilne faze definira se konstantom K_c [37].



$$K_c = \frac{(\alpha_A)_S}{(\alpha_A)_M} \approx \frac{c_S}{c_M} \quad (3)$$

Konstanta raspodjele, K_c u ovoj jednadžbi predstavlja omjer aktiviteta tvari A u mobilnoj i stacionarnoj fazi. U većini slučajeva, ako su u pitanju niske koncentracije analiziranih tvari, aktivitet tvari A u obje faze je otprilike jednak koncentraciji tvari A u obje faze. Drugim riječima ova konstanta raspodjele predstavlja vrijeme koje tvar A provede otopljena u mobilnoj fazi ili vrijeme koje provede adsorbirana na stacionarnu fazu kolone. Spomenuti omjer predstavlja količinu vremena koje je potrebno da tvar A putuje duljinom kolone. Što je adsorpcija tvari A na stacionarnu fazu veća to je potrebno više vremena za putovanje tvari A kroz kolonu. U obrnutom slučaju, što je veći afinitet za mobilnu fazu, tvar se bolje otapa u mobilnoj fazi, samim time ima manje interakcija sa stacionarnom fazom, a posljedica toga je kraće vrijeme putovanja kroz kromatografsku kolonu. Vrijeme koje protekne od injektiranja uzorka do njegovog izlaska iz kolone, tj. elucije naziva se retencijsko vrijeme, t_R . Vrijeme u kojem uzorak ne reagira sa stacionarnom fazom, što znači da ima K_c jednak nuli, naziva se mrtvo vrijeme (*void time*), t_M . Niti jedna tvar ne može biti eluirana u vremenu kraćem od t_M [37].

Ranije spomenuti K_C faktor je ovisan o vrsti kolone i brzini protoka otapala, a iz njega se izvodi tzv. retencijski faktor, k , koji nije ovisan o veličini kolone i brzini protoka otapala. Retencijski faktor, (Jednadžba 4) koristi se kao kvantitativna mjera afiniteta određene tvari za točno određenu kombinaciju stacionarne i mobilne faze te nije ovisan o veličini kolone i brzini protoka otapala. Retencijski faktor računa se množenjem konstante raspodijele, K_C s volumenom stacionarne faze, V_S te dijeljenjem dobivenog produkta s volumenom mobilne faze, V_M [37].

$$k_C = \frac{K_C V_S}{V_M} \quad (4)$$

U svrhu kvalitetne separacije dviju tvari njihovi retencijski faktori za korištenu kombinaciju dviju faza trebaju biti različiti kako bi se izbjegla istovremena elucija obje tvari. Za određivanje kvalitete separacije dvije tvari koristi se faktor selektivnosti, α prikazan u jednadžbi 5 [37].

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (5)$$

U jednadžbi, A stoji za tvar s manjim vremenom elucije, a B stoji za tvar s većim vremenom elucije.

Mjera koliko dobro se dva pika elucije mogu razlikovati nakon provedene kromatografije naziva se rezolucija elucije. Rezolucija elucije, R_S , definira se kao razlika u retencijskim vremenima dva pika podijeljena sa zbrojem širina elucijskih pikova i prikazana je u jednadžbi 6. Na slici 9. prikazane su različite kvalitete rezolucije elucije [37].

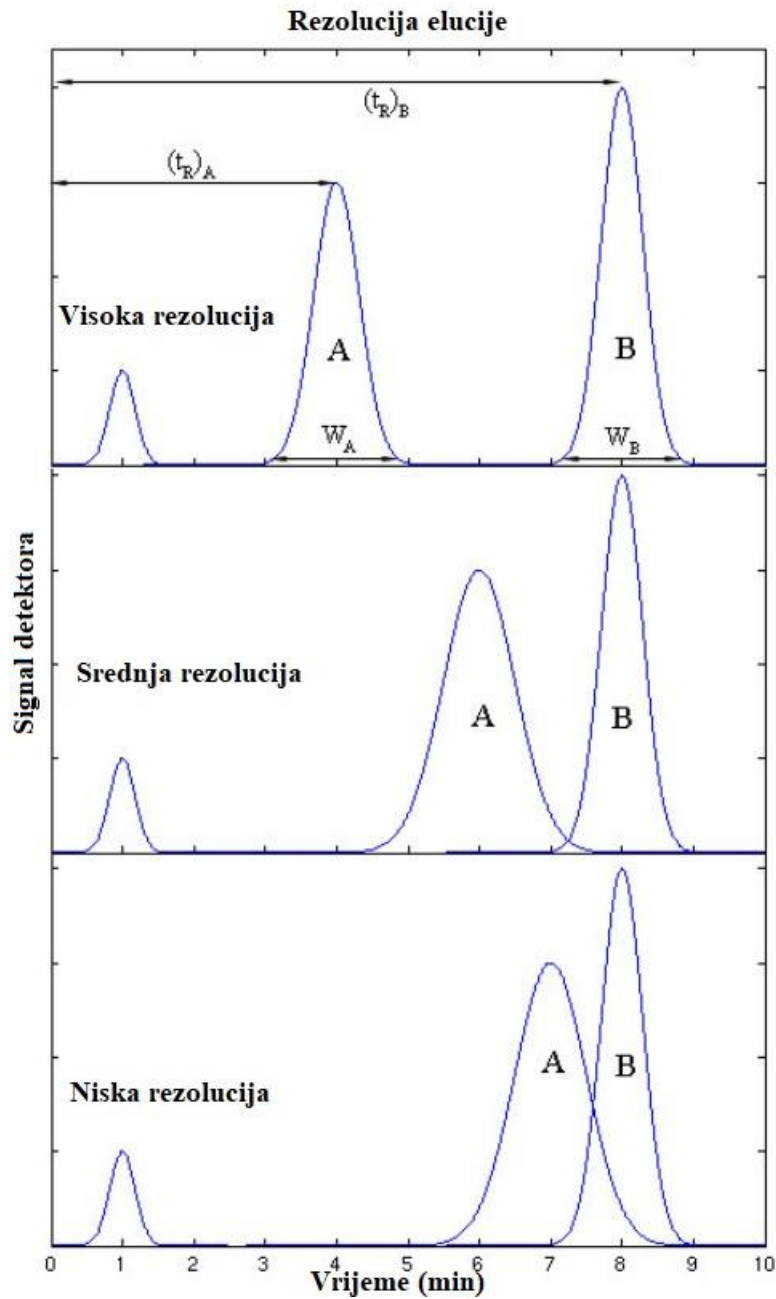
$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_B + W_A} \quad (6)$$

A - tvar manjeg vremena elucije; B - tvar većeg vremena elucije; t_R – retencijsko vrijeme; W – širina elucijskog pika.

Faktor kapaciteta ili faktor k' (Jednadžba 7 koristi se u kromatografiji kao smjernica za procjenu ponovljivosti i linearnosti pika u odnosu na vrijeme. Definicija retencije tvrdi da bi pik koji se najranije eluira trebao imati k' u vrijednosti 1 ili više, a idealno bi bilo 2 ili više. Ovo omogućuje da male pogreške u pH ili mobilnoj fazi nemaju veliki utjecaj na retencijsko vrijeme ili odziv [38].

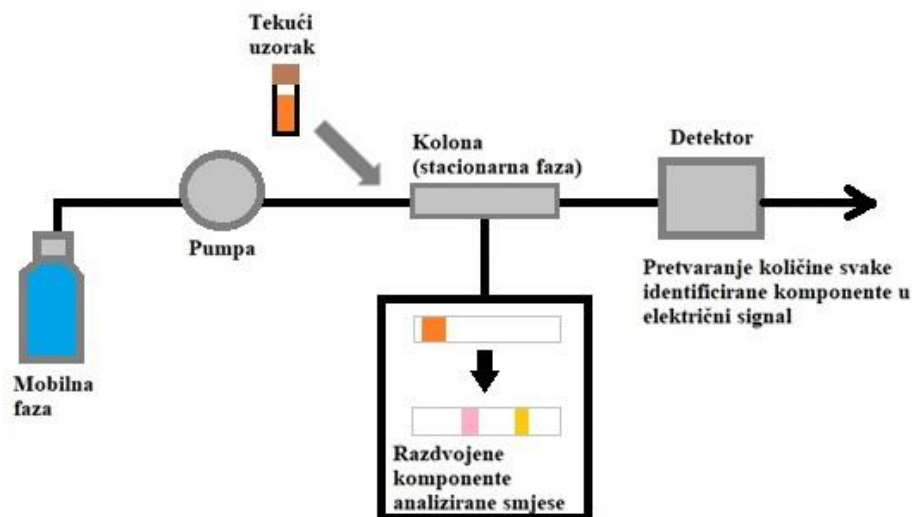
$$k' = \frac{R_t - V_0}{V_0} = \frac{R_t - t_M}{t_M} \quad (7)$$

U jednadžbi k' stoji za faktor kapaciteta, R_t za retencijsko vrijeme, a V_0 za volumen mrtvog vremena. V_0 odnosi se na volumen koji se nalazi između injektora i kolone, a ranije navedeno mrtvo vrijeme, t_M , je mjera vremena koje je potrebno da V_0 proteče i izađe iz kolone.



Slika 9. Različite kvalitete rezolucije elucije [37].

Svaki HPLC sustav sastoji se od nekoliko osnovnih dijelova, a to su: pumpa, kolona sa stacionarnom fazom, detektor, mobilna faza i tekući uzorak. Osnovna shema HPLC-a prikazana je na slici 10.



Slika 10. Osnovna shema HPLC instrumenta.

Otapala ili mobilne faze kod HPLC-a su smjese polarnih i nepolarnih otapala čiji omjer koncentracija varira u ovisnosti o sastavu ispitivanog uzorka. Mobilna faza prolazi kroz kromatografsku kolonu i nosi molekule analiziranog uzorka određenom brzinom. Ta brzina ovisi o afinitetu ispitivane tvari za mobilnu fazu. Neke od mobilnih faza koje se koriste u HPLC analizi su: voda, n-heksan, cikloheksan, ugljikov tetraklorid, acetonitril, etanol, metanol, itd [37].

Kolona je dio HPLC-a u kojem se odvija separacija uzorka. Svaka kolona napunjena je stacionarnom fazom. Sastojci smjese razdvajaju se u koloni na temelju razlike u interakcijama s mobilnom odnosno stacionarnom fazom. Ako ispitivana tvar jače reagira sa stacionarnom fazom ta tvar će imati veće vrijeme elucije. Stacionarna faza može biti kruta, npr. aluminijev oksid, silicijev oksid ili tekuća, a tada se kolona naziva vezanom kolonom zato što je tekuća stacionarna faza vezana za krutu podlogu koja je uglavnom načinjena od silicijevog oksida ili aluminijevog oksida [37].

Pumpa je dio HPLC-a koji služi za potiskivanje otapala kroz kolonu. U HPLC-u koristi se pumpa s više klipova (*Multi-piston pump*), u svrhu održavanja konstantne brzine protoka. Konstantna brzina protoka održava se na način da jedan klip kontrolira brzinu protoka dok se drugi klip puni. Za povećanu kontrolu brzine protoka može se koristiti injekcijska pumpa, ali ona nije primjenjiva kod svake HPLC analize zato što ne može proizvesti tlak jednake jačine kao pumpa s više klipova [37].

Detektor je dio HPLC-a koji se nalazi na kraju kolone, a služi za detektiranje i kvantificiranje tvari i njihove koncentracije u ispitivanom uzorku. Detektor ne smije detektirati otapalo,

stoga ne postoji univerzalni detektor nego izbor detektora ovisi o vrsti ispitivanog uzorka. Uobičajeni detektor korišten u HPLC analizi je UV-detektor. Druge vrste detektora koje se mogu koristiti su detektori za mjerenje fluorescencije, refrakcijskog indeksa, NMR detektori, plameno ionizirajući detektor (*Flame ionization detector, FID*), itd. Često se koristi kombinacija HPLC-MS ili HPLC-MS-MS u svrhu postizanja kvalitetnije separacije, detekcije i kvantifikacije [37].

Važno je naglasiti da postoje dvije različite kromatografske tehnike, a to su tehnika normalne faze (*Normal phase technique*) i tehnika obrnute faze (*Reverse phase technique*). Razlika između dviju tehnika temelji se na polarnosti mobilne i stacionarne faze. Kod tehnike normalnih faza mobilna faza je manje polarna od stacionarne faze, a kod tehnike obrnutih faza mobilna faza je polarnija od stacionarne faze. Kod tehnike obrnutih faza retencijsko vrijeme za određenu tvar povećava se smanjenjem polarnosti analizirane tvari zato što dolazi do jačeg vezanja za manje polarnu stacionarnu fazu. Kako bi se postigla što efikasnija separacija potrebno je odrediti omjer koncentracija polarnih i nepolarnih komponenti mobilne faze. Idealni cilj svake analize je provesti eluciju u što je moguće kraćem vremenu uz dovoljno kvalitetnu rezoluciju svakog pika. Kolone korištene za tehniku normalne faze punjene su aluminijevim oksidom ili silicijevim oksidom, dok se kod tehnike obrnutih faza koriste stacionarne faze s vezanim alkilnim, alifatskim ili fenilnim skupinama [37].

Potrebno je reći nešto o samoj eluciji odnosno vrstama elucije. Postoje dvije vrste elucije, a to su izokratna elucija i gradijentska elucija. Izokratna elucija je vrsta separacije u kojoj sastav mobilne faze ostaje konstantan tijekom cijelog procesa analize. S druge strane gradijentska elucija je vrsta separacije u kojoj se sastav mobilne faze, tj. omjer polarnih i nepolarnih otapala u mobilnoj fazi mijenja kroz vrijeme. Omjer polarnih i nepolarnih tvari u mobilnoj fazi ovisi o svojstvima molekula u ispitivanom uzorku. Gradijentska elucija koristi se kada u uzorku postoji veliki spektar tvari s različitim polarnostima. Svrha ove vrste elucije je skraćivanje vremena analize uz održavanje kvalitete rezolucije između pikova [37].

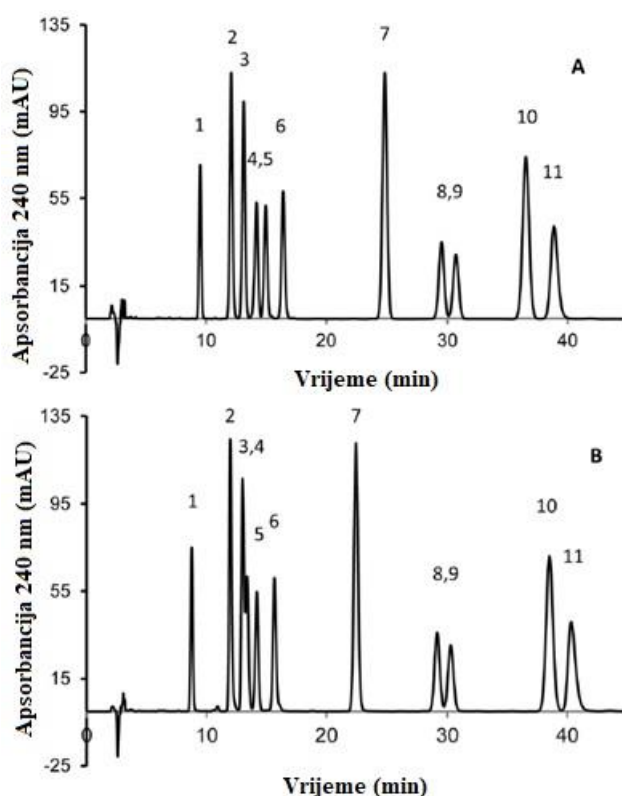
Primjena HPLC-a u kombinaciji s različitim vrstama kolona i detektora može se vidjeti kod analize kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa iz slijedećih primjera. ElSohly i suradnici su u jednom istraživanju prikazali primjenu HPLC-UV tehnike za analizu smjesa kiselih i neutralnih kanabinoida korištenjem Beckman Ultrasphere 3 μm ODS kolone (kolona s oktadecilsililnim skupinama, C18). Analizom uzorka detektirano je više od 40 komponenti [7,39].

Veress i suradnici su još 1988. godine prikazali metodu analize neutralnih kanabinoida pomoću HPLC metode. Koristili su dvije vrste kolona. Kolona s vezanim amino skupinama korištena je za razdvajanje sastojaka u biljnom materijalu pomoću nepolarnih otapala. Druga vrsta kolone korištena u ovom radu je kolona obrnutih faza (*reverse-phase column*), koja je zahtijevala prethodno pročišćavanje uzorka koje je provedeno pomoću C18-Sep-Pak uložaka. Nakon provedenih analiza pokazalo se kako kolona s vezanim amino skupinama daje bolje rezultate kod kvantifikacije neutralnih kanabinoida [7, 40].

U literaturi se nalazi cijeli niz radova na temu kvantitativne analize kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa, ali ovaj rad će se u nastavku fokusirati na jedno konkretno istraživanje. Eksperimentalni rezultati tog istraživanja koristiti će se za usporedbu s eksperimentalnim rezultatima ovog rada u svrhu određivanja kvalitete provedenih kalkulacija.

Cilj spomenutog rada bio je razviti i validirati metodu za kvantitativnu analizu kanabinoida korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s diodnim detektorom (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection, HPLC-DAD*). Validacija metode provedena je za pet kanabinoida koji su imali najveći značaj, a to su CBD, Δ^9 -THC, CBDA, THCA i CBN. Analiza je provedena korištenjem Agilent 1100, 1200 ili 1260 HPLC-DAD sustava. Separacija je provedena pomoću MacMod ACE 5 C18-AR kolona. Sastav mobilne faze bili su acetonitril i octena kiselina (0,5%) u omjeru 66:34 (bez korekcije pH, nominalni pH iznosio je 2,9). Injekcijski volumen iznosio je 25 μ L, brzina protoka 1,0 mL/min, a trajanje analize iznosilo je 50 minuta. Detekcija je provedena na nekoliko valnih duljina (220 nm, 240 nm, 270 nm, 307 nm), a ovisila je o vrsti tvari, koncentraciji tvari i vrsti uzorka koji se analizira. HPLC-DAD analiza omogućila je analizu 11 kanabinoida za koje su postojali komercijalni standardi, a ti kanabinoidi bili su: CBD, CBDA, Δ^9 -THC, THCA, CBN, Δ^8 -THC, CBG, CBGA, CBDV, THCV i CBC. Jedan od glavnih problema kod postizanja dobrog razdvajanja, tj. rezolucije kromatografije bila je strukturna sličnost parova molekula CBD i CBG te Δ^9 -THC i Δ^8 -THC. Separacija ovih tvari provedena je korištenjem miješane C18/aromatski funkcionalizirane stacionarne faze MacMod ACE 5 C18-AR (*mixed C18/aromatic functionality stationary phase*). Četiri derivatizirane stacionarne faze silicijevog oksida korištene su za razdvajanje devet kanabinoida (CBD, CBDA, Δ^9 -THC, THCA, CBN, Δ^8 -THC, CBG, THCV i CBC). Stacionarne faze bile su slijedeće: konvencionalna C18 faza (Luna C18-2), fenilheksil faza (Luna) te dvije miješane faze C18/aromatski funkcionalizirane (MacMod ACE 5 C18-AR i Siliachrom C18/fenil). Mobilna faza sadržavala je pufere, raspon pH iznosio je 2,5-5,1 a kao

otapala korišteni su acetonitril i metanol. Retencijsko vrijeme bilo je najveće za C18 kolonu, a najmanje za fenilheksil kolonu. Razdvajanje kanabinoida postiglo se korištenjem ACE 5 C18 kolone uz korištenje dviju različitih mobilnih faza. U prvom slučaju u sastavu mobilne faze nalazili su se acetonitril i 0,5% octena kiselina u omjeru 66:34 (bez korekcije pH, nominalni pH iznosio je 2,9), a u drugom slučaju u sastavu mobilne faze nalazili su se metanol i 50 mM limunska kiselina u omjeru 83:17 (pH podešen na 4,2). Na slici 11. je prikazana separacija kanabinoida korištenjem ACE 5 C18-AR kolone u usporedbi sa konvencionalnom C18 kolonom. Mobilna faza je za obje kolone bila octena kiselina/acetonitril [41].



Slika 11. HPLC-DAD separacija 11 kanabinoida (nominalne koncentracije 50 µg/mL) korištenjem dviju kolona: ACE 5 C18-AR kolone, mobilna faza 66:34 acetonitril:0,5% octena kiselina (A), te Luna C18 kolona uz mobilnu fazu 74:26 acetonitril:0,5% octena kiselina (B). Redosljed elucije je slijedeći: 1-CBDV, 2-CBDA, 3-CBGA, 4-CBG, 5-CBD, 6-THCV, 7-CBN, 8- Δ^9 -THC, 9- Δ^8 -THC, 10-CBC, 11-THCA [41].

U tablici 3. prikazana su retencijska vremena za pet kanabinoida (CBD, Δ^9 -THC, CBDA, THCA i CBN).

Tablica 3. Retencijska vremena kanabinoida (CBD, Δ^9 -THC, CBDA, THCA, CBN) [41].

| Spoj | Nominalno retencijsko vrijeme (min) |
|-----------------|-------------------------------------|
| CBDA | 12 |
| CBD | 15 |
| CBN | 25 |
| Δ^9 -THC | 29 |
| THCA | 39 |

2.6. Hansenovi parametri topljivosti (*Hansen Solubility Parameters, HSP*)

U prethodnom poglavlju govorilo se o retencijskom vremenu kanabinoida analiziranih HPLC metodom. U sljedećem poglavlju povezati će se retencijsko vrijeme s Hansenovim parametrima topljivosti u svrhu kalkulacija za predviđanje retencijskog vremena, tj. redoslijeda elucije kanabinoida, stoga je potrebno prvo definirati teorijsku pozadinu Hansenovih parametara topljivosti.

Hansenovi parametri topljivosti (HSP) razvijeni su od strane Charles M. Hansena 1967. godine u svrhu predviđanja topljivosti jedne tvari u drugoj prema principu „slično otapa slično“ [42].

Kako bi Hansenovi parametri topljivosti bili što bolje definirani potrebno je dati određenu teorijsku pozadinu. Prije definiranja Hansenovih parametara topljivosti potrebno je definirati Hildebrandove parametre topljivosti. Poznato je da je za otaparavanje molekule otapala potrebno uložiti određenu količinu energije. Ista energija dobiva se natrag kada se molekula otapala kondenzira. Ako se određena količina nekog otapala A otpari, a zatim se kondenzira isti volumen nekog drugog otapala B, ako su otapala međusobno slična tada će razlika uložene i dobivene energije biti minimalna i otapala se miješaju. S druge strane ako otapala A i B nisu slična razlika energije nije balansirana a posljedica toga je slabo miješanje otapala. Ovo se može tumačiti preko kohezijske energije otapala E , koja tumači koliko je energije potrebno uložiti da bi molekula otapala prešla u plinovito stanje. Kohezijska energija može se rastaviti na tri komponente, a to su: disperzijske sile, polarne interakcije i vodikove veze [43].

Tada jednadžba 8 koja matematički prikazuje kohezijsku energiju glasi:

$$E = E_D + E_P + E_H \quad (8)$$

Drugi način tumačenja kohezijske energije može se prikazati pomoću latentne topline isparavanja ili entalpije isparavanja, H_V . U jednadžbi 9 R stoji za univerzalnu plinsku konstantu i T za apsolutnu temperaturu [43].

$$E = H_V - RT \quad (9)$$

Kohezijska energija sama po sebi nije korisna zato što postoji razlika u energiji ovisno veličini molekula. Velike molekule imaju veću kohezijsku energiju. U svrhu olakšanja uspoređivanja molekula potrebno je uvesti pojam gustoće kohezijske energije. Gustoća kohezijske energije dobiva se dijeljenjem jednadžbe za kohezijsku energiju molarnim volumenom V [43].

Jednadžba 10 prikazuje gustoću kohezijske energije i glasi:

$$\frac{E}{V} = \frac{E_D}{V} + \frac{E_P}{V} + \frac{E_H}{V} \quad (10)$$

Gustoća kohezijske energije može se tumačiti pomoću parametra topljivosti, δ (Jednadžba 11), a u tom slučaju vrijedi:

$$\delta^2 = \frac{E}{V} \quad (11)$$

Uvrštavanjem parametra topljivosti δ dobiva se klasična jednadžba Hansenovih parametara topljivosti (Jednadžba 12), koja glasi:

$$\delta^2 = \delta D^2 + \delta P^2 + \delta H^2 \quad (12)$$

Svaka molekula ima tri Hansenova parametra koji predstavljaju različite energije prisutne kod molekula. U jednadžbi δD stoji za energiju disperzijskih veza između molekula, δP stoji za energiju dipolarnih intermolekulskih sila, a δH stoji za energiju vodikovih veza između molekula. Mjerna jedinica ove jednadžbe je $\text{MPa}^{1/2}$. Prema navedenim parametrima može se odnositi kao prema vektorima u tri dimenzije koji se nalaze u tzv. Hansenovom prostoru. Što su vektori dviju molekula bliže u trodimenzionalnom prostoru, veća je vjerojatnost da te molekule otapaju jedna drugu. Drugim riječima HSP udaljenost između molekula mjera je njihove sličnosti. Oznaka za HSP udaljenost je R_a . Što je R_a manji veća je sličnost između molekula [43,44].

Jednadžba 13 matematički prikazuje HSP udaljenost:

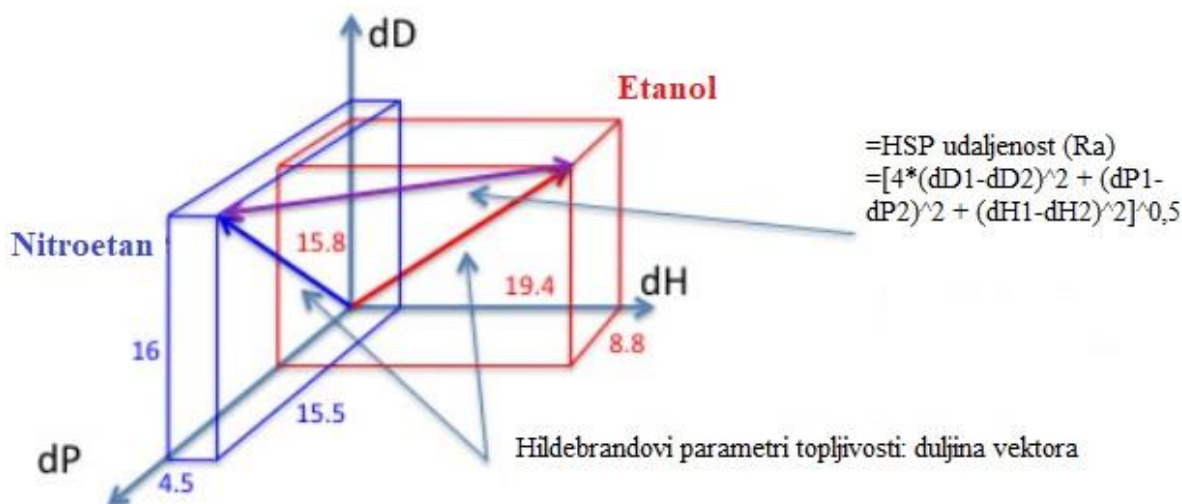
$$Ra^2 = 4(\delta D_1 - \delta D_2)^2 + (\delta P_1 - \delta P_2)^2 + (\delta H_1 - \delta H_2)^2 \quad (13)$$

Faktor 4 ispred $\Delta\delta D$ bio je predmet rasprava među znanstvenicima dugo vremena, ali brojni teorijski i eksperimentalni dokazi potvrdili su validnost tog faktora. Svrha faktora je prikaz HSP grafa u obliku sfere. Ako se iz mjerenja „loših“ i „dobrih“ otapala može formirati sfera koja sadrži sva „dobra“ otapala i posjeduje radijus R_o , tada se može definirati relativna razlika u energiji (*Relative Energy Difference, RED*) koja tumači poziciju neke tvari u „prostoru topljivosti“ druge tvari [43].

Jednadžba 14 prikazuje relativnu razliku u energiji dobiva se dijeljenjem HSP udaljenosti R_a , s radijusom sfere R_o :

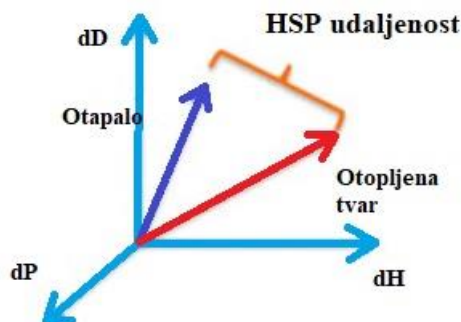
$$RED = \frac{R_a}{R_o} \quad (14)$$

Kao primjer navesti će se etanol i nitroetan. Obje molekule imaju gotovo identične vrijednosti za Hildebrandove parametre topljivosti zato što imaju slične energije isparavanja. S druge strane, njihovi Hansenovi parametri topljivosti su prilično različiti. Grafički prikaz nalazi se na slici 12.



Slika 12. HSP udaljenosti etanola i nitroetana [45].

Kao što je već ranije spomenuto, dvije molekule će otapati jedna drugu ako je HSP udaljenost između dviju molekula mala. Grafički prikaz nalazi se na slici 13.



Slika 13. HSP udaljenost dviju tvari [45].

Hansenovi parametri topljivosti mogu se izračunati za mnogo različitih tvari, npr. ugljikov dioksid, fuleren, C-60, anorganske molekule kao što je natrijev klorid, šećere, biološke materijale kao što su DNA ili razni prirodni organski spojevi, itd. HSP vrijednosti jednostavno se izračunavaju pomoću računalnog programa HSPiP (Hansen Solubility Parameters in Practice) [44].

2.6.1. HSPiP (*Hansen Solubility Parameters in Practice*)

HSPiP je računalni program koji se koristi za izračunavanje Hansenovih parametara topljivosti za molekule. U sklopu HSPiP-a nalazi se e-knjiga, software i kolekcija baza podataka i radnih primjera za 10000 molekula u posljednjoj inačici. Ovaj računalni program sadrži mnogo različitih alata za računanje, a u ovom radu će se naglasak dati na Y-MB alat i Group Contribution metodu.

Group contribution metoda rastavlja strukturu molekula na funkcijske skupine prvog, drugog i trećeg reda. Broj prisutnih funkcijskih skupina koristi se za predviđanje određenih svojstava molekule preko višestrukog linearno regresijskog modela na način da se karakterizira doprinos svake pojedine grupe u molekuli. Funkcija nekog svojstva molekule A može se zapisati kao funkcija doprinosa skupina prvog (i), drugog (j) i trećeg (k) reda i prikazana je jednadžbom 15:

$$f(A) = \sum_i N_i C_i + \sum_j M_j D_j + \sum_k E_k O_k \quad (15)$$

C_i , D_j i O_k su faktori doprinosa, a N_i , M_j i E_k je broj ponavljanja neke funkcijske skupine u molekuli [46].

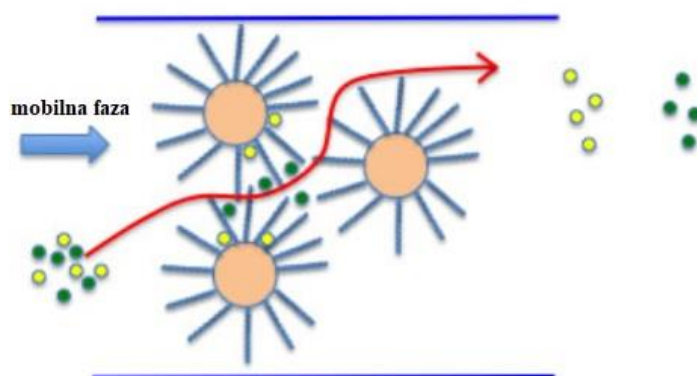
Y-MB alat izračunava HSP parametre za molekulu korištenjem SMILES (*Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) formula. SMILES je pojednostavljena verzija strukturalnih formula molekula koja se koristi u računalnim programima za konverziju

strukture u dvodimenzionalni ili trodimenzionalni prikaz. Ovom metodom izračunavaju se pored HSP-a i mnogi drugi molekularni deskriptori, između ostalih i molarni volumen (*Mvol*), molekulska površina (*Area*), ovalnost ili asimetričnost molekule (*Ovality*), koeficijent razdvajanja između vode i 1-oktanol (Log*Kow*), topljivost u vodi (*LogS*). Kod izračuna δH ovom metodom može se dalje razlučiti na doprinose kohezivnoj energiji kao proton-akceptor (δH_{Acc}) i proton-donor (δH_{Don}).

2.6.2. Teorija kalkulacije za određivanje retencijskog vremena

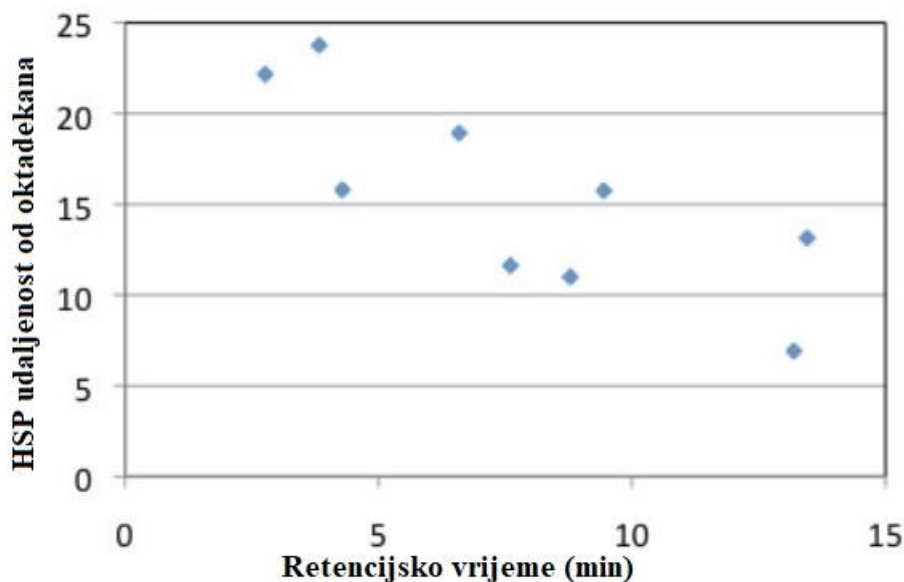
Kao što je već objašnjeno u poglavlju o HPLC-u, retencijsko vrijeme neke tvari ovisiti će o jačini interakcija tvari s mobilnom i stacionarnom fazom. Što su interakcije jače između ispitivane tvari i mobilne faze nego između ispitivane tvari i stacionarne faze retencijsko vrijeme će biti kraće. Takva tvrdnja može se protumačiti i pomoću HSP. Prema tvrdnji da „slično otapa slično“, što su kraće HSP udaljenosti između molekula one se bolje otapaju međusobno. Kombinacijom teorije kromatografije i HSP može se napraviti relacija kojom se može predvidjeti retencijsko vrijeme tj. retencijski redoslijed ispitivanih tvari u određenoj kromatografskoj koloni [44,45].

Kao primjer uzeti će se jedna od najpopularnijih kolona korištenih u HPLC analizama, ODS kolona. ODS kolona sadrži silika-gel prekriven oktadecilnim skupinama. Kada uzorak prolazi kroz kolonu, neke tvari će tvoriti jake interakcije s oktadecilnim alkilnim lancima, a neke tvari će tvoriti slabe ili nikakve interakcije. Tvari koje u ovom slučaju tvore jake interakcije zaostajat će u koloni i imati će veće retencijsko vrijeme, tj. dolaziti će kasnije u retencijskom redoslijedu. Tvari koje tvore slabe ili nikakve interakcije s oktadecilnim skupinama stacionarne faze imati će kraće retencijsko vrijeme, tj. dolaziti će ranije u retencijskom redoslijedu zato što tvore jače interakcije s mobilnom fazom pa se eluiraju brže [44,45]. Na slici 14. prikazan je prolaz čestica kroz kromatografsku kolonu.



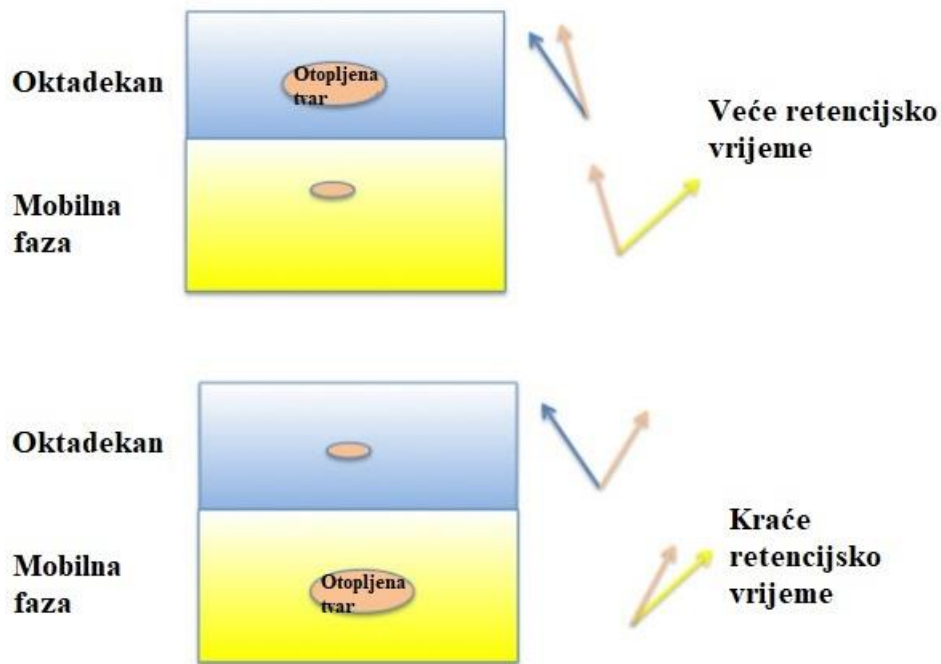
Slika 14. Molekule u HPLC koloni [45].

Kako bi se povezal retencijsko vrijeme s HSP prvo je potrebno izračunati parametre za ispitivane tvari, mobilnu fazu i stacionarnu fazu. HSP se izračunavaju pomoću Y-MB alata u software-u HSPiP. Nakon izračunavanja svih potrebnih vrijednosti pomoću jednadžbe za HSP udaljenost izračunaju se udaljenosti ispitivanih tvari od mobilne ili stacionarne faze te se pravi graf koji prikazuje ovisnost retencijskog vremena o HSP udaljenosti (Slika 15.).



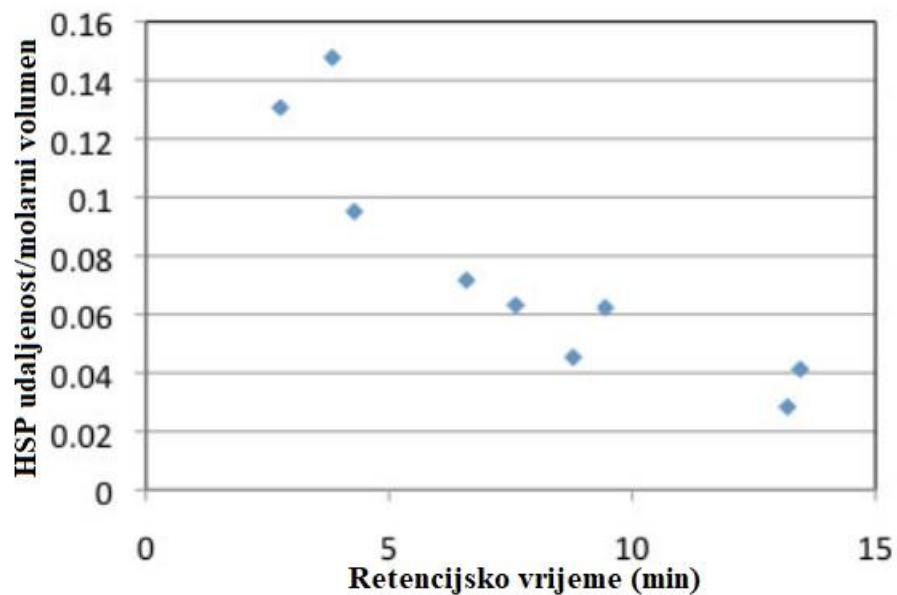
Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti retencijskog vremena analiziranih tvari o HSP udaljenosti između analiziranih tvari i oktadekana, HSP udaljenost ima oznaku R_a i mjernu jedinicu $\text{MPa}^{0,5}$ [45].

Iz grafa se da zaključiti što je HSP udaljenost tvari od oktadekana veća, retencijsko vrijeme postaje kraće. Kada HSP udaljenost postane veća, smjer i duljina vektora se mijenjaju. Tvari koje tvore slabe interakcije, tj. koje se teško otapaju u oktadekanu imati će kraće retencijsko vrijeme [44 45]. Na slici 15. prikazana je povezanost HSP faktora i retencijskog vremena.



Slika 16. Prikaz povezanosti HSP vektora i retencijskog vremena [45].

Drugi način grafičkog prikaza dobiva se kada se HSP udaljenosti podijele s molarnim volumenom (Slika 17.), a zatim se napravi relacija između tih vrijednosti i retencijskog vremena.



Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti retencijskog vremena o HSP udaljenosti/molarni volumen. Oznaka za HSP udaljenost je R_a . Mjerna jedinica $R_a/MVol$ je $MPa^{0,5}mol/cm^3$ [45].

3. Eksperimentalni dio

3.1. HSPiP kalkulacije

U tablici 4. prikazane su SMILES formule za kanabinoide, stacionarnu fazu i komponente mobilne faze na kojima su provedene kalkulacije. U tablici 5. prikazano su podaci za kanabinoide izračunati HSPiP softwareom. U tablici 6. prikazani su podaci za komponente mobilne i stacionarne faze izračunati HSPiP software-om. U tablici 7. prikazani su podaci molekularnih deskriptora za kanabinoide izračunati HSPiP software-om.

Tablica 4. SMILES formule za kanabinoide, mobilnu i stacionarnu fazu [47].

| Molekula | SMILES |
|------------------------|---|
| Δ9-THC | <chem>[H][C@@]12C=C(C)CC[C@@]1([H])C(C)(C)OC1=C2C(O)=CC(CCCC)=C1</chem> |
| THCA | <chem>CCCCC1=CC2=C([C@@H]3C=C(CC[C@H]3C(O2)(C)C)C(=C1C(=O)O)O</chem> |
| CBD | <chem>CCCCC1=CC(O)=C([C@@H]2C=C(C)CC[C@H]2C(C)=C)C(O)=C1</chem> |
| CBDA | <chem>CCCCC1=CC(=C(C(=C1C(=O)O)O)[C@@H]2C=C(CC[C@H]2C(=C)C)O</chem> |
| CBN | <chem>CCCCC1=CC2=C(C(O)=C1)C1=C(C=CC(C)=C1)C(C)(C)O2</chem> |
| CBDV | <chem>CCCC1=CC(=C(C(=C1)O)[C@@H]2C=C(CC[C@H]2C(=C)C)O</chem> |
| CBGA | <chem>CCCCC1=CC(=C(C(=C1C(=O)O)O)C/C=C(\C)/CCC=C(C)C)O</chem> |
| THCV | <chem>CCCC1=CC(=C2[C@@H]3C=C(CC[C@H]3C(OC2=C1)(C)C)C)O</chem> |
| Δ8-THC | <chem>CCCCC1=CC(=C2[C@@H]3CC(=CC[C@H]3C(OC2=C1)(C)C)C)O</chem> |
| CBC | <chem>CCCCC1=CC(=C2C=CC(OC2=C1)(C)CCC=C(C)C)O</chem> |
| CBG | <chem>CCCCC1=CC(=C(C(=C1)O)C/C=C(\C)/CCC=C(C)C)O</chem> |
| Acetonitril | <chem>CC#N</chem> |
| Octena kiselina | <chem>CC(=O)O</chem> |
| Voda | <chem>[H]O[H]</chem> |
| Oktadekan | <chem>CCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem> |

Tablica 5. Podaci za kanabinoide izračunati HSPiP software-om.

| Spoj | Δd | δP | δH | δH_{Don} | δH_{Acc} | MVol | Area | Ovality | LogKow | LogS |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------|--------|-------|
| | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | cm ³ /mol | cm ² /mol | - | - | - |
| $\Delta 9$-THC | 17,49 | 1,63 | 5,30 | 3,80 | 3,40 | 314,20 | 393,48 | 1,76 | 6,29 | -4,69 |
| THCA | 18,01 | 2,16 | 7,48 | 5,10 | 4,70 | 323,40 | 418,10 | 1,84 | 7,02 | -4,08 |
| CBD | 17,72 | 2,09 | 6,33 | 6,00 | 3,30 | 325,00 | 410,69 | 1,80 | 6,55 | -3,87 |
| CBDA | 18,24 | 2,36 | 7,48 | 6,90 | 4,30 | 333,80 | 435,75 | 1,87 | 7,55 | -3,40 |
| CBN | 18,35 | 2,08 | 5,40 | 4,00 | 3,50 | 293,60 | 375,22 | 1,76 | 6,61 | -6,83 |
| CBDV | 17,78 | 2,22 | 7,34 | 6,20 | 3,40 | 292,60 | 368,02 | 1,73 | 5,71 | -2,70 |
| CBGA | 18,26 | 2,95 | 7,82 | 6,80 | 4,20 | 336,00 | 457,87 | 1,96 | 8,27 | -4,32 |
| THCV | 17,55 | 1,72 | 5,75 | 4,00 | 3,50 | 281,50 | 351,18 | 1,69 | 5,39 | -3,50 |
| $\Delta 8$-THC | 17,57 | 1,73 | 5,27 | 3,70 | 3,50 | 314,60 | 393,11 | 1,76 | 6,26 | -3,27 |
| CBC | 17,83 | 2,16 | 5,41 | 3,70 | 3,30 | 315,80 | 410,99 | 1,83 | 6,87 | -6,19 |
| CBG | 17,83 | 2,46 | 6,42 | 5,90 | 3,20 | 326,00 | 431,47 | 1,88 | 6,95 | -4,86 |

Tablica 6. Podaci za komponente mobilne i stacionarne faze izračunati HSPiP software-om.

| Spoj | δD | δP | δH | δH_{Don} | δH_{Acc} | MVol | Area | Ovality | LogKow | LogS |
|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---------|--------|-------|
| - | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | MPa ^{0,5} | cm ³ /mol | cm ² /mol | - | - | - |
| Acetonitril | 15.61 | 16.64 | 8.32 | 4.2 | 6.4 | 53.4 | 69.7 | 1.017 | -0.15 | 1.63 |
| Octena kiselina | 15.2 | 6.58 | 13.62 | 9.8 | 8.1 | 57.5 | 83.89 | 1.165 | -0.17 | 2.36 |
| Voda | 15.64 | 15.97 | 41.98 | 35.4 | 23.1 | 18 | 36.16 | 1.09 | -2.91 | 2.04 |
| Oktadekan | 15.91 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 326.5 | 420.84 | 1.836 | 9.29 | -7.22 |

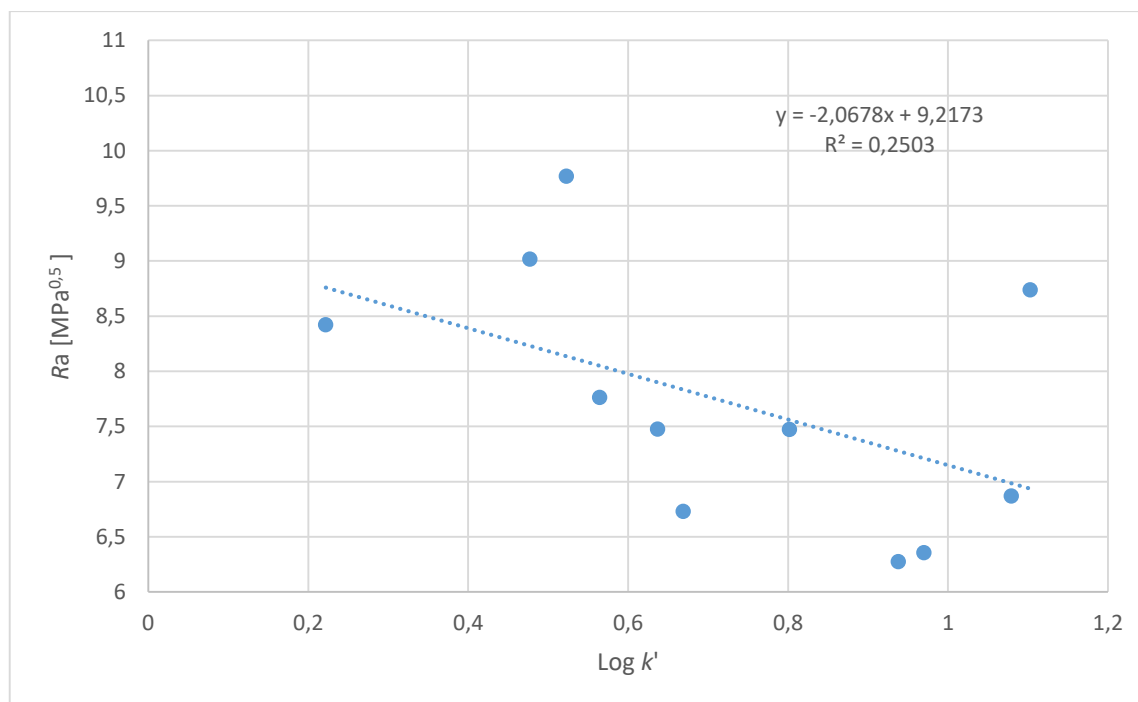
Tablica 7. Podaci molekularnih deskriptora za kanabinoide izračunati HSPiP software-om.

| Spoj | Redni broj pika | R_t | k' | $\text{Log}k'$ | Ra^* | $Ra/Mvol$ | $Ra/Area$ | $Ra/ovality$ |
|-----------------------|-----------------|--------|-------|----------------|--------------------|--|--|--------------------|
| | | minuta | - | - | $\text{MPa}^{0,5}$ | $\text{MPa}^{0,5}\text{mol}/\text{cm}^3$ | $\text{MPa}^{0,5}\text{mol}/\text{cm}^2$ | $\text{MPa}^{0,5}$ |
| $\Delta^9\text{-THC}$ | 8,00 | 29,00 | 8,67 | 0,94 | 6,27 | 0,0173 | 0,0138 | 3,56 |
| THCA | 11,00 | 41,00 | 12,67 | 1,10 | 8,74 | 0,0237 | 0,0183 | 4,76 |
| CBD | 5,00 | 16,00 | 4,33 | 0,64 | 7,48 | 0,0201 | 0,0159 | 4,16 |
| CBDA | 2,00 | 12,00 | 3,00 | 0,48 | 9,02 | 0,0231 | 0,0177 | 4,81 |
| CBN | 7,00 | 22,00 | 6,33 | 0,80 | 7,47 | 0,0193 | 0,0151 | 4,25 |
| CBDV | 1,00 | 8,00 | 1,67 | 0,22 | 8,42 | 0,0258 | 0,0205 | 4,88 |
| CBGA | 3,00 | 13,00 | 3,33 | 0,52 | 9,77 | 0,0245 | 0,0180 | 4,99 |
| THCV | 6,00 | 17,00 | 4,67 | 0,67 | 6,73 | 0,0209 | 0,0167 | 3,98 |
| $\Delta^8\text{-THC}$ | 9,00 | 31,00 | 9,33 | 0,97 | 6,36 | 0,0172 | 0,0138 | 3,62 |
| CBC | 10,00 | 39,00 | 12,00 | 1,08 | 6,87 | 0,0180 | 0,0139 | 3,75 |
| CBG | 4,00 | 14,00 | 3,67 | 0,56 | 7,76 | 0,0207 | 0,0156 | 4,12 |

* Ra je udaljenost u HSP prostoru od stacionarne faze

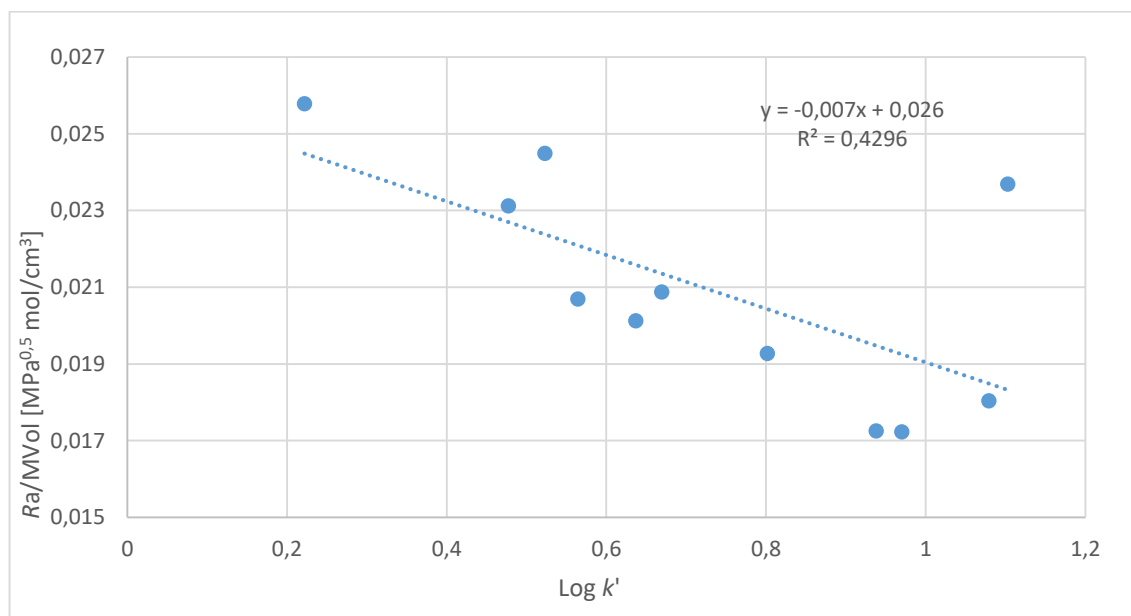
3.2. Korelacija retencijskog faktora s kalkuliranim molekularnim deskriptorima

Nakon kalkulacija izabranih molekularnih deskriptora izvršila se korelacija s podacima HPLC analiza navednih kanabinoida [41] u svrhu uspostavljanja modela za predviđanje retencijskog vremena na osnovi molekularnih deskriptora, u prvom redu udaljenost Ra (Slika 18.).



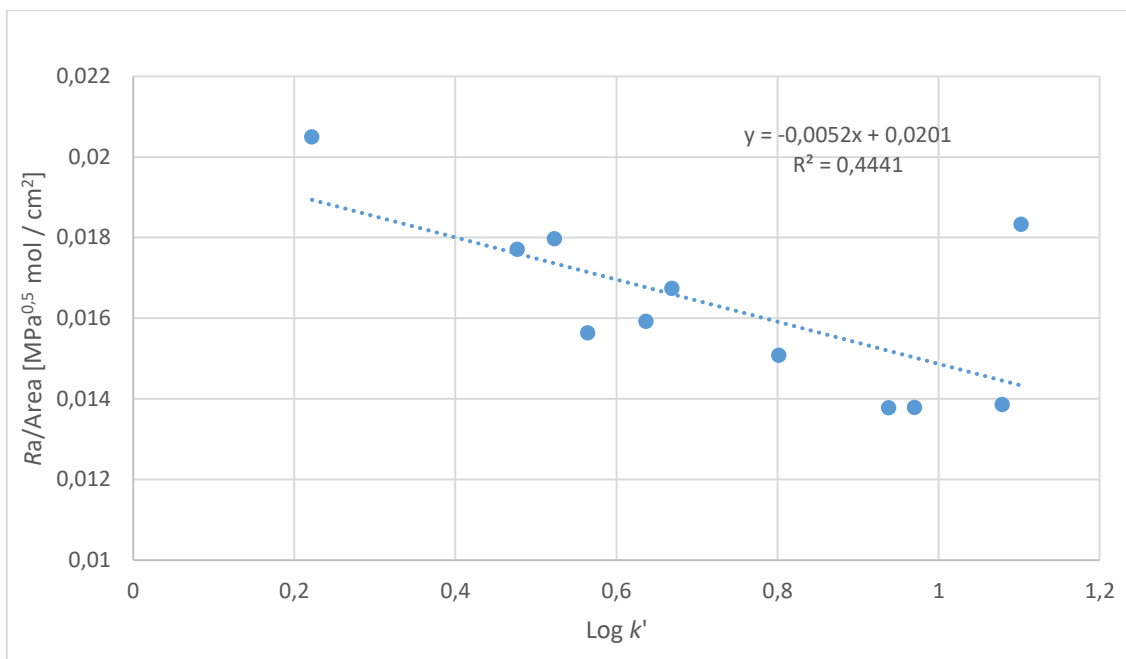
Slika 18. Grafički prikaz korelacije između $\text{Log}k'$ i Ra -vrijednosti kanabinoida.

U ispitanoj sustavu korelacija R_a s logaritmom retencijskog kapaciteta ($\log k'$) nije odgovarajuća za postavljanje modela i teoretsko određivanje retencijskih vremena na osnovi molekularnih deskriptora. U literaturi je ranije opisano da omjer udaljenosti R_a i molekularnog volumena $MVol$ ima bolju korelaciju s $\log k'$ što se može zaključiti i za ispitani sustav po povećanju korelacijskog faktora R^2 .

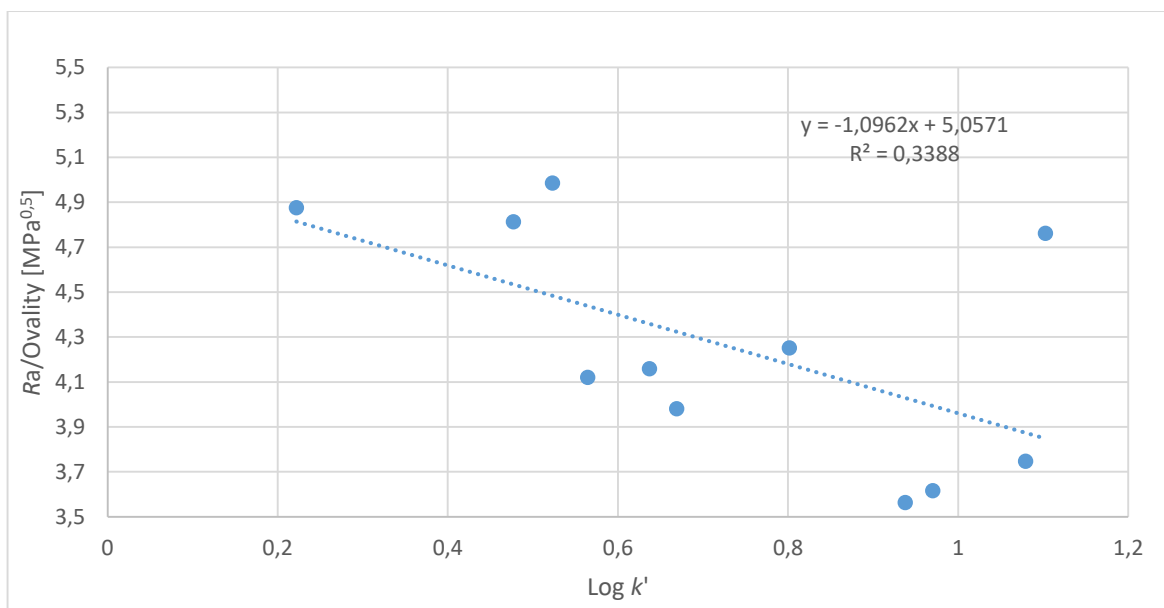


Slika 19. Grafički prikaz korelacije između $\text{Log } k'$ i $R_a/MVol$ kanabinoida.

Pretpostavka po kojoj je $MVol$ korišten kao drugi faktor koji utječe na interakciju molekula analita sa stacionarnom fazom je da manje molekule imaju jaču interakciju sa stacionarnom fazom (Slika 14.) i na taj način utječe i na retencijsko vrijeme analita. Analogno ovoj pretpostavci, može se pretpostaviti da na jakost interakcije između analita i stacionarne faze utječu i molarna površina analita ($Area$) i oblik molekule ($Ovality$). Zbog toga se ispitala korelacija ova dva faktora s logaritmom retencijskog kapaciteta ($\text{Log } k'$) što je prikazano na slikama 20. i 21.



Slika 20. Grafički prikaz korelacije između $\text{Log } k'$ i Ra/Area kanabinoida.

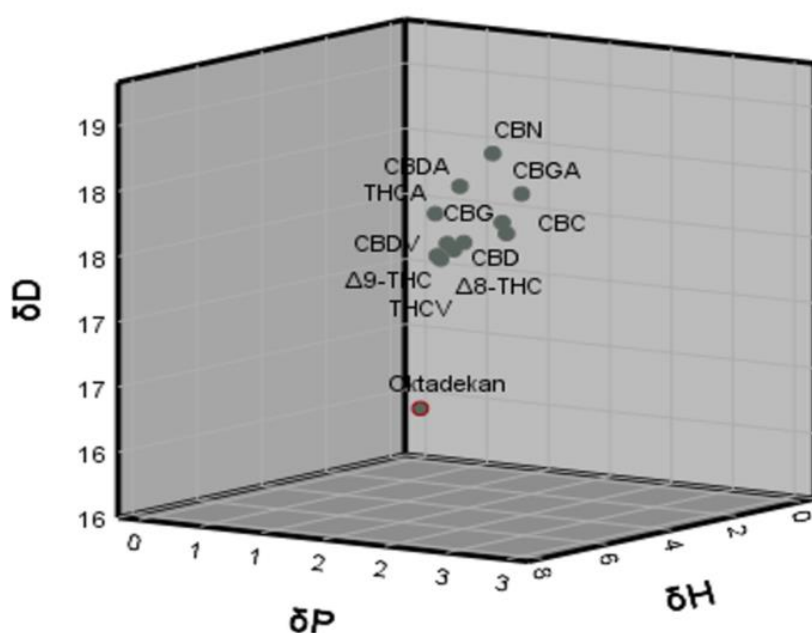


Slika 21. Grafički prikaz korelacije između $\text{Log } k'$ i $Ra/\text{Ovality}$ kanabinoida.

4. Rezultati i rasprava

4.1. HSPiP kalkulacije

Upotreba HSPiP software-a je jednostavna zato što zahtjeva samo poznavanje strukture molekule od interesa. Software ima veliku vlastitu bazu podataka s oko 10000 molekula čija su svojstva određena eksperimentalno. Za svaku molekulu čiji podaci nisu određeni eksperimentalno, mogu se izračunati molekularna svojstva na osnovi trodimenzionalne strukture molekule kao što je prikazano u Tablici 5.. Pomoću molekularnih deskriptora možemo vršiti daljnje kalkulacije i usporedbe molekularnih svojstava i interakcija.



Slika 22. 3-D grafički prikaz Hansenovih parametara topljivosti.

Na slici 22. Prikazani su Hansenovi parametri topljivosti izračunati HSPiP softverom pomoću Group-contribution metode.

4.2. Rezultati korelacija retencijskog faktora s kalkuliranim molekularnim deskriptorima

Za korelaciju teoretski kalkuliranih faktora koristio se logaritam faktora kapaciteta ($\log k'$), koji nije ovisan o dužini i volumenu kolone. Uz dobro postavljen analitički model i odgovarajuću korelaciju, na osnovi R_a može se odrediti k' i izračunati retencijsko vrijeme. Kao osnovni parametar HSP-a koji ukazuje na jačinu interakcije stacionarne faze i analita koristila se udaljenost R_a analita od stacionarne faze, u ispitanom slučaju oktadekana. Logičnim slijedom, što je R_a manji to će interakcija sa stacionarnom fazom biti jača a retencijsko vrijeme veće. Na Slici 18. jasno se vidi da je korelacija izuzetno slaba

($R^2=0,2503$) te da se samo na osnovi R_a ne može postaviti model za predviđanje retencijskih vremena. Molarni volumen analita također može imati utjecaj na interakciju sa stacionarnom fazom. Uzimajući u obzir oba faktora proučila se korelacija s logaritmom faktora kapaciteta ($\log k'$) i ona je prikazana na slici 19. Korelacijski faktor je u ovom slučaju bolji ($R^2=0,4296$). Uočljive su dvije vrijednosti koje značajno odstupaju od glavnog trenda, a to su vrijednosti za THCA i CBGA. Proučavanjem tablice 5. uočljivo je da ova dva spoja imaju najveći δH_{Acc} , sposobnost primanja vodikove veze. Ovaj podatak može objasniti odstupanje od osnovnog trenda ostalih analita. Velika sposobnost molekule da prihvati vodikovu vezu u polarnom okruženju znači da stvara jaku interakciju s polarnim protičnim otapalima i na taj način kroz kolonu prolazi zajedno sa solvatnim omotačem te se njihovo ponašanje u HPLC analizi ne može predvidjeti iz podataka koji ne uzimaju u obzir takvu specifičnu interakciju. Ako se izuzmu iz korelacije dva navedena spoja dobije se odgovarajuća korelacija ($R^2=0,9148$) za predviđanje redoslijeda analita na HPLC kromatogramu. Pored M_{vol} provjerila se korelacija uzimajući u obzir molarnu površinu i oblik molekula analita. Koristeći molarnu površinu kao drugi faktor (Slika 20.) dobivena je bolja korelacija nego s M_{vol} ($R^2=0,4441$). Slično prethodnom slučaju i tu je vidljivo da podatak za THCA odstupa od glavnog trenda. Ako taj podatak isključimo dobijemo bolju korelaciju ($R^2=0,8985$). Koristeći faktor koji daje ovalnost molekule tj. odstupanje od sferičnog oblika kao mogući faktor koji utječe na interakciju sa stacionarnom fazom nije dobivena bolja korelacija u odnosu na prethodna dva slučaja.

5. Zaključak

Bez obzira na činjenicu da EU propisuje zakone i različite smjernice vezane za kanabis i proizvode na bazi kanabisa, postoje brojne razlike u zakonskim regulacijama kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa. Razlike u tim regulacijama su posljedica više faktora, a to su: autonomija država u donošenju zakona, nedovoljno definirani zakoni za sve skupine proizvoda osim lijekova na bazi kanabisa, nedostatak podataka zasnovanih na znanstvenim istraživanjima vezanim za dugoročni utjecaj spomenutih proizvoda na zdravlje korisnika. Važno je naglasiti da se prema trenutnim podacima ne može egzaktno potvrditi štetnost proizvoda na bazi kanabisa na zdravlje korisnika, ali ne treba zanemariti činjenicu spomenutu u radu koja navodi prisutnost raznih kancerogenih nečistoća u analiziranim proizvodima. Zbog bogatstva kemijskog profila *Cannabis sativa L.*, proizvodi na bazi ove biljke potencijalno imaju veliku primjenu u budućnosti kao terapija za široku lepezu različitih bolesti. Potrebno je provesti veliki niz različitih istraživanja na svakom kanabinoidu s potencijalnom primjenom u medicini te istraživanja u svrhu pronalaženja adekvatnih načina administracije kanabinoida u svrhu dizajniranja pripravaka koji zadovoljavaju spomenute zahtjeve kvalitete i zakonske regulacije. Postoji cijeli niz različitih tehnika analize kanabisa i proizvoda na bazi kanabisa. Najkorištenije metode su GC-MS i HPLC. Obje metode imaju svoje prednosti i nedostatke. GC-MC ima najveći limit detekcije i kvantifikacije, ali nedostatak mu je termalna dekarboksilacija kiselih kanabinoida. HPLC ne utječe na promjene u strukturi kanabinoida, ali često ne daje dovoljno dobru rezoluciju u nizu kanabinoida, a to je posljedica strukturnih sličnosti između velikog broja molekula sadržanih u biljci ili analiziranim proizvodima. Ovaj rad se fokusirao na literaturni pregled HPLC analiza proizvoda na bazi kanabisa i na mogućnost korištenja teoretske metode za optimalizaciju HPLC analiza. Izvršene su kalkulacije HSP za glavne komponente ulja kanabisa, kao i kalkulacije drugih molekularnih deskriptora koji bi po pretpostavci mogli imati utjecaj na interakciju analita sa stacionarnom fazom HPLC kolone. Korelacije retencijskog kapaciteta i različitih molekularnih deskriptora nisu dale dobre rezultate za ispitani sustav. Uzrok loše korelacije najvjerojatnije je prevelika strukturna sličnost proučavanih molekula i nekorištenje specifičnih deskriptora. Za daljnji razvoj teoretskih metoda potrebne su dodatne kalkulacije i usporedba s većim brojem eksperimentalnih podataka.

6. Literaturni izvori

- [1] <https://www.forbes.com/sites/roberthoban/2020/11/25/europe-aligns-with-us-on-industrial-hemp-thc-requirements/?sh=66228449da48> (30.08.2021.)
- [2] <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13471/TD0320749ENN01.pdf> (30.08.2021.)
- [3] <https://ilesol.com/cbd-european-legislation-national/> (30.08.2021.)
- [4] W. Hall, A summary of reviews of evidence on the efficacy and safety of medical use of cannabis and cannabinoids, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon, 2018.
- [5] <https://www.epidiolex.com/> (30.08.2021.)
- [6] S. Chandra, H. Lata, M. A. ElSohly, *Cannabis sativa L.* - Botany and Biotechnology, Springer International Publishing, SAD, 2017., ISBN: 978-3-319-54564-6
- [7] A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi, Phytocannabinoids, Unraveling the Complex Chemistry and Pharmacology of Cannabis sativa, Springer International Publishing, SAD, ISBN: 978-3-319-45539-6
- [8] B. F. Thomas, M. A. ElSholy, The Analytical Chemistry of Medicinal Marijuana and Cannabinoid Preparations, Elsevier, Netherlands, 2016. ISBN: 978-0-12-804646-3
- [9] G. Mandolino, A. Carboni, S. Forapani, V. Faeti, P. Ranalli, Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa L.*), Theoretical and Applied Genetics, 98 (1999), 86-92
- [10] I. Bo'csa, P. Ma'the', L. Hangyel, Effect of nitrogen on tetrahydrocannabinol (THC) content in hemp (*Cannabis sativa L.*) leaves at different positions, J Int Hemp Assoc 4 (1997), 80-81
- [11] E.P.M. de Meijer, M. Bagatta, A. Carboni, P. Crucitti, V.M.C. Moliterni, P. Ranalli, G. Mandolino, The inheritance of chemical phenotype in *C. sativa L.*, Genetics, 163 (2003), 335-346
- [12] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00470> (05.09.2021.)
- [13] <https://go.drugbank.com/drugs/DB09061> (05.09.2021.)

- [14] C. Mannucci, M. Navarra, F. Calapai, E.V. Spagnolo, F.P. Busardo, R.D. Cas, F.M. Ippolito, G. Calapai, Neurological Aspects of Medical Use of Cannabidiol, *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 16, Issue 5, (2017), 551-553
- [15] <https://go.drugbank.com/drugs/DB14734> (05.09.2021.)
- [16] S. Deiana, Potential Medical Uses of Cannabigerol: A Brief Overview, *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*, Elsevier, Netherlands (2017), 958–967
- [17] R. Nachnani, W.M. Raup-Konsavage, K.E. Vrana, The Pharmacological Case for Cannabigerol, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 376(2), (2020), 204–212
- [18] <https://go.drugbank.com/drugs/DB14737> (05.09.2021.)
- [19] T.B. Wood, W.T.N. Spivey, T.H. Easterfield, III. - Cannabinol. Part I., *Journal of Chemical Society, Transactions*, 75(0) (1899), 20–36
- [20] E.B. Russo, J. Marcu, Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads, *Advances in Pharmacology*, 80 (2017), 67–134
- [21] M.H. Rhee, Z. Vogel, J. Barg, M. Bayewitch, R. Levy, L. Hanuš, A. Breuer, R. Mechoulam, Cannabinol Derivatives: Binding to Cannabinoid Receptors and Inhibition of Adenylylcyclase, *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(20), (1997), 3228–3233
- [22] G. Appendino, S. Gibbons, A. Giana, A. Pagani, G. Grassi, M. Stavri, E. Smith, M.M. Rahman, Antibacterial Cannabinoids from *Cannabis sativa*: A Structure–Activity Study, *Journal of Natural Products*, 71(8), (2008), 1427–1430
- [23] J.D. Wilkinson, E.M. Williamson, Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis, *Journal of Dermatological Science*, 45(2), (2007), 87–92
- [24] R. Pertwee, *Handbook of Cannabis*, Oxford Scholarship Online, (2015)
- [25] <https://go.drugbank.com/drugs/DB11755> (05.09.2021.)
- [26] R.G. Pertwee, The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin, *British Journal of Pharmacology*, 153(2), (2008), 199-215

- [27] M.G. Cascio, E. Zamberletti, P. Marini, D. Parolaro, R.G. Pertwee, The phytocannabinoid, Delta(9)-tetrahydrocannabivarin, can act through 5-HT(1)A receptors to produce antipsychotic effects, *British Journal of Pharmacology*, 172(5), (2015), 1305-18
- [28] A. Abioye, O. Ayodele, A. Marinkovic, R. Patidar, A. Akinwekomi, A. Sanyaolu, Δ^9 -Tetrahydrocannabivarin (THCV): a commentary on potential therapeutic benefit for the management of obesity and diabetes, *Journal of Cannabis Research* 2(1), (2020), 2-6
- [29] <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-8774-1840/dronabinol-oral/dronabinol-solution-oral/details> (09.09.2021.)
- [30] <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a607054.html> (09.09.2021.)
- [31] <https://www.medicines.org.uk/emc/product/602/smpc> (09.09.2021.)
- [32] <https://headshop.hr/proizvod/greenlab-cbd-ulje-basic-3/> (09.09.2021.)
- [33] R. Pavlovic, Radmila, G. Nenna, L. Calvi, S. Panseri, G. Borgonovo, L. Giupponi, G. Cannazza, A. Giorgi, Quality Traits of “Cannabidiol Oils”: Cannabinoids Content, Terpene Fingerprint and Oxidation Stability of European Commercially Available Preparations, *Molecules*, 23(5), (2018), 1230
- [34] A.K. Hewavitharana, G. Golding, G. Tempany, G. King, N. Holling, Quantitative GC-MS Analysis of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Fiber Hemp Varieties, *Journal of Analytical Toxicology*, 29(4), (2005), 258–261
- [35] S.N. Atapattu, K.R.D. Johnson, Pesticide analysis in cannabis products, *Journal of Chromatography A*, 1612, (2020), 460656
- [36] M. Morita, H. Ando, Analysis of hashish oil by gas chromatography/mass spectrometry, *Kagaku Keisatsu Kenkyujo Hokoku Hokagaku-Hen* 37, (1984), 137
- [37] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography#Resolution](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/High_Performance_Liquid_Chromatography#Resolution) (12.09.2021.)
- [38] https://support.waters.com/KB_Info/Empower_Breeze/WKB5086_What_is_the_equation_for_determining_capacity_factor_k_in_Empower (12.09.2021)

- [39] M.A. ElSohly, W. Gul, M. Salem, Handbook of analytical separations, 6, (2008), Elsevier, New York, 235
- [40] T. Veress, J. Sza'nto', L. Leisztner, HPLC analysis of cannabinoids using amino bonded stationary phase column, In: Kala'sz H, Etre L (eds) Chromatog 87, (1988), 481
- [41] L.A. Ciolino, T.L. Ranieri, A.M. Taylor, Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids, Forensic Science International, 289, (2018) 438–447
- [42] Charles M. Hansen, The Three Dimensional Solubility Parameter and Solvent diffusion Coefficient, Their Importance In Surface Coating Formulation; Copenhagen anish Technical Press, 1967.
- [43] <https://www.hansen-solubility.com/HSP-science/basics.php> (12.09.2021.)
- [44] <https://pirika.com/NewHP/PirikaE2/HPLCCalc.html> (12.09.2021.)
- [45] <https://pirika.com/NewHP/PirikaE/HPLC.html> (12.09.2021.)
- [46] R. Al, J. Frutiger, A. Zubov, G. Sin, Prediction of Environmental Properties Using a Hybrid Group Contribution Approach, Computer Aided Chemical Engineering, (2018), 1723–1728
- [47] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (12.09.2021.)

7. Popis kratica i simbola

¹H-NMR – protonska nuklearna magnetska rezonanca (*Proton Nuclear Magnetic Resonance*)

5HT1A – serotoninski receptor, podtip 1A

CB1R – kanabinoidni receptor tip 1

CB2R – kanabinoidni receptor tip 2

CBC – kanabikromen

CBD – kanabinol

CBDA –kanabinolična kiselina

CBDV – kanabidivarin

CBE – kanabielsoin

CBG – kanabigerol

CBGA – kanabigerolična kiselina

CBL – kanabiciklol

CBN – kanabinol

CBND – kanabinodiol

CBT – kanabitriol

EMCDDA – Europski centar za nadzor droge i ovisnosti o drogama (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*)

FID – plameno-ionizacijska detekcija (*Flame Ionization Detection*)

GC-FID – Kapilarna plinska kromatografija visoke rezolucije s plamenom ionizacijskom detekcijom (*High Resolution Capillary Gas Chromatography Flame Ionization Detection*)

GC-MS – plinska kromatografija-masena spektrometrija (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*)

HPLC – Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography*)

HPLC-MS – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – masena spektrometrija (*High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

HPLC-UV – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV-detekcijom

HPLD-DAD – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s diodnim detektorom (*High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*)

HSP – Hansenovi parametri topljivosti (Hansen Solubility Parameters)

HSPiP – (*Hansen Solubility Parameters in Practice*)

k – retencijski faktor

K_c – konstanta raspodjele između stacionarne i mobilne faze

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija spregnuta s dva masena spektrometra

MS – multipla-skleroza

ODS kolona – kolona s oktadecilnim skupinama, C18

PAHs – policiklički aromatski ugljikovodici (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*)

R_D – rezolucija elucije

SMILES – (*Simplified Molecular-Input Line-Entry System*)

THC – tetrahidrokanabinol

THCA – tetrahidrokanabinolična kiselina

TLC – tankoslojna kromatografija (*Thin-Layer Chromatography*)

t_M – mrtvo vrijeme (*void-time*)

t_R – retencijsko vrijeme

V_M – volumen mobilne faze

V_S – volumen stacionarne faze

α – faktor selektivnosti

Δ^8 -THC – (-)- Δ^8 -*trans*-tetrahidrokanabinol

Δ^9 -THC – (-)- Δ^9 -*trans*-tetrahidrokanabinol

8. Životopis autora

Osobni podaci:

Ime i prezime: Zvonimir Perković

Datum rođenja: 17. kolovoza 1995.

Mjesto rođenja: Našice

Obrazovanje:

2002.-2010. Osnovna škola Josipa Jurja Strossmayera, Đurđenovac

2010.-2014. Srednja škola, Medicinska Škola Osijek, Osijek

2014.-2019. Preddiplomski studij Kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek