ROZPRAWA DOKTORSKA

Analityczne oznaczanie kannabinoidów w surowcach i produktach otrzymanych z konopi za pomocą UHPLC z detektorami UV-VIS i CORONA CAD

Praca przedstawiona Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne
Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
celem uzyskania stopnia naukowego
doktora nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Robert Pietrzak
Promotor pomocniczy: dr Aleksandra Bazan-Woźniak

Serdecznie dziękuję mojemu promotorowi, Panu prof. dr. hab.Robertowi Pietrzakowi, za opiekę naukową, cenne uwagi oraz wsparcie podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej.

Bardzo dziękuję Pani dr Aleksandrze Bazan-Woźniak za zaangażowanie, pomoc w realizacji badań oraz dzielenie się wiedzą i doświadczeniem.

Szczególne podziękowania kieruję do właścicieli firmy Polygen sp. z o.o.: Pani Prezes Krystyny Niedzielskiej, Pana Marka Danielewicza oraz Pana Czesława Niedzielskiego. Dziękuję za okazane zaufanie, umożliwienie mi realizacji doktoratu wdrożeniowego oraz stworzenie warunków sprzyjających prowadzeniu badań i rozwojowi naukowemu. Pani Prezes Krystynie Niedzielskiej składam szczególne wyrazy wdzięczności za życzliwość, wyrozumiałość i nieustające wsparcie na kolejnych etapach powstawania niniejszej pracy.

Najgłębsze i najbardziej osobiste podziękowania kieruję do mojej ukochanej Żony oraz naszych czterech wspaniałych Córek. Dziękuję Wam za miłość, cierpliwość i wyrozumiałość, szczególnie w chwilach, gdy praca naukowa zabierała nam wspólny czas. Wasza obecność, codzienna radość i wiara we mnie dawały mi siłę, aby pokonywać trudności i konsekwentnie zmierzać do celu. To dzięki Wam nawet najtrudniejsze etapy tej drogi miały głęboki sens. Każda z Was była dla mnie źródłem motywacji, nadziei i spokoju. Tę pracę dedykuję Wam, ponieważ bez Waszego wsparcia, ciepła i miłości jej ukończenie nie byłoby możliwe. Jednocześnie przepraszam Was za wakacje 2026 roku, które zamiast wspólnie z Wami spędziłem głównie przed ekranem komputera. Obiecuję, że kolejne wakacje będą już bez doktoratu w bagażu.

SPIS TREŚCI

Streszczenie w języku polskim 9

Abstract in English 12

1. Wprowadzenie i uzasadnienie pracy 17

1.1. Znaczenie oznaczania kannabinoidów 17

1.2. Surowce i produkty konopne jako złożone matryce 18

1.3. Problemy analityczne 19

1.4. Uzasadnienie zastosowania UHPLC z detektorami UV-VIS i CORONA CAD 21

1.5. Zakres pracy na tle aktualnych potrzeb chemii analitycznej 22

2. Kannabinoidy - główne metabolity wtórne rośliny 24

2.1. Klasyfikacja i budowa chemiczna kannabinoidów 24

2.2. Biosynteza kannabinoidów w roślinie 27

2.3. Formy kwasowe i neutralne - dekarboksylacja 29

2.4. Właściwości fizykochemiczne kannabinoidów 31

3. Cel pracy i zakres badań 33

3.1. Cel i zakres pracy 33

3.2. Cele szczegółowe 33

3.3. Zakres badań 34

3.4. Zakres wdrożeniowy 35

4. Materiały i metody 37

4.1. Anality i substancje odniesienia 37

4.2. Odczynniki, rozpuszczalniki i fazy ruchome 38

4.3. Materiał badawczy 38

4.4. Aparatura i warunki chromatograficzne 40

4.5. Przygotowanie roztworów wzorcowych i prób badanych 42

4.6. Identyfikacja, kalibracja i obliczenia 44

4.7. Plan walidacji 46

5. Opracowanie i optymalizacja metody UHPLC 49

5.1. Założenia metodyczne 49

5.2. Dobór warunków rozdzielania 51

5.3. Dobór warunków detekcji UV-VIS/DAD i CAD 52

5.4. Finalne warunki metody 55

5.5. Regiony krytyczne chromatogramu 57

6. Walidacja i ocena przydatności metody 60

6.1. Selektywność i interferencje 61

6.2. Przydatność systemu chromatograficznego 62

6.3. Kalibracja, model odpowiedzi i zakres roboczy 66

6.4. Dokładność i precyzja 68

6.5. Oszacowanie LOD i LOQ na podstawie S/N 70

6.6. Odporność metody 73

6.7. Podsumowanie walidacji 75

7. Zastosowanie metody do próbek rzeczywistych 78

7.1. Charakterystyka próbek 78

7.2. Wyniki dla produktów olejowych dla detektora CAD 79

7.3. Wyniki dla suszu i materiału roślinnego dla detektora UV-VIS/DAD 80

7.4. Kontrola chromatogramów i regionów krytycznych w próbkach rzeczywistych 80

8. Ocena wdrożeniowa procedury 82

8.1. Zakres zastosowania w badanych warunkach 82

8.2. Warunki rutynowej pracy 82

8.3. Krytyczne punkty procedury 83

8.4. Proponowany schemat wdrożenia w laboratorium 84

8.5. Planowane wdrożenie procedury w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich 84

9. Dyskusja wyników 86

9.1. Znaczenie przygotowania próbki i matrycy 86

9.2. Przydatność UHPLC-UV-VIS/DAD 86

9.3. Przydatność UHPLC-CAD 87

9.4. Znaczenie walidacji 87

9.5. Ograniczenia pracy i dalszy rozwój metody 88

10. Wnioski 89

11. Załączniki 91

11.1. Procedury przygotowania próbek 91

11.2. Widma UV-VIS roztworów wzorcowych kannabinoidów 95

11.3. Chromatogramy wykorzystane do oceny selektywności i walidacji 102

11.4. Arkusze przydatności systemu dla detekcji UV-VIS-DAD 107

11.5. Arkusze przydatności systemu dla detekcji CAD 114

11.6. Krzywe kalibracyjne UV-VIS/DAD i Corona CAD 121

11.7. Wyniki obliczeń statystycznych parametrów walidacyjnych metod UHPLC-UV-VIS/DAD i UHPLC-CORONA CAD 131

11.8. Wyniki obliczeń statystycznych parametrów walidacyjnych 132

11.9.1 Obliczenia dla kalibracji UV-VIS/DAD 134

11.9.2 Obliczenia dla kalibracji z wykorzystaniem detektora CAD 144

11.9.3 Obliczenia precyzji dla detektora CAD 152

11.9. Obliczenia dokładności i odzysku 157

11.10. Obliczenia odporności metody 167

11.11. Chromatogramy prób rzeczywistych 193

12. Wykaz tabel..... 204

13. Wykaz rycin..... 210

14. Literatura..... 214

15. Dorobek naukowy..... 220

Streszczenie w języku polskim

Niniejsza rozprawa doktorska dotyczy opracowania, optymalizacji, walidacji i oceny przydatności procedury UHPLC przeznaczonej do analizy kannabinoidów w surowcach oraz produktach otrzymanych z konopi. W pracy wykorzystano jedną procedurę rozdzielania chromatograficznego w dwóch wariantach detekcji: UV-VIS/DAD oraz CORONA CAD. Celem badań było uzyskanie rozdzielenia 19 kannabinoidów oraz ilościowe oznaczanie wybranych analitów w badanych matrycach roślinnych i olejowych.

Zakres analityczny procedury obejmował 19 kannabinoidów: CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, CBCVA, CBNA, Δ^9-THC, CBL, Δ^9-THCA, CBC, CBCA, CBLA oraz Δ^9-THCP. W analizie uwzględniono kannabinoidy obojętne, formy kwasowe oraz wybrane związki mniejszościowe. Dobór analitów pozwolił na kompleksową ocenę profilu kannabinoidowego. Istotnym aspektem badań było rozdzielenie związków o zbliżonej budowie chemicznej i podobnych właściwościach retencyjnych.

Rozdzielanie chromatograficzne przeprowadzono w układzie odwróconych faz z zastosowaniem kolumny Accucore C18 o wymiarach 150 × 3,0 mm i średnicy cząstek 2,6 µm. Fazę ruchomą A stanowiła woda zawierająca 0,1% (v/v) kwasu octowego, natomiast fazę B stanowił acetonitryl. Zastosowano elucję izokratyczną przy stosunku faz A wynoszącym 30:70 (v/v). Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,5 ml/min, temperatura kolumny 20°C, temperatura autosamplera 25°C, a objętość nastrzyku 5 µl. Całkowity czas analizy wynosił 30 min. Dobór warunków chromatograficznych uwzględniał uzyskanie odpowiedniej jakości rozdzielenia chromatograficznego, stabilności odpowiedzi detektorów, czasu analizy oraz możliwości zastosowania procedury do próbek rzeczywistych.

W wariancie z detekcją UV-VIS/DAD sygnał wykorzystywany do oznaczeń ilościowych oraz oceny parametrów walidacyjnych rejestrowano przy długości fali 278 nm. Równolegle rejestrowano widma 3D DAD w zakresie 190-400 nm z częstotliwością akwizycji 5 Hz. Analiza widmowa stanowiła uzupełnienie identyfikacji analitów oraz służyła do porównania ich profili z widmami uzyskanymi dla roztworów wzorcowych i kontroli jakości chromatogramów. Podstawę identyfikacji analitów stanowiły zgodność czasu retencji i kolejności elucji z mieszaniną wzorcową, uzupełnione oceną zgodności widm DAD.

W wariancie z detekcją CORONA CAD temperaturę parowania ustalono na 35°C, częstotliwość akwizycji na 2 Hz, natomiast ustawienia Filter i Power Function odpowiednio na 5 i 1,00. Ze względu na aerozolowy mechanizm detekcji istotne znaczenie miały stabilność procesu nebulizacji, powtarzalność tworzenia aerozolu oraz zastosowanie lotnych składników fazy ruchomej. Ze względu na nieliniową charakterystykę odpowiedzi detektora CAD zależności kalibracyjne opisano za pomocą regresji kwadratowej z zastosowaniem ważenia $1/x$ lub $1/x^2$, dobieranego indywidualnie dla poszczególnych analitów.

Przygotowanie próbek obejmowało ekstrakcję około 70 mg materiału roślinnego lub produktu olejowego w 10 ml metanolu przez 15 min z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej, po zakończeniu ekstrakcji próbki wirowano, a następnie przesączano przez membranowy filtr z regenerowanej celulozy o średnicy porów 0,45 µm. Uzyskane ekstrakty rozcieńczano metanolem w stosunku 1:10. Procedurę zastosowano do dwóch matryc: suszu lub kwiatostanów konopi oraz produktów olejowych.

Walidacja obejmowała ocenę podstawowych parametrów metody, w tym selektywności, kalibracji, precyzji, dokładności, LOD, LOQ oraz odporności na niewielkie zmiany warunków analizy. Dla DAD zastosowano kalibrację liniową, natomiast dla CAD – regresję kwadratową z ważeniem $1/x$ lub $1/x^2$. Zakres roboczy wynosił od LOQ do 200 lub 250 µg/ml, zależnie od analitu. Wartości LOD i LOQ mieściły się odpowiednio w zakresach 1-5 i 1-10 µg/mL.

Przydatność układu chromatograficznego oceniono na podstawie parametrów systemu, w tym powtarzalności, liczby półek teoretycznych i rozdzielczości. Dla wszystkich analitów uzyskano $N \geq 2000$, natomiast pary CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC i CBCA/CBLA charakteryzowały się niższą rozdzielczością, wymagającą szczególnej kontroli integracji pików.

Badania precyzji i dokładności przeprowadzono dla ustalonych poziomów stężeń i warunków analitycznych.

Odporność metody oceniono poprzez zmianę przepływu fazy ruchomej i temperatury kolumny. Opracowaną procedurę zastosowano do analizy próbek rzeczywistych – produktów olejowych oraz suszu i materiału roślinnego. W olejach oznaczano głównie CBD, natomiast w suszu i materiale roślinnym CBD i CBDA. Procedura umożliwiła rozdzielenie 19 kannabinoidów oraz ilościowe oznaczanie analitów w zakresie objętym walidacją.

Opracowana procedura UHPLC z detekcją UV-VIS/DAD i CORONA CAD umożliwiła rozdzielenie 19 kannabinoidów oraz oznaczanie wybranych analitów w próbkach roślinnych i olejowych. Uzyskanie wiarygodnych wyników wymagało kontroli rozdzielenia par krytycznych, właściwego modelu kalibracyjnego oraz oceny przydatności układu chromatograficznego. Pełna ocena odporności metody wymaga jednak uzupełnienia kryteriów akceptacji i kompleksowej oceny wyników.

Słowa kluczowe: UHPLC, kannabinoidy, Cannabis sativa L., UV-VIS/DAD, CORONA CAD, walidacja metody, przydatność systemu chromatograficznego

Abstract in English

This doctoral dissertation concerns the development, optimization, validation, and assessment of the suitability of a UHPLC procedure for the analysis of cannabinoids in raw materials and cannabis-derived products. A single chromatographic separation procedure was used with two detection configurations: UV-VIS/DAD and CORONA CAD. The aim of the study was to achieve the separation of a panel of 19 cannabinoids and the quantitative determination of selected analytes in the plant and oil matrices investigated.

The analytical scope of the procedure included 19 cannabinoids: CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, CBCVA, CBNA, Δ^9-THC, CBL, Δ^9-THCA, CBC, CBCA, CBLA, and Δ^9-THCP. The panel included neutral cannabinoids, their acidic forms, and selected minor cannabinoids. The analytes were selected to enable the assessment of the cannabinoid profile rather than solely the determination of individual predominant components. Particular attention was given to the separation of compounds with similar chemical structures and retention properties.

Chromatographic separation was performed in reversed-phase mode using an Accucore C18 column measuring 150 × 3.0 mm and containing 2.6 µm particles. Mobile phase A consisted of water containing 0.1% (v/v) acetic acid, whereas mobile phase B consisted of acetonitrile. Isocratic elution was performed at a phase A ratio of 30:70 (v/v). The mobile-phase flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 20°C, the autosampler temperature was 25°C, and the injection volume was 5 µL. The total analysis time was 30 min. These conditions were selected taking into account chromatographic separation quality, detector response stability, analysis time, and the applicability of the procedure to real samples.

In the UV-VIS/DAD detection configuration, the signal used for quantitative determination and assessment of validation parameters was recorded at 278 nm. Three-dimensional DAD spectra were simultaneously acquired over the range of 190-400 nm at an acquisition rate of 5 Hz. The spectra were used as supporting information to compare the spectral profiles of the peaks with those obtained for the reference standard solutions and to assess chromatogram quality. Analyte identification was based primarily on agreement of the

retention times and elution order with those of the reference standard mixture, supplemented by an assessment of DAD spectral agreement.

In the CORONA CAD detection configuration, the evaporation temperature was 35°C, the acquisition rate was 2 Hz, the Filter setting was 5, and the Power Function value was 1.00. Due to the aerosol-based detection mechanism, the stability of the nebulization process, the reproducibility of aerosol formation, and the use of volatile mobile-phase components were of particular importance. Because of the nonlinear response characteristics of the CAD detector, the calibration data were described using quadratic regression with either $1/x$ or $1/x^2$ weighting, selected individually for each analyte.

Sample preparation involved the extraction of approximately 70 mg of plant material or an oil sample with 10 mL of methanol for 15 min in an ultrasonic bath. The samples were then centrifuged, filtered through a regenerated cellulose membrane filter with a pore size of 0.45 µm, and diluted 1:10 with methanol. The procedure was applied to two types of matrices: dried cannabis material or cannabis inflorescences and oil products.

The validation studies included assessments of selectivity, chromatographic system suitability, the calibration model, working range, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantification, and the effects of small variations in chromatographic conditions. Linear calibration models were used for UV-VIS/DAD detection based on the signal recorded at 278 nm. Quadratic models with either $1/x$ or $1/x^2$ weighting were used for CORONA CAD detection. The working range was established individually for each analyte, from its limit of quantification to either 200 or 250 µg/mL. The LOD values ranged from 1 to 5 µg/mL, whereas the LOQ values ranged from 1 to 10 µg/mL, depending on the analyte.

As part of the chromatographic system suitability assessment, the repeatability of retention times and peak areas, the number of theoretical plates, chromatographic resolution, and the signal-to-noise ratio were evaluated. The number of theoretical plates for all analytes exceeded the adopted minimum criterion of $N \geq 2000$. The CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC, and CBCA/CBLA pairs required particular attention. For these pairs, resolution values below $Rs = 1.5$ were obtained. In some of the studies, values below $Rs = 0.9$ or results reported as n.a. were also observed. These chromatographic regions therefore require continuous monitoring of retention times, resolution, and peak integration.

Precision and accuracy studies were conducted at the established concentration levels and under the defined analytical conditions.

As part of the robustness study, results obtained after changes in the mobile-phase flow rate and column temperature were compared. Tables 149-171 present the resulting changes in retention times, determined concentrations, and chromatographic separation parameters.

The developed procedure was applied to the analysis of real samples, including oil products, dried cannabis material, and plant material. CBD was the primary analyte quantitatively determined in the oil samples. CBD and CBDA were quantitatively determined in the dried cannabis and plant material samples. Some signals assigned to selected minor cannabinoids were below the limit of quantification. Application of the procedure to real samples demonstrated the separation of the 19-cannabinoid panel and the quantitative determination of analytes included within the confirmed scope of the method.

The developed UHPLC procedure with UV-VIS/DAD and CORONA CAD detection enabled the separation of the investigated cannabinoid panel and the determination of selected analytes in plant and oil samples. Stable chromatographic conditions, control of the separation of critical pairs, appropriate selection of the calibration model, and chromatographic system suitability assessment before each analytical sequence were essential for obtaining reliable results. Full confirmation of the robustness of the procedure requires the completion of the acceptance criteria, a detailed description of the study design, and the final assessment of all results obtained.

Wykaz skrótów i symboli

Tabela 1. Wykaz skrótów i symboli chromatograficznych zastosowanych w pracy.

Skrót	Rozwinięcie skrótu	Znaczenie w pracy
UHPLC	ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa	technika rozdzielania zastosowana do oznaczania kannabinoidów
UV-VIS/DAD	detekcja UV-VIS z detektorem z matrycą diodową	detekcja ilościowa przy 278 nm i widma 3D DAD 190-400 nm
CAD	detektor aerozolowy ładunkowy	CORONA CAD, detektor bez informacji widmowej i masowej
tR	czas retencji	czas elucji analitu z kolumny [min]
SD	odchylenie standardowe	miara rozrzutu wyników
RSD	względne odchylenie standardowe	SD odniesione do średniej, wyrażone w [%]
Rs	rozdzielczość chromatograficzna	miara rozdzielenia dwóch sąsiadujących pików
N	liczba półek teoretycznych	miara sprawności układu chromatograficznego
S/N	stosunek sygnału do szumu	parametr pomocniczy jakości sygnału, wykorzystany przy LOD/LOQ
LOD	granica wykrywalności	najniższy poziom sygnału wykrywalny według kryterium S/N
LOQ	granica oznaczalności	najniższy poziom wiarygodnego oznaczania ilościowego
SST	przydatność systemu chromatograficznego	kontrola pracy układu przed sekwencją analityczną
n.d.	nie wykryto	brak sygnału powyżej LOD
n.a.	nie dotyczy / nie wyznaczono	nie dotyczy / nie wyznaczono
<LOQ	poniżej granicy oznaczalności	sygnał wykryty poniżej zakresu wiarygodnej kwantyfikacji

Tabela 2. Nazwy zwyczajowe, skróty oraz nazwy systematyczne IUPAC kannabinoidów objętych zakresem badań.

Lp.	Skrót	Nazwa zwyczajowa	Nazwa systematyczna IUPAC
1	CBGO	kannabigerorcyna	2-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl]-5-methylbenzene-1,3-diol
2	CBDVA	kwas kannabidiwarynowy	2,4-dihydroxy-3-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-6-propylbenzoic acid
3	CBND	kannabinodiol	2-(5-methyl-2-prop-1-en-2-ylphenyl)-5-pentylbenzene-1,3-diol
4	CBDV	kannabidiwaryna	2-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-5-propylbenzene-1,3-diol
5	CBDA	kwas kannabidiolowy	2,4-dihydroxy-3-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-6-pentylbenzoic acid
6	CBGA	kwas kannabigerolowy	3-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl]-2,4-dihydroxy-6-pentylbenzoic acid
7	CBG	kannabigerol	2-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienyl]-5-pentylbenzene-1,3-diol
8	CBD	kannabidiol	2-[(1R,6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol
9	THCV	Δ^9-tetrahydrokannabiwaryna	(6aR,10aR)-6,6,9-trimethyl-3-propyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-1-ol
10	CBN	kannabinol	6,6,9-trimethyl-3-pentylbenzo[c]chromen-1-ol
11	CBCVA	kwas kannabichromowarynowy	5-hydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-7-propylchromene-6-carboxylic acid
12	CBNA	kwas kannabinolowy	1-hydroxy-6,6,9-trimethyl-3-pentylbenzo[c]chromene-2-carboxylic acid
13	Δ^9-THC	Δ^9-tetrahydrokannabinol	(6aR,10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-1-ol
14	CBL	kannabicyklol	(1R,9R,12S,14R)-9,13,13-trimethyl-5-pentyl-8-oxatetracyclo[7.4.1.$0^{2,7}$.$0^{12,14}$]tetradeca-2,4,6-trien-3-ol
15	Δ^9-THCA	kwas Δ^9-tetrahydrokannabinolowy	(6aR,10aR)-1-hydroxy-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromene-2-carboxylic acid
16	CBC	kannabichromen	2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-7-pentylchromen-5-ol
17	CBCA	kwas kannabichromenowy	5-hydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-7-pentylchromene-6-carboxylic acid
18	CBLA	kwas kannabicyklolowy	(1R,9R,12S,14R)-3-hydroxy-9,13,13-trimethyl-5-pentyl-8-oxatetracyclo[7.4.1.$0^{2,7}$.$0^{12,14}$]tetradeca-2(7),3,5-triene-4-carboxylic acid
19	Δ^9-THCP	Δ^9-tetrahydrokannabiforol	(6aR,10aR)-3-heptyl-6,6,9-trimethyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-1-ol

1. Wprowadzenie i uzasadnienie pracy

1.1. Znaczenie oznaczania kannabinoidów

Kannabinoidy, będące związkami pochodzenia roślinnego, odgrywają istotną rolę w farmakologii. Spośród ponad 150 zidentyfikowanych kannabinoidów szczególną rolę odgrywają kannabidiol (CBD) oraz Δ^9-tetrahydrokannabinol (THC) [1]. Δ^9-THC stanowi główny psychoaktywny składnik *Cannabis sativa* L., którego obecność w odpowiednim stężeniu w produktach konopnych może prowadzić do wystąpienia efektu odurzenia. CBD wykazuje działanie przeciwzapalne, przeciwdrgawkowe, anksjolityczne i neuroprotekcyjne, nie wywołuje efektu psychoaktywnego [3]. W ciągu ostatnich dwóch dekad odnotowano znaczący wzrost zainteresowania medycznym i pozamedycznym zastosowaniem konopi, co stanowi istotny czynnik napędzający globalny rozwój rynku produktów konopnych [2].

Liberalizacja przepisów w tym legalizacja medycznej marihuany w ponad 50 państwach, zmienia rynek. Rosnąca liczba suplementów diety i żywności z CBD zwiększa zapotrzebowanie na rzetelne metody analityczne umożliwiające kontrolę jakości i bezpieczeństwa tych produktów [4]. W Stanach Zjednoczonych i Europie obserwuje się dynamiczny wzrost liczby preparatów zawierających ekstrakty konopi, takich jak: olejki, kapsułki, produkty dermatologiczne oraz leki na receptę, takie jak Epidiolex® stosowany w leczeniu lekoopornej padaczki u dzieci [5]. Tak dynamiczny rozwój rynku stanowi istotne zagrożenie dla konsumentów, związane z ograniczoną standaryzacją składu oraz możliwe rozbieżności między deklarowaną a rzeczywistą zawartością substancji aktywnych [6].

Wiarygodne metody analityczne są potrzebne do oceny zawartości Δ9-THC i CBD w produktach konopnych. W Unii Europejskiej wartość 0,3% Δ9-THC stanowi istotne kryterium w odniesieniu do konopi włóknistych, natomiast wymagania dotyczące produktów końcowych są zależne od ich kategorii [2]. Problem stanowią także różnice między deklarowaną i oznaczoną zawartością CBD [7] oraz brak jednolitych procedur analitycznych, co z kolei utrudnia porównywanie wyników uzyskiwanych w różnych laboratoriach [8].

Zatem konieczne jest opracowywanie dokładnych, czułych i powtarzalnych metod oznaczania kannabinoidów, dostosowanych do potrzeb laboratoriów, przemysłu i organów nadzoru. W zależności od przeznaczenia metody jej walidację prowadzi się zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady Harmonizacji (ICH) Q2(R2), wymaganiami

farmakopealnymi lub procedurami wewnętrznymi laboratorium. [7,8]. Niniejsza rozprawa doktorska prezentuje nowe podejście analityczne oparte na technice UHPLC z detekcją UV-VIS oraz detekcją CAD (*Charged Aerosol Detection*, CORONA CAD).

1.2. Surowce i produkty konopne jako złożone matryce

Roślina *Cannabis sativa* L. jest jedną z najstarszych i najbardziej wszechstronnie wykorzystywanych roślin użytkowych na świecie [11]. Jej bogactwo fitochemiczne wynika z obecności kilku grup związków biologicznie czynnych: fitokannabinoidów (ponad 150 zidentyfikowanych związków), terpenów (ponad 150 związków), flawonoidów, steroli roślinnych, alkaloidów oraz kwasów tłuszczowych [9]. Skład chemiczny rośliny jest silnie zróżnicowany w zależności od odmiany (chemotypu), części rośliny, warunków uprawy, terminu zbioru oraz zastosowanej metody suszenia i przechowywania. Z punktu widzenia analityki tak znaczna zmienność składu stanowi istotne wyzwanie dla laboratoriów kontrolnych i naukowych [10].

Surowce konopne analizowane chemicznie obejmują kilka podstawowych kategorii. Największą zawartością kannabinoidów charakteryzują się żeńskie kwiatostany w których związki te gromadzą się głównie w trychomach gruczołowych [9]. Nasiona konopi stosowane jako żywność i składnik pasz dla zwierząt, zawierają przede wszystkim kwasy tłuszczowe, białka i związki mineralne. Mogą również zawierać śladowe ilości kannabinoidów wskutek kontaktu z trychomami [12]. Z kolei liście, łodygi i korzenie zawierają mniej fitokannabinoidów, jednak pozostają istotnymi matrycami w analizach fitochemicznych i toksykologicznych.

Wśród produktów konopnych szczególne znaczenie z punktu widzenia analityki mają olejki CBD (stosowane doustnie lub w inhalacji), produkty spożywcze (herbaty, żelki, suplementy diety w kapsułkach), kosmetyki (kremy, balsamy, szampony zawierające CBD), preparaty farmaceutyczne oraz skoncentrowane ekstrakty roślinne. Do ekstraktów tych zalicza się m.in. oleje full-spectrum (zawierające pełne spektrum kannabinoidów), broad-spectrum (zawierające szerokie spektrum kannabinoidów, przy braku Δ^9 -THC) oraz izolaty CBD (zawierające wyłącznie CBD) [13,14]. Każdy z tych produktów stanowi odrębną matrycę analityczną, różniącą się składem chemicznym, właściwościami fizykochemicznymi oraz potencjalnymi interferencjami w analizie.

Protokoły ekstrakcji stosowane w przemyśle konopnym tj. ekstrakcja nadkrytycznym CO_2, ekstrakcja etanolem, ekstrakcja węglowodorami (butanem, propanem), tłoczenie na zimno czy ekstrakcja olejami roślinnymi w istotny sposób wpływają na profil fitokannabinoidów w finalnym produkcie [13]. Zróżnicowanie procesu produkcji powoduje, że produkty wywodzące się z tej samej odmiany konopi mogą znacząco różnić się składem ilościowym i jakościowym. Dodatkowo kannabinoidy w formach kwasowych (np. CBDA, Δ^9-THCA) mogą podczas ekstrakcji, a także w trakcie przechowywania ulegać dekarboksylacji do odpowiadających im form neutralnych (CBD, Δ^9-THC). Zjawisko to może wpływać na oznaczane stężenia poszczególnych kannabinoidów i tym samym utrudniać właściwą interpretację uzyskanych wyników [15].

W związku z powyższym oznaczanie kannabinoidów w surowcach i produktach konopnych wymaga metod o szerokim zakresie dynamicznym, umożliwiających jednoczesną identyfikację oraz ilościowe oznaczanie zarówno form kwasowych, jak i neutralnych, a także metabolitów oraz produktów konwersji. Metody te muszą być dostosowane do specyfiki poszczególnych matryc, tj. uwzględniać obecność olejów roślinnych, wosków, barwników roślinnych, cukrów oraz innych substancji interferujących [12,15].

1.3. Problemy analityczne

Oznaczanie kannabinoidów w złożonych matrycach biologicznych, roślinnych, żywnościowych i kosmetycznych stanowi poważne wyzwanie analityczne, wymagające precyzyjnego podejścia metodologicznego [16]. Matryce te zawierają setki związków, które zaburzają pomiar chromatograficzny poprzez wywoływanie efektów matrycowych, zmianę retencji analitów oraz supresję lub wzmocnienie sygnału detektora [17]. Szczególnym wyzwaniem są matryce tłuszczowe w których obecność triacylogliceroli i kwasów tłuszczowych może utrudniać chromatograficzne oznaczanie kannabinoidów [18].

Efekt matrycowy w chromatografii cieczowej (HPLC/UHPLC) polega na zmianie sygnału analitu wywołanej obecnością składników matrycy, które mogą współeluować z analitem lub wpływać na proces jonizacji i detekcji. W matrycach żywnościowych istotną rolę odgrywają m.in. cukry, maltodekstryny, skrobia, emulgatory i konserwanty [19]. Z kolei w kosmetykach - wosk pszczeli, gliceryna, alkohole tłuszczowe oraz surfaktanty. Obecność tych związków

prowadzi do powstawania złożonych oddziaływań fizykochemicznych, które utrudniają skuteczne wydzielenie kannabinoidów na etapie przygotowania próbki oraz mogą negatywnie wpływać na ich oznaczanie chromatograficzne [18].

Kluczowym wyzwaniem jest rozróżnienie kannabinoidów o bardzo podobnej budowie strukturalnej, takich jak: CBD, CBDA, Δ^9-THC, Δ^9-THCA, CBN, CBC, CBG oraz ich metabolitów. Związki te różnią się często jedynie konfiguracją przestrzenną lub stopniem nasycenia pierścienia terpenowego. Te niewielkie różnice skutkują zbliżonymi czasami retencji w chromatografii [20]. W konsekwencji skuteczne rozdzielenie par związków, takich jak CBD/CBDV oraz Δ9-THCA/CBDA wymaga zastosowania wysokosprawnych kolumn chromatograficznych, np. C18 z cząstkami o średnicy 2 µm lub kolumn typu core-shell, oraz odpowiednio zoptymalizowanych warunków elucji gradientowej [21].

Ekstrakcja stanowi kluczowy etap przygotowania próbki. Wybór rozpuszczalnika, techniki ekstrakcji, takiej jak ekstrakcja ciecz–ciecz, ekstrakcja do fazy stałej lub przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikiem oraz warunków homogenizacji i działania ultradźwięków wpływa na wydajność odzysku analitów i selektywność oczyszczania [16]. Ekstrakcja zbyt agresywna powoduje dekarboksylację Δ^9-THCA i CBDA do Δ^9-THC i CBD natomiast zbyt łagodne warunki ograniczają wydajność ekstrakcji [19]. Rosnące zainteresowanie mniej popularnymi kannabinoidami (CBG, CBN, CBC, CBDV, THCV, CBGV, Δ^9 -THCP i inne) wymaga metod umożliwiających ich rozdzielenie i oznaczenie w obecności dominujących składników, przede wszystkim CBD i Δ^9-THC. Stanowi to istotne wyzwanie w analizie chromatograficznej.

Poważnym ograniczeniem chromatografii gazowej (GC) jednej z pierwszych technik stosowanych do analizy kannabinoidów, jest termiczna dekarboksylacja Δ^9-THCA do Δ^9-THC zachodząca podczas wprowadzania próbki do dozownika w wysokiej temperaturze (>200°C) [20]. Zjawisko to prowadzi do zawyżania stężenia Δ^9-THC i uniemożliwia prawidłową ocenę zawartości form kwasowych. Zastosowanie chromatografii cieczowej (HPLC/UHPLC) eliminuje ten problem. Metoda ta umożliwia jednoczesne oznaczanie form kwasowych i neutralnych w jednej analizie. Brak oficjalnych metod referencyjnych dla wszystkich typów matryc utrudnia porównanie wyników między laboratoriami. Z tego względu opracowane metody analityczne wymagają walidacji zgodnie z wytycznymi ICH Q2(R2) [16,21].

1.4. Uzasadnienie zastosowania UHPLC z detektorami UV-VIS i CORONA CAD

Technika ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC, *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*) stanowi istotny postęp w porównaniu z klasyczną HPLC. Wynika to z zastosowania kolumn wypełnionych cząstkami o średnicy ok. 2 µm lub materiałami typu core-shell, charakteryzującymi się rdzeniem pokrytym porowatą powłoką. Skrócenie drogi dyfuzji oraz zwiększenie ciśnienia roboczego (do ok. 1500 barów) umożliwiają skrócenie czasu analizy bez pogorszenia rozdzielczości chromatograficznej [29]. Technika UHPLC pozwala skrócić czas analizy kannabinoidów w porównaniu z klasyczną HPLC, przy zachowaniu wymaganej jakości rozdzielenia chromatograficznego zwiększając tym samym przepustowość laboratoriów kontrolnych [28]. Dodatkowo zużycie rozpuszczalników organicznych (acetonitrylu, metanolu) ulega istotnemu obniżeniu, co z kolei ma znaczenie zarówno ekonomiczne, jak i środowiskowe [20].

Detekcja UV-VIS (DAD - *Diode Array Detector*, detektor z matrycą diodową) jest najczęściej stosowaną techniką w analizie kannabinoidów metodami HPLC (wysokosprawna chromatografia cieczowa) lub UHPLC (ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa). Kannabinoidy zawierają w swojej strukturze grupy chromoforowe, czyli fragmenty cząsteczki pochłaniające światło, m.in. sprzężone pierścienie aromatyczne oraz wiązania dienowe. Dzięki temu wykazują absorpcję światła w zakresie 220-280 nm [29]. Detektor DAD umożliwia jednoczesną rejestrację sygnału w szerokim zakresie długości fal, weryfikację czystości piku poprzez porównanie widm UV oraz wstępną identyfikację analitów na podstawie profilu widmowego [30]. Ograniczeniem detekcji UV-VIS jest zależność sygnału od struktury chromoforowej związku. Kannabinoidy o słabej absorpcji promieniowania UV oraz składniki matrycy, takie jak niektóre oleje i dodatki, mogą nie być wykrywane tą techniką.

Detektor *Corona Charged Aerosol Detector* (CAD) stanowi nowoczesne rozwiązanie w zakresie detekcji aerozolowej stosowanej w chromatografii cieczowej. Zasada działania CAD opiera się na nadaniu ładunku elektrostatycznego cząstkom aerozolu, które powstają po odparowaniu fazy ruchomej (cieczy przenoszącej próbkę), przez strumień jonów koronowych (naładowanych cząstek generowanych w polu elektrycznym). Generowany sygnał jest proporcjonalny do masy analitu obecnego w cząstkach aerozolu, a nie do jego struktury chemicznej. Dzięki temu CAD jest detektorem aerozolowym przydatnym do oznaczania wielu nielotnych i słabo lotnych analitów w tym związków niewykazujących istotnej absorpcji

w zakresie UV-VIS. Jego odpowiedź ma charakter zbliżony do masowego, ale nie jest całkowicie niezależna od właściwości fizykochemicznych analitu i warunków chromatograficznych [23]. Zastosowanie funkcji potęgowej (*power function*) pozwala na linearyzację odpowiedzi detektora w szerokim zakresie stężeń [28].

Łączenie detekcji UV-VIS i CAD w szeregowym układzie jednego systemu UHPLC zapewnia komplementarne informacje analityczne. Detektor UV-VIS/DAD wspomaga identyfikację związków wykazujących absorpcję w zakresie UV-VIS przez porównanie czasu retencji oraz widma absorpcyjnego z odpowiednimi roztworami wzorcowymi. CAD umożliwia wykrywanie związków bez chromoforów m.in. kwasów tłuszczowych, wosków, steroli czy niektórych zanieczyszczeń z podobną czułością niezależnie od struktury chemicznej [24]. W badaniach formulacji lipidowych przeznaczonych do dostarczania kannabidiolu zastosowano HPLC z detekcją CAD do oznaczania fosfatydylocholiny i triglicerydów średniołańcuchowych, natomiast zawartość kannabidiolu oznaczano odrębnie metodą spektrofotometrii UV [25], lipidach liposomalnych [26] oraz substancjach słodzących w napojach alkoholowych [27].

W niniejszej rozprawie doktorskiej połączenie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-VIS i CAD umożliwia kompleksową analizę fitokannabinoidów w surowcach i produktach konopnych w jednym przebiegu chromatograficznym. Zastosowanie obu detektorów pozwala na wzajemną weryfikację wyników oraz oznaczanie szerszej grupy analitów, bez konieczności stosowania detekcji masowej i dodatkowej derywatyzacji [23, 28].

1.5. Zakres pracy na tle aktualnych potrzeb chemii analitycznej

Pomimo dynamicznego rozwoju metod oznaczania kannabinoidów w literaturze nadal występują ograniczenia dotyczące dostępności zwalidowanych metod UHPLC obejmujących różne grupy analitów i matryce. Brakuje jednoczesnego zastosowania detekcji UV-VIS i CAD dedykowanych matrycom konopnym. Większość opublikowanych procedur analitycznych opiera się na detekcji masowej (LC-MS/MS, UHPLC-HRMS). Techniki te zapewniają wysoką selektywność i czułość, jednak ich zastosowanie ograniczają wysokie koszty i ograniczona dostępność w laboratoriach kontroli jakości [34]. Metody z detekcją UV (RP-HPLC-UV) pozwalają na oznaczanie wyłącznie kannabinoidów zawierających chromofory, przez co nie umożliwiają pełnego profilowania produktów konopnych [6].

Obecne uwarunkowania legislacyjne w Unii Europejskiej zwiększają znaczenie opracowywania nowych metod analitycznych. Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. ustanawia maksymalne poziomy Δ^9-THC w żywności wynoszące 3,0 mg/kg w suchych nasionach konopi oraz 7,5 mg/kg w oleju z nasion konopi. Zmieniające się wymagania prawne zwiększają potrzebę stosowania dokładnych i czułych metod oznaczania tego związku na poziomie śladowym [31,59]. Rosnące zainteresowanie produktami CBD i olejami konopnymi może wpływać na wyniki testów narkotykowych u konsumentów, co dodatkowo podkreśla znaczenie wiarygodnych metod kontroli jakości [32].

Metodom UHPLC z detekcją CAD poświęcono dotychczas niewiele badań dotyczących matryc konopnych. Profilowanie fitokannabinoidów może być wykorzystane do oceny autentyczności i pochodzenia konopi [32], jednak wymaga dalszej walidacji pod kątem zastosowań regulacyjnych. Istniejące metody HPLC-PDA są użyteczne, lecz często charakteryzują się niewystarczającą rozdzielczością do jednoczesnego oznaczania form kwasowych i neutralnych w jednym cyklu analitycznym [7]. Brak oficjalnych metod referencyjnych dla wielu typów matryc konopnych wskazuje na konieczność opracowania i walidacji nowych podejść spełniających kryteria ICH Q2(R2) [7,34].

Celem pracy doktorskiej było opracowanie, optymalizacja i walidacja metod UHPLC z detekcją UV-VIS i CAD do oznaczania kannabinoidów w surowcach roślinnych i produktach konopnych. Walidację przeprowadzono zgodnie z wytycznymi ICH Q2(R2), uwzględniając zamierzone zastosowanie metod. Opracowane rozwiązanie stanowi narzędzie do wiarygodnej i efektywnej kosztowo analizy kannabinoidów w laboratoriach kontroli jakości.

2. Kannabinoidy - główne metabolity wtórne rośliny

Kannabinoidy stanowią unikalną klasę metabolitów wtórnych, produkowanych niemal wyłącznie przez rośliny z gatunku *Cannabis sativa* L. Do chwili obecnej zidentyfikowano i opisano ponad 150 różnych fitokannabinoidów, różniących się strukturą chemiczną, stopniem utlenienia oraz aktywnością biologiczną [35,36]. Kannabinoidy dzieli się na trzy główne kategorie: fitokannabinoidy, czyli związki pochodzenia roślinnego syntetyzowane przez *Cannabis sativa*, endokannabinoidy, będące endogennymi ligandami receptorów kannabinoidowych wytwarzanymi przez organizmy ssaków oraz kannabinoidy syntetyczne, otrzymywane w warunkach laboratoryjnych i niewystępujące naturalnie [37]. Z perspektywy analitycznej szczególne znaczenie mają fitokannabinoidy w formach kwasowych i neutralnych, które stanowią główne składniki chemiczne surowców i produktów konopnych podlegających kontroli jakości i regulacjom prawnym.

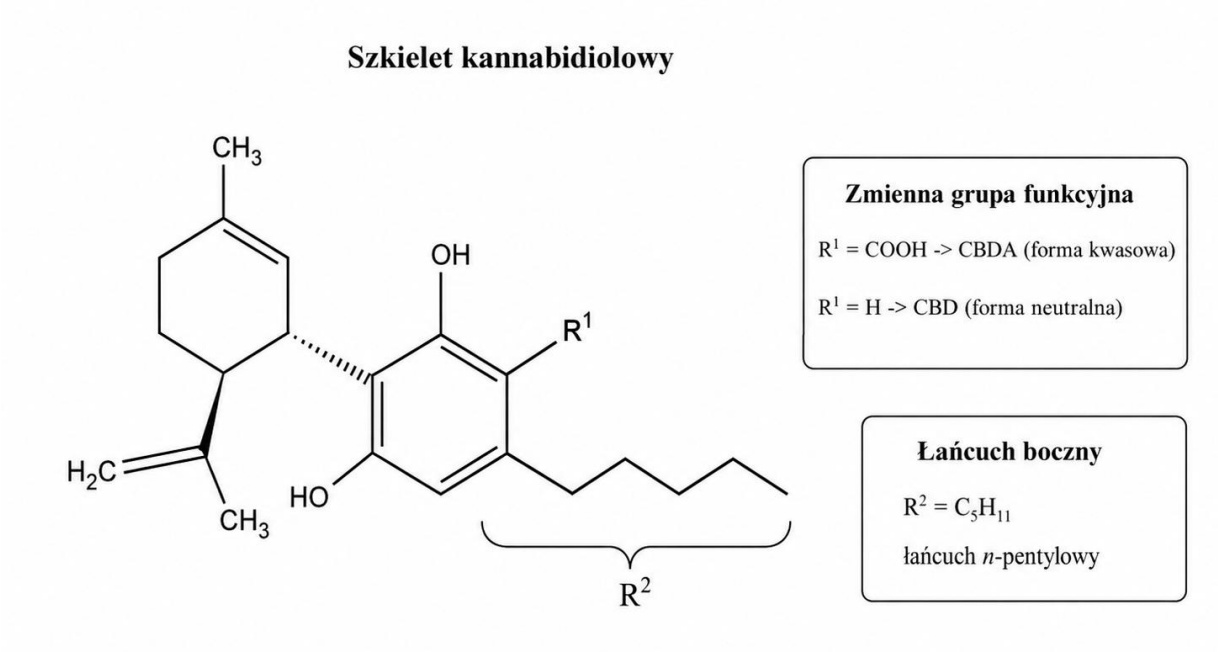
2.1. Klasyfikacja i budowa chemiczna kannabinoidów

Kannabinoidy definiuje się w chemii jako terpenofenole o szkielecie węglowym C21 (*terpenophenolic compounds*), powstające w wyniku kondensacji jednostki fenolowej pochodzenia poliketydowego z jednostką terpenową pochodzenia izoprenoidowego. Większość kannabinoidów zawiera charakterystyczny układ dibenzopiranowy, występujący m.in. w Δ^9-tetrahydrokannabinolu, lub otwarty układ rezorcynolowy, obecny w kannabidiolu i kannabigerolu [36,37] (Rys. 1). Duże zróżnicowanie strukturalne tej grupy związków wynika z procesów cyklizacji, izomeryzacji i utleniania wspólnego prekursora biosyntetycznego. Na tej podstawie Elsohly i Slade w pracy przeglądowej z 2005 r. wyróżnili jedenaście podklas fitokannabinoidów, uwzględniając budowę i sposób cyklizacji pierścienia terpenowego oraz stopień utlenienia podstawników. Do podklas tych należą: typ THC (Δ^9-tetrahydrokannabinolowy), typ CBD (kannabidiolowy), typ CBG (kannabigerolowy), typ CBN (kannabinolowy), typ CBC (kannabichromenowy), typ CBDV (kannabidiwarynowy), typ THCV (tetrahydrokannabiwarynowy), typ CBND (kannabinodiolowy), typ CBE (kannabielsoinowy), typ CBL (kannabicyklolowy) oraz typ CBT (kananbicytranowy) [36-38]. Klasyfikacja ta, mimo że powstała ponad piętnaście lat temu, wciąż stanowi fundament nomenklatury stosowanej w analityce chemicznej konopi i jest powszechnie wykorzystywana przy opisie nowo identyfikowanych związków z tej grupy [38].

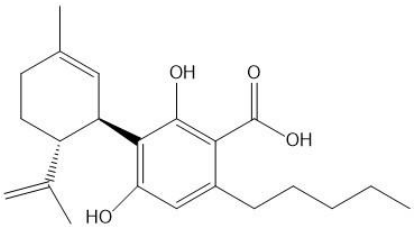
Wśród wszystkich zidentyfikowanych kannabinoidów wyróżnia się cztery związki określane w literaturze jako tzw. „*Big Four*", czyli cztery główne kannabinoidy o największym znaczeniu naukowym, analitycznym i regulacyjnym: Δ^9-tetrahydrokannabinol (Δ^9-THC), kannabidiol (CBD), kannabigerol (CBG) oraz kannabichromen (CBC) [37-39]. Δ^9-THC ma strukturę trójpierścieniową, obejmującą pierścień aromatyczny, piranowy i cykloheksenowy. Obecność asymetrycznych centrów stereogenicznych w pozycjach C6a i C10a decyduje o jego chiralności. Naturalnie występującą formą jest enancjomer (-)-trans- Δ^9-THC [37,38]. W przeciwieństwie do Δ^9-THC, CBD ma strukturę dwupierścieniową w której pierścień cykloheksenowy nie tworzy układu piranowego z pierścieniem aromatycznym. Oba pierścienie połączone są bezpośrednio, a cząsteczka zawiera łańcuch pentylowy oraz wolną grupę hydroksylową, co wpływa na jej właściwości chromatograficzne [37-39]. Kannabigerol (CBG) zajmuje szczególne miejsce w tej grupie, gdyż jego forma kwasowa (CBGA) jest wspólnym prekursorem biosyntetycznym dla większości pozostałych kannabinoidów, CBG występuje w formie otwartej, niescyklizowanej, z łańcuchem monoterpenowym (geranylowym) przyłączonym do pierścienia rezorcynolowego, bez dodatkowej cyklizacji charakterystycznej dla Δ^9-THC czy CBD [38-39]. Kannabichromen (CBC) powstaje w wyniku enzymatycznej cyklizacji tego samego prekursora, prowadzącej do utworzenia układu chromenowego (benzopiranowego), różniącego się geometrią przestrzenną od struktury Δ^9-THC [37,39].

Poza czterema głównymi kannabinoidami w roślinie *Cannabis sativa* identyfikuje się liczną grupę związków określanych jako kannabinoidy mniejszościowe (*minor cannabinoids*), występujących zazwyczaj w znacznie niższych koncentracjach niż związki główne, lecz wykazujących coraz większe znaczenie naukowe i terapeutyczne [38-40]. Kannabinol (CBN) należy do najwcześniej wyizolowanych kannabinoidów, jego strukturę częściowo scharakteryzowano już w latach 40 XX wieku. CBN powstaje w wyniku utleniania i aromatyzacji Δ^9-THC, zachodzących podczas starzenia materiału roślinnego oraz przechowywania produktów konopnych [39,40]. Do istotnych kannabinoidów mniejszościowych należą tetrahydrokannabiwaryna (THCV) i kannabidiwaryna (CBDV), będące homologami Δ^9 HC i CBD,w których łańcuch pentylowy zastąpiono krótszym łańcuchem propylowym. Do tej grupy zalicza się również kwasy: kannabigerolinowy (CBGA), kannabichromenowy (CBCA) oraz kannabinolowy (CBNA) [38,40]. Zainteresowanie kannabinoidami mniejszościowymi systematycznie wzrasta, co wynika z rozwoju czułych metod analitycznych zdolnych do ich

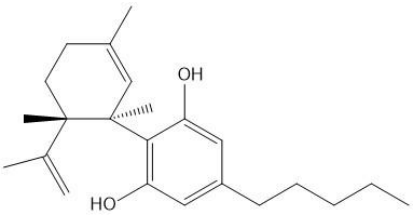
wykrywania i kwantyfikacji na poziomie śladowych koncentracji, a także z rosnącej liczby badań wskazujących na ich potencjalne właściwości farmakologiczne, odmienne od właściwości Δ^9-THC i CBD [40].



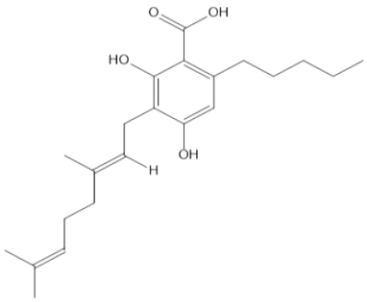
Rysunek 1**.** Struktura kannabidiolu (CBD) i kwasu kannabidiolowego (CBDA). R1 - grupa funkcyjna różnicująca obie formy, R2 - łańcuch n-pentylowy.



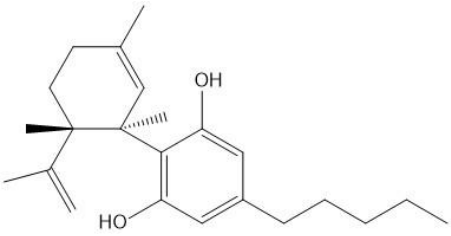
Rysunek 2. Kwas kannabidiolowy (CBDA)



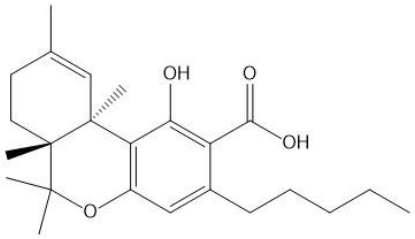
Rysunek 3. Kannabidiol (CBD)



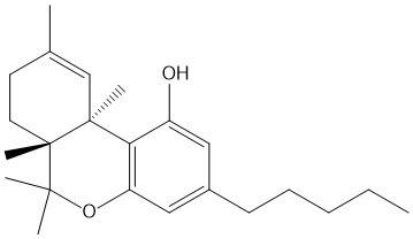
Rysunek 4. Kwas kannabigerolowy (CBGA)



Rysunek 5. Kannabigerol (CBG)



Rysunek 6. Kwas Δ^9-tetrahydrokannabinolowy (Δ^9-THCA)



Rysunek 7. Δ^9-Tetrahydrokannabinol (Δ^9-THC)

2.2. Biosynteza kannabinoidów w roślinie

Biosynteza kannabinoidów w roślinie *Cannabis sativa* przebiega w oparciu o dwa niezależne lecz komplementarne szlaki metaboliczne, których produkty łączone są w reakcji katalizowanej przez wyspecjalizowany enzym. Pierwszym z nich jest szlak poliketydowy, określany również jako szlak octanowo-malonylowy (*polyketide synthase pathway*, PKS). jego przebiegu z heksanoilo-CoA i trzech jednostek malonylo-CoA w reakcjach katalizowanych przez syntazę oliwetolową (OLS) i cyklazę oliwetolową (OAC), powstaje kwas oliwetolowy, aromatyczny prekursor stanowiący rdzeń rezorcynolowy kannabinoidów [41–43]. Drugim szlakiem jest szlak metyloerytrytolofosforanowy (*methylerythritol phosphate pathway*, MEP), zlokalizowany w plastydach. W jego przebiegu z pirogronianu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego powstaje geranylopirofosforan (GPP), będący dziesięciowęglowym prekursorem części terpenowej kannabinoidów [41-43]. Kluczowym etapem łączącym obydwa

szlaki jest reakcja katalizowana przez prenylotransferazę aromatyczną, określaną w literaturze jako CBGAS (*cannabigerolic acid synthase*) lub geranylodifosfataza syntaza (*geranyl diphosphate:olivetolate geranyltransferase*) w wyniku której kwas oliwetolowy ulega alkilacji geranylowej z wykorzystaniem GPP, prowadząc do powstania kwasu kannabigerolinowego (CBGA) [41-43]. Kwas kannabigerolinowy (CBGA) stanowi wspólny prekursor biosyntezy pozostałych kwasowych fitokannabinoidów. Reakcja katalizowana przez prenylotransferazę jest jednym z kluczowych etapów tego szlaku [41,42].

Dalsze przekształcenia CBGA do poszczególnych kannabinoidów kwasowych zależą od aktywności specyficznych enzymów oksydoredukcyjnych, określanych jako syntazy kannabinoidowe, których profil ekspresji w danej odmianie roślinnej determinuje tzw. chemotyp, czyli charakterystyczny skład kannabinoidowy [42-44]. Do głównych syntaz kannabinoidowych należą syntaza kwasu Δ9-tetrahydrokannabinolowego (THCAS), syntaza kwasu kannabidiolowego (CBDAS) oraz syntaza kwasu kannabichromenowego (CBCAS). THCAS katalizuje przekształcenie CBGA do Δ^9-THCA i dominuje w chemotypie I, charakterystycznym dla roślin o wysokiej zawartości Δ^9-THC. CBDAS odpowiada za konwersję CBGA do CBDA i jest charakterystyczna dla chemotypu III, występującego w przemysłowych odmianach konopi o niskiej zawartości Δ^9-THC. CBCAS katalizuje natomiast powstawanie CBCA z tego samego prekursora [42-44].

THCAS, CBDAS i CBCAS należą do rodziny enzymów zależnych od kofaktora FAD. Katalizują oksydacyjną cyklizację części terpenowej CBGA, której produktem ubocznym jest nadtlenek wodoru [42,43]. Enzymy te wykazują znaczne podobieństwo sekwencji aminokwasowej, co wskazuje na ich wspólne pochodzenie [43,44]. Biosynteza i akumulacja kannabinoidów zachodzi głównie w trychomach gruczołowych, występujących na powierzchni przylistków i listków okwiatowych żeńskich kwiatostanów [41,45]. Wyróżnia się trzy morfologiczne typy trychomów: trzonkowe, przysadziste oraz kolbowate, przy czym trychomy trzonkowe, charakteryzujące się największą główką wydzielniczą, wykazują najwyższą aktywność biosyntetyczną i stanowią główne miejsce produkcji i magazynowania kannabinoidów [41,45]. W przestrzeni pozakomórkowej główki trychomu, pod warstwą kutykuli, gromadzi się żywiczna wydzielina bogata w kannabinoidy i terpeny. W tym miejscu CBGA jest syntetyzowany i przekształcany do kwasowych form kannabinoidów przez

odpowiednie syntazy [41,45]. Kompartmentalizacja biosyntezy ogranicza kontakt potencjalnie fitotoksycznych metabolitów z pozostałymi strukturami komórkowymi.

Z punktu widzenia analityki istotne jest, że w świeżej nieprzetworzonej tkance roślinnej kannabinoidy występują głównie w formie kwasowej. W zależności od chemotypu Δ^9-THCA i CBDA stanowią ponad 95% całkowitej zawartości kannabinoidów. Neutralne formy Δ^9-THC i CBD występują jedynie w niewielkich ilościach. Powstają one w wyniku powolnej, naturalnej dekarboksylacji form kwasowych zachodzącej podczas wzrostu, zbioru i przechowywania roślin [10,11]. Biosynteza roślinna prowadzi do powstania form kwasowych, natomiast Δ^9-THC i CBD wyniku ich nieenzymatycznej dekarboksylacji. Proces ten może zachodzić pod wpływem temperatury, promieniowania UV lub podczas przechowywania. Zjawisko to ma istotne znaczenie w analizie produktów konopnych [44,45].

2.3. Formy kwasowe i neutralne - dekarboksylacja

Kwasowe formy kannabinoidów, takie jak Δ^9-THCA (THCA-A i THCA-B), CBDA, CBGA, CBCA i CBNA, stanowią naturalne formy tych związków obecne w świeżej tkance *Cannabis sativa* [46,47]. Charakterystycznym elementem strukturalnym wszystkich form kwasowych jest obecność wolnej grupy karboksylowej (-COOH) przyłączonej w pozycji C2 pierścienia rezorcynolowego, sąsiadującej przestrzennie z grupą hydroksylową w pozycji C1 [46]. Ta bliskość przestrzenna obu grup funkcyjnych ma kluczowe znaczenie dla mechanizmu późniejszej dekarboksylacji. Z farmakologicznego punktu widzenia istotne jest, że Δ^9-THCA nie wykazuje istotnej aktywności psychoaktywnej, w przeciwieństwie do Δ^9-THC. Obecność grupy karboksylowej ogranicza wiązanie Δ^9-THCA z receptorem CB1 [46,47]. Z analitycznego punktu widzenia oznaczanie wyłącznie Δ^9-THC, bez uwzględnienia Δ^9-THCA, może prowadzić do zaniżenia całkowitej zawartości potencjalnie psychoaktywnego Δ^9-THC po dekarboksylacji.

Mechanizm dekarboksylacji kannabinoidowych form kwasowych ma charakter nieenzymatyczny. Przebiega zgodnie z mechanizmem dekarboksylacji β-ketonowej (*beta-keto decarboxylation*). Grupa karboksylowa, znajdująca się w położeniu β względem grupy hydroksylowej fenolowej, ulega odszczepieniu z jednoczesnym uwolnieniem CO_2. Proces ten prowadzi do aromatyzacji układu i odtworzenia struktury fenolowej charakterystycznej dla formy neutralnej. Przykładowo, Δ^9-THCA przekształca się w Δ^9-THC z wydzieleniem CO_2 [47,48]. Dekarboksylacja zależy od temperatury i czasu. Jej kinetykę można opisać parametrem

DT50, oznaczającym czas potrzebny do przekształcenia 50% początkowej ilości substratu. Dla Δ^9-THCA wartość DT50 wynosi około 40 min w 120°C, natomiast dla CBDA optymalny czas procesu to około 30 min w 140°C [47-49]. Znajomość kinetyki dekarboksylacji ma znaczenie w procesach technologicznych oraz w ocenie zawartości kannabinoidów na potrzeby regulacyjne [50,59].

Z perspektywy analitycznej kluczowe znaczenie ma dobór metody chromatograficznej zdolnej do jednoczesnego rozdzielenia i oznaczenia form kwasowych oraz neutralnych bez wywoływania niekontrolowanej dekarboksylacji podczas samej analizy [51,52]. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) charakteryzuje się wysoką selektywnością i czułością. Wymaga jednak zastosowania wysokiej temperatury podczas wstrzyku i separacji, co może prowadzić do dekarboksylacji in-source. Jest to artefakt analityczny polegający na termicznej konwersji form kwasowych do neutralnych podczas analizy. W konsekwencji może dochodzić do niedoszacowania zawartości Δ^9-THCA i CBDA oraz zawyżenia wyników dla Δ9-THC i CBD. Problem ten można ograniczyć poprzez wcześniejszą derywatyzację chemiczną próbki [9,51]. Z tego względu metodą analityczną z wyboru dla jednoczesnego, wiarygodnego oznaczania obu grup związków kwasowych i neutralnych jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz jej odmiana o podwyższonej wydajności rozdzielczej, ultrasprawna chromatografia cieczowa (UHPLC), która ze względu na łagodne warunki temperaturowe procesu separacji (temperatura kolumny rzędu 20-40°C) pozwala na zachowanie natywnych form kwasowych bez ryzyka artefaktowej dekarboksylacji [9,51].

Poza dekarboksylacją, kannabinoidy mogą podlegać także innym reakcjom degradacji i interkonwersji, istotnym z punktu widzenia stabilności produktów oraz prawidłowej interpretacji wyników analitycznych. W warunkach silnie kwaśnych CBD może ulegać cyklizacji wewnątrzmolekularnej, prowadzącej do zamknięcia pierścienia piranowego i powstania Δ^9-THC oraz izomerycznego Δ8-THC, co jest reakcją niekorzystną z punktu widzenia jakości i bezpieczeństwa produktów zawierających CBD, ponieważ prowadzi do niekontrolowanego wzrostu zawartości związków psychoaktywnych [52]. Z kolei Δ^9 -THC w podwyższonej temperaturze w obecności światła i tlenu ulega nieodwracalnej degradacji oksydacyjnej do kannabinolu (CBN). Związek ten może być stosowany jako wskaźnik starzenia się (*aging marker*) materiału roślinnego lub produktu [53]. Obecność CBN może wskazywać na nieprawidłowe warunki przechowywania lub długotrwałe przechowywanie produktu. Z kolei

obecność nietypowych izomerów THC może świadczyć o niekontrolowanych przemianach chemicznych. Ich wykrycie i rozróżnienie od zamierzonego składu produktu stanowi jedno z zadań właściwie opracowanej metody UHPLC [52,53].

2.4. Właściwości fizykochemiczne kannabinoidów

Kannabinoidy jako grupa związków chemicznych charakteryzują się wysoką lipofilnością, co znajduje odzwierciedlenie w wysokich wartościach współczynnika podziału oktanol-woda (logP): dla Δ^9-THC wartość logP szacuje się na poziomie około 7,3, dla CBD na poziomie około 6,3, natomiast dla CBN na poziomie około 7,0 [54,55]. Tak wysokie wartości logP oznaczają, że związki te są silnie lipofilne i wykazują bardzo ograniczoną rozpuszczalność w środowisku wodnym. Rozpuszczalność CBD w wodzie szacowana jest na poniżej 10 µg/ml, co czyni go praktycznie nierozpuszczalnym w tym rozpuszczalniku w warunkach standardowych [54,55]. Kannabinoidy rozpuszczają się natomiast bardzo dobrze w rozpuszczalnikach niepolarnych w tym w olejach roślinnych (np. oleju z pestek winogron, oleju konopnym), etanolu, metanolu oraz acetonitrylu, co ma bezpośrednie implikacje analityczne przy projektowaniu procedur ekstrakcyjnych oraz przy doborze fazy ruchomej w metodach chromatografii cieczowej. Z uwagi na lipofilowy charakter analitów, ekstrakcja próbek konopnych prowadzona jest zazwyczaj z użyciem etanolu lub mieszanin metanol/chloroform, a separacja chromatograficzna wymaga wysokiego udziału fazy organicznej [54,55].

Kannabinoidy charakteryzują się ograniczoną stabilnością chemiczną i są podatne na działanie promieniowania UV, tlenu oraz podwyższonej temperatury [56,57]. CBD ulega szybszej degradacji w roztworach olejowych niż w postaci suchej, co wiąże się m.in. z obecnością tlenu rozpuszczonego w oleju [56]. Δ^9-THC jest natomiast podatny na utlenianie do kannabinolu (CBN) [56,57]. Z tego względu próbki i materiały referencyjne należy przechowywać w ciemności, w temperaturze poniżej 4°C oraz w szklanych pojemnikach. Zastosowanie szkła ogranicza sorpcję lipofilowych kannabinoidów na powierzchniach tworzyw sztucznych, która może prowadzić do zaniżenia oznaczanych stężeń [56,57].

Z punktu widzenia detekcji spektroskopowej, kluczową właściwością fizykochemiczną kannabinoidów jest obecność w ich strukturze aromatycznego układu rezorcynolowego, sprzężonego z dodatkowymi podstawnikami elektronodonorowymi, co skutkuje charakterystyczną absorpcją promieniowania w obszarze ultrafioletowym [10]. Dla

neutralnych form kannabinoidów, takich jak CBD, CBG i Δ^9 -THC, obserwuje się charakterystyczne maksimum absorpcji UV w okolicach 280 nm, wynikające z przejść elektronowych $\pi \rightarrow \pi^*$ w obrębie pierścienia aromatycznego [58]. Formy kwasowe kannabinoidów, takie jak Δ^9-THCA, CBDA i CBGA, charakteryzują się maksimum absorpcji przesuniętym w kierunku 270 nm, co wynika z obecności grupy karboksylowej wpływającej na właściwości elektronowe chromoforu [10]. Ta różnica w charakterystyce spektralnej form kwasowych i neutralnych ma fundamentalne znaczenie metodyczne, ponieważ właśnie absorpcja promieniowania UV w tym obszarze widma stanowi podstawę fizykochemiczną detekcji spektrofotometrycznej UV-VIS w metodach UHPLC, będącej głównym przedmiotem instrumentalnym niniejszej rozprawy doktorskiej [10].

Ze względu na wysoką lipofilność kannabinoidy silnie zatrzymują się na fazach C18 stosowanych w chromatografii RP-HPLC i UHPLC. Ich elucja wymaga więc zastosowania fazy ruchomej z dużym udziałem rozpuszczalnika organicznego, najczęściej acetonitrylu lub metanolu [10]. Zastosowanie UHPLC pozwala skrócić czas analizy, a jednocześnie uzyskać dobre rozdzielenie kannabinoidów o podobnej budowie. Szczególnie korzystne są kolumny z małymi cząstkami wypełnienia, w tym typu core-shell [10].

3. Cel pracy i zakres badań

3.1. Cel i zakres pracy

Celem pracy było opracowanie wspólnej procedury rozdzielania chromatograficznego UHPLC oraz ocena przydatności jej dwóch wariantów analitycznych do rozdzielania mieszaniny 19 kannabinoidów i ilościowego oznaczania wybranych analitów w surowcach konopnych oraz produktach otrzymanych z konopi. Warianty różniły się zastosowanym detektorem: UV-VIS z matrycą diodową (DAD) lub detektorem naładowanego aerozolu (CORONA CAD).

W dalszej części pracy termin „procedura chromatograficzna" oznacza wspólne warunki rozdzielania, obejmujące m.in. rodzaj kolumny, skład i przepływ fazy ruchomej, temperaturę kolumny, objętość nastrzyku oraz czas analizy. Określenia „wariant DAD" i „wariant CAD" odnoszą się natomiast do całego układu analitycznego, obejmującego procedurę chromatograficzną oraz odpowiedni sposób detekcji, rejestracji i opracowania sygnału.

Warunki rozdzielania chromatograficznego były wspólne dla obu wariantów. Parametry związane z identyfikacją analitów, rejestracją sygnału, kalibracją, zakresem roboczym, granicą wykrywalności, granicą oznaczalności, precyzją i dokładnością oceniano oddzielnie dla każdego wariantu detekcji.

Zakres pracy obejmował opracowanie sposobu przygotowania próbek, optymalizację warunków rozdzielania chromatograficznego, określenie zasad identyfikacji i integracji pików, dobór modeli kalibracyjnych, ocenę charakterystyk analitycznych obu wariantów w odniesieniu do ich zamierzonego zastosowania oraz porównanie przydatności detektorów DAD i CAD do analizy kannabinoidów w badanych matrycach.

3.2. Cele szczegółowe

- Zdefiniowanie zestawu 19 analitów oraz rodzajów matryc objętych badaniami.
- Przygotowanie próbek surowców i produktów otrzymanych z konopi.
- Dobór warunków chromatograficznych umożliwiających rozdzielenie 19 kannabinoidów, ze szczególnym uwzględnieniem par krytycznych.

- Opracowanie wariantu procedury z detekcją UV-VIS/DAD, obejmującego dobór długości fali, parametrów rejestracji sygnału oraz sposobu identyfikacji i oznaczania analitów.
- Opracowanie wariantu procedury z detekcją CORONA CAD, obejmującego dobór parametrów detektora oraz modeli kalibracyjnych odpowiednich dla jego nieliniowej charakterystyki odpowiedzi.
- Ustalenie zasad identyfikacji analitów, integracji pików oraz raportowania wyników dla obu wariantów detekcji.
- Ocena selektywności, przydatności systemu chromatograficznego, modeli kalibracyjnych, zakresów roboczych, granic wykrywalności i oznaczalności, precyzji oraz dokładności obu wariantów analitycznych.
- Ocena wpływu niewielkich zmian przepływu fazy ruchomej i temperatury kolumny na wyniki oznaczeń oraz parametry rozdzielenia chromatograficznego.
- Porównanie wariantów DAD i CAD pod względem charakterystyki odpowiedzi, czułości, zakresu roboczego, sposobu kalibracji oraz przydatności do analizy badanych matryc.
- Zastosowanie opracowanej procedury do analizy próbek rzeczywistych w zakresie potwierdzonym wynikami walidacji.

3.3. Zakres badań

Zakres badań obejmował opracowanie wspólnej procedury UHPLC umożliwiającej rozdzielenie mieszaniny 19 kannabinoidów: CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, CBCVA, CBNA, Δ^9-THC, CBL, Δ^9-THCA, CBC, CBCA, CBLA oraz Δ^9-THCP. W badaniach zastosowano dwa warianty detekcji: UV-VIS/DAD oraz CORONA CAD.

Ocena rozdzielenia chromatograficznego, odpowiedzi detektorów i modeli kalibracyjnych obejmowała roztwory wzorcowe wszystkich 19 analitów. Potwierdzony zakres aplikacyjny obejmował ilościowe oznaczanie CBD w próbkach produktów olejowych z wykorzystaniem wariantu CAD oraz ilościowe oznaczanie CBD i CBDA w próbkach suszu i materiału roślinnego z wykorzystaniem wariantu DAD. Pozostałe kannabinoidy uwzględniono w ocenie profilu chromatograficznego, selektywności, kolejności elucji i parametrów analitycznych w zakresie potwierdzonym uzyskanymi wynikami.

Część eksperymentalna obejmowała dobór analitów i substancji odniesienia, przygotowanie roztworów wzorcowych, opracowanie sposobu przygotowania próbek rzeczywistych, optymalizację warunków rozdzielania chromatograficznego, dobór parametrów detekcji oraz ocenę charakterystyk analitycznych właściwych dla obu wariantów procedury.

Dla wariantu DAD zastosowano liniowe modele kalibracyjne oparte na powierzchni pików rejestrowanych przy 278 nm. W wariancie CAD wykorzystano modele kwadratowe z wagą $1/x$ lub $1/x^2$, dobieraną indywidualnie dla poszczególnych analitów. W części aplikacyjnej opracowaną procedurę wykorzystano do analizy próbek produktów olejowych oraz suszu i materiału roślinnego. Wyniki oceniano z uwzględnieniem zakresów roboczych, wartości LOD i LOQ, przyjętych kryteriów walidacyjnych oraz ograniczeń związanych z obecnością krytycznych regionów chromatogramu

3.4. Zakres wdrożeniowy

Zakres wdrożeniowy pracy obejmował ocenę możliwości wykorzystania opracowanej procedury w rutynowej analizie kannabinoidów w badanych typach próbek. Oceniono znaczenie sposobu przygotowania próbek, stabilności warunków chromatograficznych, kontroli przydatności systemu chromatograficznego, doboru modelu kalibracyjnego, integracji pików oraz sposobu raportowania wyników.

Rutynowe wykorzystanie procedury wymaga przeprowadzenia kontroli przydatności systemu chromatograficznego przed rozpoczęciem sekwencji analitycznej, oceny ważności zastosowanej krzywej kalibracyjnej oraz monitorowania par krytycznych CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC i CBCA/CBLA. Szczególnej kontroli wymagają sposób wyznaczania granic integracji oraz wyniki uzyskiwane w obszarach o rozdzielczości niższej od przyjętego kryterium.

Wyniki mieszczące się w zakresie roboczym i nie niższe niż LOQ raportowano ilościowo. Wynik <LOQ oznaczał obecność sygnału spełniającego kryteria identyfikacji, którego poziom był niższy od granicy oznaczalności. Określenie „nie wykryto” (n.d.) stosowano w przypadku braku sygnału spełniającego kryteria identyfikacji analitu. Próbki, w których wynik przekraczał górną granicę zakresu roboczego, odpowiednio rozcieńczano i analizowano ponownie.

Zakres wdrożeniowy obejmował wyłącznie typy próbek, anality, zakresy stężeń i warunki analityczne ocenione w pracy. Zastosowanie procedury do innych matryc lub dodatkowych oznaczeń ilościowych wymaga odpowiedniej weryfikacji lub walidacji, obejmującej co najmniej ocenę selektywności, odzysku, wpływu matrycy, precyzji i zakresu roboczego.

4. Materiały i metody

4.1. Anality i substancje odniesienia

Do badań wykorzystano certyfikowane roztwory wzorcowe kannabinoidów o stężeniu nominalnym 1,0 mg/ml. Substancje odniesienia obejmowały 19 analitów, reprezentujaych głównie kannabinoidy występujące w surowcach i produktach konopnych, ich formy kwasowe oraz wybrane kannabinoidy mniejszościowe.

Zakres metody obejmował następujące związki: CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, CBCVA, CBNA, Δ^9-THC, CBL, Δ^9-THCA, CBC, CBCA, CBLA oraz Δ^9-THCP. Pełne nazwy analitów, odpowiadające im skróty, formy chemiczne oraz informacje dotyczące substancji odniesienia zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 3. Wykaz analitów i substancji odniesienia wykorzystanych w metodzie.

Skrót	Pełna nazwa analitu	Producent	Nr katalogowy	LOT
CBGO	cannabigerocin	LGC	DRE-A10946140AL.-1000	2-H504890AL
CBDVA	cannabidivarinic acid	Supelco/Merck	C-152-1ML	FE10112212
CBND	cannabinodiol	LGC	DRE-A10946170AL.-1000	2-H432709AL
CBDV	cannabidivarin	Lipomed	THC-1834-1LE	1834.1B1.1L2
CBDA	cannabidiolic acid	Lipomed	CBD-1735-1LA	1735.1B2.1L1
CBGA	cannabigerolic acid	Supelco/Merck	C-142-1ML	FE12052206
CBG	cannabigerol	AccuStandard	CP-CBG-01S	221061334-02
CBD	cannabidiol	AccuStandard	CP-CBD-01S	224041157
THCV	tetrahydrocannabivarin	Supelco/Merck	T-094-1ML	FE02172259
CBN	cannabinol	Lipomed	THC-377-1ML	377.1B0.1L1
CBCVA	cannabichromevarinic acid	Supelco/Merck	C-256-1ML	FN09202202
CBNA	cannabinolic acid	Supelco/Merck	C-153-1ML	FE12052207
Δ^9-THC	(-)-trans-Δ9-tetrahydrocannabinol	Lipomed	THC-135-1ML	135.1B78.0L1
CBL	cannabicyclol	Supelco/Merck	C-154-1ML	FE0816230
Δ^9-THCA	Δ-9-tetrahydrocannabinolic acid	Supelco/Merck	T-093-1ML	FE1102003
CBC	cannabichromene	AccuStandard	CP-CBC-01S	221101449-01
CBCA	cannabichromenic acid	Supelco/Merck	C-244-1ML	FN10192201
CBLA	cannabicyclolic acid	Supelco/Merck	C-264-1ML	FE09202203
Δ^9-THCP	Δ9-tetrahydrocannabiphorol	Supelco/Merck	T-168-1ML	FE02272304

Roztwory wzorcowe były dostarczone w postaci certyfikowanych materiałów odniesienia lub certyfikowanych roztworów wzorcowych przygotowanych w metanolu lub acetonitrylu. Informacje dotyczące producenta, numeru katalogowego, numeru partii,

stężenia nominalnego oraz rozpuszczalnika podano zgodnie z certyfikatami analizy poszczególnych wzorców. Roztwory przechowywano i przygotowywano zgodnie z zaleceniami producentów oraz informacjami zawartymi w certyfikatach analizy.

Dobór analitów wynikał z potrzeby oznaczania profilu kannabinoidowego obejmującego główne składniki produktów konopnych, takie jak: CBD, CBDA, Δ^9 -THC, Δ^9-THCA, CBG i CBN, a także związki występujące w niższych stężeniach w tym CBDV, CBDVA, CBCVA, CBNA, CBLA i Δ^9-THC Zestaw 19 analitów obejmował formy kwasowe i obojętne. Przemian dekarboksylacyjnych podczas przetwarzania, przechowywania ani przygotowania próbek nie oceniano w odrębnym badaniu.

4.2. Odczynniki, rozpuszczalniki i fazy ruchome

Do przygotowania roztworów wzorcowych, ekstrakcji próbek oraz przygotowania faz ruchomych stosowano rozpuszczalniki o czystości odpowiedniej do zastosowań chromatograficznych. Wykorzystano metanol, acetonitryl oraz wodę przeznaczoną do chromatografii cieczowej, natomiast do modyfikacji fazy ruchomej zastosowano kwas octowy. W metodzie UHPLC-CAD jako fazę ruchomą stosowano mieszaninę wody i acetonitrylu w stosunku 30:70 (v/v), zawierającą 0,1% (v/v) kwasu octowego. Przed rozpoczęciem analizy fazę ruchomą odgazowywano, a podczas pracy układu wykorzystywano systemowy degazer.

4.3. Materiał badawczy

Materiał badawczy obejmował surowce konopne oraz produkty otrzymane z konopi. Dobór próbek umożliwił ocenę zawartości kannabinoidów zarówno w materiale roślinnym, jak i w produktach przetworzonych. Wpływ substancji pomocniczych oraz pozostałych składników matrycy na wyniki oznaczeń nie był oceniany w ramach odrębnego badania efektu matrycowego.

Do badań włączono dwie grupy próbek: suszone kwiatostany konopi, oznaczone symbolami F1-F4 oraz oleje konopne, oznaczone symbolami O1-O4 (Tabela 3). Dla próbek komercyjnych zebrano informacje deklarowane na etykietach, obejmujące zawartość CBD i Δ^9-THC oraz podstawowe dane dotyczące opakowania. Dla próbki F4 nie podano informacji

o odmianie, numerze partii ani deklarowanej zawartości kannabinoidów. Próbki olejowe reprezentowały matryce lipidowe zawierające składniki nośnika olejowego, w tym triacyloglicerole, kwasy tłuszczowe i inne substancje hydrofobowe. Wpływu tych składników na odpowiedź analityczną nie wyznaczono ilościowo. Suszone kwiatostany stanowiły złożoną matrycę roślinną w której poza kannabinoidami obecne były m.in.: terpeny, barwniki, woski oraz inne składniki metabolomu roślinnego, mogące być współekstrahowane podczas przygotowania próbek.

Do oceny interferencji zastosowano próbę ślepą rozpuszczalnika oraz próbki matrycowe. Jako zastępczą matrycę roślinną wykorzystano sproszkowane liście czarnej herbaty. Materiał ten nie stanowił rzeczywistej matrycy konopnej pozbawionej kannabinoidów. Zastosowano go wyłącznie do sprawdzenia obecności sygnałów interferujących w przedziałach czasów retencji analizowanych kannabinoidów. W badaniu selektywności jako matryce olejowe zastosowano również olej zawierający triacyloglicerole średniołańcuchowe (MCT) oraz olej z nasion konopi.

Tabela 4. Charakterystyka próbek badanych oraz próbek kontrolnych.

Kod próbki	Typ próbki	Opis z etykiety / źródło	Deklarowane CBD	Deklarowane Δ^9-THC	Uwagi
O1	olej	PURE CBD OIL	30%, 3000 mg CBD	<0,1%	10 ml
O2	olej	CBD FORTE OIL	3,6%, 1000 mg CBD	<0,2%	30 ml
O3	olej	POLISH PREMIUM 30% CBD HEMP OIL	30%, 2760 mg CBD	0,0%	10 ml
O4	olej	Satiwell CBD 10%	10%, 1000 mg CBD	<0,1%	10 g
F1	susz/kwiat	CBD AMNESIA HAZE PREMIUM HEMP FLOWER	suma CBD 18,94%	0,1%	10 g
F2	susz/kwiat	CBD White Widow hemp flower	27,89% CBD	0,1%	10 g
F3	susz/kwiat	Pozytywne Konopie Orange Bud hemp flower	8,5% CBD	<0,1%	10 g
F4	susz/kwiat	*Cannabis sativa*, źródło rolnicze	brak danych	brak danych	*Cannabis sativa*

4.4. Aparatura i warunki chromatograficzne

Analizy chromatograficzne przeprowadzono z wykorzystaniem systemu UHPLC Vanquish Flex firmy Thermo Scientific. Rozdzielanie analitów prowadzono na kolumnie Accucore C18 o wymiarach 150 × 3,0 mm i średnicy cząstek 2,6 µm. Kolumnę C18 zastosowano ze względu na właściwości analizowanych kannabinoidów oraz ich rozdzielanie w warunkach chromatografii odwróconych faz (Tabela 4).

W opracowanej metodzie zastosowano elucję izokratyczną. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina wody i acetonitrylu w stosunku 30:70 v/v z dodatkiem 0,1% v/v kwasu octowego. Przed rozpoczęciem analiz fazę ruchomą odgazowywano w łaźni ultradźwiękowej. Dodatkowo, podczas pracy układu UHPLC, fazę ruchomą odgazowywano za pomocą zintegrowanego z systemem degazera.

Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,5 ml/min. Temperaturę kolumny utrzymywano na poziomie 20°C, a temperaturę autosamplera na poziomie 25°C. Objętość nastrzyku wynosiła 5 µl. Całkowity czas analizy wynosił 30 min. Przed rozpoczęciem sekwencji analitycznej układ chromatograficzny równoważono przez 30 min przy nominalnym przepływie fazy ruchomej.

Tabela 5. Warunki chromatograficzne i parametry detekcji UHPLC-CORONA CAD.

Parametr	UHPLC-CAD
System chromatograficzny	Vanquish Flex UHPLC
Detektor	CAD Flex D20
Kolumna	Accucore C18, 150 × 3,0 mm, 2,6 µm
Tryb elucji	izokratyczny
Faza ruchoma	woda/acetonitryl 30:70 v/v + 0,1% kwasu octowego
Przepływ	0,5 ml/min
Temperatura kolumny	20°C
Temperatura autosamplera	25°C
Objętość nastrzyku	5 µl
Czas analizy	30 min
Równoważenie układu	30 min
Temperatura komory nebulizatora CAD	35°C
Power function	1,00
Data rate	2 Hz
Filter	5
Peak width	0,2 min
Ciśnienie powietrza	5,0 bar

W wariancie metody z detekcją CORONA CAD zastosowano detektor CAD Flex D20, zasilany filtrowanym i osuszonym powietrzem z bezolejowego kompresora. Ciśnienie gazu zasilającego wynosiło 5,0 bar. Parametry pracy detektora CORONA CAD ustalono na następującym poziomie: power function 1,00, częstotliwość akwizycji 2 Hz, filtr 5, szerokość piku 0,2 min oraz temperatura odparowania 35°C. Dobór tych parametrów zapewniał stabilną odpowiedź detektora przy zachowaniu odpowiedniej jakości rozdzielenia chromatograficznego.

Wariant metody z detekcją UV-VIS/DAD prowadzono z zastosowaniem detektora z matrycą diodową Vanquish Flex Diode Array Detector firmy Thermo Scientific. Zastosowany detektor umożliwiał jednoczesną rejestrację sygnałów przy wybranych długościach fali oraz gromadzenie danych widmowych w układzie trójwymiarowym (3D). Według danych producenta detektor Vanquish Diode Array Detector FG wykorzystuje pojedynczą wiązkę optyczną, siatkę holograficzną oraz 1024-elementową matrycę fotodiodową. Detektor pracował w zakresie długości fali 190–800 nm, przy maksymalnej częstotliwości akwizycji danych wynoszącej 250 Hz (Tabela 5).

Tabela 6. Parametry detekcji UHPLC-UV-VIS/DAD.

Parametr	Wartość dla UHPLC-UV-VIS/DAD
Układ chromatograficzny	Vanquish Flex UHPLC
Detektor	Vanquish Flex Diode Array Detector, DAD
Typ detektora	detektor z matrycą diodową
Zakres pracy detektora według producenta	190-800 nm
Matryca detektora	1024-elementowa matryca fotodiodowa
Liczba kanałów według producenta	do 10 kanałów sygnału + pole 3D
Maksymalna częstotliwość akwizycji według producenta	do 250 Hz
Zakres rejestracji widm w metodzie	190-400 nm
Długość fali analitycznej	278 nm
Częstotliwość akwizycji w metodzie	5 Hz
Rodzaj danych	chromatogram UV oraz widma 3D DAD
Zastosowanie widm 3D	pomocnicza ocena zgodności profilu widmowego piku ze wzorcem
Zastosowanie sygnału przy 278 nm	obliczenia ilościowe i walidacja wariantów UHPLC-UV-VIS/DAD

W niniejszej pracy dane widmowe DAD rejestrowano w zakresie 190-400 nm z częstotliwością akwizycji 5 Hz. Dla poszczególnych kannabinoidów zbierano widma 3D DAD, które wykorzystywano pomocniczo do oceny zgodności profilu widmowego pików

z roztworami wzorcowymi oraz do kontroli jakości chromatogramów. Oznaczanie ilościowe oraz walidację wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD prowadzono przy długości fali 278 nm.

Detekcji DAD nie traktowano jako techniki jednoznacznego potwierdzania struktury związku. Widma UV wykorzystywano jako narzędzie wspierające identyfikację opartą na czasie retencji, kolejności elucji oraz porównaniu z substancjami odniesienia.

4.5. Przygotowanie roztworów wzorcowych i prób badanych

Do przygotowania roztworów wzorcowych wykorzystano certyfikowane roztwory wzorcowe kannabinoidów. Stężenia roztworów wyjściowych przyjmowano zgodnie z wartościami podanymi w certyfikatach analizy producentów. Z roztworów wyjściowych przygotowywano wieloskładnikową mieszaninę wzorcową oraz roztwory robocze poprzez kolejne rozcieńczenia w metanolu. Do odmierzania cieczy stosowano kalibrowane pipety automatyczne oraz szkło miarowe klasy A.

Kalibrację prowadzono metodą wzorca zewnętrznego. Podstawowy schemat kalibracji obejmował osiem nominalnych poziomów stężeń: 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/ml. Dla każdego poziomu kalibracyjnego wykonano pięć nastrzyków. Zakres roboczy ustalano indywidualnie dla każdego analitu z uwzględnieniem granicy oznaczalności oraz poziomów włączonych do modelu kalibracyjnego.

W wariancie z detekcją UV-VIS/DAD dla CBGO, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV i CBN zastosowano podstawowy zestaw ośmiu poziomów kalibracyjnych. Dla pozostałych analitów zastosowano następujące poziomy stężeń: CBDVA - 1, 5, 12, 25, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; CBCVA - 1, 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; CBNA - 2,4; 7,5; 15,5; 32,5; 55; 100; 200 i 250 µg/ml; Δ^9-THC - 2, 5, 10, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; CBL - 2, 6, 10, 17, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; Δ^9-THCA - 6, 10, 20, 55, 100, 200 i 250 µg/ml; CBC - 1,8; 6; 10; 17; 50; 100; 200 i 250 µg/ml; CBCA - 1, 5, 10, 17, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; CBLA - 1,5; 5; 10; 16; 45; 100; 200 i 250 µg/ml; Δ^9-THCP - 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/ml.

Dla wariantu UV-VIS/DAD zależność powierzchni piku zarejestrowanej przy długości fali 278 nm od stężenia analitu opisywano za pomocą modelu regresji liniowej.

W wariancie z detekcją CORONA CAD poziom 1 µg/ml nie został uwzględniony w modelach kalibracyjnych. Dla CBGO, CBND, CBDV, CBDA, CBG, CBD i THCV zastosowano poziomy 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; dla CBDVA - 5, 11, 25, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; dla CBGA i CBN - 5, 10, 20, 50, 100 i 200 µg/ml; dla CBCVA - 10, 20, 50, 100 i 200 µg/mL; dla CBNA - 7,5; 15,5; 32,5; 55; 100; 200 i 250 µg/ml; dla Δ^9-THC - 10, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; dla CBL i CBC - 6, 10, 17, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; dla Δ^9-THCA - 10, 20, 55, 100, 200 i 250 µg/ml; dla CBCA - 5, 10, 17, 50, 100, 200 i 250 µg/ml; dla CBLA - 10, 16, 45, 100, 200 i 250 µg/ml; natomiast dla Δ^9-THCP - 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/ml.

W wariancie z detekcją CORONA CAD zależność powierzchni piku od stężenia analitu opisywano za pomocą regresji kwadratowej z wagą 1/x lub $1/x^2$, dobieraną indywidualnie dla każdego analitu. Zastosowane warianty ważenia przedstawiono w Tabeli 88.

Próbki suszu i kwiatostanów konopi przed ekstrakcją homogenizowano przez rozdrobnienie i dokładne wymieszanie. Następnie odważano około 70 mg materiału roślinnego i dodawano 10 ml metanolu. Ekstrakcję prowadzono przez 15 min w łaźni ultradźwiękowej, a następnie próbki wirowano przez 5 min przy 2500 rpm. Przy promieniu roboczym wirnika wynoszącym 5 cm odpowiadało to względnemu przyspieszeniu odśrodkowemu około 349 × g.

Po zakończeniu wirowania pobierano supernatant i filtrowano go przez filtr membranowy z regenerowanej celulozy (RC) o średnicy porów 0,45 µm. Następnie 100 µl przefiltrowanego ekstraktu przenoszono do fiolki chromatograficznej i dodawano 900 µl metanolu, uzyskując dziesięciokrotne rozcieńczenie ekstraktu.

Próbki olejów konopnych przygotowywano według tej samej procedury. Odważano około 70 mg próbki olejowej, dodawano 10 ml metanolu i prowadzono ekstrakcję przez 15 min w łaźni ultradźwiękowej. Po ekstrakcji próbki wirowano przez 5 min przy 2500 rpm, a następnie filtrowano przez filtr membranowy RC o średnicy porów 0,45 µm. Otrzymane ekstrakty rozcieńczano dziesięciokrotnie, mieszając 100 µl ekstraktu z 900 µl metanolu. Dla obu rodzajów matryc zastosowano taki sam nominalny stosunek masy próbki do objętości rozpuszczalnika oraz identyczne warunki ekstrakcji, wirowania, filtracji i końcowego rozcieńczenia.

Roztwory robocze i ekstrakty filtrowano bezpośrednio przed analizą. Ekstrakty przygotowywano bezpośrednio przed rozpoczęciem sekwencji analitycznej, ograniczając czas między ich przygotowaniem a nastrzykiem do niezbędnego minimum.

Nie przeprowadzono odrębnego badania stabilności ekstraktów, dlatego nie wyznaczano maksymalnego czasu ich przechowywania ani kryteriów akceptacji zmian powierzchni pików lub oznaczonych stężeń. Uzyskane wyniki nie pozwalają zatem na ocenę stabilności ekstraktów ani określenie dopuszczalnego czasu ich przechowywania przed analizą.

4.6. Identyfikacja, kalibracja i obliczenia

Rejestrację danych, integrację chromatogramów oraz obliczenia ilościowe prowadzono z zastosowaniem oprogramowania Chromeleon 7.3. Chromatogramy integrowano z wykorzystaniem ujednoliconych parametrów w obrębie danej sekwencji analitycznej. W przypadku niskiej intensywności sygnału, podwyższonego tła matrycy lub obecności pików w obszarach krytycznych granice integracji weryfikowałem manualnie.

Identyfikację analitów prowadzono na podstawie porównania czasów retencji pików w próbkach z czasami retencji substancji odniesienia analizowanych w tych samych warunkach chromatograficznych. Uwzględniano również zgodność kolejności elucji w mieszaninie wzorcowej oraz brak sygnałów interferujących w oknach retencji poszczególnych analitów. Kryteria te wspierano analizą blanków oraz próbek kontrolnych.

W przypadku detekcji UV-VIS/DAD dane widmowe rejestrowano z zastosowaniem detektora Vanquish Flex DAD. Widma zbierano w zakresie 190-400 nm z częstotliwością akwizycji 5 Hz. Dla pików odpowiadających poszczególnym kannabinoidom rejestrowano widma 3D DAD i porównywano je z widmami odpowiednich roztworów wzorcowych. Zgodność widma UV stanowiła kryterium pomocnicze. Widma DAD nie stanowiły samodzielnego potwierdzenia struktury, a podobieństwo profili absorpcyjnych ograniczało ich swoistość.

W przypadku detekcji CORONA CAD identyfikacja opierała się przede wszystkim na czasie retencji, zgodności kolejności elucji oraz porównaniu z mieszaniną wzorcową. Detektor CAD nie dostarcza informacji widmowej ani masowej, dlatego szczególne znaczenie miały stabilność retencji, jakość rozdzielenia chromatograficznego oraz kontrola obszarów krytycznych chromatogramu.

Oznaczanie ilościowe prowadzono metodą kalibracji zewnętrznej. Roztwory kalibracyjne przygotowywano w rozpuszczalniku na podstawie certyfikowanych roztworów

wzorcowych poszczególnych kannabinoidów. Dla każdego analitu sporządzano krzywą kalibracyjną, wykorzystując zależność pomiędzy powierzchnią piku chromatograficznego a stężeniem analitu w roztworze wzorcowym. Dla detekcji UV-VIS/DAD zastosowano klasyczny liniowy model krzywej kalibracyjnej. Zastosowanie modelu liniowego dla detekcji DAD wynikało z charakteru odpowiedzi detektora spektrofotometrycznego w którym w określonym zakresie stężeń powierzchnia piku jest proporcjonalna do stężenia analitu w potwierdzonym zakresie liniowości. Widma 3D DAD rejestrowane w zakresie 190-400 nm wykorzystywano pomocniczo do oceny zgodności profilu widmowego pików z roztworami wzorcowymi, natomiast obliczenia ilościowe dla detekcji UV-VIS/DAD prowadzono na podstawie powierzchni pików zarejestrowanych przy długości fali 278 nm.

W wariancie z detekcją CORONA CAD zależność powierzchni piku od stężenia analitu opisywano za pomocą regresji kwadratowej z ważeniem 1/x lub $1/x^2$, dobieranym indywidualnie dla poszczególnych analitów. Ważenie 1/x zastosowano dla CBGA, CBG, CBN, Δ^9-THC, Δ^9-THCA, CBC, CBCA, CBLA i Δ^9-THCP, natomiast $1/x^2$ dla CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBD, THCV, CBCVA, CBNA i CBL.

Zakres roboczy ustalano indywidualnie dla każdego analitu i zastosowanego sposobu detekcji, o ile dany wariant detekcji wykorzystywano do oznaczeń ilościowych. Wyniki ilościowe obliczano wyłącznie dla sygnałów mieszczących się w ustalonym zakresie roboczym. Wyniki poniżej granicy wykrywalności oznaczano jako n.d. (*not detected*), natomiast sygnały wykryte powyżej granicy wykrywalności, lecz poniżej granicy oznaczalności, jako <LOQ. Wyniki <LOQ interpretowano jako potwierdzenie obecności analitu na poziomie poniżej zakresu wiarygodnej kwantyfikacji i nie uwzględniano ich w ilościowej ocenie profilu próbki.

Zawartość analitu X [mg/g] w próbce obliczano według równania:

$$X = \frac{C \times V \times DF}{m}$$

gdzie:

C - stężenie analitu oznaczone w końcowym roztworze analitycznym po rozcieńczeniu [µg/ml],

V - objętość rozpuszczalnika ekstrakcyjnego [ml],

DF - współczynnik rozcieńczenia końcowego,

m - masa próbki [mg].

4.7. Plan walidacji

Walidację metody zaplanowano z wytycznymi ICH Q2(R2). W przypadku wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD parametry walidacyjne wyznaczano na podstawie sygnału chromatograficznego rejestrowanego przy długości fali 278 nm. Widma 3D DAD rejestrowane w zakresie 190-400 nm wykorzystywano pomocniczo do oceny zgodności profilu widmowego pików, bez uwzględniania ich w obliczeniach ilościowych. Zakres walidacji dobrano do przeznaczenia procedury, którym było oznaczanie ilościowe i profilowanie kannabinoidów w surowcach oraz produktach otrzymanych z konopi. Ocenie poddano selektywność, przydatność systemu chromatograficznego, model kalibracyjny, zakres roboczy, granice wykrywalności i oznaczalności, precyzję, dokładność oraz odporność metody (Tabela 6).

Selektywność oceniano na podstawie analizy blanku rozpuszczalnikowego, matryc olejowych oraz zastępczej matrycy roślinnej. Kryterium akceptacji stanowił brak sygnałów interferujących w oknach retencji badanych kannabinoidów oraz brak istotnego wpływu tła na integrację pików. Należy zaznaczyć, że zastosowana matryca roślinna była matrycą zastępczą, a nie rzeczywistą matrycą konopną pozbawioną kannabinoidów.

Przydatność systemu chromatograficznego oceniano na podstawie pięciu kolejnych nastrzyków mieszaniny wzorcowej kannabinoidów o stężeniu 20 µg/ml. Oceniano powtarzalność czasów retencji, powtarzalność powierzchni pików, rozdzielczość sąsiadujących oraz zdefiniowanych par krytycznych, liczbę półek teoretycznych i stosunek sygnału do szumu. Kryteria akceptacji obejmowały: RSD czasu retencji ≤ 1,0%, RSD powierzchni piku ≤ 5,0% oraz N ≥ 2000. Dla dobrze rozdzielonych pików przyjęto kryterium rozdzielczości Rs ≥ 1,5, natomiast dla par krytycznych dopuszczono niższą wartość Rs ≥ 0,9, pod warunkiem stabilnej retencji, prawidłowej integracji i potwierdzenia torżsamości pików na podstawie mieszaniny wzorcowej.

Granice wykrywalności i oznaczalności oszacowano metodą opartą na stosunku sygnału do szumu. Dla każdego analitu, wariantu detekcji i poziomu stężenia uwzględnionego w ocenie wykonano pięć nastrzyków. Wartość S/N wyznaczono oddzielnie dla każdego chromatogramu. Następnie obliczono średnią arytmetyczną z pięciu wartości S/N. Za kryterium oszacowania

LOD przyjęto średnią wartość S/N ≥ 3, natomiast dla LOQ - średnią wartość S/N ≥ 10. Otrzymane wartości traktowano jako oszacowania LOD i LOQ wyznaczone na podstawie stosunku sygnału do szumu.

Precyzję oceniano na podstawie trzech wyników uzyskanych w warunkach powtarzalności oraz dwóch serii pomiarowych przedstawionych w Tabelach 109 i 110, stanowiących ocenę precyzji pośredniej. Za kryterium akceptacji przyjęto RSD ≤ 5,0%. Dokładność oceniano na podstawie trzech wartości odzysku dla każdego poziomu stężenia, przyjmując jako kryterium akceptacji średni odzysk w zakresie 90-115% wartości nominalnej.

Odporność procedury chromatograficznej oceniano poprzez wprowadzenie niewielkich, celowych zmian przepływu fazy ruchomej oraz temperatury kolumny. Przepływ zmieniano względem wartości nominalnej 0,50 ml/min do 0,45 i 0,55 ml/min, a temperaturę kolumny z 20°C do 19 i 21°C. Każdy z czynników zmieniano niezależnie, przy zachowaniu pozostałych parametrów metody na poziomie nominalnym.Oceniano wpływ wprowadzonych zmian na czas retencji, powierzchnię piku, obliczone stężenie analitu, rozdzielczość chromatograficzną, asymetrię pików, liczbę półek teoretycznych oraz stosunek sygnału do szumu. Wyniki uzyskane w zmienionych warunkach porównywano z wynikami otrzymanymi w warunkach nominalnych. Dane dla detekcji UV-VIS/DAD przedstawiono w Tabelach 149-156, natomiast dane dla detekcji CORONA CAD w Tabelach 157-164.

W ocenie uwzględniono zachowanie przyjętych kryteriów dotyczących liczby półek teoretycznych i rozdzielczości chromatograficznej. Dla liczby półek teoretycznych obowiązywało kryterium N ≥ 2000. Dla par sąsiadujących przyjęto Rs ≥ 1,5, natomiast dla zdefiniowanych par krytycznych Rs ≥ 0,9. Nie określono odrębnych liczbowych kryteriów akceptacji dla zmian czasu retencji, powierzchni piku ani obliczonego stężenia analitu. Wyniki wykorzystano do oceny wpływu kontrolowanych zmian warunków chromatograficznych na przebieg analizy oraz identyfikacji parametrów wymagających ścisłej kontroli podczas rutynowego stosowania procedury.

Wpływ ustawienia Power Function na poziomach 0,9 i 1,1 oraz temperatury odparowania detektora CAD wynoszącej 50 i 70°C oceniono na etapie badań rozwojowych detektora. Wyniki przedstawiono w Tabelach 165-171. Badań tych nie uwzględniono w formalnej ocenie odporności końcowej procedury, ponieważ zastosowane temperatury

stanowiły znaczne, a nie niewielkie, odstępstwa od ustalonej temperatury odparowania wynoszącej 35°C. Dla tych badań nie określono również liczby powtórzeń ani odrębnych kryteriów akceptacji.

Tabela 7. Podsumowanie planu walidacji metody.

Parametr	Sposób oceny	Kryterium / założenie
Selektywność	Analiza blanku rozpuszczalnikowego, matryc olejowych oraz zastępczej matrycy roślinnej	Brak sygnałów interferujących w oknach retencji analitów oraz brak wpływu tła na integrację pików
Przydatność systemu chromatograficznego (SST)	Pięć kolejnych nastrzyków mieszaniny wzorcowej o stężeniu 20 µg/mL	RSD czasu retencji ≤ 1,0%;RSD powierzchni piku ≤ 5,0%;N ≥ 2000
Rozdzielczość chromatograficzna	Ocena par sąsiadujących oraz zdefiniowanych par krytycznych	Rs ≥ 1,5;dla par krytycznych Rs ≥ 0,9, przy zachowaniu stabilnej retencji, prawidłowej integracji i potwierdzonego przypisania pików
Kalibracja i zakres roboczy	Od 6 do 8 poziomów stężeń, zależnie od analitu i wariantu detekcji;pięć nastrzyków każdego poziomu;ocena stężeń obliczonych zwrotnie i błędów względnych	Model liniowy dla DAD;model kwadratowy z ważeniem 1/x albo $1/x^2$ dla CAD;|RE| ≤ 15% dla poziomów powyżej LOQ;|RE| ≤ 20% dla poziomu odpowiadającego LOQ;kryteria powinny spełniać wszystkie poziomy w deklarowanym zakresie roboczym, w tym poziom najniższy i najwyższy
Granica wykrywalności (LOD)	Pięć nastrzyków każdego ocenianego poziomu oraz obliczenie średniej wartości S/N	Średnia wartość S/N ≥ 3;wartość ustalana indywidualnie dla każdego analitu i wariantu detekcji
Granica oznaczalności (LOQ)	Pięć nastrzyków każdego ocenianego poziomu oraz obliczenie średniej wartości S/N	Średnia wartość S/N ≥ 10;wartość ustalana indywidualnie dla każdego analitu i wariantu detekcji
Precyzja	Ocena powtarzalności oraz dwóch serii opisanych jako precyzja pośrednia;trzy wyniki w każdej ocenianej serii	RSD ≤ 5,0%
Dokładność	Ocena odzysku na poszczególnych poziomach stężeń;trzy powtórzenia na każdym poziomie	Średni odzysk w zakresie 90–115ale % wartości nominalnej

Wartości LOD i LOQ oszacowano indywidualnie dla każdego analitu i wariantu detekcji na podstawie średniej arytmetycznej wartości S/N wyznaczonej z pięciu nastrzyków na każdym ocenianym poziomie stężenia. Za LOD przyjmowano najniższy oceniony poziom, dla którego średnia wartość S/N wynosiła co najmniej 3. Za LOQ przyjmowano najniższy oceniony poziom, dla którego średnia wartość S/N wynosiła co najmniej 10.

5. Opracowanie i optymalizacja metody UHPLC

W niniejszym rozdziale opisano sposób opracowania i optymalizacji metody UHPLC przeznaczonej do oznaczania kannabinoidów w surowcach oraz produktach otrzymywanych z konopi. Prace obejmowały dobór mieszaniny analitów, wybór matryc badawczych, określenie wymagań dotyczących rozdzielenia chromatograficznego oraz dostosowanie warunków analizy do dwóch sposobów detekcji: UV-Vis/DAD i aerozolowej CORONA CAD.

Głównym założeniem było opracowanie praktycznej procedury analitycznej przeznaczonej do analizy próbek rzeczywistych. Uwzględniono główne kannabinoidy, ich formy kwasowe oraz wybrane związki występujące w mniejszych ilościach. Dobór warunków analizy stanowił kompromis między jakością rozdzielenia chromatograficznego, czasem analizy, stabilnością odpowiedzi detektorów a prostotą przygotowania próbek.

5.1. Założenia metodyczne

Podstawowym założeniem metodycznym było opracowanie procedury UHPLC umożliwiającej profilowanie kannabinoidów w złożonych matrycach konopnych. Zakres obejmował surowce roślinne i produkty przetworzone w szczególności susz lub kwiatostany konopi oraz oleje konopne. Materiał roślinny zawierał składniki współekstrahowane, takie jak terpeny, flawonoidy, barwniki i woski, natomiast produkty olejowe charakteryzowały się wysoką zawartością lipidów. Efektu matrycowego nie oceniano odrębnie (Tabela 7).

Drugim istotnym założeniem było uzyskanie rozdzielenia chromatograficznego wystarczającego do wiarygodnego przypisania oraz oznaczania pików. Miało to szczególne znaczenie ze względu na podobieństwo strukturalne wielu kannabinoidów, obecność izomerów oraz związków o zbliżonych właściwościach retencyjnychW przypadku detekcji CAD wymaganie to miało szczególne znaczenie, ponieważ detektor nie dostarcza informacji widmowej ani masowej. Wiarygodne przypisanie pików opierało się zatem przede wszystkim na stabilności czasu retencji, powtarzalności kolejności elucji, jakości rozdzielenia oraz porównaniu chromatogramów próbek z chromatogramami mieszanin wzorcowych. Istotne było również monitorowanie krytycznych obszarów chromatogramu.

Opracowana metoda nie była przeznaczona do zastępowania technik LC-MS/MS lub UHPLC-HRMS w zakresie jednoznacznego potwierdzania struktury analitów. Jej celem było

opracowanie niemasowego podejścia do rutynowego profilowania kannabinoidów w warunkach kontroli jakości. Połączono kontrolę selektywności chromatograficznej i stabilności układu z prostą procedurą przygotowania próbek. Zakres zastosowania ograniczono do warunków i matryc ocenionych w pracy.

W wariancie UV-VIS/DAD wykorzystywano absorpcję promieniowania UV przez kannabinoidy oraz pomocnicze porównanie widm UV. Detektor DAD stosowano do wspomagania przypisania pików, a nie do jednoznacznego potwierdzania struktury. Przypisanie piku opierano na zgodności czasu retencji, kolejności elucji i zarejestrowanego profilu widmowego ze wzorcem. Podobne widma analitów i składników matrycy ograniczały swoistość detekcji DAD.

Wariant z detekcją CORONA CAD wymagał odrębnej optymalizacji warunków analizy. Odpowiedź detektora zależała od ilości analitu pozostałego po odparowaniu fazy ruchomej. Uwzględniono zgodność składu fazy ruchomej z wymaganiami detektora, stabilność procesu odparowania, powtarzalność tworzenia aerozolu oraz nieliniowy charakter odpowiedzi CAD. Oceniono również dobór modelu kalibracyjnego i indywidualnych zakresów roboczych dla poszczególnych analitów. Optymalizacja obejmowała także stabilność sygnału i powtarzalność integracji pików.

Podczas opracowywania metody priorytetem było stabilne rozdzielenie szerokiego zakresu kannabinoidów w jednej analizie, przy zachowaniu kontroli par krytycznych. Optymalizacja UHPLC-CAD obejmowała skład fazy ruchomej, zawartość kwasu octowego, temperaturę kolumny, temperaturę odparowania w detektorze CAD i objętość nastrzyku.

Dla par CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC i CBCA/CBLA nie uzyskano rozdzielenia do linii podstawowej. Pary te zakwalifikowano jako regiony krytyczne i przyjęto dla nich odrębne kryterium $Rs \geq 0{,}9$. Ocena obejmowała stabilność retencji, kolejność elucji, poprawność integracji oraz porównanie z mieszaniną wzorcową.

Założeniem metodycznym było opracowanie procedury umożliwiającej jednoczesne profilowanie 19 kannabinoidów w matrycach roślinnych i olejowych z zastosowaniem detekcji UV-Vis/DAD oraz CORONA CAD. Uwzględniono wymagania dotyczące rozdzielenia chromatograficznego, w tym kontrolę krytycznych obszarów chromatogramu, a także stabilność czasów retencji, powierzchni pików i rozdzielczości par krytycznych. Założeniem

wdrożeniowym było zapewnienie możliwości rutynowego stosowania procedury przy wykorzystaniu określonych warunków ekstrakcji, przygotowania próbek i kontroli układu oraz jednoznacznych zasad raportowania wyników ilościowych, wyników <LOQ i sygnałów niewykrytych. Zakres zastosowania procedury ograniczono do warunków i matryc ocenionych w niniejszej pracy.

Tabela 8. Główne założenia metodyczne opracowania procedury UHPLC.

Założenie metodyczne	Uzasadnienie	Znaczenie praktyczne
Oznaczanie szerokiego zakresu kannabinoidów	Surowce i produkty konopne zawierają formy główne, kwasowe, obojętne i mniejszościowe	Ocena profilu 19 kannabinoidów, nie tylko CBD i Δ^9-THC
Uwzględnienie suszu/kwiatów i olejów	Matryce różnią się składem; efektu matrycowego nie wyznaczono ilościowo	Metoda ma mieć zastosowanie do różnych typów próbek
Priorytet dla rozdzielenia chromatograficznego	UV-VIS/DAD i CAD nie zapewniają potwierdzenia masowego	Stabilna retencja i rozdzielczość są kluczowe dla identyfikacji
Kontrola par krytycznych	Niektóre kannabinoidy mają zbliżone właściwości retencyjne	Konieczność monitorowania CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC i CBCA/CBLA
Kompatybilność z CAD	CAD wymaga lotnych składników fazy ruchomej i stabilnego odparowania	Dobór fazy ruchomej musi uwzględniać wymagania detektora
Użyteczność wdrożeniowa	Doktorat ma charakter wdrożeniowy	Procedurę zaprojektowano do rutynowej realizacji w opisanym zakresie

5.2. Dobór warunków rozdzielania

Warunki rozdzielania opracowano dla głównych i mniejszościowych kannabinoidów obejmujących formy kwasowe i obojętne. Priorytetem było uzyskanie powtarzalnej retencji, stabilnej kolejności elucji oraz odpowiedniej separacji związków o zbliżonej strukturze.

Dobór warunków rozdzielania prowadzono z wykorzystaniem kolumny Accucore C18 o wymiarach 150 × 3,0 mm i średnicy cząstek 2,6 µm. Zastosowanie fazy stacjonarnej C18 wynikało z hydrofobowego charakteru większości kannabinoidów oraz ich korzystnej retencji w warunkach chromatografii odwróconych faz. Rozdzielanie prowadzono w warunkach izokratycznych z zastosowaniem mieszaniny wody i acetonitrylu w stosunku 30:70 v/v z dodatkiem 0,1% v/v kwasu octowego. W metodzie UHPLC-CAD warunki te zostały dobrane jako kompromis między jakością rozdzielenia, czasem analizy oraz wymaganiami detektora CAD.

Zastosowano elucję izokratyczną, dzięki czemu skład fazy ruchomej pozostawał stały w całym przebiegu. Faza ruchoma zawierała składniki lotne zgodne z detekcją CAD. Wpływu alternatywnych składów fazy ruchomej na poziom tła i odpowiedź detektora CAD nie przedstawiono w ramach danych walidacyjnych.

Dodatek kwasu octowego do fazy ruchomej poprawiał jakość rozdzielania, sprzyjając uzyskaniu bardziej symetrycznych pików i powtarzalnej retencji. Jego zastosowanie ograniczało wtórne oddziaływania analitów z resztkowymi grupami silanolowymi fazy stacjonarnej. Jednocześnie kwas octowy był kompatybilny z detekcją CAD, ponieważ nie stanowił nielotnego składnika fazy ruchomej.

Optymalizacja obejmowała ocenę składu fazy ruchomej, zawartości kwasu octowego, temperatury kolumny, objętości nastrzyku oraz warunków pracy detektora. Czasy retencji kannabinoidów mieściły się w zakresie 2,51-25,98 min dla UV-VIS/DAD oraz 2,56-26,03 min dla CAD. Czas martwy układu wynosił t_o = 1,6 min.

Wszystkie anality były zatrzymywane na kolumnie, a współczynniki retencji k′ mieściły się w zakresie 0,60-15,66. Najniższe wartości k' obserwowano dla związków eluujących na początku chromatogramu, natomiast najwyższe dla analitów późno eluujących, co wskazuje na szeroki zakres retencji badanych kannabinoidów.

Dla większości par sąsiadujących uzyskano Rs > 1,5. Dla par CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC i CBCA/CBLA wartości były niższe i zastosowano odrębne kryterium Rs ≥ 0,9. Regiony te wyznaczono jako krytyczne i objęto kontrolą w każdej sekwencji.

5.3. Dobór warunków detekcji UV-VIS/DAD i CAD

Dobór warunków detekcji uwzględniał odmienne zasady działania UV-VIS/DAD i CORONA CAD. Obie techniki zastosowano komplementarnie: UV-VIS/DAD umożliwiał detekcję związków na podstawie ich absorpcji promieniowania, natomiast odpowiedź CAD zależała od ilości analitu pozostałego po odparowaniu fazy ruchomej i utworzeniu aerozolu.

Dla kannabinoidów rejestrowano chromatogram przy 278 nm oraz widma UV poszczególnych pików. Widma porównywano z profilami i czasami retencji odpowiednich roztworów wzorcowych jako pomocnicze kryterium identyfikacji piku.

W pracy zastosowano detektor Vanquish Flex DAD firmy Thermo Scientific, umożliwiający rejestrację widm w zakresie 190–800 nm z wykorzystaniem 1024-elementowej matrycy fotodiodowej. Detektor pozwalał na jednoczesną rejestrację wielu kanałów absorpcji oraz gromadzenie danych w trybie 3D.

W wariancie UV-VIS/DAD pomiary prowadzono przy długości fali 278 nm, którą wykorzystano do obliczeń ilościowych i oceny parametrów walidacyjnych. Jednocześnie dla każdego piku zbierano widma 3D DAD w zakresie 190-400 nm, przy częstotliwości akwizycji 5 Hz. Zakres ten obejmował obszar absorpcji właściwy dla analizowanych kannabinoidów i umożliwiał pomocniczą ocenę zgodności profilu widmowego analitów z roztworami wzorcowymi.

Analiza widm DAD roztworów wzorcowych wykazała, że maksima absorpcji poszczególnych kannabinoidów nie są identyczne. Dla wielu związków silna absorpcja występowała w krótkofalowym zakresie UV, natomiast w okolicy 278 nm obserwowano pasma o różnej intensywności. Na tej podstawie wyróżniono kilka charakterystycznych grup profili widmowych, których zestawienie przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 9. Klasyfikacja profili widmowych DAD analizowanych kannabinoidów

Grupa widmowa	Charakterystyka widma DAD	Przykładowe anality	Znaczenie walidacyjne
Profil krótkofalowy	Silne pasmo około 205-211 nm, słabsze pasmo około 275-280 nm	CBGO, CBDV, CBG, CBD, THCV, Δ^9-THC, CBL, Δ^9-THCP	Widmo wspiera identyfikację, ale nie wystarcza do jednoznacznego rozróżnienia analitów
Profil form kwasowych	Dodatkowe pasma około 220-230 nm, 265-272 nm oraz miejscami >300 nm	CBDVA, CBDA, CBGA, Δ^9-THCA	Ocena zgodności profilu widmowego i jednorodności piku
Profil z absorpcją w zakresie dłuższych fal UV	Wyraźniejsze pasma w zakresie około 255-295 nm i czasem >300 nm	CBN, CBCVA, CBNA, CBCA	Większa wartość diagnostyczna widma w ocenie selektywności
Profil pośredni	Pasma około 225-230 nm oraz 279-281 nm	CBC, CBLA	Widmo stosowano pomocniczo wraz z kontrolą retencji i rozdzielczości

Długość fali 278 nm przyjęto jako długość fali analitycznej umożliwiającą kontrolowane oznaczanie mieszaniny analitów, przy jednoczesnym ograniczeniu wpływu silnej absorpcji tła obserwowanej w krótszym zakresie UV. Widma UV/DAD roztworów wzorcowych przedstawiono w części 11.1 pracy.

Detekcję DAD stosowano jako narzędzie pomocnicze. Identyfikację analitów opierano na zgodności czasu retencji ze wzorcem, kolejności elucji w mieszaninie wzorcowej oraz zgodności profilu widmowego DAD. Widma UV nie stanowiły samodzielnego potwierdzenia struktury, a podobieństwo profili absorpcyjnych ograniczało ich swoistość.

W przypadku detekcji CORONA CAD dobór warunków uwzględniał proces nebulizacji, odparowania fazy ruchomej i ładowania cząstek aerozolu. Detektor nie dostarcza informacji widmowej ani masowej, dlatego identyfikacja analitów opierała się przede wszystkim na rozdzieleniu chromatograficznym, powtarzalności czasów retencji i kolejności elucji oraz porównaniu z roztworami wzorcowymi. Istotnym elementem oceny była również kontrola obszarów chromatogramu, w których występowały piki o zbliżonych czasach retencji.

Dla detektora CAD oceniano wpływ temperatury nebulizacji na odparowanie fazy ruchomej, stabilność tła i jakość integracji pików. Badano zakres temperatur 35–70°C, a ostatecznie zastosowano 35°C. Przyjęte warunki pracy detektora obejmowały: power function 1,00, częstotliwość akwizycji 2 Hz, filter 5, szerokość piku 0,2 min oraz ciśnienie powietrza zasilającego 5,0 bar. Dla danych CAD zastosowano model regresji kwadratowej, z ważeniem 1/x lub $1/x^2$ w zależności od analitu.

Dobór warunków detekcji UV-VIS/DAD i CORONA CAD miał więc charakter komplementarny. Detekcja DAD umożliwiała rejestrację odpowiedzi związków absorbujących promieniowanie UV oraz pomocniczą ocenę widmową pików. Detekcja CAD umożliwiała natomiast rejestrację odpowiedzi wielu nielotnych lub słabo lotnych analitów niezależnie od obecności chromoforu. Połączenie obu detektorów poszerzało zakres informacji analitycznej uzyskiwanej w ramach jednej metody UHPLC, nie zapewniało jednak jednoznacznego potwierdzenia tożsamości analitów, jakie umożliwiają techniki spektrometrii mas.

Widma UV/DAD zarejestrowane dla roztworów wzorcowych kannabinoidów wykazały zróżnicowanie profili absorpcyjnych analizowanych związków. Część analitów, takich jak CBD, CBDV, CBG, THCV, Δ^9-THC, CBL oraz Δ^9-THCP, charakteryzowała się dominującą absorpcją w krótkofalowym zakresie UV, około 205-211 nm oraz słabszym pasmem w okolicy 275-280 nm. W przypadku form kwasowych, takich jak CBDVA, CBDA, CBGA i Δ^9-THCA, obserwowano bardziej złożony przebieg widma, z dodatkowymi pasmami w zakresie około 220-230 nm, 265-272 nm oraz miejscami powyżej 300 nm. Bardziej charakterystyczne profile widmowe

wykazywały również CBN, CBCVA, CBNA i CBCA, dla których widoczne były pasma w dłuższym zakresie UV.

Różnice w profilach widmowych wykorzystywano pomocniczo w ocenie selektywności wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD. Widma pików w próbkach porównywano z widmami odpowiednich roztworów wzorcowych, a w próbkach rzeczywistych kontrolowano również sygnały w pobliżu czasów retencji analizowanych kannabinoidów. Identyfikację opierano na zgodności czasu retencji, kolejności elucji oraz profilu widmowego DAD. Widma nie stanowiły samodzielnego potwierdzenia tożsamości analitów, lecz dodatkowe kryterium oceny piku i kontroli potencjalnej współelucji.

5.4. Finalne warunki metody

Finalne warunki metody UHPLC ustalono dla 19 kannabinoidów. W ramach oceny przydatności systemu ostatni analit, Δ^9-THCP, eluował po 25,98 min w wariancie UV-VIS/DAD oraz po 26,03 min w detekcji CAD. Całkowity czas analizy wynosił 30 min.

Rozdzielanie prowadzono na kolumnie Accucore C18 o wymiarach 150 × 3,0 mm i średnicy cząstek 2,6 µm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina woda/acetonitryl 30:70 v/v z dodatkiem 0,1% v/v kwasu octowego. Zastosowano elucję izokratyczną, przepływ fazy ruchomej 0,5 ml/min, temperaturę kolumny 20°C, temperaturę autosamplera 25°C oraz objętość nastrzyku 5 µl. Przed rozpoczęciem analiz układ równoważono przez 30 min przy nominalnym przepływie fazy ruchomej.

Dla detekcji CORONA CAD zastosowano detektor CAD Flex D20. Detektor pracował z wykorzystaniem filtrowanego i osuszonego powietrza dostarczanego z kompresora bezolejowego. Ciśnienie powietrza zasilającego detektor wynosiło 5,0 bar. Przyjęte ustawienia obejmowały: power function 1,00, częstotliwość akwizycji 2 Hz, filtr 5, szerokość piku 0,2 min oraz temperaturę nebulizacji 35°C. Warunki te były zgodne z wymaganiami detekcji aerozolowej i umożliwiały uzyskanie stabilnej odpowiedzi detektora przy zastosowanej fazie ruchomej. Pełne zestawienie warunków metody z detekcją CORONA CAD przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 10. Finalne warunki metody UHPLC-CORONA CAD.

Parametr	Wartość
Układ chromatograficzny	Vanquish Flex UHPLC
Kolumna	Accucore C18, 150 × 3,0 mm, 2,6 µm
Tryb elucji	izokratyczny
Faza ruchoma	woda/acetonitryl 30:70 v/v + 0,1% v/v kwasu octowego
Przepływ	0,5 ml/min
Temperatura kolumny	20°C
Temperatura autosamplera	25°C
Objętość nastrzyku	5 µl
Czas analizy	30 min
Detektor	CORONA CAD / CAD Flex D20
Gaz nebulizujący	filtrowane i osuszone powietrze
Ciśnienie powietrza	5,0 bar
Temperatura nebulizacji	35°C
Power function	1,00
Data rate	2 Hz
Filter	5
Peak width	0,2 min

Dla wariantu UV-VIS/DAD zastosowano detektor Vanquish Flex DAD. Jako długość fali analitycznej przyjęto 278 nm. Przy tej długości fali rejestrowano sygnał wykorzystywany do obliczeń ilościowych oraz oceny parametrów walidacyjnych. Równolegle zbierano widma 3D DAD w zakresie 190-400 nm, przy częstotliwości akwizycji 5 Hz. Widma te wykorzystywano pomocniczo do oceny zgodności profilu widmowego pików z roztworami wzorcowymi oraz do kontroli jakości chromatogramów. Detekcja DAD wspomagała identyfikację analitów, ale nie stanowiła samodzielnego potwierdzenia struktury związku. Szczegółowe warunki detekcji UV-VIS/DAD zestawiono w Tabeli 10.

Tabela 11. Finalne warunki detekcji UHPLC-UV-VIS/DAD.

Parametr	Wartość
Detektor	Vanquish Flex DAD
Zakres rejestracji widm	190-400 nm
Częstotliwość akwizycji	5 Hz
Długość fali analitycznej	278 nm
Rodzaj danych	chromatogram przy 278 nm oraz widma 3D DAD
Zastosowanie widm 3D	pomocnicza ocena zgodności widmowej pików ze wzorcami
Zastosowanie sygnału 278 nm	obliczenia ilościowe i walidacja wariantu UV-VIS/DAD

Końcowe warunki metody przyjęto jako warunki nominalne. W Tabelach 149-164 przedstawiono wyniki badań wpływu zmian przepływu fazy ruchomej i temperatury kolumny na czasy retencji, powierzchnie pików, wyniki ilościowe, rozdzielczość chromatograficzną, asymetrię pików, liczbę półek teoretycznych oraz stosunek sygnału do szumu. Dodatkowe wyniki badań rozwojowych, obejmujące ocenę wpływu ustawienia Power Function oraz temperatury odparowania detektora CAD, zestawiono w Tabelach 165-171.

Uzyskane wyniki pozwoliły porównać odpowiedź metody w warunkach nominalnych i po kontrolowanych zmianach wybranych parametrów. Wyniki te stanowią charakterystykę wrażliwości procedury na zmiany warunków analizy i nie służą do jednoznacznej klasyfikacji poszczególnych parametrów jako spełniających lub niespełniających kryterium odporności. W analizach rutynowych stosowano nominalne warunki metody oraz kontrolę przydatności systemu chromatograficznego przed rozpoczęciem sekwencji analitycznej.

5.5. Regiony krytyczne chromatogramu

Regiony krytyczne chromatogramu zdefiniowano jako obszary w których eluowały sąsiadujące pary analitów o ograniczonej rozdzielczości chromatograficznej. Ich wyznaczenie umożliwiło wskazanie fragmentów chromatogramu wymagających szczególnej kontroli podczas analizy. Miało to znaczenie ze względu na szeroki zakres badanych kannabinoidów oraz ich podobieństwo strukturalne.

Kontrola regionów krytycznych była szczególnie istotna w wariancie z detekcją Corona CAD. Detektor ten nie dostarcza informacji widmowej ani informacji o stosunku masy do ładunku. Nie umożliwia zatem niezależnego potwierdzenia tożsamości analitu ani oceny czystości piku.

Do par krytycznych zaliczono CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA. W wariancie UV-Vis/DAD uzyskane wartości współczynnika rozdzielczości (Rs) wynosiły odpowiednio 1,22, 0,99 i 1,20, natomiast dla detecji Corona CAD - odpowiednio 1,19, 0,99 i 1,18 (Rys. 11). Szczegółową charakterystykę regionów krytycznych dla detekcji Corona CAD przedstawiono w Tabeli 11, a dla detekcji UV-Vis/DAD – w Tabeli 12.Wartości te były niższe od przyjętego dla pozostałych par sąsiadujących kryterium $R_s \geq 1,5$, jednak spełniały ustalone dla par krytycznych kryterium $R_s \geq 0,9$.

Tabela 12. Regiony krytyczne chromatogramu dla detekcji CORONA CAD.

Para krytyczna	Charakter problemu	Uzyskana rozdzielczość Rs	Przyjęte kryterium	Zalecenie interpretacyjne
CBND/CBDV	bliska elucja związków mniejszościowych	1,19	≥ 0,9	kontrola retencji i integracji
Δ^9-THCA/CBC	najniższa rozdzielczość spośród par krytycznych	0,99	≥ 0,9	szczególna kontrola przypisania piku
CBCA/CBLA	ograniczona separacja w późniejszej części chromatogramu	1,18	≥ 0,9	kontrola stabilności retencji i tła

Dla par krytycznych przyjęto odrębne kryterium rozdzielczości ze względu na cel metody, którym było profilowanie szerokiego zakresu kannabinoidów podczas jednej analizy. Ocena tych regionów obejmowała rozdzielczość chromatograficzną, stabilność czasów retencji, zachowanie kolejności elucji, poprawność integracji oraz porównanie z mieszaniną wzorcową analizowaną w tej samej sekwencji.

Spełnienie kryterium Rs ≥ 0,9 nie oznaczało rozdzielenia do linii podstawowej ani nie stanowiło potwierdzenia braku wzajemnego wpływu sąsiadujących sygnałów na wynik oznaczenia. Odrębne oznaczanie analitów w tych regionach oceniano łącznie, uwzględniając selektywność, dokładność, precyzję, retencję oraz sposób integracji pików.

Tabela 13. Regiony krytyczne chromatogramu dla detekcji UV-VIS/DAD.

Para krytyczna	Charakter problemu	Uzyskana rozdzielczość Rs	Przyjęte kryterium	Zalecenie interpretacyjne
CBND/CBDV	bliska elucja związków mniejszościowych	1,22	≥ 0,9	kontrola retencji i integracji
Δ^9-THCA/CBC	najniższa rozdzielczość spośród par krytycznych	0,99	≥ 0,9	szczególna kontrola przypisania piku
CBCA/CBLA	ograniczona separacja w późniejszej części chromatogramu	1,20	≥ 0,9	kontrola stabilności retencji i tła

Szczególnej uwagi wymagał region Δ^9-THCA/CBC. Dla tej pary uzyskano najniższą rozdzielczość spośród zdefiniowanych par krytycznych, wynoszącą (Rs = 0,99) w obu wariantach detekcji. Przypisanie i integracja pików w tym regionie wymagały zatem szczególnej kontroli.

W wariancie UV-VIS/DAD porównanie widm stanowiło informację pomocniczą podczas przypisywania pików i kontroli współelucji. Podobieństwo profili absorpcyjnych kannabinoidów ograniczało swoistość tej oceny. Dane DAD nie zastępowały kryterium rozdzielczości chromatograficznej.

Regiony krytyczne powinny być kontrolowane w każdej sekwencji analitycznej. Ocenie powinny podlegać czasy retencji, rozdzielczość, kształt pików, stabilność linii bazowej, sposób integracji oraz obecność sygnałów matrycowych mogących zakłócać oznaczenie. Chromatogram próbki należy porównywać z aktualnym chromatogramem mieszaniny wzorcowej analizowanej w tej samej sekwencji.

Sygnały zakłócające w regionach krytycznych wymagają oceny przed zatwierdzeniem wyniku. Gdy matryca uniemożliwia wiarygodne przypisanie albo integrację piku, sygnału nie interpretuje się ilościowo, a ograniczenie dokumentuje się wraz z wynikiem.

6. Walidacja i ocena przydatności metody

Walidację przeprowadzono w celu oceny przydatności opracowanej wspólnej procedury rozdzielania UHPLC, stosowanej z dwoma wariantami detekcji, do zamierzonego zastosowania analitycznego. Zakres walidacji obejmował selektywność, przydatność systemu chromatograficznego, rozdzielczość chromatograficzną, model kalibracyjny i zakres roboczy, dokładność, precyzję, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności oraz wpływ kontrolowanych zmian warunków analitycznych.

W ramach badania odporności oceniano wpływ zmian przepływu fazy ruchomej oraz temperatury kolumny na czasy retencji, powierzchnie pików, wyniki ilościowe i parametry chromatograficzne. Szczegółowe wyniki przedstawiono w Tabelach 149-164. Dodatkowe dane dotyczące wpływu ustawienia funkcji Power Function oraz temperatury odparowania detektora CAD, uzyskane na etapie opracowywania metody, zestawiono w Tabelach 165-171.

Wyniki przedstawione w Tabelach 149-171 wykorzystano do charakterystyki wrażliwości procedury na kontrolowane zmiany warunków analitycznych, bez jednoznacznej klasyfikacji wszystkich badanych parametrów jako spełniających albo niespełniających kryteria odporności.

Szczególną uwagę zwrócono na specyfikę detekcji CORONA CAD. Detektor CAD nie dostarcza informacji widmowej ani informacji o stosunku masy do ładunku. Identyfikację analitów opierano zatem na zgodności czasów retencji i kolejności elucji z mieszaniną wzorcową. Wiarygodność oznaczeń zależała również od jakości rozdzielenia chromatograficznego, powtarzalności odpowiedzi detektora, stabilności czasów retencji oraz kontroli krytycznych regionów chromatogramu. Ze względu na nieliniową charakterystykę odpowiedzi detektora CAD dla poszczególnych analitów stosowano modele regresji kwadratowej z ważeniem $1/x$ lub $1/x^2$, dobieranym indywidualnie.

W wariancie UHPLC-UV-VIS/DAD parametry walidacyjne oceniono na podstawie powierzchni pików rejestrowanych przy długości fali 278 nm. Sygnał ten wykorzystywano do wyznaczania liniowych krzywych kalibracyjnych i obliczenia wyników ilościowych. Widma 3D DAD rejestrowane w zakresie 190-400 nm wykorzystywano pomocniczo do oceny zgodności profilu widmowego pików z profilami uzyskanymi dla roztworów wzorcowych.

Walidację przeprowadzono w zakresie odpowiadającym zamierzonemu zastosowaniu procedury, obejmującemu rozdzielenie 19 kannabinoidów oraz ilościowe oznaczenie wybranych analitów w badanych próbkach roślinnych i olejowych. Parametry posiadające określone kryteria akceptacji oceniono przez bezpośrednie porównanie wyników z wartościami przyjętymi jako kryteria. W przypadku parametrów bez ustalonych kryteriów liczbowych wyniki wykorzystywano do opisowej oceny działania procedury. Stosunek sygnału do szumu rejestrowany podczas oceny przydatności systemu chromatograficznego traktowano jako parametr pomocniczy opisujący jakość sygnału, a nie jako kryterium akceptacji lub odrzucenia sekwencji analitycznej.

6.1. Selektywność i interferencje

Selektywność metody oceniano poprzez sprawdzenie obecności sygnałów pochodzących od rozpuszczalnika, nośników olejowych oraz składników matrycy roślinnej w oknach retencji badanych kannabinoidów. Do oceny zastosowano blank rozpuszczalnikowy, olej MCT, olej z nasion konopi oraz zastępczą matrycę roślinną. Jako matrycę roślinną wykorzystano sproszkowane liście czarnej herbaty. Materiał ten nie stanowił rzeczywistej matrycy konopnej pozbawionej kannabinoidów, lecz pełnił funkcję zastępczej kontroli roślinnej.

Kryterium akceptacji stanowił brak pików interferujących z analitami w ich oknach retencji, określonych na podstawie analizy substancji odniesienia. Dodatkowo oceniano, czy tło chromatograficzne nie wpływa istotnie na integrację pików. Analizę prowadzono przez porównanie chromatogramów blanku rozpuszczalnikowego, próbek kontrolnych, matryc olejowych, matrycy roślinnej oraz mieszaniny wzorcowej zawierającej 19 kannabinoidów. Zestawienie zastosowanych materiałów kontrolnych oraz wyników oceny selektywności przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 14. Ocena selektywności metody na podstawie analizy blanku, matryc olejowych i matrycy roślinnej zastępczej.

Materiał kontrolny	Detektor	Okna retencji	Wynik
Blank rozpuszczalnikowy	DAD/CAD	19 analitów	brak interferencji
Olej MCT	DAD/CAD	19 analitów	brak interferencji
Olej z nasion konopi	DAD/CAD	19 analitów	brak interferencji
Czarna herbata	DAD/CAD	19 analitów	brak interferencji

W wariancie UHPLC-UV-VIS/DAD dane widmowe wykorzystano jako element wspomagający ocenę selektywności. Dla każdego analitu porównywano widmo UV zarejestrowane w punkcie maksimum piku z widmem odpowiedniego roztworu wzorcowego. Zgodność profilu widmowego traktowano jako dodatkowy element potwierdzający poprawność przypisania piku, natomiast podstawę identyfikacji stanowiły czas retencji, kolejność elucji oraz brak sygnałów interferujących w odpowiednim oknie retencji.

W przypadku pików zlokalizowanych w obszarach o ograniczonej rozdzielczości chromatograficznej porównywano profile widmowe rejestrowane na zboczu narastającym w maksimum oraz na zboczu opadającym piku. Stwierdzenie różnic pomiędzy profilami traktowano jako przesłankę do weryfikacji poprawności przypisania i integracji sygnału. Na podstawie samych widm DAD nie przypisywano przyczyny niezgodności.

W wariancie z detekcją CAD podstawowe znaczenie miały brak współelucji oraz stabilność czasu retencji, ponieważ detektor ten nie dostarcza informacji widmowej umożliwiającej dodatkowe potwierdzenie tożsamości piku.

W analizowanych blankach i materiałach kontrolnych nie stwierdzono obecności sygnałów interferujących z sygnałami analitów w odpowiadających im oknach retencji. Ocena obejmowała blank rozpuszczalnikowy, nośniki olejowe oraz zastępczą matrycę roślinną. Uzyskany wynik potwierdza brak obserwowanych interferencji w zastosowanych materiałach kontrolnych, nie stanowi jednak podstawy do wnioskowania o selektywności procedury względem wszystkich możliwych matryc konopnyc

6.2. Przydatność systemu chromatograficznego

Przydatność systemu chromatograficznego oceniono na podstawie pięciu kolejnych nastrzyków mieszaniny wzorcowej kannabinoidów o stężeniu 20 µg/ml. Badanie przeprowadzono oddzielnie dla wariantu z detekcją UV-Vis/DAD oraz wariantu z detekcją Corona CAD.

W wariancie UV-Vis/DAD oceniano powierzchnie pików zarejestrowanych przy długości fali 278 nm. W wariancie Corona CAD oceniano powierzchnie pików, wyrażone w pA×min, tj. jako całkę z sygnału detektora w czasie.

Ocena obejmowała powtarzalność czasów retencji i powierzchni pików, rozdzielczość chromatograficzną oraz liczbę półek teoretycznych. Dodatkowo rejestrowano stosunek sygnału do szumu. Parametr ten miał charakter pomocniczy i nie stanowił formalnego kryterium akceptacji (Tabela 14).

Badanie przydatności systemu chromatograficznego stanowiło kontrolę sprawności układu wykonywaną przed rozpoczęciem sekwencji analitycznej. Kontrola ta była szczególnie istotna ze względu na obecność par analitów o ograniczonej rozdzielczości. W przypadku wariantu Corona CAD dodatkowym ograniczeniem był brak informacji widmowej umożliwiającej pomocniczą ocenę tożsamości rejestrowanych sygnałów.

Tabela 15. Kryteria akceptacji przydatności systemu chromatograficznego.

Parametr	Kryterium
Powtarzalność czasu retencji	RSD ≤ 1,0%
Powtarzalność powierzchni piku	RSD ≤ 5,0%
Liczba półek teoretycznych	N ≥ 2000
Rozdzielczość pików dobrze rozdzielonych	Rs ≥ 1,5
Rozdzielczość par krytycznych	Rs≥ 0,9

Dla par CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA przyjęto odrębne, właściwe dla opracowanej procedury kryterium rozdzielczości, wynoszące Rs ≥ 0,9. Wartość ta została przyjęta ze względu na ograniczoną rozdzielczość tych par w zastosowanych warunkach chromatograficznych i nie była utożsamiana z uzyskaniem rozdzielenia do linii bazowej. W regionach krytycznych kontrolowano również powtarzalność retencji, kolejność elucji oraz sposób integracji pików.

Spełnienie kryterium Rs ≥ 0,9 nie oznaczało osiągnięcia rozdzielczości Rs ≥ 1,5 przyjętej dla pozostałych par. W wariancie UV-VIS/DAD widma DAD stosowano pomocniczo podczas identyfikacji sygnałów. Porównanie widm nie zastępowało kryterium rozdzielczości chromatograficznej.

Wyniki badania przydatności systemu chromatograficznego dla wariantu UV-Vis/DAD przedstawiono w Tabeli 15. Dla wszystkich analitów spełniono kryteria dotyczące

powtarzalności czasów retencji, powtarzalności powierzchni pików oraz liczby półek teoretycznych. Dla par analitów niezakwalifikowanych jako krytyczne uzyskane wartości rozdzielczości spełniały przyjęte kryterium Rs ≥ 1,5.

Dla par krytycznych uzyskano wartości rozdzielczości Rs wynoszące 1,22 dla CBND/CBDV, 0,99 dla Δ^9-THCA/CBC oraz 1,20 dla CBCA/CBLA. Wszystkie uzyskane wartości spełniały przyjęte dla tych par kryterium rozdzielczości Rs ≥ 0,9.

Tabela 16. Wyniki oceny przydatności systemu chromatograficznego dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Analit	Średni tR [min]	RSD tR [%]	Średnia powierzchnia piku [mAU×min]	RSD powierzchni piku [%]	Rs	N	S/N
CBGO	2,51	0,00	0,7285	0,31	3,99	9177	30,44
CBDVA	2,99	0,00	6,8167	0,16	2,19	7462	232,56
CBND	3,28	0,00	2,1828	0,28	1,22	11649	85,40
CBDV	3,43	0,00	0,8016	1,11	7,41	11871	29,56
CBDA	4,49	0,00	5,2500	0,18	2,13	12124	153,36
CBGA	4,85	0,00	5,6927	0,16	2,55	12398	151,70
CBG	5,28	0,00	0,6607	0,31	2,04	16138	17,78
CBD	5,62	0,00	0,6758	0,33	3,32	19384	19,86
THCV	6,17	0,07	0,9774	0,24	14,99	21055	33,74
CBN	9,21	0,06	15,2691	0,23	1,76	24203	375,70
CBCVA	9,70	0,06	4,2892	1,49	3,50	14396	74,30
CBNA	11,26	0,08	19,4974	0,35	2,20	13516	345,34
Δ^9-THC	12,03	0,05	0,9831	1,49	8,68	24994	21,86
CBL	14,91	0,06	0,8659	0,26	3,29	26931	72,20
Δ^9-THCA	16,22	0,06	7,0622	0,26	0,99	22132	505,20
CBC	16,65	0,07	7,5110	0,35	6,40	24668	537,76
CBCA	19,77	0,05	3,5568	0,32	1,20	20268	392,86
CBLA	20,45	0,10	4,6857	0,32	9,46	22350	507,60
Δ^9-THCP	25,98	0,06	0,8987	0,53	n.a.	27306	73,96

tR - czas retencji; RSD - względne odchylenie standardowe; Rs - rozdzielczość chromatograficzna; N - liczba półek teoretycznych; S/N - stosunek sygnału do szumu; n.a. - nie dotyczy.

Wartości RSD czasu retencji mieściły się w zakresie 0,00-0,10%, natomiast wartości RSD powierzchni pików wynosiły 0,16-1,49%. Dla wszystkich analitów spełniono kryteria RSD czasu retencji ≤ 1,0%, RSD powierzchni piku ≤ 5,0% oraz N ≥ 2000. Liczba półek teoretycznych mieściła się w zakresie 7462–27306. Rozdzielczość par krytycznych wynosiła 1,22 dla CBND/CBDV, 0,99 dla Δ^9-THCA/CBC oraz 1,20 dla CBCA/CBLA, spełniając przyjęte kryterium

R_s ≥ 0,9. Stosunek sygnału do szumu wynosił od 17,78 do 537,76 i miał charakter parametru pomocniczego.

Tabela 16 przedstawia wyniki oceny przydatności systemu chromatograficznego dla wariantu Corona CAD. Wartości RSD czasu retencji mieściły się w zakresie 0,00-0,14%, natomiast wartości RSD powierzchni pików wynosiły 1,60-4,36%. Dla wszystkich analitów spełniono przyjęte kryteria: RSD czasu retencji ≤ 1,0%, RSD powierzchni piku ≤ 5,0% oraz N ≥ 2000. Liczba półek teoretycznych mieściła się w zakresie 6106–33734. Dla par krytycznych uzyskano wartości rozdzielczości Rs wynoszące 1,19 dla CBND/CBDV, 1,00 dla Δ^9-THCA/CBC oraz 1,18 dla CBCA/CBLA, spełniające przyjęte dla tych par kryterium Rs ≥ 0,9. Stosunek sygnału do szumu wynosił 11,5-97,8 i traktowano go jako parametr pomocniczy.

Tabela 17. Wyniki oceny przydatności systemu chromatograficznego dla detekcji CORONA CAD.

Analit	Średni tR [min]	RSD tR [%]	Średnia powierzchnia piku [pA×min]	RSD powierzchni piku [%]	Rs	N	S/N
CBGO	2,56	0,00	0,85	1,60	3,63	7984	97,8
CBDVA	3,05	0,14	1,19	2,23	1,95	6106	90,8
CBND	3,33	0,00	0,91	3,09	1,19	10369	82,6
CBDV	3,48	0,00	0,40	1,78	7,08	12930	39,3
CBDA	4,55	0,08	1,07	2,96	1,86	10043	74,0
CBGA	4,90	0,00	1,33	4,19	2,29	9928	82,1
CBG	5,34	0,09	1,45	2,95	1,85	13114	94,1
CBD	5,67	0,06	0,95	3,44	3,21	17454	66,9
THCV	6,22	0,06	0,73	4,09	14,36	21477	53,8
CBN	9,26	0,04	1,40	2,39	1,69	21091	58,1
CBCVA	9,75	0,04	1,32	3,75	4,22	13506	41,6
CBNA	11,32	0,06	2,38	2,94	2,14	12402	65,0
Δ^9-THC	12,08	0,06	1,29	2,20	9,18	25334	45,2
CBL	14,96	0,03	0,68	2,29	3,41	33734	26,9
Δ^9-THCA	16,28	0,04	1,14	3,17	1,00	21155	35,2
CBC	16,71	0,10	1,12	3,06	6,37	26308	35,3
CBCA	19,83	0,08	1,36	3,72	1,18	19277	20,2
CBLA	20,50	0,09	0,77	4,36	9,23	21614	11,5
Δ^9-THCP	26,03	0,09	1,68	4,18	n.a.	26161	19,7

tR - czas retencji; SD - odchylenie standardowe; RSD - względne odchylenie standardowe; Rs - rozdzielczość chromatograficzna, wartość w wierszu odnosi się do pary tworzonej z kolejnym pikiem; N - liczba półek teoretycznych; S/N - stosunek sygnału do szumu; n.a. - nie dotyczy.

Stosunek sygnału do szumu rejestrowano jako parametr pomocniczy opisujący jakość sygnału poszczególnych analitów. Nie wykorzystywano go jako kryterium dopuszczenia ani odrzucenia sekwencji analitycznej.

Na podstawie przyjętych kryteriów system chromatograficzny uznano za przydatny do realizacji analiz w obu wariantach detekcji. W obu przypadkach uzyskano powtarzalne czasy retencji i powierzchnie pików oraz wymaganą sprawność chromatograficzną. Regiony obejmujące pary CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA zakwalifikowano jako krytyczne i wymagające kontroli w każdej sekwencji analitycznej.

6.3. Kalibracja, model odpowiedzi i zakres roboczy

Zależność między stężeniem analitu a odpowiedzią detektora, wyrażoną jako powierzchnia piku chromatograficznego, oceniono oddzielnie dla wariantu z detekcją UHPLC-UV-Vis/DAD oraz UHPLC-Corona CAD. Zastosowane modele regresji, współczynniki determinacji, zakresy robocze oraz pozostałe parametry kalibracyjne przedstawiono w Tabelach 17 i 18.

Tabela 18. Modele kalibracyjne i zakresy robocze dla wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD.

Analit	Sygnał	Model	Zakres roboczy [µg/ml]	Równanie krzywej	R^2
CBGO	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,0309x	0,9989
CBDVA	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,2139x	0,9994
CBND	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,0772x	0,9984
CBDV	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,0303x	0,9983
CBDA	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,1755x	0,9989
CBGA	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,1914x	0,9991
CBG	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,0243x	0,9998
CBD	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,0268x	0,9992
THCV	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,0353x	0,9995
CBN	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,5261x	0,9994
CBCVA	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,1411x	0,9998
CBNA	278 nm	liniowy	2,4-250	y = 0,337x	0,9993
Δ^9-THC	278 nm	liniowy	2-250	y = 0,0291x	0,9993
CBL	278 nm	liniowy	2-250	y = 0,0303x	0,9998
Δ^9-THCA	278 nm	liniowy	6-250	y = 0,2463x	0,9986
CBC	278 nm	liniowy	1,8-250	y = 0,2531x	0,9994
CBCA	278 nm	liniowy	1-250	y = 0,1384x	0,9999
CBLA	278 nm	liniowy	1,5-250	y = 0,1627x	0,9983
Δ^9-THCP	278 nm	liniowy	5-250	y = 0,0323x	0,9993

Tabela 19. Modele kalibracyjne i zakresy robocze dla wariantu UHPLC-CORONA CAD.

Analit	Sygnał	Model	Zakres roboczy [µg/ml]	Równanie krzywej	R^2
CBGO	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	5-250	$y = -0{,}000034x^2+0{,}0373x+-0{,}0387$	0,9989
CBDVA	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	5-250	$y = -0{,}000066x^2+0{,}0403x+0{,}0732$	0,9974
CBND	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	5-250	$y = -0{,}000057x^2+0{,}0394x+0$	0,9976
CBDV	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	5-250	$y = -0{,}000013x^2+0{,}0249x+-0{,}0584$	0,9987
CBDA	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	5-250	$y = -0{,}000069x^2+0{,}041x+0{,}0533$	0,9976
CBGA	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	5-200	$y = -0{,}000071x^2+0{,}0448x+0{,}1053$	0,9987
CBG	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	5-250	$y = -0{,}000068x^2+0{,}0485x+0{,}0942$	0,9984
CBD	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	5-250	$y = -0{,}000061x^2+0{,}0426x+-0{,}042$	0,9971
THCV	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	5-250	$y = -0{,}00004x^2+0{,}0347x+-0{,}0656$	0,9978
CBN	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	5-200	$y = -0{,}000083x^2+0{,}0504x+0{,}0619$	0,9985
CBCVA	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	10-200	$y = -0{,}000039x^2+0{,}0457x+-0{,}0081$	0,9987
CBNA	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	7,5-250	$y = -0{,}000059x^2+0{,}0443x+0{,}0193$	0,998
Δ^9-THC	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	10-250	$y = -0{,}000065x^2+0{,}0564x+0{,}0287$	0,9996
CBL	sygnał CAD	kwadratowy $1/x^2$	6-250	$y = -0{,}000018x^2+0{,}0353x+-0{,}1217$	0,9973
Δ^9-THCA	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	10-250	$y = -0{,}000044x^2+0{,}05x+0{,}0308$	0,9992
CBC	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	6-250	$y = -0{,}000039x^2+0{,}0455x+-0{,}0375$	0,9987
CBCA	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	5-250	$y = -0{,}000028x^2+0{,}0459x+0{,}0344$	0,9991
CBLA	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	10-250	$y = 0{,}000004x^2+0{,}0244x+0{,}0776$	0,9983
Δ^9-THCP	sygnał CAD	kwadratowy 1/x	10-250	$y = -0{,}000037x^2+0{,}0518x+0{,}2581$	0,9984

Dla każdego poziomu kalibracyjnego wykonano pięć powtórzeń (n = 5). Uzyskane wyniki wykorzystano do wyznaczenia parametrów modeli regresji, współczynników determinacji R^2, stężeń obliczonych zwrotnie oraz błędów względnych.

W wariancie UHPLC-UV-Vis/DAD sygnał wszystkich analitów rejestrowano przy długości fali 278 nm. Dla wszystkich 19 kannabinoidów zastosowano model regresji liniowej. Górna granica zakresu roboczego wynosiła 250 µg/ml dla wszystkich analitów. Zakres 1-250 µg/ml zastosowano dla CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN, CBCVA i CBCA. Dolne granice pozostałych zakresów wynosiły 1,5 µg/ml dla CBLA, 1,8 µg/ml dla CBC, 2 µg/ml dla Δ^9-THC i CBL, 2,4 µg/ml dla CBNA, 5 µg/ml dla Δ^9-THCP oraz 6 µg/ml dla Δ^9-THCA. Wartości R^2 mieściły się w zakresie 0,9983-0,9999.

W wariancie UHPLC-Corona CAD zastosowano model regresji kwadratowej z ważeniem 1/x lub $1/x^2$, dobieranym indywidualnie dla poszczególnych analitów. Ważenie 1/x zastosowano dla CBGA, CBG, CBN, Δ^9-THC, Δ^9-THCA, CBC, CBCA, CBLA i Δ^9-THCP, natomiast $1/x^2$ dla CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBD, THCV, CBNA i CBL. Zakres 5-250 µg/ml

zastosowano dla CBGO, CBDVA, CBND, CBDV, CBDA, CBG, CBD, THCV i CBCA, natomiast dla CBGA, CBCVA i CBN przyjęto zakres 5–200 µg/mL. Pozostałe zakresy wynosiły 6–250 µg/ml dla CBL ,
i CBC, 7,5-250 µg/ml dla CBNA oraz 10–250 µg/ml dla CBCVA, Δ^9-THC, Δ^9-THCA, CBLA i Δ^9-THCP. Wartości R^2 mieściły się w zakresie 0,9971-0,9996.

W porównaniu z wariantem UHPLC-UV-Vis/DAD zastosowanie detekcji Corona CAD wymagało zastosowania wyższych dolnych granic zakresów roboczych. Dla wszystkich 19 analitów dolna granica zakresu roboczego była niższa w wariancie UV-Vis/DAD niż w wariancie Corona CAD.

Współczynnik determinacji R^2 traktowano jako parametr pomocniczy opisujący stopień dopasowania modelu kalibracyjnego i nie stosowano go jako samodzielnego kryterium akceptacji. Zgodność modeli oceniano na podstawie stężeń obliczonych zwrotnie oraz odpowiadających im błędów względnych (RE). Poziom kalibracyjny powyżej granicy oznaczalności uznawano za zgodny, jeżeli bezwzględna wartość RE nie przekraczała 15%, natomiast dla najniższego poziomu kalibracyjnego, odpowiadającego LOQ danego analitu, stosowano kryterium $|RE| \leq 20\%$. Model uznawano za akceptowalny, jeżeli wymagania te były spełnione dla wszystkich poziomów kalibracyjnych w deklarowanym zakresie roboczym, w tym dla poziomu najniższego i najwyższego.

6.4. Dokładność i precyzja

Precyzję oceniano na podstawie trzech wyników uzyskanych dla każdego analitu. Kryterium akceptacji ustalono na poziomie RSD ≤ 5,0%. Zestawienie wyników oceny precyzji i dokładności metody, wraz z przyjętymi kryteriami akceptacji, przedstawiono w Tabeli 19.

W badaniu powtarzalności, którego wyniki przedstawiono w Tabeli 108, dla większości analitów zastosowano stężenie 5 µg/ml, natomiast dla Δ9-THC i CBC - 10 µg/ml. Uzyskane wartości RSD spełniły przyjęte kryterium akceptacji dla wszystkich ocenianych analitów. Najwyższą wartość RSD odnotowano dla CBGA.

W Tabelach 109 i 110 przedstawiono wyniki dwóch dodatkowych serii oznaczeń, przeprowadzonych oddzielnie dla wariantów detekcji CORONA CAD i UV-VIS/DAD, określonych

jako badanie precyzji pośredniej. W obu wariantach wszystkie uzyskane wartości RSD były niższe od przyjętego limitu 5,0%. Najwyższą wartość dla detekcji CORONA CAD uzyskano dla CBGA, natomiast dla UV-VIS/DAD - dla CBCVA.

Tabela 20. Zestawienie wyników precyzji i dokładności metody na podstawie dostępnych danych.

Parametr	Zakres/poziom	Wynik	Kryterium	Ocena/komentarz
Powtarzalność	n = 3; poziom zależny od analitu	RSD 0,13-4,63%; 19/19 wyników ≤ 5,0%	RSD ≤ 5,0%	spełnione
Seria CAD opisana jako precyzja pośrednia	n = 3; poziom zależny od analitu	RSD 0,30-4,80%; 19/19 wyników ≤ 5,0%	RSD ≤ 5,0%	spełnione
Seria UV-VIS/DAD opisana jako precyzja pośrednia	n = 3; poziom zależny od analitu	RSD 0,20-4,41%; 19/19 wyników ≤ 5,0%	RSD ≤ 5,0%	spełnione
Dokładność/odzysk	3 oznaczenia na poziom; 264 średnie wartości odzysku	90,17-113,45%; 264 z 264 wyników w przyjętym zakresie	90-115%	Spełnione

n – liczba wyników wykorzystanych do obliczenia RSD lub średniego odzysku.

Uzyskane wyniki wskazują na dobrą precyzję opracowanej procedury. Wszystkie oceniane warianty oznaczeń spełniły przyjęte wymaganie dotyczące zmienności wyników, co świadczy o niewielkim rozproszeniu uzyskiwanych wartości w badanych warunkach. Zbliżony poziom zmienności obserwowany dla obu sposobów detekcji wskazuje ponadto, że zastosowany wariant detekcji nie wpływał istotnie na precyzję oznaczeń.

Dokładność oceniano na podstawie średniego odzysku obliczonego z trzech wyników uzyskanych na każdym poziomie stężenia. W Tabelach 111-148 przedstawiono 264 średnie wartości odzysku, z których wszystkie mieściły się w przyjętym zakresie akceptacji 90-115%. Oznacza to, że kryterium dokładności zostało spełnione dla wszystkich ocenianych kombinacji analitu i poziomu stężenia.

Uzyskane wyniki wskazują na prawidłową dokładność opracowanej procedury oraz brak istotnego obciążenia wyników w ocenianych warunkach. Spełnienie kryterium przez wszystkie analizowane wartości odzysku, obejmujące różne anality i poziomy stężeń, potwierdza odpowiednią dokładność metody.

Łączna ocena precyzji i dokładności potwierdziła, że opracowana procedura zapewnia odpowiednią powtarzalność i dokładność oznaczeń. Jest to szczególnie istotne w przypadku jednoczesnego oznaczania wielu kannabinoidów, różniących się właściwościami

fizykochemicznymi oraz odpowiedzią detektorów. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem przydatność procedury do ilościowej oceny badanych kannabinoidów.

6.5. Oszacowanie LOD i LOQ na podstawie S/N

Granicę wykrywalności i granicę oznaczalności oszacowano dla 19 kannabinoidów, oddzielnie dla wariantu z detekcją UV-Vis/DAD oraz wariantu z detekcją Corona CAD. Dla każdego ocenianego poziomu stężenia wykonano pięć nastrzyków. Stosunek sygnału do szumu (S/N) wyznaczono dla każdego chromatogramu, a następnie obliczono średnią arytmetyczną z pięciu wyników. Jako kryterium wyznaczenia LOD przyjęto średnią wartość S/N ≥ 3, natomiast dla LOQ - średnią wartość S/N ≥ 10. Uzyskane wartości LOD i LOQ należy zatem traktować jako granice oszacowane na podstawie kryterium stosunku sygnału do szumu.

Dla detekcji Corona CAD wartości LOD mieściły się w zakresie 1–5 µg/ml, natomiast wartości LOQ w zakresie 5–10 µg/ml. Szczegółowe wartości dla poszczególnych analitów wraz z czasami retencji przedstawiono w Tabeli 20.

Tabela 21. Zestawienie LOD i LOQ dla detekcji CORONA CAD.

Analit	Rt [min]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
CBGO	2,55	1,00	5
CBDVA	3,06	1,00	5
CBND	3,33	1,00	5
CBDV	3,48	1,00	5
CBDA	4,60	1,00	5
CBGA	4,96	1,00	5
CBG	5,39	1,00	5
CBD	5,72	1,00	5
THCV	6,29	1,00	5
CBN	9,40	1,00	5
CBCVA	10,01	5,00	10
CBNA	11,73	1,00	7,5
Δ^9-THC	12,27	5,00	10
CBL	15,26	1,00	6
Δ^9-THCA	16,66	5,00	10
CBC	17,00	5,00	6
CBCA	20,46	1,00	5
CBLA	21,05	5,00	10
Δ^9-THCP	26,66	1,00	10

W przypadku detekcji UV-Vis/DAD wartości LOD mieściły się w zakresie 1–5 µg/ml, a wartości LOQ w zakresie 1–6 µg/ml. Szczegółowe wyniki przedstawiono w Tabeli 21.

Tabela 22. Zestawienie LOD i LOQ dla detekcji UV-VIS/DAD.

Analit	Rt [min]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
CBGO	2,55	1,00	1,00
CBDVA	3,06	1,00	1,00
CBND	3,33	1,00	1,00
CBDV	3,48	1,00	1,00
CBDA	4,60	1,00	1,00
CBGA	4,96	1,00	1,00
CBG	5,39	1,00	1,00
CBD	5,72	1,00	1,00
THCV	6,29	1,00	1,00
CBN	9,40	1,00	1,00
CBCVA	10,01	1,00	1,00
CBNA	11,73	1,00	2,40
Δ^9-THC	12,27	1,00	2,00
CBL	15,26	1,00	2,00
Δ^9-THCA	16,66	5,00	6,00
CBC	17,00	1,00	1,80
CBCA	20,46	1,00	1,00
CBLA	21,05	1,00	1,50
Δ^9-THCP	26,66	1,00	5,00

Porównanie uzyskanych wyników wskazuje na korzystniejsze parametry czułości detekcji UV-Vis/DAD w odniesieniu do większości badanych kannabinoidów. Różnica pomiędzy zastosowanymi wariantami detekcji jest szczególnie widoczna dla wartości LOQ, które dla UV-Vis/DAD były niższe niż dla Corona CAD dla większości analitów. Wskazuje to na możliwość prowadzenia oznaczeń ilościowych na niższych poziomach stężeń przy zastosowaniu detekcji UV-Vis/DAD. Jednocześnie Corona CAD umożliwiała wykrywanie i oznaczanie całego ocenianego zestawu kannabinoidów, choć dla części z nich wymagała zastosowania wyższych poziomów stężeń.

Obserwowane różnice w wartościach LOD i LOQ pomiędzy poszczególnymi analitami wskazują, że uzyskiwana czułość była zależna od rodzaju oznaczanego związku oraz zastosowanego sposobu detekcji. Ma to szczególne znaczenie w przypadku jednoczesnego oznaczania wielu kannabinoidów, które mogą różnić się właściwościami fizykochemicznymi oraz intensywnością odpowiedzi detektora.

Wartości LOD i LOQ interpretowano łącznie z zakresem kalibracyjnym właściwym dla danego analitu i wariantu detekcji. Ilościową interpretację wyniku prowadzono wyłącznie wtedy, gdy stężenie analitu było równe lub wyższe od LOQ oraz mieściło się w odpowiednim zakresie roboczym. Sygnały znajdujące się pomiędzy LOD a LOQ raportowano jako <LOQ i nie interpretowano ich ilościowo, natomiast sygnały poniżej LOD oznaczano jako n.d.

Wartości LOD i LOQ odnoszą się do analizowanych roztworów oraz warunków zastosowanych w badaniu. W przypadku detekcji Corona CAD do obliczeń ilościowych stosowano model kwadratowy z ważeniem $1/x$ lub $1/x^2$, zgodnie z charakterystyką kalibracyjną poszczególnych analitów przedstawioną w Tabelach 18 i 88.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że opracowana procedura umożliwia wykrywanie oraz ilościowe oznaczanie wszystkich 19 analizowanych kannabinoidów. Zastosowanie dwóch wariantów detekcji pozwoliło na uzyskanie komplementarnych możliwości analitycznych, przy czym UV-Vis/DAD zapewniał na ogół niższe poziomy oznaczalności. Corona CAD, mimo wyższych wartości LOQ dla części analitów, umożliwiał oznaczanie całego badanego zestawu związków.

Z punktu widzenia zastosowania opracowanej procedury istotne jest również przyjęcie jednoznacznych zasad interpretacji wyników w pobliżu granic oznaczalności. Ograniczenie raportowania ilościowego do wyników nie niższych niż LOQ i jednocześnie mieszczących się w zakresie roboczym pozwala na rozróżnienie pomiędzy samą obecnością analitu a możliwością jego wiarygodnego oznaczenia ilościowego. Takie podejście zwiększa jednoznaczność interpretacji wyników uzyskiwanych dla próbek o niskiej zawartości kannabinoidów.

Podsumowując, ocena LOD i LOQ wykazała, że opracowana metoda charakteryzuje się zróżnicowaną, zależną od analitu czułością obu zastosowanych wariantów detekcji. UV-Vis/DAD zapewniał korzystniejsze granice oznaczalności dla większości analizowanych związków, natomiast Corona CAD stanowił uzupełniający wariant detekcji umożliwiający ilościową ocenę całego badanego zestawu kannabinoidów. W połączeniu z odpowiednio zdefiniowanymi zakresami roboczymi i zasadami raportowania wyników uzyskane parametry LOD i LOQ potwierdzają przydatność opracowanej procedury do ilościowej charakterystyki profilu kannabinoidowego badanych próbek.

6.6. Odporność metody

Badanie odporności metody przeprowadzono poprzez celowe zmiany przepływu fazy ruchomej o ±0,05 ml/min oraz temperatury kolumny o ±1°C względem warunków nominalnych. Przepływ zmieniano z 0,50 ml/min do 0,45 i 0,55 ml/min, natomiast temperaturę kolumny z 20°C do 19 i 21°C. Po każdej zmianie badanego parametru układ kondycjonowano przed wykonaniem pomiarów.

Ocenie poddano czas retencji, powierzchnię piku, wynik ilościowy oraz rozdzielczość par krytycznych: CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC i CBCA/CBLA. Wyniki uzyskane w warunkach zmienionych porównywano z odpowiednim przebiegiem odniesienia wykonanym w ramach tej samej serii pomiarowej. Rozdzielczość oceniano względem przyjętego kryterium Rs ≥ 0,9 dla par krytycznych. Przyjęto, że wartość Rs przypisana w raporcie do pierwszego analitu odnosi się do rozdzielenia tego analitu od kolejnego piku. Sposób przypisania wartości Rs wymaga potwierdzenia w ustawieniach raportu Chromeleon (Tabela 22a).

Tabela 23a. Wyniki badania odporności metody UHPLC dla wariantów detekcji DAD i CAD.

Wariant	Badany czynnik	Warunek	CBND/CBDV, Rs	Δ^9-THCA/CBC, Rs	CBCA/CBLA, Rs
DAD	Przepływ	0,50 ml/min, odniesienie	1,30	0,85	1,24
DAD	Przepływ	0,45 ml/min	1,35	0,96	1,23
DAD	Przepływ	0,55 ml/min	1,28	0,86	1,21
DAD	Temperatura kolumny	20°C, odniesienie	1,30	n.a.	0,94
DAD	Temperatura kolumny	19°C	1,29	n.a.	1,00
DAD	Temperatura kolumny	21°C	1,29	n.a.	0,92
CAD	Przepływ	0,50 ml/min, odniesienie*	1,25	0,86	1,27
CAD	Przepływ	0,45 ml/min	1,34	1,04	1,28
CAD	Przepływ	0,55 ml/min	1,17	0,83	1,32
CAD	Temperatura kolumny	20°C, odniesienie*	1,23	n.a.	1,00
CAD	Temperatura kolumny	19°C	1,23	n.a.	0,93
CAD	Temperatura kolumny	21°C	1,20	0,76	n.a.

n.a. – wartość niedostępna

Zmiany czasu retencji, wyniku ilościowego i powierzchni piku wyrażano jako różnicę procentową względem odpowiedniego przebiegu odniesienia. W Tabeli 22 zestawiono zarówno wartości rozdzielczości par krytycznych, jak i największe bezwzględne zmiany czasu retencji, wyniku ilościowego oraz powierzchni piku obserwowane w mieszaninie 19 analitów.

Tabela 22b. Największe bezwzględne zmiany czasu retencji, wyników ilościowych i powierzchni pików w badaniu odporności metody UHPLC.

Wariant	Zmieniony warunek	Maks. |ΔtR| [%]	Maks. |Δ wyniku ilościowego| [%]	Maks. |Δ powierzchni piku| [%]
DAD	Przepływ 0,45 ml/min	10,29	20,76	20,77
DAD	Przepływ 0,55 ml/min	9,41	19,30	19,71
DAD	Temperatura kolumny 19°C	1,21	12,11	12,10
DAD	Temperatura kolumny 21°C	0,99	23,43	23,42
CAD	Przepływ 0,45 ml/min	10,40	41,27	27,18
CAD	Przepływ 0,55 ml/min	9,41	37,36	30,38
CAD	Temperatura kolumny 19°C	1,14	26,36	18,85
CAD	Temperatura kolumny 21°C	1,05	24,11	13,44

Wartości przedstawiają największą bezwzględną zmianę zaobserwowaną w pmieszaninie 19 analitów względem odpowiedniego warunku odniesienia.

Zmiana przepływu fazy ruchomej powodowała maksymalne zmiany czasu retencji wynoszące 9,41-10,40%. W przypadku detekcji DAD maksymalne zmiany wyników ilościowych wynosiły 19,30-20,76%, natomiast dla detekcji CAD były wyraźnie większe i wynosiły 37,36-41,27%. Zmiany powierzchni pików były zbliżone do zmian wyników ilościowych i osiągały odpowiednio 19,71-20,77% dla DAD oraz 27,18-30,38% dla CAD. Zmiana temperatury kolumny powodowała znacznie mniejsze zmiany czasu retencji. Maksymalne wartości wynosiły 0,99-1,21% dla DAD oraz 1,05-1,14% dla CAD. Jednocześnie wpływ temperatury na wyniki ilościowe był większy niż na czas retencji. W wariancie DAD maksymalna zmiana wyniku ilościowego wynosiła 12,11% przy 19°C oraz 23,43% przy 21°C, natomiast w wariancie CAD odpowiednio 26,36% i 24,11%. Zmiany powierzchni pików wynosiły 12,10-23,42% dla DAD oraz 13,44-18,85% dla CAD.

Wyniki dotyczące rozdzielczości przedstawione w Tabeli 22a wskazują, że para CBND/CBDV była rozdzielana z wartościami Rs w zakresie 1,17-1,35, a zatem powyżej przyjętego kryterium Rs ≥ 0,9 we wszystkich warunkach, dla których wartość była dostępna. Podobnie dla pary CBCA/CBLA uzyskano wartości Rs spełniające przyjęte kryterium, mieszczące się w zakresie 0,92-1,32. Największą zmienność wykazano dla pary Δ^9-THCA/CBC. W wariancie DAD wartość Rs wynosiła 0,85 w warunku odniesienia, 0,96 przy przepływie 0,45 ml/min oraz 0,86 przy przepływie 0,55 ml/min. W wariancie CAD wartości te wynosiły odpowiednio 0,86, 1,04 i 0,83. Oznacza to, że przy zmianie przepływu rozdzielenie tej pary nie zawsze spełniało

przyjęte kryterium Rs ≥ 0,9. W serii temperaturowej część wartości Rs dla Δ^9-THCA/CBC była niedostępna, natomiast dla wariantu CAD przy temperaturze 21°C uzyskano Rs = 0,76.

Na podstawie przeprowadzonego badania można stwierdzić, że przepływ fazy ruchomej był parametrem silniej wpływającym na czas retencji niż temperatura kolumny, natomiast temperatura wykazywała relatywnie niewielki wpływ na ten parametr. Jednocześnie obie zmiany warunków chromatograficznych wpływały na wyniki ilościowe, przy czym największe zmiany obserwowano dla detekcji CAD. Pod względem rozdzielenia para CBND/CBDV wykazywała wysoką odporność na badane zmiany warunków, natomiast CBCA/CBLA pozostawała powyżej przyjętego kryterium we wszystkich dostępnych pomiarach. Najbardziej krytyczna była para Δ^9-THCA/CBC, dla której w części badanych warunków uzyskano Rs < 0,9. Wskazuje to, że właśnie ta para wymaga szczególnej kontroli warunków chromatograficznych, zwłaszcza w przypadku detekcji CAD.

Na podstawie uzyskanych wyników odporność metody w zakresie parametrów chromatograficznych można ocenić jako zależną od rodzaju badanego czynnika i sposobu detekcji. Zmiana temperatury w zakresie ±1°C powodowała niewielkie zmiany czasu retencji, natomiast zmiana przepływu o ±0,05 ml/min prowadziła do wyraźniejszych zmian tego parametru. Największe różnice wyników ilościowych obserwowano dla CAD, co wskazuje na większą wrażliwość tego wariantu detekcji na niewielkie zmiany warunków pracy układu.

6.7. Podsumowanie walidacji

Ocena walidacyjna dotyczyła opracowanej metody UHPLC w dwóch wariantach detekcji: UV-VIS/DAD i Corona CAD, obejmujących oznaczanie 19 kannabinoidów. Oceniono selektywność, przydatność systemu chromatograficznego, kalibrację, zakresy robocze, granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzję oraz dokładność. Przeprowadzono również badanie odporności poprzez kontrolowane zmiany przepływu fazy ruchomej i temperatury kolumny. Podsumowanie wyników przedstawiono w Tabeli 23.

Tabela 24. Podsumowanie wyników oceny walidacyjnej metody.

Parametr	Wynik	Kryterium	Ocena
Selektywność	brak interferencji w badanych blankach i materiałach kontrolnych	brak pików w oknach retencji	spełnione dla badanych materiałów
SST UV-VIS/DAD	RSD tR <0,01-0,06%; RSD powierzchni <0,16-1,49%; N > 2000	RSD tR ≤ 1,0%; RSD pola ≤ 5,0%; N ≥ 2000	kryteria spełnione
SST CORONA CAD	RSD tR <0,01%; RSD powierzchni 1,79-4,36%; N > 2000	RSD tR ≤ 1,0%; RSD pola ≤ 5,0%; N ≥ 2000	kryteria spełnione
Kalibracja UV-VIS/DAD	model liniowy przy 278 nm; R^2 0,9983-0,9999	ocena w zakresie roboczym właściwym dla analitu	parametry zgodne z Tabelą 17
Kalibracja CORONA CAD	model kwadratowy; ważenie 1/x dla 9 analitów i $1/x^2$ dla 10 analitów; R^2 0,9971-0,9996	ocena w zakresie roboczym właściwym dla analitu	parametry zgodne z Tabelą 18
Precyzja	powtarzalność 0,13-4,63%; seria CAD 0,30-4,80%; seria DAD 0,20-4,41%	RSD ≤ 5,0%	wszystkie przedstawione wartości spełniły kryterium
Dokładność	90,17-113,45%; 264/264 średnich w zakresie 90-115%	90-115%	kryteria spełnione
LOD i LOQ, Corona CAD	LOD 1-5 µg/ml; LOQ 5-10 µg/ml	S/N ≥ 3 dla LOD; S/N ≥ 10 dla LOQ	granice oszacowane na podstawie S/N
LOD i LOQ, UV-VIS/DAD	LOD 1-5 µg/ml; LOQ 1-6 µg/ml	S/N ≥ 3 dla LOD; S/N ≥ 10 dla LOQ	granice oszacowane na podstawie S/N

Wyniki potwierdziły spełnienie przyjętych kryteriów selektywności, przydatności systemu chromatograficznego, precyzji i dokładności. Dla obu wariantów detekcji uzyskano wysoką zgodność odpowiedzi z przyjętymi modelami kalibracyjnymi, a zakresy robocze ustalono indywidualnie dla poszczególnych analitów. Granice LOD i LOQ wyznaczono doświadczalnie na podstawie stosunku sygnału do szumu, wykonując pięć nastrzyków na każdym ocenianym poziomie stężenia.

Badanie odporności obejmowało kontrolowane zmiany przepływu fazy ruchomej oraz temperatury kolumny. Zmiana przepływu wywierała większy wpływ na czas retencji niż zmiana temperatury, natomiast większą zmienność wyników ilościowych obserwowano dla detekcji Corona CAD. Pary CBND/CBDV oraz CBCA/CBLA spełniały przyjęte kryterium rozdzielczości Rs ≥0,9. Najbardziej problematyczna była para Δ^9-THCA/CBC, dla której w części badanych warunków uzyskano Rs poniżej 0,9. Brak liczby powtórzeń, SD/RSD oraz liczbowych kryteriów akceptacji dla zmian parametrów odpowiedzi ogranicza możliwość pełnej formalnej oceny odporności.

Wyniki ilościowe raportowano wyłącznie w potwierdzonym zakresie roboczym i dla stężeń nie niższych od LOQ. Sygnały poniżej LOQ oznaczano jako <LOQ, natomiast niespełniające kryterium LOD jako n.d.

Podsumowując, opracowana metoda UHPLC wykazała przydatność do oznaczania 19 kannabinoidów w badanych warunkach i matrycach. Najważniejszym ograniczeniem pozostaje niepełna formalna ocena odporności oraz niewystarczające rozdzielenie pary Δ^9-THCA/CBC w części zmienionych warunków chromatograficznych.

7. Zastosowanie metody do próbek rzeczywistych

Opracowaną metodę UHPLC-CAD zastosowano do analizy rzeczywistych próbek produktów konopnych w celu oceny jej praktycznej przydatności do oznaczania kannabinoidów w matrycach o zróżnicowanym składzie chemicznym i właściwościach fizykochemicznych. Do badań wybrano próbki reprezentujące dwie grupy materiałów: produkty olejowe oraz susz/materiał roślinny.

Wyniki oznaczeń przeliczono na zawartość poszczególnych kannabinoidów w próbce i wyrażono w mg/g próbki. W obliczeniach uwzględniono nominalną masę próbki wynoszącą 70 mg, ekstrakcję w 10 mL metanolu oraz końcowe rozcieńczenie ekstraktu 1:10. Przyjęty sposób przeliczenia umożliwił bezpośrednie porównanie wyników uzyskanych dla próbek olejowych i materiału roślinnego.

7.1. Charakterystyka próbek

Do analizy wykorzystano osiem próbek rzeczywistych w tym cztery produkty olejowe (O1-O4) oraz cztery próbki suszu/materiału roślinnego (F1-F4). Próbki dobrano tak, aby uwzględnić produkty różniące się deklarowaną zawartością CBD i Δ^9-THC oraz rodzajem matrycy.

Produkty olejowe obejmowały oleje CBD o deklarowanej zawartości CBD od 3,6% do 30%. Dla próbek O1 i O3 deklarowana zawartość CBD wynosiła około 30%, dla O4 - 10%, natomiast dla O2 - 3,6%. Deklarowana zawartość Δ^9-THC w tych produktach wynosiła <0,1%, <0,2% lub 0,0%, zależnie od produktu.

Grupę suszu/materiału roślinnego stanowiły trzy produkty komercyjne oraz jedna próbka pochodząca z uprawy rolniczej. Dla próbek F1-F3 dostępne były informacje etykietowe dotyczące zawartości CBD lub sumy CBD. Próbka F1 była oznaczona jako produkt o sumie CBD wynoszącej 18,94%, F2 zawierała deklarowane 27,89% CBD, a F3 - 8,5% CBD. W przypadku F4 nie były dostępne informacje dotyczące odmiany, partii ani deklarowanej zawartości CBD i Δ^9-THC.

Wszystkie próbki przygotowano według jednolitej procedury obejmującej ekstrakcję, wirowanie, filtrację oraz końcowe rozcieńczenie ekstraktu. Ten sam sposób przygotowania

zastosowano zarówno do próbek olejowych, jak i materiału roślinnego. Charakterystykę badanych próbek przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 25. Charakterystyka próbek rzeczywistych.

Kod próbki	Typ matrycy	Opis próbki	Deklarowane CBD	Deklarowane Δ^9-THC
O1	olej	PURE CBD OIL	30%, 3000 mg CBD	<0,1%
O2	olej	CBD FORTE OIL	3,6%, 1000 mg CBD	<0,2%
O3	olej	POLISH PREMIUM 30% CBD HEMP OIL	30%, 2760 mg CBD	0,0%
O4	olej	Satiwell CBD 10%	10%, 1000 mg CBD	<0,1%
F1	susz/kwiat	CBD AMNESIA HAZE PREMIUM HEMP FLOWER	suma CBD 18,94%	0,1%
F2	susz/kwiat	CBD White Widow hemp flower	27,89% CBD	0,1%
F3	susz/kwiat	Pozytywne Konopie Orange Bud hemp flower	8,5% CBD	<0,1%
F4	susz/kwiat	Cannabis sativa, źródło - uprawa rolnicza	Brak deklaracji	>0,01%

7.2. Wyniki dla produktów olejowych dla detektora CAD

W próbkach olejowych ilościowo oznaczono wyłącznie CBD. Pozostałych analizowanych kannabinoidów nie wykryto powyżej granicy wykrywalności (LOD). Dla każdej z czterech próbek uzyskano dwa wyniki oznaczenia CBD, przedstawione w Tabeli 25.

Najwyższą zawartość CBD stwierdzono w próbce O1 w której uzyskano 374,89 i 374,93 mg/g. W próbce O3 oznaczono odpowiednio 327,74 i 331,24 mg/g. Dla próbki O4 uzyskano wartości 97,73 i 92,37 mg/g, natomiast najniższą zawartość CBD stwierdzono w próbce O2 - 52,74 i 54,41 mg/g. Oznaczone zawartości CBD były zgodne z deklarowanym poziomem produktu, przy czym w próbkach O1 i O3 uzyskane wartości były niższe od wartości wynikających bezpośrednio z deklaracji producenta. Na podstawie przeprowadzonych oznaczeń nie ustalono przyczyny braku sygnałów pozostałych kannabinoidów powyżej LOD.

Tabela 26. Zawartość CBD w próbkach olejowych.

Próbka	CBD [mg/g] powtórzenie a	CBD [mg/g] powtórzenie b	Pozostałe kannabinoidy
O1	374,89	374,93	n.d.
O2	52,74	54,41	n.d.
O3	327,74	331,24	n.d.
O4	97,73	92,37	n.d.

n.d.- brak wykrycia sygnału powyżej granicy wykrywalności.

7.3. Wyniki dla suszu i materiału roślinnego dla detektora UV-VIS/DAD

W czterech próbkach suszu/materiału roślinnego ilościowo oznaczono CBD i CBDA. Uzyskane proporcje obu kannabinoidów różniły się pomiędzy próbkami, jednak na podstawie przeprowadzonych oznaczeń nie ustalono przyczyn tych różnic ani stopnia dekarboksylacji.

Najwyższą zawartość CBD oznaczono w próbce F2 - 180,97 i 158,43 mg/g. W próbkach F4, F1 i F3 uzyskano odpowiednio 119,11 i 119,11 mg/g, 63,41 i 63,76 mg/g oraz 55,03 i 49,07 mg/g. Najwyższą zawartość CBDA stwierdzono w próbce F3 - 142,01 i 159,63 mg/g. W próbkach F1, F2 i F4 oznaczono odpowiednio 96,46 i 95,99 mg/g, 71,23 i 71,77 mg/g oraz 55,46 i 50,97 mg/g. W badanych próbkach wykryto również wybrane kannabinoidy mniejszościowe w stężeniach poniżej LOQ. W próbkach F1 i F3 wykryto CBGA i CBG, w F2 - CBND, CBN, CBC i CBG, natomiast w F4 - Δ^9-THC i CBC. Pozostałych analizowanych kannabinoidów nie wykryto powyżej LOD w zastosowanych warunkach analitycznych. Ilościowe wyniki CBD i CBDA oraz wyniki oznaczone jako <LOQ przedstawiono w Tabeli 26. Wyniki <LOQ wskazują na obecność sygnału spełniającego kryteria identyfikacji, ale znajdującego się poniżej zakresu wiarygodnej kwantyfikacji. Nie stanowią zatem podstawy do ilościowej oceny zawartości danego kannabinoidu.

Tabela 27. Główne kannabinoidy oznaczone ilościowo w próbkach suszu i materiału roślinnego.

Próbka	CBD [mg/g] - powtórzenie a	CBD [mg/g] - powtórzenie b	CBDA [mg/g] - powtórzenie a	CBDA [mg/g] - powtórzenie b	Kannabinoidy <LOQ
F1	63,41	63,76	96,46	95,99	CBGA, CBG
F2	180,97	158,43	71,23	71,77	CBND, CBN, CBC, CBG
F3	55,03	49,07	142,01	159,63	CBGA, CBG
F4	119,11	119,11	55,46	50,97	Δ^9-THC, CBC

7.4. Kontrola chromatogramów i regionów krytycznych w próbkach rzeczywistych

Podczas analizy próbek rzeczywistych szczególną uwagę zwracano na regiony chromatogramu obejmujące pary CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA. Ocena obejmowała kształt i położenie pików, przebieg linii podstawowej oraz prawidłowość wyznaczenia granic integracji. Sprawdzano również, czy sąsiadujące sygnały lub zakłócenia linii podstawowej mogły wpływać na wyznaczoną powierzchnię piku. Nie oceniano natomiast

odrębnie ilościowego wpływu składników matrycy, różnic stężeń analitów ani poszczególnych etapów przygotowania próbek na rozdzielczość analizowanych par.

W wariancie UHPLC-UV-VIS/DAD kontrolę regionów krytycznych uzupełniano o porównanie widm rejestrowanych w maksimum oraz na obu zboczach piku z widmem odpowiedniego roztworu wzorcowego. Stwierdzenie różnic w profilu widmowym skutkowało ponowną oceną przypisania piku i granic integracji. Samo porównanie widm nie było traktowane jako jednoznaczne potwierdzenie tożsamości analitu ani jako podstawa do określenia przyczyny stwierdzonych różnic.

W wariancie UHPLC-Corona CAD, ze względu na brak informacji widmowej, ocenę opierano na zgodności czasu retencji, kolejności elucji, kształcie pików oraz porównaniu chromatogramu próbki z chromatogramem mieszaniny wzorcowej. W przypadku niejednoznacznego rozdzielenia, niestabilnej linii podstawowej lub trudności z wyznaczeniem granic integracji chromatogram poddawano ponownej ocenie, a w uzasadnionych przypadkach powtarzano przygotowanie próbki lub analizę.

Wynik uznawano za prawidłowy, jeżeli przypisanie pików w analizowanych regionach było jednoznaczne w zakresie możliwości zastosowanego wariantu detekcji, a przebieg chromatogramu umożliwiał prawidłową integrację. Ocena ta stanowiła kontrolę jakości chromatogramu i sposobu integracji w próbkach rzeczywistych i nie była równoznaczna z odrębną oceną efektu matrycowego.

8. Ocena wdrożeniowa procedury

8.1. Zakres zastosowania w badanych warunkach

Procedurę zastosowano do profilowania kannabinoidów w badanych produktach olejowych oraz suszu lub materiale roślinnym. Zakres metody obejmował 19 kannabinoidów, w tym związki obojętne, formy kwasowe i wybrane kannabinoidy mniejszościowe.

W produktach olejowych procedura umożliwiła ilościowe oznaczanie CBD w zakresie objętym badaniem. W materiale roślinnym umożliwiła ilościowe oznaczanie głównych składników profilu, przede wszystkim CBD i CBDA, oraz sygnalizację obecności wybranych kannabinoidów mniejszościowych poniżej LOQ.

Zakres zastosowania należy odnosić wyłącznie do matryc i warunków opisanych w pracy. Dla nowych typów próbek, takich jak kosmetyki, produkty spożywcze, ekstrakty żywiczne lub preparaty wieloskładnikowe, konieczna jest dodatkowa weryfikacja matrycowa.

8.2. Warunki rutynowej pracy

Rutynowe stosowanie metody powinno obejmować przygotowanie świeżych faz ruchomych, właściwe równoważenie układu, kontrolę temperatury kolumny i autosamplera oraz utrzymywanie nominalnego przepływu fazy ruchomej. Przed rozpoczęciem sekwencji analitycznej układ należy równoważyć przez 30 min w nominalnych warunkach pracy.

Każda sekwencja powinna obejmować co najmniej blank rozpuszczalnikowy, mieszaninę wzorcową, próbki kontrolne lub matrycowe oraz próbki badane. Przed rozpoczęciem analizy próbek należy przeprowadzić ocenę przydatności systemu chromatograficznego, obejmującą powtarzalność czasu retencji i powierzchni pików, liczbę półek teoretycznych oraz rozdzielczość par krytycznych.

Podczas obróbki danych należy stosować ujednolicone parametry integracji. W regionach krytycznych oraz w przypadku niskiego stosunku sygnału do szumu granice integracji powinny być dodatkowo weryfikowane manualnie. Wyniki ilościowe należy raportować wyłącznie dla sygnałów mieszczących się w potwierdzonym zakresie roboczym metody i spełniających kryterium LOQ.

8.3. Krytyczne punkty procedury

Do punktów krytycznych procedury zaliczono regiony chromatogramu obejmujące pary CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA. Kontrola tych regionów obejmowała prawidłowe przypisanie pików, ocenę ich rozdzielenia i granic integracji oraz porównanie chromatogramu próbki z chromatogramem mieszaniny wzorcowej.

Przed rozpoczęciem serii analiz należy potwierdzić prawidłowe działanie układu na podstawie wyników testu przydatności systemu. Spełnienie ogólnych kryteriów dotyczących powtarzalności czasu retencji, powierzchni pików i sprawności kolumny nie powinno zastępować bezpośredniej oceny chromatogramu w regionach krytycznych. W każdej serii należy przeprowadzić wizualną kontrolę rozdzielenia par CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA, a także ocenić stabilność linii podstawowej, kształt pików i możliwość prawidłowego wyznaczenia ich granic integracji.

Warunki pracy układu obejmują ustaloną temperaturę kolumny, przepływ i skład fazy ruchomej oraz objętość nastrzyku. Prawidłowe działanie układu i stan kolumny kontroluje się na podstawie wyników testu przydatności systemu (SST), z uwzględnieniem parametrów określonych dla metody oraz rozdzielczości w regionach krytycznych.

W przypadku wystąpienia zmiany czasu retencji, deformacji piku, zwiększenia nakładania się sygnałów lub niestabilności integracji wyniku nie należy automatycznie akceptować. Należy ustalić możliwą przyczynę nieprawidłowości, weryfikując przygotowanie fazy ruchomej, temperaturę kolumny, szczelność układu, stan kolumny, poprawność przygotowania próbki oraz ustawienia integracji.

W rutynowej pracy należy stosować ujednolicone parametry integracji. Ręczną korektę granic piku dopuszcza się wyłącznie w przypadkach uzasadnionych przebiegiem chromatogramu i każdorazowo należy ją dokumentować. Ma to szczególne znaczenie w regionach CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA, w których sposób wyznaczenia granic integracji może bezpośrednio wpływać na wynik ilościowy sąsiadujących analitów.

Regiony krytyczne stanowią zatem element bieżącej oceny przydatności systemu i jakości uzyskiwanych chromatogramów. Kontrola obejmuje ocenę rozdzielenia sygnałów, stabilności linii podstawowej, kształtu pików, obecności potencjalnych interferencji oraz możliwości prawidłowej integracji.

8.4. Proponowany schemat wdrożenia w laboratorium

Wdrożenie procedury do rutynowej pracy powinno obejmować przygotowanie instrukcji SOP, weryfikację sprawności aparatury, przygotowanie roztworów wzorcowych, potwierdzenie zakresów roboczych, zdefiniowanie kryteriów testu przydatności systemu (SST) oraz ustalenie zasad integracji i raportowania wyników.

Rutynowa sekwencja analityczna powinna obejmować kolejno przygotowanie fazy ruchomej, równoważenie układu, analizę blanku rozpuszczalnikowego, analizę mieszaniny wzorcowej i ocenę SST, a następnie analizę próbek kontrolnych i badanych. Po zakończeniu analiz należy przeprowadzić kontrolę regionów krytycznych oraz przegląd uzyskanych wyników i raportu analitycznego.

W przypadku niespełnienia kryteriów SST sekwencja nie powinna być wykorzystywana do raportowania wyników ilościowych. Przed rozpoczęciem kolejnej serii należy ustalić przyczynę nieprawidłowości, w szczególności zweryfikować stan kolumny, szczelność układu, przygotowanie i skład fazy ruchomej, stabilność odpowiedzi detektorów oraz poprawność przygotowania roztworów wzorcowych. Po usunięciu przyczyny należy ponownie potwierdzić przydatność systemu przed przystąpieniem do analizy próbek.

8.5. Planowane wdrożenie procedury w Instytucie Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich

Jednym z planowanych rezultatów realizacji doktoratu wdrożeniowego jest wykorzystanie opracowanej procedury UHPLC w działalności analitycznej Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu. Planowane wdrożenie będzie prowadzone we współpracy pomiędzy Instytutem a firmą Polygen sp. z o.o. i będzie dotyczyło zastosowania procedury do analizy surowców oraz produktów otrzymanych z konopi.

Przedmiotem planowanego wdrożenia jest procedura rozdzielania chromatograficznego 19 kannabinoidów wykorzystująca jeden układ chromatograficzny oraz dwa warianty detekcji: UV-VIS/DAD i CORONA CAD. Dobór wariantu detekcji będzie uzależniony od rodzaju badanej próbki, celu analizy oraz dostępnej konfiguracji aparaturowej. W praktycznym zastosowaniu przewiduje się wykorzystanie detekcji UV-VIS/DAD w tandemie z detekcją CORONA CAD przede wszystkim do oznaczania CBD, CBDA, THC i THCA w produktach olejowych i w materiale roślinnym.

Wdrożenie procedury będzie wymagało jej transferu do laboratorium Instytutu oraz potwierdzenia możliwości uzyskania porównywalnych wyników w lokalnych warunkach aparaturowych i organizacyjnych. Działania te powinny obejmować sprawdzenie konfiguracji układu UHPLC, przygotowanie roztworów wzorcowych i materiałów kontrolnych, potwierdzenie czasów retencji, ocenę rozdzielczości par krytycznych oraz wykonanie testu przydatności systemu. Konieczne będzie również ustalenie zasad integracji, obliczania i raportowania wyników oraz przygotowanie odpowiedniej dokumentacji laboratoryjnej.

Zakres wdrożenia będzie odpowiadać zakresowi potwierdzonemu w niniejszej pracy.

Potwierdzeniem zainteresowania praktycznym wykorzystaniem rezultatów pracy jest list intencyjny dotyczący współpracy w zakresie planowanego wdrożenia procedury. Dokument ten przedstawiono w Załączniku 2.

9. Dyskusja wyników

9.1. Znaczenie przygotowania próbki i matrycy

Przygotowanie próbek stanowiło istotny element procedury analitycznej, wpływający na powtarzalność i interpretację uzyskiwanych wyników. Zastosowano ekstrakcję metanolem wspomaganą ultradźwiękami, a następnie wirowanie, filtrację i końcowe rozcieńczenie ekstraktu. Ujednolicony schemat przygotowania zastosowano zarówno do próbek olejowych, jak i materiału roślinnego, co umożliwiło bezpośrednie porównanie uzyskanych wyników.

Badane matryce różniły się składem chemicznym. Produkty olejowe zawierały składniki lipidowe, natomiast materiał roślinny mógł zawierać związki współekstrahowane w tym barwniki, woski, terpeny i inne metabolity roślinne. Wpływu tych składników na odpowiedź analityczną nie oceniano odrębnie, dlatego uzyskane wyniki nie stanowią pełnej charakterystyki efektu matrycowego dla badanych produktów.

Przedstawione dane dokumentują zastosowany sposób przygotowania próbek i jego wykorzystanie w analizie rzeczywistych materiałów konopnych. Nie obejmują natomiast pełnej oceny efektu matrycowego, wydajności ekstrakcji ani stabilności ekstraktów, zarówno dla badanych próbek, jak i innych typów produktów konopnych.

9.2. Przydatność UHPLC-UV-VIS/DAD

Wariant UHPLC-UV-VIS/DAD umożliwiał rejestrację sygnału analitycznego przy długości fali 278 nm oraz zbieranie widm 3D DAD w zakresie 190-400 nm. Sygnał przy 278 nm wykorzystywano do obliczeń ilościowych i oceny parametrów walidacyjnych, natomiast widma UV stosowano pomocniczo w kontroli jakości chromatogramów i przypisaniu pików.

Wybór długości fali 278 nm stanowił kompromis wynikający z różnic w właściwościach absorpcyjnych poszczególnych kannabinoidów. Ich maksima absorpcji nie były identyczne, dlatego przyjęta długość fali umożliwiała jednoczesną analizę szerokiego zakresu związków, przy ograniczeniu wpływu tła obserwowanego w krótszym zakresie UV.

Widma rejestrowane dla pików porównywano z widmami odpowiednich roztworów wzorcowych. Porównanie obejmowało przebieg absorpcji i profil widmowy piku, a jego interpretację prowadzono łącznie z czasem retencji, kolejnością elucji oraz rozdzielczością chromatograficzną. Widma DAD nie były traktowane jako samodzielne potwierdzenie struktury ani jednoznacznej tożsamości analitu.

Wartość diagnostyczna widm była zróżnicowana pomiędzy poszczególnymi kannabinoidami. Większą zdolność rozróżniającą wykazywały związki posiadające dodatkowe pasma absorpcji w średnim i dłuższym zakresie UV, m.in. CBN, CBCVA, CBNA, CBCA oraz wybrane formy kwasowe. Mniejszą swoistość obserwowano dla związków, których widma były zdominowane przez silne pasmo w zakresie około 205-211 nm. W tych przypadkach podobieństwo profili widmowych ograniczało możliwość różnicowania związków o zbliżonej budowie, dlatego przypisanie piku wymagało uwzględnienia również danych chromatograficznych.

9.3. Przydatność UHPLC-CAD

Wariant UHPLC-CORONA CAD umożliwiał detekcję analitów z wykorzystaniem detekcji aerozolowej. Zastosowano lotną fazę ruchomą zgodną z wymaganiami detektora oraz warunki pracy CAD zapewniające stabilną odpowiedź analityczną.

Dane uzyskane z detektora CAD analizowano z zastosowaniem kwadratowego modelu regresji z ważeniem $1/x$ lub $1/x^2$, w zależności od analitu, zgodnie z danymi przedstawionymi w Tabelach 18 i 88. Dolne granice zakresów roboczych wynosiły 5-10 µg/ml.

9.4. Znaczenie walidacji

Zakres badań walidacyjnych obejmował ocenę selektywności, przydatności systemu chromatograficznego, modeli kalibracyjnych, zakresów roboczych, precyzji, dokładności, granicy wykrywalności i granicy oznaczalności. Oceniano również wpływ kontrolowanych zmian przepływu fazy ruchomej i temperatury kolumny na parametry chromatograficzne oraz wyniki ilościowe.

Kryteria przydatności systemu chromatograficznego spełniono dla obu wariantów detekcji. Wszystkie wartości RSD uzyskane w badaniu powtarzalności oraz w dwóch dodatkowych seriach, stanowiących ocenę precyzji pośredniej, były niższe od przyjętego limitu 5,0%. W ocenie dokładności wszystkie 264 średnie wartości odzysku spełniły kryterium 90-115%, a uzyskane wartości mieściły się w zakresie 90,17-113,45%. Wyniki te potwierdziły odpowiednią precyzję i dokładność opracowanej procedury w badanym zakresie.

Tabele 149-171 przedstawiają wyniki oceny wpływu zmian przepływu fazy ruchomej, temperatury kolumny, parametru Power Function oraz temperatury nebulizacji. Zmiana przepływu powodowała maksymalne bezwzględne zmiany czasu retencji wynoszące 9,41-10,40%. Maksymalne zmiany wyników ilościowych wynosiły 20,76% dla wariantu DAD i 41,27% dla wariantu CAD. Zmiana temperatury kolumny powodowała mniejsze zmiany czasu retencji, nieprzekraczające 1,21%, natomiast maksymalne zmiany wyników ilościowych wynosiły odpowiednio 23,43% dla DAD i 26,36% dla CAD.

W części badanych warunków wartości Rs dla pary Δ^9-THCA/CBC były niższe od przyjętego kryterium Rs ≥ 0,9; odnotowano między innymi wartości 0,86, 0,83 i 0,76. Dla części par krytycznych wartości Rs oznaczono jako n.a., co uniemożliwiło ich pełną ocenę.

Uzyskane wyniki wskazują, że zmiany przepływu fazy ruchomej i temperatury kolumny mogą wpływać zarówno na parametry retencji, jak i na wyniki ilościowe, przy czym wpływ ten był większy dla wariantu CAD. Jednocześnie obserwowane zmiany wartości Rs dla wybranych par analitów wskazują na znaczenie stabilności warunków chromatograficznych dla zachowania wymaganej jakości rozdzielenia.

Wyniki dotyczące parametru Power Function oraz temperatury nebulizacji należy traktować jako dane rozwojowe. Czynniki te nie zostały uwzględnione w podstawowym planie badania odporności, a zastosowany warunek odniesienia „Std.**" nie został jednoznacznie zdefiniowany. Z tego względu wyników tych nie włączono do formalnej oceny odporności finalnej procedury.

9.5. Ograniczenia pracy i dalszy rozwój metody

Najważniejsze ograniczenia pracy wynikają z liczby i rodzaju badanych matryc, zastosowania zastępczej matrycy roślinnej w ocenie selektywności oraz obecności regionów krytycznych chromatogramu obejmujących pary CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC i CBCA/CBLA.

Wnioski dotyczące przydatności procedury odnoszą się do badanych typów próbek, zastosowanego sposobu przygotowania próbek, opisanych warunków chromatograficznych oraz potwierdzonych zakresów roboczych.

Dalszy rozwój procedury powinien obejmować badania kolejnych typów matryc i różnych partii próbek, ocenę selektywności w reprezentatywnych matrycach, ilościową ocenę efektu matrycowego oraz badanie stabilności roztworów wzorcowych i ekstraktów. Dalszej optymalizacji wymagają również warunki rozdzielenia par krytycznych.

10. Wnioski

- Opracowano procedurę rozdzielania chromatograficznego UHPLC, którą zastosowano w dwóch wariantach analitycznych: z detekcją UV-VIS/DAD oraz z detekcją CORONA CAD. Charakterystyki analityczne zależne od sposobu detekcji i wyznaczania wyniku oceniano oddzielnie dla każdego wariantu.
- Finalne warunki chromatograficzne obejmowały kolumnę Accucore C18 o wymiarach 150 × 3,0 mm i średnicy cząstek 2,6 µm, fazę A złożoną z wody zawierającej 0,1% (v/v) kwasu octowego oraz fazę B stanowiącą acetonitryl. Elucję izokratyczną prowadzono przy stosunku faz A wynoszącym 30:70 (v/v), przepływie 0,5 ml/min, temperaturze kolumny 20°C i całkowitym czasie analizy 30 min.
- W wariancie UV-VIS/DAD sygnał rejestrowany przy długości fali 278 nm wykorzystywano do oznaczeń ilościowych i oceny parametrów walidacyjnych. Widma 3D DAD rejestrowane w zakresie 190-400 nm wykorzystywano pomocniczo do porównania profili widmowych pików z roztworami wzorcowymi oraz do kontroli jakości chromatogramów.
- Dla wariantu CORONA CAD zastosowano modele regresji kwadratowej z ważeniem dobieranym indywidualnie dla poszczególnych analitów. Ważenie $1/x$ zastosowano dla 9 analitów, natomiast ważenie $1/x^2$ dla 10 analitów. Dla CBCVA potwierdzono model z ważeniem $1/x^2$.
- Ocena przydatności systemu chromatograficznego potwierdziła, że oba warianty metody, z detekcją DAD i CAD, spełniają przyjęte kryteria dotyczące powtarzalności czasów retencji, powtarzalności powierzchni pików oraz liczby półek teoretycznych. Wyniki potwierdzają przydatność obu wariantów do analiz w ocenianym zakresie.
- Wszystkie wartości RSD uzyskane w badaniu powtarzalności oraz w dwóch dodatkowych seriach opisanych jako badanie precyzji pośredniej były niższe od przyjętego limitu 5,0%. W ocenie dokładności wszystkie 264 średnie wartości odzysku

spełniły kryterium 90-115% i mieściły się w zakresie 90,17-113,45%. Wartości LOD i LOQ oszacowano doświadczalnie na podstawie średniego stosunku sygnału do szumu wyznaczonego z pięciu nastrzyków na każdym ocenianym poziomie stężenia.

- Pary CBND/CBDV, Δ^9 -THCA/CBC i CBCA/CBLA stanowiły regiony krytyczne chromatogramu i wymagają bieżącej kontroli podczas rutynowego stosowania procedury. W badaniu odporności dla części warunków uzyskano wartości Rs poniżej przyjętego kryterium Rs ≥ 0,9, w tym 0,86, 0,83 i 0,76 dla pary Δ^9-THCA/CBC. Dla części par krytycznych wartości Rs były niedostępne.
- Badanie odporności wykazało, że kontrolowane zmiany przepływu fazy ruchomej, temperatury kolumny, parametru Power Function oraz temperatury nebulizacji wpływały na parametry chromatograficzne w różnym stopniu, zależnie od zastosowanego wariantu detekcji i ocenianego analitu.
- Procedurę zastosowano do analizy czterech produktów olejowych oraz czterech próbek suszu lub materiału roślinnego. Wnioski dotyczą wyłącznie badanych próbek, zastosowanego sposobu przygotowania próbek, potwierdzonych zakresów roboczych, wartości LOQ oraz opisanych warunków chromatograficznych.
- Zastosowanie detekcji DAD pozwoliło dodatkowo wykorzystać informacje widmowe do wspomagania identyfikacji analitów poprzez porównanie profili widmowych zarejestrowanych dla próbek i roztworów wzorcowych. W przypadku detekcji CORONA CAD identyfikację opierano na zgodności czasów retencji i kolejności elucji z mieszaniną wzorcową.
- Planowane wdrożenie metody w Instytucie Włókien Naturalnych i Rośln Zielarskich w Poznaniu, realizowane we współpracy z firmą Polygen sp. z o.o., będzie wymagało przeprowadzenia transferu procedury, potwierdzenia jej przydatności w warunkach laboratorium docelowego oraz spełnienia obowiązujących wymagań jakościowych. Tym samym uzyskane wyniki mają nie tylko znaczenie naukowe, lecz także wyraźny potencjał aplikacyjny i wdrożeniowy.

11. Załączniki

11.1. Procedury przygotowania próbek

Przygotowanie próbek obejmowało ekstrakcję kannabinoidów z materiału roślinnego oraz produktów olejowych z zastosowaniem metanolu. Dla obu typów matryc zastosowano ujednolicony schemat obejmujący ekstrakcję ultradźwiękową, wirowanie, filtrację oraz końcowe rozcieńczenie ekstraktu. Różnica pomiędzy procedurami dotyczyła wstępnej homogenizacji materiału roślinnego.

Procedury przedstawione w załączniku odnoszą się do próbek objętych zakresem pracy. Ich zastosowanie do innych matryc wymaga odrębnej oceny przygotowania próbek, selektywności, odzysku oraz wpływu składników matrycy na wynik oznaczenia.

Materiały i wyposażenie wykorzystywane podczas przygotowania próbek

Do przygotowania próbek stosowano:

- metanol o czystości chromatograficznej,
- kalibrowaną wagę analityczną,
- naczynia przeznaczone do ekstrakcji próbek,
- łaźnię ultradźwiękową,
- wirówkę,
- filtry membranowe RC o średnicy porów 0,45 µm,
- fiolki chromatograficzne,
- kalibrowane pipety automatyczne,
- szkło miarowe odpowiedniej klasy.

Do ekstrakcji każdej próbki stosowano 10 ml metanolu. Masa próbki wynosiła około 70 mg.

Przygotowanie próbek materiału roślinnego

Próbki suszu lub kwiatostanów konopi przed pobraniem porcji analitycznej rozdrabniano i dokładnie mieszano w celu ujednorodnienia materiału. Przygotowanie próbek obejmowało ekstrakcję metanolem z wykorzystaniem łaźni ultradźwiękowej, następnie wirowanie, filtrację oraz końcowe rozcieńczenie ekstraktu. Szczegółowy przebieg procedury wraz z zastosowanymi parametrami przedstawiono w Tabeli 27.

Procedura obejmowała następujące etapy:

A. Próbkę materiału roślinnego rozdrobniono i dokładnie wymieszano.

B. Do naczynia ekstrakcyjnego odważono 70 mg próbki.

C. Dodano 10 mL metanolu.

D. Próbkę umieszczono w łaźni ultradźwiękowej na 15 min.

E. Po zakończeniu ekstrakcji próbkę wirowano przez 5 min przy 2500 rpm.

F. Zastosowane warunki wirowania odpowiadały około 700 × g przy średnicy wirnika wynoszącej 10 cm.

G. Klarowną część ekstraktu pobrano znad osadu.

H. Ekstrakt przefiltrowano przez filtr membranowy RC o średnicy porów 0,45 µm.

I. Do fiolki chromatograficznej przeniesiono 100 µL przefiltrowanego ekstraktu.

J. Dodano 900 µL metanolu.

K. Otrzymany roztwór, odpowiadający końcowemu rozcieńczeniu 1:10, poddano analizie UHPLC.

Tabela 28. Procedura przygotowania próbek materiału roślinnego.

Etap	Czynność	Parametr
Homogenizacja	rozdrobnienie i wymieszanie próbki	przed pobraniem porcji analitycznej
Odważanie	odważenie materiału roślinnego	70 mg
Ekstrakcja	dodanie metanolu	10 ml
Ekstrakcja ultradźwiękowa	umieszczenie próbki w łaźni ultradźwiękowej	15 min
Wirowanie	oddzielenie składników nierozpuszczalnych	5 min, 2500 rpm, około 700 × g
Filtracja	filtracja klarownej części ekstraktu	filtr RC, 0,45 µm
Rozcieńczenie	100 µl ekstraktu i 900 µl metanolu	1:10
Analiza	przeniesienie roztworu do fiolki	analiza UHPLC

Przygotowanie próbek produktów olejowych

Próbki produktów olejowych przygotowywano według zasadniczo takiego samego schematu ekstrakcji jak próbki materiału roślinnego. Ze względu na charakter matrycy nie stosowano etapu rozdrabniania. Przed pobraniem porcji analitycznej próbkę dokładnie mieszano w celu jej ujednorodnienia i ograniczenia wpływu ewentualnej niejednorodności

produktu. Szczegółowy przebieg procedury wraz z zastosowanymi parametrami przedstawiono w Tabeli 28.

Procedura obejmowała następujące etapy:

A. Próbkę produktu olejowego dokładnie wymieszano.

B. Do naczynia ekstrakcyjnego odważono 70 mg próbki.

C. Dodano 10 mL metanolu.

D. Próbkę poddano ekstrakcji w łaźni ultradźwiękowej przez 15 min.

E. Po zakończeniu ekstrakcji próbkę wirowano przez 5 min przy 2500 rpm.

F. Klarowną część fazy metanolowej pobrano znad pozostałych składników próbki.

G. Ekstrakt przefiltrowano przez filtr membranowy RC o średnicy porów 0,45 µm.

H. Do fiolki chromatograficznej przeniesiono 100 µL przefiltrowanego ekstraktu.

I. Dodano 900 µL metanolu.

J. Otrzymany roztwór, odpowiadający końcowemu rozcieńczeniu 1:10, poddano analizie UHPLC.

Tabela 29. Procedura przygotowania próbek produktów olejowych.

Etap	Czynność	Parametr
Wymieszanie próbki	ujednorodnienie produktu olejowego	przed pobraniem porcji analitycznej
Odważanie	odważenie próbki olejowej	70 mg
Ekstrakcja	dodanie metanolu	10 ml
Ekstrakcja ultradźwiękowa	umieszczenie próbki w łaźni ultradźwiękowej	15 min
Wirowanie	rozdzielenie faz i składników matrycy	5 min, 2500 rpm, około 700 × g
Filtracja	filtracja fazy metanolowej	filtr RC, 0,45 µm
Rozcieńczenie	100 µl ekstraktu i 900 µL metanolu	1:10
Analiza	przeniesienie roztworu do fiolki	analiza UHPLC

Przygotowanie materiałów kontrolnych

W badaniu selektywności stosowano blank rozpuszczalnikowy, olej MCT, olej z nasion konopi oraz sproszkowane liście czarnej herbaty jako zastępczą matrycę roślinną. Materiały kontrolne przygotowywano z zastosowaniem procedur odpowiadających poszczególnym

typom badanych próbek. Szczegółowy sposób przygotowania oraz zastosowanie poszczególnych materiałów kontrolnych przedstawiono w Tabeli 29.

Blank rozpuszczalnikowy stanowił metanol bez dodatku próbki i służył do kontroli obecności zanieczyszczeń pochodzących z rozpuszczalnika oraz układu chromatograficznego. Olej MCT oraz olej z nasion konopi przygotowywano zgodnie z procedurą stosowaną dla produktów olejowych, natomiast sproszkowane liście czarnej herbaty przygotowywano według procedury stosowanej dla materiału roślinnego.

Tabela 30. Sposób przygotowania materiałów kontrolnych.

Materiał kontrolny	Sposób przygotowania	Zastosowanie
Blank rozpuszczalnikowy	metanol bez dodatku próbki	kontrola zanieczyszczeń rozpuszczalnika i układu
Olej MCT	procedura dla próbek olejowych	kontrola matrycy olejowej
Olej z nasion konopi	procedura dla próbek olejowych	kontrola matrycy olejowej
Czarna herbata	procedura dla materiału roślinnego	zastępcza kontrola matrycy roślinnej

Czarna herbata nie stanowiła rzeczywistej matrycy konopnej pozbawionej kannabinoidów. Wykorzystano ją wyłącznie jako zastępczą matrycę roślinną do oceny obecności sygnałów w oknach retencji odpowiadających analizowanym związkom.

Postępowanie z ekstraktami

Przefiltrowane i rozcieńczone ekstrakty przenoszono do fiolek chromatograficznych i poddawano analizie UHPLC. Roztwory przygotowywano bezpośrednio przed analizą, a czas ich przechowywania ograniczano do okresu niezbędnego do wykonania sekwencji analitycznej. Stabilności ekstraktów nie oceniano w odrębnym badaniu.

W przypadku uzyskania odpowiedzi analitycznej przekraczającej zakres zastosowanej krzywej kalibracyjnej ekstrakt dodatkowo rozcieńczano metanolem. Zastosowany współczynnik dodatkowego rozcieńczenia uwzględniano podczas obliczania zawartości analitu w próbce.

Krytyczne etapy przygotowania próbek

Do krytycznych etapów przygotowania próbek zaliczono:

- reprezentatywne pobranie i homogenizację materiału roślinnego,
- dokładność odważenia próbki analitycznej,

- zachowanie stałego stosunku masy próbki do objętości metanolu,
- utrzymanie czasu ekstrakcji ultradźwiękowej wynoszącego 15 min,
- utrzymanie określonych warunków wirowania,
- pobranie klarownej części ekstraktu,
- stosowanie filtrów RC o średnicy porów 0,45 µm,
- dokładność końcowego rozcieńczenia 1:10,
- ograniczenie czasu przechowywania przygotowanych ekstraktów do okresu niezbędnego do wykonania analizy,
- ochronę próbek i przygotowanych roztworów przed warunkami mogącymi sprzyjać przemianom analizowanych związków.

Podsumowanie

Procedura przygotowania próbek obejmowała ekstrakcję metanolem wspomaganą ultradźwiękami, wirowanie, filtrację oraz końcowe rozcieńczenie ekstraktu. Dla materiału roślinnego i produktów olejowych zastosowano jednakową masę próbki, objętość metanolu oraz czas ekstrakcji. Różnica w przygotowaniu obu typów próbek polegała na zastosowaniu etapu homogenizacji przez rozdrobnienie i wymieszanie w przypadku materiału roślinnego, podczas gdy próbki produktów olejowych jedynie dokładnie mieszano przed pobraniem porcji analitycznej.

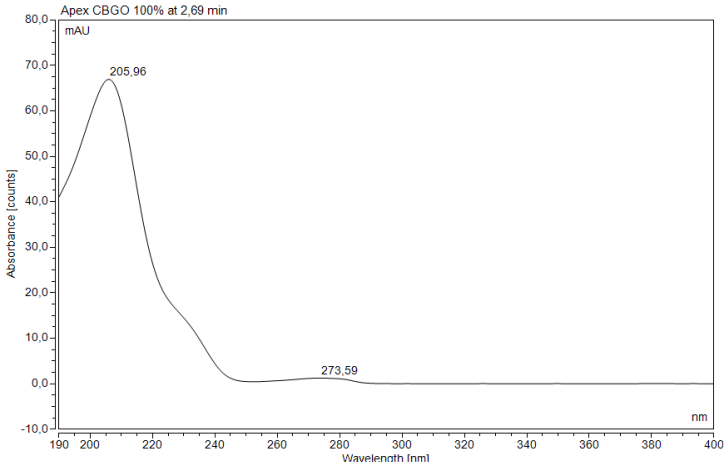
11.2. Widma UV-VIS roztworów wzorcowych kannabinoidów

W załączniku przedstawiono widma UV/DAD zarejestrowane dla roztworów wzorcowych analizowanych kannabinoidów. Widma uzyskiwano z danych UV-VIS w punkcie odpowiadającym maksimum piku chromatograficznego, w zakresie długości fali 190-400 nm. Dane te wykorzystano jako materiał pomocniczy do oceny profilu absorpcyjnego poszczególnych analitów.

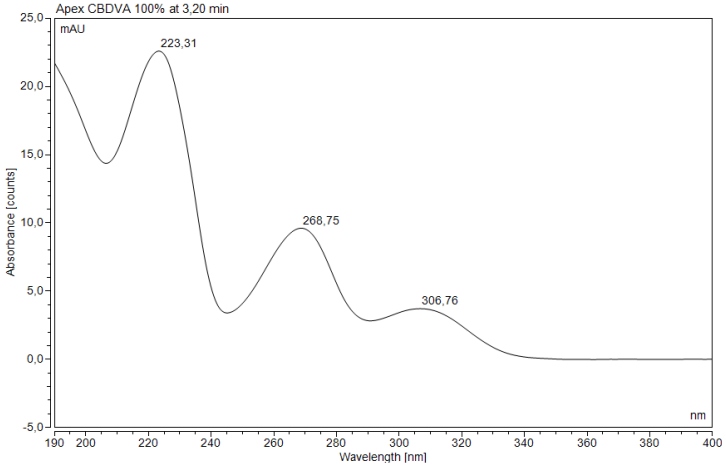
Profile widmowe porównywano z widmami odpowiednich substancji odniesienia. Informacje uzyskane z detektora DAD wykorzystywano jako dodatkowe kryterium oceny

zgodności piku w próbkach rzeczywistych oraz pomocniczo w ocenie selektywności metody. Widma UV/DAD nie były traktowane jako samodzielne potwierdzenie tożsamości ani struktury analitów. Identyfikację kannabinoidów opierano przede wszystkim na zgodności czasu retencji i kolejności elucji z mieszaniną wzorcową oraz ocenie obecności sygnałów interferujących w odpowiednich oknach retencji. Dane widmowe DAD służyły dodatkowo do oceny zgodności profilu absorpcyjnego piku ze wzorcem.

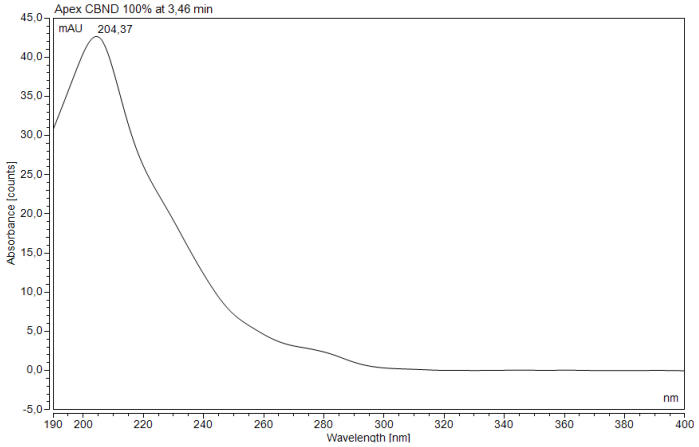
Zarejestrowane widma różniły się profilem absorpcyjnym poszczególnych kannabinoidów, co wykorzystywano pomocniczo podczas oceny selektywności wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD i porównywania pików w próbkach z odpowiednimi wzorcami.



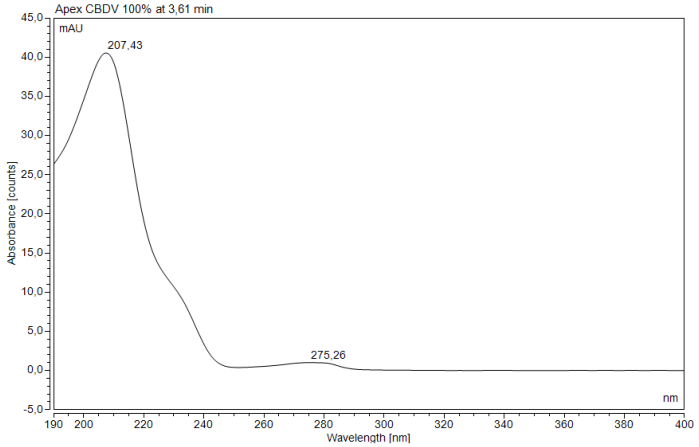
Rysunek 8. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBGO zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



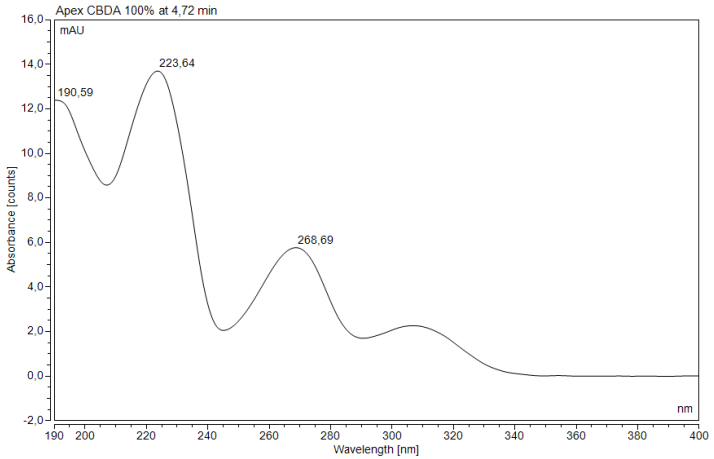
Rysunek 9. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBDVA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



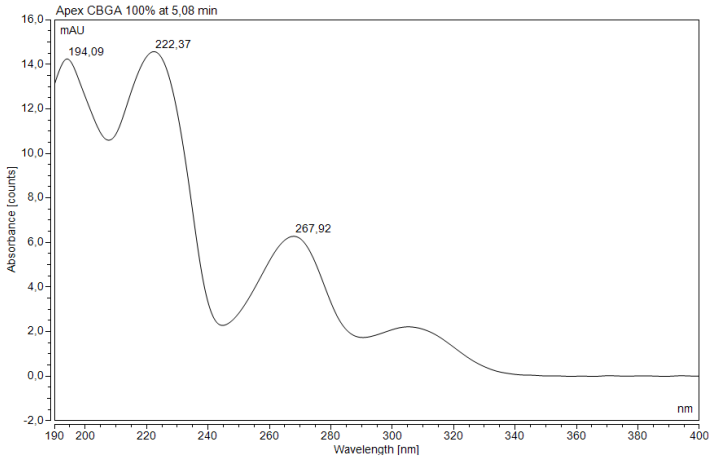
Rysunek 10. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBND zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



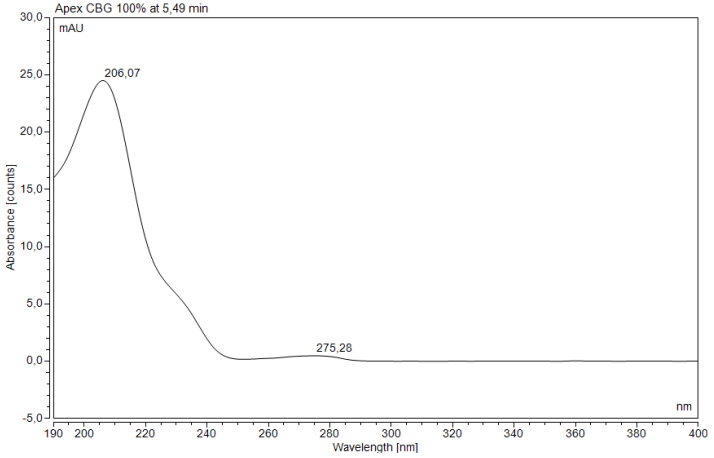
Rysunek 11. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBDV zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



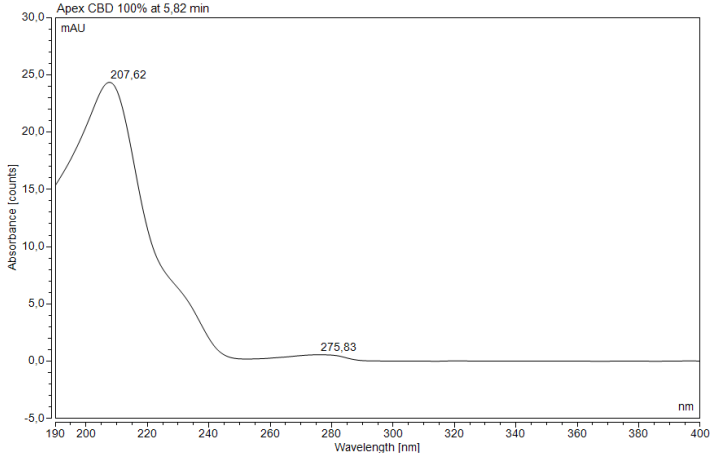
Rysunek 12. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBDA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



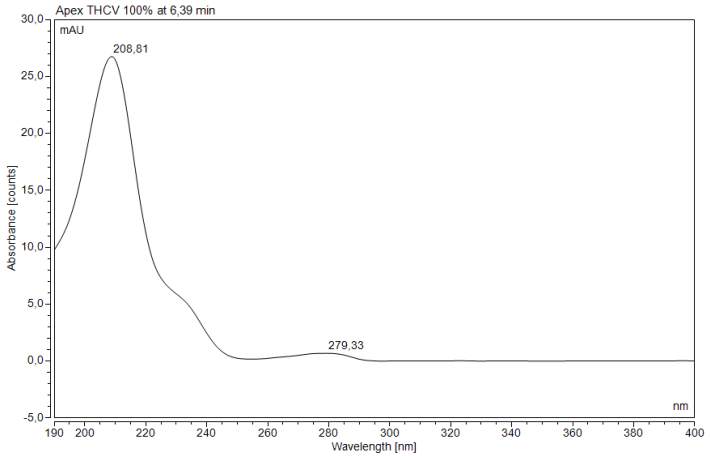
Rysunek 13. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBGA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



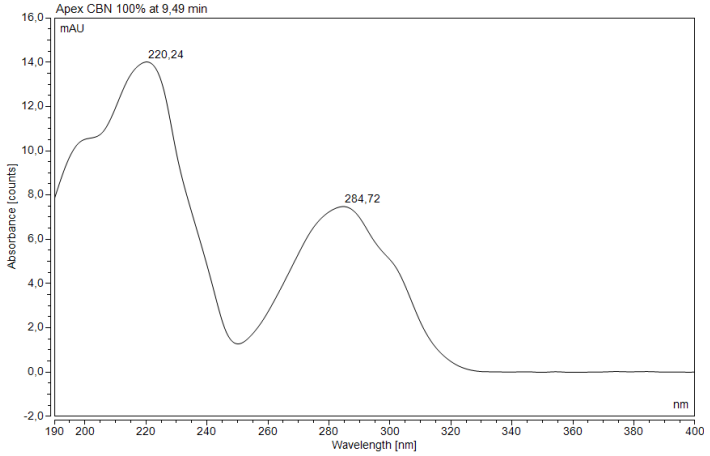
Rysunek 14. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBG zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



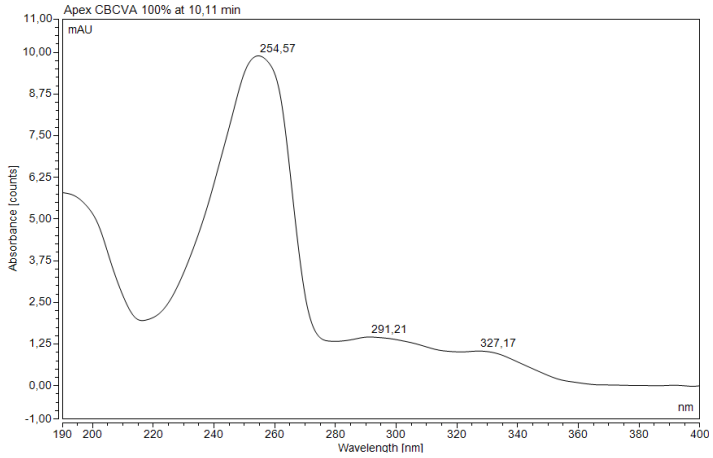
Rysunek 15. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBD zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



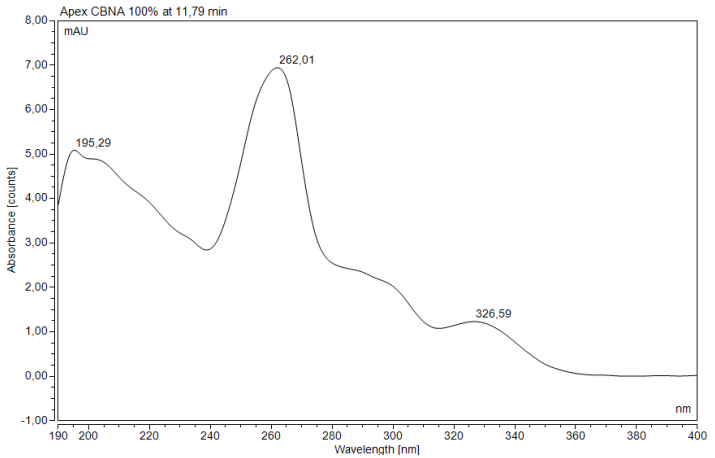
Rysunek 16**.** Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego THCV zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



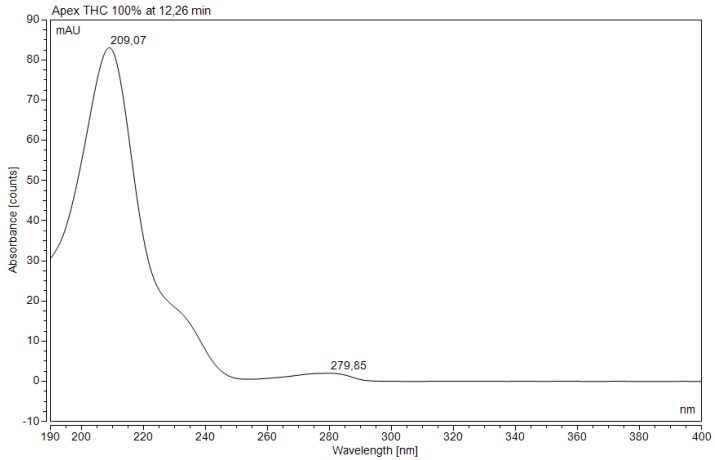
Rysunek 17**.** Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBN zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



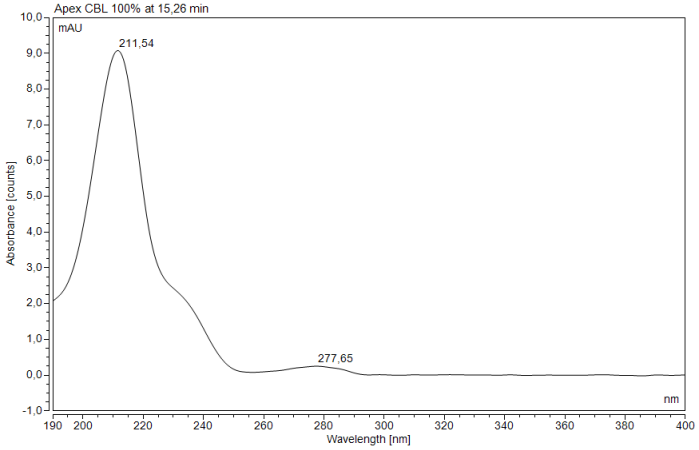
Rysunek 18**.** Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBCVA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



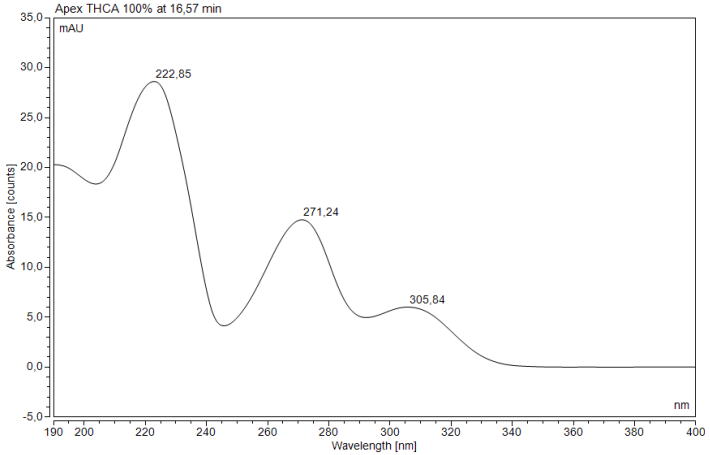
Rysunek 19. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBNA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



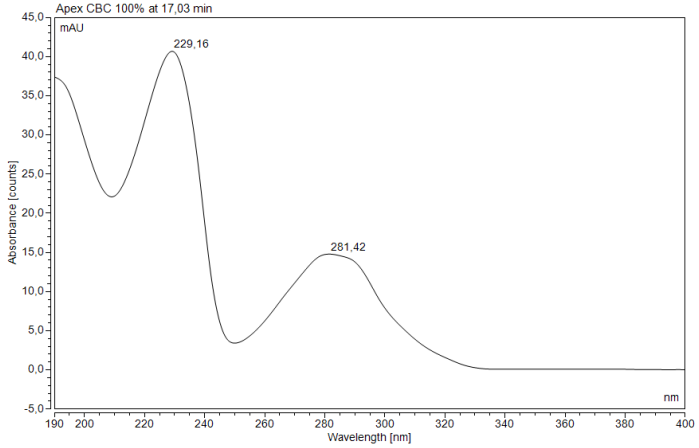
Rysunek 20**.** Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego Δ^9-THC zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



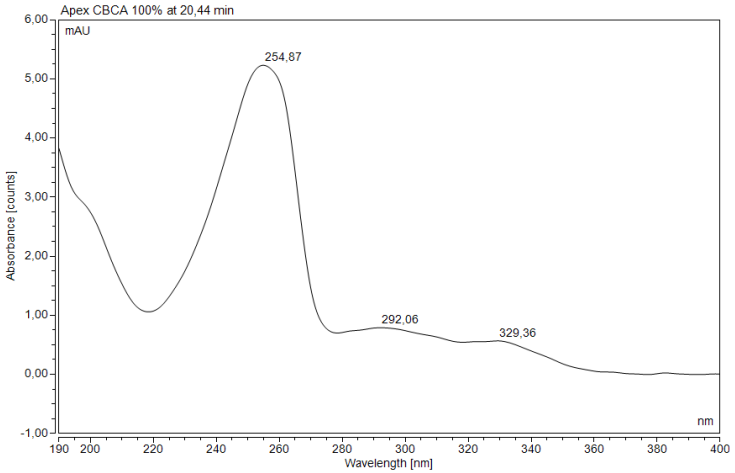
Rysunek 21**.** Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBL zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



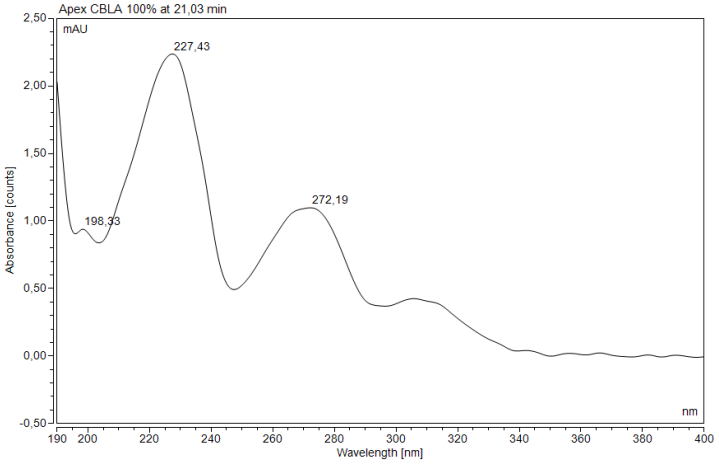
Rysunek 22**.** Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego Δ^9-THCA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



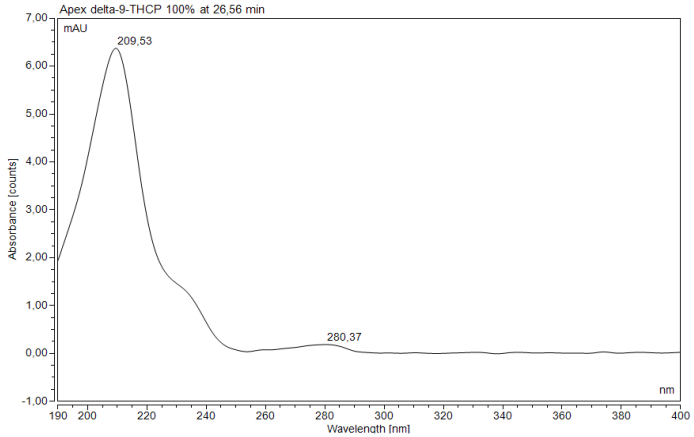
Rysunek 23. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBC zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



Rysunek 24. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBCA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



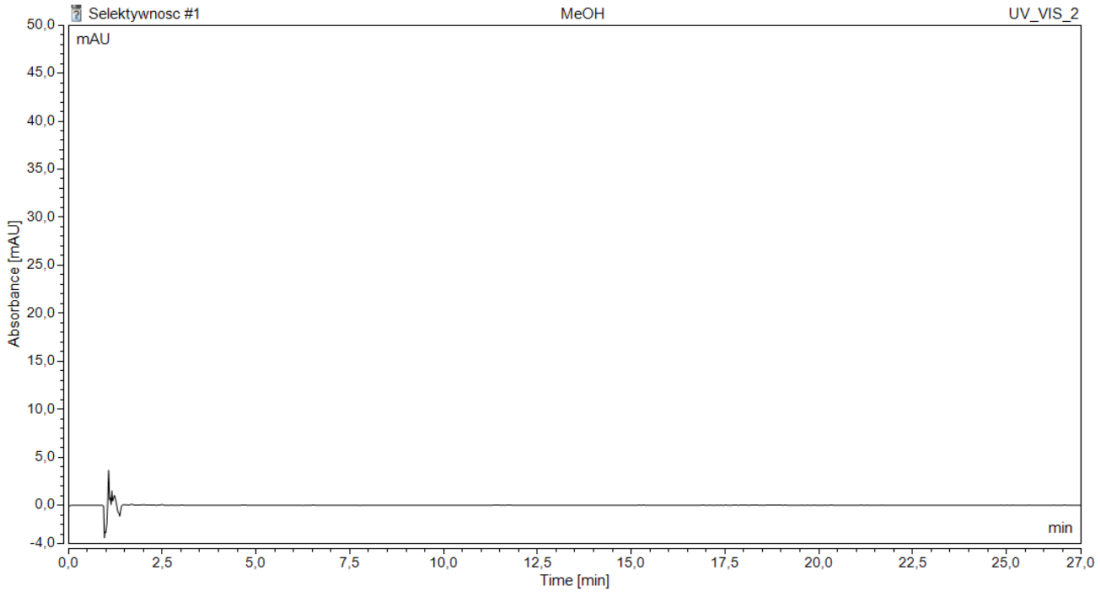
Rysunek 25. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBLA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.



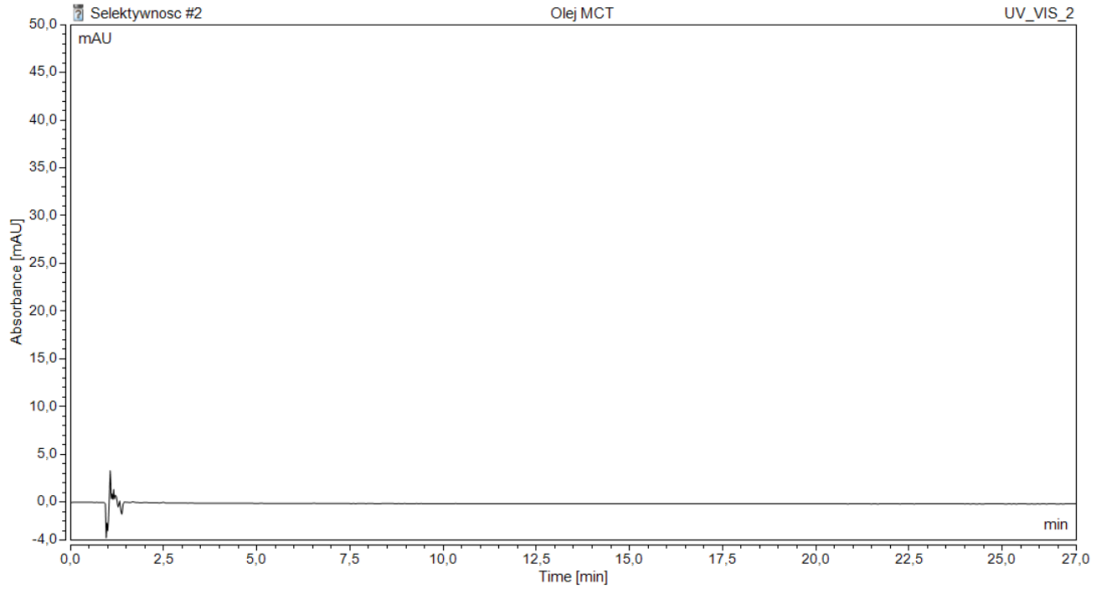
Rysunek 26. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego Δ^9-THCP zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.

11.3. Chromatogramy wykorzystane do oceny selektywności i walidacji

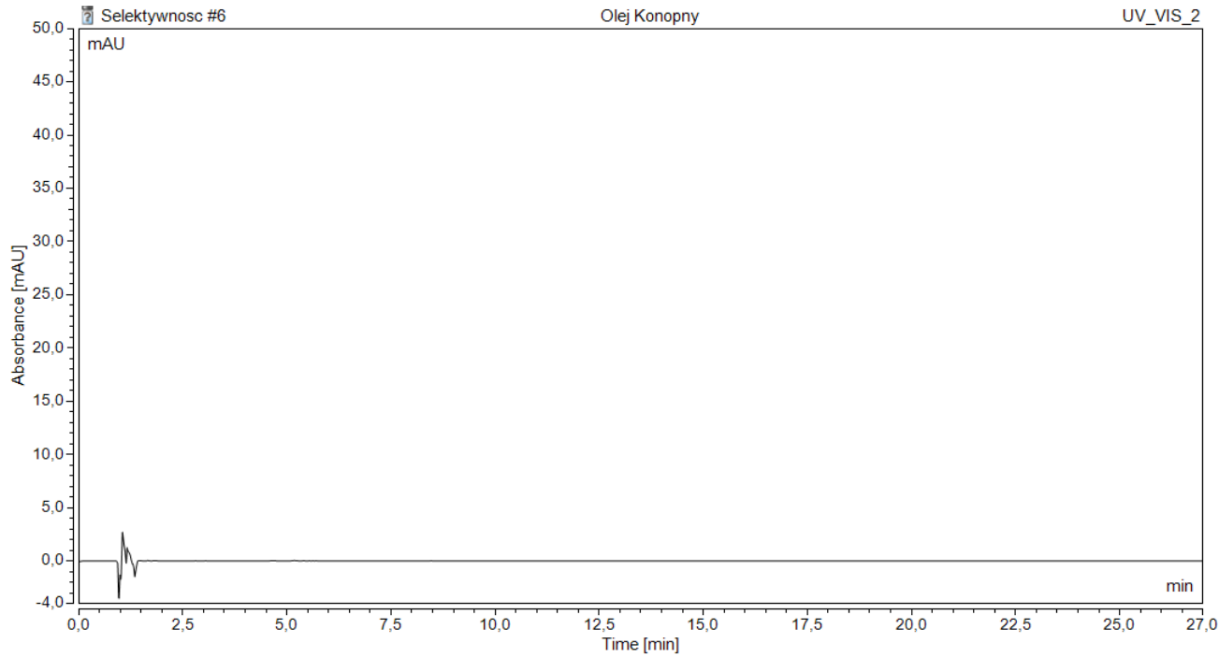
Selektywność: Chromatogramy dla detektora UV-VIS/DAD



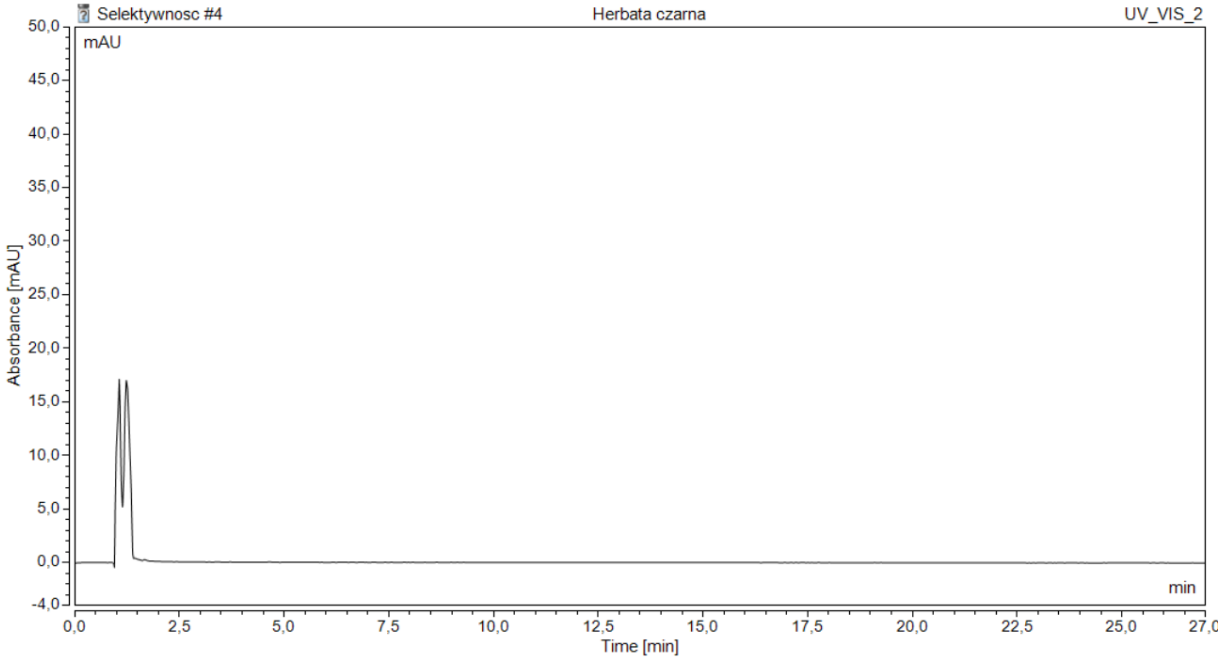
Rysunek 27. Chromatogram blanku rozpuszczalnikowego metanolu zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm.



Rysunek 28. Chromatogram oleju MCT rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm.

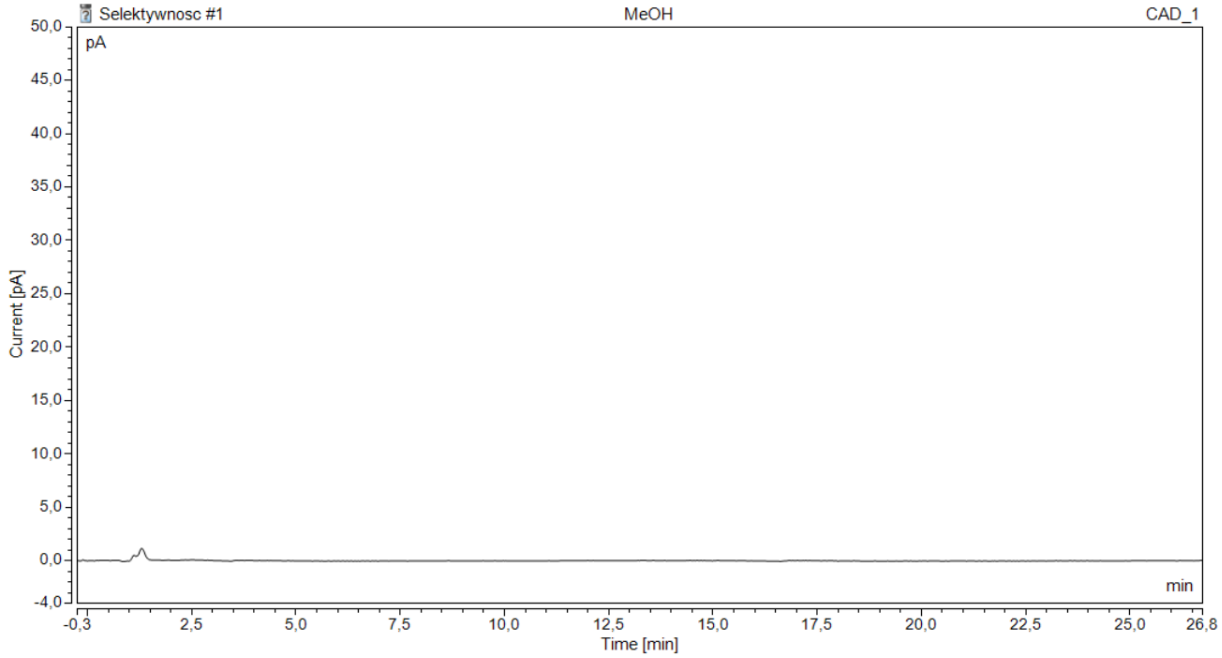


Rysunek 29. Chromatogram oleju konopnego rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm.

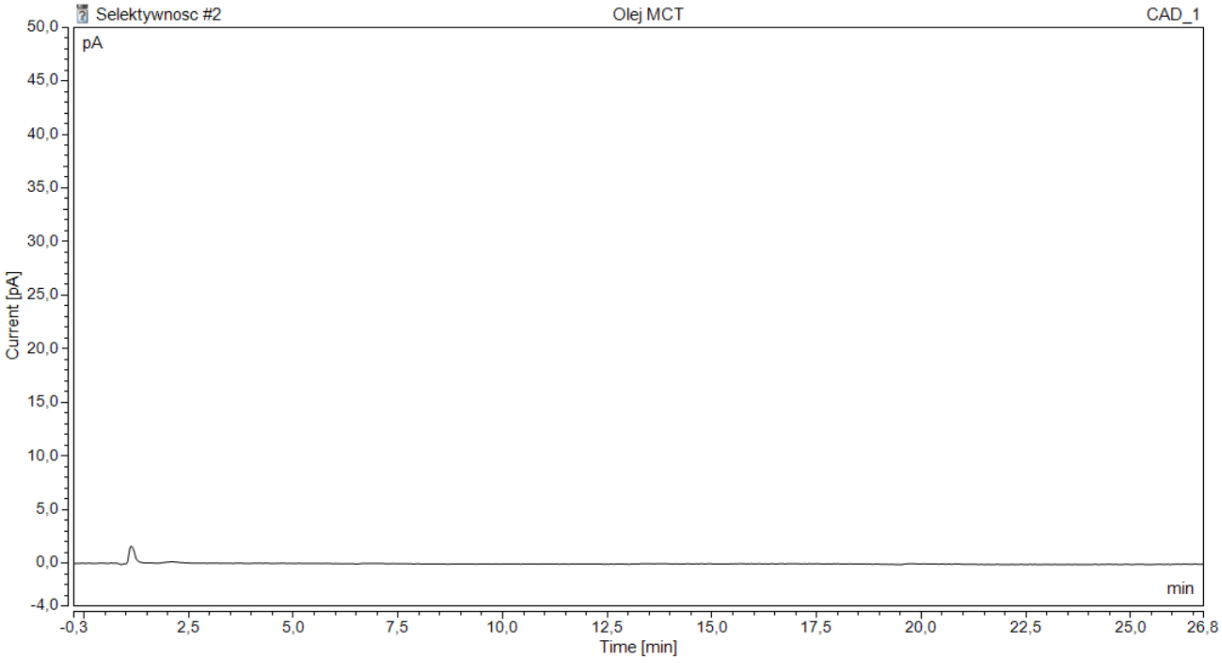


Rysunek 30. Chromatogram ekstraktu czarnej herbaty, zastosowanej jako zastępcza matryca roślinna, zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm.

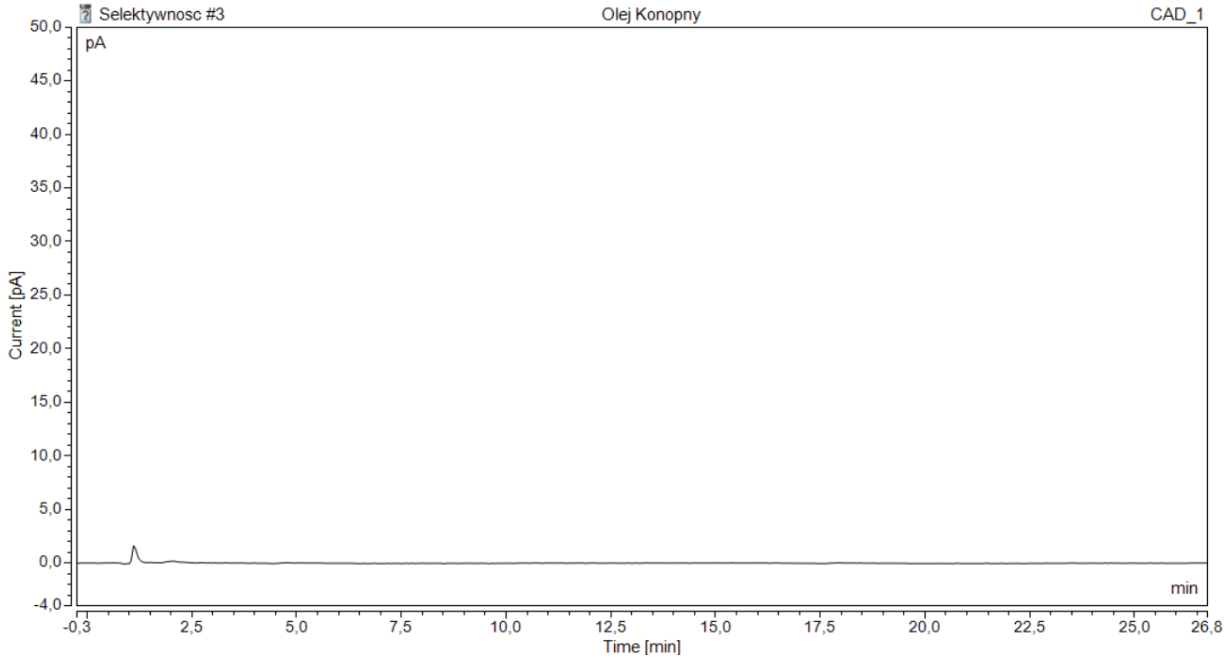
Selektywność: Chromatogramy dla detektora CAD



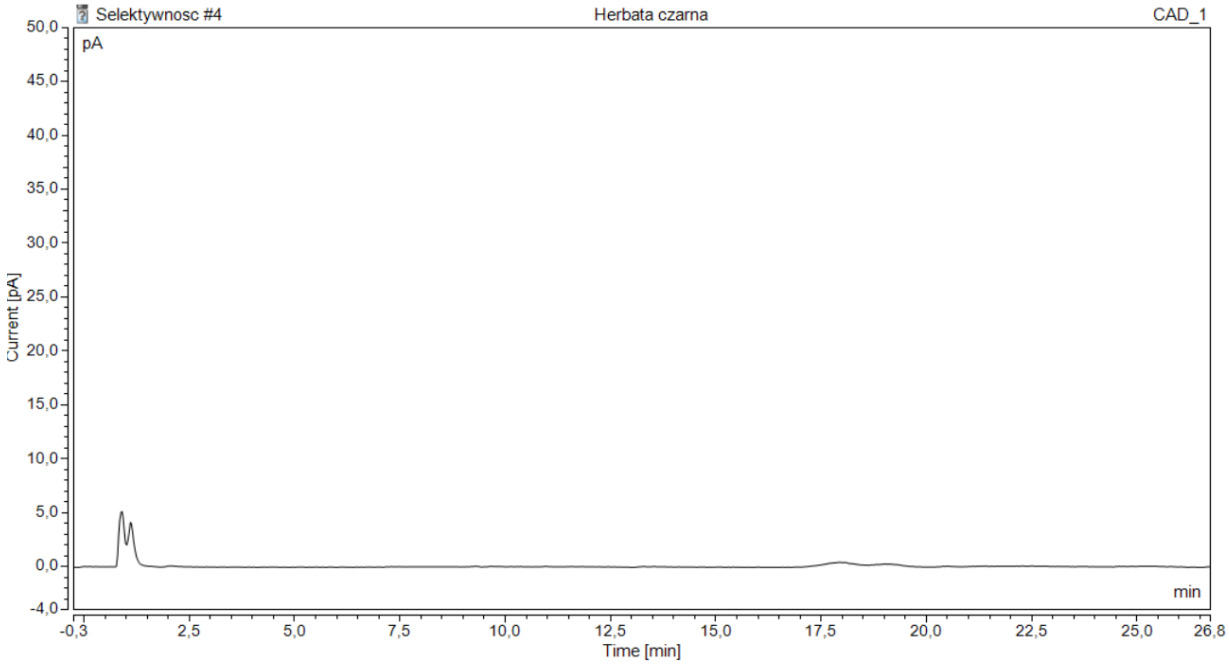
Rysunek 31. Chromatogram blanku rozpuszczalnikowego metanolu zarejestrowany detektorem CAD.



Rysunek 32. Chromatogram oleju MCT rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem CAD.

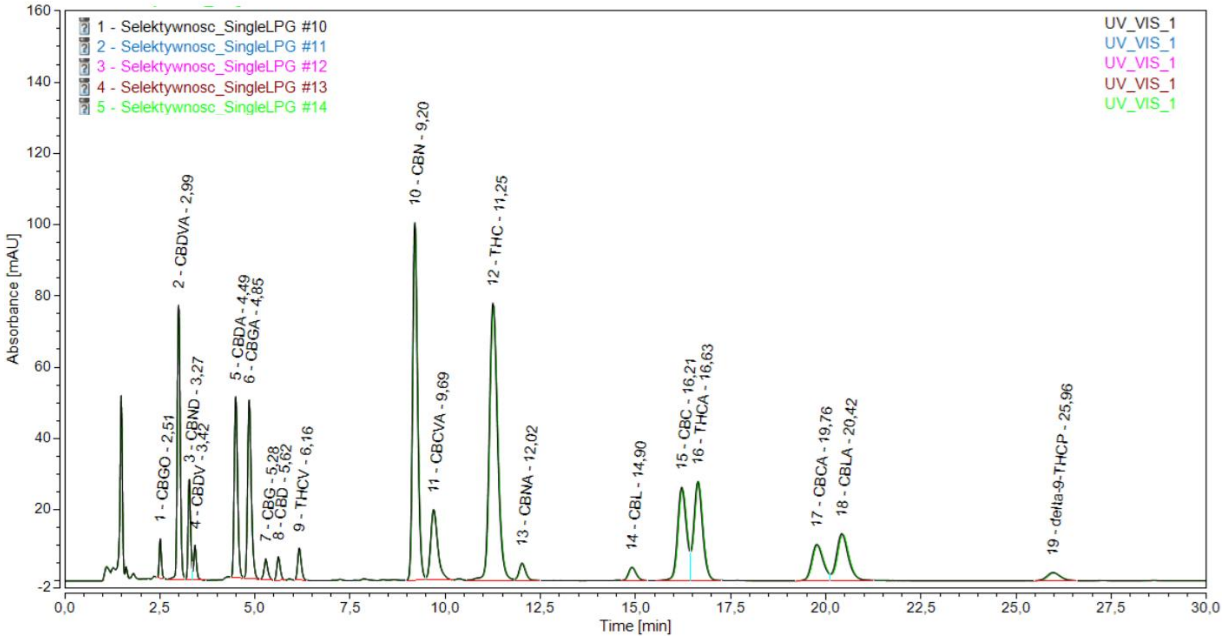


Rysunek 33. Chromatogram oleju konopnego rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem CAD.

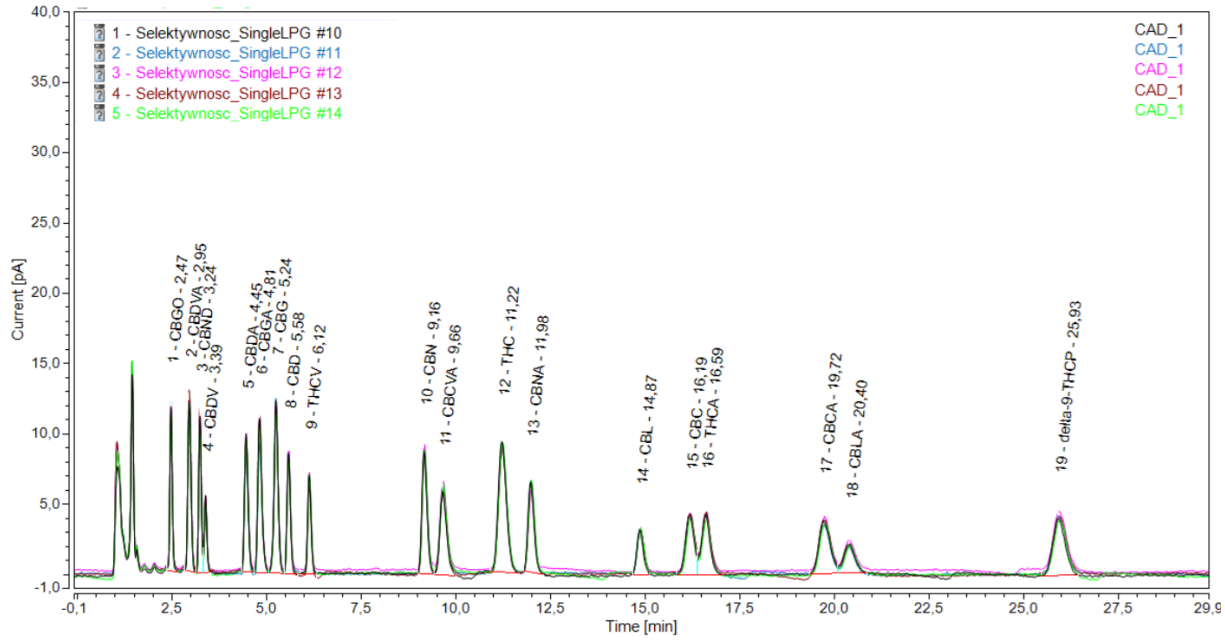


Rysunek 34. Chromatogram ekstraktu czarnej herbaty, zastosowanej jako zastępcza matryca roślinna, zarejestrowany detektorem CAD.

Chromatogramy Przydatności systemu chromatograficznego:



Rysunek 29. Nałożone chromatogramy pięciu kolejnych nastrzyków mieszaniny wzorcowej 19 kannabinoidów o stężeniu 20 µg/ml, wykorzystanych do oceny przydatności systemu UHPLC-UV-VIS/DAD przy długości fali 278 nm.



Rysunek 30. Nałożone chromatogramy pięciu kolejnych nastrzyków mieszaniny wzorcowej 19 kannabinoidów o stężeniu 20 µg/ml, wykorzystanych do oceny przydatności systemu UHPLC-CAD.

11.4. Arkusze przydatności systemu dla detekcji UV-VIS-DAD

W niniejszym załączniku przedstawiono szczegółowe arkusze oceny przydatności systemu chromatograficznego dla wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD. Ocenę przeprowadzono na podstawie pięciu kolejnych nastrzyków mieszaniny wzorcowej 19 kannabinoidów o stężeniu 20 µg/ml. Sygnał analityczny rejestrowano przy długości fali 278 nm.

Arkusze zawierają wyniki poszczególnych nastrzyków oraz obliczenia statystyczne wykonane dla każdego analitu. Uwzględniono:

- czas retencji,
- powierzchnię piku,
- średnią arytmetyczną,
- odchylenie standardowe,
- względne odchylenie standardowe,
- rozdzielczość chromatograficzną,
- liczbę półek teoretycznych,
- stosunek sygnału do szumu.

Powtarzalność czasów retencji i powierzchni pików oceniano na podstawie wartości RSD. Przyjęto następujące kryteria akceptacji:

$$RSD_{t_R} \leq 1{,}0\%$$

$$RSD_{A} \leq 5{,}0\%$$

$$N \geq 2000$$

Dla pików dobrze rozdzielonych przyjęto kryterium:

$$R_S \geq 1{,}5$$

Dla zdefiniowanych par krytycznych CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA zastosowano zmodyfikowane kryterium:

$$R_S \geq 0{,}9$$

Zmodyfikowane kryterium dla par krytycznych stosowano pod warunkiem zachowania stabilnych czasów retencji, powtarzalnej kolejności elucji, prawidłowej integracji pików oraz zgodności przypisania analitów z mieszaniną wzorcową.

Wartości stosunku sygnału do szumu przedstawiono jako parametr pomocniczy charakteryzujący jakość sygnału analitycznego. Parametru S/N nie stosowano jako samodzielnego kryterium akceptacji lub odrzucenia sekwencji w ramach oceny przydatności systemu.

Przedstawione arkusze stanowią dokumentację źródłową dla wyników zbiorczych przedstawionych w rozdziale 6.2. Powtarzalności powierzchni pików uzyskanej na podstawie kolejnych nastrzyków tego samego roztworu nie należy utożsamiać z precyzją całej procedury analitycznej. Wyniki oceny przydatności systemu charakteryzują krótkoterminową powtarzalność nastrzyku oraz odpowiedź systemu chromatograficznego.

Tabela 31. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBGO.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	2,51	0,7316	3,99	9159	30,6
11	all	2,51	0,7273	3,99	9174	30,2
12	all	2,51	0,7258	3,99	9199	30,1
13	all	2,51	0,7300	3,98	9176	30,4
14	all	2,51	0,7280	3,98	9179	30,9
Średnia		**2,51**	**0,7285**	**3,99**	**9177**	**30,4**
SD		**0,00**	**0,00**	**0,01**	**14,33**	**0,32**
RSD [%]		**0,00**	**0,31**	**0,14**	**0,16**	**1,05**

Tabela 32. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBDVA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	2,99	6,8274	2,19	7483	233,8
11	all	2,99	6,8066	2,19	7475	238,3
12	all	2,99	6,8047	2,19	7472	240,1
13	all	2,99	6,8259	2,18	7439	224,4
14	all	2,99	6,8190	2,18	7439	226,2
Średnia		**2,99**	**6,8167**	**2,19**	**7461**	**232,6**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,01**	**21,02**	**7,04**
RSD [%]		**0,00**	**0,16**	**0,25**	**0,28**	**3,03**

Tabela 33. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBND.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	3,28	2,1728	1,22	11639	85,6
11	all	3,28	2,1854	1,22	11632	87,5
12	all	3,28	2,1828	1,22	11658	88,2
13	all	3,28	2,1890	1,22	11658	82,6
14	all	3,28	2,1841	1,22	11656	83,1
Średnia		**3,28**	**2,1828**	**1,22**	**11648**	**85,4**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,00**	**12,24**	**2,52**
RSD [%]		**0,00**	**0,28**	**0,00**	**0,11**	**2,95**

Tabela 34. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBDV.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	3,43	0,8173	7,41	11867	29,6
11	all	3,43	0,7960	7,41	11865	30,3
12	all	3,43	0,7974	7,41	11881	30,5
13	all	3,43	0,8000	7,40	11873	28,6
14	all	3,43	0,7974	7,40	11870	28,8
Średnia		**3,43**	**0,8016**	**7,41**	**11871**	**29,6**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,01**	**6,26**	**0,86**
RSD [%]		**0,00**	**1,11**	**0,07**	**0,05**	**2,90**

Tabela 35. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBDA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	4,492	5,2603	2,13	12182	154,5
11	all	4,492	5,2419	2,13	12147	157,2
12	all	4,492	5,2387	2,13	12125	158,1
13	all	4,492	5,2584	2,13	12075	147,9
14	all	4,492	5,2506	2,13	12090	149,1
Średnia		**4,492**	**5,2500**	**2,13**	**12124**	**153,4**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,00**	**43,16**	**4,65**
RSD [%]		**0,00**	**0,18**	**0,00**	**0,36**	**3,03**

Tabela 36. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBGA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	4,85	5,7036	2,55	12407	152,2
11	all	4,85	5,6840	2,55	12422	155,4
12	all	4,85	5,6820	2,55	12414	156,7
13	all	4,85	5,6989	2,55	12372	146,5
14	all	4,85	5,6950	2,55	12373	147,7
Średnia		**4,85**	**5,6927**	**2,55**	**12398**	**151,7**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,00**	**23,52**	**4,53**
RSD [%]		**0,00**	**0,16**	**0,00**	**0,19**	**2,98**

Tabela 37. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBG.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	5,28	0,6630	2,04	16122	17,9
11	all	5,28	0,6586	2,04	16088	18,2
12	all	5,28	0,6588	2,04	16167	18,3
13	all	5,28	0,6626	2,04	16128	17,2
14	all	5,28	0,6603	2,04	16184	17,3
Średnia		**5,28**	**0,6607**	**2,04**	**16138**	**17,8**
SD		**0,00**	**0,00**	**0,00**	**38,12**	**0,51**
RSD [%]		**0,00**	**0,31**	**0,00**	**0,24**	**2,85**

Tabela 38. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBD.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	5,62	0,6789	3,27	19248	19,9
11	all	5,62	0,6759	3,32	19318	20,4
12	all	5,62	0,6726	3,33	19479	20,5
13	all	5,62	0,6764	3,33	19428	19,2
14	all	5,62	0,6754	3,33	19446	19,3
Średnia		**5,62**	**0,6758**	**3,32**	**19383**	**19,9**
SD		**0,00**	**0,00**	**0,03**	**97,03**	**0,60**
RSD [%]		**0,00**	**0,33**	**0,79**	**0,50**	**3,03**

Tabela 39. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu THCV.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	6,16	0,9808	15,00	20957	33,5
11	all	6,17	0,9785	14,95	20981	33,9
12	all	6,17	0,9745	15,00	21116	34,4
13	all	6,17	0,9770	15,00	21108	33,4
14	all	6,17	0,9763	15,01	21115	33,5
Średnia		**6,17**	**0,9774**	**14,99**	**21055**	**33,7**
SD		**0,00**	**0,00**	**0,02**	**79,39**	**0,42**
RSD [%]		**0,07**	**0,24**	**0,16**	**0,38**	**1,23**

Tabela 40. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBN.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	9,20	15,2937	1,77	24244	374,2
11	all	9,20	15,2372	1,76	24215	381,9
12	all	9,21	15,2292	1,76	24152	386,0
13	all	9,21	15,3075	1,75	24181	365,8
14	all	9,21	15,2780	1,75	24221	370,6
Średnia		**9,21**	**15,2691**	**1,76**	**24202**	**375,7**
SD		**0,00**	**0,03**	**0,01**	**36,17**	**8,23**
RSD [%]		**0,05**	**0,23**	**0,48**	**0,15**	**2,19**

Tabela 41. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBCVA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	9,69	4,2565	4,42	14541	74,0
11	all	9,69	4,2347	4,43	14476	75,3
12	all	9,70	4,2376	4,43	14490	76,3
13	all	9,70	4,3601	2,09	14238	72,5
14	all	9,70	4,3572	2,15	14237	73,4
Średnia		**9,70**	**4,2892**	**3,50**	**14396**	**74,3**
SD		**0,00**	**0,06**	**1,26**	**147,06**	**1,51**
RSD [%]		**0,05**	**1,49**	**36,06**	**1,02**	**2,03**

Tabela 42. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBNA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	11,25	19,5180	2,23	13615	377,0
11	all	11,26	19,4482	2,20	13571	394,5
12	all	11,27	19,4081	2,20	13546	387,7
13	all	11,27	19,5762	2,19	13427	282,1
14	all	11,27	19,5367	2,19	13422	285,4
Średnia		**11,27**	**19,4974**	**2,20**	**13516**	**345,3**
SD		**0,01**	**0,07**	**0,02**	**87,30**	**56,58**
RSD [%]		**0,07**	**0,35**	**0,75**	**0,65**	**16,38**

Tabela 43. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu Δ^9-THC.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	12,02	0,9835	8,67	25049	23,8
11	all	12,02	0,9742	8,70	25106	24,9
12	all	12,03	0,9636	8,67	25235	24,4
13	all	12,03	0,9988	8,66	24825	18,0
14	all	12,03	0,9954	8,68	24757	18,2
Średnia		**12,02**	**0,9831**	**8,68**	**24994**	**21,9**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,02**	**198,98**	**3,46**
RSD [%]		**0,04**	**1,49**	**0,17**	**0,80**	**15,81**

Tabela 44. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBL.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	14,90	0,8694	3,29	26873	75,9
11	all	14,91	0,8640	3,29	27014	74,0
12	all	14,91	0,8640	3,30	26829	72,7
13	all	14,92	0,8662	3,27	26868	66,0
14	all	14,92	0,8659	3,30	27072	72,4
Średnia		**14,91**	**0,8659**	**3,29**	**26931**	**72,2**
SD		**0,01**	**0,00**	**0,01**	**105,48**	**3,73**
RSD [%]		**0,05**	**0,26**	**0,37**	**0,39**	**5,17**

Tabela 45. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu Δ^9-THCA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	16,21	7,0863	0,99	22255	531,5
11	all	16,22	7,0450	0,99	22181	518,0
12	all	16,23	7,0439	0,99	22162	509,5
13	all	16,23	7,0618	0,99	21990	462,3
14	all	16,23	7,0739	0,99	22072	504,7
Średnia		**16,22**	**7,0621**	**0,99**	**22132**	**505,2**
SD		**0,01**	**0,02**	**0,00**	**102,71**	**26,05**
RSD [%]		**0,06**	**0,26**	**0,00**	**0,46**	**5,16**

Tabela 46. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBC.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	16,63	7,5187	6,43	24802	564,8
11	all	16,64	7,5075	6,41	24683	550,9
12	all	16,65	7,4745	6,40	24691	542,4
13	all	16,65	7,5477	6,38	24600	492,7
14	all	16,66	7,5068	6,38	24564	538,0
Średnia		**16,65**	**7,5110**	**6,40**	**24668**	**537,8**
SD		**0,01**	**0,03**	**0,02**	**92,40**	**27,18**
RSD [%]		**0,06**	**0,35**	**0,33**	**0,37**	**5,05**

Tabela 47. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBCA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	19,76	3,5597	1,20	20486	211,1
11	all	19,77	3,5420	1,20	20317	338,7
12	all	19,78	3,5477	1,20	20247	416,4
13	all	19,78	3,5661	1,21	20155	512,1
14	all	19,78	3,5683	1,21	20133	486,0
Średnia		**19,77**	**3,5567**	**1,20**	**20267**	**392,9**
SD		**0,01**	**0,01**	**0,01**	**142,62**	**121,88**
RSD [%]		**0,05**	**0,32**	**0,45**	**0,70**	**31,02**

Tabela 48. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBLA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	20,48	4,7080	9,48	22374	273,1
11	all	20,43	4,6677	9,49	22412	437,3
12	all	20,43	4,6769	9,47	22370	537,9
13	all	20,44	4,6910	9,43	22292	662,0
14	all	20,45	4,6850	9,45	22303	627,7
Średnia		**20,43**	**4,6857**	**9,46**	**22350**	**507,6**
SD		**0,01**	**0,02**	**0,02**	**50,97**	**157,41**
RSD [%]		**0,06**	**0,32**	**0,25**	**0,23**	**31,01**

Tabela 49. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu Δ^9-THCP.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [mAU·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
10	all	25,96	0,9016	**n.a.**	27496	46,8
11	all	25,98	0,8921	**n.a.**	27440	74,9
12	all	25,98	0,9007	**n.a.**	27359	89,2
13	all	25,99	0,9037	**n.a.**	26961	83,4
14	all	26,00	0,8956	**n.a.**	27274	75,5
Średnia		**25,98**	**0,8987**	**n.a.**	**27306**	**74,0**
SD		**0,02**	**0,00**	**n.a.**	**210,31**	**16,30**
RSD [%]		**0,06**	**0,53**	**n.a.**	**0,77**	**22,03**

11.5. Arkusze przydatności systemu dla detekcji CAD

Tabela 50. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBGO.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	2,56	0,86	3,65	8096	90,4
29	all	2,56	0,86	3,64	7905	96,7
30	all	2,56	0,84	3,58	7748	79,7
31	all	2,56	0,84	3,62	7725	81,9
32	all	2,56	0,86	3,65	8448	140,4
Średnia		**2,56**	**0,85**	**3,63**	**7984,**	**97,8**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,03**	**298**	**24,75**
RSD [%]		**0,00**	**1,60**	**0,81**	**3,74**	**25,31**

Tabela 51. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBDVA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	3,04	1,16	1,98	5974	94,6
29	all	3,05	1,21	1,93	6071	100,7
30	all	3,05	1,19	1,93	6154	84,2
31	all	3,04	1,22	2,01	6221	78,1
32	all	3,05	1,16	1,90	6112	96,2
Średnia		**3,05**	**1,19**	**1,95**	**6106**	**90,8**
SD		**0,00**	**0,03**	**0,04**	**92,48**	**9,31**
RSD [%]		**0,14**	**2,23**	**2,26**	**1,51**	**10,25**

Tabela 52. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBND.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	3,33	0,89	1,20	10426	87,2
29	all	3,33	0,94	1,19	10516	91,8
30	all	3,33	0,92	1,20	10353	77,2
31	all	3,33	0,92	1,20	10742	71,2
32	all	3,33	0,87	1,16	9811	85,5
Średnia		**3,33**	**0,91**	**1,19**	**10369**	**82,6**
SD		**0,00**	**0,03**	**0,02**	**344,82**	**8,27**
RSD [%]		**0,00**	**3,09**	**1,46**	**3,33**	**10,01**

Tabela 53. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBDV.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	3,48	0,41	7,11	13471	42,8
29	all	3,48	0,40	7,02	12556	44,0
30	all	3,48	0,39	7,17	13391	36,4
31	all	3,48	0,41	7,04	12842	32,8
32	all	3,48	0,40	7,07	12392	40,7
Średnia		**3,48**	**0,40**	**7,08**	**12930**	**39,3**
SD		**0,00**	**0,01**	**0,06**	**485,35**	**4,66**
RSD [%]		**0,00**	**1,78**	**0,84**	**3,75**	**11,85**

Tabela 54. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBDA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	4,54	1,10	1,90	10081	77,4
29	all	4,55	1,02	1,82	9910	77,8
30	all	4,55	1,09	1,86	10183	81,0
31	all	4,55	1,08	1,86	9813	57,3
32	all	4,55	1,07	1,87	10229	76,3
Średnia		**4,55**	**1,07**	**1,86**	**10043**	**74,0**
SD		**0,00**	**0,03**	**0,03**	**177,64**	**9,48**
RSD [%]		**0,08**	**2,96**	**1,54**	**1,77**	**12,81**

Tabela 55. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBGA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	4,90	1,39	2,29	9909	86,0
29	all	4,90	1,26	2,21	9427	82,9
30	all	4,90	1,34	2,32	9970	89,8
31	all	4,90	1,39	2,34	10321	68,2
32	all	4,90	1,30	2,30	10014	83,4
Średnia		**4,90**	**1,33**	**2,29**	**9928**	**82,1**
SD		**0,00**	**0,06**	**0,05**	**322,09**	**8,22**
RSD [%]		**0,00**	**4,19**	**2,17**	**3,24**	**10,01**

Tabela 56. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBG.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	5,33	1,48	1,90	13660	97,2
29	all	5,33	1,50	1,83	12523	109,7
30	all	5,34	1,41	1,82	13343	98,4
31	all	5,34	1,45	1,89	13216	73,3
32	all	5,34	1,40	1,81	12831	91,9
Średnia		**5,34**	**1,45**	**1,85**	**13114**	**94,1**
SD		**0,00**	**0,04**	**0,04**	**444,50**	**13,31**
RSD [%]		**0,09**	**2,95**	**2,26**	**3,39**	**14,15**

Tabela 57. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBD.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	5,67	0,92	3,21	17866	67,6
29	all	5,67	1,00	3,17	16701	77,3
30	all	5,67	0,92	3,20	17150	71,6
31	all	5,68	0,94	3,24	18117	50,9
32	all	5,67	0,95	3,24	17437	67,1
Średnia		**5,67**	**0,95**	**3,21**	**17454**	**66,9**
SD		**0,00**	**0,03**	**0,03**	**563,26**	**9,83**
RSD [%]		**0,06**	**3,44**	**0,92**	**3,23**	**14,70**

Tabela 58. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu THCV.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	6,21	0,74	14,52	21630	59,7
29	all	6,22	0,75	14,15	20720	60,7
30	all	6,22	0,73	14,36	21131	51,6
31	all	6,22	0,68	14,46	22150	22,7
32	all	6,22	0,76	14,32	21756	74,5
Średnia		**6,22**	**0,73**	**14,36**	**21477**	**53,8**
SD		**0,00**	**0,03**	**0,14**	**558,33**	**19,25**
RSD [%]		**0,06**	**4,09**	**0,99**	**2,60**	**35,76**

Tabela 59. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBN.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	9,25	1,39	1,71	21712	31,9
29	all	9,26	1,36	1,68	20545	73,5
30	all	9,26	1,45	1,69	21321	66,7
31	all	9,26	1,42	1,66	21155	29,8
32	all	9,26	1,41	1,70	20725	88,6
Średnia		9,26	1,40	1,69	21091	58,1
SD		0,00	0,03	0,02	467,63	26,12
RSD [%]		0,04	2,39	1,14	2,22	44,95

Tabela 60. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBCVA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	9,75	1,26	4,21	13632	21,7
29	all	9,76	1,31	4,25	13430	54,7
30	all	9,76	1,40	4,20	13325	47,1
31	all	9,75	1,31	4,24	13340	20,5
32	all	9,76	1,33	4,22	13807	63,8
Średnia		**9,75**	**1,32**	**4,22**	**13506**	**41,6**
SD		**0,00**	**0,05**	**0,02**	**207,71**	**19,60**
RSD [%]		**0,04**	**3,75**	**0,49**	**1,54**	**47,15**

Tabela 61. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBNA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	11,31	2,40	2,12	12293	34,0
29	all	11,33	2,47	2,14	12636	83,2
30	all	11,32	2,36	2,20	12410	102,3
31	all	11,33	2,28	2,12	12415	73,5
32	all	11,32	2,38	2,14	12258	32,2
Średnia		**11,32**	**2,38**	**2,14**	**12402**	**65,0**
SD		**0,01**	**0,07**	**0,03**	**147,99**	**30,95**
RSD [%]		**0,06**	**2,94**	**1,53**	**1,19**	**47,59**

Tabela 62. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu Δ^9-THC.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	12,07	1,32	9,27	24489	24,3
29	all	12,08	1,31	8,89	24500	59,1
30	all	12,08	1,29	9,51	27415	66,7
31	all	12,08	1,25	9,25	25657	52,8
32	all	12,08	1,31	9,00	24611	23,0
Średnia		**12,08**	**1,29**	**9,18**	**25334**	**45,2**
SD		**0,01**	**0,03**	**0,24**	**1261,67**	**20,27**
RSD [%]		**0,06**	**2,20**	**2,66**	**4,98**	**44,86**

Tabela 63. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBL.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	14,96	0,68	3,46	35532	30,6
29	all	14,96	0,70	3,36	31068	29,1
30	all	14,97	0,66	3,42	35803	37,3
31	all	14,96	0,67	3,42	34232	26,1
32	all	14,97	0,67	3,41	32037	11,2
Średnia		**14,96**	**0,68**	**3,41**	**33734**	**26,9**
SD		**0,00**	**0,02**	**0,04**	**2106,47**	**9,67**
RSD [%]		**0,03**	**2,29**	**1,05**	**6,24**	**35,99**

Tabela 64. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu Δ^9-THCA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	16,28	1,14	0,96	21314	40,0
29	all	16,28	1,17	0,97	20727	16,7
30	all	16,27	1,14	1,01	21234	39,4
31	all	16,28	1,16	1,02	20600	38,0
32	all	16,28	1,08	1,02	21901	42,1
Średnia		**16,28**	**1,14**	**1,00**	**21155**	**35,2**
SD		**0,01**	**0,04**	**0,03**	**519,43**	**10,47**
RSD [%]		**0,04**	**3,17**	**2,89**	**2,46**	**29,71**

Tabela 65. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBC.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	16,68	1,16	6,43	26336	41,0
29	all	16,70	1,10	6,51	26809	16,4
30	all	16,70	1,11	6,42	25857	39,5
31	all	16,72	1,16	6,16	27771	38,8
32	all	16,73	1,08	6,34	24770	40,9
Średnia		**16,71**	**1,12**	**6,37**	**26308**	**35,3**
SD		**0,02**	**0,03**	**0,13**	**1113,66**	**10,62**
RSD [%]		**0,10**	**3,06**	**2,09**	**4,23**	**30,06**

Tabela 66. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBCA.

Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	19,81	1,38	1,22	19790	13,7
29	all	19,83	1,28	1,15	20267	13,7
30	all	19,83	1,36	1,19	19869	14,8
31	all	19,85	1,42	1,06	16443	27,3
32	all	19,84	1,39	1,26	20017	31,5
Średnia		**19,83**	**1,36**	**1,18**	**19277**	**20,2**
SD		**0,02**	**0,05**	**0,08**	**1594,75**	**8,54**
RSD [%]		**0,08**	**3,72**	**6,49**	**8,27**	**42,28**

Tabela 67. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBLA.

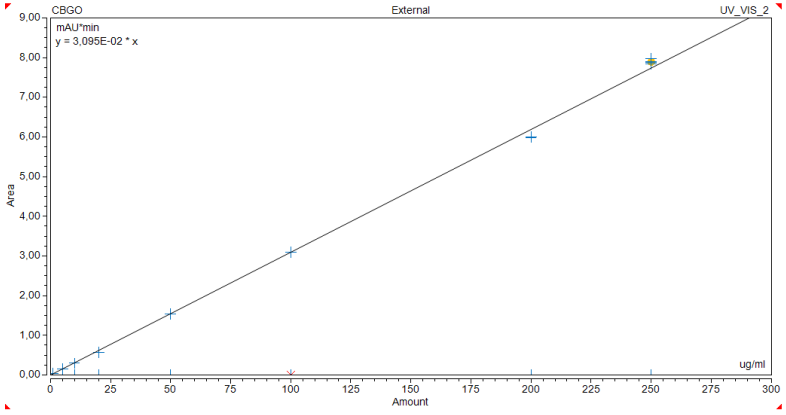
Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	20,49	0,76	9,35	21469	7,4
29	all	20,48	0,78	9,25	21594	7,7
30	all	20,49	0,79	9,30	22551	8,3
31	all	20,50	0,81	8,95	18358	15,4
32	all	20,53	0,72	9,31	24102	18,5
Średnia		**20,50**	**0,77**	**9,23**	**21614**	**11,5**
SD		**0,02**	**0,03**	**0,16**	**2103,04**	**5,14**
RSD [%]		**0,09**	**4,36**	**1,75**	**9,73**	**44,85**

Tabela 68. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu Δ^9-THCP.

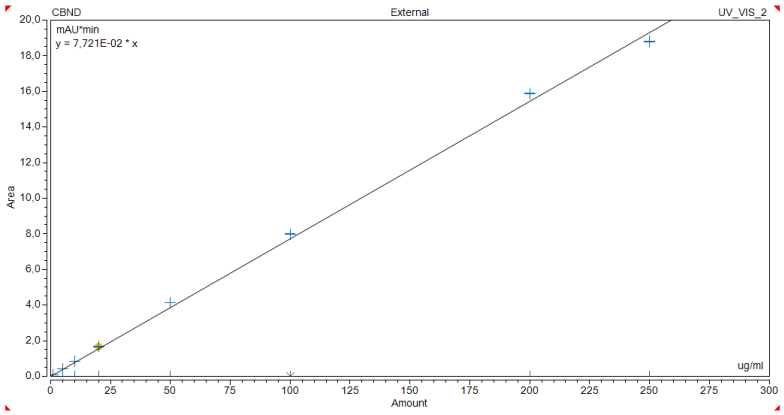
Nastrzyk	Analit	t_R [min]	Powierzchnia piku [pA·min]	R_S wg EP [-]	N wg EP [-]	S/N [-]
28	all	26,02	1,58	n.a.	27719	14,5
29	all	26,03	1,71	n.a.	25800	25,4
30	all	26,03	1,78	n.a.	25825	16,0
31	all	26,08	1,66	n.a.	26182	26,5
32	all	26,02	1,67	n.a.	25279	16,0
Średnia		**26,03**	**1,68**	**n.a.**	**26161**	**19,7**
SD		**0,02**	**0,07**	**n.a.**	**928,57**	**5,77**
RSD [%]		**0,09**	**4,18**	**n.a.**	**3,55**	**29,32**

11.6. Krzywe kalibracyjne UV-VIS/DAD i Corona CAD

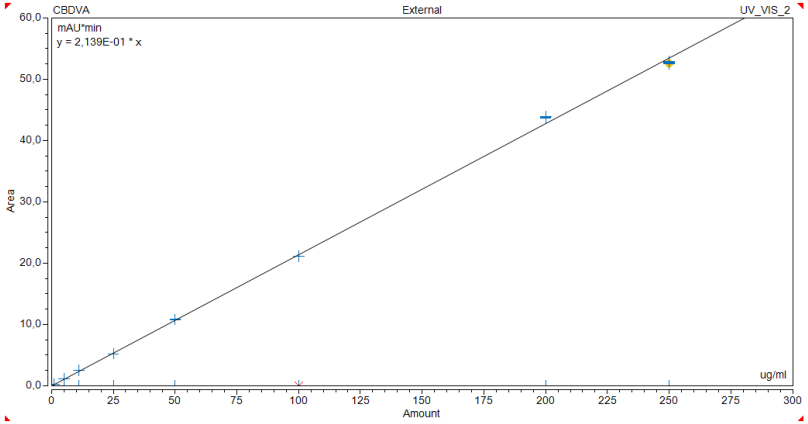
Detekcja UV-VIS/DAD



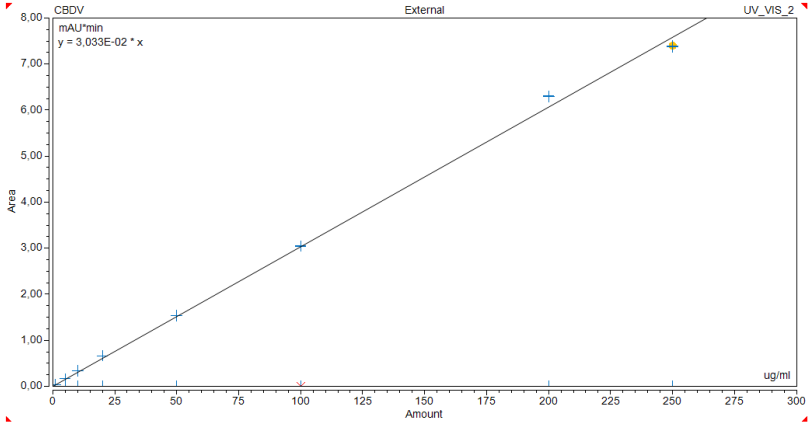
Rysunek 31. Krzywa kalibracyjna CBGO dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



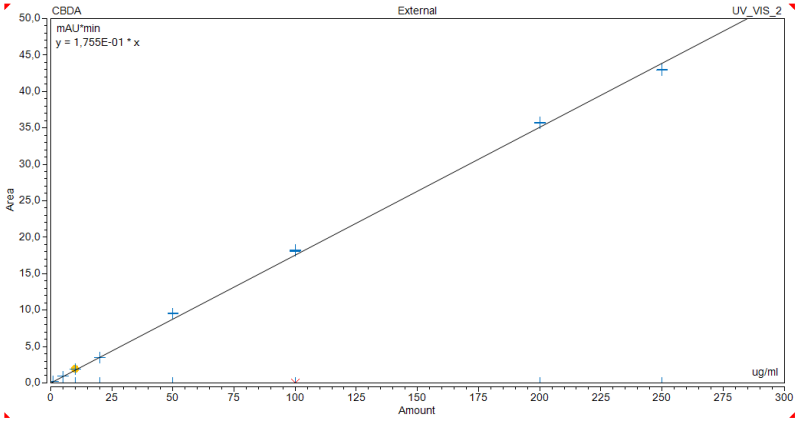
Rysunek 32. Krzywa kalibracyjna CBND dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



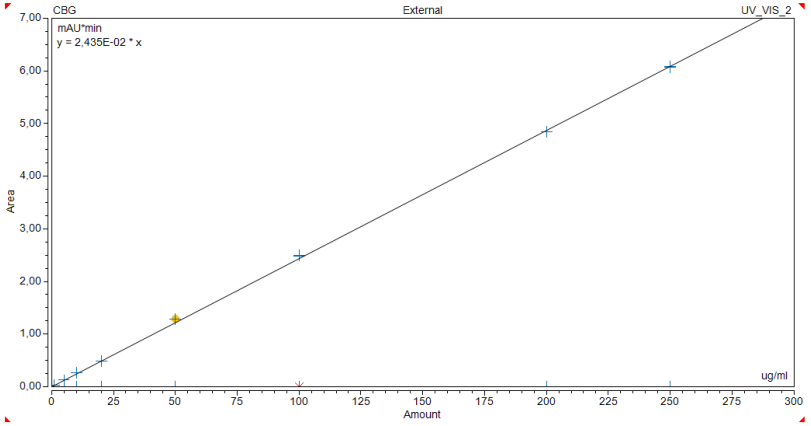
Rysunek 35. Krzywa kalibracyjna CBDVA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



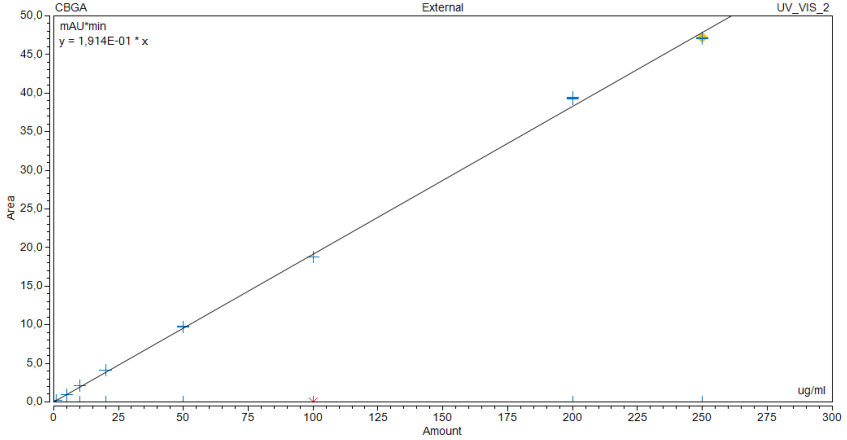
Rysunek 34. Krzywa kalibracyjna CBDV dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



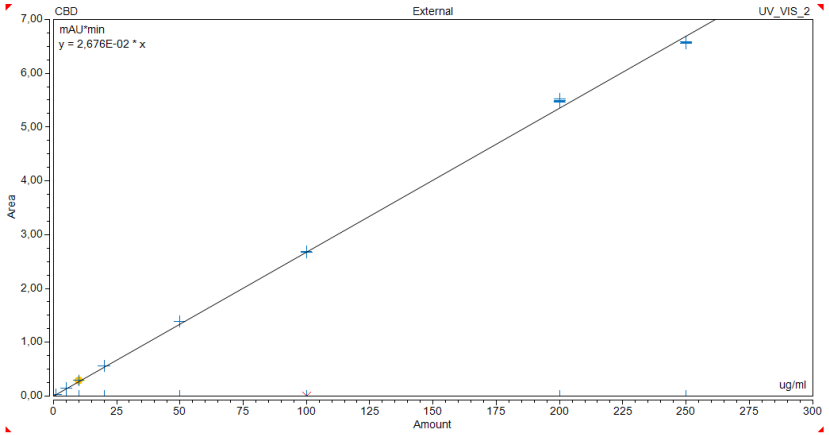
Rysunek 35. Krzywa kalibracyjna CBDA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



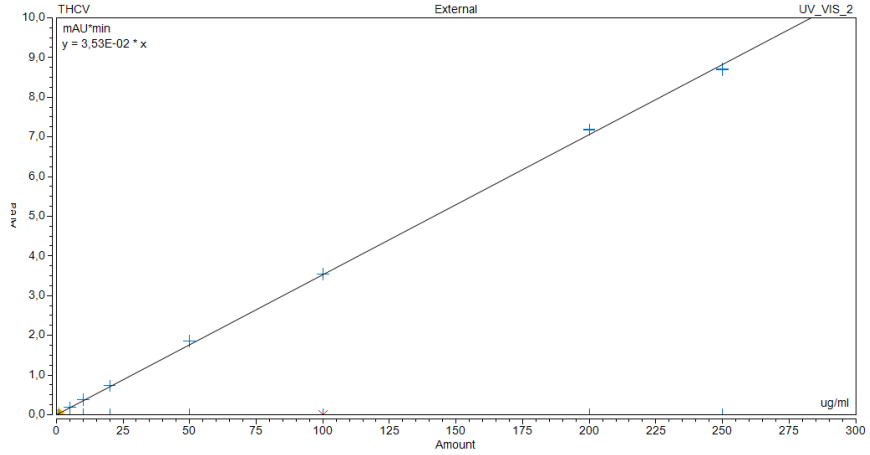
Rysunek 36. Krzywa kalibracyjna CBG dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



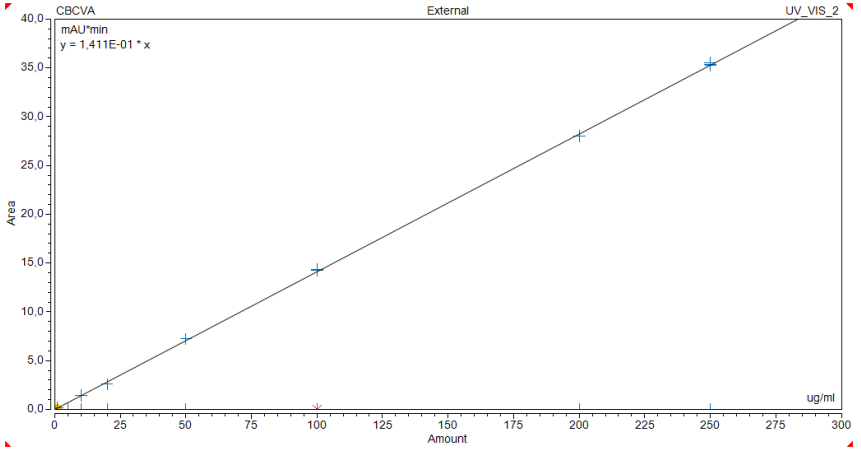
Rysunek 36. Krzywa kalibracyjna CBGA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



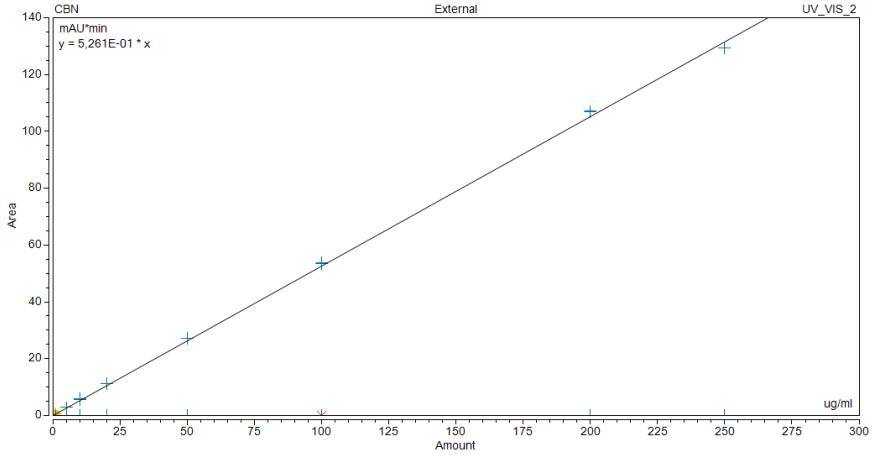
Rysunek 38. Krzywa kalibracyjna CBD dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



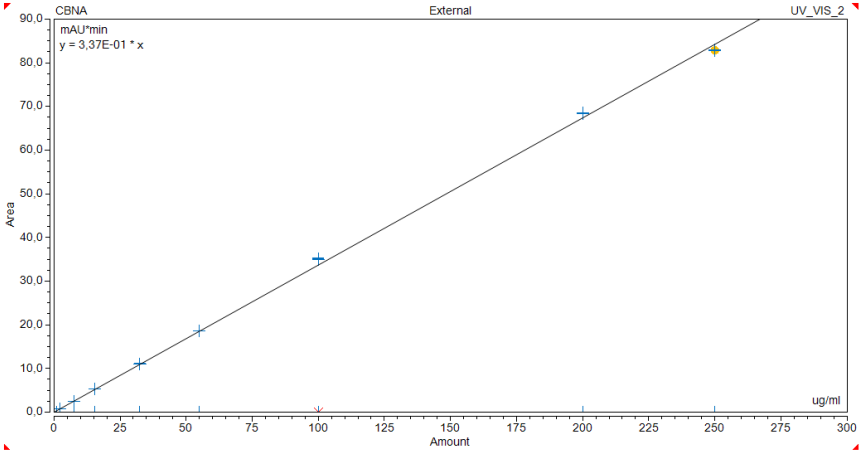
Rysunek 37. Krzywa kalibracyjna THCV dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



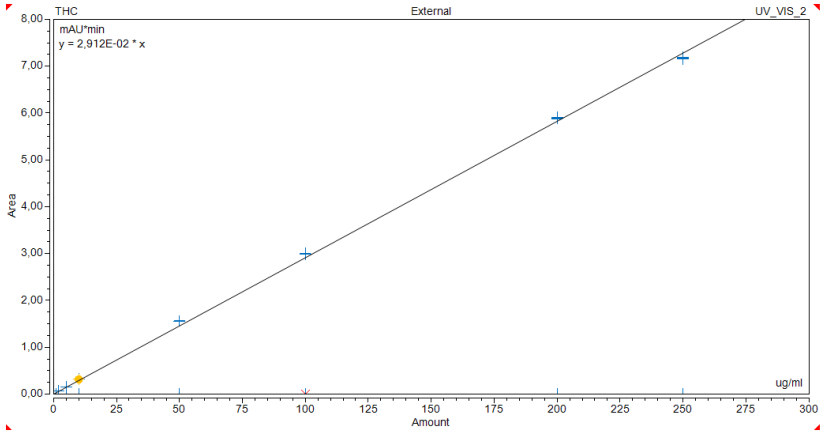
Rysunek 40. Krzywa kalibracyjna CBCVA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



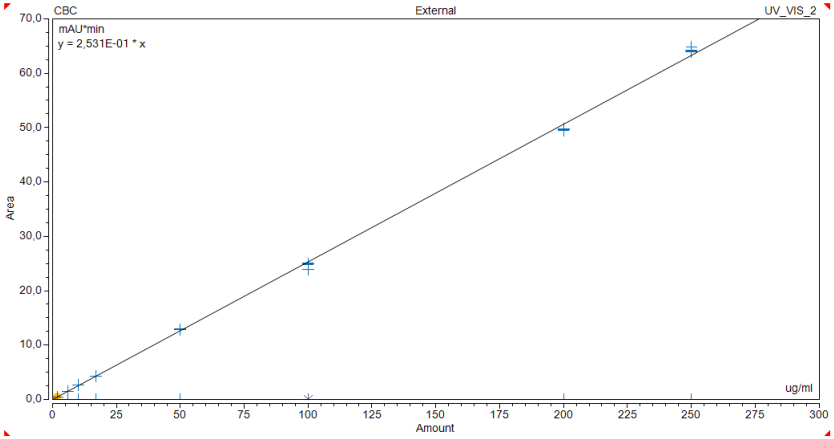
Rysunek 41. Krzywa kalibracyjna CBN dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



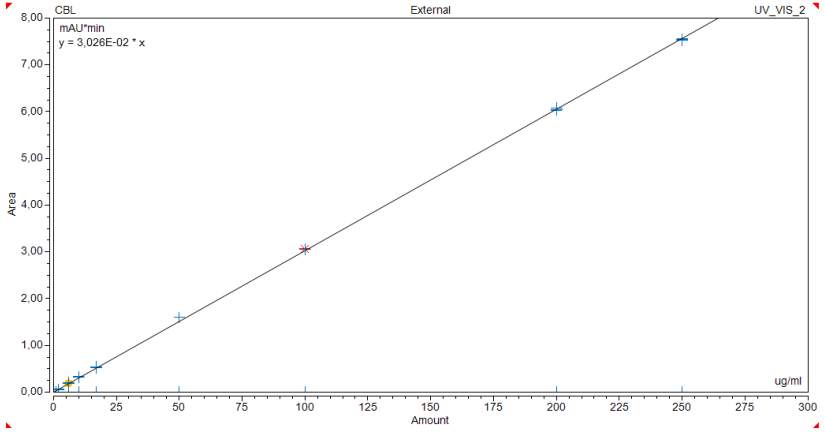
Rysunek 42. Krzywa kalibracyjna CBNA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



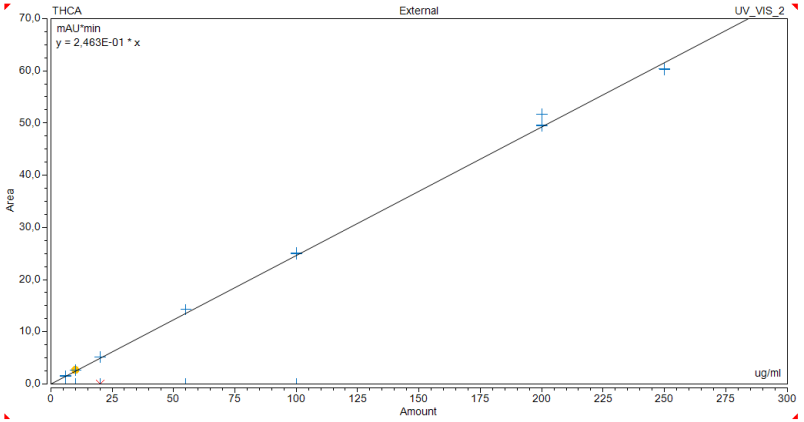
Rysunek 38.Krzywa kalibracyjna Δ^9-THC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



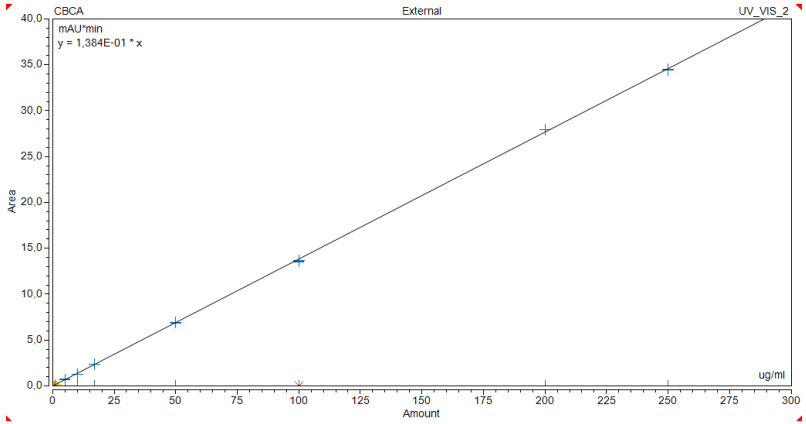
Rysunek 39. Krzywa kalibracyjna CBC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



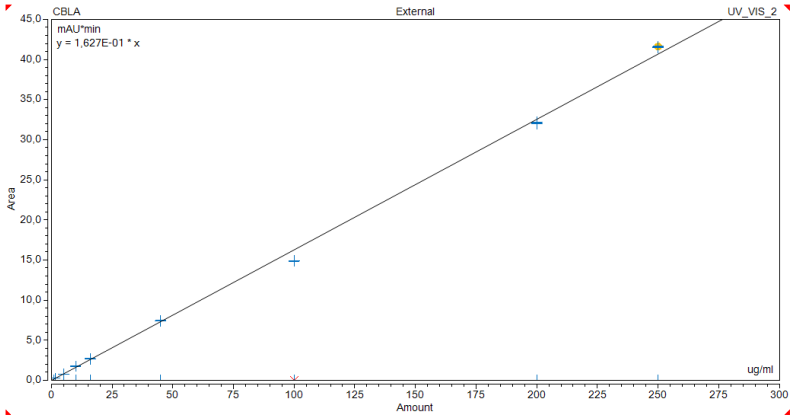
Rysunek 45. Krzywa kalibracyjna CBL dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



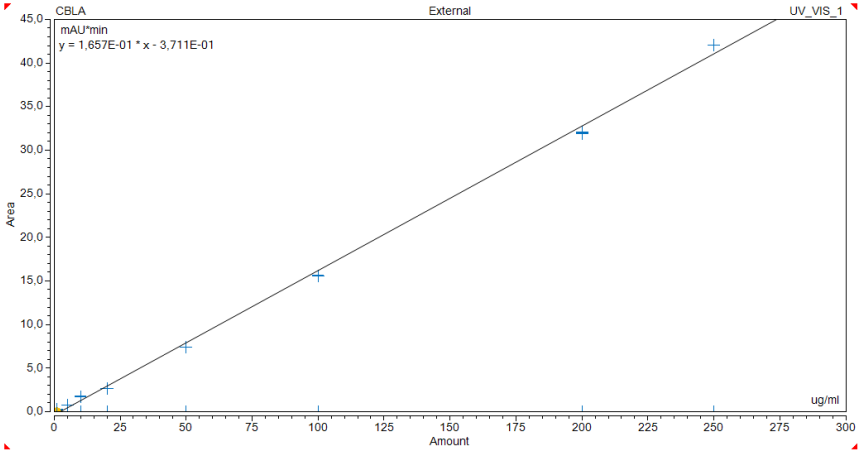
Rysunek 46. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THCA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.



Rysunek 40. Krzywa kalibracyjna CBCA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.

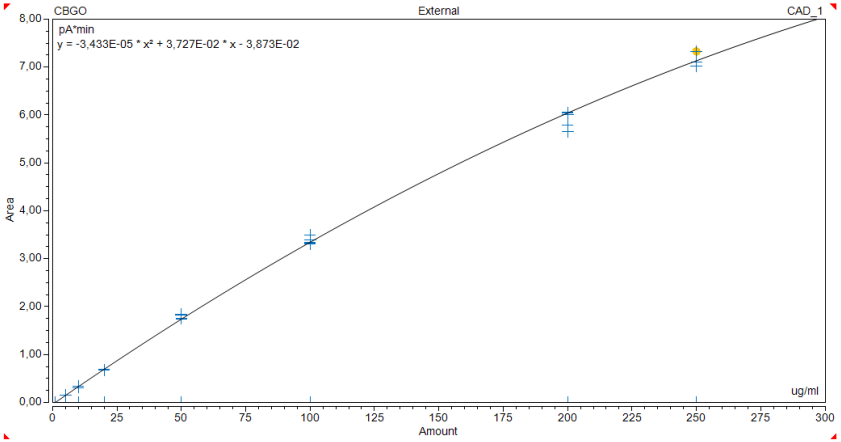


Rysunek 41. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THCP dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.

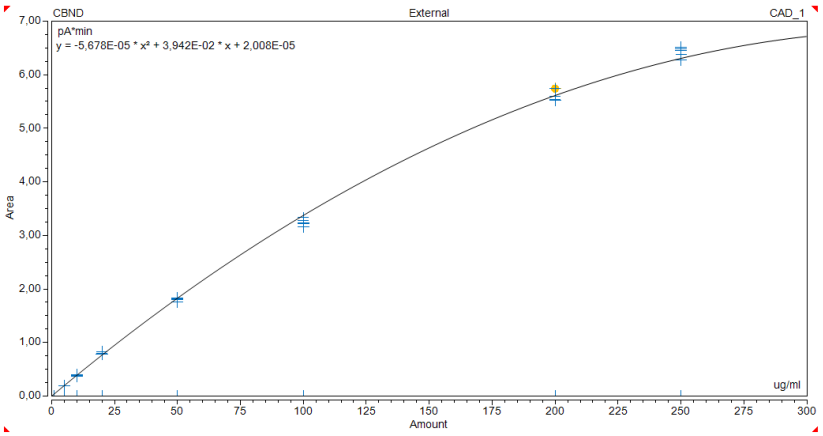


Rysunek 42. Krzywa kalibracyjna CBLA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym.

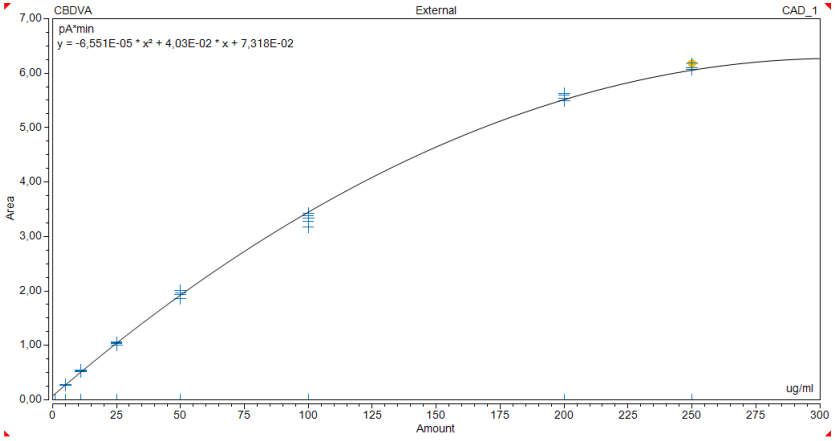
Detekcja CAD



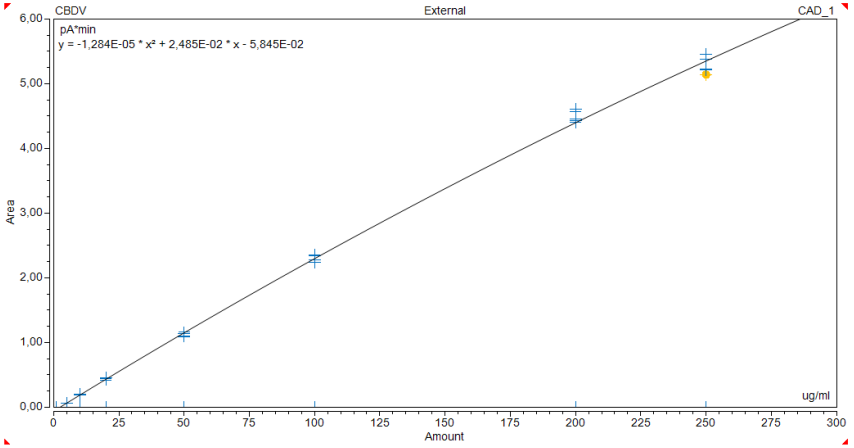
Rysunek 43. Krzywa kalibracyjna CBGO dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$.



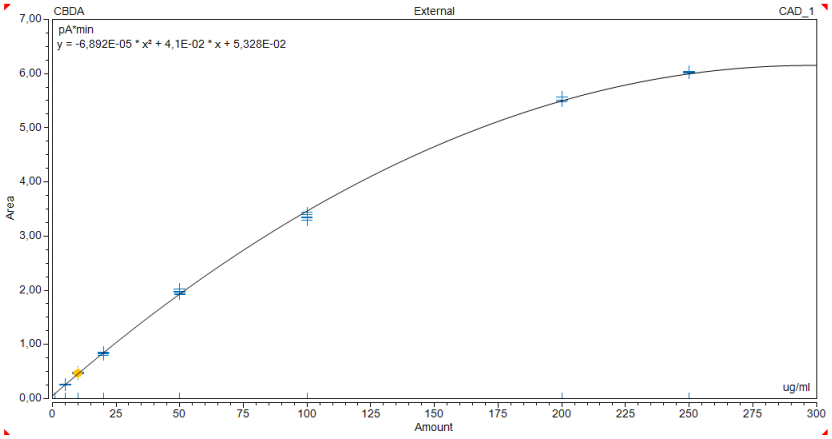
Rysunek 45. Krzywa kalibracyjna CBND dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2.



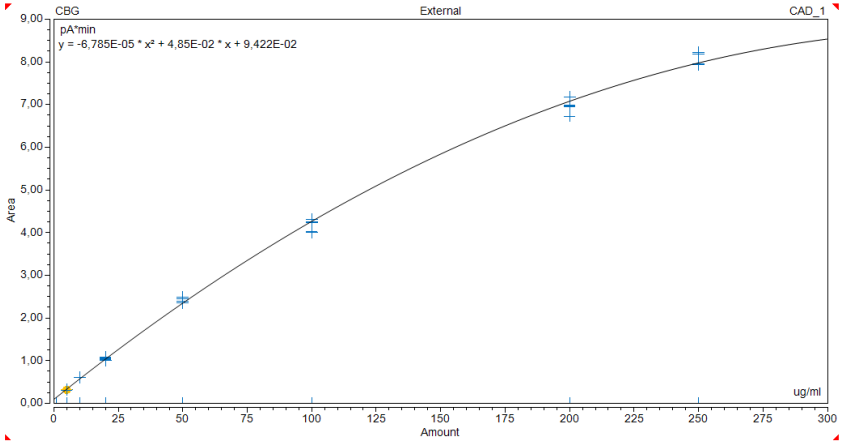
Rysunek 44. Krzywa kalibracyjna CBDVA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana kwadratowym z ważeniem 1/x2.



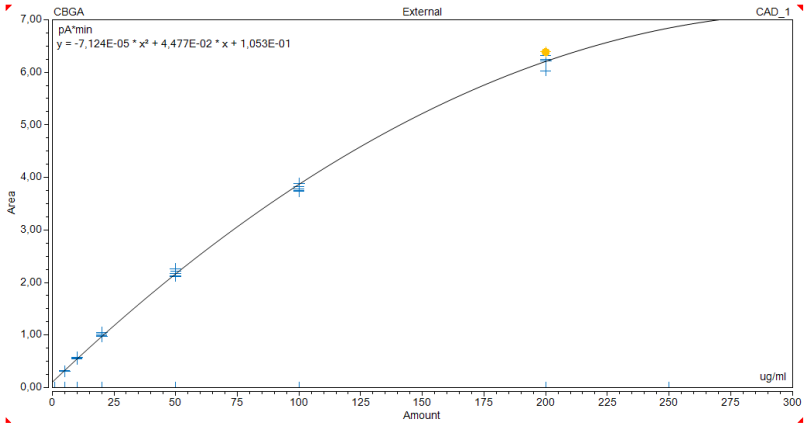
Rysunek 46. Krzywa kalibracyjna CBDV dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2.



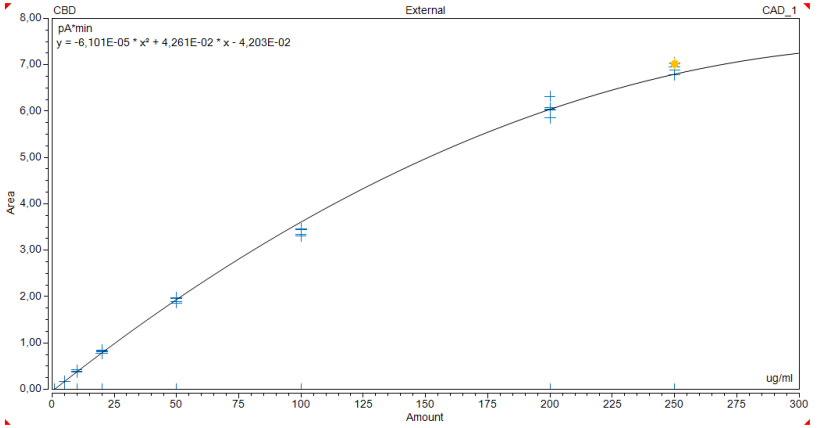
Rysunek 47. Krzywa kalibracyjna CBDA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2.



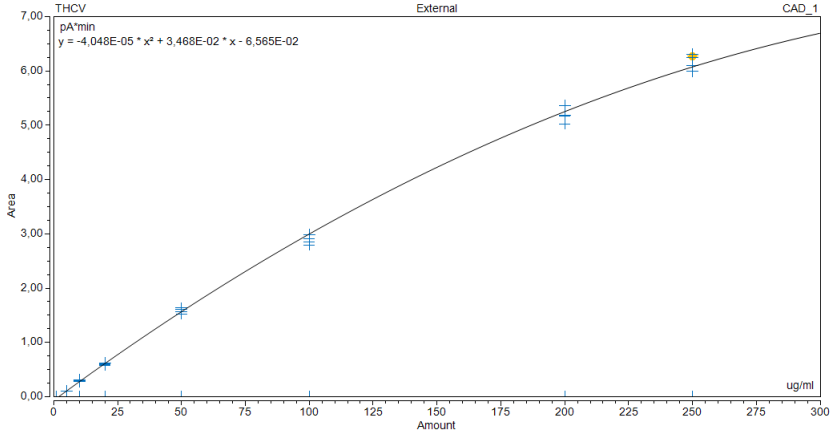
Rysunek 48. Krzywa kalibracyjna CBG dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



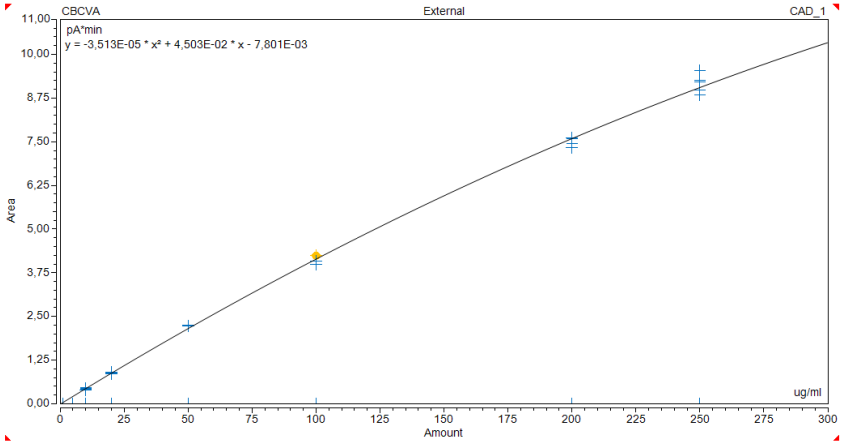
Rysunek 49. Krzywa kalibracyjna CBGA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



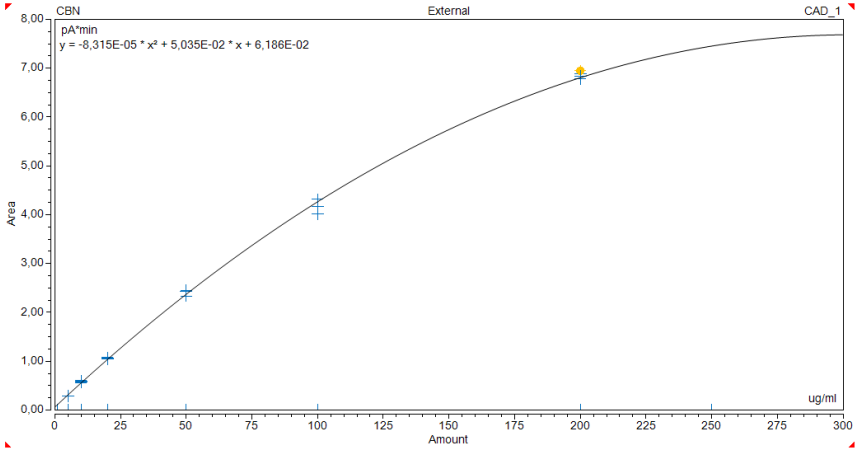
Rysunek 50. Krzywa kalibracyjna CBD dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$.



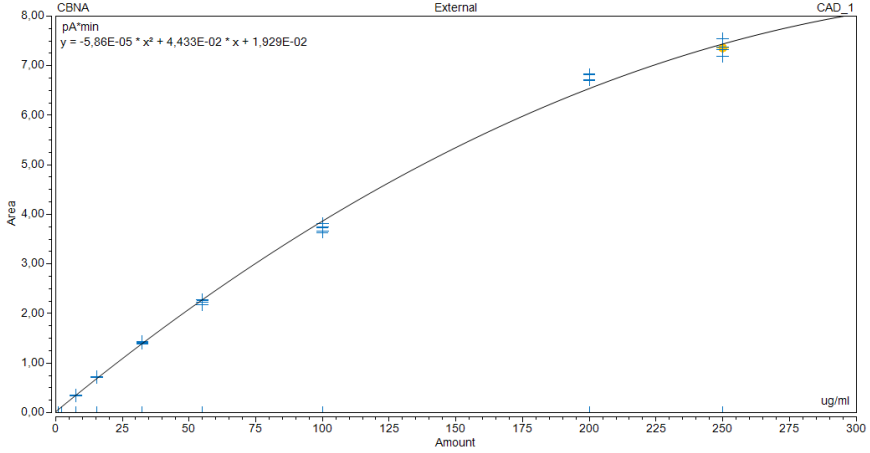
Rysunek 51. Krzywa kalibracyjna THCV dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$.



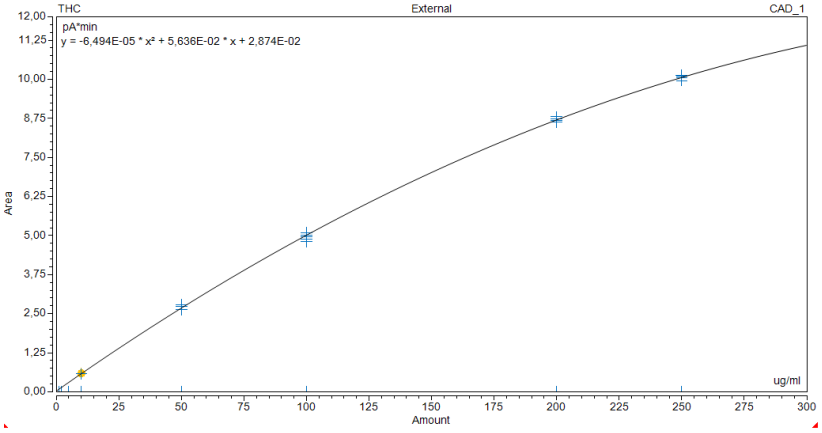
Rysunek 52. Krzywa kalibracyjna CBCVA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$.



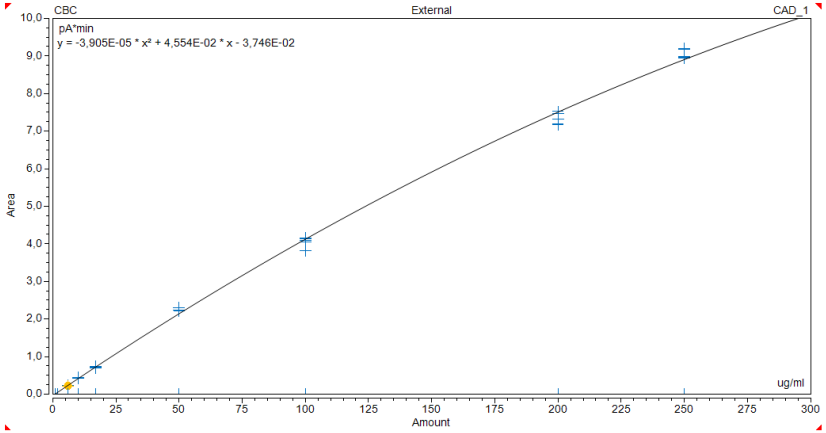
Rysunek 53. Krzywa kalibracyjna CBN dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



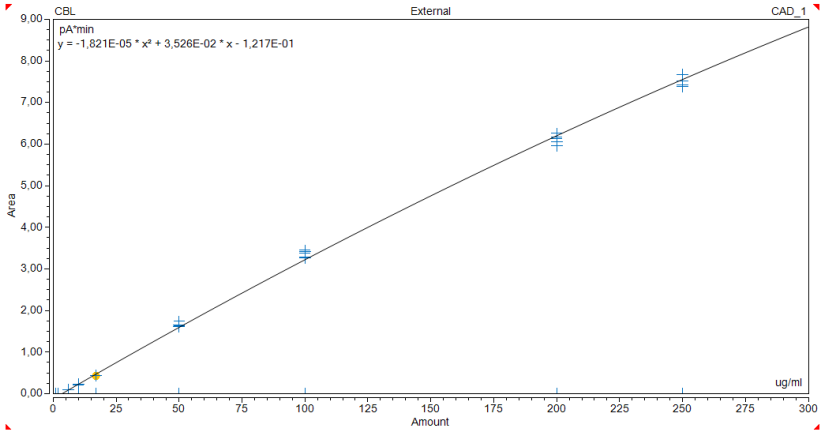
Rysunek 54. Krzywa kalibracyjna CBNA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2.



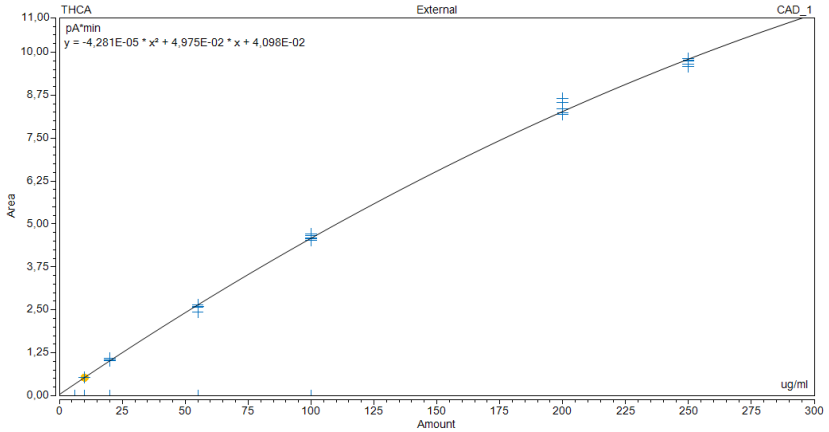
Rysunek 55. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THC dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



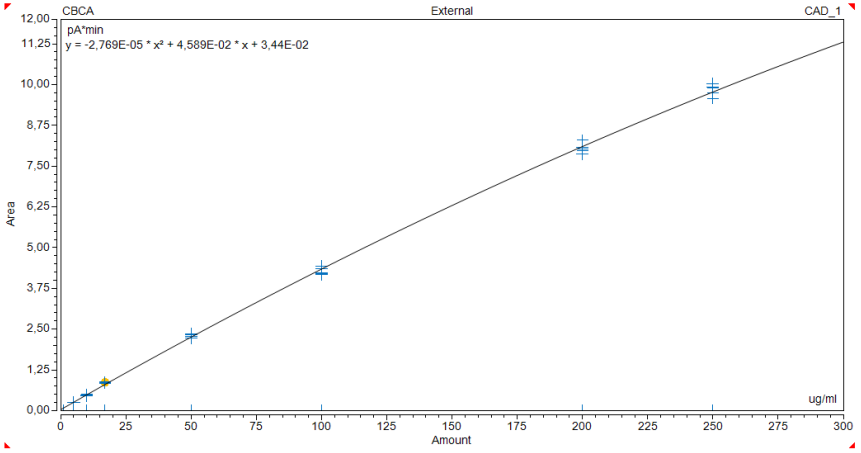
Rysunek 56. Krzywa kalibracyjna CBC dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



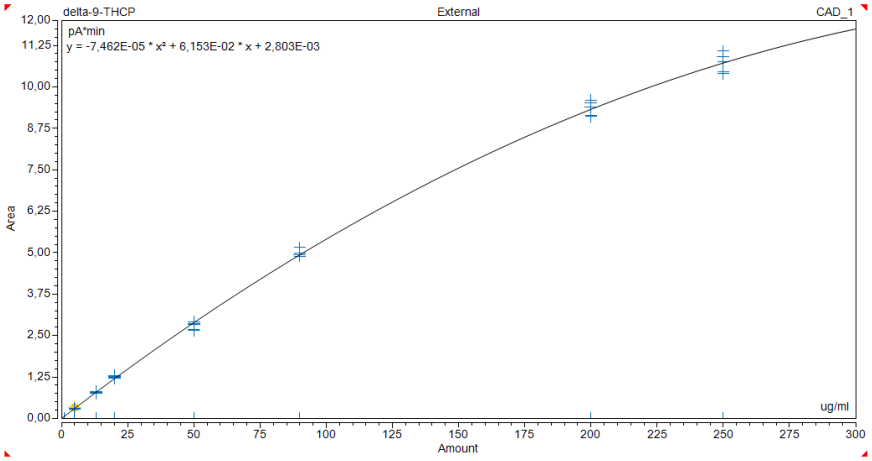
Rysunek 57. Krzywa kalibracyjna CBL dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2.



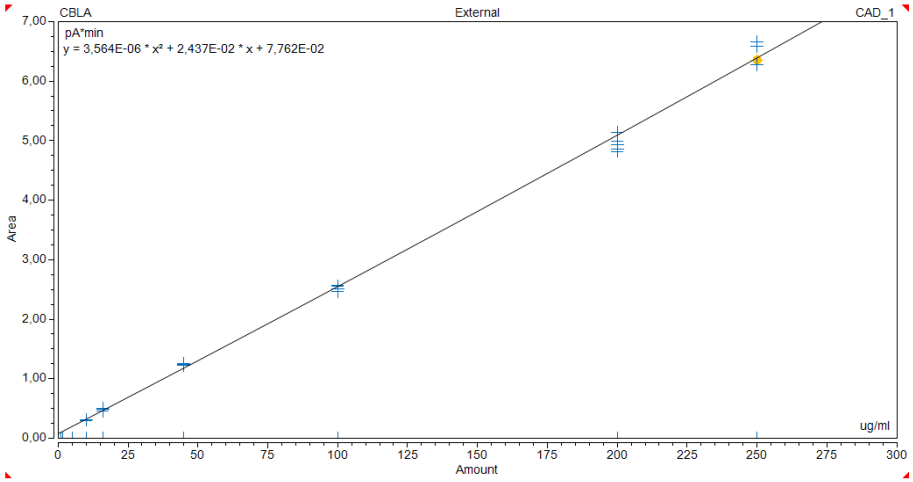
Rysunek 58. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THCA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



Rysunek 59. Krzywa kalibracyjna CBCA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



Rysunek 60. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THCP dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.



Rysunek 61. Krzywa kalibracyjna CBLA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x.

11.7. Wyniki obliczeń statystycznych parametrów walidacyjnych metod UHPLC-UV-VIS/DAD i UHPLC-CORONA CAD

Załącznik zawiera zestawienia wyników oraz obliczenia statystyczne wykorzystane do oceny parametrów walidacyjnych procedury UHPLC w wariantach UV-VIS/DAD i CORONA CAD. Dla odpowiednich serii wyznaczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (SD) oraz względne odchylenie standardowe (RSD).

W części dotyczącej kalibracji przedstawiono nominalne poziomy stężeń, powierzchnie pików, stężenia obliczone zwrotnie, błędy względne, równania krzywych kalibracyjnych, współczynniki determinacji R^2 oraz zakresy robocze. Dla wariantu UV-VIS/DAD zastosowano modele liniowe, natomiast dla wariantu CORONA CAD modele kwadratowe z ważeniem 1/x albo $1/x^2$, dobieranym indywidualnie dla poszczególnych analitów.

W tabelach dotyczących precyzji przedstawiono wyniki pojedynczych oznaczeń oraz obliczone wartości średnie, SD i RSD. Dokładność oceniono na podstawie wartości odzysku uzyskanych z trzech oznaczeń na każdym poziomie stężenia, a także średniego odzysku oraz parametrów opisujących rozproszenie wyników. Przyjęte kryterium akceptacji średniego odzysku wynosiło 90-115%.

Wartości LOD i LOQ oszacowano doświadczalnie na podstawie stosunku sygnału do szumu. Dla każdego ocenianego poziomu przedstawiono wartości S/N uzyskane z pięciu nastrzyków oraz ich średnią arytmetyczną. Dla LOD przyjęto średnią wartość $S/N \geq 3$, natomiast dla LOQ średnią wartość $S/N \geq 10$.

Tabele 149-171 zawierają wyniki liczbowe dotyczące wpływu zmian przepływu fazy ruchomej, temperatury kolumny, parametru Power Function oraz temperatury opisanej jako temperatura nebulizacji. Przedstawiono w nich czasy retencji, wyniki ilościowe, powierzchnie pików, rozdzielczość chromatograficzną, asymetrię pików, liczbę półek teoretycznych i wartości S/N. Dla zmienionych warunków obliczono również różnice bezwzględne i procentowe względem odpowiednich przebiegów odniesienia.

Dane zawarte w tabelach odporności umożliwiają opisową ocenę kierunku i wielkości obserwowanych zmian, jednak nie stanowią pełnej dokumentacji formalnej oceny tego parametru. W tabelach nie uwzględniono liczby powtórzeń, liczby niezależnych przygotowań, wartości SD i RSD ani liczbowych kryteriów akceptacji zmian retencji, powierzchni pików

i wyników ilościowych. Dla części par krytycznych wartości Rs są niedostępne lub niższe od przyjętego kryterium Rs ≥ 0,9.

11.8. Wyniki obliczeń statystycznych parametrów walidacyjnych

Do opracowania wyników walidacyjnych wykorzystano podstawowe parametry statystyki opisowej. Obliczenia wykonywano oddzielnie dla poszczególnych analitów oraz ocenianych wariantów detekcji. W zależności od analizowanego parametru wyznaczano średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe, względne odchylenie standardowe oraz odzysk.

Średnią arytmetyczną obliczono według równania:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

gdzie:

$\bar{x}$ - średnia arytmetyczna wyników,

x_i - wartość pojedynczego wyniku pomiaru,

i - numer kolejnego wyniku,

n - liczba wyników uwzględnionych w obliczeniu.

Średnia arytmetyczna stanowiła wartość reprezentującą serię powtórzonych pomiarów. Wykorzystywano ją między innymi do obliczania średnich czasów retencji, powierzchni pików, oznaczonych stężeń oraz wartości odzysku.

Odchylenie standardowe dla próby obliczono według równania:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n-1}};$$

gdzie:

$\bar{x}$ - średnia arytmetyczna wyników,

x_i - wartość pojedynczego wyniku pomiaru,

i - numer kolejnego wyniku,

n - liczba wyników uwzględnionych w obliczeniu,

n-1 - liczba stopni swobody.

Odchylenie standardowe określało rozproszenie pojedynczych wyników wokół wartości średniej. Wartość tego parametru wyrażano w tej samej jednostce co analizowane wyniki.

Względne odchylenie standardowe obliczono według równania:

$$RSD[\%] = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100;$$

gdzie:

RSD - względne odchylenie standardowe wyrażone w procentach,

SD - odchylenie standardowe wyników,

$\bar{x}$ - średnia arytmetyczna wyników.

Wartość RSD wykorzystywano do oceny względnej zmienności wyników. Parametr ten stosowano m.in. w ocenie powtarzalności czasów retencji, powierzchni pików, precyzji metody oraz przydatności systemu chromatograficznego.

Odzysk analitu obliczono według równania:

$$Odzysk[\%] = \frac{C_{oznaczone}}{C_{nominalne}} \times 100$$

gdzie:

$C_{oznaczone}$ - stężenie analitu wyznaczone na podstawie zastosowanego modelu kalibracyjnego,

$C_{nominalne}$ - nominalne stężenie analitu w analizowanym roztworze.

Wartość odzysku wykorzystano do porównania oznaczonego stężenia analitu z wartością nominalną. Odzysk 100% oznaczał zgodność obu wartości. Odzyski poniżej albo powyżej 100% odpowiadały odpowiednio ujemnemu albo dodatniemu odchyleniu od wartości nominalnej.

11.9.1 Obliczenia dla kalibracji UV-VIS/DAD

Kalibrację wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego. Sygnał analityczny stanowiła powierzchnia piku chromatograficznego zarejestrowanego przy długości fali 278 nm i wyrażona w mAU·min. W zależności od analitu do modelu kalibracyjnego włączano siedem albo osiem poziomów stężeń. Dla każdego poziomu wykonano pięć nastrzyków.

Podstawowy zestaw ośmiu poziomów, obejmujący stężenia 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/ml, zastosowano dla CBGO, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV i CBN. Dla pozostałych analitów zastosowano indywidualne zestawy poziomów odpowiadające zakresom roboczym przedstawionym w Tabelach 68-87.

Tabela 69. Poziomy kalibracyjne zastosowane w wariancie UHPLC-UV-VIS/DAD.

Analit	Poziomy stężeń włączone do modelu [µg/ml]
CBGO, CBND, CBDV, CBDA, CBGA, CBG, CBD, THCV, CBN	1; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 250
CBDVA	1; 5; 11; 25; 50; 100; 200; 250
CBCVA	1; 10; 20; 50; 100; 200; 250
CBNA	2,4; 7,5; 15,5; 32,5; 55; 100; 200; 250
Δ^9-THC	2; 5; 10; 50; 100; 200; 250
CBL	2; 6; 10; 17; 50; 100; 200; 250
Δ^9-THCA	6; 10; 20; 55; 100; 200; 250
CBC	1,8; 6; 10; 17; 50; 100; 200; 250
CBCA	1; 5; 10; 17; 50; 100; 200; 250
CBLA	1,5; 5; 10; 16; 45; 100; 200; 250
Δ^9-THCP	5; 10; 20; 50; 100; 200; 250

Poziomy 6 µg/ml dla CBL i CBC oraz 7,5 µg/ml dla CBNA wprowadzono dodatkowo w celu dokładniejszej oceny odpowiedzi w dolnej części zakresu kalibracyjnego. Dokumentacja źródłowa nie zawiera odrębnego uzasadnienia przygotowania pozostałych poziomów niestandardowych. Z tego względu nie przypisano im szczegółowego celu bez odwołania do protokołu albo arkusza przygotowania roztworów.

Dla każdego analitu i poziomu stężenia obliczono średnią powierzchnię piku, odchylenie standardowe oraz względne odchylenie standardowe. Obliczenia wykonywano zgodnie z równaniami przedstawionymi w punkcie 11.6.1.

Model kalibracyjny

Zależność pomiędzy powierzchnią piku a stężeniem analitu opisywano liniowym modelem kalibracyjnym:

$$y = ax + b$$

gdzie:

y - powierzchnia piku chromatograficznego zarejestrowanego przy długości fali 278 nm, wyrażona w mAU·min,
x - stężenie analitu w roztworze kalibracyjnym, wyrażone w µg/mL,
a - współczynnik kierunkowy prostej kalibracyjnej, określający zmianę odpowiedzi detektora przypadającą na jednostkową zmianę stężenia,
b - wyraz wolny równania kalibracyjnego.

W wariancie UHPLC-UV-VIS/DAD zastosowano liniowy model kalibracyjny bez wyrazu wolnego:

$$y = ax$$

Model bez wyrazu wolnego przyjęto ze względu na charakter odpowiedzi analitycznej. W analizach blanku rozpuszczalnikowego nie obserwowano mierzalnych pików w oknach retencji poszczególnych analitów, dlatego w przypadku braku analitu oczekiwana powierzchnia piku wynosiła zero. Sygnał analityczny stanowiła powierzchnia piku wyznaczana względem skorygowanej linii podstawowej. Z tego względu wprowadzenie niezerowego wyrazu wolnego nie znajdowało uzasadnienia w charakterze pomiaru.

Założenie proporcjonalności odpowiedzi detektora DAD do stężenia analitu było spełnione w deklarowanych zakresach roboczych. Przydatność modelu liniowego bez wyrazu wolnego oceniano na podstawie stężeń obliczonych zwrotnie oraz odpowiadających im błędów względnych. Kryteria akceptacji spełniały poziomy włączone do zakresu roboczego

w tym poziomy najniższe i najwyższe. Współczynnik determinacji R^2 traktowano jako parametr pomocniczy, a nie jako samodzielne kryterium wyboru modelu.

Zastosowanie modelu bez wyrazu wolnego ograniczało również wpływ niewielkich, przypadkowych zmian linii podstawowej na wartość stałego składnika równania. Decyzję o zastosowaniu modelu przechodzącego przez początek układu współrzędnych podejmowano na podstawie zgodności modelu z charakterem sygnału analitycznego oraz wynikami stężeń obliczonych zwrotnie, a nie wyłącznie na podstawie wartości R^2.

Zakres roboczy ustalano indywidualnie dla każdego analitu. Obejmował on poziomy stężeń znajdujące się na poziomie LOQ lub powyżej LOQ, uwzględnione w odpowiednim modelu kalibracyjnym i spełniające przyjęte kryteria błędu względnego.

Tabela 70. Parametry liniowych modeli kalibracyjnych dla wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD przy długości fali 278 nm.

Analit	Zakres roboczy [µg/mL]	Liczba poziomów	Liczba powtórzeń na poziom	Współczynnika	Równanie krzywej	R^2
CBGO	1-250	8	5	0,0309	y = 0,0309x	0,9989
CBDVA	1-250	8	5	0,2139	y = 0,2139x	0,9994
CBND	1-250	8	5	0,0772	y = 0,0772x	0,9984
CBDV	1-250	8	5	0,0303	y = 0,0303x	0,9983
CBDA	1-250	8	5	0,1755	y = 0,1755x	0,9989
CBGA	1-250	8	5	0,1914	y = 0,1914x	0,9991
CBG	1-250	8	5	0,0243	y = 0,0243x	0,9998
CBD	1-250	8	5	0,0268	y = 0,0268x	0,9992
THCV	1-250	8	5	0,0353	y = 0,0353x	0,9995
CBN	1-250	8	5	0,5261	y = 0,5261x	0,9994
CBCVA	1-250	7	5	0,1411	y = 0,1411x	0,9998
CBNA	2,4-250	8	5	0,337	y = 0,3370x	0,9993
Δ^9-THC	2-250	7	5	0,0291	y = 0,0291x	0,9993
CBL	2-250	8	5	0,0303	y = 0,0303x	0,9998
Δ^9-THCA	6-250	7	5	0,2463	y = 0,2463x	0,9986
CBC	1,8-250	8	5	0,2531	y = 0,2531x	0,9994
CBCA	1-250	8	5	0,1384	y = 0,1384x	0,9999
CBLA	1,5-250	8	5	0,1627	y = 0,1627x	0,9983
Δ^9-THCP	5-250	7	5	0,0323	y = 0,0323x	0,9993

Jeżeli dla poszczególnych poziomów wyznaczano stężenie zwrotne, obliczono je przez przekształcenie równania liniowego:

$$C_{obliczone} = \frac{y-b}{a}$$

gdzie:

$C_{obliczone}$ - stężenie analitu obliczone na podstawie równania kalibracyjnego, wyrażone w µg/ml,

y - zmierzona powierzchnia piku,

a - współczynnik kierunkowy prostej kalibracyjnej,

b - wyraz wolny równania.

Błąd względny został obliczony według równania:

Błąd względny obliczono w celu oceny dokładności oznaczeń oraz identyfikacji systematycznego zawyżania lub zaniżania wyników względem wartości referencyjnej. Parametr wyznaczono oddzielnie dla każdego poziomu stężenia, co umożliwiło również ocenę poprawności zastosowanego modelu kalibracyjnego w całym badanym zakresie.

$$Błąd\ względny[\%] = \frac{C_{obliczone} - C_{nominalne}}{C_{nominalne}} x100$$

gdzie:

$C_{obliczone}$ - stężenie wyznaczone na podstawie modelu kalibracyjnego,

$C_{nominalne}$ - nominalne stężenie roztworu kalibracyjnego.

Dodatnia wartość błędu względnego wskazywała na zawyżenie wyniku względem stężenia nominalnego, natomiast wartość ujemna na jego zaniżenie.

Tabela 71. Wyniki kalibracji CBGO dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,0308	0,000	0,92	1,00	-0,4620
5	5	0,1558	0,000	0,27	5,03	0,6684
10	5	0,2963	0,001	0,26	9,57	-4,2614
20	5	0,5665	0,002	0,36	18,30	-8,4779
50	5	1,5368	0,001	0,06	49,66	-0,6872
100	5	3,0998	0,003	0,08	100,16	0,1591
200	5	5,9973	0,007	0,11	193,78	-3,1112
250	5	7,8962	0,044	0,56	255,14	2,0540

Tabela 72. Wyniki kalibracji CBDVA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,2240	0,00	0,89	1,05	4,7200
5	5	1,1421	0,00	0,23	5,34	6,7932
12	5	2,5708	0,01	0,29	12,02	9,2698
25	5	5,2361	0,01	0,11	24,48	-2,0762
50	5	10,8168	0,01	0,08	50,57	1,1453
100	5	21,1732	0,02	0,07	98,99	-1,0064
200	5	43,8117	0,07	0,17	204,84	2,4186
250	5	52,7052	0,13	0,26	246,42	-1,4327

Tabela 73. Wyniki kalibracji CBND dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,0837	0,0008	0,97	1,08	8,35
5	5	0,4230	0,0012	0,28	5,48	9,57
10	5	0,8481	0,0008	0,09	10,98	9,85
20	5	1,6825	0,0145	0,86	21,79	8,95
50	5	4,1323	0,0057	0,14	53,52	7,04
100	5	7,9789	0,0117	0,15	103,34	3,34
200	5	15,8670	0,0129	0,08	205,50	2,75
250	5	18,7912	0,0201	0,11	243,37	-2,65

Tabela 74. Wyniki kalibracji CBDV dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,0327	0,0003	0,86	1,08	7,83
5	5	0,1622	0,0002	0,12	5,35	6,94
10	5	0,3310	0,0012	0,37	10,91	9,13
20	5	0,6634	0,0009	0,14	21,87	9,37
50	5	1,5346	0,0019	0,12	50,59	1,19
100	5	3,0465	0,0019	0,06	100,44	0,44
200	5	6,2981	0,0074	0,12	207,64	3,82
250	5	7,3825	0,0095	0,13	243,40	-2,64

Tabela 75. Wyniki kalibracji CBDA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,1915	0,0006	0,33	1,09	9,14
5	5	0,9140	0,0014	0,16	5,21	4,17
10	5	1,9163	0,0071	0,37	10,92	9,20
20	5	3,5038	0,0078	0,22	19,97	-0,17
50	5	9,5430	0,0116	0,12	54,38	8,76
100	5	18,1774	0,0659	0,36	103,58	3,58
200	5	35,6891	0,0660	0,19	203,37	1,69
250	5	42,9852	0,0844	0,20	244,95	-2,02

Tabela 76. Wyniki kalibracji CBGA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,2063	0,0038	1,84	1,08	7,78
5	5	0,9867	0,0053	0,54	5,15	3,10
10	5	2,0851	0,0122	0,58	10,89	8,93
20	5	4,1150	0,0088	0,21	21,50	7,49
50	5	9,7420	0,0336	0,35	50,89	1,79
100	5	18,7592	0,0230	0,12	98,00	-2,00
200	5	39,3505	0,1089	0,28	205,57	2,79
250	5	47,0892	0,0781	0,17	246,00	-1,60

Tabela 77. Wyniki kalibracji CBG dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,0263	0,0003	1,02	1,08	7,98
5	5	0,1268	0,0007	0,58	5,21	4,14
10	5	0,2608	0,0031	1,17	10,71	7,11
20	5	0,4847	0,0017	0,35	19,91	-0,46
50	5	1,2885	0,0012	0,10	52,92	5,85
100	5	2,4896	0,0024	0,09	102,26	2,26
200	5	4,8429	0,0046	0,09	198,91	-0,54
250	5	6,0711	0,0046	0,08	249,36	-0,26

Tabela 78. Wyniki kalibracji CBD dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,0290	0,0001	0,31	1,08	8,15
5	5	0,1434	0,0005	0,38	5,36	7,19
10	5	0,2897	0,0011	0,39	10,83	8,27
20	5	0,5635	0,0027	0,49	21,06	5,29
50	5	1,2209	0,3650	0,40	45,63	-8,75
100	5	2,4194	0,5778	0,48	90,41	-9,59
200	5	5,4836	0,0239	0,44	204,92	2,46
250	5	6,5709	0,0151	0,23	245,55	-1,78

Tabela 79. Wyniki kalibracji THCV dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,0377	0,0004	1,04	1,07	6,74
5	5	0,1819	0,0014	0,77	5,15	3,03
10	5	0,3853	0,0004	0,11	10,91	9,15
20	5	0,7308	0,0021	0,29	20,70	3,51
50	5	1,8549	0,0019	0,10	52,54	5,09
100	5	3,5466	0,0020	0,06	100,46	0,46
200	5	7,1848	0,0027	0,04	203,52	1,76
250	5	8,6982	0,0066	0,08	246,39	-1,44

Tabela 80. Wyniki kalibracji CBN dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,5472	0,0015	0,28	1,04	4,01
5	5	2,8147	0,0046	0,16	5,35	7,00
10	5	5,7245	0,0507	0,89	10,88	8,81
20	5	11,2301	0,0051	0,05	21,35	6,73
50	5	27,1600	0,0124	0,05	51,62	3,25
100	5	53,5701	0,0454	0,08	101,82	1,82
200	5	107,0384	0,0961	0,09	203,45	1,73
250	5	129,4421	0,0489	0,04	246,03	-1,59

Tabela 81. Wyniki kalibracji CBCVA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,1481	0,0017	1,11	1,05	4,91
10	5	1,4088	0,0141	1,00	9,98	-0,18
20	5	2,5915	0,0032	0,13	18,36	-8,19
50	5	7,2220	0,0062	0,09	51,17	2,34
100	5	14,3116	0,0219	0,15	101,40	1,40
200	5	28,0145	0,0137	0,05	198,48	-0,76
250	5	35,3633	0,0784	0,22	250,55	0,22

Tabela 82. Wyniki kalibracji CBNA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
2,4	5	0,8052	0,0086	1,07	2,39	-0,43
7,5	5	2,4911	0,0085	0,34	7,39	-1,43
15,5	5	5,2758	0,0270	0,51	15,66	1,01
32,5	5	11,0451	0,0632	0,57	32,78	0,86
55	5	18,5984	0,0186	0,10	55,19	0,35
100	5	35,0160	0,1400	0,40	103,91	3,91
200	5	68,4396	0,0738	0,11	203,10	1,55
250	5	82,8493	0,0503	0,06	245,87	-1,65

Tabela 83. Wyniki kalibracji Δ^9-THC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
2	5	0,0602	0,0016	2,71	2,07	3,38
5	5	0,1537	0,0030	1,94	5,28	5,58
10	5	0,3157	0,0024	0,75	10,84	8,39
50	5	1,5589	0,0027	0,18	53,53	7,06
100	5	2,9909	0,0082	0,27	102,70	2,70
200	5	5,8948	0,0111	0,19	202,41	1,21
250	5	7,1715	0,0111	0,16	246,25	-1,50

Tabela 84. Wyniki kalibracji CBL dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
2	5	0,0564	0,0014	2,57	1,86	-6,77
6	5	0,1901	0,0036	1,89	6,28	4,70
10	5	0,3278	0,0018	0,55	10,83	8,31
17	5	0,5282	0,0074	1,41	17,45	2,66
50	5	1,5964	0,0010	0,07	52,75	5,49
100	5	3,0574	0,0057	0,19	101,02	1,02
200	5	6,0531	0,0239	0,40	200,01	0,00
250	5	7,5380	0,0090	0,12	249,07	-0,37

Tabela 85. Wyniki kalibracji Δ^9-THCA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
6	5	1,5318	0,0103	0,67	6,22	3,66
10	5	2,6961	0,0082	0,31	10,95	9,47
20	5	5,1432	0,0078	0,15	20,88	4,42
55	5	14,2573	0,0055	0,04	57,89	5,26
100	5	25,0181	0,0821	0,33	101,58	1,58
200	5	50,4153	1,1909	2,36	204,71	2,35
250	5	60,3020	0,0754	0,13	244,85	-2,06

Tabela 86. Wyniki kalibracji CBC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1,8	5	0,4568	0,0025	0,54	1,80	0,25
6	5	1,4876	0,0046	0,31	5,88	-2,06
10	5	2,6873	0,0053	0,20	10,62	6,16
17	5	4,2373	0,0155	0,37	16,74	-1,53
50	5	12,9041	0,0317	0,25	50,98	1,95
100	5	24,7550	0,4921	1,99	97,79	-2,21
200	5	49,6297	0,1345	0,27	196,06	-1,97
250	5	64,2554	0,3688	0,57	253,84	1,53

Tabela 87. Wyniki kalibracji CBCA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1	5	0,1491	0,0025	1,68	1,08	7,77
5	5	0,7154	0,0058	0,82	5,17	3,39
10	5	1,2681	0,0105	0,83	9,16	-8,36
17	5	2,3456	0,0037	0,16	16,95	-0,29
50	5	6,8861	0,0167	0,24	49,76	-0,48
100	5	13,6133	0,0463	0,34	98,37	-1,63
200	5	27,9285	0,0231	0,08	201,82	0,91
250	5	34,4954	0,0373	0,11	249,27	-0,29

Tabela 88. Wyniki kalibracji CBLA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
1,5	5	0,2428	0,0034	1,40	1,49	-0,55
5	5	0,7718	0,0052	0,68	4,74	-5,15
10	5	1,7542	0,0129	0,73	10,78	7,79
16	5	2,6853	0,0194	0,72	16,50	3,13
45	5	7,4342	0,0224	0,30	45,68	1,52
100	5	14,8889	0,0298	0,20	91,49	-8,51
200	5	32,0874	0,0746	0,23	197,18	-1,41
250	5	41,5761	0,0513	0,12	255,48	2,19

Tabela 89. Wyniki kalibracji Δ^9-THCP dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,1605	0,0052	3,27	4,98	-0,49
10	5	0,3520	0,0022	0,61	10,91	9,08
20	5	0,6448	0,0032	0,50	19,98	-0,09
50	5	1,5486	0,0071	0,46	47,99	-4,03
100	5	3,1696	0,0031	0,10	98,22	-1,78
200	5	6,6116	0,0086	0,13	204,88	2,44
250	5	7,9763	0,0039	0,05	247,17	-1,13

Stężenia obliczone zwrotnie oraz wartości błędu względnego wyznaczano na podstawie niezaokrąglonych wartości powierzchni pików oraz współczynników modelu. Ewentualne różnice między wartościami obliczonymi na podstawie danych niezaokrąglonych a wartościami

odtworzonymi z danych przedstawionych w tabelach wynikają z zaokrąglenia prezentowanych wartości.

11.9.2 Obliczenia dla kalibracji z wykorzystaniem detektora CAD

Kalibrację wariantu UHPLC-CORONA CAD przeprowadzono metodą wzorca zewnętrznego. Sygnał analityczny stanowiła powierzchnia piku chromatograficznego, wyrażona w pA·min. Plan kalibracji obejmował wykonanie pięciu nastrzyków dla każdego poziomu stężenia. Dla większości analitów w arkuszu źródłowym dostępnych było sześć lub siedem poziomów stężeń, przy czym każdy poziom obejmował pięć wyników pomiarowych. Odstępstwa w tym zakresie, dotyczące CBD i Δ^9-THC, opisano poniżej.

Podstawowy zestaw poziomów stężeń obejmował wartości 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 250 µg/ml. Do budowy modeli kalibracyjnych dla wariantu CAD uwzględniano jednak wyłącznie poziomy stężeń mieszczące się w indywidualnym zakresie roboczym danego analitu. Rzeczywiste zestawy poziomów stężeń wykorzystane w analizie, odtworzone na podstawie arkuszy źródłowych, przedstawiono w Tabeli 89.

Tabela 90. Poziomy kalibracyjne udokumentowane dla wariantu UHPLC-CORONA CAD.

Analit	Poziomy stężeń włączone do zestawienia [µg/ml
CBGO, CBND, CBDV, CBDA, CBG, CBD, THCV	5; 10; 20; 50; 100; 200; 250
CBDVA	5; 11; 25; 50; 100; 200; 250
CBGA, CBN	5; 10; 20; 50; 100; 200
CBCVA	10; 20; 50; 100; 200; 250
CBNA	7,5; 15,5; 32,5; 55; 100; 200; 250
Δ^9-THC	10; 50; 100; 200; 250*
CBL	6; 10; 17; 50; 100; 200; 250
Δ^9-THCA	10; 20; 55; 100; 200; 250
CBC	6; 10; 17; 50; 100; 200; 250
CBCA	5; 10; 17; 50; 100; 200; 250
CBLA	10; 16; 45; 100; 200; 250
Δ^9-THCP	10; 20; 50; 100; 200; 250

Poza podstawowym zestawem kalibracyjnym dla wybranych analitów przygotowano dodatkowe poziomy stężeń: 6 µg/ml dla CBL i CBC; 7,5, 15,5, 32,5 i 55 µg/ml dla CBNA; 11 i 25

µg/ml dla CBDVA; 16 i 45 µg/ml dla CBLA; 17 µg/ml dla CBL, CBC i CBCA oraz 55 µg/ml dla Δ^9-THCA. Dodatkowe poziomy wprowadzono w celu zwiększenia liczby punktów kalibracyjnych w niższej części zakresu roboczego, dokładniejszego odwzorowania odpowiedzi detektora CAD oraz poprawy dokładności stężeń obliczonych zwrotnie. Rozwiązanie to umożliwiło lepsze dopasowanie modelu kalibracyjnego w zakresie niskich stężeń w tym w pobliżu indywidualnej granicy oznaczalności poszczególnych analitów. Każdy dodatkowy poziom analizowano w pięciu powtórzeniach.

Ze względu na nieliniową charakterystykę odpowiedzi detektora CAD zależność pomiędzy powierzchnią piku a stężeniem analitu opisano równaniem regresji kwadratowej:

$$y = ax^2 + bx + c$$

gdzie:

y - powierzchnia piku chromatograficznego wyrażona w pA·min,
x - stężenie analitu w roztworze kalibracyjnym wyrażone w µg/ml,
a - współczynnik składnika kwadratowego,
b - współczynnik składnika liniowego,
c - wyraz wolny równania regresji.

Dla poszczególnych analitów zastosowano ważenie 1/x albo $1/x^2$ zgodnie z Tabelą 88:

$$w_i = \frac{1}{x_i}; \text{ lub } w_i = \frac{1}{x_i^2};$$

gdzie:

w_i - waga przypisana do danego punktu kalibracyjnego,
x_i - nominalne stężenie analitu dla danego punktu kalibracyjnego.

Ważenie 1/x zastosowano dla 9 analitów, a ważenie $1/x^2$ dla 10 analitów. Przypisanie wag do analitów przedstawiono w Tabeli 90.

Dla każdego analitu wyznaczano parametry modelu regresji, równanie krzywej kalibracyjnej, współczynnik determinacji R^2, zakres roboczy oraz liczbę poziomów kalibracyjnych uwzględnionych w modelu. Zakres roboczy ustalano indywidualnie dla poszczególnych analitów, z uwzględnieniem granicy oznaczalności oraz jakości dopasowania modelu.

Tabela 90 zawiera wartości współczynnika determinacji R^2, natomiast w Tabelach 91-109 przedstawiono stężenia obliczone zwrotnie oraz odpowiadające im błędy względne. Nie przedstawiono odrębnych kryteriów akceptacji dla wartości R^2 ani wyników oceny reszt modeli.

Tabela 91. Parametry kwadratowych modeli kalibracyjnych z ważeniem 1/x lub $1/x^2$ dla wariantu UHPLC-CAD.

Analit	Zakres roboczy [µg/ml]	Liczba poziomów[1]	Powtórzenia na poziom	(a)	(b)	(c)	(R^2)	Ważenie
CBGO	5-250	7	5	-0,000034	0,0373	-0,0387	0,9989	$1/x^2$
CBDVA	5-250	7	5	-0,000066	0,0403	0,0732	0,9974	$1/x^2$
CBND	5-250	7	5	-0,000057	0,0394	0,0000	0,9976	$1/x^2$
CBDV	5-250	7	5	-0,000013	0,0249	-0,0584	0,9987	$1/x^2$
CBDA	5-250	7	5	-0,000069	0,0410	0,0533	0,9976	$1/x^2$
CBGA	5-200	6	5	-0,000071	0,0448	0,1053	0,9987	1/x
CBG	5-250	7	5	-0,000068	0,0485	0,0942	0,9984	1/x
CBD	5-250	7	5	-0,000061	0,0426	-0,0420	0,9971	$1/x^2$
THCV	5-250	7	5	-0,000040	0,0347	-0,0656	0,9978	$1/x^2$
CBN	5-200	6	5	-0,000083	0,0504	0,0619	0,9985	1/x
CBCVA	10-250	6	5	-0,000041	0,0463	-0,0263	0,9987	1/x
CBNA	7,5-250	7	5	-0,000059	0,0443	0,0193	0,998	$1/x^2$
Δ^9-THC	10-250	6	5	-0,000065	0,0564	0,0287	0,9996	1/x
CBL	6-250	7	5	-0,000018	0,0353	-0,1217	0,9973	$1/x^2$
Δ^9-THCA	10-250	6	5	-0,000043	0,0497	0,041	0,9992	1/x
CBC	6-250	7	5	-0,000039	0,0455	-0,0375	0,9987	1/x
CBCA	5-250	7	5	-0,000028	0,0459	0,0344	0,9991	1/x
CBLA	10-250	6	5	0,000004	0,0244	0,0776	0,9983	1/x
Δ^9-THCP	10-250	6	5	-0,000037	0,0518	0,2581	0,9984	1/x

Zgodność modeli kalibracyjnych oceniano na podstawie stężeń obliczonych zwrotnie oraz odpowiadających im błędów względnych. Poziom kalibracyjny uznawano za zgodny z kryteriami, jeżeli bezwzględna wartość błędu względnego nie przekraczała 15% dla poziomów powyżej granicy oznaczalności. Dla najniższego poziomu kalibracyjnego, odpowiadającego LOQ danego analitu, przyjęto kryterium $|RE| \leq 20\%$. Model uznawano za akceptowalny, jeżeli kryteria te były spełnione dla wszystkich poziomów uwzględnionych w deklarowanym zakresie roboczym w tym dla poziomu najniższego i najwyższego. Dodatkowo uwzględniano brak systematycznego trendu błędów względnych oraz losowy rozkład reszt wokół wartości zerowej. Współczynnik determinacji R^2 traktowano jako parametr pomocniczy oceny dopasowania modelu, a nie jako samodzielne kryterium jego akceptacji (ICH Q2(R2), 2023).

Dla każdego analitu porównano modele regresji kwadratowej z ważeniem 1/x oraz $1/x^2$, wyznaczone na podstawie tego samego zestawu danych kalibracyjnych. Sposób ważenia wybierano spośród modeli spełniających kryteria akceptacji stężeń obliczonych zwrotnie.

Podstawę wyboru stanowiła mniejsza suma bezwzględnych wartości błędów względnych oraz brak systematycznego przebiegu reszt w funkcji stężenia. Jeżeli oba warianty ważenia spełniały przyjęte kryteria akceptacji, wybierano model charakteryzujący się mniejszą wartością sumy |RE|. W przypadku zbliżonych wartości tego parametru preferowano model zapewniający mniejszy maksymalny błąd względny w dolnej części zakresu kalibracyjnego. Przyjęte sposoby ważenia dla poszczególnych analitów przedstawiono w Tabeli 90.

Wyznaczenie stężenia z modelu kwadratowego

Stężenie analitu obliczano przez przekształcenie równania regresji:

$$y = ax^2 + bx + c$$

Po rozwiązaniu równania kwadratowego otrzymuje się:

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4a(c - y)}}{2a}$$

gdzie:

x - obliczone stężenie analitu,

y - zmierzona powierzchnia piku,

a, b, c - współczynniki modelu kalibracyjnego.

Spośród rozwiązań równania wybierano dodatnie rozwiązanie odpowiadające zakresowi roboczemu zastosowanej krzywej kalibracyjnej.

Sposób obliczania różnicy pomiędzy stężeniem obliczonym a nominalnym oraz błędu względnego przedstawiono w punkcie 11.1.2. Z tego względu w niniejszym podrozdziale nie powtarzano odpowiednich równań ani definicji. W tabelach wyników kalibracji dla detekcji CORONA CAD przedstawiono wyłącznie wartości uzyskane na podstawie opisanej wcześniej procedury obliczeniowej.

Tabela 92. Wyniki kalibracji CBGO dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,1480	0,0019	1,26	5,03	0,65
10	5	0,3271	0,0095	2,89	9,91	-0,93
20	5	0,6806	0,0077	1,13	19,66	-1,72
50	5	1,7804	0,0474	2,66	51,23	2,46
100	5	3,3667	0,0759	2,25	100,73	0,73
200	5	5,9056	0,1804	3,06	194,32	-2,84
250	5	7,2202	0,1426	1,97	254,45	1,78

Tabela 93. Wyniki kalibracji CBDVA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,2694	0,0064	2,36	4,91	-1,86
11	5	0,5297	0,0119	2,25	11,54	4,95
25	5	1,0299	0,0262	2,54	24,73	-1,07
50	5	1,9221	0,0653	3,40	49,93	-0,13
100	5	3,3228	0,0966	2,91	95,45	-4,55
200	5	5,5503	0,0615	1,11	202,71	1,36
250	5	6,1386	0,0560	0,91	263,21	5,28

Tabela 94. Wyniki kalibracji CBND dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,1950	0,0021	1,08	4,98	-0,38
10	5	0,3831	0,0097	2,52	9,86	-1,42
20	5	0,8093	0,0204	2,52	21,18	5,88
50	5	1,7936	0,0321	1,79	48,95	-2,09
100	5	3,2428	0,0624	1,93	95,37	-4,63
200	5	5,6289	0,1056	1,88	201,08	0,54
250	5	6,4192	0,0941	1,47	261,28	4,51

Tabela 95. Wyniki kalibracji CBDV dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,0642	0,0012	1,94	4,95	-1,08
10	5	0,1945	0,0061	3,16	10,23	2,33
20	5	0,4369	0,0159	3,64	20,14	0,70
50	5	1,1181	0,0295	2,64	48,56	-2,88
100	5	2,2991	0,0487	2,12	100,03	0,03
200	5	4,4949	0,0908	2,02	204,92	2,46
250	5	5,2813	0,1280	2,42	246,19	-1,52

Tabela 96. Wyniki kalibracji CBDA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,2541	0,0087	3,41	4,94	-1,22
10	5	0,4702	0,0115	2,44	10,35	3,50
20	5	0,8275	0,0267	3,23	19,53	-2,37
50	5	1,9657	0,0384	1,96	51,03	2,05
100	5	3,3618	0,0543	1,62	96,29	-3,71
200	5	5,5386	0,0406	0,73	203,25	1,63
250	5	6,0269	0,0134	0,22	255,15	2,06

Tabela 97. Wyniki kalibracji CBGA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,3129	0,0043	1,37	4,67	-6,55
10	5	0,5632	0,0157	2,78	10,40	4,02
20	5	1,0023	0,0291	2,91	20,72	3,61
50	5	2,1783	0,0620	2,84	50,35	0,69
100	5	3,7907	0,0634	1,67	97,44	-2,56
200	5	6,2412	0,1356	2,17	202,27	1,13

Tabela 98. Wyniki kalibracji CBG dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,3142	0,0019	0,60	4,57	-8,69
10	5	0,6047	0,0044	0,72	10,69	6,85
20	5	1,0450	0,0335	3,20	20,18	0,88
50	5	2,4333	0,0554	2,28	52,02	4,04
100	5	4,1634	0,1429	3,43	97,12	-2,88
200	5	6,9605	0,1579	2,27	194,64	-2,68
250	5	8,0959	0,1415	1,75	258,86	3,54

Tabela 99. Wyniki kalibracji CBD dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,1668	0,0055	3,31	4,94	-1,29
10	5	0,3839	0,0187	4,86	10,14	1,44
20	5	0,8022	0,0236	2,94	20,41	2,06
50	5	1,9146	0,0495	2,59	49,42	-1,16
100	5	3,3904	0,0705	2,08	92,93	-7,07
200	5	6,0603	0,1651	2,72	201,41	0,71
250	5	6,9390	0,1051	1,51	263,01	5,20

Tabela 100. Wyniki kalibracji THCV dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,1044	0,0043	4,15	4,93	-1,40
10	5	0,2889	0,0134	4,64	10,35	3,48
20	5	0,6032	0,0202	3,35	19,74	-1,31
50	5	1,5881	0,0424	2,67	50,68	1,36
100	5	2,9044	0,0846	2,91	96,51	-3,49
200	5	5,2187	0,1430	2,74	198,32	-0,84
250	5	6,1804	0,1320	2,14	257,64	3,06

Tabela 101. Wyniki kalibracji CBN dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,2920	0,0010	0,33	4,61	-7,87
10	5	0,5842	0,0172	2,94	10,56	5,56
20	5	1,0628	0,0103	0,97	20,58	2,88
50	5	2,4152	0,0465	1,92	51,04	2,08
100	5	4,1384	0,1248	3,02	96,28	-3,72
200	5	6,8560	0,0630	0,92	202,98	1,49

Tabela 102. Wyniki kalibracji CBCVA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
10	5	0,4453	0,0237	4,60	10,01	0,12
20	5	0,8831	0,0183	2,07	19,84	-0,78
50	5	2,2261	0,0310	1,39	51,13	2,25
100	5	4,1117	0,1239	3,01	98,40	-1,60
200	5	7,4611	0,1303	1,75	196,09	-1,96

Tabela 103. Wyniki kalibracji CBNA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
7,5	5	0,3430	0,0074	2,15	7,38	-1,66
15,5	5	0,7175	0,0065	0,91	16,09	3,83
32,5	5	1,4161	0,0199	1,41	32,95	1,37
55	5	2,2332	0,0378	1,69	53,77	-2,24
100	5	3,7189	0,0701	1,89	95,53	-4,47
200	5	6,7815	0,0611	0,90	211,95	5,97
250	5	7,3540	0,1286	1,75	244,69	-2,12

Tabela 104. Wyniki kalibracji Δ^9-THC dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
10	5	0,5813	0,0136	2,35	9,92	-0,83
50	5	2,7364	0,0657	2,40	51,05	2,09
100	5	4,9490	0,1057	2,14	98,48	-1,52
200	5	8,7160	0,0635	0,73	200,43	0,22
250	5	10,0658	0,0671	0,67	250,26	0,11

Tabela 105. Wyniki kalibracji CBL dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
6	5	0,0943	0,0045	4,82	6,15	2,42
10	5	0,2237	0,0052	2,31	9,85	-1,54
17	5	0,4381	0,0049	1,12	16,01	-5,84
50	5	1,6482	0,0547	3,32	51,56	3,13
100	5	3,3600	0,0785	2,34	104,36	4,36
200	5	6,1154	0,1109	1,81	196,90	-1,55
250	5	7,4877	0,1169	1,56	247,41	-1,03

Tabela 106. Wyniki kalibracji CBC dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/m]	Błąd względny [%]
6	5	0,2220	0,0036	1,64	5,73	-4,56
10	5	0,4282	0,0090	2,11	10,32	3,17
17	5	0,7175	0,0113	1,58	16,82	-1,05
50	5	2,2478	0,0455	2,02	52,55	5,11
100	5	4,0507	0,1343	3,32	98,03	-1,97
200	5	7,3374	0,1555	2,12	194,37	-2,81
250	5	9,0513	0,1266	1,40	255,67	2,27

Tabela 107. Wyniki kalibracji Δ^9-THCA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
10	5	0,5305	0,0043	0,81	9,93	-0,75
20	5	1,0425	0,0272	2,61	20,62	3,08
55	5	2,5792	0,0912	3,53	53,49	-2,74
100	5	4,6074	0,0752	1,63	100,37	0,37
200	5	8,3955	0,1976	2,35	203,57	1,78
250	5	9,7143	0,0940	0,97	247,03	-1,19

Tabela 108. Wyniki kalibracji CBCA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
5	5	0,2564	0,0040	1,57	4,85	-2,97
10	5	0,4697	0,0157	3,34	9,54	-4,59
17	5	0,8677	0,0171	1,97	18,36	8,02
50	5	2,2872	0,0569	2,49	50,64	1,29
100	5	4,2763	0,1071	2,50	98,27	-1,73
200	5	8,0513	0,1544	1,92	198,49	-0,75
250	5	9,8373	0,1748	1,78	251,95	0,78

Tabela 109. Wyniki kalibracji CBLA dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
10	5	0,3034	0,0026	0,86	9,25	-7,48
16	5	0,4855	0,0130	2,69	16,70	4,38
45	5	1,2404	0,0112	0,90	47,39	5,31
100	5	2,5193	0,0408	1,62	98,78	-1,22
200	5	4,9503	0,1285	2,59	194,45	-2,78
250	5	6,5076	0,1809	2,78	254,42	1,77

Tabela 110. Wyniki kalibracji Δ^9-THCPΔ^9 dla detekcji CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Liczba powtórzeń	Średnia powierzchnia piku [mAU·min]	SD [mAU·min]	RSD [%]	Stężenie obliczone [µg/ml]	Błąd względny [%]
10	5	0,7876	0,0199	2,53	10,30	3,01
20	5	1,2421	0,0337	2,71	19,27	-3,65
50	5	2,7857	0,1107	3,97	50,66	1,31
100	5	4,9800	0,1018	2,04	98,09	-1,91
200	5	9,3529	0,2205	2,36	206,16	3,08
250	5	10,7310	0,2761	2,57	245,57	-1,77

11.9.3 Obliczenia precyzji dla detektora CAD

Precyzję oceniono w dwóch aspektach: jako powtarzalność oraz jako precyzję pośrednią, obejmującą odrębnie warianty UHPLC-CORONA CAD i UHPLC-UV-VIS/DAD. W zakresie precyzji pośredniej nie przedstawiono oddzielnych danych dotyczących zmienności międzyaparatowej.

Dla każdego analitu analizowano trzy pojedyncze wyniki. Na ich podstawie obliczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe oraz względne odchylenie standardowe (RSD).

Kryterium akceptacji dla ocenianych wariantów precyzji wynosiło:

$$RSD \leq 5{,}0\%$$

Wyniki spełniające powyższe kryterium uznawano za zgodne z przyjętym wymaganiem precyzji w badanych warunkach.

Wyniki uzyskane w ramach oceny przydatności systemu chromatograficznego nie były utożsamiane z precyzją całej procedury analitycznej. Kolejne nastrzyki tego samego roztworu wzorcowego służyły do oceny powtarzalności odpowiedzi układu chromatograficznego i procesu nastrzyku. Natomiast ocena precyzji procedury wymaga uwzględnienia wyników uzyskanych z niezależnych przygotowań roztworów analitycznych lub próbek.

Powtarzalność CAD

P owtarzalność wariantu UHPLC-CORONA CAD oceniono na podstawie trzech wyników uzyskanych w krótkim przedziale czasu, przy zachowaniu tych samych warunków analitycznych. Dla każdego analitu wyznaczono średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe (SD) oraz względne odchylenie standardowe (RSD). Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 110.

Wartości RSD dla poszczególnych analitów mieściły się w zakresie od 0,13 do 4,63%. Najniższą zmienność wyników odnotowano dla CBN (RSD = 0,13%), natomiast najwyższą dla CBGA (RSD = 4,63%). Dla pozostałych analitów wartości RSD wynosiły od 0,26 do 4,20%. Pomimo zróżnicowania wartości RSD, dla wszystkich ocenianych analitów uzyskane wyniki spełniały przyjęte kryterium akceptacji, wynoszące RSD ≤5,0%.

Średnie wartości stężeń uzyskane z trzech powtórzeń pozostawały zbliżone do poziomów nominalnych. Największe względne różnice pomiędzy poszczególnymi wynikami obserwowano dla analitów charakteryzujących się wyższymi wartościami RSD, jednak rozrzut ten nie przekraczał przyjętego poziomu akceptacji. W przypadku większości analitów uzyskane wartości RSD były wyraźnie niższe od wartości granicznej 5,0%, co wskazuje na stabilną odpowiedź układu pomiarowego w analizowanych warunkach.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wariant UHPLC-CORONA CAD charakteryzował się zadowalającą powtarzalnością wyników w badanym zakresie stężeń.

Największą zmienność odpowiedzi obserwowano dla CBGA, jednak również w tym przypadku wartość RSD pozostawała poniżej przyjętego kryterium akceptacji. Wyniki potwierdzają zatem powtarzalność pomiarów wykonywanych w tych samych, kontrolowanych warunkach analitycznych.

Tabela 111. Wyniki oceny powtarzalności metody.

Analit	Poziom [µg/ml]	Wynik 1 [µg/ml]	Wynik 2 [µg/ml]	Wynik 3 [µg/ml]	Średnia	SD	RSD [%]	Kryterium	Ocena
CBGO	5	5,07	5,08	5,18	5,11	0,06	1,18	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDVA	5	5,28	5,45	5,27	5,33	0,10	1,86	≤5,0%	spełnia kryterium
CBND	5	4,81	4,45	4,66	4,64	0,18	3,98	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDV	5	4,97	5,04	4,93	4,98	0,06	1,16	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDA	5	5,53	5,34	5,63	5,50	0,15	2,70	≤5,0%	spełnia kryterium
CBGA	5	5,58	5,65	5,18	5,47	0,25	4,63	≤5,0%	spełnia kryterium
CBG	5	5,23	5,58	5,17	5,33	0,22	4,20	≤5,0%	spełnia kryterium
CBD	5	4,95	4,93	4,95	4,94	0,01	0,26	≤5,0%	spełnia kryterium
THCV	5	4,38	4,44	4,41	4,41	0,03	0,66	≤5,0%	spełnia kryterium
CBN	5	4,96	4,96	4,95	4,96	0,01	0,13	≤5,0%	spełnia kryterium
CBCVA	5	4,85	4,99	5,14	4,99	0,14	2,88	≤5,0%	spełnia kryterium
CBNA	5	4,86	4,77	4,74	4,79	0,07	1,35	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THC	10	10,35	10,01	9,98	10,11	0,21	2,05	≤5,0%	spełnia kryterium
CBL	5	5,46	5,44	5,42	5,44	0,02	0,42	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THCA	5	4,88	4,95	5,14	4,99	0,13	2,68	≤5,0%	spełnia kryterium
CBC	10	10,28	9,94	10,59	10,27	0,33	3,17	≤5,0%	spełnia kryterium
CBCA	5	6,08	6,13	6,07	6,09	0,03	0,47	≤5,0%	spełnia kryterium
CBLA	5	4,72	4,72	4,65	4,70	0,04	0,79	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THCP	5	4,46	4,69	4,78	4,64	0,16	3,52	≤5,0%	spełnia kryterium

Należy podkreślić, że przedstawiona ocena dotyczy powtarzalności wyników uzyskanych w krótkim czasie i przy zachowaniu tych samych warunków pomiarowych. Nie

obejmuje ona zmienności wynikającej z niezależnego przygotowania próbek, zmian warunków analitycznych ani zastosowania innego aparatu. Z tego względu wyniki te stanowią ocenę powtarzalności i nie powinny być interpretowane jako pełna charakterystyka precyzji pośredniej procedury analitycznej.

Precyzja pośrednia dla detektora CAD i UV-VIS/DAD

Wyniki oceny precyzji pośredniej przedstawiono w Tabelach 111 i 112. Dla każdego z 19 analizowanych kannabinoidów wykonano trzy oznaczenia, a precyzję oceniono na podstawie wartości względnego odchylenia standardowego (RSD). Przyjęte kryterium akceptacji wynosiło RSD ≤5,0%.

Dla wariantu UHPLC-CORONA CAD wartości RSD mieściły się w zakresie 0,30-4,80%. Wszystkie wyniki spełniły przyjęte kryterium, co potwierdza zachowanie wymaganej precyzji pośredniej w badanych warunkach.

W przypadku wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD wartości RSD były niższe i mieściły się w zakresie 0,20 - 4,41%. Najniższą wartość uzyskano dla CBDA (0,20%), a najwyższą dla CBCVA (4,41%). Wartość RSD przekraczającą 4,0% uzyskano także dla CBGO (4,10%). Dla pozostałych kannabinoidów RSD nie przekraczało 4,0%, a wszystkie 19 wyników spełniło przyjęte kryterium.

Porównanie obu wariantów wskazuje na mniejszą zmienność wyników uzyskanych z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. W wariancie CAD większe wartości RSD obserwowano przede wszystkim dla kilku analitów, jednak również w tych przypadkach nie przekroczono wartości granicznej 5,0%. Otrzymane wyniki wskazują zatem, że oba warianty detekcji spełniały wymagania dotyczące precyzji pośredniej dla wszystkich 19 analizowanych kannabinoidów.

Tabela 112. Wyniki oceny precyzji pośredniej dla detektora CAD.

Analit	Poziom [µg/ml]	Wynik 1 [µg/ml]	Wynik 2 [µg/ml]	Wynik 3 [µg/ml]	Średnia [µg/ml]	SD	RSD [%]	Kryterium	Ocena
CBGO	40	41,42	41,28	41,17	41,29	0,13	0,30	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDVA	50	49,35	49,57	48,78	49,24	0,41	0,83	≤5,0%	spełnia kryterium
CBND	45	39,91	42,34	41,42	41,23	1,23	2,98	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDV	40	30,55	29,87	29,20	29,87	0,68	2,28	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDA	50	44,65	41,26	43,87	43,26	1,78	4,11	≤5,0%	spełnia kryterium
CBGA	50	50,52	45,89	48,14	48,18	2,32	4,80	≤5,0%	spełnia kryterium
CBG	45	48,37	51,91	48,02	49,43	2,15	4,35	≤5,0%	spełnia kryterium
CBD	40	40,27	43,46	42,03	41,92	1,60	3,81	≤5,0%	spełnia kryterium
THCV	45	40,36	40,76	39,59	40,24	0,60	1,48	≤5,0%	spełnia kryterium
CBN	50	48,33	45,75	48,88	47,65	1,67	3,51	≤5,0%	spełnia kryterium
CBCVA	50	54,22	53,92	57,55	55,23	2,02	3,65	≤5,0%	spełnia kryterium
CBNA	100	96,95	99,93	94,98	97,28	2,49	2,56	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THC	55	39,93	39,38	36,66	38,65	1,75	4,53	≤5,0%	spełnia kryterium
CBL	50	35,91	37,20	35,08	36,06	1,07	2,97	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THCA	50	36,71	37,85	36,89	37,15	0,61	1,65	≤5,0%	spełnia kryterium
CBC	50	45,72	43,60	43,74	44,35	1,18	2,67	≤5,0%	spełnia kryterium
CBCA	40	50,32	47,43	48,80	48,85	1,45	2,96	≤5,0%	spełnia kryterium
CBLA	50	49,61	46,58	46,21	47,47	1,87	3,94	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THCP	50	45,07	48,76	47,39	47,08	1,86	3,96	≤5,0%	spełnia kryterium

Tabela 113. Wyniki oceny precyzji pośredniej dla detektora UV-VIS/DAD.

Analit	Poziom [µg/ml]	Wynik 1 [µg/ml]	Wynik 2 [µg/ml]	Wynik 3 [µg/ml]	Średnia [µg/ml]	SD	RSD [%]	Kryterium	Ocena
CBGO	40	38,99	36,36	36,34	37,23	1,53	4,10	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDVA	50	51,72	51,54	51,51	51,59	0,11	0,22	≤5,0%	spełnia kryterium
CBND	45	46,37	45,83	46,17	46,13	0,27	0,59	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDV	40	42,10	43,08	40,88	42,02	1,10	2,62	≤5,0%	spełnia kryterium
CBDA	50	49,99	49,81	49,83	49,88	0,10	0,20	≤5,0%	spełnia kryterium
CBGA	50	49,61	49,43	49,44	49,50	0,10	0,21	≤5,0%	spełnia kryterium
CBG	45	44,93	44,70	44,81	44,81	0,12	0,26	≤5,0%	spełnia kryterium
CBD	40	42,29	42,07	41,87	42,08	0,21	0,50	≤5,0%	spełnia kryterium
THCV	45	46,36	46,27	46,08	46,24	0,15	0,31	≤5,0%	spełnia kryterium
CBN	50	48,61	49,68	48,92	49,07	0,55	1,12	≤5,0%	spełnia kryterium
CBCVA	50	51,64	47,93	47,84	49,14	2,17	4,41	≤5,0%	spełnia kryterium
CBNA	100	97,55	98,14	97,57	97,75	0,33	0,34	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THC	55	56,70	56,60	55,98	56,43	0,39	0,69	≤5,0%	spełnia kryterium
CBL	50	47,81	47,64	47,39	47,61	0,21	0,44	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THCA	50	47,95	47,71	47,73	47,80	0,13	0,28	≤5,0%	spełnia kryterium
CBC	50	49,63	49,57	49,39	49,53	0,13	0,25	≤5,0%	spełnia kryterium
CBCA	40	43,78	43,58	43,49	43,62	0,15	0,34	≤5,0%	spełnia kryterium
CBLA	50	48,48	48,05	47,89	48,14	0,31	0,63	≤5,0%	spełnia kryterium
Δ^9-THCP	50	47,05	46,97	46,56	46,86	0,26	0,56	≤5,0%	spełnia kryterium

11.9. Obliczenia dokładności i odzysku

Dokładność metody oceniano na podstawie odzysku analitów. Dla każdego analitu wykonano trzy oznaczenia na określonym poziomie stężenia nominalnego. Na podstawie

uzyskanych wyników obliczano odzysk dla każdego oznaczenia, średni odzysk, odchylenie standardowe oraz względne odchylenie standardowe.

Odzysk pojedynczego oznaczenia obliczono zgodnie zrównaniem:

$$Odzysk_i[\%] = \frac{C_{oznaczone,i}}{C_{nominalne}} x100$$

gdzie:

Odzysk - odzysk uzyskany dla pojedynczego oznaczenia, wyrażony w procentach,

$C_{oznaczone,i}$ - stężenie analitu wyznaczone w danym oznaczeniu,

$C_{nominalne}$ - stężenie analitu,

i - numer kolejnego oznaczenia.

Średni odzysk obliczano na podstawie trzech indywidualnych wartości odzysku:

$$\overline{Odzysk}[\%] = \frac{\sum_{i=1}^{n} Odzysk_i}{n}$$

gdzie:

$\overline{Odzysk}$ - średni odzysk analitu,

$Odzysk_i$ - odzysk uzyskany dla pojedynczego oznaczenia,

n - liczba oznaczeń; w przeprowadzonym badaniu n=3.

Tabela 114. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGO z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	99,63	100,6	100,82	100,35	0,63	0,63	0,35
10	94,53	99,52	100,38	98,14	3,16	3,22	-1,86
20	96,59	98,17	98,17	97,64	0,91	0,93	-2,36
50	100,1	100,17	100,41	100,23	0,16	0,16	0,23
100	98,45	98,97	99,44	98,95	0,50	0,51	-1,05
200	91,85	94,52	99,35	95,24	3,80	3,99	-4,76
250	97,98	99,74	103,97	100,56	3,08	3,06	0,56

Tabela 115. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDVA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
4	103,74	105,29	109,17	106,06	2,80	2,64	6,06
11	98,93	100,50	102,96	100,79	2,03	2,01	0,79
25	96,88	97,14	100,16	98,06	1,83	1,87	-1,94
50	97,84	98,21	102,68	99,58	2,69	2,70	-0,42
100	91,93	95,62	97,54	95,03	2,85	3,00	-4,97
200	96,09	97,31	99,81	97,74	1,90	1,94	-2,26
250	96,51	98,17	99,42	98,04	1,46	1,49	-1,96

Tabela 116. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBND z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	93,98	95,37	95,63	95,00	0,89	0,94	-5,00
10	95,35	96,38	98,16	96,63	1,42	1,47	-3,37
20	103,93	106,54	107,00	105,82	1,66	1,57	5,82
50	98,20	98,37	100,84	99,14	1,47	1,48	-0,86
100	94,63	96,54	97,18	96,12	1,33	1,38	-3,88
200	97,32	97,82	99,45	98,20	1,11	1,13	-1,80
250	96,38	99,08	101,62	99,02	2,62	2,65	-0,98

Tabela 117. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDV z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	98,18	99,29	99,55	99,01	0,73	0,74	-0,99
10	101,17	101,75	101,89	101,60	0,38	0,37	1,60
20	97,40	101,22	103,34	100,65	3,01	2,99	0,65
50	95,32	95,94	98,85	96,70	1,89	1,95	-3,30
100	99,02	99,07	101,83	99,97	1,61	1,61	-0,03
200	100,78	101,42	104,47	102,22	1,97	1,93	2,22
250	97,05	97,22	100,51	98,26	1,95	1,98	-1,74

Tabela 118. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
4,5	98,08	101,35	102,16	100,53	2,16	2,15	0,53
10	103,78	105,82	107,51	105,70	1,87	1,77	5,70
20	94,26	94,28	98,13	95,56	2,23	2,33	-4,44
50	100,83	101,59	102,90	101,77	1,05	1,03	1,77
100	94,57	96,56	97,11	96,08	1,34	1,39	-3,92
200	98,31	99,10	101,08	99,50	1,43	1,44	-0,50
250	98,97	100,36	100,74	100,02	0,93	0,93	0,02

Tabela 119. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
4,5	90,04	95,38	99,78	95,07	4,87	5,12	-4,93
10	100,28	103,80	106,52	103,53	3,13	3,02	3,53
20	102,61	103,07	104,77	103,48	1,14	1,10	3,48
50	99,31	99,93	102,07	100,44	1,45	1,44	0,44
100	92,03	92,66	96,43	93,71	2,38	2,54	-6,29
200	94,06	98,21	99,19	97,15	2,72	2,80	-2,85
250	100,34	101,17	101,17	100,89	0,48	0,48	0,89

Tabela 120. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBG z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
3,5	98,61	104,83	107,12	103,52	4,40	4,25	3,52
10	101,60	104,43	105,34	103,79	1,95	1,88	3,79
20	93,90	95,25	97,41	95,52	1,77	1,85	-4,48
50	100,28	102,16	104,58	102,34	2,15	2,10	2,34
100	93,15	93,74	99,82	95,57	3,69	3,86	-4,43
200	94,29	95,73	97,90	95,98	1,82	1,90	-4,02
250	99,34	99,35	103,46	100,72	2,38	2,36	0,72

Tabela 121. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBD z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	90,18	91,08	91,18	90,81	0,55	0,61	-9,19
10	96,46	99,90	100,42	98,93	2,15	2,17	-1,07
20	101,23	101,53	105,39	102,72	2,32	2,26	2,72
50	100,94	99,49	100,82	100,42	0,80	0,80	0,42
100	97,61	91,97	92,76	94,11	3,06	3,25	-5,89
200	95,00	98,84	99,16	97,67	2,32	2,38	-2,33
250	95,23	97,90	99,53	97,56	2,17	2,22	-2,44

Tabela 122. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla THCV z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	91,15	95,86	96,67	94,56	2,98	3,15	-5,44
10	99,77	100,35	101,87	100,66	1,09	1,08	0,66
20	96,36	96,79	100,62	97,92	2,35	2,40	-2,08
50	99,08	101,55	104,25	101,63	2,58	2,54	1,63
100	93,90	95,67	98,30	95,96	2,21	2,30	-4,04
200	94,12	97,62	98,17	96,64	2,19	2,27	-3,36
250	96,42	98,88	102,74	99,35	3,19	3,21	-0,65

Tabela 123. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBN z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
4	105,57	108,09	109,86	107,84	2,15	1,99	7,84
10	101,26	102,95	106,32	103,51	2,57	2,48	3,51
20	104,56	104,96	105,00	104,84	0,24	0,23	4,84
50	100,21	104,38	104,85	103,15	2,55	2,47	3,15
100	93,34	93,51	97,76	94,87	2,50	2,64	-5,13
200	92,85	94,05	94,10	93,67	0,71	0,76	-6,33
250	103,93	104,88	105,06	104,62	0,61	0,58	4,62

Tabela 124. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCVA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
10	94,82	93,37	94,31	94,17	0,74	0,79	-5,83
20	99,21	97,16	97,50	97,95	1,10	1,12	-2,05
50	104,18	104,03	104,14	104,11	0,08	0,08	4,11
100	103,18	96,68	96,69	98,85	3,75	3,79	-1,15
200	96,03	96,07	98,02	96,71	1,14	1,18	-3,29
250	96,73	98,57	101,99	99,10	2,67	2,69	-0,90

Tabela 125. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBNA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
7,5	90,81	93,49	95,13	93,14	2,18	2,34	-6,86
15	105,55	105,94	106,01	105,83	0,25	0,24	5,83
32,5	99,87	101,08	101,82	100,92	0,99	0,98	0,92
50	105,68	108,10	108,18	107,32	1,42	1,32	7,32
100	93,97	94,90	97,03	95,30	1,57	1,65	-4,70
200	103,91	104,32	106,81	105,01	1,57	1,50	5,01
250	92,91	95,26	96,06	94,75	1,63	1,72	-5,25

Tabela 126. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ^9-THC z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	101,92	104,75	105,70	104,12	1,96	1,88	4,12
10	111,59	111,82	111,82	111,74	0,13	0,12	11,74
50	106,78	106,78	106,78	106,78	0,00	0,00	6,78
100	102,23	102,52	102,52	102,42	0,17	0,17	2,42
200	100,90	101,14	101,14	101,06	0,14	0,14	1,06
250	98,30	98,45	98,45	98,40	0,08	0,08	-1,60

Tabela 127. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBL z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	106,30	107,83	109,67	107,93	1,69	1,57	7,93
9	96,87	100,16	100,96	99,33	2,17	2,18	-0,67
15	94,06	99,71	100,32	98,03	3,45	3,52	-1,97
50	97,02	97,67	98,21	97,63	0,60	0,61	-2,37
100	99,14	100,00	102,99	100,71	2,02	2,01	0,71
200	95,79	97,56	98,80	97,38	1,51	1,55	-2,62
250	98,96	99,49	99,55	99,33	0,32	0,32	-0,67

Tabela 128. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBC z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	96,93	100,60	103,08	100,20	3,10	3,09	0,20
10	102,17	103,99	104,67	103,61	1,30	1,25	3,61
15	111,92	113,21	115,23	113,45	1,67	1,47	13,45
50	105,36	105,40	106,64	105,80	0,73	0,69	5,80
100	93,71	99,79	100,74	98,08	3,81	3,88	-1,92
200	95,06	95,44	97,27	95,92	1,18	1,23	-4,08
250	99,89	100,12	100,40	100,14	0,26	0,26	0,14

Tabela 129. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ^9-THCA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	94,57	97,45	100,66	97,56	3,05	3,13	-2,44
9	92,26	103,18	103,18	99,54	6,30	6,33	-0,46
20	91,66	94,74	95,04	93,81	1,87	1,99	-6,19
40	99,15	100,27	101,50	100,30	1,18	1,18	0,30
50	96,29	100,95	101,92	99,72	3,01	3,02	-0,28
100	97,78	97,94	99,15	98,29	0,75	0,76	-1,71
200	98,08	98,78	98,78	98,55	0,40	0,41	-1,45
250	99,16	99,97	100,13	99,76	0,52	0,52	-0,24

Tabela 130. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	108,66	99,61	103,96	104,08	4,53	4,35	4,08
10	96,06	98,92	99,45	98,14	1,82	1,85	-1,86
20	92,33	95,53	96,93	94,93	2,35	2,48	-5,07
50	100,40	100,67	101,10	100,72	0,36	0,36	0,72
100	97,15	97,74	97,97	97,62	0,42	0,43	-2,38
200	96,95	98,48	99,12	98,18	1,11	1,13	-1,82
250	97,32	99,40	101,27	99,33	1,98	1,99	-0,67

Tabela 131. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBLA z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
10	101,57	105,28	105,91	104,25	2,34	2,24	4,25
20	96,65	96,62	93,15	95,48	2,01	2,11	-4,52
50	98,64	101,17	101,82	100,54	1,68	1,67	0,54
100	99,47	99,83	101,44	100,24	1,05	1,05	0,24
200	95,28	97,35	98,01	96,88	1,42	1,47	-3,12
250	97,17	98,94	101,82	99,31	2,35	2,37	-0,69

Tabela 132. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ^9-THCP z detektorem CAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
4	98,10	94,46	97,73	96,76	2,00	2,07	-3,24
12	100,24	102,43	103,73	102,14	1,76	1,72	2,14
20	100,48	101,56	102,79	101,61	1,15	1,13	1,61
50	95,24	95,46	101,63	97,44	3,63	3,73	-2,56
100	93,27	94,07	94,14	93,82	0,48	0,51	-6,18
200	98,63	99,33	102,96	100,31	2,33	2,32	0,31
250	94,54	95,82	99,96	96,77	2,83	2,92	-3,23

Tabela 133. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGO z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
1	**98,52**	**98,68**	**100,04**	**99,08**	**0,84**	**0,85**	**-0,92**
5	100,43	100,49	100,57	100,49	0,07	0,07	0,49
10	95,46	95,47	95,86	95,60	0,22	0,23	-4,40
20	91,07	91,35	91,55	91,32	0,24	0,26	-8,68
50	99,25	99,28	99,31	99,28	0,03	0,03	-0,72
100	100,04	100,14	100,16	100,11	0,07	0,07	0,11
200	96,74	96,87	96,88	96,83	0,08	0,08	-3,17
250	101,43	101,83	102,01	101,76	0,29	0,28	1,76

Tabela 134. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDVA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
10	94,45	98,65	99,19	97,43	2,59	2,66	-2,57
25	91,85	91,70	91,73	91,76	0,08	0,09	-8,24
50	102,41	102,26	102,29	102,32	0,08	0,08	2,32
100	101,62	101,19	101,41	101,41	0,21	0,21	1,41
200	99,24	99,24	99,24	99,24	0,00	0,00	-0,76
250	100,08	100,16	100,16	100,14	0,05	0,05	0,14

Tabela 135. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBND z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5,5	101,24	102,24	102,48	101,99	0,66	0,65	1,99
12,5	95,71	96,02	96,12	95,95	0,21	0,22	-4,05
25	94,23	94,41	94,67	94,44	0,22	0,23	-5,56
50	106,72	106,79	106,79	106,77	0,04	0,04	6,77
100	103,09	103,09	103,14	103,11	0,03	0,03	3,11
200	102,65	102,66	102,73	102,68	0,04	0,04	2,68
250	97,17	97,29	97,29	97,25	0,07	0,07	-2,75

Tabela 136. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDV z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	106,80	106,85	106,88	106,84	0,04	0,04	6,84
12,5	93,93	94,00	94,18	94,04	0,13	0,14	-5,96
25	90,11	90,19	90,21	90,17	0,05	0,06	-9,83
50	101,10	101,11	101,12	101,11	0,01	0,01	1,11
100	100,34	100,40	100,42	100,38	0,04	0,04	0,38
200	103,61	103,77	103,82	103,74	0,11	0,11	3,74
250	97,17	97,35	97,35	97,29	0,10	0,10	-2,71

Tabela 137. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	103,88	104,22	104,22	104,11	0,20	0,19	4,11
11	105,59	105,90	106,25	105,92	0,33	0,31	5,92
20	99,60	99,74	99,78	99,71	0,09	0,09	-0,29
50	108,59	108,71	108,72	108,67	0,07	0,06	8,67
100	103,04	103,39	103,62	103,35	0,29	0,28	3,35
200	101,49	101,55	101,60	101,55	0,05	0,05	1,55
250	97,80	97,88	97,88	97,85	0,04	0,04	-2,15

Tabela 138. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
1	104,52	107,47	108,23	106,74	1,96	1,84	6,74
5	102,31	102,74	103,24	102,76	0,47	0,46	2,76
11	102,03	102,57	102,67	102,42	0,35	0,34	2,42
20	107,20	107,42	107,45	107,35	0,13	0,12	7,35
50	101,32	101,55	101,84	101,57	0,26	0,26	1,57
100	97,85	97,92	97,99	97,92	0,07	0,07	-2,08
200	102,46	102,63	102,67	102,59	0,11	0,11	2,59
250	98,27	98,32	98,32	98,30	0,03	0,03	-1,70

Tabela 139. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBG z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	103,18	104,01	104,30	103,83	0,58	0,56	3,83
11	101,07	101,53	101,54	101,38	0,27	0,27	1,38
20	99,04	99,32	99,68	99,34	0,32	0,32	-0,66
50	105,92	106,08	106,19	106,06	0,14	0,13	6,06
100	102,09	102,25	102,27	102,20	0,10	0,10	2,20
200	99,33	99,38	99,46	99,39	0,06	0,06	-0,61
250	99,67	99,71	99,71	99,70	0,02	0,02	-0,30

Tabela 140. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBD z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	107,11	107,45	107,63	107,40	0,26	0,24	7,40
10	107,69	108,05	108,40	108,05	0,35	0,32	8,05
20	104,67	104,81	105,57	105,02	0,49	0,47	5,02
50	103,50	103,42	103,42	103,45	0,04	0,04	3,45
100	100,27	99,75	100,09	100,03	0,26	0,26	0,03
200	102,07	102,16	102,27	102,17	0,10	0,10	2,17
250	98,00	98,11	98,11	98,07	0,06	0,06	-1,93

Tabela 141. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla THCV z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	103,16	103,17	103,36	103,23	0,11	0,11	3,23
11	100,16	100,66	100,80	100,54	0,33	0,33	0,54
20	103,07	103,36	103,55	103,33	0,24	0,23	3,33
50	104,98	104,99	105,05	105,01	0,04	0,04	5,01
100	100,41	100,43	100,45	100,43	0,02	0,02	0,43
200	101,71	101,74	101,76	101,74	0,03	0,03	1,74
250	98,46	98,57	98,57	98,53	0,06	0,06	-1,47

Tabela 142. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBN z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	106,80	106,89	106,91	106,87	0,06	0,06	6,87
11	104,64	104,76	104,77	104,72	0,07	0,07	4,72
20	106,64	106,73	106,73	106,70	0,05	0,05	6,70
50	103,17	103,24	103,25	103,22	0,05	0,05	3,22
100	101,69	101,78	101,82	101,76	0,06	0,06	1,76
200	101,58	101,69	101,73	101,67	0,08	0,08	1,67
250	98,36	98,42	98,42	98,40	0,04	0,04	-1,60

Tabela 143. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCVA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
10	94,45	98,65	99,19	97,43	2,59	2,66	-2,57
20	91,85	91,70	91,73	91,76	0,08	0,09	-8,24
50	102,41	102,26	102,29	102,32	0,08	0,08	2,32
100	101,62	101,19	101,41	101,41	0,21	0,21	1,41
200	99,24	99,24	99,24	99,24	0,00	0,00	-0,76
250	100,08	100,16	100,16	100,14	0,05	0,05	0,14

Tabela 144. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBNA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
7,5	98,05	98,42	98,69	98,39	0,32	0,33	-1,61
15	103,67	103,95	104,57	104,07	0,46	0,44	4,07
30	108,71	108,73	108,97	108,80	0,15	0,14	8,80
55	100,24	100,28	100,32	100,28	0,04	0,04	0,28
100	103,50	103,64	103,85	103,66	0,18	0,17	3,66
200	101,43	101,47	101,52	101,47	0,04	0,04	1,47
250	98,26	98,36	98,36	98,33	0,06	0,06	-1,67

Tabela 145. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ^9-THC z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
1,2	90,83	91,08	97,59	93,17	3,83	4,11	-6,83
2,2	102,22	107,66	107,66	105,85	3,14	2,97	5,85
5	101,92	104,75	105,70	104,12	1,96	1,88	4,12
11	101,44	101,44	101,65	101,51	0,12	0,12	1,51
50	106,78	106,78	106,78	106,78	0,00	0,00	6,78
100	102,23	102,23	102,52	102,33	0,17	0,17	2,33
200	100,90	101,14	101,14	101,06	0,14	0,14	1,06
250	98,30	98,45	98,45	98,40	0,08	0,08	-1,60

Tabela 146. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBL z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
6	102,85	103,07	104,16	103,36	0,70	0,68	3,36
10	107,46	108,25	108,28	107,99	0,46	0,43	7,99
17,5	99,39	99,50	99,57	99,49	0,09	0,09	-0,51
50	105,46	105,51	105,51	105,49	0,03	0,03	5,49
100	100,83	100,98	101,07	100,96	0,12	0,12	0,96
200	99,66	99,78	99,86	99,77	0,10	0,10	-0,23
250	99,53	99,66	99,66	99,62	0,08	0,08	-0,38

Tabela 147. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ^9-THCA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
10	109,38	109,77	109,77	109,64	0,22	0,20	9,64
20	102,99	103,59	103,59	103,39	0,35	0,34	3,39
55	104,45	104,45	104,63	104,51	0,10	0,10	4,51
100	100,76	100,76	100,83	100,78	0,04	0,04	0,78
200	99,99	100,21	100,52	100,24	0,26	0,26	0,24
250	97,42	97,98	97,98	97,79	0,32	0,33	-2,21

Tabela 148. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBC z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
6	97,91	98,10	98,13	98,05	0,12	0,12	-1,95
10	106,05	106,22	106,40	106,22	0,17	0,16	6,22
17,5	95,54	95,73	95,90	95,72	0,18	0,19	-4,28
50	101,83	101,88	102,09	101,93	0,13	0,13	1,93
100	98,22	98,76	98,82	98,60	0,33	0,33	-1,40
200	98,04	98,12	98,23	98,13	0,10	0,10	-1,87
250	101,21	101,55	101,55	101,44	0,20	0,20	1,44

Tabela 149. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	102,51	102,76	103,53	102,94	0,53	0,51	2,94
10	91,06	91,11	91,24	91,13	0,09	0,10	-8,87
17	99,48	99,78	99,82	99,70	0,18	0,18	-0,30
50	99,26	99,41	99,59	99,42	0,17	0,17	-0,58
100	97,86	98,39	98,54	98,26	0,36	0,37	-1,74
200	100,86	100,93	100,94	100,91	0,05	0,05	0,91
250	99,63	99,74	99,74	99,71	0,06	0,06	-0,29

Tabela 150. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBLA z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	92,83	93,74	93,78	93,45	0,54	0,58	-6,55
10	106,14	106,19	106,31	106,21	0,08	0,08	6,21
17	95,23	95,88	95,99	95,70	0,41	0,43	-4,30
50	90,15	90,34	90,53	90,34	0,19	0,21	-9,66
100	94,42	94,53	94,68	94,54	0,13	0,14	-5,46
200	97,33	97,54	97,72	97,53	0,19	0,19	-2,47
250	102,73	102,85	102,85	102,81	0,07	0,07	2,81

Tabela 151. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ^9-THCP z detektorem UV-VIS/DAD.

Stężenie nominalne [µg/ml]	Odzysk 1 [%]	Odzysk 2 [%]	Odzysk 3 [%]	Średni odzysk [%]	SD [%]	RSD [%]	Bias [%]
5	93,99	99,48	100,17	97,88	3,39	3,46	-2,12
12	99,75	101,41	101,99	101,05	1,16	1,15	1,05
20	99,45	99,54	99,61	99,53	0,08	0,08	-0,47
50	95,48	95,65	95,95	95,69	0,24	0,25	-4,31
100	98,08	98,14	98,22	98,15	0,07	0,07	-1,85
200	102,31	102,36	102,36	102,34	0,03	0,03	2,34
250	98,77	98,88	98,88	98,84	0,06	0,06	-1,16

Kryterium akceptacji średniego odzysku wynosiło 90-115% wartości nominalnej. Ocenę przeprowadzono oddzielnie dla każdego analitu i poziomu stężenia na podstawie trzech oznaczeń.

11.10. Obliczenia odporności metody

Plan badania odporności obejmował wprowadzenie kontrolowanych zmian przepływu fazy ruchomej oraz temperatury kolumny. Warunki nominalne wynosiły odpowiednio 0,50 ml/min i 20°C.

Wpływ przepływu fazy ruchomej oceniano przy następujących wartościach:

- 0,45 ml/min,
- 0,50 ml/min, warunek nominalny,
- 0,55 ml/min.

Wpływ temperatury kolumny oceniano przy następujących wartościach:

- 19°C,

- 20°C, warunek nominalny,
- 21°C.

Dla każdego badanego warunku oceniano czas retencji, powierzchnię piku, wynik ilościowy oraz rozdzielczość chromatograficzną. Pomocniczo analizowano również liczbę półek teoretycznych, asymetrię pików oraz stosunek sygnału do szumu. Szczególną uwagę zwrócono na pary krytyczne CBND/CBDV, Δ^{9}-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA.

Zmianę czasu retencji względem warunków nominalnych obliczano według równania:

$$\Delta t_R[\%] = \frac{t_{R,wariant} - t_{R,nominalne}}{t_{R,nominalne}} x100$$

gdzie:

Δt_R - procentowa zmiana czasu retencji,

$t_{R,wariant}$ - czas retencji uzyskany po zmianie badanego parametru,

$t_{R,nominalne}$ - czas retencji uzyskany w warunkach nominalnych.

Zmianę powierzchni piku obliczano według równania:

$$\Delta A[\%] = \frac{A_{wariant} - A_{nominalne}}{A_{nominalne}} x100$$

ΔA - procentowa zmiana powierzchni piku,

$A_{wariant}$ - powierzchnia piku uzyskana po zmianie badanego parametru,

$A_{nominalne}$ - powierzchnia piku uzyskana w warunkach nominalnych.

Zmianę wyniku ilościowego obliczano według równania:

$$\Delta C[\%] = \frac{C_{wariant} - C_{nominalne}}{C_{nominalne}} x100$$

ΔC - procentowa zmiana oznaczonego stężenia,

$C_{wariant}$ – tp stężenie oznaczone po po zmianie badanego parametru,

$C_{nominalne}$ – to stężenie oznaczone w warunkach nominalnych.

Dodatnia wartość Δt_R , ΔA lub ΔC oznaczała odpowiednio wzrost czasu retencji, powierzchni piku lub oznaczonego stężenia względem warunków nominalnych, natomiast

wartość ujemna wskazywała na ich zmniejszenie. W zestawieniach maksymalnych zmian wykorzystywano wartości bezwzględne.

Tabela 152. Wpływ zmian przepływu fazy ruchomej na czas retencji analitów dla detekcji UV-Vis.

Analit	t_R 0,50 [ml/min]	t_R 0,45 [ml/min]	Δt_R, 0,45 [min]	Zmiana [%]	t_R0,55 [ml/min]	Δt_R, 0,55 [ml/min]	Zmiana [%]
CBGO	2,51	2,77	+0,26	+10,24	2,29	-0,22	-8,69
CBDVA	3,00	3,31	+0,31	+10,27	2,74	-0,26	-8,60
CBND	3,28	3,62	+0,34	+10,27	2,98	-0,30	-9,05
CBDV	3,43	3,78	+0,35	+10,29	3,13	-0,31	-8,89
CBDA	4,51	4,97	+0,46	+10,13	4,12	-0,393	-8,71
CBGA	4,88	5,36	+0,48	+9,80	4,45	-0,43	-8,81
CBG	5,30	5,83	+0,53	+10,06	4,83	-0,47	-8,81
CBD	5,63	6,21	+0,58	+10,27	5,13	-0,51	-8,97
THCV	6,20	6,82	+0,62	+9,95	5,64	-0,56	-9,00
CBN	9,28	10,18	+0,90	+9,73	8,44	-0,84	-9,03
CBCVA	9,80	10,76	+0,96	+9,78	8,91	-0,89	-9,10
CBNA	11,42	12,49	+1,07	+9,39	10,38	-1,05	-9,15
Δ^9-THC	12,13	13,31	+1,18	+9,71	11,03	-1,11	-9,11
CBL	15,06	16,53	+1,47	+9,73	13,67	-1,39	-9,25
Δ^9-THCA	16,43	17,99	+1,56	+9,51	14,90	-1,53	-9,31
CBC	16,80	18,44	+1,64	+9,77	15,25	-1,55	-9,23
CBCA	20,03	21,95	+1,92	+9,59	18,16	-1,87	-9,35
CBLA	20,71	22,68	+1,97	+9,49	18,77	-1,94	-9,38
Δ^9-THCP	26,29	28,81	+2,52	+9,58	23,82	-2,47	-9,41

t_R - czas retencji piku

Tabela 153. Wpływ zmiany przepływu na wynik ilościowy i powierzchnię piku dla detekcji UV-Vis.

Analit	Zawartość 0,50 [ml/min]	Zawartość 0,45 [ml/min]	Δ Zawartość [%]	Zawartość 0,55 [ml/min]	Δ Zawartość [%]	Pole powierzchni 0,50 [ml/min]	Pole powierzchni 0,45 [ml/min]	Δ Pole powierzchni [%]	Pole powierzchni 0,55 [lmin]	Δ Pole powierzchni [%]
CBGO	6,6800	6,9677	+4,31	6,7336	+0,80	0,5200	0,5391	+3,67	0,5210	+0,19
CBDVA	8,4600	9,3768	+10,84	7,7880	-7,94	4,5200	5,0139	+10,93	4,1643	-7,87
CBND	7,5200	8,3673	+11,27	6,6322	-11,81	1,4500	1,6152	+11,39	1,2802	-11,71
CBDV	6,3900	7,1395	+11,73	6,6756	+4,47	0,4800	0,5414	+12,79	0,5062	+5,46
CBDA	8,1600	9,3287	+14,32	7,8101	-4,29	3,5800	4,0926	+14,32	3,4264	-4,29
CBGA	8,1300	9,1978	+13,13	7,4878	-7,90	3,8900	4,4015	+13,15	3,5832	-7,89
CBG	7,2300	8,7309	+20,76	7,0478	-2,52	0,4400	0,5314	+20,77	0,4290	-2,50
CBD	6,7800	7,5683	+11,63	6,0879	-10,21	0,4500	0,5063	+12,51	0,4073	-9,49
THCV	7,5100	8,2533	+9,90	6,7009	-10,77	0,6600	0,7284	+10,36	0,5914	-10,39
CBN	7,8700	8,6716	+10,19	7,0886	-9,93	10,3500	11,4057	+10,20	9,3235	-9,92
CBCVA	8,3100	8,9375	+7,55	7,2139	-13,19	2,9300	3,1536	+7,63	2,5454	-13,13
CBNA	15,6600	16,7900	+7,22	13,9681	-10,80	13,1900	14,1443	+7,24	11,7670	-10,79
Δ^9-THC	9,4700	8,7324	-7,79	8,1586	-13,85	0,6900	0,6358	-7,86	0,5940	-13,91
CBL	7,7700	8,4890	+9,25	6,9093	-11,08	0,5900	0,6423	+8,86	0,5228	-11,39
Δ^9-THCA	7,5400	8,4149	+11,60	6,3358	-15,97	4,6400	5,1811	+11,66	3,9009	-15,93
CBC	8,2600	8,9724	+8,62	7,7795	-5,82	5,2300	5,6781	+8,57	4,9232	-5,87
CBCA	6,8800	7,3805	+7,27	6,3024	-8,40	2,3800	2,5534	+7,29	2,1803	-8,39
CBLA	7,7700	8,5406	+9,92	6,9191	-10,95	3,1600	3,4746	+9,96	2,8150	-10,92
Δ^9-THCP	7,7700	7,4093	-4,64	6,2701	-19,30	0,6300	0,5978	-5,11	0,5058	-19,71

Zawartość – wyrażona w mg/ml

Tabela 154. Wpływ zmiany przepływu na rozdzielczość i asymetrię pików dla detekcji UV-Vis.

Analit	Rs 0,50 [ml/min]	Rs 0,45 [ml/min]	Rs 0,55 [ml/min]	Asym. 0,50 [ml/min]	Asym. 0,45 [ml/min]	Asym. 0,55 [ml/min]
CBGO	4,40	4,55	4,23	1,13	1,27	1,03
CBDVA	2,34	2,44	2,17	1,27	1,28	1,13
CBND	1,30	1,35	1,28	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDV	8,19	8,31	7,85	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDA	2,40	2,36	2,30	1,32	1,32	1,18
CBGA	4,82	2,74	2,51	1,39	1,41	1,29
CBG	2,06	2,18	1,93	*n.a.*	1,06	1,01
CBD	3,51	3,49	3,41	1,20	1,23	1,29
THCV	15,36	15,53	14,95	1,21	1,24	1,25
CBN	1,98	1,99	1,89	1,24	1,22	1,22
CBCVA	5,05	4,97	4,93	1,48	1,48	1,43
CBNA	2,18	2,36	2,17	1,23	1,27	1,21
Δ^9-THC	8,78	9,07	8,58	*n.a.*	1,22	*n.a.*
CBL	3,40	3,41	3,31	1,20	1,19	1,20
Δ^9-THCA	0,85	0,96	0,86	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	6,56	6,63	6,37	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBCA	1,24	1,23	1,21	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBLA	9,45	9,73	9,45	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
Δ^9-THCP	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,18	1,12	1,10

Rs - rozdział pomiędzy pikami
Asym. - symetria pików

Tabela 155. Wpływ zmiany przepływu na liczbę półek teoretycznych i stosunek sygnału do szumu dla detekcji UV-Vis.

Analit	N 0,50 [ml/min]	N 0,45 [ml/min]	N 0,55 [ml/min]	S/N 0,50 [ml/min]	S/N 0,45 [ml/min]	S/N 0,55 [ml/min]
CBGO	9499	10415	8643	65,0	0,3	0,3
CBDVA	9853	10318	9101	182,3	202,2	2,7
CBND	13115	13754	12014	62,0	69,6	256,1
CBDV	13591	14658	12118	20,7	23,0	0,3
CBDA	14898	15307	13855	117,6	304,9	416,5
CBGA	15147	15525	13908	115,2	297,2	404,7
CBG	16585	17628	15513	15,6	33,2	45,5
CBD	20643	21374	19243	14,1	36,3	49,2
THCV	22088	22961	20798	36,0	35,0	35,7
CBN	25005	25579	23765	667,9	383,3	380,6
CBCVA	17308	17648	16681	139,4	79,0	78,9
CBNA	17582	17731	16742	561,7	329,9	477,1
Δ^9-THC	25005	28090	24582	33,0	18,1	27,5
CBL	27463	28170	26493	69,2	62,4	63,4
Δ^9-THCA	21963	23543	21001	486,0	737,9	606,8
CBC	22967	24833	22179	522,3	778,7	653,7
CBCA	21634	21887	20632	319,0	112,9	235,5
CBLA	23012	23506	22145	408,2	145,4	302,9
Δ^9THCP	27157	29348	28197	70,4	23,6	31,9

N - liczba półek teoretycznych
S/N - sygnał do szumu

Tabela 156. Wpływ temperatury termostatu kolumny na czas retencji dla detekcji UV-Vis.

Analit	t_R20°C	t_R19°C	Δt_R19°C	Zmiana [%]	t_R21°C	Δt_R 21°C	Zmiana [%]
CBGO	2,517	2,525	+0,008	+0,32	2,508	-0,009	-0,36
CBDVA	3,017	3,025	+0,008	+0,27	3,008	-0,009	-0,30
CBND	3,283	3,292	+0,009	+0,27	3,275	-0,008	-0,24
CBDV	3,433	3,442	+0,009	+0,26	3,425	-0,008	-0,23
CBDA	4,533	4,550	+0,017	+0,38	4,517	-0,016	-0,35
CBGA	4,892	4,917	+0,025	+0,51	4,875	-0,017	-0,35
CBG	5,308	5,333	+0,025	+0,47	5,300	-0,008	-0,15
CBD	5,642	5,667	+0,025	+0,44	5,625	-0,017	-0,30
THCV	6,192	6,233	+0,041	+0,66	6,167	-0,025	-0,40
CBN	9,267	9,333	+0,066	+0,71	9,208	-0,059	-0,64
CBCVA	9,892	9,975	+0,083	+0,84	9,833	-0,059	-0,60
CBNA	11,558	11,675	+0,117	+1,01	11,467	-0,091	-0,79
Δ^9-THC	12,100	12,200	+0,100	+0,83	12,025	-0,075	-0,62
CBL	15,017	15,150	+0,133	+0,89	14,908	-0,109	-0,73
Δ^9-THCA	16,442	16,617	+0,175	+1,06	16,300	-0,142	-0,86
CBC	16,758	16,908	+0,150	+0,90	16,642	-0,116	-0,69
CBCA	20,167	20,383	+0,216	+1,07	19,983	-0,184	-0,91
CBLA	20,683	20,933	+0,250	+1,21	20,483	-0,200	-0,97
Δ^9-THCP	26,192	26,500	+0,308	+1,18	25,933	-0,259	-0,99

t_R - czas retencji piku

Tabela 157. Wpływ zmiany temperatury termostatu kolumny na wynik ilościowy i powierzchnię piku dla detekcji UV-Vis.

Analit	Zawartość 20°C	Zawartość 19°C	Δ Zawartość [%]	Zawartość 21°C	Δ Zawartość [%]	Pole powierzchni 20°C	Pole powierzchni 19°C	Δ Pole powierzchni [%]	Pole powierzchni 21°C	Δ Pole powierzchni [%]
CBGO	9,6904	9,0481	-6,63	9,1946	-5,12	0,7498	0,7001	-6,63	0,7114	-5,12
CBDVA	12,2246	12,9169	+5,66	12,9520	+5,95	6,5367	6,9068	+5,66	6,9256	+5,95
CBND	10,2848	10,8383	+5,38	10,9637	+6,60	1,9853	2,0921	+5,38	2,1163	+6,60
CBDV	8,9322	9,4639	+5,95	9,3361	+4,52	0,6773	0,7176	+5,95	0,7079	+4,52
CBDA	12,1483	12,8245	+5,57	12,9134	+6,30	5,3296	5,6262	+5,57	5,6653	+6,30
CBGA	11,8836	12,5148	+5,31	12,4931	+5,13	5,6868	5,9889	+5,31	5,9785	+5,13
CBG	10,9543	11,2240	+2,46	11,0774	+1,12	0,6668	0,6832	+2,46	0,6742	+1,11
CBD	11,4141	11,7240	+2,72	11,6470	+2,04	0,7636	0,7843	+2,71	0,7792	+2,04
THCV	11,0279	11,3301	+2,74	11,3273	+2,71	0,9733	0,9999	+2,73	0,9997	+2,71
CBN	11,3236	11,9428	+5,47	11,8473	+4,62	14,8937	15,7082	+5,47	15,5825	+4,62
CBCVA	11,8014	12,4665	+5,64	12,0476	+2,09	4,1642	4,3988	+5,63	4,2510	+2,08
CBNA	22,3303	23,5382	+5,41	23,6198	+5,77	18,8115	19,8291	+5,41	19,8979	+5,78
Δ^9-THC	13,2823	14,3166	+7,79	14,0960	+6,13	0,9671	1,0424	+7,79	1,0263	+6,12
CBL	10,8191	11,1811	+3,35	11,4036	+5,40	0,8186	0,8460	+3,35	0,8628	+5,40
Δ^9-THCA	11,0139	11,4419	+3,89	10,9644	-0,45	6,7812	7,0448	+3,89	6,7508	-0,45
CBC	11,5316	12,2426	+6,17	12,8523	+11,45	7,2977	7,7477	+6,17	8,1335	+11,45
CBCA	9,0490	10,1445	+12,11	11,1688	+23,43	3,1306	3,5095	+12,10	3,8639	+23,42
CBLA	12,0499	11,7622	-2,39	11,2209	-6,88	4,9024	4,7853	-2,39	4,5651	-6,88
Δ^9-THCP	10,7666	11,5306	+7,10	11,1709	+3,76	0,8686	0,9302	+7,09	0,9012	+3,75

Zawartość – wyrażona w mg/ml

Tabela 158. Wpływ zmiany temperatury termostatu na rozdzielczość i asymetrię pików dla detekcji UV-Vis.

Analit	Rs 20°C	Rs 19°C	Rs 21°C	Asym. 20°C	Asym. 19°C	Asym. 21°C
CBGO	4,51	4,53	4,54	1,14	1,15	1,27
CBDVA	2,30	2,28	2,28	1,21	1,23	1,24
CBND	1,30	1,29	1,29	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDV	8,36	8,35	8,26	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDA	2,37	2,40	2,36	1,24	1,27	1,30
CBGA	2,58	2,58	2,63	1,40	1,42	1,38
CBG	2,06	2,08	2,02	0,98	1,01	0,95
CBD	3,38	3,49	3,37	1,29	1,25	1,29
THCV	15,29	15,32	15,26	1,28	1,26	1,31
CBN	2,39	2,43	2,41	1,22	1,28	1,29
CBCVA	5,34	5,38	5,28	1,48	1,45	1,43
CBNA	1,67	1,58	1,74	1,34	1,33	1,37
Δ^9-THC	8,65	8,59	8,67	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBL	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,19	1,21	1,20
Δ^9-THCA	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	*n.a.*	*n.a.*	6,57	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBCA	0,94	1,00	0,92	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBLA	9,29	9,26	9,32	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
Δ^9-THCP	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,22	1,20	1,21

Rs - rozdział pomiędzy pikami
Asym. - symetria pików

Tabela 159. Wpływ zmiany temperatury termostatu na liczbę półek teoretycznych i stosunek sygnału do szumu dla detekcji UV-Vis.

Analit	N 20°C	N 19°C	N 21°C	S/N 20°C	S/N 19°C	S/N 21°C
CBGO	9405	9854	9707	534,7	0,3	0,3
CBDVA	10373	10239	10183	150,1	139,9	158,5
CBND	13197	13085	12946	48,3	45,1	50,9
CBDV	13661	13454	13358	16,0	14,8	16,9
CBDA	15361	15245	15180	163,7	235,5	247,2
CBGA	15470	15312	15352	151,4	225,6	237,9
CBG	16191	16801	16296	16,1	24,0	25,0
CBD	20563	20771	20822	21,2	31,5	32,9
THCV	21592	21863	21879	25,2	25,7	25,2
CBN	24940	24790	25015	258,8	263,6	263,5
CBCVA	18637	18546	18882	57,0	57,9	57,7
CBNA	18957	18806	18803	424,3	427,5	412,1
Δ^9-THC	23490	22429	24106	24,0	24,4	23,0
CBL	27758	27882	27860	68,0	67,6	60,8
Δ^9-THCA	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	*n.a.*	*n.a.*	18914	*n.a.*	*n.a.*	823,1
CBCA	22266	22641	22257	193,3	185,8	218,3
CBLA	21963	22431	22044	243,9	232,8	275,2
Δ^9-THCP	27549	26938	27902	40,4	39,0	45,3

N - liczba półek teoretycznych
S/N - sygnał do szumu

Tabela 160. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na czas retencji dla detekcji CAD.

Analit	t_R 0,50 [ml/min]	t_R 0,45 [ml/min]	Δt_R 0,45 [ml/min]	Zmiana [%]	t_R0,55 [ml/min]	Δt_R0,55 [ml/min]	Zmiana [%]
CBGO	2,560	2,825	+0,265	+10,35	2,333	-0,227	-8,87
CBDVA	3,060	3,367	+0,307	+10,03	2,783	-0,277	-9,05
CBND	3,330	3,667	+0,337	+10,12	3,033	-0,297	-8,92
CBDV	3,480	3,842	+0,362	+10,40	3,167	-0,313	-8,99
CBDA	4,560	5,025	+0,465	+10,20	4,167	-0,393	-8,62
CBGA	4,930	5,425	+0,495	+10,04	4,492	-0,438	-8,88
CBG	5,350	5,892	+0,542	+10,13	4,883	-0,467	-8,73
CBD	5,680	6,267	+0,587	+10,33	5,175	-0,505	-8,89
THCV	6,250	6,875	+0,625	+10,00	5,692	-0,558	-8,93
CBN	9,330	10,242	+0,912	+9,77	8,492	-0,838	-8,98
CBCVA	9,860	10,817	+0,957	+9,71	8,958	-0,902	-9,15
CBNA	11,470	12,558	+1,088	+9,49	10,425	-1,045	-9,11
Δ^9-THC	12,180	13,367	+1,187	+9,75	11,067	-1,113	-9,14
CBL	15,100	16,592	+1,492	+9,88	13,725	-1,375	-9,11
Δ^9-THCA	16,480	18,058	+1,578	+9,58	14,967	-1,513	-9,18
CBC	16,860	18,533	+1,673	+9,92	15,300	-1,560	-9,25
CBCA	20,090	21,992	+1,902	+9,47	18,200	-1,890	-9,41
CBLA	20,760	22,708	+1,948	+9,38	18,817	-1,943	-9,36
Δ^9-THCP	26,350	28,833	+2,483	+9,42	23,883	-2,467	-9,36

t_R - czas retencji piku

Tabela 161. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na wynik ilościowy i powierzchnię piku.

Analit	Zawartość 0,50 [ml/min]	Zawartość 0,45 [ml/min]	Δ Zawartość [%]	Zawartość 0,55 [ml/min]	Δ Zawartość [%]	Pole powierzchni 0,50 [ml/min]	Pole powierzchni 0,45 [ml/min]	Δ Pole powierzchni [%]	Pole powierzchni 0,55 [ml/min]	Δ Pole powierzchni [%]
CBGO	6,1100	5,3430	-12,55	4,9410	-19,13	0,5200	0,5482	+5,42	0,5074	-2,42
CBDVA	6,9700	8,4219	+20,83	7,3224	+5,06	0,7600	0,8728	+14,84	0,7620	+0,26
CBND	5,9300	7,6433	+28,89	6,7992	+14,66	0,5700	0,6142	+7,75	0,5449	-4,40
CBDV	4,7900	4,1831	-12,67	3,8727	-19,15	0,2400	0,2510	+4,58	0,2323	-3,21
CBDA	6,6500	7,8192	+17,58	7,2917	+9,65	0,7200	0,7383	+2,54	0,6892	-4,28
CBGA	7,2300	8,6472	+19,60	7,1469	-1,15	0,8900	1,0092	+13,39	0,8368	-5,98
CBG	7,1800	8,0731	+12,44	6,2798	-12,54	0,9400	1,1955	+27,18	0,9358	-0,45
CBD	5,8100	5,9240	+1,96	5,0116	-13,74	0,5600	0,6401	+14,30	0,5426	-3,11
THCV	6,0400	5,8145	-3,73	5,4356	-10,01	0,4500	0,4765	+5,89	0,4455	-1,00
CBN	6,8800	9,7195	+41,27	9,3013	+35,19	0,9000	0,9681	+7,57	0,9233	+2,59
CBCVA	7,7800	8,9300	+14,78	8,0508	+3,48	0,8600	0,9406	+9,37	0,8489	-1,29
CBNA	17,1300	12,8825	-24,80	13,4439	-21,52	1,8100	1,6508	-8,80	1,7194	-5,01
Δ^9-THC	6,3800	6,4530	+1,14	6,4278	+0,75	0,9100	0,8874	-2,48	0,8840	-2,86
CBL	5,4700	5,5095	+0,72	5,0446	-7,78	0,3600	0,4107	+14,08	0,3757	+4,36
Δ^9-THCA	5,7600	5,0397	-12,51	5,2793	-8,35	0,7500	0,6620	-11,73	0,6921	-7,72
CBC	6,7500	4,3741	-35,20	4,8438	-28,24	0,7200	0,6616	-8,11	0,7316	+1,61
CBCA	7,2300	7,4738	+3,37	6,5180	-9,85	0,8500	0,8755	+3,00	0,7646	-10,05
CBLA	6,6500	7,5177	+13,05	6,6693	+0,29	0,4800	0,4856	+1,17	0,4310	-10,21
Δ^9-THCP	6,4800	6,9274	+6,90	8,9007	+37,36	1,0900	1,1105	+1,88	1,4211	+30,38

Zawartość – wyrażona w mg/ml

Tabela 162. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na rozdzielczość i asymetrię pików.

Analit	Rs 0,50 [ml/min]	Rs 0,45 [ml/min]	Rs 0,55[ml/min]	Asym. 0,50 [ml/min]	Asym. 0,45 [ml/min]	Asym. 0,55 [ml/min]
CBGO	4,00	4,05	3,82	1,24	1,24	1,26
CBDVA	2,01	2,10	2,01	1,18	1,29	1,31
CBND	1,25	1,34	1,17	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDV	7,75	7,74	7,63	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDA	2,16	2,11	2,04	1,36	1,31	1,18
CBGA	2,44	2,39	2,32	1,37	1,61	1,40
CBG	2,01	2,05	1,83	1,08	1,02	1,01
CBD	3,55	3,53	3,41	1,24	1,18	1,23
THCV	14,97	15,73	14,80	1,19	1,18	1,21
CBN	1,93	1,91	1,86	1,31	1,26	1,28
CBCVA	4,76	4,66	4,73	1,23	1,34	1,27
CBNA	2,11	2,24	2,07	1,35	1,22	1,31
Δ^9-THC	9,52	9,71	8,94	*n.a.*	1,18	*n.a.*
CBL	3,56	3,69	3,45	1,34	1,21	1,04
Δ^9-THCA	0,86	1,04	0,83	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	6,77	6,61	6,52	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBCA	1,27	1,28	1,32	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBLA	9,68	9,89	9,48	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
Δ^9-THCP	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,05	1,35	1,07

Rs - rozdział pomiędzy pikami
Asym. - symetria pików

Tabela 163. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na liczbę półek teoretycznych i S/N.

Analit	N 0,50 [ml/min]	N 0,45 [ml/min]	N 0,55 [ml/min]	S/N 0,50 [ml/min]	S/N 0,45 [ml/min]	S/N 0,55 [ml/min]
CBGO	8558	9212	7876	122,1	41,3	115,6
CBDVA	7632	8041	7197	87,5	89,7	138,1
CBND	11227	11648	10573	74,5	70,5	111,6
CBDV	14637	14840	13122	32,9	31,1	49,7
CBDA	12148	12429	11976	68,9	79,4	109,5
CBGA	12584	11752	11606	78,3	92,0	117,0
CBG	15062	15183	13035	82,8	110,7	128,1
CBD	20738	20367	19227	56,1	69,3	87,0
THCV	23721	26123	21686	29,9	35,7	39,2
CBN	22338	25032	22811	38,9	49,4	50,3
CBCVA	16821	15860	16474	28,3	35,2	36,0
CBNA	15062	15347	14787	76,8	50,9	67,0
Δ^9-THC	26475	28505	25042	50,2	34,6	41,0
CBL	36321	36134	30064	19,2	14,6	16,6
Δ^9-THCA	20762	25978	21792	25,5	20,6	28,5
CBC	23779	25416	23625	24,9	19,3	29,5
CBCA	23782	22662	21718	7,5	20,0	10,9
CBLA	24113	28505	28678	3,9	11,6	7,1
Δ^9-THCP	28554	26845	23194	7,8	22,0	15,1

N - liczba półek teoretycznych
S/N - sygnał do szumu

Tabela 164. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na czas retencji pików.

Analit	t_R 20°C	t_R 19°C	Δt_R 19°C	Zmiana [%]	t_R 21°C	Δt_R 21°C	Zmiana [%]
CBGO	2,567	2,575	+0,008	+0,31	2,567	0,000	0,00
CBDVA	3,067	3,083	+0,016	+0,52	3,067	0,000	0,00
CBND	3,333	3,350	+0,017	+0,51	3,333	0,000	0,00
CBDV	3,483	3,500	+0,017	+0,49	3,483	0,000	0,00
CBDA	4,583	4,600	+0,017	+0,37	4,575	-0,008	-0,17
CBGA	4,942	4,975	+0,033	+0,67	4,933	-0,009	-0,18
CBG	5,367	5,392	+0,025	+0,47	5,350	-0,017	-0,32
CBD	5,700	5,725	+0,025	+0,44	5,683	-0,017	-0,30
THCV	6,250	6,292	+0,042	+0,67	6,225	-0,025	-0,40
CBN	9,325	9,392	+0,067	+0,72	9,267	-0,058	-0,62
CBCVA	9,950	10,025	+0,075	+0,75	9,900	-0,050	-0,50
CBNA	11,608	11,725	+0,117	+1,01	11,533	-0,075	-0,65
Δ^9-THC	12,167	12,258	+0,091	+0,75	12,083	-0,084	-0,69
CBL	15,067	15,217	+0,150	+1,00	14,942	-0,125	-0,83
Δ^9-THCA	16,500	16,675	+0,175	+1,06	16,350	-0,150	-0,91
CBC	16,817	16,983	+0,166	+0,99	16,700	-0,117	-0,70
CBCA	20,225	20,442	+0,217	+1,07	20,050	-0,175	-0,87
CBLA	20,758	20,975	+0,217	+1,05	20,558	-0,200	-0,96
Δ^9-THCP	26,258	26,558	+0,300	+1,14	25,983	-0,275	-1,05

t_R - czas retencji piku

Tabela 165. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na wynik ilościowy i powierzchnię piku.

Analit	Zawartość 20°C	Zawartość 19°C	Δ Zawartość [%]	Zawartość 21°C	Δ Zawartość [%]	Pole powierzchni 20°C	Pole powierzchni 19°C	Δ Pole powierzchni [%]	Pole powierzchni 21°C	Δ Pole powierzchni [%]
CBGO	9,7069	10,2869	+5,98	10,4424	+7,58	0,8572	0,8970	+4,64	0,9108	+6,25
CBDVA	11,0689	11,2269	+1,43	11,3568	+2,60	1,0594	1,1528	+8,82	1,1647	+9,94
CBND	9,3497	9,4072	+0,61	9,6587	+3,30	0,8560	0,8957	+4,64	0,9188	+7,34
CBDV	6,5149	7,8032	+19,77	7,8320	+20,22	0,3904	0,4215	+7,97	0,4233	+8,43
CBDA	10,1719	10,2043	+0,32	10,8260	+6,43	1,0002	1,0543	+5,41	1,1124	+11,22
CBGA	11,6101	11,1936	-3,59	11,9420	+2,86	1,2403	1,3022	+4,99	1,3782	+11,12
CBG	11,2455	11,1759	-0,62	11,1476	-0,87	1,3312	1,3963	+4,89	1,3931	+4,65
CBD	11,0971	11,2755	+1,61	11,1852	+0,79	1,0487	1,1105	+5,89	1,1017	+5,05
THCV	9,6964	10,2721	+5,94	9,6625	-0,35	0,7610	0,7983	+4,90	0,7486	-1,63
CBN	10,8977	10,8568	-0,38	10,6197	-2,55	1,2558	1,3673	+8,88	1,3401	+6,71
CBCVA	10,4200	11,1994	+7,48	11,3023	+8,47	1,1228	1,2370	+10,17	1,2484	+11,19
CBNA	19,8684	20,6202	+3,78	20,2195	+1,77	2,0694	2,1487	+3,83	2,1103	+1,98
Δ^9-THC	8,5849	8,8883	+3,53	8,3021	-3,29	1,1827	1,2490	+5,61	1,1705	-1,03
CBL	7,8012	9,8576	+26,36	9,5178	+22,00	0,6655	0,7362	+10,62	0,7070	+6,24
Δ^9-THCA	7,3857	7,7683	+5,18	8,6387	+16,97	0,9656	0,9910	+2,63	1,0954	+13,44
CBC	10,2612	10,9751	+6,96	10,5724	+3,03	1,0884	1,1826	+8,65	1,1388	+4,63
CBCA	10,8814	11,1079	+2,08	9,8060	-9,88	1,2130	1,2873	+6,13	1,1427	-5,80
CBLA	11,5568	12,0373	+4,16	8,7706	-24,11	0,6850	0,8141	+18,85	0,6136	-10,42
Δ^9-THCP	10,9255	10,2811	-5,90	10,3850	-4,95	1,5304	1,5646	+2,23	1,5775	+3,08

Zawartość – wyrażona w mg/ml

Tabela 166. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na rozdzielczość i asymetrię pików.

Analit	Rs 20°C	Rs 19°C	Rs 21°C	Asym. 20°C	Asym. 19°C	Asym. 21°C
CBGO	4,04	4,00	4,03	1,22	1,10	1,08
CBDVA	2,02	2,00	2,04	1,30	1,15	1,18
CBND	1,23	1,23	1,20	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDV	7,96	7,76	7,60	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDA	2,14	2,17	2,11	1,30	1,36	1,22
CBGA	2,37	2,34	2,38	1,56	1,31	1,30
CBG	1,87	1,91	1,96	1,05	1,04	1,07
CBD	3,20	3,30	3,22	1,21	1,19	1,24
THCV	14,49	14,55	14,57	1,22	1,16	1,21
CBN	2,26	2,26	2,32	1,21	1,19	1,27
CBCVA	5,12	5,09	5,09	1,39	1,42	1,29
CBNA	1,72	1,58	1,73	1,43	1,41	1,27
Δ^9-THC	9,31	9,19	9,22	*n.a.*	*n.a.*	1,13
CBL	*n.a.*	*n.a.*	3,50	1,17	1,12	1,38
Δ^9-THCA	*n.a.*	*n.a.*	0,76	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	*n.a.*	*n.a.*	7,07	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBCA	1,00	0,93	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBLA	9,40	9,08	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
Δ^9-THCP	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,23	1,31	1,26

Rs - rozdział pomiędzy pikami
Asym. - symetria pików

Tabela 167. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na liczbę półek teoretycznych i S/N.

Analit	N 20°C	N 19°C	N 21°C	S/N 20°C	S/N 19°C	S/N 21°C
CBGO	8603	8039	8221	129,3	1,2	1,2
CBDVA	7978	7795	8200	71,9	75,5	98,3
CBND	10846	10947	11129	63,3	65,8	84,6
CBDV	14133	14517	12715	30,5	32,6	40,6
CBDA	13159	12002	12402	57,1	58,4	79,8
CBGA	12585	12493	12527	62,5	65,5	88,5
CBG	13702	14442	14889	64,7	68,7	89,0
CBD	17195	17909	18718	56,0	59,7	78,0
THCV	21292	21118	21128	58,6	54,9	67,9
CBN	21518	21860	22472	62,8	61,5	70,3
CBCVA	17580	16900	17355	48,2	45,1	52,7
CBNA	17643	16907	18115	86,4	91,6	63,6
Δ^9-THC	25820	24347	26785	57,4	62,0	42,3
CBL	35089	33758	33497	30,7	36,5	22,3
Δ^9-THCA	*n.a.*	*n.a.*	18566	*n.a.*	*n.a.*	37,8
CBC	*n.a.*	*n.a.*	22873	*n.a.*	*n.a.*	39,5
CBCA	24023	22103	24888	18,2	22,4	20,8
CBLA	22694	19422	*n.a.*	10,2	12,4	*n.a.*
Δ^9-THCP	28536	28313	27158	19,4	21,8	21,8

N - liczba półek teoretycznych
S/N - sygnał do szumu

Tabela 168. Zmiana parametru Power Function detektora CAD na wynik ilościowy i powierzchnię piku.

Analit	Zawartość 1,0	Zawartość 0,9	Δ Zawartość [%]	Zawartość 1,1	Δ Zawartość [%]	Pole powierzchni 1,0	Pole powierzchni 0,9	Δ Pole powierzchni [%]	Pole powierzchni 1,1	Δ Pole powierzchni [%]
CBGO	9,7069	14,6982	+51,42	7,0834	-27,03	0,8572	1,2844	+49,84	0,6105	-28,78
CBDVA	11,0689	16,0590	+45,08	8,1476	-26,39	1,0594	1,5857	+49,68	0,8669	-18,17
CBND	9,3497	13,3885	+43,20	6,9514	-25,65	0,8560	1,2558	+46,71	0,6679	-21,97
CBDV	6,5149	11,8227	+81,47	6,0413	-7,27	0,3904	0,6649	+70,31	0,3140	-19,57
CBDA	10,1719	14,6029	+43,56	7,0902	-30,30	1,0002	1,4582	+45,79	0,7583	-24,19
CBGA	11,6101	15,1477	+30,47	7,4158	-36,13	1,2403	1,6983	+36,93	0,9107	-26,57
CBG	11,2455	14,3842	+27,91	7,3899	-34,29	1,3312	1,7505	+31,50	0,9670	-27,36
CBD	11,0971	14,5221	+30,86	7,6420	-31,14	1,0487	1,4244	+35,83	0,7497	-28,51
THCV	9,6964	13,5090	+39,32	6,6115	-31,81	0,7610	1,0595	+39,22	0,4966	-34,74
CBN	10,8977	15,2937	+40,34	7,4703	-31,45	1,2558	1,8656	+48,56	0,9733	-22,50
CBCVA	10,4200	15,6276	+49,98	7,8116	-25,03	1,1228	1,7188	+53,08	0,8617	-23,25
CBNA	19,8684	31,1298	+56,68	14,6276	-26,38	2,0694	3,1141	+50,48	1,5619	-24,52
Δ^9-THC	8,5849	13,5036	+57,29	6,2053	-27,72	1,1827	1,8573	+57,04	0,8874	-24,97
CBL	7,8012	12,8081	+64,18	6,9441	-10,99	0,6655	0,9887	+48,56	0,4850	-27,12
Δ^9-THCA	7,3857	11,2641	+52,51	5,7834	-21,69	0,9656	1,4080	+45,82	0,7513	-22,19
CBC	10,2612	16,1907	+57,79	8,0186	-21,86	1,0884	1,7417	+60,02	0,8597	-21,01
CBCA	10,8814	14,6193	+34,35	6,6464	-38,92	1,2130	1,6745	+38,05	0,7892	-34,94
CBLA	11,5568	14,5638	+26,02	5,9423	-48,58	0,6850	0,9695	+41,53	0,4404	-35,71
Δ^9-THCP	10,9255	16,1244	+47,59	6,6434	-39,19	1,5304	2,2852	+49,32	1,1079	-27,61

Zawartość – wyrażona w mg/ml

Tabela 169. Zmiana parametru Power Function detektora CAD na rozdzielczość i asymetrię pików.

Analit	Rs 1,0	Rs 0,9	Rs 1,1	Asym. 1,0	Asym. 0,9	Asym. 1,1
CBGO	4,04	4,03	4,07	1,22	1,14	1,20
CBDVA	2,02	1,91	2,08	1,30	1,16	1,22
CBND	1,23	1,19	1,24	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDV	7,96	7,63	7,80	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDA	2,14	2,11	2,13	1,30	1,31	1,18
CBGA	2,37	2,29	2,43	1,56	1,34	1,35
CBG	1,87	1,86	2,04	1,05	1,06	1,08
CBD	3,20	3,17	3,32	1,21	1,23	1,13
THCV	14,49	14,49	15,00	1,22	1,26	1,17
CBN	2,26	2,25	2,30	1,21	1,14	1,17
CBCVA	5,12	5,04	5,14	1,39	1,34	1,38
CBNA	1,72	1,62	1,68	1,43	1,39	1,38
Δ^9-THC	9,31	9,11	9,18	*n.a.*	*n.a.*	1,21
CBL	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,17	1,28	1,14
Δ^9-THCA	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	*n.a.*	*n.a.*	6,80	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBCA	1,00	0,89	0,90	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBLA	9,40	8,87	9,21	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
Δ^9-THCP	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,23	1,15	1,14

Rs - rozdział pomiędzy pikami
Asym. - symetria pików

Tabela 170. Zmiana parametru Power Function detektora CAD na liczbę półek teoretycznych i S/N.

Analit	N 1,0	N 0,9	N 1,1	S/N 1,0	S/N 0,9	S/N 1,1
CBGO	8603	8212	8339	129,3	1,2	1,2
CBDVA	7978	7764	8357	71,9	89,1	93,2
CBND	10846	10206	11655	63,3	76,1	78,9
CBDV	14133	13380	13809	30,5	40,8	38,1
CBDA	13159	11817	12467	57,1	85,0	67,0
CBGA	12585	12157	13109	62,5	91,1	73,3
CBG	13702	13511	15728	64,7	92,1	77,2
CBD	17195	17216	19066	56,0	81,1	64,1
THCV	21292	20652	23831	58,6	59,0	74,9
CBN	21518	21824	22486	62,8	60,7	71,4
CBCVA	17580	17869	17928	48,2	46,7	51,7
CBNA	17643	16167	17803	86,4	70,4	81,3
Δ^9-THC	25820	23756	24727	57,4	47,9	51,7
CBL	35089	34876	33597	30,7	27,9	33,9
Δ^9-THCA	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	*n.a.*	*n.a.*	20087	*n.a.*	*n.a.*	45,8
CBCA	24023	25024	23379	18,2	27,5	27,6
CBLA	22694	18494	20213	10,2	15,5	15,9
Δ^9-THCP	28536	26710	28372	19,4	25,8	32,4

N - liczba półek teoretycznych
S/N - sygnał do szumu

Tabela 171. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na czas retencji.

Analit	t_R 35°C	t_R 50°C	Δt_R 50°C	Zmiana [%]	t_R 70°C	Δt_R 70°C	Zmiana [%]
CBGO	2,567	2,567	0,000	0,00	2,575	+0,008	+0,31
CBDVA	3,067	3,067	0,000	0,00	3,067	0,000	0,00
CBND	3,333	3,333	0,000	0,00	3,342	+0,009	+0,27
CBDV	3,483	3,483	0,000	0,00	3,500	+0,017	+0,49
CBDA	4,583	4,592	+0,009	+0,20	4,583	0,000	0,00
CBGA	4,942	4,950	+0,008	+0,16	4,950	+0,008	+0,16
CBG	5,367	5,367	0,000	0,00	5,367	0,000	0,00
CBD	5,700	5,700	0,000	0,00	5,700	0,000	0,00
THCV	6,250	6,250	0,000	0,00	6,250	0,000	0,00
CBN	9,325	9,325	0,000	0,00	9,333	+0,008	+0,09
CBCVA	9,950	9,950	0,000	0,00	9,950	0,000	0,00
CBNA	11,608	11,617	+0,009	+0,08	11,633	+0,025	+0,22
Δ^9-THC	12,167	12,167	0,000	0,00	12,142	-0,025	-0,21
CBL	15,067	15,083	+0,016	+0,11	15,075	+0,008	+0,05
Δ^9-THCA	16,500	16,517	+0,017	+0,10	16,517	+0,017	+0,10
CBC	16,817	16,817	0,000	0,00	16,742	-0,075	-0,45
CBCA	20,225	20,233	+0,008	+0,04	20,225	0,000	0,00
CBLA	20,758	20,725	-0,033	-0,16	20,767	+0,009	+0,04
Δ^9-THCP	26,258	26,308	+0,050	+0,19	26,275	+0,017	+0,06

t_R - czas retencji piku

Tabela 172. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na wynik ilościowy i powierzchnię pików.

Analit	Zawartość 35°C	Zawartość 50°C	Δ Zawartość [%]	Zawartość 70°C	Δ Zawartość [%]	Pole powierzchni 35°C	Pole powierzchni 50°C	Δ Pole powierzchni [%]	Pole powierzchni 70°C	Δ Pole powierzchni [%]
CBGO	9,7069	2,9345	-69,77	2,1665	-77,68	0,8572	0,2328	-72,84	0,1621	-81,09
CBDVA	11,0689	11,3097	+2,18	8,3978	-24,13	1,0594	1,1604	+9,53	0,8905	-15,94
CBND	9,3497	4,4723	-52,17	0,9777	-89,54	0,8560	0,4337	-49,33	0,0960	-88,79
CBDV	6,5149	2,2957	-64,76	2,4120	-62,98	0,3904	0,0838	-78,53	0,0909	-76,72
CBDA	10,1719	9,7740	-3,91	8,7904	-13,58	1,0002	1,0139	+1,37	0,9210	-7,92
CBGA	11,6101	10,3121	-11,18	10,5893	-8,79	1,2403	1,2120	-2,28	1,2404	+0,01
CBG	11,2455	7,2351	-35,66	1,3208	-88,25	1,3312	0,9492	-28,70	0,2536	-80,95
CBD	11,0971	4,3985	-60,36	1,6136	-85,46	1,0487	0,4191	-60,04	0,1289	-87,71
THCV	9,6964	3,5520	-63,37	2,2823	-76,46	0,7610	0,2391	-68,58	0,1309	-82,80
CBN	10,8977	6,6138	-39,31	1,6389	-84,96	1,2558	0,8717	-30,59	0,2668	-78,75
CBCVA	10,4200	11,3753	+9,17	11,4429	+9,82	1,1228	1,2564	+11,90	1,2638	+12,56
CBNA	19,8684	22,0051	+10,75	21,3846	+7,63	2,0694	2,2805	+10,20	2,2216	+7,35
Δ^9-THC	8,5849	4,5428	-47,08	1,0875	-87,33	1,1827	0,6604	-44,16	0,1815	-84,65
CBL	7,8012	4,3479	-44,27	2,7781	-64,39	0,6655	0,2594	-61,02	0,1223	-81,62
Δ^9-THCA	7,3857	9,3320	+26,35	10,1763	+37,78	0,9656	1,1783	+22,03	1,2789	+32,45
CBC	10,2612	5,8180	-43,30	3,1960	-68,85	1,0884	0,6166	-43,35	0,3239	-70,24
CBCA	10,8814	11,0814	+1,84	10,7517	-1,19	1,2130	1,2844	+5,89	1,2478	+2,87
CBLA	11,5568	10,5101	-9,06	11,2789	-2,40	0,6850	0,7203	+5,15	0,7675	+12,04
Δ^9-THCP	10,9255	7,0656	-35,33	0,3630	-96,68	1,5304	1,1612	-24,12	0,3051	-80,06

Zawartość – wyrażona w mg/ml

Tabela 173. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na rozdzielczość i asymetrię pików.

Analit	Rs 35°C	Rs 50°C	Rs 70°C	Asym. 35°C	Asym. 50°C	Asym. 70°C
CBGO	4,04	4,03	3,05	1,22	1,22	1,02
CBDVA	2,02	2,07	1,73	1,30	1,31	1,32
CBND	1,23	8,94	0,99	*n.a.*	2,25	*n.a.*
CBDV	7,96	*n.a.*	6,34	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBDA	2,14	2,11	2,05	1,30	1,21	1,27
CBGA	2,37	2,43	2,50	1,56	1,37	1,32
CBG	1,87	2,10	1,95	1,05	1,06	1,02
CBD	3,20	3,49	2,82	1,21	1,29	1,40
THCV	14,49	15,75	13,98	1,22	1,37	1,02
CBN	2,26	2,35	2,06	1,21	1,20	0,99
CBCVA	5,12	5,00	4,50	1,39	1,46	1,47
CBNA	1,72	1,76	1,38	1,43	1,38	1,27
Δ^9-THC	9,31	9,29	7,33	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBL	*n.a.*	3,53	3,19	1,17	1,13	1,09
Δ^9-THCA	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBC	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBCA	1,00	0,88	0,96	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBLA	9,40	9,30	9,75	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
Δ^9-THCP	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	1,23	1,07	1,11

Rs - rozdział pomiędzy pikami
Asym. - symetria pików

Tabela 174. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na liczbę półek teoretycznych i sygnał do szumu.

Analit	N 35°C	N 50°C	N 70°C	S/N 35°C	S/N 50°C	S/N 70°C
CBGO	8603	9139	3996	129,3	0,4	0,2
CBDVA	7978	7553	5877	71,9	125,0	66,2
CBND	10846	12817	7075	63,3	49,0	7,7
CBDV	14133	*n.a.*	7451	30,5	*n.a.*	6,8
CBDA	13159	12471	10342	57,1	93,1	61,3
CBGA	12585	12582	12352	62,5	103,5	79,2
CBG	13702	16565	18873	64,7	84,4	16,7
CBD	17195	22512	14888	56,0	40,7	7,5
THCV	21292	23317	15060	58,6	19,3	7,0
CBN	21518	26807	24512	62,8	47,7	13,9
CBCVA	17580	16895	12179	48,2	49,9	53,5
CBNA	17643	16414	14270	86,4	110,9	96,3
Δ^9-THC	25820	34030	19253	57,4	41,0	8,9
CBL	35089	27176	17765	30,7	11,3	5,1
Δ^9-THCA	21988	21738	21280	*n.a.*	38,4	38,2
CBC	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*	*n.a.*
CBCA	24023	23943	21668	18,2	32,4	30,5
CBLA	22694	19262	20161	10,2	17,7	18,3
Δ^9-THCP	28536	30116	36794	19,4	30,1	7,8

N - liczba półek teoretycznych
S/N - sygnał do szumu

11.11. Chromatogramy prób rzeczywistych

Chromatogramy próbek rzeczywistych oceniano w celu potwierdzenia możliwości zastosowania opracowanej procedury chromatograficznej do analizy produktów olejowych oraz materiału roślinnego. Badaniami objęto cztery próbki olejowe oznaczone symbolami O1-O4 oraz cztery próbki suszu lub kwiatów konopi oznaczone symbolami F1-F4. Próbki przygotowano zgodnie z procedurą opisaną w części eksperymentalnej, a analizy przeprowadzono w nominalnych warunkach chromatograficznych.

Charakterystykę próbek, sporządzoną na podstawie informacji zamieszczonych na etykietach lub danych dotyczących ich pochodzenia, przedstawiono w Tabeli 174.

Tabela 175. Charakterystyka próbek rzeczywistych wykorzystanych w badaniach.

Kod próbki	Typ próbki	Opis z etykiety / źródło	Deklarowane CBD	Deklarowane Δ^9-THC	Uwagi
O1	olej	PURE CBD OIL	30%, 3000 mg CBD	<0,1%	10 mL
O2	olej	CBD FORTE OIL	3,6%, 1000 mg CBD	<0,2%	30 mL
O3	olej	POLISH PREMIUM 30% CBD HEMP OIL	30%, 2760 mg CBD	0,0%	10 mL
O4	olej	Satiwell CBD 10%	10%, 1000 mg CBD	<0,1%	10 g
F1	susz/kwiat	CBD AMNESIA HAZE PREMIUM HEMP FLOWER	suma CBD 18,94%	0,1%	10 g
F2	susz/kwiat	CBD White Widow hemp flower	27,89% CBD	0,1%	10 g
F3	susz/kwiat	Pozytywne Konopie Orange Bud hemp flower	8,5% CBD	<0,1%	10 g
F4	susz/kwiat	Cannabis sativa, źródło rolnicze	brak danych	brak danych	Cannabis sativa

Wartości przedstawione w Tabeli 174 pochodzą z etykiet produktów i nie stanowią wyników oznaczeń wykonanych w ramach niniejszej pracy. Deklarowane przez producentów zawartości, podane w procentach lub miligramach, przepisano zgodnie z informacjami zamieszczonymi na etykietach. Określenie „suma CBD” zachowano w brzmieniu zgodnym

z etykietą próbki F1. Chromatogram każdej próbki porównywano z chromatogramem mieszaniny wzorcowej zawierającej 19 kannabinoidów. Przypisanie sygnałów opierano na zgodności czasu retencji, kolejności elucji oraz kształtu piku. Oceniano również przebieg linii podstawowej, obecność sygnałów mogących pochodzić od składników matrycy oraz możliwość jednoznacznego wyznaczenia granic integracji.

W wariancie UHPLC-UV-VIS/DAD chromatogramy wykorzystywane do oznaczeń ilościowych rejestrowano przy długości fali 278 nm. Identyfikację pików wspomagano przez porównanie widm DAD z widmami zarejestrowanymi dla roztworów wzorcowych. Oceniano profil widmowy w maksimum oraz na zboczach piku. Niezgodność profilu widmowego stanowiła podstawę do ponownej kontroli przypisania sygnału i granic integracji. Samo widmo DAD nie było traktowane jako jednoznaczne potwierdzenie tożsamości związku.

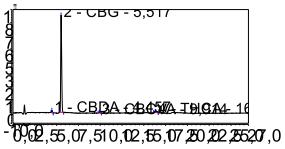
W wariancie UHPLC-CORONA CAD przypisanie pików opierano na zgodności czasu retencji, kolejności elucji, kształtu sygnału oraz porównaniu chromatogramu próbki z chromatogramem mieszaniny wzorcowej.

Szczególną uwagę zwrócono na regiony obejmujące pary CBND/CBDV, Δ^9-THCA/CBC oraz CBCA/CBLA. Dla tych par oceniano położenie maksimów pików, przebieg linii podstawowej pomiędzy sygnałami oraz możliwy wpływ sąsiadującego piku na wyznaczone granice integracji. Ze względu na uzyskiwane w części analiz wartości rozdzielczości niższe niż Rs = 1,5 regiony te traktowano jako krytyczne.

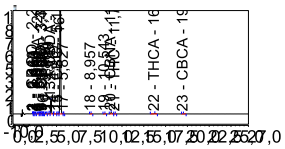
W próbkach olejowych dominującym ilościowo oznaczanym kannabinoidem był CBD. Ze względu na jego stężenie sygnał CBD był wyraźnie większy od sygnałów pozostałych składników. W próbkach materiału roślinnego ilościowo oznaczano przede wszystkim CBD i CBDA. Dla części pozostałych kannabinoidów obserwowano sygnały odpowiadające stężeniom niższym od granicy oznaczalności.

Wyniki ilościowe raportowano wyłącznie dla stężeń mieszczących się w potwierdzonym zakresie roboczym danego analitu i wariantu detekcji. Sygnały odpowiadające stężeniom równym lub wyższym od LOD, lecz niższym od LOQ, raportowano jako „<LOQ”, bez podawania wyniku ilościowego. Brak sygnału lub sygnał odpowiadający stężeniu niższemu od LOD raportowano jako „n.d.”.

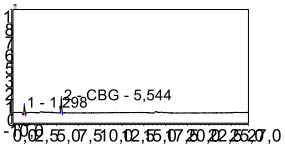
W dalszej części podrozdziału przedstawiono przykładowe chromatogramy wybranych próbek rzeczywistych. Chromatogramy dobrano tak, aby zilustrować profile uzyskane dla obu rodzajów matryc, obecność dominujących kannabinoidów oraz wygląd krytycznych regionów rozdzielenia. Przedstawione chromatogramy mają charakter reprezentatywny, natomiast wyniki oznaczeń dla wszystkich ośmiu próbek zestawiono w odpowiednich tabelach wynikowych.



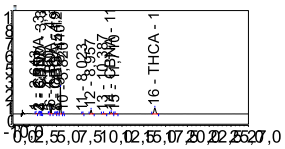
Rysunek 62. Przykładowy chromatogram próbki olejowej CBD - Pure Oil 30% uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



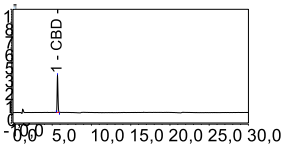
Rysunek 63. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego CBD Pure Oil 30% zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.



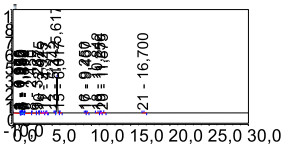
Rysunek 64. Przykładowy chromatogram próbki olejowej Kom uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



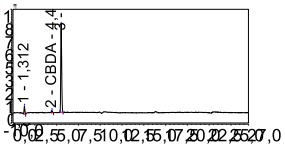
Rysunek 65. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego Kombinat Konopny Olej CBD Forte zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.



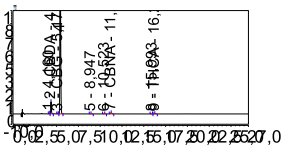
Rysunek 66. Przykładowy chromatogram próbki olejowej Polski Olej Konopny CD 30% uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



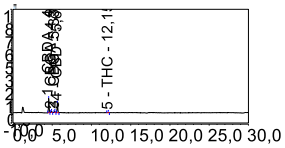
Rysunek 67. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego Polski Olej Konopny CD 30% zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.



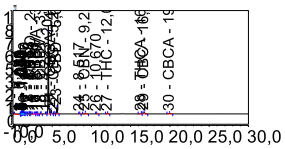
Rysunek 68. Przykładowy chromatogram próbki olejowej Satiwell CBD 10% uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



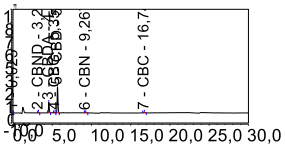
Rysunek 69. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego Satiwell 10% zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.



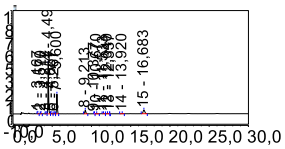
Rysunek 70. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Amnesia uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



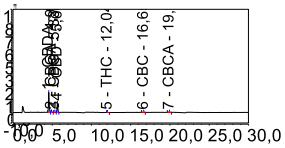
Rysunek 71. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Amnesia zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.



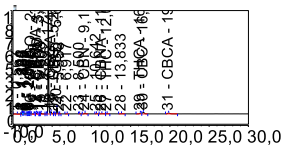
Rysunek 72. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego CBD White Widow Hemp flower uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



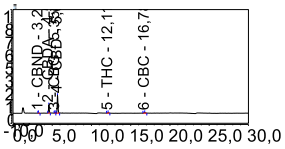
Rysunek 73. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego CBD White Widow Hemp flower zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.



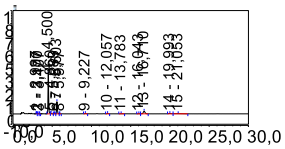
Rysunek 74. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Orange Bud uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



Rysunek 75. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Orange Bud zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.



Rysunek 76. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego próba od rolnika uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD.



Rysunek 77. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego próba od rolnika zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD.

12. Wykaz tabel

Tabela 1. Wykaz skrótów i symboli chromatograficznych zastosowanych w pracy. 15

Tabela 2. Nazwy zwyczajowe, skróty oraz nazwy systematyczne IUPAC kannabinoidów objętych zakresem badań. 16

Tabela 3. Wykaz analitów i substancji odniesienia wykorzystanych w metodzie. 37

Tabela 4. Charakterystyka próbek badanych oraz próbek kontrolnych. 39

Tabela 5. Warunki chromatograficzne i parametry detekcji UHPLC-CORONA CAD. 40

Tabela 6. Parametry detekcji UHPLC-UV-VIS/DAD. 41

Tabela 7. Podsumowanie planu walidacji metody. 48

Tabela 8. Główne założenia metodyczne opracowania procedury UHPLC. 51

Tabela 9. Klasyfikacja profili widmowych DAD analizowanych kannabinoidów 53

Tabela 10. Finalne warunki metody UHPLC-CORONA CAD. 56

Tabela 11. Finalne warunki detekcji UHPLC-UV-VIS/DAD. 56

Tabela 12. Regiony krytyczne chromatogramu dla detekcji CORONA CAD. 58

Tabela 13. Regiony krytyczne chromatogramu dla detekcji UV-VIS/DAD. 58

Tabela 14. Ocena selektywności metody na podstawie analizy blanku, matryc olejowych i matrycy roślinnej zastępczej. 61

Tabela 15. Kryteria akceptacji przydatności systemu chromatograficznego. 63

Tabela 16. Wyniki oceny przydatności systemu chromatograficznego dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 64

Tabela 17. Wyniki oceny przydatności systemu chromatograficznego dla detekcji CORONA CAD. 65

Tabela 18. Modele kalibracyjne i zakresy robocze dla wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD. 66

Tabela 19. Modele kalibracyjne i zakresy robocze dla wariantu UHPLC-CORONA CAD. 67

Tabela 20. Zestawienie wyników precyzji i dokładności metody na podstawie dostępnych danych. 69

Tabela 21. Zestawienie LOD i LOQ dla detekcji CORONA CAD. 70

Tabela 22. Zestawienie LOD i LOQ dla detekcji UV-VIS/DAD. 71

Tabela 23a. Wyniki badania odporności metody UHPLC dla wariantów detekcji DAD i CAD. 73

Tabela 24. Podsumowanie wyników oceny walidacyjnej metody. 76

Tabela 25. Charakterystyka próbek rzeczywistych. 79

Tabela 26. Zawartość CBD w próbkach olejowych. 79

Tabela 27. Główne kannabinoidy oznaczone ilościowo w próbkach suszu i materiału roślinnego. 80

Tabela 28. Procedura przygotowania próbek materiału roślinnego. 92

Tabela 29. Procedura przygotowania próbek produktów olejowych. 93

Tabela 30. Sposób przygotowania materiałów kontrolnych. 94

Tabela 31. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBGO. 108

Tabela 32. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBDVA. 108

Tabela 33. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBND. 109

Tabela 34. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBDV. 109

Tabela 35. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBDA. 109
Tabela 36. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBGA. 110
Tabela 37. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBG. 110
Tabela 38. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBD. 110
Tabela 39. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu THCV. 111
Tabela 40. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBN. 111
Tabela 41. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBCVA. 111
Tabela 42. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBNA. 112
Tabela 43. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu $\Delta\mathbf{9}$-THC. 112
Tabela 44. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBL. 112
Tabela 45. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu $\Delta\mathbf{9}$-THCA. 113
Tabela 46. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBC. 113
Tabela 47. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBCA. 113
Tabela 48. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu CBLA. 114
Tabela 49. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego UV-VIS/DAD dla analitu $\Delta\mathbf{9}$-THCP. 114
Tabela 50. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBGO. 114
Tabela 51. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBDVA. 115
Tabela 52. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBND. 115
Tabela 53. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBDV. 115
Tabela 54. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBDA. 116
Tabela 55. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBGA. 116
Tabela 56. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBG. 116
Tabela 57. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBD. 117
Tabela 58. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu THCV. 117
Tabela 59. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBN. 117
Tabela 60. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBCVA. 118
Tabela 61. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBNA. 118
Tabela 62. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu $\Delta\mathbf{9}$-THC. 118
Tabela 63. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBL. 119
Tabela 64. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu $\Delta\mathbf{9}$-THCA. 119
Tabela 65. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBC. 119
Tabela 66. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBCA. 120
Tabela 67. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu CBLA. 120
Tabela 68. Arkusz przydatności systemu chromatograficznego CORONA CAD dla analitu $\Delta\mathbf{9}$-THCP. 120
Tabela 69. Poziomy kalibracyjne zastosowane w wariancie UHPLC-UV-VIS/DAD. 134
Tabela 70. Parametry liniowych modeli kalibracyjnych dla wariantu UHPLC-UV-VIS/DAD przy długości fali 278 nm. 136
Tabela 71. Wyniki kalibracji CBGO dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 137

Tabela 72. Wyniki kalibracji CBDVA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 138
Tabela 73. Wyniki kalibracji CBND dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 138
Tabela 74. Wyniki kalibracji CBDV dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 138
Tabela 75. Wyniki kalibracji CBDA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 139
Tabela 76. Wyniki kalibracji CBGA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 139
Tabela 77. Wyniki kalibracji CBG dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 139
Tabela 78. Wyniki kalibracji CBD dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 140
Tabela 79. Wyniki kalibracji THCV dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 140
Tabela 80. Wyniki kalibracji CBN dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 140
Tabela 81. Wyniki kalibracji CBCVA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 141
Tabela 82. Wyniki kalibracji CBNA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 141
Tabela 83. Wyniki kalibracji Δ**9**-THC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 141
Tabela 84. Wyniki kalibracji CBL dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 142
Tabela 85. Wyniki kalibracji Δ**9**-THCA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 142
Tabela 86. Wyniki kalibracji CBC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 142
Tabela 87. Wyniki kalibracji CBCA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 143
Tabela 88. Wyniki kalibracji CBLA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 143
Tabela 89. Wyniki kalibracji Δ**9**-THCP dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm. 143
Tabela 90. Poziomy kalibracyjne udokumentowane dla wariantu UHPLC-CORONA CAD. 144
Tabela 91. Parametry kwadratowych modeli kalibracyjnych z ważeniem 1/x lub $1/x^2$ dla wariantu UHPLC-CAD. 146
Tabela 92. Wyniki kalibracji CBGO dla detekcji CAD. 148
Tabela 93. Wyniki kalibracji CBDVA dla detekcji CAD. 148
Tabela 94. Wyniki kalibracji CBND dla detekcji CAD. 148
Tabela 95. Wyniki kalibracji CBDV dla detekcji CAD. 148
Tabela 96. Wyniki kalibracji CBDA dla detekcji CAD. 149
Tabela 97. Wyniki kalibracji CBGA dla detekcji CAD. 149
Tabela 98. Wyniki kalibracji CBG dla detekcji CAD. 149
Tabela 99. Wyniki kalibracji CBD dla detekcji CAD. 149
Tabela 100. Wyniki kalibracji THCV dla detekcji CAD. 150
Tabela 101. Wyniki kalibracji CBN dla detekcji CAD. 150
Tabela 102. Wyniki kalibracji CBCVA dla detekcji CAD. 150
Tabela 103. Wyniki kalibracji CBNA dla detekcji CAD. 150
Tabela 104. Wyniki kalibracji Δ**9**-THC dla detekcji CAD. 151
Tabela 105. Wyniki kalibracji CBL dla detekcji CAD. 151
Tabela 106. Wyniki kalibracji CBC dla detekcji CAD. 151
Tabela 107. Wyniki kalibracji Δ**9**-THCA dla detekcji CAD. 151
Tabela 108. Wyniki kalibracji CBCA dla detekcji CAD. 152

Tabela 109. Wyniki kalibracji CBLA dla detekcji CAD. 152
Tabela 110. Wyniki kalibracji Δ⁹-THCPΔ**9** dla detekcji CAD. 152
Tabela 111. Wyniki oceny powtarzalności metody. 154
Tabela 112. Wyniki oceny precyzji pośredniej dla detektora CAD. 156
Tabela 113. Wyniki oceny precyzji pośredniej dla detektora UV-VIS/DAD. 157
Tabela 114. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGO z detektorem CAD. 158
Tabela 115. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDVA z detektorem CAD. 159
Tabela 116. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBND z detektorem CAD. 159
Tabela 117. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDV z detektorem CAD. 159
Tabela 118. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDA z detektorem CAD. 159
Tabela 119. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGA z detektorem CAD. 160
Tabela 120. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBG z detektorem CAD. 160
Tabela 121. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBD z detektorem CAD. 160
Tabela 122. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla THCV z detektorem CAD. 160
Tabela 123. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBN z detektorem CAD. 161
Tabela 124. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCVA z detektorem CAD. 161
Tabela 125. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBNA z detektorem CAD. 161
Tabela 126. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ**9**-THC z detektorem CAD. 161
Tabela 127. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBL z detektorem CAD. 162
Tabela 128. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBC z detektorem CAD. 162
Tabela 129. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ**9**-THCA z detektorem CAD. 162
Tabela 130. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCA z detektorem CAD. 162
Tabela 131. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBLA z detektorem CAD. 163
Tabela 132. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ⁹-THCP z detektorem CAD. 163
Tabela 133. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGO z detektorem UV-VIS/DAD. 163
Tabela 134. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDVA z detektorem UV-VIS/DAD. 163
Tabela 135. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBND z detektorem UV-VIS/DAD. 164
Tabela 136. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDV z detektorem UV-VIS/DAD. 164
Tabela 137. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBDA z detektorem UV-VIS/DAD. 164
Tabela 138. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBGA z detektorem UV-VIS/DAD. 164
Tabela 139. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBG z detektorem UV-VIS/DAD. 164
Tabela 140. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBD z detektorem UV-VIS/DAD. 165
Tabela 141. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla THCV z detektorem UV-VIS/DAD. 165
Tabela 142. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBN z detektorem UV-VIS/DAD. 165
Tabela 143. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCVA z detektorem UV-VIS/DAD. 165
Tabela 144. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBNA z detektorem UV-VIS/DAD. 165
Tabela 145. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ**9**-THC z detektorem UV-VIS/DAD. 166
Tabela 146. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBL z detektorem UV-VIS/DAD. 166

Tabela 147. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ**9**-THCA z detektorem UV-VIS/DAD. ... 166
Tabela 148. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBC z detektorem UV-VIS/DAD. 166
Tabela 149. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBCA z detektorem UV-VIS/DAD. 166
Tabela 150. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla CBLA z detektorem UV-VIS/DAD. 167
Tabela 151. Wyniki oceny dokładności i odzysku metody dla Δ**9**-THCP z detektorem UV-VIS/DAD. 167
Tabela 152. Wpływ zmian przepływu fazy ruchomej na czas retencji analitów dla detekcji UV-Vis. 170
Tabela 153. Wpływ zmiany przepływu na wynik ilościowy i powierzchnię piku dla detekcji UV-Vis..... 171
Tabela 154. Wpływ zmiany przepływu na rozdzielczość i asymetrię pików dla detekcji UV-Vis. 172
Tabela 155. Wpływ zmiany przepływu na liczbę półek teoretycznych i stosunek sygnału do szumu dla detekcji UV-Vis. 173
Tabela 156. Wpływ temperatury termostatu kolumny na czas retencji dla detekcji UV-Vis. 174
Tabela 157. Wpływ zmiany temperatury termostatu kolumny na wynik ilościowy i powierzchnię piku dla detekcji UV-Vis. 175
Tabela 158. Wpływ zmiany temperatury termostatu na rozdzielczość i asymetrię pików dla detekcji UV-Vis. 176
Tabela 159. Wpływ zmiany temperatury termostatu na liczbę półek teoretycznych i stosunek sygnału do szumu dla detekcji UV-Vis. 177
Tabela 160. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na czas retencji dla detekcji CAD. 178
Tabela 161. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na wynik ilościowy i powierzchnię piku. 179
Tabela 162. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na rozdzielczość i asymetrię pików. 180
Tabela 163. Wpływ zmiany przepływu fazy ruchomej na liczbę półek teoretycznych i S/N. 181
Tabela 164. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na czas retencji pików. 182
Tabela 165. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na wynik ilościowy i powierzchnię piku. 183
Tabela 166. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na rozdzielczość i asymetrię pików. 184
Tabela 167. Wpływ zmiany temperatury pieca kolumny na liczbę półek teoretycznych i S/N. 185
Tabela 168. Zmiana parametru Power Function detektora CAD na wynik ilościowy i powierzchnię piku. 186
Tabela 169. Zmiana parametru Power Function detektora CAD na rozdzielczość i asymetrię pików. .. 187
Tabela 170. Zmiana parametru Power Function detektora CAD na liczbę półek teoretycznych i S/N. . 188
Tabela 171. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na czas retencji. 189
Tabela 172. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na wynik ilościowy i powierzchnię pików. 190
Tabela 173. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na rozdzielczość i asymetrię pików. 191
Tabela 174. Zmiana temperatury nebulizacji detektora CAD na liczbę półek teoretycznych i sygnał do szumu. 192
Tabela 175. Charakterystyka próbek rzeczywistych wykorzystanych w badaniach..... 193

13. Wykaz rycin

Rysunek 1. Struktura kannabidiolu (CBD) i kwasu kannabidiolowego (CBDA). R1 - grupa funkcyjna różnicująca obie formy, R2 - łańcuch n-pentylowy. 26
Rysunek 2. Kwas kannabidiolowy (CBDA) 27
Rysunek 3. Kannabidiol (CBD) 27
Rysunek 4. Kwas kannabigerolowy (CBGA) 27
Rysunek 5. Kannabigerol (CBG) 27
Rysunek 6. Kwas Δ^9-tetrahydrokannabinolowy (Δ^9-THCA) 27
Rysunek 7. Δ^9-Tetrahydrokannabinol (Δ^9-THC) 27
Rysunek 8. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBGO zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. 97
Rysunek 9. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBDVA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. .. 97
Rysunek 10. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBND zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. .. 97
Rysunek 11. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBDV zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. .. 97
Rysunek 12. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBDA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. .. 98
Rysunek 13. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBGA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. .. 98
Rysunek 14. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBG zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. 98
Rysunek 15. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBD zarejestrowane w zakresie 190-400 nm..... 98
Rysunek 16. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego THCV zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. .. 99
Rysunek 17. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBN zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. 99
Rysunek 18. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBCVA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. 99
Rysunek 19. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBNA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. .. 99
Rysunek 20. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego $\Delta 9$-THC zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. 100
Rysunek 21. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBL zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. ... 100
Rysunek 22. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego $\Delta 9$-THCA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. 100
Rysunek 23. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBC zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. ... 100
Rysunek 24. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBCA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.. 101
Rysunek 25. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego CBLA zarejestrowane w zakresie 190-400 nm.. 101
Rysunek 26. Widmo UV/DAD roztworu wzorcowego $\Delta 9$-THCP zarejestrowane w zakresie 190-400 nm. 101
Rysunek 27. Chromatogram blanku rozpuszczalnikowego metanolu zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm. 102
Rysunek 28. Chromatogram oleju MCT rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm. 102
Rysunek 29. Chromatogram oleju konopnego rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm. 103

Rysunek 30. Chromatogram ekstraktu czarnej herbaty, zastosowanej jako zastępcza matryca roślinna, zarejestrowany detektorem UV-VIS/DAD przy 278 nm. 103
Rysunek 31. Chromatogram blanku rozpuszczalnikowego metanolu zarejestrowany detektorem CAD. 104
Rysunek 32. Chromatogram oleju MCT rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem CAD. 104
Rysunek 33. Chromatogram oleju konopnego rozpuszczonego w metanolu zarejestrowany detektorem CAD. 105
Rysunek 34. Chromatogram ekstraktu czarnej herbaty, zastosowanej jako zastępcza matryca roślinna, zarejestrowany detektorem CAD. 105
Rysunek 35. Krzywa kalibracyjna CBDVA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 121
Rysunek 36. Krzywa kalibracyjna CBGA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 122
Rysunek 37. Krzywa kalibracyjna THCV dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 123
Rysunek 38.Krzywa kalibracyjna $\Delta 9$ -THC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 124
Rysunek 39. Krzywa kalibracyjna CBC dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 124
Rysunek 40. Krzywa kalibracyjna CBCA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 125
Rysunek 41. Krzywa kalibracyjna $\Delta 9$ -THCP dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 125
Rysunek 42. Krzywa kalibracyjna CBLA dla detekcji UV-VIS/DAD przy 278 nm; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem liniowym. 125
Rysunek 43. Krzywa kalibracyjna CBGO dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$ 126
Rysunek 44. Krzywa kalibracyjna CBDVA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana kwadratowym z ważeniem 1/x2. 126
Rysunek 45. Krzywa kalibracyjna CBND dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2. 126
Rysunek 46. Krzywa kalibracyjna CBDV dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2. 126
Rysunek 47. Krzywa kalibracyjna CBDA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2. 127
Rysunek 48. Krzywa kalibracyjna CBG dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 127

Rysunek 49. Krzywa kalibracyjna CBGA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 127
Rysunek 50. Krzywa kalibracyjna CBD dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$ 127
Rysunek 51. Krzywa kalibracyjna THCV dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$ 128
Rysunek 52. Krzywa kalibracyjna CBCVA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem $1/x^2$ 128
Rysunek 53. Krzywa kalibracyjna CBN dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 128
Rysunek 54. Krzywa kalibracyjna CBNA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2. 128
Rysunek 55. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THC dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 129
Rysunek 56. Krzywa kalibracyjna CBC dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 129
Rysunek 57. Krzywa kalibracyjna CBL dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x2. 129
Rysunek 58. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THCA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 129
Rysunek 59. Krzywa kalibracyjna CBCA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 130
Rysunek 60. Krzywa kalibracyjna Δ^9-THCP dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 130
Rysunek 61. Krzywa kalibracyjna CBLA dla detekcji CAD; zależność pola powierzchni piku od stężenia analitu opisana modelem kwadratowym z ważeniem 1/x. 130
Rysunek 62. Przykładowy chromatogram próbki olejowej CBD - Pure Oil 30% uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 195
Rysunek 63. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego CBD Pure Oil 30% zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 196
Rysunek 64. Przykładowy chromatogram próbki olejowej Kom uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 196
Rysunek 65. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego Kombinat Konopny Olej CBD Forte zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 197
Rysunek 66. Przykładowy chromatogram próbki olejowej Polski Olej Konopny CD 30% uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 197
Rysunek 67. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego Polski Olej Konopny CD 30% zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 198

Rysunek 68. Przykładowy chromatogram próbki olejowej Satiwell CBD 10% uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 198
Rysunek 69. Przykładowy chromatogram próbki suszu lub materiału roślinnego Satiwell 10% zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 199
Rysunek 70. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Amnesia uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 199
Rysunek 71. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Amnesia zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 200
Rysunek 72. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego CBD White Widow Hemp flower uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 200
Rysunek 73. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego CBD White Widow Hemp flower zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 201
Rysunek 74. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Orange Bud uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 201
Rysunek 75. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego Orange Bud zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 202
Rysunek 76. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego próba od rolnika uzyskany z zastosowaniem detekcji CORONA CAD. 202
Rysunek 77. Przykładowy chromatogram próbki suszu konopnego próba od rolnika zarejestrowany przy długości fali 278 nm z zastosowaniem detekcji UV-VIS/DAD. 203

14. Literatura

[1] Vergne M.J., Reynolds L., Brown A., Pullias G., Froemming A. „A Review on the Impact of Cannabis in Society and the Analytical Methodologies for Cannabinoids". Psychoactives, 2023, 2(1), 37-51.
DOI: https://doi.org/10.3390/psychoactives2010003
[2] Vrdoljak G. et al. „The analytical landscape of cannabis comiance testing." J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2021. DOI:
https://doi.org/10.1080/10826076.2021.1996390
[3] Antunes M., Barroso M., Gallardo E. „Analysis of Cannabinoids in Biological Specimens: An Update". International Journal of Environmental Research and Public Health, 2023, 20(3), 2312.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijerph20032312
[4] Thomas B., Pollard G.T. „Preparation and Distribution of Cannabis and Cannabis-Derived Dosage Formulations for Investigational and Therapeutic Use in the United States." Front. Pharmacol., 2016, 7, 285.
DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00285
[5] MacCallum C.A., Lo L.A., Pistawka C.A., Boivin M. „A Clinical Framework for Evaluating Cannabis Product Quality and Safety". Cannabis and Cannabinoid Research, 2023, 8(3), 567-574. DOI:
DOI: https://doi.org/10.1089/can.2021.0137
[6] Bell A.D., MacCallum C. et al. „Clinical Practice Guidelines for Cannabis and Cannabinoid-Based Medicines in the Management of Chronic Pain and Co-Occurring Conditions." Cannabis Cannabinoid Res., 2024, 9(2), 669-687.
DOI: https://doi.org/10.1089/can.2021.0156
[7] Pourseyed Lazarjani M., Torres S., Hooker T., Fowlie C., Young O., Seyfoddin A. „Methods for Quantification of Cannabinoids: A Narrative Review". Journal of Cannabis Research, 2020, 2, 35.
DOI: https://doi.org/10.1186/s42238-020-00040-2
[8] Welling M.T., Liu L., Hazekamp A., Dowell A., King G.J. „Developing Robust Standardised Analytical Procedures for Cannabinoid Quantification: Laying the Foundations for an Emerging Cannabis-Based Pharmaceutical Industry". Medical Cannabis and Cannabinoids, 2019, 2(1), 1-13.
DOI: https://doi.org/10.1159/000496868
[9] Gjoshe Stefkov. et al. „Analytical Techniques for Phytocannabinoid Profiling of Cannabis and Cannabis-Based Products—A Comprehensive Review." Molecules, 2022, 27(3), 975.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules27030975
[10] Bertelli D. et al. „New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in Cannabis sativa L. (hemp)." Molecules, 2018, 23(10), 2639.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules23102639
[11] Masek A., Tutek K. „Hemp and Its Derivatives as a Universal Industrial Raw Material (with Particular Emphasis on the Polymer Industry)—A Review." Materials,

2022, 15(7), 2565.
DOI: https://doi.org/10.3390/ma15072565
[12] Dubrow G.A., Pawar R.S., Srigley C., Fong Sam J., Talavera C., Parker C.H., Noonan G.O. „A Survey of Cannabinoids and Toxic Elements in Hemp-Derived Products from the United States Marketplace". Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 97, 103800.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103800
[13] McCorkle A. et al. „The impact of extraction protocol on the chemical profile of cannabis extracts from a single cultivar." Sci. Rep., 2021.
DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-021-01378-0
[14] Hsu Y. et al. „Determination of cannabinoids in hemp oil based cosmetic products by LC-tandem MS." J. Food Drug Anal., 2021, 29(3).
DOI: https://doi.org/10.38212/2224-6614.3370
[15] Kanabus J., Bryła M., Roszko M. „The Development, Validation, and Application of a UHPLC-HESI-MS Method for the Determination of 17 Cannabinoids in Cannabis sativa L. var. sativa Plant Material." Molecules, 2023, 28(24), 8008.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules28248008
[16] Ioannou K.A. et al. „Extraction and analysis of cannabinoids: A decade of progress, challenges and future directions." J. Chromatogr. A, 2025.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.466321
[17] Vella Szijj J. „Challenges of Extracting and Determining Cannabinoids in Different Matrices." Cannabis Cannabinoid Res., 2024. DOI: https://doi.org/10.1089/can.2024.0087
[18] Vágnerová M. et al. „Challenges of cannabidiol determination in emulsified cosmetics and application of solid-phase extraction followed by HPLC-UV-MS/MS." Anal. Bioanal. Chem., 2025.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00216-024-05716-9
[19] Estevam D.C.D. et al. „Optimized Extraction Method for Neutral Cannabinoids Quantification Using UHPLC-HRMS/MS." Biomolecules, 2025, 15(2), 246.
DOI: https://doi.org/10.3390/biom15020246
[20] Deidda R. et al. „The Analysis of Cannabinoids in Cannabis Samples by Supercritical Fluid Chromatography and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography: A Comparison Study". Analytical Science Advances, 2021, 2(1-2), 2-14. DOI: https://doi.org/10.1002/ansa.202000091
[21] Mudge E.M., Murch S.J., Brown P.N. „Leaner and Greener Analysis of Cannabinoids". Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409, 3153-3163.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00216-017-0256-3
[22] Porada R. et al. „Simultaneous determination of eight cannabinoids in hemp-based dietary supplements via an optimized SE-HPLC-PDA workflow integrating chemometric evaluation." Anal. Methods, 2026.
DOI: https://doi.org/10.1039/d6ay00387g
[23] Schilling K., Holzgrabe U. „Recent applications of the Charged Aerosol Detector for liquid chromatography in drug quality control." J. Chromatogr. A, 2020.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460911
[24] Fibigr J., Šatínský D., Solich P. „A UHPLC method for the rapid separation and quantification of phytosterols using tandem UV/Charged aerosol detection - A comparison of both detection techniques." J. Pharm. Biomed. Anal., 2017.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.057
[25] Grüne L., Bunjes H. „Solubility of Poorly Soluble Drugs in Phosphatidylcholine-Based Drug Delivery Systems: Comparison of the Loading Capacity in the Bulk Formulation and Its Dispersed State". Pharmaceuticals, 2024, 17(3), 400.
DOI: https://doi.org/10.3390/ph17030400
[26] Weber F., Rahnfeld L., Luciani P. „Analytical profiling and stability evaluation of liposomal drug delivery systems: A rapid UHPLC-CAD-based approach for phospholipids in research and quality control." Talanta, 2020.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121320
[27] Ma K. et al. „Determining High-Intensity Sweeteners in White Spirits Using an Ultrahigh Performance Liquid Chromatograph with a Photo-Diode Array Detector and Charged Aerosol Detector." Molecules, 2019, 25(1), 40.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules25010040
[28] Feng S.-Y. et al. „Direct Corona Charging: A New Strategy for Enhancing Sensitivity and Stability in Charged Aerosol Detection." Anal. Chem., 2025.
DOI: https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c05557
[29] Mandrioli M. et al. „Fast Detection of 10 Cannabinoids by RP-HPLC-UV Method in Cannabis sativa L." Molecules, 2019, 24(11), 2113.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules24112113
[30] Rambu D. et al. „Very Fast RP-UHPLC-PDA Method for Identification and Quantification of the Cannabinoids from Hemp Oil." Appl. Sci., 2021, 11(20), 9414.
DOI: https://doi.org/10.3390/app11209414
[31] Oprita Cioara C.M. et al. „Determination of Opium Alkaloids from Poppy Seeds and Cannabinoids from Hemp Seeds by LC MS/MS." Ann. Acad. Roman. Sci. Ser. Biol. Sci., 2026.
DOI: https://doi.org/10.56082/annalsarscibio.2026.1.51
[32] Ovat D.Y. et al. „Impact of CBD and hemp oil use on drug test results: a systematic review." Int. J. Legal Med., 2026.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00414-026-03790-5
[33] Park E.-S. et al. „A Metabolomics and Big Data Approach to Cannabis Authenticity (Authentomics)." Int. J. Mol. Sci., 2023, 24(9), 8202.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijms24098202
[34] Baird G.L. et al. „Peer-review Blinded Assay Test (P-BAT): a framework for trustless laboratory quality assurance for state-regulated cannabis markets." J. Cannabis Res., 2025.
DOI: https://doi.org/10.1186/s42238-025-00261-3
[35] Duczmal D, Bazan-Woźniak A.,. et al. „Cannabinoids—Multifunctional Compounds, Applications and Challenges—Mini Review." Molecules, 2024, 29(20), 4923.

DOI: https://doi.org/10.3390/molecules29204923
[36] Caprioglio D. et al. „Minor Phytocannabinoids: A Misleading Name but a Promising Opportunity for Biomedical Research." Biomolecules, 2022, 12(8), 1084.
DOI: https://doi.org/10.3390/biom12081084
[37] Pricopie A.I. et al. „Phytocannabinoids: Exploring Pharmacological Profiles and Their Impact on Therapeutical Use." Int. J. Mol. Sci., 2024, 25(8), 4204.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijms25084204
[38] Jurga A. et al. „Cannabis-Based Phytocannabinoids: Overview, Mechanism of Action, Therapeutic Application, Production, and Affecting Environmental Factors." Int. J. Mol. Sci., 2024, 25(20), 11258.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijms252011258
[39] Minassi A. et al. „Cannabinol: History, Syntheses, and Biological Profile of the Greatest 'Minor' Cannabinoid." Plants, 2022, 11(21), 2896.
DOI: https://doi.org/10.3390/plants11212896
[40] McKinney A.E. et al. „Minor Cannabinoids: Biosynthesis, Molecular Pharmacology and Potential Therapeutic Uses." Front. Pharmacol., 2021, 12, 777804.
DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2021.777804
[41] Blatt-Janmaat K.L., Qu Y. „The Biochemistry of Phytocannabinoids and Metabolic Engineering of Their Production in Heterologous Systems." Int. J. Mol. Sci., 2021, 22(5), 2454.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijms22052454
[42] Mishra A.K. et al. „Biosynthesis of Phytocannabinoids and Structural Insights: A Review." Metabolites, 2023, 13(3), 442.
DOI: https://doi.org/10.3390/metabo13030442
[43] Shahbazi F. et al. „The biosynthesis of the cannabinoids." J. Cannabis Res., 2021, 3, 7.
DOI: https://doi.org/10.1186/s42238-021-00062-4
[44] Kim A.L. et al. „Profiling Cannabinoid Contents and Expression Levels of Corresponding Biosynthetic Genes in Commercial Cannabis (Cannabis sativa L.) Cultivars." Plants, 2022, 11(22), 3088.
DOI: https://doi.org/10.3390/plants11223088
[45] Moschella A. et al. „Analysis of Sequence Variability and Transcriptional Profile of Cannabinoid Synthase Genes in Cannabis sativa L. Chemotypes with a Focus on Cannabichromenic Acid Synthase." Plants, 2021, 10(9), 1857.
DOI: https://doi.org/10.3390/plants10091857
[46] Filer C.N. „Acidic Cannabinoid Decarboxylation." Cannabis Cannabinoid Res., 2022, 7(4), 466-470.
DOI: https://doi.org/10.1089/can.2021.0072
[47] Wang M. et al. „Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry." Cannabis Cannabinoid Res., 2016, 1(1), 262-271.

DOI: https://doi.org/10.1089/can.2016.0020
[48] Ryu B. et al. „Conversion Characteristics of Some Major Cannabinoids from Hemp (Cannabis sativa L.) Raw Materials by New Rapid Simultaneous Analysis Method." Molecules, 2021, 26(14), 4113.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules26144113
[49] Kinney C.A. et al. „Thermo-chemical conversion kinetics of cannabinoid acids in hemp (Cannabis sativa L.) using pressurized liquid extraction." J. Cannabis Res., 2024, 6, 33.
DOI: https://doi.org/10.1186/s42238-024-00243-x
[50] Sgrò S. et al. „Delta9-THC determination by the EU official method: evaluation of measurement uncertainty and compliance assessment of hemp samples." Anal. Bioanal. Chem., 2021, 413(13), 3399-3410.
DOI: https://doi.org/10.1007/s00216-021-03283-x
[51] Franzin M. et al. „Incomplete Decarboxylation of Acidic Cannabinoids in GC-MS Leads to Underestimation of the Total Cannabinoid Content in Cannabis Oils Without Derivatization." Pharmaceutics, 2025, 17(3), 334.
DOI: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17030334
[52] Seo C. et al. „Chemical transformation of cannabidiol into psychotropic cannabinoids under acidic reaction conditions: Identification of transformed products by GC-MS." J. Food Drug Anal., 2023, 31(1), 129-142.
DOI: https://doi.org/10.38212/2224-6614.3452
[53] Jaidee W, Siridechakorn I. et al. „Kinetics of CBD, Δ9-THC Degradation and Cannabinol Formation in Cannabis Resin at Various Temperature and pH Conditions." Cannabis Cannabinoid Res., 2022, 7(4), 470-479.
DOI: https://doi.org/10.1089/can.2021.0004
[54] Bachari A. et al. „The Transdermal Delivery of Therapeutic Cannabinoids." Pharmaceutics, 2022, 14(2), 438.
DOI: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020438
[55] Khetan R. et al. „Optimising Cannabidiol Delivery: Improving Water Solubility and Permeability Through Phospholipid Complexation." Int. J. Mol. Sci., 2025, 26(6), 2647.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijms26062647
[56] Sýkora D. et al. „Stability Study of Cannabidiol in the Form of Solid Powder and Sunflower Oil Solution." Pharmaceutics, 2021, 13(3), 412.
DOI: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030412
[57] Pierzgalski A. et al. „Cannabinoids—Characteristics and Potential for Use in Food Production." Molecules, 2021, 26(21), 6723.
DOI: https://doi.org/10.3390/molecules26216723
[58] Stella N. „THC and CBD: Similarities and differences between siblings." Neuron, 2023, 111(3), 302-327.
DOI: https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.022
[59] Rozporządzenie Komisji (UE) 2023/915 z dnia 25 kwietnia 2023 r. w sprawie najwyższych dopuszczalnych poziomów niektórych zanieczyszczeń w żywności oraz

uchylające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006, Dz.U. UE L 119 z 5.05.2023, s. 103-157, CELEX: 32023R0915,EUR-Lex, https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/?uri=CELEX:32023R0915

15. Dorobek naukowy

Publikacje:

Współautor publikacji:

- Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R. Cannabinoids—Multifunctional Compounds, Applications and Challenges—Mini Review. *Molecules* 2024, *29*, 4923. https://doi.org/10.3390/molecules29204923

Wystąpienia konferencyjne krajowe i międzynarodowe opublikowane w postaci streszczenia w materiałach konferencyjnych:

1) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
   Zawartość kannabinoidów w wybranych olejkach konopnych dostępnych na rynku.
   BioOrg 2022. IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów. Poznań, 3 grudnia 2022; prezentacja wyników, plakat
2) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
   Charakterystyka ekstraktów otrzymanych z suszów konopi włóknistej.
   Zjazd zimowy SMPTChem 2022; prezentacja wyników, plakat
3) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
   The content of cannabinoids in selected hemp oils available on the market
   9th Polish-Kazakh Meeting: Relationship Between Chemistry and Biology. 27.06.2023; on-line - wystąpienie ustne
4) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
   Różnice zawartości kanabinoidów w wybranych olejkach dostępnych na rynku Polskim.
   II Ogólnopolska Konferencja Bioaktywne Związki Pochodzenia Naturalnego. 10.10.2023; prezentacja wyników, plakat
5) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
   Zróżnicowanie Poziomów Kannabinoidów w Wyselekcjonowanych Olejkach Konopnych dostępnych w Polsce.
   Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia. 23-24.10.2023; prezentacja wyników, plakat

6) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Porównawcza Analiza Zawartości Kannabinoidów w Wybranych Olejkach Konopnych na Polskim Rynku.
Bio Idea 4.0. Ogólnopolska *Konferencja Doktorantów Nauk Ścisłych I Przyrodniczych* 03.02.2024; prezentacja wyników, plakat

7) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Kannabinoidy w Kosmetykach: Potencjał i Wyzwania.
Ogólnopolska Konferencja Naukowa. Zrównoważony rozwój w obszarze kosmetyków i detergentów. 12.04.2024; prezentacja wyników, plakat

8) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Reasons to choose a corona CAD detector for research.
6th Symposium on Biotransformations for Pharmaceutical and Cosmetic Industry. 17-21.06.2024; prezentacja wyników, plakat

9) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Expanding the Scope of HPLC: The Role of Charged Aerosol Detectors in Quantitative Analysis of Non-Volatile and Semi-Volatile Compounds
10th Polish-Kazakh Meeting: Relationship Between Chemistry and Biology. 26.06.2024, on-line - wystąpienie ustne

10) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Zastosowanie konopi w wyrobach kosmetycznych i spożywczych.
II Ogólnopolska Konferencja Naukowa. Naturalne surowce lecznicze i kosmetyczne. 18-19.03.2025 prezentacja wyników, plakat

11) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Porównanie skuteczności detektorów CAD i DAD w oznaczeniach kannabinoidów metodą HPLC - analiza parametrów liniowości, precyzji i dokładności.
Na Pograniczu Chemii, Biologii i Farmacji. 15-18.06.2025, prezentacja wyników, plakat

12) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Development and Validation of a UHPLC Analytical Method for the Determination of Cannabinoids in Plant and Oil Matrices Using UV-DAD and Corona CAD Detectors
I Konferencja „Forum doktoranckie" w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych UAM. 25.06.2025, prezentacja wyników, abstrakt plus wystąpienie ustne

13) Duczmal, D.; Bazan-Wozniak, A.; Niedzielska, K.; Pietrzak, R.
Profilowanie głównych i pomniejszych kannabinoidów, w tym ich form kwasowych, w matrycach konopnych metodą UHPLC-CAD: opracowanie i walidacja metody.

Na Pograniczu Chemii, Biologii i Farmacji. 31.05-03.06.2026, prezentacja wyników, abstrakt plus wystąpienie ustne

Nagrody i wyróżnienia:

II Ogólnopolska Konferencja „Bioaktywne związki pochodzenia naturalnego”, zajęcie III miejsca za prezentację posterową.


Bioaktywne związki pochodzenia naturalnego
9-10.10.2023 Trzebnica

PTTŻ
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

II Ogólnopolska Konferencja
„Bioaktywne związki pochodzenia naturalnego”

DYPLOM

za zajęcie III miejsca za prezentację posterową
dla

Mgr. Dominika Duczmala

Przewodnicząca
Komitetu Organizacyjnego
Dr hab. inż.
Anna Chojnacka, prof. UPWr

Prezes Oddziału Wrocławskiego PTTŻ
Dr inż. Anna Kancelista

9-10.10.2023 Trzebnica

Załącznik 1. Dyplom za zajęcie III miejsca za prezentację posterową.

INSTYTUT WŁÓKIEN NATURALNYCH I ROŚLIN ZIELARSKICH
Państwowy Instytut Badawczy

ul. Wojska Polskiego 71 B, 60-630 Poznań, Polska KRS 0000321899 NIP 7811830940 REGON 301027411
+48 61 845 58 00 sekretariat@iwnirz.pl +48 61 841 78 30 www.iwnirz.pl www.sklep.iwnirz.pl

Poznań, dnia 25 września 2026 r.

Polygen sp. z o.o.
ul. Portowa 16L
44-102 Gliwice

LIST INTENCYJNY

Szanowni Państwo,

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu wyraża zainteresowanie kontynuacją współpracy z firmą Polygen sp. z o.o. w zakresie rozwoju i wdrażania nowoczesnych metod analitycznych.

Istotnym elementem planowanej współpracy jest wdrożenie, do końca 2026 roku, metody oznaczania kannabinoidów opracowanej w ramach doktoratu wdrożeniowego realizowanego na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu we współpracy z firmą Polygen sp. z o.o.

Metoda wykorzystuje chromatografię cieczową UHPLC oraz dwa uzupełniające się warianty detekcji: DAD i CAD. Zastosowanie detektora DAD umożliwia rejestrację widm UV-Vis i wspiera identyfikację oznaczanych związków, natomiast detektor CAD zapewnia komplementarną odpowiedź dla związków nielotnych i rozszerza możliwości oceny próbek. Wykorzystanie obu detektorów pozwoli zwiększyć zakres informacji uzyskiwanych podczas analizy oraz wzmocnić wiarygodność interpretacji wyników.

Planowane wdrożenie będzie praktycznym wykorzystaniem rezultatów doktoratu wdrożeniowego. Pozwoli przenieść opracowane rozwiązanie z etapu badań do rutynowej pracy laboratoryjnej Instytutu oraz rozwinąć możliwości analizy surowców i produktów otrzymywanych z konopi.

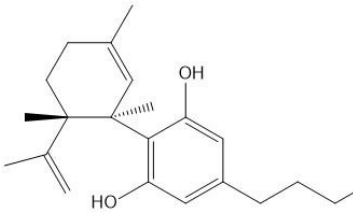
Współpraca będzie obejmowała transfer metody na aparaturę Instytutu, wykonanie badań potwierdzających jej prawidłowe działanie, przygotowanie zespołu analitycznego oraz opracowanie niezbędnej dokumentacji wdrożeniowej.

Instytut deklaruje gotowość do dalszych uzgodnień organizacyjnych i technicznych z firmą Polygen sp. z o.o. w celu skutecznej realizacji planowanego wdrożenia.

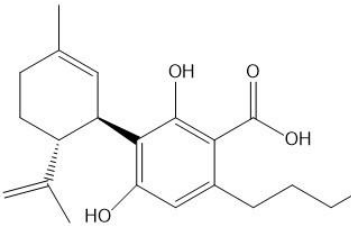
Z poważaniem,
INSTYTUT WŁÓKIEN NATURALNYCH
I ROŚLIN ZIELARSKICH
Państwowy Instytut Badawczy
dr Katarzyna Wielgusa
Dyrektor / osoba upoważniona
IWNiRZ – PIB

INSTYTUT WŁÓKIEN NATURALNYCH
I ROŚLIN ZIELARSKICH
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Wojska Polskiego 71 B
60-630 POZNAŃ
tel. (61) 845-58-00, fax (61) 841-78-
NIP 7811830940 REGON 30102
Pieczęć i podpis

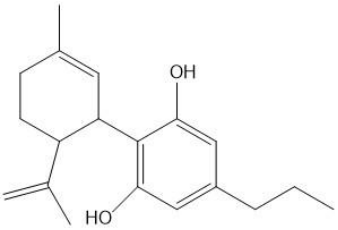
Załącznik 2. List intencyjny Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich – Państwowego Instytutu Badawczego dotyczący planowanego wdrożenia metody oznaczania kannabinoidów opracowanej w ramach doktoratu wdrożeniowego.



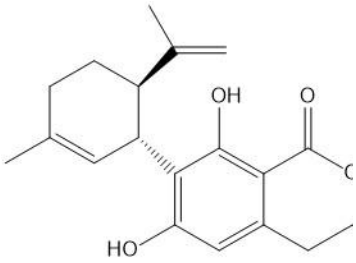
Kannabidiol (CBD)



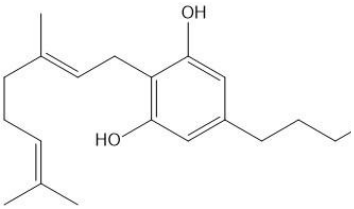
Kwas kannabidiolowy (CBDA)



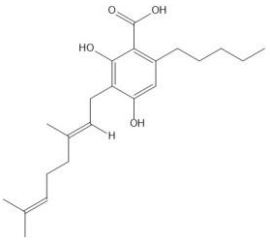
Kannabidiwaryna (CBDV)



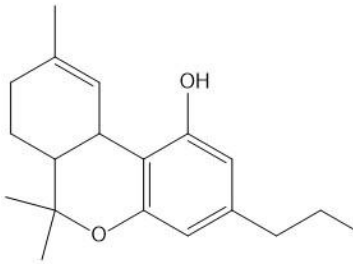
Kwas kannabidiwarynowy (CBDVA)



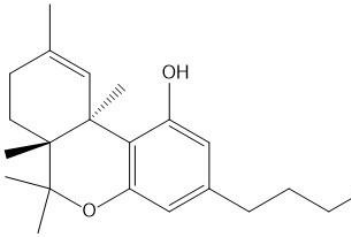
Kannabigerol (CBG)



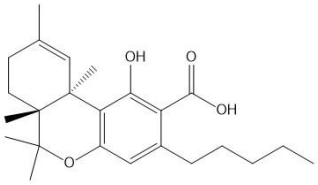
Kwas kannabigerolowy (CBGA)



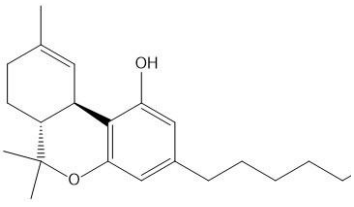
Tetrahydrokannabiwaryna (THCV)



Δ⁹-Tetrahydrokannabinol (Δ⁹-THC)

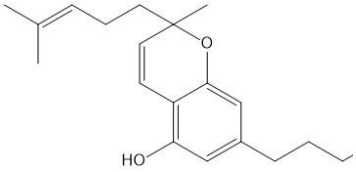


Kwas Δ⁹-tetrahydrokannabinolowy (Δ⁹-THCA)

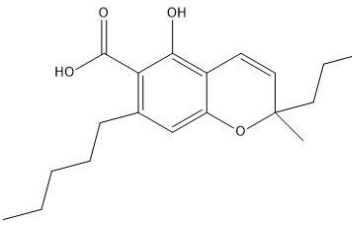


Δ⁹-Tetrahydrokannabiforol (Δ⁹-THCP)

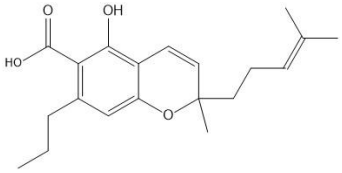
Załącznik 3. Struktury chemiczne kannabinoidów objętych zakresem badań



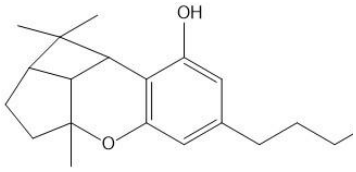
Kannabichromen (CBC)



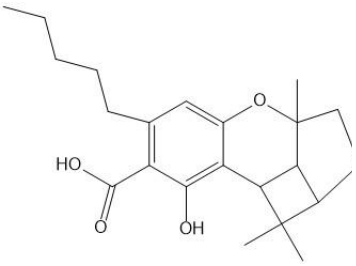
Kwas kannabichromenowy (CBCA)



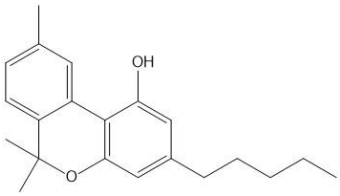
Kwas kannabichromowarynowy (CBCVA)



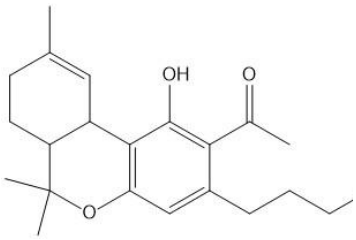
Kannabicyklol (CBL)



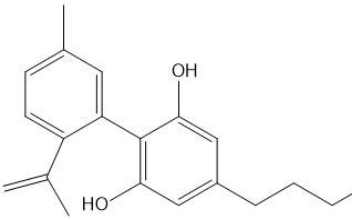
Kwas kannabicyklolowy (CBLA)



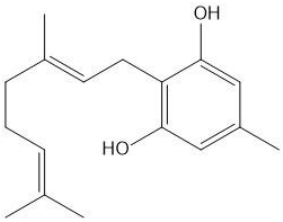
Kannabinol (CBN)



Kwas kannabinolowy (CBNA)



Kannabinodiol (CBND)



Kannabigerocin (CBGO)

Załącznik 4. Struktury chemiczne kannabinoidów objętych zakresem badań.