VVVZ VĚDECKÝ VÝBOR VÝŽIVY ZVÍŘAT

VĚDECKÝ VÝBOR VÝŽIVY ZVÍŘAT

Vývoj a aplikace chromatografických metod pro stanovení širokého spektra kanabinoidů a cholesterolu v různých vzorcích biologického původu

Ing. Tomáš Taubner, Ph.D.

prof. Ing. Věra Skřivanová, CSc.

Praha, říjen 2025

VÚŽV

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.

ISBN 978-80-7403-342-1

Anotace

Cílem studie bylo vyvinout a popsat analytickou metodu plynové chromatografie spojenou s hmotností spektrometrií (GC-MS) a metodu kapalinové chromatografie s detekcí ve fotodiodovém poli (HPLC-DAD) pro přímé stanovení nederivatizovaných neutrálních kanabinoidů (CBDs-N), kanabinoidů ve formě kyselin (CBDs-A) a cholesterolu (Chol). Důraz byl kladen také na srovnání metody GC-MS s metodou HPLC-DAD. Byla vyvinuta metoda pro současné stanovení 16 fyziologicky významných kanabinoidů (CBDs) pomocí HPLC-DAD a 17 CBDs pomocí GC-MS a volného Chol pomocí obou metod ve vzorcích rostlinného a živočišného původu. Postup přípravy pro analýzu CBDs v rostlinných vzorcích zahrnoval dvě extrakce methanolem a dvě extrakce n-hexanem. Postup stanovení ve vzorcích živočišného původu (homogenizované zvířecí tkáně, vaječný žloutek slepic a výkaly), kde byl analyzován Chol společně s CBDs, sestával ze čtyř n-hexanových extrakcí. Methanol a n-hexan se ukázaly jako vhodná rozpouštědla pro extrakci CBDs a n-hexan pro analýzu Chol vyskytujících se v testovaných biologických vzorcích v širokém koncentračním rozmezí. Široká škála vzorků různého původu byla analyzována pomocí HPLC-DAD s gradientovou elucí acetonitrilem s kyselinou mravenčí, vodou s kyselinou mravenčí a methanolem. Tato metoda umožnila selektivní, přesnou a citlivou kvantifikaci CBDs a Chol ve standardních vzorcích a ve vzorcích rostlin a zvířat. Citlivá a selektivní kvantifikace CBDs je důležitá, zejména v potravinářských výrobcích, protože přesné sledování psychotropních forem CBDs je obzvláště důležité. Kombinace dlouhého teplotního programu a postupného teplotního nárůstu byla použita u metody GC-MS, aby se předešlo problémům vyplývajícím z překrývání píků mezi CBDs a Chol. CBDs-A prošly dekarboxylací na CBDs-N během analýzy GC-MS a tedy přímým nástřikem byl odezvou sumární pík pro obě formy CBDs-N a CBDs-A. Extrakcí pomocí NaOH byly odstraněny CBDs-A formy a bylo možné analyzovat pouze CBDs-N původně přítomných ve vzorku. V extrahovaných vzorcích nebyly pozorovány žádné ztráty CBDs-N roztokem NaOH. GC-MS analýzy vzorků před a po extrakci roztokem NaOH umožnily kvantifikaci CBDs-A a CBDs-N. Použití metody C18 HPLC-DAD umožnilo simultánní stanovení CBDs-N a CBDs-A. Ve srovnání s metodou C18 HPLC-DAD, technika GC-MS nabídla vyšší

citlivost, přesnost, specificitu a dostatečnou separaci nederivatizovaných CBDs a Chol z biologických materiálů endogenního původu, zejména u vzorků konopí a slepičího vaječného žloutku. Nevýhodou použité GC-MS metody je pak vyšší časová naročnost. Vědeckou novinkou této studie je aplikace metody GC-MS pro kvantifikaci nederivatizovaných forem CBDs-A, CBDs-N a Chol a využití HPLC-DAD pro široké spektrum vzorků rostlinného a živočišného původu.

Obsah

Anotace 3
Obsah 5
1. Úvod 6
1.1. Konopí seté 6
1.2. Chemické složení konopí 7
1.3. Kanabinoidy 7
1.4. Konopí e výživě zvířat 8
1.5. Přehled analytických metod pro stanovení kanabinoidů 10
1.6. Konopí, kanabinoidy a vliv na obsah cholesterolu 11
2. Vývoj chromatografických metod pro stanovení kanabinoidů 12
2.1. Použité standardy a chemikálie 13
2.2. Analytická metoda GC-MS 13
2.2.1. Použité GC-MS zařízení 14
2.2.2. Teplotní gradient 14
2.2.3 Charakteristiky GC-MS analytické metody 15
2.2.4. Analýza standardů a vzorků pomocí GC-MS 16
2.3. Analytická metoda HPLC-DAD 23
2.3.1. Použité HPLC-DAD zařízení 23
2.3.2. Program gradientové eluce 23
2.3.3. Charakteristiky HPLC-DAD analytické metody 24
2.3.4. Analýza standardů a vzorků pomocí HPLC-DAD 28
2.4. Příprava vzorků pro GC-MS a HPLC-DAD analytické metody 28
3. Metoda C18-HPLC-DAD pro analýzu kanabinoidů a cholesterolu ve vzorcích různého původu 30
3.1. Popis analyzovaných vzorků 30
3.2. Validace HPLC-DAD metody pro různé biologické materiály 30
Závěr 38
Poděkování 39
Literatura 39

1. Úvod

Kanabinoidy (CBDs) nebo jejich deriváty jsou látky přirozeně se vyskytující v různých rostlinných materiálech, v nejvyšší koncentraci jsou však obsaženy v rostlinách konopí. Předkládaná studie se zaměřuje na popis významných látek vyskytujících se v konopí se specifickým zaměřením na CBDs. Jelikož se v dnešní době využívají různé části rostliny konopí ve výživě lidí a zvířat, je důležité sledovat obsah CBDs, jak z pohledu jejich legislativního omezení (psychotropní formy např. Δ^9-tetrahydrokanabinol), tak např. z marketingového pohledu (deklarované množství látek a možné klamání spotřebitele) nebo čistě pro určení koncentrace látek z hlediska jejich biologické aktivity a vlivu na zdraví. Chromatografické metody patří v dnešní době mezi nejvíce využívané laboratorní techniky, zejména díky jejich citlivosti, přesnosti, dostupnosti a jejich využití při analýze CBDs je více než vhodné. Pokud se zahrnou komponenty z rostlin konopí do výživy zvířat, je důležité mít laboratorní metodu pro sledování koncentrace jednotlivých fyziologicky nejvýznamnějších CBDs v různých vzorcích rostlinného původu (komponenty krmných směsí nebo krmné směsi) a živočišného původu (maso, ostatní biologická tkáň, žloutek) nebo sledovat retenci těchto látek v organismu analýzou CBDs ve výkalech.

1.1. Konopí seté

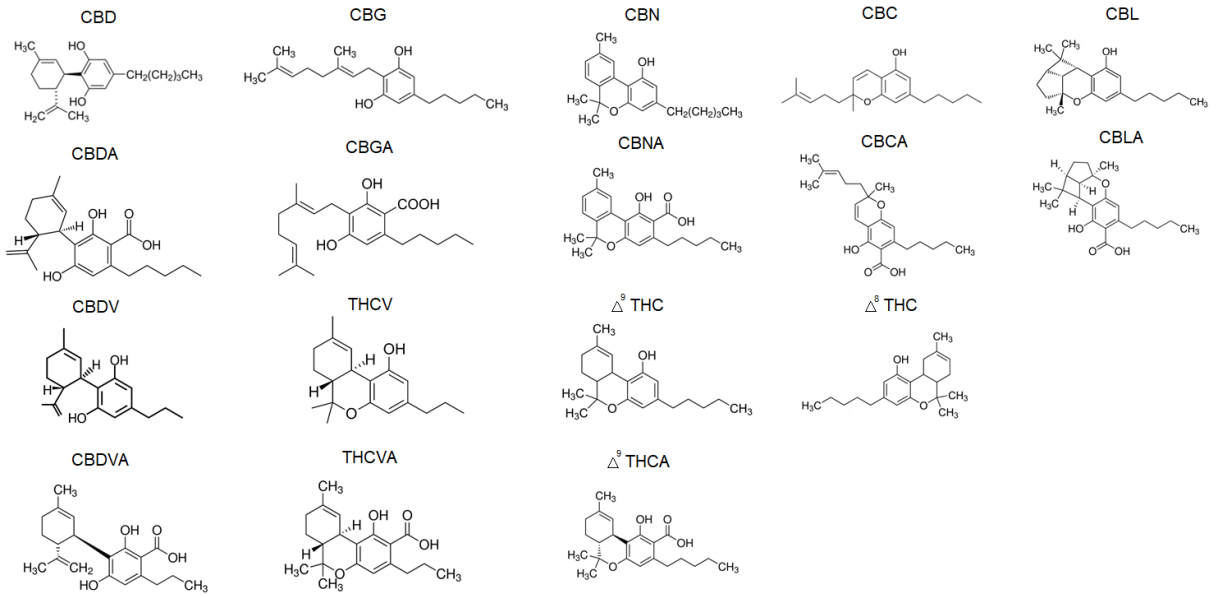
Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je rostlina s širokým spektrem využití. Z pohledu výživy je zdrojem významných látek. Je pěstována zejména pro průmyslové nebo lékařské použití (Farinon et al., 2020). Od 1.1.2022 vstoupil v účinnost zákon č. 366/2021 Sb., který novelizuje především zákon č. 167/1998 Sb. Došlo zde k navýšení povolené výše obsahu tetrahydrokanabinolu (THC) z 0,3 % na 1 %. Extrakt a tinktura konopí obsahující méně než 1 % THC se za návykovou látku nepovažují. Technické konopí je rostlinou s velkým potenciálem nabízející řešení různých environmentálních problémů od čištění půdy, vody a vzduchu přes potravinářské, chemické, farmaceutické a energetické využití. Průmyslové využití lze dále rozdělit v závislosti na zpracovávané části rostliny (Visković et al., 2023).

1.2. Chemické složení konopí

Chemické složení konopí závisí na mnoha faktorech (odrůda, podmínky pěstování, výskyt chorob rostliny atd.), ale obecně Ji et al. (2021) popsali, že složení rostliny je 32–51 % celulózy, 11–17 % hemicelulóza, 15–29 % lignin, 2,6–7,6 % minerální látky, 4–20 % extrahovatelné látky a 0,3–23,1 % ostatní látky. Konopná semínka obsahují 27–36 % vlákniny, 25–35 % tuku (významné množství kyseliny linolové a dalších mastných kyselin, jako je kyselina α-linolová, kyselina olejová, kyselina palmitová a γ-linolenová kyselina), a 21–28 % bílkovin (Alonso-Esteban et al., 2021). V rostlinách konopí se vyskytuje více než 500 různých sloučenin s potenciální biologickou aktivitou, včetně terpenoidů, kanabinoidů, uhlovodíků, glykosidických sloučeniny, dusíkatých sloučeniny, nekanabinoidních fenolů, mastných kyselin, aminokyselin, jednoduchých ketonů, jednoduchých esterů a laktonů, jednoduchých aldehydů, proteinů, glykoproteinů, enzymů, steroidů, stopových prvků, jednoduchých alkoholů, pigmentů a vitamínu K (Cerino et al., 2022; Atalay et al., 2020).

1.3. Kanabinoidy

CBDs patří do zdánlivě jednoduché třídy terpenofenolických sekundárních metabolitů izolovaných zejména z rostliny *Cannabis sativa* L. (Bow a Rimoldi, 2016). Po několik desetiletí vědci identifikovali více než 144 typů CBDs v rostlině konopí (Pen a Shahidi, 2021; Rock a Parker, 2021; Cardenia et al., 2018). CBDs jsou skupinou látek s charakteristickou C21 terpenofenolickou strukturou. CBDs lze dále rozdělit do 11 podtříd, jmenovitě kanabichromen, kanabidiol, kanabielsoin, kanabigerol, kanabicyklol, kanabinol, kanabinodiol, kanabitriol, (-)-Δ^8-trans-tetrahydrokanabinol, (-)-Δ^9-trans-tetrahydrokanabinol a kanabinoidy různého typu (Radwan et al., 2021). CBDs se dělí na dvě chemické formy: CBDs ve formě kyselin (CBDs-A) a neutrální CBDs (CBDs-N) (Pourseyed Lazarjani et al., 2020).



Obr.1 Přehled nejvýznamnějších kanabinoidů v jejich neutrální formě a jejich analogů ve formě kyselin analyzovaných v této práci (CBD-kanabidiol, CBG-kanabigerol, CBN-kanabinol, CBC-kanabichromen, CBL-kanabicyklol, CBDA-kanabidiolová kyselina, CBGA-kanabigerolová kyselina, CBNA-kanabinolová kyselina, CBCA-Kanabichromenová kyselina, CBLA-kanabicyklolová kyselina, CBDV-kanabidivarin, THCV-tetrahydrokanabivarin, Δ^9-THC-Δ^9-tetrahydrokanabinol, Δ^8-THC-Δ^8-tetrahydrokanabinol, CBDVA-tetrahydrokanabidivarinová kyselna, THCV-tetrahydrokanabivarinová kyselina, Δ^9-THCA-Δ^9-tetrahydrokanabinolová kyselina)

1.4. Konopí ve výživě zvířat

CBDs jsou lipofilní látky nacházející se ve vysokých koncentracích v konopí a jejich přenos do tukových tkání nebo např. do vaječného žloutku je reálný. Tukové tkáně lze považovat za cílové po expozici Δ^9-tetrahydrokanabinolu (Δ^9-THC) v dietě. Konopné semeno a vedlejší produkty z konopí jsou díky převládajícím benefitům široce a úspěšně využívány ve výživě zvířat. Výživa drůbeže s využitím konopného semínka má příznivé účinky na produkci vajec (Gakhar et al., 2012), pozitivní vliv na obsah polynenasycených mastných kyselin (PUFA) (Neijat et al., 2016) a složení mastných kyselin (Jurgoński et al., 2020; Skřivan et al., 2020), snižuje hladinu cholesterolu (Skřivan et al., 2019) a má pozitivní vliv na aktivitu enzymů v trávicím traktu v

kombinaci s lepší stravitelností a užitkovostí (Taubner et al., 2023; Skřivan et al., 2020). Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) zveřejnil vědecké stanovisko k bezpečnosti konopných krmných surovin používaných jako krmivo pro zvířata (jako jsou konopná semena, konopná moučka/koláč, olej z konopných semen a celá rostlina konopí nebo jednotlivé její části) a stanovil některé doporučené hladiny konopného semene v krmivu (3 % pro výkrm drůbeže, 5–7 % pro nosnice, 2–5 % pro prasata, 5 % pro prasata, 5 % pro přežvýkavce). Celá rostlina konopí (stonek i listy) by díky vysokému obsahu vlákniny mohla být vhodným krmivem pro přežvýkavce a koně. Všechny tyto pozitivní aspekty pro použití konopí jsou však omezeny přítomností psychotropního Δ^9-THC. Ve srovnání s jinými částmi rostlin mají konopná semena nízký obsah CBDs. EFSA nedoporučuje krmivo s celou rostlinou konopí pro výživu zvířat a stanovil maximální obsah Δ^9-THC 10 mg/kg v krmivu obsahujícím konopná semena (EFSA, 2011). Vzhledem k velmi málo vědeckým poznatkům o vlivu zařazení celé rostliny konopí ve výživě zvířat a rizik týkající se lidského zdraví, vědecký panel doporučil získávat více poznatků a údajů o této problematice (EFSA, 2015). Díky těmto zjištěním, bylo cílem této studie definovat chromatografickou metodu pro analýzu širokého spektra CBDs, včetně Δ^9-THC v různých vzorcích biologického původu a vlivu konopných materiálů po zařazení do diety a sledovat vliv na hladinu cholesterolu (Chol) v experimentech na zvířatech, konkrétně u drůbeže. Vzorky biologického původu analyzované v této práci jsou výchozími komponentami krmných směsí, včetně různých částí rostliny konopí (semena a různé směsi konopné biomasy), krmné směsi, živočišné produkty (maso a vaječný žloutek) a výkaly, jako indikátory retence látek v organismu. Nejnovější literatura se zabývá HPLC analýzou CBDs v rostlinných materiálech (Križman, 2020), biologických vzorcích (Antunes et al., 2023) nebo různých vzorcích hovězího masa (Chakrabarty et al., 2022; Smith et al., 2023) nebo identifikaci stopových koncentrací Δ^9-THC v kravském mléce (Wagner et al., 2022). Velkou otázkou při analýze CBDs je, zda je možné oddělit CBDs od endogenních složek testovaných biologických vzorků. V poslední době se kromě důležitosti analýzy psychotropních forem CBDs stává důležité analyzovat i ostatní CBDs opět díky jejich biologické aktivitě a otázkou je, zda zařadit některé z těchto látek do skupiny psychomodulačních látek. Proto je stále důležitější vyvinout

jednoduchý postup předkolonové přípravy vzorku s následným výběrem vhodné analytické metody, což je citlivá a selektivní metoda C18 vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reverzní fázi s fotodiodovou detekcí (C18-HPLC-DAD) nebo metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) pro kvantifikaci širokého spektra CBDs a volného Chol ve stravě zvířat a lidí, doplňcích stravy a vybraných živočišných a rostlinných materiálech.

1.5. Přehled analytických metod pro stanovení kanabinoidů

Existuje široká škála laboratorních metod pro kvantifikaci CBDs, z nichž některé jsou přesnější a citlivější, jiné zase slouží pouze k orientační analýze látek ve vzorku. Bohužel, čím je daná metoda citlivější, je její analýza finančně nákladnější a vyžaduje značné zkušenosti při jejich aplikaci. Laboratorní metody, které je možné využít při analýze CBDs zahrnují GC-FID/MS (plynová chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním detektorem nebo hmotnostním detektorem), dvoudimenzionální GC, HPLC-UV/DAD/MS (kapalinová chromatografie ve spojení s UV detektorem, detekcí ve fotodiodovém poli a hmotnostním detektorem), HPLC-MS/MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií), LC-MS/MS a APCI (kapalinová chromatografie s tandemovou spektrometrií a chemickou ionizací za atmosférického tlaku), UPLC-qTOF (ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie s využitím Time-of-Flight kvadrupólu), MALDI-MS (matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s hmotnostní detekcí), TLC (tenkovrstvá chromatografie), FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací), NMR (nukleární magnetická rezonance). Využití některých metod jako je např. TLC či FTIR je spíše pro kvalitativní analýzu, proto se v této oblasti směřuje hlavní pozornost na chromatografické metody. Výhodou při analýze kanabinoidů je možnost využití jak kapalinové, tak plynové chromatografie s běžně využívanými C18 kolonami v LC a kapilárními kolonami v GC instrumentaci. Rozdíl je zde hlavně v jednotlivých možnostech detekce. Výhodou je možnost detekce CBDs pomocí různých metod, z nichž některé jsou více a jiné méně citlivé. GC-MS se často používá pro kvantifikaci CBDs. Ve srovnání s využitím UHPLC-MS je pořízení GC-MS

techniky méně nákladné a GC-MS zařízení je tedy pro mnoho pracovišť výhodnější variantou. Využití MS detektoru je špičkou v chromatografické detekci látek, kdy tento detektor řadíme mezi jedny z nejcitlivějších pro nízké koncentrace látek ve vzorku. Bohužel GC-MS technika vyžaduje derivatizační krok k zabránění destrukci karboxylových skupin, tedy CBDs-A. Nevýhodou je i časová náročnost přípravy vzorku a využití dalších laboratorních činidel. HPLC-DAD a HPLC-UV jsou výhodnou alternativou ke GC analýze, ale tyto detekční techniky jsou méně specifické a citlivé. Literatura naznačuje, že HPLC-MS/MS pomocí metod ESI (elektrosprejová ionizace) a APCI poskytuje nejlepší specificitu a citlivost pro kvantifikaci obsahu CBDs v extraktech vzorku. Použití HPLC má několik výhod oproti jiným analytickým metodám uvedeným v tomto přehledu. Například HPLC může rozlišovat mezi CBDs-A a CBDs-N, na rozdíl od GC bez nutnosti derivatizace. MS nabízí oproti jiným detekčním metodám také několik výhod zejména v rozlišení na základě hodnoty m/z jejich molekulárního iontu. Nabízí větší specifitu ve srovnání s UV detektory a dokáže analyzovat extrakty ze složitých matric, jako je konopí (Pourseyed Lazarjani et al., 2020).

1.6. Konopí, kanabinoidy a vliv na obsah cholesterolu

Existuje řada studií, které zmiňují vliv konopí nebo kanabinoidů na obsah Chol v organismu. Hlavní poznatky z dosavadních studií naznačují pozitivní vliv na snižování hladiny Chol v organismu (Skřivan et al., 2019). Endokanabinoidní systém hraje důležitou roli v regulaci metabolismu, včetně metabolismu lipidů. Endokanabinoidní systém je síť signálních molekul (endokanabinoidů), receptorů (CB1, CB2) a enzymů, která reguluje různé biologické procesy, včetně metabolismu lipidů, kardiovaskulárního systému, chuti k jídlu a mnoha dalších funkcí. CB1 receptory se nacházejí převážně v centrální nervové soustavě, ale i v periferních tkáních, včetně tukové tkáně, jater a svalů. CB2 receptory jsou více lokalizovány v imunitním systému a mají vliv na zánětlivé procesy a imunitní odpovědi. Receptory CB1 a CB2, které jsou aktivovány CBDs, mají vliv na různé metabolické procesy, včetně lipogeneze (tvorba tuků) a lipolýzy (rozklad tuků) (Romero-Zerbo a Bermúndez-Silva et al., 2014; Simankowicz a Stępniewska, 2025). Když se CBDs (např. THC) vážou na CB1 receptory, mohou mít různé

účinky, včetně regulace metabolismu tuků. V některých studiích na zvířatech bylo prokázáno, že aktivace CB1 receptoru může zvyšovat ukládání tuků, zvyšovat hladinu triglyceridů a LDL cholesterolu (Cota et al., 2003; Lazarte a Hegele et al. 2019). Kanabidiol (CBD) je nepsychoaktivní kanabinoid, který naopak může působit jako antagonista CB1 receptoru, což znamená, že blokuje nadměrnou aktivaci těchto receptorů, která by mohla vést k hromadění tuků a zvyšování hladiny Chol. CBD, přestože neaktivuje CB1 a CB2 receptory stejným způsobem jako THC, může mít vliv na různé biologické dráhy, které regulují metabolismus lipidů. CBD může ovlivnit receptory jako PPAR-gamma (peroxisome proliferator-activated receptor), což je receptor, který hraje klíčovou roli v regulaci metabolismu lipidů a glukózy. Aktivace tohoto receptoru může vést ke zlepšení metabolického profilu a snížení hladiny triglyceridů a LDL Chol. CBD také vykazuje protizánětlivé účinky, které mohou přispět k lepšímu zdraví cév a snižování hladiny Chol, protože chronický zánět je spojen s vyššími hladinami LDL cholesterolu a zvýšeným rizikem aterosklerózy. Efekt CBDs na lipidový profil může záviset na mnoha faktorech, jako je koncentrace látky, typ kanabinoidu (CBD vs. THC), doba expozice, genetické predispozice a celkové zdraví jednotlivce. To znamená, že u některých lidí mohou CBDs vést ke zlepšení lipidového profilu, zatímco u jiných mohou mít opačný účinek. Shrnutím je, že CBDs mohou ovlivnit hladinu Chol různými způsoby, a to prostřednictvím interakce s receptory, jako jsou CB1 a CB2. Zatímco THC může na některých úrovních zvyšovat hladiny Chol, CBD a blokování CB1 receptorů (například pomocí léku Rimonabantu) mohou mít opačné účinky, které vedou k snížení Chol. Důležitým faktorem je i to, že CBDs mohou mít protizánětlivé účinky, což může vést k celkovému zlepšení zdraví cév a lipidového profilu (Porcu et al., 2018; Van Gaal et al., 2005). I přesto, že některé studie ukazují pozitivní účinky CBD na Chol, je stále potřeba více klinických studií pro potvrzení těchto účinků a lepší pochopení mechanismů, jakým CBDs ovlivňují metabolismus lipidů.

2. Vývoj chromatografických metod pro stanovení kanabinoidů pomocí GC/MS a HPLC/DAD

2.1. Použité standardy a chemikálie

Cholesterol (Chol), 5-α-cholestan (vnitřní standard; GCIS), 3,5-dimetylfenol (vnitřní standard; HPLCIS) a všechny CBDs standardy byly zakoupeny od Sigma-Aldrich Corp., (St. Louis, MO, USA). Analyzované CBDs zahrnovaly: Δ^9-tetrahydrokanabinol (Δ^9-THC), Δ^9-tetrahydrokanabinolovou kyselinu (Δ^9-THC-A), Δ^8-tetrahydrokanabinol (Δ^8-THC), kanabidiol (CBD), kanabidiolovou kyselinu (CBD-A), kanabigerol (CBG), kanabigerolovou kyselinu (CBG-A), kanabinol (CBN), kannabinolovou kyselinu (CBN-A) kanabichromen (CBC), kanabichromenovou kyselinu (CBC-A), Δ^9-tetrahydrokanabivarin (THCV), Δ^9-tetrahydrokanabivarinovou kyselinu (THCV-A), kanabidivarin (CBDV), kanabidivarinovou kyselinu (CBDV-A), kanabicyklol (CBL) a kanabicyklovou kyselinu (CBL-A). Čistota Chol, GCIS, HPLCIS a všech standardů CBDs byla 99 %, ≥ 97 %, ≥ 99 % a ≥ 98 %, v tomto pořadí. K přípravě zásobních roztoků byly standardy Chol, GCIS a CBDs rozpuštěny v 1 ml n-hexanu GC pro metodu GC-MS nebo byl Chol. HPLCIS a CBDs rozpuštěny v 1 ml methanolu HPLC pro metodu HPLC-DAD a skladovány při -78 °C až do použití. Methanol pro HPLC (≥99,8 %), ethanol, n-hexan GC (≥99,0 %), acetonitril pro HPLC (ACN), kyselina mravenčí pro HPLC a NaOH byly zakoupeny od společnosti Merck (Darmstadt, Německo). Všechny ostatní chemikálie byly p.a. kvality a byly zakoupeny od společnosti Fluka (Steinheim, Německo). Voda použitá k přípravě chemických činidel byla purifikována pomocí systému pro čištění vody Elix™ (Millipore, Oakville, ON, Kanada). Byly použity vysoce čisté He (>99,9992 %) a N_2 analytické čistoty, Zásobní roztoky GCIS (160 µg 5-α-cholestanu/ml n-hexanu) a HPLCIS (2,8 mg 3,5-dimethylfenolu/ml methanolu) byly použity k výpočtu výtěžku předkolonových metod před separací na kapilárních GC a HPLC-C18 kolonách. Ke zpracovaným biologickým vzorkům bylo přidáno 50 µl zásobního roztoku GCIS (tj. 8 µg GCIS) nebo 20 µl zásobního roztoku HPLCIS (tj. 56 µg HPLCIS). Konečný objem zpracovaných biologických vzorků pro GC nebo HPLC kolony byl 1 ml.

2.2. Analytická metoda GC-MS

2.2.1. Použité GC-MS zařízení

CBDs a Chol ve standardních roztocích a připravené biologické vzorky byly analyzovány pomocí plynového chromatografu „Focus GC“ Thermo Scientific spojeného s hmotnostním spektrometrem (MS) Thermo ITQ 1100 (Obr. 2). Hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu m/z od 20 do 500. Byla použita kolona Thermo TR-5 ms SQC (30 m × 0,25 mm vnitřní průměr × 0,25 µm tloušťka vrstvy) obsahující 5% fenylpolysilfenylensiloxanu jako stacionární fáze kolony s He použitým jako mobilní fáze při konstantním průtoku nosného plynu 1,0 ml/min. Teploty nástřiky a transfer line byly udržovány na 240 °C, respektive 330 °C. Teplota iontového zdroje MS byla nastavena na 280 °C (s limitem 300 °C); energie elektronů byla 70 eV. Všechny analýzy CBDs, Chol a GCIS GC-MS provedené u standardních roztoků a zpracovaných biologických vzorkách byly založeny na chromatogramech celkového iontového proudu (TIC).

Obr. 2 GC-MS zařízení Focus GC doplněný hmotnostním spektrometrem Thermo ITQ 1100.

2.2.2. Teplotní gradient

CBDs, Chol a GCIS ve standardních roztocích a zpracovaných biologických vzorcích byly stanoveny použitím teplotního programu kolony: počáteční teplota kolony 100 °C byla udržována po dobu 1 min a poté zvýšena na 210 °C rychlostí 8 °C/min a udržována po dobu 7 minut před zvýšením 1 °C/min na 215 °C a udržována po dobu 7 min; následně byla teplota naprogramována tak, aby se zvyšovala rychlostí 2 °C/min až na 230 °C, udržovala se 5 min,

poté se zvyšovala rychlostí 5 °C/min na 250 °C, udržovala se 3 minuty, zvyšovala se rychlostí 10 °C/min na 300 °C, udržovala se 1 min, zvyšovala se rychlostí 10 °C/min na 320 °C/min, držela se po dobu 20 min a poté se zvýšila na 334 °C a udržovala se 10 min. Doporučuje se nástřik 1–3 µl analyzovaných vzorků v režimu splitless nástřiku.

2.2.3. Charakteristiky GC-MS analytické metody

Identifikace CBDs, Chol a GCIS byla ověřena na základě spekter ionizace dopadem elektronů analyzovaných látek a porovnána se standardy CBDs, Chol a GCIS a referenční knihovnou hmotnostních spekter NIST 2007. Čistota píku CBDs, Chol a GCIS ve standardních roztocích a biologických vzorcích byla stanovena pomocí knihovny hmotnostních spekter NIST MS Search 2.0. Čistota píku CBDs, Chol a GCIS byla hodnocena na základě podobnosti píku jejich hmotnostních spekter ze vzorků s těmi v knihovně hmotnostních spekter NIST. Hmotnostní spektra CBDs, Chol a GCIS ve všech biologických materiálech byla korigována odečtením pozadí na obou stranách píků CBDs, Chol a GCIS. Píky CBDs, Chol a GCIS v analyzovaných biologických materiálech byly také identifikovány podle retenčního času samostatně nastřikovaných zpracovaných standardů a přidáním těchto standardních roztoků k biologickým vzorkům. Mez detekce (LOD) byla vypočtena při poměru signálu (Sn) k šumu (σ) násobena třemi (LOD = 3 × Sn/σ), zatímco mez kvantifikace (LOQ) byla definována jako 10násobek šumu pod vrcholem (LOQ = 10 × Sn/σ); šum (σ) pod vrcholem byl odvozen ze šumu z levé (σL) a pravé (σR) strany vrcholu (tj. σ = (σL + σR)/2). Přesnost chromatografické metody byla také hodnocena analýzou relativní směrodatné odchylky (RSD, %) vypočtené z měření koncentrací CBDs a Chol v biologických vzorcích následovně:

$$\text{RSD, \%} = (\text{SD}/\mu) \times 100\ \%\ ,$$

kde: SD je směrodatná odchylka měření CBDs a Chol ve vzorcích, µ je střední hodnota měření CBDs a Chol ve standardních roztocích a biologických materiálech. Přesnost chromatografických metod byla stanovena analýzou stejného vzorku vstřikovaného několikrát

během chromatografické analýzy. Tailing faktor (TF) píku CBDs-N, CBDs-A, GSIS a Chol byl vypočten následovně:

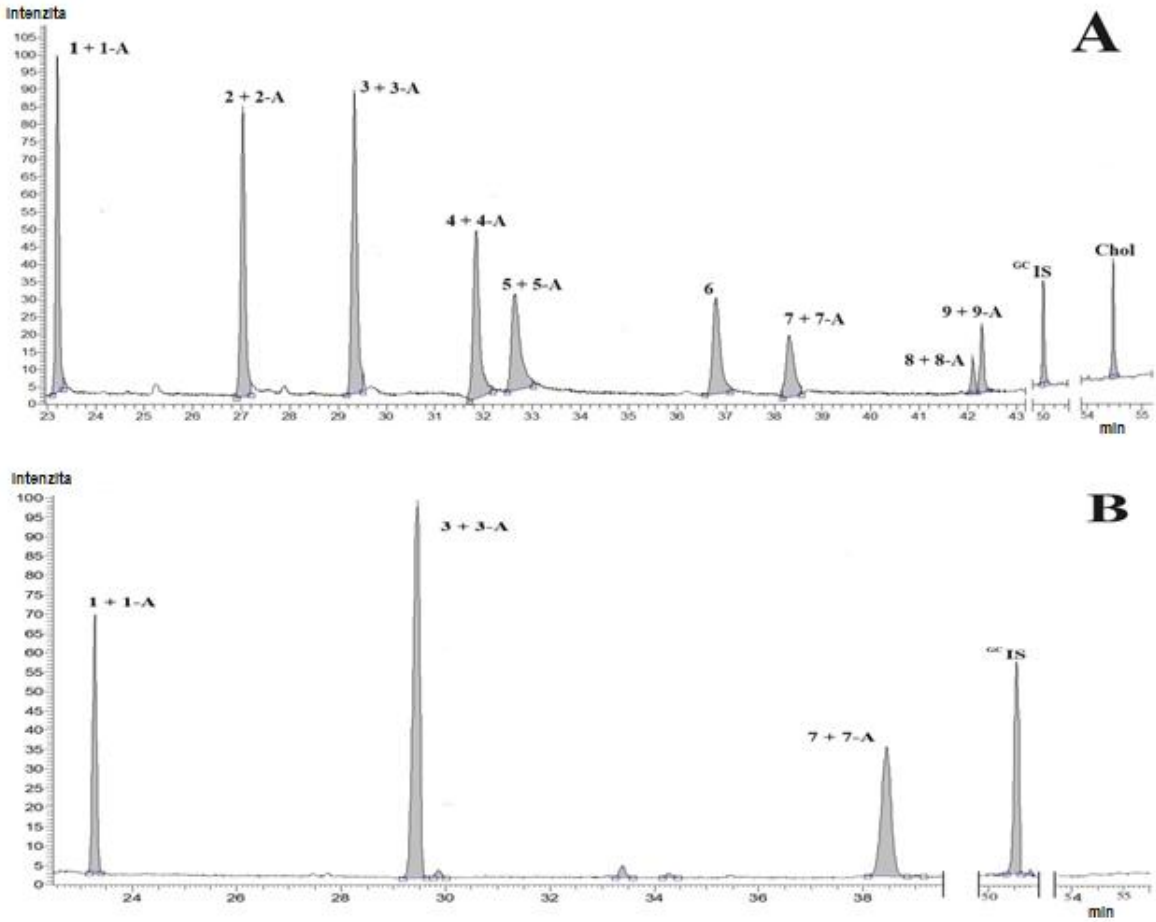
$$TF = (a + b)/(2 \times a),$$

kde: a a b jsou poloviční šířky píku při 5% výšce píku; a je přední poloviční šířka; b je zadní poloviční šířka.

2.2.4. Analýza standardů a vzorků pomocí GC-MS

Hlavním analytickým úkolem v této části studie bylo dosáhnout vhodné separace sedmnácti CBDs (Tab. 1) a Chol od interferujících endogenních složek přítomných v testovaných biologických materiálech. Dalším problémem bylo dosažení uspokojivé separace CBDs bez předkolonové derivatizace. Aby se vyřešily problémy způsobené potenciálním překrýváním mezi CBDs, GCIS, Chol a endogenními látkami přítomnými v biologických materiálech, byla nízká počáteční teplota kolony (tj. 100 °C) udržována po dobu 1 minuty. Podrobné GC-MS analýzy biologických materiálů, zejména vzorků konopí a slepičích vaječných žloutků, ukázaly, že úplné odstranění všech endogenních složek vyžadovalo zvýšení teploty GC kolony na 334 °C. Kombinace parametrů, tedy dlouhokapilární GC kolony, programu s postupným zvyšováním teploty a selektivní hmotnostní spektrometrie, poskytla vhodnou analytickou metodu pro kvantifikaci CBDs, GCIS a Chol v roztocích n-hexanu, stejně jako v testovaných biologických materiálech. Typické chromatogramy celkového iontového proudu (TIC) pro nederivatizované CBDs, GCIS a Chol (GC-chromatogram A) a vzorek zpracované konopné biomasy (GC-chromatogram B) jsou zobrazeny na obrázku 3. Jak se dalo očekávat, bylo dosaženo vynikající stability základní linie a dostatečné separace všech analytických píků, bez pozorovaných problémů. Pro analyzované standardy byly zaznamenány téměř symetrické tvary píků CBDs, GCIS a Chol. Bohužel GC-MS analýzy vyžadují vysoké teploty injektoru a kolony, což vede k dekarboxylaci CBDs-A během nástřiků a průchodu GC kolonou (Citti et al., 2018; Pourseyed Lazarjani, 2020). K tomu dochází i běžně působením vyšších teplot při stárnutí

biologických materiálů obsahujících CBDs-A, nebo např. při skladování konopných materiálů, kdy se přeměňují CBDs-A formy na formy neutrální (tj. CBDs-A na CBDs-N) (Obr. 4).



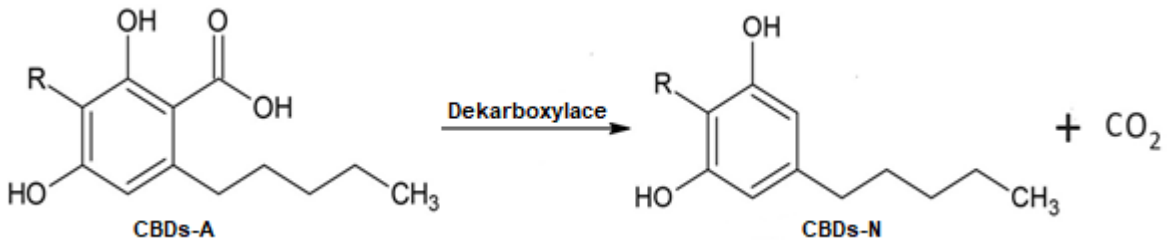
Obr. 3 Typické chromatogramy GC-MS pro devět CBDs-N, osm CBDs-A, GCIS (interní standard; 5-α-cholestan) a Chol (TIC-chromatogram A) a zpracovaný vzorek konopné biomasy (TIC-chromatogram B). Píky: 1-CBDV a CBDV z dekarboxylace CBDV-A (1-A); 2-THCV a THCV z dekarboxylace THCV-A (2-A); 3-CBL a CBL z dekarboxylace CBL-A (3-A); 4-CBD a CBD z dekarboxylace CBD-A (4-A); 5-CBC a CBC z dekarboxylace CBC-A (5-A); 6-Δ^8-THC; 7-Δ^9-THC a Δ^9-THC z dekarboxylace Δ^9-THC-A (7-A); 8-CBG a CBG z dekarboxylace CBG-A (8-A); 9-CBN a CBN z dekarboxylace CBN-A (9-A). Koncentrace Chol ve vzorku konopné biomasy byla pod mezí detekce (LOD).

Tab. 1. Retenční časy CBDs, GCIS (jako 5-α-cholestan) a Chol, kalibrační rovnice, linearita (korelační koeficienty; r), limity detekce (LOD), limity kvantifikace (LOQ), inter-assay variační koeficienty (RSD, %), tailing faktory píků (TF) a odpověď MS k 1 pg testovaných standardů.

Analyt	**Retenční čas, min (hodnota ± SD)**	**[a] $^{o}S_n$ před extrakcí**	**[b] $^{ext}S_n$ po extrakci**	**[c] Výtěžnost (R), %**	**[d] Kalibrační rovnice $y(ng) = a \times S_n$**	**[e] r; Koeficient lineární regrese**	**[f] LOD pg/mL**	**[f] LOQ pg/mL**	**[g] Inter-Assay RSD, %**	**[h] Tailing faktor (TF) píku**	**[i] MS odpověď k 1 pg standardu**
Neutrální formy kanabinoidů (CBDs-N)											
CBDV	23,2 ± 0,1	576,784	577,484	100,1	$y = 2,68 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9968	6,8 (0,024)	22,7 (0,08)	1,21	0,994	373
THCV	27,1 ± 0,1	623,956	622,793	99,8	$y = 2,40 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9968	5,9 (0,021)	19,4 (0,07)	1,32	0,990	417
CBL	29,3 ± 0,1	539,796	540,184	100,1	$y = 2,05 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9973	2,8 (0,009)	9,3 (0,03)	1,09	0,991	487
CBD	31,9 ± 0,1	414,490	413,206	99,7	$y = 2,59 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9976	5,0 (0,015)	16,8 (0,05)	1,46	0,987	387
CBC	32,6 ± 0,1	298,395	297,171	99,6	$y = 2,34 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9974	5,8 (0,019)	19,4 (0,06)	1,54	0,993	427
Δ^8-THC	36,8 ± 0,1	324,754	323,256	99,5	$y = 1,91 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9982	6,1 (0,022)	20,3 (0,07)	1,07	0,987	523
Δ^9-THC	38,3 ± 0,1	248,395	250,171	100,8	$y = 2,60 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9969	1,6 (0,007)	5,4 (0,02)	1,29	0,986	385
CBG	42,1 ± 0,1	154,899	155,901	100,6	$y = 2,69 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9981	4,0 (0,013)	13,2 (0,04)	2,23	0,988	372
CBN	42,4 ± 0,1	356,274	353,893	99,3	$y = 5,89 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9990	5,5 (0,018)	18,2 (0,06)	2,07	0,990	170
Kanabinoidy ve formě kyselin (CBDs-A)											
CBDV-A [j]	-	-	-	0	$y = 2,87 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9987	7,3 (0,022)	24,3 (0,07)	1,18	0,993	348
(CBDV)	23,2 ± 0,1 [k]	595,039 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
THCV-A [j]	-	-	-	0	$y = 2,76 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9963	6,8 (0,022)	22,6 (0,07)	1,28	0,991	461
(THCV)	27,1 ± 0,1 [k]	607,956 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
CBL-A [j]	-	-	-	0	$y = 2,09 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9980	2,9 (0,009)	9,5 (0,03)	1,13	0,990	479
(CBL)	29,3 ± 0,1 [k]	576,831 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
CBD-A [j]	-	-	-	0	$y = 2,95 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9984	5,7 (0,0015)	19,1 (0,05)	1,43	0,988	339

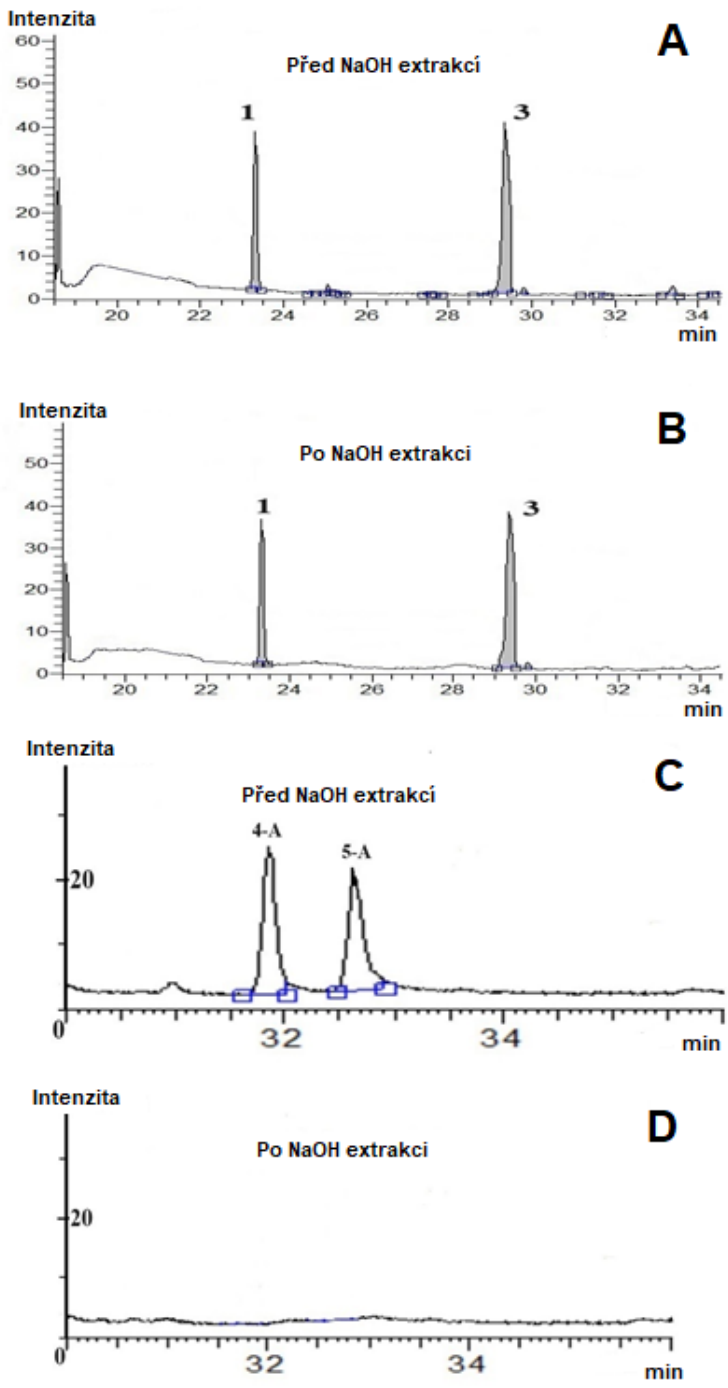
(CBD)	31,9 ± 0,1 [k]	442,352 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
CBC-A [j]	-	-	-	0	$y = 2{,}67 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9976	6,6 (0,019)	22,1 (0,06)	1,52	0,992	375
(CBC)	32,6 ± 0,1 [k]	276,873 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
Δ^9-THC-A [j]	-	-	-	0	$y = 2{,}96 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9979	1,8 (0,009)	6,1 (0,02)	1,12	0,987	338
(Δ^9-THC)	38,3 ± 0,1 [k]	496,482 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
CBG-A [j]	-	-	-	0	$y = 3{,}07 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9983	4,5 (0,013)	15,0 (0,04)	2,18	0,989	326
(CBG)	42,1 ± 0,1 [k]	184,328 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
CBN-A [j]	-	-	-	0	$y = 6{,}71 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9987	6,2 (0,019)	20,7 (0,06)	1,93	0,991	149
(CBN)	42,4 ± 0,1 [k]	395,373 [k]	0	0	-	-	-	-	-	-	-
GCIS [l]	50,6 ± 0,1	299,184 [m]	297,705	99,5	$y = 2{,}669 \times 10^{-5} \times S_n$	0,9991	62,8 (0,17)	209,0 (0,56)	1,32	0,992	37
Chol	54,5 ± 0,2	623,523	621,097	99,6	$y = 8{,}37 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9944	18,2 (0,05)	60,5 (0,16)	1,49	0,989	1094

SD-směrodatná odchylka; RSD-relativní směrodatná odchylka; CBDs-kanabinoidy; Chol-cholesterol; GCIS-vnitřní standard použitý pro výpočet výtěžku předkolonové extrakce CBDs a Chol; S_n-plocha píku. [a] ${}^{o}S_n$ (objem nástřiku: 1 µL)-CBDs, GCIS a Chol plochy píků analyzovány ve standardním roztoku před extrakcí vodným roztokem 0,1 M NaOH. [b] ${}^{ext}S_n$ (objem nástřiku: 1 µl)-CBDs, GCIS a Chol plochy píků analyzovány ve standardním roztoku po extrakci vodným roztokem 0,1 M NaOH. [c] Výtěžnost (R) byla vypočtena následovně: R, % = $({}^{ext}S_n/{}^{o}S_n) \times 100\%$. [d] S_n-plochy píků látek analyzovány pomocí MS; přímka lineární regrese s průchodem v bodě 0,0 s počtem bodů 5 pro všechny látky. [e] Numerická hodnota statistického vztahu mezi odpověďmi MS a množstvím nastřikovaných standardů. [f] LOD a LOQ hodnoty uvedené v závorkách jsou v pmol/mL. [g] Přesnost (RSD, %) byla hodnocena multianalýzou analyzovaných standardů (CBDs-N, CBDs-A, GCIS and Chol). [h] Tailing faktory (TF) píků CBDs, GCIS a Chol jednotlivých standard byly vypočteny s pěti různých koncentrací CBDs-N, CBDs-A, GCIS a Chol použitých pro přípravu kalibračních rovnic. [i] Zaznamenaná hodnota signálu detektoru (MS) na 1 pg analyzovaných CBDs nebo Chol. [j] CBDs ve formě kyselin (CBDs-A) jsou dekarboxylovány na odpovídající neutrální formu CBDs (CBDs-N); znázorněno na obr. 3. CBDs-N vzniklé z dekarboxylovaných CBDs-A jsou uvedeny v závorce. [k] Retenční časy a píky (S_n) CBDs-N produktů (v závorkách) vzniklé dekarboxylací z CBDs-A. [l] Vnitřní standard: 8 µg GCIS byl přidán do analyzovaných biologických vzorků; celkový objem vzorků: 1 ml. Rozsah přidaného GCIS v 1 ml kalibračního roztoku: 2–10 µg GCIS (objem nástřiku: 1 µl; tj., hodnota rozsahu nástřiku GCIS na kapilární GC kolonu: 2–10 ng/nástřik). [m] Objem nástřiku GCIS roztoku (8 µg GCIS/ml; 8 ng/nástřik): 1 µl (4 počet opakování).



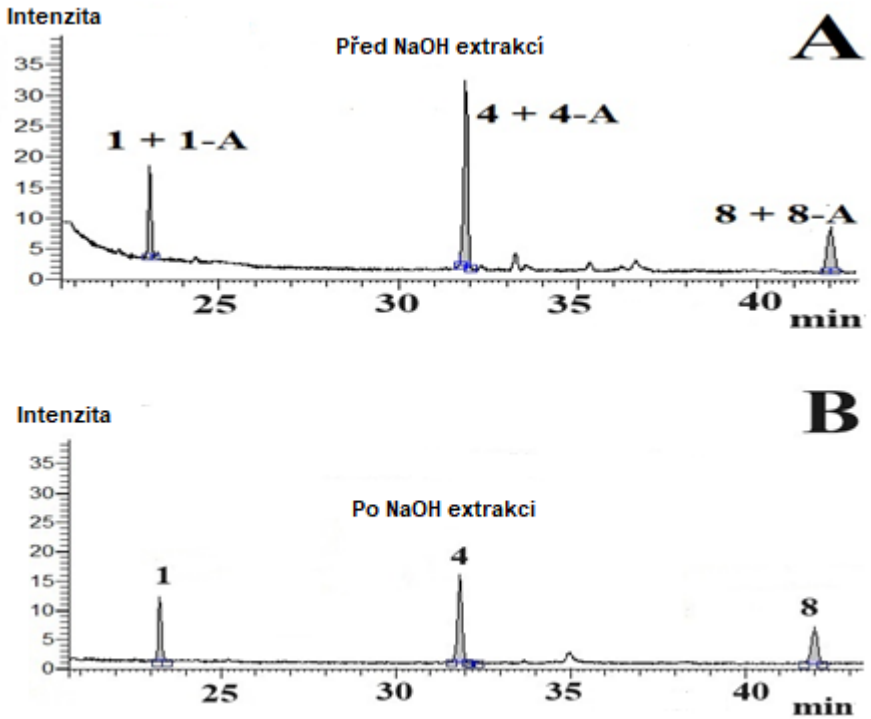
Obr. 4 Schéma dekarboxylace kanabinoidů ve formě kyseliny (CBDs-A) na neutrální formu kanabinoidů (CBDs-N).

S ohledem na nedávné studie (Citti et al., 2018; Pourseyed Lazarjani, 2020) a dosažené výsledky je možné potvrdit, že lze pomocí GC-MS detekovat pouze CBDs-N, v biologickém vzorku jsou pak CBDs-N součty původních neutrálních forem CBDs (CBDs-N) a CBDs-N vzniklých z dekarboxylovaných CBDs-A během GC-analýz. Podobnost píků CBDs-N, GCIS a Chol ve standardních roztocích s hmotnostními spektry v knihovně NIST byla více než 95 %. Tyto poznatky vedly k možnosti nástřiku vzorku, kde analyzovaný pík bude součtem obou forem CBDs (CBDs-A a CBDs-N) a konverzí CBDs-A na odpovídající sodnou sůl pomocí roztoku NaOH a dale pak extrakcí původní CBDs-N formy do n-hexanu je možné kvantifikovat CBDs-A formu ve vzorku. Obsahy CBDs-A, CBDs-N, GCIS a Chol ve standardních roztocích a biologických materiálech před a po extrakci vodným 0,1 M roztokem NaOH byly stanoveny pomocí kolonového teplotního programu hmotnostně selektivní detekcí a ukázaly, že konverze COOH skupin na COONa v CBDs-A poskytla účinnost ~100 % (Obr. 5). Spolehlivost této GC-metody byla také hodnocena pomocí LOD, LOQ, inter-assay variačního koeficientu, tailing faktorů a MS-odezvou pro 1 pg standardu, jakož i pomocí vypočítaných kalibračních rovnic standardů a lineárních regresních koeficientů (r) (Tab. 1).



Obr. 5 Vliv extrakce vodným roztokem 0,1 M NaOH na složenín- hexanových roztoků CBDs. Části typických GC-MS chromatogramů: (A) chromatografická analýza neextrahovaných CBDs-N (tj. CBDV a CBL); (B) chromatografická analýza CBDs-N (tj. CBDV a CBL) extrahovaných 0,1 M NaOH; (C) chromatografická analýza neextrahovaných CBDs-A (tj. CBD-A a CBC-A); (D) chromatografická analýza CBDs-A (tj. CBD-A a CBC-A) extrahovaných 0,1 M roztokem NaOH. Píky: 1-CBDV; 3-CBL; 4-A-CBD-A; 5-A-CBC-A.

Úspěšné výsledky při aplikací metody GC-MS u standardů daly impuls pro aplikaci analytických postupů na biologické vzorky. Jak je znázorněno na obrázku 6, chromatogram vzorku konopného semene neextrahovaného roztokem NaOH (Obr. 6A), následovaný chromatogramem stejného vzorku extrahovaného 0,1 M roztokem NaOH (Obr. 6B), umožnil kvantifikaci CBDs-N a CBDs-A v konopných semenech. Pro podrobnou analýzu identifikovaných píků CBDs v testovaných vzorcích byla hmotnostní spektra píků CBDs korigována odečtením pozadí na obou stranách analyzovaných píku. Jak se očekávalo, opravená hmotnostní spektra CBD potvrdila molekulární hmotnosti a chemické vzorce detekovaných CBDs v analyzovaných vzorcích. Chromatogram 6A opět ukazuje součet obou forem CBDs-N a CBDs-A, zatímco chromatogram 6B ukazuje pouze formu CBDs-N. Rozdílem ploch píků obou chromatogramů téže látky je možné kvantifikovat CBDs-A ve vzorku.



Obr.5 Koncentrace CBDs ve vzorku konopného semene (~0,5 g) metodou GC-MS, objem nástřiku: 1 µl. Části GC-MS chromatogramů vzorku konopného semene před (A) extrakcí 0,1 M roztokem NaOH a po extrakci (B) 0,1 M roztokem NaOH. Koncentrace detekovaných CBDs-N: pík 1: CBDV-3,37 µg/g; pík 4: CBD-6,06 µg/g; pík 8: CBG-3,11 µg/g. Koncentrace detekovaných CBDs-A: pík 1-A: CBDV-A-1,32 µg/g; pík 4-A: CBD-A-3,39 µg/g; píkl 8-A: CBG-A-1,01 µg/g.

2.3. Analytická metoda HPLC-DAD

2.3.1. Použité HPLC-DAD zařízení

CBDs a Chol ve standardních roztocích a následně v připravených biologických vzorcích byly stanoveny pomocí přístroje Shimadzu HPLC (řada VP) obsahujícího kapalinový chromatograf, auto-sampler, modul komunikační sběrnice, kolonovou pec, odplyňovač a selektivní detektor SPD fotodiodového pole (DAD) (Obr. 6). Byly použity analytické kolony Shim-Pak C18 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko; střední průměr částic 2,2 µm, délka kolony 75 mm, vnitřní průměr 3 mm) a dvě kolony Phenomenex Synergy C18 (Phenomenex, Torrance, CA, USA; střední průměr částic 2,5 µm, délka kolony 100 mm, vnitřní průměr 3 mm). Jako předkolona byla použita Phenomenex C18 předkolona (Phenomenex, Torrance, CA, USA; 5 mm x 2 mm) a byla umístěna před analytickými kolonami pro jejich ochranu. Termostat kolony udržoval teplotu na 40 °C. Termostat automatického vzorkovače byl nastaven na 4 °C. DAD pracoval v UV rozsahu od 190 do 410 nm.

Obr. 6 HPLC zařízení ve spojení s DAD detektorem (Shimadzu, Japan)

2.3.2. Program gradientové eluce

Všechny CBDs ve standardních roztocích a biologických vzorcích byly analyzovány pomocí lineárního ternárního gradientového elučního programu (Tab. 2) ACN s 0,1% kyselinou mravenčí (v/v; rozpouštědlo A), H_2O s 0,1% kyselinou mravenčí (v/v; rozpouštědlo B) a methanol (rozpouštědlo C) (Tab. 5). Maximální tlak v systému byl 24,5 MPa. Objem nástřiku se pohyboval v rozmezí 5–30 µl. Píky Chol a CBDs v biologických vzorcích byly identifikovány na základě UV absorpčních spekter a porovnáním retenčních časů se zpracovanými standardy Chol a CBDs vstřikovanými odděleně a přidáním standardních

roztoků do zpracovaných biologických vzorků. Ke stanovení koncentrací Chol a CBDs v biologických vzorcích byly použity kalibrační rovnice (Tab. 3). Ke stanovení koncentrací CBDs a Chol v biologických vzorcích byl použit vnitřní standard HPLCIS ke kvantifikaci výtěžku předkolonového postupu. Tento výtěžek byl stanoven hodnocením koncentrací HPLCIS ve zpracovaných biologických vzorcích a přímou analýzou roztoku HPLCIS (56 µg HPLCIS/ml) bez téhož postupu přípravy.

Tab. 2. Gradientový eluční program použitý pro C18-HPLC-DAD analýzu CBDs a Chol ve standardních vzorcích a biologických vzorcích.

Čas, min	**Průtok mobilní fáze min/ml**	**Složení, % [a]**		
		Roztok A	**Roztok B**	**Roztok C**
0	0,30	55	45	0
2,5	0,30	55	45	0
4,0	0,30	70	30	0
9,0	0,30	75	25	0
17,0	0,30	75	25	0
19,0	0,35	75	25	0
26,0	0,35	75	25	0
30,0	0,35	82	18	0
32,0	0,40	85	15	0
35,0	0,40	85	15	0
39,0	0,40	92	8	0
43,0	0,40	99	1	0
44,0	0,40	100	0	0
46,2	0,40	0	0	100
70,0 [b]	0,41	0	0	100

Roztok A-ACN (HPLC čistota-acetonitril) s 0,1% kyselinou mravenčí (v/v); roztok B-voda s 0,1% kyselinou mravenčí (v/v); roztok C-HPLC čistota-methanol. [b] Po 70 min C18 kolona byla ekvilibrována 18 min v 55% roztoku A a 45% roztoku B při průtoku 0,3 ml/min.

2.3.3. Charakteristiky HPLC-DAD analytické metody

Pro dosažení dostatečných výtěžků extrakce analytů a přesnosti chromatografické analýzy fyziologicky důležitých CBDs v rostlinných a živočišných vzorcích byly vyvinuty originální předkolonové postupy extrakce. Pro kvantifikaci CBDs a Chol v biologických materiálech byly použity tři vysoce účinné kolony (kolona Shim-Pak C18 a dvě kolony Phenomenex C18). Psychoaktivní forma CBDs Δ^9-THC a nepsychoaktivní CBD, stejně jako jejich kyseliny (tj. Δ^9-THC-A a CBD-A) byly nejvyšší prioritou při analýze v našich chromatografických studiích. Hlavním analytickým cílem bylo dosáhnout vhodné separace CBDs a volného Chol od interferujících organických sloučenin obsahujících chromoforní skupiny. Proto byly použity různé monitorovací vlnové délky pro kontrolu účinnosti separace CBDs píků (Tab. 3) od interferujících látek v rostlinných materiálech, nebo zejména u živočišných tkání bohatých na

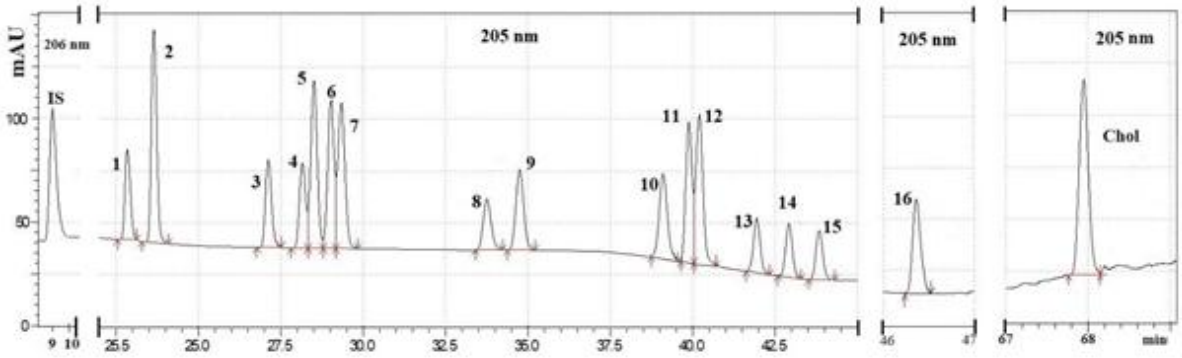
biomolekuly s aromatickými kruhy a/nebo polynenasycenými skupinami. Pro dosáhnutí co nejvyšší citlivosti, selektivity a specifity chromatografické analýzy byl použit plynulý ternární gradientový eluční program (Tab. 2), detektor s fotodiodovým polem (měřící celý rozsah vlnových délek v reálném čase) a tři kolony obsahující amorfní oxid křemičitý s dimethyloktadecylsilylovou vazbou a velikost částic s malým průměrem (tj. 2,2 a 5 μm náplň kolony). Ve skutečnosti měly kolony C18 s větší průměrnou velikostí částic (≥3 μm) za následek méně účinnou separaci CBDs a Chol od mnoha endogenních látek přítomných v rostlinných a živočišných materiálech. Jak se očekávalo, bylo dosaženo vynikající stability základní linie a chromatografické separace píků CBDs a Chol pomocí programu ternární gradientové eluce a optimální vlnové délky UV detekce analyzovaných CBDs (Tab. 3). Přidání 0,1% kyseliny mravenčí k ACN a H2O vedlo k téměř symetrickým tvarům píků CBDs a Chol a rozlišení v chromatografické analýze standardů CBDs a Chol (Obr. 7) ve srovnání s mobilními fázemi bez kyseliny mravenčí. Jak je ukázáno na obrázku 7 a v tabulce 3, monitorování DAD při maximech absorbance analyzovaných CBDs bylo použito k optimalizaci selektivity a citlivosti detekce CBDs ve standardních roztocích a biologických vzorcích. Na rozdíl od metod GC-MS, metoda C18-HPLC-DAD, bez ohledu na použitou předkolonovou proceduru, umožňuje simultánní kvantifikaci CBDs-A a CBDs-N ve standardních roztocích. Tabulka 3 pak ukazuje veškeré charakteristiky HPLCIS, CBDs a Chol ve standardních vzorcích, od uvedených retenčních časů, až po dosaženou kvalitu separace píků jednotlivých analytů. Symetrické tvary píků CBDs a Chol byly pozorovány s časem eluce až 70 minut. Jak je vidět z výsledků uvedených v tabulce 3, tato chromatografická metoda slouží jako vhodný analytický nástroj pro selektivní kvantifikaci CBDs a Chol (viz retenční časy a APF, %) a je citlivá (tj. má nízké hodnoty LOD a LOQ) ve standardních roztocích. Důležité je, že navrhovaná metoda C18-HPLC-DAD umožňuje získat velmi dobrou přesnost nástřiku. Sledování různých absorpčních maxim jednotlivých analytů je velmi účinným nástrojem při kvantifikaci látek v biologických vzorcích. Některé práce uvádí pouze jednu zvolenou vlnovou délku, což lehce limituje kvantifikaci ve složitých biologických matricích (Križman, 2019). Chol a všechny testované CBDs byly stabilní (≥ 97,1 %) po dobu 48 h v roztocích methanolu, chráněny před světlem a skladovány při 4 °C, což odpovídá literatuře (Križman, 2019).

Tab. 3. Retenční časy analyzovaných CBDs, Chol, HPLCIS[a], kalibrační rovnice, linearita (koeficienty regrese; r), limity detekce (LOD), limity kvantifikace (LOQ), tailing faktory (TF) analyzovaných standard ve standardních roztocích s využitím C18-HPLC-DAD metody a nastaveným ternárním gradientovým elučním programem.

Analyt	Retenční čas, min (hodnota ± SD)	DAD detekce (nm)	Kalibrační rovnice [b] $y(\mu g) = a \times S_n$	r; Lineární regresní koeficient	LOD c ng/mL	LOQ c ng/mL	Tailing faktor (TF) píku d	DAD odpověď k 1 pg standardu
HPLCIS	9,25 ± 0,05	206	$y = 5{,}861 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9994	9,6 (79)	32,0 (263)	0,999	0,171
CBDV-A [e]	22,9 ± 0,1	221	$y = 8{,}165 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	20,6 (62)	60,8 (208)	0,998	12,2
		268	$y = 1{,}727 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9998	3,3 (10)	10,9 (33)	0,997	5,8
CBDV [f]	23,7 ± 0,1	205	$y = 4{,}467 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	14,7 (51)	49,1 (172)	0,998	22,4
		273	$y = 1{,}767 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9998	9,8 (34)	32,8 (115)	0,997	0,6
CBD-A [e]	27,1 ± 0,1	221	$y = 8{,}778 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	26,0 (73)	86,8 (242)	0,996	11,4
		268	$y = 1{,}876 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	4,2 (12)	13,9 (39)	0,996	5,3
CBG-A [e]	28,1 ± 0,1	220	$y = 8{,}168 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	27,4 (76)	91,5 (254)	0,998	12,2
		268	$y = 1{,}733 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	4,2 (12)	13,9 (39)	0,999	5,8
CBG [f]	28,5 ± 0,1	205	$y = 4{,}762 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	18,9 (60)	63,1 (199)	0,996	21,0
		273	$y = 2{,}137 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9999	14,2 (45)	47,5 (150)	0,997	0,5
CBD [f]	29,1 ± 0,1	205	$y = 4{,}617 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	19,5 (62)	65,1 (207)	0,998	21,7
		274	$y = 1{,}839 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9999	13,8 (44)	46,1 (146)	0,999	0,54
THCV [f]	29,4 ± 0,1	205	$y = 5{,}774 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	23,3 (81)	77,7 (271)	0,995	17,3
		278	$y = 2{,}139 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9999	15,4 (54)	51,4 (180)	0,996	0,47
THCV-A [e]	33,7 ± 0,1	220	$y = 1{,}007 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	45,2 (137)	150,8 (457)	0,996	9,9
		269	$y = 1{,}779 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	5,3 (16)	17,7 (53)	0,997	5,6
CBN [f]	34,6 ± 0,1	215	$y = 6{,}793 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	37,8 (122)	125,9 (405)	0,997	14,7
		284	$y = 1{,}247 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	1,3 (4,2)	4,3 (14)	0,996	8,0
Δ^9-THC [f]	39,0 ± 0,1	209	$y = 6{,}343 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	34,7 (110)	115,6 (368)	0,996	15,8
		279	$y = 2{,}492 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9965	21,4 (68)	71,2 (224)	0,996	0,4
Δ^8-THC [f]	39,8 ± 0,1	207	$y = 7{,}548 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	50,9 (162)	169,8 (540)	0,995	13,2
		279	$y = 2{,}833 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	35,8 (113)	119,3 (372)	0,995	3,5
CBN-A [e]	40,3 ± 0,1	262	$y = 7{,}270 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	0,4 (1,2)	1,4 (4,1)	0,996	13,8
		326	$y = 3{,}954 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	2,2 (6,6)	7,3 (22)	0,996	2,5
CBL [f]	42,0 ± 0,2	210	$y = 6{,}044 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9999	24,7 (78)	82,2 (261)	0,995	16,5
		278	$y = 1{,}743 \times 10^{-6} \times S_n$	0,9998	10,2 (32)	33,8 (106)	0,995	0,6
CBC [f]	43,0 ± 0,1	230	$y = 1{,}100 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	17,0 (54)	56,6 (180)	0,997	9,1
		279	$y = 2{,}723 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	2,0 (6,3)	6,6 (21)	0,996	3,7
Δ^9-THC-A [e]	43,9 ± 0,1	220	$y = 1{,}077 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	40,8 (114)	136,2 (380)	0,996	9,3

		271	$y = 1{,}927 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	4,2 (12)	14,1 (39)	0,995	5,2
CBC-A [e]	46,3 ± 0,1	199	$y = 1{,}394 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9996	36,1 (101)	120,3 (336)	0,995	7,2
		254	$y = 8{,}045 \times 10^{-8} \times S_n$	0,9997	0,4 (1,2)	1,5 (4,0)	0,994	12,4
CBL-A [e]	46,6 ± 0,1	227	$y = 1{,}969 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9999	43,5 (122)	145,1 (405)	0,994	5,1
		273	$y = 3{,}472 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9997	2,8 (7,9)	9,4 (26)	0,993	2,9
Chol	67,2 ± 0,3	205	$y = 1{,}120 \times 10^{-7} \times S_n$	0,9892	1444,6 (3736)	4815,2 (12454)	0,991	4,5

[a] Vnitřní standard (3,5-dimethylphenol): 56 µg HPLCIS bylo přidáváno do analyzovaného biologického vzorku; výsledný objem vzorků byl 1 ml. Rozsah hodnot HPLCIS: 20-60 µg HPLCIS v 1 mL kalibračních HPLCIS roztoků (rozsah nástřiku HPLCIS na C18 kolony: 0,4–1,2 µg/nástřik; objem nástřiku: 20 µL). [b] S_n-plochy píku látek s DAD analýzou; lineární regrese procházející 0,0; počet kalibračních bodů použitých v kalibraci: 6 (tj. 6 setů koncentrací HPLCIS, CBDs, a Chol standardů byly použity pro přípravu kalibrační přímky); rozsah objemu nástřiku standardů CBDs a Chol rozpuštěných v methanolu: 0,05–0,40 µg/nástřik. [c] LOD a LOQ hodnoty v závorkách jsou vyjádřeny v pmol/mm. [d] TF CBDs, HPLCIS a Chol píků. [e] CBDs ve formě kyselin (CBDS-A). [f] Neutrální CBDs (CBDs-N).



Obr. 7. C18-HPLC-DAD chromatogram pro 7 CBDs ve formě kyselin (CBDs-a), 9 neutrálních forem CBDs (CBDs-N), vnitřní standard HPLCIS a Chol v roztoku methanolu. Píky: IS, vnitřní standard (3,5-dimetylfenol); 1, kanabidivarinová kyselina (CBDV-A); 2, kanabidivarin (CBDV); 3, kanabidiolová kyselina (CBD-A); 4, kanabigerolová kyselina (CBG-A); 5, kanabigerol (CBG); 6, kanabidiol (CBD); 7, Δ^9-tetrahydrokankabidivarin (THCV); 8, Δ^9-tetrahydrokanabidivarinová kyselina (THCV-A); 9, kanabinol (CBN); 10, Δ^9-tetrahydrokanabinol (Δ^9-THC); 11, Δ^8-tetrahydrokanabinol (Δ^8-THC); 12, kanabinolová kyselina (CBN-A); 13, kanabicyklol (CBL); 14, kanabichromen (CBC); 15, Δ^9-tetrahydrokanabinolová kyselina (Δ^9-THC-A); 16, kanabichromenová kyselina (CBC-A); cholesterol (Chol).

2.3.4. Analýza standardů a vzorků pomocí HPLC-DAD

Charakteristiky a analýza čistých standardů včetně chromatogramu při zvolené vlnové délce byly uvedeny v kapitole 2.3.3., na obrázku 7 a v tabulce 3. Analytická metoda byla odzkoušena na rostlinném vzorku konopného semene a na vaječném žloutku. Vhodně nastavené podmínky extrakce látek ze vzorku, včetně parametrů C18-HPLC-DAD analytické metody, vedly k úspěšné kvantifikaci látek ve vzorku. Jelikož byla metoda rozšířena a detailně validována na širší rozsah vzorků rostlinného a živočišného původu, je detailně popsána v kapitole 3 (Metoda C18-HPLC-DAD pro analýzu kanabinoidů a cholesterolu ve vzorcích různého původu). Ve srovnání s výše popsanou GC-MS metodou je příprava vzorků pro analýzu méně časově náročná a čas analýzy pro analýzu všech forem CBDs (CBDs-A a CBDs-N) je kratší. Metoda GC-MS na rozdíl od HPLC-DAD poskytuje vyšší citlivost a možnost kvantifikace velmi nízkých koncentrací látek ve vzorku. Díky knihovnám hmotnostních spekter je přesnější vyhodnocování naměřených chromatogramů. Zároveň pak díky kvalitnější separaci na kapilární GC-MS koloně, umožňuje separaci vyššího množství CBDs.

2.4. Příprava vzorků pro GC-MS a HPLC-DAD analytické metody

Příprava vzorků živočišného původu jako je např. biologická tkáň nebo vaječný žloutek zahrnovala čtyři extrakce n-hexanem. Ke vzorkům (0,8–1,2 g) bylo přidáno 3,5 ml n-hexanu a 50 µL roztoku GCIS (před GC analýzami) nebo 20 µl roztoku HPLCIS (před HPLC analýzami) a v případě vaječného žloutku 0,8–1,2 ml vody (tj. 100 µL vody/100 mg vzorku žloutku). Výsledná směs byla intenzivně míchána po dobu 30-40 min pomocí třepačky (800 ot./min). Před odstraněním horní n-hexanové vrstvy byla směs centrifugována při 4–5 °C (~5 minut; 3500 ot./min; r = 9 cm) a supernatant byl poté přenesen do samostatné zkumavky. Následně bylo ke zbytku přidáno 3,5 ml n-hexanu a extrakční postup s třepáním byl ještě jednou opakován. Poté bylo k získanému zbytku přidáno 3,5 ml n-hexanu. Výsledná směs byla ponechána v ultrazvukové lázni po dobu 30–40 min při ~20 °C. Směs byla odstředěna při 4–5 °C (~5 min; 3500 ot./min; r = 9 cm) a následně byla n-hexanová vrstva přenesena do zkumavky určené pro sběr supernatantu. K výslednému zbytku bylo opět přidáno 3,5 ml n-hexanu a extrakce v ultrazvukové lázni byla ještě jednou opakována. Nakonec byly všechny vrchní hexanové vrstvy spojeny a n-hexan byl odstraněn pod N_2; zbytek byl skladován při -78 °C až do dalšího zpracování. Zbytek se znovu rozpustil přímo před chromatografickými analýzami (tj. GC-MS a HPLC) v 1 ml n-hexanu (pro GC-MS analýzy) nebo 1 ml HPLC-grade methanolu (pro C18-HPLC-DAD analýzy). Stejný předkolonový postup (skládající se ze čtyř n-hexanových extrakcí) by měl být aplikován na homogenizované čerstvé zvířecí tkáně (kvůli přítomnosti cholesterolu). U vzorků rostlinného původu jako jsou komponenty krmných směsí nebo krmné směsi byly vzorky jemně rozdrceny (~500 mg) s 3,5 ml methanolu a 50 µl roztoku GCIS (před GC analýzami) nebo 20 µl roztoku HPLCIS (před analýzami HPLC). Výsledná směs byla intenzivně míchána po dobu 30–40 min pomocí třepačky (800 ot./min). Směs byla odstřeďována po dobu ~3 min při ~20 °C (13000 ot./min; r = 3 cm) a byl odebrán supernatant. Dále bylo k získanému zbytku přidáno 3,5 ml methanolu a extrakční postup v třepačce byl ještě jednou opakován. Nakonec bylo k výslednému zbytku přidáno 3,5 ml n-hexanu. Získaná směs byla sonifikována po dobu 30–40 min při ~20 °C. Směs byla odstředěna po dobu ~3 min při ~20 °C (13000 ot./min; r = 3 cm) a byl odebrán supernatant. Poté bylo ke zbytku přidáno 3,5 ml n-hexanu a extrakce v ultrazvukové lázni byla ještě jednou opakována. Nakonec byly všechny methanolové a n-hexanové vrstvy spojeny a organická rozpouštědla byla odstraněna pod proudem N_2 a skladována při -78 °C do dalšího zpracování. Přímo před chromatografickými analýzami (tj. GC-MS a HPLC) byl zbytek znovu rozpuštěn v 1 ml n-hexanu (pro GC-MS analýzy) nebo 1 ml methanolu (pro C18-HPLC-DAD analýzy). Vzorek byl pro GC-MS anaýzu použit a výsledná hodnota CBDs-A a CBDs-N. Následně bylo 500 µl roztoku n-hexanu obsahujícího CBDs intenzivně extrahováno po dobu 1–2 min 500 µl vodného

0,1 M roztoku NaOH. Po intenzivní extrakci byla horní hexanová vrstva přenesena do GC vialky. Kvantifikace CBDs-N v odebraném supernatantu byla provedena pomocí programu teplotního gradientu v GC-MS. Vodná spodní vrstva pak obsahovala CBDs-A.

3. Metoda C18-HPLC-DAD pro analýzu kanabinoidů a cholesterolu ve vzorcích různého původu

3.1. Popis analyzovaných vzorků

Pro analýzu C18-HPLC-DAD bylo použito osm různých biologických vzorků: [1] konopná semena odrůdy *Cannabis sativa* L. Futura-(1) (Agritec Plant Research s.r.o. Šumperk, Česká republika); [2] konopná biomasa-(2) (odpadní produkt po čištění semen konopí obsahující semena a části rostlin; směs odrůd Biolobrzeski, Santhica a Futura v poměru 10:10:40; Biohemp s.r.o. Praha, Česká republika); [3] konopná biomasa-(3) (odrůda Futura; Biohemp s.r.o. Praha, Česká republika); [4] krmná směs-(4) pro brojlerová kuřata s obsahem 9 % konopné biomasay-(2); [5] krmná směs-(5) pro nosnice s obsahem 9 % konopné biomasy-(3); [6] vzorek kuřecího masa-(6) (maso brojlerových kuřat krmených krmivem odpovídajícím složení krmné směsi-(4)); [7] vzorek vaječného žloutku-(7) (vejce nosnic krmených krmnou směsí-(5)) a [8] vzorek trusu-(8) (výkaly brojlerových kuřat krmených krmnou směsí (5) byly v celém experimentu krmeny brojlery s krmnou směsí (5)). Ve věku 35 dnů byl experiment s kuřaty ukončen a pro analýzu bylo odebráno maso z prsou (Pectoralis major). Vzorek trusu z pokusu s brojlerovými kuřaty byl odebrán 5 dní před koncem experiment. Nosnice byly krmeny odpovídající krmnou směsí po dobu 9 týdnů přes odebráním vzorku žloutku.

3.2. Validace HPLC-DAD metody pro různé biologické materiály

Analýza vzorků a validace metody byla provedena metodou C18-HPLC-DAD s uvedenými parametry přístroje popsanými v kapitole 2.3. Koncentrace jednotlivých CDBs nebo Chol v biologických materiálech [1-8] byly analyzovány ve čtyřech opakování a vypočteny jako průměr, přičemž byla vypočtena směrodatná odchylka (průměr ± SD) (Tab. 4). Přesnost (intra a inter-assay variační koeficienty) metody a chromatografické analýzy CBDs a Chol v biologických materiálech [1-8], byla vypočtena na základě osmi postupů příprav biologických vzorků a poté nástřiků zpracovaného vzorku (intra-assay a inter-assay opakovatelnost; ^{Intra}RSD, %, ^{Inter}RSD, %) (Tab. 5, 6). Účinnost extrakce (E, %; tab. 7) byla vypočtena na základě čtyř extrakcí použitých v postupu přípravy vzorku ($I_{extrakce}$) a poté dvou extra extrakčních postupech ($^{extra}I_{extrakce}$ a $^{extra}II_{extrakce}$), zahrnující každý z těchto čtyř extrakčních kroků. Účinnost extrakce (E, %) byla tedy vypočtena následovně:

$$E, \% = (I_{extrakce}/(I_{extrakce} + {}^{extra}I_{extrakce} + {}^{extra}II_{extrakce})) \times 100\%$$

Přesnost metody byla také testována přidáním známých množství CBDs a Chol standardů k testovaným biologickým materiálům a výpočtem procentuálního výtěžku (R, %) (Tab. 7). Procentuální výtěžek metody byl vypočten následovně:

$$R, \% = (({}^{F}S_n - {}^{o}S_n) \times 100\%)/{}^{Standard}S_n,$$

kde ${}^{o}S_n$ and ${}^{F}S_n$ jsou měření (jako plochy píku) před a po přidání kanabinoidu nebo standardu Chol do analyzovaných biologických vzorků, v daném pořadí; a ${}^{Standard}Sn$ je množství (jako plocha píku) přidaného kanabinoidu nebo standardu Chol do analyzovaných biologických vzorků. Dosažené výsledky (Tab. 5, 6) ukazují, že metoda C18-HPLC-DAD pro analýzu CBDs v testovaných biologických materiálech dosahuje dostatečné přesnosti a opakovatelnosti (${}^{Intra}RSD$ a ${}^{Inter}RSD$, %). Výsledky shrnuté v tabulce 7 ukazují, že náš laboratorní postup přípravy zajistil uspokojivou účinnost extrakce CBDs (75,7 % ≤ E, % ≤ 100 %) a tabulka 8 výtěžnost (74,3 % ≤ R, % ≤ 136,1 %) z rostlinných [1-5] a živočišných [6-8] materiálů. Tabulka 9 uvádí koncentrace volného Chol ve vzorcích živočišného původu včetně všech validačních parametrů. Stanovení volného Chol v těchto vzorcích bylo následně srovnáno s používanou metodou GC-FID pro stanovení celkového Chol. Výsledky ukazují, že byla vyvinuta originální metoda C18-HPLC-DAD pro analýzu fyziologicky významných CBDs (sedm CBDs-A a devět CBDs-N) a volného Chol ve vzorcích rostlin a zvířat. Methanol a n-hexan se ukázaly být vhodnými rozpouštědly pro kvantitativní extrakci analyzovaných CBDs-A a CBDs-N, které se vyskytují v testovaných biologických vzorcích v širokém koncentračním rozmezí, s použitím co nejnižšího poměru konečného objemu k hmotnosti zpracovaných biologických vzorků. Důležité je, že pro účinnou extrakci Chol a CBDs ze vzorků živočišného původu se doporučují čtyři extrakce n-hexanem. Koncentrace Chol v rostlinných materiálech jsou obvykle velmi nízké.

Tab. 4. Koncentrace[a] (µg/g) CBDs ve vybraných 8 biologických vzorcích [1-8] (rostlinný a živočišný materiál); průměrné hodnoty 4 opakování[b].

Analyt	**[c] Konopné semeno Futura-(1)**	**[c] Konopná biomasa-(2)**	**[c] Konopná biomasa-(3)**	**[c] Krmná směs-(4)**	**[c] Krmná směs-(5)**	**Kuřecí maso-(6)**	**Vajčný žloutek-(7)**	**[d] Kuřecí trus-(8)**
CBDV-A	0,645 ± 0,022	113,1 ± 2,2	69,9 ± 2,8	11,6 ± 0,7	3,38 ± 0,12	0,054 ± 0,000	0,032 ± 0,002	0,275 ± 0,007
CBDV	1,55 ± 0,03	114,5 ± 11,8	23,8 ± 0,7	12,1 ± 0,8	6,36 ± 0,26	0,020 ± 0,002	n.d.	1,06 ± 0,05
CBD-A	46,3 ± 2,4	3195,4 ± 69,8	3073,0 ± 46,1	396,6 ± 23,1	126,9 ± 4,5	0,202 ± 0,001	0,352 ± 0,029	20,4 ± 0,3
CBG-A	2,14 ± 0,07	521,3 ± 7,4	64,2 ± 3,5	92,5 ± 6,0	6,62 ± 0,44	0,034 ± 0,003	0,024 ± 0,001	3,51 ± 0,34
CBG	1,82 ± 0,10	935,9 ± 20,2	29,1 ± 0,3	47,4 ± 4,5	1,98 ± 0,20	n.d.	0,026 ± 0,002	1,11 ± 0,04
CBD	9,14 ± 0,23	4530,8 ± 86,5	1418,3 ± 31,6	236,6 ± 14,8	102,1 ± 4,3	n.d.	0,235 ± 0,013	5,63 ± 0,38
Δ^9-THCV	n.d.[c]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^9-THCV-A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN	n.d.	74,9 ± 2,1	21,8 ± 0,6	2,07 ± 0,12	1,58 ± 0,08	n.d.	0,018 ± 0,002	0,308 ± 0,007
Δ^9-THC	0,226 ± 0,017	434,8 ± 6,9	54,3 ± 0,5	37,3 ± 2,12	3,69 ± 0,20	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^8-THC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN-A	0,099 ± 0,007	7,09 ± 0,58	11,5 ± 0,6	1,36 ± 0,10	0,444 ± 0,040	n.d.	n.d.	0,395 ± 0,006
CBL	n.d.	67,2 ± 1,5	14,0 ± 0,9	2,74 ± 0,13	1,17 ± 0,04	n.d.	n.d.	n.d.
CBC	0,964 ± 0,035	692,3 ± 4,4	110,1 ± 4,1	4,21 ± 0,45	6,96 ± 0,73	0,063 ± 0,001	0,103 ± 0,009	1,75 ± 0,04
Δ^9-THC-A	0,657 ± 0,039	39,5 ± 2,2	44,4 ± 1,8	8,82 ± 0,70	0,796 ± 0,080	0,089 ± 0,007	0,119 ± 0,008	0,732 ± 0,016
CBC-A	2,48 ± 0,15	252,7 ± 11,9	129,3 ± 6,7	39,9 ± 2,8	7,12 ± 0,42	0,028 ± 0,001	n.d.	2,72 ± 0,04
Celkový obsah CBDs	66,0	10979,6	5063,6	893,1	269,1	0,490	0,909	37,9

[a] Koncentrace CBDs se směrodatnými odchylkami (±SD) v analyzovaných biologických materiálech [1-8] byly stanoveny pomocí UV-vlnové délky (λ) uvedené v tabulce 3. [b] Počet opakování: 4 (tj. 4 předkolonové přípravy stejného vzorku a poté samostatnýnástřik vzorku). [c] Koncentrace volného CHol byla pod limitem detekce (LOD). [d] Vzorek trusu byl lyofilizovaný; obsah sušiny by 25,93 %. [c] n.d.-látka nebyla detekována.

Tab. 5. Stanovení[a] intra-assay variačních koeficientů, % ([Intra]RSD, %)[b] koncentrací CBDs ve vybraných rostlinných a živočišných materiálech pro posouzení opakovatelnosti při stejných podmínkách v jednom dni.

Analyt	**Konopné semeno Futura-(1)**	**Konopná biomasa-(2)**	**Konopná biomasa-(3)**	**Krmná směs-(4)**	**Krmná směs-(5)**	**Kuřecí maso-(6)**	**Vajčný žloutek-(7)**	**Kuřecí trus-(8)**
CBDV-A	3,40 (268 nm)	1,97 (268 nm)	3,94 (268 nm)	5,87 (268 nm)	3,39 (268 nm)	0,66 (268 nm)	7,39 (268 nm)	2,54 (268 nm)
CBDV	2,07 (273 nm)	10,29 (205 nm)	3,02 (205 nm)	6,33 (205 nm)	4,09 (205 nm)	8,75 (205 nm)	n.d.	4,29 (205 nm)
CBD-A	5,21 (221 nm)	2,18 (221 nm)	1,50 (268 nm)	5,82 (268 nm)	3,54 (268 nm)	0,66 (268 nm)	8,33 (268 nm)	1,55 (268 nm)
CBG-A	3,03 (220 nm)	1,42 (220 nm)	5,51 (220 nm)	6,51 (268 nm)	6,71 (268 nm)	8,32 (268 nm)	5,40 (268 nm)	9,60 (268 nm)
CBG	5,60 (273 nm)	2,15 (205 nm)	1,08 (205 nm)	9,55 (205 nm)	9,84 (205 nm)	n.d.	6,32 (205 nm)	3,22 (205 nm)
CBD	2,54 (205 nm)	1,91 (274 nm)	2,23 (274 nm)	6,27 (274 nm)	4,22 (274 nm)	n.d.	5,50 (205 nm)	6,71 (205 nm)
Δ^9-THCV	n.d.[c]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^9-THCV-A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN	n.d.	2,78 (215 nm)	2,66 (215 nm)	5,76 (215 nm)	5,09 (284 nm)	n.d.	8,05 (284 nm)	2,11 (284 nm)
Δ^9-THC	7,46 (209 nm)	1,58 (209 nm)	0,93 (209 nm)	5,67 (209 nm)	5,29 (209 nm)	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^8-THC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN-A	7,14 (262 nm)	8,14 (262 nm)	5,53 (262 nm)	7,01 (262 nm)	8,92 (262 nm)	n.d.	n.d.	1,56 (262 nm)
CBL	n.d.	2,15 (210 nm)	6,31 (210 nm)	4,77 (210 nm)	3,34 (210 nm)	n.d.	n.d.	n.d.
CBC	3,64 (279 nm)	0,64 (279 nm)	3,71 (279 nm)	10,80 (279 nm)	10,51 (279 nm)	2,26 (279 nm)	9,00 (279 nm)	2,06 (279 nm)
Δ^9-THC-A	6,00 (271 nm)	5,47 (271 nm)	3,98 (210 nm)	7,96 (210 nm)	9,99 (271 nm)	8,15 (271 nm)	6,60 (271 nm)	2,15 (271 nm)
CBC-A	5,93 (254 nm)	4,72 (254 nm)	5,14 (254 nm)	6,89 (254 nm)	5,89 (254 nm)	3,13 (254 nm)	n.d.	1,51 (254 nm)

[a] DAD sledovaná vlnová délka (λ, nm) detekovaných CBDs je uvedena v závorkách. [b] Počet opakování: 4 (tj. čtyři nástřiky stejného vzorku připravený stejným předkolonovým postupem přípravy). [c] n.d.-látka nebyla detekována.

Tab. 6. Stanovení[a] inter-assay variačních koeficientů, % ([Inter]RSD, %)[b] koncentrací CBDs ve vybraných rostlinných a živočišných materiálech pro posouzení opakovatelnosti v různých dnech.

Analyt	**Konopné semeno Futura-(1)**	**Konopná biomasa-(2)**	**Konopná biomasa-(3)**	**Krmná směs-(4)**	**Krmná směs-(5)**	**Kuřecí maso-(6)**	**Vajčný žloutek-(7)**	**Kuřecí trus-(8)**
CBDV-A	7,44	5,43	13,49	8,90	14,13	3,37	2,48	11,29
CBDV	8,77	10,24	14,90	0,09	7,28	14,98	n.d.	1,87
CBD-A	2,88	2,81	13,20	6,92	14,12	19,67	12,77	1,13
CBG-A	5,16	4,53	16,87	9,67	13,55	3,03	6,16	0,45
CBG	2,00	7,90	15,36	4,59	13,01	n.d.	0,61	7,65
CBD	3,39	5,74	13,93	3,79	10,58	n.d.	6,78	4,31
Δ^9-THCV	n.d.[c]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^9-THCV-A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN	n.d.	4,72	14,58	1,49	12,77	n.d.	6,02	2,81
Δ^9-THC	2,63	5,28	12,99	5,24	1,38	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^8-THC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN-A	2,91	10,34	15,57	7,28	15,83	n.d.	n.d.	5,41
CBL	n.d.	2,70	12,88	3,55	8,80	n.d.	n.d.	n.d.
CBC	5,43	5,92	13,76	2,82	8,19	16,38	7,70	2,53
Δ^9-THC-A	3,78	0,88	11,40	6,59	14,88	18,48	9,90	2,46
CBC-A	4,35	5,58	14,94	7,85	14,27	13,10	n.d.	3,52

[a] DAD sledovaná vlnová délka (λ, nm) stejná jako v tabulce 5. [b] Počet opakování: 8 (tj. čtyři nástřiky stejného vzorku připravený stejným předkolonovým postupem přípravy v jednom dni a čtyři nástřiky vzorky připravené v jiném dni). [c] n.d.-látka nebyla detekována.

Tab. 7. Účinnost extrakce (E, %)[a] látek z analyzovaných biologických vzorků vypočtené na základě stanovení koncentrace[b] CBDs ve vzorku

Analyt	**Konopné semeno Futura-(1)**	**Konopná biomasa-(2)**	**Konopná biomasa-(3)**	**Krmná směs-(4)**	**Krmná směs-(5)**	**Kuřecí maso-(6)**	**Vajčný žloutek-(7)**	**Kuřecí trus-(8)**
CBDV-A	100,0	92,4	89,6	96,1	94,2	94,0	92,1	90,6
CBDV	100,0	97,3	95,5	95,8	95,4	94,0	n.d.	95,6
CBD-A	93,0	87,5	94,0	97,4	95,6	96,7	91,9	84,7
CBG-A	93,8	90,9	94,7	97,9	96,9	89,4	92,2	88,0
CBG	97,6	99,7	98,9	99,7	99,6	n.d.	92,2	99,0
CBD	97,4	98,4	98,4	99,8	99,5	n.d.	91,8	97,2
Δ^9-THCV	n.d.[c]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^9-THCV-A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN	n.d.	98,3	98,7	100,0	98,9	n.d.	92,3	80,7
Δ^9-THC	94,3	98,2	97,3	99,8	92,1	n.d.	n.d.	n.d.
Δ^8-THC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CBN-A	99,8	98,5	87,7	95,8	92,9	n.d.	n.d.	84,9
CBL	n.d.	98,5	98,7	93,5	91,3	n.d.	n.d.	n.d.
CBC	96,3	98,7	98,7	96,7	99,0	95,8	94,2	86,5
Δ^9-THC-A	96,7	79,5	91,9	97,7	90,6	97,8	95,6	86,8
CBC-A	99,2	75,7	90,9	98,3	96,4	92,2	n.d.	89,8

[a] E, % byla vypočtena na základě 4 extrakcí CBDs předkolonovou extrakční metodou a poté dvěmi dalšími extra sety 4 extrakcí. [b] Koncentrace CBDs ve stanovených biologických vzorcích byla stanovena s využitím UV-vlnových délek (λ) jako v tabulce 4. [c] n.d.-látka nebyla detekována.

Tab. 8. Výtěžnost[a] (R, %) 2,5 µg[b] CBDs standardů přidaných do analyzovaných biologických materiálů.

Analyt	**Konopné semeno Futura-(1)**	**Konopná biomasa-(2)**	**Konopná biomasa-(3)**	**Krmná směs-(4)**	**Krmná směs-(5)**	**Kuřecí maso-(6)**	**Vajčný žloutek-(7)**	**Kuřecí trus-(8)**
CBDV-A	79,2 (268 nm)	91,2 (268 nm)	97,1 (268 nm)	101,2 (268 nm)	88,8 (268 nm)	88,1 (268 nm)	86,8 (268 nm)	86,6 (268 nm)
CBDV	82,9 (205 nm)	97,3 (205 nm)	89,9 (205 nm)	104,4 (205 nm)	91,2 (205 nm)	87,0 (205 nm)	85,7 (205 nm)	91,5 (205 nm)
CBD-A	104,0 (221 nm)	121,0 (221 nm)	105,5 (268 nm)	100,6 (268 nm)	113,3 (268 nm)	90,2 (268 nm)	87,1 (268 nm)	104,8 (268 nm)
CBG-A	74,3 (220 nm)	96,2 (220 nm)	100,9 (220 nm)	97,4 (268 nm)	113,4 (268 nm)	94,2 (268 nm)	86,3 (268 nm)	112,7 (268 nm)
CBG	87,7 (205 nm)	110,0 (205 nm)	88,1 (220 nm)	111,6 (205 nm)	89,2 (205 nm)	94,0 (205 nm)	89,6 (205 nm)	106,1 (205 nm)
CBD	84,0 (205 nm)	112,9 (274 nm)	100,3 (274 nm)	107,4 (274 nm)	96,4 (274 nm)	87,5 (205 nm)	82,4 (205 nm)	103,2 (205 nm)
Δ^9-THCV	96,4 (205 nm)	92,4 (205 nm)	100,7 (205 nm)	89,2 (205 nm)	103,0 (205 nm)	108,6 (278 nm)	103,8 (278 nm)	112,7 (205 nm)
Δ^9-THCV-A	81,0 (220 nm)	93,2 (220 nm)	94,3 (220 nm)	91,0 (220 nm)	94,4 (220 nm)	96,1 (220 nm)	89,5 (220 nm)	101,9 (220 nm)
CBN	68,4 (215 nm)	98,2 (284 nm)	80,8 (215 nm)	88,8 (215 nm)	88,4 (215 nm)	87,6 (215 nm)	78,4 (284 nm)	92,2 (215 nm)
Δ^9-THC[c]	101,3 (209 nm)	104,6 (209 nm)	136,1 (209 nm)	104,8 (209 nm)	112,1 (209 nm)	86,4 (209 nm)	102,0 (279 nm)	79,4 (279 nm)
Δ^8-THC	91,8 (207 nm)	99,8 (207 nm)	94,3 (207 nm)	101,6 (207 nm)	91,8 (207 nm)	104,4 (207 nm)	105,4 (279 nm)	101,2 (207 nm)
CBN-A	81,0 (262 nm)	89,8 (262 nm)	92,2 (262 nm)	97,6 (262 nm)	86,7 (262 nm)	88,8 (262 nm)	92,5 (262 nm)	87,9 (262 nm)
CBL	87,5 (210 nm)	89,7 (210 nm)	91,8 (210 nm)	91,4 (210 nm)	85,0 (210 nm)	95,6 (210 nm)	93,0 (210 nm)	110,0 (278 nm)
CBC	90,0 (279 nm)	101,6 (279 nm)	112,3 (279 nm)	97,0 (279 nm)	96,7 (279 nm)	100,2 (279 nm)	98,1 (279 nm)	96,9 (279 nm)
Δ^9-THC-A	79,8 (271 nm)	88,0 (271 nm)	99,1 (271 nm)	102,5 (271 nm)	88,2 (271 nm)	91,2 (271 nm)	85,6 (271 nm)	96,8 (271 nm)
CBC-A	79,2 (254 nm)	91,2 (254 nm)	97,1 (254 nm)	101,2 (254 nm)	88,8 (254 nm)	88,1 (254 nm)	86,8 (254 nm)	86,6 (254 nm)

[a] DAD-sledovaná vlnová délka (λ, nm) je uvedena v závorkách. [b] Množství přidaných CBDs standardů bylo 2,5 ug s vyjímkou Δ^9-THC. [c] 0,25 µg Δ^9-THC bylo přidáno k biologickým vzorkům.

Tab. 9. Koncentrace volného a celkového Chol ve zpracovaných vzorcích živočišného původu

Analyt	**Kuřecí maso-(6)**	**Vaječný žloutek-(7)**	**Kuřecí trus-(8)[a]**
Obsah volného Chol (mg/g) analyzované C18-HPLC-DAD[b]	0,279 ± 0.006	9,82 ± 0.21	0,627 ± 0.034
Intra assay variační koeficient (^{Intra}RSD, %); 4 opakování	2,08	2,09	5,39
Inter assay variační koeficient (^{Inter}RSD, %); 8 opakování	7,74	4,00	5,63
Účinnost extrakce volného Chol (E, %)[b]	62,7	98,9	98,8
Výtěžnost metody (R, %)[c]	109,4	101,2	105,8
Obsah (mg/g) celkového Chol analyzováno pomocí GC-FID methody[d]	1,227	12,88	0,926

[a] Vzorek trusu byl lyofilizován; obsah sušiny byl 25,93%. [b] E, % byla vypočtena na základě 4 extrakcí CBDs předkolonovou extrakční metodou a poté dvěmi dalšími extra sety 4 extrakcí. [c] Výtěžnost 0,215 mg of Chol přidaného do biologických vzorků. [d] Vzorky pro stanovení cholesterolu v mase, žloutku a trusu, lipidy byly zmýdelněny a nezmýdelněná hmota byla extrahována diethyletherem v souladu s ISO 3596:2011. Silylové deriváty byly připraveny pomocí trimethylsilylových (TMCS) a hexamethyldisilazanových (HMDS) silylačních činidel (Sigma-Aldrich, Česká republika) a analyzovány na plynovém chromatografu vybaveném plamenově ionizačním detektorem a kapilární kolonou (sériové číslo US 1621146H; číslo dílu 19091-413; kolona 30 m × 0,32 mm i.d., 0,25 µm tloušťka vrstvy; Agilent J&W HP-5; USA), který byl provozován izotermicky při 285 °C (objem nástřiku: 1 µl).

Závěr

Byly zavedeny a validovány analytické metody pro kvantifikaci fyziologicky nejvýznamnějších CBDs v různých vzorcích biologického původu. Součástí metod byla také možnost kvantifikace volného Chol. Mezi použité analytické metody byly zařazeny GC-MS a HPLC-DAD, které jsou v současné době velice rozšíené a používané v analytické praxi. Metoda GC-MS zahrnovala analýzu 17 CBDs a metoda HPLC-DAD zahrnovala analýzu 16 CBDs. Lepší separace látek na kapilární koloně GC-MS umožňovala analýzu vyššího množství CBDs. Nejdůležitější vědeckou novinkou současné studie bylo využití kapilární GC-MS analytické metody pro kvantifikaci nederivatizovaných CBD-N, CBD-A a Chol v biologických materiálech. Dalším významným vědeckým pokrokem této studie bylo použití předkolonové extrakce roztokem NaOH k odstranění CBDs-A přítomných v analyzovaných vzorcích. Tato originální metoda GC-MS může být použita pro jednoduchou a selektivní kvantifikaci stopových koncentrací nederivatizovaných CBDs a Chol v biologických materiálech bohatých na endogenní složky. Metoda GC-MS může pak mít větší použitelnost pro rutinní analýzu stopových množství nederivatizovaných CBDs-N, CBDs-A nebo/a Chol v biologických vzorcích ve srovnání s kapalinovou chromatografií, jako je HPLC/UHPLC nebo HILIC s reverzní fází. Pro budoucí studie je možné navrhnout implementaci delší kapilární GC kolony (např. 60 m) a techniky GC-MS/MS pro stanovení nederivatizovaných CBDs, Chol a možnou analýzu oxidovaného Chol (Ox-Chol) v živočišných tkáních (zejména bohatých na Chol) a nederivatizovaných rostlinných materiálech, jako je konopí. Tyto nové analytické techniky mohou zlepšit selektivitu, citlivost, přesnost a přesnost kvantifikace CBDs, Chol a Ox-Chol v biologických vzorcích (zejména ve vzorcích zvířat). Zároveň byly navrženy originální předkolonové postupy extrakce vzorku pro metodu C18-HPLC-DAD pro současnou analýzu fyziologicky významných CBDs (sedm CBDs-A a devět CBDs-N) a volného Chol ve vzorcích rostlin a zvířat. Methanol a n-hexan se ukázaly být vhodnými rozpouštědly pro kvantitativní extrakci analyzovaných CBDs, které se vyskytují v testovaných biologických vzorcích v širokém koncentračním rozmezí, s použitím co nejnižšího poměru konečného objemu k hmotnosti zpracovaných biologických vzorků. Pro účinnou extrakci Chol a CBDs ze vzorků živočišného původu se doporučují čtyři extrakce n-hexanem. Koncentrace Chol v rostlinných materiálech jsou obvykle velmi nízké. Navržené postupy přípravy vzorku, následované originální C18-kapalinou chromatografií s optimalizovaným monitorováním DAD umožnily současnou kvantifikaci CBDs-A a CBDs-N a také volného Chol v rostlinných a živočišných materiálech. Citlivá a selektivní kvantifikace CBDs je důležitá, zejména v potravinářských

produktech, protože přesné monitorování psychotropních forem CBDs (jako je např. Δ^9-THC) je obzvláště důležité. Detailní validace standardních látek u GC-MS a HPLC-DAD analytické metody včetně detailní validace na různé biologické materiály u metody HPLC-DAD byla popsána v této studii a je důležitým ukazatelem použitých analytických postupů. Obě použité analytické metody s sebou nesou jak výhody, tak nevýhody, mezi které je možné zařadit různou časovou náročnost při přípravě vzorků a samotné chromatografické analýze, tak i citlivost a účinnost separace daných analytických metod.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory projektu MZE-RO0723.

Literatura

Alonso-Esteban, J. I., Pinela, J., Ćirić, A., Calhelha, R. C., Soković, M., Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Torija-Isasa, E., & Sánchez-Mata, M. (2021). Chemical composition and Biological activities of whole and dehulled hemp (Cannabis sativaL.) seeds. Food Chemistry, 374, 131754.

Antunes, M., Barroso, M., & Gallardo, E. (2023). Analysis of Cannabinoids in Biological Specimens: An Update. International Journal of Environmental Research Public Health, 20(3), 2312.

Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2020). Antioxidative and anti-inflammatory properties of cannabidiol. Antioxidants, 9, 21.

Bow, E. W., & Rimoldi, J. M. (2016). The structure-function relationships of classical cannabinoids: CB1/CB2 modulation. Perspectives in Medicinal Chemistry, 8, 17-39.

Cardenia, V., Toschi, T. G., Scappini, S., Rubino, R. C., & Rodriguez-Estrada M. T. (2018). Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in Cannabis sativa L. Journal of Food and Drug Analysis, 26, 1283-1292.

Cerino, P., Buonerba, C., Cannazza, G., D´Auria, J., Ottoni, E., Fulgione, A., Di Stasio, A., Biancamaria, P., & Gallo, A. (2022). A review of hemp as food and nutritional supplement. Cannabis and Cannabinoid Reseasch, 6(1), 19-27.

Chakrabarty, S., Serum, E. M., Winders, T. M., Neville, B., Kleinhenz, M. D., Magnin, G., Coetzee, J. F., Dahlen, C. R. Swanson, K. C., & Smith, D. J. (2022). Rapid quantification of cannabinoids in beef tissues and bodily fluids using direct-delivery electrospray

ionization mass spectrometry. Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 39(10), 1705-1717.

Citti, C.; Braghiroli, D.; Vandelli, M. A.; Cannazza, G. (2018). Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. J. Pharm. Biomed. Anal., 147, 565–579.

Cota, D., Marsicano, G., Tschöp, M., Flachskamm, C., Schubert, M., Dorothee, A., Yassouridis, A., Thöne-Reineke, Ch., Ortmann, S., Tomassoni, F., Cervino, C., Nisoli, E., Linthorst, A. C. E., Pasquali, R., Lutz, B., Stalla, G. K., Pagotto, U. (2003). The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis, Journal of Clinical Investigation, 112, 423-431.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) (2015). Scientific Opinion on the risks for human health related to the presence of tetrahydrocannabinol (THC) in milk and other food of animal origin. EFSA Journal, 13, 4141.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2011). Scientific Opinion on the safety of hemp (Cannabis genus) for use as animal feed. EFSA Journal, 9, 41.

Farinon, B., Molinari, R., Constantini, L., Merendino, N. (2020). The seed of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.): Nutritional quality and potential functionality for human health and nutrition. Nutrients 12, 1935.

Gakhar, N., Goldberg, E., Jing, M., Gibson, R., & House, J. D. (2012). Effect of feeding hemp seed and hemp seed oil on laying hen performance and egg yolk fatty acid content: Evidence of their safety and efficacy for laying hen diets. Poultry Science, 91(3), 701-711.

Ji, A., Jia, L., Kumar, D., & Yoo, Ch. G. (2021). Recent advancements in Biological conversion of industrial hemp for biofuel and value-added products. *Fermentation,* 7(1), 6.

Jurgoński, A., Opyd, P. M., & Fotschki, B. (2020). Effects of native or partially defatted hemp seeds on hindgut function, antioxidant status and lipid metabolism in diet-induced obese rats. Journal of Functional Foods, 72, 104071.

Križman, M. (2020). A simplified approach for isocratic HPLC analysis of cannabinoids by fine tuning chromatographic selectivity. *European Food Research and Technology*, 246, 315-322.

Lazarte, J., Hegele, R. A. (2019). Cannabis effects on lipoproteins, *Current Opinion in Lipidology*, 30, 140-146.

Neijat, M., Suh, M., Neufeld, J., & House, J. D. (2016). Hempseed products fed to hens effectively increased n-3 polyunsaturated fatty acids in total lipids, triacylglycerol and phospholipid of egg yolk. Lipids, 51(5), 601-614.

Pen, H., & Shahidi, F. (2021). Cannabis and Cannabis Edibles: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69(6), 1751-1774.

Pourseyed Lazarjani, M., Torres, S., Hooker, T., Fowlie, Ch., Young, O., Seyfoddin, A. (2020). Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review. Journal of Cannabis Research, 2, 35.

Porcu, A., Melis, M., Turecek, R., Ullrich, C., Mocci, I., Bettler, B., Gessa, G. L., Castelli, M. P. (2018). Rimonabant, a potent CB1 cannabinoid receptor antagonist, is a Gαi/o protein inhibitor, *Neuropharmacology*, 1, 107-120.

Rock, E. M., & Parker, L. A. (2021). Constituents of Cannabis sativa. Advances in Experimental Medicine and Biology, 1264, 1-13.

Romero-Zerbo, S. Y., Bermúndez-Silva, F. J. (2014). Cannabinoids, eating nehaviour, and energy homeostasis, Drug Testing and Analysis, 6, 52-58.

Simankowicz, P., Stępniewska, J. (2025). The Role of Endocannabinoids in Physiological Processes and Disease Pathology: A Comprehensive Review, *Journal of Clinical Medicine*, 14, 2851.

Skřivan, M., Englmaierová, M., Taubner, T., & Skřivanová, E. (2020). Effects of dietary hemp seed and flaxseed on growth performance, meat fatty acid compositions, liver tocopherol concentration and bone strenght of cockerels. Animals, 10, 458.

Skřivan, M., Englmaierová, M., Vít, T., & Skřivanová, E. (2019). Hempseed increases gamma-tocopherol in egg yolks and the breaking strength of tibias in laying hens. Public Library of Science One, 14(5), e0217509.

Smith, D. J., Serum, E. M., Winders, T. M., Neville, B., Herges, G. R., Dahlen, C. R., & Swanson, K. C. (2023). Excretion and residue depletion of cannabinoids in beef cattle fed hempseed cake for 111 days. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 40(4), 552-565.

Taubner, T., Skřivan, M., Englmaierová, M., Malá, L. (2023). Effects of hemp seed and flaxseed on enzyme activity in the broiler chicken digestive tract. animal, 17, 100765.

Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O., Rössner, S. (2005). Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study, *The Lancet*, 365, 1389-1397.

Visković, J., Zheljazkov, V.D., Sikora, V., Noller, J., Latković, D., Ocamb, C.M., Koren, A., 2023. Hemp (Cannabis sativa L.) Agronomy and Utilization: A Review. Agronomy 13, 931.

Wagner, B., Gerletti, P., Fürst, P., Keuth, O., Bernsmann, T., Martin, A., Schäfer, B., Numata, J., Lorenzen, M. C., & Pieper, R. (2022). Transfer of cannabinoids into the milk of dairy cows fed with industrial hemp could lead to Δ9-THC exposure that exceeds acute reference dose. Nature Food, 3, 921-932.