

. Základy fytochemie a farmakognozie P4 2024/2025

Chromatografické metody

TLC, sloupcová chromatografie, HPLC, plynová chromatografie

Princip chromatografie

Distribuce látek mezi dvě fáze:

Mobilní fáze- pohyblivá

Stacionární fáze- pevná

Separace založená na způsobu, kterým se látka mezi obě fáze rozděluje.

Distribuční koeficient: $K_D = \frac{C_{stac. fáze}}{C_{mob. fáze}}$

Látky v konstantní, dynamické rovnováze mezi oběma fázemi.

Pro danou látku platí: pozice v systému je daná interakcí látky se stacionární fází a soutěží interakcí s mobilní fází.

Stacionární fáze:

- Pevná
- Kapalná

Mobilní fáze:

- Kapalná
- Plynná

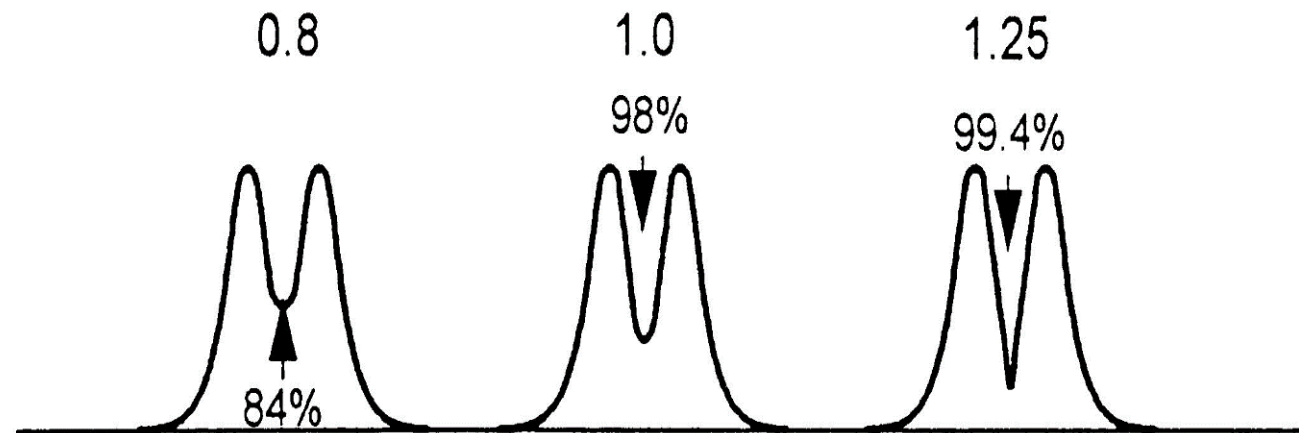
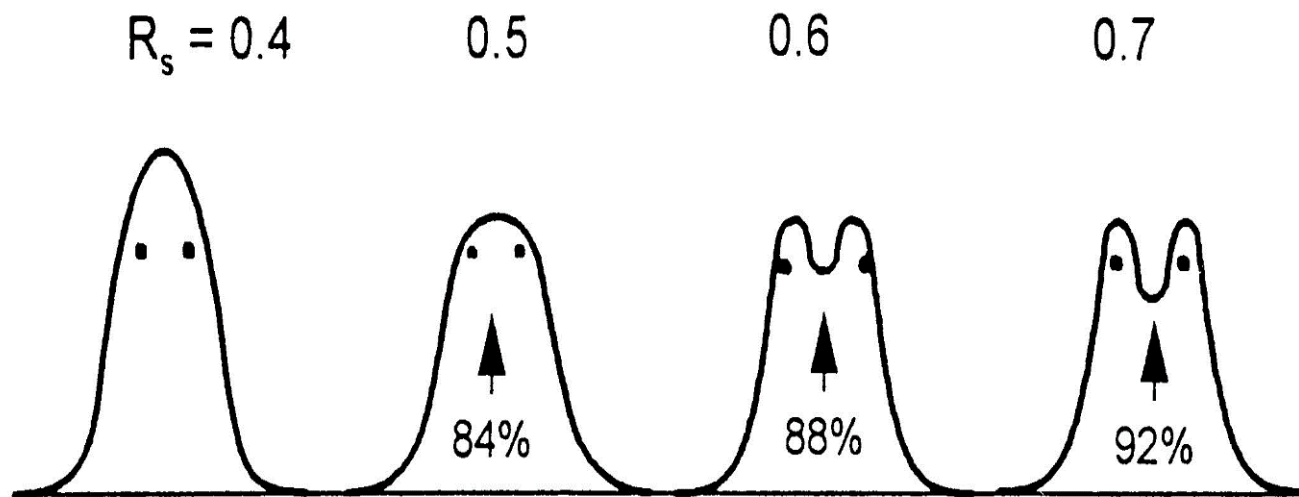
Klasifikace chromatografických metod

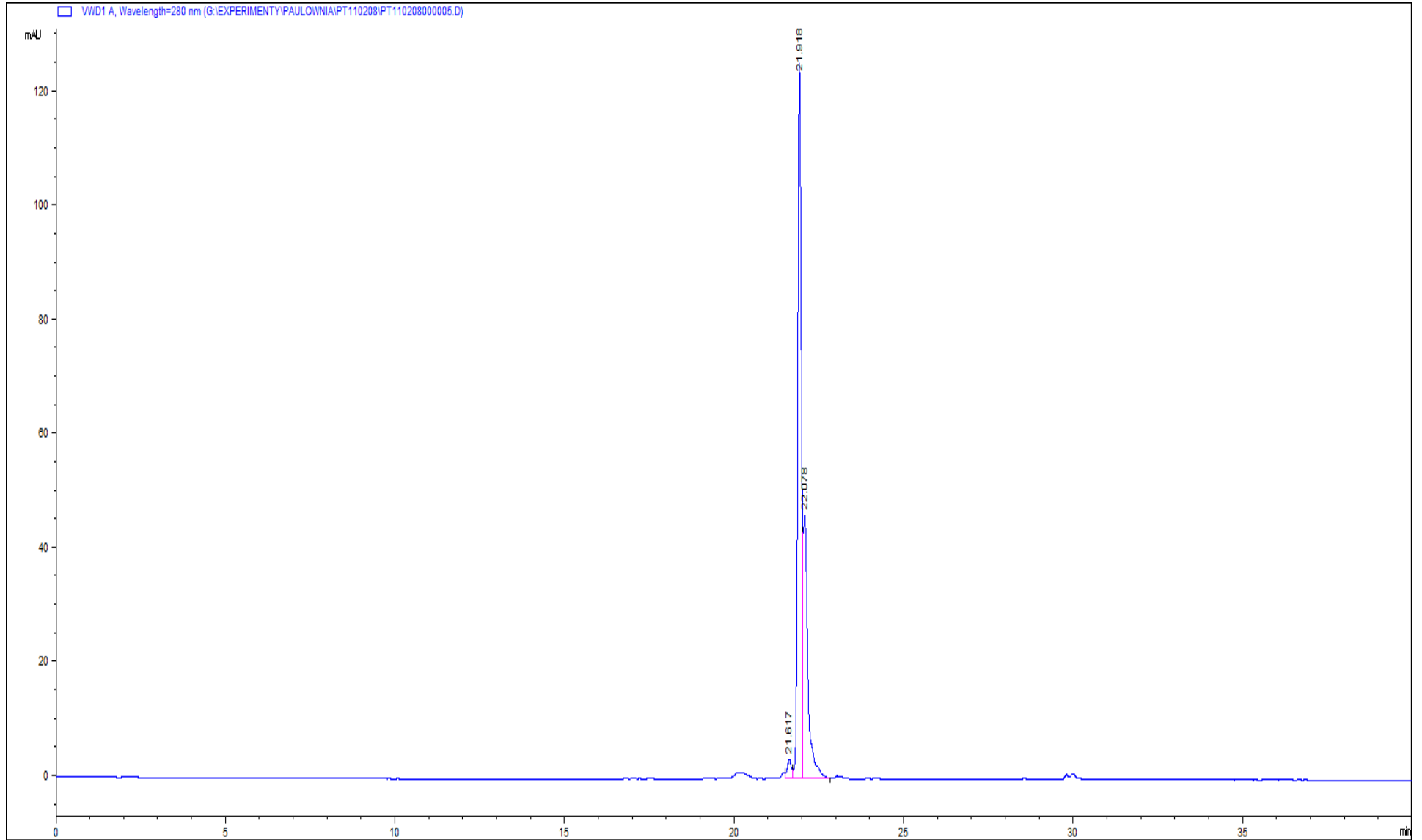
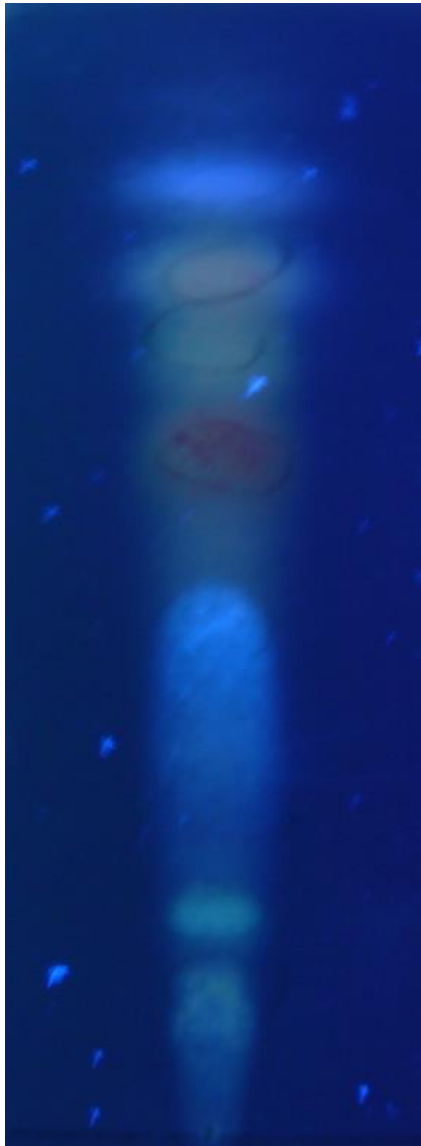
Podle uspořádání:

- Sloupcová chromatografie- od kapilárních analytických metod po preparativní velké sloupce
- Plošná chromatografie- různé formy TLC

Podle módu separace:

- Adsorpční
- Rozdělovací
- Podle náboje:
 - Iontově výměnná
 - Iontově párová
- Na základě velikosti částic
- Biologicky afinitní





Co lze vyčíst z chromatogramu

1. Identifikace

- Retenční čas- každá látka charakteristický retenční čas v daném souboru podmínek.
- Dvě látky stejné t_R → pravděpodobně stejné látky.
- Metoda současného nástřiku.
- Ověření pomocí detekční metody.

2. Fyzikálně- chemická povaha látky

- Nepochární látky → pomalá eluce na reverzní fázi
→ rychlá eluce na normální fázi
- Polární látky → pomalá eluce na normální fázi
→ rychlá eluce na reverzní fázi

3. Množství

- Pro danou látku je oblast pod křivkou chromatografického píku přímo úměrná množství látky.
- Standard o známé koncentraci → kalibrační křivka.
- Odhad koncentrace podle výšky píku.

– **Kvantitativní analýza**

– **metoda vnitřní normalizace**

- základní podmínkou je, aby všechny složky analyzované směsi byly eluovány
- detektor musí poskytovat lineární, stejně velkou odezvu pro stejné koncentrace všech analyzovaných látek
- procentuální složení směsi se pak určí ze změřených ploch všech elučních křivek (analytických signálů, píků)
- metoda je velmi jednoduchá, je však problematická, pokud jsou odezvy detektoru pro různé analyty odlišné

– **metoda absolutní kalibrace**

- metoda je založena na dávkování známých množství vzorku a standardu za stejných experimentálních podmínek
- vyhodnocení se provádí podle kalibrační křivky nebo přímým srovnáním ploch získaných analytických signálů (píků)
- musím znát alespoň dva nástřiky do kolony (vzorek + standard)

– **metoda vnitřního standardu**

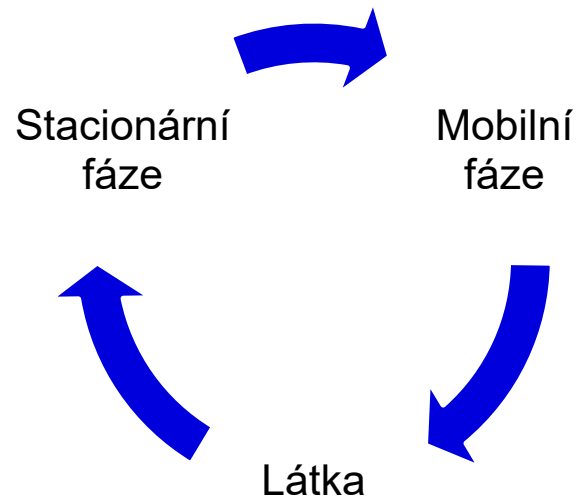
- ze standardu a čistě stanovované komponenty se připraví směsi s různým hmotnostním složením a provede se analýza
- sestrojí se kalibrační graf, ve kterém se vynáší poměr ploch píků A_{vz}/A_{st} proti poměru hmotností m_{vz}/m_{st}
- při určování neznámého vzorku se tento vzorek přidá ke známému množství standardu a vyhodnotí se poměr ploch píků vnitřního standardu a stanovované složky
- ze známé hmotnosti vnitřního standardu se určí hmotnost stanovované složky
- není potřeba přesně znát množství nastříkovaných vzorků
- nevýhodou je obtížné hledání vhodné standardní látky

– **metoda standardního přídavku**

- metoda je založena na přídavku definovaného množství stanovované látky ke vzorku
- provádějí se dvě analýzy, první s původním vzorkem, druhá se vzorkem po přidání daného množství stanovované látky
- zvětšení plochy píku je přímo úměrné přidanému množství analytu

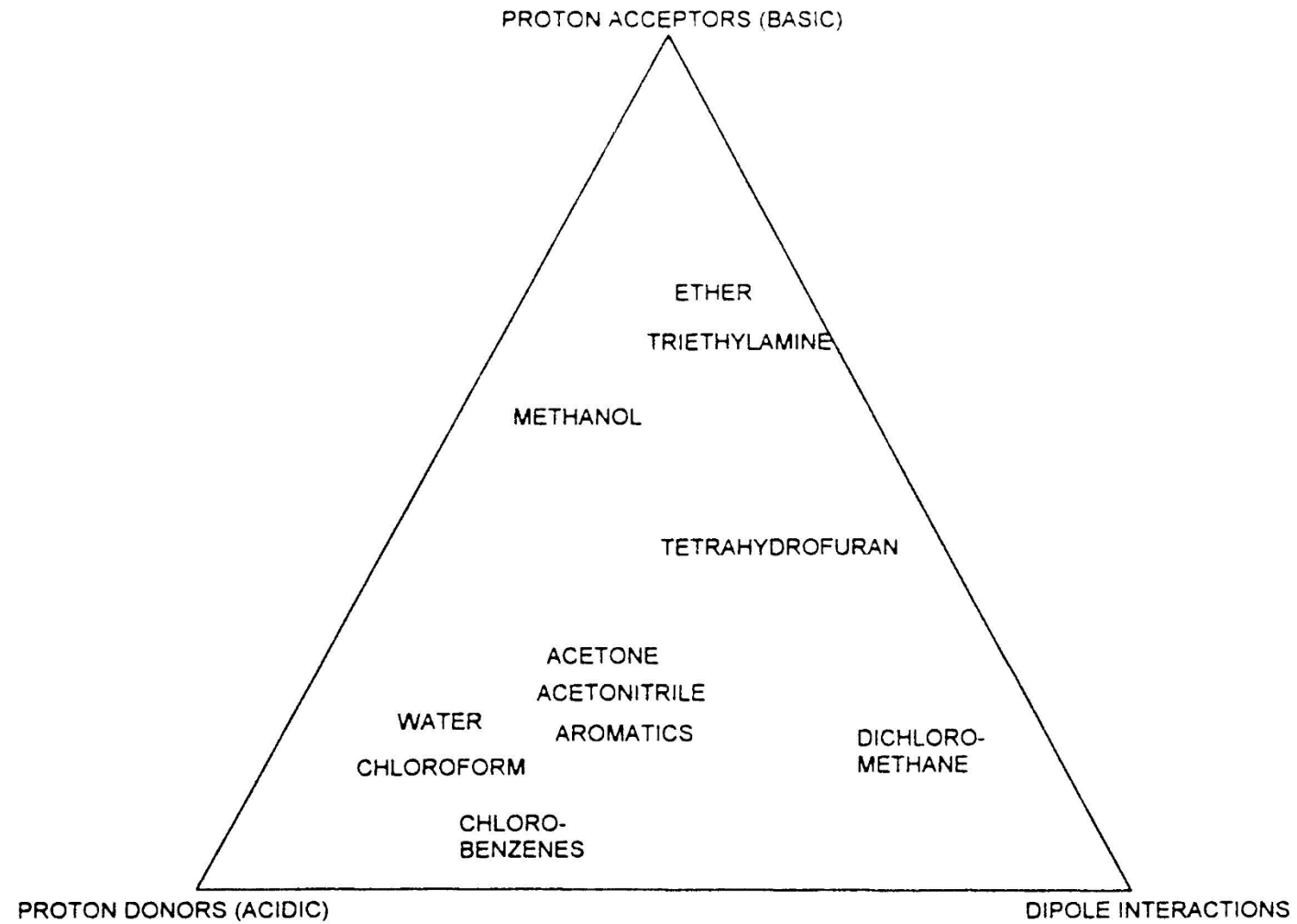
Selektivita

3 sady molekulárních interakcí



Eluotropic Series of Solvents

Solvent	$E^0(\text{Al}_2\text{O}_3)$	Boiling pt., °C	Viscosity, $\text{mN}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}(20^\circ\text{C})$	UV Cutoff, nm
Pentane	0	36	0.24	210
Cyclohexane	0.04	69	0.98	210
CCl_4	0.18	77	0.97	265
Toluene	0.29	111	0.59	286
Diethyl ether	0.38	35	0.25	218
Chloroform	0.40	62	0.57	245
Dichloromethane	0.42	40	0.44	235
Tetrahydrofuran	0.45	66	0.55	220
2-Butanone	0.51	80	0.32	330
Acetone	0.56	56	0.32	330
1,4-Dioxane	0.56	107	1.44	215
Ethyl acetate	0.58	77	0.45	255
Diethylamine	0.63	115	0.33	275
Acetonitrile	0.65	82	0.37	190
2-Propanol	0.82	82	2.50	210
Ethanol	0.88	78	1.20	210
Methanol	0.95	64	0.59	210
Water	1.00	100	1.0	—



Chromatografie na normálních a obrácených fázích

- Interakce analytů se stacionární fází je založena na procesu adsorpce
- Distribuční konstanta zde závisí na celé řadě proměnných (objem monomolekulární vrstvy rozpouštědla, aktivita adsorbentu, eluční síla rozpouštědla)
- Je žádoucí, aby docházelo pouze k fyzikální adsorpci, nikoliv k chemické interakci
- Mezi nejběžnější adsorbenty patří silikagel či aluminiumoxid
- Uplatnění nacházejí také uhlíkaté organické sorbenty
- Jako mobilní fáze se často používá nepolární uhlovodík + polární modifikátor
- Použité stacionární fáze mají nepolární charakter
- Jako mobilní fáze se používá voda s přídavkem polárních organických rozpouštědel (alkoholy, acetonitril, dioxan, tetrahydrofuran, aceton)
- Selektivita je výrazně ovlivňována vlastnostmi mobilní fáze
- Eluční síla mobilní fáze roste s její klesající polaritou
- Chromatografie na obrácených fázích je vhodná pro dělení látek v homologických řadách
- Použití obrácených fází v HPLC dnes převládá
- Označení “obrácené fáze” se používá z historických důvodů

Silikagel

Gel kyseliny křemičité

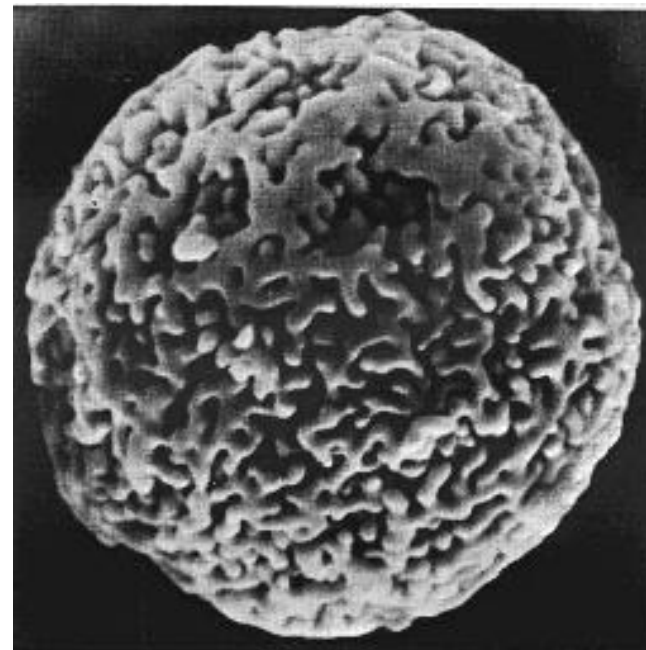
Adsorbční chromatografie

Normální fáze

Polární charakter- přítomnost -OH skupin.

Silikagel má slabě kyselé vlastnosti (lze jej použít při pH = 2 až 8)

Za norm. podmínek- separace látek lišících se polárními funkčními skupinami. Rozdíly v nepolárních funkcích- nedochází k účinné separaci.



Modifikovaný silikagel

Silikagel + uhlíkový řetězec

C2, C8, C18

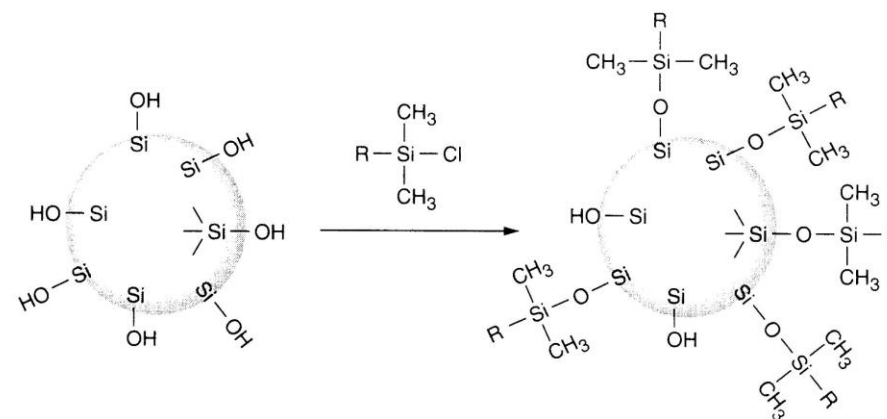
Rozdělovací chromatografie

Nepolární charakter

Reverzní fáze

Změny v nepolární části molekuly látky ovlivní separaci.

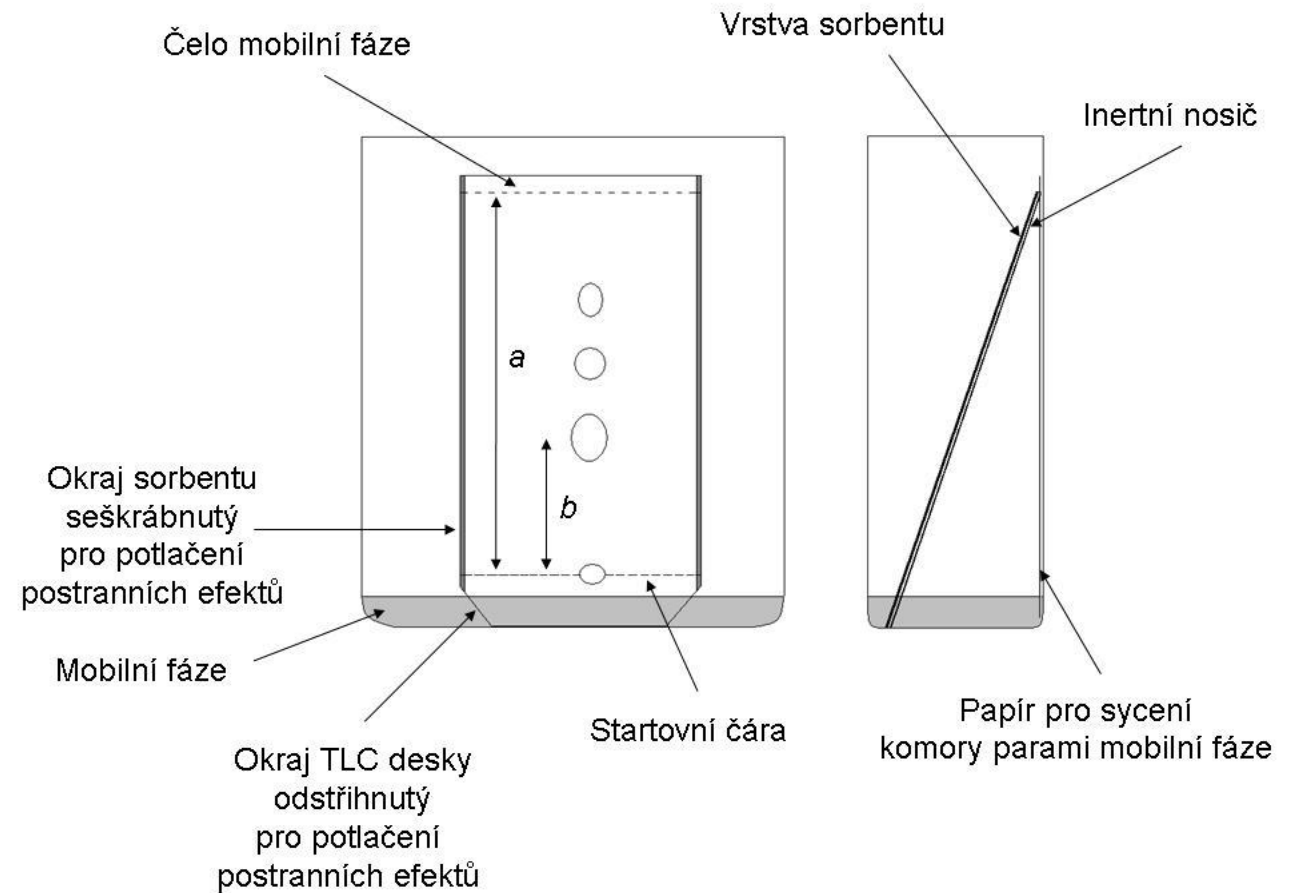
Omezený rozsah pracovního pH



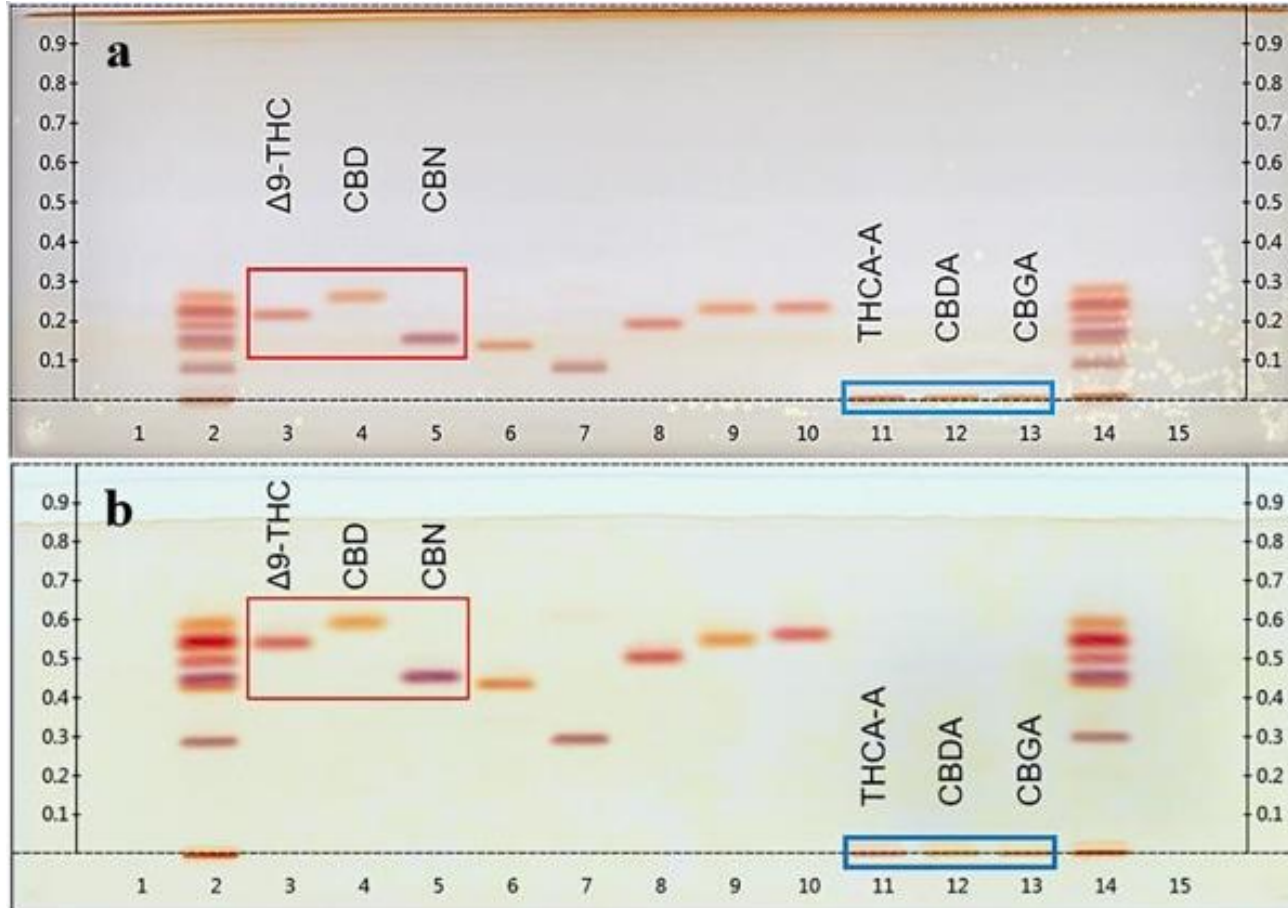
R = -CH₂(CH₂)_nCH₃ n = 0 to 16
= Phenyl, etc...

Tenkovrstvá chromatografie

- Jedna z nejjednodušších metod chromatografie
- Planární uspořádání
- Otevřený systém
- Homogenní vrstva sorbentu se chová jako kapilára
- Obvykle silikagel
 - Adsorpční chromatografie
- Detekce látek
 - Nedestruktivní – viditelné nebo UV světlo
 - Destruktivní – detekční činidla
- Porovnání se standardem



Tenkovrstvá chromatografie kanabinoidů



Forensic Chemistry
Volume 19, June 2020, 100249



High performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of cannabinoids in cannabis extracts



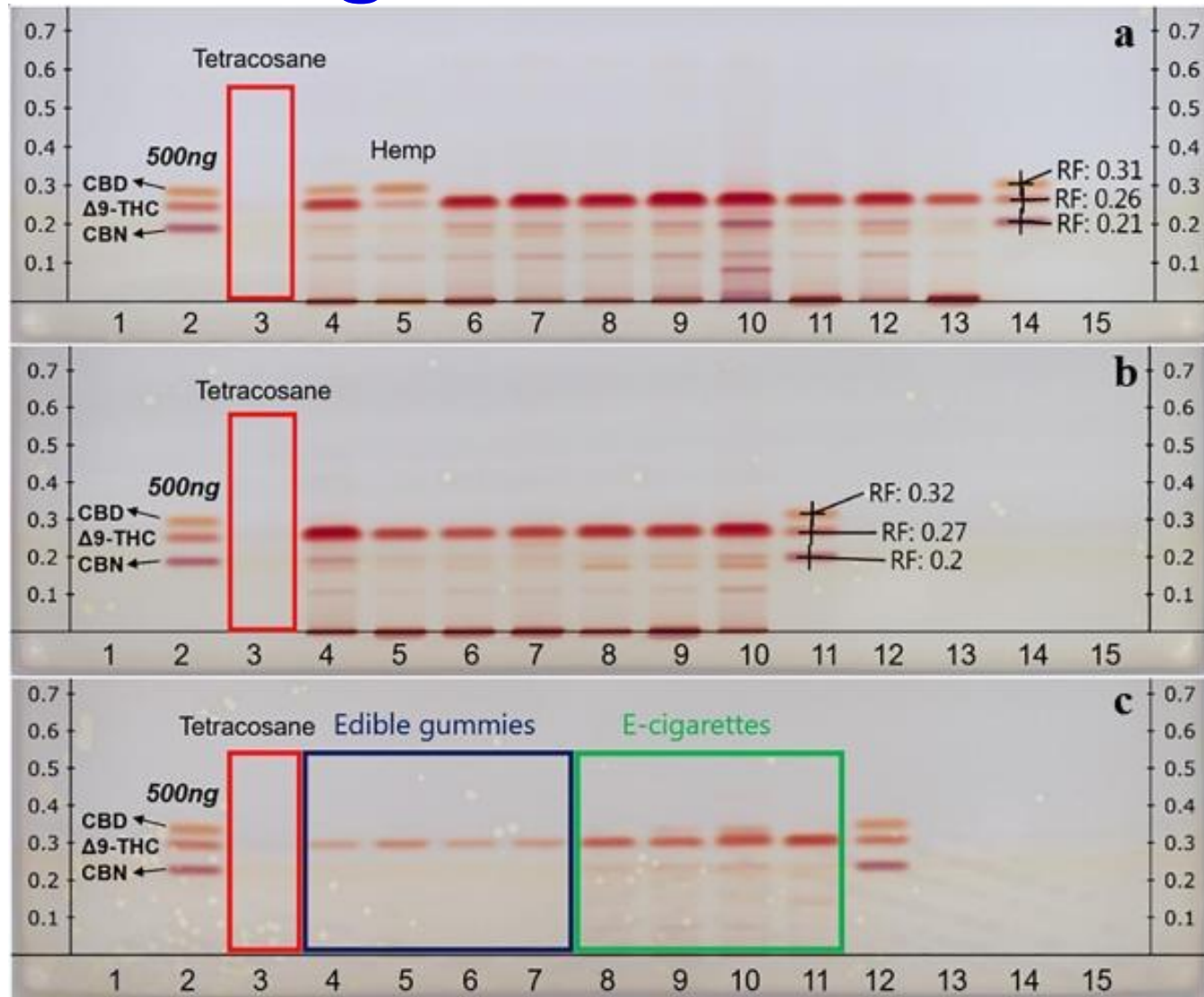
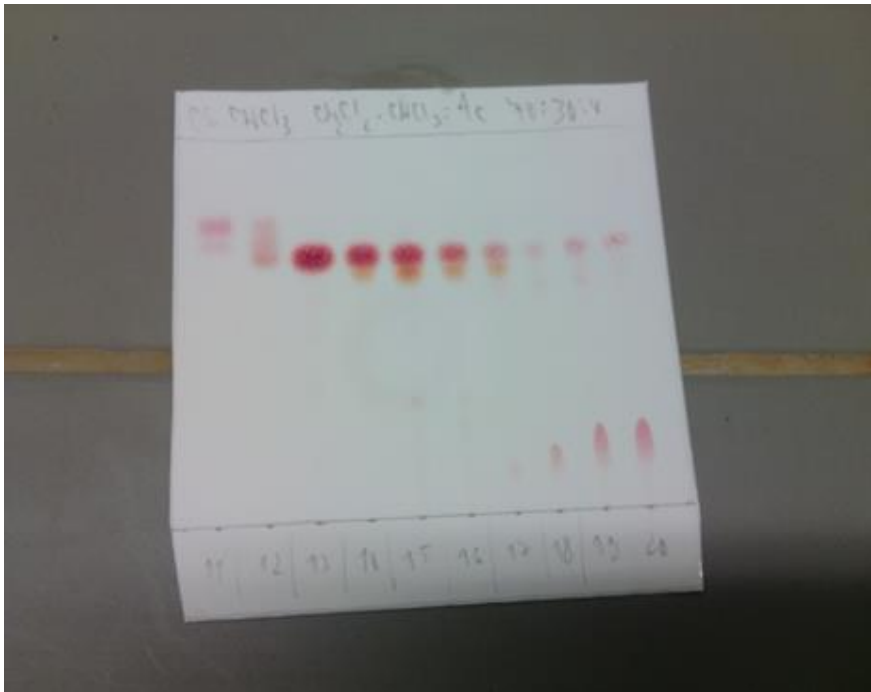
Yifan Liu^a, Thomas A. Brettell^a  , Justin Victoria^b, Matthew R. Wood^b,
Marianne E. Staretz^a

Fig. 2. HPTLC plate (a. mobile phase of xylene:n-hexane:diethylamine (25:10:1), b. mobile phase of 6% diethylamine in toluene). Lane 1 and 15: methanol blank; lane 2 and 14: mixture of 11 standards, lane 3–13: $\Delta 9$ -THC, CBD, CBN, CBG, CBC, THCV, CBDV, $\Delta 8$ -THC, THCA-A, CBDA and CBGA respectively. Application volume: 2 μ L (lane 1, 15) 5 μ L (lane 2–14).

Fast Blue B detekce

Tenkovrstvá chromatografie kanabinoidů



Typy kapalinové chromatografie

– Klasická sloupcová chromatografie

Nejstarší, nejjednodušší.

Obvykle normální fáze (silikagel, aluminiumoxid).

Velká velikost částic (60-200 μm)

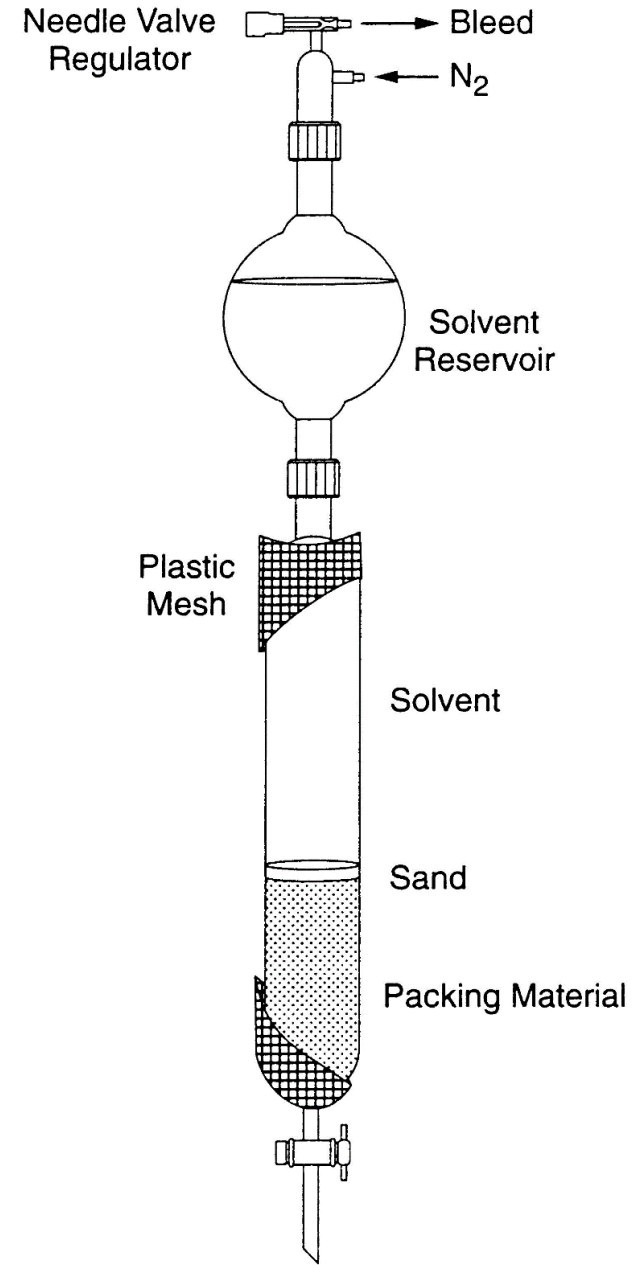
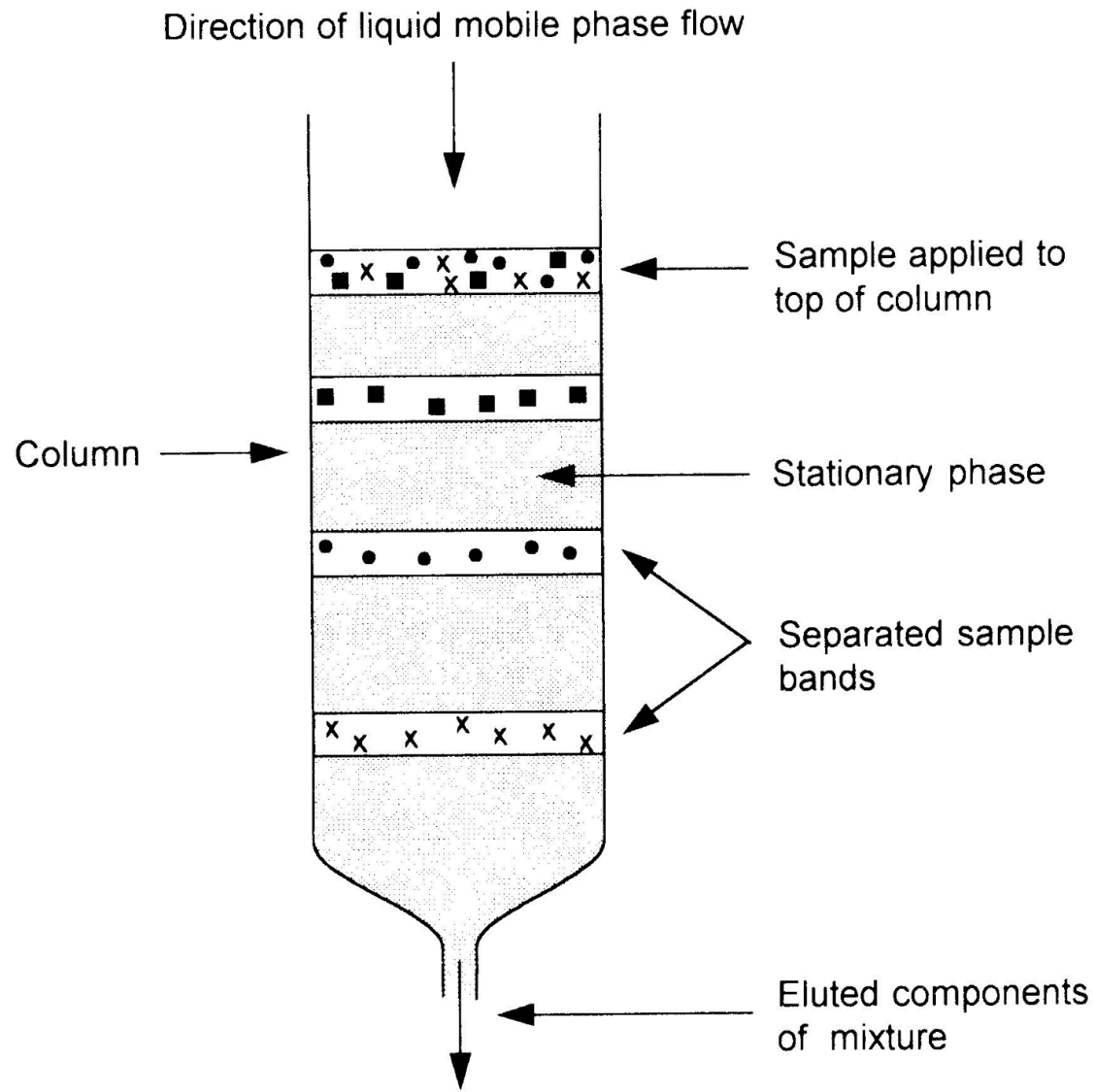
První krok separace.

Velká množství vzorku.

Nanášení vzorku:

Kapalný vzorek (dobrá rozpustnost v mob. fázi)

Pevný vzorek (špatná rozpustnost, adsorpce na silikagel 1:1)



Flash chromatografie

– Flash chromatografie

- Stejný princip jako klasika.
- Tlak nad mobilní fází (vzduch, N₂).
- Vyšší tlak → vyšší rychlost → menší částice sorbentu 40-60 μm.
- Rychlejší a/nebo lepší separace.

– Nízkotlaká a střednětlaká chromatografie (LPLC a MPLC)

– LPLC

Hybrid flash chromatografie a HPLC.
Mobilní fáze je tlakována na 1-6 atm.
Jednoduchá pumpa.
Částice podobné velikosti jako flash chromatografie.
Různé rozměry sloupců, různé typy sorbentů.

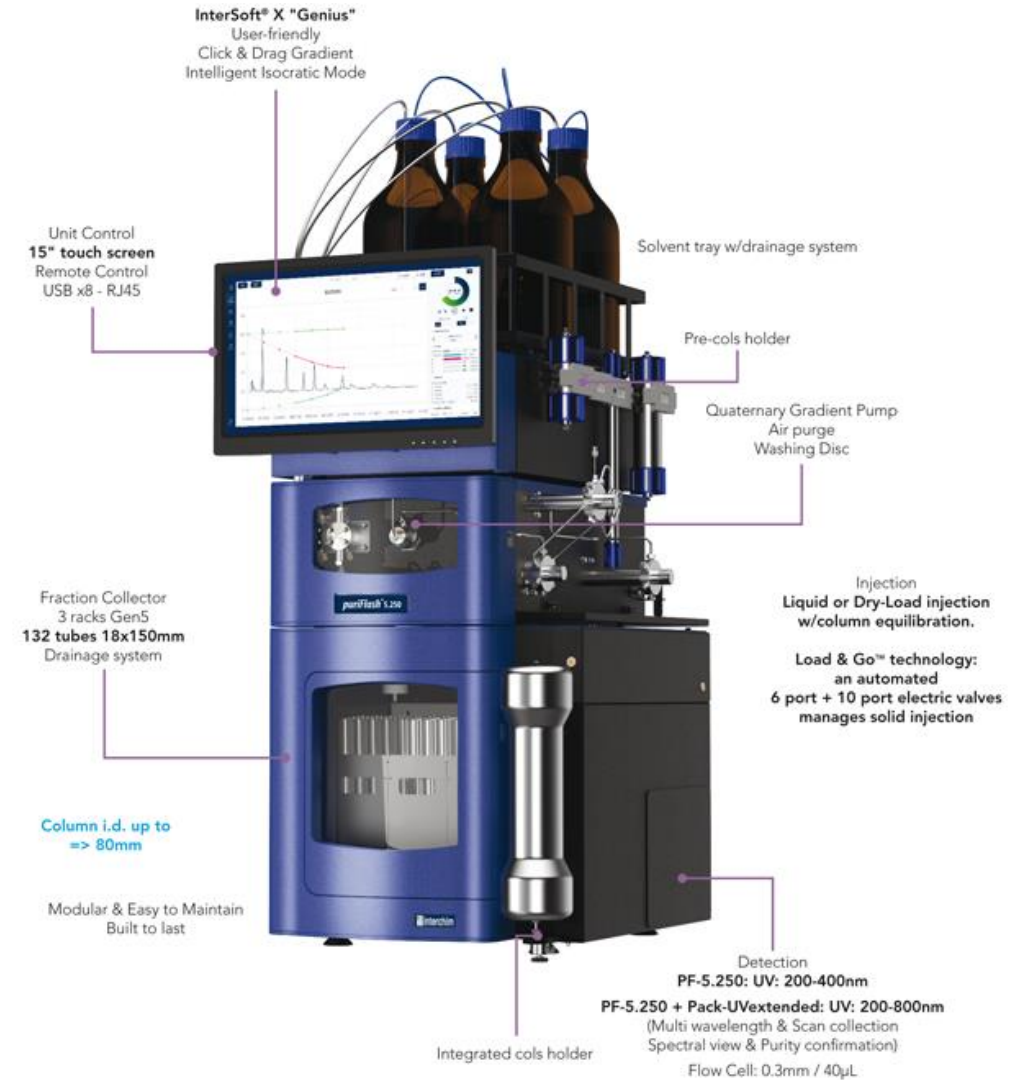
– MPLC

Sofistikovanější aparát.
Menší částice 10-40 μm.
Tlak 3-50 atm.

Flash chromatografieLPLC

– Flash chromatografie

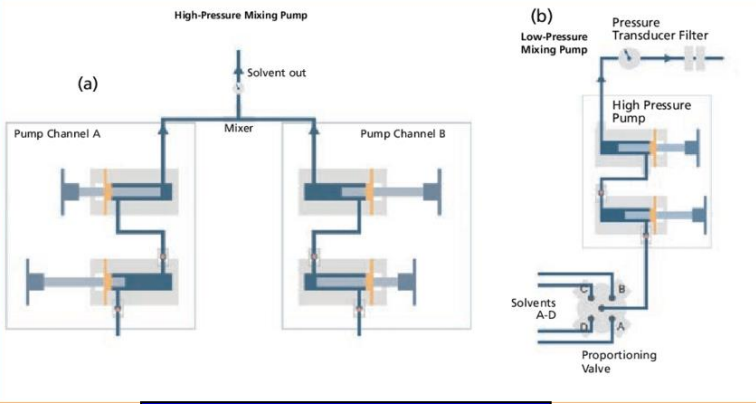
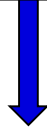
- Různé systémy
- Variabilní rozměry kolon
- Různá kapacita
- Detekce – obvykle ELSD a UV/Vis
- Často kombinace stroje s HPLC



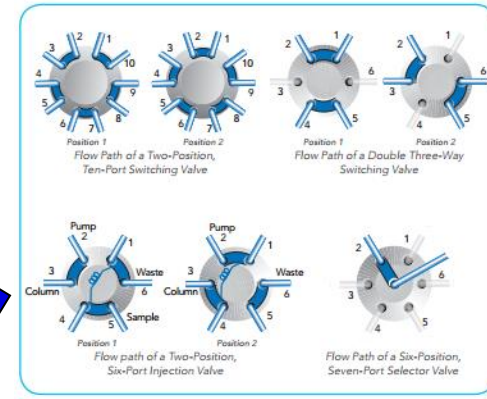
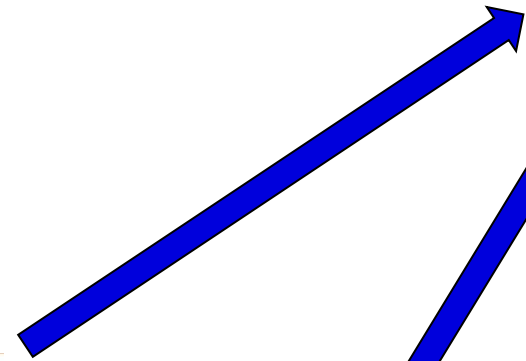
Flash chromatografie



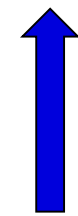
Zásobník mobilní fáze



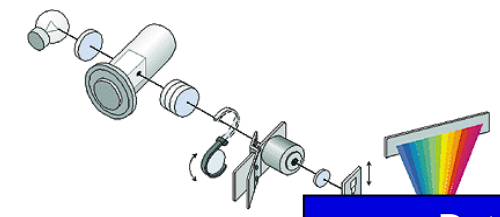
Pumpa



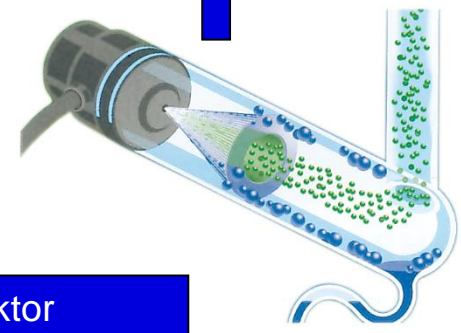
Injekční ventil



Chromatografická kolona



Detektor



Požadavky na HPLC:

- 1.Kolony plněné velmi jemnými částicemi sorbentu
- 2.Vysoké průtoky mobilní fáze

Řešení:

- Použití - vysokotlakých čerpadel
- kontinuálních detektorů
 - dávkovacích systémů
 - nových chromatografických sorbentů

Rychlost

Účinnost

Automatizovatelnost

Snadná kvantifikovatelnost

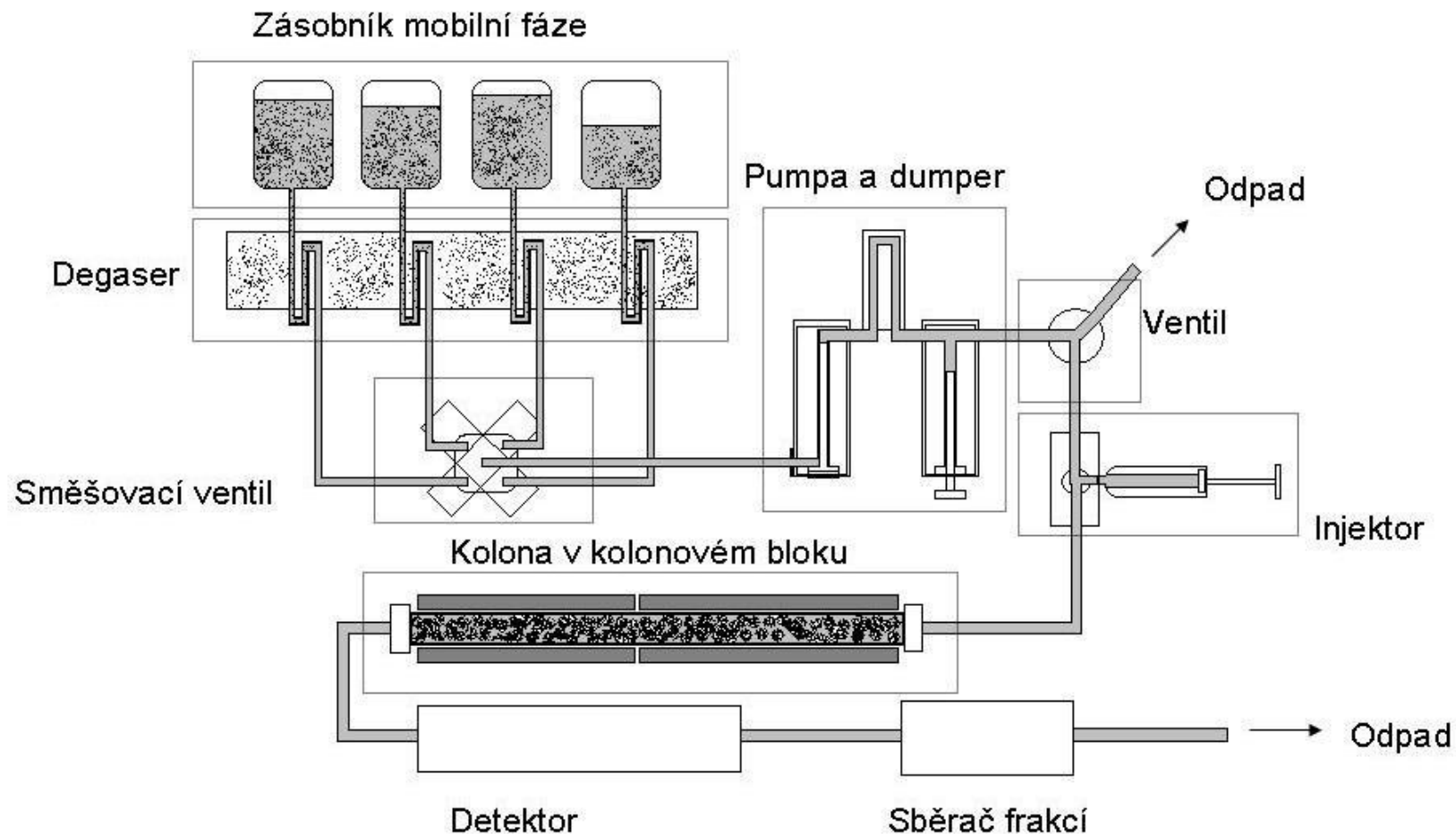
výsledků

Reprodukovatelnost

Zařízení pro HPLC obsahuje

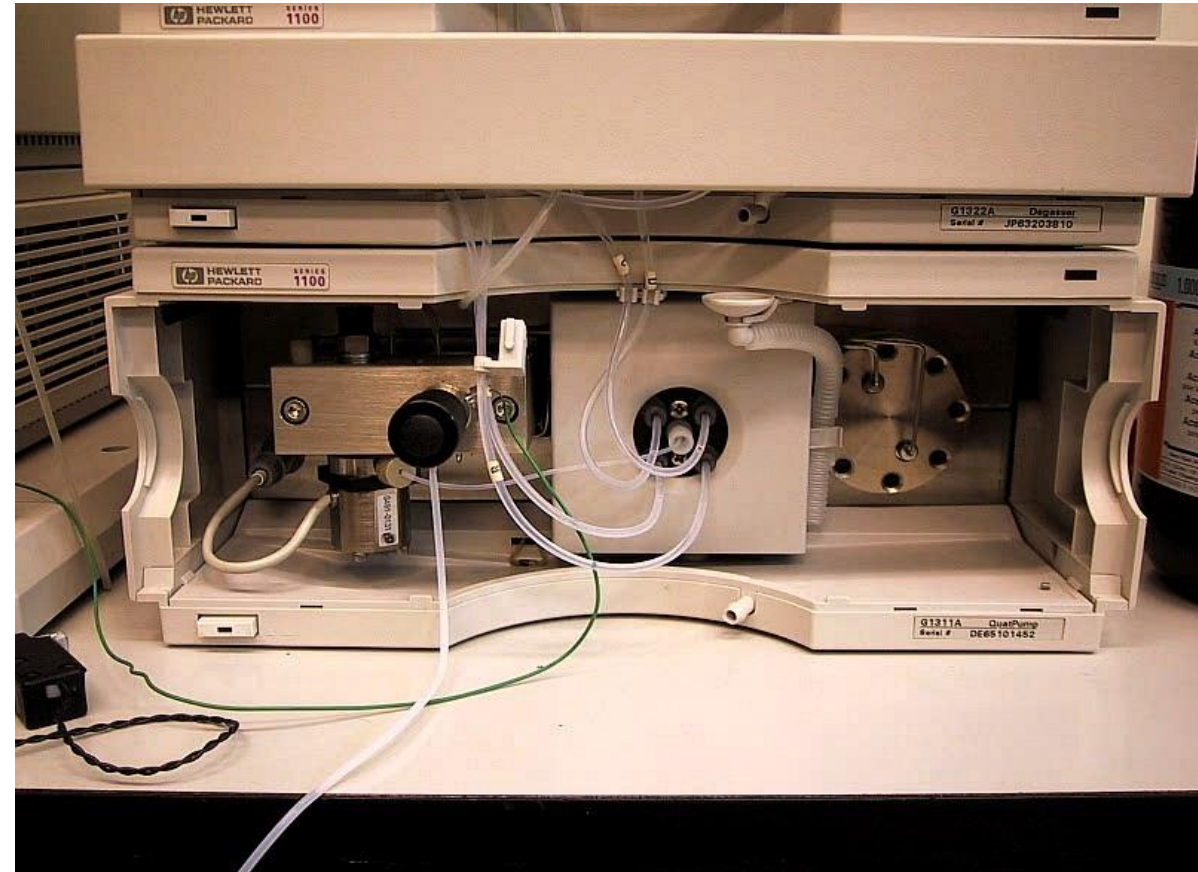
Základní součásti:

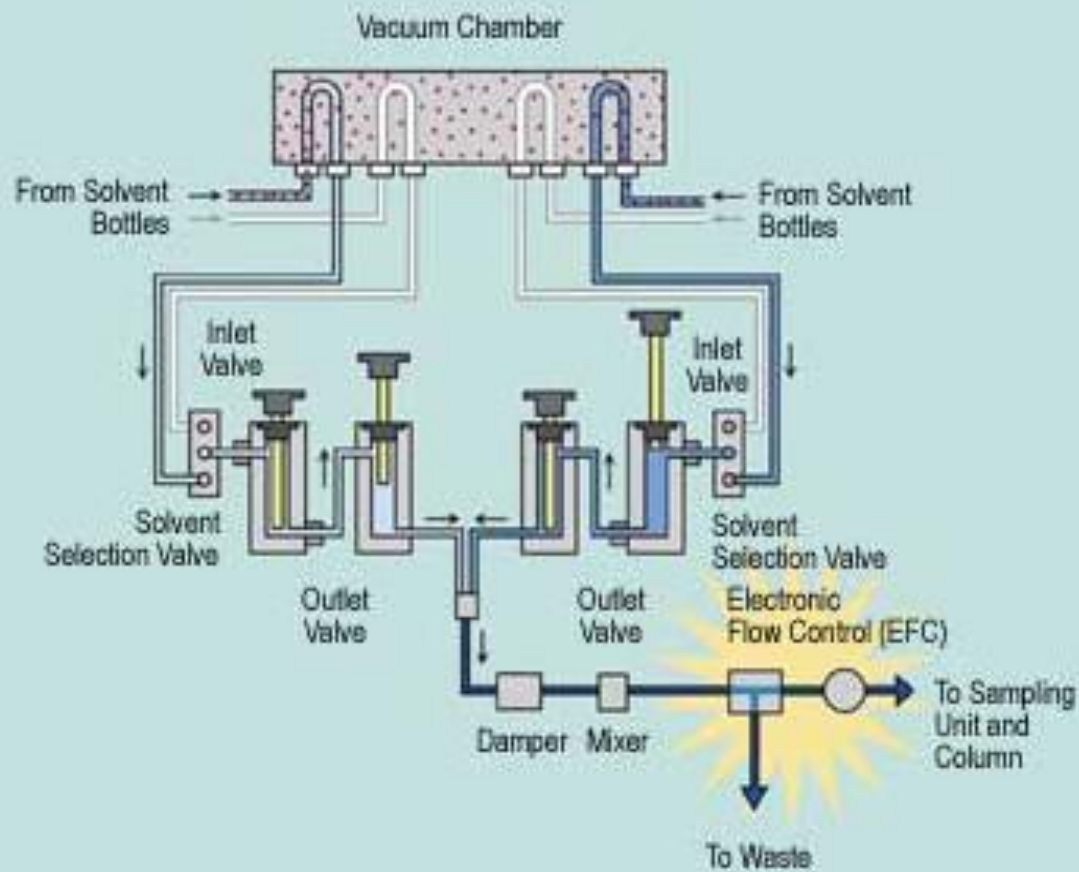
- rezervoár mobilní fáze
- odplynovač (degasér)
- čerpadlo, pumpu
- dávkovač vzorku
- kolonu s chromatografickým materiálem
- detektor
- jímač frakcí





- **střídavé pístové pumpy 35-400 μ L, 3-4, střídavá práce fázově o 80-120°, měníme objem pístové komory i rychlost**
 - charakteristickým znakem je zde pulsní tok mobilní fáze
 - čerpaná kapalina je vytlačována pístem nebo membránou
 - hlava čerpadla je opatřena dvěma ventily - sacím a výtlačným
- **stříkačkové pumpy 250-500 mL, píst o konstantním objemu**
 - tlak na píst je vyvoláván mechanicky použitím elektromotoru
 - pracovní objem čerpadel je 100 až 500 ml
 - hlavní výhodou je konstantní průtok a nepulsující tlak
 - vysoká stabilita základní linie detektoru
 - cena čerpadel je velmi vysoká z důvodu přesného opracování jednotlivých dílů
 - stabilní průtok se ustavuje pomalu - za 15 až 60 minut
 - čerpadlo se musí po několika hodinách práce plnit mobilní fází
 - použitá mobilní fáze musí být odvzdušněna
 - čerpadlo je vhodné pro práci s vysokými
- **pumpy tvořící konstantní tlak proudem plynu z tlakové láhve, malý tlak plynu je schopen vytvořit velký tlak v kapalině**
 - pneumatická čerpadla
 - zdrojem energie je stlačený plyn
 - plyn je zaveden přímo nad hladinu kapaliny nebo je od ní oddělen pomocí pístu
 - při kontaktu plynu s kapalinou se plyn částečně v kapalině rozpouští
 - výhodnější je oddělit plyn od kapaliny prostřednictvím pístu či membrány
 - čerpadla jsou obvykle bezpulsní, velmi jednoduchá a levná

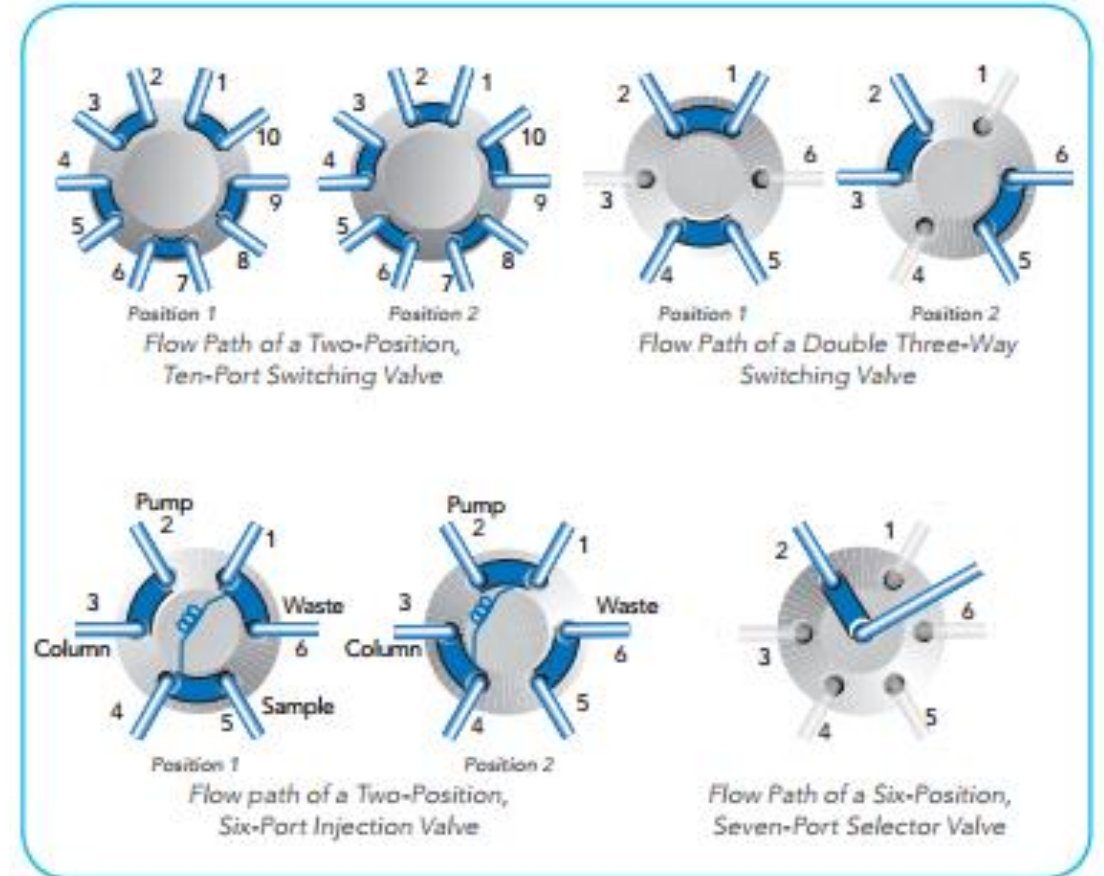




- 1 složková
- Vícesložková
- izokratická eluce x gradientová eluce
- Gradientová eluce
 - změna poměru složek mobilní fáze
 - krátí čas analýzy
 - zlepšuje rozdělení složitějších směsí
 - zvyšuje citlivost
- kroková x kontinuální

Dávkování vzorku v kapalinové chromatografii

- při dávkování vzorku je nutné překonat velký pracovní tlak uvnitř kolony
- nelze použít jednoduché dávkovače známé z plynové chromatografie
- nejčastěji se v HPLC používá 6-cestný injekční ventil s vyměnitelnou smyčkou
- používané dávkovací ventily dosahují vysoké reprodukovatelnosti nástřiku



Volba kolony

- chromatografickou kolonu volíme podle požadavků na analýzu a podle použité techniky
- vedle analytických kolon se setkáváme se speciálními kolonami preparačními o velkém průměru a délce
- podmínky analýzy je nutné volit kompromisně s ohledem na dobu analýzy, požadované rozlišení a zatížení chromatografické kolony
- je-li požadováno vysoké rozlišení, doba analýzy se prodlouží, kolonu nelze zatěžovat dávkováním velkého objemu vzorku
- je-li nutné provést analýzu v co nejkratší době, bude dosaženo horšího rozlišení, kolonu nelze zatěžovat dávkováním velkého objemu vzorku
- je-li potřebné analyzovat velké objemy vzorků, doba analýzy se prodlouží a rozlišení bude dosahovat nižších hodnot

- jemnější sorbent = vyšší tlak a vyšší dělicí schopnost
- typy sorbentu:
 - 1) silikagel nebo Al_2O_3
 - 2) fáze vázaná na silikagelu nebo Al_2O_3
 - 3) gely
 - 4) materiál s póry o kontrolované velikosti
- další dělení:
 - 1) normální fáze
 - 2) reverzní fáze
 - 3) kombinovaná

- Průměr okolo 4 mm
- Délka 30, 100 a 250 mm
- Nerezavějící ocel
- Plnivo částice o průměru 2-10 μm , většinou anorganická matrice – silikagel, na něm zakotvené různé stacionární fáze
- tzv. sekcionované kolony – pro dělení složitých směsí látek



HPLC detektory

- Odpovídající citlivost
 - Stabilita a reprodukovatelnost
 - Široký lineární dynamický rozsah
 - Rychlá odezva
 - Minimální objem detekční cely

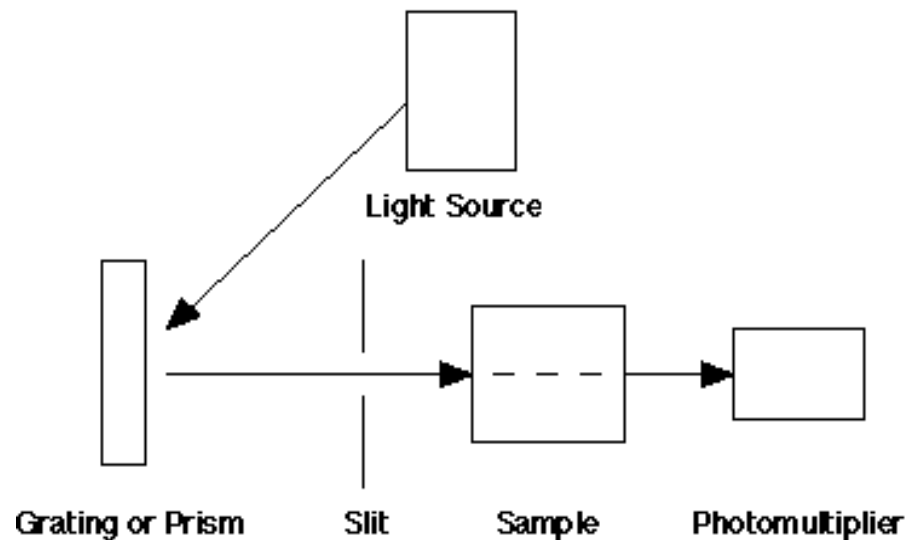
 - detektor může být univerzální nebo selektivní
 - univerzální detektor reaguje na vlastnosti systému jako celku (refraktometrický)
 - selektivní detektor reaguje na určitou selektivní vlastnost analytu (fluorescenční)
 - detektor může být destruktivní (AAS, AES) nebo nedestruktivní (UV/VIS)
 - detektory lze vhodně kombinovat (vícenásobná detekce)
 - detektor může pracovat ve více doménách (detektor s diodovým polem)
 - některé detektory vyžadují připojení pomocí interface (MS)
- UV/Vis detekce
 - Fluorescenční detektory
 - Radiochemické detekce
 - Elektrochemické detektory
 - Nuclear Magnetic Resonance (NMR) detektory
 - Light-Scattering (LS) detektory
 - Refraktometrické detektory
 - Polarometrické detektory
 - IR detektory

UV detekce

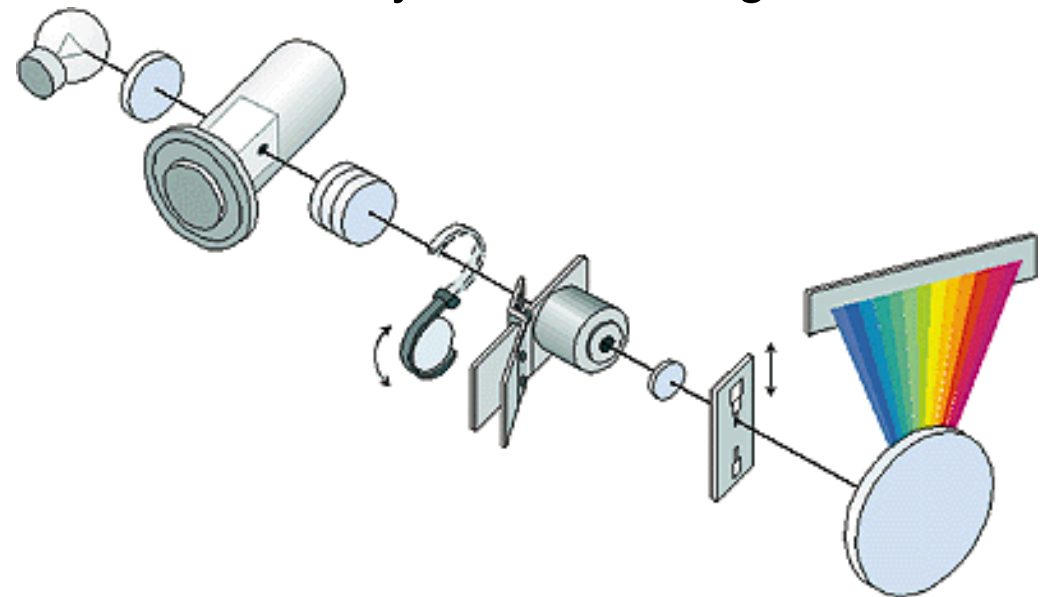
- UV/Vis detekce

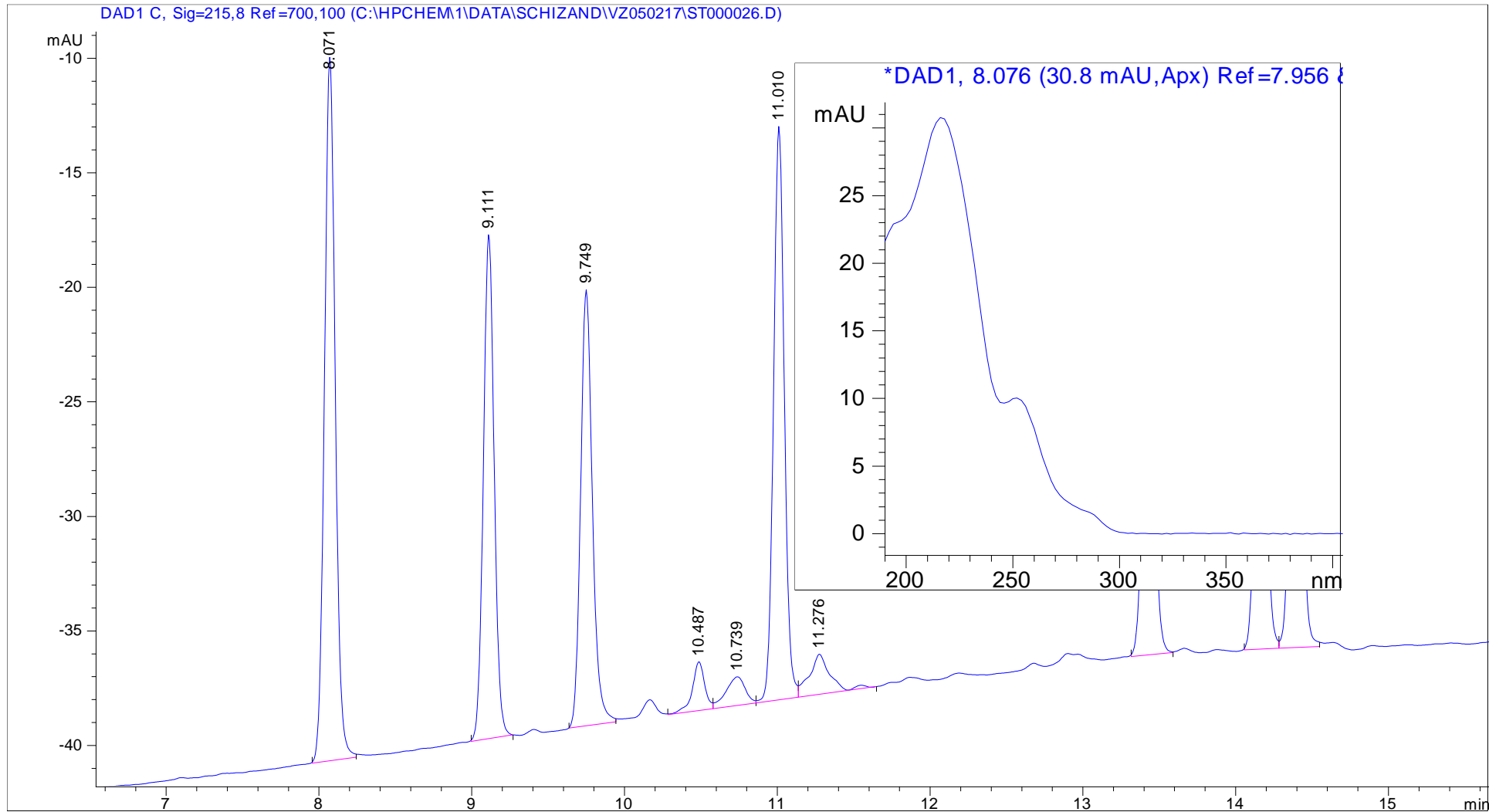
 - pevná vlnová délka
 - měnitelná vlnová délka
 - DAD

- standardní monochromatický spektrofotometr, vlnová délka se mění otočením hranolu nebo mřížky, v daném okamžiku pouze jedna vlnová délka, deuteriová lamp



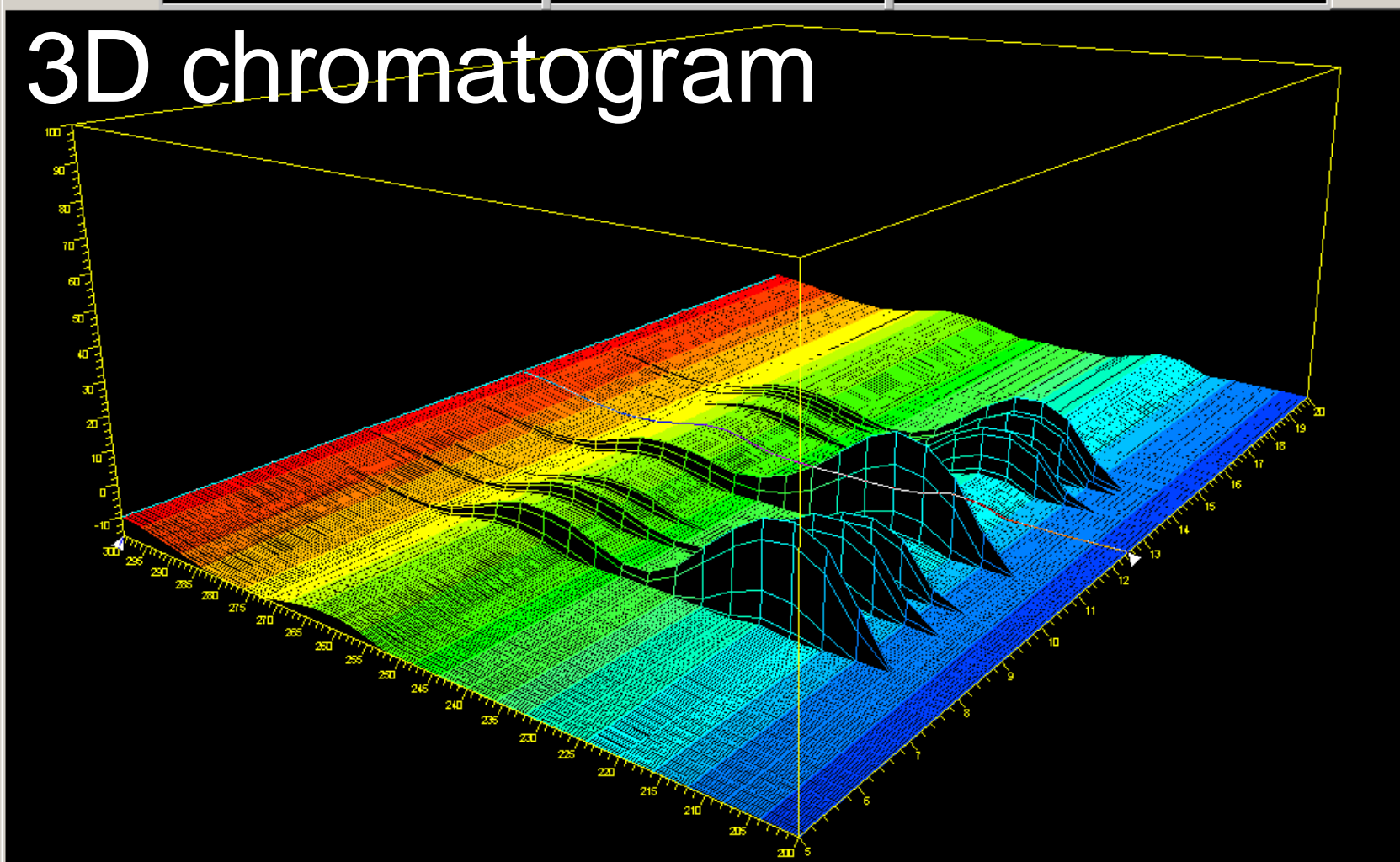
- kontinuální sledování celého spektra UV i Vis:
- a) několik standardních spektrofotometrů za sebou – několik UV/Vis regionů
- b) DAD - Diode Array detektor - simultánní měření celé oblasti, data okamžitě, možnost tvorby 3D chromatogramu





3D Plot of C:\HPCHEM\1\DATA\SCHIZAND\V2050217\ST000026.D

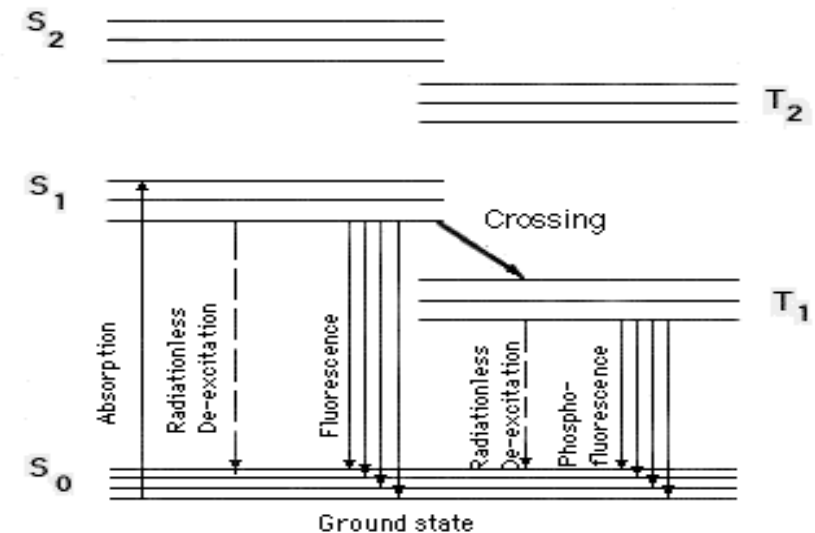
x: 12.50 min y: 300.00 nm z: -9.41 mAU Cube
x y z Redraw



Expand z Data view Projection Print Close

Fluorescenční detektory

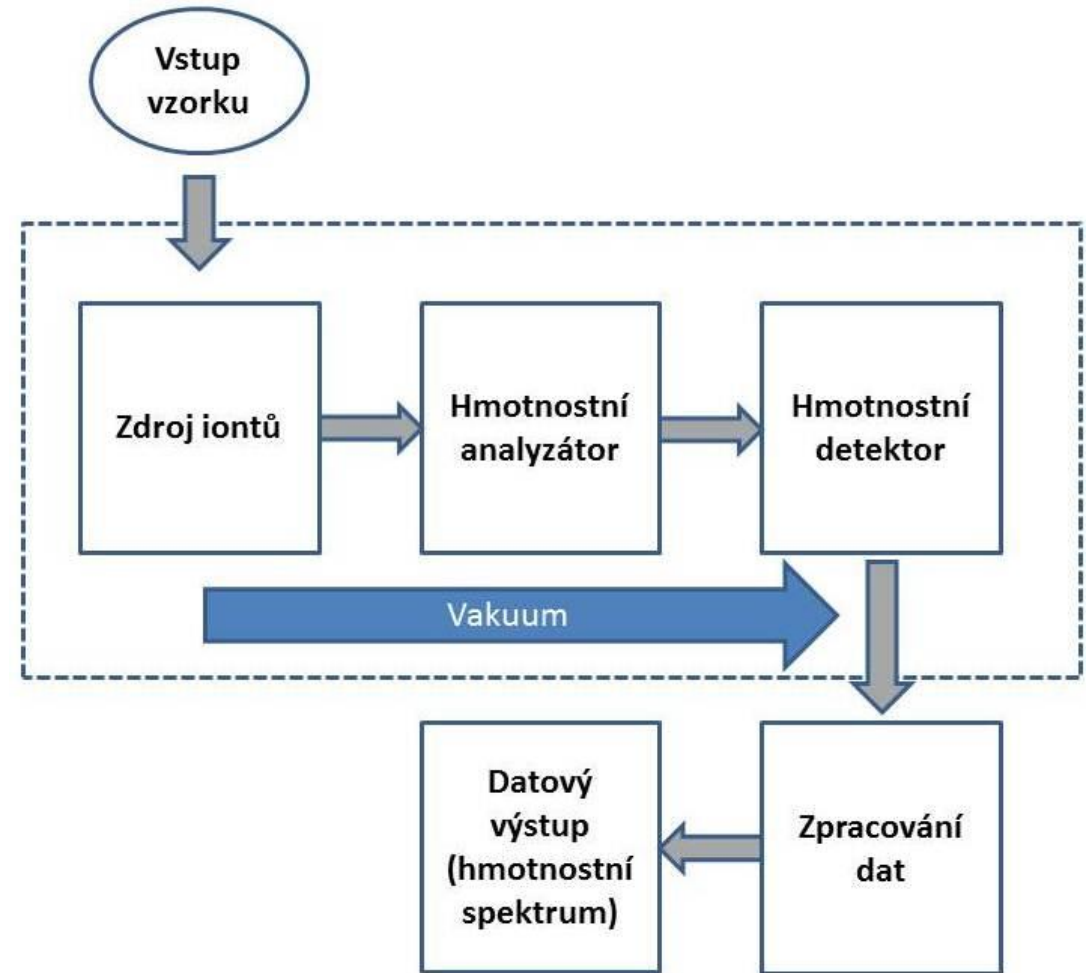
- měří schopnost absorbovat a vydávat světlo při určité vlnové délce. Každá látka může charakteristicky fluoreskovat. Zdroj excitace prochází průtokovou celou do fotodetektoru, měříme vlnovou délku emitovaného světla
- citlivost 10^{-9} až 10^{-11} g/ml.



- 1) DNA/RNA
- 2) Enzymatické metody
- 3) Protein-Ligand Interakce
- 4) Další fluoreskující látky

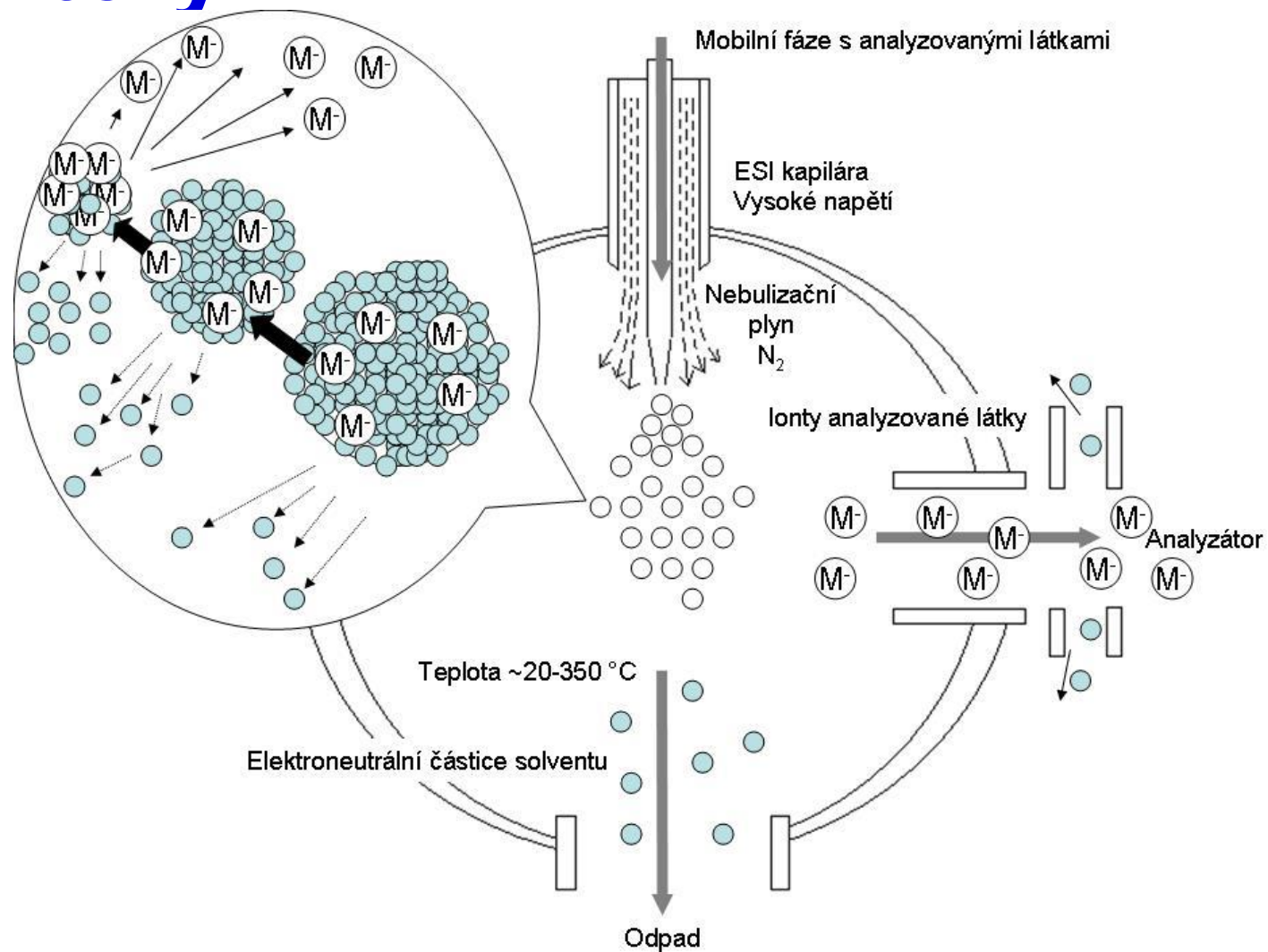
Hmotnostní detektory

- Měří počet iontů generovaných elektrickým polem
 - Měření pouze ionizovaných molekul
 - Různé uspořádání systému
 - Odlišné způsoby ionizace a separace iontů
 - Relativně složité a drahé
 - Extrémní citlivost a přesnost
-
- Získané informace
 - Molekulová hmotnost
 - Analýza fragmentů
 - Strukturní analýza



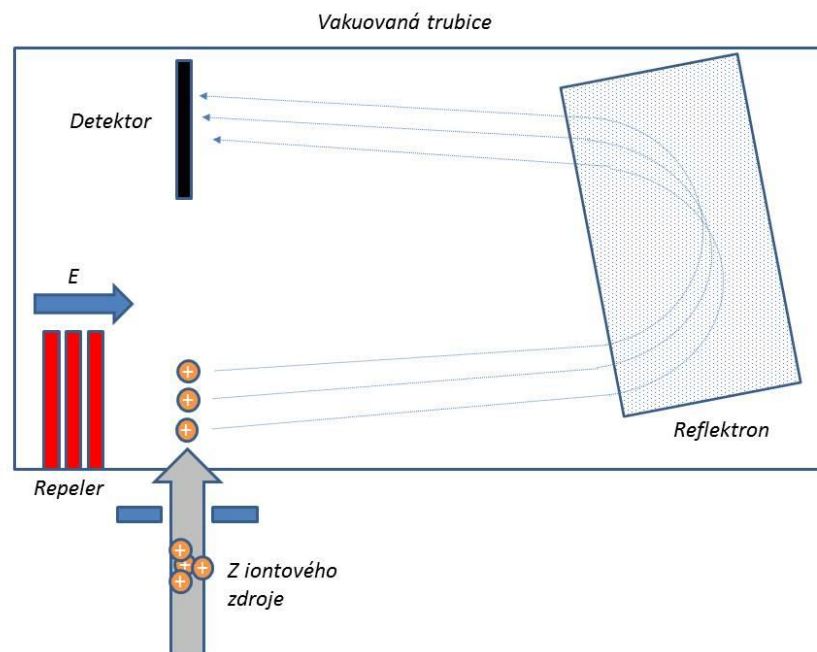
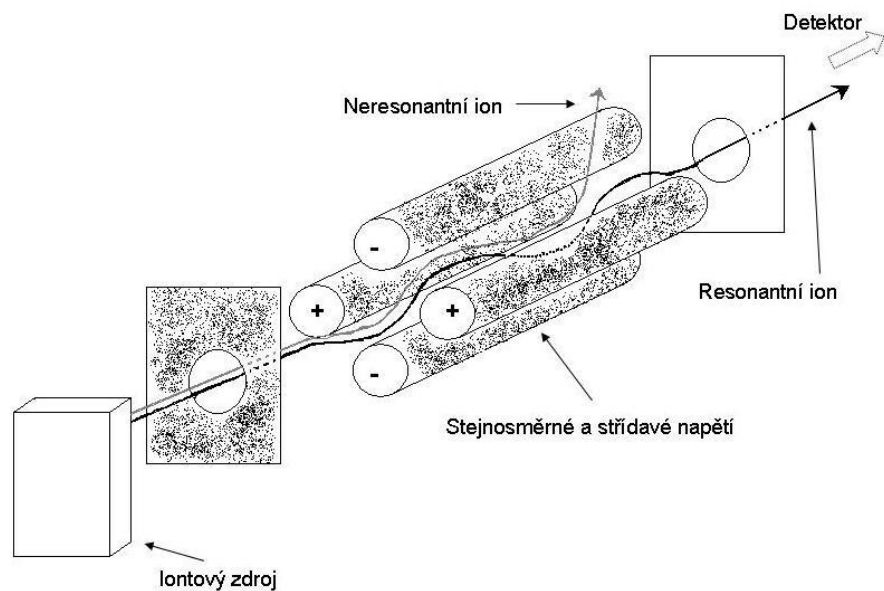
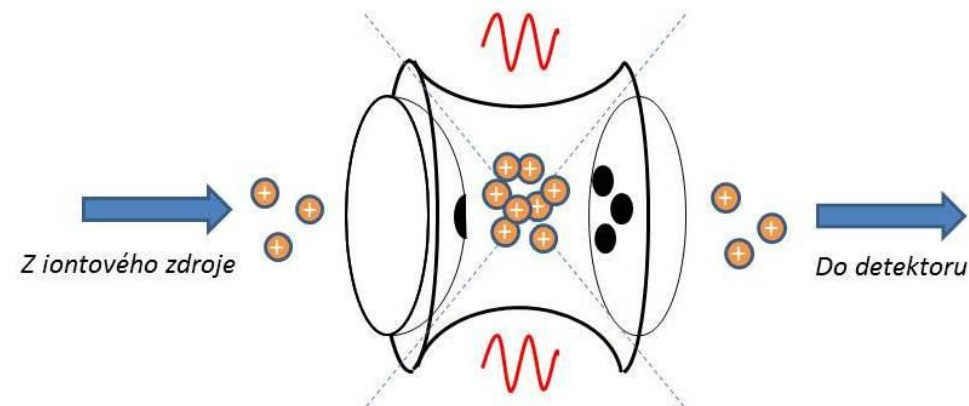
Hmotnostní detektory

- Způsob ionizace
 - ESI – electrospray ionization

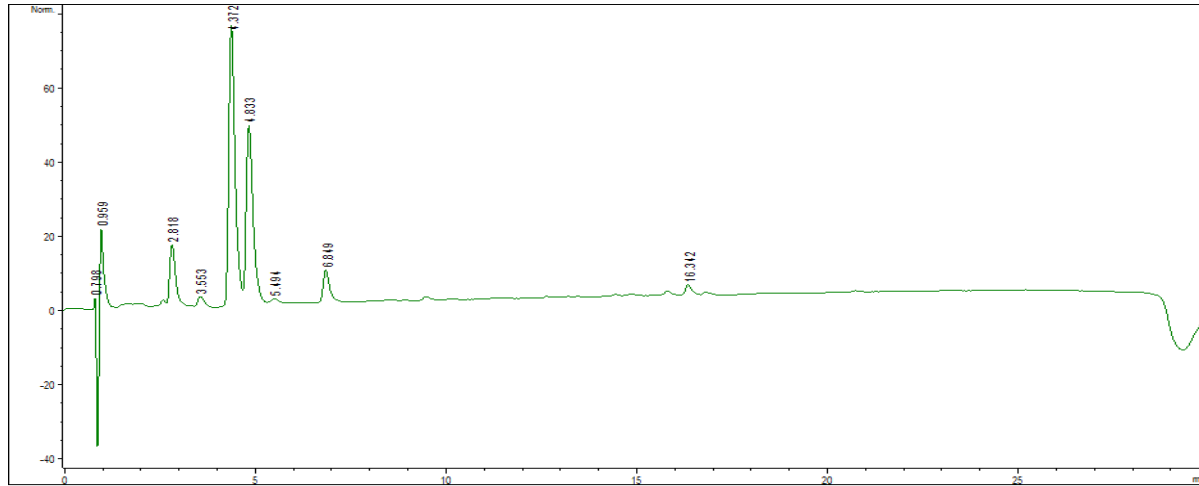


Hmotnostní detektory

- Způsob separace
 - Ion trap
 - TOF
 - Quadrupole

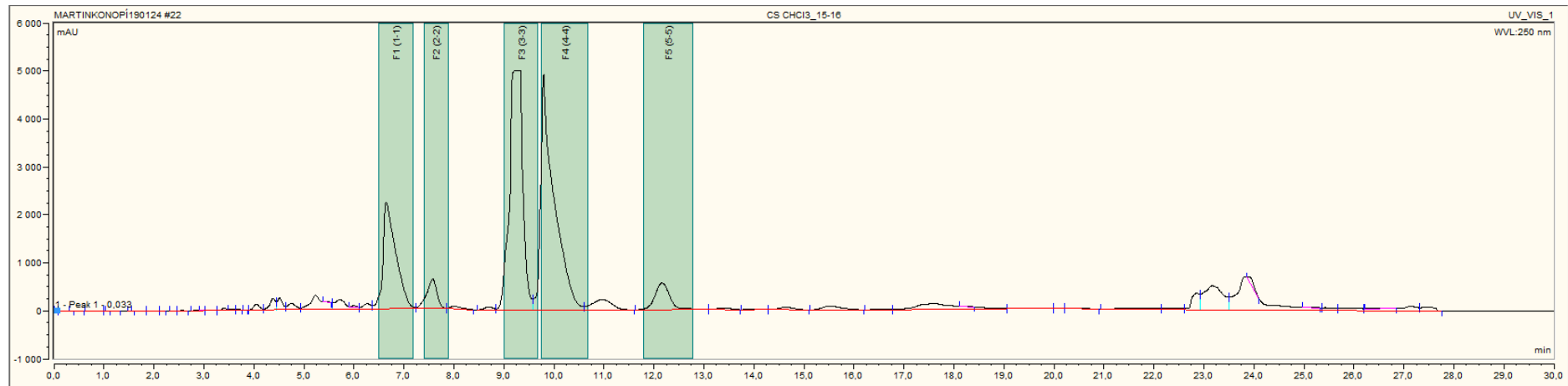


Ukážka separace



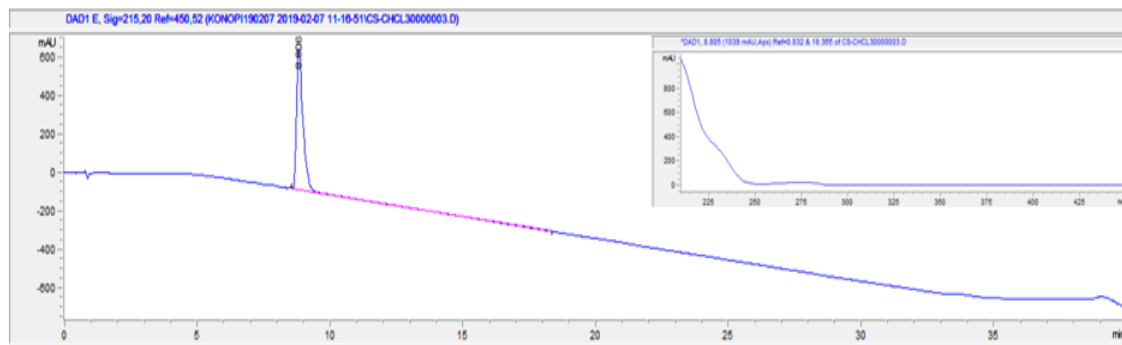
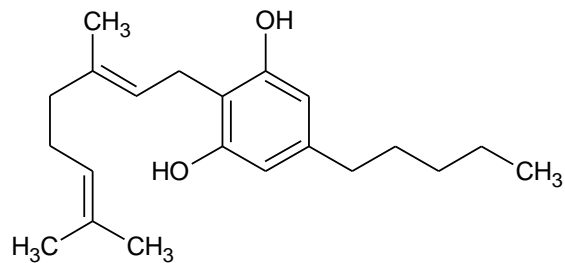
Látka	Hmotnosť [mg]
15-16/1	325
15-16/2	16
15-16/3	86
15-16/4	772
15-16/5	23

Analytický HPLC chromatogram frakcie CI CHCl₃ 15-16 pri 280 nm (metóda Konopi1)

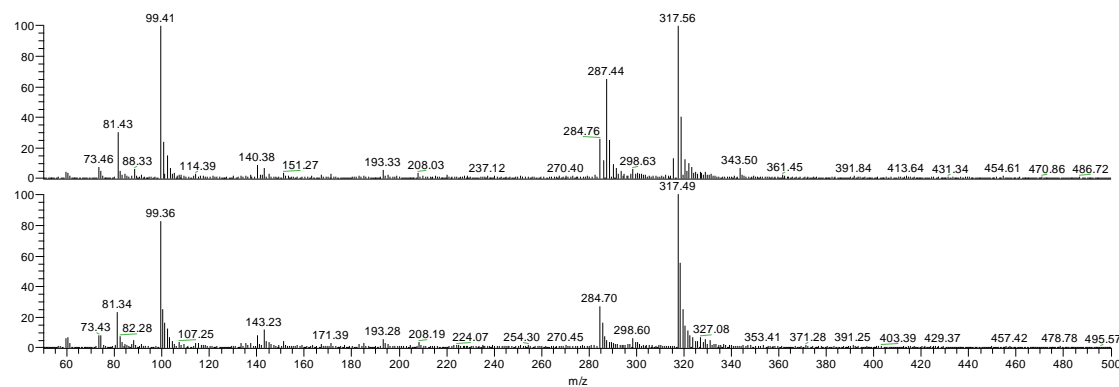


Chromatogram semipreparatívnej HPLC pri 254 nm. Zelenou sú zvýraznené oblasti zbierania frakcií.

Identifikace CBG



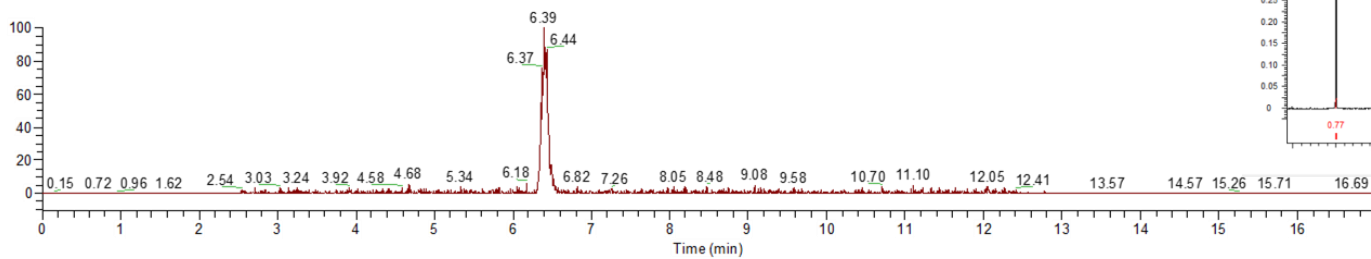
Analytický HPLC chromatogram subfrakcie CI CHCl₃ 15-16/1 pozorovaný pri vlnovej dĺžke 215 nm a UV spektrum píku s retenčným časom 8,606 min.



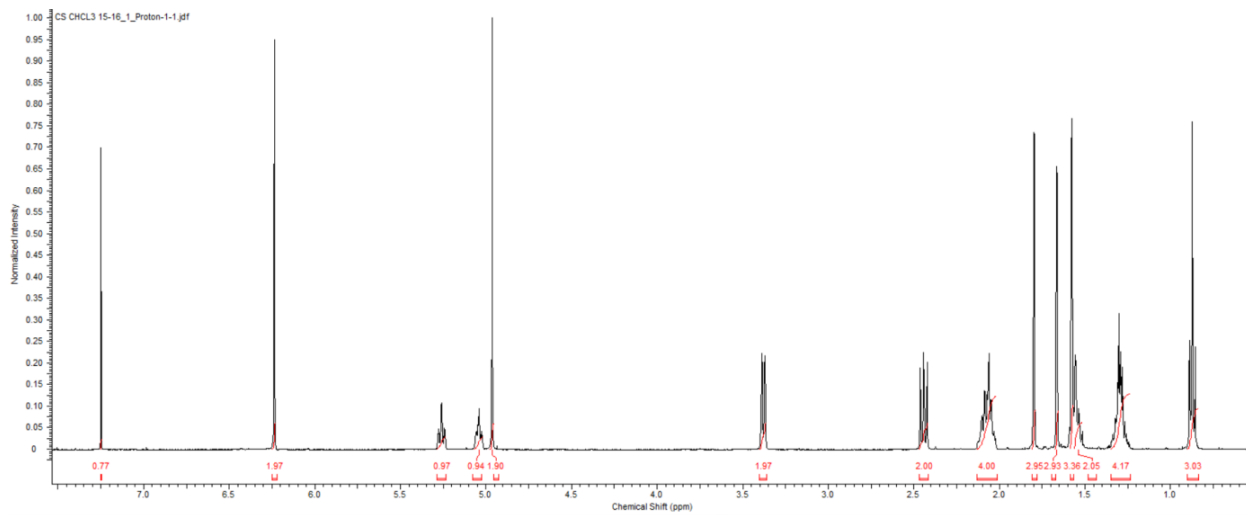
MS spektrum standardu CBG (hore).a MS spektrum subfrakcie CI CHCl₃ 15-16/1 (dole)

NL: 5.09E5
190821_02#1389-
1428 RT:
6.29-6.46 AV: 40
T: + c ESI Q1 MS
[50.000-500.000]

NL: 6.13E5
190822_12#1381-
1413 RT:
6.32-6.47 AV: 33
T: + c ESI Q1 MS
[50.000-500.000]



UHPLC-MS chromatogram subfrakcie CI CHCl₃ 15-16/1



¹H-NMR spektrum subfrakcie CI CHCl₃ 15-16/1 v CDCl₃ (5 mg/ml)

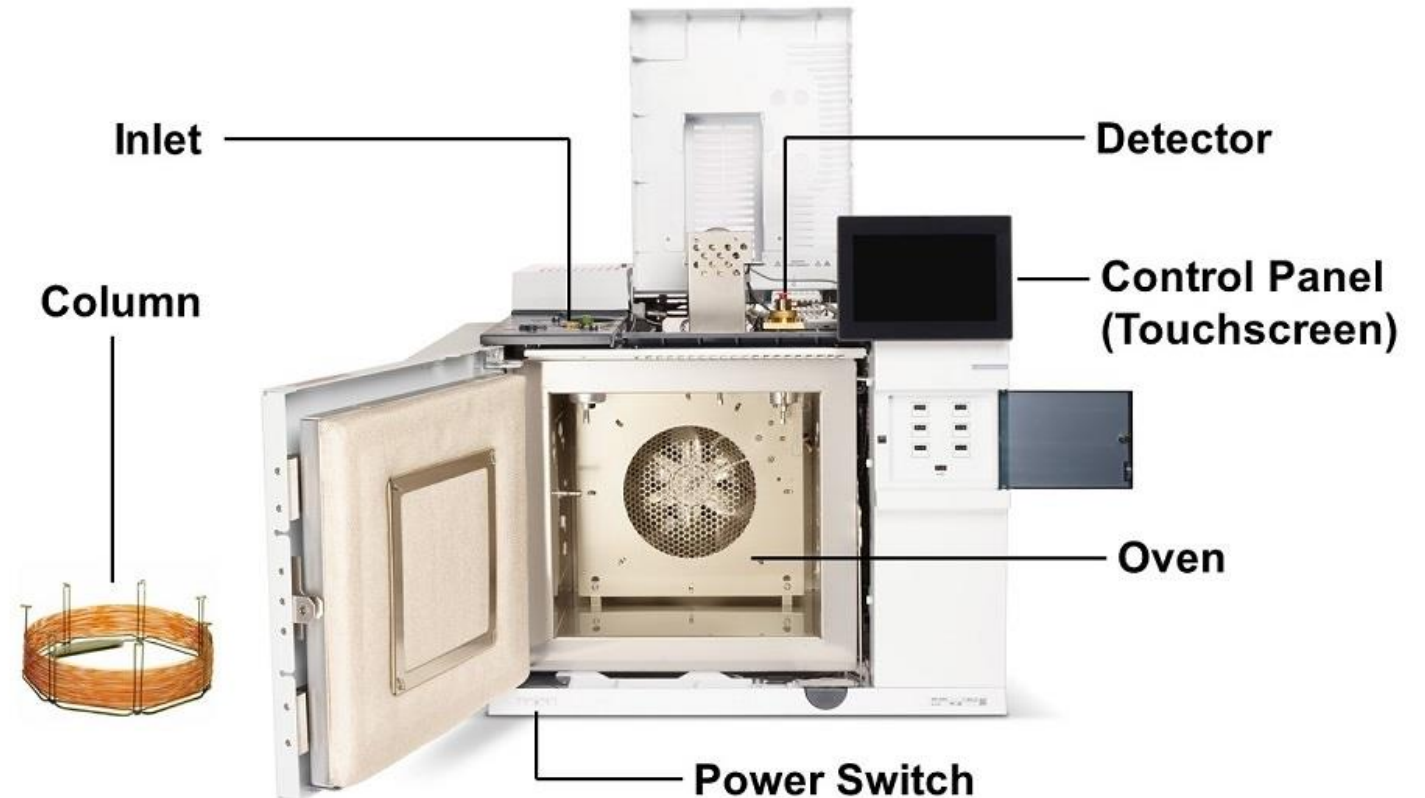
GC - gas chromatography

Plynová chromatografie

- Analytická separační technika užitečná pro separaci těkavých organických sloučenin
- Separace na základě rozdílného rozdělování a selektivní retardace v koloně
- Mobilní fáze - inertní plyn, pouze transport analytu kolonou, žádná interakce se vzorkem

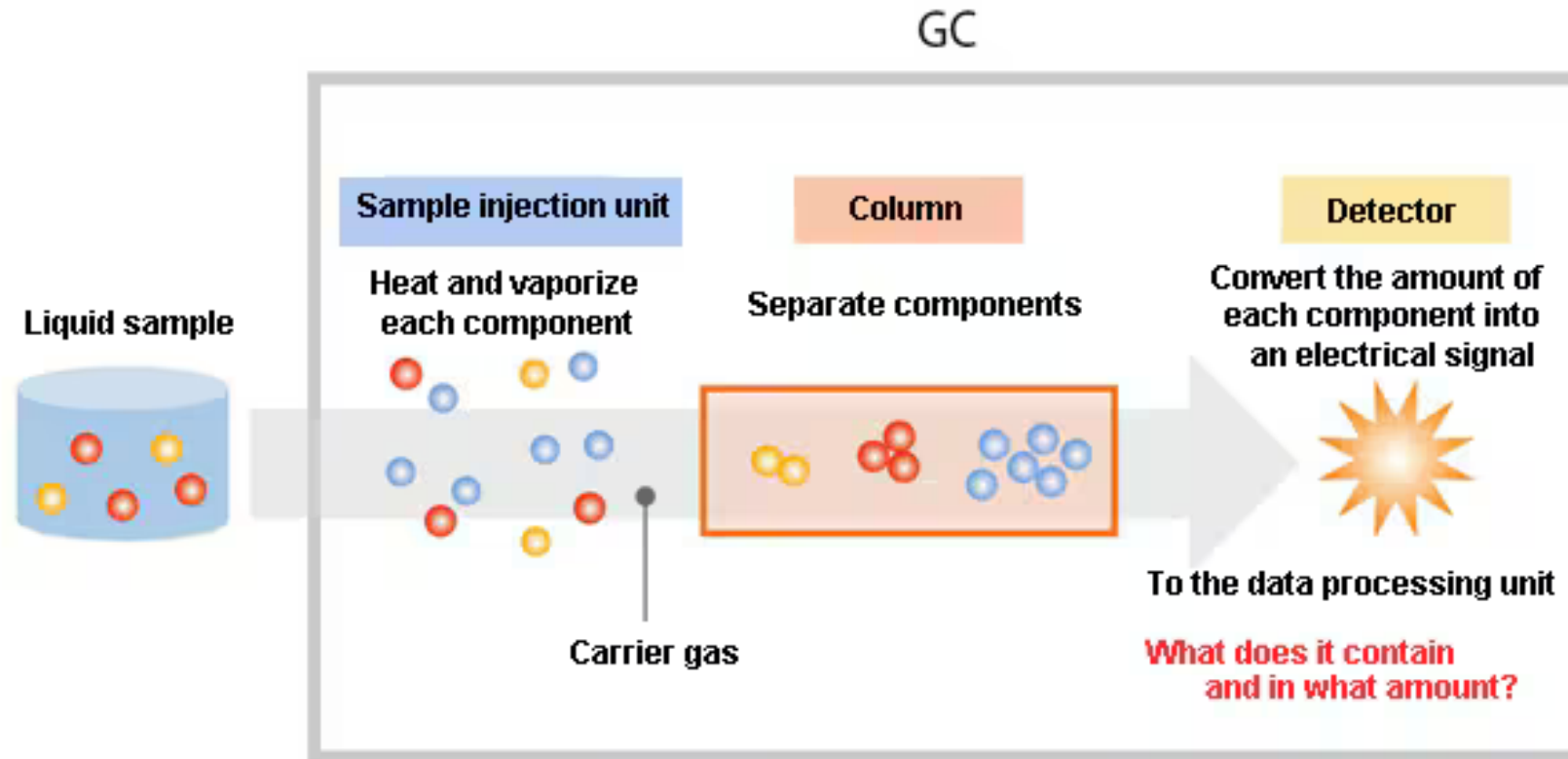
Zařízení se skládá ze:

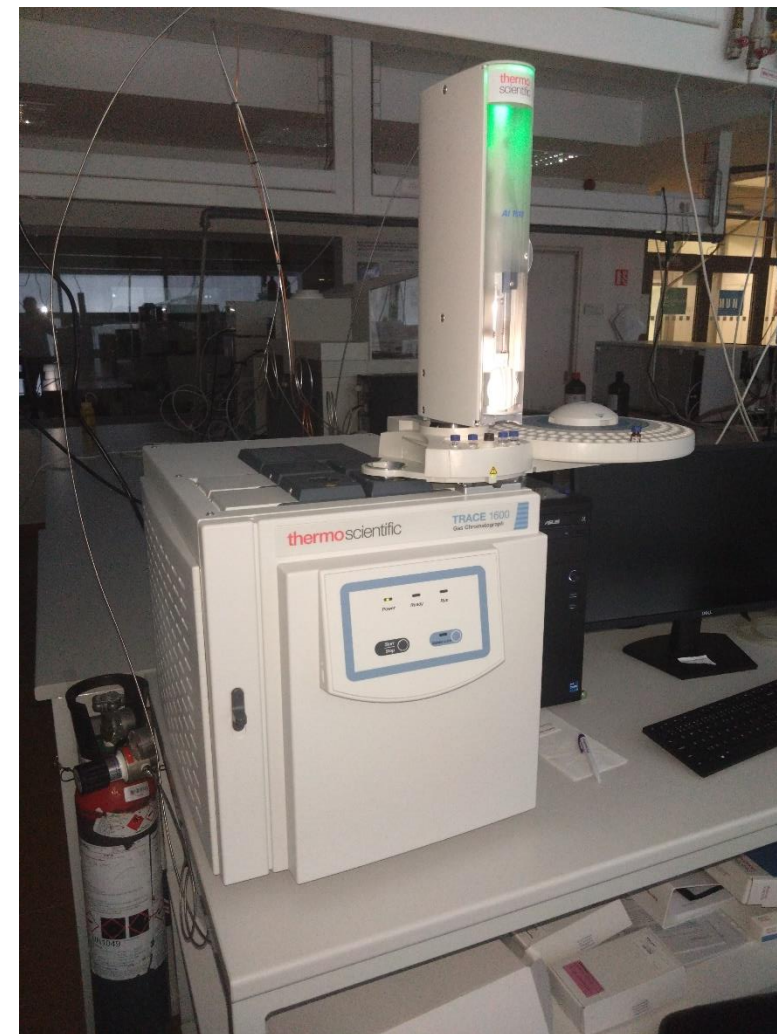
- Zásobníku mobilní fáze - inertní plyn (He, Ar)
- Injektoru - udržovaného při stabilní teplotě
- Separační kolony obsahující stabilní fázi - vyhřívané na kontrolovanou teplotu
- Detektoru



<https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/what-is-gas-chromatography>

Princip GC



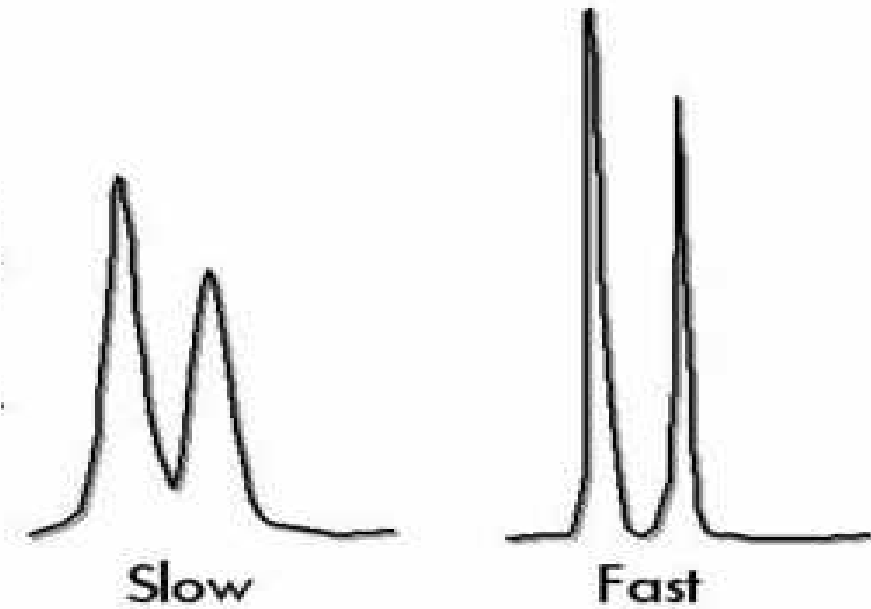
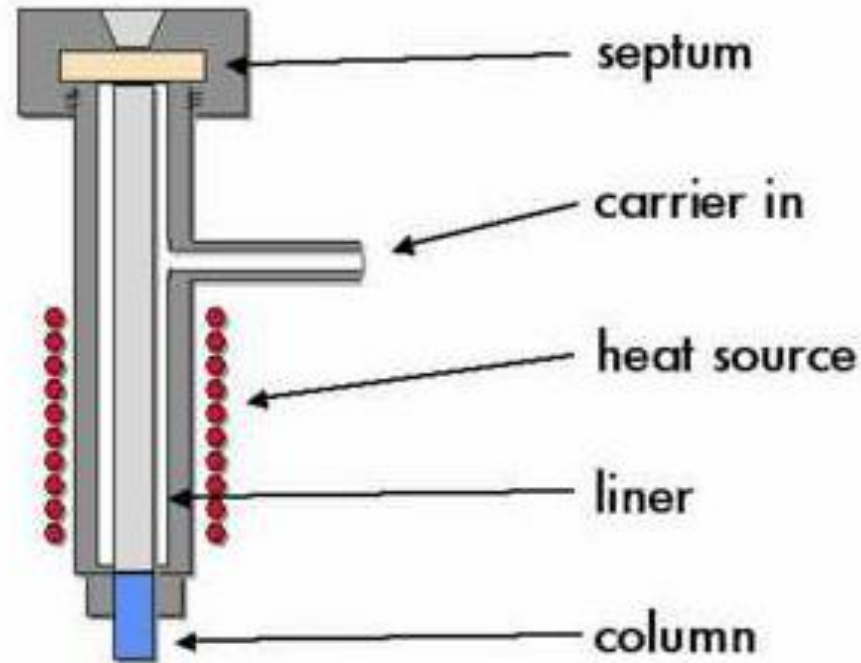


Mobilní fáze

- Nosný plyn
- Úkolem je transport vzorku
- Inertní k analytu i stacionární fázi
- N_2 , H_2 , He, v případě ionizačních detektorů s radioaktivním zářičem Ar

Injektor

- U vstupu do kolony
- Malý prostor pro zplynování vzorku
- Objem vzorku co nejmenší (0.1 - 1 μL)
- Teplota komory vyšší než bod varu nejméně těkavé složky roztoku

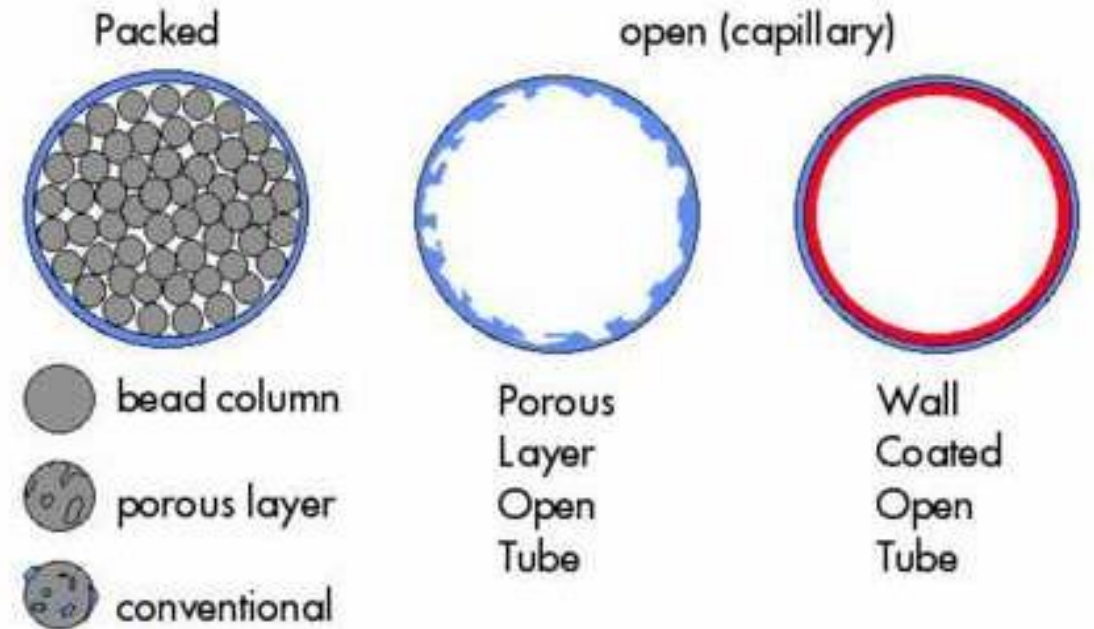


Mobilní fáze

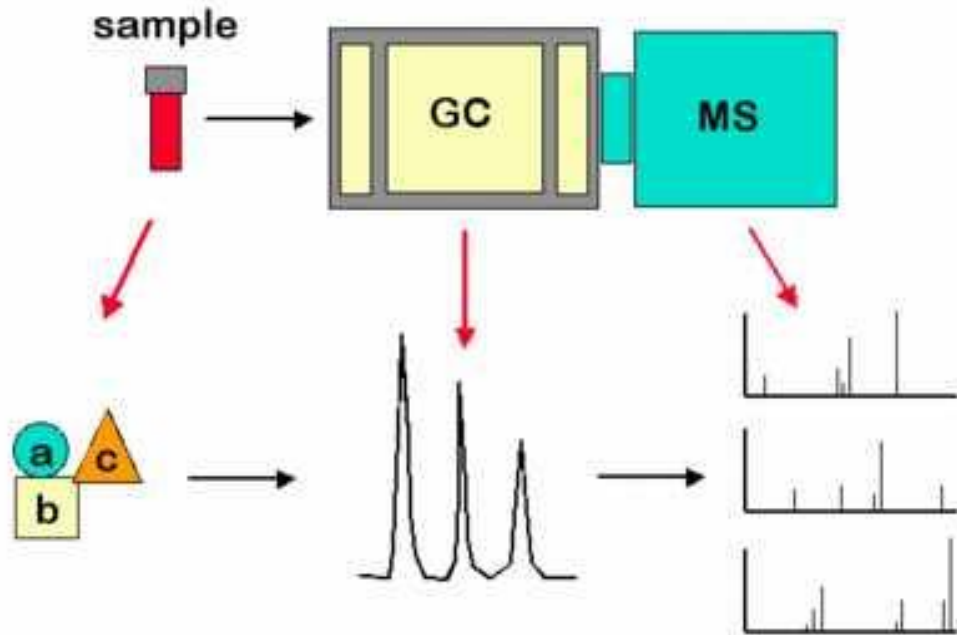
- Nosný plyn
- Úkolem je transport vzorku
- Inertní k analytu i stacionární fázi
- N_2 , H_2 , He, v případě ionizačních detektorů s radioaktivním zářičem Ar

Kolony

- Náplňové x kapilární
- Různé materiály
- Tvar podle typu chromatografu
 - rovné
 - tvaru U
 - šroubovice
- Nutnost udržovat stanovenou teplotu - rychlost pohybu složek vzorku je závislá na teplotě



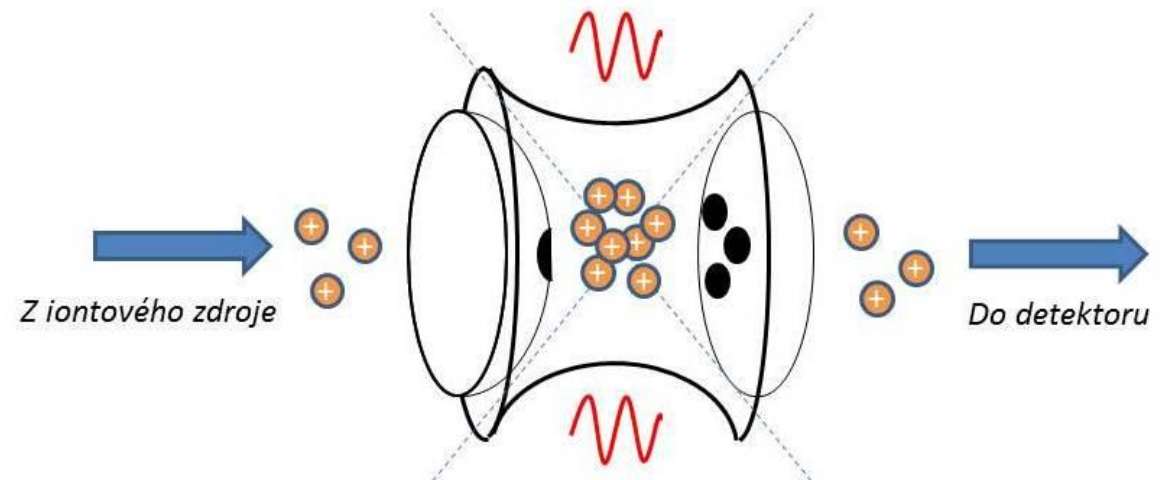
GC/MS process



Electron Impact (EI)- ionizace dopadem elektronového paprsku nebo silného elektrického pole
Chemical Ionization- ionizace pomocí ionizovaného plynu
Fast Atom Bombardment (FAB) – bombardování xenonovými atomy
citlivost 10^{-8} až 10^{-10} g/ml.

Hmotnostní detektory Mass spectroscopy MS

kombinace ionizačního, fragmentačního a separačního procesu
tvorba iontů různými metodami
fragmentace látky
záchyt - hmotnostní spektrum
interface mezi GC/MS
- vysoké vakuum
- molekulární separátory



GC-FID

- Z kolony odchází separované uhlovodíky
- Spalování v plamenu tvořeném spalováním vodíku



- Tvorba iontů a zachytávání signálu

- Široký dynamický rozsah
- Vysoká citlivost
- Stabilní a opakovatelná odpověď

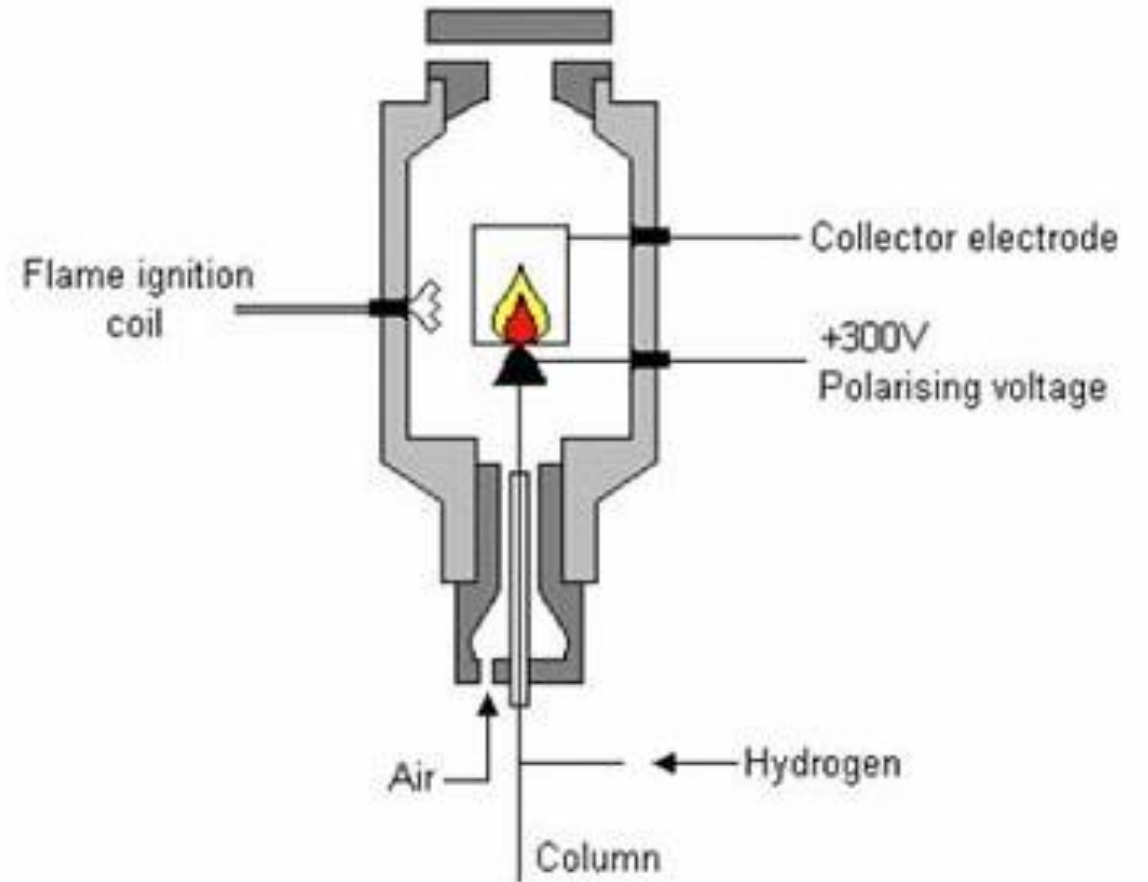


Figure 1. The Flame Ionisation Detector

GC konopných extraktů a materiálů

GC

- Analytická technika pro regulační orgány a toxikologické laboratoře
- Nestabilita kannabinoidů ve formě kyselin
 - Vysoká teplota během zplynování vzorku a separačního procesu
 - Analýza THC
 - Analýza THC x THCA x celkové THC
 - Podle legislativy, často nejjednodušší získat celkové THC

Total (celkové) THC

- Dekarboxylace před měřením
- 150 °C po dobu 5 min
- MW 900 W po dobu 1 min, 450 W po dobu 3 min
- Dekarboxylace i v injektoru a koloně, ale podle techniky může být nekompletní

GC konopných extraktů a materiálů

Derivatizace

- Pro překonání problémů s dekarboxylací
- Vytvoření stabilních derivátů, zachování těkavosti
- Trimethylsilylační činidla → konverze kannabinoidů na trimethylsilyl (TMS) deriváty
 - Trimethylhalosilany, trimethylsilyl (TMS)-aminy, TMS-estery a TMS-amidy, včetně N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (BSTFA), N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (MSTFA), a N-methyl-N-(tert-butyl)dimethylsilyl)trifluoroacetamidu (MTBSTFA).
 - Katalyzátory: trimethylchlorosilan (TMCS), trimethylsilylimidazol (TMSI), trimethyljodosilan (TMIS) nebo octan draselný
- Popisováno i lepší rozlišení derivátů než původních kannabinoidů
- Deriváty relativně stabilní i při laboratorní teplotě po dobu 48 hod.

Kolony

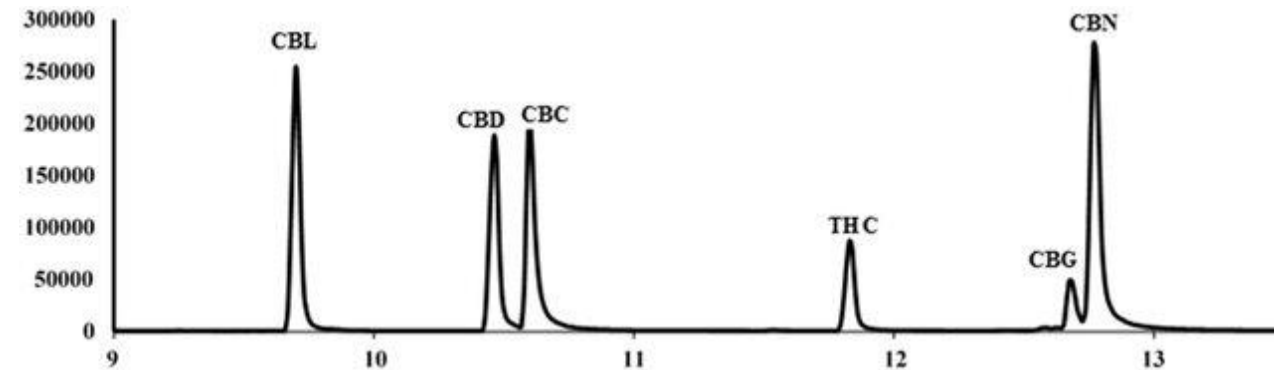
- Různé stacionární fáze
- Kannabinoidy obsahují aromatické skupiny, alkyly, hydroxylové skupiny (v případě kyselin karboxyly)
- Aromatické skupiny
 - Fenylové skupiny v dimethylpolysiloxanesilfenylech nebo směsné dimethylpolysiloxane-dimethyl-difenylové stacionární fáze
 - Nejčastěji směsné křemíkové nepolární kolony jako je 5% fenyl a 95% dimethylpolysiloxan
 - Více polární potahované kolony s 35 % fenylů a 65% dimethylpolysiloxanů

GC konopných extraktů a materiálů

Vnitřní standardy – kvantifikace Množství GC-MS metod

- Docosan a tetracosane pro FID
- Směsi kanabinoidních standardů
- Někdy nedostačující, drahé, málo minoritních kannabinoidů
- THC ne příliš často – relativně nestabilní
- Využití CBN (pro FID teoreticky 1 korelační faktor)
- American Herbal Pharmacopeia používá androsten-3,17-dion pro GC-FID
- Využití deuterovaných kannabinoidů (THC-d3, THC-d6 and THC-d9) pro MS detekci

- Typicky tripleQ nebo Ion Trap
- Využití typických MRM přechodů



Quantification of Cannabinoids in Cultivars of Cannabis sp. by Gas Chromatography–Mass Spectrometry

August 2021 · *Chromatographia* 84(8)

DOI: [10.1007/s10337-021-04060-9](https://doi.org/10.1007/s10337-021-04060-9)

Abdul Qudeer Ahmed · David Noshad · Paul C. H. Li

Table 1
GC methods for the analysis of cannabinoids in cannabis-based products.

Sample Type	Extraction Method	GC System	GC column and Temperature Program	Cannabinoids	Ref.
<i>Cannabis sativa</i> spp. <i>sativa</i> , <i>Cannabis sativa</i> spp. <i>indica</i> and hybrid forms	Preliminary liquid extraction: water:methanol:acetone (5:4:1) and stir bar sorptive extraction (SBSE) with PDMS phase	GC × GC-LR ToF MS	¹ D: Rxi-5MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>) ² D: Rxi-17Sil MS (5.0 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 50°C (2 min) to 330°C (2 min) at 3°C/min	THC, CBD, CBN	[2]
Hemp inflorescences	Steam distillation (SD) and hydro-distillation (HD)	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.10 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C (5 min) to 220°C at 4°C/min and after up to 280°C (15 min) at 11°C/min	CBDV; CBD; CBC; THC	[10]
		GC-FID	DB-225 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 40°C (3 min) to 220°C (5 min) at 20°C/min and after up to 240°C (23 min) at 20°C/min		
Cannabis inflorescences, cannabis resin and cannabis oil	Solvent extraction: ethanol	GC-FID	5% Diphenyl – 95% Dimethylpolysiloxane stationary phase (15 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 200°C (2 min) to 240°C (2 min) at 10°C/min	CBD, Δ ⁹ -THC, CBN	[18]
Marijuana inflorescences	Solvent extraction: methanol	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 150°C (1 min) to 280°C (5 min) at 10°C/min	Δ ⁹ -THC, THCV, CBC, CBD, THC, CBG, CBN	[20]
		GC-FID	HP-5 MS (30 m × 0.32 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 150°C (1 min) to 280°C (5 min) at 10°C/min		
Hop	Solvent extraction: methanol	GC-MS/MS	Rxi-5 ms (20 m × 0.18 mm <i>id</i> × 0.18 μm <i>df</i>). Temp. Program: 40°C (1 min) to 200°C at 20°C/min and after up to 235°C or 242°C at 3°C/min	THCV, CBD, CBC, Δ ⁹ -THC, Δ ⁹ -THC, CBG, CBN	[21]
Medical cannabis and hemp inflorescences	Solvent extraction: n-hexane	GC-ToF/MS	DB-5MS-UI (30 m × 0.32 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 50°C to 104°C (27 min) at 2°C/min, after up to 120°C (0.8 min) at 20°C/min, after up to 160°C (10 min) at 4°C/min, after up to 232°C (2.9 min) 25°C/min, after up to 242°C (6.7 min) 1.5°C/min, after up to 250°C (4 min) 2°C/min to, and finally up to 300°C (2 min) from 25°C/min	CBDV, Δ ⁹ -THCV, CBD, CBC, Δ ⁸ -THC, Δ ⁹ -THC, CBG, CBN	[22]
Marijuana and medical cannabis inflorescences	Solvent extraction: ethanol	GC-MS and GC-FID	DB-5 (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C to 240°C (5 min) at 3°C/min	THCV, CBC, CBD, CBGM, THC, CBG, CBN	[23]
Marijuana inflorescences	Solvent extraction: ethanol	GC-MS	DB-5ms (15 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C to 240°C (2 min) at 8.5°C/min	CBDV, THCV, CBD, CBC, THC, CBN, CBG	[24]
Marijuana inflorescences, cannabis-based products and hempseed oils	Solvent extraction: pure ethanol, 95% ethanol and 100% acetonitrile	GC-MS	Rxi-35Sil MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). DGSMS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). HP5MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C (0.5 min) to 220°C (10 min) at 25°C/min and after up to 300°C (15 min) at 10°C/min	CBD, CBDA, CBN, THC, THCA, Δ ⁸ -THC, CBC, CBDV, THCV, CBG, CBGA	[27]
Marijuana inflorescences	Solvent extraction: hexane	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 100°C (1 min) to 260°C (10 min) at 10°C/min	CBC, CBD, THC, CBG, CBN	[29]
Hashish	Solvent extraction: hexane	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 100°C to 260°C (10 min) at 10°C/min	CBC, CBD, THC, CBG, CBN	[30]
Marijuana inflorescences	HS-SPME: PDMS (100 μm), PDMS/DVB (65 μm), CAR/PDMS (85 μm), DVB/CAR/PDMS (50/30 μm)	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 150°C (2 min) to 210°C (10 min) at 30°C/min, from 210°C to 250°C at 5°C/min after up to 280°C (3.0 min) at 10°C/min	THCV, CBCL, CBV; CBD; CBC, Δ ⁹ -THC, CBG, CBN	[37]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Sample Type	Extraction Method	GC System	GC column and Temperature Program	Cannabinoids	Ref.
Hemp and marijuana inflorescences, hashish and hash oil	Solvent extraction: chloroform/methanol (9:1)	GC-FID	DB1 MS (15 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 170°C (1 min) to 250°C (3 min) at 10°C/min	THCV, CBD, CBC, Δ ⁹ -THC, CBG, CBN	[44]
Marijuana inflorescences	Not specified	GC-FID	Zebtron™ ZB-35HT (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 80°C (1 min) to 120°C at 15°C/min and after up to 325°C (2.1 min) at 25°C/min	Δ ⁸ -THC, Δ ⁹ -THC, CBD, CBN	[46]
Medical cannabis inflorescences	Not specified	GC-FID	Rxi®-35Sil MS (15 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 190°C (0.1 min) to 330°C (0.9 min) at 35°C/min	CBDV, THCV, CBC, CBD, Δ ⁸ -THC, Δ ⁹ -THC, CBG, CBN	[47]
Hashish	Solvent extraction: petroleum ether	GC-MS	DB5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 120°C (5 min) to 290°C (15 min) at 10°C/min	CBD, CBN, Δ ⁹ -THC	[50]
		GC-FID	SPB 35 (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 200°C (1 min) to 230°C at 10°C/min and after up to 300°C at 3°C/min		
Marijuana inflorescences	Solvent extraction: hexane	GC-MS	HP-5 (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 100°C to 300°C (8 min) at 15°C/min	CBD, Δ ⁹ -THC, CBN	[51]
Hemp inflorescences	Solvent extraction: methanol/chloroform (9:1)	fast GC/MS	RTX 5 (10 m × 0.10 mm <i>id</i> × 0.10 μm <i>df</i>). Temp. Program: 180°C (30 sec) to 250°C at 10°C/min and after up to 350°C at 60°C/min	THCV, CBD, CBC, Δ ⁸ -THC, Δ ⁹ -THC, CBG, CBN, CBDA, THCA, CBGA	[52]
Hemp inflorescences	Hydro-distillation (HD) and SPME with PDMS (100 μm) and Carboxen (100 μm) phases	GC-MS	HP-5 (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C (10 min) to 220°C at 5°C/min	THC, CBD	[53]
		GC-FID	HP-WAX (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C to 240°C at 3°C/min		
Hemp inflorescences	Hydro-distillation (HD)	GC-MS	DB-5 (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C to 240°C at 3°C/min	CBD, CBC	[54]
Marijuana inflorescences	Solvent extraction: ethanol, hexane, and a mixture of hexane and ethanol (7:3)	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 50°C (2 min) to 300°C at 6°C/min	CBD, CBC, CBG, CBN, THC	[55]
Marijuana inflorescences	Supercritical fluid extraction (SFE)	GC × GC-FID/MS	¹ D: HP-5MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>) ² D: DB-17MS (5.0 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C to 102°C at 4°C/min, from 102°C to 165°C at 12°C/min and 165°C to 300°C (5 min) at 6°C/min	THC	[56]
Hemp foods	Solvent extraction: hexane/isopropanol (9:1)	GC-MS	HP-5MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 120°C (2 min) to 290°C (10 min) at 20°C/min	CBD, THC, CBN	[57]
Hemp inflorescences	Steam distillation (SD)	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.10 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C (5 min) to 280°C (15 min) at 4°C/min	CBD	[58]
		GC-FID	HP-5 MS (30 m × 0.32 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 60°C (3 min) to 350°C (1 min) at 25°C/min		
Hemp inflorescences	Solvent extraction: hexane/ethyl acetate (60:40)	GC-MS	HP-5 MS (30 m × 0.25 mm <i>id</i> × 0.25 μm <i>df</i>). Temp. Program: 100°C (1 min) to 290°C (10 min) at 20°C/min	CBD, CBN, THC	[59]