



# **KANNABINOIDIDE MÄÄRAMINE VEDELIKKROMATOGRAAFIA JA TANDEMMASSISPEKTROMEETRIA MEETODIL**

Magistritöö

Üliõpilane: Mann Vares

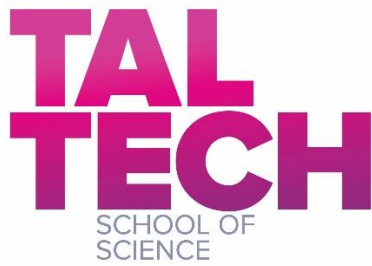
Juhendaja: Aime Riikoja, Eesti Kohtuekspertiisi instituut, keemiaosakonna juhataja

Kaasjuhendaja: Maria Kuhtinskaja, Keemia ja Biotehnoloogia Instituut, dotsent

Mentor: Tarmo Barndök, Eesti Kohtuekspertiisi instituut, ekspert

Õppekava: YASM02/18 - Rakenduskeemia ja biotehnoloogia

Tallinn 2021



# **QUANTITATION OF CANNABINOIDS USING LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY**

Master thesis

Student: Mann Vares

Supervisor: Aime Riikoja, Estonian Forensic Science Institute, Head of Chemistry department

Co-supervisor: Maria Kuhtinskaja, Tallinn University of Technology, Associate professor

Mentor: Tarmo Barndõk, Estonian Forensic Science Institute, Expert

Study program: YASM02/18

Tallinn 2021

## **Autorideklaratsioon**

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Mann Vares

[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab magistritööle esitatavatele nõuetele.

Juhendaja: Aime Riikoja

[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.

Kaitsmiskomisjoni esimees: Tõnis Timmusk

[allkiri ja kuupäev]

# Sisukord

<b>Autorideklaratsioon.....</b>	<b>3</b>
<b>Sisukord .....</b>	<b>4</b>
<b>Kasutatud lühendite loetelu.....</b>	<b>6</b>
<b>Sissejuhatus .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Kirjanduslik ülevaade.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Kanep ja kannabinoidid .....</b>	<b>9</b>
1.1.1 Kanepi taksonoomia .....	9
1.1.2 Kanepi bioloogilised tunnused .....	9
1.1.3 Kanepi keemilised tunnused: kannabinoidid .....	10
1.1.4 Kanepi legaalsus Eestis .....	13
1.1.5 Analüütilised meetodid kannabinoidide määramiseks .....	14
<b>1.2 Kromatomassispektromeetria.....</b>	<b>14</b>
1.2.1 Meetodika optimeerimine: statsionaarne ja mobiilne faas.....	14
1.2.2 Massispektromeeter .....	15
<b>1.3 Valideerimine .....</b>	<b>17</b>
1.3.1 Selektiivsus ja spetsiifilisus .....	17
1.3.2 Täpsus: kordustäpsus, tõesus, saagis .....	18
1.3.3 Lineaarsus/lineaarne ala.....	19
1.3.4 Avastamis- ja määramispiir .....	19
1.3.5 Tundlikkus.....	19
1.3.6 Robustsus .....	19
<b>1.4 Mõõtemääramatus.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 Kannabinoidide määramine LC-MS/MS meetodiga .....</b>	<b>20</b>
1.5.1 Kannabinoidide massispektrid .....	20
1.5.2 Kirjanduses olevate meetodikate parameetrid.....	22
1.5.3 Kirjanduses olevate meetodikate proovide ettevalmistamise protokollid .....	22
<b>2 Töö eesmärk.....</b>	<b>23</b>
<b>3 Eksperimentaalne osa.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Materjalid ja meetodika .....</b>	<b>24</b>
3.1.1 Materjalid ja analüütilised instrumendid .....	24
3.1.2 MRM meetodi parameetrite optimeerimine .....	24
3.1.3 Standardainete segu ja sisestandardi valmistamine .....	25
3.1.4 Statsionaarse faasi valik .....	26
3.1.5 Mobiilse faasi valik .....	26
3.1.6 Kalibreerimisgraafiku moodustamine .....	27
3.1.7 Proovide ettevalmistamine ja ekstraheerimine .....	27
<b>3.2 Tulemused .....</b>	<b>28</b>
3.2.1 MRM parameetrid ja produktooni skaneerimine .....	28
3.2.2 Statsionaarne ja mobiilne faas .....	29

3.2.3	Kannabinoidide valideerimisparameetrid: selektiivsus ja spetsiifilisus .....	34
3.2.4	Kannabinoidide valideerimisparameetrid: lineaarsus ja tundlikkus .....	36
3.2.5	Kannabinoidide valideerimisparameetrid: avastamis- ja määramispiirkond.....	38
3.2.6	Kannabinoidide valideerimisparameetrid: kordustäpsus, täpsus, saagis .....	38
3.2.7	Kannabinoidide valideerimisparameetrid: robustsus .....	40
3.2.8	Kannabinoidide valideerimisparameetrid: mõõtemääramatus .....	40
3.2.9	Metoodika rakendamine reaalse proovi analüüsimiseks.....	41
<b>4</b>	<b>Arutelu ja järeldused .....</b>	<b>46</b>
4.1.1	Metoodika parameetrid .....	46
4.1.2	Metoodika kokkuvõtlikud valideerimistulemused .....	46
<b>5</b>	<b>Kokkuvõte .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Abstract .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Tänuavaldus .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>Kasutatud kirjanduse loetelu .....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>LISAD .....</b>	<b>53</b>
<b>10</b>	<b>LISA 1. Kanepitaim ja selle osad .....</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>LISA 2. Kannabinoidide biosünteesirada .....</b>	<b>54</b>
<b>12</b>	<b>LISA 3. <math>\Delta^9</math>-THC oksüdatiivne degradeerumine CBN-iks .....</b>	<b>55</b>
<b>13</b>	<b>LISA 4. Esilekutsutud MRM režiimi skeem.....</b>	<b>56</b>
<b>14</b>	<b>LISA 5. Avastamis- ja määramispiirkonna arvutamise meetodid .....</b>	<b>57</b>
<b>15</b>	<b>LISA 6. Standardainete referentsmaterjalid .....</b>	<b>58</b>
<b>16</b>	<b>LISA 7. <math>\Delta^9</math>-THC valideerimisandmed.....</b>	<b>59</b>
<b>17</b>	<b>LISA 8. <math>\Delta^9</math>-THCA valideerimisandmed .....</b>	<b>62</b>
<b>18</b>	<b>LISA 9. Kogu THC analüüs reaalse proovi võrdluses .....</b>	<b>66</b>
<b>19</b>	<b>LISA 10. CBD valideerimisandmed .....</b>	<b>67</b>
<b>20</b>	<b>LISA 11. CBDA valideerimisandmed .....</b>	<b>73</b>
<b>21</b>	<b>LISA 12. Kogu CBD analüüs reaalse proovi võrdluses .....</b>	<b>77</b>
<b>22</b>	<b>LISA 13. CBN valideerimisandmed .....</b>	<b>78</b>
<b>23</b>	<b>LISA 14. CBN analüüs reaalse proovi võrdluses .....</b>	<b>82</b>

## Kasutatud lühendite loetelu

Lühend	Inglise keeles	Eesti keeles
Δ8-THC	<i>Delta8-tetrahydrocannabinol</i>	Delta8-tetrahüdrokannabinool
Δ9-THC	<i>Trans-delta9-tetrahydrocannabinol</i>	Trans-delta9-tetrahüdrokannabinool
ACN	<i>Acetonitrile</i>	Atsetonitril
AF	<i>Ammonium formate</i>	Ammoonium formiaat
CAV	<i>Cell Acceleration Voltage</i>	Raku kiirenduspinge
CBC	<i>Cannabichromene</i>	Kannabikromeen
CBD	<i>Cannabidiol</i>	Kannabidiol
CBD-d3	<i>Deuterated cannabidiol</i>	Deuteeritud kannabidiol
CBE	<i>Cannabielsoin</i>	Kannabielsoin
CBG	<i>Cannabigerol</i>	Kannabigerool
CBL	<i>Cannabicyclol</i>	Kannabitsüklool
CBN	<i>Cannabinol</i>	Kannabinool
CBND	<i>Cannabinodiol</i>	Kannabinodiol
CBT	<i>Cannabitrilol</i>	Kannabitrilool
CE	<i>Collision energy</i>	Kollisioonienergia
DAD	<i>Diode array detector</i>	Diodrividetektor
EtOH	<i>Ethanol</i>	Etanool
ESI	<i>Electrosprey ionization</i>	Elektropihustuse ionisatsioon
FA	<i>Formic Acid</i>	Sipelghape
FID	<i>Flame ionization detector</i>	Leekionisatsioonidetektor
FTIR	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>	Fourier teisendusega infrapuna spektroskoopia
GC	<i>Gas chromatography</i>	Gaasikromatograafia
GPP	<i>Geranyl pyrophosphate</i>	Geranüülpürofosfaat
IS	<i>Internal standard</i>	Sisestandard
ISO	<i>the International Organization for Standardization</i>	Rahvusvaheline Standardiorganisatsioon
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>	Kõrgsurvevedelikromatograafia
MeOH	<i>Methanol</i>	Metanool
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>	Mitme reaktsiooni seire
tMRM	<i>Triggered multiple reaction monitoring</i>	Esilekutsutud mitme reaktsiooni seire
dMRM	<i>Dynamic multiple reaction monitoring</i>	Dünaamiline mitme reaktsiooni seire
MS	<i>Mass spectrometry</i>	Massispektromeetria
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>	Tandem-massispektromeetria
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>	Tuumamagnetresonants
RT/ret. aeg	<i>Retention time</i>	Retentsiooniaeg
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>	Trifluoroäädikhape
THC-d3	<i>Deuterated delta9-tetrahydrocannabinol</i>	Deuteeritud delta9-tetrahüdrokannabinool
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>	Õhekihikromatograafia

## Sissejuhatus

Kanepit (*Cannabis sativa* L.) on kasutatud aastatuhandeid. Kannabinoidid seonduvad organismis CB<sub>1</sub> ja CB<sub>2</sub> retseptoritele, mis vastutavad närvisüsteemi, isukuse, emotsioonide, kehalise motoorika jm eest. On teada, et just need retseptorid on olulisel kohal järgmiste haiguste puhul: valu, *Sclerosis multiplex*, anoreksia, iiveldus ja oksendamine, seedehäired, unehäired, Tourette'i sündroom, ärevus, epilepsia, skisofreenia, Alzheimeri ja Parkinsoni tõbi. (1) Oma headele omadustele vaatamata omab kanep ka psühhoaktiivset toimet.

Kanepitaim sisaldab erinevaid keemilisi aineid, seal hulgas ka fütokannabinoidide. Peamised fütokannabinoidid on CBD ja  $\Delta^9$ -THC. CBD omab lõõgastavat, valu leevendavat toimet, kuid ta ei ole psühhoaktiivne aine.  $\Delta^9$ -THC vastutab kognitsiooni, emotsioonide, isu, kehalise motoorika eest ning mõjutab perifeerset närvisüsteemi.  $\Delta^9$ -THC on psühhoaktiivne aine, mis on määratud narkootiliste ja psühhotroopsete ainete ja ainerühmade nimekirja. Lubatud  $\Delta^9$ -THC kontsentratsioon on alla 0.2%. Üle 0.2%  $\Delta^9$ -THC sisaldusega kanepitaim ja -toote omamine, käitlemine, kasutamine on Eestis keelatud.

Kannabinoidide määramiseks on enamlevinud meetod gaasikromatograafia (GC) meetod. GC meetodi puuduseks on kõrgetel temperatuuridel lagunevad  $\Delta^9$ -THC ja CBD karboksüülhapped. Antud karboksüülhapped lagunevad vastavalt  $\Delta^9$ -THC-ks ja CBD-ks. See võib aga tähendada  $\Delta^9$ -THC ja ka CBD kontsentratsioonide ülehindamist. Narkootilise kanepi puhul ( $\Delta^9$ -THC kontsentratsioon üle 0.2%), mille kasutamisel kasutatakse kuumutamist (suitsetamine, küpsetamine), muutuvad antud ainete karboksüülhapped  $\Delta^9$ -THC-ks ja CBD-ks ning sellega seoses ülehindamist GC meetodiga ei toimu.

Aastal 2019 hakkas Eestisse tekkima hulgaliselt kanepipode, mis müüvad „THC-vabaid“ või alla 0.2%  $\Delta^9$ -THC sisaldavaid tooteid (2). Need tooted on tööstuslik kanep, pastad, kreemid, õlid, jpm. Enamus toodete kasutamisel kuumutamist ei toimu ning  $\Delta^9$ -THC määramisel GC meetodiga tekib selle kontsentratsiooni ülehindamine. Kuna antud poodide toodete legaalsust peab siiski kontrollima, siis GC meetod ei pruugi olla enam piisav. Probleem on lahendatav kasutades vedelikkromatograafia (LC) meetodit, sest sealsed temperatuurid ei ole kõrged, et  $\Delta^9$ -THC ja CBD karboksüülhapped laguneksid  $\Delta^9$ -THC-ks ja CBD-ks.

LC kasutamine kannabinoidide määramisel ei ole kasutusel olnud väga pikalt, sest meetod on kallid ning aeganõudev. Sellegi poolest on hakatud kannabinoidide määramiseks ka HPLC meetodiga. Üldiselt kasutatakse seda koos DAD detektoriga, sest see on odavam ja lihtsam opereerimisel. Kõige täpsemad kvantitatiivsed tulemused saavutatakse siiski HPLC meetodiga koos tandem-massispektromeetriaga (LC-MS/MS). LC-MS/MS võimaldab kasutada ka mitme reaktsiooni seire (MRM) režiimi, mis annab veel lisaks olulise tundlikuse ja täpsuse.

Käesolev töö koosneb kirjanduslikust ülevaatest ning eksperimentaalsest osast. Kirjanduslikus osas antakse ülevaade kanepist ja kannabinoididest, kõrgsurvevedelikkromatograafiast, meetodika valideerimisest, mõõtemääramatuse arvutamisest ning olemasoleva kirjanduse analüüsist

kannabinoidide määramisel HPLC meetodiga. Eksperimentaalses osas kirjeldatakse kasutatud materjale, standardainete segu valmistamise protokoll, meetodika optimeerimise samme, kalibreerimisgraafiku moodustamise põhimõtteid, reaalse proovi ettevalmistamise ja ekstraheerimise protokoll. Lisaks kirjeldatakse saadud tulemusi: meetodika optimeerimise samme ning iga kannabinoidi jaoks eraldi veel selle valideerimistulemusi. Eksperimentaalse osa lõpus asub reaalse proovi analüüs iga kannabinoidi kohta meetodika valideerimistulemusi arvestades. Töö lõpetab arutelu, järeldused ning kokkuvõte.

Käesoleva magistr töö eesmärk on välja töötada, optimeerida ja osaliselt valideerida meetodika kannabinoidide ( $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD, CBDA, CBN) kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks vedelikkromatograafia ja tandemmassispektromeetria (LC-MS/MS) abil, mitme reaktsiooni seire (MRM) režiimis.



# 1 Kirjanduslik ülevaade

## 1.1 Kanep ja kannabinoidid

### 1.1.1 Kanepi taksonoomia

Kanep (*Cannabis sativa* Linnaeus ehk *C. Sativa* L.) on õistaim, mis kuulub kanepi (*Cannabis*) perekonda kanepiliste (*Cannabaceae*) sugukonda. Hariliku kanepi alamliikide nimetus ja taksonoomia on aastasadu olnud erinev, kuid üldlevinud alamliigid harilikule kanepile on järgmised (3), (4), (5), (6), (7):

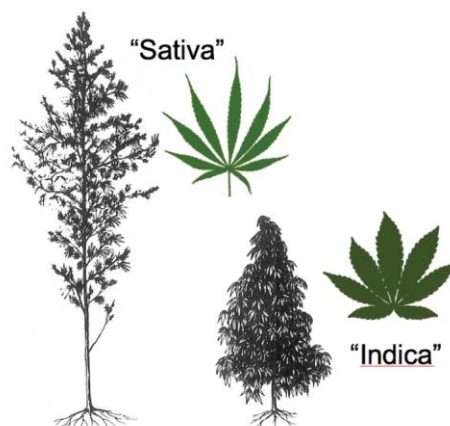
- *C. sativa* subsp. *sativa* var. *sativa*
- *C. sativa* subsp. *sativa* var. *spontanea* (erinevates allikates ka *C. Ruderalis*)
- *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica*
- *C. sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica*.

Üldiselt jaotatakse kanepi alamliigid nii, et *C. sativa* subsp. *sativa* var. *Sativa* ja *C. sativa* subsp. *sativa* var. *Spontanea* on liigid, mida nimetatakse koondnimega *C. sativa*. Neid kasvatatakse tööstuslikul (kiu- ja seemnekanep) eesmärgil ning oma madala delta-9-tetrahydrokannabinooli ( $\Delta^9$ -THC) sisalduse tõttu ei ole nad psühhotroopse ja narkootilise toimega. (6). *C. sativa* kasvuala on üldiselt Põhja-Ameerikas, Euroopas, Ida-Aasias ja Lääne-Aasias. Sealjuures *C. sativa* subsp. var. *sativa* on kodustatud ja aretatud liik ning *C. sativa* subsp. var. *spontanea* on metsik liik. (3), (4), (5), (6), (7), (8)

*C. indica* on koondnimi ülejäänud kahele alamliigile, mõlemad sisaldavad suuremas koguses THC-d ning on seetõttu klassifitseeritud kui psühhotroopse ning narkootilise toimeainega taimed. (6). *C. indica* taimed kasvavad Kesk-Aasias ja Lõuna-Aasias (peamiselt Afganistanis ja selle lähiriikides). *C. sativa* subsp. *indica* var. *indica* on kodustatud ja aretatud liik ning *C. sativa* subsp. *indica* var. *kafiristanica* on metsik liik. (3), (4), (5), (6), (7), (8)

### 1.1.2 Kanepi bioloogilised tunnused

*C. indica* ja *C. sativa* peamised morfoloogilised erinevused on lehtedes ning taime enda kõrguses: *C. sativa* lehed on kitsamad ja väiksemad kui *C. indica* omad. Kuigi lehed on suuremad, siis *C. indica* taim ise on madalam (keskmiselt alla 2 meetri) ning tihedam. *C. sativa* kasvab keskmiselt 3 meetri pikkuseks, kuid võib kasvada kuni kuue meetri pikkuseks. Tal on üks keskne vars, kusjuures lehed paiknevad koonuselaselt ümber varre (Joonis 1). (9)



Joonis 1. *C. sativa* (joonisel "Sativa") alamliik on kõrgem ning kitsamate lehtedega. *C. indica* (joonisel "Indica") alamliik on madalam ning suuremate lehtedega. (5)

Kanep on kahekojaline tuultolmleja taim, mille puhul eristatakse isas- ja emastaime. Isastaim on väiksem ning tänu hõredamale lehestikule näeb õidumise ajal kollasem välja kui emastaim. Kui isastaim ära õidub, siis langetab ta lehed ning kasvatab õietolmuga kaetud viie tolmutuga kobarad. Emastaimed aga kasvavad oma lehti kauem ning seetõttu saadakse temast paremini kiudu. Emastaime õite tupplehtedel paiknevad näärmekarvad, mis toodavad vaiku. (LISA 1) See vaik sisaldab suuremas koguses THC-d ja CBD-d ning seetõttu on emastaimedes suurem THC ja CBD sisaldus kui isastaimes. (8), (10), (11) Lisaks õitele sisaldub THC ja CBD nii isas- kui ka emastaime lehekarvades ehk trikoomides (Joonis 2). (1)



Joonis 2. Kanepitaim (vasakul), millel on suurendusega pildistatud lehekarvad ehk trikoomid (1).

Kanepitaim eelistab kasvamiseks huumuse- ja valguserikkaid tingimusi. Kanepitaim on sellistes tingimustes üpris lihtsasti kasvatatav taim, kuna ta ei vaja pestitsiide, herbitsiide ega muid taimekasvu soodustavaid vahendeid. Nimelt kaitsevad taime taimtoiduliste organismide ja muude kahjurite eest trikoomides asuvad fütokannabinoidid (edaspidi kannabinoidid). Lisaks aitavad taimel kasvada ning teiste läheduses olevate taimede kasvu pärssida trikoomides olevad terpenoidid, mille isepärane aroom peletab eemale putukad. (1)

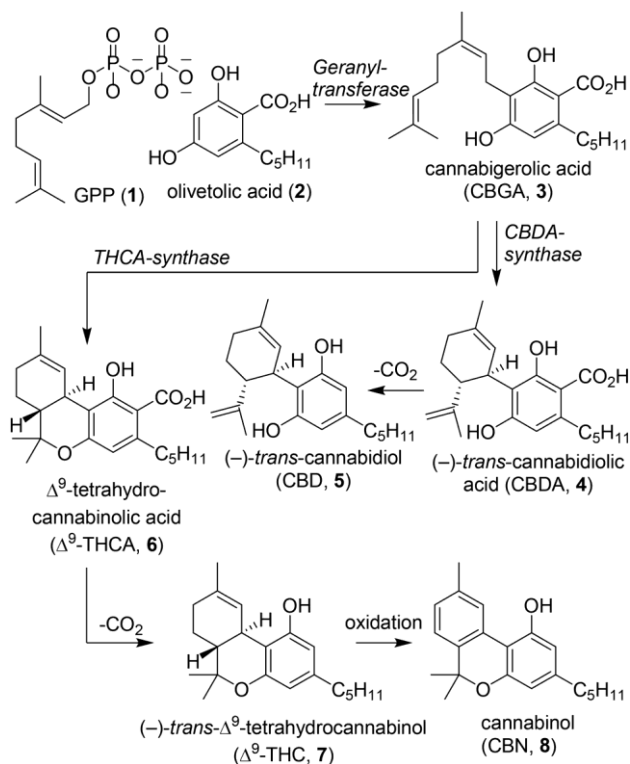
### 1.1.3 Kanepi keemilised tunnused: kannabinoidid

Olenemata alamliigist sisaldab kanep (*C. sativa* L.) rohkem kui 500 fütokeemilist ainet. Need liigituvad järgnevalt: kannabinoidid, terpeenid, lämmastikku sisaldavad ained, aminohapped, valgud ja ensüümid, suhkrud, jpm. (12) Sealjuures kannabinoide on leitud kanepitaimes üle 100,

mittekannabinoide on leitud üle 400. (9) Kannabinoidid on kanepis määrava tähtsusega, kuna just need ained võivad avaldada psühhotroopset mõju organismides.

Kannabinoide on liigitatud erinevatesse gruppidesse: CBG tüüpi (17 erinevat), CBC tüüpi (8 erinevat), CBD tüüpi (8 erinevat), THC tüüpi (20 erinevat), CBL tüüpi (3 erinevat), CBE tüüpi (5 erinevat), CBN tüüpi (10 erinevat), CBND tüüpi (2 erinevat) ja CBT tüüpi kannabinoidid (9 erinevat) (9). Sealjuures sulgudes olev arv tähistab antud autori leide – tänaseks on leitud eri tüüpidesse veel rohkem erinevaid kannabinoide. Kõikidest tüüpidest tuntuimaid on  $\Delta^9$ -THC ja CBD.

Kõik kannabinoidid on oma struktuurilt sarnased. Nad biosünteesitakse kannabigeroolhapest (CBGA), mis omakorda biosünteesitakse olivetoolhappe, geranüülpürofosfaadi (GPP) ja geranüültransferaasi koostoimel. CBGA-st biosünteesitakse tema molekuli avatud osa stereoselektiivse ringisulgemise protsessi käigus CBCA, CBDA või THCA vastavalt CBCA süntaasi, CBDA süntaasi või THCA süntaasi abil (LISA 2). CBD tekib CBDA dekarboksüleerumise käigus ning THC tekib THCA dekarboksüleerumise käigus. CBN on THC oksüdeerumisel tekkinud laguprodukt (Joonis 3). (13)



**Joonis 3. Peamiste kannabinoidide biosünteesi rada.** CBGA (3) biosünteesitakse olivetoolhappe (2), geranüülpürofosfaadi (1) ja geranüültransferaasi koostoimel. CBGA-st biosünteesitakse CBDA süntaasi abil CBDA (4) või THCA süntaasi abil THCA (6). CBD (5) tekib CBDA dekarboksüleerumise käigus ning THC (7) tekib THCA dekarboksüleerumise käigus. CBN (8) on THC oksüdatsiooniprodukt. (13)

Trikoomides asuvat kannabinoidide vahetada saab mõjutada erinevate keskkonningimuste (niiskus, temperatuur, radiatsioon, muld) abil. Näiteks on võimalik mõjutada  $\Delta^9$ -THC tekkimise võimalust, kui kiiritada taime ultravioletse kiirgusega lainepikkusel 280-315nm (UV-B). Teised kannabinoidid on UV-B kiirguse suhtes tundlikumad kui  $\Delta^9$ -THC ja nii on võimalik suurendada selle tekkimist. (1)

### **THC tüüpi kannabinoidid**

THC tüüpi kannabinoidid on  $\Delta^9$ -THC happed ( $\Delta^9$ -THCA-A või  $\Delta^9$ -THCA-B),  $\Delta^9$ -THC stereoisomeerid, laguproduktid või ensümaatiliste protsesside käigus tekkinud sarnased ained: *cis* ja *trans* konfiguratsioonid  $\Delta^9$ -THC molekulis ja nende tüübid,  $\Delta^8$ -THC molekuli tüübid,  $\Delta^{6a,10a}$ -THC tüübid, jm. (14)

Aastal 1964 isoleeriti esimest korda kanepist  $\Delta^9$ -THC ning kirjeldati  $\Delta^9$ -THC molekuli läbi tuumamagnetresonantsi (NMR) teadlaste Gaoni ja Mechoulam poolt. (13)  $\Delta^9$ -THC avaldab organismile psühhoaktiivset toimet, kui ta seondub kannabinoidide retseptoritele CB<sub>1</sub> ja CB<sub>2</sub>. Retseptor CB<sub>1</sub> vastutab tunnetuse ehk kognitsiooni, emotsioonide, isu ja kehalise motoorika eest, CB<sub>2</sub> mõjutab perifeerset närvisüsteemi. Teadlased on näidanud, et antud retseptorid on spetsiifilised vaid mõnele fütokannabinoidile, neist peamine  $\Delta^9$ -THC, ja teised fütokannabinoidid (sh ka  $\Delta^9$ -THCA) nendele ei seonu (15). Puhtal kujul on  $\Delta^9$ -THC väga ebastabiilne aine ning ta laguneb kergesti CBN-iks (LISA 3). Kuna tema stereoisomeer  $\Delta^8$ -THC on stabiilsem, teda on lihtsam sünteesida ning ta seondub sarnaselt CB<sub>1</sub> ja CB<sub>2</sub> retseptoritele, siis kasutatakse teda ka alternatiivse psühhoaktiivse ainenäiteks. Seda siiski märkimisväärselt vähem kui  $\Delta^9$ -THC-d. (16)

$\Delta^9$ -THC on segu  $\Delta^9$ -THCA hapete isomeeride 2-COOH-THC ( $\Delta^9$ -THCA-A) ja 4-COOH-THC ( $\Delta^9$ -THCA-B) dekarboksüleeritud vormidest. Kanepitaimes biosünteesitakse enamasti  $\Delta^9$ -THCA-A isomeeri ning seetõttu kasutatakse seda vormi kõige rohkem analüütilistes uurimistöodes. Seevastu  $\Delta^9$ -THCA-B on stabiilsem ning kristalliseerub paremini, mistõttu kasutatakse seda isomeeri, kui mudeldatakse näiteks kannabinoidide retseptoreid. (16)

$\Delta^9$ -THCA-A ei dekarboksüleeru väga hästi elusas taimes, mistõttu värskelt korjatud taimest ei ole võimalik  $\Delta^9$ -THC-d suures kontsentratsioonis manustada, et saavutada psühhoaktiivne toime. Kui taim korjatakse mullast, siis hakkab kuivatamisel, kokkupuutel valgusega ning pikaajalisel ladustamisel tekkima  $\Delta^9$ -THC. Uuringud on näidanud, et  $\Delta^9$ -THCA-A on termolabiilne aine, mis dekarboksüleerub kergesti temperatuuridel üle 80°C (suitsetamine, küpsetamine) ja vähesel määral ka toatemperatuuril (20% ainest dekarboksüleerub 25 kuu jooksul). Tavalises külmutuskapis (4°C) ning ka sügavkülmas (-18°C) on  $\Delta^9$ -THCA-A-d stabiilne, kui ei ole pikaajalist kokkupuudet valgusallikaga. (16)

### **CBD tüüpi kannabinoidid**

Kõige esimene taimest isoleeritud kannabinoid oli CBD, mis isoleeriti 1940. aastal. Samas struktuur suudeti tõeselt määrata alles aastakümned hiljem. CBD on peamine kannabinoid kiukanepis ning seetõttu on ta laialt levinud ja uuritud kannabinoid. Lisaks on tal ka lõõgastav, valu leevendav toime, kuid ta ei ole psühhoaktiivne aine. (14)

CBD ja  $\Delta^9$ -THC on oma biosünteesiradadelt sarnased – mõlemad on elusas taimes oma happelisel kujul (vastavalt CBDA ja  $\Delta^9$ -THCA). Samuti sarnaselt  $\Delta^9$ -THCA-le dekarboksüleerub ka CBDA samadel tingimustel, olles taimes stabiilne kuid juba lõigatud taimes ebastabiilne, suurendades CBD kontsentratsiooni. Siiski on neil struktuurilised erinevused, nimelt on  $\Delta^9$ -THC kolmetsükliline planaarne ja jäik molekul, kuid CBD üks tsükel on avatud ning see annab tal võimaluse muuta oma konformatsiooni (Joonis 3). Kuna CBD on liikuv molekul, siis ta ei sobitu CB<sub>1</sub> retseptorile ideaalselt

ning seetõttu ei seondu sellega tihti. Kui ta seondu CB<sub>1</sub> retseptorile, siis inhibiitorina, seejuures vähendades Δ<sup>9</sup>-THC toimet. CBD ei seondu CB<sub>2</sub> retseptorile, kuid ta seondu mitmetele teistele retseptoritele või muudele sidumiskohtadele tekitades stimuleerivat efekti närvisüsteemile: maandab stressi, ärevust, valu, unetust, jm. Arvatakse ka, et CBD aitab leevendada lastel epilepsiat. (14)

Happelistes tingimustes tsükliseerib CBD Δ<sup>9</sup>-THC ja Δ<sup>8</sup>-THC seguks. On näidatud, et pH=1 juures muutub CBD 98% ulatuses vastavaks seguks. Aluselistes tingimustes Δ<sup>9</sup>-THC ja Δ<sup>8</sup>-THC segu ei teki, mistõttu lihtsalt THC-vaba CBD-kanepi suitsetamisel (veesisalduse tõttu pH≈8) psühhoaktiivset toimet ei avaldu. Küll aga võib psühhoaktiivne toime avalduda, kui tubakale on lisatud juurde CBD-d või CBD õli, mis muudab toote happelisemaks (pH≈5.7). (14) Sellegi poolest on näidatud, et kuigi in vitro on eelnev tõene, siis in vivo ehk organismides CBD THC-ks ei tsükliseeru (17). Lisaks on näidatud, et kõrgetel temperatuuridel ja ka suurtel kontsentratsioonidel (üle 20%) tsükliseerub osa CBD-st Δ<sup>9</sup>-THC ja selle isomeeride seguks, mis pakub väljakutset analüütiliste meetodite valimisel. (18)

### ***CBN tüüpi kannabinooidid***

1940. aastal määrati CBN. See oli kõige esimene kannabinooid, mida teadlased suutsid kanepitaimest isoleerida ning struktuuriliselt määrata. CBN on oma olemuselt kanepitaimelise laguprodukt, mis tähendab, et ta ei ole üks taime metaboliitidest. Ta tekib THC-st kanepitaimelise kuivatamise või kuumutamise (oksideerumise) käigus. (19) Mida rohkem on kanepi kuivanud taimelises või tootes CBN-i, seda vanema kuivanud taime või tootega on tegu. Chousidis et al. on leidnud, et keskmiselt laguneb 4.4% THC-d CBN-iks kolme kuu jooksul, kui taime on hoiustatud pimedas neljakraadises ruumis (20). Lisaks leidsid Ross et al., et THC degradeerumise määrad toatemperatuuril, pimedas õhukindlas ruumis on järgnevad: ühe aastaga kaob kanepi kuivanud taimelises või tootest THC-d 16.6% ± 7.4%, kahe aastaga 26.8% ± 7.3%, kolme aastaga 34.5% ± 7.6% ning nelja aastaga 41.4% ± 6.5%. (21) See tähendab, et THC degradeerumise määr on suhteliselt suur. CBN on väga nõrk psühhotroopne aine, mis avaldab mõju vaid veenikaudsel manustamisel, mistõttu ei ole teda liigitatud narkootiliseks ja psühhotroopseks aineks. (19)

#### **1.1.4 Kanepi legaalsus Eestis**

Eestis on kanepitaimelise ja kanepitoote õiguslik positsioon määratud selle THC-sisaldusega. Piiriks on THC kontsentratsioon 0.2%.

Vastavalt nimekirjale, mis on toodud määruses „Narkootiliste ja psühhotroopsete ainete meditsiinilisel ja teaduslikul eesmärgil käitlemise ning sellealase arvestuse ja aruandluse tingimused ja kord ning narkootiliste ja psühhotroopsete ainete nimekirjad“, I nimekirja kuulub „Kanep (v.a Euroopa Liidu ühtsesse põllukultuuride sordilehte võetud sordid, mille tetrahüdrokannabinooli sisaldus ei ületa 0,2%) ja selle töötlemisproduktid (hašis, marihuaana, vaik, ekstraktid, tinktuurid jne) /.../ Tetrahüdrokannabinool (THC), isomeerid ja nende stereokeemilised teisendid.“ (22) See tähendab, et proov, mille kogu THC (THCA ja THC oma kõikide isomeeridega) on üle 0.2%, on Eestis keelatud kasvatada, tarbida, omada. Muud kannabinooidid, sh CBD, on lubatud, kui proovis pole üle

0.2% THC-d. Lubatud on erandkordadel omada kanepit, mille THC sisaldus on üle 0.2%, kui see on meditsiiniliselt näidustatud või teaduslikel eesmärkidel. (23)

### **1.1.5 Analüütilised meetodid kannabinoidide määramiseks**

Kannabinoide on määratud erinevate analüütiliste meetodite (GC, HPLC, TLC, FTIR, NMR, jm) abil, millest põhilised on kromatograafilised meetodid - gaasikromatograafia ja kõrgsurvevedelikkromatograafia. Kromatograafia põhineb koostisosade eraldumisel teineteisest või nende komponentideks jaotamisel tema keemiliste või füüsikaliste omaduste järgi (nt hüdrofoobsus, suurus, laeng, afiinsus). Kõige enam kasutatakse GC-d, kui ühte odavamat ja robustsemat analüütilist meetodit. (24)

Kannabinoidide määramiseks kasutatakse GC-d enamjaolt koos massi-spektromeetria (MS) või leekionisatsioonidetekteerimise (FID) meetoditega. MS meetodid on kallim, kuna nad tavaliselt vajavad deuteeritud standardeid. (24) Deuteeritud standardid on deuteeriumiga (2H/D) isotoopiliselt märgistatud ained, mis elueeruvad samaaegselt kvantiteeritava ainega ning seeläbi on võimalik erinevaid analüüte eristada (25). Üldiselt on GC-MS ja GC-FID meetodid sarnased: analüüsi pikkus umbes 20 minutit, statsionaarseks faasiks kasutatakse madala polaarsusega kolonni ja temperatuurid kerkivad kuni 300°C. (24) Just kõrge temperatuur on põhjuseks, miks valitakse üha enam HPLC-d kannabinoidide määramiseks: nii kõrgetel temperatuuridel happelised kannabinoidid dekarboksüleeruvad. Kõige olulisem on see THC määramisel, kuna THCA dekarboksüleerub THC-ks ning ei ole võimalik hinnata, kui palju oli proovis THC-d ja THCA-d eraldi. Kui tegu on prooviga, mis ongi mõeldud kuumutamiseks (taimne proov, mis on mõeldud suitsetamiseks), siis sobib GC väga hästi. Kui on tegu prooviga, mis ei ole mõeldud kuumutamiseks (kanepiõlid, vahad, pastad, kreemid, jm), siis on võimalus, et GC-ga hinnatakse tegelik THC kogus suuremaks, kui ta on.

Kui GC-s on vajalik, et analüüt oleks lenduv, sest analüüs toimub gaasifaasis, siis HPLC-s aine võib olla ka kõrge keemistemperatuuriga. Antud juhul on oluline, et analüüt lahustuks solvendis. (26)

## **1.2 Kromatomassispektromeetria**

HPLC-MS kasutatakse keeruliste komponentide lahutamiseks ja detekteerimiseks. Liitsüsteemiga on võimalik kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt määrata väga madalaid kontsentratsioone, mistõttu on ta väga hea meetod madalate kontsentratsioonidega analüütide jaoks (narkootilise aine jäägid, dopinguproovid, jm). HPLC-s toimub pidev mobiilse faasi kontrollitud pumpamine läbi statsionaarse faasi massispektromeetri ioonide allikani. HPLC koosneb degasaatorist, pumpade süsteemist, mikserist, automaatproovisisestus süsteemist ja tahkete osakestega täidetud kolonnist. (27)

### **1.2.1 Meetodika optimeerimine: statsionaarne ja mobiilne faas**

HPLC meetodika optimeerimise põhimõte on leida lahutamise protsessi tingimusi, mille juures uuritava segu komponente saab analüüsida suhteliselt lühikese analüüsiajaga, nii et nad oleksid omavahel lahutatud. Lahutamise mehhanisme on mitmeid: normaalfaasi kromatograafia (NP-HPLC), pööratud faasi kromatograafia (RP-HPLC),ioonvahetuse kromatograafia (IEC), jm. (26), (27)

### ***Pöördfaasi kromatograafia: kolonni omadused***

RP-HPLC on üks enimkasutatavaid kromatograafia liikidest. Lahutamise mehhanism põhineb analüüdi jaotamisel mittepolaarse statsionaarse faasi ja polaarset mobiilset faasi vahel. Kolonni täitematerjalina kasutatakse modifitseeritud silikageeli - silanoolrühmad on kaetud hüdrofoobsetega jääkidega (näiteks, alküülrühmadega), millega interakteeruvad analüüdid. (26), (27) Kui RP-HPLC mobiilse faasi pH > 3.5, siis katmata silanoolrühmad deprotoneeruvad. pH alandamiseks ja asümmeetriliste piikide vältimiseks lisatakse RP-HPLC puhul tihti solvendis kas trifluoroäädikhapet (TFA), sipelghapet (FA), ammooniumformiaati (AF) või kahe viimase segu (FA/AF). (28)

Kõige tuntum kolonn HPLC-s on C18 kolonn. Tegu on RP-HPLC kolonniga, mille hüdrofoobne jääk koosneb 18 süsinikuga alküülahelast. Ta on kõige mittepolaarsem ja hüdrofoobsem kolonn. Temale järgnevad C8, C4, CH4, CN, fenüül- ja aminoahelate või -rühmadega kolonnid. (26), (27)

### ***Kolonni parameetrid***

Metoodikat saab muuta efektiivsemaks, tundlikumaks, kiiremaks ja selektiivsemaks muutes kolonni parameetrid. Kolonnidel on neli peamist parameetrit: osakeste suurus, kolonni pikkus, kolonni sisediameeter ja kolonni temperatuur. (26)

Kolonnid on väga kallid (600-1000 EUR), samal ajal mobiilne faas on suhteliselt odav. Seetõttu kui laboris pole just mitut erinevat kolonni saadaval, siis proovitakse esialgu optimeerida analüüsi protsessi kasutades erinevaid solvente. (26) (27)

### ***Pöördfaasi kromatograafia: solvendid***

RP-HPLC puhul kasutatakse tavaliselt vee ja orgaanilise solvendi segu, mistõttu peab olema orgaaniline solvent ka vees segunev. Solvendil peab olema madal viskoossus, et mitte tekitada suurt rõhku süsteemis ning samuti ei tohi olla solvent reaktiivne analüüdi suhtes. (26) (27)

Kõige nõrgem solvent RP-HPLC puhul on vesi: tema ei interakteeru hüdrofoobsete analüütidega ning seega ei suuda neid analüüte kolonnist välja elueerida. Elueerimise solvendi tugevuse tõstmiseks kasutatakse metanooli, atsetonitrili (ACN) ja alles siis tetrahüdrofuraani (THF). Antud solvente saab ka kombineerida, et saada aru millises vahekorras annab nende segu kõige parema proovi analüütilise lahutuvuse. (26) (27)

Kui proovis on üks huvipakkuv analüüt või väga sarnaste omadustega analüüdid (nt.homoloogid), siis tavaliselt kasutatakse isokraatilist elueerimist (mobiilse faasi koostis analüüsi käigus ei muutu). Kui on mitu analüüti, mille omadused on erinevad, siis praktiseeritakse gradientelueerimist. (26) (27)

## **1.2.2 Massispektromeeter**

Massispektromeeter koosneb ionide allikast, massianalüsaatorist ja detektorist. MS abil määratakse gaasifaasis oleva analüüdi massi/laengu (m/z) suhe, analüüdi molekulmassi, struktuuri, element- ja isotoopkoostist. (26), (27)

### **Ioone allikas: ESI**

Ioone allika eesmärk on ioniseerida analüüt ning tagada analüüdi vedela oleku üleminek gaasifaasiks. Ioone allikaid on erinevaid: elektroonne ionisatsioon (EI), keemiline ionisatsioon (CI), keemiline ionisatsioon atmosfäärirõhul (APCI), elektropihustus (ESI), jm. (26)

ESI meetodit kasutatakse suurte, mittelenduvate molekulide puhul. ESI kapillaartorusse juhatatakse katioone/anioone ning neutraalseid ühendeid sisaldav eluent. Seejärel rakendatakse kõrgepinge (2-6V), mille abil tekib koonusekujuline laetud aerosooli juga (elektrosprei). Tänu pihustamise gaasile (*nebulising gas*) kuumutatakse ja desolvateeritakse laetud aerosooliosakesi nii, et laetud osakesed eralduvad gaasifaasina, mis saavad edasi minna massianalüsaatorisse. ESI opereerib nii positiivses (ESI+) kui ka negatiivses (ESI-) režiimis. (29), (26)

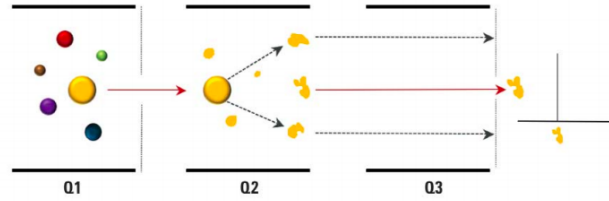
### **Massianalüsaator ja detektor: kvadrupoolid ja MS/MS**

Massianalüsaatori eesmärk on ioone lahutada vastavalt nende  $m/z$  suhtele. Üks tuntumaid massianalüsaatoritest on kvadrupool. Kvadrupool koosneb neljast vardast, millele rakendatakse alalisvoolu koos raadiolainetega. Ioone, mis liiguvad mööda vardaid, hakkavad võnkuma rakendatava pingete kombinatsiooni ajendil. Ühele  $m/z$  suhtega ioonidele vastab ainult üks pingete kombinatsioon, et nad suudaksid kvadrupooli läbida. Mida kitsam  $m/z$  suhtega ioonide vahemik on valitud, seda tundlikum on meetoodika, kuna siis pääseb kõige rohkem soovitud ioone läbi kvadrupooli. (26), (29)

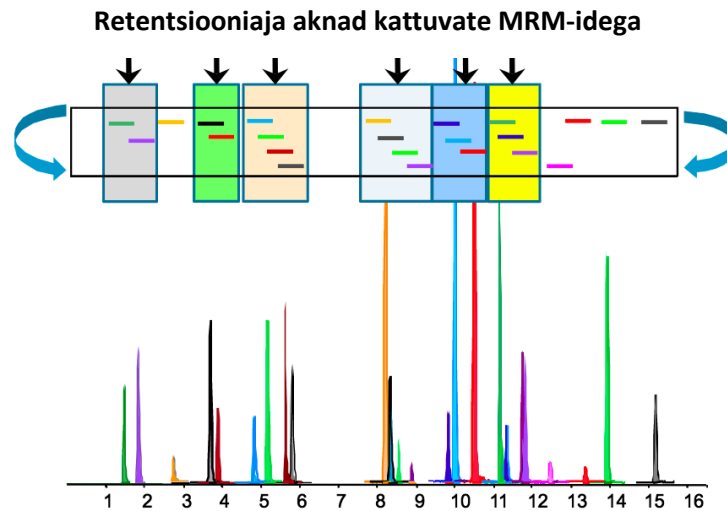
Tandemmassispektromeetria koosneb kolmest kvadrupoolist, mille juures keskmine mängib kollisioonikambri (*collision cell*) rolli. Kollisioonikambrisse jõudes ioonid fragmenteeritakse tänu kokkupõrgetele inertsete gaasidega. See tähendab, et esimest kvadrupooli läbib laetud molekulaarioon ning kolmandat kvadrupooli läbivad molekulaariooni fragmendid. Mõlemad kvadrupoole saab kasutada nii skaneerivas kui ka staatilises režiimis. (26), (29)

Kõige tundlikum meetoodika on võimalik saavutada kasutades nn. mitme reaktsiooni seire (MRM) meetodit – mõlemad kvadrupoolid on staatilises režiimis. Esimene kvadrupool laseb läbi üheainsa  $m/z$  suhtega eellasiooni (*precursor ion*), kolmas kvadrupool laseb läbi ainult ühe või mitu eellasiooni fragmenteerunud kindla  $m/z$  suhtega tütariooni (*product ion*) (Joonis 4). (26), (29) Eellasiooni fragmenteerumist tütariooniks nimetatakse ka **üleminekuks**. Saab valida, kas analüüsitakse dünaamilises MRM (dMRM) või esilekutsutud (*triggered*) MRM (tMRM) režiimis (Joonis 5; LISA 4). dMRM puhul analüüsitakse ühte või mitut üleminekut, mis on tavaliselt väga spetsiifilised uuritavale analüüdile. Enne dMRM analüüsi, määratakse kindlaks analüüdi RT tavalise MRM analüüsi käigus, nii saame kindlad olla, et tegu on õige molekuliga. (30) tMRM on dMRM edasiarendus. Andmehõive käigus toimub kogu aeg dMRM režiim, kui õigel ajal tabatakse õiged MRM-id ja osakeste arv ületab teatud etteantud piiri (*threshold*), siis vallandubki tMRM režiim, mistõttu saadakse üsna spetsiifiline massispekter. Etteantud piir saavutatakse kohas, mis kromatogrammil vastab piigi algusele. MRM puhul on ka baasjoone müra minimaalne, mis teeb kvantitatiivse analüüsi veelgi täpsemaks. (26), (29)





Joonis 4. MRM režiimi tööpõhimõtte kolmekordse kvadrupool-massispektromeetrias. Kvadrupoolis (Q1) selekteeritakse eellasioon, kolisioonikambris (Q2) fragmenteeritakse valitud eellasioon tütarioonideks. Kvadrupoolid (Q3) valitakse välja kindlad tütarioonid, mis on spetsiifilised analüüdile. (31)



Joonis 5. Dünaamilise MRM režiimi joonis, millel on kujutatud erinevate analüütide kattuvad piigid. Igale analüüdile vastavad spetsiifilised MRM üleminekud ning need skaneeritakse antud analüüdile spetsiifilises retentsioonaja aknas. Tänu spetsiifilistele MRM-idele on võimalik hiljem kattuvaid piike vaadata eraldiseisvalt. Lisaks on ka parem tundlikkus, sest antud RT aknas skaneeritakse vaid teatud fragmente. (32)

### 1.3 Valideerimine

Valideerimine on protsess, mille käigus kinnitatakse, et meetodika vastab talle püstitatud nõuetele. Kui labor omab ISO/IEC standardit, siis meetodikate rakendamisel on valideerimine kohustuslik. (33)

#### 1.3.1 Selektiivsus ja spetsiifilisus

Selektiivsus näitab, mil määral mõjutavad teised analüüdid ehk segajad (maatriks, ebapuhtus, sarnased analüüdid) proovis meetodikaga analüüsivat komponenti. Spetsiifilisus näitab, kui selektiivne on meetodika meile huvipakkuva analüüdi suhtes. Kui meetodika on 100% spetsiifiline, siis ta identifitseerib kindlat analüüti ja kinnitab, et analüüdi piik ei ole mõjutatud segajatest. (34), (33)

Selektiivsust hinnatakse kvalitatiivsel analüüsil sarnase struktuuriga analüütide eristamisel teineteisest või võrreldes analüüdi referentsmaterjaliga. Segajaid tuleb hinnata/loetleda vastavalt proovi iseloomule ja teadlase kogemusele. Analüüdi piiki mõjutatavaid segajaid hinnatakse nii, et segajad nn. spaigitakse teadaoleva kontsentratsiooniga analüüdile – kui spaigitud tulemus ei erine ilma spaikimata proovi tulemusest, siis on meetodika selektiivne ja spetsiifiline. Kui spaikimine ei ole võimalik, tuleb näidata selektiivsust ja spetsiifilisust mingil muul moel. (34), (33)

### 1.3.2 Täpsus: kordustäpsus, tõesus, saagis

Kordustäpsus (*Precision*) näitab kui hästi on meetodika tulemus reprodutseeritav. Tegu on juhusliku veaga, mida ei suudeta ette näha. Instrumentaalanalüüsis ei ole kunagi ükski meetodika täielikult reprodutseeritav, kuid siiski, mida paremini suudetakse samu tingimusi luua, seda täpsem on meetodika. Kordustäpsust mõõdetakse korduvuse ja korratavusega. Korduvus on lühikese aja jooksul erinevatel aegadel valmistatud sama inimese ja samades laboritingimustes valmistatud proovide tulemuste kõikumine. Korduvust hinnatakse tulemuste kõikumise standardhälvena –  $s_r$ . Korduvuse piirina ( $r$ ) loetakse kahe erineva korduvuse tingimustes mõõdetud paralleelmõõtmise tulemuste maksimaalset lubatud erinevust teatud usaldusnivoo juures. Seda arvutatakse valemiga

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_r, \quad (\text{valem 1})$$

kusjuures  $r$  on korduvuse piir,  $t_{\infty}$  on Studenti koefitsient 95% usaldusnivool ja  $s_r$  on korduvuse standardhälve. Korratavus on proovide analüüsimine erineva inimese poolt, erinevate laborite poolt või sama inimese poolt, aga pika aja tagant. Korratavust hinnatakse tulemuste kõikumise standardhälvena –  $s_{rw}$ . (35) Korratavuse piirina ( $R$ ) loetakse kahe erineva korratavuse tingimustes mõõdetud paralleelmõõtmise tulemuste maksimaalset lubatud erinevust teatud usaldusnivoo juures. Arvutuslik valem on sarnane:

$$R = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_{rw}, \quad (\text{valem 2})$$

kus  $R$  on korratavuse piir,  $t_{\infty}$  on Studenti koefitsient 95% usaldusnivool ja  $s_{rw}$  on korratavuse standardhälve. (34), (33), (35)

Tõesus (*trueness*) on süstemaatilise vea määr. Mida tõesem on meetodika, seda täpsem on analüüsitulemus tõelise väärtusega võrreldes. Tõesus ja kordustäpsus annavad kokku üldise meetodika täpsuse (*accuracy*). (35) Tõesust saab hinnata teatud analüüdi suhtes analüüsitulemuste ja referentsmaterjali võrdlemisel. Reaalse proovi analüüsitäpsust saab hinnata, kui spaikida proove kindla kontsentratsiooniga analüütidega (*recovery*) või kui võrrelda analüüsitulemusi teise sõltumatult väljatöötatud ja usaldusväärse meetodikaga (*bias*). (34) Hälvet (*bias*) saab mõõta suhtühikutes protsentidena järgmise valemiga:

$$\text{bias} (\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100, \quad (\text{valem 3})$$

sealjuures  $\bar{x}$  on paralleelkatsete keskvärtus ja  $x_{ref}$  on referentsmaterjali või võrdluskatse referentsvärtus. (34), (33), (35)

### 1.3.3 Lineaarsus/lineaarne ala

Lineaarsus on meetodika võime näidata analüüsitulemusi, mis on proportsionaalsed reaalse kontsentratsiooniga proovis. Tavaliselt väljendatakse seda seost matemaatilise funktsioonina, tihti lineaarse funktsioonina:

$$y = b_1 \times x + b_0, \quad (\text{funktsioon 1})$$

sealjuures  $y$  on mõõdetud signaal,  $x$  kontsentratsioon,  $b_0$  vabaliige ja  $b_1$  tõus). Et näidata proportsionaalsuse tingimusi, on vajalik regressioonisirge ehk kalibreerimisgraafiku koostamine. Lineaarne kalibreerimisgraafik koosneb lineaarsest alast ja tööalast. Tööala on piirkond, mis näitab absoluutselt kõiki kontsentratsioonide analüüsitulemusi. Lineaarne ala on tööala piirkond, kus kehtib seos: analüüsitulemus ja proovi reaalse kontsentratsiooni sõltuvus on lineaarne. Antud sõltuvust saab kontrollida analüüsides kalibreerimisgraafiku residuaale (analüüdi mõõdetud kaugus teoreetilisest kalibreerimisgraafikust) – kui nende jaotus on ebakorrapärane, siis on tegu lineaarse sõltuvusega. Kui joonistub mingisugune trend, siis on kalibreerimisgraafik mittelineaarne. Lisaks aitab lineaarsust ja täpsust hinnata korrelatsioonikoefitsient ( $r$ ) – tegu on korrelatsiooniga teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahel. Tihti hinnatakse kalibreerimiskõvera lineaarsust determinatsioonikordajaga ( $R^2$ ). (35), (34), (33)

### 1.3.4 Avastamis- ja määramispiir

Avastamispiir (LoD) on vähim analüüdi kogus, mida on võimalik meetodikaga usaldusväärselt tuvastada. Määramispiir (LoQ) on vähim analüüdi kogus, mida on võimalik meetodikaga usaldusväärselt kvantiteerida. Seega LoD on alati väiksem kui LoQ. (35), (33)

Mõlema määramiseks kasutatakse mitmeid erinevaid viise: visuaalne hindamine, signaali/müra suhe, null-proovi kordumõõtmiste standardhälve, suhteline kordustäpsus/mõõtemääramatus, residuaalide standardhälve, regressioonisirge 95% usalduspiir (35). Kaks viimast annab suhteliselt kõrgeid LoD ja LoQ väärtusi, kui kalibreerimisgraafiku tööala sisaldab suurtes vahemikes kalibreerimisproove. Esimesed kolm seevastu ei sõltu kalibreerimisgraafikust ning võimaldavad anda tõesemaid LoD ja LoQ väärtusi. (36) Erinevad LoQ ja LoD väärtuste arvutamise meetodid on lisatud lisades (LISA 5).

### 1.3.5 Tundlikkus

Tundlikkus näitab, kuidas mõjutab analüüdi kontsentratsioon signaalitugevust. Tundlikkuse määr on lineaarse kalibreerimise puhul tõusu ( $b_1$ ) suurus. Tundlikkust saab muuta meetodika optimeerimise käigus.

### 1.3.6 Robustsus

Robustsus näitab meetodika usaldusväärsust erinevate analüütiliste parameetrite kõikumise piires. Meetodika on seda robustsem, mida vähem mõjutavad teda väikesed variatsioonid meetodika parameetrites. Robustsust saab hinnata erinevate variatsioonidega: analüütiliste solventide

stabiilsus, proovi ekstraheerimise ja analüüsi tegemise aja vahe, pH varieerumine mobiilses faasis, erinevad kolonnid, temperatuur, voolukiirus, jm. (33), (34)

## 1.4 Mõõtemääramatus

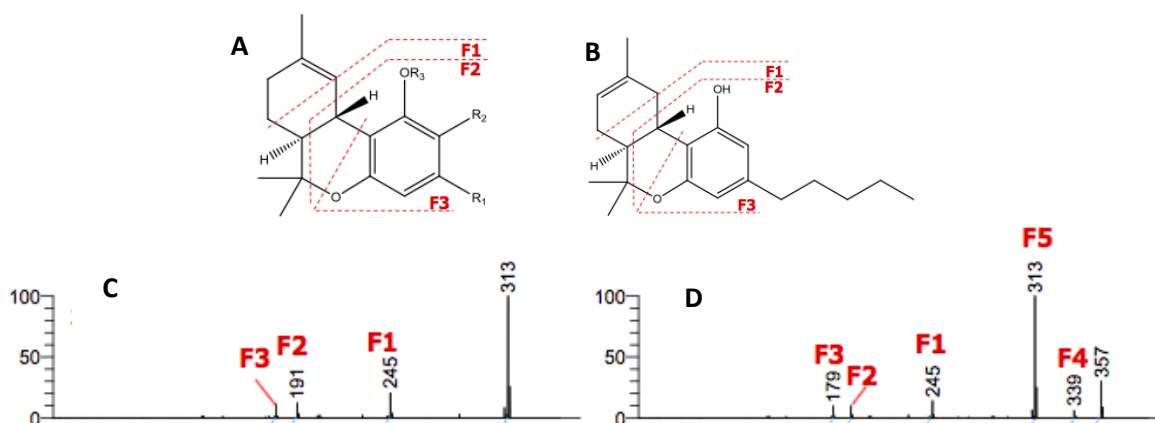
Mõõtemääramatus iseloomustab mõõtetulemuse väärtuse hajumist ning mõõtetulemus tuleb alati edastada koos mõõtemääramatusega. Mõõtemääramatus arvutatakse üldjuhul peale valideerimist, kuna enamust andmetest mõõtemääramatuse leidmiseks tulenevad valideerimisandmetest. (35) Kaks põhilist mõõtemääramatuse hindamise meetodi on ISO GUM ja NordTest. ISO GUM meetodi puhul arvestatakse sisse kõikvõimalikud mõõtemääramatused iga laboratoorse mõõtmise korral. ISO GUM puhul tuleb mõõtemääramatuse allikad ise määrata, mis võib tekitada olukorra, kus kõiki allikaid ei tuvastata või ei ole võimalik määrata. Sellegi poolest annab ISO GUM täpset ülevaadet iga mõõtemääramatuse allika kohta. NordTest meetodit kasutatakse jooksvalt analüüse tehes. Mõõtemääramatuse allikaid eraldi ei määrata vaid hinnatakse mõõdetud tulemusi ning nende hajuvust pika aja vältel. (35), (37)

## 1.5 Kannabinoidide määramine LC-MS/MS meetodiga

### 1.5.1 Kannabinoidide massispektrid

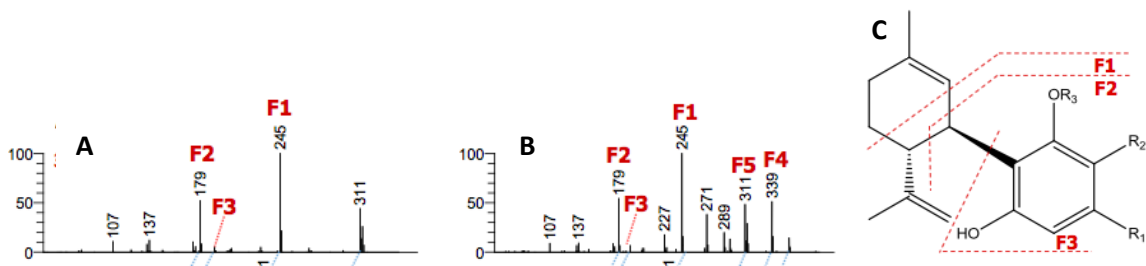
Berman et al. identifitseerisid ja kasutasid profileerimisel 94 erinevat kannabinoidi. (38)

Kirjeldata 11 erinevat THC tüüpi kannabinoidi.  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^8$ -THC omavad identseid üleminekuid.  $\Delta^9$ -THCA üleminekud erinevad  $\Delta^9$ -THC-st ja  $\Delta^8$ -THC-st, sest tema eellasioon on karboksüülhappe võrra suurem ning seega eristatav massispektril.  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^8$ -THC eellasioon on m/z 313.2 ning esimesed fragmendid m/z 245.2 ja 191.1.  $\Delta^9$ -THCA-l on eellasioon m/z 357.2 ja edasised fragmendid m/z 313.2, 245.2 ja 191.1 (Joonis 6). Antud üleminekud mõõdeti ESI- režiimis. (38)



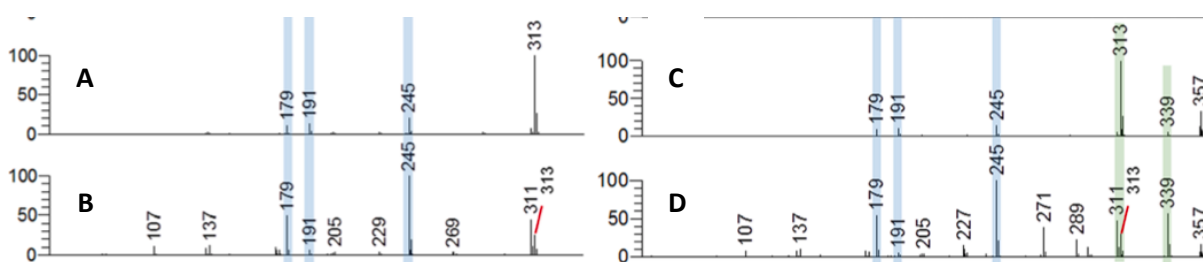
Joonis 6. Joonisel on välja toodud THC tüüpi kannabinoidide esimeste fragmenteerumiste asukohad molekulis (A),  $\Delta^8$ -THC esimeste fragmenteerumiste asukohad molekulis (B);  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^8$ -THC massispekter esimeste üleminekutega (C) ja  $\Delta^9$ -THCA massispekter esimeste üleminekutega (D). Massispektrid on iseloomulikud negatiivses ESI režiimis. (38)

Lisaks kirjeldasid nad 10 erinevat CBD tüüpi kannabinoide. CBD omab samasuguseid üleminekuid  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^8$ -THC-ga, CBDA omab samasuguseid üleminekuid  $\Delta^9$ -THCA-ga (Joonis 6). (38)



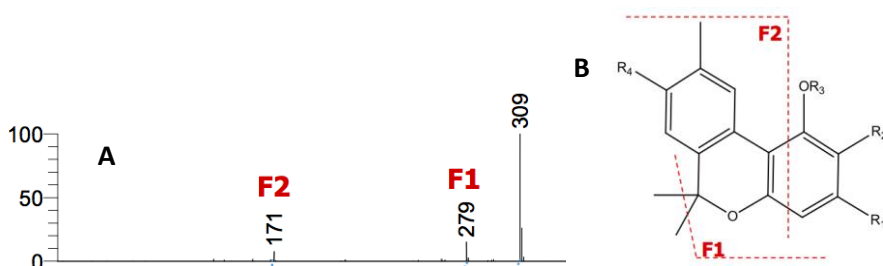
Joonis 7. Joonisel on välja toodud CBD tüüpi kannabinoide esimeste fragmenteerumiste asukohad molekulis (C); CBD massispekter esimeste üleminekutega (A) ja CBDA massispekter esimeste üleminekutega (B). Massispektrid on iseloomulikud negatiivses ESI režiimis. (38)

Autorid tõid välja, et nende uuringu kohaselt saab eristada CBD-d  $\Delta^9$ -THC-st ja CBDA-d  $\Delta^9$ -THCA-st hinnates massispektrit. Nimelt on CBD puhul eellasioon ( $m/z$  313) madalam, kui tütarioon  $m/z$  245.  $\Delta^9$ -THC puhul on just tegu vastupidise suhtega. Ka nende hapetel on samasugune tendents massispektril (Joonis 8).



Joonis 8. Berman et al. poolt välja pakutud süsteem eristamaks CBD-d (B)  $\Delta^9$ -THC-st (A) ja CBDA-d (D)  $\Delta^9$ -THCA-st (C) ainult massispektrit kasutades. Oluline on vaadata ionide 313 ja 245 suhteid. Massispektrid on iseloomulikud negatiivses ESI režiimis. (38)

CBN tüüpi kannabinoide kirjeldati kokku 11. Neist peamine ehk CBN eellasioon on negatiivses ESI režiimis  $m/z$  309.2 ning tütarioonid  $m/z$  279.1 ja 171.1 (Joonis 9). (38)



Joonis 9. Joonisel on välja toodud CBN tüüpi kannabinoide esimeste fragmenteerumiste asukohad molekulis (B) ja CBN massispekter esimeste üleminekutega (A). Massispekter on iseloomulik ESI- režiimis. (38)

### 1.5.2 Kirjanduses olevate meetodikate parameetrid

HPLC-d hakati esmakordselt kasutama kannabinoidide määramiseks aastal 1975 (17). Kannabinoidide määramiseks on loodud mitmeid erinevaid meetodikaid erinevate detektoritega. Kui võrrelda meetodikaid, mis on loodud kasutades vedelikkromatograafiat koos tandem-massispektromeetriaga (LC-MS/MS) ja ESI ionisatsiooni allikat, siis kasutatakse enamjaolt C18 kolonni, kolonni temperatuur on 40-50°C, voolukiirus 0.4-0.5 ml/min, süstekogus 1-5 µl. Kasutatakse nii ESI+ kui ka ESI- režiime. Mobiilse faasina kasutatakse esimese solvendina Milli-Q vett koos 0.1% sipelghappe (FA) ja/või 5mM ammoonium formiaadiga (AF); teise solvendina metanooli, etanooli või atsetonitriili, millele osadel juhtudel on lisatud ka 0.1% sipelghape (FA). Sisestandardi valmistamisel kasutati üldjuhul ( $\Delta^9$ -THC-d3 või CBD-d3). (39), (40), (41), (42), (43), (38)

HPLC-s mõõdetud kogu THC ja kogu CBD tulemused arvutatakse järgmiselt: (44)

- Kogu THC = ( $\Delta^9$ -THC) + 0.88\*( $\Delta^9$ -THCA) (valem 5)
- Kogu CBD = (CBD) + 0.88\*(CBDA) (valem 6)

### 1.5.3 Kirjanduses olevate meetodikate proovide ettevalmistamise protokollid

Proovide ettevalmistamise ja ekstraheerimise üldistatud protokoll (39), (40), (41), (42), (43), (38), (45):

- Proovi ettevalmistus
  - Proovi kogus: 0.03-2.5g
  - Ekstraheerimise lahusti: 0.5-30ml
  - Tablettide, kapslite kogus: 3-10 tk
  - Ekstraheerimise lahusti: etanool, metanool
- Ekstraheerimise protseduur
  - Lahustuvad proovid
    1. Lisa ekstraheerimise lahus
    2. Kasutada Vortexit, kui ei lahustu, siis pane ultrahelivanni 30min-ks.
    3. Filtreeri läbi 0.45 µm nailoni membraanifiltri
    4. Vajadusel lahusta proovi veel, et püsida lineaarses alas
  - Rasvased ja õlised proovid
    1. Peale ekstraheerimise lahusti lisamist, kui proov ei lahustu, kuumuta proovi. Jälgida tuleb keemistemperatuure
    2. Vortex+lahustuvate proovide all väljatoodud meetoodika (alates punktist 2)
  - Kõrge suhkruisaldusega proovid
    1. Lisa vett proovile nii, et hiljem oleks vee ja ekstraheerimise lahuse suhe 5%:95%
    2. Kuumuta vesi koos prooviga, kuni proov lahustub
    3. Lisa 100% kontsentratsiooniga ekstraheerimise lahust, nii et kogu ekstraheerimise lahuse kontsentratsioon proovis oleks 95%
    4. Vortex+lahustuvate proovide all väljatoodud meetoodika (alates punktist 2)

## 2 Töö eesmärk

Käesoleva magistritöö eesmärk on töötada välja, optimeerida ja osaliselt valideerida meetodika kannabinoidide ( $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD, CBDA, CBN) kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks vedelikkromatograafia ja tandemmassispektromeetria (LC-MS/MS) abil, mitme reaktsiooni seire (MRM) režiimis.

## 3 Eksperimentaalne osa

### 3.1 Materjalid ja meetodika

#### 3.1.1 Materjalid ja analüütilised instrumendid

Standardained  $\Delta^9$ -THCA, CBN, CBD, CBD-d3,  $\Delta^9$ -THC-d3,  $\Delta^8$ -THC soetati Lipomedist,  $\Delta^9$ -THC ja CBDA soetati LGC-st (LISA 6). Teised kasutatud kemikaalid olid LC-MS puhtusega.

Analüüsid teostati kasutades Agilent Technologies 1260 Infinity, 6410 Triple Quad LC/MS instrumenti.

Kasutatud tarkvara:

- Instrumendi tarkvara/juhtprogramm: Agilent Masshunter Workstation Data Acquisition
- Kvalitatiivse analüüsi programm: Agilent Masshunter Qualitative Analysis B.07.00
- Kvantitatiivse analüüsi programm: Agilent QQQ Analysis

Andmebaasid, kust võeti andmed analüütide kohta:

- Forensic Dynamic MRM database (Agilent Technologies)
- ForTOX Triggered MRM\_B0601 (Agilent Technologies)

#### 3.1.2 MRM meetodi parameetrite optimeerimine

Katsetati kahte erinevat MRM skaneerimise tüüpi - dMRM ja tMRM. dMRM puhul analüüsiti proove kahe üleminekuga, mis leiti kõige sobilikumad olema kirjandusele ja andmebaasidele toetudes. tMRM puhul analüüsiti proove kõikide üleminekutega, mis andmebaasides olid välja toodud.

$\Delta^9$ -THCA, CBN, CBD, CBD-d3,  $\Delta^9$ -THC-d3 ja  $\Delta^9$ -THC olid andmebaasides ning MRM parameetrid võeti sealt. CBDA-d ja  $\Delta^8$ -THC-d andmebaasides ei olnud ning nende üleminekud ja muud MRM parameetrid leiti kirjandusest ja tuginedes eksperimentaalsetele andmetele.

CBD ja  $\Delta^9$ -THC on täpselt samasuguse molekulmassiga ning nad omavad ka täpselt samasuguseid üleminekuid. Sama on ka nende hapete CBDA ja  $\Delta^9$ -THCA puhul. MRM meetodi parameetrite optimeerimisel oli oluline, et mõlemad paarid saaksid võimalikult lahutatud kromatogrammil. Kui nad on teineteisest lahutatud, siis saab tänu erinevatele retentsiooniaegadele alati olla kindel, kumma analüüdiga on tegu. Sealjuures on oluline aru saada, milline paariline jõuab enne MS detektorini ja milline hiljem kindla meetodika tingimustes. Selleks kasutati sisestandardit.



Lisaks kuna CBD ja tema hape CBDA ning  $\Delta^9$ -THC ja tema hape  $\Delta^9$ -THCA erinevad teineteisest vaid karboksüülhappe rühma poolest, siis nende mahtuvustegur on sarnane. Nende eristamiseks teineteisest kasutati samuti sisestandardeid.

### **Produktiooni skaneerimine**

Produktiooni skaneerimise protsess läbiti, et veenduda, kas andmebaasis olevad parameetrid on ka käesoleva töö raames kasutatava LC-MS/MS-i puhul kõige paremad. Lisaks sooviti saada teada, kas kirjanduses kirjeldatud väited, et  $\Delta^9$ -THC ja CBD-d ning  $\Delta^9$ -THCA ja CBDA-d saab teineteisest eristada nende produktioonide üleminekute kõrguste suhteid hinnates massispektril (1.5.1).

### **3.1.3 Standardainete segu ja sisestandardi valmistamine**

#### **Standardainete segu meetodika optimeerimiseks: segu<sub>opt</sub>**

Standardainete segu „segu<sub>opt</sub>“ valmistati mobiilse ja statsionaarse faasi optimeerimiseks. Esialgsete segud (segu<sub>opt\_1</sub>) koosnesid CBD, CBD-d3,  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA ja CBN-ist, kuna ülejäänud standardaineid laboris sel hetkel polnud. Hiljem koosnesid segud kõikidest komponentidest (segu<sub>opt\_2</sub>):  $\Delta^9$ -THCA, CBN, CBD, CBD-d3,  $\Delta^9$ -THC-d3,  $\Delta^9$ -THC, CBDA. Olenevalt segust võeti kõikidesse võrdne kogus standardaineid, et saaks täpselt hinnata, milline segu, kolonn või solventide kombinatsioon oleks kõige efektiivsem nendele analüütidele. Nii segu<sub>opt\_1</sub> kui ka segu<sub>opt\_2</sub> lahjendati kahe erineva lahustiga: 100% metanooli ja 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN seguga. Lahustid valiti kirjanduse ja eksperdi kogemuse põhjal. Erinevad lahustid valiti, et optimeerida meetodika parameetreid.

Lisaks sooviti hiljem lisada ka  $\Delta^8$ -THC meetodikasse ning juba optimeeritud meetodika parameetritega analüüsiti ka  $\Delta^8$ -THC-d lisatuna segu<sub>opt\_2</sub> lisandiks.

#### **Standardainete segu kalibreerimisgraafiku koostamiseks: segu<sub>cal</sub>**

Kalibreerimisgraafiku koostamise standardainete segu „segu<sub>cal</sub>“ valmistati viiest standardainest ( $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBN, CBD, CBDA), kusjuures kõikide kontsentratsioonid olid eraldi 1mg/ml. Kuna antud meetodika eesmärk on analüüsida eelkõige väikeste kontsentratsioonide juures  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA-d, siis standardainete segu tehti 20 protsendiline, sealjuures igat komponenti jäi segusse 200 µg/ml. Selleks pipeteeriti igat standardainet võrdne kogus viaali. Seejärel lahjendati enamasti proovi põhimõttel, et eelmisest lahjendusest võetakse lahust uue lahjenduse tegemiseks. Kuna seal on võimalus süsteemseks veaks, kuid teisiti oleks tekkinud liiga suur standardainete kulu, siis tehti osad korrad lahjendused 5% lahjendusest nii, et kõik lahjendused tehti kasutades seda sama 5% proovi – nii sooviti võrrelda kahe erineva lahjendamise meetodi erinevust. Kui kõik lahjendused olid valmis, siis pipeteeriti 50 µl igat proovi eraldi viaalides asuvatesse koonusekujulisse siseanumatesse. Igasse viaali pipeteeriti 10 µl sisestandardit (IS) kontsentratsiooniga 10 µg/ml. IS koosnes CBD-d3 ja  $\Delta^9$ -THC-d3-st.

### **Sisestandardi ja mobiilse faasi solvendi A valmistamise eeskiri**

Sisestandardi valmistamisel pipeteeriti 100 µl THC-d3 kontsentratsiooniga 100 µg/ml ja 10 µl CBD-d3 kontsentratsiooniga 1 mg/ml tumedasse, korgiga suletavasse viaali. Standardainetele lisati 890 ml 100% metanooli, et saada IS kontsentratsiooniks 10 µg/ml.

Mobiilse faasi solvendi A (H<sub>2</sub>O 5mM AF + 0.01% FA) valmistamine: tume korgiga suletav anum tuleb täita 1000 ml Milli Q veega. Sellele lisatakse 500 µl 10M AF lahust ja 100 µl FA-d.

#### **3.1.4 Statsionaarse faasi valik**

Lahutusprotsessi optimeerimisel võrreldi nelja erinevat kolonni:

- „C18 100mm“: Agilent Zobrax® Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HT 1.8 µm (100 x 2.1 mm)
  - Eelkolonn: Agilent Zobrax® Eclipse Plus C18 1.8µm (3.0 x 5mm)
- „C18 50mm“: Agilent Zobrax® Extend C18 1.8 µm (50 x 2.1 mm)
- „C8“: Phenomenex Kinetex® CoreShell 2.6 µm C8 100 Å (100 x 2.1 mm)
- „Bifenüül“: Phenomenex Kinetex® CoreShell 2.6 µm Biphenyl 100 Å (100 x 3.0 mm)

Kõik kolonnid on RP-HPLC kolonnid. C18 kolonnid on kõige mittepolaarsemad andes hüdrofoobseid interaktsioone, siis järgnevad tugevuselt C8 ja seejärel bifenüül kolonn. C18 kolonnide osakeste suurus on kõige väiksem, kuid kuna C18 kolonni puhul on tegu traditsiooniliste osakesega (täielikult täidetud silikageeliga) ja C8 ning bifenüüli kolonnis on „CoreShell“ tehnoloogiaga, siis osakeste suuruseid ei saa otseselt võrrelda ja nad võivad liigituda võrdväärteteks. Üks C18 kolonnidest on lühem, kui ülejäänud kolm, mis peaks tegema analüüsi kiiremaks. Bifenüüli kolonnil on kõige suurem sisediameeter, mis tähendab, et ta kannatab suuremaid voolukiirusi, kuid seejuures kaotab efektiivsuses. Üldjoontes on kõigi nelja puhul tegu väga efektiivsete kolonnidega.

Kolonni temperatuuri ei muudetud – see oli kõikide katsete käigus stabiilselt 50°C. Muutuste tegemist ei peetud vajalikuks, sest madalamal temperatuuril oleks rõhk olnud liiga kõrge (analüüsi ajal oli rõhk kuni 470bar), kuid kõrgemal oleks olnud instrumendi enda limiit (60°C).

#### **3.1.5 Mobiilse faasi valik**

Kasutati gradientlueerimise põhimõtteid. Peamiselt kasutati kahe solvendi segu:

- „ACN“= Solvent A: 60% H<sub>2</sub>O (5mM AF + 0.01% FA); Solvent B: 40% ACN (0.01% FA)
- „MeOH“= Solvent A: 60% H<sub>2</sub>O (5mM AF + 0.01% FA); Solvent B: 40% metanool

Nii metanooli kui ka ACN-i prooviti toetudes kirjanduse ülevaatele ja ka eksperdi kogemusele. Kuna mõlemal juhul olid lahutuvused piisavad, siis rohkem orgaanilisi solvante ei katsetatud. Vesifaasile oli lisatud 5mM AF + 0.01% FA, et alandada mobiilse faasi pH väärtust. See tähendab, et kolonnis olevad silanoolrühmad peaksid jääma protoneerituks ning ioonvahetuse reaktsioone seal ei tohiks toimuda. Lisaks katsetati vesifaasi happelise osa muutmist: 5mM AF ja 0.01% FA segu asendati 0.1% sipelghappe vastu.

Metoodikat optimeeriti kahe gradiendiga (Tabel 1):

**Tabel 1. Erinevad gradiendid, millega optimeeriti metoodika mobiilset faasi. Tabelis A ja B tähistavad vastavalt solvent A-d ja solvent B-d.**

<b>Esimene gradient</b>	<b>Teine gradient</b>
0.5 min 60%:40% A:B	0.5 min 60%:40% A:B
2 min 5%:95% A:B	5 min 5%:95% A:B
5 min 5%:95% A:B	7 min 5%:95% A:B
5.5 min 60%:40% A:B	7.5 min 60%:40% A:B

### **3.1.6 Kalibreerimisgraafiku moodustamine**

Igale analüüdile koostati eraldi kalibreerimisgraafik, kusjuures happelistele analüütidele ( $\Delta^9$ -THCA ja CBDA) ja CBD-le koostati nii ESI+ kui ka ESI- režiimis kalibreerimisgraafikud, ülejäänud analüütidele koostati kalibreerimisgraafikud ainult ESI+ režiimis.

Esimesed kalibreerimisgraafikud tehti, et näha milline ekstrahent annab lineaarsema kalibreerimiskõvera juba välja valitud statsionaarse ja mobiilse faasi tingimustes. Seejärel kasutati antud ekstrahenti ning analüüsiti üle 250 erineva kalibreerimisproovi. ESI- režiimis analüüsiti 19 erineva kontsentratsiooniga proovi, mida oli kokku 178. ESI+ režiimis analüüsiti 19 erineva kontsentratsiooniga proovi, mida oli kokku 260. Sellega otsustati ära, millises režiimis on milline analüüt kõige lineaarsema ja täpsema kalibreerimisgraafikuga ning mis on lineaarne ala. Kalibreerimisproove tehti nii palju, sest sooviti tagada esinduslik korduvus ja korratavus.

CBDA ja CBD lõplikud kalibreerimisgraafikud tehti ESI- režiimis analüüsitud kalibreerimisproovide abil, kusjuures CBD-le tehti kaks eraldi kalibreerimisgraafikut. Põhjus seisnes selles, et reaalses proovides varieerub nii CBD kui ka CBDA kontsentratsioon väga suurel määral ning kahe erineva kalibreerimisgraafikuga saavutati parem LoQ. CBDA-le tehti üks kalibreerimisgraafik, sest väga madalatel kontsentratsioonidel ei olnud CBDA lineaarne.  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA ja CBN kalibreerimisgraafik tehti ESI+ režiimis analüüsitud kalibreerimisproovide abil.

Kalibreerimisgraafikute moodustamise esimese sammuna valiti välja kontsentratsioonid, mis jäid graafikut esindama. Seejärel valiti välja kalibreerimisproovidest igale kontsentratsioonile kaks või enam sama päeva paralleelset proovi, mis paiknesid kalibreerimisgraafiku usalduspiirides. Kõiki proove ei kasutatud kalibreerimiskõvera moodustamisel, kuna otsustati, et proovitakse jätta võimalikult lihtne kalibreerimisgraafik. Sellegi poolest arvutati ülejäänud proove arvestades muud veamäärad.

### **3.1.7 Proovide ettevalmistamine ja ekstraheerimine**

Proovide ettevalmistamisel lähtuti ekspertide kogemusest ja kirjanduse ülevaatest (1.5.3). Kuna sooviti võimalikul lihtne metoodika valmistada, siis proovide ettevalmistamise etapp oli sarnane kõikidele proovimaatriksitele (kanepitaime puru, õlid, vaigud, jm).

Proovi ettevalmistamisel lähtuti põhimõttest, et proov peab esindama võimalikult täpselt kogu analüüsitava proovimaterjali. Kuna tegu on üldjuhul kas taimse puruga või muu mittetäielikult homogeense proovimaterjaliga, siis võeti prooviks piisavalt suur kogus proovimaterjalist - 50mg.

Seejärel lisati proovile 5ml ekstrahenti. Katsetati kolme erinevat ekstraheerimise lahustit: heptaan, metanool ja etanool. Heptaani kasutati toetudes eksperdi kogemustele GC meetodikaga, metanooli ja etanooli katsetati kirjandusest lähtudes. Proovide ettevalmistusprotsess erines erineva lahusti kontekstis. Eelkõige heptaani puhul: kuna heptaani ei tohi süstida HPLC-sse, siis tuli heptaan proovist välja aurutada ja seejärel proov uuesti katseklaasis ära lahustada etanooli või metanooliga.

Ekstraheeritud proovist tehti kümnekordne lahjendus. Juhul kui on teada või on aimatav, et proovis olevate analüütide sisaldus on üle 20%, siis tuleks proovi veel lahjendada, et ei tekiks kromatograafiliste piikide kattumine ning tulemus mahuks kalibreerimisgraafiku tööalasse, veel parem kui lineaarsesse alasse.

Peale segu lahjendamist (x10), tuli ekstrakti tugevalt loksutada umbes 1-2 minutit ning seejärel lisada ultrahelivanni vähemalt 30 minutiks. Kusjuures proove pidi vahepeal loksutama, et sade ei kinnituks proovianuma põhja. Kui proovid olid ultrahelivanni läbinud, siis pandi nad sadestumise eesmärgil tsentrifugima 5 minutiks 2500min<sup>-1</sup>. Peale tsentrifugimise tuli lasta proovidel natuke aega seista, et viimasedki tahked osakesed sadestuksid. Seejärel pipeteeriti proovi keskelt, selgelt alalt 50 µl proovi viaali koonusekujulisse siseanumasse, lisati 10 µl sisestandardit (10µg/ml), suleti korgiga ning viidi proov analüüsima või sügavkülma.

## 3.2 Tulemused

### 3.2.1 MRM parameetrid ja produktiooni skaneerimine

MRM parameetrid, mis saadi andmebaasidest, täiendati produktiooni skaneerimise teel. Produktiooni skaneerimine läbiti nii positiivses kui ka negatiivses ESI režiimis. Molekuli fragmenteerimiseks kasutati erinevaid kollisioonienergiad (CE=10-40V), skaneerimisaknaid, süstekoguseid ning korrigeeriti andmebaasidest saadud üleminekuid. (Tabel 2 ja Tabel 3)

Tabel 2. Negatiivse ESI režiimi MRM parameetrid.

Aine	Eellasioon	Produktioon	Fragmentor	CE (V)	CAV (V)	Ret. aeg	Ret. aken	Polaarsus
CBD	313.2	245.2	135	24	3	8.51	1	Negatiivne
CBDA	357.2	245.2	135	30	3	8.42	1	Negatiivne
CBDA	357.2	179.1	135	30	3	8.42	1	Negatiivne
CBDA	357.2	107.1	135	40	3	8.42	1	Negatiivne
CBD-d3	316.2	248.2	135	24	3	8.51	1	Negatiivne
Δ9-THCA	357.2	245.2	135	40	3	9.24	1	Negatiivne
Δ9-THCA	357.2	191.1	135	40	3	9.24	1	Negatiivne
Δ9-THCA	357.2	179.1	135	30	3	9.24	1	Negatiivne

Tabel 3. Positiivse ESI režiimi MRM parameetrid.

Aine	Eellasioon	Produktioon	Fragmentor	CE (V)	CAV (V)	Ret. aeg	Ret. aken	Polaarsus
CBD	315.2	193.1	118	20	4	8.51	1	Positiivne
CBD	315.2	123	118	32	4	8.51	1	Positiivne
CBDA	359.2	341.2	150	10	3	8.42	1	Positiivne
CBDA	359.2	219.1	150	40	3	8.42	1	Positiivne
CBD-d3	318.2	196.1	118	20	4	8.51	1	Positiivne
CBD-d3	318.2	123	118	32	4	8.51	1	Positiivne
CBN	311.2	293.2	126	16	3	8.92	1	Positiivne
CBN	311.2	223	126	20	3	8.92	1	Positiivne
$\Delta^9$ -THC	315.2	193.1	150	20	3	9.11	1	Positiivne
$\Delta^9$ -THC	315.2	123	150	40	3	9.11	1	Positiivne
$\Delta^9$ -THCA	359.2	341.2	150	10	3	9.24	1	Positiivne
$\Delta^9$ -THCA	359.2	219.1	150	40	3	9.24	1	Positiivne
$\Delta^9$ -THC-d3	318.3	196.1	150	20	3	9.11	1	Positiivne
$\Delta^9$ -THC-d3	318.3	123	150	40	3	9.11	1	Positiivne

Lisaks täheldati, et nii ESI+ kui ka ESI- režiimis on m/z 247/245 ning m/z 315/313 üleminekute suhe erinevate CE-de puhul erinev ning ei saa tuua kindlat järeldust, et CBD-d saab  $\Delta^9$ -THC-st eristada antud üleminekute kõrguste suhete võrdluses nagu väitsid autorid Berman et al. (1.5.1). Sama kehtis ka CBDA ja  $\Delta^9$ -THCA üleminekute puhul.

### 3.2.2 Statsionaarne ja mobiilne faas

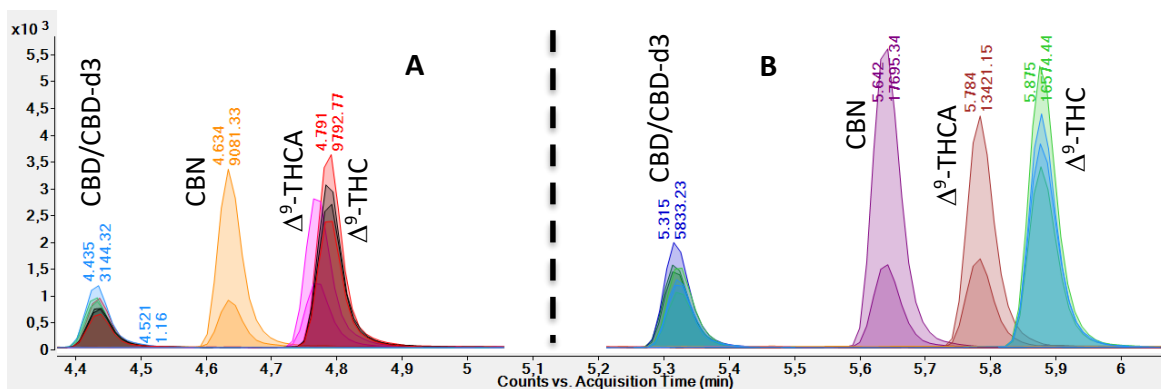
Kuigi kirjanduse allikad soovivad meetodika optimeerimisel alustada mobiilse faasi optimeerimisest, siis kuna laboris oli neli erinevat kolonni kohe saadaval ja erinevaid kolonne proovides on optimeerimise teekond lühem, otsustati alustada statsionaarse faasi optimeerimisest. Tegelikult käisid statsionaarse faasi ja mobiilse faasi optimeerimine koos, kuid statsionaarne faas otsustati ära enne mobiilset faasi. Sealjuures kolonni tüüp valiti välja segu<sub>opt\_1</sub> abil ning hiljem kontrolliti sobivust puuduolevatele analüütidele (CBDA ja  $\Delta^9$ -THC-d3) segu<sub>opt\_2</sub> abil.

#### ***C18 50mm ja C18 100mm kolonnide võrdlus, mobiilne faas ACN***

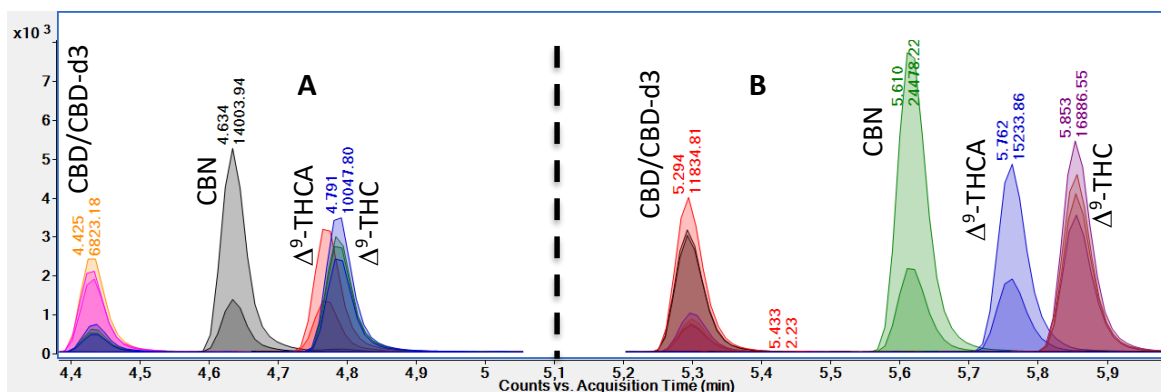
Mõlema C18 kolonni puhul oli segu<sub>opt\_1</sub> analüütide järjestus kromatogrammil järgmine: CBD/CBD-d3, CBN,  $\Delta^9$ -THCA,  $\Delta^9$ -THC. Kolonnide võrdlemisel oli selge erinevus: lühem C18 ei lahutanud analüüte  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA, pikem lahutas. Kuna antud meetodika tegemisel ei olnud oluline ühe minutiline ajaline võit, siis otsustati koheselt C18 50mm kolonn jätta kõrvale ning optimeerimist jätkata nii, et C18 100mm jääks valikusse. Kuna C18 50mm kolonn otsustati koheselt eemaldada valikust, siis sellega proovitigi ainult ühte mobiilset faasi. C18 100mm puhul tuli aga arvestada sellega, et parendada optimeerimisparameetreid piikide kattuvuse tõttu (Joonis 10 ja Joonis 11).

Järjestus ega lahutus ei muutunud segu<sub>opt\_1</sub> lahusti erinevusel – ainus vahe oli selles, et 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil valmistatud segu piigid olid pindalalt väiksemad, kui 100% metanooli baasi segul. Ainult  $\Delta^9$ -THC piik jäi pindalalt mõlema lahustiga enam-vähem sama suureks. (Joonis 10 ja Joonis 11).

Järeldus: C18 kolonnide võrdlusest jäi valikusse pikem C18 kolonn ning segu lahustina eelistati 100% metanooli.



Joonis 10. C18 kolonnide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil. Joonisel (A) - C18 50mm kolonni, (B) C18 100mm kolonni analüütide piigid.



Joonis 11. C18 kolonnide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 100% metanooli baasil. Joonisel (A) - C18 50mm kolonni, (B) C18 100mm kolonni analüütide piigid.

### C8 ja bifenüüli kolonnide võrdlus, mobiilne faas ACN

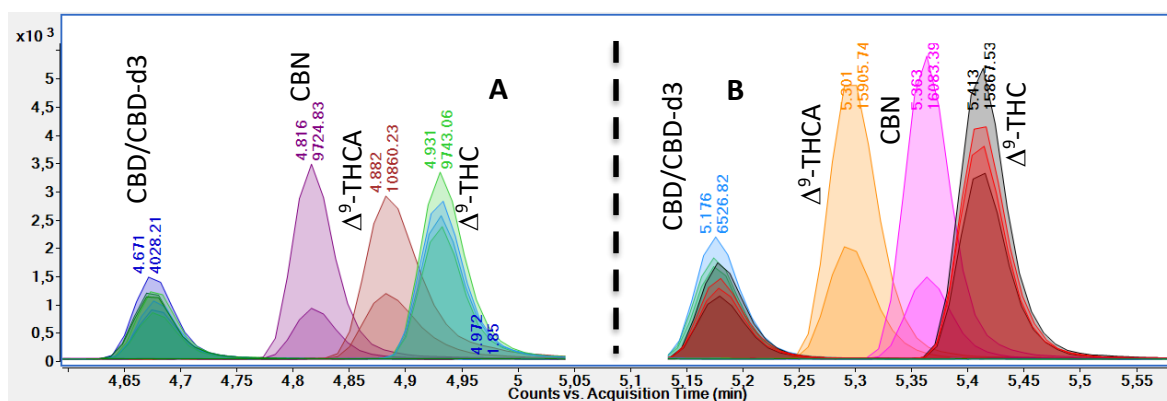
Nagu C18 kolonnidel, oli ka C8 kolonni puhul segu<sub>opt\_1</sub> analüütide järjestus kromatogrammil järgmine: CBD/CBD-d3, CBN,  $\Delta^9$ -THCA,  $\Delta^9$ -THC. Bifenüüli kolonni puhul vahetasid CBN,  $\Delta^9$ -THCA kohad, nii et kromatogrammil esineb  $\Delta^9$ -THCA enne kui CBN. Mõlema kolonni lahutusvõime oli sarnane: CBN,  $\Delta^9$ -THCA,  $\Delta^9$ -THC piigid kattusid osaliselt ning CBD ja CBD-d3 olid lahutunud ülejäänud kolmest (Joonis 12 ja Joonis 13).

C8 Kolonn: 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil valmistatud segu<sub>opt\_1</sub> puhul olid CBD/CBD-d3 ja CBN piikide pindalad kolmandiku või vähema võrra väiksemad, kuid  $\Delta^9$ -THC piigi pindala umbes kolmandiku ja  $\Delta^9$ -THCA piigi pindala umbes poole võrra suuremad, kui 100% metanooli baasil valmistatud segu puhul. Kuna,  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA on ülejäänud analüütidest olulisemad, kuna need on seadusega reguleeritud, siis leiti, et 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil segu sobib paremini C8 kolonnile (Joonis 12 ja Joonis 13).

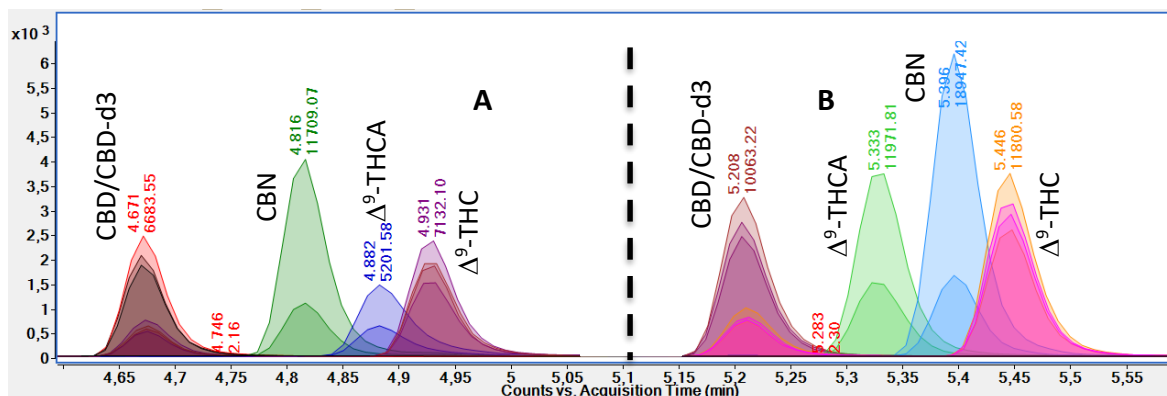
Bifenüüli kolonn: 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil valmistatud segu<sub>opt\_1</sub> puhul olid CBN,  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA piigid sarnaste pindaladega. 100% metanooli baasil valmistatud segu<sub>opt\_1</sub> puhul oli CBD ja CBN kõrgemad ja  $\Delta^9$ -THCA,  $\Delta^9$ -THC madalamad, kui 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil valmistatud segu<sub>opt\_1</sub> puhul. Sellistel tingimustel loeti paremaks 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN segu<sub>opt\_1</sub>, sest  $\Delta^9$ -THCA,  $\Delta^9$ -THC olid metoodika

tähtsaimad analüüdid, kuid edasistest analüüsides välja ei heidetud veel midagi (Joonis 12 ja Joonis 13).

**Järeldus:** Kuid kuna piigid olid koos, siis sooviti gradientelueerimist läbi viia. Lisaks sooviti mobiilset faasi vahetada. Samas C8 ja bifenuüli omavahelisest võrdlusest oli näha, et C8 ei anna nii suurte pindaladega piike, kui bifenuüli kolonn. Seega kolonnide edasisse võrdlusesse valiti nendest kahest bifenuüli kolonn. Nüüd hakati võrdlema erinevaid gradiente, erinevaid mobiilseid faase ja C18 ning bifenuüli kolonne.



Joonis 12. C8 (A) ja bifenuüli (B) kolonnide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil.



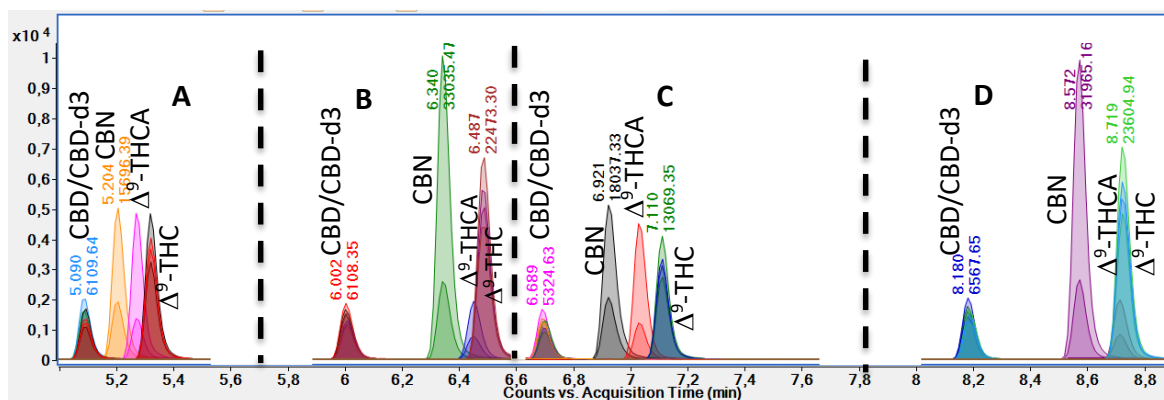
Joonis 13. C8 (A) ja bifenuüli (B) kolonnide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 100% metanooli baasil.

**Bifenuüli kolonn, 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil segu<sub>opt\_1</sub>: mobiilsete faaside ja gradientide vaheline võrdlus**

**Mobiilsete faaside võrdlus:** ACN mobiilse faasiga on analüütide järjestus selline nagu eelnevalt kirjeldatud. MeOH mobiilse faasiga muutsid CBN ja  $\Delta^9$ -THCA oma kohad ning järjekord on selline: CBD/CBD-d3, CBN,  $\Delta^9$ -THCA,  $\Delta^9$ -THC. Lisaks on näha, et kuigi CBD/CBD-d3 eraldusid hästi CBN,  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA-st, kui mobiilne faas oli MeOH, siis  $\Delta^9$ -THCA ei lahutunud  $\Delta^9$ -THC-st peaaegu üldse. ACN mobiilse faasiga küll piigid kattuvad, aga nad on rohkem lahus. MeOH mobiilse faasiga on CBN ja  $\Delta^9$ -THC piigid suuremad kui ACN mobiilse faasi puhul (Joonis 14).

**Gradientide võrdlus:** Mobiilne faas ACN: Uus gradient lahutas CBN,  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA piike paremini kui algradient. Kui C18 kolonni või bifenuüli kolonni ja teise segu<sub>opt\_1</sub>-ga analüüsid ei tule paremaid tulemusi, siis peab gradienti veel proovima suurendada. Mobiilne faas MeOH: Uue gradiendiga läksid  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA piigid üldse kokku ehk pigem sobis algradient (Joonis 14).

**Järeldus:** Metanool ei olnud hea solvent bifenuüli kolonniga, kui segu<sub>opt\_1</sub> oli valmistatud 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil. Sellest analüüsist jäi edaspidisesse võrdlusesse ACN mobiilse faasina ja uues gradient.



**Joonis 14.** Bifenuüli kolonni mobiilse faasi ja erinevate gradientide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil. Joonisel (A) - algradient, mobiilne faas ACN; (B) - algradient, mobiilne faas MeOH; (C) – uus gradient, mobiilne faas ACN; (D) – uus gradient, mobiilne faas MeOH.

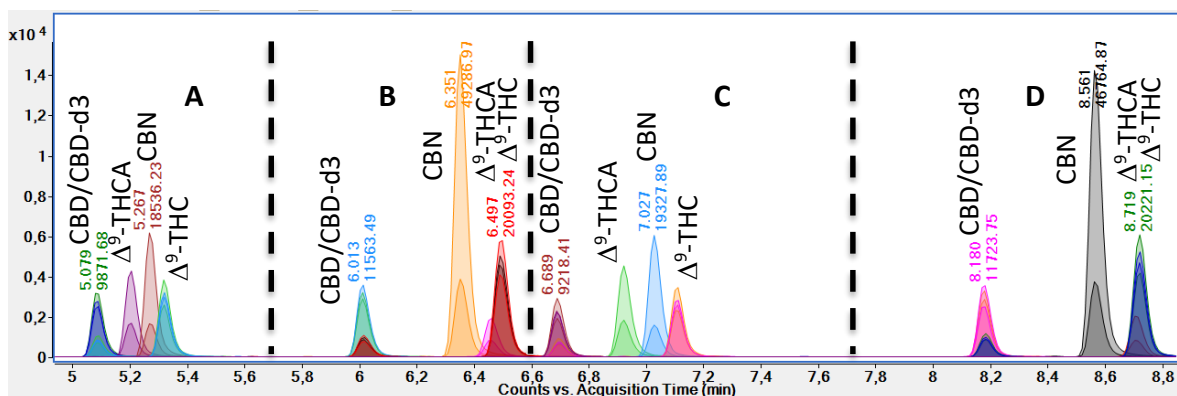
***Bifenuüli kolonn, 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub>: kahe segu<sub>opt\_1</sub>, mobiilsete faaside ja gradientide vaheline võrdlus***

**Kahe segu<sub>opt\_1</sub> ja mobiilsete faaside võrdlus:** Analüütide järjekord ja lahutuvus kromatogrammil on samasugune nagu eelnevas punktis kirjeldati. MeOH mobiilse faasi puhul andis CBN pea kolmandiku võrra suurema piigi kui 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil segu<sub>opt\_1</sub> puhul sama mobiilne faas. 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub> andis suuremaid piike, v.a.  $\Delta^9$ -THC, kui teine segu<sub>opt\_1</sub>.  $\Delta^9$ -THC on isegi madalam võrreldes 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil segu<sub>opt\_1</sub>-ga (Joonis 14 ja Joonis 15).

**Kahe segu<sub>opt\_1</sub> ja gradientide võrdlus:** Lahutumise kohapealt on võrdlus sarnane nagu eelmises punktis kirjeldati. Kinnitust saadi sellele, et segu<sub>opt\_1</sub> ei mõjutanud lahutuvust uue gradiendiga (Joonis 14 ja Joonis 15).

**Järeldus:** Kuna enamus analüütide piike olid 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub>-ga suuremad, siis valiti see segu bifenuüli kolonni jaoks. Samas arvestati sellega, et  $\Delta^9$ -THC oli väiksema pindalaga. Lisaks valiti bifenuüli kolonni jaoks mobiilseks faasiks ACN.





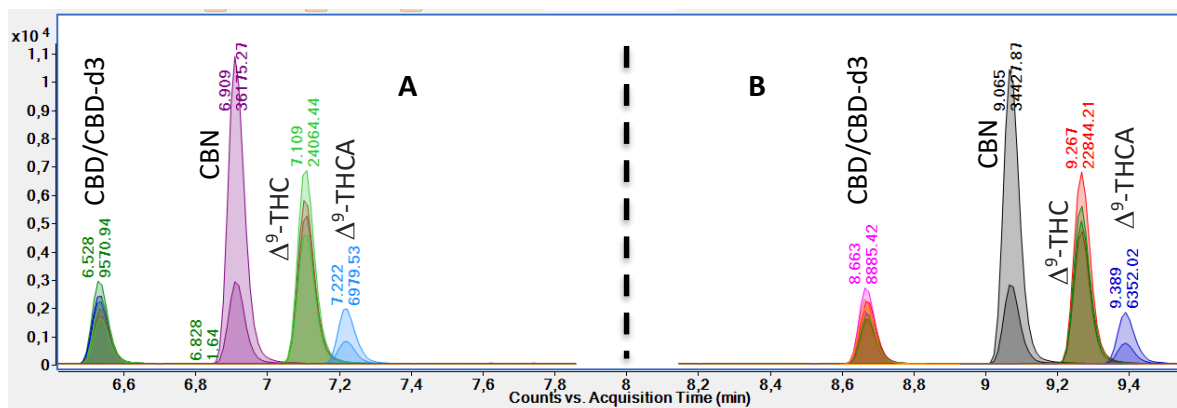
**Joonis 15. Bifenüüli kolonni mobiilse faasi ja erinevate gradientide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 100% metanooli baasil.** Joonisel (A) - alggradient, mobiilne faas ACN; (B) - alggradient, mobiilne faas MeOH; (C) – uus gradient, mobiilne faas ACN; (D) – uus gradient, mobiilne faas MeOH.

**C18 100mm kolonn, mobiilne faas MeOH: kahe segu<sub>opt\_1</sub> ja gradientide vaheline võrdlus**

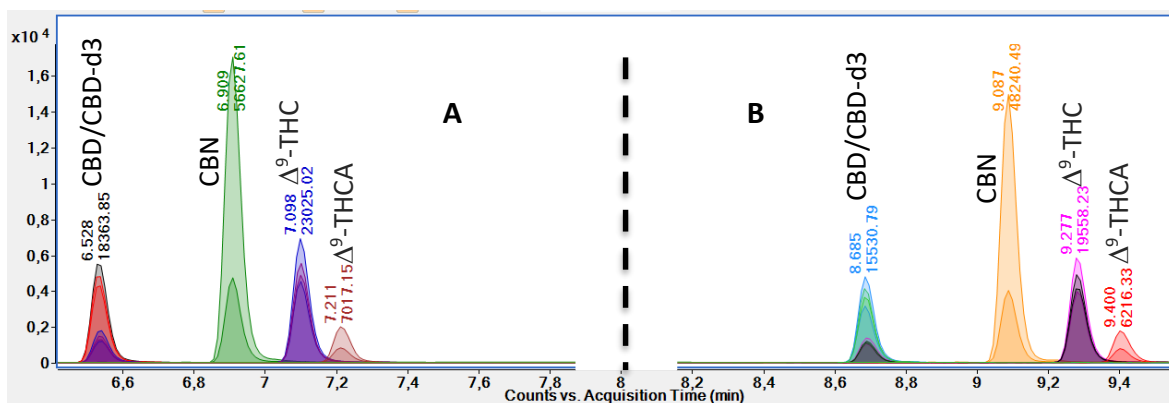
Mobiilsete faaside ja gradientide analüüs. Analüütide järjekord on järgmine: CBD, CBD-d3, CBN, Δ<sup>9</sup>-THC, Δ<sup>9</sup>-THCA. Seega Δ<sup>9</sup>-THC ja Δ<sup>9</sup>-THCA vahetasid erinevate mobiilsete faaside puhul kohad. Alggradiendiga analüütide piikide pindalad on suuremad, kui uue gradiendiga analüütide piikide pindalad. 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub> puhul oli Δ<sup>9</sup>-THC ja Δ<sup>9</sup>-THCA parem. Uue gradiendiga oli lahutus üldjoontes sarnane, kuid siiski oli väike vahe CBD ja Δ<sup>9</sup>-THC vahel – nendevaheline lahutus oli suurenenud ja kuna neil on samasugused üleminekud, siis oligi uus gradient eelistatud, olenemata sellest, et alggradiendiga olid piigi pindalad veidi suuremad (Joonis 16 ja Joonis 17)

Kahe segu<sub>opt\_1</sub> analüüs. Δ<sup>9</sup>-THC ja Δ<sup>9</sup>-THCA piikide pindalad olid 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub> puhul veidi väiksemad. CBD ja CBN puhul olid piigi pindalad umbes kolmandiku või poole võrra suuremad, mistõttu otsustati, et 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub> on parem. (Joonis 16 ja Joonis 17)

Järeldus. Valiti uus gradient ja 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub> viimaseks võrdluseks. Nüüd jäid võrdlusesse C18 100mm kolonn 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub> erinevate mobiilsete faasidega.



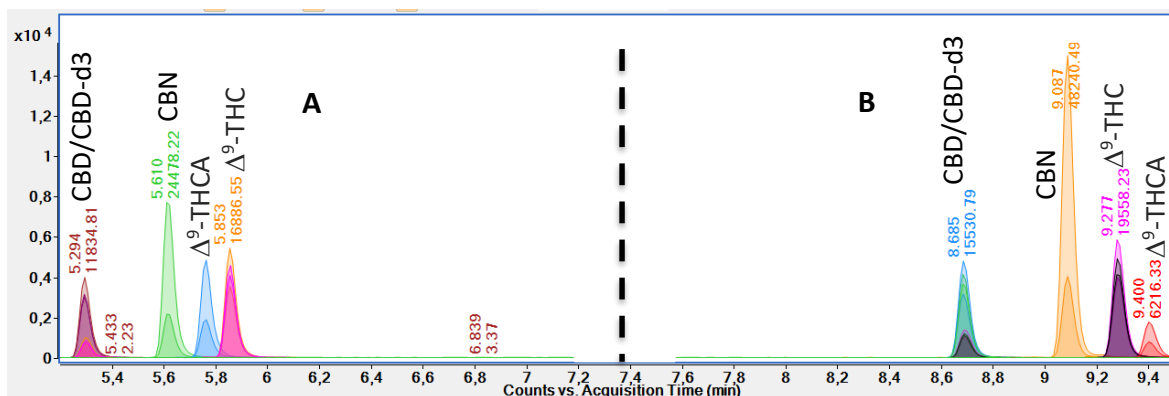
**Joonis 16. C18 100mm kolonni MeOH mobiilse faasi ja erinevate gradientide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 60:40 H<sub>2</sub>O:ACN baasil.** Joonisel (A) – alggradiendiga, (B) - uue gradiendiga tehtud analüüs.



Joonis 17. C18 100mm kolonni MeOH mobiilse faasi ja erinevate gradientide võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 100% metanooli baasil. Joonisel (A) – alggradiendiga, (B) - uue gradiendiga tehtud analüüs.

### C18 kolonn, 100% metanooli baasil segu<sub>opt\_1</sub>: erinevate mobiilsete faaside võrdlus

MeOH mobiilse faasi puhul on CBD, CBD-d3, CBN,  $\Delta^9$ -THC analüütide piigid 3000 ühikut suuremad, kusjuures CBN poole suurem.  $\Delta^9$ -THCA piigi pindala on aga 10 000 ühikut madalam. Kuna  $\Delta^9$ -THC piik oli suurem ning see analüüt on ka seadusega reguleeritud, siis otsustati, et soovitakse suuremat tundlikkust  $\Delta^9$ -THC puhul. Kuna tavaliselt on proovides  $\Delta^9$ -THCA kontsentratsioon väiksem, kui  $\Delta^9$ -THC oma, siis kogu THC arvutuses on vaja suuremat tundlikkust  $\Delta^9$ -THC-le (Joonis 18).



Joonis 18. C18 100mm kolonni ACN (A) ja MeOH (B) mobiilse faasi võrdluse kromatogramm, kui segu<sub>opt\_1</sub> on valmistatud 100% metanooli baasil. Joonisel (A) - ACN mobiilse faasiga, alggradiendiga tehtud analüüs. (B) - MeOH mobiilse faasiga, uue gradiendiga tehtud analüüs.

Kuna MRM analüüsil skaneeritakse kindlaid üleminekuid, siis C18 100mm kolonni, MeOH mobiilset faasi ja st. ainete segu, mis on 100% metanooli baasil, peeti piisavaks antud metoodika optimeerimisel.

### 3.2.3 Kannabinoidide valideerimisparameetrid: selektiivsus ja spetsiifilisus

#### $\Delta^9$ -THC selektiivsus ja spetsiifilisus

$\Delta^9$ -THC selektiivsust mõjutab eelkõige  $\Delta^9$ -THCA, kuna nende molekulid erinevad vaid karboksüülhappe pooltest ning neid mõlemad leidub reaalses proovis kõige enam võrreldes teiste

THC tüüpi kannabinoididega. Tänu deuteeritud  $\Delta^9$ -THC sisestandardi kasutamisele, selgus, et  $\Delta^9$ -THCA on suurema mahtuvusteguriga kui  $\Delta^9$ -THC. Lisaks omab  $\Delta^9$ -THC erinevaid üleminekuid  $\Delta^9$ -THCA-st ehk nad on eristatavad teineteisest massispektrite poolest. Kuna tegu on MRM analüüsiga, siis võib järeldada, et meetoodika on  $\Delta^9$ -THC spetsiifiline vähemalt  $\Delta^9$ -THCA suhtes.

$\Delta^8$ -THC on ainus THC tüüpi kannabinoid, mis omab samu üleminekuid, mis  $\Delta^9$ -THC. Eksperimendi käigus tehti kindlaks, et  $\Delta^8$ -THC mahtuvustegur on suurem kui  $\Delta^9$ -THC-l ning nad on MRM analüüsiga eristatavad erineva retentsiooniaja tõttu. Siiski asuvad nad üksteisele lähedastikku ning  $\Delta^9$ -THC piikide interpreteerimisel tuleb olla teadlik, et  $\Delta^8$ -THC võib olla potentsiaalne segaja. Kuna  $\Delta^8$ -THC esineb reaalses proovis harva, siis ei võetud teda suure segajana arvesse.

Lisaks on  $\Delta^9$ -THC-ga identsed üleminekud veel CBD-l. Oluline oli meetoodika optimeerimisel CBD ja  $\Delta^9$ -THC teineteisest lahutada ning seejärel tuvastada mõlemad nende deuteeritud standardite ja retentsiooniaja järgi. See lahendati statsionaarse ja mobiilse faasi optimeerimise käigus, kus tagati võimalikult kõrge lahutusvõime ainetel vahel. Kuna nad said piisavalt lahutatud, siis võib pidada meetoodikat  $\Delta^9$ -THC ja CBD teineteise suhtes spetsiifiliseks.

$\Delta^9$ -THC üleminekud kattuvad suuremas osas ka CBDA, CBC, CBL ja CBG-ga (38). Oluline on siinkohal eriti hoolikalt jälgida  $\Delta^9$ -THC-d3 retentsiooniaega kromatogrammil ning kasutada seda tulemuste analüüsimisel. Kuna  $\Delta^9$ -THC-d3 ja  $\Delta^9$ -THC piigid elueeruvad samaaegselt, siis võib antud meetoodikat pidada siiski  $\Delta^9$ -THC spetsiifiliseks.

#### ***$\Delta^9$ -THCA selektiivsus ja spetsiifilisus***

$\Delta^9$ -THCA selektiivsust mõjutab eelkõige  $\Delta^9$ -THC ning  $\Delta^9$ -THC selektiivsuse ja spetsiifilisuse alapeatükis leiti, et meetoodika on spetsiifiline  $\Delta^9$ -THCA suhtes  $\Delta^9$ -THC kontekstis.

$\Delta^9$ -THCA-l on identsed üleminekud CBDA-ga, mis tähendab, et üks potentsiaalseid segajaid on CBDA. See lahendati statsionaarse ja mobiilse faasi optimeerimise käigus, kus tagati võimalikult suur lahutusvõime ainetel vahel. Kuna THC tüüpi kannabinoide on vähemalt 20 ja neist vaid  $\Delta^9$ -THCA-l on üleminek  $m/z$  357.2-245.2 negatiivses ESI režiimis, siis võib olla kindel tänu MRM analüüsile, et meetoodika on sarnaste analüütide kontekstis spetsiifiline.

#### ***CBD selektiivsus ja spetsiifilisus***

CBD selektiivsust mõjutab eelkõige CBDA, kuna nende molekulid erinevad vaid karboksüülhappe poolest ning neid mõlemaid leidub reaalses proovis kõige enam võrreldes teiste CBD tüüpi kannabinoididega. Tänu deuteeritud CBD sisestandardi kasutamisele, selgus, et CBDA on väiksema mahtuvusteguriga kui CBD. Lisaks omab CBD erinevaid üleminekuid CBDA-st ehk nad on eristatavad teineteisest massispektrite poolest. Kuna tegu on MRM analüüsiga, siis võib järeldada, et meetoodika on CBD spetsiifiline vähemalt CBDA suhtes.

Lisaks omab CBD ka kattuvaid üleminekuid veel  $\Delta^9$ -THC, CBDA, CBC, CBL ja CBG-ga (38). Oluline on siinkohal eriti hoolikalt jälgida CBD-d3 asukohta kromatogrammil ning kasutada seda tulemuste analüüsimisel. Kuna CBD-d3 ja CBD on sama mahtuvusteguriga, siis võib antud meetoodikat pidada siiski CBD spetsiifiliseks.

### **CBDA selektiivsus ja spetsiifilisus**

CBDA selektiivsust mõjutab eelkõige CBD. CBD selektiivsus ja spetsiifilisus alapeatükile toetudes võib öelda, et CBDA on spetsiifiline CBD suhtes, sest neil on erinevad mahtuvustegurid. Kuna CBD tüüpi kannabinoide on vähemalt 8 ja neist vaid CBDA-l on üleminek  $m/z$  357.2-245.2 negatiivses ESI režiimis, siis võib olla kindel, et meetodika on vähemalt sarnaste analüütide kontekstis spetsiifiline. Lisaks on veel üks segajatest  $\Delta^9$ -THCA, mis omab CBDA-ga samu üleminekuid. Selle lahendas ka erinevad mahtuvustegurid ning piisavalt hea lahutus  $\Delta^9$ -THCA ja CBDA vahel.

### **CBN selektiivsus ja spetsiifilisus**

CBN-i puhul puuduvad segajad THC ja CBD tüüpi kannabinoidide seas, kuna CBN-il on teistest erinevad üleminekud. Lisaks on tal ka teistest erinev mahtuvustegur. CBN-il on vaid ühe CBN tüüpi kannabinoidiga (CBND) täpselt samasugused üleminekud. Sellegi poolest ei esine CBND päris proovis nii sagedasti kui CBN ning meetodikat võib pidada spetsiifiliseks CBN suhtes.

#### **3.2.4 Kannabinoidide valideerimisparameetrid: lineaarsus ja tundlikkus**

Kõikidele uuritavatele kannabinoididele koostati üks kalibreerimisgraafik, välja arvatud CBD-le. CBD analüüsimisel tehti kaks eraldi kalibreerimisgraafikut, sest päris proovides oleva CBD kontsentratsioonide vahemik on väga suur – võib olla alla 1%, kuid võib olla ka üle 20%. Nii laias kalibreerimisalas tekib olukord, kus väikeseid kontsentratsioone ei ole võimalik arvutada täpselt. Seetõttu tehti järgnevad kalibreerimisgraafikud: CBD väga madalatel kontsentratsioonidel ja CBD madalatel kuni kõrgetel kontsentratsioonidel. Ka CBDA kontsentratsioonide vahemik võib olla väga suur nii nagu ka CBD puhul. Kuna aga CBDA ei olnud lineaarne väikestel kontsentratsioonidel, otsustati teha ainult üks kalibreerimisgraafik.

Kõikide kannabinoidide kalibreerimisgraafikud koosnesid enam kui 18 punktist, kusjuures igas punktis oli tehtud vähemalt kaks paralleelmõõtmist (Tabel 4, Joonis 19). Kalibreerimisgraafikud on detailsemalt ja suuremalt näha LISADES (LISA 7.1; 8.1; 10.1; 10.2; 11.1; 13.1).

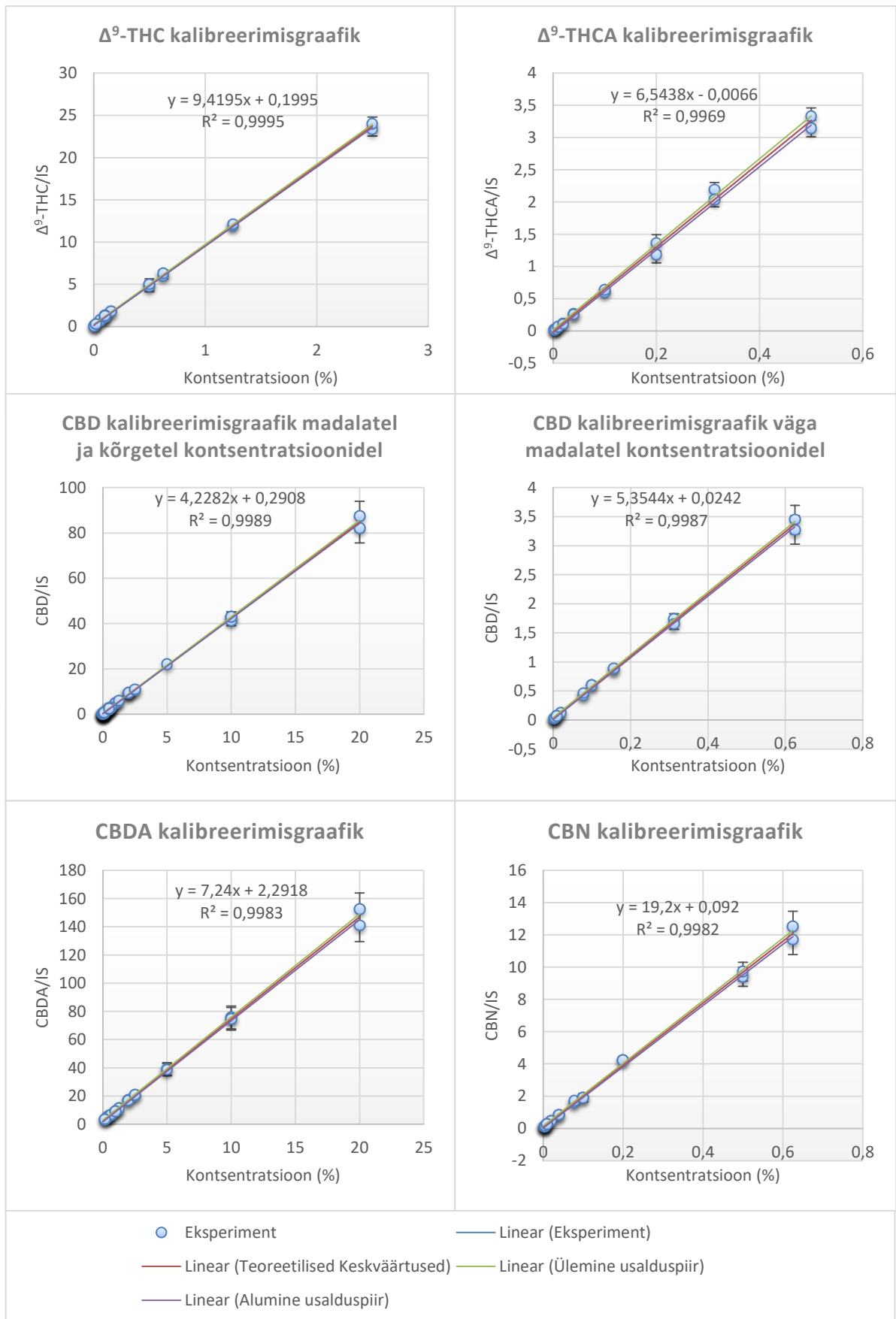
$\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD väga madalatel kontsentratsioonidel, CBD madalatel või kõrgetel kontsentratsioonidel, CBDA ja CBN-i kalibreerimisgraafikute koostamisel kasutati vastavalt 9, 9, 9, 14, 11, 10 erinevat kalibreerimisgraafiku punkti. Tundlikkused olid vastavalt 9.4, 6.5, 5.4, 4.2, 7.2 ja 19.2. Determinatsioonikordajad jäid kõikide kannabinoidide puhul 0.9969 ja 0.9995 vahele (Tabel 4).

**Tabel 4. Kannabinoidide kalibreerimisgraafiku punktid, sirge valem ja determinatsioonikordaja ( $R^2$ ).**

Aine	Proovide arv	Kalibreerimisgraafiku punktid (%)	Sirge valem	$R^2$
$\Delta^9$ -THC	20	0.005; 0.02; 0.06; 0.1; 0.16; 0.5; 0.625; 1.25; 2.5	$y = 9.4195x + 0.1995$	<b>0.9995</b>
$\Delta^9$ -THCA	18	0.002; 0.005; 0.01; 0.02; 0.04; 0.1; 0.2; 0.3; 0.5	$y = 6.5438x - 0.0066$	<b>0.9969</b>
CBD (1)*	18	0.002; 0.005; 0.01; 0.02; 0.08; 0.1; 0.16; 0.3; 0.6	$y = 5.3544x + 0.0242$	<b>0.9987</b>
CBD (2)**	45	0.002; 0.005; 0.06; 0.1; 0.16; 0.5; 0.6; 1; 1.25; 2; 2.5; 5; 10; 20	$y = 4.2282x + 0.2908$	<b>0.9989</b>
CBDA	22	0.156; 0.3125; 0.5; 0.625; 1; 1.25; 2; 2.5; 5; 10; 20	$y = 7.24x + 2.2918$	<b>0.9983</b>
CBN	22	0.002; 0.005; 0.01; 0.02; 0.039; 0.078; 0.1; 0.2; 0.5; 0.625	$y = 19.2x + 0.092$	<b>0.9982</b>

\* CBD väga madalatel kontsentratsioonidel

\*\* CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel



Joonis 19. Δ<sup>9</sup>-THC, Δ<sup>9</sup>-THCA, CBD väga madalatel kontsentratsioonidel, CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel, CBDA ja CBN kalibreerimisgraafikud koos ülemise ja alumise usalduspiiriga (CI=95%).

Residuaalide võrdluses tehti kindlaks, et kõikide kannabinoidide kalibreerimisgraafikud on lineaarsed kogu valitud ulatuses, sest punktid olid graafikutel ebakorrapäraselt jaotunud (LISA 7.2; 8.2; 10.3; 10.4; 11.2; 13.2).

### **3.2.5 Kannabinoidide valideerimisparameetrid: avastamis- ja määramispiirkond**

#### ***$\Delta^9$ -THC, $\Delta^9$ -THCA ja CBN avastamis- ja määramispiirkonnad***

$\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA ja CBN avastamis- ja määramispiirkondade arvutamisel kasutati null-proovi korduvmõõtmiste standardhälbe meetodit (LISA 5), sealjuures LoD ja LoQ arvutati välja madala analüüdi sisaldusega null-proovi analüüsides korduvuse tingimisel. Madal analüüdi sisaldus null-proovis oli juhuslik aine sisaldus, mis oli kahe suure kontsentratsiooniga proovi vahel analüüsitud null-proovi koostises ehk üle kantud ühest proovist null-proovi. LoD ja LoQ määramisel kasutati  $\Delta^9$ -THC puhul 22,  $\Delta^9$ -THCA puhul 16 ning CBN puhul 4 null-proovi tulemusi. CBN puhul LoD ja LoQ hindamisel kasutatud 4 proovi peeti piisavaks, sest tegelik määramispiirkond oli kõrgem kui teoreetiliselt arvatud LoQ väärtus. Tulemused olid järgmised:

- $\Delta^9$ -THC: LoD=0.002%; LoQ=0.005%
- $\Delta^9$ -THCA: LoD=0.0035%; LoQ=0.0070%
- CBN: LoD=0.002%; LoQ=0.006%

$\Delta^9$ -THC ja CBN puhul valiti eksperimentaalsete tulemuste põhjal LoQ ning see oli vastavalt 0.04% ja 0.0098%.  $\Delta^9$ -THCA puhul valiti eksperimentaalseid tulemusi arvestades teoreetiline LoQ väärtus 0.0070%.

#### ***CBD ja CBDA avastamis- ja määramispiirkonnad***

CBD ja CBDA avastamis- ja määramispiirkondade arvutamisel kasutati regressioonisirge 95% usalduspiiride meetodit (LISA 5). CBD puhul koostati kaks erinevat kalibreerimisgraafikut ning mõlemale määrati erinevad LoD ja LoQ väärtused. Tulemused olid järgmised:

- CBD väga madalatel kontsentratsioonidel: LoD=0.0046%; LoQ=0.0113%
- CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel: LoD=0.0514%; LoQ=0.1593%
- CBDA: LoD=0.1333%; LoQ=0.3409%

Metoodika tegelikud määramispiirkonnad otsustati eksperimentaalsetele tulemustele lähtudes ning need saadi vastavalt 0.0195%, 0.16% ja 0.3125%.

### **3.2.6 Kannabinoidide valideerimisparameetrid: kordustäpsus, tõesus, saagis**

Kannabinoidide kordustäpsuse, tõesuse ja saagise arvutamisel võeti arvesse kõiki punkte tööalas. Kuna  $\Delta^9$ -THCA piigid ei olnud iga analüüsi ajal sümmeetrilised, siis võeti arvesse vaid need tulemused, kus piigid olid sümmeetrilised, mistõttu ei ole ka korratavus väga esinduslik. Lisaks oli töö lõpus masin katki, mistõttu happed andsid tavapäraselt madalamaid piike positiivses ESI režiimis. Ka neid proove ei saanud tulemustes arvestada.

Käesolevas töös analüüsitud kannabinooidide keskmised korduvused jäid 2.47-5.44%, keskmised korratavused jäid 4.46-7.5%, korduvuse piir jäi 6.85-15.08% ja korratavuse piir jäi 12.26-20.79% vahele (Tabel 5). Vaid  $\Delta^9$ -THC ühe päeva ühe kontsentratsiooni korduvuse tulemus jäi piiridest välja (päev: 6.10; konts.: 0.06%; korduvus: 7.36%), ülejäänud korduvuse ja korratavuse tulemused jäid korduvuse ja korratavuse piiridesse. Individuaalsed korduvused ja korratavused päevade ja kontsentratsioonide lõikes on välja toodud töö LISADES:  $\Delta^9$ -THC: (LISA 7.3),  $\Delta^9$ -THCA: (LISA 8.8), CBD väga madalatel kontsentratsioonidel: (LISA 10.5), CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel: (LISA 10.6), CBDA: (LISA 11.3), CBN: (LISA 13.3).

**Tabel 5. Kannabinooidide keskmised korduvused, korratavused ja nende piirid. Lisaks on tabelis ära toodud tööalas kasutatavate proovide arv, lineaarne ala ning tõesus.**

Aine	Proovide arv	Tööala	Lineaarne ala	Korduvus (%)	Korduvuse piir (%)	Korratavus (%)	Korratavuse piir (%)	Tõesus (%)
$\Delta^9$ -THC	87	0.005-2.5%	0.04-2.5%	2.47	6.85	4.46	12.26	103.71
$\Delta^9$ -THCA	32	0.002-0.5%	0.005-0.5%	5.44	15.08	7.5	20.79	101.49
CBD (1)*	72	0.002-0.6%	0.0195-0.625%	3.53	9.78	4.74	13.14	97.93
CBD (2)**	93	0.002-20%	0.16-20%	2.98	8.26	4.65	12.89	101.04
CBDA	50	0.156-20%	0.32-20%	3.13	8.68	5.64	15.63	100.88
CBN	67	0.002-0.625%	0.0098-0.625%	3.66	10.15	6.11	16.94	104.65

\* CBD väga madalatel kontsentratsioonidel

\*\* CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel

Tõesus arvutati iga kontsentratsiooni jaoks eraldi (Tabel 5):

- $\Delta^9$ -THC keskmine tõesus kontsentratsioonidele 0.04%-2.5% oli 103.71% (LISA 7.4). Kuna 0.04%-st väiksematel kontsentratsioonidel oli tõesus alla 85%, siis võeti meetodika usaldusväärseks määramispiiriks 0.04%.
- $\Delta^9$ -THCA keskmine tõesus kontsentratsioonidele 0.005%-0.5% oli 101.49% (LISA 8.4). Kuna 0.005% on väiksem kui meetodika teoreetiline määramispiir, siis võeti meetodika määramispiiriks teoreetiline LoQ väärtus 0.0070%.
- CBD väga madalatel kontsentratsioonidel keskmine tõesus kontsentratsioonidele 0.0195%-0.625% oli 97.93% (LISA 10.7). Kuna 0.0195%-st väiksematel kontsentratsioonidel oli tõesus alla 85% ning teoreetiline LoQ väärtus on 0.0113%, siis võeti meetodika usaldusväärseks määramispiiriks 0.0195%.
- CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel keskmine tõesus kontsentratsioonidele 0.16%-20% oli 101.04% (LISA 10.8). Kuna 0.16%-st väiksematel kontsentratsioonidel oli tõesus alla 85% ja teoreetiline LoQ väärtus on 0.1593%, siis võeti meetodika usaldusväärseks määramispiiriks 0.16%.
- CBDA keskmine tõesus kontsentratsioonidele 0.32%-20% oli 100.88% (LISA 11.4). 0.16%-st väiksemad kontsentratsioonid ei olnud enam lineaarses sõltuvuses. Otsustati jätta meetodika avastamispiir teoreetiliselt arvutatud LoD väärtusega võrdseks – 0.1333%. Meetodika määramispiiriks otsustati jätta mõõdetud tulemustest lähtudes 0.3125%.
- CBN keskmine tõesus kontsentratsioonidele 0.0098%-0.625% oli 104.65% (LISA 13.4). Kuna 0.0098%-st väiksematel kontsentratsioonidel oli tõesus alla 85%, siis võeti meetodika usaldusväärseks määramispiiriks 0.0098%.

Alla LoQ väärtuse kontsentratsioonidel võib anda kvalitatiivset hinnangut, kui see jääb LoD piiridesse. Välja arvatud CBD madalatel ja keskmistel kontsentratsioonide puhul - alla 0.16% kontsentratsioonidel võib anda kvalitatiivset hinnangut ning soovi korral ka kvantitatiivset

hinnangut kasutades CBD väga madalatel kontsentratsioonidel kalibreerimisgraafikut, kui see mahub LoQ piiridesse

Saagise hälve (*bias*) määrati kasutades akrediteeritud ja sõltumatu meetodika andmeid. Kuna antud meetodika hõlmas GC meetodit, mis arvestab  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA (kogu THC) ning CBD ja CBDA (kogu CBD) kokku, arvutati saagise hälve (*bias*) nende kannabinooidide puhul kokku (3.2.9).

Kuna CBN sisaldub reaalses proovides väga minimaalselt või puudub üldse, siis saagise hälvet (*bias*) ei olnud võimalik CBN puhul välja arvutada käesoleva meetodikaga analüüsitud proovide lõikes. (LISA 14) CBN saagise hälve (*bias*) tuleb edaspidi arvutada rohkemate proovidega analüüse tehes või tuleb kasutada spaikimise meetodit.

### **3.2.7 Kannabinooidide valideerimisparameetrid: robustsus**

Robustsust hinnati kalibreerimisproovide analüüsimise käigus. Kalibreerimislahuseid valmistati poole aasta jooksul, mis tähendas et proovide valmistamise ja analüüsimise käigus muutus õhurõhk, toatemperatuur, õhuniiskus. Lisaks valmistati proove erinevatel hoiustamistingimustel – kord valmistati neid nii, et proovid olid tundide viisi toatemperatuuril ning seejärel pandi otse analüüsima, siis jälle valmistati neid nii, et proovid viidi kohe peale ettevalmistust sügavkülma ning eemaldati sealt järgmisel päeval või vahe peal isegi mitmete kuude tagant ning viidi analüüsima. Sellega seoses olid proovid väga erineva aja ka valguse käes.

Lisaks proovide ettevalmistamise protseduurile seisnes robustsuse analüüs ka selles, et LC-MS/MS masina MS-i peenhäälestati (*autotune*) väga erinevalt – mõnikord oli masina MS peenhäälestamata üle kuu aja, mõnikord tehti MS-i peenhäälestus vahetult enne analüüsi. Ka masina rõhk kõikus erinevatel päevadel 380-470 bari vahel, mis näitab ka robustsust.

Kogu eelnev informatsioon kajastub proovide tõesuse hindamises võrreldes referentsmaterjalidega (LISA 6). See on nähtav LISADES (LISA 7.4; LISA 8.4; LISA 10.7; LISA 10.8; LISA 11.4; LISA 13.4).

$\Delta^9$ -THCA puhul tuleb eraldi välja tuua, et meetodika ei olnud selles mõttes robustne  $\Delta^9$ -THCA puhul, et iga kord ei tulnud sümmeetrilised, Gaussi kõverat meenutavad piigid. Samas kui oli selline olukord, siis pärast masina MS-ile peenhäälestuse tegemist olid piigid jälle sümmeetrilised.

### **3.2.8 Kannabinooidide valideerimisparameetrid: mõõtemääramatus**

Mõõtemääramatus arvutati NordTest meetodil. Kuna päris proove analüüsiti vaid ühel päeval, siis võeti aluseks kõik tööalas olevad kalibreerimisproovid. Mõõtemääramatus arvutati iga kontsentratsiooni jaoks eraldi.

#### ***$\Delta^9$ -THC ja $\Delta^9$ -THCA mõõtemääramatus***

Kõige kõrgema mõõtemääramatusega olid  $\Delta^9$ -THC puhul kontsentratsioonid 0.1% ja 0.2% ning  $\Delta^9$ -THCA puhul 0.005%-0.039%. See on tingitud sellest, et just nendel kontsentratsioonidel oli proovide arv kõige suurem ehk valim oli kõige esinduslikum (LISA 7.4; LISA 8.4). Kogu  $\Delta^9$ -THC mõõtemääramatus meetodikal hinnati üheseks igal kontsentratsioonil ning see määrati olema 28%



mõõtetulemusest.  $\Delta^9$ -THCA üldine mõõtemääramatus jagati kaheks: kontsentratsioonidel 0.005%-0.039% on mõõtemääramatus 37%, kontsentratsioonidel 0.04%-0.5% on mõõtemääramatus 21%. Individuaalsed mõõtemääramatused  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA igale kontsentratsioonile on näidatud LISADES (LISA 7.5; LISA 8.5).

### ***CBD mõõtemääramatus***

CBD väga madalatel kontsentratsioonidel kõige kõrgema mõõtemääramatusega olid kontsentratsioonid 0.1%, 0.5% ja 0.63%. Kaks esimest kontsentratsiooni neist omasid kõige suuremat kalibreerimisproovide arvu (LISA 10.7) ning seetõttu võeti nad aluseks kogu CBD väga madalatel kontsentratsioonidel mõõtemääramatuse hindamisel. Mõõtemääramatuseks võeti 26%. CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel kõige kõrgema mõõtemääramatusega olid kontsentratsioonid 0.2%, 0.6% ja 10%. Kuna proovide arv oli esinduslik kogu tööalas (LISA 10.8), siis võeti mõõtemääramatuseks 30%. Individuaalsed mõõtemääramatused igale kontsentratsioonile on näidatud LISADES (LISA 10.9; LISA 10.10).

### ***CBDA ja CBN mõõtemääramatus***

Kõige kõrgema mõõtemääramatusega olid CBDA kontsentratsioonid 0.3125%, 5% ja 10%, CBN puhul olid selleks kontsentratsioonid 0.0195%, 0.039%, 0.08% ja 0.16%. CBDA üldiseks mõõtemääramatuseks võeti 33%, CBN puhul 37%. Individuaalsed mõõtemääramatused igale kontsentratsioonile on näidatud LISADES (LISA 11.5; LISA 13.5).

## **3.2.9 Metoodika rakendamine reaalse proovi analüüsimiseks**

Metoodika valideerimise käigus analüüsiti 33 erinevat reaalselt proovi, millest 16 olid taimne puru, 4 olid CBD õli tooted, 4 olid vaigulaadsed tooted, 5 olid vedelikud ja 4 olid šokolaadid. 31 proovi olid varasemalt analüüsitud akrediteeritud ja sõltumatu GC metoodikaga. Kuna GC metoodikaga määratakse kogu THC ( $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA) ning kogu CBD (CBD ja CBDA) kokku, siis arvestati käesoleva metoodika raames samuti paariliste mõõtmistulemused kokku (LISA 9; LISA 11).

### ***Kogu THC määramine***

#### ***Taimne puru***

Taimse puru proovidest (16 proovi) üks oli 2021 aasta proov, 11 olid 2020 aasta proovid ning 4 olid 2019 aasta proovid. 6 taimse puru proovi tulemust olid alla  $\Delta^9$ -THC määramispiiri, millest 2 olid ka alla  $\Delta^9$ -THCA määramispiiri. Kõik alla määramispiiri proovid oli aastast 2020. Sellegi poolest ei ole aastaarvul siinkohal muud rolli kui see, et antud proovid olid kõik tööstusliku kanepi proovid ning nad pididki olema väga väikese THC sisaldusega. Ülejäänud viis 2020 aasta proovi mahtusid  $\Delta^9$ -THC ja  $\Delta^9$ -THCA määramispiirkondadesse. Nende viie proovi mõõdetud tulemused käesoleva metoodikaga mahtusid GC metoodikaga mõõdetud tulemuse veamääradesse. Sealjuures keskmiselt oli saagise hälve (*bias*) kõikumine 0.4%, kuid kui arvestada saagiste absoluutväärtusi, siis oli saagise hälve (*bias*) keskmiselt 8.8%. Ka 2021 aasta proov mahtus GC metoodika veamääradesse saades saagise hälbeks (*bias*) -13.3% (LISA 9).

2019 aasta proovide käesoleva meetodikaga mõõdetud tulemused olid kõik 34-47% madalamad (LISA 9). Tuginedes Ross et al. poolt välja THC degradeerumise määradele (1.1.3: *CBN tüüpi kannabinoidid*), arutati välja 2019 proovide THC teoreetiline väärtus aastal 2021 (Tabel 6). Selgus, et neli taimse puru proovi vastasid antud teooriale, vaid ühe proovi (proov 14) teoreetilised tulemused jäid kõrgemaks kui käesoleva meetodiga mõõdetud tulemus. Siiski, kui vaadata käesoleva meetodika veamääraga tulemust (LISA 9), jääb ka proov 14 teoreetiline väärtus aastal 2021 vastavusse käesoleva meetodikaga mõõdetud tulemusega. Kuna tegemist on teoreetiliste tulemustega ning taoliste arvutuslike tulemuste avaldamine ei ole kohtuekspertiisis pädev, siis saagist 2019 proovidel ei võetud arvesse.

**Tabel 6. Teoreetiline kogu THC degradeerumise tabel.** Tabelis on välja toodud 2019 ja 2021 mõõdetud proovide tulemused ja 2019 THC proovide teoreetilised degradeerumise määrad aastaks 2021. Tabelis on arvatud välja ka 2019 proovide THC teoreetilised väärtused aastal 2021.

Proovi kirjeldus		Mõõdetud tulemused		Teoreetiline degradeerumine - tulemused			
Proov	Proovi kirjeldus	THC 2019 mõõdetud tulemus GC	THC 2021 mõõdetud tulemus LC-MS/MS	2019 THC teoreetiline degradeerumise määr aastaks 2021 (34.5%)	THC teoreetiline väärtus aastal 2021	THC teoreetilise väärtuse aastal 2021 alumine veamäär (42.1%)	THC teoreetilise väärtuse aastal 2021 ülemine veamäär (29.6%)
12	puru	0.69	0.46	0.24	0.45	0.40	0.50
13	puru	0.54	0.31	0.19	0.35	0.31	0.39
14	puru	0.53	0.28	0.18	0.35	0.31	0.39
15	puru	0.26	0.16	0.09	0.17	0.15	0.19
23	vaik	0.11	0.07	0.04	0.07	0.06	0.08
24	vaik	0.13	0.07	0.04	0.09	0.08	0.10
29	vedelik etanoolis	1.90	1.15	0.66	1.24	1.10	1.39
	<b>ÜHIK:</b>	%	%	%	%	%	%

### **CBD õli tooted**

CBD õli toodete proovidest kaks (proovid 19, 20) olid 2021 aasta omad ning kaks (proovid 17, 18) olid 2020 omad. Vastavalt GC meetodikale, proovid 17 ja 18 ei sisaldanud THC-d. Käesoleva meetodikaga mõõdetud kogu THC väärtus oli samuti alla määramispiiri (LISA 9).

Proove 19 ja 20 ei olnud mõõdetud GC meetodikaga ning neid tulemusi ei saa võrrelda, mistõttu ei saa ka saagise hälvet (*bias*) arvutada. Sellegi poolest on teada, et toote informatsioonisedelitel on kirjas, et sisaldab THC-d alla 0.2%. Käesoleva meetodikaga mõõdetud tulemused jäävad proov 19 puhul 0.13-0.24% ja proov 20 puhul 0.14-0.25% vahele (LISA 9). Kindlasti tuleks tulevikus analüüsida neid proove ka GC meetodikaga.

### **Vaigulaadsed tooted**

Vaigulaadsete toodete proovides kaks (proov 21, 22) olid 2020 aasta omad ning kaks (proov 23, 24) olid 2019 aasta omad. Mõlemad 2020 aasta proovid jäid  $\Delta^9$ -THC määramispiiridest alla poole, mistõttu neid tulemusi arvestada ei saa. Mõlemad 2019 aasta proovid olid 40-47% madalamad, kui GC meetodikaga mõõdetud tulemused (LISA 9). Tabelis 7 välja toodud THC degradeerumise määradele vastavalt oli proov 23 teoreetiline väärtus aastal 2021 vastavuses käesoleva meetodikaga mõõdetud tulemusele. Proov 24 teoreetiline väärtus aastal 2021 oli kõrgemal kui mõõdetud tulemus, kuid kui vaadata käesoleva meetodika veamääraga tulemust (LISA 9), jääb ka proov 24 teoreetiline väärtus aastal 2021 vastavusse käesoleva meetodikaga mõõdetud tulemusega (Tabel

6). Kuna tegemist on teoreetiliste tulemustega ning taoliste arvutuslike tulemuste avaldamine ei ole kohtuekspertiisis pädev, siis saagise hälvet 2019 proovidel ei võetud arvesse.

### **Vedelikud**

Vedelike proovidest üks oli 2021 aasta proov, kaks olid 2020 aasta proovid ning kaks olid 2019 aasta proovid.  $\Delta^9$ -THCA-d sai määrata vaid ühes proovis kõigist viiest, sest ülejäänud nelja tulemused jäid alla  $\Delta^9$ -THCA määramispiirkonda. Nendest kolm (proov 27, 28, 29) ei pidanudki vastavalt GC meetodikale sisaldama üldse THC-d, siiski kvalitatiivselt olid seal  $\Delta^9$ -THCA jäägid. Kvantitatiivselt ei tuvastanud käesolev meetodika proovides 27, 28, 29 ei  $\Delta^9$ -THC-d ega  $\Delta^9$ -THCA-d (LISA 9).

2021 aasta proov sisaldas vastavalt GC meetodikale 0.13-0.19% kogu THC-d. Käesoleva meetodikaga määrati proovis olema 0.06-0.1%  $\Delta^9$ -THC-d. See teeb keskmiseks saagise hälbeks (*bias*) 48%.  $\Delta^9$ -THCA-d ei määratud, sest see jäi alla määramispiiri (LISA 9). Kuna vedelikus olid sees ka tükid, siis võib käesoleva meetodikaga mõõdetud proovi madalam tulemus seisneda proovi mittehomoogeensuses või võisid antud tükid absorbeerida THC-d ning sellega seoses jõudis THC-d ekstraheerimislahusesse vähem.

Üks 2019 proovidest (proov 29) sisaldas GC meetodikaga mõõdetuna 1.9% THC-d (LISA 9). Tabelis 7 välja toodud THC degradeerumise määrale vastavalt oli proov 29 teoreetiline väärtus aastal 2021 vastavuses käesoleva meetodikaga mõõdetud tulemusele (Tabel 6). Kuna tegemist on teoreetilise tulemusega ning taoliste arvutuslike tulemuste avaldamine ei ole kohtuekspertiisis pädev, siis saagist antud proovi puhul ei võetud arvesse.

### **Šokolaadid**

Kõik šokolaadi proovid oli 2021 aasta omad. Neid analüüsiti käesoleva meetodika ja GC meetodikaga samaaegselt. Heleda ja tumeda šokolaadi tulemused jäid GC meetodika tulemustega vastavusse. Valge šokolaadi tulemus jäi samuti vastavusse, kuid jäi käesoleva meetodika ülemise veamäära piiride lähedale. Põhjus võib seisneda selles, et valge šokolaad on palju rasvasem ning omab suuremat maatriksefekti kui teised. Kõigi nelja šokolaadiproovi saagise hälbe (*bias*) kõikumine on keskmiselt -4.9%, kuid kui arvestada saagise hälbe (*bias*) absoluutväärtusi, siis on keskmine 12.2% (LISA 9).

### **Kogu CBD määramine**

#### **Taimse puru**

Taimse puru proovidest (16 proovi) üks oli 2021 aasta proov, 11 olid 2020 aasta proovid ning 4 olid 2019 aasta proovid (LISA 12).

9 taimse puru proovi tulemust olid alla CBDA ning üks alla CBD määramispiiri. Kõik alla CBDA määramispiiri proovid oli aastast 2020, alla CBD määramispiiri proov oli aastat 2021. Sellegi poolest ei ole aastaarvul siinkohal muud rolli kui see, et alla CBD LoQ olid kõik tööstusliku kanepi proovid ning nad pididki olema väga väikese kogu CBD sisaldusega. Proov, mille CBD väärtus oli alla määramispiiri, ei pidanudki sisaldama CBD-d vastavalt GC meetodikale, mis teeb ka saagise hälbe (*bias*) 0%. Kõikide 9 proovi, mille CBDA väärtus oli alla tema LoQ, teoreetiline kogu CBD sisaldus oli

alla 0.62%. Nende proovide saagise hälve jäi vahemikku -48.5% kuni 73.5%. Sai teha järelduse, et väga väikeste kogu CBD sisaldusega (0.2-0.62%) taimse puru proovides on CBD ja CBDA vaheline tendents selline: CBD ja CBDA sisaldus taimse puru proovides on võrdne või leidub ~65-75% CBDA-d rohkem kui CBD-d või vastupidi ~80-85% CBD-d rohkem kui CBDA-d (LISA 12).

Ülejäänud kuus taimse puru proovi mahtusid CBD ja CBDA määramispiirkondadesse. Nende kuue proovi mõõdetud tulemused käesoleva meetodikaga mahtusid GC meetodikaga mõõdetud tulemuse veamääradesse. Üks proov kuuest oli alla 1% ning selle mõõdetud tulemus käesoleva meetodikaga langes ülemise veamääraga GC meetodika usalduspiiridesse. Saagise hälbeks (*bias*) oli -21.7%. Ülejäänud viis taimse puru proovi kogu CBD sisaldus jäi vahemikku 6.4-15%. Sealjuures keskmiselt oli saagise hälbe (*bias*) kõikumine -0.5%, kuid kui arvestada saagiste absoluutväärtusi, siis oli saagis hälve (*bias*) keskmiselt 1.7%. Võib teha järelduse, et käesolev meetodika on täpne taimse puru kõrgete kogu CBD sisaldusega proovide määramisel (LISA 12).

### ***CBD õli tooted***

CBD õli toodete proovidest kaks (proovid 19, 20) olid 2021 aasta omad ning kaks (proovid 17, 18) olid 2020 omad. Proovide 17, 18 ja 20 CBDA mõõtetulemused jäid alla tema LoQ väärtust. Sellegi poolest selgus, et CBDA ei panusta suurelt kogu CBD sisaldusele õlide puhul, sest ka ilma CBDA tulemuseta saadi meetodika saagise hälbeks (*bias*) -9.6%. Tulemused olid madalamad, sest CBDA komponenti arvestada ei saanud, kuid piisavalt täpsed, et öelda, et käesolev meetodika on täpne CBD õlide kogu CBD sisaldusega proovide määramisel (LISA 12).

Proove 19 ja 20 ei olnud mõõdetud GC meetodikaga ning neid tulemusi ei saa võrrelda, mistõttu ei saa ka saagise hälvet (*bias*) arvutada. Sellegi poolest on teada, et toote informatsioonisedelitel on kirjas, et proov 19 sisaldab CBD-d 5% ja proov 20 sisaldab CBD-d 10%. Käesoleva meetodikaga mõõdetud tulemused jäävad proov 19 puhul 4.94-9.34% (keskm. 7.14%) ja proov 20 puhul 6.36-11.81% (keskm. 9.08%) vahele (LISA 12).

Kindlasti tuleks tulevikus analüüsida neid proove ka GC meetodikaga.

### ***Vaigulaadsed tooted***

Vaigulaadsete toodete neljast proovist kolm jäid alla CBDA määramispiirkonda. Sellegi poolest selgus, et kõrgetel kogu CBD sisaldustel (8.6-69%) ei panusta CBDA suurelt kogu CBD sisaldusele vaigulaadsete toodete puhul, sest ka ilma CBDA tulemuseta saadi meetodika saagise hälbeks (*bias*) -4.5% (LISA 12).

Alla 2% kogu CBD sisaldusega proovides panustas CBDA kas vähem kui võrdselt CBD-ga kogu CBD sisaldusse. Proov 23, mille CBDA sisaldus jäi alla LoQ väärtuse, sisaldas enamasti (~85%) CBD-d, selle proovi saagise hälbeks (*bias*) ilma CBDA tulemusteta oli -15.9%. Proov 24, mille CBDA sisaldus oli üle LoQ väärtuse, sisaldas CBD-d ja CBDA-d enam vähem võrdselt. Selle proovi saagise hälve (*bias*) oli 7.0% (LISA 12).

### **Vedelikud**

Vedelike proovide puhul jäid samuti viiest neli proovi alla CBDA määramispiirkonda. Sellegi poolest selgus, et CBDA ei panusta kogu CBD sisaldusse vedelike puhul suurelt. CBDA sisaldus vedelike proovides jäi ~3-15% juurde. Tänu sellele sai arvutada ka käesoleva meetodika saagise hälbe (*bias*): keskmine saagise hälve (*bias*) vedelike proovidel, kus CBDA-d arvestada ei saa, oli -6.8%; vedeliku proovi saagise hälve (*bias*), kus CBDA-d saab arvestada, oli -14.3% (LISA 12).

### **Šokolaadid**

Šokolaadi proovide GC meetodikaga arvatud tulemus ei ole teada. Kõik neli proovi jäid CBDA määramispiirkonnast alla poole. Ühe proovi puhul jäi ka CBD tulemus alla tema määramispiirkonda. Siiski kuna GC meetodika tulemusi ei ole, ei saa saagise hälvet (*bias*) välja arvutada (LISA 12).

## 4 Arutelu ja järeldused

### 4.1.1 Metoodika parameetrid

Üldised metoodika parameetrid on järgmised: süstekogus 1 µl; proovivõtu ja süstimise kiirus 200 µl/min; eluendi liikumiskiirus 0.400 ml/min; stopp-aeg 12min; kolonni temperatuur 50°C. Nõela pesuks kasutati isopropanooli, null-prooviks H<sub>2</sub>O (5mM AF + 0.01% FA). Statsionaarne faas on Zobrax® Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HT 1.8µm (100 x 2.1 mm) koos eelkolonniga Agilent Zobrax® Eclipse Plus C18 1.8µm (3.0 x 5mm). Mobiilne faas on 60% H<sub>2</sub>O (5mM AF + 0.01% FA) 40% metanool, kasutatakse gradientelueerimist (3.2.2). MRM parameetrid on leitavad punktis 3.2.1.

Antud parameetrid olid ka enamasti kasutusel kirjandusest leitavates töödes (1.5.2). Ka proovide ettevalmistamise protokoll sarnanes kirjandusest leitavale proovide ettevalmistusviisile (1.5.3), tehti mõned muudatused toetudes oma ala ekspertide kogemusele ja nõuannetele (3.1.7).

### 4.1.2 Metoodika kokkuvõtlikud valideerimistulemused

Metoodikaga valideeritud analüütide avastamispiirid jäid 0.002% ja 0.1333% vahele, määramispiirid jäid 0.007% ja 0.3409% vahele. Korduvused jäid 2.47% ja 5.44% vahele, korratavused 4.46% ja 6.11% vahele. Tõesused jäid 97.93% ja 104.65% vahele. Kuna nii korduvus ja korratavuse parameetrid on üsna madalad, võib üldiselt pidada metoodika antud parameetreid rahuldavaks. Lisaks kuna tõesus kõigub 5% ümber täiuslikust 100% väärtusest, siis võib metoodika tõesust pidada samuti rahuldavaks. Metoodika mõõtemääramatused jäid 21% ja 37% vahele. Kuna kannabinoide määramisel ongi üldiselt taolised mõõtemääramatused tuginedes nii kirjandusele kui ka oma ala ekspertide kogemustele, siis võib ka neid tulemusi pidada rahuldavaks metoodika valideerimisel. Metoodika valideerimistulemused on vaadeldavad tabelis Tabel 7.

Tabel 7. Metoodika kokkuvõtlikud valideerimistulemused.

Aine	ESI režiim	Lineaarne ala	LoD (%)	LoQ (%)	Korduvus (%)	Korratavus (%)	Tõesus (%)	Mõõtemääramatus
Δ9-THC	+	0.04-2.5%	0.002	0.04	2.47	4.46	103.71	28%
Δ9-THCA	+	0.005-0.5%	0.0035	0.007	5.44	7.5	101.49	0.005-0.039%: 37%; (0.04-0.5%): 21%
CBD (1)*	-	0.0195-0.625%	0.0046	0.0195	3.53	4.74	97.93	26%
CBD (2)**	-	0.16-20%	0.0514	0.16	2.98	4.65	101.04	30%
CBDA	-	0.32-20%	0.1333	0.3409	3.13	5.64	100.88	33%
CBN	+	0.0098-0.625%	0.002	0.0098	3.66	6.11	104.65	37%

\* CBD väga madalatel kontsentratsioonidel

\*\* CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel

Saagise hälvet (*bias*) ei arvestata arvuliselt lõpptulemusse, kuna see arvutati teoreetilise tulemuse ja käesoleva metoodikaga mõõdetud tulemuse keskväärtuste abil. Kui võtta arvesse ka mõlema metoodika veamäärad, siis võib hinnata, et saagise hälve (*bias*) oli rahuldav, kuna kui käesoleva metoodikaga mõõdetud tulemusi oli võimalik arvestada (oli üle LoQ piiri), siis sai hinnata tulemused teoreetiliste tulemustega võrdelisteks. Üldiselt on kirjanduses määratud saagis spaikimise teel, kuid antud töö puhul otsustati seda mitte teha nii materjali kokkuhoiu mõttes, proovide iseloomu arvestades kui ka oma ala ekspertide kogemusele tuginedes.

Üldiselt ei täheldatud maatriksefekte ning proovide ekstraheerimisprotsess oli piisavalt lihtne ja robustne. Analüüsi 5 erinevat tüüpi reaalseid proove ning kõikide tulemusi võib pidada rahuldavaks tulemuste suhtes.

Töö eesmärk sai osaliselt täidetud. Metoodika osalise valideerimise käigus selgus, et metoodikaga saab kvalitatiivselt ja ka kvantitatiivselt määrata kannabinoidide  $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD ja CBDA. Kannabinoidile CBN antakse vaid kvalitatiivset hinnangut, sest reaalsete proovide arv oli liiga väike. Kui soovitakse rohkem täpsust, siis tuleks täiustada  $\Delta^9$ -THCA tulemusi. Kuna analüüsi käigus  $\Delta^9$ -THCA tulemused kõikisid piikide sümmeerialt piisavalt palju, siis tuleks tulevikus proovida  $\Delta^9$ -THCA puhul kasutada muud statsionaarset faasi. Antud töö käigus rõhuti lihtsusele ning seega sooviti analüüsida kõik ühe ja sama kolonniga.

## Kokkuvõte

Käesoleva magistritöö eesmärk oli välja töötada, optimeerida ja osaliselt valideerida meetodika kannabinooidide ( $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD, CBDA, CBN) kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks vedelikkromatograafia ja tandem-massispektromeetria abil ning mitme reaktsiooni seire režiimis. Eesmärk täideti osaliselt, sest CBN-i valideerimistulemustele lähtudes määratakse seda ainult kvalitatiivselt. Kõikide teiste kannabinooidide ( $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD, CBDA) suhtes sai töö eesmärk saavutatud.

Metoodika väljatöötamisel lähtuti sellest, et tulevikus saaks seda võimalikult hõlpsasti ka rakendada. See tähendas, et meetodika loodi kõikide uuritavate kannabinooidide suhtes ühene – kõikide kannabinooidide suhtes kasutati samu LC-MS/MS parameetreid koos samade statsionaarse ja mobiilse faasiga. Osadele kannabinooididele oleks paremini sobinud muud optimeerimise parameetrid, kuid sellisel juhul oleks tulevikus meetodika rakendamine olnud keerukam.

Üldised meetodika parameetrid on järgnevad: süstekogus 1  $\mu$ l; proovivõtu ja süstamise kiirus 200  $\mu$ l/min; eluendi liikumiskiirus 0.400 ml/min; stopp-aeg 12min; kolonni temperatuur 50°C. Nõela pesuks kasutatakse isopropanooli, null-prooviks H<sub>2</sub>O (5mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> + 0.01% sipelghape). Statsionaarne faas on Zobrax® Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HT 1.8  $\mu$ m (100 x 2.1 mm) koos eelkolonniga Agilent Zobrax® Eclipse Plus C18 1.8 $\mu$ m (3.0 x 5mm). Mobiilne faas on 60% H<sub>2</sub>O (5mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> + 0.01% FA) 40% metanool.

Metoodikaga valideeritud analüütide avastamispiirid jäid 0.002% ja 0.1333% vahele, määramispiirid jäid 0.007% ja 0.3409% vahele. Korduvused jäid 2.47% ja 5.44% vahele, korratavused 4.46% ja 6.11% vahele. Tõesused jäid 97.93% ja 104.65% vahele. Metoodika mõõtemääramatused jäid 21% ja 37% vahele. Kõiki eelnimetatud valideerimisparameetreid peeti rahuldavaks meetodika väljatöötamisel ning piisavaks, et tulevikus meetodikat ka rakendada.

Tulevikus, kui soovitakse välja arendada veel täpsemat meetodikat, siis tuleks kasutada  $\Delta^9$ -THCA ja CBDA puhul muud statsionaarset ja/või mobiilset faasi. Statsionaarse faasi puhul oli käesoleva meetodikaga kasutatav C18 1.8  $\mu$ m (100 x 2.1 mm) kolonn antud analüütidele kõige parem, võib proovida optimeerimist muude kolonnidega, mis antud meetodika optimeerimise käigus ei kasutatud. Mobiilse faasi puhul oli ka antud meetodika optimeerimise käigus parem hapetele atsetonitriili segu veega, kuid otsustati ülejäänud analüütide kontekstis siiski kasutada metanooli ja vee segu. Soovi korral võib asendada metanooli siis atsetonitriiliga. Samuti väljatöötatud meetodika vajab täiendamist ka valideerimise osas, edaspidi plaanitakse uurida meetodika robustsus läbi mitmete robustsuse näitajate parameetreid.

Kokkuvõttes loodi töö käigus rakendatav meetodika kannabinooidide määramiseks.



## Abstract

The aim of this Master's thesis was to develop, optimize and partially validate a qualitative and quantitative method to analyse cannabinoids ( $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD, CBDA, CBN) using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and multiple reaction monitoring (MRM). The aims were fulfilled partially as the validation results for CBN were incomplete. For CBN only qualitative method was developed. The aims for all the other cannabinoids ( $\Delta^9$ -THC,  $\Delta^9$ -THCA, CBD, CBDA) were fulfilled completely.

The purpose of the method development was to be able to use it in the future in forensic expertise. Therefore, it was essential to develop a method that was easy to use and was as robust as possible. The method was developed so it all the cannabinoids could be analysed at the same time with the same LC-MS/MS optimized parameters. For some of the cannabinoids other optimized parameters would have worked better, but it would have been more complicated method to use.

Overall method parameters were as follows: injection volume 1  $\mu$ l; sampler's draw and eject speed 200  $\mu$ l/min; solvent's flow rate 0.400 ml/min; stop-time 12 min; temperature of the column 50°C. For needle was isopropanol was used, for blank H<sub>2</sub>O (5mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> + 0.01% formic acid) was used. The stationary phase was Zobrax® Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HT 1.8  $\mu$ m (100 x 2.1 mm) with precolumn Agilent Zobrax® Eclipse Plus C18 1.8 $\mu$ m (3.0 x 5mm). Mobile phase was 60% H<sub>2</sub>O (5mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> + 0.01% formic acid) 40% methanol.

The method validation results were as follows: the limits of detection were measured between 0.002% and 0.1333%, the limits of quantitation were measured between 0.007% and 0.3409%. The repeatabilities were measured between 2.47% and 5.44%, the reproducibilities were measured between 4.46% and 6.11%. The accuracies were measured between 97.93% and 104.65%. The measures of uncertainties were between 21% and 37%. All the validation parameters were considered satisfying enough so that the method can be used in the forensic expertise.

In the future, one may further develop the method to gain more accurate results for acids  $\Delta^9$ -THCA and CBDA. One can try to optimize LC-MS/MS parameters, especially stationary and mobile phases. In this thesis four different columns were used and the one that was selected for stationary phase, this was the best for all of the cannabinoids. One can try to use other than the four tested columns to gain better results. In addition, during the mobile phase optimization, it was seen that acetonitrile with water was better solvent for  $\Delta^9$ -THCA than methanol with water. Methanol was used in the present method, because it was better for all of the other cannabinoids. All in all, the other optimized parameters can make the method more accurate, but the usage of the method can be more complicated after the optimization. Author of the thesis suggest that in the further validation process more parameters should be used to make the method more robust and accurate.

In conclusion a method was successfully developed for analysis of cannabinoids for forensic expertise.

## Tänuavaldus

Töö autor soovib tänada Eesti Kohtuekspertiisi Instituuti (EKEI), et võimaldasite antud magistritööd teie asutuses teha. Lisaks soovib autor tänada oma EKEI juhendajaid Aime Riikoja ning Tarmo Barndõki, et olite alati töö autori kõrval ning aitasite, kui vajadust oli. Lisaks soovib töö autor tänada EKEI töötajaid, kellega ta kokku puutus – kogu kollektiiv on väga meeldiv ning olid väga toetavad kõikides küsimustes. Töö autor soovib tänada ka oma Tallinna Tehnikaülikooli juhendajat Maria Kuhtinskajat, et olite kannatlik ning mõistev töö valmimisel. Töö autor soovib tänada ka oma perekonda ja lähikondseid, et nad alati toeks on ning on alati aidanud õppimisel, kui on vajadus olnud.

## Kasutatud kirjanduse loetelu

- [1] S. Bonini, M. Premoli, S. Tambaro, A. Kumar, G. Maccarinelli, M. Memo and A. Mastinu, "Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 227, lk. 300-315, 2018.
- [2] H. Aaspõllu, "Hulgaliselt tekkinud kanepipoode riigil takistada plaanis ei ole," *ERR: Majandus*, 06.08.2019.
- [3] L. C. Anderson, "Leaf Variation Among Cannabis Species From A Controlled Garden," *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, vol. 28, nr. 1, lk. 61-69, 1980.
- [4] G. W. Guy, J. McPartland, "Models of Cannabis Taxonomy, Cultural Bias, and Conflicts between Scientific and Vernacular Names," *The Botanical Review*, vol. 83, lk. 327-381, 2017.
- [5] E. S. John, M. McPartland, "A classification of endangered high-THC cannabis (*Cannabis sativa* subsp. *indica*) domesticates and their wild relatives," *PhytoKeys*, vol. 144, lk. 81-112, 2020.
- [6] J. M. McPartland, "Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species," *Cannabis and Cannabinoid Research*, vol. 3, nr. 1, lk. 203-212, 2018.
- [7] G. Micalizzi, F. Vento, F. Alibrando, D. Donnarumma, P. Dugo, L. Mondello, "Cannabis Sativa L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization," *Journal of Chromatography A*, vol. 1637, nr. 461864, 2021.
- [8] E. Small, "Evolution and Classification of Cannabis sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization," *The Botanical Review*, vol. 81, lk. 189-294, 2015.
- [9] B. F. Thomas and M. A. ElSohly, *The Analytical Chemistry of Cannabis*, Elsevier; RTI Press, 2016.
- [10] T. Kukk, Ü. Sillasoo, "Kanepi ajalugu ja tänapäev," *Eesti Loodus*, vol. 10, 2003.
- [11] Perfect Plant, "Perfect Plant," 2019. [veeb].  
URL: <https://www.perfectplant.ee/kanepi-fusioloogia>. [Loetud 19.04.2021].
- [12] C. E. Turner, M. A. Elsohly, E. G. Boeren, "Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A Review of the Natural Constituents," *Journal of Natural Products*, vol. 43, nr. 2, lk. 169-234, 1980.
- [13] V. R. L. J. Bloemendal, J. C. M. van Hest and F. P. J. T. Rutjes, "Synthetic pathways to tetrahydrocannabinol (THC): an overview," *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 18, lk. 3203-3215, 2020.
- [14] L. O. Hanuš, S. M. Meyer, E. Muñoz, O. Tagliatela-Scafati and G. Appendino, "Phytocannabinoids: a unified critical inventory," *Natural Product Reports*, vol. 33, nr. 12, lk. 1357-1392, 2016.
- [15] P. H. Reggio, "Endocannabinoid Binding to the Cannabinoid Receptors: What Is Known and What Remains Unknown," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 17, nr. 14, 2010.
- [16] J. M. McPartland, C. MacDonald, M. Young, P. S. Grant, D. P. Furkert and M. Glass, "Affinity and Efficacy Studies of Tetrahydrocannabinolic Acid A at Cannabinoid Receptor Types One and Two," *Cannabis and Cannabinoid Research*, vol. 2, nr. 1, lk. 87-95, 2017.
- [17] P. Golombek, M. Müller, I. Barthlott and D. W. Lachenmeier, "Conversion of Cannabidiol (CBD) into Psychotropic Cannabinoids Including Tetrahydrocannabinol (THC): A Controversy in the Scientific Literature," *Toxics*, vol. 8, nr. 2, lk. 41, 2020.
- [18] B. K. Logan, "Cannabinoid Quantitation in Plants and Beyond: Liquids, Oils, Vape Cartridges, and Edibles," in *NMS Labs, USA*, 2020.
- [19] Hazekamp, A, "Chemistry of Cannabis," in *Comprehensive Natural Products II*, Elsevier, 2010, lk. 1033-1084.
- [20] I. Chousidis, T. Chatzimitakos, D. Leonardos, M. D. Filiou, C. D. Stalikas and I. D. Leonardos, "Cannabinol in the spotlight: Toxicometabolomic study and behavioral analysis of zebrafish embryos exposed to the unknown cannabinoid," *Chemosphere*, vol. 252, nr. 126417, 2020.
- [21] S. A. Ross and M. A. Elsohly, "CBN and D9-THC concentration ratio as an indicator of the age of stored marijuana samples," *United Nations Office on Drugs and Crime*, 1999.
- [22] Sotsiaalministri 18.mai 2005. määrus nr. 73, "Narkootiliste ja psühhotropsete ainete meditsiinilisel ja teaduslikul eesmärgil käitlemise ning sellealase arvestuse ja aruandluse tingimused ja kord ning narkootiliste ja psühhotropsete ainete nimekirjad" Lisa 1 NARKOOTILISTE JA PSÜHHOTROOPSETE AINETE," 18.05.2005. [veeb]. URL: [https://www.riigiteataja.ee/aktiilisa/1181/0201/6004/M73\\_lisa.pdf](https://www.riigiteataja.ee/aktiilisa/1181/0201/6004/M73_lisa.pdf). [Loetud 22.04.2021].
- [23] Tervise Arengu Instituut, "Narko.ee," [veeb].  
URL: <https://www.narko.ee/olukord-eesis/eesi-seadusandlus/>. [Loetud 22.04.2021].
- [24] M. P. Lazarjani, S. Torres, T. Hooker, C. Fowlie, O. Young and A. Seyfoddin, "Methods for quantification of cannabinoids: a narrative review," *Journal of Cannabis Research*, vol. 2, nr. 35, 2020.

- [25] AptoChem, "Aptochme home: Internal Standards," 2008. [veeb]. URL: <http://www.aptochem.com/t-bioanalysis.aspx>. [Loetud 01.05.2021].
- [26] M. Kuhtinskaja, "Füüsikaliste Analüüsimeetodite," loengute konspekt, *Tallinna Tehnikaülikool*, Tallinn, 2020.
- [27] Y. Zuo, High-performance liquid chromatography (HPLC): Principles, practices and procedures, UK: Nova Science Pub Inc, 2014.
- [28] D. Johnson, B. Boyes and R. Orlando, "The Use of Ammonium Formate as a Mobile-Phase Modifier for LC-MS/MS Analysis of Tryptic Digests," *Journal of Biomolecular Techniques*, vol. 24, nr. 4, lk. 187–197, 2013.
- [29] C. S. Ho, C. W. K. Lam, M. H. M. Chan, R. C. K. Cheung, L. K. Law, L. C. W. Lit, K. F. Ng, M. W. M. Suen and H. L. Tai, "Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications," *The Clinical Biochemist Reviews*, vol. 24, nr. 1, lk. 3-12, 2003.
- [30] Agilent Technologies, "Triggered MRM: Simultaneous Quantitation and Confirmation Using Agilent Triple Quadrupole LC/MS Systems," Technical Overview, 2013.
- [31] P. Stone, T. Glauner, F. Kuhlmann, T. Schlabach and K. Miller, "Agilent Technologies," Agilent Technologies USA, 30.06.2009. [veeb]. URL: [https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-3595en\\_lo%20CMS.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5990-3595en_lo%20CMS.pdf). [Loetud 25.05.2021].
- [32] T. Benton, "SlideServe.com," Agilent Technologies, 27.11.2014. [veeb]. URL: <https://www.slideserve.com/travis-benton/the-6420-triple-quad-lc-ms-system>. [Loetud 25.05.2021].
- [33] EMEA, "NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95)," in ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, London, 2006.
- [34] Waters Corporation, "A Guide to Analytical Method Validation," Waters Corporation, 2006.
- [35] M. Kulp, "Metrologia," loengute konspekt, *Tallinna Tehnikaülikool*, Tallinn, 2019.
- [36] D. A. Armbruster and T. Pry, "Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation," *The Clinical Biochemist Review*, vol. 29, nr. Supplement 1, lk. S49–S52, 2008.
- [37] EAL 2. Komitee, "EA-4/02: Mõõtemääramatuse väljendamine kalibreerimisel," 01.2003. [veeb]. URL: [http://www.eak.ee/dokumentid/pdf/EA4\\_02\\_total\\_270103.pdf](http://www.eak.ee/dokumentid/pdf/EA4_02_total_270103.pdf). [Loetud 26.04.2021].
- [38] P. Berman, K. Futoran, G. M. Lewitus, D. Mukha, M. Benami, T. Shlomi and D. Meiri, "A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in Cannabis," *Scientific Reports*, vol. 8, nr. 14280, 2018.
- [39] A. Szczesniowski, K. Kevin McCann and A. Technologies, "Analysis of Cannabinoids and Their Metabolites in Urine Using the MassHunter StreamSelect LC/MS System," *Agilent Application Note: Clinical Research*, 2019.
- [40] N. A. dos Santos, L. V. Tose, S. R. C. da Silva, M. Murgu, R. M. Kuster, R. S. Ortiz, F. A. O. Camargo, B. G. Vaz, V. Lacerda Jr and W. Romão, "Analysis of Isomeric Cannabinoid Standards and Cannabis Products by UPLC-ESI-TWIM-MS: a Comparison with GC-MS and GC × GC-QMS," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 30, nr. 1, lk. 60-70, 2019.
- [41] K. C. Hyland, C. Borton, P. Winkler, S. Roberts and M. Noestheden, "Quantitation of Cannabinoids and Pesticides in Cannabis Products Using the Triple Quad™ 3500 LC-MS/MS System," *AB SCIEX, Vols. RUO-MKT-02-4546-A*, 2016.
- [42] B. Clifford, C. Young, A. Owens, J. Mott and R. Lieberman, "Choosing the Right Instrumentation for Cannabinoid Analysis," *Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, USA*, 2019.
- [43] C. Cruz-Espindola, "Development and validation of a UPLC-MS method for quantification of selected cannabinoids in canine plasma and its application to commercial cannabis products," *Magistritöö*, 2018.
- [44] A. Beadle, "Determining Decarboxylation in the Cannabis Lab," *Analytical Cannabis*, 2020.
- [45] L. A. Ciolino, T. L. Ranieri and A. M. Taylor, "Commercial cannabis consumer products part 2: HPLC-DAD quantitative analysis of cannabis cannabinoids," *Forensic Science International*, vol. 289, lk. 438–447, 2018.
- [46] H. Evard, "LC-MS Method Validation," *Tartu Ülikool*, [veeb]. URL: [https://sisu.ut.ee/lcms\\_method\\_validation/93-estimating-lod](https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/93-estimating-lod). [Loetud 05.05.2021].

## LISAD

### LISA 1. Kanepitaim ja selle osad

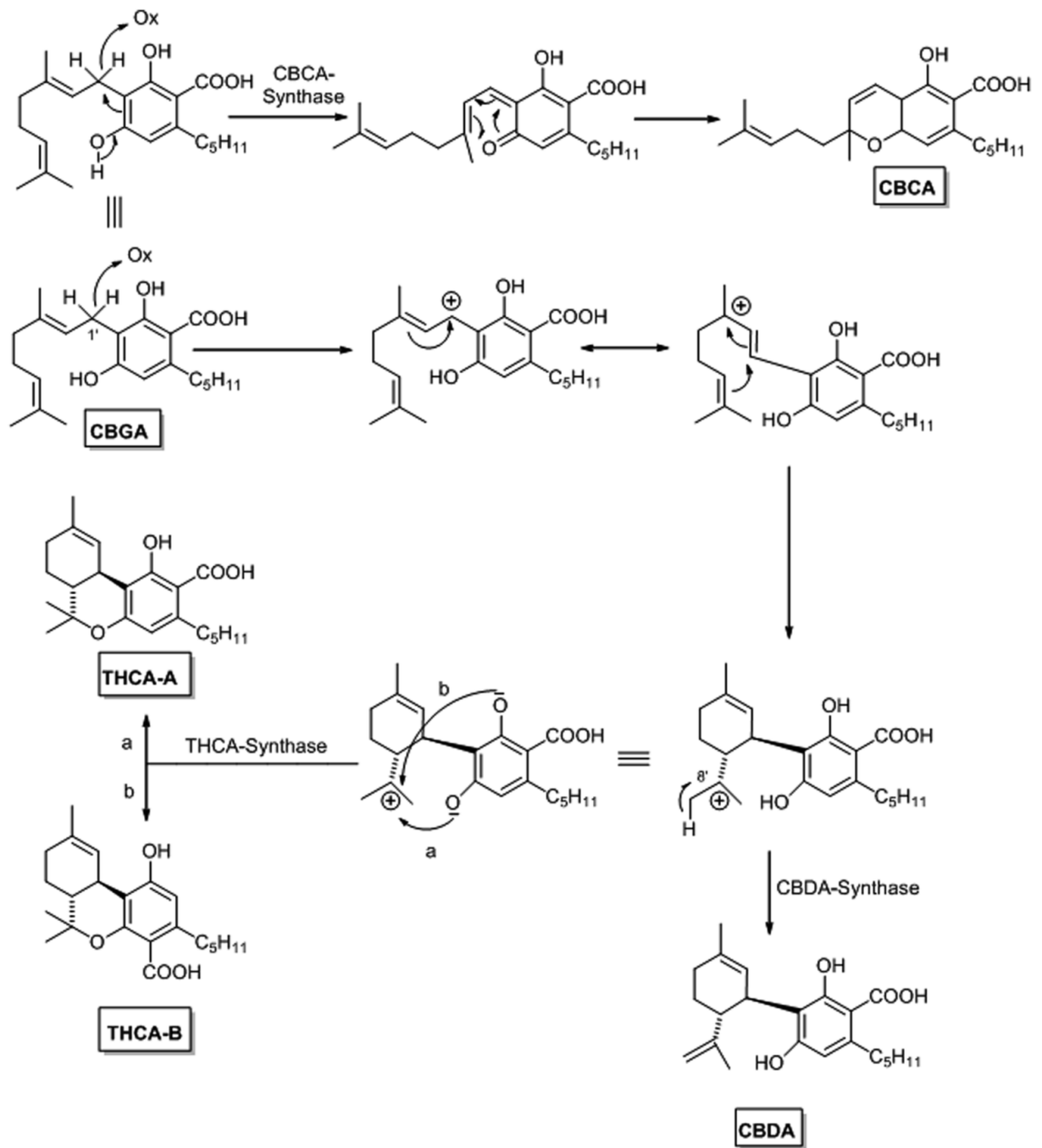


Fotodel on kujutatud kanepitaimede isastaime (A) ja emastaime (B) (1).

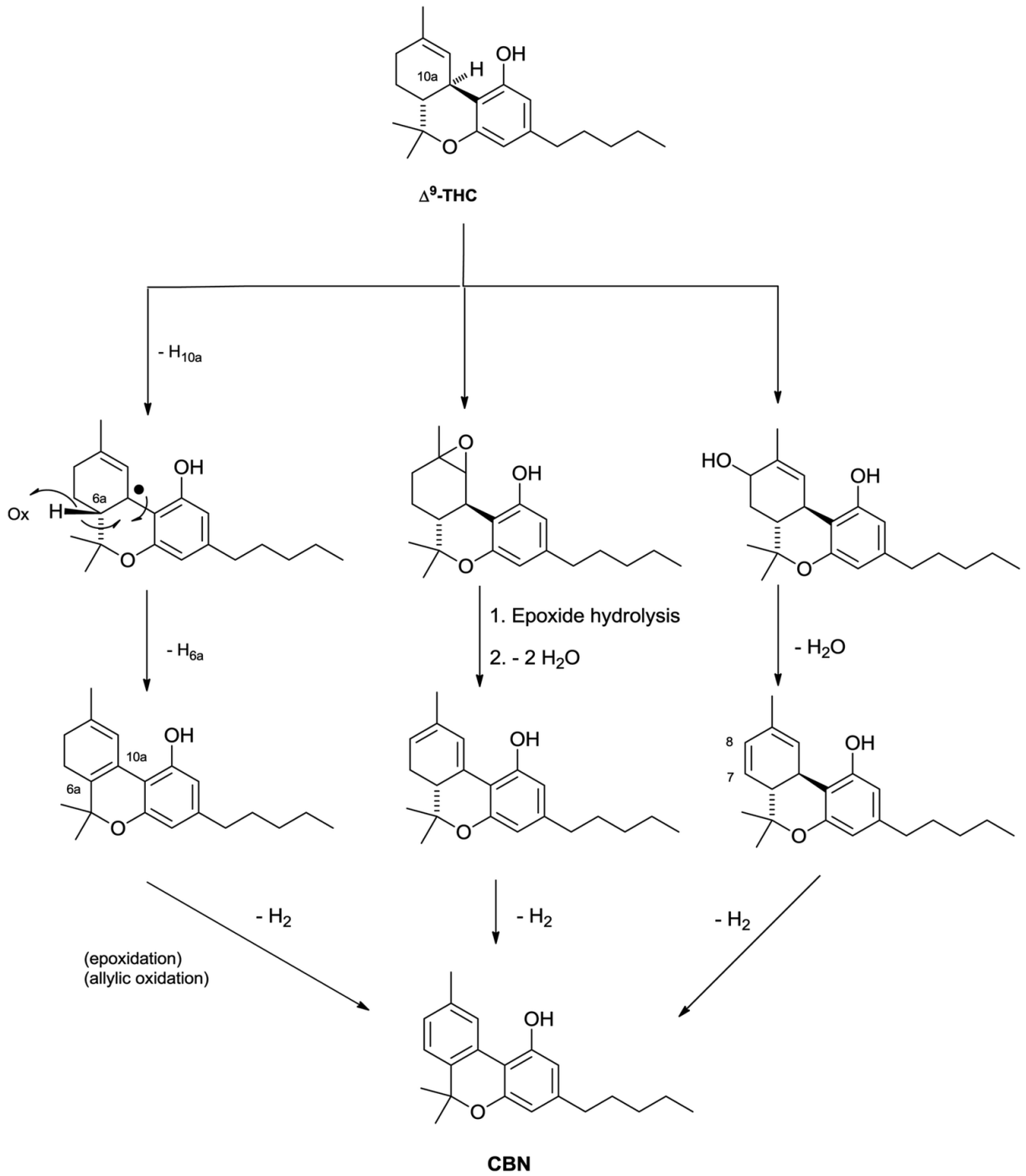


Joonisel on kujutatud kanepitaimede isastaime (A), emastaime (B), isastaime õietolmuga kaetud viie tolmuksaga kobaraid (C), kanepiseemneid (D, E, F), emasõie tupplehti koos näärmekearvadega. Joonise originaalautor on Köhler (1887). (8)

## LISA 2. Kannabinoidide biosünteesirada (14)

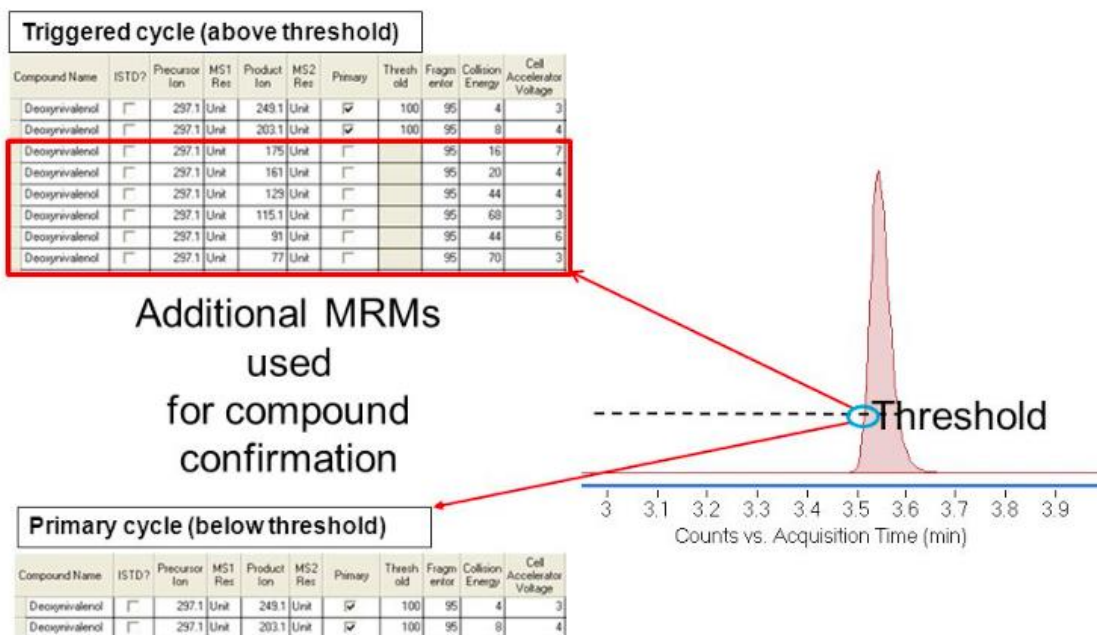


### LISA 3. $\Delta^9$ -THC oksüdativne degradeerumine CBN-iks (16)



## LISA 4. Esilekutsutud MRM režiimi skeem

### Triggered MRM in MassHunter Acquisition



Enne teatud osakeste hulga piiri (*below threshold*) toimub analüüs dMRM režiimis ning skaneeritakse ühte või kahte etteantud üleminekut (*primary cycle*). Kui saavutatakse teatud osakeste hulga piir (*above threshold*), siis kutsutakse esile selline MRM režiim, mis skaneerib kuni kümme erinevat etteantud üleminekut. Saadakse analüüdile iseloomulik massispekter. (32)



## LISA 5. Avastamis- ja määramispiirkonna arvutamise valemid (35)

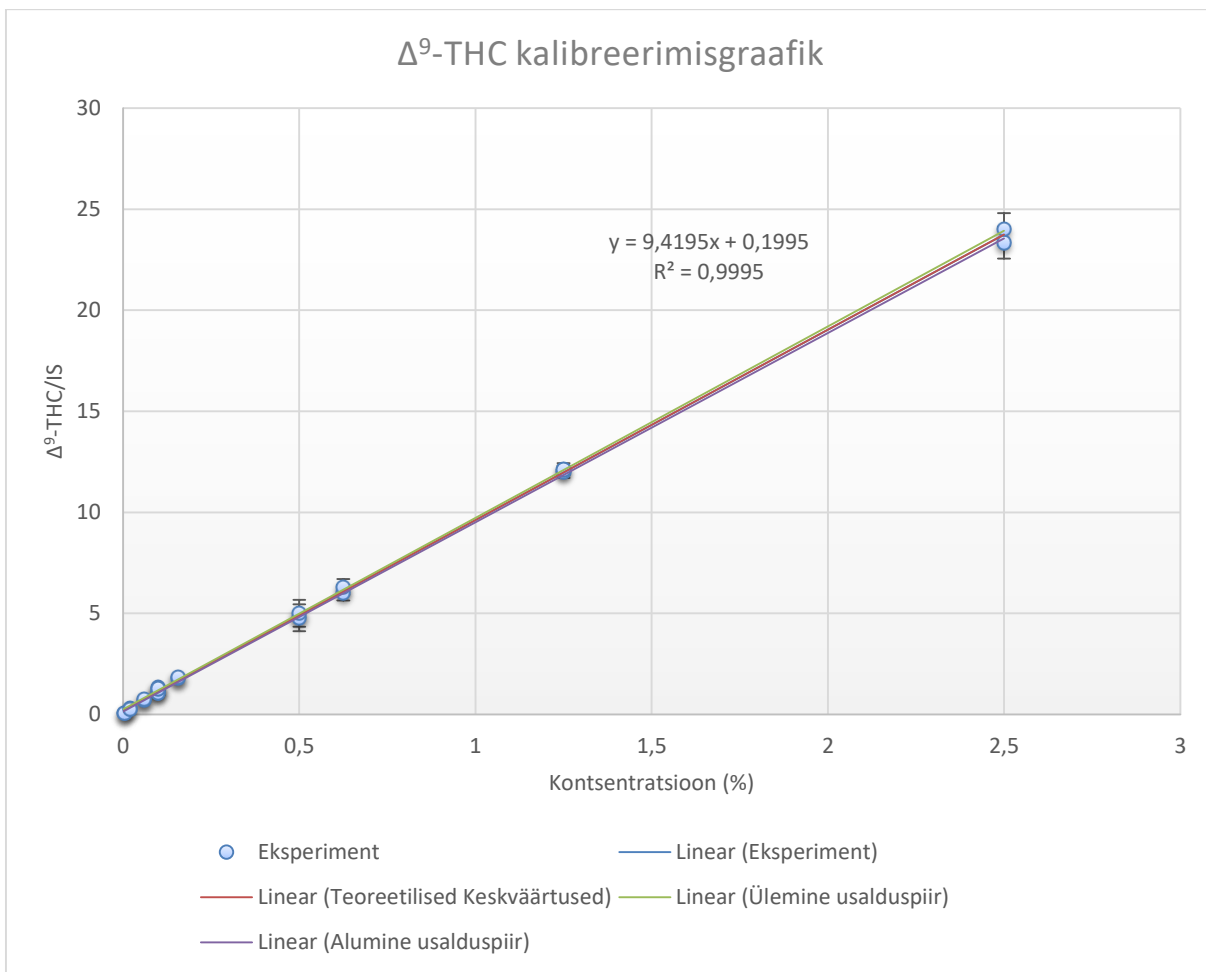
Meetod	LoD valem	LoQ valem
Signaali/müra suhe	S/N 3:1	S/N 10:1
Null-proovi kordumõõtmiste standardhälve	$\bar{X} + 3s$	$\bar{X} + 10s$
Suhteline kordustäpsus/mõõtemääramatus	Konts., kus meetodika suhteline laiendmääramatus on $\leq 50\%$	Konts., mille mõõtmistulemuste suhteline standardhälve on $\leq 10\%$
Residuaalide standardhälve	$3.3 \times \frac{s_y}{b_1}$	$10 \times \frac{s_y}{b_1}$
Regressioonisirge 95% usalduspiir	$\frac{[y'(0) + \Delta y'(0)] - b_0}{b_1}$	$LoD + c'(0)$ $\Delta c' = t_{\alpha, N-2}^{kahep} \frac{s_y}{b_1} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{M} + \frac{(c'_i - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^N (c'_i - \bar{c})^2}}$
<p>Legend: S – piigi intensiivsus; N – müra; <math>\bar{X}</math> – mõõtmistulemuste keskmine; s – mõõtmistulemuste standardhälve; <math>s_y</math> – kalibreerimisgraafiku residuaalide standardhälve, <math>b_1</math> – kalibreerimisgraafiku sirge tõus; N - eksperimendi katsete arv; M – teoreetiliste punktide arv; <math>\bar{c}</math> – eksperimentaalsete tulemuste keskvärtus; <math>c'_i</math> - teoreetiline värtus</p>		

## LISA 6. Standardainete referentsmaterjalid

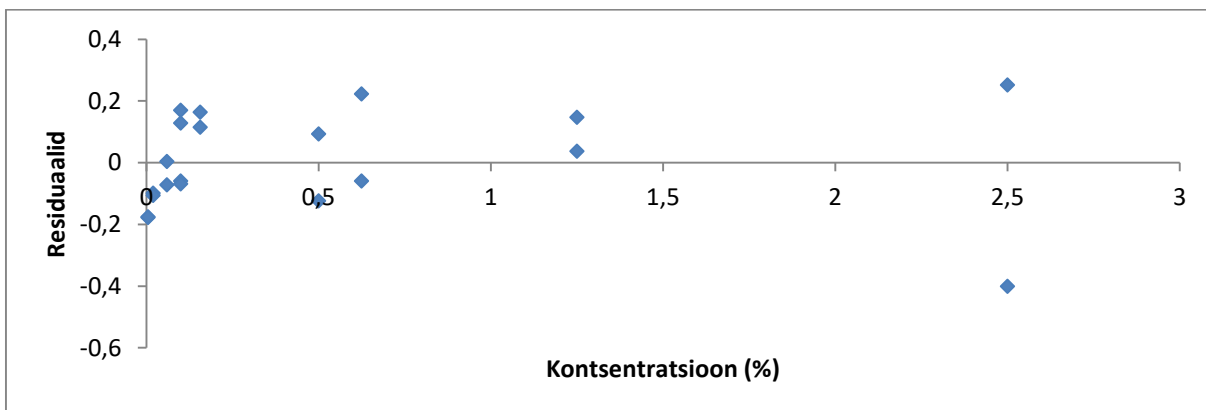
Standard	$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -THC-d3	$\Delta^9$ -THCA	CBD	CBD-d3	CBDA	CBN	$\Delta^8$ -THC
CAS no.	1972-08-3	81586-39-2	23978-85-0	13956-29-1	N/A	1244-58-2	521-35-7	5957-75-5
MW	314.47	317.49	358.48	314.47	317.47	358.47	310.44	314.47
Molekulaarvalem	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> D <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> D <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
Kontsentratsioon (mg/l)	994.6	0.1050	979.46	-	0.9811	1001	994.27	9.4
Liitstandardmääratus (mg/l)	34	0.0004	0.4%	-	1.1%	50	0.04%	2.3%
Lahusti	MeOH	EtOH	Isopropanool	<i>pulber</i>	MeOH	ACN	MeOH	EtOH
Puhtus %	99.2	98.5	97.0	99.95	99.9	99.29		98.9
Hoiustamine	<-10°C	2-8°C	-18°C	2-8°C	-18°C	<-10°C	2-8°C	2-8°C
Tootja	LGC	Lipomed	Lipomed	Lipomed	Lipomed	LGC	Lipomed	Lipomed

## LISA 7. $\Delta^9$ -THC valideerimisandmed

### LISA 7.1. $\Delta^9$ -THC kalibreerimisgraafik



### LISA 7.2. $\Delta^9$ -THC kalibreerimisgraafiku residuaalide graafik



**LISA 7.3.  $\Delta^9$ -THC korduvus ja korratavus erinevate päevade ja kontsentratsioonide lõikes**

Konts.	5.10 Korduvus (%)	6.10 Korduvus (%)	9.03 Korduvus (%)	18.03 Korduvus (%)	Korratavus (%)	Konts.	4.11 Korduvus (%)	24.11 Korduvus (%)	Korratavus (%)
0.005%				3.95	3.95	0.0049%	1.40	3.06	2.00
0.01%				2.79	3.39	0.0098%		3.33	3.33
0.02%		0.47			0.47	0.0195%	1.71	0.91	7.59
0.04%	2.44	1.68			5.55	0.0391%	4.86	3.80	3.57
0.06%		7.36			7.36	0.0781%	2.10	2.11	2.07
0.10%	3.44	0.98	2.79	2.06	10.08	0.1563%	1.92	4.80	3.10
0.20%	0.35		3.27		9.76	0.3125%	2.04	0.21	2.08
0.50%			4.52	1.51	4.00	0.6250%	2.52	3.24	6.00
1.00%						1.2500%	1.61	0.65	2.51
2.00%						2.5000%	1.95	1.70	3.46

**LISA 7.4.  $\Delta^9$ -THC tõesuse hindamise parameetrid**

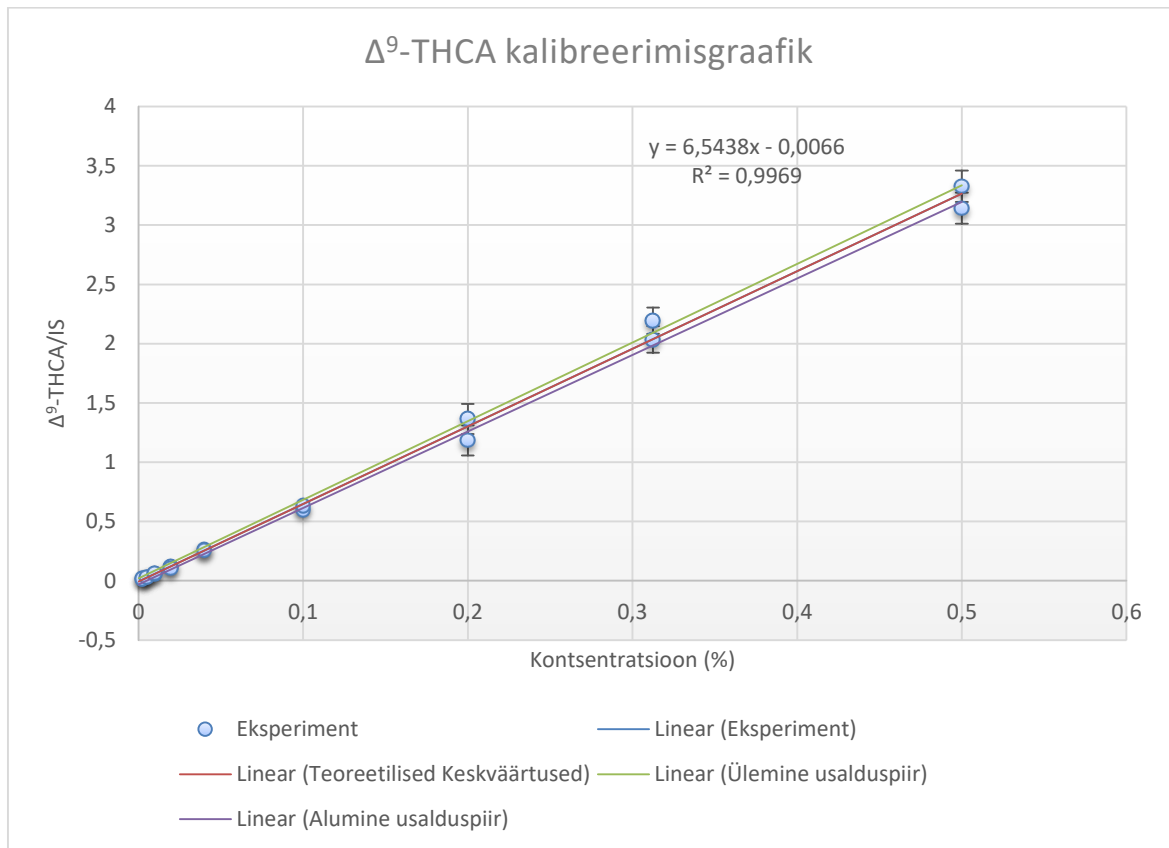
Teoreetiline konts. (%)	Proovide arv	Mõõdetud keskm. THC/IS	Mõõdetud keskm. SH (%) proovide vahel	Mõõdetud keskm. konts (%)	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe %	Tõesus (%)
0.0049	4	0.069	0.021	0.014	-0.009	-183.7	283.70
0.005	2	0.061	0.021	0.015	-0.010	-193.5	293.54
0.0098	2	0.162	0.021	0.004	0.006	59.6	40.39
0.01	3	0.152	0.021	0.005	0.005	50.0	49.97
0.0195	4	0.264	0.019	0.007	0.013	64.8	35.25
0.02	2	0.333	0.021	0.014	0.006	28.9	71.09
0.039	4	0.495	0.019	0.031	0.008	19.6	80.43
0.04	4	0.606	0.018	0.043	-0.003	-7.9	107.92
0.06	2	0.731	0.015	0.056	0.004	6.0	94.02
0.08	4	0.926	0.019	0.077	0.001	1.3	98.72
0.1	14	1.195	0.008	0.106	-0.006	-5.7	105.69
0.16	4	1.797	0.015	0.170	-0.013	-8.6	108.55
0.2	9	2.232	0.002	0.216	-0.016	-7.9	107.91
0.3	4	3.315	0.014	0.331	-0.018	-5.8	105.83
0.5	7	5.176	0.001	0.528	-0.028	-5.7	105.66
0.6	4	6.478	0.020	0.667	-0.042	-6.7	106.66
1.25	4	12.311	0.012	1.286	-0.036	-2.9	102.86
2.5	4	23.052	0.064	2.426	0.074	3.0	97.04
<b>Keskmine alates kontsentratsioonist 0.04%</b>							<b>103.71</b>

LISA 7.5.  $\Delta^9$ -THC mõõtemääramatuse arvutamine

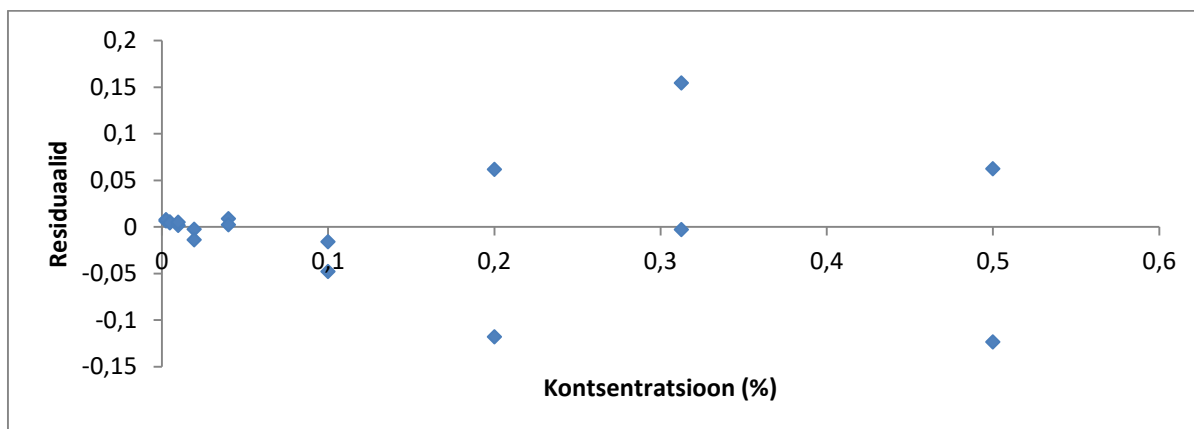
Referentsväärtus:											
D <sup>9</sup> -THC_Cref (mg/ml)	0.9946	100%									
U (D <sup>9</sup> -THC_Cref) (mg/ml)	0.034	100%									
Kontsentratsioon (%)	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	0.16%	0.20%	0.31%	0.50%	0.63%	1.25%	2.50%
D <sup>9</sup> -THC_Cref (mg/ml)	0.000398	0.000597	0.000777	0.000995	0.001554	0.001989	0.003108	0.004973	0.006216	0.012433	0.024865
U (D <sup>9</sup> -THC_Cref) (mg/ml)	0.000014	0.000020	0.000027	0.000034	0.000053	0.000068	0.000106	0.000170	0.000213	0.000425	0.000850
Labori tulemus (%)	0.043167	0.056411	0.077127	0.105690	0.169610	0.215813	0.330729	0.528282	0.666598	1.285763	2.426068
Labori tulemus (mg/ml)	0.000429	0.000561	0.000767	0.001051	0.001687	0.002146	0.003289	0.005254	0.006630	0.012788	0.024130
Ref. väärtus (mg/ml)	0.000398	0.000597	0.000777	0.000995	0.001554	0.001989	0.003108	0.004973	0.006216	0.012433	0.024865
bias	-0.000031	0.000036	0.000010	-0.000057	-0.000133	-0.000157	-0.000181	-0.000281	-0.000414	-0.000356	0.000735
s <sub>bias</sub>	-0.000031	0.000036	0.000010	-0.000068	-0.000133	-0.000157	-0.000181	-0.000234	-0.000414	-0.000356	0.000735
U (C ref) (k=2) (mg/ml)	0.000014	0.000020	0.000027	0.000034	0.000053	0.000068	0.000106	0.000170	0.000213	0.000425	0.000850
u(Cref) (mg/ml)	0.000007	0.000010	0.000013	0.000017	0.000027	0.000034	0.000053	0.000085	0.000106	0.000213	0.000425
bias_rel (%)	-7.92	5.98	1.28	-5.69	-8.55	-7.91	-5.83	-5.66	-6.66	-2.86	2.96
u(Cref)_rel (%)=	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71	1.71
s <sub>bias_rel</sub> (%)	-7.92	5.98	1.28	-6.88	-8.55	-7.91	-5.83	-4.70	-6.66	-2.86	2.96
u(bias)_rel (%) =	9.02	7.52	2.23	6.22	9.71	8.51	6.74	6.17	7.64	3.63	3.72
u(Rw) (%) = s <sub>Rw</sub> =	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
u(Rw)_rel (%) =	8.27	10.12	2.64	11.96	3.48	10.72	2.21	4.19	6.19	2.55	3.49
<b>Tulemus:</b>											
u <sub>c_rel</sub> (%) =	12.2	12.6	3.5	13.5	10.3	13.7	7.1	7.5	9.8	4.4	5.1
U <sub>rel</sub> (k=2) (%) =	24.5	25.2	6.9	27.0	20.6	27.4	14.2	14.9	19.7	8.9	10.2

## LISA 8. $\Delta^9$ -THCA valideerimisandmed

### LISA 8.1. $\Delta^9$ -THCA kalibreerimisgraafik



LISA 8.2.  $\Delta^9$ -THCA kalibreerimisgraafiku residuaalide graafik



LISA 8.3.  $\Delta^9$ -THCA korduvus ja korratavus erinevate päevade ja kontsentratsioonide lõikes

Konts.	5.10 Korduvus (%)	Korratavus (%)	Konts.	4.11 Korduvus (%)	24.11 Korduvus (%)	Korratavus (%)
	-		0.002%	<b>5.25</b>		<b>13.47</b>
0.005%			0.0049%	<i>n=1</i>	<i>n=1</i>	<b>2.74</b>
0.01%			0.0098%	<b>4.04</b>	<b>7.18</b>	<b>5.06</b>
0.02%	<b>2.1</b>	<b>2.1</b>	0.0195%	<b>7.17</b>	<b>4.35</b>	<b>15.87</b>
0.04%	<b>1.75</b>	<b>1.75</b>	0.0391%	<b>9.11</b>	<i>n=1</i>	<b>19.26</b>
0.06%	<b>6.83</b>	<b>6.83</b>				
0.10%	<b>3.69</b>	<b>3.69</b>	0.1563%			
0.20%	<b>9.96</b>	<b>9.96</b>	0.3125%		<b>5.27</b>	<b>5.27</b>
0.50%	<b>4.06</b>	<b>4.06</b>				

LISA 8.4.  $\Delta^9$ -THCA tõesuse hindamise parameetrid

Teoreetiline konts. (%)	Proovide arv	Mõõdetud keskm. THCA/IS	Mõõdetud keskm. SH (%) proovide vahel	Mõõdetud keskm. konts (%)	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe (%)	Tõesus (%)
0.002	3	0.016	0.001	0.003	-0.001	-38.9	<b>138.87</b>
0.005	2	0.030	0.001	0.006	-0.001	-16.0	<b>116.01</b>
0.0098	4	0.062	0.001	0.010	-0.001	-6.7	<b>106.72</b>
0.0195	4	0.130	0.004	0.021	-0.001	-7.2	<b>107.16</b>
0.02	2	0.139	0.001	0.022	-0.002	-11.5	<b>111.52</b>
0.039	3	0.232	0.008	0.037	0.003	6.6	<b>93.44</b>
0.04	2	0.261	0.002	0.041	-0.001	-2.2	<b>102.24</b>
0.06	2	0.321	0.004	0.050	0.010	16.5	<b>83.52</b>
0.1	2	0.616	0.004	0.095	0.005	4.8	<b>95.17</b>
0.2	2	1.274	0.020	0.196	0.004	2.1	<b>97.87</b>
0.3	2	2.114	0.018	0.324	-0.012	-3.7	<b>103.72</b>
0.5	2	3.235	0.021	0.495	0.005	0.9	<b>99.07</b>
Keskmine alates kontsentratsioonist 0.005%							<b>101.49</b>



LISA 8.5.  $\Delta^9$ -THCA mõõtemääramatuse arvutamine

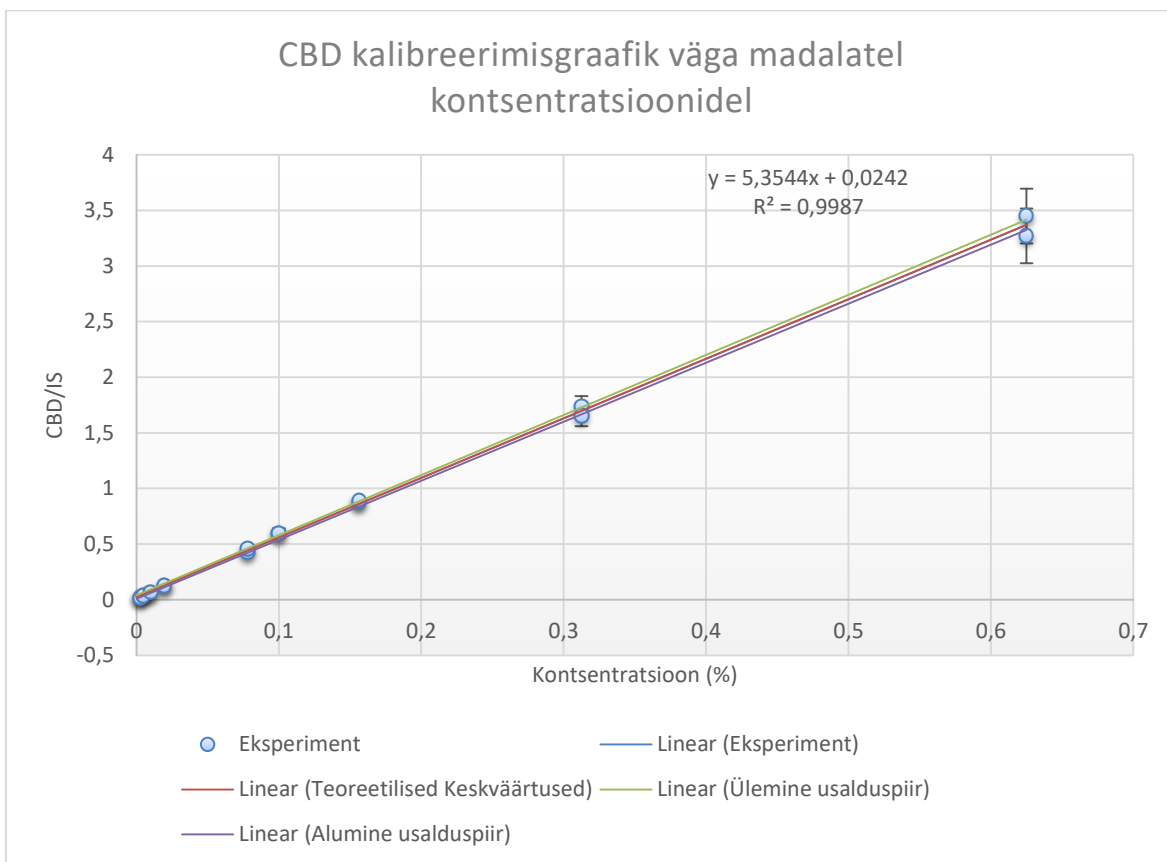
Referentsväärtus:										
D <sup>9</sup> -THCA_Cref (mg/ml)	0.97946	100%								
U (D <sup>9</sup> -THCA_Cref) (mg/ml)	0.00391784	100%								
Kontsentratsioon (%)	0.005%	0.0098%	0.0195%	0.020%	0.039%	0.040%	0.10%	0.20%	0.30%	0.50%
D <sup>9</sup> -THCA_Cref (mg/ml)	0.000049	0.000096	0.000191	0.000196	0.000382	0.000392	0.000979	0.001959	0.003061	0.004897
U (D <sup>9</sup> -THCA_Cref) (mg/ml)	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000004	0.000008	0.000012	0.000020
Labori tulemus (%)	0.005664	0.010421	0.020930	0.022304	0.036502	0.040895	0.095172	0.195744	0.324122	0.495357
Labori tulemus (mg/ml)	0.000055	0.000102	0.000205	0.000218	0.000358	0.000401	0.000932	0.001917	0.003175	0.004852
Ref. väärtus (mg/ml)	0.000049	0.000096	0.000191	0.000196	0.000382	0.000392	0.000979	0.001959	0.003061	0.004897
bias	-0.000007	-0.000006	-0.000014	-0.000023	0.000024	-0.000009	0.000047	0.000042	-0.000114	0.000045
S <sub>bias</sub>	-0.000007	-0.000007	-0.000040	-0.000023	-0.000004	-0.000009	0.000047	0.000042	-0.000114	0.000045
U (C ref) (k=2) (mg/ml)	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000004	0.000008	0.000012	0.000020
u(Cref) (mg/ml)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000002	0.000004	0.000006	0.000010
bias_rel (%)	-13.29	-6.34	-7.33	-11.52	6.41	-2.24	4.83	2.13	-3.72	0.93
u(Cref)_rel (%)=	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
S <sub>bias_rel</sub> (%)	-13.29	-7.68	-20.77	-11.52	-1.04	-2.24	4.83	2.13	-3.72	0.93
u(bias)_rel (%) =	16.27	7.42	12.72	14.11	6.44	2.75	5.92	2.61	4.56	1.15
u(Rw) (%) = s_Rw =	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
u(Rw)_rel (%) =	2.25	4.51	13.42	2.00	17.35	1.71	3.65	9.91	5.25	4.05
Tulemus:										
u <sub>c_rel</sub> (%) =	16.4	8.7	18.5	14.3	18.5	3.2	7.0	10.2	7.0	4.2
U <sub>rel</sub> (k=2) (%) =	32.9	17.4	37.0	28.5	37.0	6.5	13.9	20.5	13.9	8.4

## LISA 9. Kogu THC analüüs reaalse proovi võrdluses

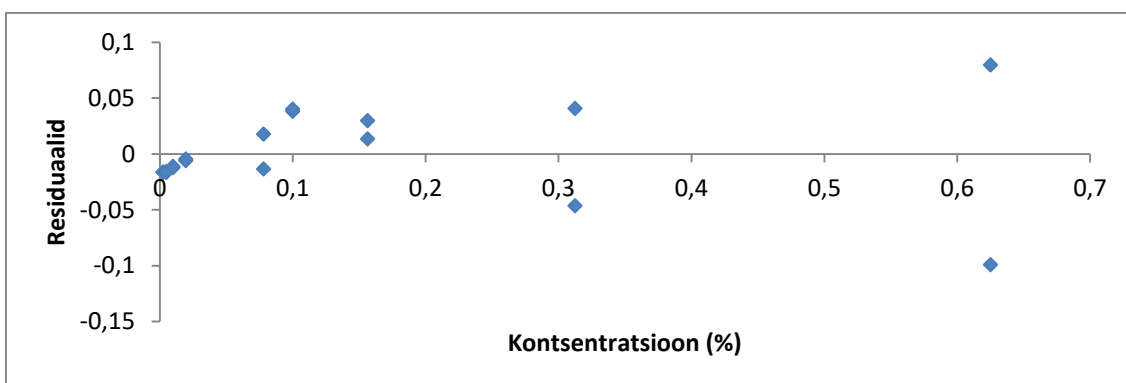
Proovi kirjeldus			Teoreetilised andmed		Mõõdetud tulemuste andmed						Mõõdetud kogu THC			
Proov	Proovi kirjeldus	Proovi vanus aasta arvult	Teoreetiline tulemus	Teoreetiline tulemus koos veamääraga	Mõõdetud tulemus Δ9-THC	Mõõdetud tulemus Δ9-THC veamääraga alumine piir	Mõõdetud tulemus Δ9-THC ülemine piir	Mõõdetud tulemus Δ9-THCA	Mõõdetud tulemus Δ9-THCA alumine piir	Mõõdetud tulemus Δ9-THCA ülemine piir	Kogu THC	Kogu THC alumine veamäär	Kogu THC ülemine veamäär	Saagis (%)
1	puru	2020	0.00883	0.0069-0.0107	0.01057	0.00761	0.01353	0.00548	0.00345	0.00751	0.02	0.011	0.020	74.3
2	puru	2020	0.00930	0.0074-0.0113	0.01078	0.00776	0.01380	0.00448	0.00282	0.00614	0.01	0.010	0.019	58.3
3	puru	2020	0.02890	0.0228-0.0350	0.00242	0.00174	0.00309	0.01153	0.00726	0.01579	0.01	0.008	0.017	-56.5
4	puru	2020	0.03000	0.0237-0.0363	0.01277	0.00920	0.01635	0.01655	0.01042	0.02267	0.03	0.018	0.036	-8.9
5	puru	2020	0.05600	0.0442-0.0678	0.02334	0.01680	0.02987	0.01628	0.01026	0.02231	0.04	0.026	0.050	-32.7
6	puru	2020	0.07250	0.0573-0.0877	0.04424	0.03185	0.05662	0.01466	0.00923	0.02008	0.06	0.040	0.074	-21.2
7	puru	2020	0.08940	0.0706-0.1082	0.03343	0.02407	0.04279	0.02607	0.01642	0.03572	0.06	0.039	0.074	-36.9
8	puru	2020	0.09600	0.0759-0.1162	0.07118	0.05125	0.09111	0.02628	0.01656	0.03601	0.09	0.066	0.123	-1.8
9	puru	2020	0.12160	0.0961-0.1471	0.10952	0.07886	0.14019	0.02398	0.01510	0.03285	0.13	0.092	0.169	7.4
10	puru	2020	0.14570	0.1151-0.1763	0.13458	0.09690	0.17226	0.02801	0.01765	0.03838	0.16	0.112	0.206	9.3
11	puru	2020	0.26	0.1054-0.3146	0.21	0.15	0.27	0.07	0.05	0.08	0.27	0.20	0.34	4.1
12	puru	2019	0.69	0.5451-0.8349	0.27	0.19	0.35	0.21	0.17	0.26	0.46	0.34	0.57	-33.8
13	puru	2019	0.54	0.4266-0.6534	0.25	0.18	0.33	0.07	0.05	0.08	0.31	0.23	0.40	-41.8
14	puru	2019	0.53	0.4187-0.6413	0.23	0.16	0.29	0.06	0.05	0.08	0.28	0.21	0.36	-47.0
15	puru	2019	0.26	0.2054-0.3146	0.12	0.08	0.15	0.05	0.04	0.06	0.16	0.12	0.20	-38.2
16	puru	2021	1.30	1.0270-1.5730	0.44	0.31	0.56	0.78	0.62	0.95	1.13	0.86	1.39	-13.3
17	CBD õli	2020	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
18	CBD õli	2020	0.00		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	
19	CBD õli, full spectrum, raw	2021			0.16	0.12	0.21	0.03	0.02	0.04	0.19	0.13	0.24	
20	CBD õli, full spectrum, raw	2021			0.16	0.12	0.21	0.04	0.02	0.05	0.19	0.14	0.25	
21	meetaoline	2020	0.12	0.0948-0.1452	0.05	0.04	0.06	0.03	0.02	0.05	0.08	0.05	0.10	-33.5
22	vaik	2020	0.10	0.0790-0.1210	0.03	0.02	0.04	0.01	0.01	0.02	0.04	0.03	0.05	-59.3
23	vaik	2019	0.11	0.0869-0.1331	0.06	0.04	0.07	0.01	0.01	0.01	0.07	0.05	0.09	-39.8
24	vaik	2019	0.13	0.1027-0.1573	0.05	0.04	0.07	0.02	0.01	0.03	0.07	0.05	0.09	-47.1
25	vedelik	2021	0.16	0.1264-0.1936	0.08	0.06	0.10	0.00	0.00	0.00	0.08	0.06	0.10	-47.7
26	e-sigareti vedelik	2020	0.00			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
27	e-sigareti vedelik	2020	0.00			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
28	vaht	2019	0.00			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
29	vedelik etanoolis	2019	1.90	1.5010-2.2990	1.11	0.80	1.42	0.04	0.04	0.05	1.15	0.83	1.47	-39.4
30	hele šokolaad	2021	0.10	0.0790-0.1210	0.09	0.07	0.12	0.02	0.01	0.03	0.11	0.08	0.14	11.4
31	hele šokolaad	2021	0.09	0.0735-0.1125	0.09	0.06	0.11	0.00	0.00	0.00	0.09	0.06	0.12	-3.6
32	tume šokolaad	2021	0.09	0.0703-0.1077	0.09	0.06	0.11	0.00	0.00	0.00	0.09	0.07	0.12	3.3
33	valge šokolaad	2021	0.06	0.0474-0.0726	0.04	0.03	0.05	0.00	0.00	0.01	0.04	0.03	0.05	-30.7

## LISA 10. CBD valideerimisandmed

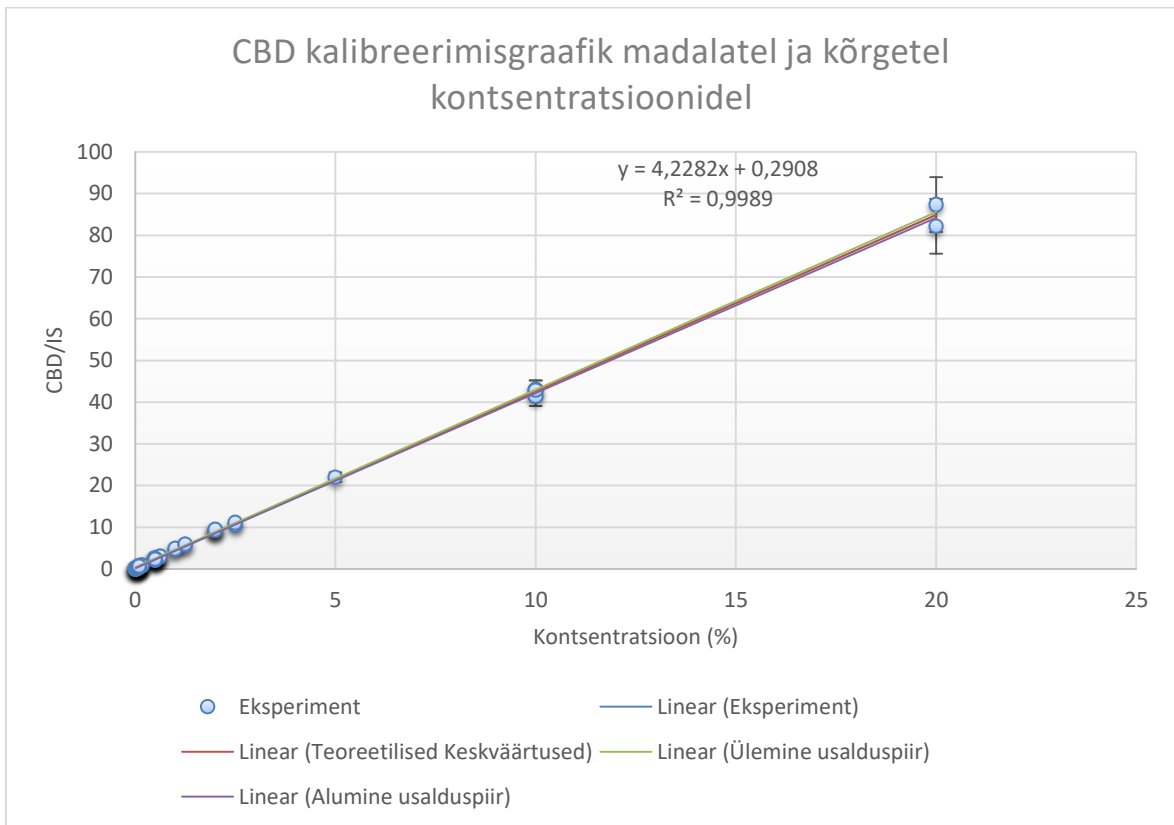
### LISA 10.1. CBD väga madalatel kontsentratsioonidel kalibreerimisgraafik



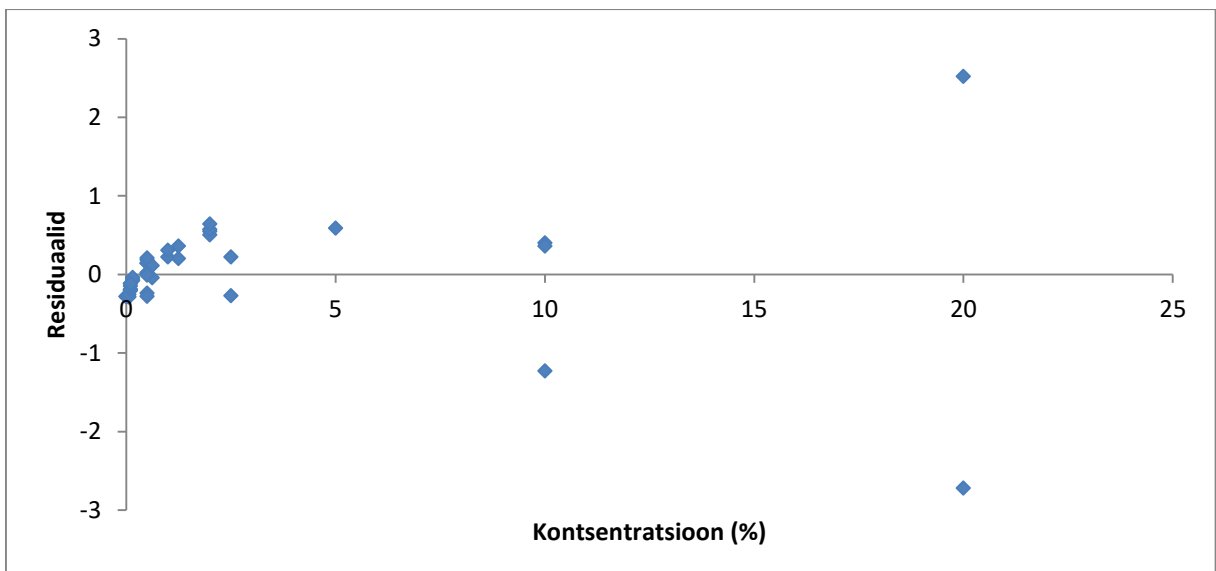
### LISA 10.2. CBD väga madalatel kontsentratsioonidel kalibreerimisgraafiku residuaalide graafik



LISA 10.3. CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel kalibreerimisgraafik



LISA 10.4. CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel kalibreerimisgraafiku residuaalide graafik



**LISA 10.5. CBD väga madalatel kontsentratsioonidel korduvus ja korratavus erinevate päevade ja kontsentratsioonide lõikes**

Konts.	5.10 Korduvus (%)	6.10 Korduvus (%)	15.03 Korduvus (%)	18.03 Korduvus (%)	Korratavus (%)	Konts.	4.11 Korduvus (%)	24.11 Korduvus (%)	Korratavus (%)
						0.002%	3.10	0.80	4.65
0.005%				5.90	5.90	0.0049%	1.88	5.13	3.21
0.01%	4.63	6.95	3.46		5.36	0.0098%	7.89	6.34	5.87
0.02%	3.06	4.11	3.51		3.26	0.0195%	2.92	0.70	3.76
0.04%	1.59	1.57			1.29	0.0391%	2.13	5.84	3.59
0.10%	1.93	1.90		3.02	7.88	0.0781%	3.77	4.95	4.23
0.20%	0.20	1.58			4.85	0.1563%	1.30		1.30
0.50%	1.80	1.24	7.67	7.13	7.31	0.3125%	3.63	4.25	5.63
						0.6250%	3.76	3.75	7.76

**LISA 10.6. CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel korduvus ja korratavus erinevate päevade ja kontsentratsioonide lõikes**

Konts.	5.10 Korduvus (%)	6.10 Korduvus (%)	15.03 Korduvus (%)	18.03 Korduvus (%)	Korratavus (%)	Konts.	04.11 Korduvus (%)	24.11 Korduvus (%)	Korratavus (%)
						0.002%	3.10	0.80	4.65
						0.0049%	1.88		1.88
0.01%	4.63			0.13	7.28	0.0098%			
0.02%	3.06	4.11			3.26	0.0195%	2.92	0.70	3.76
0.04%	1.59	1.57			1.29	0.0391%	2.13		2.13
0.06%	7.70	7.35			6.15	0.0781%	3.77		3.77
0.10%	1.93	1.90	3.46	3.02	7.88	0.1563%	1.30		2.28
0.20%	0.20	1.58	3.51		4.85	0.3125%	3.63	4.25	5.63
0.50%	1.80	1.24	7.67	7.13	7.31	0.6250%	3.76	3.75	7.76
1%	3.48	5.60			3.81	1.25%	0.28	1.93	3.13
2%	0.53	0.33			0.62	2.50%	2.21	3.20	5.72
5%	2.06	1.79				5%	1.29	4.59	5.14
10%		1.01				10%	2.66	4.23	5.46
20%		7.36				20%	7.79	0.26	8.50

LISA 10.7. CBD väga madalatel kontsentratsioonidel tõesuse hindamise parameetrid

Teoreetiline konts. (%)	Proovide arv	Möödetud keskm. CBD/IS	Möödetud keskm. SH (%) proovide vahel	Möödetud keskm. konts (%)	Teoreetilise ja möödetud tulemuse vahe	Teoreetilise ja möödetud tulemuse vahe (%)	Tõesus (%)
0.002441406	4	0.020	0.0043	0.001	0.002	69.1	30.92
0.004882813	4	0.034	0.0043	0.002	0.003	61.5	38.51
0.005	2	0.031	0.0042	0.001	0.004	76.0	23.99
0.009765625	4	0.068	0.0038	0.008	0.002	16.3	83.71
0.01	4	0.069	0.0038	0.008	0.002	16.6	83.37
0.01953125	4	0.127	0.0036	0.019	0.000	1.7	98.34
0.02	4	0.133	0.0037	0.020	0.000	-1.6	101.62
0.0390625	4	0.245	0.0029	0.041	-0.002	-5.6	105.57
0.04	4	0.233	0.0040	0.039	0.001	2.5	97.53
0.078125	4	0.453	0.0009	0.080	-0.002	-2.6	102.61
0.1	9	0.536	0.0034	0.096	0.004	4.4	95.59
0.15625	2	0.882	0.0024	0.160	-0.004	-2.6	102.58
0.2	6	1.029	0.0048	0.188	0.012	6.2	93.82
0.3125	4	1.629	0.0126	0.300	0.013	4.1	95.93
0.5	9	2.427	0.0286	0.449	0.051	10.3	89.74
0.625	4	3.165	0.0414	0.587	0.038	6.1	93.86
Keskmine alates kontsentratsioonist 0.0195%							97.93

LISA 10.8. CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel tõesuse hindamise parameetrid

Teoreetiline konts. (%)	Proovide arv	Möödetud keskm. CBD/IS	Möödetud keskm. SH (%) proovide vahel	Möödetud keskm. konts (%)	Teoreetilise ja möödetud tulemuse vahe	Teoreetilise ja möödetud tulemuse vahe (%)	Tõesus (%)
0.002441406	4	0.020	0.069	0.064	-0.062	-2522.2	2622.19
0.004882813	2	0.034	0.069	0.061	-0.056	-1143.5	1243.47
0.01	5	0.063	0.068	0.054	-0.044	-439.4	539.38
0.01953125	4	0.127	0.068	0.039	-0.019	-98.4	198.35
0.02	4	0.133	0.068	0.037	-0.017	-86.6	186.63
0.0390625	2	0.246	0.068	0.011	0.028	72.6	27.42
0.04	4	0.233	0.068	0.014	0.026	65.9	34.15
0.06	4	0.276	0.065	0.004	0.056	94.0	5.95
0.078125	2	0.462	0.065	0.041	0.038	48.1	51.91
0.1	9	0.536	0.059	0.058	0.042	42.0	57.99
0.15625	3	0.893	0.064	0.142	0.014	8.8	91.17
0.2	6	1.029	0.057	0.175	0.025	12.7	87.28
0.3125	4	1.629	0.047	0.317	-0.004	-1.3	101.30
0.5	9	2.427	0.027	0.505	-0.005	-1.0	101.03
0.625	4	3.165	0.011	0.680	-0.055	-8.8	108.78
1	4	4.943	0.024	1.100	-0.100	-10.0	110.03
1.25	4	6.011	0.024	1.353	-0.103	-8.2	108.23
2	4	9.315	0.055	2.134	-0.134	-6.7	106.72
2.5	4	11.357	0.085	2.617	-0.117	-4.7	104.69
5	9	22.465	0.204	5.244	-0.244	-4.9	104.89
10	6	41.419	0.466	9.727	0.273	2.7	97.27
20	6	77.355	1.487	18.226	1.774	8.9	91.13
Keskmine alates kontsentratsioonist 0.16%							101.04

LISA 10.9. CBD väga madalatel kontsentratsioonidel mõõtemääramatuse arvutamine

Referentsväärtus:												
CBD_Cref (mg/ml)	0.9995	100%										
U (CBD_Cref) (mg/ml)	0.00049975	100%										
Kontsentratsioon (%)	0.16%	0.20%	0.31%	0.50%	0.63%	1.00%	1.25%	2.00%	2.50%	5.00%	10.00%	20.00%
CBD_Cref (mg/ml)	0.001562	0.001999	0.003123	0.004998	0.006247	0.009995	0.012494	0.019990	0.024988	0.049975	0.099950	0.199900
U (CBD_Cref) (mg/ml)	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000003	0.000005	0.000006	0.000010	0.000012	0.000025	0.000050	0.000100
Labori tulemus (%)	0.142454	0.174564	0.316560	0.505174	0.679849	1.100316	1.352841	2.134337	2.617304	5.244257	9.727051	18.226212
Labori tulemus (mg/ml)	0.001424	0.001745	0.003164	0.005049	0.006795	0.010998	0.013522	0.021333	0.026160	0.052416	0.097222	0.182171
Ref. väärtus (mg/ml)	0.001562	0.001999	0.003123	0.004998	0.006247	0.009995	0.012494	0.019990	0.024988	0.049975	0.099950	0.199900
bias	0.000138	0.000254	-0.000041	-0.000052	-0.000548	-0.001003	-0.001028	-0.001343	-0.001172	-0.002441	0.002728	0.017729
S <sub>bias</sub>	0.000138	0.000254	-0.000041	-0.000181	-0.000548	-0.001003	-0.001028	-0.001343	-0.001172	-0.003973	0.002728	0.017729
U (C <sub>ref</sub> ) (k=2) (mg/ml)	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000003	0.000005	0.000006	0.000010	0.000012	0.000025	0.000050	0.000100
u(C <sub>ref</sub> ) (mg/ml)	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000003	0.000005	0.000006	0.000012	0.000025	0.000050
bias <sub>rel</sub> (%)	8.83	12.72	-1.30	-1.03	-8.78	-10.03	-8.23	-6.72	-4.69	-4.89	2.73	8.87
u(C <sub>ref</sub> ) <sub>rel</sub> (%) =	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
S <sub>bias<sub>rel</sub></sub> (%)	8.83	12.72	-1.30	-3.62	-8.78	-10.03	-8.23	-6.72	-4.69	-7.95	2.73	8.87
u(bias) <sub>rel</sub> (%) =	10.20	13.74	1.45	1.59	9.81	11.22	9.20	7.51	5.25	5.56	2.95	9.58
u(R <sub>w</sub> ) (%) = s <sub>Rw</sub> =	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
u(R <sub>w</sub> ) <sub>rel</sub> (%) =	3.38	6.76	6.85	8.10	8.55	4.05	3.29	0.64	5.87	5.06	5.50	8.53
<b>Tulemus:</b>												
u <sub>c</sub> <sub>rel</sub> (%) =	10.7	15.3	7.0	8.3	13.0	11.9	9.8	7.5	7.9	7.5	6.2	12.8
U <sub>rel</sub> (k=2) (%) =	21.5	30.6	14.0	16.5	26.0	23.8	19.5	15.1	15.7	15.0	12.5	25.7

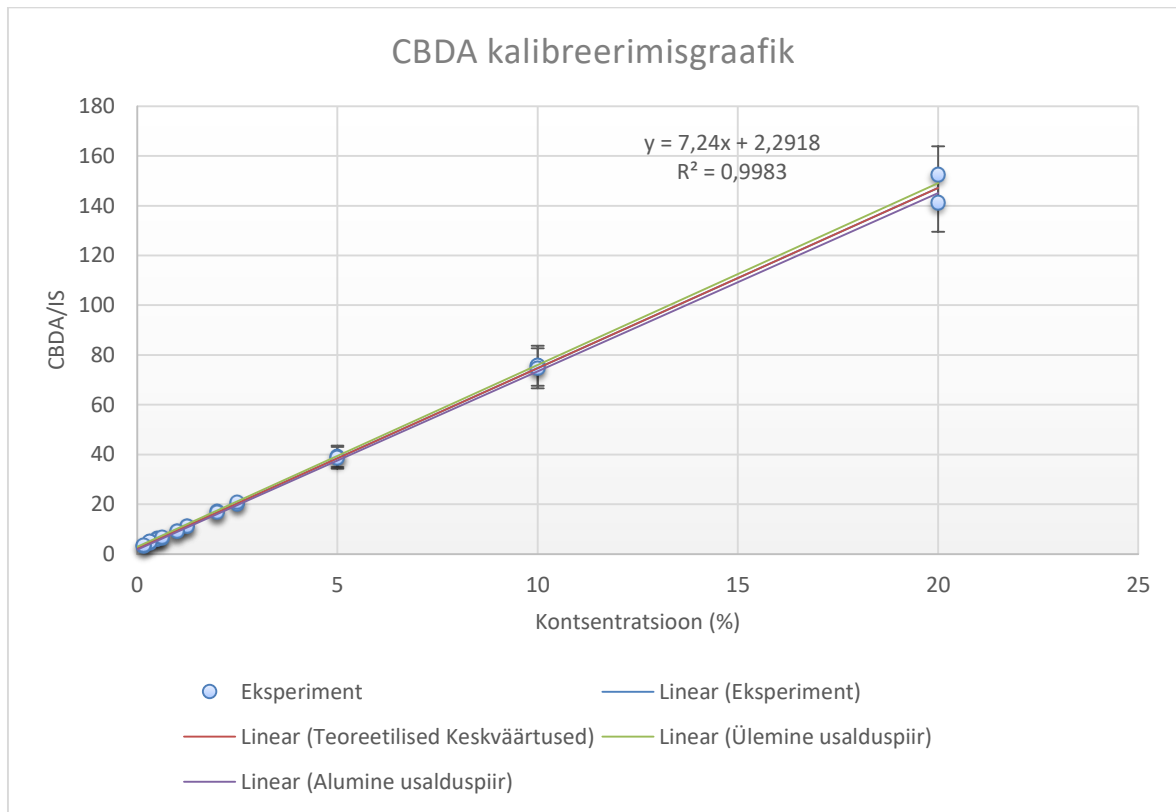
LISA 10.10. CBD madalatel ja kõrgetel kontsentratsioonidel mõõtemääramatuse arvutamine

Referentsväärtus:												
CBD_Cref (mg/ml)	0.9995	100%										
U (CBD_Cref) (mg/ml)	0.00049975	100%										
Kontsentratsioon (%)	0.16%	0.20%	0.31%	0.50%	0.63%	1.00%	1.25%	2.00%	2.50%	5.00%	10.00%	20.00%
CBD_Cref (mg/ml)	0.001562	0.001999	0.003123	0.004998	0.006247	0.009995	0.012494	0.019990	0.024988	0.049975	0.099950	0.199900
U (CBD_Cref) (mg/ml)	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000003	0.000005	0.000006	0.000010	0.000012	0.000025	0.000050	0.000100
Labori tulemus (%)	0.142454	0.174564	0.316560	0.505174	0.679849	1.100316	1.352841	2.134337	2.617304	5.244257	9.727051	18.226212
Labori tulemus (mg/ml)	0.001424	0.001745	0.003164	0.005049	0.006795	0.010998	0.013522	0.021333	0.026160	0.052416	0.097222	0.182171
Ref. väärtus (mg/ml)	0.001562	0.001999	0.003123	0.004998	0.006247	0.009995	0.012494	0.019990	0.024988	0.049975	0.099950	0.199900
bias	0.000138	0.000254	-0.000041	-0.000052	-0.000548	-0.001003	-0.001028	-0.001343	-0.001172	-0.002441	0.002728	0.017729
S <sub>bias</sub>	0.000138	0.000254	-0.000041	-0.000181	-0.000548	-0.001003	-0.001028	-0.001343	-0.001172	-0.003973	0.002728	0.017729
U (C <sub>ref</sub> ) (k=2) (mg/ml)	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000003	0.000005	0.000006	0.000010	0.000012	0.000025	0.000050	0.000100
u(C <sub>ref</sub> ) (mg/ml)	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002	0.000003	0.000005	0.000006	0.000012	0.000025	0.000050
bias <sub>rel</sub> (%)	8.83	12.72	-1.30	-1.03	-8.78	-10.03	-8.23	-6.72	-4.69	-4.89	2.73	8.87
u(C <sub>ref</sub> ) <sub>rel</sub> (%) =	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
S <sub>bias<sub>rel</sub></sub> (%)	8.83	12.72	-1.30	-3.62	-8.78	-10.03	-8.23	-6.72	-4.69	-7.95	2.73	8.87
u(bias) <sub>rel</sub> (%) =	10.20	13.74	1.45	1.59	9.81	11.22	9.20	7.51	5.25	5.56	2.95	9.58
u(Rw) (%) = s <sub>Rw</sub> =	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
u(Rw) <sub>rel</sub> (%) =	3.38	6.76	6.85	8.10	8.55	4.05	3.29	0.64	5.87	5.06	5.50	8.53
<b>Tulemus:</b>												
u <sub>c</sub> <sub>rel</sub> (%) =	10.7	15.3	7.0	8.3	13.0	11.9	9.8	7.5	7.9	7.5	6.2	12.8
U <sub>rel</sub> (k=2) (%) =	21.5	30.6	14.0	16.5	26.0	23.8	19.5	15.1	15.7	15.0	12.5	25.7

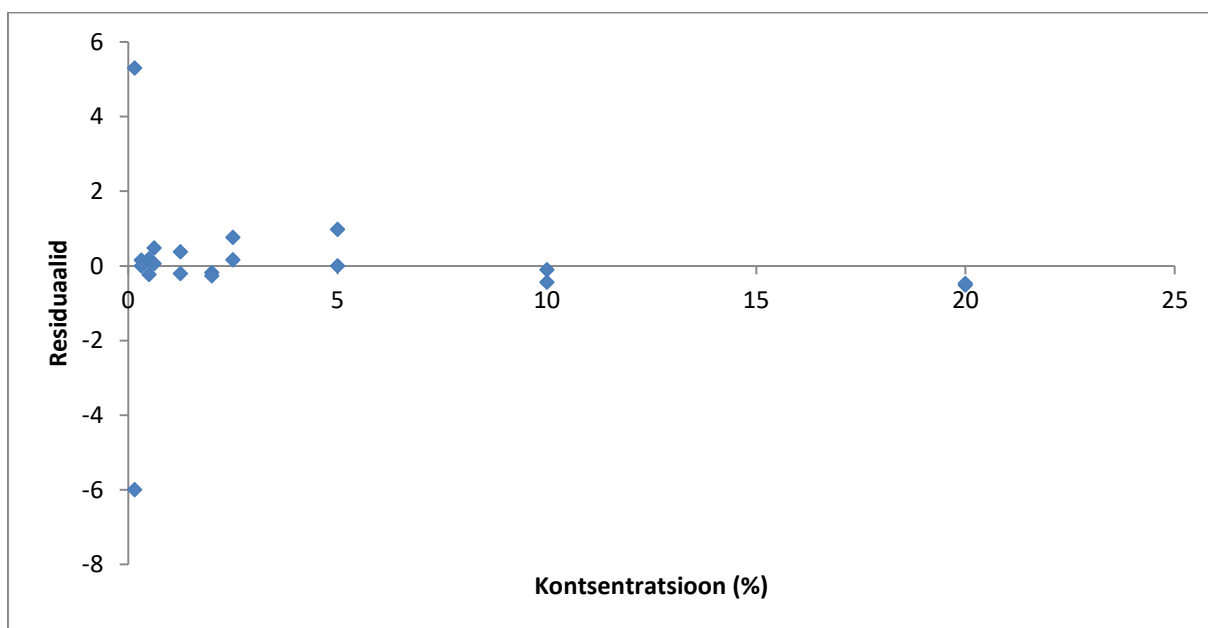


# LISA 11. CBDA valideerimisandmed

## LISA 11.1. CBDA kalibreerimisgraafik



### LISA 11.2. CBDA kalibreerimisgraafiku residuaalide graafik



### LISA 11.3. CBDA korduvus ja korratavus erinevate päevade ja kontsentratsioonide lõikes

Konts. (%)	05.10 Korduvus (%)	06.10 Korduvus (%)	23.10 Korduvus (%)	4.11 Korduvus (%)	24.11 Korduvus (%)	15.03 Korduvus (%)	Korratavus (%)
0.15625					8.66		8.66
0.3125			7.96				7.96
0.5		1.81					1.81
0.625				3.61			3.61
1	3.16	1.88				2.15	5.82
1.25				0.55			0.55
2	1.75	2.43					2.84
2.5				2.02	2.71		16.62
5	2.80	0.48		1.09	2.86	3.36	11.05
10		0.92		0.88	4.98		10.24
20		5.44		8.81	1.35		7.49

#### LISA 11.4. CBDA tõesuse hindamise parameetrid

Teoreetiline konts. (%)	Proovide arv	Mõõdetud keskm. CBDA/IS	Mõõdetud keskm. SH (%) proovide vahel	Mõõdetud keskm. konts (%)	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe (%)	Tõesus (%)
0.15625	2	3.398	0.294	0.153	0.003	2.2	97.78
0.3125	2	4.567	0.364	0.314	-0.002	-0.5	100.54
0.5	2	5.981	0.108	0.510	-0.010	-1.9	101.91
0.625	2	6.540	0.236	0.587	0.038	6.1	93.88
1	8	9.319	0.542	0.971	0.029	2.9	97.06
1.25	2	11.116	0.061	1.219	0.031	2.5	97.51
2	4	17.373	0.494	2.083	-0.083	-4.2	104.15
2.5	2	20.474	0.414	2.511	-0.011	-0.5	100.45
5	14	39.543	4.370	5.145	-0.145	-2.9	102.90
10	6	78.708	8.058	10.555	-0.555	-5.5	105.55
20	6	154.038	11.543	20.959	-0.959	-4.8	104.80
Keskmine alates kontsentratsioonist 0.32%							100.88

LISA 11.5. CBDA mõõtemääramatuse arvutamine

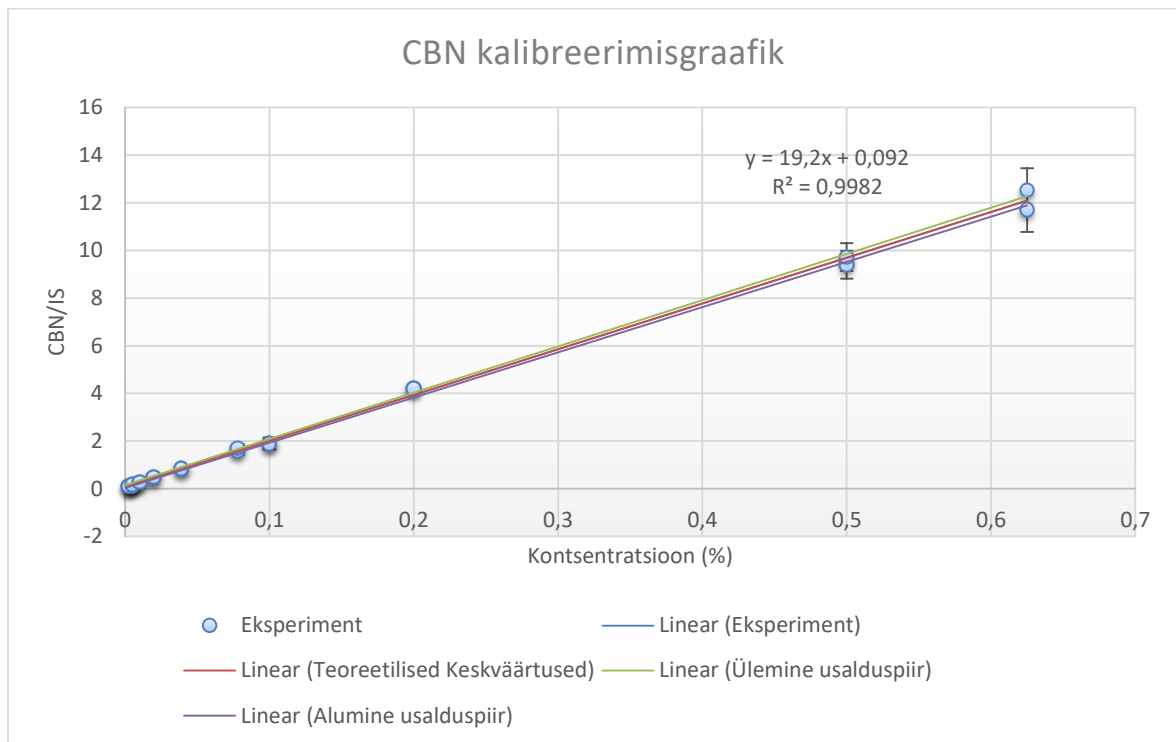
Referentsväärtus:										
CBDA_Cref (mg/ml)	1.001	100%								
U (CBDA_Cref) (mg/ml)	0.05	100%								
Kontsentratsioon (%)	0.31%	0.5%	0.625%	1%	1.25%	2%	2.5%	5%	10%	20%
CBDA_Cref (mg/ml)	0.003128	0.005005	0.006256	0.010010	0.012513	0.020020	0.025025	0.050050	0.100100	0.200200
U (CBDA_Cref) (mg/ml)	0.000156	0.000250	0.000313	0.000500	0.000625	0.001000	0.001250	0.002500	0.005000	0.010000
Labori tulemus (%)	0.314192	0.509566	0.586780	0.970602	1.218865	2.083000	2.511287	5.529141	10.554641	20.959342
Labori tulemus (mg/ml)	0.003145	0.005101	0.005874	0.009716	0.012201	0.020851	0.025138	0.055347	0.105652	0.209803
Ref. väärtus (mg/ml)	0.003128	0.005005	0.006256	0.010010	0.012513	0.020020	0.025025	0.050050	0.100100	0.200200
bias	-0.000017	-0.000096	0.000383	0.000294	0.000312	-0.000831	-0.000113	-0.005297	-0.005552	-0.009603
s <sub>bias</sub>	-0.000017	-0.000096	0.000383	0.000079	0.000312	-0.000831	-0.000113	-0.001453	-0.005552	-0.009603
U (C ref) (k=2) (mg/ml)	0.000156	0.000250	0.000313	0.000500	0.000625	0.001000	0.001250	0.002500	0.005000	0.010000
u(Cref) (mg/ml)	0.000078	0.000125	0.000156	0.000250	0.000313	0.000500	0.000625	0.001250	0.002500	0.005000
bias_rel (%)	-0.54	-1.91	6.12	2.94	2.49	-4.15	-0.45	-10.58	-5.55	-4.80
u(Cref)_rel (%)=	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50
s <sub>bias_rel</sub> (%)	-0.54	-1.91	6.12	0.79	2.49	-4.15	-0.45	-2.90	-5.55	-4.80
u(bias)_rel (%) =	2.58	3.42	7.90	3.87	3.94	5.27	2.56	10.90	6.49	5.75
u(Rw) (%) = s <sub>Rw</sub> =	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02
u(Rw)_rel (%) =	15.98	2.93	5.56	7.55	0.69	3.27	2.28	11.73	10.55	7.61
Tulemus:										
u <sub>c_rel</sub> (%) =	16.2	4.5	9.7	8.5	4.0	6.2	3.4	16.0	12.4	9.5
U <sub>rel</sub> (k=2) (%) =	32.4	9.0	19.3	17.0	8.0	12.4	6.8	32.0	24.8	19.1

## LISA 12. Kogu CBD analüüs reaalse proovi võrdluses

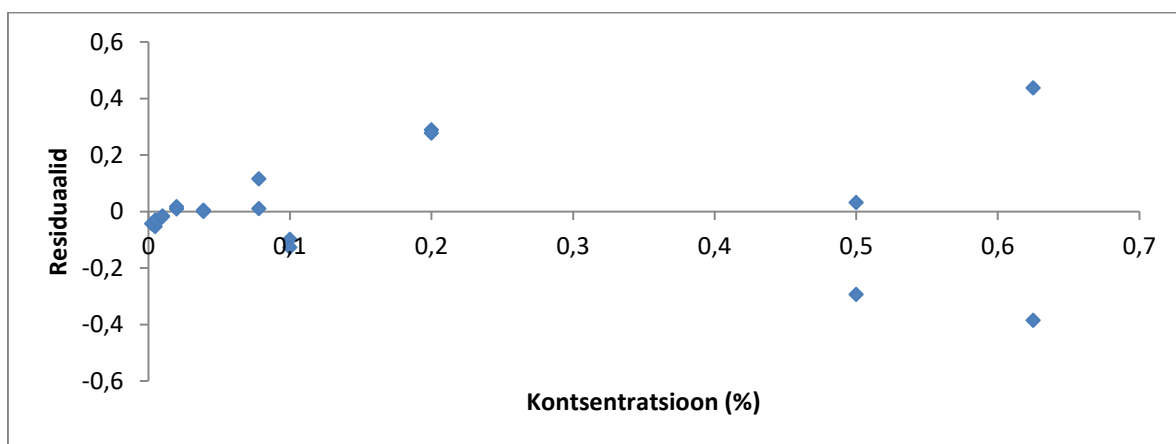
Proovi kirjeldus			Teoreetilised andmed		Mõõdetud tulemuste andmed						Mõõdetud kogu CBD			
Proov	Proovi kirjeldus	Proovi vanus aasta arvult	Teoreetiline tulemus	Teoreetiline tulemus koos veamääraga	Mõõdetud tulemus CBD	Mõõdetud tulemus CBD veamääraga alumine piir	Mõõdetud tulemus CBD veamääraga ülemine piir	Mõõdetud tulemus CBDA	Mõõdetud tulemus CBDA veamääraga alumine piir	Mõõdetud tulemus CBDA veamääraga ülemine piir	Kogu CBD	Kogu CBD alumine veamäär	Kogu CBD ülemine veamäär	Saagis (%)
1	puru	2020	0.2195	0.1734-0.2656	0.08105	0.05998	0.10212	0.060256	0.04037	0.08014	0.08	0.060	0.102	-63.1
2	puru	2020	0.2214	0.1749-0.2679	0.106916	0.07912	0.13471	0.090423	0.06058	0.12026	0.11	0.079	0.135	-51.7
3	puru	2020	0.2774	0.2191-0.3357	0.073587	0.05445	0.09272	0.004462	0.00299	0.00593	0.07	0.054	0.093	-73.5
4	puru	2020	0.7655	0.6047-0.9263	0.0571	0.04225	0.07195	0.616038	0.41275	0.81933	0.60	0.405	0.793	-21.7
5	puru	2020	0.4492	0.3549-0.5435	0.157069	0.10995	0.20419	0.13365	0.08955	0.17775	0.27	0.110	0.204	-38.9
6	puru	2020	0.4170	0.3294-0.5046	0.207689	0.14538	0.27000	0.018993	0.01273	0.02526	0.21	0.145	0.270	-50.2
7	puru	2020	0.4317	0.3410-0.5224	0.146244	0.10822	0.18427	0.128957	0.08640	0.17151	0.15	0.108	0.184	-66.1
8	puru	2020	0.5083	0.4016-0.6150	0.261826	0.18328	0.34037	0.219039	0.14676	0.29132	0.26	0.183	0.340	-48.5
9	puru	2020	0.3904	0.3084-0.4724	0.32298	0.22609	0.41987	0.111884	0.07496	0.14881	0.32	0.226	0.420	-17.3
10	puru	2020	0.6131	0.4843-0.7419	0.515466	0.36083	0.67011	0.227618	0.15250	0.30273	0.52	0.361	0.670	-15.9
11	puru	2020	7.00	5.53-8.47	5.314858	3.72040	6.90932	2.01424	1.34954	2.67894	7.09	4.908	9.267	1.2
12	puru	2019	14.00	11.06-16.94	1.825629	1.27794	2.37332	13.64968	9.14528	18.15407	13.84	9.326	18.349	-1.2
13	puru	2019	14.00	11.06-16.94	5.671243	3.96987	7.37262	9.719746	6.51223	12.92726	14.22	9.701	18.749	1.6
14	puru	2019	15.00	11.85-18.15	4.695444	3.28681	6.10408	11.63946	7.79844	15.48048	14.94	10.149	19.727	-0.4
15	puru	2019	6.40	5.06-7.74	3.27546	2.29282	4.25810	3.26324	2.18637	4.34011	6.15	4.217	8.077	-4.0
16	puru	2021	0.00	0	0.001079	0.00080	0.00136	0	0.00000	0.00000	0.00	0.001	0.001	
17	CBD õli	2020	4.90	3.87-5.93	4.416134	3.09129	5.74097	0.308893	0.20696	0.41083	4.42	3.091	5.741	-9.9
18	CBD õli	2020	23.00	18.17-27.83	20.84974	14.59482	27.10467	0.308636	0.20679	0.41049	20.85	14.595	27.105	-9.3
19	CBD õli, full spectrum, raw	2021	5.00		5.106148	3.57430	6.63799	2.3096	1.54743	3.07177	7.14	4.936	9.341	42.8
20	CBD õli, full spectrum, raw	2021	10.00		9.082722	6.35791	11.80754	0.260564	0.17458	0.34655	9.08	6.358	11.808	-9.2
21	meetaoline	2020	69.00	55-83	63.01484	44.11039	81.91929	0.310745	0.20820	0.41329	63.01	44.110	81.919	-8.7
22	vaik	2020	8.60	6.79-10.41	8.567258	5.99708	11.13744	0.311471	0.20869	0.41426	8.57	5.997	11.137	-0.4
23	vaik	2019	1.40	1.11-1.69	1.176733	0.82371	1.52975	0.089098	0.05970	0.11850	1.18	0.824	1.530	-15.9
24	vaik	2019	1.60	1.26-1.94	0.937082	0.65596	1.21821	0.881183	0.59039	1.17197	1.71	1.176	2.250	7.0
25	vedelik	2021	10.95	8.65-13.25	9.751801	6.82626	12.67734	0.306826	0.20557	0.40808	9.75	6.826	12.677	-10.9
26	e-sigareti vedelik	2020	8.50	6.72-10.29	8.227576	5.75930	10.69585	0.314031	0.21040	0.41766	8.23	5.759	10.696	-3.2
27	e-sigareti vedelik	2020	1.30	1.03-1.58	1.195988	0.83719	1.55478	0.314951	0.21102	0.41889	1.20	0.837	1.555	-8.0
28	vaht	2019	4.90	3.87-5.93	4.644666	3.25127	6.03807	0.309648	0.20746	0.41183	4.64	3.251	6.038	-5.2
29	vedelik etanoolis	2019	13.00	10.27-15.73	10.46819	7.32774	13.60865	0.7714	0.51684	1.02596	11.15	7.328	13.609	-14.3
30	hele šokolaad	2021			0.026146	0.01935	0.03294	0.310695	0.20817	0.41322	0.03	0.019	0.033	
31	hele šokolaad	2021			0.003342	0.00247	0.00421	0.311522	0.20872	0.41432	0.00	0.002	0.004	
32	tume šokolaad	2021			0.027669	0.02048	0.03486	0.311893	0.20897	0.41482	0.03	0.020	0.035	
33	valge šokolaad	2021			0.027119	0.02007	0.03417	0.312936	0.20967	0.41620	0.03	0.020	0.034	

## LISA 13. CBN valideerimisandmed

### LISA 13.1. CBN kalibreerimisgraafik



### LISA 13.2. CBN kalibreerimisgraafiku residuaalide graafik



### LISA 13.3. CBN korduvus ja korratavus erinevate päevade ja kontsentratsioonide lõikes

Konts.	6.10 Korduvus (%)	10.03 Korduvus (%)	18.03 Korduvus (%)	Korratavus (%)	Konts.	4.11 Korduvus (%)	24.11 Korduvus (%)	22.01 Korduvus (%)	Korratavus (%)
					0.002%	0.48		7.64	4.44
0.005%			0.01	0.01	0.0049%	7.39	5.21	5.65	11.52
0.01%			0.36	0.36	0.0098%	5.30			5.30
0.02%	1.15			1.15	0.0195%	6.63		6.86	6.59
0.04%	6.43			6.43	0.0391%	7.85		0.38	11.65
0.06%					0.0781%	4.01		4.51	10.12
0.10%	0.86	5.01		12.30	0.1563%	2.56	6.41	0.79	12.64
0.20%	2.74	0.96		2.33	0.3125%		0.17		0.61
0.50%	0.31	6.77		6.15	0.625%	1.24	4.80		7.22

### LISA 13.4. CBN tõesuse hindamise parameetrid

Teoreetiline konts. (%)	Proovide arv	Mõõdetud keskm. CBN/IS	Mõõdetud keskm. SH (%) proovide vahel	Mõõdetud keskm. Konts. (%)	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe	Teoreetilise ja mõõdetud tulemuse vahe (%)	Tõesus (%)
0.002441406	4	0.096	0.005	0.0002	0.002	92.5	<b>7.53</b>
0.004882813	6	0.147	0.004	0.0028	0.002	41.7	<b>58.32</b>
0.005	2	0.157	0.005	0.0034	0.002	31.8	<b>68.17</b>
0.009765625	2	0.269	0.004	0.0092	0.001	5.3	<b>94.67</b>
0.01	2	0.267	0.005	0.0091	0.001	9.1	<b>90.93</b>
0.01953125	4	0.515	0.003	0.0220	-0.003	-12.9	<b>112.86</b>
0.02	2	0.488	0.004	0.0206	-0.001	-3.2	<b>103.17</b>
0.0390625	4	0.929	0.001	0.0436	-0.005	-11.5	<b>111.55</b>
0.04	2	0.876	0.002	0.0408	-0.001	-2.1	<b>102.05</b>
0.078125	4	1.803	0.005	0.0891	-0.011	-14.1	<b>114.08</b>
0.1	6	1.975	0.008	0.0981	0.002	1.9	<b>98.10</b>
0.15625	6	3.373	0.017	0.1709	-0.015	-9.4	<b>109.38</b>
0.2	7	4.294	0.000	0.2188	-0.019	-9.4	<b>109.42</b>
0.3125	3	6.694	0.003	0.3439	-0.031	-10.0	<b>110.04</b>
0.5	9	9.479	0.026	0.4889	0.011	2.2	<b>97.78</b>
0.625	4	12.862	0.044	0.6651	-0.040	-6.4	<b>106.41</b>
Keskmine alates kontsentratsioonist 0.0098%							<b>104.65</b>



LISA 13.5. CBN mõõtemääramatuse arvutamine

Referentsväärtus:													
CBN_Cref (mg/ml)	0.99427	100%											
U (CBN_Cref) (mg/ml)	0.00039771	100%											
Kontsentratsioon (%)	0.0098%	0.0100%	0.0195%	0.020%	0.039%	0.040%	0.08%	0.10%	0.16%	0.20%	0.31%	0.50%	0.63%
CBN_Cref (mg/ml)	0.000097	0.000099	0.000194	0.000199	0.000388	0.000398	0.000777	0.000994	0.001554	0.001989	0.003107	0.004971	0.006214
U (CBN_Cref) (mg/ml)	3.88E-08	3.98E-08	7.77E-08	7.95E-08	1.55E-07	1.59E-07	3.11E-07	3.98E-07	6.21E-07	7.95E-07	1.24E-06	1.99E-06	2.49E-06
Labori tulemus (%)	0.009245	0.009093	0.022042	0.020634	0.043573	0.040821	0.089125	0.098098	0.170903	0.218846	0.343864	0.488905	0.665091
Labori tulemus (mg/ml)	0.000092	0.000090	0.000219	0.000205	0.000433	0.000406	0.000886	0.000975	0.001699	0.002176	0.003419	0.004861	0.006613
Ref. väärtus (mg/ml)	0.000097	0.000099	0.000194	0.000199	0.000388	0.000398	0.000777	0.000994	0.001554	0.001989	0.003107	0.004971	0.006214
bias	0.000005	0.000009	-0.000025	-0.000006	-0.000045	-0.000008	-0.000109	0.000019	-0.000146	-0.000187	-0.000312	0.000110	-0.000399
S <sub>bias</sub>	0.000005	0.000009	-0.000017	-0.000006	-0.000001	-0.000008	-0.000032	-0.000136	0.000128	-0.000249	-0.000300	0.000257	-0.000013
U (C ref) (k=2) (mg/ml)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000001	0.000002	0.000002
u(Cref) (mg/ml)	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000001	0.000001	0.000001
bias_rel (%)	5.33	9.07	-12.86	-3.17	-11.55	-2.05	-14.08	1.90	-9.38	-9.42	-10.04	2.22	-6.41
u(Cref)_rel (%)=	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
S <sub>bias_rel</sub> (%)	5.33	9.07	-8.54	-3.17	-0.24	-2.05	-4.18	-13.72	8.21	-12.50	-9.65	5.18	-0.21
u(bias)_rel (%) =	6.53	11.11	13.55	3.88	11.55	2.51	14.23	5.91	9.96	10.54	11.48	2.81	6.42
u(Rw) (%) = s_Rw =	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
u(Rw)_rel (%) =	8.04	0.55	8.34	1.42	14.39	7.19	11.68	11.13	15.48	2.32	0.62	6.41	7.72
<b>Tulemus:</b>													
u <sub>c</sub> _rel (%) =	10.4	11.1	15.9	4.1	18.5	7.6	18.4	12.6	18.4	10.8	11.5	7.0	10.0
U <sub>rel</sub> (k=2) (%) =	20.7	22.3	31.8	8.3	36.9	15.2	36.8	25.2	36.8	21.6	23.0	14.0	20.1

## LISA 14. CBN analüüs reaalse proovi võrdluses

Proovi kirjeldus			Teoreetilised andmed			Mõõdetud tulemuste andmed		
Proov	Proovi kirjeldus	Proovi vanus aasta arvult	Teoreetiline tulemus	Teoreetiline tulemus veamääraga alumine piir	Teoreetiline tulemus veamääraga ülemine piir	Mõõdetud tulemus CBN	Mõõdetud tulemus CBN veamääraga alumine piir	Mõõdetud tulemus CBN veamääraga ülemine piir
1	puru	2020	0.00000			0.004330	0.00273	0.00593
2	puru	2020	0.00000			0.004427	0.00279	0.00606
3	puru	2020	0.00000			0.003979	0.00251	0.00545
4	puru	2020	0.01001	0.00791	0.01211	0.004296	0.00271	0.00589
5	puru	2020	0.00701	0.00554	0.00848	0.002061	0.00130	0.00282
6	puru	2020	0.01389	0.01097	0.01681	0.001510	0.00095	0.00207
7	puru	2020	0.00738	0.00583	0.00893	0.001053	0.00066	0.00144
8	puru	2020	0.01214	0.00959	0.01469	0.000834	0.00053	0.00114
9	puru	2020	0.01240	0.00979	0.01500	0.002271	0.00143	0.00311
10	puru	2020	0.00776	0.00613	0.00939	0.002762	0.00174	0.00378
11	puru	2020	0.00			0.018773109	0.01183	0.02572
12	puru	2019	0.00			0.031873824	0.02008	0.04367
13	puru	2019	0.00			0.090681924	0.05713	0.12423
14	puru	2019	0.00			0.073050742	0.04602	0.10008
15	puru	2019	0.00			0.032610893	0.02054	0.04468
16	puru	2021	2.30	1.81700	2.78300	1.03380334	0.65130	1.41631
17	CBD õli	2020	0.00			0.004660182	0.00294	0.00638
18	CBD õli	2020	0.00			0.004025293	0.00254	0.00551
19	CBD õli, full spectrum, raw	2021	0.00			0.020867919	0.01315	0.02859
20	CBD õli, full spectrum, raw	2021	0.00			0.007665671	0.00483	0.01050
21	meetaoline	2020	0.00			0.013670213	0.00861	0.01873
22	vaik	2020	0.00			0.004706111	0.00296	0.00645
23	vaik	2019	0.00			0.000554745	0.00035	0.00076
24	vaik	2019	0.00			0.008669943	0.00546	0.01188
25	vedelik	2021	0.00			0.010516777	0.00663	0.01441
26	e-sigareti vedelik	2020	0.00			0.004931115	0.00311	0.00676
27	e-sigareti vedelik	2020	0.00			0.004714401	0.00297	0.00646
28	vaht	2019	0.00			0.00463763	0.00292	0.00635
29	vedelik etanoolis	2019	0.30	0.23700	0.36300	0.30003011	0.18902	0.41104
30	hele šokolaad	2021	0.00			0.003209627	0.00202	0.00440
31	hele šokolaad	2021	0.00			0.002986256	0.00188	0.00409
32	tume šokolaad	2021	0.00			0.002911617	0.00183	0.00399
33	valge šokolaad	2021	0.00			0.003399953	0.00214	0.00466