

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ**  
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ**  
**О.О.БОГОМОЛЬЦЯ**  
**ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології

**ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**

на тему

**«Розробка та валідація екобезпечної методики визначення  
канабідіолу в дієтичних добавках»**

**Виконала:** студентка 5-го курсу, групи  
10801 фармацевтичного факультету

**Подгорних Анна Віталіївна**

Науковий керівник:

Кандидат хімічних наук, доцент кафедри  
хімії ліків та лікарської токсикології

**Глушаченко Ольга Олександрівна**

Кандидат хімічних наук

**Сиротчук Олександр Андрійович**

Рецензент: **Карпюк Уляна Володимирівна**

**Київ – 2025**

## ЗМІСТ

Перелік умовних скорочень.....	4
Вступ.....	5
Розділ 1. Короткі історичні відомості, добування, фармакокінетичні показники, механізм дії та методи визначення канабідіолу.....	7
1.1. Історичні відомості про канабідіол та його застосування в реальному часі.....	7
1.2. Структура канабідіолу та подібного до нього ТГК.....	9
1.3. Біосинтез канабідіолу.....	11
1.3.1. Синтез канабіноїдів, зокрема канабідіолу в канабісі...	11
1.3.2. Штучний синтез канабідіолу та його дослідження....	13
1.4. Механізм дії канабідіолу.....	15
1.5. Абсорбція канабідіолу при застосування різних методів його введення.....	16
1.5.1. Пероральне введення.....	16
1.5.2. Інгаляційне введення .....	16
1.5.3. Внутрішньовенне введення .....	17
1.5.4. Трансдермальне введення .....	17
1.6. Розподіл канабідіолу.....	17
1.7. Метаболізм канабідіолу.....	18
1.8. Екскреція канабідіолу.....	21
1.9. Взаємодія з іншими ліками.....	21
1.10. Методи визначення КБД.....	21
Розділ 2. Умови до експериментальної частини роботи.....	30
2.1. Визначення фактору утримування CBD при різних співвідношеннях $H_2O$ та $C_2H_5OH$ .....	30
2.2. Аналіз досліджуваних колонок за параметром утримування на них CBD та роздільною здатністю.....	31
2.3. Вибір оптимальної довжини хвилі.....	32

2.4. Вибір оптимальної температури колонки .....	33
2.5. Вибір об'єму інжекції.....	33
Розділ 3. Результати експериментальної частини.....	35
3.1. Результати визначення фактору утримання.....	36
3.2. Результат вибору колонки.....	42
3.3. Результат вибору довжини хвилі.....	50
3.4. Результат вибору температури колонки .....	56
3.5. Результат вибору об'єму інжекції.....	55
Розділ 4. Перевірка придатності розробленої методики.....	57
Розділ 5. Валідація розробленої методики.....	61
5.1. Ідентифікація компонентів у досліджуваних зразках.....	61
5.2. Перевірка специфічності методики.....	88
5.3. Перевірка методики на лінійність.....	92
5.4. Перевірка правильності методики.....	94
5.5. Перевірка збіжності методики.....	96
5.6. Перевірка ефективності екстракції.....	97
5.7. Перевірка внутрішньолабораторної сходимості результатів.....	101
Висновки.....	104
SUMMARY.....	105
Список використаних джерел.....	107

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

**ДД** – дієтичні добавки

**КБД (CBD)** – канабідіол

**ЕМА** – Європейське агентство з лікарських засобів

**FDA** – Управління з продовольства і медикаментів США

**ТГК** – тетрагідроканабінол

**PKS** – полікетидсинтетаза

**ОАС** – циклаза оліветолієвої кислоти

**OLA** – оліветолієва кислота

**GBGA** – каннабігеролінова кислота

**GBGAS** – синтетаза каннабігеролінової кислоти

**GPP** – геранілдіфосфат

**ФК** – фармакокінетика

**T<sub>max</sub>** – час досягнення максимальної концентрації

**t<sub>1/2</sub>** – період напіввиведення

**AUC** – площа під кінетичною кривою

**C<sub>max</sub>** – максимальна концентрація

**RT** – час утримання

**k** – коефіцієнт утримання

**N** – число теоретичних тарілок

**Rs** – коефіцієнт розділення

## ВСТУП

Дієтичні добавки - харчові продукти, які є концентрованими джерелами поживних речовин, у тому числі білків, жирів, вуглеводів, вітамінів і мінералів або інших речовин, що мають поживну або фізіологічну дію і випускаються у вигляді капсул, драже, таблеток, пакетиків, ампул з рідиною, флаконів для інфузій або інших форм рідини та/або порошку, призначених для прийому в невеликих і конкретних кількостях [1].

Дієтичні добавки (ДД) є популярним засобом самолікування. Вони допомагають вирішити такі проблеми, як авітаміноз, низький імунітет, дефіцит мікроелементів, нервові напруження та надмірна вага.

Сьогодні стали популярними добавки з одним із 120 канабіноїдів – канабідіолом (КБД). Він має протисудомні, заспокійливі, протиблювотні, антипсихотичні та анальгезивні властивості. Але не дивлячись на хороші властивості, є також і побічні ефекти: сухість у роті, втома або сонливість, зниження артеріального тиску, діарея, зміни апетиту та ваги, тощо.

В Україні та за кордоном продукти з канабідіолом не проходять якогось особливого контролю, тому з розробкою кожної добавки та її виходом на ринок країни, збільшуються ризики появи небажаних реакцій. Тож все частіше з'являються фальсифіковані ДД, у яких заявлені речовини в складі не відповідають дійсності. Наприклад, зазначеної в складі речовини, насправді, може бути менше за кількістю, вона може бути взагалі відсутньою, або, у випадку з КБД, може бути заміненою, так як КБД містить подібну структуру з ТГК. А він є забороненою речовиною, проте через вплив різних факторів може з'явитися у ДД.

Тому актуальним є контроль безпечності і створення методик визначення канабідіолу за допомогою фармацевтичної хімії у дієтичних добавках, що є доступними на ринку України.

**Мета:** розробити і валідувати екобезпечну методику визначення канабідіолу в дієтичних добавках, встановити вміст канабідіолу в окремих дієтичних добавках присутніх на ринку України.

**Завдання:**

1. Проаналізувати літературні джерела щодо фармакологічних властивостей канабідіолу, методик його визначення.
2. Розробити методику хроматографування та екстракції канабідіолу у випадку визначення в дієтичних добавках.
3. Провести валідацію методики визначення канабідіолу в дієтичних добавках.
4. Апробувати розроблену методику на дієтичних добавках, що доступні на ринку України.

# РОЗДІЛ 1. КОРОТКІ ІСТОРИЧНІ ВІДОМОСТІ, ДОБУВАННЯ, ФАРМАКОКІНЕТИЧНІ ПОКАЗНИКИ, МЕХАНІЗМ ДІЇ ТА МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ КАНАБІДІОЛУ

## *1.1. Історичні відомості про Cannabis sativa та його застосування у реальному часі*

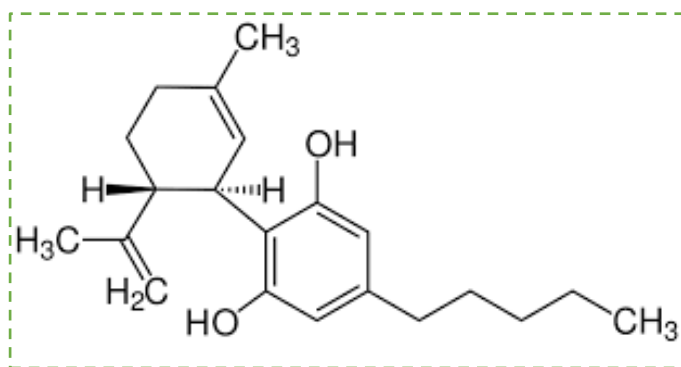
*Cannabis sativa* L. - це дводомна однорічна рослина, що належить до родини Cannabaceae. Має прямостояче стебло, заввишки до 2 м; супротивні, черешкові, пальчастороздільні листки та одностатеві квітки зеленувато-жовтого кольору [2].

Родом з Центральної Азії і має давню історію. Перші дані про використання цієї рослини датуються 2500 роком до нашої ери [3].

В Європі її почали вирощувати в 14-15 століттях, і протягом цього часу вона відіграла важливу роль у сільському господарстві та сприяла економічному зростанню. У західному світі її використання в медицині зросло в 19 столітті. У 18-19 століттях рослину вирощували по всьому світу як джерело клітковини, продуктів харчування та олії [4].

Відомо, що коноплі посівні містять у собі більше 500 хімічних сполук, з яких понад 120 є біологічно активними хімічними молекулами [5]. Основними складовими конопляної олії є фітоканабіноїди, такі як канабідіол (КБД), тетрагідроканабінол (ТГК) і терпеноїди [6].

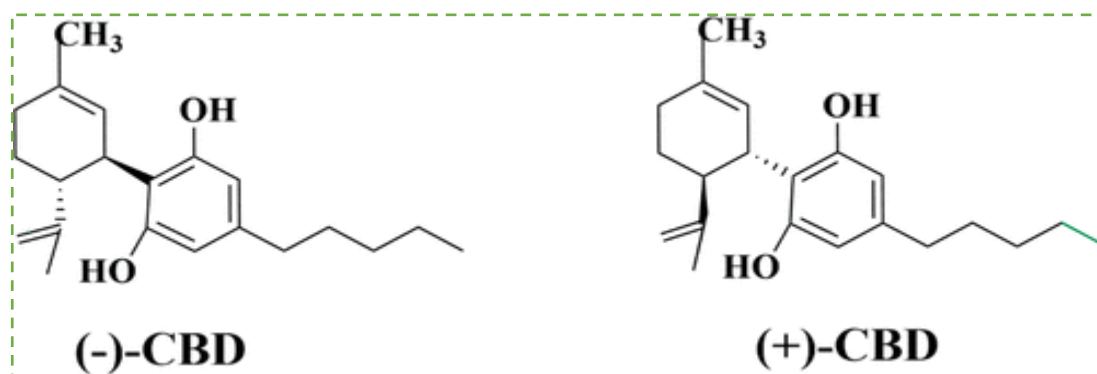
**КБД** — це речовина, яка виділяється з коноплі, але не має наркотичних/психоактивних властивостей. Дивлячись на формулу можна побачити, що канабідіол утворений п-цименом, і похідним алкілрезорцину, оліветолом (рис.1.1.1).



**Рис.1.1.1.** Структурна формула КБД

КБД вперше був виділений з мексиканської марихуани Роджером Адамсом та з індійської марихуани Олександром Тоддом у 1940 році. На основі хімічної деградації та кореляції з канабінолом було запропоновано загальну структуру. Дивно, але протягом майже 25 років не було повідомлень про подальші дослідження [7].

Згодом, у 1977 році, Джонс та інші повідомили про дві хіральні структури CBD, головною відмінністю яких була конформація бічного ланцюга пентилу. У рослинах цей канабіноїд існує у формі (-)-CBD (рис.1.1.2).



**Рис. 1.1.2.** Молекулярні структури (-)-CBD і (+)-CBD

Як зазначається, КБД відіграє важливу роль у боротьбі з тривожністю, має антипсихотичну, знеболювальну, протизапальну та снодійну дію, а також застосовується у лікуванні таких захворювань, як епілепсія та шизофренія, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона та для полегшення хронічного

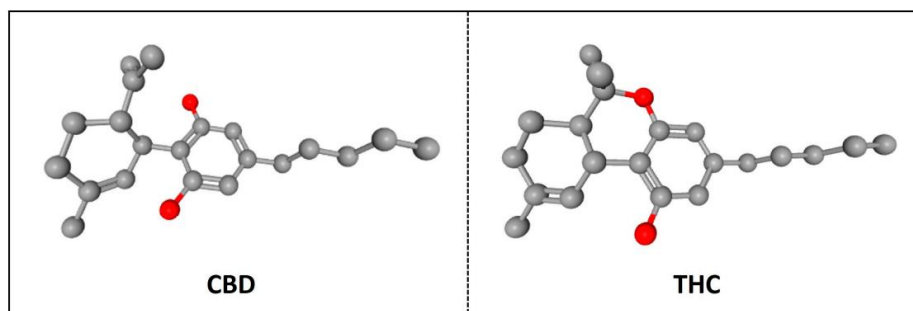
болю. Однак доступ до КБД був обмежений через його поєднання з ТГК. У 2018 році Європейське агентство з лікарських засобів (ЕМА) та Управління з контролю за продуктами і ліками США (FDA) схвалили препарат на основі КБД «Епідіолекс» як допоміжний засіб для лікування нападів, пов'язаних із синдромом Леннокса-Гасто та синдромом Драветта. Це було схвалено послідовно [8,9].

Наразі КБД схвалений для лікування судомних розладів у дітей віком від 2 років і старше. Поточні клінічні випробування досліджують використання КБД для лікування розладів пов'язаних з настроєм, таких як тривожність, хронічний біль та запальні захворювання, а також вивчаються його протипухлинні властивості [10].

Правовий статус в Україні - КБД виключений зі списку наркотичних і психотропних засобів, а отже, є на 100% легальною речовиною [11].

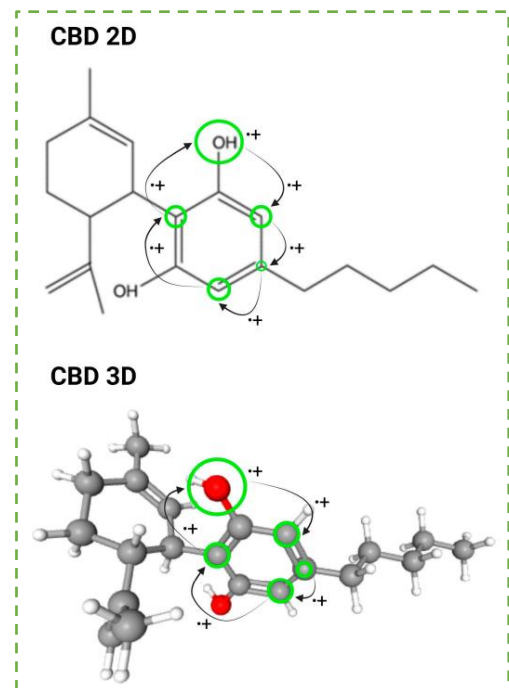
### ***1.2. Структура канабідіолу та подібного до нього ТГК***

КБД містить 21 атом вуглецю, має точну хімічну формулу з ТГК -  $C_{21}H_{30}O_2$ , молекулярну масу 314,464 г/моль і складається з циклогексенового кільця, фенольного кільця і пентильного бічного ланцюга. Терпенове і фенольне кільця розташовані в площині, приблизно перпендикулярній один одному. Структурно між КБД і  $\Delta^9$ -ТГК існує вирішальна відмінність: CBD містить гідроксильну групу, тоді як  $\Delta^9$ -ТНС містить циклічне кільце (Рис. 1.2.1). Слід зазначити, що насичений екзоциклічний подвійний зв'язок С-С перешкоджає перетворенню КБД на психоактивний  $\Delta^9$ -ТГК [12].



**Рис. 1.2.1.** Тривимірні хімічні структури CBD і  $\Delta^9$ -THC. Сірі сфери представляють атоми вуглецю, а червоні сфери представляють атоми кисню. Невеликі відмінності в молекулярних структурах цих двох сполук мають значний вплив на їх фармакологічні властивості: КБД має кілька стабільних резонансних структур з потенційною антиоксидантною дією завдяки вільним катіон-радикалам, що утворюються в результаті реакцій знешкодження вільних радикалів. Антиоксидантна реакція розподіляє неспарені електрони в молекулі КБД переважно на ефірні та алкільні групи і бензольне кільце. Цей резонанс стабілізує вільний радикал КБД і знижує його реактивність, перетворюючи його на більш довгоживучий і менш реактивний вид вільних радикалів, ніж вихідний радикал-субстрат (Рис.1.2.2) [13].

**Рис. 1.2.2.** Структура CBD. Атоми Карбону зображені сірим кольором, атоми Оксигену – червоним, а атоми Гідрогену атоми білого кольору. Розташування безкатіонних радикалів у CBD показано зеленими колами, а стрілки вказують на резонанс електронів у молекулі як на 2D, так і на 3D зображеннях.



### 1.3. Біосинтез канабідіолу

#### *1.3.1. Біосинтез канабіноїдів, зокрема канабідіолу в канабісі*

Канабіноїди біосинтезуються в залозистих пучках (трихомах) жіночих квіток або «бруньках марихуани» [14].

На нижній стороні пиляків, листках та приквітках чоловічих квіток також розташовані трихоми. Трихома в перекладі з грецької означає «волосся». Вони класифікуються як сидячі, стеблові або цибулинні. Цибулинні трихоми є найменшими за розміром і виробляють канабіноїди в обмеженій кількості. Інші морфології відповідають майже за все виробництво канабіноїдів. Сидячі трихоми, які підтримуються короткою ніжкою, мають кулясту головку, що складається з багатоклітинного диска секреторних клітин з підшкірною порожниною для зберігання метаболітів. Стеблоподібні трихоми характеризуються злегка збільшеною кулястою головкою, яка піднімається над поверхнею епідермісу на кілька сотень мікронів. Але досі незрозумілий відносний внесок як сидячих, так і стеблових трихом у синтез канабіноїдів [15].

На молекулярному рівні біосинтез канабіноїдів у канабісі каталізується в три основні етапи (рис.1.3.1.1.). На першому етапі він каталізується полікетидсинтетазою (PKS) типу III і циклазою оліветолієвої кислоти (OAS), яка перетворює капроїл-Co-A і три малоніл-Co-A в оліветолієву кислоту (OLA). На другому етапі ароматична ізопреніл трансфераза (синтетаза каннабігерольної кислоти, GBGAS) каталізує ізопренілювання геранілдифосфату (GPP) і OLA з утворенням каннабігерольної кислоти (CBGA). На третьому - різні канабіноїдні синтази каталізують часткову окислювальну циклізацію монотерпенів CBGA до відповідних канабіноїдних кислот, таких як  $\Delta^9$ -THCA, CBDA і CBCA, відповідно  $\Delta^9$ -THC, CBD і CBC, які утворюються шляхом неферментативного декарбоксілювання [16,17].

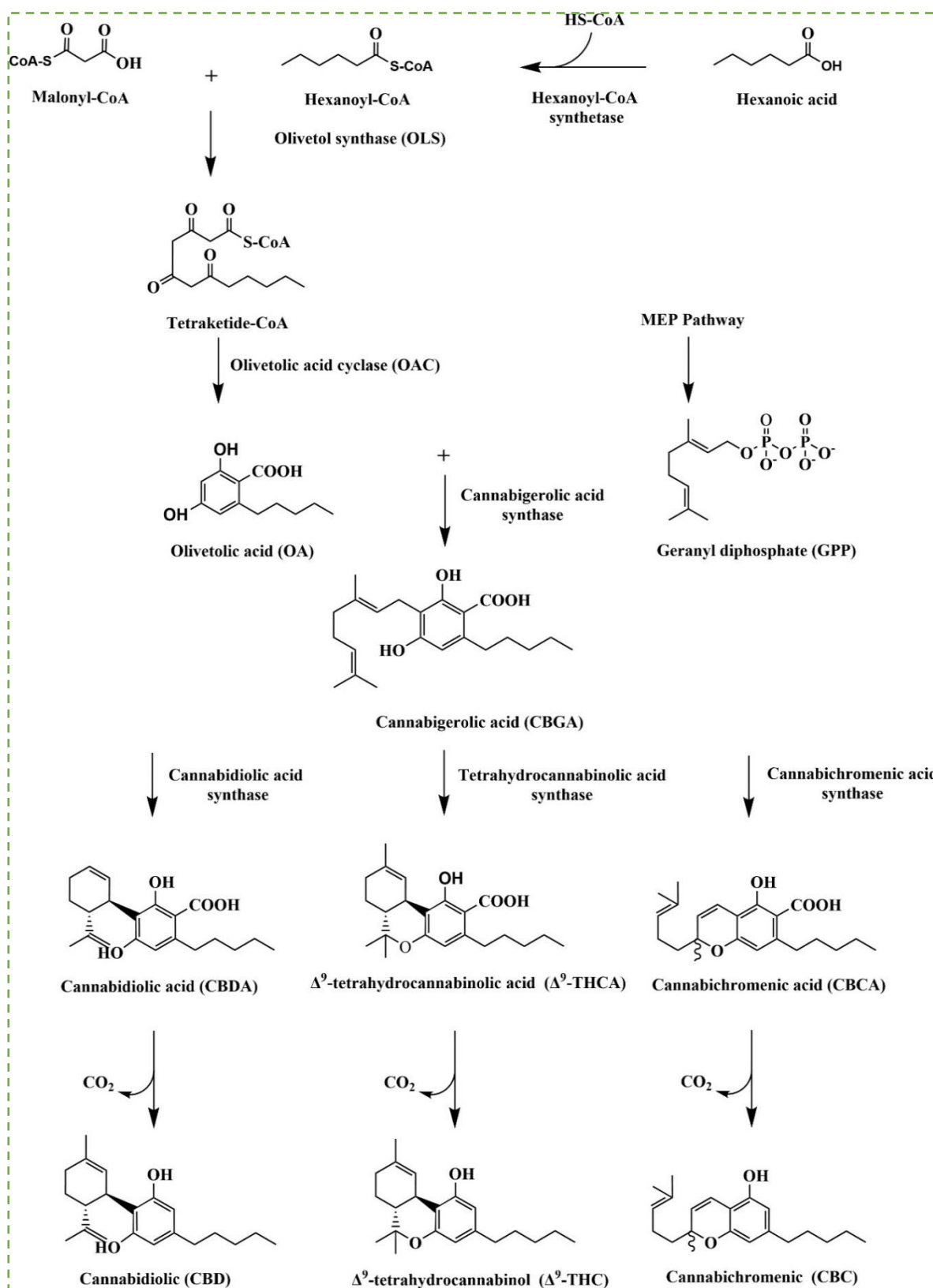


Рис.1.3.1.1. Шлях біосинтезу канабіноїдів у канабісі

### ***1.3.2. Штучний хімічний синтез канабідіолу та його дослідження***

Ще в 1965 році Мечулам і Гаоні запропонували хімічний синтез рацемічного ( $\pm$ )-КБД. Ця схема дозволила вперше отримати рацемічний ( $\pm$ )-КБД з цитралю А шляхом деметилювання (рис. 1.3.2.1.A). Згодом, у 1967 році, Петрзілка та ін. запропонували метод, заснований на зворотному ретросинтетичному розщепленні С-С зв'язку між резорциновим китайським лімоненом, що дозволило здійснити прямий стереоселективний синтез (-)-КБД з оліветолу та оптично чистого  $\Delta$ -2,8-ментадієн-1-олу (рис. 1.3.2.1.B). Однак через низьку регіоселективність цього методу Рікардс і Роннеберг у 1984 році синтезували (-)-CBDD використовуючи BF<sub>3</sub> як каталізатор. У 2006 році Кобаясі синтезував (-) CBD шляхом поєднання йодокетонів з соляними комплексами ціаніду міді та ціанідно-олівіновим диметиловим ефіром. З іншого боку, (-)-CBD можна краще синтезувати, додаючи різні реагенти олеїнових металів до циклогексенілмоноацетату та використовуючи нікель як каталізатор (рис. 1.3.2.1.C). У 2018 році Ліхі та ін. повідомили про відновлення кетонів Корі-Бакші-Шибата, перегрупування Ірланда-Клезена та Ru-каталізовану метатезу замикання кільця, тобто комбінацію трьох визнаних реакцій, продемонстровано для отримання енантіомеру (-)-CBD (рис. 1.3.2.1.D) [18,19,20].



#### *1.4. Механізм дії канабідіолу*

CBD діє на ендоканабіноїдну систему та декілька нейронних систем. Механізм дії канабіноїдів був з'ясований завдяки відкриттю двох ендоканабіноїдних рецепторів, названих канабіноїдними рецепторами типу 1 (CB1) і канабіноїдними рецепторами типу 2 (CB2), що підтверджено виділенням двох ендогенних лігандів 2-арахідоноїлгліцерину(2-AG) і нараквідоноїлу-етаноламід(AEA). Таким чином, взаємодія ендогенних лігандів з ендоканабіноїдними рецепторами відповідає за фармакологічні ефекти канабіноїдів [21].

CB1 широко поширений по всьому організму, особливо в пресинаптичних терміналах центральної нервової системи, в областях, пов'язаних з моторним контролем, навчанням, пам'яттю, пізнанням і емоціями, і відповідає за психотропні ефекти канабіноїдів. CB2 в основному зустрічається в імунній системі і в специфічних областях ЦНС, таких як мікроглія і постсинаптичні області; CB2 може відігравати певну роль в регуляції вивільнення цитокінів з імунних клітин і їх міграції, пригніченні запалення і сприйнятті/регуляції болю.

Ендоканабіноїди діють як атипові нейротрансмітери на відміну від класичних нейротрансмітерів, втручаючись у передачу інформації від пресинаптичної та постсинаптичної терміналей як ретроградні синаптичні передавачі. Дія завершується поглинанням ендоканабіноїдів у пресинаптичній терміналі. Їхня активація сприяє зміні рівня низки нейротрансмітерів, включно з ацетилхоліном, дофаміном,  $\gamma$ -аміномасляною кислотою (ГАМК), глутаматом, серотоніном, норадреналіном та ендогенними опіоїдами в нормальних фізіологічних умовах [22].

### *1.5. Абсорбція канабідіолу при різних методах введення*

Оскільки КБД вивчався при різних шляхах введення, його фармакокінетичний (ФК) аналіз є більш складним, ніж для інших терапевтичних засобів. Окрім традиційних перорального (наприклад, капсули) та парентерального (внутрішньовенного) шляхів введення, КБД також вивчався як інгредієнт сублінгвальних крапель, спреїв для слизової оболонки порожнини рота та харчових продуктів, а також як інгалянт у вигляді аерозолів, небулайзерів, парів та тютюну. Всі ці різні форми та шляхи введення мають різні тенденції до адсорбції та розподілу, що впливає на вимірювання інших фармакокінетичних властивостей сполуки.

#### *1.5.1 Показники при пероральному застосуванні*

Час досягнення максимальної концентрації канабідіолу ( $T_{max}$ ) становить від 1 до 6,13 години після прийому, а період напіввиведення ( $t_{1/2}$ ) оцінюється у 18-32 години [23].

КБД показує високу варіабельність абсорбції, на яку впливає споживання їжі, а особливо багато жиру, збільшуючи площу під кривою (AUC) і максимальну концентрацію ( $C_{max}$ ) [24].

Гендерні відмінності вказують на те, що абсорбція вища у жінок, ніж у чоловіків, що, можливо, пов'язано з відмінностями в об'ємі розподілу, відсотком жиру в організмі або гормонами, що ставить під сумнів єдину стратегію дозування. Крім того, у пацієнтів з помірною або тяжкою печінковою недостатністю показники AUC канабідіолу в 2,5-5,2 рази вищі, ніж у пацієнтів з нормальною функцією печінки [25].

#### *1.5.2. Інгаляційний метод введення.*

Вдихання призводить до швидкого досягнення пікових концентрацій у плазмі (протягом 3-10 хвилин) і вищих максимальних концентрацій

порівняно з пероральним прийомом, в результаті чого біодоступність становить 11%-45% (в середньому 31%). Доставка шляхом інгаляції або через слизову оболонку порожнини рота мінімізує або зменшує екстенсивний метаболізм першого проходження, пов'язаний з пероральним прийомом канабіноїдів [26].

### *1.5.3. Внутрішньовенне введення*

Найвищі концентрації КБД у плазмі досягалися при внутрішньовенному введенні: після внутрішньовенного введення 20 мг міченого дейтерієм КБД, середня концентрація в плазмі становила 686 нг/мл (через 3 хвилини після введення) і знижувалася до 48 нг/мл через 1 годину [27].

### *1.5.4. Трансдермальне введення*

Гідрофобна природа канабідіолу обмежує його дифузію через водний шар шкіри, і для поліпшення проникності КБД використовували різні стратегії, включаючи хімічні підсилювачі проникності, мікроемульсії та фізичні підсилювачі. Цей шлях введення дозволяє уникнути метаболізму першого проходження, що призводить до вищої біодоступності навіть у присутності підсилювачів, і більш тривалої концентрації в плазмі порівняно з іншими шляхами доставки [28].

Кількість опублікованих досліджень трансдермальних систем доставки канабіноїдів обмежена, але гелі та креми для місцевого застосування КБД продемонстрували свою ефективність у дослідженнях на тваринах [29].

## **1.6. Розподіл канабідіолу**

КБД швидко розподіляється у васкуляризованих органах, таких як легені, серце, мозок і печінка, а потім врівноважується в менш васкуляризованих тканинах. Розподіл може залежати від складу тіла, розміру тіла та медичних станів, які впливають на проникність гематоенцефалічного бар'єру [30].

При тривалому застосуванні накопичення канабідіолу може відбуватися в жировій тканині. Подальше вивільнення та перерозподіл (наприклад, втрата ваги) може призвести до того, що активність канабіноїду зберігатиметься протягом декількох тижнів після прийому [31].

Зв'язування CBD з білками плазми, переважно з ліпопротеїнами, подібне до зв'язування THC і становить близько 97%. З цієї причини споживання CBD може спричинити підвищення концентрації препаратів, які одночасно вводяться, витісняючи їх із зв'язку з білками і викликаючи можливі побічні ефекти [32].

Об'єм розподілу ( $V_d$ ) КБД є високим  $V_{d\beta} \sim 32 \text{ л кг}^{-1}$  (розрахований після внутрішньовенного введення) і  $V_{dss} 3,4 \text{ л кг}^{-1}$  (розрахований після інгаляції), відповідно [33].

### ***1.7. Метаболізм канабідіолу***

КБД метаболізується в печінці. Метаболічна трансформація є важливим аспектом, який слід враховувати при вивченні токсичності та потенційної генотоксичності його метаболітів (рис. 1.7.1.). Канабідіол є переважним субстратом для оксидаз зі змішаною функцією CYP450 і зазнає значного гідроксилювання в різних положеннях всередині молекули [34].

Декілька досліджень *in vitro* показали, які ферменти цитохрому P450 в основному беруть участь у перетворенні. Гідроксилювання алілових кислот (рис.1.7.2.) в основному здійснюється CYP2C19 та CYP3A4, тоді як гідроксилювання алкілів відбувається за участю більшої кількості ферментів: CYP3A4, CYP3A5, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9 і CYP2D6 [35].

Дані фармакокінетики метаболіту *in vivo*, опубліковані Тейлором та ін. та додатково уточнені в експериментах *in vitro* Бірсом та ін., свідчать про досить складний окислювальний метаболізм та метаболізм II фази CBD, який складається в основному з трьох основних шляхів: окислення кільця I,

окислення кільця II, і глюкуронізація в кільці II (рис. 8). Також може відбуватися сульфатування видів КБД, але такі кон'югати невідомі [36].

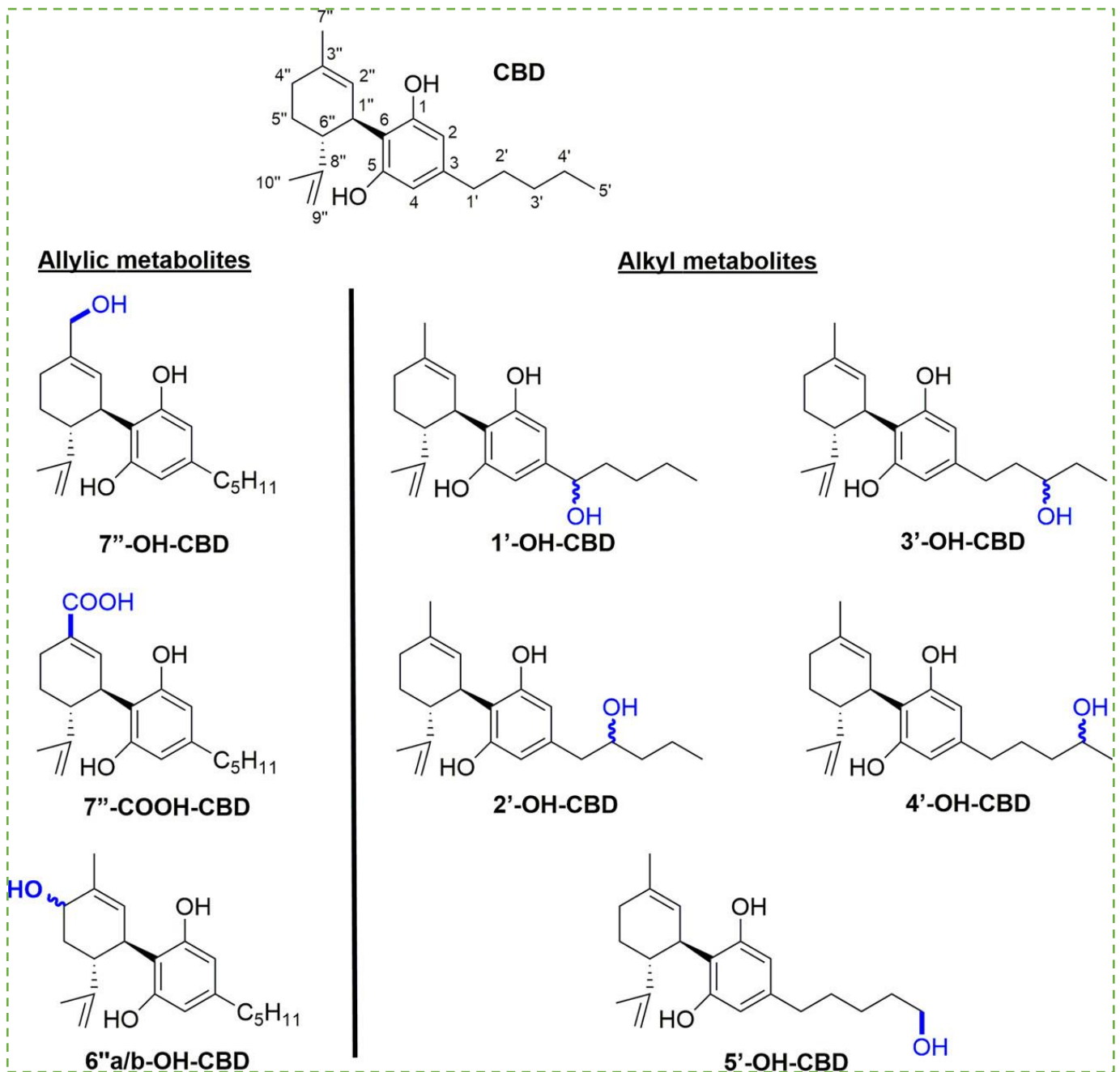
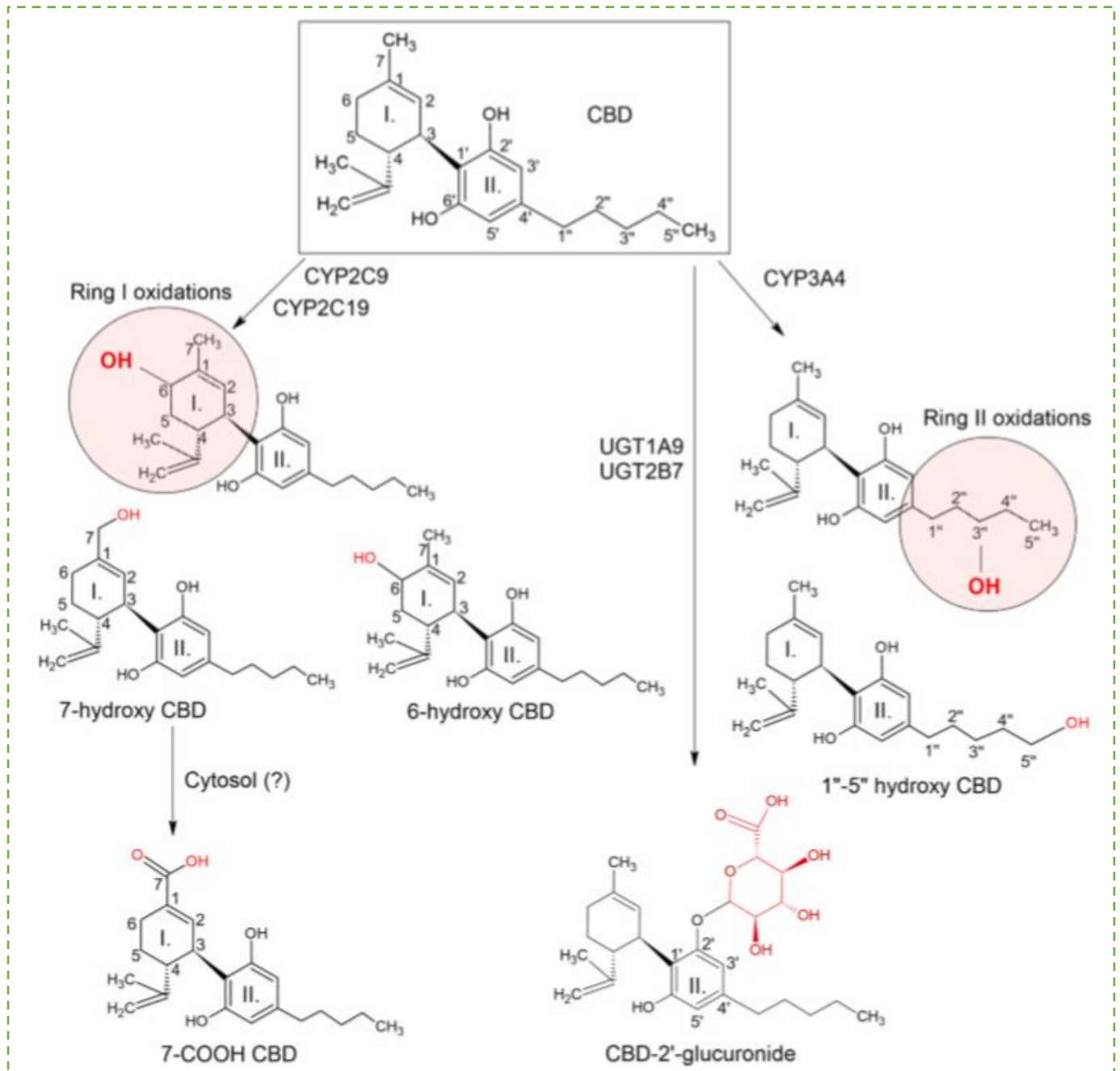


Рис. 1.7.1. Основні метаболіти канабідіолу



**Рис.1.7.2.** Схематичне представлення метаболізму CBD, що демонструє три основні шляхи: окислення в кільці I, окислення в кільці II та глюкуронізацію в кільці II

### ***1.8. Екскреція канабідіолу***

Період напіввиведення ( $t_{1/2}$ ) КБД варіюється і залежить, зокрема, від способу введення. Загалом,  $t_{1/2}$  при пероральному застосуванні за допомогою олії або спрею для порожнини рота становить близько 2 годин. При потраплянні внаслідок куріння або хронічному прийомі  $t_{1/2}$  значно довший і становить 24 -31 година і 2-5 днів відповідно. КБД має сильний ефект першого проходження, але значна частина канабіноїдів виводиться в незміненому вигляді з фекаліями, а також з сечею у вигляді незміненого та глюкуронізованого КБД. Це свідчить про те, що значна частина дози КБД не всмоктується, що узгоджується з повідомленнями про низьку біодоступність [37,38].

### ***1.9. Взаємодія з іншими ліками***

КБД може взаємодіяти з багатьма безрецептурними та рецептурними препаратами, оскільки діє на ізоформи цитохрому P450 (ферменти, що беруть участь у метаболізмі багатьох ліків). CBD пригнічує CYP3A4 і CYP2D6, збільшуючи концентрацію інших препаратів через посилення метаболізму, таким чином перебільшуючи їхню дію і призводячи до серйозних побічних ефектів [39].

### ***1.10. Методи визначення КБД***

Сучасний ринок дієтичних добавок із вмістом канабідіолу (КБД) стрімко розширюється, що потребує нових та сучасних методів контролю якості цих продуктів. Точне і надійне визначення КБД потрібне не лише для підтвердження його наявності, а й для забезпечення точного дозування, що безпосередньо впливає на ефективність і безпеку добавок.

В даному розділі була проаналізована низка статей про методи визначення канабідіолу. Це було зроблено з такою ціллю:

- 1) Для порівняння існуючих методів, тому що розгляд найпоширеніших методик дозволяє провести порівняльний аналіз, щоб застосувати переваги та недоліки кожного з них, а також оцінити ефективність і застосовність у різних умовах.
- 2) Для вибору оптимальних умов для розробки - аналізуючи відомі методи, можна виокремити найкращі параметри, які можна використовувати у власній методиці. Це стосується вибору колонок, рухомих фаз, налаштування приладів, типів детекторів та інших важливих елементів.
- 3) Обґрунтувати необхідність нової методики. Огляд окремих методів і їх обмеження демонструє, що жоден з них не є універсальним. Це підтверджує необхідність в новій методиці, яка поєднує в собі найкращі рішення та забезпечує точніші й більш надійні результати для визначення КБД у сучасних ДД.

Тому можна виокремити ті методи, які найбільше всього застосовують у дослідженнях, через їх високу ефективність.

*Перший метод* – це рідинна хроматографія у поєднанні з детектором, що забезпечує розділення та кількісне визначення компонентів суміші. Основний принцип цього методу полягає в тому, що різні компоненти суміші розділяються під час проходження через хроматографічну систему, так як по-різному взаємодіють з рухомою і нерухомою фазами. Потім потрапляють у детектори, які відіграють ключову роль у цьому процесі, перетворюючи фізико-хімічні властивості розділених компонентів у електричні сигнали, які можуть бути зареєстровані та оброблені. Існує широкий спектр детекторів, кожен з яких має свої переваги та обмеження, залежно від типу аналізованих сполук та вимог до чутливості та селективності аналізу. Приклади таких методів описано в таблиці 1.10.1 (№1-9) [40-48].

*Другий* – газова хроматографія в поєднанні з мас-спектрометрією (GC-MS). Така комбінація дозволяє не тільки розділяти складні суміші, а й точно ідентифікувати кожен компонент за допомогою мас-спектрів. Оскільки канабіноїди можуть бути термічно нестабільними або важко леткими, часто перед аналізом виконується дериватизація для полегшення процесу аналізу. Приклади такого методу визначення наведені в таблиці 1.10.1. (№10-12) [49-51].

Також є й інші методи за допомогою яких можна визначити вміст канабідіолу у різних продуктах, але інформація про них обмежена: ЯМР-спектроскопія, УФ-спектрофотометрія, ІЧ-спектроскопія.

- 1) ЯМР - спектроскопія хоч і має високу точність, але висуваються високі вимоги до чистоти зразків та обладнання надто дороге.
- 2) УФ - спектрофотометрія дозволяє визначати кількість CBD на основі його здатності поглинати УФ-випромінювання при певних довжинах хвиль. Проте наявність домішок значно впливає на точність вимірювання.
- 3) Інфрачервона спектроскопія - може бути використана для ідентифікації функціональних груп у молекулі CBD.

№	Метод аналізу	Хромат. колонка	Рухома фаза	Налаштування приладу	Розчинник	Межа детектування	Особливості розділення
1	Рідинна хроматографія	l = 0,15 м, Ø = 4,6 мм t° = 45° <i>Стаціонарна фаза:</i> етилен-зв'язаний фенілгексилсиліл силікагель (2,5 мкм)	<i>А:</i> розчин мурашиної кислоти R <i>Б:</i> ацетонітрил R	<i>Швидкість потоку:</i> 1,2 мл/хв <i>Виявлення:</i> спектрофотометр при 275 нм <i>Автосамплер:</i> встановлений на 5 °С <i>Ін'єкція:</i> 10 мкл	<i>Розчинники:</i> етанол (96%), метанол, ацетонітрил	-	-
2	Високоєфективна рідинна хроматографія	l = 10 м, Ø = 2,1 мм t° = 25° <i>Стаціонарна фаза:</i> core-shell частинки	<i>А:</i> розчин мурашиної кислоти у воді <i>Б:</i> розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі	<i>Швидкість потоку:</i> 0,6 мл/хв <i>Діапазон детекції:</i> 200–800 нм, основна довжина хвилі — 210 нм <i>Ін'єкція:</i> 5 мкл	<i>Розчинник:</i> Метанол/гексан у співвідношенні 9:1	0,3 мкг/мл	<i>Час аналізу:</i> 13 хв <i>Коефіцієнт симетрії (РРМ):</i> перевищує 990

3	ВЕРХ з діодним матричним детектором (HPLC-DAD)	Колонка: Agilent Poroshell 120 SB-C18 l = 75 мм, Ø = 3 мм t° = 30° Розміром частин: 2,7 мкм	А: Водний розчин амоній ацетату В: метанол	Швидкість потоку: 0,7 мл/хв t° зразка = 15 °С Довжина хвили детектора: 235 нм	Розчинник: суміш метанолу і води у співвідношенні 65:35	0,25 мкг/мл	-
4	Ультрависокоєфективна рідинна хроматографія з фотодіодним мас-спектрометром (UHPLC-UV-MS)	Колонка: Waters Cortecs UPLC C18 l = 0,10 м, Ø = 2,1 мм t° = 35° Розміром частин: 1,6 мкм	А: вода з 0,05% мурашиною кислотою В: ацетонітрил з 0,05% мурашиною кислотою	Швидкість потоку: 0,25 мл/хв t° зразка = 15 °С Довжина хвили детектора: 220 нм	Розчинник: суміш ацетонітрилу і метанолу в співвідношенні 80:20	0,2 мкг/мл	Канабіноїди були розділені за 10 хвилин із високою відтворюваністю та низькою похибкою (відносне стандартне відхилення <2,5%)
5	Метод зворотно-фазової вискоєфективної рідинної хроматографії RP-HPLC	Колонка: SOLAS™ l = 0,15 м, Ø = 4,6 мм t° = 25° Розміром частин: 5 мкм Стаціонарна фаза: C18	Суміш ацетонітрилу і води у співвідношенні 75:25	Швидкість потоку: 1,5 мл/хв Об'єм ін'єкції: 10 мкл Довжина хвили детектора: 214 нм	Розчинник: ацетонітрил	-	Метод валідований для регулярного контролю якості продуктів на основі коноплі

6	Метод високоефективної рідинної хроматографії з діодно-матричним детектуванням HPLC/DAD	Колонка: Purospher® Star RP18e l = 0,15 м, Ø = 4,6 мм t° = 30° Розміром частин: 5 мкм Стаціонарна фаза: C18	Суміш ацетонітрилу та води. Концентрація ацетонітрилу змінювалася від 50% до 80%	Швидкість потоку: 1,5 мл/хв Об'єм ін'єкції: 10 мкл Довжина хвили детектора: 220 нм Час аналізу для одного зразка: 31 хв	Розчинник: метанол	-	Час утримання CBD склав 15,9 хв
7	Високоефективна рідинна хроматографія з діодно-матричним детектуванням HPLC-DAD	Колонка: Spheri-5 типу C18 l = 0,25 м, Ø = 4,6 мм t° = 25° Розміром частин: 5 мкм	Суміш ацетонітрилу та 0,5% оцтової кислоти у співвідношенні 66:34	Швидкість потоку: 1,0 мл/хв Об'єм ін'єкції: 10 мкл Довжина хвили детектора: 220 і 240 нм	Розчинник: ацетонітрил	1,94 мкг/мл	Метод валідований і орієнтований на мінімальне використання реагентів і зразків, що відповідає вимогам «зеленої» хімії
8	Високоефективна рідинна хроматографія ВЕРХ	Колонка: Ascentis Express C18 l = 0,15 м, Ø = 3,0 мм t° = 25°	Фаза А: 0.1% мурашина кислота у воді з додаванням амоній форміату (2, 5, 8 мМ). Фаза В: 0.1% мурашина кислота в ацетонітрилі	Швидкість потоку: від 0,3 до 0,6 мл/хв Об'єм ін'єкції: 6 мкл Довжина хвили детектора: 210 нм	Розчинник: метанол	-	Використання дизайну експерименту (DoE), що включає побудову центрального композиційного дизайну з обличчям по центру (CCF) для оптимізації

							розділення та мінімізації кількості експериментів
<b>9</b>	Ультрависокоефективна рідинна хроматографія з діодною матрицею (UHPLC-DAD)	Колонка: Acquity UPLC HSS C18 SB l = 0,10 м, Ø = 2,1 мм t° = 45° Розміром частин: 1,8 мкм	Фаза А: метанол Фаза В: вода з 0,1% мурашиною к-тою (50/50) Градiєнтний режим: стартова фаза А — 65%, збільшується до 95% за 16 хвилин	Швидкість потоку: 0,35 мл/хв Об'єм ін'єкції: 10 мкл Длина хвилі детектора: 211 нм	Розчинник: метанол і суміш метанол/вода (50/50)	-	Чіткість розділення підвищена за рахунок оптимізації градiєнтного режиму і точної настройки температури колонки, що знижує ймовірність накладок сигналів.
<b>10</b>	Газова хроматографія/мас-спектрометрія	l = 30 м, Ø = 0,25 мм t° = 120° Стационарна фаза: 35% дифеніл і 65% диметилсилікон	Гелій	Швидкість потоку: 1,3 мл/хв t° ін'єкції: 275°	Розчинник: метанол, ізопропанол	-	Час аналізу: 30 хв Особливості: завдяки мас-спектрометрії, ідентифікація відбувається з високою точністю

11	Метод газової хроматографії з мас-спектрометрією (GC-MS)	Колонка: Zebtron ZB5-MSi l = 30 м, Ø = 0,25 мм t° початкова = 60° Товщина плівки: 0,25 мкм	Гелій	Швидкість потоку: 1 мл/хв t° джерела іонів = 225° t° інжектора = 310° Об'єм ін'єкції: 1 мкл Іонізація електронів з енергією 70 еВ Діапазон детекції 40–650 м/з	Розчинник: ацетонітрил, толуол та дихлорметан	-	Аналіз дозволяє отримати чіткі піки на хроматограмі для ацильованих похідних, забезпечуючи симетричне розділення без утворення побічних ізомерів
12	Метод газової хроматографії з мас-спектрометрією (GC-MS)	Колонка: HP-5MS l = 30 м, Ø = 0,25 мм t° початкова = 180° t° проміжна = 250° t° кінцева = 325° Товщина плівки: 0,25 мкм	Водень	Швидкість потоку: 1,6 мл/хв t° інжектора = 280° Об'єм ін'єкції: 1 мкл	Розчинник: метанол	6-8 мкг/мл	-

Табл.1.10.1. Методи визначення КБД

Але всі ці методи давно вже відомі, тому актуальним є розробка нової методики, через низку факторів:

- 1) Актуалізація вимог до точності та безпеки. Сучасні вимоги до аналітичних методик передбачають їхню високу точність, відтворюваність, а також екологічність і безпеку. Нові технології дають можливість покращити ці характеристики, що робить актуальною розробку сучасної методики визначення КБД, яка відповідає б новим стандартам.
- 2) Особливості нових матриць продукту. Сучасний ринок дієтичних добавок постійно змінюється, і з'являються нові типи продукції, для яких існуючі методи можуть бути недостатньо чутливими чи специфічними. Нова методика дозволяє правильно визначати КБД у різних продуктах із різним складом.
- 3) Підвищення точності та чутливості. Деякі з відомих методів не забезпечують достатньо низької межі детектування для точного визначення малих концентрацій КБД, що може бути критичним для різних добавок. Нова методика дозволяє підвищити аналіз чутливості та виявити навіть незначні компоненти КБД.

## РОЗДІЛ 2. УМОВИ ДО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ РОБОТИ

### 2.1 Визначення фактору утримування CBD при різних співвідношеннях $H_2O$ та $C_2H_5OH$ .

Для дослідження було взято зразок олії канабідіолу GeNo, 500mg.

Для приготування досліджуваного розчину було взято 0,2 мл олії GeNo. Цей об'єм було поміщено у колбу об'ємом 10 мл та доведено розчинником до мітки. Як розчинник було застосовано ізопропанол. Потім колбу обережно стряхнули для кращого перемішування. Після даних маніпуляцій досліджуваний розчин було поміщено у віалу для подальшого дослідження.

Дослідження проводилось на рідинному хроматографі **AGILENT 1100**, на трьох різних колонках при різних концентраціях етанолу:

- 1) Ascentis Phenyl, 250×4,6 (5 мкм)
- 2) Discovery HS F5, 250×4,6 (5 мкм)
- 3) Discovery HS C18, 250×4,6 (5 мкм)

Налаштування приладу наступні:

- 1) Об'єм ін'єкції = 10 мкл
- 2) Температура колонки = 40°C  $C_2H_5OH$
- 3) Швидкість потоку = 1 мл/хв
- 4) Довжина хвилі = 275нм
- 5) Рухома фаза А:  $H_2O$   
Рухома фаза В:  $C_2H_5OH$
- 6) Концентрації спирту які використовувались:

$C_2H_5OH:H_2O$	Вміст $C_2H_5OH$
65:35	62,4%
70:30	67,2%
75:25	72,0%

80:20	76,8%
85:15	81,6%
90:10	86,4%

Досліджуючи сполуку на використаних колонках, можна побачити залежність між показниками часу утримування (RT), коефіцієнтом утримування (k) та числом теоретичних тарілок (N), наведених у таблиці, і вмістом органічного компонента в рухомій фазі.

## ***2.2. Аналіз досліджуваних колонок за параметром утримування на них CBD та роздільною здатністю.***

Для підвищення точності аналізу було враховано можливість адсорбції деяких домішок на стінках флакона, що могло вплинути на результат. З метою мінімізації цього впливу застосовували віали з низькою адсорбційною активністю, що спеціально розроблені для аналітичної хімії.

Досліджувані колонки:

- 1) Колонка №1: Ascentis Phenyl 250\*4,6 (5 мкм)
- 2) Колонка №2: Discovery HS C18 250\*4,6 (5 мкм)
- 3) Колонка №3: Discovery HS F5 250\*4,6 (5 мкм)
- 4) Концентрації спирту які використовувались:

<b><i>Співвідношення C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH(96%):H<sub>2</sub>O</i></b>	<b><i>Вміст C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, % в рухомій фазі</i></b>
64:36	61,4%
66:34	63,4%
68:32	65,3%
70:30	67,2%
72:28	69,1%

### 5) Приготування досліджуваного розчину:

Для приготування досліджуваного розчину було взято 1 капсулу зразку біодобавки Stark, середня маса капсули = 0,4316 мг. Її було відкрито та поміщено у колбу об'ємом 25 мл та доведено до мітки розчинником, в даному випадку був застосований ізопропанол. Потім для кращого переходу досліджуваної речовини у розчинник, колбу було поміщено в ультразвукову баню на 15 хв. Після проведення даних маніпуляцій розчин профільтрували крізь мембранний фільтр PTFE з величиною пор 0,45 мкм у віалу.

6) Температура колонки: 40<sup>0</sup>C

7) Швидкість рухомої фази: 1 мл/хв

8) Об'єм інжекції: 5мкл

### ***2.3. Вибір оптимальної довжини хвилі для аналізу***

Для проведення даного експерименту, було обрано три діапазони довжини хвиль для їх порівняння:

1) 200 – 250 нм

2) 240 – 300 нм

3) 250 – 300 нм

Умови експерименту:

1) Прилад: рідинний хроматограф **AGILENT 1100**

2) Реактив: ізопропанол

3) Об'єкт аналізу: капсули Stark Pharm CBD 25 mg

4) Приготування розчину: взяли 1 капсулу та 25 мл розчинника, розчинили, профільтрували у віалу через мембранний фільтр з порами 0,45мкм.

5) Хроматографічні умови:

▪ Температура колонки = 40<sup>0</sup>C

▪ Швидкість потоку = 1 мл/хв

- Об'єм ін'єкції = 5 мкл
- Рухома фаза А: H<sub>2</sub>O  
Рухома фаза В: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

#### ***2.4. Вибір оптимальної температури***

Вибір температури колонки при хроматографії є критичним, оскільки вона безпосередньо впливає утримання аналітів у колонці, ефективність розділення та форму піків, що в сукупності визначає якість і точність отриманих результатів аналізу.

Метою даного експерименту було застосування різних температур на однаковій колонці.

Умови експерименту:

- 1) Колонка Discovery HS F5 250\*4,6 (5 мкм)
- 2) Швидкість потоку 1 мл/хв
- 3) Довжина хвилі 275 нм
- 4) Досліджувані температури: 35<sup>0</sup>, 40<sup>0</sup>, 45<sup>0</sup>.
- 5) Рухома фаза А: H<sub>2</sub>O  
Рухома фаза В: C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

#### ***2.5. Вибір об'єму ін'єкції***

Для того щоб підібрати оптимальний об'єм, проведено 4 експерименти з різними об'ємами ін'єкції.

Досліджувані об'єми:

- 1) 2 мкл
- 2) 5 мкл
- 3) 10 мкл
- 4) 20 мкл

Налаштування приладу наступні:

- 1) Колонку випробовували всюди однакову: Discovery HS F5 250\*4,6 (5 мкм)
- 2) Температура колонки = 40<sup>0</sup>С
- 3) Швидкість потоку = 1 мл/хв
- 4) Довжина хвилі = 275нм
- 5) Рухома фаза А: Н<sub>2</sub>О  
Рухома фаза В: С<sub>2</sub>Н<sub>5</sub>ОН

### РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ РОБОТИ

Перед початком роботи експериментальної частини виконано всебічний аналіз ключових параметрів, що забезпечує якість хроматографічного розділення та точність отриманих результатів. Методом цього підготовчого етапу стало створення умов, які дозволяють максимально точно і селективно визначати канабідіол у складних матрицях, таких як біологічні зразки або продукти рослинного походження.

Одним із найбільш важливих елементів хроматографічної системи є вибір аналітичної колонки. При виборі колонки враховували кілька важливих факторів, які мають вирішальне значення для ефективності аналізу:

1. *Тип стаціонарної фази.* Оскільки канабідіол належить до неполярних сполук, було вирішено використовувати стаціонарні фази середньої полярності з наявністю функціональних груп, таких як фенільні або ціанопропільні. Ці групи здатні забезпечити додаткову селективність щодо демонстративно присутніх ароматичних домішок у матриці, які можуть заважати точному визначенню канабідіолу.
2. *Розмір частинок сорбенту.* Розмір частинок є групою факторів, які впливають на ефективність розділення. Зменшення розміру частинок дозволяє підвищити кількість теоретичних тарілок, тим самим покращуючи роздільну здатність колонки. Однак це вимагає застосування високих тисків у системі, що є додатковим технічним викликом.
3. *Діаметр внутрішнього капіляра.* Цей параметр впливає на необхідний тиск елюенту та чутливість детектування. Колонки з меншим діаметром зменшують споживання елюенту та досягають кращих результатів для меншого розміру зразка.

Крім того, було враховано кілька інших факторів, які впливають на точність та відтворюваність результатів:

- *Температури колонки.* Температурний режим впливає на взаємодію аналітів із сорбентом і, відповідно, на час утримання та роздільну здатність. Підвищення температури постійно скорочує час аналізу, але може погіршити селективність через зменшення взаємодії між молекулами аналіту та стаціонарною фазою.
- *Об'єм ін'єкції.* Правильний вибір об'єму ін'єкції дозволяє досягти оптимального показника між сигналом аналіту та рівнем шуму, що особливо важливо при аналізі малих концентрацій речовин.
- *Довжина хвилі детектування.* Використання конкретної тривалості хвилі, на якій канабідіол поглинає світло найбільш ефективно, забезпечує точність вимірювання та мінімізує вплив компонентів матриці.

Під час попереднього етапу роботи було також враховано вплив відповідної рухомої фази, яка складається з води та етанолу. Було встановлено, що збільшення вмісту органічного компонента (етанолу) зменшує час утримання канабідіолу, однак при цьому може зменшити частку здатності системи. Оптимальна сукупність рухомої фази була підібрана шляхом експериментального тестування.

Таким чином, детальний аналіз та оптимізація ключових параметрів дозволили створити експериментальну методику, що забезпечує високу точність, селективність і відтворюваність результатів. Цей розділ описує результати, отримані за визначеними умовами, та їх аналіз у контексті поставлених завдань.

### ***3.1 Результати визначення фактору утримування.***

Для досягнення мети експерименту, зокрема визначення фактора утримування КБД, було проведено низку досліджень із варіюванням складу рухомої фази. Основна увага приділялася відповідному компоненту рухомої фази — води ( $H_2O$ ) та етанолу ( $C_2H_5OH$ ), так як саме цей параметр

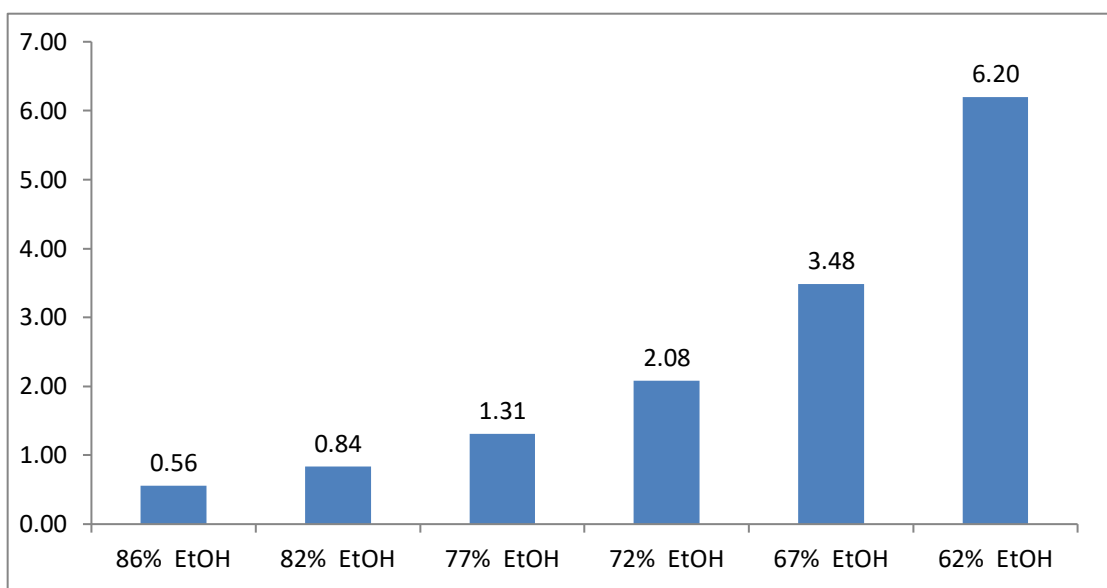
суттєво впливає на взаємодію аналіту зі стаціонарною фазою та, відповідно, на час утримання.

Важливою частиною роботи було забезпечення відтворюваності умов аналізу. Для цього на кожному етапі експерименту стабільно підтримувалися температура колонки, об'єм ін'єкції та швидкість потоку. Особливо увага приділялась чистоті реагентів та стабільності системи, щоб виключити можливий вплив зовнішніх факторів на отримані результати.

*Результати дослідження подані у вигляді таблиць.*

**Табл.3.1.1.** Результати експерименту на колонці Ascentis Phenyl.

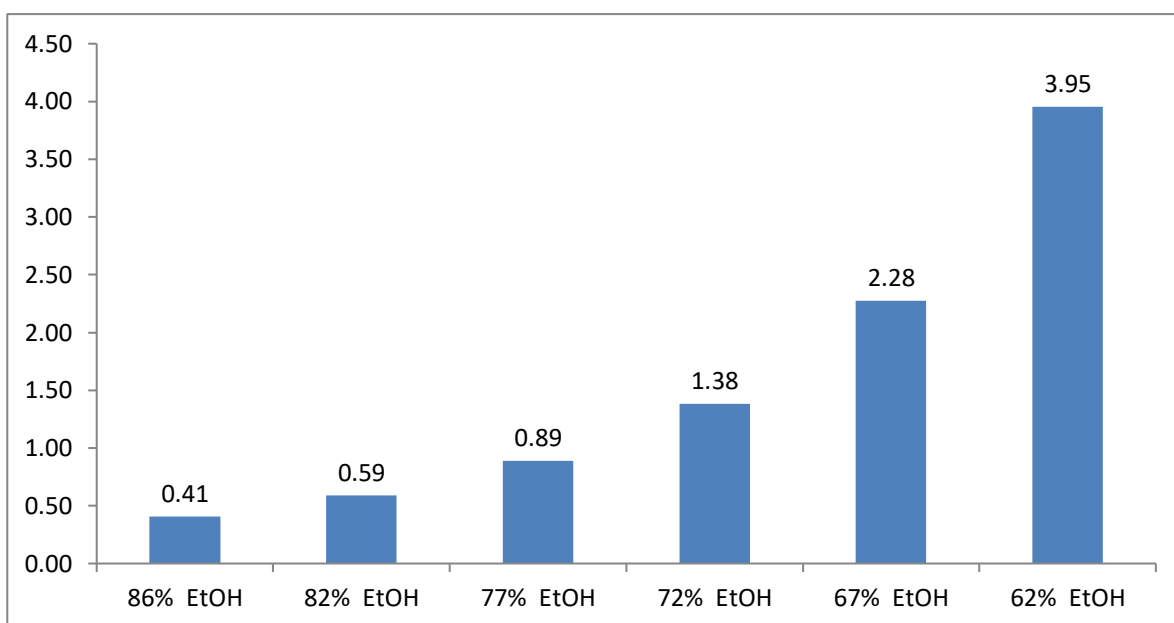
Конц. етанолу	RT	k	N (EP)
86.4% EtOH	4,374	0,56	3666
81,6% EtOH	5,139	0,84	3581
76,8% EtOH	6,464	1,31	3912
72,0% EtOH	8,624	2,08	4679
67,2% EtOH	12,555	3,48	5608
62,4% EtOH	20,161	6,20	7353



**Діаграма 3.1.1.** Залежність коефіцієнту розподілу від вмісту етанолу в рухомій фазі на колонці Ascentis Phenyl.

**Табл.3.1.2.** Результати експерименту на колонці Discovery HS F5.

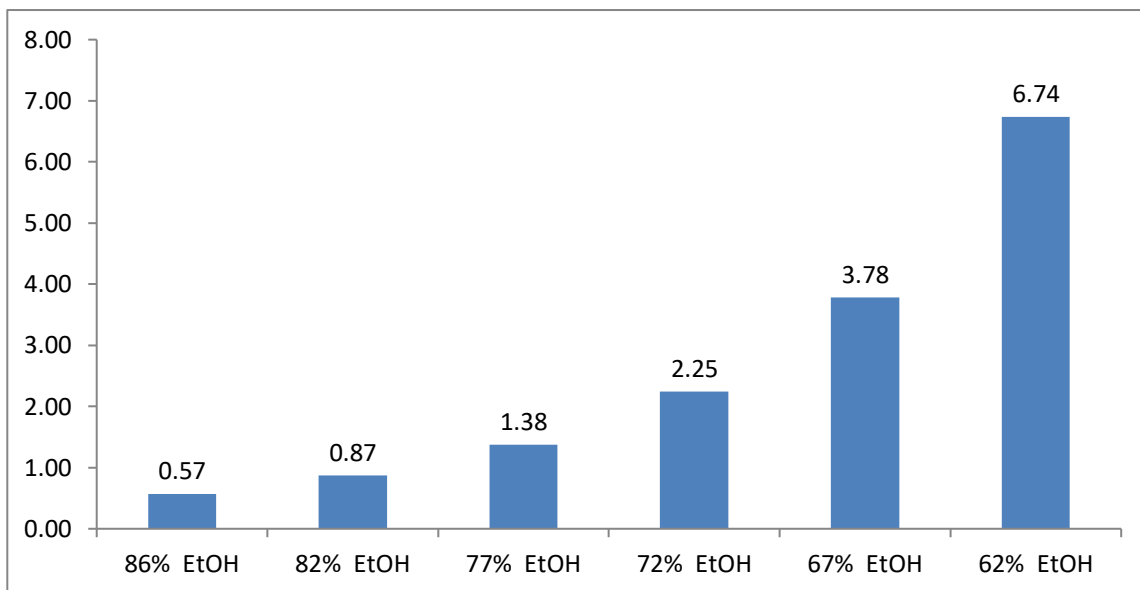
Конц. етанолу	RT	k	N (EP)
86.4% EtOH	3,653	0,46	3303
81,6% EtOH	4,131	0,65	3030
76,8% EtOH	4,906	0,96	3028
72,0% EtOH	6,19	1,48	3682
67,2% EtOH	8,518	2,41	4564
62,4% EtOH	12,88	4,15	6144



**Діаграма 3.1.2.** Залежність коефіцієнту розподілу від вмісту етанолу в рухомій фазі на колонці Discovery HS F5.

**Табл.3.1.3.** Результати експерименту на колонці Discovery HS C18.

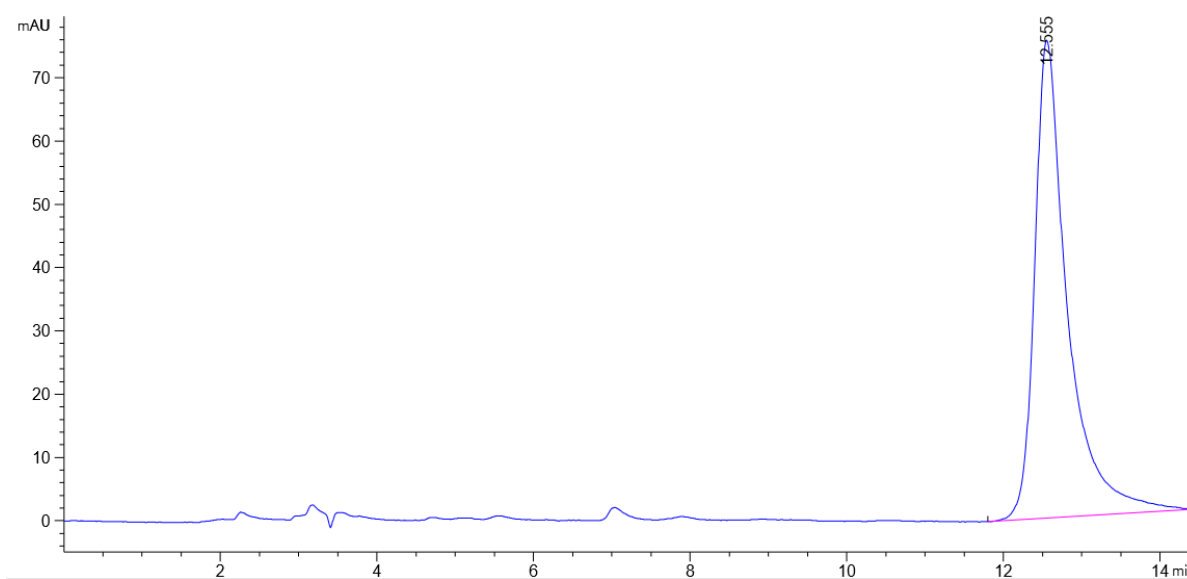
Конц. етанолу	RT	k	N (EP)
86.4% EtOH	4,075	0,46	3369
81,6% EtOH	4,872	0,74	3285
76,8% EtOH	6,181	1,21	3480
72,0% EtOH	8,441	2,01	4327
67,2% EtOH	12,431	3,44	5727
62,4% EtOH	20,111	6,18	8079



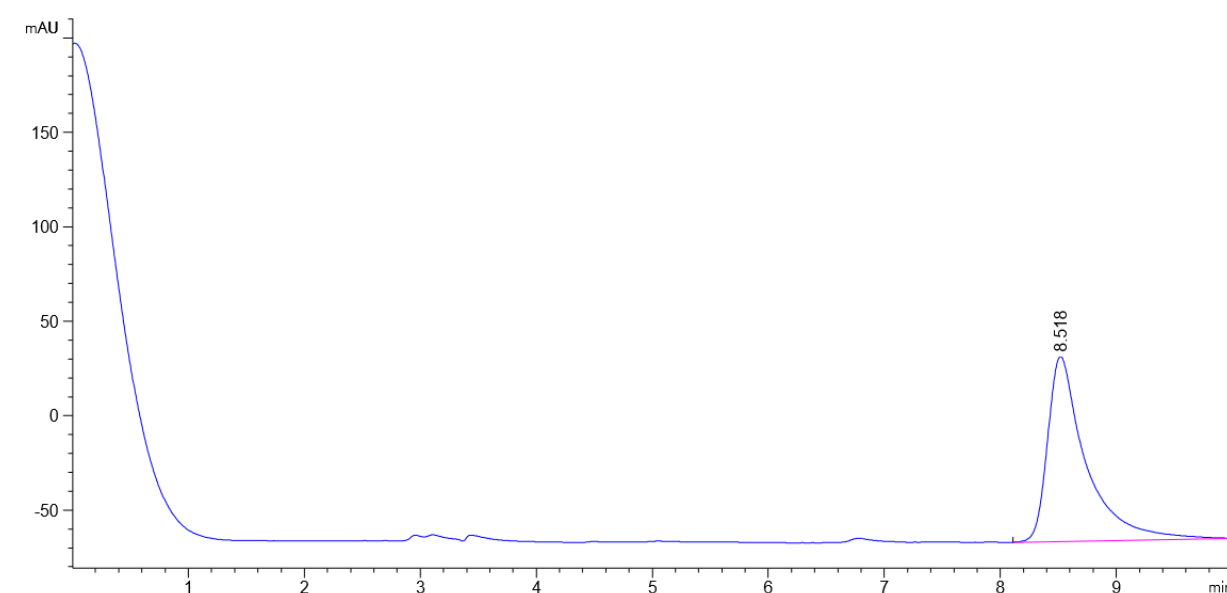
**Діаграма 3.1.3.** Залежність коефіцієнту розподілу від вмісту етанолу в рухомій фазі на колонці Discovery HS C18.

### Результати хроматографічного аналізу

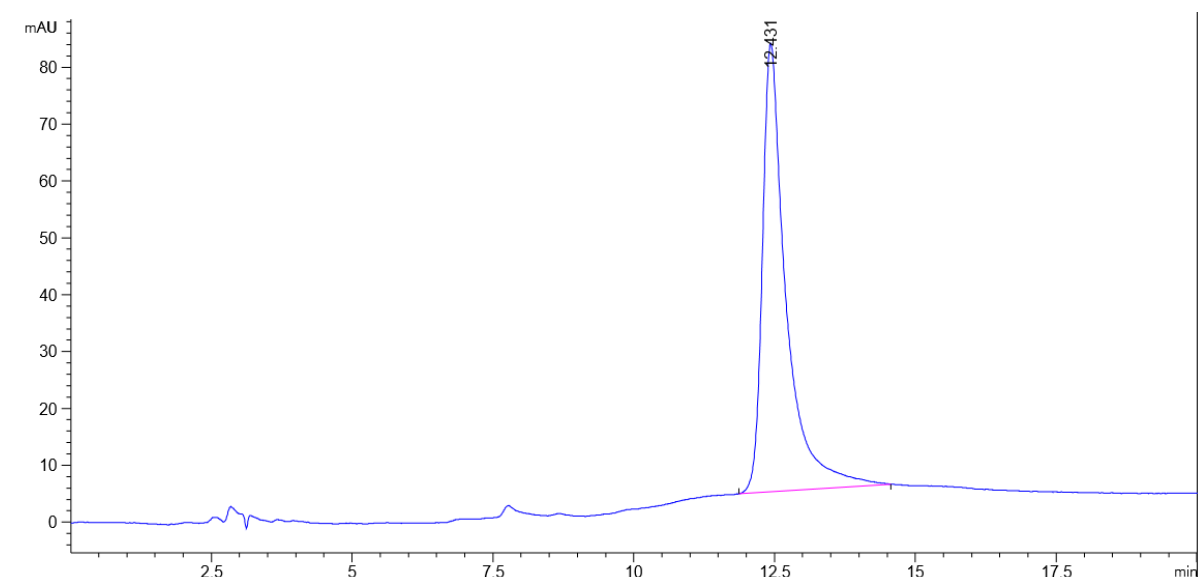
Досліди виконувались при співвідношенні етанолу та води - 70:30 відповідно.



**Хроматограма 3.1.1.** Залежність фактора утримування від вмісту етанолу в рухомій фазі на колонці Ascentis Phenyl.



**Хроматограма 3.1.2.** Залежність фактора утримування від вмісту етанолу в рухомій фазі на колонці Discovery HS F5.



**Хроматограма 3.1.3.** Залежність фактора утримування від вмісту етанолу в рухомій фазі на колонці Discovery HS C18.

Згідно з результатами, видно, що зі зменшенням концентрації етанолу (EtOH) значення  $k$  та  $N$  зростають. Тобто за нижчого вмісту етанолу в мобільній фазі підвищуються роздільна здатність та ефективність колонки. Зважаючи на те, що в аналітичній роботі потрібно досягти балансу між ефективною роздільністю та практичною зручністю проведення аналізу, потрібно щоб коефіцієнт утримування ( $k$ ) знаходився в межах 2–4. Цей інтервал забезпечує достатньо високу роздільну здатність при прийнятному часі аналізу.

Аналіз отриманих даних дозволяє використовувати програмне забезпечення, яке для досягнення бажаного коефіцієнта повинне мати співвідношення вмісту води до 96% етанолу на рівні 30:70. Саме за цих умов досягається найкраще поєднання селективності, ефективності розділення та тривалості аналізу. Цей підхід забезпечує точне визначення концентрації CBD та мінімізує вплив негативних домішок.

У подальшій роботі дане поєднання буде використано як стандарт для підготовки рухомої фази, що дозволяє забезпечити відтворюваність отриманих результатів та високий рівень.

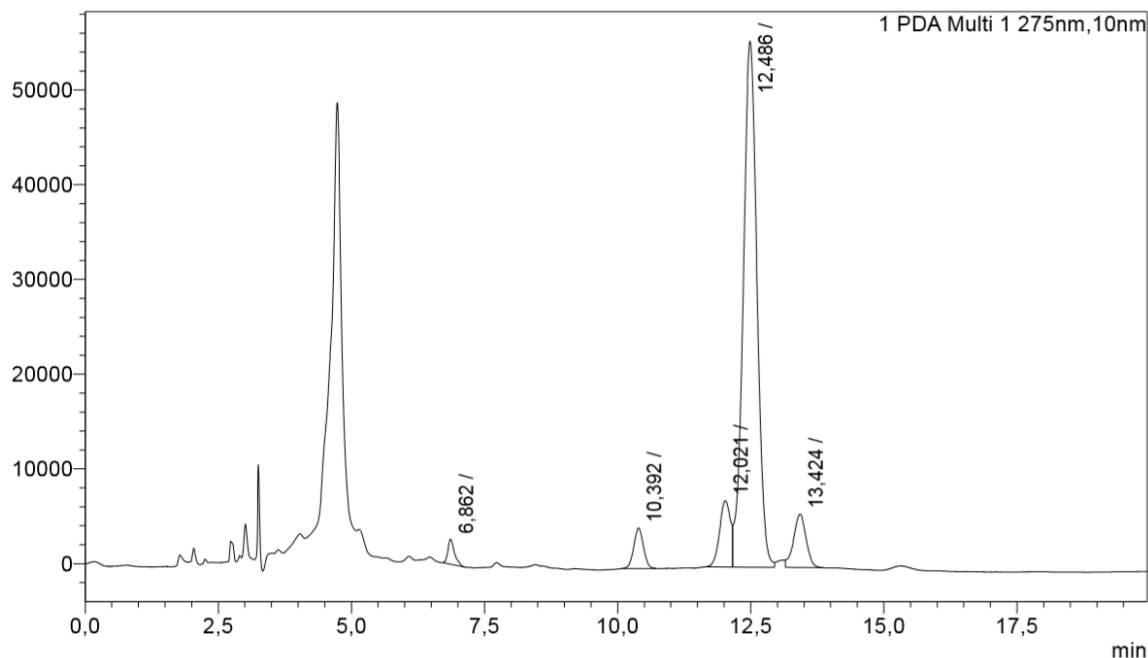
### ***3.2. Результати визначення досліджуваної колонки.***

Для досягнення оптимального розділення речовин у досліджуваному зразку методом високоефективної рідинної хроматографії на досліджуваних колонках, було проведено дослідження впливу різних концентрацій етанолу в рухомій фазі на розділення канабідіолу з іншими компонентами дієтичної добавки Stark. Варіювання складу елюенту дозволило підібрати оптимальні умови для розділення досліджуваних речовин, а саме, відокремити їх від канабідіолу.

Початковим співвідношенням етанолу та води було обрано 70:30, оскільки аналіз відомих методик у попередньому розділі показав, що саме при такій

концентрації етанолу спостерігається найкраща детекція канабідіолу та його роздлення з іншими речовинами.

а) Дане дослідження проводилось на колонці Ascentis Phenyl:



**Рисунок 3.2.1.** Хроматограма досліджуваного розчину препарату Stark на колонці Ascentis Phenyl при використанні рухомої фази етанол (96%)/вода=70/30.

Час утримання основної досліджуваної речовини (канабідіолу) на даній колонці становить 12,486 хв. Також наявні домішки, які будуть присутні на подальших отриманих хроматограмах:

Домішка 1 (Д1) –  $R_t = 6,862$  хв

Домішка 2 (Д2) –  $R_t = 10,392$  хв

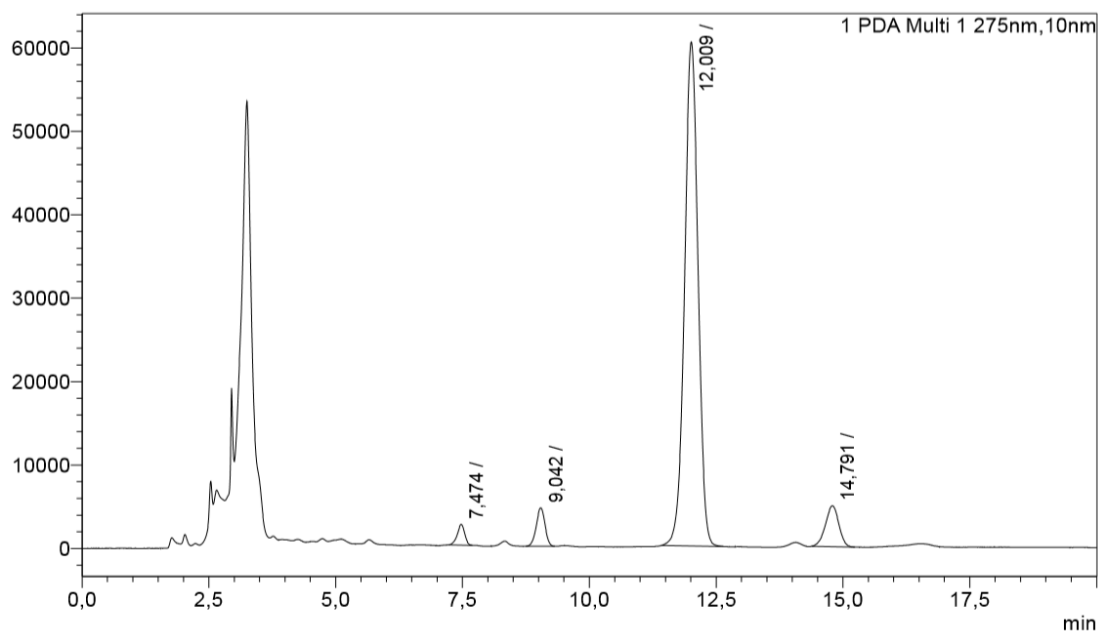
Домішка 3 (Д3) –  $R_t = 12,021$  хв

Домішка 4 (Д4) –  $R_t = 13,424$  хв

Коефіцієнт розділення канабідіолу з Д3 = 1,0, а з Д4 = 2,118

Отже, як можна побачити домішка 3 майже коелювалася з піком КБД, що є неприпустимим. Тому колонка Ascentis Phenyl у роботі не використовуватиметься.

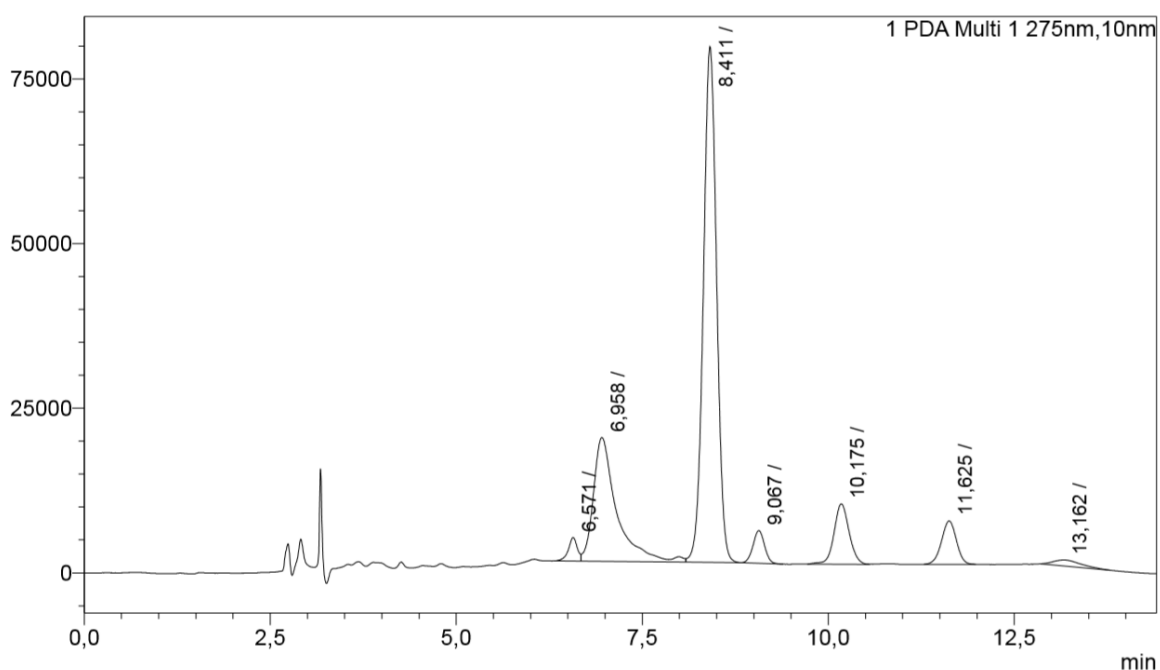
б) Дане дослідження проводилось на колонці Discovery HS C18 при співвідношенні етанолу та води - 70:30 відповідно.



**Рисунок 3.2.2.** Хроматограма досліджуваного розчину препарату Stark на колонці Discovery HS C18 при використанні рухомої фази етанол (96%)/вода=70/30.

З результатів ми бачимо, що  $R_t$  CBD = 12, 009 хв, але ДЗ повністю коелювалася з піком канабідіолу. Це є неприпустимим, тому колонка Discovery HS C18 в роботі також не використовуватиметься.

с) Дане дослідження проводилось на колонці Discovery HS F5 при співвідношенні етанолу та води - 70:30 відповідно



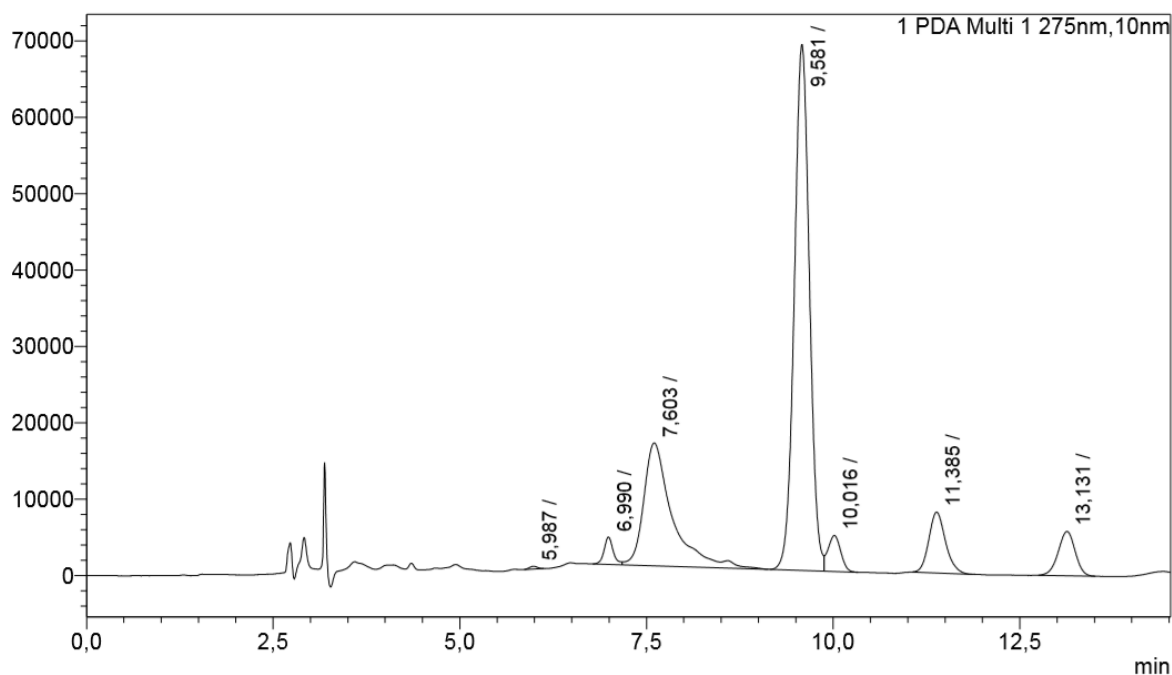
**Рисунок 3.2.3.** Хроматограма досліджуваного розчину препарату Stark на колонці Discovery HS F5 при використанні рухомої фази етанол (96%)/вода=70/30.

За результатами ми бачимо, що час утримування CBD= 8, 411хв. Домішка Д2 і канабідіол елюються в іншому порядку ніж в попередніх експериментах, але коефіцієнт розділення між Д2 і КБД становить 2,167, що значно вища ніж при попередній концентрації етанолу.

Ця комбінація рухомої фази на колонки є оптимальнішою.

Далі проведено перевірку розділення при незначних але можливих змінах співвідношення компонентів  $70\pm 2\%$  вмісту органічного компоненту(96% етилового спирту).

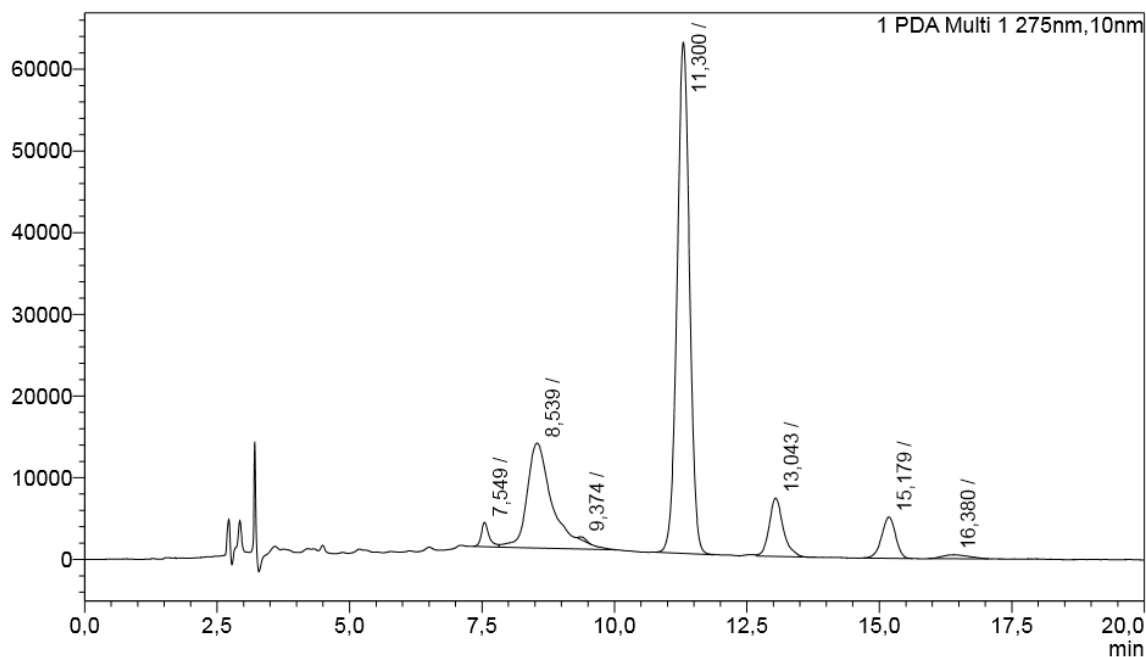
d) Дане дослідження проводилось на колонці Discovery HS F5 при співвідношенні етанолу та води - 68:32 відповідно.



**Рисунок 3.2.4.** Хроматограма досліджуваного розчину препарату Stark на колонці Discovery HS F5 при використанні рухомої фази етанол (96%)/вода=68/32.

З результатів хроматограми бачимо, що  $R_t$  CBD = 9,581 хв,  $R_t$  Д2 = 10,016 хв. Коефіцієнт розділення ( $R_s$ ) між ними = 1,229. Це свідчить про те що домішка 2 частково коелювалася з канабідіолом. Це не є нормою, тому дана концентрація спирту не підходить.

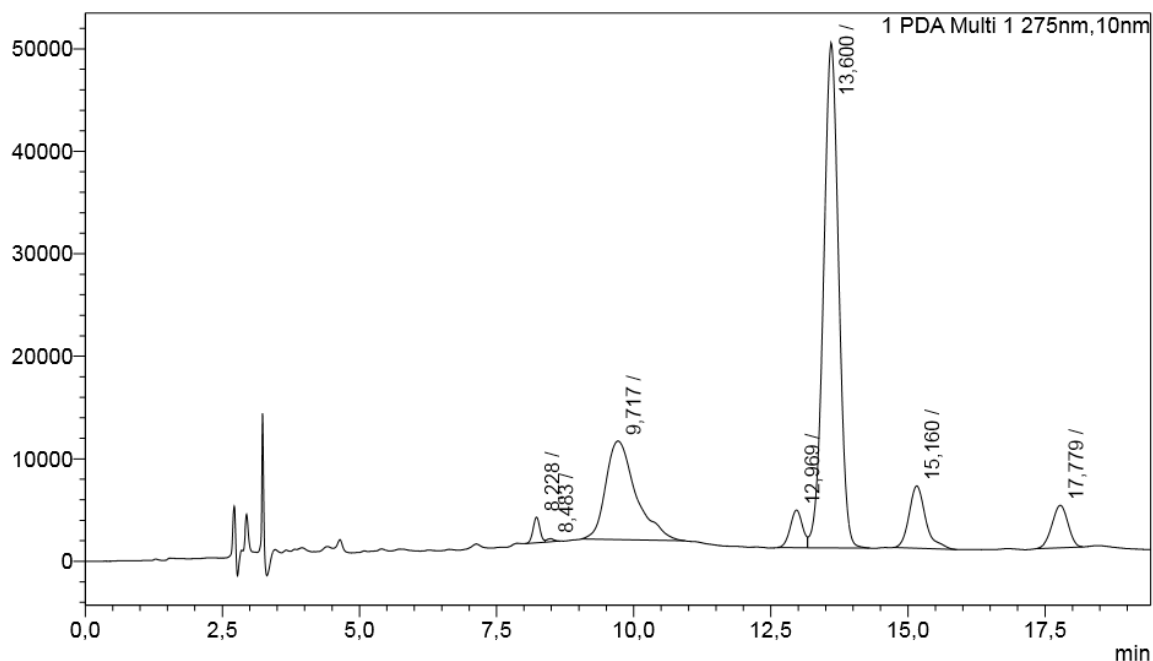
е) Дане дослідження проводилось на колонці Discovery HS F5 при співвідношенні етанолу та води - 66:34 відповідно.



**Рисунок 3.2.5.** Хроматограма досліджуваного розчину препарату Stark на колонці Discovery HS F5 при використанні рухомої фази етанол (96%)/вода=66/34.

З отриманих результатів бачимо, що час утримування КБД = 11,30 хв, що є нормальним, але Д2 повністю коелювалася з піком канабідіолу. Тому це свідчить про те, що обрана концентрація спирту не забезпечує достатнього розділення КБД і домішки 2 та не підходить для роботи.

ф) Дане дослідження проводилось на колонці Discovery HS F5 при співвідношенні етанолу та води - 64:36 відповідно.



**Рисунок 3.2.6.** Хроматограма досліджуваного розчину препарату Stark на колонці Discovery HS F5 при використанні рухомої фази етанол (96%)/вода=64/36.

Час утримання основної досліджуваної речовини (канабідіолу) на даній колонці становить 13,60 хв.

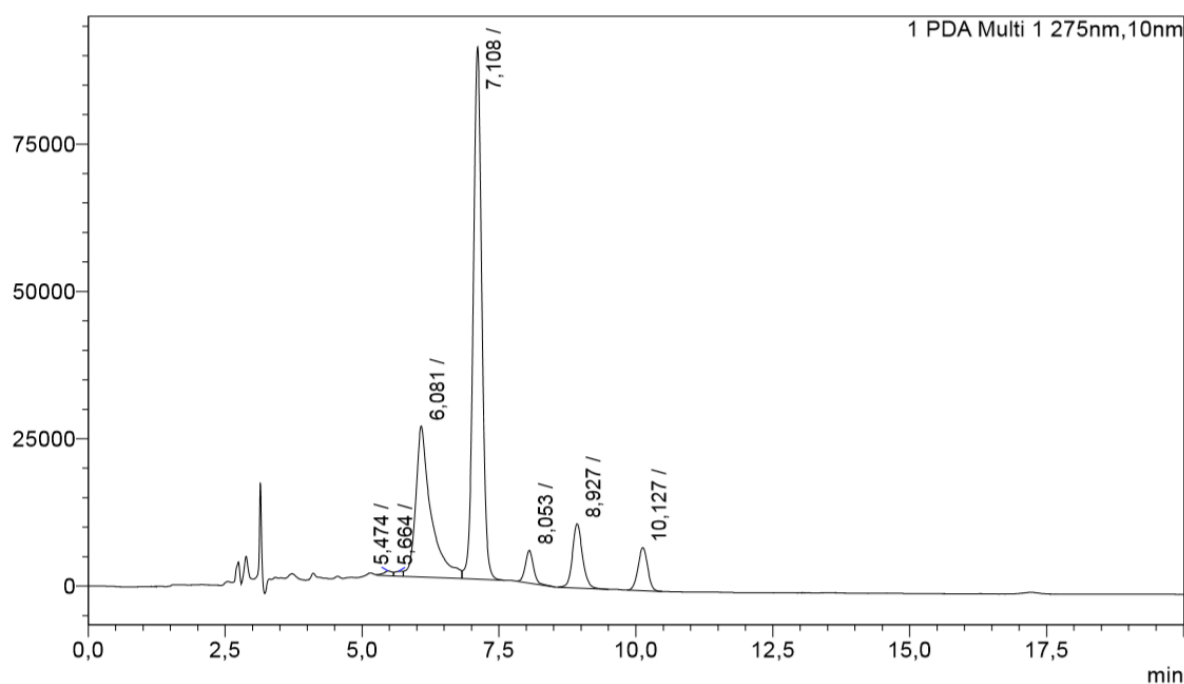
Проте, як можна побачити, коефіцієнт розділення між Д2 і КБД дорівнює 1,362, що свідчить про недостатнє розділення цих двох сполук. Тому обраний вміст етанолу не є оптимальним для розділення даної суміші сполук.

**Висновок.** З метою оптимізації умов хроматографічного розділення КБД та домішки 2, так як ця речовина за часом утримання є найближчою до канабідіолу, було протестовано три різні колонки та чотири різних співвідношень етанолу та води. Найкращі результати були отримані при використанні колонки Discovery HS F5 та рухомої фази зі співвідношенням етанол:вода - 70:30. Коефіцієнт розділення для цієї комбінації склав 2,167, що дозволяє достатньо точно визначити вміст КБД. Інші домішки також

мають нормальний коефіцієнт розділення та не заважають виявленню КБД при даній комбінації.

Проте, щоб перевірити, чи дійсно концентрація етанолу 70% підходить, було здійснено ще один хроматографічний аналіз при комбінації колонки Discovery HS F5 та співвідношенні етанолу та води – 72:28.

g) Результат:



**Рисунок 3.2.7.** Хроматограма досліджуваного розчину препарату Stark на колонці Discovery HS F5 при використанні рухомої фази етанол (96%)/вода=72/28.

Як можна побачити, параметр утримування CVD = 7,108. Це свідчить про те, що при збільшенні концентрації етанолу в рухомій фазі (елюенті) під час хроматографічного аналізу, ми спостерігаємо зменшення часу протягом якого канабідіол утримується на колонці.

**Табл. 3.2.1.** Результати дослідження

	<b>68%</b>	<b>70%</b>	<b>72%</b>
<b>Rt</b>	9,581	8,411	7,108
<b>Rs з Д1</b>	4,775	3,637	1,8
<b>Rs з Д2</b>	1,229	2,167	3,486
<b>N</b>	10856	10845	10210
<b>S</b>	970324	969792	986721

Враховуючи отримані дані, співвідношення етанолу:води як 70/30 є найоптимальнішим, тому що стійкість розділення при незначних але можливих змінах співвідношення зберігається ( $\pm 2\%$ ) що вказує на робасність (стійкість) такого співвідношення води і спирту 96% для методики визначення канабідіолу яка розробляється.

### **3.3. Результати вибору довжини хвилі.**

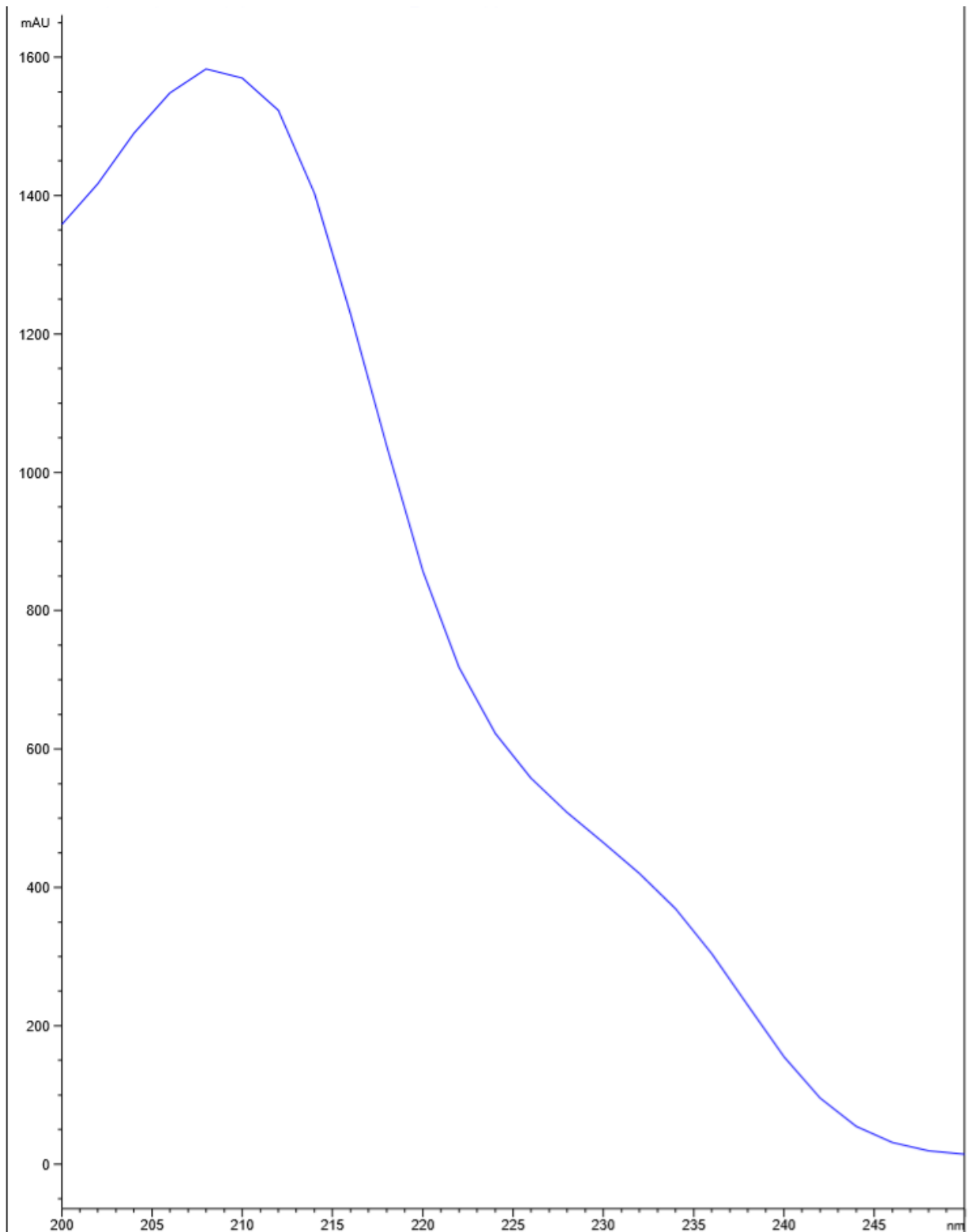
Вибір довжини хвилі базувався на аналізі спектральних характеристик СВД. Для цього було досліджено декілька ділянок хвиль, характерних для органічних сполук, зокрема від 200 до 520 нм. У ході експериментів враховували, що канабідіол має специфічний спектр поглинання, що дозволяє йому бути ефективно детектованим на певних довжинах хвилі.

Для визначення оптимального параметра була проведена серія експериментів із використанням різних довжин хвиль. Оцінювалися такі критерії, як інтенсивність сигналу, мінімізація впливу шуму базової лінії та можливість уникнення перекриття піків домішок.

Детальні результати дослідження представлені на графіках, які демонструють залежність сигналу від тривалої хвилі, та використані експериментальні умови, які були оптимізовані для досягнення найбільш точних і надійних результатів.

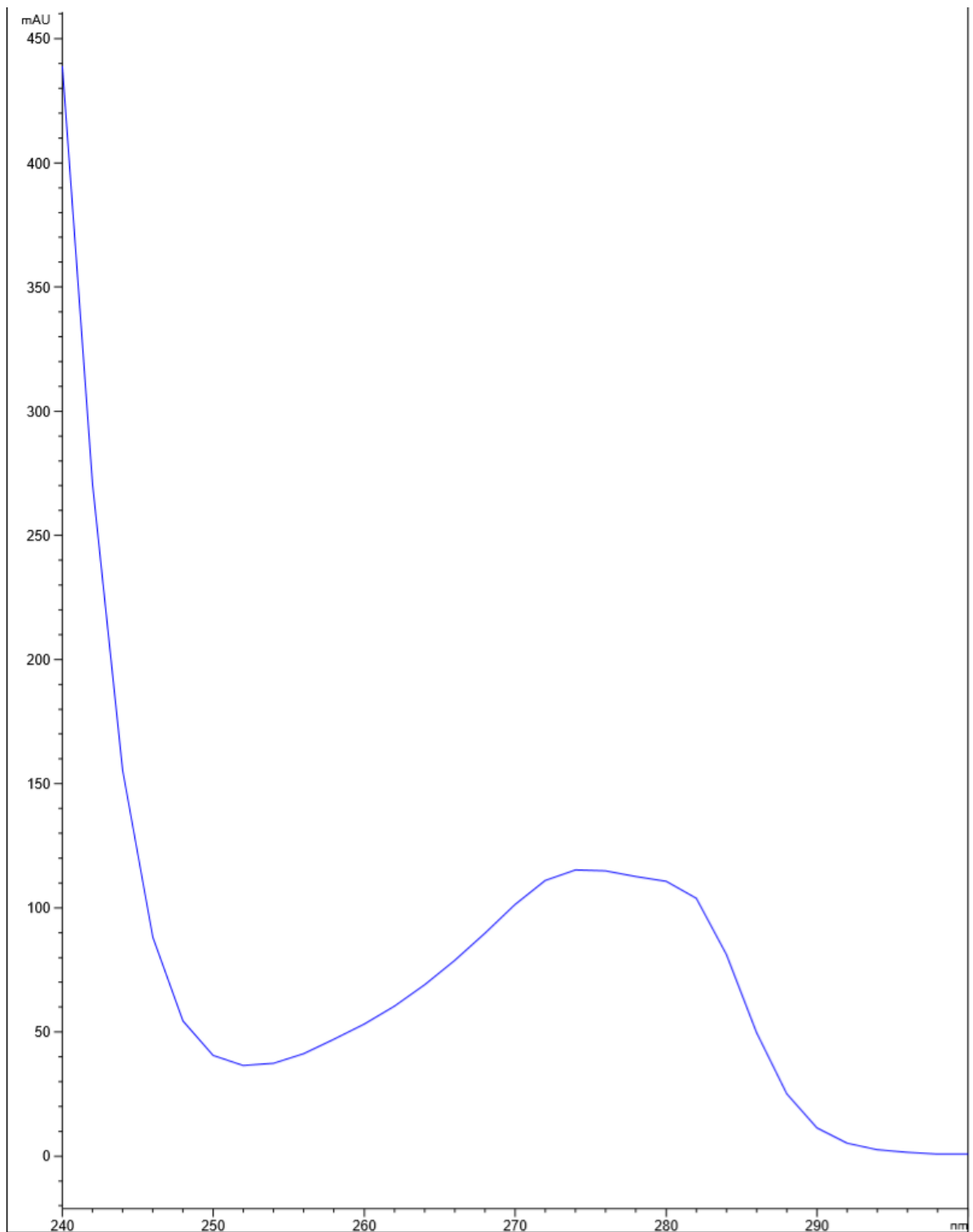
Результати у вигляді графіків:

а) 200 – 250 нм



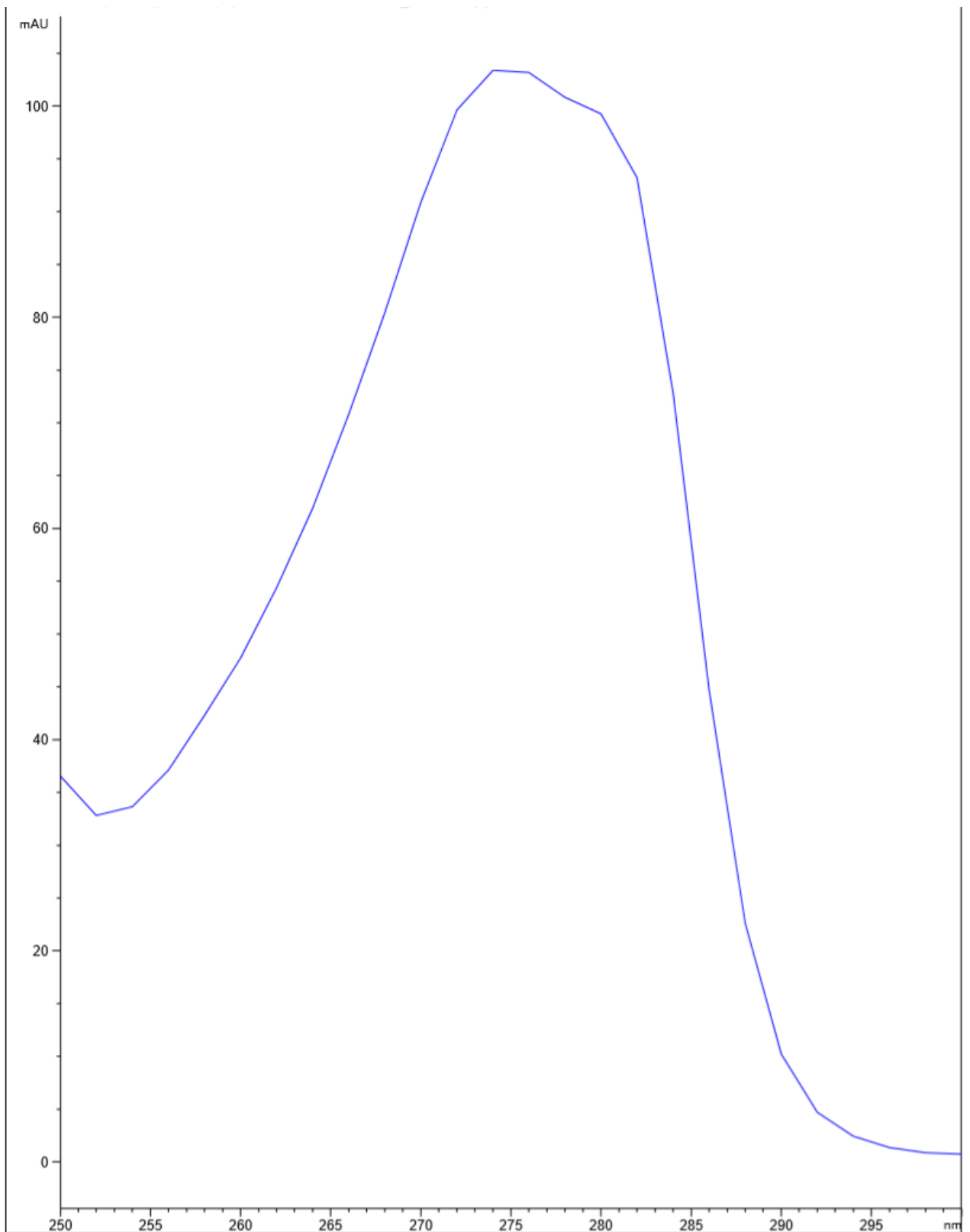
**Рисунок 3.3.1.** Довжина хвилі для КБД на даному проміжку становить 208 нм.

б) 240 – 300 нм



**Рисунок 3.3.2.** Довжина хвилі для КБД на даному проміжку становить 275 нм

с) 250 – 300 нм



**Рисунок 3.3.3.** Довжина хвилі для КБД на даному проміжку становить 274 нм.

Вивчаючи статтю Європейської фармакопеї, де вказано, що для ідентифікації канабідіолу використали довжину хвилі - 275 нм, бо саме при цій довжині хвилі молекули КБД поглинають найбільше світла, було проаналізовано наведені отримані результати та зроблено висновок, що використання довжини хвилі 275 нм для аналізу КБД є надійним, добре обґрунтованим методом і відповідає загальноприйнятим стандартам у фармацевтичній індустрії.

Тож у роботі використовуватиметься довжина хвилі яка дорівнює 275 нм.

#### ***3.4. Результати вибору температури колонки.***

В процесі дослідження одним із етапів стало визначення оптимальної температури для досягнення бажаних результатів. Температурний режим має значний вплив на хід процесів, тому було проведено серію експериментів, спрямованих на вивчення цієї залежності.

Під час випробувань враховувалися ключові показники, які демонструють ефективність обраних умов, а також стабільність і якість кінцевих результатів. Усі отримані дані були систематизовані та зведені в таблицю №4, що дозволяє більш детально оцінити вплив температури та зробити висновки щодо оптимальних умов.

**Табл. 3.4.1.** Результати експерименту:

T <sup>0C</sup>	N (число теоретичних тарілок)	Rt (хв)	Rs	P (бар)
35	8815	8,818	2,825	235
40	10465	8,184	3,245	202
45	11159	7,741	2,721	180

З огляду на результати, можна зробити висновок, що збільшення температури колонки призводить до зменшення часу утримання і роздільної здатності. Це типове явище для вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Зі збільшенням температури, в'язкість рухомої фази зменшується, що призводить до швидшого масопереносу аналітів через сорбент і, відповідно, до зменшення часу утримання. Однак, одночасно зменшується і селективність розділення, оскільки при більш високих температурах взаємодія між аналітами і стаціонарною фазою послаблюється. Це призводить до зменшення роздільної здатності і може призвести до перекриття піків сусідніх компонентів суміші.

Висновок. Після проведення експериментів та аналізу їх результатів, було виявлено що найоптимальніша температура яка дає найбільш ефективні результати при комбінації з уже вибраними колонкою та довжиною хвилі (див.вище), є 40<sup>0C</sup>.

### 3.5. Результати вибору об'єму інжекції.

Наступним етапом дослідження, стало визначення оптимального об'єму інжекції. Щоб встановити найбільш доцільне значення, було також здійснено серію експериментів із застосуванням різних об'ємів.

Для забезпечення повноти аналізу й зручності подальшого використання всі отримані результати згруповано в таблиці №5.

**Табл. 3.5.1.** Результати вибору об'єму інжекції:

Об'єм ін'єкції (мкл)	Rt (хв)	N (число теоретичних тарілок)	Rs
2	8,194	11906	3,258
5	8,184	10465	3,245
10	8,147	6481	2,998
20	8,150	2063	2,314

З огляду на отримані результати можна зробити висновок:

Зі збільшенням об'єму ін'єкції число теоретичних тарілок зменшується, що вказує на погіршення роздільної здатності колонки. Також зменшується фактор розділення, що також свідчить про погіршення розділення речовин у зразку.

Тому результатом вибору став об'єм ін'єкції – 5 мкл, оскільки результати ефективності колонки і розділення є однаковими з отриманими при інжектуванні 2 мкл, але при цьому інтенсивність сигналу буде вищою, що потенційно зменшує межу детектування для майбутньої аналітичної методики і зменшує негативний вплив шуму базової лінії на відтворюваність паралельних інжекцій (відносне стандартне відхилення площ для послідовних інжекцій буде меншим при 5 мкл).

## РОЗДІЛ 4. ПЕРЕВІРКА ПРИДАТНОСТІ РОЗРОБЛЕНОЇ МЕТОДИКИ

Як видно з розробки умов для хроматографування одним із критичних параметрів методики є розділення з іншими компонентами препарату. Для того щоб сформулювати достатні і необхідні вимоги щодо придатності хроматографічної системи необхідно розглянути фактори, які можуть загрожувати методиці в процесі використання. Для цього розглянемо параметри формули для розділення такі як час утримування і ширина піку на половині висоти.

$$R_s = 1.18 \times (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h1} + w_{h2})$$

Час утримування може змінюватися залежно від точності змішування компонентів рухомої фази, яка в свою чергу може варіюватися від 68% до 72%, оскільки типова точність градієнтного змішування гарантується виробниками на рівні  $\pm 2\%$ . Цей вплив було перевірено при розробці методики і його вплив визнано незначним.

З іншого боку на розділення може впливати ширина піків, яка залежить від хроматографічної системи, зокрема від діаметру з'єднувальних капілярів після автоматичного інжектора і до комірки детектора, об'єму комірки детектора, а також від ступеня зношеності хроматографічної колонки.

При хроматографуванні зразка дієтичної добавки Stark було отримано розділення з компонентом на задньому фронті піку 2,17, а ефективність колонки 9803 теоретичних тарілок. Для коректної оцінки площі піку висуваємо вимогу розділення не менше 1,5. Це означає, що розділення може погіршитися в  $2,17/1,5 = 1,45$  раз.

Тобто це означає, що параметр  $w_{h1} + w_{h2}$  стане в 1,45 раз більшим, і за умови рівномірного погіршення якості хроматографічних піків, при цьому ефективність колонки погіршиться в  $1,45^2 = 2,1$  раз.

Це пов'язано з тим що ефективність колонки залежить від ширини піку обернено квадратично, а саме:  $N=5.54 \times (t_R/w_h)^2$ .

Це означає, що якщо при розробці отримано 9803 т.т., то в процесі використання допускається погіршення ефективності до  $9803/2,1= 4668$ . Тому резонною вимогою до ефективності колонки можна приймати цифру 4700 теоретичних тарілок (після округлення).

Перед початком валідаційного дослідження було перевірено придатність хроматографічної системи. Система вважається придатною, якщо хроматограма зразку для тестування придатності хроматографічної системи відповідає наступним умовам:

1. Відносне стандартне відхилення (RSD,%) площ піків шести послідовних інжекцій стандартного зразку має бути не більше 1,0%. Отримано 0,11 %.
2. RSD часів утримання для шести послідовних інжекцій стандартного зразка не перевищує 0,5 %. Отримано 0,04 %.

Результати розрахунків RSD площ піків та часів утримання для шести послідовних інжекцій стандартного зразка наведено в таблиці 4.1.

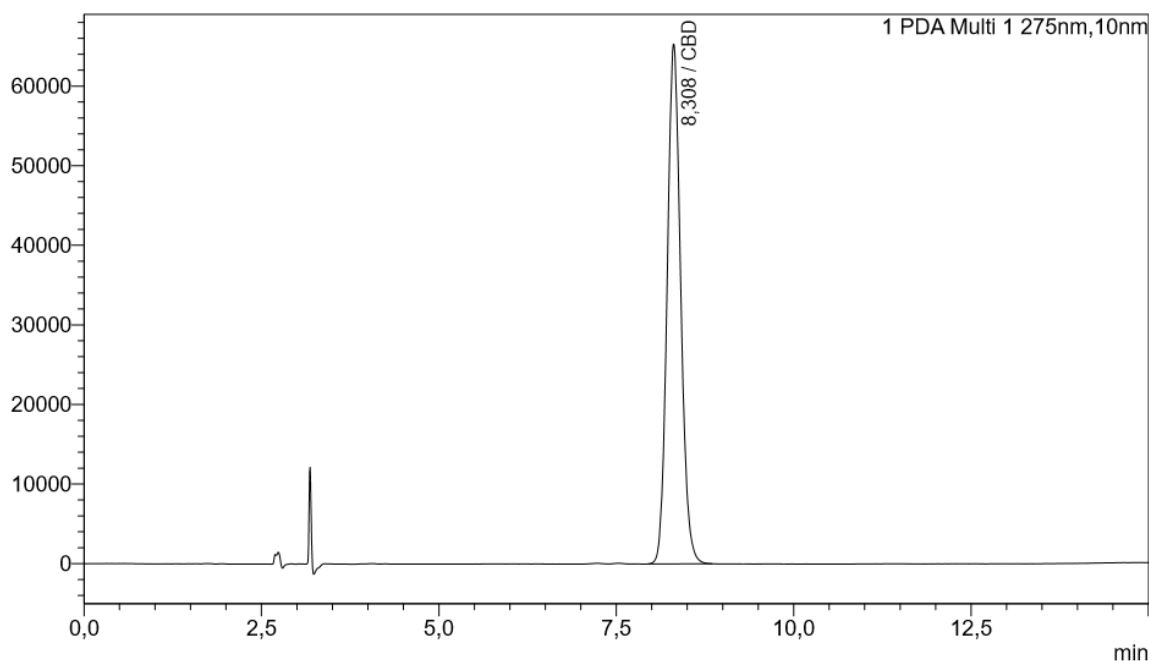
**Таблиця 4.1.** Розрахунки відносного стандартного відхилення площ піків та часів утримання

№	S, mAU*s	RT, хв
1	864117	8,308
2	862541	8,308
3	863290	8,305
4	861391	8,304

5	861961	8,300
6	862675	8,301
RSD,%	0,1116	0,0408

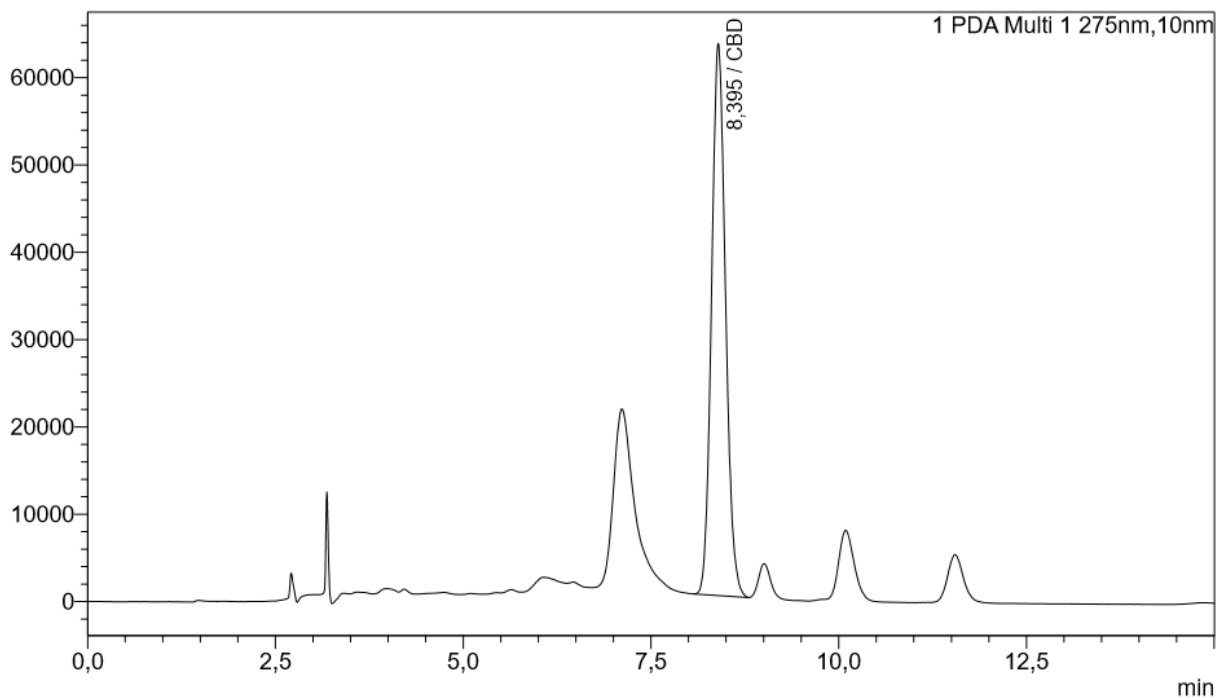
3. Ефективність піку канабідіолу на хроматограмі розчину стандарту для перевірки придатності становить 9353 теоретичних тарілок.

На рис. 4.1. наведено результати дослідження стандартного зразку.



**Рис. 4.1.** Хроматограма стандартного зразку для перевірки придатності хроматографічної системи.

На рис. 4.2 наведено результати досліджуваного зразку Stark Pharm CBD за концентрації етанолу 70%.



**Рис. 4.2.** Хроматограма досліджуваного зразку Stark Pharm CBD для перевірки придатності хроматографічної системи.

4. Симетрія піку канабідіолу на хроматограмі стандартного зразку має бути в межах 0,8-1,8 (вимога до симетрії з фармакопеї Європи).

В результаті дослідження отримано таку симетрію 1,1.

Згідно з результатами розрахунків, всі вище зазначені умови виконуються, а отже, ця методика є придатною.

## РОЗДІЛ 5. ВАЛІДАЦІЯ РОЗРОБЛЕНОЇ МЕТОДИКИ

### 5.1. Ідентифікація компонентів у досліджуваних зразках

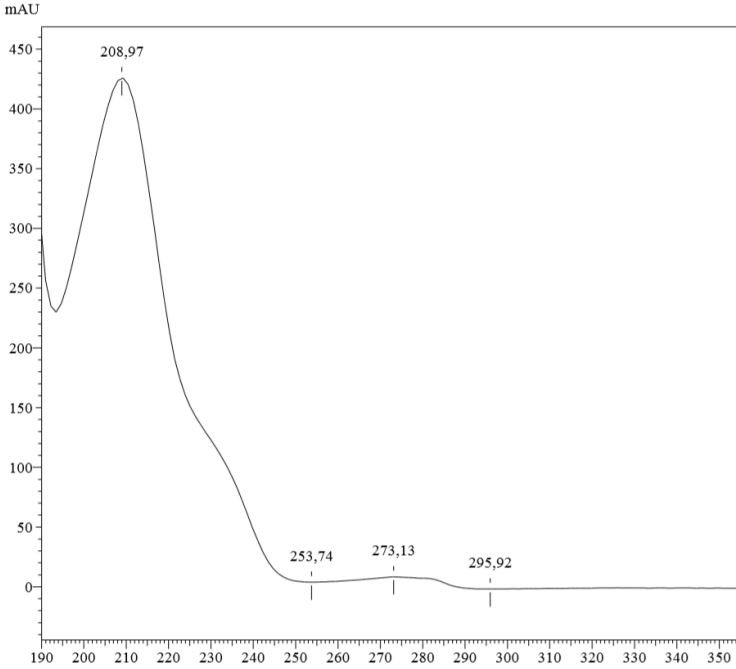
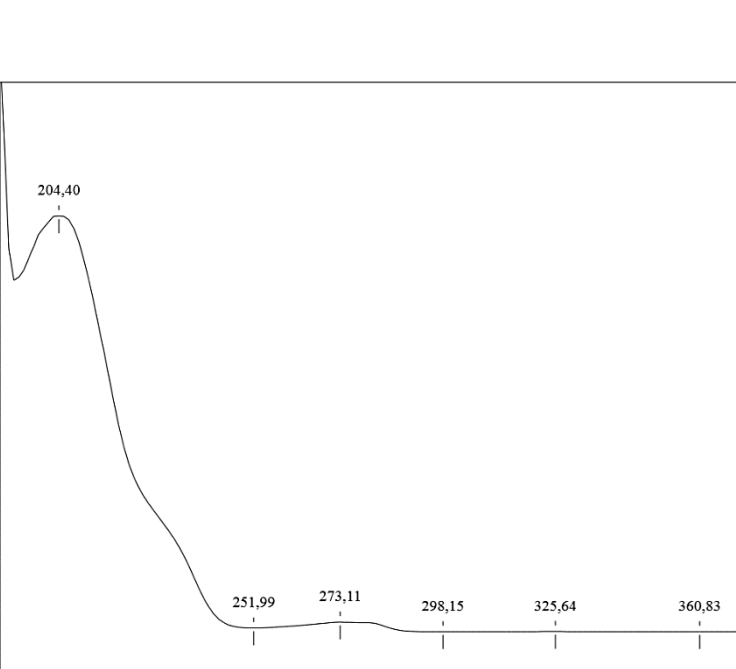
Ідентифікація заборонених сполук в дієтичних добавках є такою ж важливою задачею перевірки якості дієтичних добавок з канабідіолом як і встановлення кількісного вмісту канабідіолу. Для того щоб ідентифікувати дельта-9-тетрагідроканабінол, встановити відносний час його утримування було приготовано розчин для перевірки придатності хроматографічної системи. Згідно зі статтею Європейської фармакопеї «Канабідіол» при обробці канабідіолу соляною кислотою утворюється дельта-9-тетрагідроканабінол. Було приготовано розчин для перевірки придатності хроматографічної системи згідно описаної в монографії методики. Цей розчин було хроматографовано в умовах методики ЄФ «Канабідіол» з використанням хроматографічної колонки Xbridge C18, 150-4.6, 3.5  $\mu\text{m}$  з перерахунком градієнта згідно 2.2.46 (відхилення -29%). Результат можна побачити в таблиці 5.1.1.

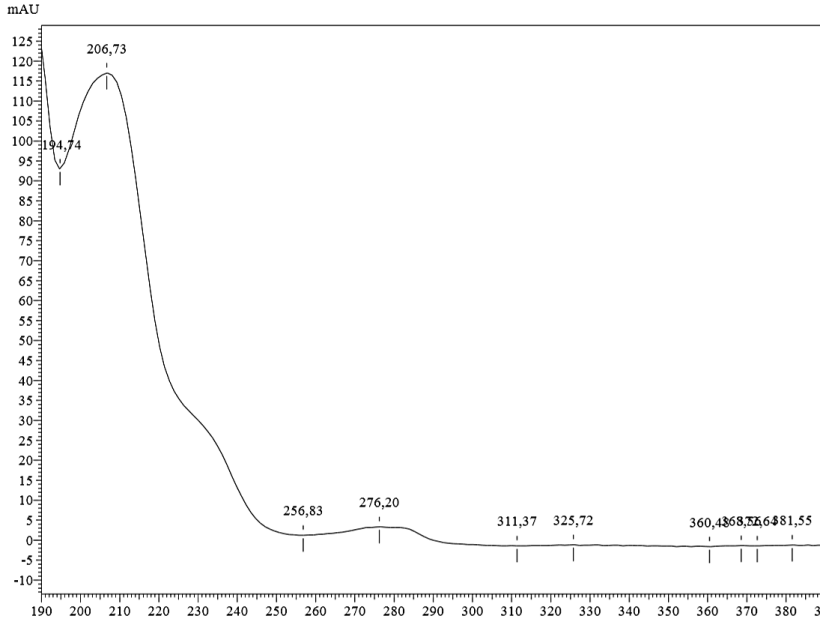
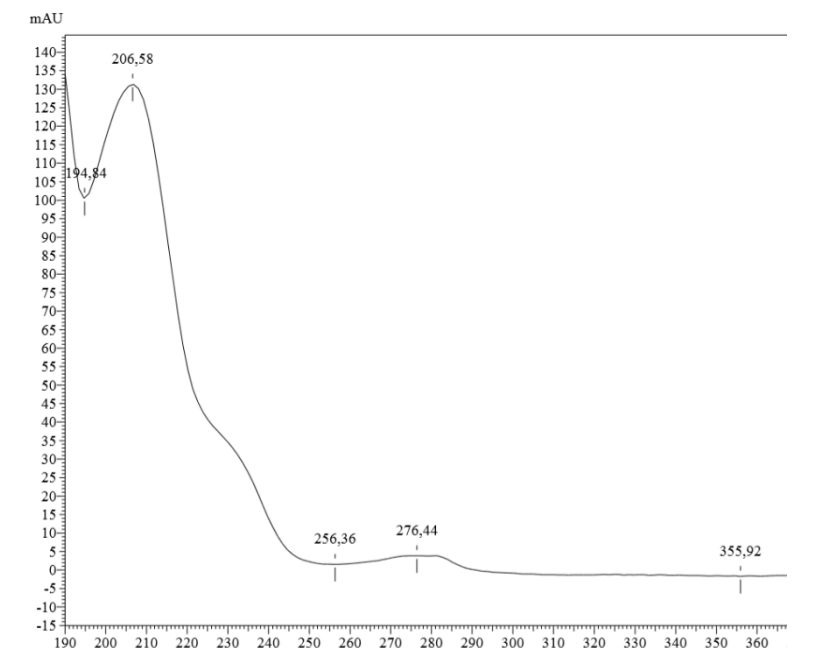
**Таблиця 5.1.1.** Градієнтна програма

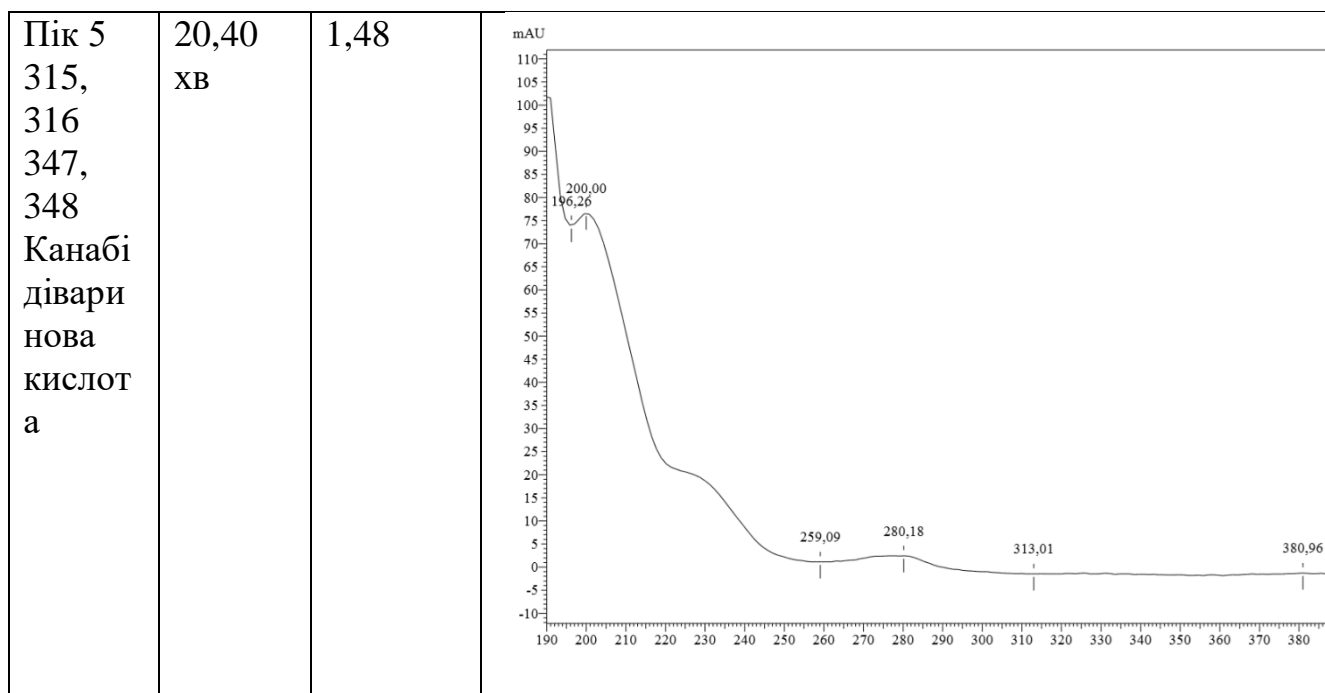
За ЄФ (хв)	Перераховано на іншу колонку (хв)	0,1% мурашина кислота (%)	Ацетонітрил (%)
0	0	50	50
1	1,4	50	50
14	19,6	65	35
24	33,6	95	5

Було встановлено відносний час утримування для кожного піку, що міститься в розчині для перевірки придатності. Також записано УФ-спектри сполук які представлено в таблиці 5.1.2.

**Таблиця 5.1.2.** Звірка методики з ЄФ

	Час утримування	Відносний час утримання	Спектри
Пік 1 315, 316 347, 348 Канабі тріол	12,40 хв	0,90	 <p>Chromatogram showing a major peak at 208.97 minutes. Other labeled peaks are at 253.74, 273.13, and 295.92 minutes. The y-axis is mAU (0-450) and the x-axis is time (190-350).</p>
Канабі діол 315, 316	13,80 хв	1,00	 <p>Chromatogram showing a major peak at 204.40 minutes. Other labeled peaks are at 251.99, 273.11, 298.15, 325.64, and 360.83 minutes. The y-axis is mAU (-200 to 2200) and the x-axis is time (190-370).</p>

<p>Пік 3 315, 316 Дельта -8- тетрагі дрокан абінол</p>	<p>17,84 хв</p>	<p>1,29</p>	 <p>Chromatogram showing a major peak at 206.73 minutes. Other labeled peaks include 194.74, 256.83, 276.20, 311.37, 325.72, 360.48, 368.33, and 381.55 minutes. The y-axis is mAU (ranging from -10 to 125) and the x-axis is time in minutes (ranging from 190 to 380).</p>
<p>Пік 4 315, 316 Дельта -9- тетрагі дрокан абінол</p>	<p>18,25 хв</p>	<p>1,32</p>	 <p>Chromatogram showing a major peak at 206.58 minutes. Other labeled peaks include 194.84, 256.36, 276.44, and 355.92 minutes. The y-axis is mAU (ranging from -15 to 140) and the x-axis is time in minutes (ranging from 190 to 360).</p>



Згідно європейської фармакопеї за відносними часами утримування ідентифікуються домішки які подано в таблиці 5.1.3.

**Таблиця 5.1.3.** Аналіз домішок за ЄФ

	Відносний час утримування	Назва
Домішка А	0,72	Канабідіварин
Домішка В	0,85	Канабідібутол
Домішка С	1,15	Канабінол
Домішка Д	1,21	Тетрагідроканабінол
Домішка Е	1,26	Канабідіол гідроксихінон

Домішка Д в цій таблиці і є тетрагідроканабінолом, яка має утворитися при кислотній обробці згідно фармакопейної статті. Не зважаючи на те що хроматографічні колонки у дослідженні різні, було виявлено два піки з відносними часами 1,29 та 1,32, які можуть бути тетрагідроканабінолом, який в свою чергу може складатися зі структурних ізомерів дельта-8-тетрагідроканабінол та дельта-9-тетрагідроканабінол. Згідно ЄФ відносний

час утримування тетрагідроканабінолу 1,21. З огляду на близькі значення можна припустити що ці два піки і є тетрагідроканабінолом.

Для того щоб дізнатися які саме речовини містяться в розчині для перевірки придатності було використано метод газової хроматографії з мас-детектуванням і ідентифікацією за допомогою бібліотек NIST.

### **Ідентифікація піків методом газової хроматографії**

*Прилад:* газовий хроматограф з мас-спектром – GCMS – QP2010

*Колонка:* Restek Rxi-5ms (30m x 0,25mm), товщина шару на стінках = 0,25 мкм

*Температурна програма:*  $t^0$  печі колонки =  $40^0$ ;  $t^0$  колонки початкова =  $40^0$ ;  $t^0$  колонки кінцева =  $300^0$ ;  $t^0$  інжекції =  $220^0$ ; швидкість нагрівання колонки =  $10^0$ /хв

*Тиск:* 86,9 кПа, *загальний потік:* 41,1 мл/хв, *потік колонки:* 1,56 мл/хв

### **Розчин для перевірки придатності згідно монографії канабідіол Європейської фармакопеї**

При хроматографуванні розчину для перевірки придатності було виявлено 10 піків речовин, серед яких виявлено канабідіол, канабіхромен, дельта-8-канабінол і дельта-9-канабінол, які представлені інтенсивними піками 5-10 на рис. 5.1.1. Спектри сполук представлені на рис. 5.1.2 - 5.1.11.

SST cannabidiol

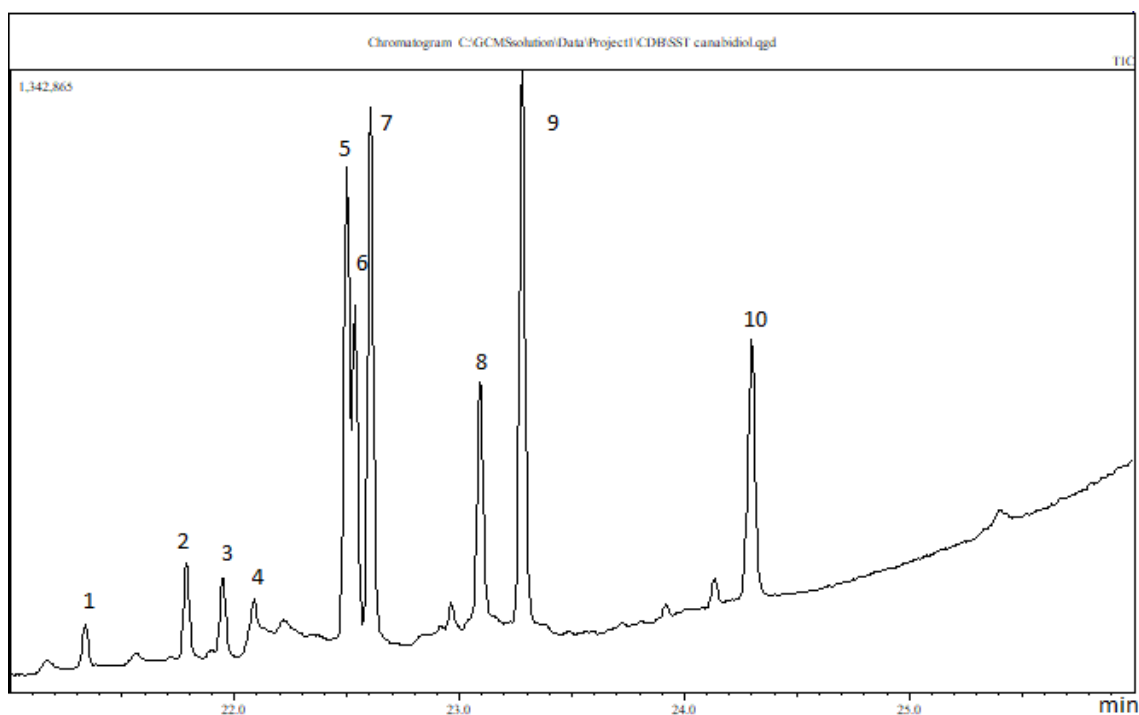


Рис. 5.1.1. Хроматограма розчину для перевірки придатності

### Пік 1

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabidiol	85%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

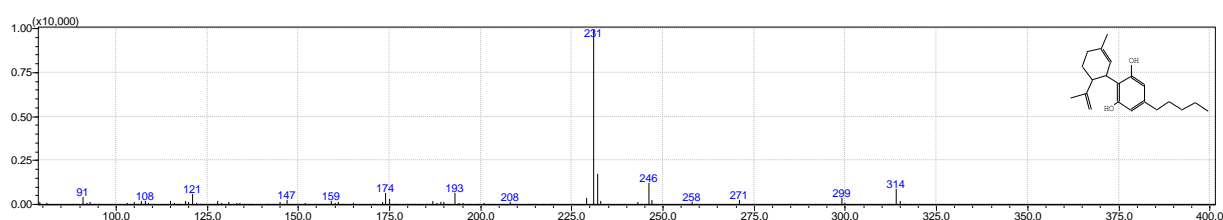
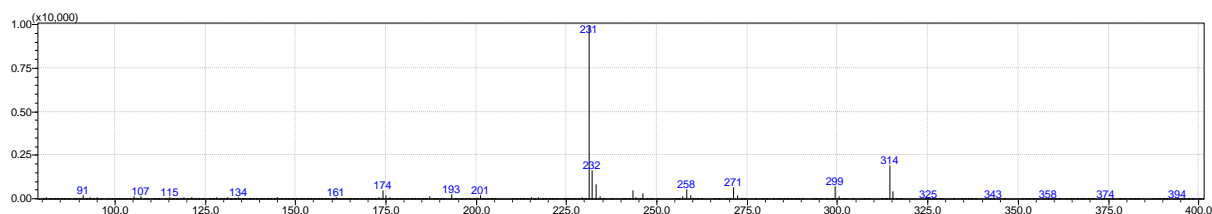


Рис. 5.1.2. Спектр піку 1 і бібліотечний спектр.

### Пік 2

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabichromene	88%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

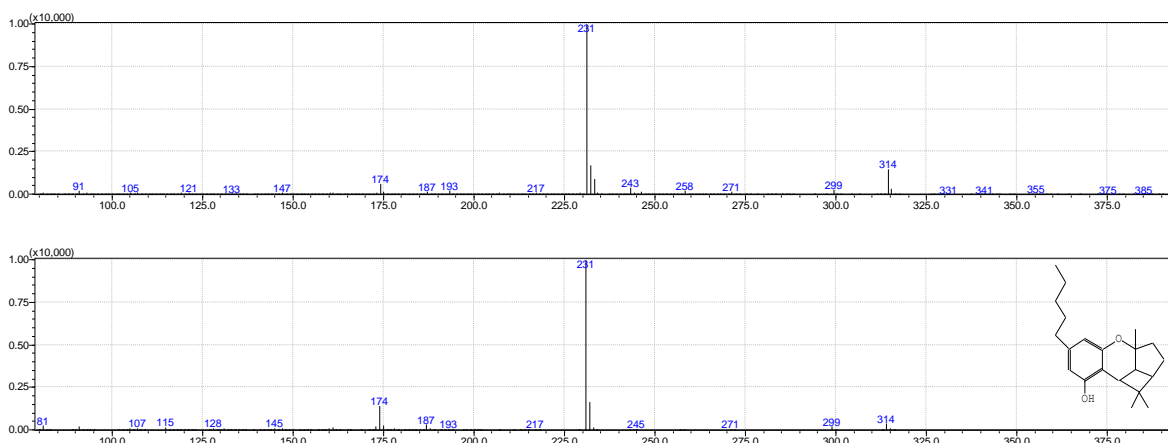


Рис. 5.1.3. Спектр піку 2 і бібліотечний спектр.

### Пік 3

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8- Tetrahydrocannabinol	77%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

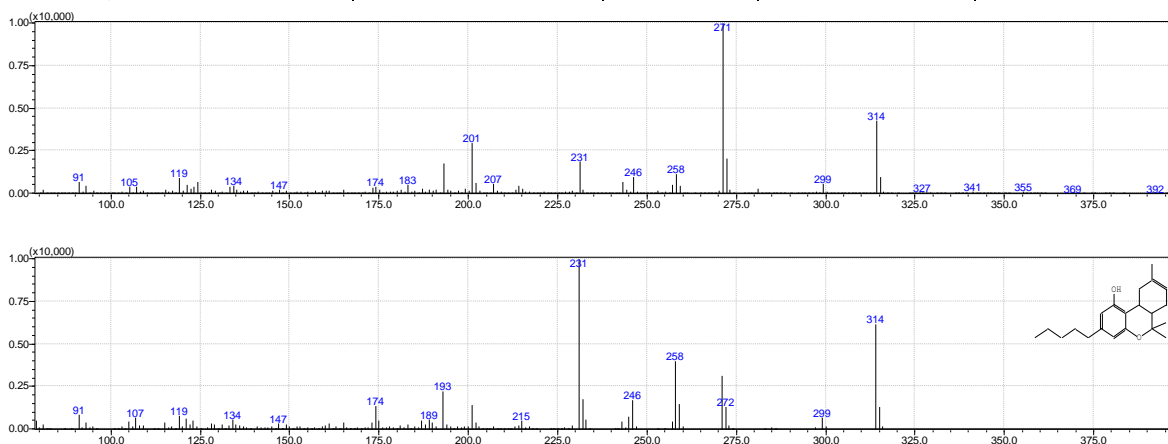
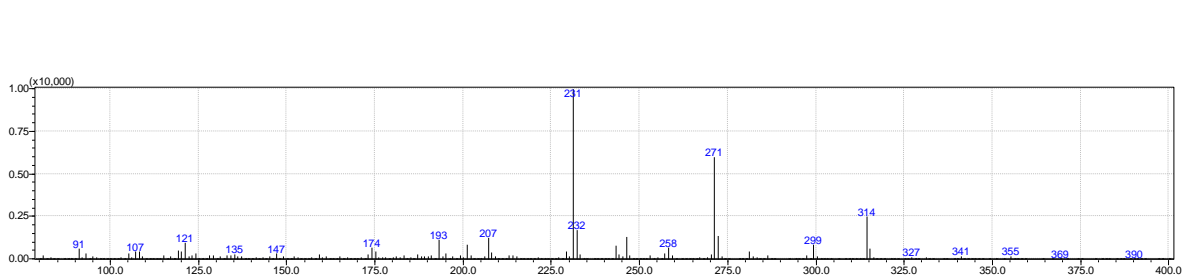


Рис. 5.1.4. Спектр піку 3 і бібліотечний спектр.

### Пік 4

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8- Tetrahydrocannabinol	80%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib



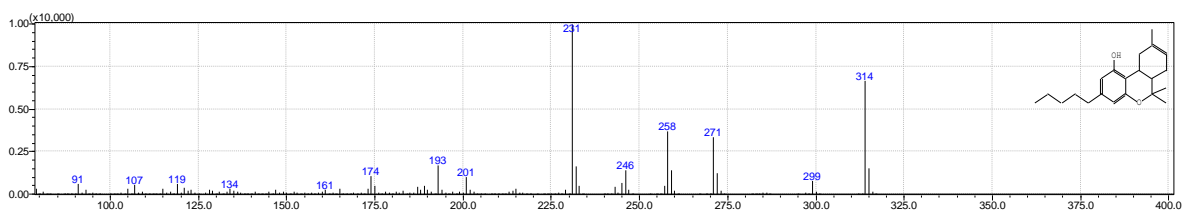


Рис. 5.1.5. Спектр піку 4 і бібліотечний спектр.

### Пік 5

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabidiol	94%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

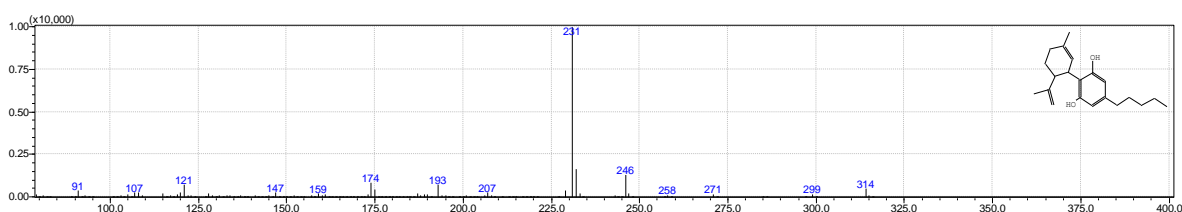
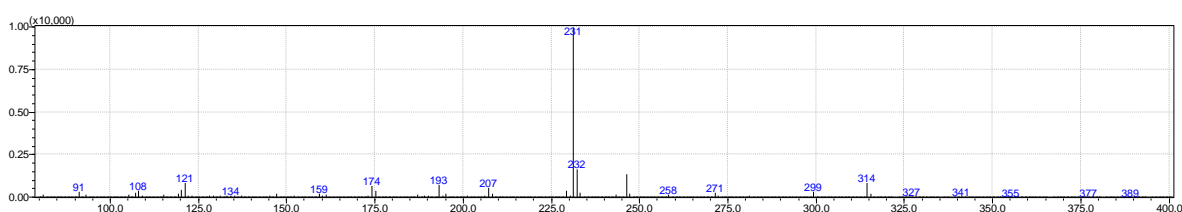
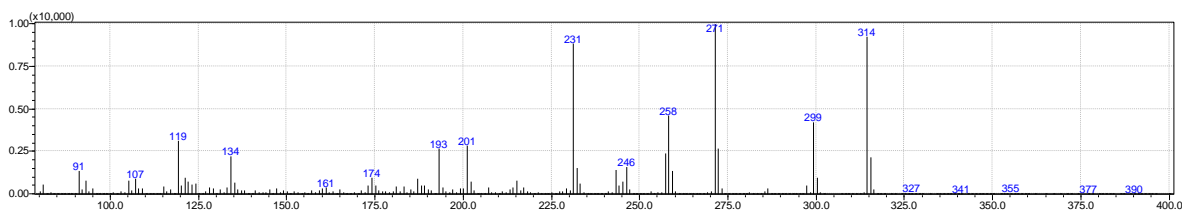


Рис.5.1.6. Спектр піку 5 і бібліотечний спектр.

### Пік 6

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8-Tetrahydrocannabinol	83%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib



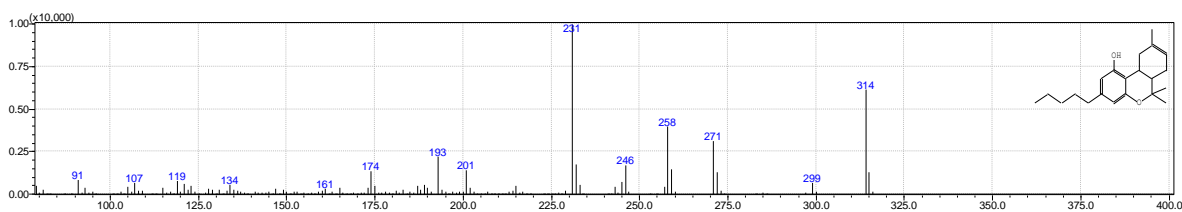


Рис. 5.1.7. Спектр піку 6 і бібліотечний спектр.

### Пік 7

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabichromene	89%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

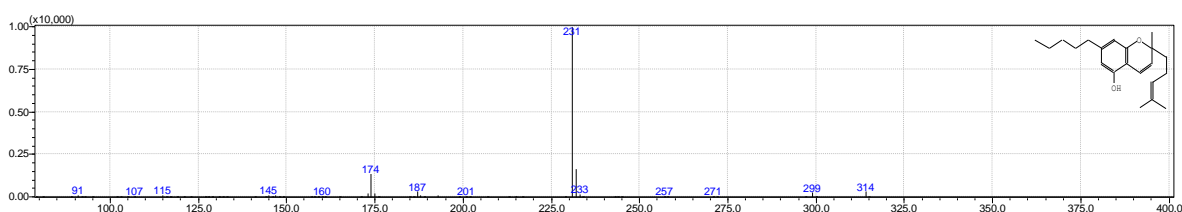
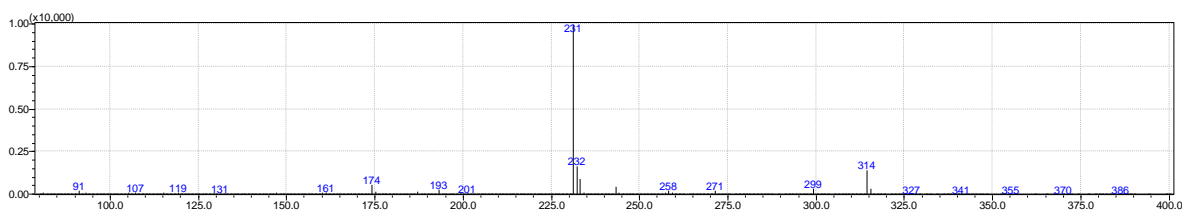
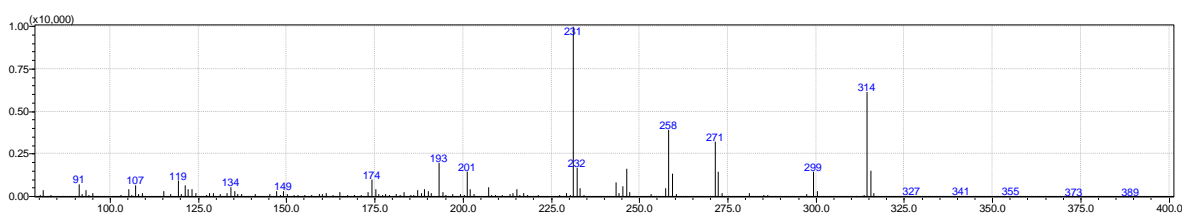


Рис.5.1.8. Спектр піку 7 і бібліотечний спектр.

### Пік 8

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8-Tetrahydrocannabinol	95%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

95% DELTA.8-Tetrahydrocannabinol 314 C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> NIST17s.lib



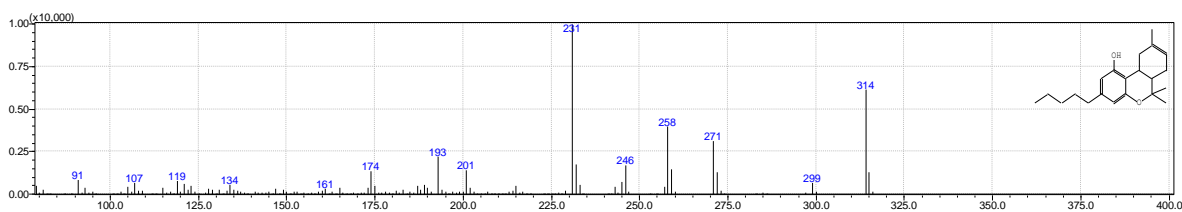


Рис. 5.1.9. Спектр піку 8 і бібліотечний спектр.

### Пік 9

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Dronabinol	95%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

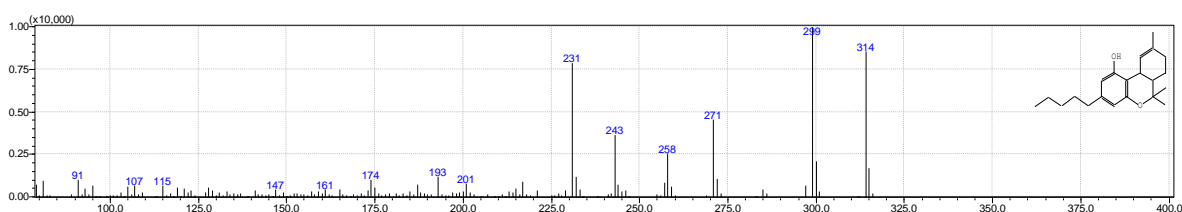
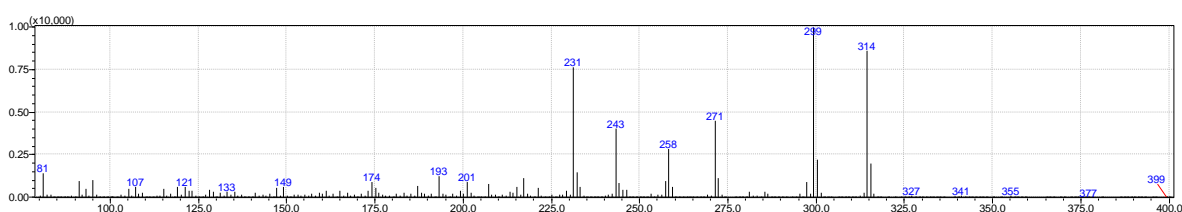
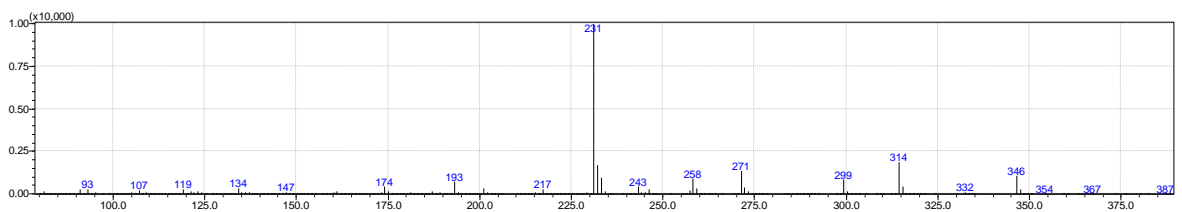
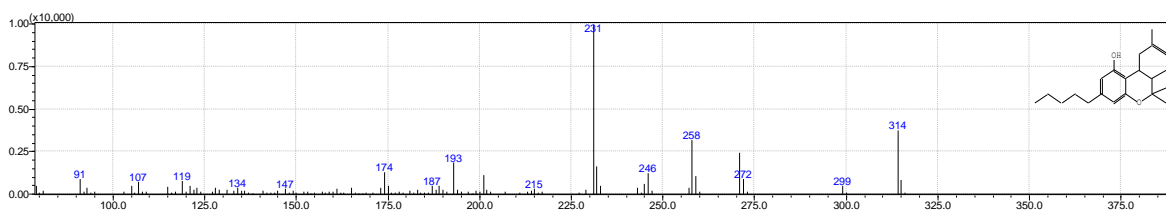


Рис. 5.1.10. Спектр піку 9 і бібліотечний спектр.

### Пік 10

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8-Tetrahydrocannabinol	79%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib





**Рис. 5.1.11.** Спектр піку 10 і бібліотечний спектр.

Також методом газової хроматограми було встановлено склад дієтичних добавок для яких буде розроблятися методика. Це зроблено для того щоб розуміти які сполуки можуть заважати специфічності методики і в яких дієтичних добавок, а які дієтичні добавки не потребують значної уваги при перевірці специфічності визначення канабідіолу і ризику заважаючого впливу допоміжних речовин немає.

Зокрема в олії GeNo було виявлено канабідіол і тригліцериди жирних кислот які є компонентами олії – допоміжного компонента цього препарату. Тому при проведенні визначення методом рідинної хроматографії при детектуванні за 275 нм ризик заважаючого впливу допоміжних компонентів відсутній, оскільки тригліцериди жирних кислот не можуть сигналізувати за такої довжини хвилі, оскільки не містять хромофорних груп, які на таке здатні. Хроматограма і спектри сполук зображено на рис 5.1.12 – 5.1.16.

## Олія GeNo

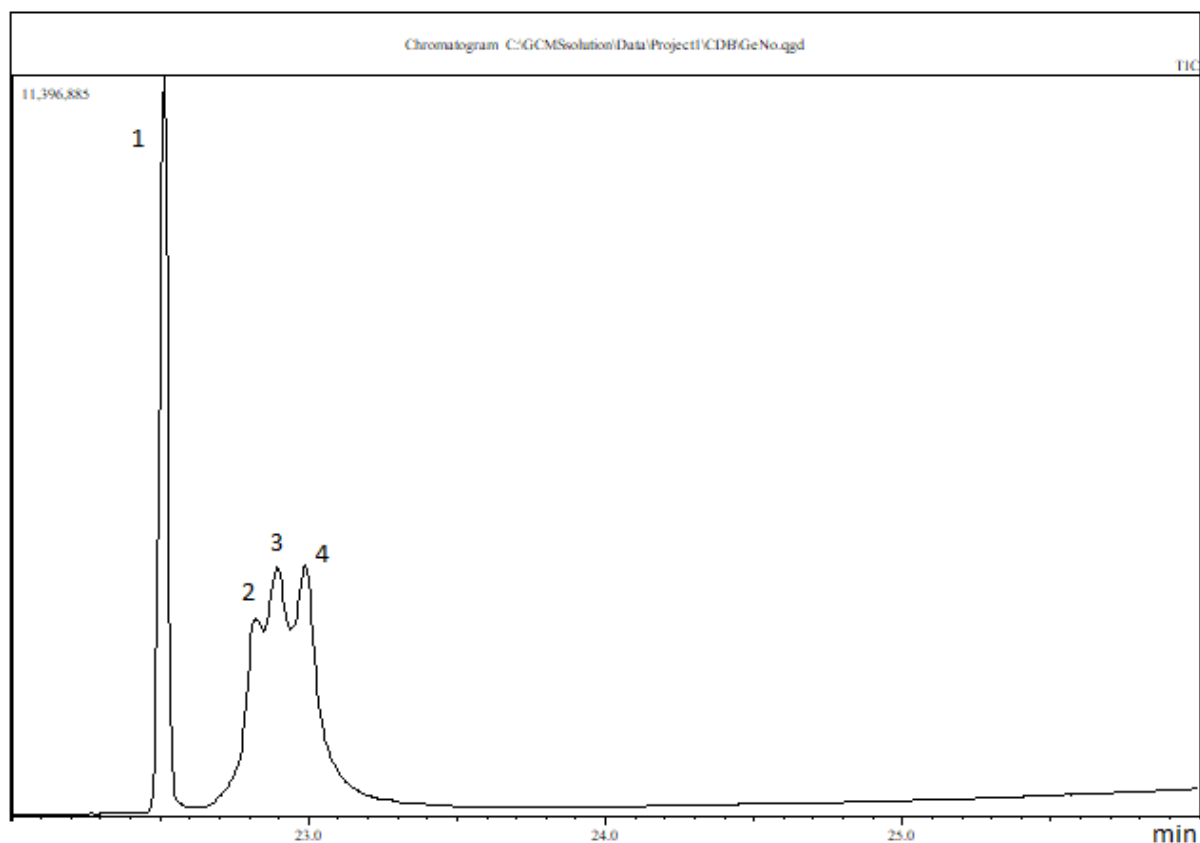


Рис.5.1.12. Хроматограма ідентифікації олії GeNo.

### Пік 1

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabidiol	95%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

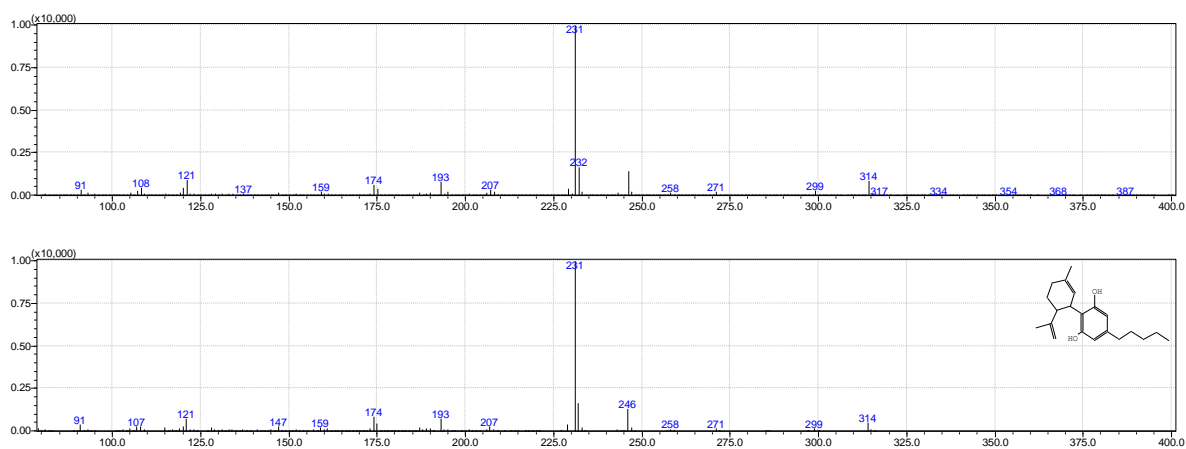


Рис. 5.1.13. Спектр піку 1 і бібліотечний спектр.

### Пік 2

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
2-(Octanoyloxy)propane-1,3-diyl bis(decanoate)	95%	526	C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	NIST17-2.lib

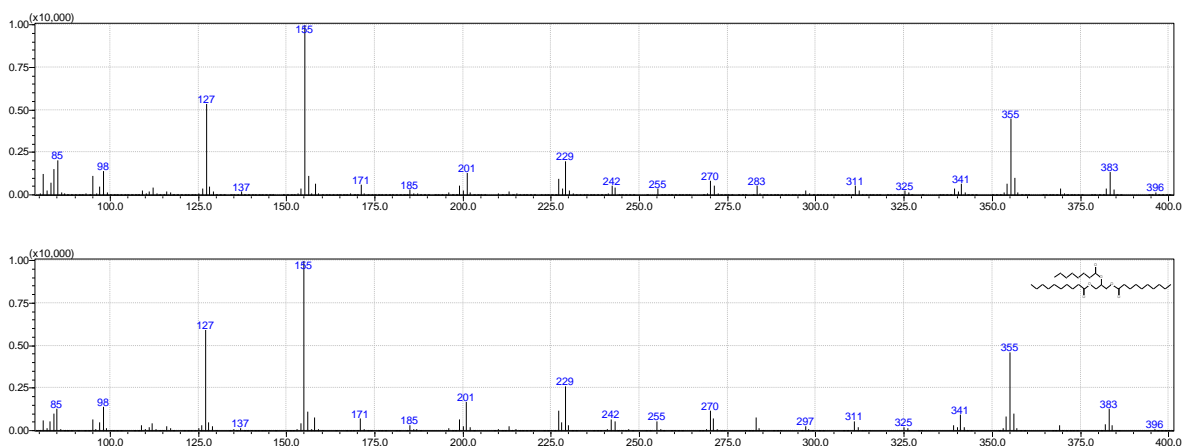


Рис. 5.1.14. Спектр піку 2 і бібліотечний спектр.

### Пік 3

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
2-(Octanoyloxy)propane-1,3-diyl bis(decanoate)	95%	526	C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	NIST17-2.lib

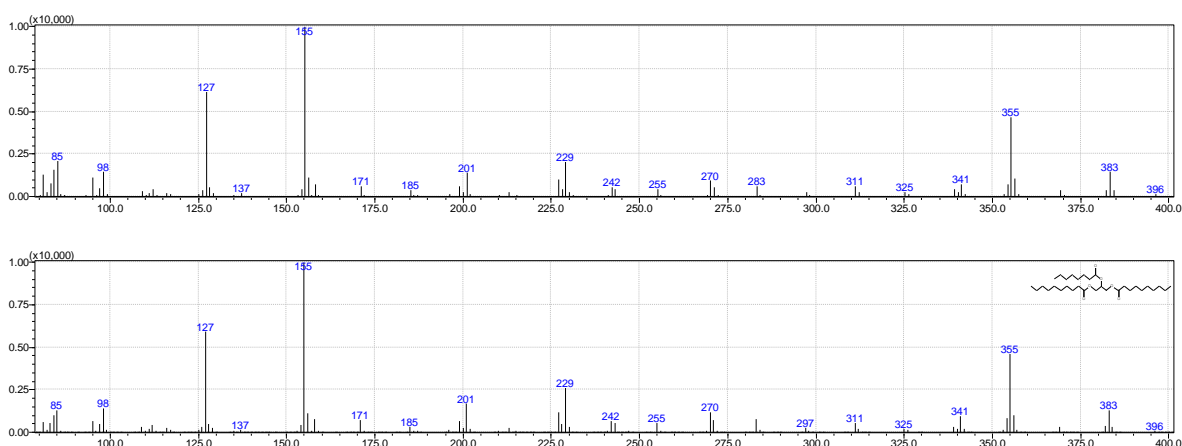
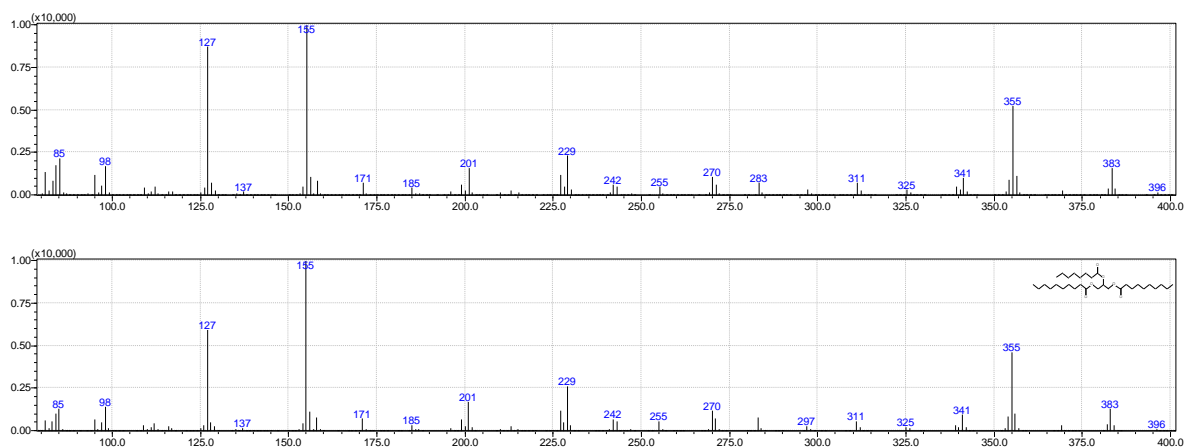


Рис. 5.1.15. Спектр піку 3 і бібліотечний спектр.

### Пік 4

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
2-(Octanoyloxy)propane-1,3-diyl bis(decanoate)	94%	526	C <sub>31</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	NIST17-2.lib



**Рис. 5.1.16.** Спектр піку 4 і бібліотечний спектр.

### Олія 100 CBD

В олії Меді було виявлено канабіноїди утворення яких могло відбутися внаслідок тривалого зберігання цієї олії за кімнатних умов. Хроматограма і мас-спектри зображено на рис. 5.1.17 – 5.1.26.

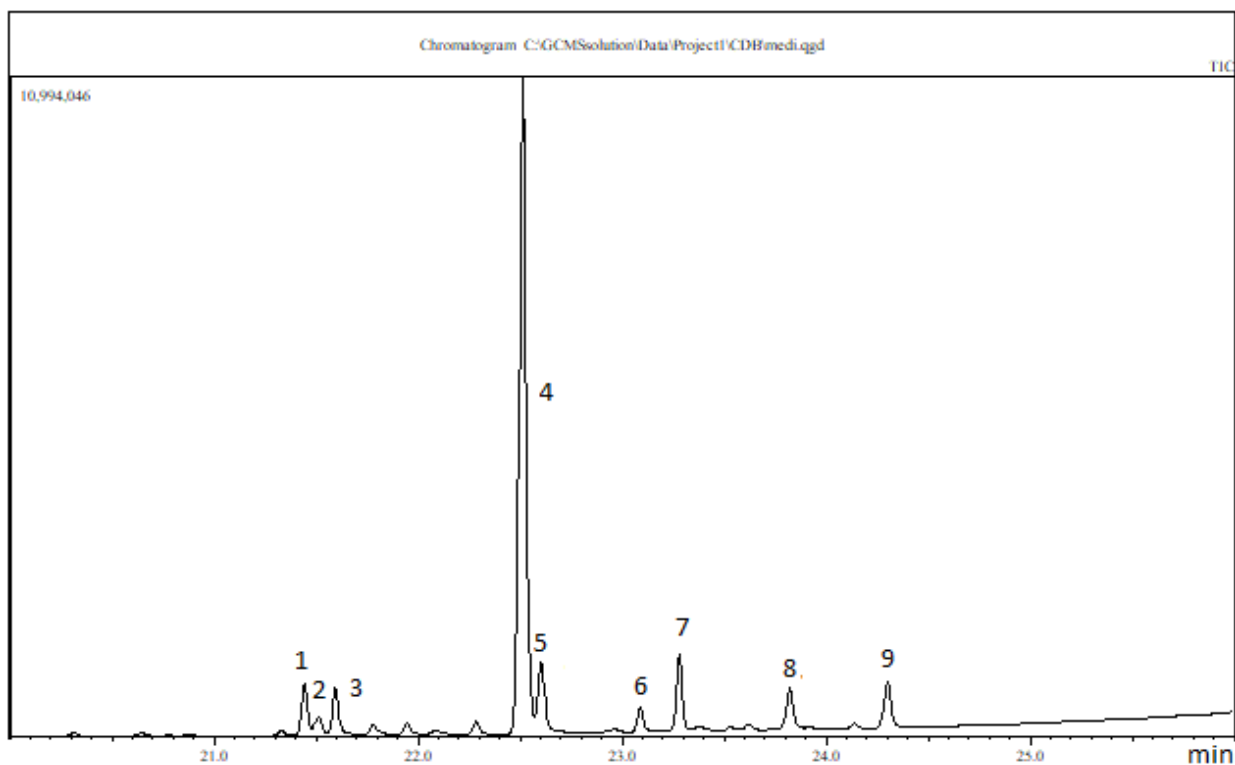


Рис. 5.1.17. Хроматограма ідентифікації олії 100 CBD.

### Пік 1

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabidiol	95%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

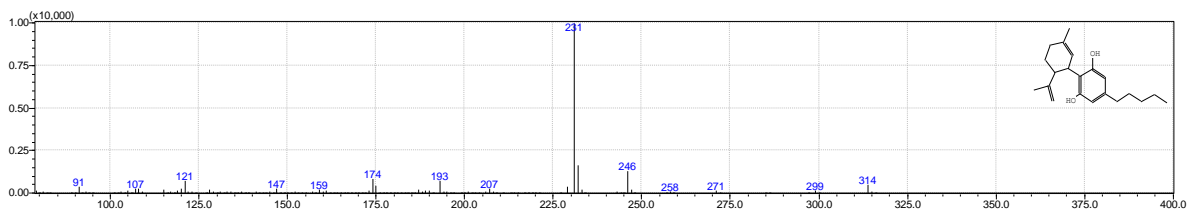
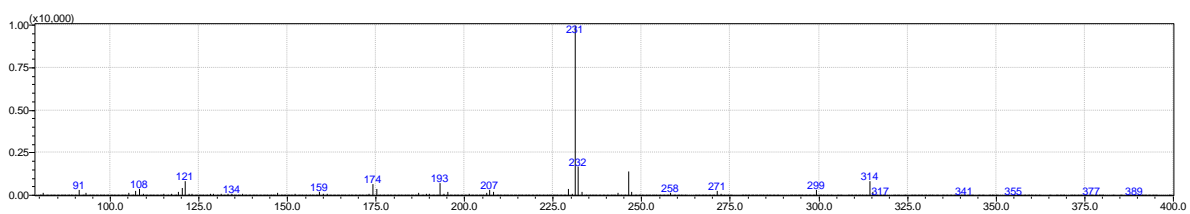


Рис. 5.1.18. Спектр піку 1 і бібліотечний спектр.

### Пік 2

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8- Tetrahydrocannabinol	82%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

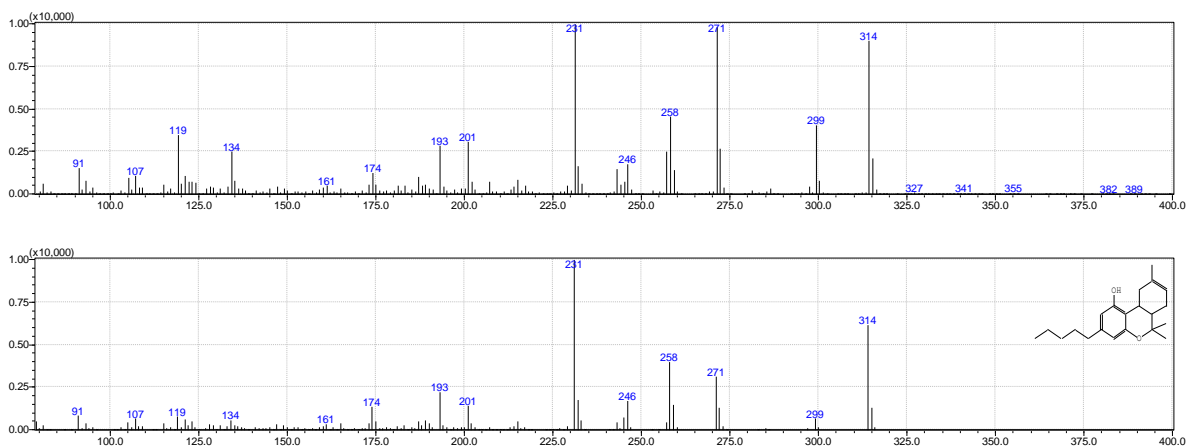


Рис. 5.1.19. Спектр піку 2 і бібліотечний спектр.

### Пік 3

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabichromene	88%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

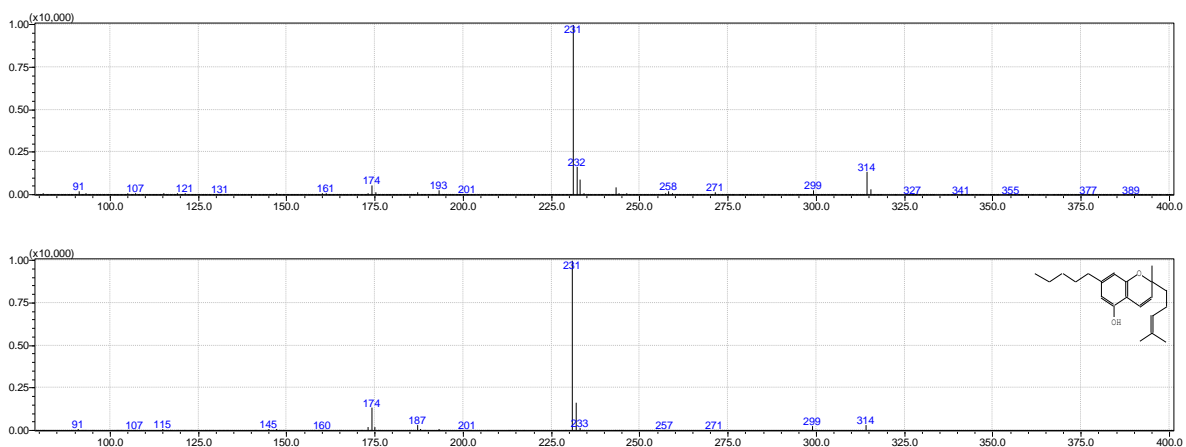


Рис. 5.1.20. Спектр піку 3 і бібліотечний спектр.

### Пік 4

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabidiol	93%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

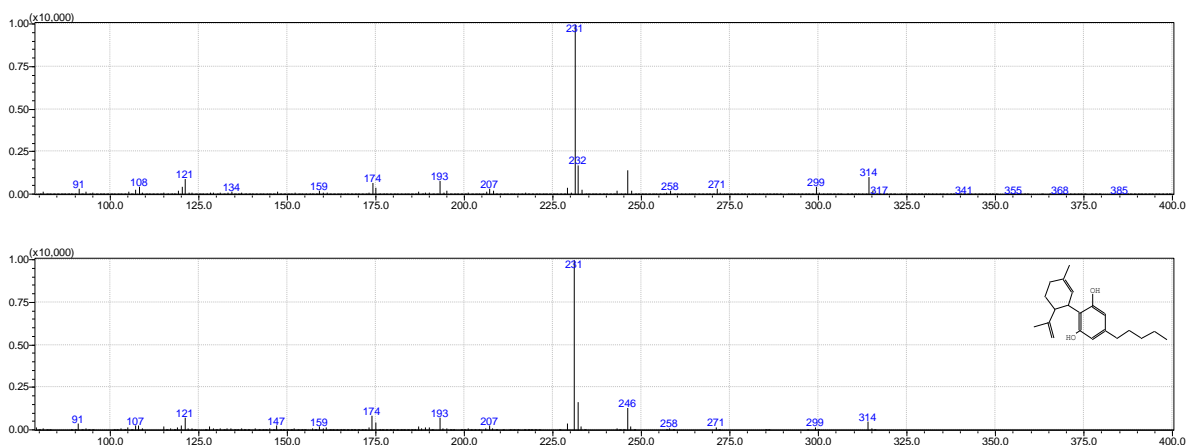


Рис. 5.1.21. Спектр піку 4 і бібліотечний спектр.

### Пік 5

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabichromene	87%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

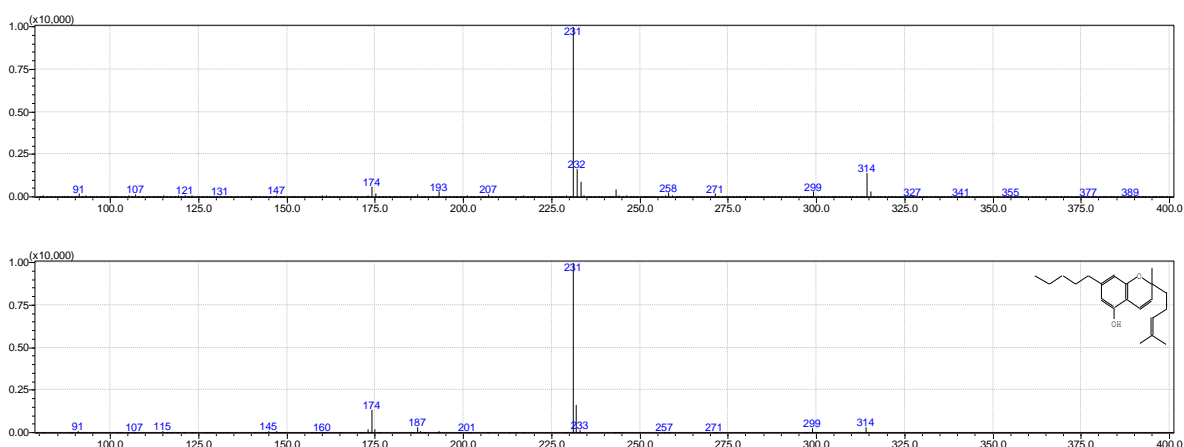


Рис. 5.1.22. Спектр піку 5 і бібліотечний спектр.

### Пік 6

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8- Tetrahydrocannabinol	92%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

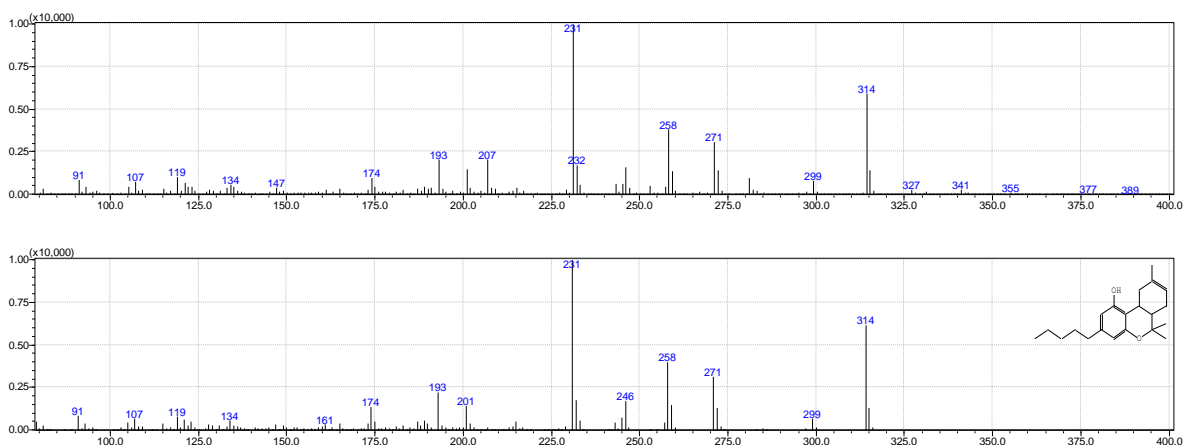


Рис. 5.1.23. Спектр піку 6 і бібліотечний спектр.

### Пік 7

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Dronabinol	94%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

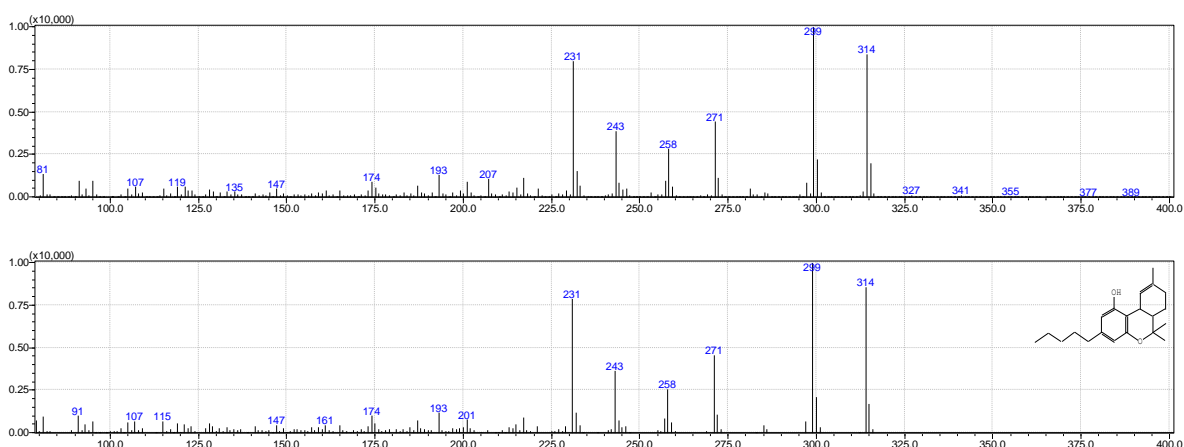


Рис. 5.1.24. Спектр піку 7 і бібліотечний спектр.

### Пік 8

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8-Tetrahydrocannabinol	75%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

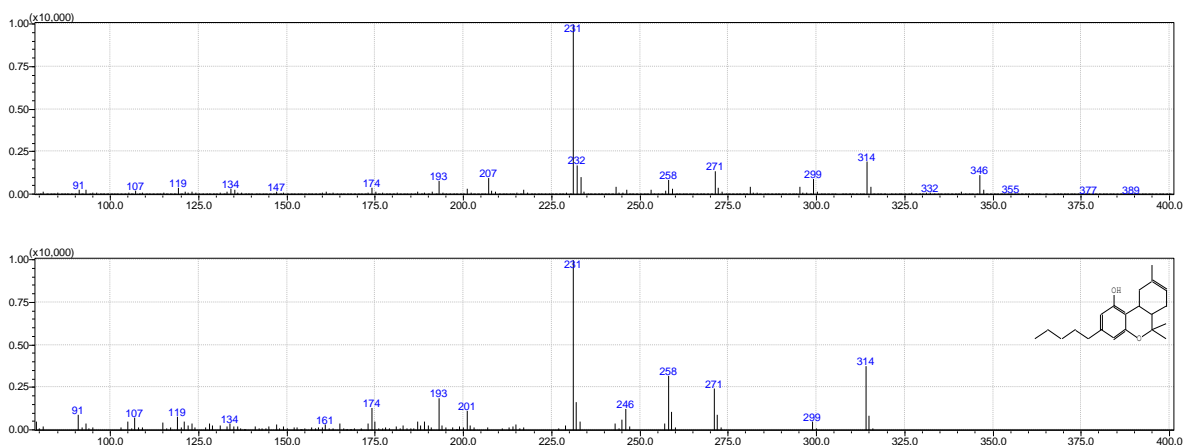


Рис. 5.1.25. Спектр піку 8 і бібліотечний спектр.

### Пік 9

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
DELTA.8- Tetrahydrocannabinol	72%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

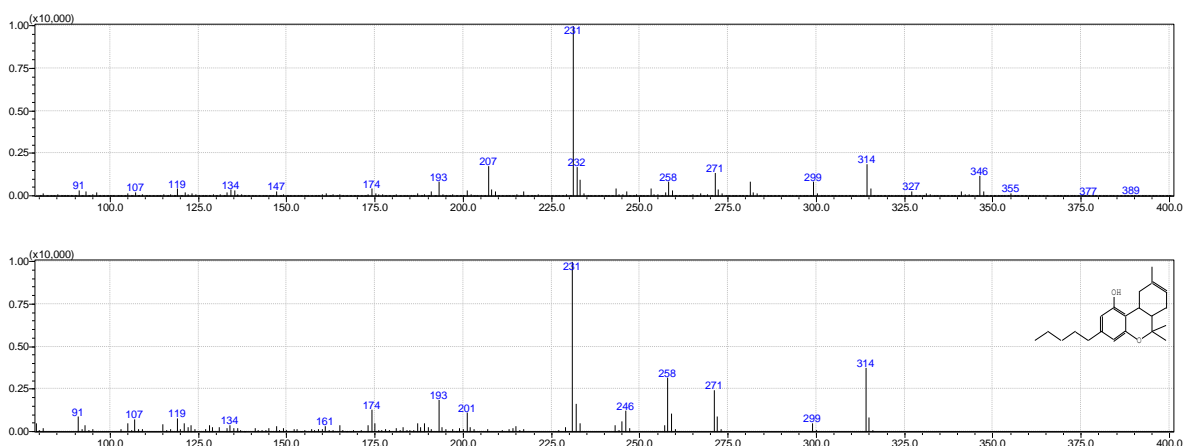


Рис. 5.1.26. Спектр піку 9 і бібліотечний спектр.

### Капсули Stark

В капсулах, що містять крім канабідіолу і екстракт куркуми виявлено компоненти куркуми – тумерон, альфа-турмерон, курлон, що містять спряжені подвійні зв'язки або ароматичне кільце. Тому ці сполуки можуть нести загрозу для специфічності методики, оскільки можуть мати сигнал за 275 нм. Допоміжні компоненти гліцерол трикаприлат і

Decanoyloxy)propane-1,3-diyl dioctanoate не становлять загрози специфічності методики, оскільки його молекула не містить хромофорів. Хроматограма і спектри зображено на рис 5.1.27 – 5.1.34.

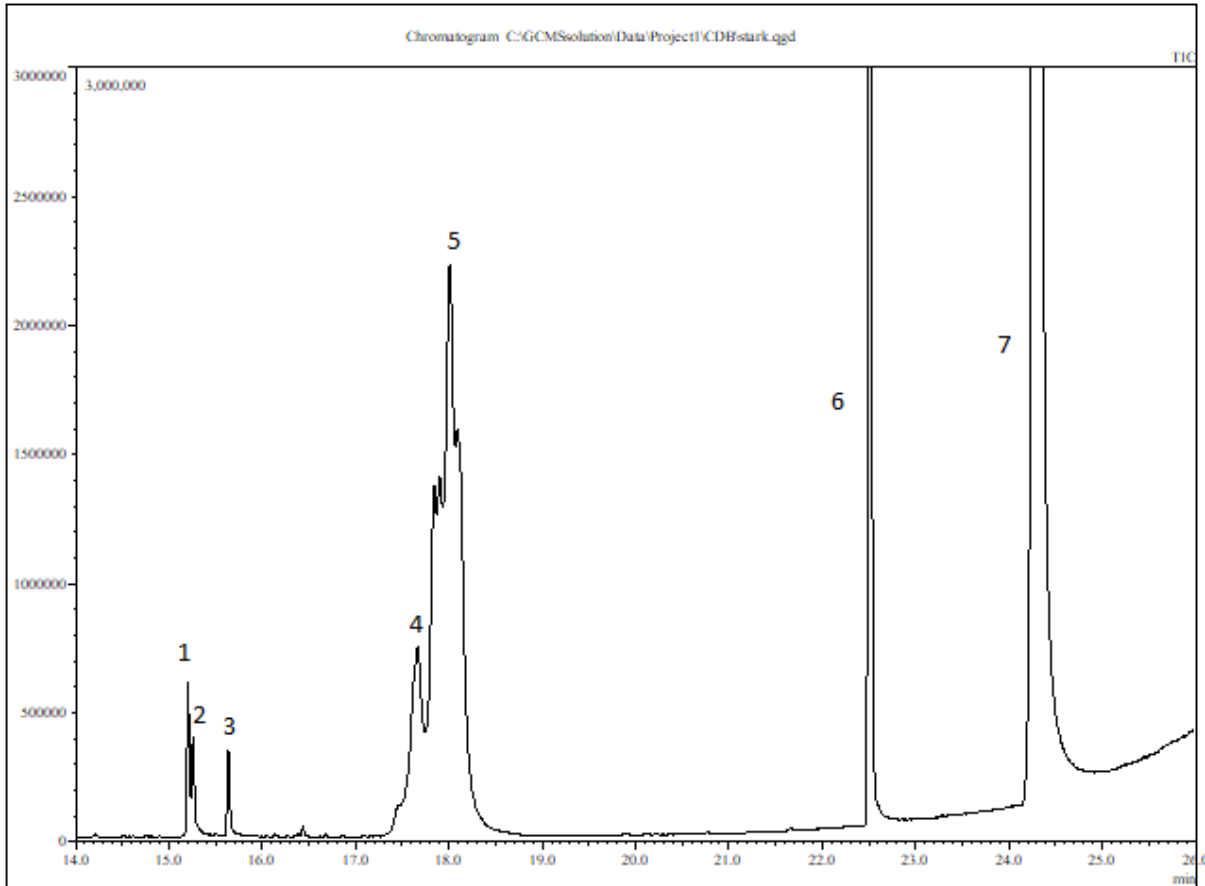
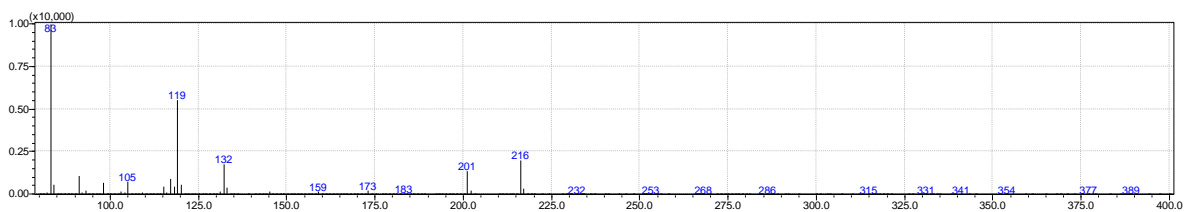


Рис. 5.1.27. Хроматограма ідентифікації капсул Stark.

### Пік 1

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
aR-Turmerone	94%	216	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O	NIST17-1.lib



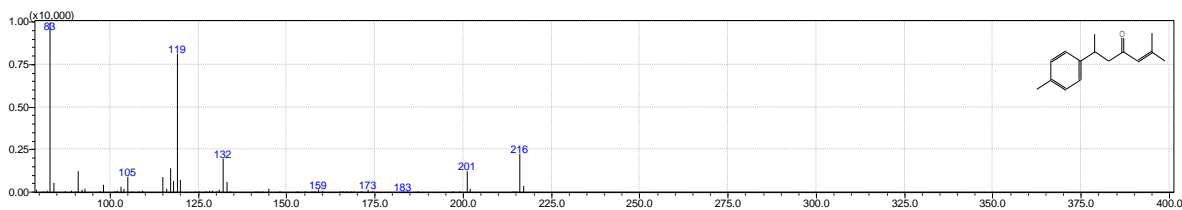


Рис. 5.1.28. Спектр піку 1 і бібліотечний спектр.

### Пік 2

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Thimerone	92%	218	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	NIST17s.lib

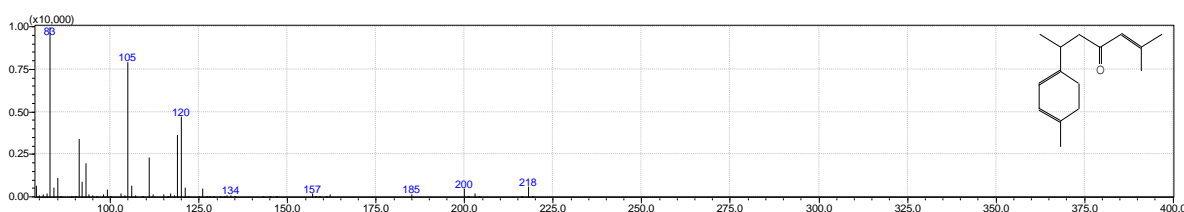
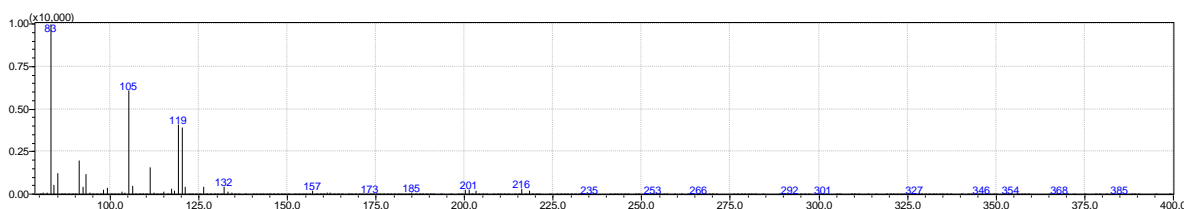


Рис. 5.1.29. Спектр піку 2 і бібліотечний спектр.

### Пік 3

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Curlone	98%	218	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	NIST17-1.lib

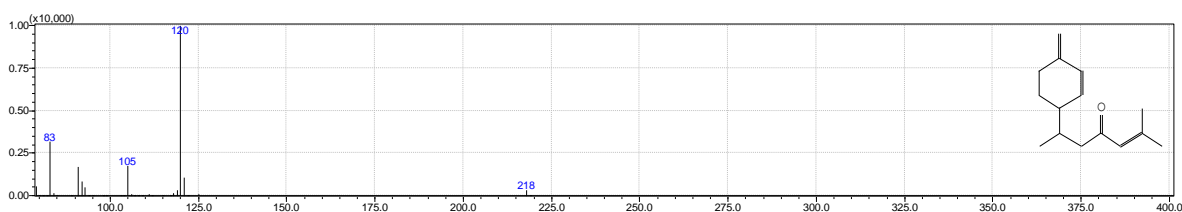
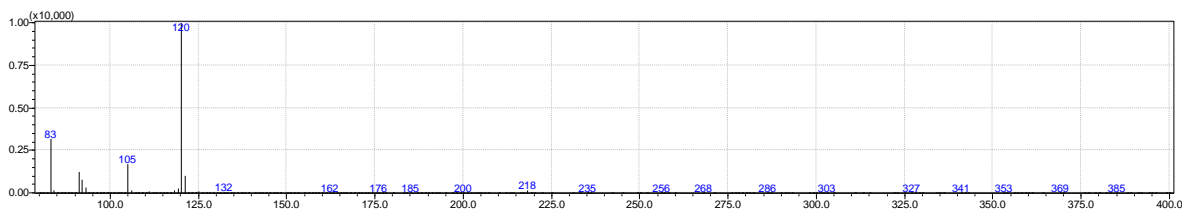


Рис. 5.1.30. Спектр піку 3 і бібліотечний спектр.

Пік 4

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Glycerol tricaprylate	96%	470	C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub>	NIST17s.lib

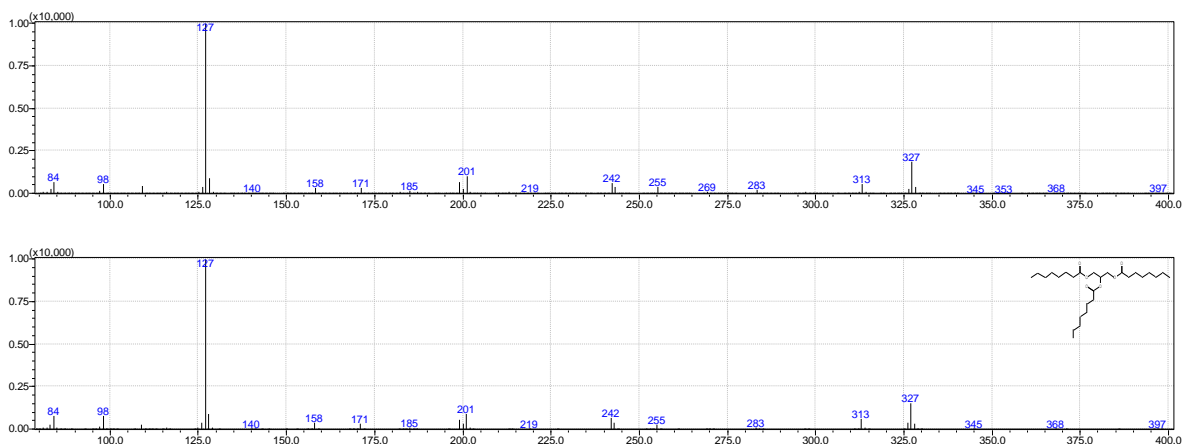


Рис. 5.1.31. Спектр піку 4 і бібліотечний спектр.

Пік 5

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Glycerol tricaprylate	96%	470	C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub>	NIST17s.lib

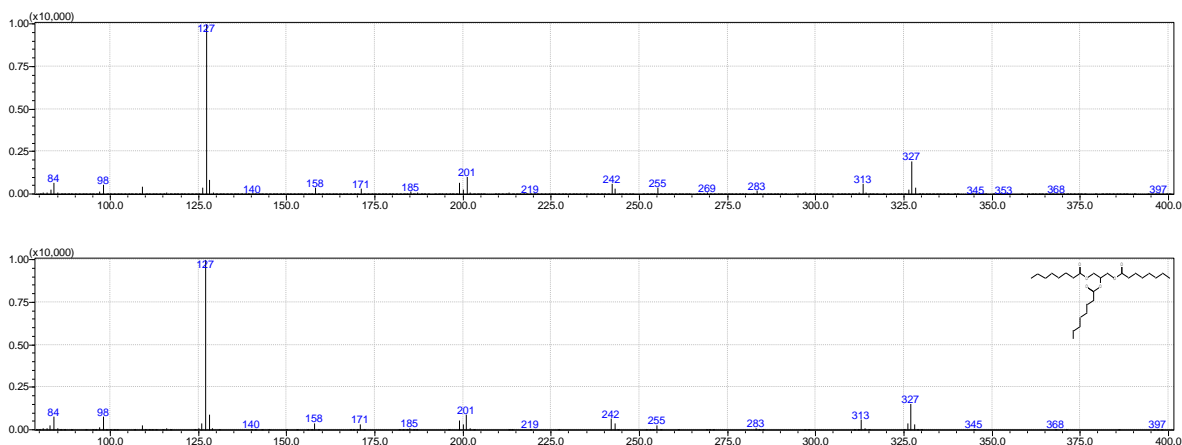


Рис. 5.1.32. Спектр піку 5 і бібліотечний спектр.

Пік 6

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
Cannabidiol	95%	314	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	NIST17s.lib

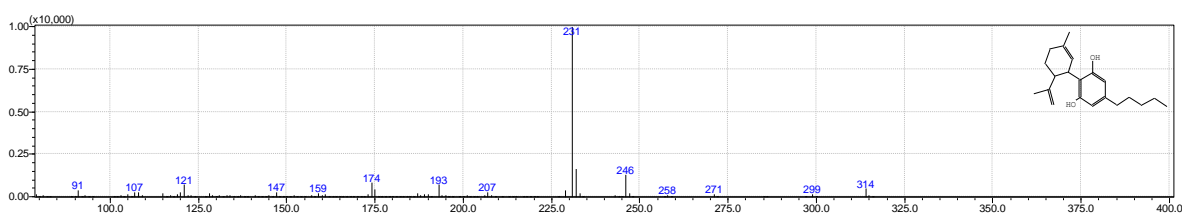
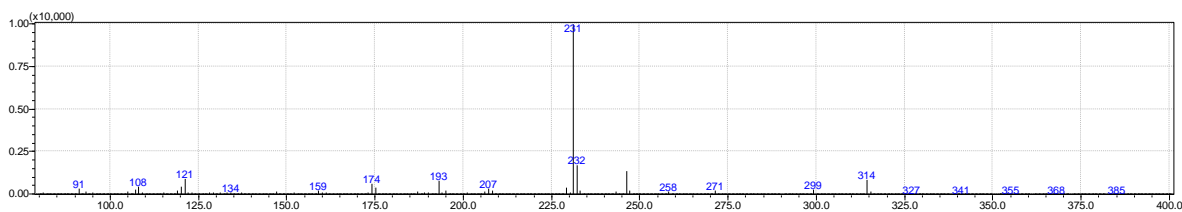


Рис. 5.1.33. Спектр піку 6 і бібліотечний спектр.

### Пік 7

Назва речовини	Ймовірність, %	Маса, m/z	Формула	Бібліотека спектрів
2-(Decanoyloxy)propane-1,3-diyl dioctanoate nol	96%	498	C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	NIST17-1.lib

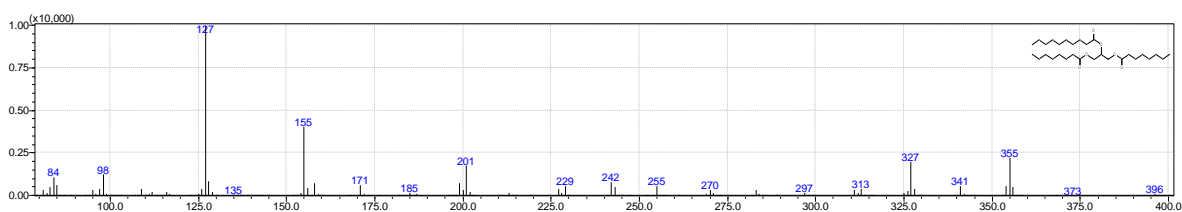
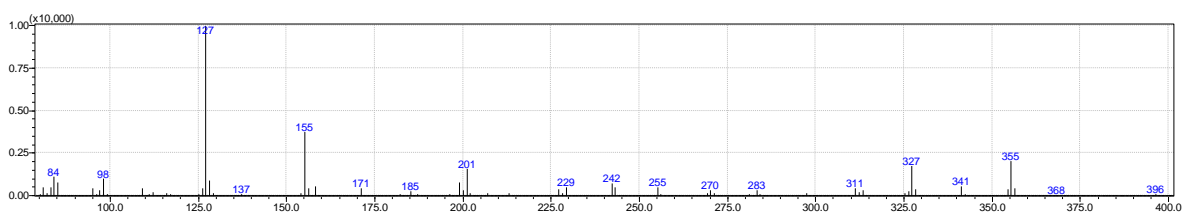
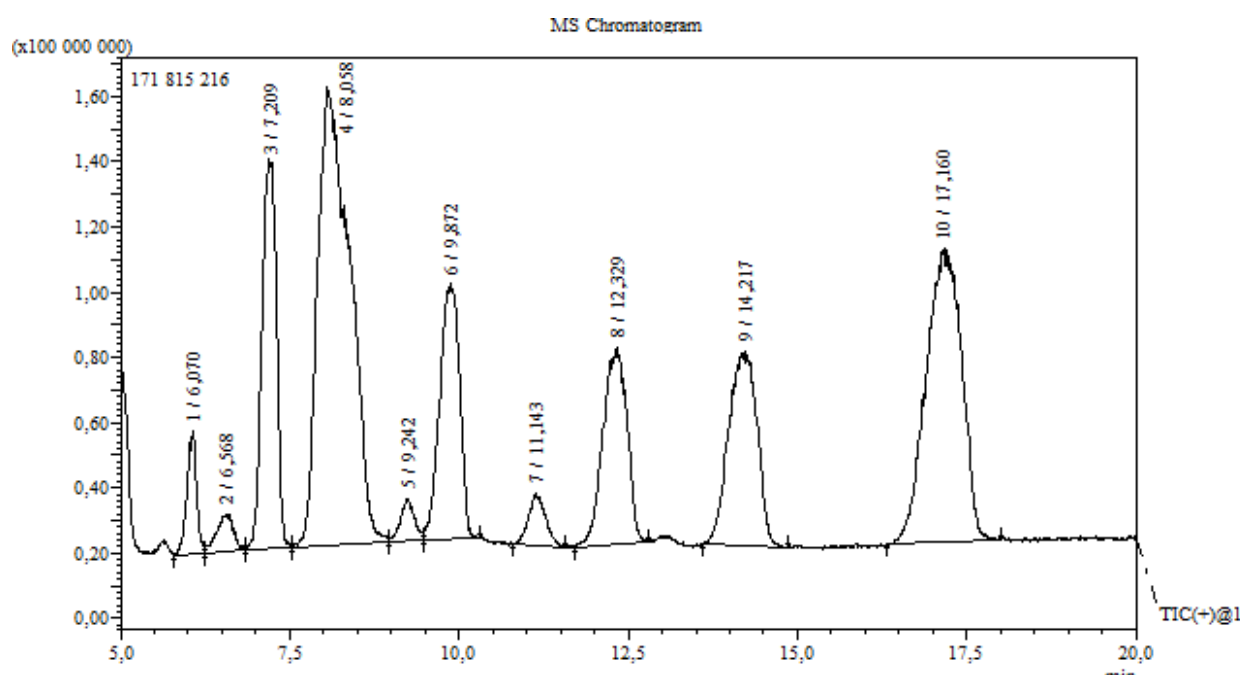


Рис. 5.1.34. Спектр піку 7 і бібліотечний спектр.

## Ідентифікація піків методом ВЕРХ-МС у розроблених хроматографічних умовах

Проведено хроматографування в розроблених умовах для визначення канабідіолу, де УФ-детектор замінено на Мас-детектор, задля отримання інформації про речовин в розчині для перевірки придатності хроматографічної системи.



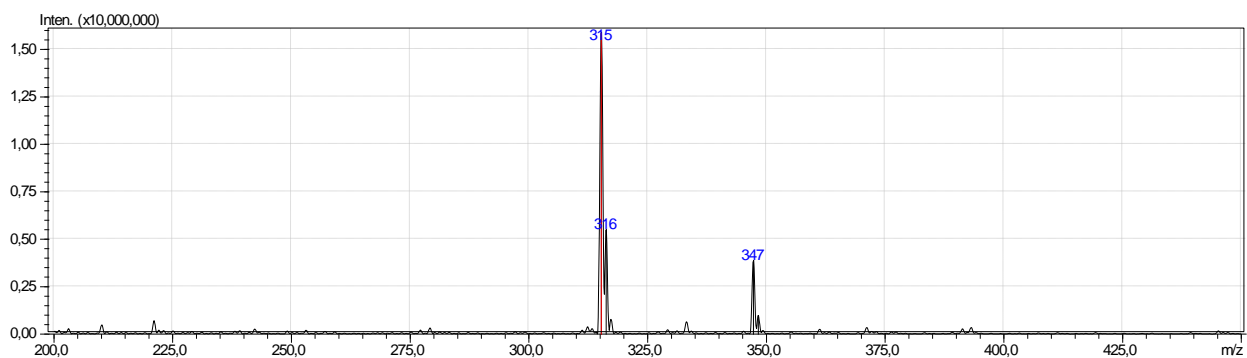
**Рис. 5.1.35.** Хроматограма розчину для перевірки придатності системи. Ідентифікація піків на хроматограмі проводилася на основі аналізу молекулярної маси, отриманої з мас-спектрометричного детектора. Для кожного піку було визначено його час утримання та відповідну молекулярну масу, що дозволило зробити припущення щодо можливої назви сполуки.

**Таблиця 5.1.4.** Результати аналізу

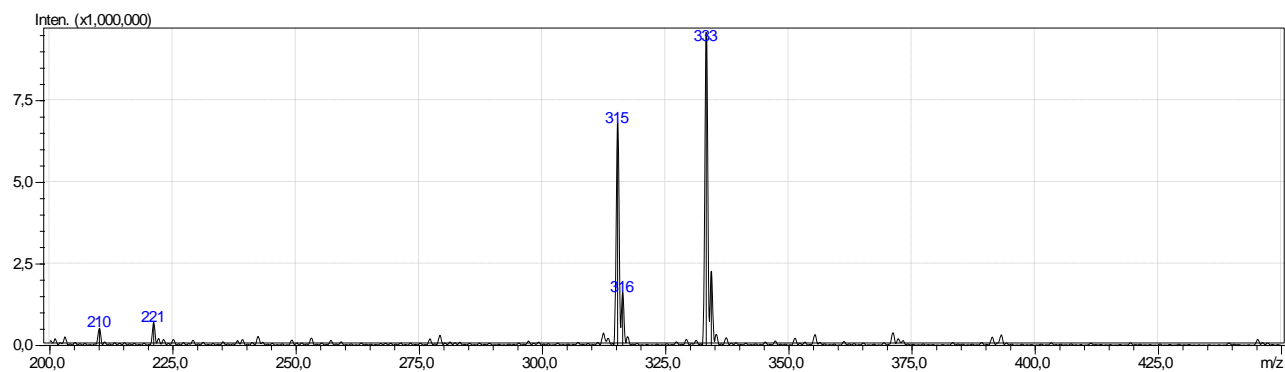
№ спектру піку	Час утримання	Молекулярна маса, m/z	Назва речовини
1	≈ 5 хв	315, 347	Канабітріол

2	≈ 6,05 хв	315, 333	trans-(-)-delta-9-tetrahydrocannabivarinic acid
3	≈ 7,2 хв	315, 347	trans-(-)-delta-9-tetrahydrocannabinolic acid
4	≈ 9,9 хв	315, 333	trans-(-)-delta-9-tetrahydrocannabivarinic acid
5	≈ 12,3 хв	315	Дельта-8-тетрагідроканабінол
6	≈ 14,2 хв	315	Дельта-9-тетрагідроканабінол
7	≈ 17,2 хв	315, 347	Канабідіваринова кислота

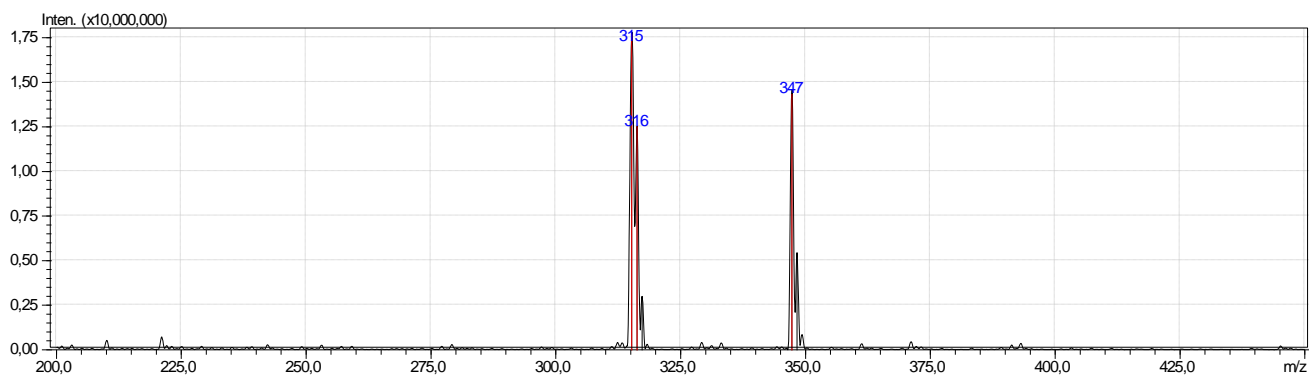
### 1. Пік близько 5 хв.



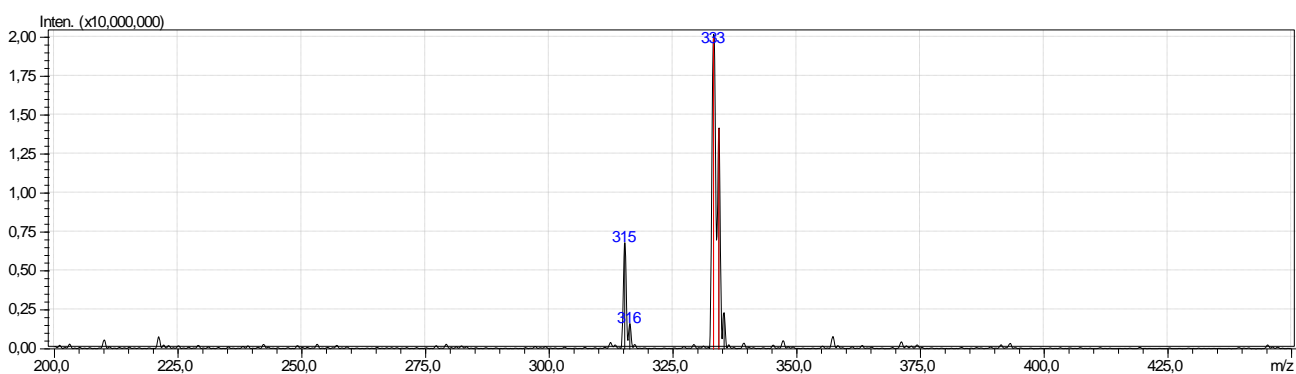
## 2. Пік на 6,05 хв.



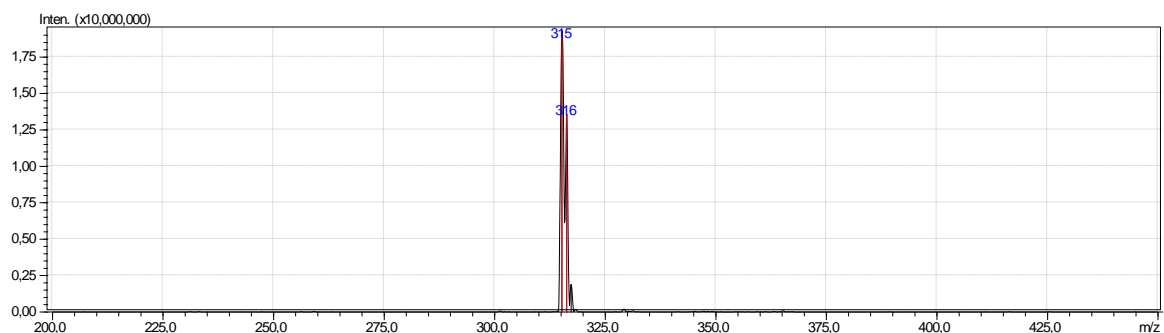
## 3. Пік близько 7,2 хв.



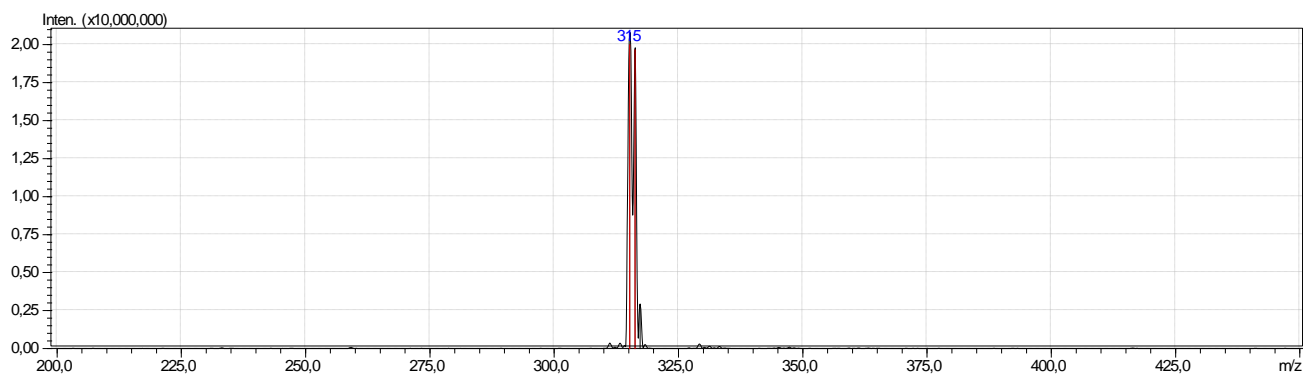
## 4. Пік близько 9,9 хв.



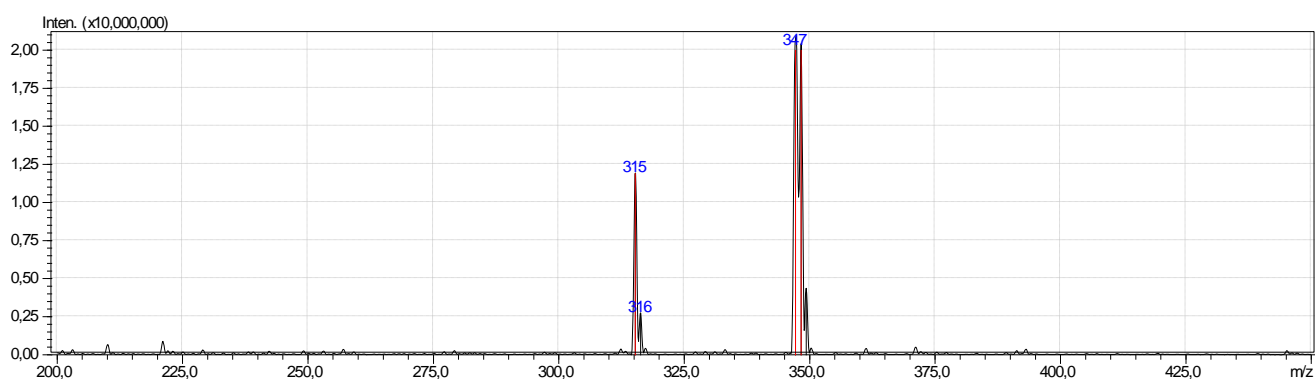
### 5. Пік близько 12,3 хв.



### 6. Пік близько 14,2 хв.



### 7. Пік близько 17,2 хв.



**Рисунок 5.1.36.** Сім спектрів отриманих в результаті аналізу.

Було виявлено, що піки з часами утримування 12,3 хв і 14,2 хв відповідають сполукам з молекулярною масою 315 а.о.м. Ці сполуки можуть відповідати дельта8-тетрагідроканабінолу і дельта-9-тетрагідроканабінолу які були ідентифіковані методом газової хроматографії з мас-детектором. Також це

узгоджується з даними отриманими за методикою Європейської фармакопеї. Тому можна говорити, що розчин для перевірки придатності можна використати для ідентифікації тетрагідроканабінолу і його кількісної оцінки по стандарту канабідіолу, який має ідентичну структуру а отже і відгук в УФ-діапазоні.

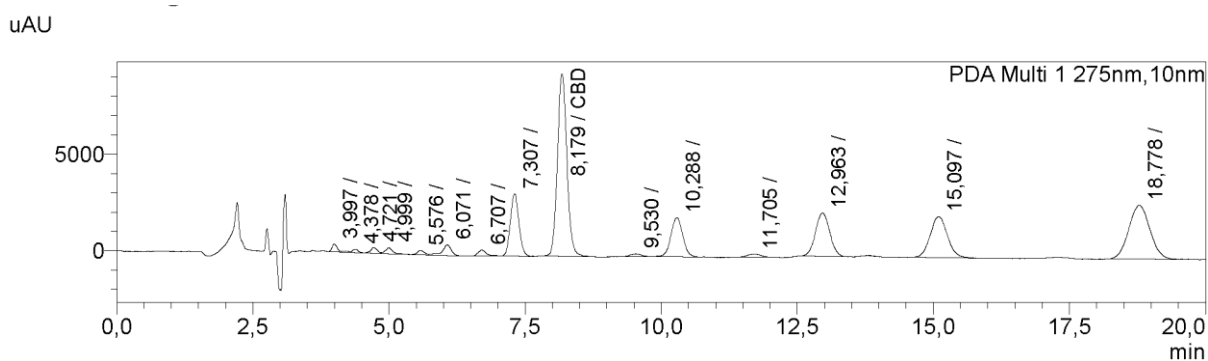
## 5.2. Перевірка специфічності методики

### Зразок розчин для перевірки придатності хроматографічної системи

Для перевірки специфічності хроматографічної методики зазвичай використовують 2 підходи:

- 1) Перевірка розділення з відомими можливими домішками АФІ.
- 2) АФІ піддають стресовим умовам для продукування максимальної кількості продуктів деградації з подальшою перевіркою розділення з ними і перевіркою спектральної чистоти піку АФІ для того щоб впевнитися, що всі домішки добре відділені.

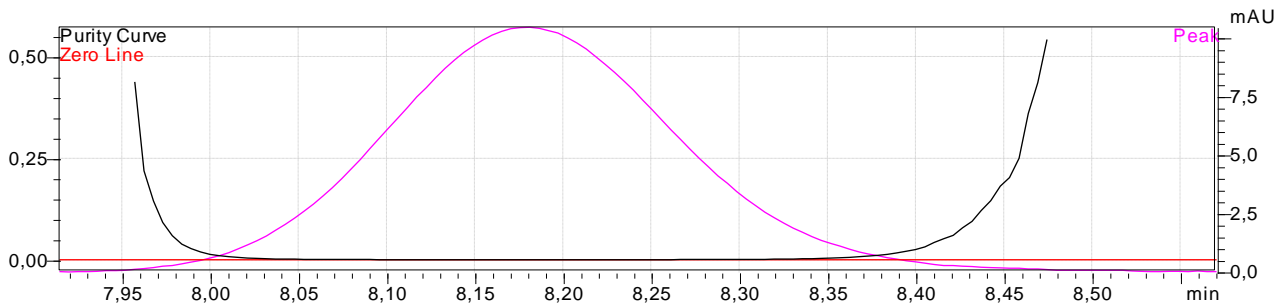
Користуючись другим підходом було використано методику приготування домішок з монографії ЄФ Каннабідіол, де АФІ канабідіол піддають дію кислого середовища для утворення дельта-9-ТГК, як описано в монографії.



**Рис.5.2.1.** Хроматограма розчину після кислотного гідролізу канабідіолу

Зокрема в результаті дії кислотного середовища було утворено не менше 14 сполук, які можна розглядіти на хроматограмі, і всі ці сполуки відділені від піку канабідіолу з коефіцієнтом розділення з найближчим піком з часом

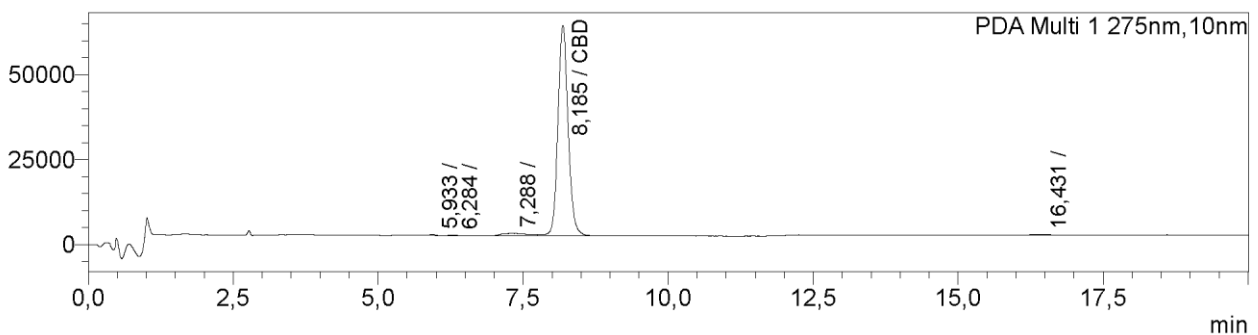
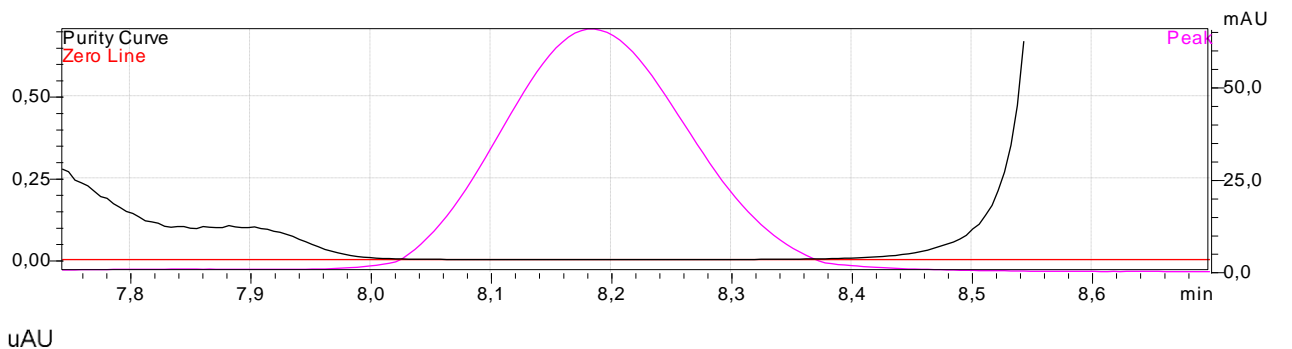
утримування 7,3 хв  $R_s=2,2$ . Ступінь перетворення канабідіолу в інші канабіноїди становить близько 69%. Аналіз спектральної чистоти показав, що пік канабідіолу є спектрально чистим індекс спектральної чистоти становить 0,99999 при критерію встановленому програмним забезпеченням 0,99998.



**Рис. 5.2.2.** Спектральний аналіз чистоти піка КБД у розчині для перевірки придатності хроматографічної системи

### Зразок олії 100 CBD

Було проведено перевірку на спектральну чистоту піка канабідіолу в досліджуваному зразку 100 CBD.

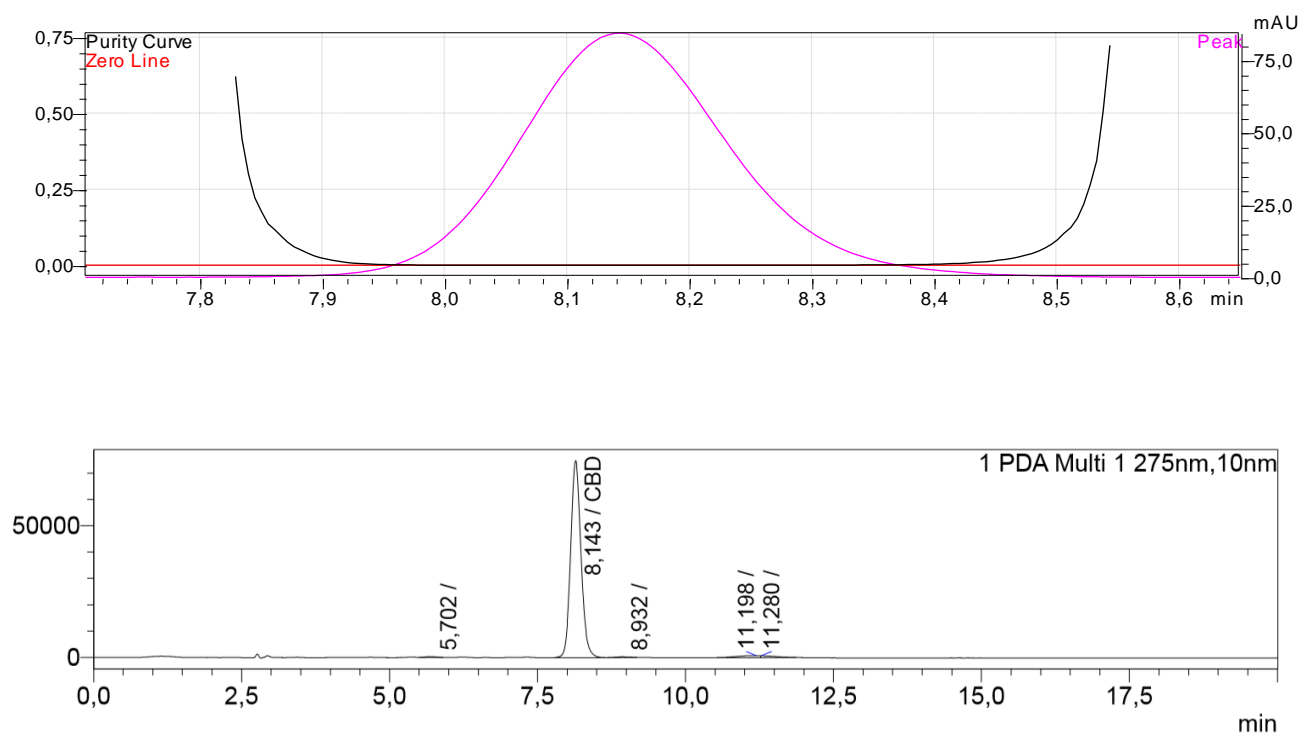


**Рис. 5.2.3.** Спектральний аналіз чистоти піку КБД у зразку 100 CBD та хроматограма того ж зразку

Було проведено перевірку на спектральну чистоту піка канабідіолу в досліджуваному зразку 100 CBD. Результати аналізу показали, що пік КБД чистий від інших речовин, що і підтверджує чистоту досліджуваного зразку. Індекс спектральної чистоти = = 0,99998, критерій чистоти встановлений програмою 0,99993.

### Зразок олії GeNo

Досліджено спектральну чистоту піку КБД у зразку олії GeNo. З отриманих результатів видно, що пік є спектрально чистим, без значного впливу сторонніх домішок.

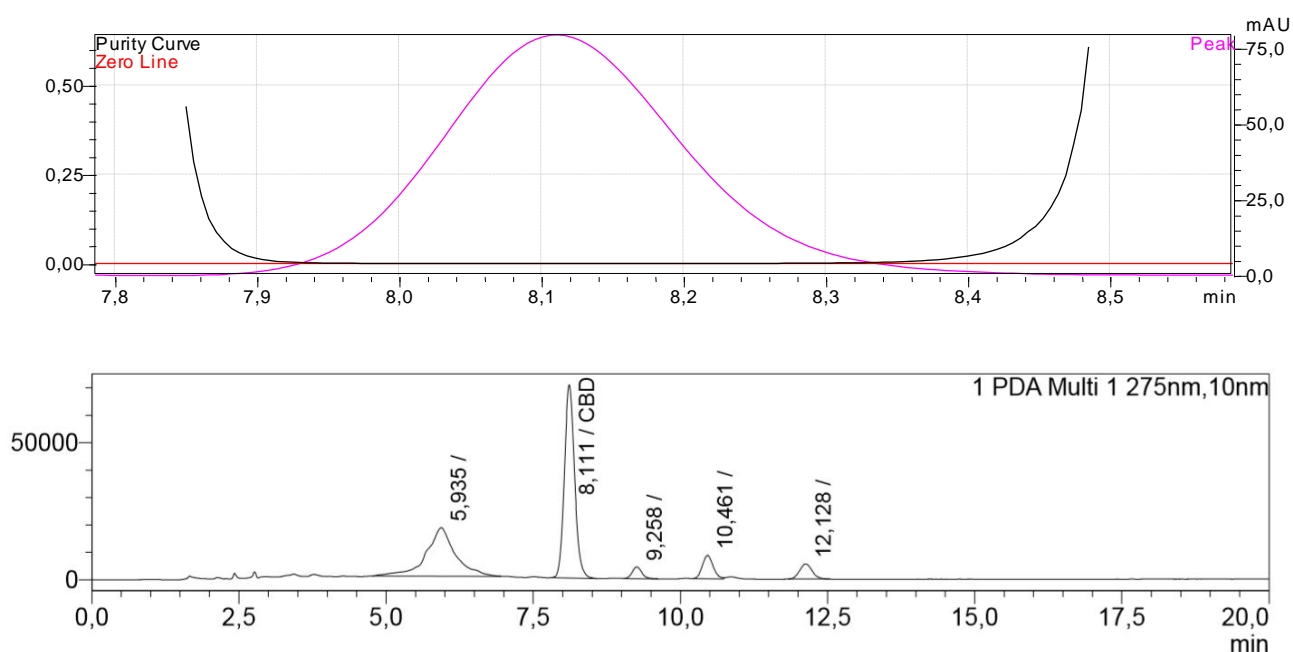


**Рис. 5.2.4.** Спектральний аналіз чистоти піку КБД у зразку олії GeNo та хроматограма цього ж зразку

Отриманий індекс спектральної чистоти = 0,99997, а індекс встановлений програмою = 0,99997. Отриманий результат доволі близький до встановленого критерію, що свідчить про хорошу селективність хроматографічної системи.

### Зразок капсул Stark

Для зразку капсул Stark також було проведено визначення спектральної чистоти піку CBD. Згідно з наведеним спектром та хроматограмою, видно, що пік чистий та не містить перекривань з іншими сполуками.



**Рис. 5.2.5.** Спектральний аналіз чистоти піку канабідіолу в зразку капсул Stark та хроматограма цього ж зразку

Отриманий індекс спектральної чистоти становить 0,99997, індекс встановлений програмою становить 0,99997. Селективність хроматографічної системи хороша, про що свідчать отримані результати.

### **5.3. Перевірка методики на лінійність**

Було перевірено лінійність, яка відображає здатність методики забезпечувати пропорційність між концентрацією аналіту та аналітичним сигналом у межах певного діапазону концентрацій.

#### **Діапазон концентрацій**

Для перевірки лінійності було обрано діапазон концентрацій 40-160%, де за 100% концентрацію було взято 1,0 мг/мл. Цей діапазон є репрезентативним для очікуваних концентрацій аналіту у реальних зразках.

#### **Кількість рівнів концентрацій**

Лінійність було досліджено на 7 рівнях концентрацій, що є достатнім для оцінки характеру залежності між концентрацією та сигналом.

#### **Критерії прийнятності**

Для оцінки лінійності використовується коефіцієнт регресії ( $r^2$ ). Критерієм прийнятності є вимога, щоб значення  $r^2$  було не менше 0,998.

Критерій прийнятності для вільного члена лінійної залежності ( $a$ ):

— практична незначущість

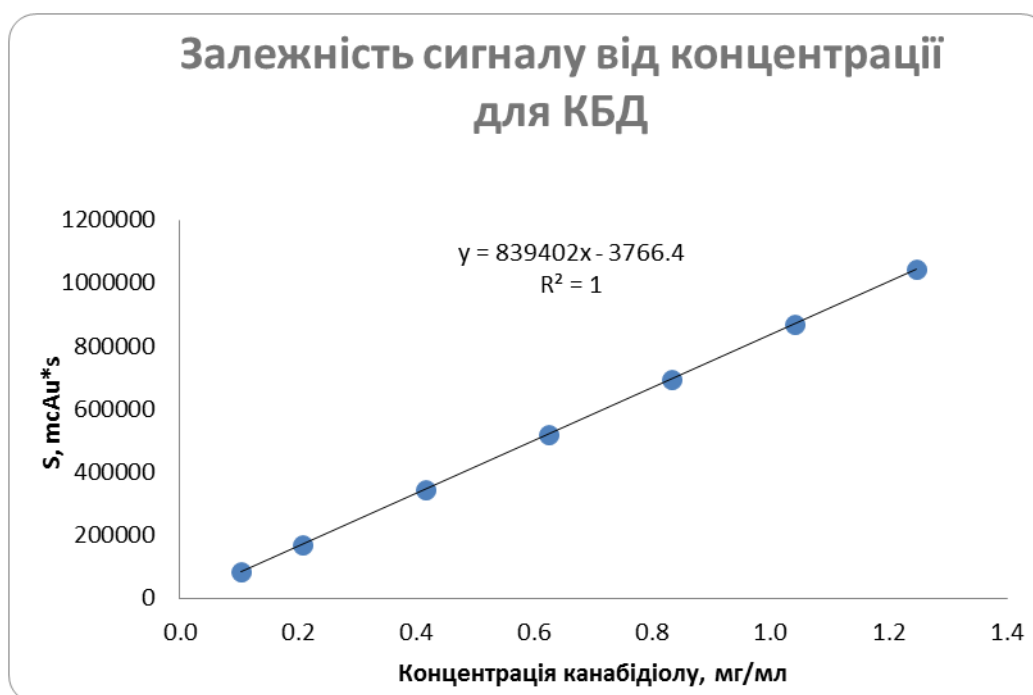
$$\frac{a}{St(100\%)} \leq Max\Delta_{As}$$

Для методики кількісного визначення канабідіолу в дієтичній добавці вибрано максимально допустиму невизначеність 3,2%, як для препарату з допуском  $\pm 10\%$  згідно ДФУ ( $Max\Delta_{As}=10\%*0,32=3,2\%$ )

**Таблиця 5.3.1.** Первинні дані і результати лінійності канабідіолу

C St мг/мл	S, mAu*s	Асеп(y)	y^	r	x_back	bias,%
0,104	85036	85036,0	83531,4	-1504,63	0,11	101,7
0,208	169383	169383,0	170829,2	1446,19	0,21	99,2
0,416	345241	345241,0	345424,8	183,82	0,42	99,9
0,624	519823	519823,0	520020,5	197,45	0,62	100,0
0,832	693650	693650,0	694616,1	966,09	0,83	99,9
1,04	871427	871427,0	869211,7	-2215,28	1,04	100,3
1,248	1042881	1042881,0	#####	926,36	1,25	99,9

В таблиці 5.3.1 показано дані для побудови калібрувального графіку і розраховано концентрацію розчинів використанням рівняння прямої  $x_{back}$  і порівняно цю концентрацію з теоретичною  $C_{St}$ . Максимальне відхилення практично розрахованої концентрації від теоретичної складо 1,7%.



**Рис. 5.3.1.** Концентраційна залежність сигналу канабідіолу від концентрації.

Результати розрахунків параметрів отриманої лінійної залежності  $Y=b \cdot X+a$

**Таблиця 5.3.2.** Параметри калібрувальної кривої

Величина	Значення	Невизначеність	Критерій	Висновок
a	-3766,4	1072,63	$\leq \Delta(a)$	відповідає
b	839402,1	1428,30	-	-
a/St100%	-0,72%	-	$\leq 3,2\%$	відповідає
$\Delta(a)$	2145,26	-	-	-
R <sup>2</sup>	1,000	-	$\geq 0,998$	відповідає

**Можемо зробити висновок, що:** в дослідженому діапазоні концентрацій (40-160% від 1,0 мг/мл) спостерігається лінійна залежність між сигналом та концентрацією канабідіолу. Отримане рівняння регресії може бути використано для кількісного визначення канабідіолу в межах цього діапазону концентрацій.

#### ***5.4. Перевірка правильності методики***

Для розрахунку правильності використовується наступна формула:

$$Z = (\text{Знайдено} / \text{Введено}) * 100\%$$

де:

- Z - відношення знайденого значення до введеного, виражене у відсотках;
- Знайдено - кількість речовини, виміряна за допомогою розробленої методики;
- Введено - відома кількість речовини, додана до зразка (наприклад, у стандартному зразку).

#### **Оцінка похибки**

Похибка була розрахована як середнє відхилення для кожного з 7 рівнів концентрації в діапазоні 40-160%.

Для оцінки похибки використовується формула:

$$\delta = |Z - 100|$$

де:

- $\delta$  - абсолютне відхилення значення  $Z$  від 100%

### **Критерії прийнятності**

Систематична похибка вважається незначущою, якщо вона менша за максимально допустиму невизначеність аналізу. У даному випадку встановлено наступні критерії прийнятності:

$$\delta \leq 0.32 \times \text{Max}\Delta_{As}$$

де:

- $\text{Max}\Delta_{As}$  - максимальна аналітична невизначеність;

У наведеному прикладі, якщо  $\text{Max}\Delta_{As} = 6,4\%$ , то:

$$\delta < 0,32 * 3,2\% = 1,024\%$$

З калібрувальної кривої отримано значення  $\delta = 0,4\%$ , що задовольняє вищевказану вимогу.

### **Висновок**

Отримані результати свідчать про те, що розроблена аналітична методика відповідає вимогам щодо правильності, оскільки значення  $\delta$  знаходиться в межах встановлених критеріїв прийнятності. Це означає, що методика може бути використана для достовірного кількісного визначення аналізованої речовини.

### 5.5. Перевірка збіжності методики

Було описано процес оцінки збіжності аналітичної методики, яка є однією з ключових характеристик валідації. Збіжність відображає ступінь близькості результатів окремих вимірювань, отриманих за короткий проміжок часу одним і тим же аналітиком в однакових умовах.

#### Розрахунок збіжності

Для оцінки збіжності використовувались дані, які були отримані при дослідженні правильності, а саме, значення "знайдено", виражене у відсотках.

#### Критерії прийнятності

Критерієм прийнятності для збіжності є вимога, щоб невизначеність аналізу у вибраному діапазоні концентрацій не перевищувала максимально допустиму невизначеність аналізу (Max As).

У даному випадку встановлено наступний критерій:

$$2,01 \times RSD, \% \leq \text{MaxAs}$$

де:

- RSD, % - відносне стандартне відхилення, яке характеризує розсіювання результатів вимірювань;
- MaxAs - максимально допустима невизначеність аналізу;
- 2,01 – коефіцієнт Стюдента для 5 ступенів свободи для однобічного інтервалу і статистичної достовірності на рівні 95%.

Параметр	Критерій прийнятності	Результат	Висновок
$\Delta_{As}, \%$	$\leq 3,2$	1,5	Відповідає

## Результати

Згідно з наведеними даними, RSD становить 1,5%, що є меншим за встановлений критерій (3,2%).

Це означає, що методика забезпечує достатню близькість результатів окремих вимірювань, виконаних в однакових умовах, що є важливим для забезпечення достовірності та відтворюваності аналізу.

### 5.6. Перевірка ефективності екстракції

Ефективність екстракції є ключовим параметром у валідації методики визначення канабідіолу (КБД) у дієтичних добавках, що впливає на точність, повторюваність і повноту вилучення аналіту. У цьому дослідженні оцінювали ефективність екстракції КБД із трьох досліджуваних зразків: Stark, GeNo та 100 CBD.

Для зразку Stark була досліджена екстракція із застосуванням двох розчинників: ізопропанолу та етанолу 96 об.%.

У випадках зразків GeNo та 100 CBD, які представлені у вигляді олії, екстракція не досліджувалася, так як ці зразки повністю розчинялися в обраних розчинниках без видимого твердого або рідкого залишку.

**Таблиця 5.6.1.** Результати екстракції зразку Stark ізопропанолом

Stark		
S,mAu*s		
	Ізопропанол	м./капс., %
1	790415	23,7
	791866	23,8
	774401	23,3
2	22946	0,8
	29098	1,0
	30449	1,0
3	1417	0,2

	1135	0,1
	1200	0,1
Сумарно 1 екстракція		24,6
Сумарно 2 екстракція		25,0
Сумарно 3 екстракція		24,5
Середнє значення, %		24,7
Невизначеність, %		1,8

**Таблиця 5.6.2.** Результати екстракції зразку Stark етанолом

Stark		
S,mAu*s		
	Етанол	м./капс., %
1	684667	20,5
	829224	25,0
	788988	23,5
2	135032	4,1
	23343	0,8
	36690	1,2
3	3459	0,2
	0	0,1
	4610	0,2
Сумарно 1 екстракція		24,8
Сумарно 2 екстракція		25,9
Сумарно 3 екстракція		25,0
Середнє значення, %		25,2
Невизначеність, %		3,8

**Таблиця 5.6.3.** Варіабельність показників першої екстракції.

Вихід першої екстракції екстракції	
Етанол,%	ІПС,%
81.2	95.8
98.9	96.6
93.2	94.4

### Перша стадія екстракції Stark

На першій стадії екстракції, ізопропанол показав вищу ефективність, а саме на цьому етапі було вилучено близько 94-96% КБД, а отримані результати були більш збіжними (менша варіабельність між пробами), що видно з таблиці 5.6.3.

При використанні етанолу результати більш варіабельні, в діапазоні від 81 до 99%, що пов'язано з меншою екстракційною здатністю етанолу порівняно з ізопропанолом для ліпофільного канабідіолу, тому інші фактори могли більше впливати на вилучення, зокрема положення в посудин в яких проводилася екстракція в ультразвуковій бані і відповідно різній інтенсивності ультразвуку.

### **Друга стадія екстракції Stark**

У другому процесі екстракції етанол показав значне збільшення концентрації КБД, тоді як ізопропанол майже завершив процес екстракції.

### **Кінцева (третья) стадія екстракції Stark**

Після третьої екстракції результати для обох розчинників зрівноважилися, підтвердивши, що екстракція КБД була мінімальною і майже 100% КБД у зразку Stark було вилучено після трьох екстракцій.

### **Дослідження препаратів GeNo та 100 CBD**

Оскільки досліджувані зразки GeNo і 100 CBD були в олійній формі, багатоступеневої екстракції, як у випадку зі зразком Stark, не проводили. Олії повністю розчиняли у вибраному розчиннику в одну стадію, після чого аналізували на вміст КБД.

**Таблиця 5.6.4.** Результати екстракції зразку GeNo етанолом.

GeNo
S,mAu*s

	Етанол	мг в 10 мл
1	962973	575,9
2	918567	549,4
3	962177	575,4
Середнє значення, %		566,9
Невизначеність, %		4,5

**Таблиця 5.6.5.** Результати екстракції зразку GeNo ізопропанолом.

GeNo		
S,mAu*s		
	Ізопропанол	мг в 10 мл
1	928866	555,5
2	940386	562,4
3	916101	547,9
Середнє значення, %		555,3
Невизначеність, %		2,2

**Таблиця 5.6.6.** Результати екстракції зразку 100 CBD етанолом

100 CBD		
S,mAu*s		
	Етанол	мг в 20 мл
1	772965	925,3
2	782591	936,8
3	767998	919,4
Середнє значення, %		927,2
Невизначеність, %		1,6

**Таблиця 5.6.7.** Результати екстракції зразку 100 CBD ізопропанолом

100 CBD		
S,mAu*s		
	Ізопропанол	мг в 20 мл
1	771935	924,1
2	760634	910,6
3	760809	910,9
Середнє значення, %		915,2
Невизначеність, %		1,4

Отримані результати показали, що GeNo та 100 CBD давали подібні кінцеві значення при використанні як ізопропанолу, так і етанолу.

З отриманих результатів можна зробити висновок, що як ізопропанол, так і етанол є придатними розчинниками для екстракції КБД з дієтичних добавок. Хоча ізопропанол демонструє кращу ефективність на першому етапі екстракції і дає більш збіжні результати, кінцева концентрація канабідіолу після трьох етапів екстракції майже однакова в обох розчинниках. У олійних формах (GeNo і 100CBD) достатньо одного етапу розчинення, оскільки CBD повністю розчиняється. Таким чином, обидва розчинники можна використовувати для визначення канабідіолу, вибір якого залежить від конкретних умов аналізу, зокрема вимог до чутливості та відтворюваності.

### ***5.7. Перевірка внутрішньолабораторної сходимості результатів***

Внутрішньолабораторна збіжність вимірювалася шляхом порівняння результатів роботи двох аналітиків, які виконували дослідження в різні дні. Її було визначено шляхом порівняння 3 розчинів кожного досліджуваного зразку.

Отримані результати представлені в таблицях нижче.

**Таблиця 5.7.1.** Результати дослідження прецизійності методики на зразку Stark.

Розчин	Кількісний вміст канабідіолу, %	
	Аналітик №1	Аналітик №2
1	24,7	24,6
2	23,8	25,0
3	24,3	24,5
Середнє значення	24,3	24,7
Невизначеність, %	0,7	1,8
Відносна різниця середніх значень, %	1,6	

**Таблиця 5.7.2.** Результати дослідження прецизійності методики на зразку GeNo.

Розчин	Кількісний вміст канабідіолу, %	
	Аналітик №1	Аналітик №2
1	574,0	555,5
2	570,3	562,4
3	579,2	547,9
Середнє значення	574,6	555,3
Невизначеність, %	7,8	2,2
Відносна різниця середніх значень, %	3,4	

**Таблиця 5.7.3.** Результати дослідження прецизійності методики на зразку 100 CBD.

Розчин	Кількісний вміст канабідіолу, %	
	Аналітик №1	Аналітик №2
1	962,5	924,1
2	952,0	910,6
3	953,2	910,9
Середнє значення	955,9	915,2
Невизначеність, %	9,7	1,4
Відносна різниця середніх значень, %	4,4	

Відносна різниця середніх значень між аналітиками також є досить низькою (менше 5%) для всіх трьох зразків. Це свідчить про задовільну внутрішньо-лабораторну сходимість результатів, що підтверджує відтворюваність методики.

## ВИСНОВКИ

- 1) Канабідіол є речовиною з широким спектром біологічної активності, що обумовлює його активне застосування в дієтичних добавках. Разом з тим, недостатній регуляторний контроль підвищує ризики фальсифікації складу продуктів, що несе загрозу для здоров'я споживачів.
- 2) На основі оцінки літературних джерел і проведених експериментальних досліджень, було розроблено методику визначення канабідіолу за допомогою високоефективної рідинної хроматографії із застосуванням нетоксичних розчинників, що підтверджує екобезпечність даної методики.
- 3) Проведена валідація розробленої методики визначення канабідіолу в досліджуваних зразках, підтвердила ефективність розробленого підходу. Методика виявилася придатною до застосування в умовах лабораторного аналізу, демонструючи стабільні результати при роботі з різними зразками дієтичних добавок, доступних на фармацевтичному ринку України.
- 4) Апробація розробленої методики на зразках дієтичних добавок, що представлені на ринку України, підтвердила її валідність. Метод забезпечив надійне виявлення та кількісне визначення канабідіолу у продуктах зі складною органічною матрицею без необхідності попереднього очищення або спеціальної пробопідготовки.

## SUMMARY

**Podhornykh A.V.**

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ECO-FRIENDLY METHOD FOR DETERMINING CANNABIDIOL IN DIETARY SUPPLEMENTS

**Scientific supervisors:** Ph.D. Syrotchuk O.A., Ph.D., Associate Professor Hlushachenko O.O.

**Keywords:** cannabidiol, dietary supplements, development, validation.

**Introduction.** Cannabidiol (CBD) is widely used as an active ingredient in dietary supplements due to its broad range of therapeutic properties. However, the quality of such products is often not adequately controlled, posing risks to consumers. Therefore, the development of a reliable and eco-friendly method for monitoring CBD content in such supplements is highly relevant.

**Materials and Methods.** Three samples were studied: capsules and two oils. Isopropanol was used for extraction: the oils dissolved completely, while the capsules required three stages of extraction with ultrasonic treatment. Solutions were filtered through membrane filters (0.45  $\mu\text{m}$ ).

The analysis was conducted using liquid chromatography. Three types of columns were examined — Ascentis Phenyl, Discovery HS C18, and Discovery HS F5. The mobile phase ratio ranged from ethanol:water 65:35 to 90:10; temperature conditions ranged from 35–45°C; detection wavelength was 200–300 nm; and injection volume ranged from 2 to 20  $\mu\text{L}$ . The suitability of the chromatographic system was checked prior to validation.

Method validation included the parameters: extraction efficiency, specificity, accuracy, precision, linearity, and intra-laboratory precision. CBD recovery with various solvents, spectral purity of the peak, linearity in the 0.4–1.6 mg/mL range, result repeatability within a single batch, and reproducibility under different conditions were studied.

**Results.** Optimal chromatographic conditions were established as: Discovery HS F5 column, temperature 40°C, detection wavelength 275 nm, mobile phase

ethanol:water (70:30), and injection volume 5  $\mu$ L. Under these conditions, a clear CBD peak was obtained with a retention time of 8.2 min, a resolution factor of 3.2, and a theoretical plate count exceeding 10,000, confirming the method's high efficiency.

System suitability was confirmed by six consecutive injections of the standard sample, yielding a peak area RSD of 0.11%, a retention time RSD of 0.04%, and a peak symmetry factor of 1.1.

Isopropanol provided effective CBD recovery in the first stage (94.4–96.6%) compared to ethanol (81.2–98.9%), but total recovery after the second extraction showed no significant difference. The third extraction demonstrated an almost complete absence of residual CBD.

Method specificity was confirmed by the resolution factor between CBD and the nearest impurity ( $R_s = 2.2$ ). For accuracy, systematic error ( $\delta$ ) did not exceed 0.4% (criterion 1.024%), and precision was within 1.5% for all samples (criterion 3.2%).

Intra-laboratory precision upon repeated analysis on different days by different analysts remained within 1.6–4.4%, depending on the sample.

The method also demonstrated linearity within 40–160% of the nominal concentration, with a correlation coefficient close to 1.0.

**Conclusion.** The developed method is universal for the analysis of CBD-containing dietary supplements in various forms. It is characterized by reliability, as confirmed by successful validation, and is suitable for implementation in laboratory practice as a tool for quality control of cannabidiol products.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Про основні принципи та вимоги до безпечності та якості харчових продуктів : Закон України від 23.12.1997 № 771/97-ВР : станом на 18 груд. 2024 р.
2. В.С. Кисличенко, І.О. Журавель, С.М. Марчишин та ін; Фармакогнозія : базовий підручник для студентів вищих фармацевтичних навчальних закладів IV рівня акредитації. За ред. В.С. Кисличенко. — Харків : НФаУ : Золоті сторінки, 2015.
3. Abrams D., Guzman M. Cannabis in cancer care. *Clinical pharmacology & therapeutics*. 2015. Vol. 97, no. 6. P. 575–586.
4. Zuardi A. W. History of cannabis as a medicine: a review. *Revista brasileira de psiquiatria*. 2006. Vol. 28, no. 2. P. 153–157.
5. Ivanov I. Analysis of the phaunistic composition of Ukraine // Modern problems of science, education and society. Proceedings of the 5th International scientific and practical conference. SPC “Sci-conf.com.ua”. Kyiv, Ukraine. 2023.
6. I. Ibarra-Lecue et al / The endocannabinoid system in mental disorders: evidence from human brain studies. *Biochemical pharmacology*. 2018. Vol. 157. P. 97–107.
7. Mechoulam R., Shvo Y. Hashish–I. *Tetrahedron*. 1963. Vol. 19, no. 12. P. 2073–2078.
8. Mechoulam R., Hanuš L. Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2002. Vol. 121, no. 1-2. P. 35–43.
9. R. K. Govindarajan et al / Biosynthesis of Phytocannabinoids and Structural Insights: A Review. *Metabolites*. 2023. Vol. 13, no. 3. P. 442.

10. J. A. Crippa et al / Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 9.
11. Про затвердження переліку наркотичних засобів, психотропних речовин і прекурсорів : Постанова Каб. Міністрів України від 06.05.2000 № 770 : станом на 19 лют. 2025 р.
12. Mechoulam R., Parker L. A., Gallily R. Cannabidiol: An Overview of Some Pharmacological Aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2002. Vol. 42, S1. P. 11S–19S.
13. Atalay S., Jarocka-Karpowicz I., Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants*. 2019. Vol. 9, no. 1. P. 21.
14. S. J. Livingston et al / Cannabis glandular trichomes alter morphology and metabolite content during flower maturation. *The Plant Journal*. 2019. Vol. 101, no. 1. P. 37–56.
15. Hammond C. T., Mahlberg P. G. MORPHOGENESIS OF CAPITATE GLANDULAR HAIRS OF CANNABIS SATIVA (CANNABACEAE). *American Journal of Botany*. 1977. Vol. 64, no. 8. P. 1023–1031.
16. F. Taura et al / Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type Cannabis sativa. *FEBS Letters*. 2007. Vol. 581, no. 16. P. 2929–2934.
17. Tan Z., Clomburg J. M., Gonzalez R. Synthetic Pathway for the Production of Olivetolic Acid in Escherichia coli. *ACS Synthetic Biology*. 2018. Vol. 7, no. 8. P. 1886–1896.
18. Mechoulam R., Gaoni Y. Hashish–IV. *Tetrahedron*. 1965. Vol. 21, no. 5. P. 1223–1229.

19. B. Jung et al / Synthetic Strategies for (-)-Cannabidiol and Its Structural Analogs. *Chemistry – An Asian Journal*. 2019. Vol. 14, no. 21. P. 3749–3762.
20. Rickards R. W., Roenneberg H. Synthesis of (-)-.DELTA.9-6a,10a-trans-tetrahydrocannabinol. Boron trifluoride catalyzed arylation by a homocuprate. *The Journal of Organic Chemistry*. 1984. Vol. 49, no. 3. P. 572–573.
21. Santos A. B., Scherf J. R., Mendes R. D. C. Eficácia do canabidiol no tratamento de convulsões e doenças do sistema nervoso central: revisão sistemática. *Acta Brasiliensis*. 2019. Vol. 3, no. 1. P. 30.
22. R. L. A. Matos et al / The Cannabidiol Use in the Treatment of Epilepsy. *Revista Virtual de Química*. 2017. P. 786–814.
23. Britch S. C., Babalonis S., Walsh S. L. Cannabidiol: pharmacology and therapeutic targets. *Psychopharmacology*. 2020. Vol. 238, no. 1. P. 9–28.
24. K. S. S. Abbotts et al / Cannabidiol and Cannabidiol Metabolites: Pharmacokinetics, Interaction with Food, and Influence on Liver Function. *Nutrients*. 2022. Vol. 14, no. 10. P. 2152.
25. A Phase I, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single Ascending Dose, Multiple Dose, and Food Effect Trial of the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of Highly Purified Cannabidiol in Healthy Subjects / L. Taylor et al. *CNS Drugs*. 2018. Vol. 32, no. 11. P. 1053–1067.
26. Lucas C. J., Galettis P., Schneider J. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2018. Vol. 84, no. 11. P. 2477–2482.
27. A. Ohlsson et al / Single-dose kinetics of deuterium-labelled cannabidiol in man after smoking and intravenous administration. *Biological Mass Spectrometry*. 1986. Vol. 13, no. 2. P. 77–83.

28. A. L. Stinchcomb та ін / Human skin permeation of  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2004. Т. 56, № 3. С. 291–297.
29. M. Lodzki et al / Cannabidiol–transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *Journal of Controlled Release*. 2003. Vol. 93, no. 3. P. 377–387.
30. C. J. Lucas et al / Cannabinoid Disposition After Human Intraperitoneal Use: An Insight Into Intraperitoneal Pharmacokinetic Properties in Metastatic Cancer. *Clinical Therapeutics*. 2018. Vol. 40, no. 9. P. 1442–1447.
31. E. C. Rosenberg et al / Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics*. 2015. Vol. 12, no. 4. P. 747–768.
32. K. Socała et al / Acute effect of cannabidiol on the activity of various novel antiepileptic drugs in the maximal electroshock- and 6 Hz-induced seizures in mice: Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies. *Neuropharmacology*. 2019. Vol. 158. P. 107733.
33. Huestis M. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chemistry & Biodiversity*. 2007. Vol. 4, no. 8. P. 1770–1804.
34. Pietro Brunetti, Alfredo Fabrizio Lo Faro, Filippo Pirani, Paolo Berretta, Roberta Pacifici, Simona Pichini and Francesco Paolo Busardò. / Pharmacology and legal status of cannabidiol / 2020. Vol. 56, No. 3: 285–291.
35. K. M. Nelson et al / The Essential Medicinal Chemistry of Cannabidiol (CBD). *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. Vol. 63, no. 21. P. 12137–12155.
36. Ujváry I., Hanuš L. Human Metabolites of Cannabidiol: A Review on Their Formation, Biological Activity, and Relevance in Therapy. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 2016. Vol. 1, no. 1. P. 90–101.

37. National Institute on Drug Abuse. New York : Raven Press / Pharmacology of marijuana: [proceedings] / ed. by B. M. C, S. S. I. 1923/1976. 865 p.
38. K. Bardhi et al / Cannabinoids and drug metabolizing enzymes: potential for drug-drug interactions and implications for drug safety and efficacy. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2022.
39. Chayasirisobhon S. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *The Permanente Journal*. 2020. Vol. 24, no. 5.
40. European Pharmacopoeia 11.5 / Cannabidiol
41. Hädener M., König S., Weinmann W. Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Science International*. 2019. Vol. 299. P. 142–150.
42. Patel B., Wene D., Fan Z. (. Qualitative and quantitative measurement of cannabinoids in cannabis using modified HPLC/DAD method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017. Vol. 146. P. 15–23.
43. Y.-H. Wang та иН / Quantitative Determination of  $\Delta^9$ -THC, CBG, CBD, Their Acid Precursors and Five Other Neutral Cannabinoids by UHPLC-UV-MS. *Planta Medica*. 2017. T. 84, № 04. C. 260–266.
44. S. Analakkattillam et al / Analytical method validation for assay determination of cannabidiol and tetrahydrocannabinol in hemp oil infused products by RP-HPLC. *Scientific Reports*. 2022. Vol. 12, no. 1.
45. Maja Shishovska, Dragica Doneva, Zorica Arsova-Sarafinovska and Katerina Starkoska / Determination of cannabidiol and  $\Delta^9$ tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa* L. preparations present in the European market by HPLC/DAD
46. K. Madej et al / HPLC-DAD Analysis of Hemp Oil Supplements for Determination of Four Cannabinoids: Cannabidiol, Cannabidiolic Acid, Cannabinol and Delta 9-Tetrahydrocannabinol. *Separations*. 2021. Vol. 8, no. 12. P. 227.

47. C. Durante et al / Application of experimental design in HPLC method optimisation for the simultaneous determination of multiple bioactive cannabinoids . *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022. P. 115037.
48. M. Deville et al / Validation of an UHPLC/DAD method for the determination of cannabinoids in seized materials: Analysis of 213 samples sold in Belgian CBD shops. *Forensic Science International*. 2020. Vol. 310. P. 110234.
49. Timothy D. Ruppel, Nathaniel Kuffel, PerkinElmer, Inc., Shelton, CT / Cannabis Analysis: Potency Testing Identification and Quantification of THC and CBD by GC/FID and GC/MS
50. R. Typek et al. *Talanta* / Chromatographic analysis of CBD and THC after their acylation with blockade of compound transformation. 2022. P. 123777.
51. Ahmed A. Q., Noshad D., Li P. C. H. Quantification of Cannabinoids in Cultivars of Cannabis sp. by Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Chromatographia*. 2021.