



DETERMINATION OF THC, THC-COOH, CBN AND CBD IN HAIR WITH APPLICATION OF DERIVATISATION AND CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

Marek WIERGOWSKI¹, Marzena PATELCZYK², Katarzyna GALER¹, Beata SZPIECH¹

¹ *Chair and Department of Forensic Medicine, Medical University, Gdańsk*

² *Chemical Faculty, University of Technology, Gdańsk*

Abstract

In the study, analytical conditions for the determination of selected cannabinoids by GC-FID and HPLC-UV methods were optimised and an attempt was made to develop a determination procedure for these compounds in hair. Application of MTBSTFA derivatisation of cannabinoids in the GC-FID procedure resulted in much lower limits of detection. For hair sample preparation in the HPLC-UV procedure, ultrasonic-assisted extraction (UAE) and dichloromethane as an extractant were chosen. The best chromatographic separation of cannabinoids was achieved by HPLC-UV in isocratic elution with acetonitrile and 0.05 mmol/dm³ formic acid (75:25, v/v). For the developed procedure which utilised UAE-HPLC/UV, the evaluated limits of detection in hair were: 3.4 µg/g for THC, 0.2 µg/g CBN, 0.5 µg/g CBD and 0.4 µg/g for THC-COOH. The procedure was applied to the determination of cannabinoids in authentic hair samples ($n = 12$), and the average concentrations in 1 g of hair were: 3.4 µg THC ($n = 1$); 1.4 µg CBD ($n = 7$); 0.5 µg CBN ($n = 11$) and 2.1 µg THC-COOH ($n = 12$).

Key words

Cannabinols; Hair analysis; Derivatization; Liquid chromatography; Gas chromatography.

Received 20 December 2005; accepted 30 December 2005

1. Introduction

Cannabis is the most frequently abused drug in European Union countries. In 2002, about 6% of young people in Poland (aged 15–34) admitted to using cannabis (at least once a year), whilst the European Union average value was approximately two times higher [12]. Inhabitants of large urban conglomerations most frequently admit to marijuana and hashish abuse. According to research that was carried out in 2002 among Warsaw inhabitants aged 16–24, 48% of the study population admitted to one-off marijuana or hashish use [24]. Results of analysis of biological material collected from living persons that was carried out at the Department of Forensic Medicine, Medical University

of Gdańsk in 1997–2002 show that cannabis was detected in 40% of people in a studied group in which drugs of abuse were detected. Analogous analysis of post-mortem biological materials which were positive for drugs of abuse revealed that only 4% of cases were positive for cannabis.

The decree of the Minister of Health on the list of substances acting similarly to alcohol and conditions of their determination in the body issued in 2003 [29] together with its amendment issued in 2004 [30], relating to the temporary concentrations of psychoactive substances in the body, imposes on a laboratory, amongst other things, the obligation to detect at least 2 ng of ⁹-tetrahydrocannabinol in 1 ml of blood and 20 ng of 11-nor-⁹-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in

1 ml of urine during chemical-toxicological analysis. However, sometimes there is a need for confirmation of the chronic abuse of cannabis, which must be achieved by the analysis of epidermal outgrowths of the skin, such as hair or nails.

2. Determination of cannabinoids in hair

Although there are many compounds in cannabis products which are classified as cannabinoids, such as cannabidiol (CBD) and cannabinol (CBN), it is Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) which is mainly responsible for psychoactive effects. THC is intensively metabolised in the human body to its main metabolite, 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THC-COOH). The mechanism of incorporation of drugs into hair is not well known. Drugs and metabolites are entrapped by the hair bulb from the blood reaching the hair root and incorporated into the shaft. Average hair growth rate is from 0.3 mm to 0.4 mm/day (0.9–1.2 cm/month). Hair growth depends on race, sex, age, nutrition, physiological and pathological factors [2].

Biological sample preparation is a complex task and its stages and operations can be a source of loss of analytes as well as additional contamination and errors [23]. In order to correlate the concentration of drugs in hair with the time of their consumption, the hair sample should be collected from the back of the head (vertex posterior region), since this is the region of least variation of growth rate and loss. A hair sample of the thickness of a pencil (diameter about 0.5 cm) should be tied as near as possible to the skin with a thread. Hair samples should be cut as close as possible to the scalp. If this is not possible, the remaining uncut length should be measured and recorded. The root (proximal) side should be marked. This is done to enable segmental analysis. A hair sample may also be plucked out with hair roots (in *post-mortem* cases). The hair specimen should be packed in an envelope, plastic bag, or glass container. It can be stored at room temperature or in a fridge (4°C). If wet, the hair sample should be dried at room temperature.

In the case of hair analysis, the possibility of false positive results caused by the absorption of substances (including drugs) on the hair surface is an important issue. This causes difficulties in distinguishing drugs which were absorbed onto the hair surface from the environment (passive exposure) from those which were incorporated directly from the blood.

Therefore before the actual analysis, hair samples must be subjected to the procedure of decontamination. The hair washing procedures usually applied con-

sist in rinsing at room temperature for several minutes in dichloromethane [1, 13, 10, 27], deionised water and acetone [19, 20] or a mixture of methanol and ethanol [11]. A robust extraction method of analytes is very important in the analysis of drugs in hair. Complete hydrolytic digestion of hair facilitates this process. Therefore an appropriate hydrolysis method must be chosen. Severe hydrolysis conditions may cause degradation of analytes. The following hair hydrolysis methods were used: 500 mg hair was incubated in 1 ml of 1 mol/dm³ NaOH for 10 min at 95 °C [5, 6]; then, to 20 mg hair, 2 ml of 8 mol/dm³ of urea was added and hydrolysis was carried out at room temperature overnight. Next, to 15 mg hair, 0.5 ml of 10 mol/dm³ NaOH was added and kept in a thermostat for 30 min at 70°C [37], and 20 mg hair was hydrolysed by adding 200 µl of 1 mol/dm³ hydrochloric acid (HCl) at 60°C for 60 min [14].

Alkali hydrolysis is the most frequent type of hydrolysis used. It is considered more efficient and repeatable than acid and enzymatic hydrolysis [8, 39]. Biological material extraction offers many advantages, for instance simplifying of the matrix of the original sample and the possibility of increasing the concentration of the analyte [22]. Biological samples are an example of samples in which transferring of analytes into the secondary matrix is especially crucial, because it enables analysis of samples by chromatographic techniques [5, 6, 11, 33, 37].

Among the techniques used in extraction of cannabinoids from hair samples that have been previously hydrolysed are solvent liquid-liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE), and ultrasonic-assisted extraction (UAE). An LLE solvent should be insoluble in water, very pure (to minimise sample contamination) and volatile (to ease the subsequent evaporation process). Among solvents which are most frequently used for extraction of cannabinoids from biological samples, are: methanol, ethyl acetate, acetone, acetonitrile, dichloromethane or a mixture of these solvents. To extract analytes from a sample by the ultrasonic-assisted extraction technique (UAE), a sample is placed in a glass or metal container and put in an ultrasound bath or an ultrasound probe is placed in the container. Ultrasound frequency used in solvent extraction ranges from 20 kHz to 500 kHz. Advantages of the UEA technique include: good repeatability, the possibility of applying this technique to samples of various sizes, high extraction efficiency, the possibility of carrying out several extractions simultaneously [18, 26]. Solid phase extraction SPE is defined as transferring of analytes from liquid samples to solid phase, which is made up of specially selected sorbents [21].

Derivatisation is applied only if it is really necessary, as it complicates the composition of the extraction matrix, extends the time of analysis and increases its cost. Its main advantage is that it improves the limit of detection by as many as several times [32, 35]. The most popular and universal derivatising agents that block polar proton donating groups are silylating agents [31]. The agents which are most frequently used for derivatisation of cannabinoids are MTBSTFA [3, 7, 36, 37, 40], PFPA/PFPOH [6, 17], BSTFA [6, 16] and TMAH [15, 38]. In our study for derivatisation of cannabinoids, the silylating agent tert-butyldimethylsilyltrifluoroacetamide with 1% tert-butyldimethylsilyl (MTBSTFA + 1% TBDMS) was used. MTBSTFA is very reactive, and its main role is to exchange the hydrogen atom that is bound to the heteroatom for the functional group $[-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3]$. The TBDMS derivatives that arise are characterised by higher volatility and less polarity compared to parent cannabinoids. Moreover, they should be more stable and sensitive during gas chromatography analysis [34].

3. Materials and methods

3.1. Chemical reagents and study material

In the study, the following chemical reagents were used: (HPLC grade or pure for analysis grade): acetone, acetonitrile, methanol, dichloromethane (Merck, Germany), hexane (Promil Chemicals, England), MTBSTFA in 1% TBDMS (Sigma-Aldrich, USA), ethyl acetate, formic acid, acetic acid, sulphuric acid, potassium hydroxide (POCh, Poland) and standards: THC, CBD, CBN and THC-COOH at a concentration of 1 mg/ml in methanol (Cerilliant, LGC Promochem, USA).

Hair samples were collected from anonymous volunteer students at Gdańsk University of Technology in February 2005. The students admitted the use of cannabis during the previous several months. The samples were stored in sealed plastic bags at room temperature.

3.2. Apparatus

The following apparatus and analytical equipment were used during optimisation of the analytical procedure and performing of the actual study:

- ThermoFinnigan Focus GC gas chromatograph equipped with a flame ionisation detector (FID), Rtx-5 Sil MS Restek column, length 30 m, inner diameter 0.25 and film thickness 0.25 μ m. The analysis was carried out at a detector temperature of

315°C, injector temperature of 280°C and oven temperature program: 150°C for 0.7 min, ramp to 270°C at 15°C/min, maintain at 270°C for 1 min, increase to 290°C at 2°C/min, maintain at 290°C for 5 min. 2 μ l samples were injected into injector operating in splitless mode. Gas flow rate was 1 ml/min;

- ThermoFinnigan Trace GC gas chromatograph equipped with mass spectrometer (MS), Rtx-5 Sil MS Restek column (length 30 m, inner diameter 0.25 and film thickness 0.25 μ m). 2 μ l samples were injected into the injector operating in split mode. Analysis was carried out at an injector temperature of 280°C and at the same programmable oven temperature as in GC-FID. The MS detector was operated in electron ionisation mode (EI). Spectrum recording was carried out in scan mode (SCAN) in the range from 50 m/z to 650 m/z as well as in selected ion monitoring mode (SIM);
- Shimadzu LC10Avp liquid chromatograph with UV/VIS detector, manual injector with 5 μ l loop, column filled with octadecyl modified silica Luna 5 μ m C18(2), Phenomenex (length 15 cm, inner diameter 4.6 mm, particles diameter 5 μ m).
- C-18 SPE J.T. Baker extraction columns, an ultrasonic bath (Polsonic, Poland), a TLC Plate Heater III (Camag, Switzerland) and water deionisation system (Millipore, USA) were also used in the study.

4. Results and discussion

Validation of the method was carried out by evaluation of selected parameters such as: selectivity, linearity, limits of detection and quantification, limits of working range and uncertainty of measurements after previously performed optimisation of GC-FID and HPLC-UV determination conditions. Limits of detection *LOD* in most cases were calculated based on the signal/noise ratio (Table I, III and IV). To do this, the noise level was determined for a chromatogram obtained for a blank sample (mean of 10 peaks integrated near the retention time of an analyte) and the achieved value was multiplied by 3 and then the obtained signal value was converted to a concentration.

In Table I the limits of quantification values *LOQ* calculated from the previously determined limits of detection, based upon calibration curves, are presented.

$$LOD = \frac{3.3 \cdot s}{a} \quad \{1\}$$

The *LOD* value was evaluated based on the slope of the calibration curve (*a*) and the average value of standard deviation (*s*) calculated from the mean of intercept standard deviation (*s_b*) and residual standard deviation value (*s_{xy}*) [25]. Limits of quantification *LOQ* were calculated as a triplicate of evaluated limits of detections values *LOD*.

4.1. Selection of GC-FID and GC-MS analytical conditions

In order to evaluate the limits of detection and quantification of underivatised THC, CBN, CBD and THC-COOH by both GC-FID and GC-MS, 2 µl of each standard (THC, CBN, CBD, THC-COOH) at a concentration of 1 mg/ml was injected onto chromatographic column. Calculated values of limits of detection and quantification are presented in Table I.

TABLE I. LIMITS OF DETECTION AND QUANTIFICATION OF UNDERIVATISED CANNABINOLS BY GC-FID AND GC-MS

		THC	CBN	CBD	THC-COOH
GC-FID	<i>LOD</i>	99	75	43	Not detected
	<i>LOQ</i>	300	224	130	
GC-MS	<i>LOD</i>	38	56	60	Not detected
	<i>LOQ</i>	120	170	180	

Due to non-detection of a certified THC-COOH standard by GC-FID (at the relatively high concentration of 1 mg/ml), in accordance with literature data [3, 7, 36, 37, 40], we decided to introduce a derivatisation stage into the analytical procedure in subsequent experiments.

In order to optimise the determination procedure and lower the limits of quantification, three procedures of derivatisation were tested (Table II).

2 µl of the analysed samples previously derivatised by method A were injected onto a GC-FID column and 4 µl of aliquots were injected onto a GC-MS column. The results of chromatographic analysis of samples derivatised by method A were not positive.

The main reason might have been the loss of very volatile derivatisation products during evaporation of the solvent under nitrogen. This hypothesis was confirmed by the results achieved by method B. The only difference between method A and B was omission of post reaction drying of derivatisation products under

nitrogen. In accordance with Bourquin and Brenneisen's suggestions [3], methods A and B were modified (method C). Limits of detection and quantification of cannabinoids achieved by methods B and C and with the application of GC-FID and GC-MS are summarised in Table III. GC-MS was operated in scan mode during determination of cannabinoids.

TABLE II. COMPARISON OF DERIVATISATION METHODS OF CANNABINOLS WITH MTBSTFA REAGENT

Method	Method description
A [37]	2 µl of THC, CBN, CBD standards at 1 mg/ml, THC-COOH at 0.1 mg/ml were evaporated to dryness under nitrogen. Derivatisation: 75 µl MTBSTFA, 90°C, 1h. Reaction products were evaporated to dryness under nitrogen. Residue was reconstituted in 75 µl ethyl acetate.
B	2 µl of THC, CBN, CBD standards at 1 mg/ml, THC-COOH at 0.1 mg/ml were evaporated to dryness under nitrogen. Derivatisation: 75 µl MTBSTFA, 90°C, 1h. The residue was reconstituted in 75 µl ethyl acetate.
C [3]	2 µl of THC, CBN, CBD standards at 1 mg/ml, THC-COOH at 0.1 mg/ml were evaporated to dryness under nitrogen. Residue was reconstituted in 75 µl acetonitrile. Derivatisation: 75 µl MTBSTFA, 90°C, 1h.

TABLE III. LIMITS OF DETECTION AND QUANTIFICATION OF CANNABINOLS AFTER DERIVATISATION BY GC-FID AND GC-MS [µg/ml]

	GC-FID		GC-MS	
	Method B	Method C	Method B	Method C
THC	1.7	1.3	1.2	0.74
CBN	0.70	1.4	0.86	0.62
CBD	0.59	0.18	0.98	0.78
THC-COOH	0.065	0.30	0.52	0.64

Derivatisation method C resulted in better limits of detection for THC after analysing of standards by GC-FID and GC-MS. In the case of THC-COOH, lower *LOQ* values were achieved by utilising method B. When determining CBN by GC-FID, lower limits

of quantification were achieved for method C, whereas method B turned out to be more sensitive using GC-MS. Approximately 13 µg CBD in 1 ml solution was detected during GC-FID analysis, whilst CBD was detected using GC-MS in SCAN mode only when its concentration was two times higher (about 26 µg/ml). Finally, method B was selected, for which – using GC-FID – the limit of quantification for THC-COOH was lower. For evaluation of improvement in method sensitivity after derivatisation of cannabinoids compared to underivatised cannabinoids, using GC-FID and GC-MS, Table IV was drawn up.

TABLE IV. CANNABINOLS SIGNAL INTENSIFICATION GAIN USING GC-FID AND GC-MS WITH DERIVATISATION BY METHOD B COMPARED TO UNDERIVATISED COMPOUNDS

	THC	CBN	CBD	THC-COOH
GC-FID	180	320	220	–
GC-MS	90	200	180	–

In the case of cannabinoids determination by GC-FID after derivatisation, the limits of quantification were much lower than for underivatised compounds. Signal intensification gain was in the range from 180 (for THC) to 320 (for CBN). Limits of quantification for the other analytes were lower. Signal intensification gain using GC-MS for THC was 90, and 200 for CBN. Derivatisation had a positive effect on THC-COOH determination. THC acid was detected by GC-FID and GC-MS.

In a subsequent study, derivatisation by method B was applied. To improve the limit of detection of cannabinoids, selected ion monitoring (SIM) is recommended. In SCAN mode, the most intensive ions of analysed cannabinoids were determined after derivatisation with MTBSTFA: $m/z = 428, 345$ and 413 for THC derivative, $m/z = 418, 475$ and 344 for CBD derivative, $m/z = 409, 424$ and 367 for CBN derivative and $m/z = 515, 572, 557$ for THC-COOH derivative.

To prepare calibration curves for the procedure which used derivatisation (method B) and GC-FID gas chromatography, 5 standard mixtures were analysed in the range of concentration from 30 µg/ml to 1000 µg/ml. 2 µl of each sample was injected onto a column. Chromatographic analysis of each sample was done in triplicate. Taking into consideration correlation coefficients equal to $R^2 = 0.992 - 0.999$, (chromatographic peaks areas and corresponding concentrations) we could state that in the studied concentration range there is a linear correlation between these variables.

4.2. Selection of HPLC-UV conditions

Determination of cannabinol type compounds by HPLC was carried out in the reverse phase system, which is the most appropriate for separation of non-polar and slightly polar compounds. On the basis of literature data [21, 28], two wavelengths of 228 and 278 nm were chosen for determination of cannabinoids. Gradient elution of three solvents (A – 0.05 mmol/dm³ acetate buffer, B – acetonitrile, C – methanol) [9] was primarily applied. For the first 2 min, the phase composition was the following: 13% A, 22% B, 65% C. For the next 25 min, acetonitrile content (B) increased to 35% with an accompanying decrease in solvent A (Figure 1 a).

Chromatographic analysis in this phase system showed no repeatability of retention times (retention times varied by even 2–5 min). Moreover, chromatographic analysis did not provide sufficient separation of THC-COOH and CBD. In subsequent experiments, acetic buffer was replaced with formic acid solution at the same concentration. Separation was carried out in isocratic conditions. These changes improved the repeatability of retention times. To achieve better separation of THC-COOH and CBD, methanol was excluded from the mobile phase composition. Elution was done in isocratic conditions for 30 min. The mobile phase consisted of acetonitrile and aqueous solution of formic acid at 0.05 mmol/dm³ (87:13, v/v). Chromatographic analysis ensured correct separation of THC-COOH and CBD (Figure 1 b). As a result of optimisation of mobile phase composition, the best separation was achieved by isocratic elution of mobile phase consisting of acetonitrile and 0.05 mmol/dm³ formic acid, 75:25, v/v (Figure 1 c).

For preparation of calibration curves, 5 standard mixtures were analysed in the range from 0.1 µg/ml to 1000 µg/ml by HPLC-UV. 5 µl of the sample was injected onto a column. Chromatographic analysis of all samples was repeated 3 times. Taking into consideration correlation coefficients ($r^2 = 0.999$ in all cases), we could state that in the studied concentration range from 0.1 µg/ml to 1000 µg/ml, there is a linear correlation between chromatographic peaks areas and the corresponding concentrations of analytes. The ascertained extended measurement uncertainty (calculated as doubled standard deviation for 6 measurements) for analyte concentrations of 1 µg/ml, using HPLC-UV (for 228 nm) was: 6.2% for THC-COOH; 6.9% for CBD; 6.5% for CBN and 3.8% for THC.

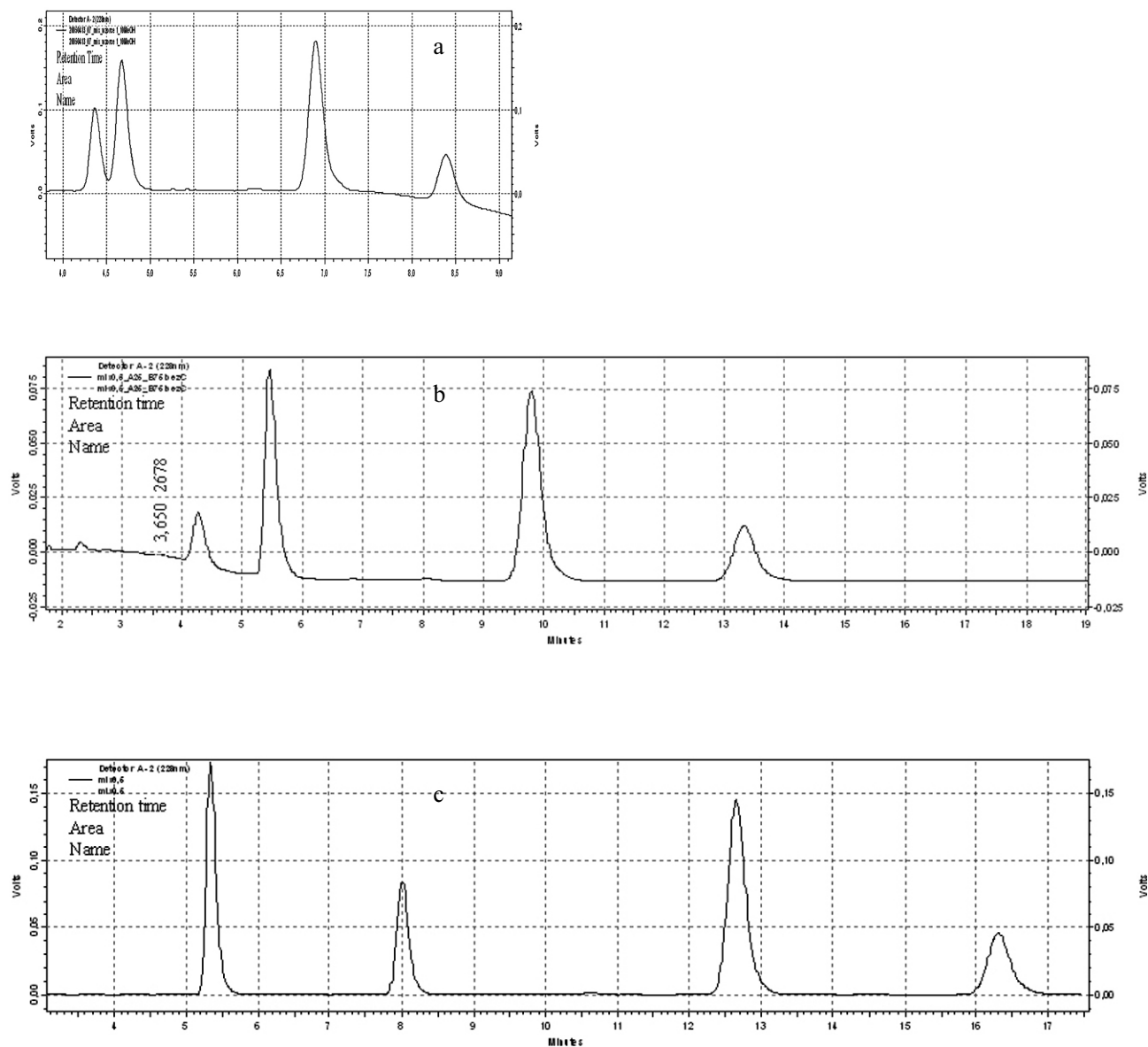


Fig. 1. HPLC/UV chromatograms achieved by analysis of a cannabinoids standard mixture sample (peaks from the left-hand side: THC-COOH, CBD, CBN, THC) at 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; wavelength 228 nm; mobile phase: a – acetonitrile:methanol:0.05 mmol/dm^3 acetate buffer (gradient elution); b – acetonitrile:0.05 mmol/dm^3 formic acid (87:13); c – acetonitrile:0.05 mmol/dm^3 formic acid (75:25).

4.3. Comparison of detection and quantification limits achieved by GC-FID and HPLC-UV

Limits of detection for particular analytes achieved using GC-FID after derivatisation calculated on the basis of residue standard deviation were lower than limits of detection calculated on the basis of standard deviation of intercept (Table V). However, the range of calculated values of limits of detection was the same, so the average value of both measurements was

accepted. The limits of quantification ranged within 0.27–0.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The lowest *LOD* (*LOQ*) was obtained for CBN, the highest for CBD. The limits of detection for THC (0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and THC-COOH (0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were similar. For verification of the ascertained limits of quantification, 5 μl of certified THC-COOH standards at concentrations of 0.035 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.050 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.110 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were injected. THC-COOH was detected and determined only at its highest concentration, which was in accordance with evalu-

ated *LOQ*, which was based upon calibration curves. Comparing *LOQ* for cannabinoids evaluated by GC-FID (with derivatisation of analytes) and HPLC-UV, we conclude that lower limits of quantification for CBN, CBD, and THC-COOH were achieved by using a liquid chromatograph with a UV detector (Table V).

TABLE V. COMPARISON OF EVALUATED LIMITS OF QUANTIFICATION OF CANNABINOLS ACHIEVED BY GC-FID WITH DERIVATISATION AND HPLC/UV BASED UPON CALIBRATION CURVES OF STANDARDS AND HAIR SAMPLES (TAKING INTO CONSIDERATION UAE TOGETHER WITH RECOVERY VALUES)

	THC	CBN	CBD	THC-COOH
<i>LOQ</i> for standard solutions [$\mu\text{g/ml}$]				
GC-FID	0.4	0.3	0.6	0.3
HPLC-UV	2.2	0.2	0.4	0.2
<i>LOQ</i> for hair samples [$\mu\text{g/g}$]				
GC-FID	0.8	0.5	1.2	1.0
HPLC-UV	3.4	0.2	0.5	0.4

Standard solutions of all analytes within the range of concentrations from 30 $\mu\text{g/ml}$ to 1000 $\mu\text{g/ml}$, which were used for preparing a calibration curve used in chromatographic determination were stored at -20°C . After 48 h, analyses of these samples were repeated. In all samples, concentrations of derivatives after 48 h were lower (down to as little as 50%) than concentrations determined in samples directly after preparation for chromatographic analysis. This was due to the partial evaporation of part of TBDMS volatile derivatives in spite of tightly closed vials and low temperature of storage. As a result of this observation, it was realised that it was necessary to check the mass of the vials with samples injected onto the chromatograph (and, if necessary, take into account mass loss during calculations) or in the case of large losses of analytes, use newly prepared solutions.

In the case of authentic hair samples, the problem of analyte loss should be overcome by using isotopic labelled cannabinol standards (GC-MS) or minimised by using unlabeled internal standard (GC-FID).

4.4. Selection of preparation and hair analysis parameters

Taking into account satisfactory *LOQ* values, good chromatographic separation of cannabinoids, sim-

ilarity of measurements, for subsequent stages of the study we decided to apply the optimised procedure of cannabinoids determination by the HPLC-UV system. Before the actual analysis, hair samples were washed by dipping in methanol for 5 min and dichloromethane for 5 min. Hair samples were dried at room temperature, cut into 1–2 mm pieces and weighed out. The solvent extraction method (LLE), ultrasonic-assisted extraction (UAE) and solid phase extraction (SPE) were chosen for evaluation of isolation efficiency of analytes.

Initially prepared hair samples were hydrolysed before solvent extraction. Hydrolysis was performed in 2 ml of 1 mol/dm³ potassium hydroxide at 95°C for 15 min. Solvent extraction was carried out in two ways: after acidification of hydrolysed sample with concentrated formic acid (0.5 ml) or from alkali medium without addition of any reagents. The main extraction steps were: adding of 4 ml of a mixture of hexane:ethyl acetate, (9:1, v/v), manual shaking for 10 min, centrifuging (3000 cycles/min, 4°C, 10 min), transferring of organic layer, solvent evaporation under weak nitrogen stream and reconstitution of residue in 100 μl methanol. The extracted samples were analysed by HPLC-UV.

In ultrasonic-assisted extraction (UAE), 4 ml of methanol was added to unhydrolysed hair samples, which were then incubated in an ultrasonic bath at 40°C. After 5 h, the organic layer was separated and evaporated under nitrogen. The residue was reconstituted in 100 μl methanol. The extraction samples were analysed by HPLC-UV.

In solid phase extraction (SPE), the sorbent was conditioned with methanol and water. The volume of each solvent was equal to the capacity of the column. Before extraction, hair samples were hydrolysed. The hydrolysis process was performed with 2 ml of 1 mol/dm³ potassium hydroxide at 95°C for 15 min. The sample was acidified by adding 0.5 ml of concentrated formic acid, diluted with 5 ml of deionised water and introduced onto the extraction columns. Then, the column bed was dried under vacuum for 3 min. The analytes were eluted with 4 ml of acetone and dichloromethane mixture (3:1, v/v). After evaporation under nitrogen, the residue was reconstituted in 100 μl of methanol. The extracts were analysed by HPLC-UV.

Ultrasonic-assisted extraction (UAE) turned out to be the most efficient. The average SPE recovery was about 25%, for acidic LLE about 19%, for alkali SPE about 17%, whereas for UAE the average recovery was 58% (48% for THC, 32% for THC-COOH, 85% for CBD and 67% for CBN). In order to improve extraction efficiency and potentially apply the method to

TABLE VI. RECOVERIES ACHIEVED DURING HPLC/UV ANALYSIS OF UAE HAIR EXTRACTS AND WATER SPIKED WITH STANDARDS WITH DICHLOROMETAHENE USED AS A SOLVENT EXTRAHENT

Types of analysed samples		THC	CBN	CBD	THC-COOH
		Recovery [%]			
Hair + dichloromethane	Unhydrolysed	64	78	77	50
	Hydrolysed	63	50	70	53
Water + dichloromethane	Neutral	85	92	86	86
	Acidic	80	88	87	79

urinalysis, methanol was replaced with dichloromethane [11]. The results achieved with UAE and dichloromethane are presented in Table VI.

Comparing the extraction efficiency of cannabinoids from hair, better recoveries were obtained for unhydrolysed samples (except for THC-COOH). For water samples, better extraction was achieved in a neutral medium; in acidic medium extraction of analytes was less efficient.

Recoveries for aqueous samples in neutral pH were in the range 85–92%. Recoveries of cannabinoids for hair samples were in the 50–78% range.

4.5. Authentic hair samples analysis

Authentic hair samples were collected in January 2005 from volunteer anonymous students of Gdańsk University of Technology who admitted having used marihuana or hashish in the previous three months. The samples were stored in sealed plastic bags at room temperature. Authentic hair samples were analysed according to the procedure described below.

About 100 mg of hair was washed by dipping it in methanol for 5 min and dichloromethane for 5 min. Hair samples were dried at room temperature, cut into 1–2 mm pieces and weighed out. Samples prepared in this way were extracted by ultrasonic-assisted extraction. 4 ml of dichloromethane was added to the samples, which were then incubated in an ultrasonic bath for 5 h at 40°C. After that, the samples were centrifuged (3000 cycle/min, 4°C, 10 min) and the organic layer was separated from the hair. The solvent was evaporated in a weak nitrogen stream and the residue was reconstituted in 100 µl methanol. The extracted samples were analysed by HPLC-UV (acetonitrile-formic acid, 75:25, v/v, 228 nm). Recovery values were taken into consideration in quantifying analysis.

In the 12 analysed samples, THC was detected at a concentration of 3.4 µg/g hair in only one case. CBD was detected in 7 samples in the range from 0.5 µg to

3.3 µg in 1 g hair (average 1.4 µg), CBN in 11 samples in the range from 0.2 µg to 1.8 µg in 1 g hair (average 0.5 µg/g), whereas THC-COOH was determined in all samples in the range from 1.2 µg to 6.6 µg in 1 g hair (average 2.1 µg/g THC-COOH).

5. Conclusions

In the primary stage of the study, GC-FID and HPLC-UV determination conditions were optimised. The most efficient extraction method was ultrasonic-assisted extraction with the application of dichloromethane as a solvent. In view of the need to determine THC-COOH, GC-FID could only be used after derivatisation. Significant lowering of limits of detection was possible to achieve by derivatising cannabinoids with MTBSTFA. The best chromatographic separation was achieved by using HPLC-UV in the following isocratic elution system: acetonitrile and 0.05 mmol/dm³ formic acid (75:25, v/v). The retention times for particular compounds were also stable using this system. In the developed procedure which utilised UAE-HPLC-UV, evaluated limits of detection in hair were as follows: 3.4 µg/g for THC; 0.2 µg/g for CBN; 0.5 µg/g for CBD and 0.4 µg/g for THC-COOH. This procedure was also used for determination of cannabinoids in authentic samples ($n = 12$) – the average concentration for 1 g hair was: 3.4 µg for THC ($n = 1$); 1.4 µg for CBD ($n = 7$); 0.5 µg for CBN ($n = 11$) and 2.1 µg for THC-COOH ($n = 12$).

References

- Allen D. L., Oliver J. S., The use of supercritical fluid extraction for the determination of amphetamines in hair, *Forensic Science International* 2000, 107, 191–199.
- Advances in analytical toxicology, vol. 2, Baselt R. C. [ed.], Year Book Medical Publishers, London 1989.

3. Bourquin D., Brenneisen R., Confirmation of cannabis abuse by the determination of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine with high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *Journal of Chromatography B* 1987, 414, 187–191.
4. Chemia i inżynieria ekologiczna, Namieśnik J. [red.], Wydawnictwo Uniwersytetu Opolskiego, Opole 1997.
5. Chiarotti M., Costamagna L., Analysis of 11-nor- Δ^9 -carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in biological samples by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC/MS-MS), *Forensic Science International* 2000, 114, 1–6.
6. Cirimele V., Kintz P., Mangin N., Testing human hair for cannabis, *Forensic Science International* 1995, 70, 175–182.
7. Clouette R., Jacob M., Koteel P. [et al.], Confirmation of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol in urine as its t-butylidimethylsilyl derivative using GC/MS, *Journal of Analytical Toxicology* 1993, 17, 1–4.
8. Cone E. J., Johnson R. E., Darwin W. D. [et al.], Passive inhalation of marijuana smoke: Urinalysis and room air levels of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, *Journal of Analytical Toxicology* 1987, 11, 89–96.
9. Dussy F. E., Hamberg C., Luginbühl M. [et al.], Isolation of Δ^9 -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of Δ^9 -THC in cannabis products, *Forensic Science International* 2005, 149, 3–10.
10. El Mahjoub A., Staub C., Determination of benzodiazepines in human hair by on-line high-performance liquid chromatography using a restricted access extraction column, *Forensic Science International* 2001, 123, 17–25.
11. Eser H. P., Potsch L., Skopp G. [et al.], Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis (GC/MS) on hair snippets versus hair powder using various extraction methods, *Forensic Science International* 1997, 84, 271–279.
12. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii, sprawozdanie roczne 2004: Stan problemu narkotykowego w Unii Europejskiej i Norwegii, Lizbona 2004.
13. Gaillard Y., Pepin G., Simultaneous solid-phase extraction on C18 cartridges of opiates and cocaine for an improved quantitation in human hair by GC-MS: one year of forensic applications, *Forensic Science International* 1997, 86, 49–59.
14. Gentili S., Cornetta M., Macchia T., Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair, *Journal of Chromatography B* 2004, 801, 289–296.
15. Giroud C., Menetrey A., Augsburg M. [et al.], Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC and Δ^9 -THCCOOH plasma or serum to whole blood concentrations distribution ratios in blood samples taken from living and dead people, *Forensic Science International* 2001, 123, 159–164.
16. Kemp P. M., Abukhalaf I. K., Manno J. E. [et al.], Cannabinoids in humans. I. Analysis of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and six metabolites in plasma and urine using GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 1995, 19, 285–291.
17. Kintz P., Cirimele V., Mangin P., Testing human hair for Cannabis II. Identification of THC-COOH by GC-MS-NCI as a unique proof, *Journal of Forensic Sciences* 1995, 40, 619–622.
18. Lee S. C., Zou S. C., Ho K. F. [et al.], Direct ultrasonic agitation for rapid extraction of organic matter from airborne particulate, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 2001, 369, 166–169.
19. Lewis D., Moore C., Morrissey P. [et al.], Determination of drug exposure using hair: application to child protective cases, *Forensic Science International* 1997, 84, 123.
20. Lucas A. C. S., Use of SPME for the determination of methadone and EDDP in human hair by GC-MS, *Forensic Science International* 2000, 107, 225–232.
21. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B. [eds.], Clarke's analysis of drugs and poisons, Pharmaceutical Press, 2004 [electronic version].
22. Namieśnik J. [red.], Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy, WNT, Warszawa 2000.
23. Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P., Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym, CEEAM, Gdańsk 2003.
24. Sierosławski J., Substancje psychoaktywne. Postawy i zachowania. Używanie narkotyków wśród dorosłych. Wyniki ogólnopolskiego badania ankietowego 2002, *Serwis Informacyjny Narkomania*, 2003, 21, 1–20 (<http://www.kbnp.gov.pl>).
25. Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk 2004.
26. Otterbach A., Wenclawiak B. W., Ultrasonic (Soxhlet) supercritical fluid extraction kinetics of pyrethrins from flowers and allethrin from paper strips, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1999, 365, 472–474.
27. Paterson S., McLachlan-Troup N., Cordero R. [et al.], Qualitative screening for drugs of abuse in hair using GC-MS, *Journal of Analytical Toxicology* 2001, 25, 203–208.
28. Prgast F., Herzler M., Herre S. [et al.], UV spectra of toxic compounds, Institute of Legal Medicine – Humboldt University Berlin, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim 2001.
29. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 r. w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie, Dz. U. 2003, nr 116, poz. 1104.
30. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 marca 2004 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie wykazu

- środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie, Dz. U. 2004, nr 52, poz. 524.
31. Segura J., Ventura R., Jurado C., Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents, *Journal of Chromatography B* 1998, 713, 61–90.
 32. Shareef A., Parnis C. J., Angove M. J. [et al.], Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butyl)dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 β -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 2004, 1026, 295–300.
 33. Shen M., Xiang P., Wu H. [et al.], Detection of antidepressant and antipsychotic drugs in human hair, *Forensic Science International* 2002, 126, 153–161.
 34. Takao Y., Yamashita K., Kohra S. [et al.], High sensitivity analysis of Indirubin by silylation using GC/MS, *Journal of Health Science* 2003, 49, 88–90.
 35. Tomaszewska E., Hebert V. R., Method for the determination of O,S-dimethyl thiophosphate in urine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 6103–6109.
 36. Uhl M., Determination of drugs in hair using GC/MS/MS, *Forensic Science International* 1997, 84, 281–294.
 37. Uhl M., Sachs H., Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption, *Forensic Science International* 2004, 145, 143–147.
 38. Whiting J. D., Manders W. W., Confirmation of a tetrahydrocannabinol metabolite in urine by gas chromatography, *Journal of Analytical Toxicology* 1982, 6, 49–52.
 39. Williams P. L., Moffat A. C., King L. J., Combined high-pressure liquid chromatography and radioimmunoassay method for the analysis of delta-9-tetrahydrocannabinol metabolites in human urine, *Journal of Chromatography* 1979, 186, 595–603.
 40. Wu A. H. B., Liu N., Cho Y. [et al.], Extraction and simultaneous elution and derivatization of 11-nor-9-carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol using toxi-lab SPEC prior to GC/MS analysis of urine, *Journal of Analytical Toxicology* 1993, 17, 215.

Corresponding author

Marek Wiergowski
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Akademii Medycznej w Gdańsku
ul. Dębowa 23
80-204 Gdańsk
e-mail: marwier@amg.gda.pl

OZNACZANIE THC, THC-COOH, CBN I CBD WE WŁOSACH Z WYKORZYSTANIEM DERYWATYZACJI ORAZ TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH

1. Wprowadzenie

Przetwory konopi indyjskich są najczęściej stosowanymi narkotykami w krajach Unii Europejskiej. Do przyjmowania konopi (co najmniej jednokrotnie w ciągu roku) przyznało się w 2002 roku w Polsce ok. 6% młodych osób (15–34 lat), podczas gdy średnia w krajach Unii Europejskiej była w tym czasie około dwa razy większa [12]. Do stosowania marihuany i haszyszu najczęściej przyznają się osoby pochodzące z dużych skupisk miejskich. Według badań z 2002 r. przeprowadzonych wśród mieszkańców Warszawy w wieku od 16 do 24 lat, do jednokrotnego użycia marihuany albo haszyszu przyznało się 48% badanych [24]. Z badań materiału biologicznego pobranego od osób żywych przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1997–2002 wynika, że w grupie badanych, u których potwierdzono obecność narkotyków, aż u 40% osób wykryto kannabinole. Analogiczna analiza materiałów biologicznych – z dodatnią potwierdzoną obecnością narkotyków – pobranych podczas sekcji zwłok wykazała obecność kannabinoli tylko w przypadku 4% badanych.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie z 2003 r. [29] wraz z nowelizacją z 2004 r. [30], odnoszące się do chwilowego stężenia substancji psychoaktywnych, m.in. nakłada na laboratorium wykonujące badania obowiązek wykrywania w trakcie analizy chemiczno-toksykologicznej w 1 ml próbce krwi przynajmniej 2 ng ⁹-tetrahydrokannabinolu, natomiast w 1 ml próbce moczu 20 ng kwasu 11-nor-⁹-tetrahydrokannabinolo-9-karboksyowego. Niekiedy występuje jednak potrzeba potwierdzenia chronicznego przyjmowania kannabinoli, która zwykle jest związana z analizą wytworów rogowych skóry, takich jak włosy czy paznokcie.

2. Oznaczanie kannabinoli we włosach

Pomimo tego, że w produktach konopi indyjskich znajduje się wiele substancji zaliczanych do grupy kannabinoli, m.in. kannabidiol (CBD) i kannabinol (CBN), to za działanie psychoaktywne odpowiedzialny jest przede wszystkim ⁹-tetrahydrokannabinol (THC). THC ulega w organizmie ludzkim intensywnemu metabolizmowi z wytworzeniem jako głównego metabolitu kwasu 11-nor-

⁹-tetrahydrokannabinolo-9-karboksyowego (THC-COOH). Mechanizm wbudowywania narkotyków do zrębu włosa jest słabo poznany. Wiadomo, że cebulka włosowa wychwytuje narkotyki i ich metabolity z krwi docierającej do korzenia włosa i zatrzymuje je na stałe w jego łodydze. Średnia szybkość wzrostu włosów wynosi od 0,3 mm do 0,4 mm/dobę (0,9–1,2 cm/miesiąc). Wzrost ten zależy od rasy człowieka, płci, wieku, odżywiania, czynników fizjologicznych i patologicznych [2].

Przygotowanie próbek biologicznych do analizy jest zadaniem złożonym, a operacje i procesy wchodzące w skład tego etapu, mogą być zarówno przyczyną straty analitów, jak i źródłem dodatkowych zanieczyszczeń i błędów [23]. W celu odniesienia stężenia narkotyków we włosach do czasu ich zażywania, próbka powinna być pobrana z potylicznej części głowy, gdzie występuje najmniejsze zróżnicowanie szybkości wzrostu i wypadania włosów. Próbka grubości ołówka (ok. 0,5 cm średnicy) powinna być związana kawałkiem nici jak najbliższej skóry głowy. Włosy należy uciąć tuż przy skórze. Jeżeli nie jest to możliwe, długość pozostającej nieuciętej części włosów powinna być zmierzona i zaprotokołowana. Należy zaznaczyć część bliższą korzeniowi. Czynności te mają na celu umożliwić przeprowadzenie analizy sekwencyjnej. Próbkę można także wrywać z cebulkami ze skóry (w przypadku analizy materiału sekcyjnego pobranego ze zwłok). Włosy powinny być zapakowane do koperty, woreczka foliowego lub szklanego naczynia. Mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej lub w lodówce (4°C). Jeżeli są mokre, to należy je wysuszyć w temperaturze pokojowej.

W przypadku analizy włosów istotnym zagadnieniem jest możliwość zafałszowania wyniku przez obecność substancji (w tym narkotyków) zaadsorbowanych na powierzchni włosów. Konsekwencją tego zjawiska jest trudność w odróżnieniu narkotyków, które zaadsorbowały się na powierzchni włosów z otoczenia (ekspozycja bierna), od tych, które wniknęły do włosa bezpośrednio z krwi. Dlatego przed przystąpieniem do właściwej analizy narkotyków próbki włosów muszą być poddane procedurze usuwania zanieczyszczeń z ich powierzchni. Zastosowane metody mycia włosów najczęściej polegały na zastosowaniu w temperaturze pokojowej przez kilka do kilkunastu minut płukania w dichlorometanie [1, 13, 10, 27], w wodzie dejonizowanej i acetonie [19, 20] czy też mieszaninie metanolu i etanolu [11]. Przy oznaczaniu narkotyków we włosach bardzo ważna jest wydajna i powtarzalna ekstrakcja tych analitów. Sprzyja temu całkowita

hydroliza włosów. Należy jednak dobrać odpowiednią metodę hydrolizy. Drastyczne warunki, jakie stosuje się przy pełnej hydrolizie, mogą spowodować rozkład badanych substancji. Stosowane tu były m.in. następujące metody hydrolizy włosów: 500 mg włosów poddawano inkubacji z 1 ml 1 mol/dm³ NaOH przez 10 min w temperaturze 95 °C [5, 6], a następnie do 20 mg włosów dodawano 2 ml 8 mol/dm³ roztworu mocznika. Hydroliza zachodziła w temperaturze pokojowej przez noc, po czym do 15 mg włosów dodawano 0,5 ml 10 mol/dm³ NaOH i termostatowano przez 30 min w 70°C [37], a 20 mg włosów hydrolizowano 200 µl 1 mol/dm³ kwasu chlorowodorowego (HCl) w temperaturze 60°C przez 60 min [14].

Najczęściej stosowaną metodą hydrolizy jest hydroliza alkaliczna. Uważana jest ona za bardziej wydajną i powtarzalną niż hydroliza kwaśna i enzymatyczna [8, 39]. Wprowadzenie operacji ekstrakcji w analizie materiału biologicznego daje wiele korzyści (m.in. uproszczenie składu matrycy pierwotnej próbki, możliwość zwiększenia stężenia analitu w matrycy odbierającej) [22]. Próbki biologiczne są przykładem próbek, w których przeprowadzenie analizy do matrycy wtórnej jest szczególnie istotne, pozwala bowiem na wykonanie analizy tych próbek z wykorzystaniem technik chromatograficznych [5, 6, 11, 33, 37].

Techniki stosowane do ekstrakcji kannabinoli z roztworów próbek włosów po wcześniej przeprowadzonej hydrolizie matrycy biologicznej to m.in. ekstrakcja rozpuszczalnikiem (ang. liquid-liquid extraction – LLE), ekstrakcja do fazy stałej (ang. solid phase extraction – SPE), ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ang. ultrasonic-assisted extraction – UAE). Rozpuszczalnik stosowany do ekstrakcji LLE powinien bardzo słabo rozpuszczać się w wodzie, charakteryzować się dużą czystością (zminimalizowanie zanieczyszczenia próbki) oraz dużą lotnością (ułatwienie późniejszego odparowania). Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji kannabinoli z próbek biologicznych są: metanol, octan etylu, aceton, acetonitryl, dichlorometan lub mieszaniny tych rozpuszczalników. W celu przeprowadzenia ekstrakcji analitów z próbki z użyciem techniki ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami (UAE) próbkę umieszcza się w szklanym lub metalowym naczyniu i wstawia do łaźni ultradźwiękowej lub też wewnątrz naczynia umieszcza się sondę ultradźwiękową. Zakres ultradźwięków wykorzystywanych do ekstrakcji rozpuszczalnikiem wynosi od 20 kHz do 500 kHz. Do zalet techniki UEA zalicza się: dobrą powtarzalność, możliwość zastosowania metody do próbek o różnych rozmiarach, wysoką efektywność ekstrakcji oraz możliwość prowadzenia kilku ekstrakcji jednocześnie [18, 26]. Ekstrakcja do fazy stałej SPE polega na przeniesieniu analitów z próbki ciekłej do fazy stałej, którą stanowią odpowiednio dobrane sorbenty [21].

Derywatyzację wprowadza się tylko wtedy, gdy rzeczywiście jest konieczna, ponieważ komplikuje skład matrycy ekstraktu, przedłuża czas badania i zwiększa koszt analizy. Jej główną zaletą jest poprawa granicy oznaczalności nawet o kilka rzędów [32, 35]. Najbardziej popularnymi i uniwersalnymi odczynnikami derywatyżującymi do blokowania grup polarnych będących donorami protonów są odczynniki silylujące [31]. Do odczynników najczęściej wykorzystywanych do derywatyżacji kannabinoli można zaliczyć: MTBSTFA [3, 7, 36, 37, 40], PFPA/PFPOH [6, 17], BSTFA [6, 16] i TMAH [15, 38]. W niniejszych badaniach do derywatyżacji kannabinoli użyto odczynnika silylującego tert-butylo-dimetylosililotrifluoro-acetamidu z 1% zawartością tert-butylo-dimetylosililu (MTBSTFA + 1% TBDMS). MTBSTFA jest bardzo reaktywny, a jego działanie polega na wymianie atomu wodoru związanego z heteroatomem na grupę funkcyjną $[-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3]$. Powstające pochodne TBDMS charakteryzują się dużo większą lotnością i mniejszą polarnością od kannabinoli. Powinny wykazywać również większą stabilność i czułość w badaniu w przypadku zastosowania chromatografii gazowej [34].

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki i materiał badawczy

W badaniach zastosowano następujące odczynniki (o czystości HPLC lub cz.d.a.): aceton, acetonitryl, metanol, dichlorometan (Merck, Niemcy), heksan (Promil Chemicals, Anglia), MTBSTFA w 1% TBDMS (Sigma-Aldrich, Stany Zjednoczone), octan etylu, kwas mrówkowy, kwas octowy, kwas siarkowy, wodorotlenek potasu (POCH, Polska) oraz substancje wzorcowe: THC, CBD, CBN i THC-COOH o stężeniu 1 mg/ml w metanolu (Cerilliant, LGC Promochem, Stany Zjednoczone).

Próbki włosów pobierano od studentów Politechniki Gdańskiej w lutym 2005 r. z zachowaniem zasady dobrowoli i anonimowości. Przed pobraniem próbek studenci oświadczyli, że zażywali produkty konopi indyjskich w czasie ostatnich kilku miesięcy. Próbki przechowywano w szczelnie zamkniętych woreczkach foliowych w temperaturze pokojowej.

3.2. Aparatura

W trakcie optymalizacji procedury analitycznej oraz podczas prowadzonych badań wykorzystywane były następujące urządzenia i elementy wyposażenia analitycznego:

- chromatograf gazowy Focus GC firmy ThermoFinnigan wyposażony w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), kolumna Rtx-5 Sil MS firmy Restek

o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,25 mm i grubości fazy 0,25 μm . Analizy prowadzono przy temperaturze detektora 315°C, dozownika 280°C oraz przy programowanej temperaturze pieca: 150°C przez 0,7 min, wzrost temperatury do 270°C przy 15°C/min, utrzymanie temperatury 270°C przez 1 min, wzrost do 290°C przy 2°C/min, utrzymanie temperatury 290°C przez 5 min. Do dozownika, który pracował w trybie bez podziału strumienia gazu nośnego, wprowadzano 2 μl próbki. Natężenie przepływu strumienia gazu nośnego wynosiło 1 ml/min;

- chromatograf gazowy Trace GC firmy ThermoFinnigan z detektorem spektrometrii mas (MS), kolumna firmy Restek Rtx-5 Sil MS (długość 30 m, średnica wewnętrzna 0,25 mm i grubość fazy 0,25 μm). Do dozownika, który pracował w trybie z podziałem strumienia gazu nośnego, wprowadzano 4 μl próbki. Analizy prowadzono przy temperaturze dozownika 280°C oraz takiej samej programowanej temperaturze pieca, jak w przypadku oznaczeń GC-FID. Detektor MS pracował w trybie jonizacji elektronowej (EI). Rejestrację widm mas wykonano w trybie skanowania jonów (SCAN) w zakresie mas od 50 m/z do 650 m/z oraz w trybie monitorowania wybranych jonów (SIM);
- chromatograf cieczerwowy LC10Avp firmy Shimadzu z detektorem UV/VIS, manualny dozownik z pętlą dozującą o objętości 5 μl , kolumna wypełniona żel krzemionkowym modyfikowanym fazą oktadecylową Luna 5 μm C18(2) firmy Phenomenex (długość 15 cm, średnica wewnętrzna 4,6 mm, średnica ziarna 5 μm).

Ponadto w badaniach wykorzystano: kolumny ekstrakcyjne do SPE wypełnione żel krzemionkowym modyfikowanym oktadecylem (C18) firmy J. T. Baker, łąźnię ultradźwiękową (Polsonic Sp. z o.o., Polska), laboratoryjną płytę grzejną TLC Plate Heater III (Camag, Szwajcaria) oraz zestaw do dejonizowania wody (Millipore, Stany Zjednoczone).

4. Dyskusja wyników

Wybrane elementy walidacji w niniejszej pracy przeprowadzono przez określenie selektywności, wyznaczenie liniowości, granic wykrywalności i oznaczalności, zakresu pomiarowego oraz określenie niepewności pomiarów, przy czym proces ten był poprzedzony optymalizacją warunków oznaczenia GC-FID oraz HPLC-UV.

Granice wykrywalności LOD obliczano w większości przypadków na podstawie wartości stosunku sygnału do szumu (tabela I, III i IV). W tym celu dla uzyskanego chromatogramu próbki ślepej określono poziom szumów (średnia arytmetyczna powierzchni 10 pików zintegrowanych w pobliżu czasu retencji agalitu), a następnie

wielkość tę przemnożono przez 3 i przeliczono uzyskaną wartość sygnału na stężenie.

Natomiast w tabeli V przedstawiono wartości granic oznaczalności LOQ obliczonych na podstawie wcześniej wyznaczonych granic wykrywalności LOD w oparciu o krzywe kalibracyjne:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot s}{a} \quad \{1\}$$

Wartość LOD była wyznaczona na podstawie współczynnika kierunkowego krzywej kalibracyjnej (a) oraz średniej wartości odchylenia standardowego (s) uzyskanej przez uśrednienie odchylenia standardowego wyrazu wolnego (s_b) i wartości szczytkowego odchylenia standardowego (s_{xy}) [25]. Granice oznaczalności LOQ obliczono jako potrójną wartość oszacowanego stężenia granicy wykrywalności LOD .

4.1. Dobór warunków prowadzenia analizy GC-FID i GC-MS

W celu wyznaczenia granicy wykrywalności i oznaczalności dla THC, CBN, CBD oraz THC-COOH bez zastosowania derywatywacji zarówno techniką GC-FID, jak i GC-MS, do kolumn chromatograficznych wprowadzono po 2 μl roztworu każdego wzorca (THC, CBN, CBD, THC-COOH) o stężeniu 1 mg/ml. Obliczone wartości granic wykrywalności i oznaczalności poszczególnych analitów zestawiono w tabeli I.

Ze względu na niewykrycie certyfikowanego wzorca THC-COOH w zastosowanym układzie chromatograficznym GC-FID (w relatywnie dużym stężeniu 1 mg/ml), w dalszej części badań postanowiono wprowadzić – zgodnie z licznymi danymi zawartymi w literaturze przedmiotu [3, 7, 36, 37, 40] – etap derywatywacji do procedury analitycznej. W celu optymalizacji oznaczenia oraz obniżenia granicy oznaczalności zastosowano trzy procedury przeprowadzania badanych analitów w pochodne (tabela II).

Do kolumny chromatograficznej GC-FID wprowadzono, po wcześniejszej derywatywacji metodą A, po 2 μl analizowanej próbki, natomiast do kolumny chromatograficznej GC-MS po 4 μl roztworu próbki. Analiza chromatograficzna próbek wykonanych metodą A nie dała pozytywnych wyników. Główną przyczyną mogła być strata bardzo lotnych produktów reakcji derywatywacji podczas odparowywania rozpuszczalnika w łagodnym strumieniu azotu. Dowodem potwierdzającym tę tezę były wyniki uzyskane drugą metodą derywatywacji. Jedyną różnicą między metodą A i B było opuszczenie etapu poreakcyjnego suszenia produktów reakcji derywatywacji w strumieniu azotu. Zgodnie ze wskazówkami Bourquina oraz Brenneisena [3] zmodyfikowano powyższe metody (metoda C). Wyznaczone wartości granicy wykrywalności i oznaczalności dla kannabinoli z zasto-

sowaniem reakcji derywatywacji metodą B i C oraz z wykorzystaniem techniki GC-FID i techniki GC-MS zestawiono w tabeli III. Podczas oznaczania kannabinoli za pomocą techniki GC-MS zastosowano tryb SCAN.

Porównując wyniki otrzymane podczas analizy próbek wzorców po derywatywacji przy zastosowaniu techniki GC-FID oraz GC-MS, stwierdzono, iż dla THC otrzymano niższe granice oznaczalności, gdy zastosowano metodę C. W przypadku THC-COOH niższe wartości *LOQ* otrzymano, stosując metodę B. Oznaczając CBN za pomocą techniki GC-FID, niższe wartości granicy oznaczalności otrzymano dla metody C, natomiast metoda B okazała się czulsza przy zastosowaniu techniki GC-MS. Stężenie około 13 µg CBD w 1 ml roztworu było wykrywane podczas analizy próbki za pomocą GC-FID, natomiast CBD był wykrywalny z zastosowaniem techniki GC-MS w trybie SCAN dopiero przy podwojonej jego zawartości w próbce (ok. 26 µg/ml). Ostatecznie wybrano derywatywację metodą B, dla której – przy oznaczaniu techniką GC-FID – wartość granicy oznaczalności dla THC-COOH była niższa. W celu oceny wzmocnienia czułości metody po derywatywacji kannabinoli w stosunku do wartości oznaczanych bez zastosowania tego etapu przy użyciu GC-FID oraz GC-MS, sporządzono tabelę IV.

W przypadku oznaczania kannabinoli techniką GC-FID po zastosowaniu derywatywacji granice oznaczalności były znacznie niższe niż wartości granic oznaczalności bez wcześniejszego przeprowadzenia derywatywacji kannabinoli. Wielokrotność wzmocnienia sygnału wynosiła od 180 (dla THC) do 320 (dla CBN). Granice oznaczalności dla pozostałych kannabinoli były niższe. Wielokrotność wzmocnienia dla THC przy zastosowaniu techniki GC-MS wynosiła 90, a dla CBN 200. Reakcja derywatywacji wpłynęła korzystnie na oznaczanie THC-COOH. Kwas ten został wykryty za pomocą techniki GC-FID oraz GC-MS.

W dalszych badaniach wykorzystywano reakcję derywatywacji metodą B. W celu obniżenia granicy wykrywalności kannabinoli postulowane jest monitorowanie wybranych jonów (SIM). W trybie SCAN określono najbardziej intensywne jony mas badanych kannabinoli po derywatywacji za pomocą MTBSTFA: $m/z = 428, 345$ i 413 dla pochodnej THC, $m/z = 418, 475$ i 344 dla pochodnej CBD, $m/z = 409, 424$ i 367 dla pochodnej CBN oraz $m/z = 515, 572$ i 557 dla pochodnej THC-COOH.

W celu wyznaczenia krzywych wzorcowych procedury wykorzystującej derywatywację (zgodnie z metodą B) oraz chromatografię gazową GC-FID przeprowadzono analizy 5 roztworów mieszanin wzorcowych w zakresie stężeń od 30 µg/ml do 1000 µg/ml. Do kolumny chromatograficznej wprowadzano po 2 µl każdej próbki. Analizę chromatograficzną wszystkich próbek powtórzono trzykrotnie. Biorąc pod uwagę wartości uzyskanych współczynników regresji wynoszących $R^2 = 0,992-$

0,999 (powierzchnie pików chromatograficznych i odpowiadające im stężenia analitu), można stwierdzić, że w badanym zakresie stężeń istnieje liniowa zależność pomiędzy tymi zmiennymi.

4.2. Dobór warunków analizy metodą HPLC-UV

Oznaczanie związków z grupy kannabinoli z wykorzystaniem techniki HPLC prowadzono w układzie faz odwróconych, najkorzystniejszym do rozdzielania substancji niepolarnych i słabo polarnych. Korzystając z danych zawartych w literaturze przedmiotu [21, 28], do oznaczania kannabinoli wybrano dwie długości fal – 228 i 278 nm. Początkowo do ustalenia składu fazy ruchomej zastosowano elucję gradientową trzech rozpuszczalników (A – 0,05 mmol/dm³ buforu octanowego, B – acetonitryl, C – metanol) [9]. Przez pierwsze 2 min skład faz był następujący: 13% A, 22% B, 65% C. Przez następne 25 min zawartość acetonitrylu (B) wzrastała do 35% kosztem malejącej zawartości rozpuszczalnika A (rycina 1 a).

Analiza chromatograficzna w takim układzie faz wykazywała brak powtarzalności czasów retencji (czasy retencji różniły się nawet o 2–5 min). Poza tym analiza chromatograficzna nie zapewniła skutecznego rozdzielania THC-COOH i CBD. W dalszych badaniach bufor octanowy zastąpiono roztworem kwasu mrówkowego o tym samym stężeniu. Rozdział prowadzono w warunkach izokratycznych. Wprowadzone zmiany wpłynęły korzystnie na powtarzalność czasów retencji. W celu poprawienia rozdzielczości THC-COOH i CBD ze składu fazy ruchomej całkowicie wyeliminowano metanol. Elucję prowadzono w układzie izokratycznym przez 30 min. Faza ruchoma składała się z acetonitrylu oraz wodnego roztworu kwasu mrówkowego o stężeniu 0,05 mmol/dm³ (87:13, v/v). Analiza chromatograficzna zapewniła prawidłowe rozdzielanie THC-COOH i CBD (rycina 1 b). W wyniku optymalizacji zawartości składu fazy ruchomej najlepsze rozdzielanie uzyskano przy izokratycznym składzie fazy ruchomej acetonitryl: 0,05 mmol/dm³ kwasu mrówkowego, 75:25, v/v (rycina 1 c).

W celu sporządzenia krzywych wzorcowych podano analizie techniką chromatografii cieczowej HPLC-UV 5 mieszanin wzorcowych w zakresie stężeń od 0,1 µg/ml do 1000 µg/ml. Do kolumny chromatograficznej wprowadzano po 5 µl każdej próbki. Analizę chromatograficzną wszystkich próbek powtórzono trzykrotnie. Biorąc pod uwagę wartości współczynników regresji ($r^2 = 0,999$ we wszystkich przypadkach), można stwierdzić, że w badanym zakresie stężeń od 0,1 µg/ml do 1000 µg/ml istnieje liniowa zależność pomiędzy powierzchniami pików chromatograficznych i odpowiadającymi im stężeniami analitu. Wyznaczona rozszerzona niepewność pomiarowa (oszacowana jako podwojona wartość odchylenia standardowego wyznaczona dla sześciu pomia-

rów) dla stężenia analitów 1 µg/ml wynosiła w zastosowanej metodzie HPLC-UV (dla 228 nm): 6,2% dla THC-COOH; 6,9% dla CBD; 6,5% dla CBN oraz 3,8% dla THC.

4.3. Porównanie granic oznaczalności i wykrywalności GC-FID i HPLC-UV

Granice wykrywalności dla poszczególnych analitów wyznaczone przy zastosowaniu metody GC-FID z wcześniejszą derywatyzacją i obliczone na podstawie szczytkowego odchylenia standardowego były niższe niż granice wykrywalności obliczone na podstawie odchylenia standardowego wyrazu wolnego (tabela V). Jednak rząd wielkości obliczonych wartości granic wykrywalności był taki sam, więc jako wyznaczoną wartość przyjęto średnią z obu pomiarów. Wyznaczone granice oznaczalności mieściły się w przedziale 0,27–0,64 µg/ml. Najniższe *LOD* (*LOQ*) otrzymano dla CBN, najwyższe zaś dla CBD. Granice wykrywalności dla THC (0,35 µg/ml) i THC-COOH (0,33 µg/ml) były zbliżone. W celu weryfikacji wyznaczonych wartości granic oznaczalności do kolumny chromatograficznej wprowadzono po 5 µl certyfikowanych wzorców THC-COOH o stężeniach 0,035 µg/ml, 0,050 µg/ml oraz 0,110 µg/ml. THC-COOH wykryto i oznaczono tylko dla najwyższego stężenia, co było zgodne z szacowanym – na podstawie krzywych kalibracyjnych – stężeniem *LOQ*. Porównując wyznaczone *LOQ* dla kannabinoli technikami GC-FID (z wcześniejszą derywatyzacją analitów) oraz HPLC-UV, stwierdzono, że niższe wartości granic oznaczalności dla CBN, CBD, THC-COOH otrzymano, stosując chromatografię cieczową z detektorem UV (tabela V).

Próbki roztworów wzorców wszystkich analitów w zakresie stężeń od 30 µg/ml do 1000 µg/ml, a wykorzystane do sporządzenia krzywej kalibracyjnej po analizie chromatograficznej, przechowywano w temperaturze –20°C. Po 48 godzinach powtórzono analizy tych próbek. We wszystkich próbkach stężenia roztworów pochodnych TBDMS po 48 godzinach były niższe (nawet do 50%) od stężeń otrzymanych bezpośrednio po przygotowaniu próbek do analizy chromatograficznej. Zostało to spowodowane odparowaniem części lotnych pochodnych TBDMS pomimo szczelnie zamkniętych naczynek oraz niskiej temperatury przechowywania. Wynikiem tego spostrzeżenia była konieczność kontroli masy naczynek z próbkami dozowanymi do chromatografu (i ewentualne uwzględnienie strat masy podczas obliczeń) lub – w przypadku dużych strat analitów – konieczność przygotowania na nowo badanych roztworów. W przypadku badania próbek rzeczywistych problem strat analitów po derywatywacji powinien być rozwiązany przez stosowanie wzorców kannabinoli znakowanych izotopowo (w trakcie analizy z wykorzystaniem techniki

GC-MS) lub zminimalizowany przez wykorzystanie wzorca wewnętrznego (w analizie techniką GC-FID).

4.4. Dobór warunków przygotowywania i analizy włosów

Z uwagi na zadowalające wartości *LOQ*, skuteczniejszy rozdział kannabinoli oraz prostotę oznaczeń do dalszych badań, postanowiono wykorzystać zoptymalizowaną metodykę oznaczenia kannabinoli w układzie HPLC-UV. Przed przystąpieniem do właściwej analizy próbki włosów myto przez zanurzenie przez 5 min w metanolu oraz przez 5 min w dichlorometanie. Włosy wysuszone w temperaturze pokojowej, następnie pocięto je na 1–2 mm odcinki i zważono. Do zbadania efektywności izolacji analitów z próbek włosów wybrano technikę ekstrakcji rozpuszczalnikiem (LLE), ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (UAE) oraz ekstrakcję do fazy stałej (SPE).

Przed przystąpieniem do ekstrakcji analitów rozpuszczalnikiem, wstępnie przygotowane próbki włosów poddano hydrolizie. Proces hydrolizy przeprowadzono za pomocą 2 ml 1 mol/dm³ roztworu wodorotlenku potasu w temperaturze 95°C przez 15 min. Ekstrakcja analitów rozpuszczalnikiem przebiegała w dwóch wariantach: w środowisku kwaśnym po zakwaszeniu zhydrolizowanej próbki włosów stężonym kwasem mrówkowym (0,5 ml) lub w środowisku alkalicznym bez dodatku żadnego odczynnika. Główne etapy ekstrakcji to: dodanie do roztworu analizowanej próbki włosów 4 ml mieszaniny rozpuszczalników (heksan:octan etylu, 9:1, v/v), ręczne wytrząsanie analizowanej próbki przez 10 min, odwirowanie próbki (3000 obr/min, 4°C, 10 min), oddzielenie warstwy organicznej od pozostałości, odparowanie rozpuszczalnika w łagodnym strumieniu azotu i rozpuszczenie suchej pozostałości w 100 µl metanolu. Próbkę otrzymanych ekstraktów poddawano analizie metodą HPLC-UV.

W ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami (UAE) do próbek wstępnie przygotowanych włosów, bez poddania ich wcześniej procesowi hydrolizy, dodano po 4 ml metanolu. Następnie wstawiono je do łaźni ultradźwiękowej o temperaturze 40°C. Po upływie 5 godzin oddzielono warstwę rozpuszczalnika od włosów i odparowano je do sucha w łagodnym strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczono w 100 µl metanolu. Próbkę otrzymanych ekstraktów poddawano analizie metodą HPLC-UV.

W metodzie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) sorbent kondycjonowano za pomocą metanolu i wody. Objętość każdego z rozpuszczalników równoważna była objętości kolumnienki. Przed przystąpieniem do ekstrakcji analitów rozpuszczalnikiem wstępnie przygotowane próbki włosów poddano hydrolizie. Proces hydrolizy przeprowadzono za pomocą 2 ml 1 mol/dm³ roztworu wodorotlenku potasu w temperaturze 95°C przez 15 min. Próbkę zakwaszono przez dodanie 0,5 ml stężonego kwasu mrów-

kowego, rozcieńczono 5 ml wody dejonizowanej i naniesiono na kolumnki ekstrakcyjne. Następnie złoże w kolumnkach suszono przez 3 min w próżni. Anality eluowano z sorbentu za pomocą 4 ml mieszaniny acetonu i dichlorometanu (3:1, v/v). Po odparowaniu mieszaniny rozpuszczalników w łagodnym strumieniu azotu otrzymano suchą pozostałość, którą rozpuszczono w 100 µl metanolu. Próbkki otrzymanych ekstraktów poddawano analizie metodą HPLC-UV.

Najbardziej efektywną z zastosowanych metod ekstrakcji kannabinoli okazała się ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami. Średnia wartość odzysku dla metody SPE wynosiła ok. 25%, dla LLE ze środowiska kwaśnego ok. 19%, a z zasadowego ok. 17%, natomiast dla UAE otrzymano średnio 58% (dla THC 48% odzysku, THC-COOH 32%, CBD 85% i CBN 67%). W celu zwiększenia wydajności ekstrakcji oraz potencjalnego wykorzystania metody do analizy moczu, metanol zastąpiono dichlorometanem [11]. Wyniki uzyskane podczas analizy włosów techniką UAE z zastosowaniem dichlorometanu jako rozpuszczalnika zamieszczono w tabeli VI.

Porównując efektywność ekstrakcji kannabinoli z próbek włosów, zauważono, że wyższe wartości odzysku stwierdzono dla próbek bez hydrolizy (oprócz THC-COOH). Dla próbek wodnych wydajniejsza ekstrakcja zachodziła w środowisku obojętnym, w środowisku kwaśnym izolacja analitów była mniej wydajna. Procent odzysku w przypadku próbek wodnych w środowisku obojętnym mieścił się w przedziale 85–92%. Odzyski kannabinoli dla próbek włosów mieściły się w przedziale 50–78%.

4.5. Badania próbek rzeczywistych

Rzeczywiste próbki włosów pobrane zostały w lutym 2005 r. od 12 studentów Politechniki Gdańskiej, którzy przyznali się do przyjmowania marihuany lub haszyszu w okresie ostatnich 3 miesięcy. Próbkki przechowywano w szczelnie zamkniętych woreczkach foliowych w temperaturze pokojowej. W oparciu o opracowaną procedurę, której opis podano poniżej, dokonano analizy rzeczywistych próbek włosów.

Około 100 mg włosów myto przez zanurzenie przez 5 min w metanolu oraz przez 5 min w dichlorometanie. Próbkki włosów suszono w temperaturze pokojowej, następnie cięto je na 1–2 mm odcinki i ważono. Tak przygotowane próbki włosów poddawano ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami. Do próbek dodano po 4 ml dichlorometanu i wstawiono na 5 h do łaźni ultradźwiękowej o temperaturze 40°C. Po tym czasie próbki odwirowano (3000 obr./min, 4°C, 10 min) i oddzielono warstwę rozpuszczalnika od włosów. Rozpuszczalnik odparowano w łagodnym strumieniu azotu, a suchą pozostałość rozpuszczono w 100 µl metanolu. Próbkki otrzymanych ekstraktów poddawano analizie chroma-

tograficznej z wykorzystaniem układu HPLC-UV (acetonitryl-kwas mrówkowy, 75:25, v/v, 228 nm). W analizie ilościowej próbek rzeczywistych uwzględniono wartości odzysków.

W analizowanych dwunastu próbkach wykryto THC o zawartości 3,4 µg/g włosów tylko w jednym przypadku. CBD oznaczono w siedmiu próbkach w zakresie od 0,5 µg do 3,3 µg w 1 g włosów (średnia zawartość 1,4 µg), CBN w jedenastu próbkach w zakresie od 0,2 µg do 1,8 µg w 1 g włosów (średnio 0,5 µg/g), natomiast THC-COOH był oznaczony we wszystkich próbkach w zakresie od 1,2 µg do 6,6 µg w 1 g włosów (średnio 2,1 µg/g THC-COOH).

5. Wnioski

We wstępnym etapie badań zoptymalizowano warunki oznaczenia w układzie GC-FID i HPLC-UV. Najwydajniejszą z zastosowanych metod ekstrakcyjnych była ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami UAE, przy czym wydajnym ekstrahentem okazał się dichlorometan. Ze względu na konieczność oznaczenia THC-COOH, technika GC-FID mogła być użyta tylko w przypadku zastosowania derywatyzacji. Znaczące obniżenie granic wykrywalności było możliwe przez przeprowadzenie kannabinoli w pochodne za pomocą odczynnika derywatyzującego MTBSTFA. Najlepszą rozdzielczość kannabinoli uzyskano dzięki zastosowaniu techniki HPLC-UV w układzie izokratycznym acetonitrylu i 0,05 mmol/dm³ kwasu mrówkowego (75:25, v/v). Układ ten zapewnił również stabilne czasy retencji dla poszczególnych związków. Dla opracowanej procedury UAE-HPLC-UV oszacowane wartości granic oznaczalności we włosach wyniosły: 3,4 µg/g dla THC; 0,2 µg/g dla CBN; 0,5 µg/g dla CBD oraz 0,4 µg/g dla THC-COOH. Procedurę tę wykorzystano również do oznaczania kannabinoli w rzeczywistych próbkach włosów ($n = 12$), których średnia zawartość w 1 g włosów wynosiła: 3,4 µg dla THC ($n = 1$); 1,4 µg dla CBD ($n = 7$); 0,5 µg dla CBN ($n = 11$) oraz 2,1 µg dla THC-COOH ($n = 12$).