

# IDENTIFIKACE TERPENŮ ROSTLIN RODU CANNABIS V OVZDUŠÍ.

## IDENTIFICATION OF TERPENES GENUS CANNABIS IN THE AIR.

**Henryk SIKORA, Daniel LEPIČ**

*Školící středisko a laboratoř Třemošná,  
HZS Plzeňského kraje, Ku staré cihelně 1111, 330 11 Třemošná*

*e-mail: henryk.sikora@hzspk.cz*

*e-mail: daniel.lepic@hzspk.cz*

**KLÍČOVÁ SLOVA:** termální desorpce, terpeny, konopí.

**KEY WORDS:** thermal desorption, terpenes, cannabis.

### **ABSTRAKT**

V současné době dochází k nárůstu pěstíren konopí, které jsou velmi obtížně odhalovány. Při pěstování konopí dochází k uvolňování terpenů do ovzduší, které vytvářejí charakteristický zápach pro tyto rostliny. V těchto případech lze provést odběr vzorků vzduchu z přípustné vzdálenosti od místa pěstování. Vhodnou metodou pro odběr vzorků z ovzduší je technika termální desorpce, kdy vzorek je odebrán na sorpční trubičku a následně analyzován v laboratoři na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Pomocí této techniky byly identifikovány charakteristické monoterpeny, které prokázaly přítomnost pěstírny konopí v daném objektu.

### **ABSTRACT**

Currently, there is an increase in cannabis cultivation, which is very difficult to detect. During growing cannabis, terpenes are released into the air, which creates a characteristic odor for these plants. In these cases it is possible to take air samples from an acceptable distance from the place of cultivation. A suitable method for sampling from the air is the technique of thermal desorption, where the sample is taken on a sorption tube and subsequently analyzed in the laboratory on a gas chromatograph with a mass detector. Using this technique, characteristic monoterpenes were identified, which proved the presence of cannabis cultivation in the object.

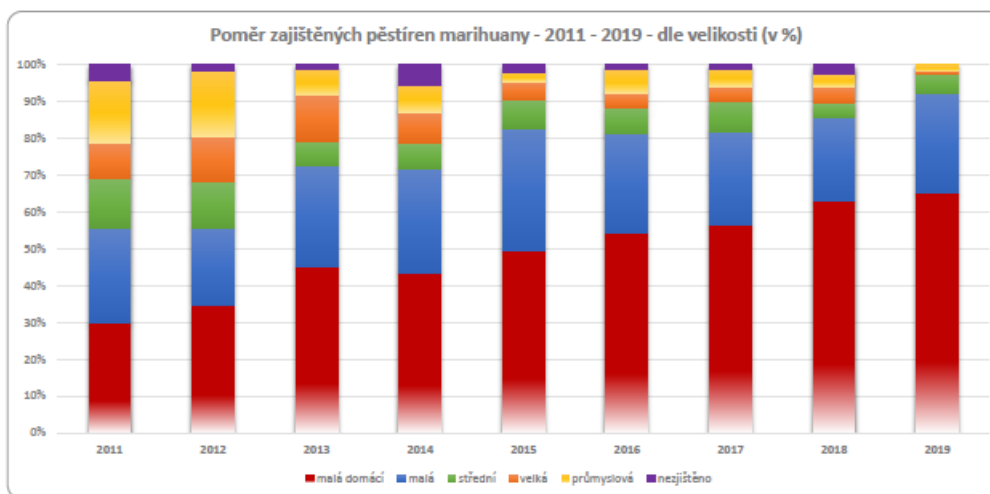
### **1 ÚVOD**

## 2 PĚSTÍRNÝ KONOPÍ

Podle výroční zprávy Národní protidrogové centrály za rok 2019, dochází nadále k nárůstu malých pěstebních provozů jak ve vnitřním, tak i venkovním prostředí. Celkový počet zajištěných pěstíren v posledních 7 letech zůstává prakticky neměnný [1]. Většina pěstíren je odhalena na základě černého odběru elektrické energie [2]. U malých pěstíren je ale tato spotřeba nedostatečným důkazem k získání příkazu k domovní prohlídce.

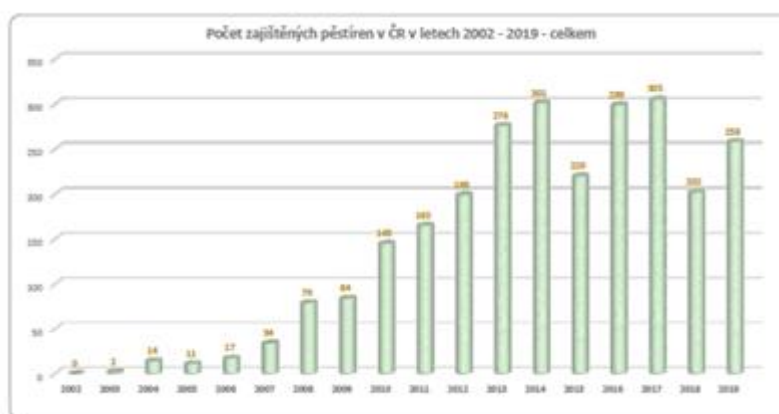
*Tabulka I*  
*Vývoj zajištěného množství v letech 2009 - 2019 [1]:*

	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
cannabis (g)	171 800	277 988	440 780	563 335	735 362	569 564	655 055	722 107	1 094 601	948 015	546 339
cannabis - rostliny (ks)	33 427	64 904	62 817	90 091	73 639	77 685	30 770	57 660	54 392	28 334	26 925
pěstírna	84	145	165	199	276	301	220	299	305	202	258
hašíš (g)	12 499	9 354	2 431	20 532	1 321	14 852	7 558	6 566	9 126	2 916	1 650



*Obr. 2.*

*Poměr zajištěných pěstíren marihuany - 2011 - 2019 - dle velikosti (v %) [1]*



*Obr. 3.*

*Počet zajištěných pěstíren v ČR v letech 2002 - 2019 celkem [1]*

## 2 TERPENY

Při pěstování konopí dochází k uvolňování těkavých látek do ovzduší. Jedná se o terpeny, které vytvářejí intenzivní a charakteristický zápach pro tyto rostliny. Někteří autoři popisují, že do ovzduší se uvolňuje až okolo 200 látek, jedná se především o monoterpeny, případně seskviterpeny [4, 5, 6]. Společně pak tyto látky mohou být identifikačním znakem přítomnosti rostlin rodu *Cannabis* v daném místě. Stále důmyslnější zabezpečení objektů a zejména dodržování práva domovní svobody, znemožňuje odběr vzorků přímo z interiéru objektů, nebo jejich bezprostřední blízkosti. V těchto případech je jedinou možností odběr vzorků vzduchu z přípustné vzdálenosti od objektu, obvykle se jedná o jednotky až desítky metrů. Terpeny uvolňované do ovzduší jsou sensoricky cítit již ve velmi malé koncentraci. Literární zdroje uvádějí obvykle koncentrace okolo 0,1 ppm [7, 8].

Základem biosyntézy terpenů a kanabinoidů v konopí představují 5-uhlíkové izoprenoidové stavební bloky isopententyl difosfát (IPP) a dimethylallyl difosfát (DMAPP), které jsou kondenzovány za vzniku geranyl difosfátu (GPP) (C10) nebo farnesyl difosfátu (FPP) (C15). Terpenové syntázy (TPS) převádějí GPP nebo FPP na terpeny. Aromatické prenyltransferázy (aPT) kondenzují GPP s kyselinou olivetolovou za vzniku kyseliny kanabigerolové (CBGA), která je cyklizována kanabinoidními syntázami za vzniku kanabinoidů [5].

Terpenové složení je fenotypová vlastnost, která vykazuje určité rozdíly mezi různými „konopnými“ kmeny konopí. Většina terpenů nalezených v konopí jsou uhlovodíky, které jsou přímými produkty enzymů terpenové syntázy (TPS), na rozdíl od složitějších terpenů, které vyžadují modifikaci jinými enzymy, jako jsou cytochrom P450. Proto chemická rozmanitost konopných terpenů odráží rozmanitost enzymů TPS kódovaných v genové rodině konopných TPS. [5] Terpenové složení konopné pryskyřice se podstatně liší v závislosti na genetických, environmentálních a vývojových faktorech. [4, 9].

Naši zájmovou skupinou látek jsou v tomto případě monoterpeny. Autoři Booth a Bohlmann uvádějí dvanáct základní monoterpenů. Jedná se o:  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -thujon, 3-karen, terpinolen, limonen, terpineol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpinen, linalool, myrcen a (Z)- $\beta$ -ocimen [5]. Při extrakci terpenů zjistil Booth, Page a Bohlmann, že nezávisle na fázi květenství byly nejhojnějšími monoterpeny  $\alpha$ -pinen, limonen,  $\beta$ -pinen, terpinolen a (E)- $\beta$ -ocimen [6]. Další zdroj uvádí z 13 monoterpenů a 14 seskviterpenů 5 nejčastějších, a to monoterpeny myrcen, terpinolen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ - a limonen a jeden seskviterpen caryophyllen [9]. U sušených rostlin koncentrace monoterpenů klesá. Bylo prokázáno, že na základě přítomnosti 5,5-dimethyl-1-vinylbicyklo[2.1.1]hexanu lze rozlišit hašiš od čerstvých a sušených rostlin. Tato látka vzniká z  $\beta$ -myrcenu při UV záření [4].

Nedávné studie udávají, že *C. indica* obsahuje o 60-80% více myrcenu než *C. sativa*. Myrcen se tak stává dominantním terpenem přítomným v rostlinách rodu *Cannabis* [10].

$\alpha$ -pinen a  $\beta$ -pinen jsou další podstatné terpeny pro identifikaci. Ze všech terpenů přítomných v rostlinách rodu *Cannabis* představují 10- 20 % celkového obsahu. Jejich prioritou je jejich těkavost, proto v chromatografech často vykazují dominantní píky. Pineny jsou základní složkou jehličnanů, proto při vzorkování musíme dodržet dostatečný odstup od těchto dřevin, případně analýzu doplnit dalším srovnávacím vzorkem [10].

d-limonen je druhým nejhojnějším terpenem v konopí. Zároveň je však docela hojně využíván jako vonná látka do různých kosmetických a čistících prostředků. V přírodě je součástí citrusových plodů. Tyto fakta musíme rovněž zohlednit při vzorkování. [10, 11].

Linalol je terpen, který má největší podíl na charakteristické vůni konopí [11].

Eukalyptol, karen, felandren a terpinolen jsou důležité terpeny, jelikož odborné studie poukazují, že se vyskytují téměř výhradně u odrůd *sativa* [10].

Karyofylen patří do skupiny seskviterpenů, je však z této skupiny nejtěkavější a proto i za vhodných podmínek detekovatelný v ovzduší. Jeho předností je, že nepodléhá dekarboxylaci, a je tak nejsnadněji naležitelnou složkou v extraktech konopí [10].

### 3 METODIKA ANALÝZY TERPENŮ V OVZDUŠÍ

Z dosavadních analýz vyplývá, že senzorická identifikace je jakýmsi limitním množstvím pro odběr vzorků vzduchu a následnou analýzu. Měření tak nízkých koncentrací pomocí PID detektoru se v praxi moc neosvědčilo, zejména z důvodu rušivých vlivů ostatních těkavých látek z okolí. Senzorický zápach je však natolik specifický, že je pro následné vzorkování nepostradatelný. Využití čichu služebních psů je problematické, jelikož jsou cvičeni na suchý rostlinný materiál, nebo hašiš. U těchto vzorků je potlačena koncentrace monoterpenů. Navíc služební psi jsou cvičeni na vyhledání konkrétního místa výskytu dané látky (výbušniny, drogy, akceleranty, apod.). Všude přítomný zápach v ovzduší vyvolává u psů dezorientaci a znesnadňuje určení zdroje.

Pro odběr vzorků z ovzduší se nejlépe osvědčila technika termální desorpce, kdy na sorpční trubičku je odebírán vzorek ovzduší a následně analyzován v laboratoři na plynovém chromatografu s hmotnostním detektorem. Vzorkování lze provádět pasivně i aktivně. Pasivní vzorkování se ovšem moc neosvědčilo v exteriéru. V případě aktivního vzorkování byl požíván průtok do 500 ml/min a dobou vzorkování 30 - 60 minut. Kratší doba vzorkování může být nedostatečná pro identifikaci sledovaných terpenů. Delší doba zase naopak není příliš efektivní z důvodu sorpce ostatních těkavých látek z okolí. Jako náplň sorpční trubičky se osvědčily kombinované sorbenty (slabý a silný), v našem případě Tenax TA 35/60 (100 mg) + Carbograph 5TD 40/60 (100 mg). Analýzu může významně narušit přítomnost pevných částic (pylu, prachu) zachycených na sorpční trubičce, které při termální desorpci produkují za nepřítomnosti kyslíku řadu produktu termodegradace a výrazně sťažují identifikaci sledovaných terpenů. K tomuto účelu je vhodné při vzorkování používat vhodné předfiltry.

#### 3.1 Odběr vzorků

V praxi se neosvědčilo odebírat vzorky pomocí druhé osoby, ani po důkladném zaškolení, jelikož počty špatně odebraných vzorků byly příliš vysoké. Nejčastější příčinou byla kontaminace sorpční trubičky a znehodnocení daného vzorku. Při vzorkování nízkých koncentrací z exteriéru je potřeba klást důraz na preciznost a čistotu. Trubičky by měly být připraveny a kondicionovány krátce před analýzou a těsně uzavřeny v dvojbalu. Při transportu na místo zájmu a zpět musí být zajištěno, aby nepřišly sorpční trubičky do kontaktu s jinou těkavou látkou, ve vozidlech jsou to nejčastěji pohonné hmoty. Manipulace by měla být prováděná v rukavicích.

Před samotným odběrem je potřeba znát meteorologickou situaci. Vždy je výhodnější odebírat vzorek za vyšší okolní teploty, kdy dochází k lepšímu odpařování terpenů. Důležitým faktorem je směr větru. Vzorky odebíráme na závětrné straně, často v úzkém pásu šíření. Je potřeba se vyvarovat místům s možnou přítomností přírodních terpenů (květiny, kvetoucí keře a stromy, jehličnany, apod.) Sorpce by neměla být prováděna na vyvýšeném místě, pokud možno ne přímo na zemi z důvodu zvýšené přítomnosti prachu, pylu apod.

Obdobným způsobem je vhodné odebrat kontrolní (srovnávací) vzorek na návětrné straně, případně tam, kde to situace dovoluje, musí být ovšem zajištěna dostatečná vzdálenost od místa s očekávaným výskytem terpenů.

Mnohdy je zapotřebí odhlučnit čerpadlo a zakrýt světelné zdroje z důvodu možného prozrazení. Je vhodné vždy provádět odběr min. dvou vzorků. Výhodné je tento odběr provádět současně a minimalizovat tak přítomnost na daném místě.

Po ukončení vzorkování je potřeba sorpční trubičky těsně uzavřít do čistého dvojbalu a co nejdříve je transportovat do laboratoře k následné analýze.

### 3.2 Analýza vzorků

Pro analýzu terpenů byly využity poznatky jiných autorů, kteří se zabývali obdobným tématem [12, 13, 14, 15, 16, 17].

Před samotnou analýzou bychom již měli mít k dispozici vlastní chromatogramy standardů terpenů. V našem případě se jednalo o standardy RESTEK [18]. Nedoporučujeme analyzovat standard těsně před analýzou, aby případné rezidua nezpůsobily falešné výsledky.

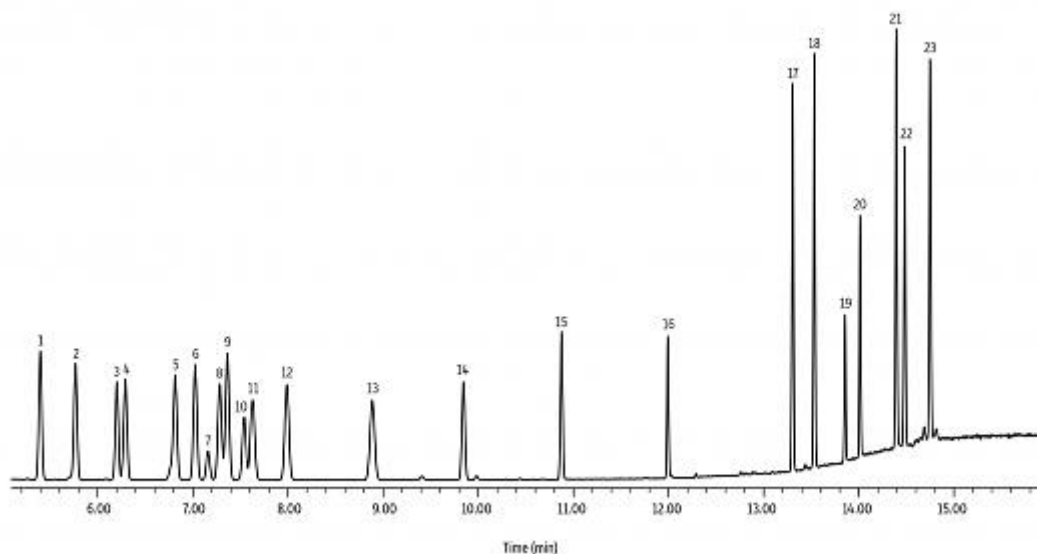
Termální desorpce by měla být připravena již před samotným odběrem vzorků, tzn. v čase kondicionace sorpčních trubiček. Je zapotřebí vyhřát všechny větve včetně „ColdTrap“ a zbavit se tak případných nečistot.

Před zahájením analýz můžeme ještě provést kontrolu citlivosti na daný standard. Nemělo by se ale jednat o sledované terpeny. Následně lze provést kontrolu čistoty systému.

Tabulka II *Cannabis* Terpenes Standard #1 & #2, kolona Rxi-624Sil MS [18]:

Pík	Název	RT (min)	
1.	alpha-Pinene	5.399	monoterpen
2.	Camphene	5.768	monoterpen
3.	beta-Myrcene	6.203	monoterpen
4.	(-)-beta-Pinene	6.290	monoterpen
5.	delta-3-Carene	6.816	monoterpen
6.	alpha-Terpinene	7.026	monoterpen
7.	Ocimene 1	7.158	monoterpen
8.	D-Limonene	7.281	monoterpen
9.	p-Cymene	7.362	monoterpen
10.	Ocimene 2	7.539	monoterpen
11.	Eucalyptol	7.629	monoterpenoid
12.	Gamma terpinene	7.990	monoterpen
13.	Terpinolene	8.887	monoterpen
14.	Linalool	9.845	monoterpen
15.	(-)-Isopulegol	10.874	monoterpenoid
16.	Geraniol	11.991	monoterpenoid
17.	beta-Caryophyllene	13.303	seskviterpen
18.	alpha-Humulene	13.531	seskviterpen
19.	Nerolidol 1	13.855	seskviterpen
20.	Nerolidol 2	14.012	
21.	(-)-Guaiol	14.393	seskviterpen
22.	Caryophyllene oxide	14.483	seskviterpen

23. (-)-alpha-Bisabolol	14.747	seskviterpen
-------------------------	--------	--------------



Obr. 4: Cannabis Terpenes Standard #1 & #2, kolona Rxi-624Sil MS, nástřik, FID [18].

Analýza vzorků musí být provedena pokud možno ihned, aby nedošlo k případnému znehodnocení (kontaminaci). Nastavení splitovacího poměru pro primární a sekundární desorpci, případně v nástřikovém modulu, je vhodné nastavit na nižší hodnoty. V našem případě se jednalo o celkový split 1:50 (viz Obr. 6).

Ještě před zahájením provedeme analýzu kontrolního vzorku, abychom definitivně vyloučili případnou kontaminaci při vzorkování, přepravě, nebo samotné analýze.

Před analýzou vzorků je nutné mít připravenou čistou splitovací trubičku, pro případ neúspěšné analýzy a následné opakování.

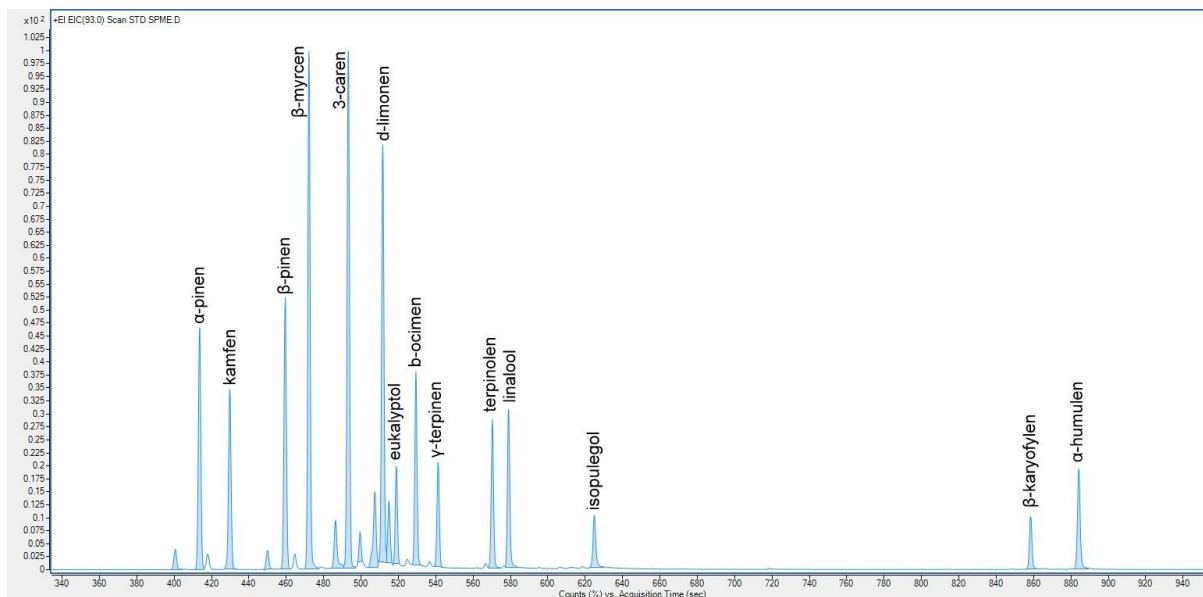
### 3.3 Interpretace

Přestože provedeme analýzu maximálně pečlivě, lze očekávat, že ve vzorku bude vysoké pozadí, tzn. píky těkavých látek, které se vyskytují v místě odběru ve vzduchu, případně vznikly termodegradací zachycených pevných částic, nebo došlo ke kontaminaci trubičky. Vzniklá chromatogram musíme proto extrahovat na iontu  $m/z$  93 (viz Obr. 5 a 6), který je typický pro všechny monoterpeny. Případně můžeme použít i  $m/z$  XZ, který je typický pro seskviterpeny. Při procesování je nutné zvolit správné nastavení jednotlivých parametrů, které nám mohou výrazně ovlivnit výsledky. Důležitým krokem je použití dekonvoluce. K tomuto účelu se dobře osvědčily zejména hmotnostní spektrometry a analyzátořem „Time of Flight“,

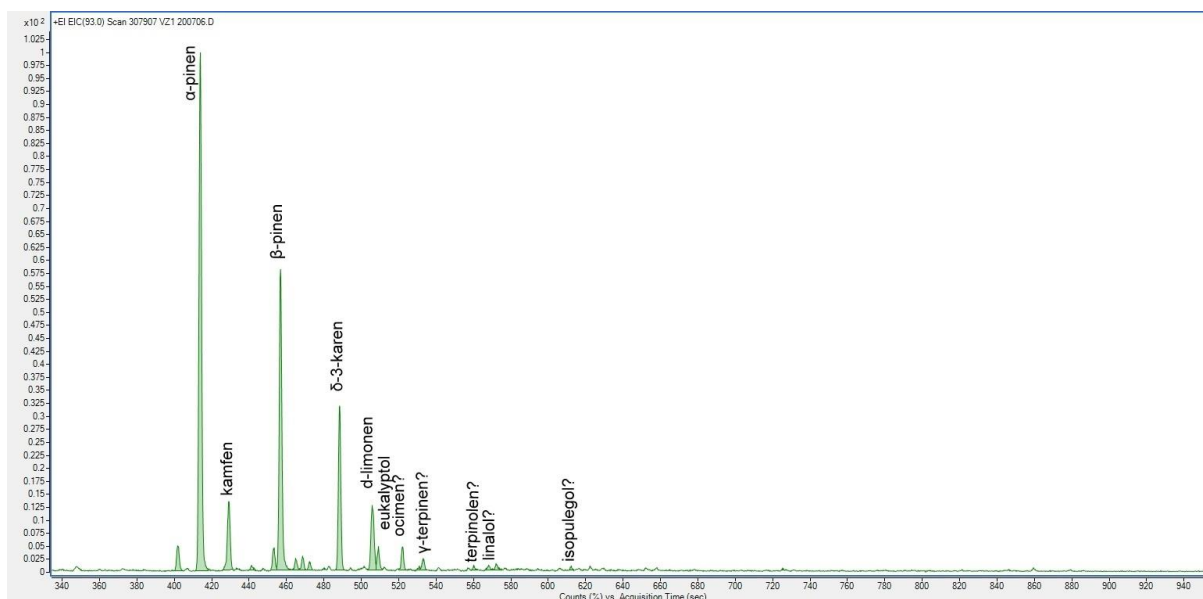
Nalezené terpeny identifikujeme pomocí hmotnostního spektra a NIST knihovny. Zároveň je důležité srovnávat retenční časy se standardy. U některých malých píků může dojít k špatnému vyhodnocení. Jedna se obvykle o méně těkavější terpeny. Přítomnost iontu  $m/z$  93 a shodného retenčního času nám může pomoci odhalit pravděpodobnou přítomnost dalších terpenů.

Množství identifikovaných terpenů je zásadní pro výsledné potvrzení či vyvrácení přítomnosti rostlin rodu *Cannabis*. Počet těchto terpenů nebyl z našich analýz zatím přesně

stanoven, přesto je patrné, že potvrdit minimálně 5 hlavních terpenů by nemělo činit problém a tento počet již s vysokou pravděpodobností potvrzuje přítomnost konopí.



Obr. 5: Chromatogram STD Restek, SPME.



Obr. 6: Chromatogram reálného vzorku.

## Závěr

Analýzou vzorku vzduchu pomocí termální desorpce a plynové chromatografie z hmotným detektorem lze identifikovat rostliny rodu *Cannabis* v okolí jejich výskytu. Při vzorkování a následní analýze je potřeba dodržet přesný metodický postup. Jako hlavní terpeny byly pro identifikaci zvoleny monoterpeny alpha-pinen, kamfen, (-)-beta-pinen, beta-myrcen, delta-3-careen, d-limonen, ocimen, terpinolen, linalool, eukalyptol a jeden seskviterpen beta-karyofylen. Úspěšnou identifikaci těchto terpenů v ovzduší lze s velkou pravděpodobností prokázat přítomnost rostlin rodu *Cannabis* nebo produkty zpracování těchto rostlin, v daném

místě, případně konopí bez nutnosti vstupu do objektu a na pozemky v soukromém vlastnictví.

Metodika byla vypracována za účelem doplnění, usnadnění a urychlení získávání operativních informací pro účely Policie České republiky v souvislosti s nedovolenou výrobou a nakládáním s omamnými a psychotropními látkami.

## Literatura

1. Kudláčková, B.: *Výroční zpráva NPC za rok 2019*. Národní protidrogová centrála SKPV PČR.
2. Hrazdíra, D.: *Konopný ráj to na pohled...?* Elektronický časopis KRIMI-info, Kriministický ústav Praha Policie ČR.
3. Roman, M., Komorousová, L.: *Profil kannabinoidů ve vzorcích konopí (Cannabis sp. L., Cannabaceae)*. Elektronický časopis KRIMI-info, Kriministický ústav Praha Policie ČR.
4. MARCHINI, M., CHARVOZ, C., DUJOURDY, L., BALDOVINI, N., FILIPPI, J. J.: *Multidimensional analysis of cannabis volatile constituents: Identification of 5,5-dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane as a volatile marker of hashish, the resin of Cannabis sativa L.* Journal of Chromatography A, 1370 (2014) 200–215.
5. Booth J. K., Bohlmann J., 2019. Terpenes in Cannabis sativa - From plant genome to humans. DataPlant Science. 284, 67-72 s. ISSN: 0168-9452, DOI: 10.1016/j.plantsci.2019.03.022.
6. Booth J. K., Page J. E., Bohlmann J., 2017. Terpene synthases from Cannabis sativa. PLOS ONE 12(3): e0173911. DOI: [10.1371/journal.pone.0173911](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173911).
7. Cometto-Muñiz, J. & Cain, William & Abraham, Michael & Kumarsingh, Rachel. (1998). Sensory Properties of Selected Terpenes: Thresholds for Odor, Nasal Pungency, Nasal Localization, and Eye Irritation. Annals of the New York Academy of Sciences. 855. 648-51. 10.1111/j.1749-6632.1998.tb10640.x.
8. Gminski, Richard & Marutzky, Rainer & Kevekordes, Sebastian & Fuhrmann, Frank & Bürger, Werner & Hauschke, Dieter & Ebner, Winfried & Mersch-Sundermann, Volker. (2011). Sensory irritations and pulmonary effects in human volunteers following short-term exposure to pinewood emissions. Journal of Wood Science - J WOOD SCI. 57. 10.1007/s10086-011-1182-1.
9. Gómez, P.: Terpene Content in Cannabis – The Variability Problem, Prof of Pot, 2017
10. Fundación Canná, Terpenes, Zdroj: <https://www.fundacion-canna.es/en/terpenes>
11. Green Cultur ED: 15 Cannabis Terpenes Explained (Complete Visual Guide), <https://www.greencultured.co/15-cannabis-terpenes-explained-complete-visual-guide/>
12. Sage J. B. Dunham, Victoria L. Noad, Bailey S. Arakelian & Daniel B. Cardin, Cannabinoid & Terpene Profiling of Cannabis by Solvent-Free Headspace Extraction and Thermal Desorption-GC-MS, Entech Instruments,
13. Ronald Honnold, Robert Kubas, Anthony Macherone, Analysis of Terpenes in Cannabis Using the Agilent 7697A/7890B/5977B Headspace GC-MSD System, Application Note, Agilent Technologies, Inc., 2017.
14. Michael Halpenny, Katherine K. Stenerson, Quantitative Determination of Terpenes in Cannabis Using Headspace Solid Phase Microextraction and GC/MS, GERSTEL Application Note No. 189, 2017
15. Katherine K. Stenerson, Headspace SPME-GC/MS Analysis of Terpenes in Hops and Cannabis, FOOD & BEVERAGE
16. Jessica Westland, SPME Arrow Sampling of Terpenes in Cannabis Plant Material, Application Note, Sample Preparation, Agilent Technologies Inc., 2019



17. MARKES INTERNATIONAL: Thermal Desorption: A Practical Applications Guide, III. Defence and Forensic. URL: <http://www.markes.com/>
18. Restek, Pure Chromatography, Analytical standard, Cannabis Terpenes Standard #1, Cannabis Terpenes Standard #2, Zdroj: <https://www.restek.com/catalog/view/45361>, <https://www.restek.com/catalog/view/45362>