

# Određivanje kanabinoida u ekstraktima cvijeta industrijske konoplje dobivenih primjenom supkritične vode uz sušenje raspršivanjem

---

**Barišić, Ana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:120345>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**

REPOZITORIJ

**PTFS**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**dabar**  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Ana Barišić**

**ODREĐIVANJE KANABINOIDA U EKSTRAKTIMA CVIJETA  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE DOBIVENIH  
PRIMJENOM SUPKRITIČNE VODE UZ SUŠENJE RASPRŠIVANJEM**

**DIPLOMSKI RAD**

**Osijek, rujan, 2022.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje  
**Tema rada** je prihvaćena na IV. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj elektroničkim putem 23. - 25. ožujka 2022.  
**Mentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić*  
**Komentor:** doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*  
**Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Marija Banožić*

### Određivanje kanabinoida u ekstraktima cvijeta industrijske konoplje dobivenih primjenom supkritične vode uz sušenje raspršivanjem

Ana Barišić, 0113144433

#### Sažetak:

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je biljka koja je u posljednje vrijeme stekla veliku popularnost zbog svojih bioaktivnih spojeva (kanabinoida) kojima se pripisuju raznorazni blagotvorni učinci na zdravlje. Kanabinoidi djelovanjem topline, svjetlosti ili dužim skladištenjem prelaze iz jednog oblika u drugi pa je tako cilj ovog rada bio istražiti utjecaj različitih temperatura u rasponu od 100 °C do 275 °C. Tijekom ekstrakcije supkritičnom vodom na udio pojedinih kanabinoida u dobivenim ekstraktima iz cvjetova konoplje. Utvrđeno je da je najpogodnija temperatura ekstrakcije 125 °C. Ispitana je i mogućnost prevođenja tekućeg ekstrakta u prah primjenom sušenja raspršivanjem, gdje je iskorištenje sušenja iznosilo 98,72 %. Identifikacija i kvantifikacija kanabinoida u ekstraktima konoplje provedena je primjenom visokotlačne tekućinske kromatografije (HPLC), putem koje se utvrdilo da je najdominantniji kanabinoid u ekstraktima kanabidiol (CBD), čija je najviša koncentracija zabilježena na 150 °C i iznosila je 10,86 µg/mg. Ukupni fenoli i antiradikalna aktivnost kod tekućih ekstrakata i kod dobivenog suhog ekstrakta određeni su spektrofotometrijskim metodama. Suhom ekstraktu su određena fizikalno-kemijska svojstva kako bi se utvrdila mogućnost primjene praha ekstrakta konoplje u razvoju novih proizvoda.

**Ključne riječi:** industrijska konoplja, ekstrakcija supkritičnom vodom, sušenje raspršivanjem, kanabinoidi

**Rad sadrži:** 42 stranica  
17 slika  
5 tablica  
37 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i>      | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>      | član-mentor   |
| 3. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>  | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Maja Molnar</i> | zamjena člana |

**Datum obrane:** 20. rujna 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of process engineering**  
**Subdepartment of process design and pharmaceutical engineering**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Technological design

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IV 2021./2022. held on 23-25, March, 2022.

**Mentor:** *Stela Jokić*, PhD, full prof.

**Co-mentor:** *Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:** *Marija Banožić*, PhD

### **Determination of Cannabinoids in Extracts of Industrial Hemp Flower Obtained by Subcritical Water Followed by Spray Drying**

*Ana Barišić, 0113144433*

#### Summary:

Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) is a plant that has recently gained great popularity due to its bioactive compounds (Cannabinoids) attributed to various beneficial effects on health. Cannabinoids convert from one form to another due to exposure to heat, light or prolonged storage. Therefore, the aim of this work was to investigate the influence of different extraction temperatures in the range from 100 °C to 275 °C on the content of individual cannabinoids in extracts of dried hemp flowers. It turned out that the most suitable temperature for the extraction was 125 °C. The possibility of direct transforming the liquid extract into a powder form using spray drying was also investigated, where the drying efficiency was 98.72%. The identification and quantification of cannabinoids in hemp extracts was carried out using high-pressure liquid chromatography (HPLC), through which it was determined that the most dominant cannabinoid in the extracts was cannabidiol (CBD), the highest concentration of which was recorded at 150 °C and was 10.86 µg/mg. Total phenols and antiradical activity in the liquid extracts and in the obtained dry extract were determined by spectrophotometric methods. The physicochemical properties of the dry extract were determined in order to test the possibility of using hemp extract powder in novel food products.

**Key words:** Industrial Hemp, Subcritical Water Extraction (SWE), Spray Drying, Cannabinoids

**Thesis contains:** 42 pages  
17 figures  
5 tables  
37 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Darko Velić</i> , Full prof.               | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , Full prof.               | supervisor   |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD assistant prof. | member       |
| 4. <i>Maja Molnar</i> , PhD associate prof.      | stand-in     |

**Defense date:** September, 20th, 2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.



*Najiskrenije se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na ukazanom povjerenju te susretljivosti, vodstvu i podršci, bez čijih neiscrpnih ideja i stručnih savjeta izrada ovog rada ne bi bila moguća.*

*Hvala i komentoru doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću na svim savjetima i pomoći tijekom izrade rada,*

*Zahvaljujem se i dragoj dr. sc. Mariji Banožić na svojoj pruženoj pomoći, savjetima i potpori te ugodnoj atmosferi tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama koji su mi sa svim razgovorima, kavama i druženjima olakšali i uljepšali moje razdoblje studiranja.*

*Najveće hvala mojoj obitelji na neizmjerne ljubavi, potpori, razumijevanju, strpljenju i vječnoj vjeri u mene.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	4
2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA ( <i>Cannabis sativa</i> L.) .....	5
2.2. AKTIVNI SASTOJCI CVIJETA INDUSTRIJSKE KONOPLJE.....	7
2.2.1. BIOSINTEZA FITOKANABINOIDA .....	7
2.2.2. TETRAHIDROKANABINOL (THC) .....	8
2.2.3. KANABIDIOL (CBD).....	10
2.2.4. KANABINOL (CBN).....	11
2.2.5. KANABIGEROL (CBG).....	12
2.2.6. KANABIKROMEN (CBC) .....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. Zadatak.....	16
3.2. Materijali.....	17
3.3. Metode.....	18
3.3.1. Priprema uzorka.....	18
3.3.2. Ekstrakcija supkritičnom vodom (SWE) .....	18
3.3.4. Određivanje ukupnih fenola.....	21
3.3.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti .....	22
3.3.6. Određivanje sadržaja bioaktivnih spojeva primjenom HPLC .....	23
3.3.7. Sušenje raspršivanjem .....	24
3.3.8. Određivanje fizikalno kemijskih karakteristika dobivenog praha .....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	28
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA .....	39

## Popis oznaka, kratica i simbola

CBC	Kanabikromen ( <i>engl.</i> Cannabichromene)
CBCA	Kanabikromenska kiselina ( <i>engl.</i> Cannabichromenic Acid)
CBD	Kanabidiol ( <i>engl.</i> Cannabidiol )
CBDA	Kanabidiolna kiselina ( <i>engl.</i> Cannabidiolic acid )
CBDVA	Kanabidivarinska kiselina ( <i>engl.</i> Cannabidivarinic Acid)
CBG	Kanabigerol ( <i>engl.</i> Cannabigerol)
CBGA	Kanabigerolna kiselina ( <i>engl.</i> Cannabigerolic acid)
CBN	Kanabinol ( <i>engl.</i> Cannabinol)
CO <sub>2</sub>	Ugljikov dioksid ( <i>engl.</i> Carbon dioxide)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil ( <i>engl.</i> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ( <i>engl.</i> High Performance Liquid Chromatography)
SWE	Ekstrakcija vodom u supkritičnom stanju ( <i>engl.</i> Subcritical Water Extraction)
THCA	Tetrahidrokanabinolna kiselina ( <i>engl.</i> Tetrahydrocannabinolic acid)
THCVA	Tetrahidroksikanabivarinska kiselina ( <i>engl.</i> Tetrahydrocannabivarin acid)
Δ9-THC	Δ9-Tetrahidrokanabinol ( <i>engl.</i> Δ9-Tetrahydrocannabinol)
v/v	Volumni udio ( <i>engl.</i> Volume per volume)
TRPV1	Privremeni receptijski potencijalni kationski kanal podfamilije V član 1 ( <i>engl.</i> Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1)
TRPV2	Privremeni receptijski potencijalni kationski kanal podfamilije V član 2 ( <i>engl.</i> Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 2)
TRPV4	Privremeni receptijski potencijalni kationski kanal podfamilije V član 4 ( <i>engl.</i> Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4)



- TRPV8 Privremeni receptijski potencijalni kationski kanal podfamilije V član 8 (*engl. Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 8*)
- TRPA1 Privremeni receptijski potencijalni kationski kanal podfamilije A član 1 (*engl. Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1*)
- TRPA3 Privremeni receptijski potencijalni kationski kanal podfamilije A član 3 (*engl. Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 3*)
- GPR55 G-protein-receptor 55 (*engl. G-protein-coupled receptor 55*)

## 1. UVOD

*Cannabis sativa* L. je zeljasta jednogodišnja biljka koja pripada porodici Cannabaceae. Smatra se jednom od najstarijih kultiviranih biljaka diljem svijeta iz razloga što joj pogoduju različiti klimatski uvjeti. Ima dugu povijest korištenja u medicinske svrhe pretežito na području Bliskog Istoka i Azije, te se tijekom kolonizacijskog perioda početkom 19. st. raširila u ostale dijelove svijeta pa tako i u Europu gdje se primjenjivala kod ublažavanja boli, grčeva, nesanice i dr. (Vladimir-Knežević i sur., 2017).

U konoplji je izolirano više od 525 kemijskih spojeva od kojih mnoge nastaju kao produkt sekundarnog metabolizma, a one se mogu podijeliti u dvije skupine spojeva: kanabinoidne (fitokanabinoidi) i nekanabinoidne spojeve (poput fenolnih spojeva, fitosterola, amina, masnih kiselina i njihovih estera i dr.) (Gazdek, 2014). Kanabinoidi pripadaju skupini cikličkih terpenkih spojeva s 21 ugljikovim atomom u svojoj strukturi. Prema mjestu nastanka mogu se razvrstati u 3 skupine: endokanabinoidi, fitokanabinoidi i sintetski kanabinoidi (Pertwee i Cascio, 2014). Nalaze se u biljnom tkivu gdje nastaju procesom biosinteze kao kiseli oblici koji se, pod utjecajem svjetlosti, topline i čuvanjem, razgrađuju u svoje neutralne oblike (Čolak, 2016).

Najpoznatiji kanabinoid je  $\Delta^9$ -Tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC) koji ujedno predstavlja i primarnu psihoaktivnu komponentu ove biljke. Ostali često spominjani pripadnici ove skupine spojeva su kanabidiol (CBD) i kanabinol (CBN) (Gazdek, 2014).

Zbog povećanja ljudske populacije, a samim tim i industrijske proizvodnje, sve veći je interes za pronalaskom alternativnih, zelenih tehnika kojima je krajnji cilj smanjenje upotrebe supstanci štetnih za okoliš i zdravlje ljudi, a da uz to povećavaju iskorištenje samog procesa. U zelene ekstrakcijske tehnike ubrajaju se ekstrakcije potpomognute mikrovalovima i/ili ultrazvukom, primjenom alternativnih otapala poput superkričnih fluida ( $\text{CO}_2$  i voda), ionskih kapljevina i eutekčnih otapala. Industrije poput prehrambene, farmaceutske i kemijske sve više se okreću prema alternativnim tehnikama koje zadovoljavaju ekološke i ekonomske zahtjeve. SWE (*engl.* Subcritical Water Extraction) pripada skupini zelenih ekstrakcijskih tehnika u čijem procesu ulogu otapala ima supkrična voda, koja osim što je neotrovnost i jeftina također predstavlja zadovoljavajuću zamjenu za organska otapala kod ekstrakcijskih postupaka (Jokić i sur., 2018). Ekstrakcija predstavlja važan korak u izolaciji i identifikaciji bioaktivnih spojeva iz industrijske konoplje, pa tako je cilj ovog rada bio ispitivanje utjecaja

različnih temperatura na učinkovitost SWE u smislu sastava kanabinoida u dobivenim ekstraktima.

## 2. TEORIJSKI DIO

## 2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA (*Cannabis sativa* L.)

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je zeljasta jednogodišnja dvodomna kritosjemenjača koja pripada porodici Cannabaceae i rodu *Cannabis* (Domac, 2002). Taksonomska klasifikacija *Cannabis sativa* L. prikazana je u **Tablici 1**. Pretpostavlja se da je konoplja u Europu stigla iz Centralne Azije tijekom kolonizacijskog perioda. Ova biljka pronašla je svoju primjenu u različitim granama industrije, te postaje sve zanimljivija zbog sve većeg broja istraživanja koja ukazuju da zbog svojeg kemijskog sastava ima potencijal korištenja u ljekovite svrhe. Stabljika konoplje je uspravna, te u početku nježna i zeljasta, a kasnije odrveni. Listovi konoplje su dlanasti s ušiljenim vrhom i pilastim rubom. List je sastavljen je od peteljke koja ima dva srasla paralistića pri dnu i prstasto razdijeljenih liski. Broj listića je neparan i kreće se između 3 i 13. Visina (0,2-6 m) i stupanj razgranatosti ovise o klimatskim uvjetima u kojima je uzgajana i genetskim čimbenicima (Vladimir-Knežević i sur., 2017). Muške biljke ranije cvjetaju od ženskih, njihov cvat je rahla metlica s pet visećih prašnika i cvjetovima žuto-zelene boje. U usporedbi s muškim, ženske biljke su niže i robusnije te imaju cvjetove s tučkom zelene, ponekad ljubičasto do crvene boje bez stapke.

**Tablica 1.** Klasifikacija *Cannabis sativa* L. prema integriranom taksonomskom informacijskom sustavu (ITIS, 2018)

<b>CARSTVO</b>	Plantae
<b>ODJELJAK</b>	Tracheophyta
<b>RAZRED</b>	Magnoliopsida
<b>PODRAZRED</b>	Rosanae
<b>RED</b>	Rosales
<b>PORODICA</b>	Cannabaceae
<b>ROD</b>	<i>Cannabis</i> L.
<b>VRSTA</b>	<i>Cannabis sativa</i> L.

Zbog sličnih morfoloških obilježja često se može zamijeniti s indijskom konopljom (*C. sativa* L. subsp. *indica*), međutim znatno se razlikuju po udjelu  $\Delta^9$ -THC, psihoaktivne komponente kod ženskih biljaka. Naime, industrijska konoplja u prosjeku sadrži između 0,1 % i 0,3 %  $\Delta^9$ -THC dok indijska može sadržavati i do 10 puta veće koncentracije ove komponente. Prema omjeru dva glavna predstavnika kanabinoida u biljci, THC i CBD, pridružuju se određenom kemijskom

fenotipu (kemotipu). Prema udjelu ovih komponenata u osušenim cvatućim vršnim dijelovima razlikuju se 3 kemotipa:

1.  $\text{THC} > 0,3 \%$ ;  $\text{CBD} < 0,5 \%$  - THC kemotip
2.  $\text{THC} \geq 0,3 \%$ ;  $\text{CBD} > 0,5 \%$  - THC/CBD kemotip
3.  $\text{THC} < 0,3 \%$ ;  $\text{CBD} > 0,5 \%$  - CBD kemotip (Holy, 2018).

Određeni kemotipi se koriste u uređene svrhe, prema tome konoplje koje se koriste u medicinske i rekreativne svrhe imaju omjer  $\text{THC}/\text{CBD} > 1$ , dok pod "industrijski kemotip" pripadaju biljke čiji je omjer  $\text{THC}/\text{CBD} < 1$  (Jovanović, 2020). U Europskoj Uniji (EU), tako i u Republici Hrvatskoj (RH) se smiju uzgajati sorte koje sadrže 0,2 % i manje THC-a u suhoj tvari biljke (HAH, 2015). Nadalje, u RH vrijede sva pravila, legislativa i regulacija kao i za EU, prema tome hrana i dodaci prehrani koji sadrže CBD i druge kanabinoide pripadaju u skupinu pod nazivom tzv. nova hrana (*engl.* Novel Food) i njihovo puštanje na tržište mora biti u skladu s Direktivom 2015/2283, dok za kozmetičke proizvode koji sadrže ekstrakt konoplje vrijedi Direktiva 1223/2009.

Industrijska konoplja ima vrlo široku primjenu, te se navodno od cijele biljke može proizvesti više od 25000 različitih proizvoda (Small i Marcus, 2002). Vlakna iz stabljike konoplje imaju veliku čvrstoću te su upravo zbog tog svojstva svoju primjenu pronašla u građevinskoj i tekstilnoj industriji. Osim toga, drvenasti dio biljke koristi se kao sirovina u proizvodnji papira. Zbog visoke nutritivne vrijednosti i sadržaja bioaktivnih komponenti te brojnih blagotvornih svojstava svoju primjenu je pronašla u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Konopljne sjemenke sadrže velike količine esencijalnih aminokiselina i masnih kiselina kao i minerala poput kalija, kalcija, magnezija i željeza. Također su bogate vitaminima B kompleksa i E vitaminom. U proizvode za ljudsku prehranu pripadaju čajevi, proteini, ulje i brašno od konoplje. Mogu se mogu konzumirati u vidu dodataka prehrani te se na tržištu mogu naći proizvodi obogaćeni nekom od ovih komponenata. Dolaze u obliku ulja (pojedinačnih kanabinoida ili kao ulja širokog spektra gdje su prisutni svi kanabinoidi iz biljke), balzama, sprejeva, kapsula i gumenih bombone te najčešće se reklamiraju uz tvrdnje da potiču san, ublažavaju bol i smanjuju stres (VanDolah i sur., 2019).

Prema istraživanjima postoje dosta čvrsti dokazi koji ukazuju na terapijska svojstva kanabisa kod ublažavanja nuspojava nakon primjene kemoterapija, liječenja kaheksije i anoreksije kod

ljudi oboljelih od AIDS-a (*engl.* Acquired Immunodeficiency Syndrome) te smanjenja grčenja mišića koji se pojavljuju kod ljudi oboljelih od multiple skleroze (Vladimir-Knežević i sur., 2017).

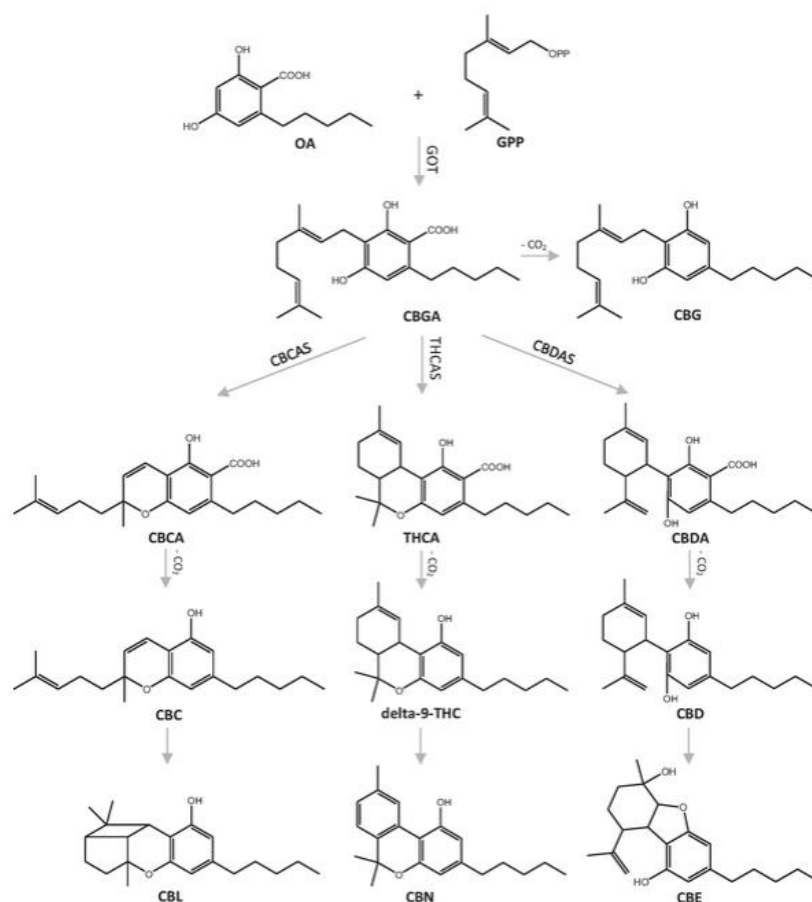
## 2.2. AKTIVNI SASTOJCI CVIJETA INDUSTRIJSKE KONOPLJE

### 2.2.1. BIOSINTEZA FITOKANABINOIDA

Fitokanabinoidi pripadaju skupini terpenofenolnih komponenata nastalih sekundarnim metabolizmom u konoplji. Ovi spojevi mogu biti prisutni i u biljkama rodova *Radula* i *Helichrysum*. Osim fitokanabinoida, pod sekundarne metabolite konoplje spadaju terpeni i fenolni spojevi. Kanabinoidi nastaju biosintezom u obliku preniliranih aromatskih karboksilnih kiselina. Najkoncentriraniji su u smolastom sekretu (u obliku svojih kiselih prekursora) koji stvaraju glandularni trihomi na površini cvatova, najčešće ženskih biljki. U svoje neutralne oblike mogu preći spontanom dekarboksilacijom pod utjecajem svjetla, topline i dužim skladištenjem (**Slika 1**). U obliku kiselina, kanabinoidi se ne smatraju farmakološki aktivnima iz razloga što nemaju utjecaja na endokanabinoidni sustav kao što imaju u svome neutralnom obliku (Vladimir-Knežević i sur., 2017; Andre i sur., 2016; Marioti i sur., 2015).

Prekursori kanabinoida potječu iz 2 biosintetska puta: poliketidnim lancem (*engl.* poliketyde pathway) i metileritrol fosfatnim putem (*engl.* methylerythritol phosphate pathway, MEP). Kondenzacijom olivetolne kiseline (poliketid) i geranil difosfat (terpen) nastaje kanabigerolna kiselina (CBGA), koja je glavni intermedijer za nastajanje tetrahidrokanabinolne kiseline ( $\Delta^9$ -THCA), kanabidiolne kiseline (CBDA) i kanabikromenske kiseline (CBCA). Ove fitokanabinoidne kiseline neenzimatskom dekarboksilacijom prelaze u svoje neutralne oblike:  $\Delta^9$ -THC, CBC i CBD. Tetrahidroksikanabivarinska kiselina (CBDVA) je propilni kanabinoid sintetiziran iz divarinolne kiseline vjerojatno vrlo sličnim načinom kao i prethodne komponente. U ovisnosti o ekološkim čimbenicima, spolu i starosti ovisi i udio pojedinih fitokanabinoida u biljci. Trenutno je oko 100 fitokanabinoida identificirano s razjašnjenim strukturama (Vladimir-Knežević i sur., 2017; Andre i sur., 2016).



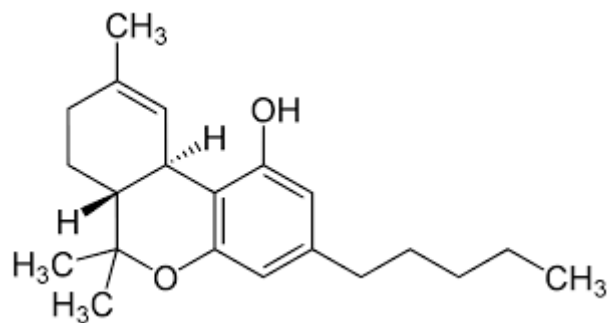


**Slika 1.** Biosinteza i degradacija fitokanabinoida . **OA** - olivetolna kiselina; **GPP** - geranil pirofosfat; **GOT** -geranilpirofosfat:olivetolat geraniltransferaza; **CBGA** - kanabigerolna kiselina; **CBG** - kanabigerol; **CBCAS** - sintaza kanabikromenske kiseline; **THCAS** - sintaza tetrahidrokanabinolne kiseline; **CBDAS** - sintaza kanabidiolne kiseline; **CBCA** - kanabikromenska kiselina; **THCA** - tetrahidrokanabinolna kiselina; **CBDA** - kanabidiolna kiselina; **CBC** - kanabikromen; **delta-9-THC** – Δ9-tetrahidrokanabinol; **CBD** - kanabidiol; **CBL**- kanabicyklol; **CBN**- kanabinol; **CBE**- kanabielsoin (Vladimir-Knežević i sur, 2017)

### 2.2.2. TETRAHIDROKANABINOL (THC)

THC je alkaloidni kanabinoid slabo topljiv u vodi koji se nalazi u obliku viskozne smole koja nema mogućnost kristalizacije. Predstavlja glavnu psihoaktivnu komponentu konoplje koja utječe na psihomotorne i kognitivne funkcije kod ljudi. Struktura (**Slika 2**) i stereokemija Δ9-THC otkrivena je 1964. godine nakon čega dolazi do povećanog interesa za proučavanjem kemijskih i farmakoloških svojstava ovog spoja. Nastaje iz prekursora THCA prilikom rasta i razvoja biljke i pod utjecajem topline i svjetlosti. Istraživanja su pokazala da je ovaj spoj odgovoran za motoričke poremećaje, katelepsije (psihomotorna napetost i uzbuđenost),

gubitak refleksa, euforije i neraspoloženja, tjeskobe, uspavanosti, napadaja panike i oslabljene memorije prilikom konzumacije (Tomašić Paić, 2012)



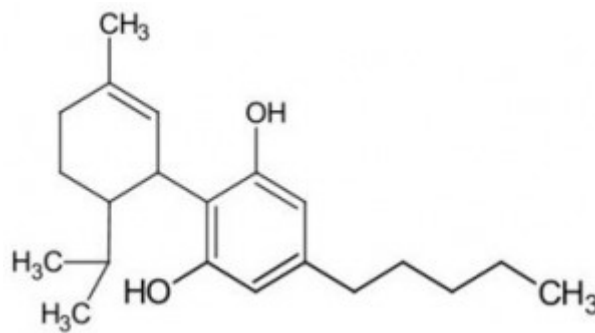
**Slika 2.** Kemijska struktura  $\Delta^9$ -Tetrahidrokanabinol (preuzeto s <https://sielc.com/delta-9-tetrahydrocannabinol-thc.html> [23.7.2022.])

Mehanizam djelovanja  $\Delta^9$ -THC u organizmu postaje poznat gotovo dva desetljeća nakon njegova otkrića. Istraživanjima se pokazalo kako dolazi do interakcije kanabinoida s endokanabinoidnim sustavom u čovjekom preko dva receptora: CB1 i CB2, postoje dokazi i o postojanju drugih receptora međutim njihova karakterizacija još nije dovršena. Neka istraživanja upućuju na to da endokanabinoidi imaju regulacijsku ulogu ili bi mogli modulirati razne fiziološke procese poput apetita, pamćenja, raspoloženja, osjetljivosti na bol, inzulinske osjetljivosti te metabolizma masti i energije. Centralni, CB1 se pojavljuje unutar i izvan centralnog živčanog sustava, a otkriven je 1990. godine. Spominje se njegov potencijalni terapijski učinak kod ovisnosti o alkoholu, pretilosti i Parkinsonove bolesti. Iako su ovi receptori najzastupljeniji u mozgu, rasprostranjeni su i u ostalim tkivima poput gastrointestinalnog, mokraćnog, reproduktivnog, srčanog, plućnog te u imunološkim stanicama gdje svojim prisustvom potencijalno omogućuju djelovanje kanabinoida. CB2 receptor otkriven je isključivo u perifernom živčanom sustavu. Njegova ekspresija je ograničena na tkiva imunološkog sustava (slezina i krajnici) i hematopoetske matične stanice. Smatra se da CB2 receptori imaju imunomodulatorni efekt te samim tim potencijalnu terapijsku primjenu kod supresije tumora i upala (Tomašić Paić, 2012; Čolak, 2016; Horvatić, 2019). Kod raznih tkiva zahvaćenih tumorom, pronađene su veće razine ekspresije CB1 i CB2 receptora kao i endokanabinoida što predstavlja potencijalnu primjenu ovih spojeva u liječenju raka (Vladimir-Knežević i sur.,2017). THC je agonist za oba receptora, ali ima veći afinitet za centralni receptor za koji se pretpostavlja je posrednik kod psihoaktivnog učinka

ovog spoja. Osim na CB1 i CB2 receptore, svojim djelovanjem i na druge molekularne strukture pokazuje antikancerogeno, analgetsko i protuupalno djelovanje (Čolak, 2016).

### 2.2.3. KANABIDIOL (CBD)

Kanabidiol je komponenta konoplje koja ima veliki spektar farmakoloških svojstava. Važna je prateća komponenta THC-a iz razloga što povećava sigurnost primjene ekstrakta biljke jer ima mogućnost smanjivanja njegovih negativnih učinaka. Prekursori njegova nastajanja su CBGA iz kojeg nastaje CBDA koji zatim dekarboksilacijom prelazi u CBD (**Slika 3**).



**Slika 3.** Kemijska struktura kanabidiola (preuzeto s <https://sielc.com/Compound-Cannabidiol.html> [23.7.2022.] )

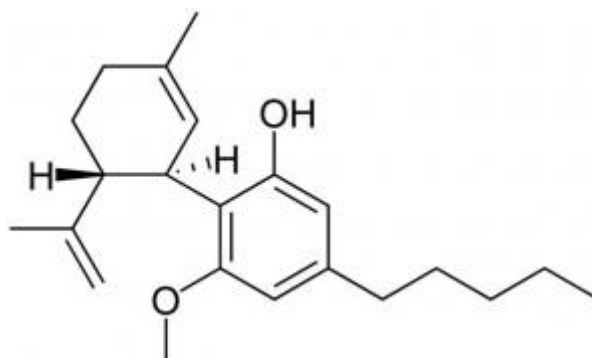
Istraživanja su pokazala da se primjenom CBD-a može umanjiti bol, stres te anksioznost kod ljudi. Nadalje mogu pomoći kod ublažavanja posljedica kemoterapija poput mučnina i povraćanja, te povećanja težine kod osoba inficiranih HIV-om, međutim ove tvrdnje nisu u potpunosti dokazane (VanDolah i sur.,2019; Chang i Zhongli, 2021). Ovaj kanabinoid je pokazao potencijal korištenja u pretkliničkim studijama koje su proučavale bolesti središnjeg živčanog sustava poput neurodegenerativnih bolesti, epilepsije, šizofrenije i dr. (Čolak, 2016). Endokanabioidni sustav ima važnu regulatornu ulogu u koži, prema tome postoji mogućnost topikalne primjene CBD-a kod osoba koji imaju problema s kožom kao što su akne, dermatitis i psorijaza. Primjenjuje se u raznim kozmetičkim proizvodima jer djeluje na sprječavanje znakova starenja, te ima sposobnost zaštite i borbe protiv slobodnih radikala. Međutim, jako malo istraživanja je provedeno s topikalnim pripravcima CBD-a te se još uvijek ne zna koliko su učinkoviti u prethodno navedene svrhe (Baswan i sur., 2020). CBD je komponenta koja posjeduje antimikrobna svojstva i ima snažno djelovanje na meticilinrezistentni

*Staphylococcus aureus* (engl. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), ovo svojstvo također posjeduju i CBG, CBN, CBC i  $\Delta^9$ -THC. Istraživanjima se utvrdilo njegovo baktericidno djelovanje na Gram-pozitivne stafilokoke i streptokoke primjenom ekstrakta koncentracije u rasponu od 1 do 5  $\mu\text{g/ml}$ , također se pokazalo da nemaju djelovanje na Gram-negativne bakterije (Gülck i Møller, 2020).

Zbog svojih fizikalnih i kemijskih svojstava i povoljnog utjecaja na zdravlje, sve veći je interes implementiranja CBD-a u prehrambenoj industriji kao funkcionalnog sastojka namirnice. Kava, čaj i čokolada su neki od proizvoda koji postoje na tržištu u koje je dodan CBD u njihov sastav kao funkcionalna komponenta (Chang i Zhongli, 2021).

#### 2.2.4. KANABINOL (CBN)

Kanabinol (**Slika 4**) je prvi izolirani i identificirani kanabinoid iz *Cannabis sativa* L. Nastaje neenzimatskom oksidacijom iz THC-a kod dužeg skladištenja, sušenja i pri višim temperaturama. Iz tog razloga je prisutan u većim koncentracijama u osušenim i starijim cvjetovima konoplje. Pri većim količinama, odnosno unesen intravenozno, može imati psihoaktivno djelovanje (Liu i Mander, 2010). Djeluje jače na stanice imunološkog sustava nego na središnji živčani sustav zato što ima gotovo tri puta veći afinitet prema CB2 receptorima i dva puta manji prema CB1 receptorima u usporedbi s THC-om (Čolak, 2016).



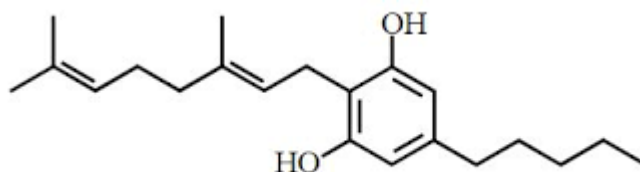
**Slika 4.** Kemijska struktura kanabinola (preuzeto s <https://sielc.com/Compound-Cannabinol.html>

[23.7.2022.]

Istraživanja provedena na ljudima i životinjama indiciraju na njegova sedativna i antikolzulzantna svojstva kao i na protuupalno te anti-MRSA djelovanje pri minimalnoj inhibitornoj koncentraciji (MIC, *engl.* Minimum Inhibitory Concentration) od 11 µg/mL. CBN ima potencijal topikalne primjene kod psorijaze jer inhibira proliferaciju keratinocita (Russo i Marcu, 2017).

### 2.2.5. KANABIGEROL (CBG)

Kanabigerol (**Slika 5**) je spoj čije je obilježje strukture je linearni izoprenilni ostatak, to obilježje je razjašnjeno 1964. godine. Nastaje uklanjanjem karboksilne skupine kanabigerolnoj kiselini. Nalazi se u puno manjem udjelu u odnosu na CBD s kojim se i najčešće uspoređuju jer također imaju interakcije s jednakim receptorima u organizmu i nemaju psihoaktivno djelovanje.



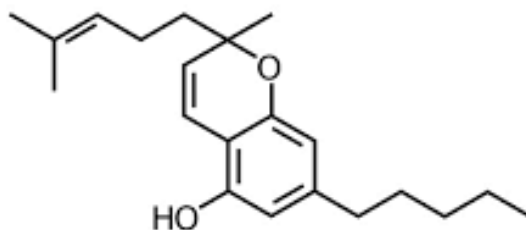
**Slika 5.** Kemijska struktura kanabigerola (preuzeto s <https://sielc.com/cannabigerol-cbg.html> [23.7.2022.])

Dosadašnja istraživanja pokazuju njegova protuupalna svojstva protiv različitih okolišnih stresora i antimikrobna svojstva na mikroorganizme poput *Cutibacterium acnes* i *Staphylococcus aureus* koji su odgovorni za nastajanje akni i atopijskog dermatitisa. Ovim svojstvom imaju potencijalnu primjenu u kozmetičkoj industriji, međutim zbog zahtjevne i skupe izolacije nije toliko istraživanja provedeno na njihov utjecaj na kožu u usporedbi s CBD-om. Osim toga, mehanizam njegova djelovanja u organizmu rezultira sedacijom, opuštanjem mišića i analgezijom. Postoji mogućnost korištenja CBG-a kod ljudi oboljelih od crijevnih bolesti jer su eksperimenti na miševima ukazali na njegovo djelovanje na kolitis (Hanuš i sur., 2016, Schuetz i sur, 2021). Osim toga, u *in vitro* istraživanjima pokazala se sposobnost CBG-a na umanjeње proliferacije kod tumorskih stanica. Nadalje, u visokim dozama je citotoksičan na karcinome kod miševa i pokazao se vrlo efektivan protiv karcinoma dojke. Istraživanja

provedenih na glodavcima ukazuju na njegovo djelovanje kao antidepresiv. Iz razloga što je većina studija vezanih za CBG-ov utjecaj na zdravlje provedena na životinjama, ove tvrdnje predstavljaju potencijal primjene ovog fitokanabinoida te je potrebno provesti istraživanja na ljudima kako bi se dokazale (Zagožen i sur., 2020).

### 2.2.6. KANABIKROMEN (CBC)

Kanabikromen (**Slika 6**) je prvi put izoliran iz *Cannabis sativa* L. 1966. godine te zauzima treće mjesto po učestalosti fitokanabinoida. Nastaje slično kao i CBD, odnosno iz CBGA nastaje CBCA koji pod utjecajem svjetla ili topline prelazi u CBC. Zajedno sa  $\Delta$ 9-THC-om, CBD-om i CBG-om čini "veliku četvorku" spojeva koje sadržava konoplja. Osim u konoplji prisutnost CBC-a zabilježena je i u *Rhododendron anthopogonoides* (Pollastro i sur., 2018; Zagožen i sur., 2020).



**Slika 6.** Kemijska struktura kanabikromena (preuzeto s <https://sielc.com/cannabichromene-cbc.html> [26.7.2022.])

CBC se ne veže dobro s CB1 receptorima u mozgu, odnosno nema psihoaktivno djelovanje. Međutim, dolazi u interakciju s CB2 receptorima i stimulira ih tako što inhibira inaktivaciju endokanabinoida. Ujedno reagira s receptorima u tijelu koji su povezani s percepcijom boli i onima povezanih kod upalnih procesa. Ovaj fitokanabinoid pokazao je da smanjuje hiperpermeabilnost crijeva te da posjeduje analgetska, sedativna i protuupalna (u kombinaciji s THC-om ima jače djelovanje) svojstva. U znanstvenim radovima navode se i njegova antifungalna i antimikrobna svojstva te samim time djeluje povoljno na akne. Nadalje, u preglednom radu, Izzo i sur. (2009) navode proapoptotički i antiproliferalno djelovanje na tumorske stanice kod ljudi, pretežito kod raka dojke, prostate i želuca (Pollastro i sur., 2018; Zagožen i sur., 2020).

U **Tablici 2** prikazan je utjecaj pojedinog kanabinoida u organizmu preko receptora za koje imaju afinitet vezanja.

**Tablica 2.** Vezanje kanabinoida s receptorima i njihov učinak na organizam (VanDolah i sur.,2019; Zagožen i sur., 2020)

KANABINOID	RECEPTOR	ZDRAVSTVENI UČINAK/ POTENCIJALNO DJELOAVNJE KAO
<b><math>\Delta</math>9-THC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ CB1 i CB2 receptori (veći afinitet za CB1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Antiemetik</li> <li>▪ Antinociceptivno djelovanje</li> <li>▪ Antikancerogeno</li> <li>▪ Protuupalno</li> </ul>
<b>CBD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Inhibitor anadamina</li> <li>▪ Aktivacija TRPV1, GPR55, 5-HT<sub>1A</sub> receptora</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Antilepileptik</li> <li>▪ Antidepresiv i anksiolitik</li> <li>▪ Protuupalno</li> <li>▪ Neuroprotektivni učinak</li> <li>▪ Uklanjanje dermatoloških oboljenja</li> </ul>
<b>CBN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Veći afinitet za CB2 receptore</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Antikonvulzant</li> <li>▪ Protuupalno</li> </ul>
<b>CBG</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ TRPV1, TRPV2, TRPA1, TRPA3, TRPV4 receptor</li> <li>▪ <math>\alpha</math>2-adrenergički receptor</li> <li>▪ inhibitor anadamina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Protuupalno</li> <li>▪ Antikancerogeno</li> <li>▪ Uklanjanje dermatoloških oboljenja</li> </ul>
<b>CBC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ CB2 receptor</li> <li>▪ TRPA1, TRPV1-4, TRPV8</li> <li>▪ Inhibitor anadamina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Antinociceptivno djelovanje</li> <li>▪ Antimikrobno i antifungalno</li> <li>▪ Protuupalno</li> </ul>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO



### 3.1. Zadatak

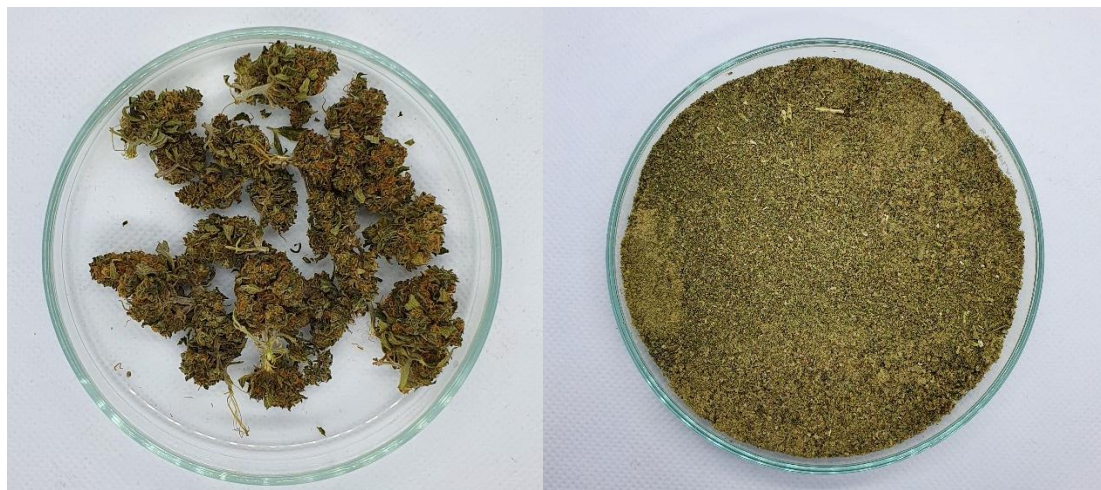
Cilj ovog rada je:

- Provesti ekstrakciju kanabinoida iz cvijeta industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) primjenom vode u supkritičnom stanju te ispitati utjecaj različitih temperatura ekstrakcije na sastav kanabinoida u dobivenim ekstraktima,
- Identificirati i kvantificirati pojedine kanabinoide u dobivenim ekstraktima cvijeta konoplje primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD),
- Spektrofotometrijskim metodama odrediti antioksidacijsku aktivnost te udio ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima,
- Ispitati mogućnost prevođenja tekućeg ekstrakta u prah primjenom tehnike sušenja raspršivanjem,
- Ispitati fizikalna i kemijska svojstva dobivenog praha.

## 3.2. Materijali

### Uzorak

- Osušeni cvjetovi *Cannabis sativa* L. (**Slika 7**) dobiveni su od tvrtke Hemp Agro d.o.o. (Selci, Hrvatska) 2021. godine. Prije ekstrakcije biljni materijal je samljeven na laboratorijskom mlinu te kao takav korišten tijekom provedbe ekstrakcija.



**Slika 7.** Osušeni cvjetovi *Cannabis sativa* L. i uzorak nakon usitnjavanja (Izvor: autor)

### Uređaji

- Mlin Grindomix GM200 (Retsch GM200, Njemačka)
- Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- UV/VIS spektrofotometar S-220 (Boeco, Njemačka)
- Uređaj za SWE (Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Hrvatska)

### Kemikalije

- Galna kiselina, čistoće 97,5 % (Sigma-Aldrich, Njemačka),
- 96% etanol (Gram-mol d.o.o., Hrvatska),
- Folin-Ciocalteu reagens (Sigma-Aldrich, Njemačka),
- Mili-Q voda (provodnost:  $\leq 0,055 \mu\text{S}/\text{cm}$ ),
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Gram-mol d.o.o., Hrvatska),

- 1,1-difenil-pikrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, Njemačka),
- Metanol, HPLC čistoće (J. T. Baker, Poljska),
- Mravlja kiselina (J. T. Baker, Poljska),
- Octena kiselina (J. T. Baker, Poljska),
- Maltodextrin DE 4-7, (Sigma Aldrich, Njemačka)

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Priprema uzorka

Radi povećanja površine, prije ekstrakcije uzorak je usitnjen u mlinu "Mill Grindomix GM200" (**Slika 8**) (Retsch GM200, Njemačka) na 4000 rpm u trajanju od 1 minute nakon čega je prebačen u nepropusnu plastičnu vrećicu i čuvan do ekstrakcije.

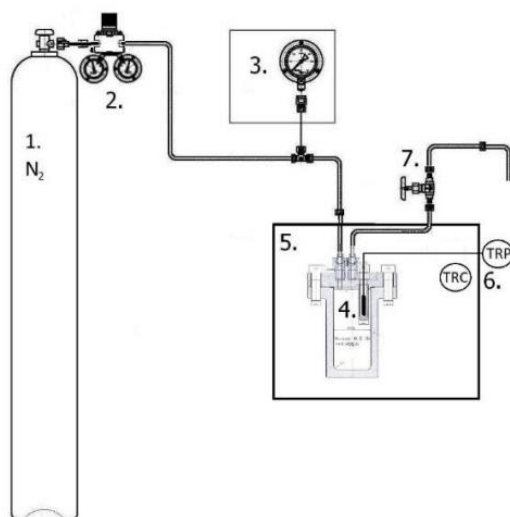


**Slika 8.** Mlin Grindomix GM200, Retsch GM200 (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

#### 3.3.2. Ekstrakcija supkritičnom vodom (SWE)

Ekstrakcija supkritičnom vodom provedena je na uređaju izrađenom od nehrđajućeg čelika (AISI 316Ti i AISI 304) koji se sastoji od šaržnog ekstraktora u kojem se nalazi pripremljeni uzorak za ekstrakciju i pećnice koja zagrijava ekstraktor na željenu temperaturu. Tijekom

procesa ekstrakcije tlak je kontroliran s WIKA manometrom od 20 MPa, a temperatura pomoću termometra s PT sondom. Radi kontrole tlaka i uklanjanje prisutnog kisika, odnosno izbjegavanja reakcija oksidacije, korišten je inertni plin dušik. Shema ekstraktora prikazana je na **Slici 9**.



**Slika 9.** Procesna shema ekstraktora sa supkritičnom vodom.

- (1) boca N<sub>2</sub> (2) Regulator N<sub>2</sub> 20/5 MPa (3) Manometar 0-20 MPa (4) Ekstraktor 20 MPa, 200°C (5) Termostat ili pećnica 20-300°C (6) TRC – regulator temperature; TRP – Temperaturna sonda  
(7) Visokotlačni igličasti ventil  
(Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

Biljni materijal je pomiješan s vodom u omjeru 1/20 g/ml. Ovako pripremljen uzorak položio se u šaržni reaktor. Pri ekstrakciji reaktor se zagrijavao na različitim temperaturama, a smjesa miješala. Ekstrakcija uzorka provedena je na slijedećim temperaturama: 100 °C, 112,5 °C, 137,5 °C, 125 °C, 150 °C, 175 °C, 200 °C, 225 °C, 250 °C i 275 °C, pri tlaku od 30 bara tijekom 10 min uz miješanje. Nakon završetka ekstrakcije ekstraktor je ohlađen na temperaturu ispod 100 °C u hladnoj kupelji, potom se ekstrakt profiltrirao kroz filter papir te skladištio na temperaturi od 4 °C do analize.

### 3.3.3. Određivanje udjela suhe tvari u ekstraktu i iskorištenja ekstrakcije

#### Određivanje udjela suhe tvari

Prema AOAC-u (1995), cjelokupna količina tvari iz sastava proizvoda čini ukupnu suhu tvar koja ne isparava pod definiranim uvjetima. Ovom metodom određuje se ostatak tvari nakon sušenja pri temperaturi od 105 °C do konstantne mase.

Posudica izrađena od aluminijske sušena je s poklopcem u sušioniku pri 105 °C oko 2 sata sa skinutim poklopcem. Nakon toga, posudica je poklopljena i ohlađena u eksikatoru, a zatim je izvagana s točnošću ±0,0002 g. Oko 1 g prethodno pripremljenog uzorka (ekstrakta) stavljeno je u ohlađenu i izvaganu posudicu te je potom ponovno sve zajedno izvagano s točnošću od ±0,0002 g. U sušionik koji je prethodno zagrijan na 105 °C ± 0,5 °C stavljena je aluminijska posudica s uzorkom. Otklopljeni uzorak u sušioniku zagrijavan je 1 sat nakon čega je ohlađen i izvagan. Sušenje je provedeno onoliko dugo koliko je bilo potrebno da razlika između dva uzastopna sušenja (u razmaku od 30 minuta) ne bude manja od 0,001 g.

Posudica s uzorkom i poklopcem bila je ponovno izvagana s točnošću ± 0,0002g. Udio suhe tvari (*ws. tv.*) računao se prema jednadžbi (1).

$$ws. tv = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} (1)$$

gdje je:

- *ws. tv.* – udio suhe tvari [%],
- $m_1$  – masa posudice i uzorka prije sušenja [g],
- $m_2$  – masa posudice i uzorka nakon sušenja [g],
- $m_0$  – masa prazne posudice [g]

#### Iskorištenje ekstrakcije

Iskorištenje ekstrakcije računalo se prema jednadžbi(2).

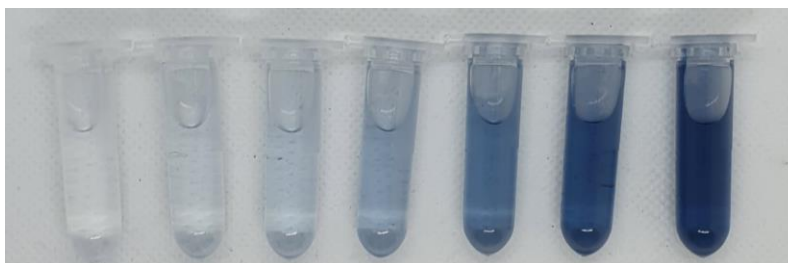
$$Y (\%) = \frac{m_1}{m_2} \times 100 (2)$$

Gdje je:

- $Y$  – iskorištenje ekstrakcije [%]
- $m_1$  – masa dobivenog ekstrakta nakon uklanjanja otapala [g]
- $m_2$  – masa uzorka koji se koristio za ekstrakciju [g]

### 3.3.4. Određivanje ukupnih fenola

Prema modificiranoj spektrofotometrijskoj metodi (Jakobek i sur., 2007) određen je udio ukupnih fenola u ekstraktima. Za određivanje ukupnih fenola prvo je pripravljena temeljna otopina galne kiseline radi izrade kalibracijske krivulje, na način da se otopilo 0,5 g galne kiseline s 10 mL 96 %-otopine etanola nakon čega se do oznake ulijevala destilirana voda u odmjernu tikvici od 100 mL. Pripremljena otopina je stabilna naredna dva tjedna. Nadalje, su se pripremale otopine različitih razrjeđenja (0,05 mg/mL – 1 mg/mL) tako što je u odmjerne tikvice od 50 mL otpipetiralo po: 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,5 mL, 5,0 mL, 7,5 mL i 10 mL otopine galne kiseline te se zatim do oznake nadopunilo destiliranom vodom. **Slika 10** prikazuje različita razrjeđenja otopine galne kiseline spremna za izradu kalibracijske krivulje.



**Slika 10.** Pripremljena razrjeđenja otopine galne kiseline za izradu kalibracijske krivulje (izvor: autor)

Postupak za mjerenje ukupnih fenola u ekstraktu započeo je tako što je u 20  $\mu$ L razrijeđenog ekstrakta, koncentracije 1 mg/mL, dodano 1580  $\mu$ L destilirane vode i 100  $\mu$ L nerazrijeđenog Folin-Ciocalteu reagensa. Nakon 3 minute dodano je 300  $\mu$ L 20 %-tne otopine natrijeva karbonata pripremljenog tako što je kuhanjem otopljeno 200 g bezvodnog natrijeva karbonata u 1 L vode. Pripremljeni uzorci su se termostatirali na 40 °C kroz 30 minuta.



**Slika 11.** UV/VIS spektrofotometar, Boeco S-220 UV/VIS, Njemačka (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta 2021)

Potom se mjerila apsorbancija na UV/VIS Spektrofotometru (Boeco S-220 UV/VIS, Njemačka; **Slika 11**) pri valnoj duljini od 765 nm u tri paralele rezultati se izračunavaju prema izrađenoj kalibracijskoj krivulji te se izražavaju kao mg galne kiseline (GAE) po litri ekstrakta.

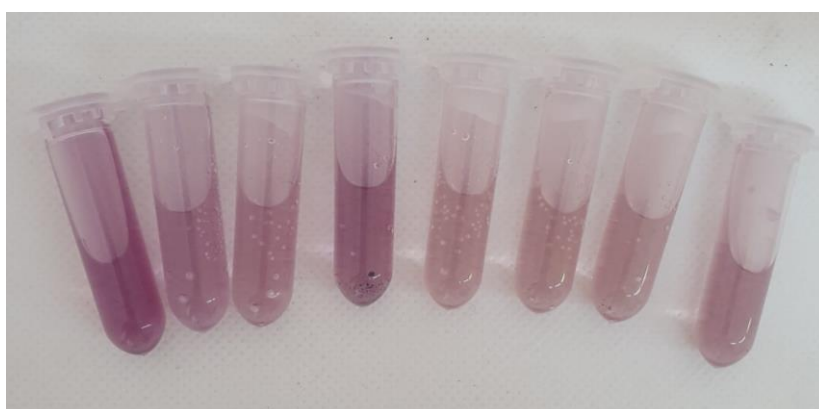
### 3.3.5. Određivanje antiradikalne aktivnosti

Prema metodi opisanoj u radu Jakobek i sur. (2007) određena je antiradikalna aktivnost ekstrakata DPPH metodom. Otopine su se pripremale na način da se 1,2 mL ekstrakta, koncentracije 0,25 mg/mL, dodaje 0,5 mL 0,2 mM DPPH svježe pripremljene otopine (**Slika 12**). Na spektrofotometru navedenom u prethodnoj metodi se provelo mjerenje apsorbancije u 3 ponavljanja pri valnoj duljini od 517 nm.

Dobiveni rezultati izraženi su kao postotak inhibicije DPPH radikala (% DPPH) te su izračunati pomoću jednadžbe (3).

$$\% DPPH = \frac{(A_{DPPH} + A_b) - A_s}{A_{DPPH}} \times 100 \quad (3)$$

- $A_{DPPH}$  – predstavlja kontrolu apsorbance (umjesto uzorka dodan je metanol),
- $A_b$  - absorbanca uzorka (umjesto DPPH otopine dodan je metanol)
- $A_s$  - absorbanca uzorka pomiješanog s DPPH otopinom.



**Slika 12.** Pripremljeni uzorci za određivanje antiradikalne aktivnosti ekstrakata (izvor: autor)

### 3.3.6. Određivanje sadržaja bioaktivnih spojeva primjenom HPLC

Identifikacija i kvantifikacija kanabinoida u ekstraktima dobivenih pomoću SWE provedena je metodom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije (HPLC), odnosno pomoću uređaja Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD; **Slika 13**). Automatskim injektorom se u sustav injektiralo 35  $\mu\text{L}$  pripremljenog uzorka (20  $\mu\text{L}$  ekstrakta + 1980  $\mu\text{L}$  metanola). Uzorci prije HPLC analize su bili profiltrirani kroz najlon-filter 0,45  $\mu\text{m}$  uz pomoć odgovarajuće šprice.

Korištene su dvije mobilne faze:

- A faza: 0,1 %  $\text{HCOOH}$  u  $\text{H}_2\text{O}$
- B faza: 0,05 %  $\text{HCOOH}$  u  $\text{CH}_3\text{OH}$

Ovaj dvokomponentni sustav mobilnih faza koristio se prema gradijentu:

- 0 min, 40 % A, 60 % B;
- 7,05 min, 40 % A, 60 % B;
- 49,37 min, 23% A, 77 % B;
- 67 min, 5 % A, 95 % B.

Vrijeme trajanja analize iznosi 67 minuta s "posttime" od 10 minuta pri temperaturi kolone u iznosu od 50 °C. Detekcija kanabinoida u uzorku provedena je pomoću detektora pri slijedećim valnim duljinama: 210, 230, 250, 280 nm. Identifikacija pojedinih kanabinoida u ekstraktima provedena je usporedbom retencijskog vremena u uzorku s retencijskim vremenom injektiranog standarda poznate koncentracije određene komponente. Dok se kvantifikacija detektiranih kanabinoida provodila integriranjem površine ispod dobivenih pikova na temelju kalibracijske krivulje prethodno izrađene za svaku pojedinačnu analiziranu komponentu.





**Slika 13.** HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

### 3.3.7. Sušenje raspršivanjem

Za sušenje raspršivanjem korišten je uređaj Buchi Mini Spray Dryer B-290 s odvlaživačem zraka i Inert loopom (**Slika 14**). Tijekom provedbe procesa sušenja konstantni parametri bili su sljedeći:

- 10 % kapaciteta pumpe (3 mL/min);
- 100 % kapaciteta aspiratora (maksimum: 35 m<sup>3</sup>/h)
- 25 mL/min protok na dizni

Izlazna temperatura kretala se oko 75 °C ovisno o ulaznoj temperaturi koja je bila konstantna i iznosila je 125 °C. Za inkapsulaciju bioaktivnih spojeva tijekom odvijanja sušenja koristio se biopolimer maltodekstrin koji se dodaje uzorku prije postupka sušenja. Dodao se ekstraktu u količini koja iznosi 50 % mase suhe tvari dobivenog ekstrakta.



Slika 14. Uređaj Buchi Mini Spray Dryer B-290 (izvor: autor)

### 3.3.8. Određivanje fizikalno kemijskih karakteristika dobivenog praha

#### **Određivanje iskorištenja sušenja raspršivanjem**

Iskorištenje provedenog postupka sušenja raspršivanjem računa se prema sljedećoj jednadžbi (4).

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{P}{S+N} \times 100 \quad (4)$$

Gdje je:

- $P$  – masa praha dobivena postupkom sušenja raspršivanjem [g]
- $S$  – suha tvar ekstrakta u volumenu korištenom za sušenje [g]
- $N$  – masa nosača dodana ekstraktu prije postupka sušenja [g]

#### **Određivanje udjela suhe tvari u prahu**

Udio suhe tvari u prahu određuje se na isti način kao i kod ekstrakta, metoda je opisana u poglavlju 3.3.3. *Određivanje udjela suhe tvari u ekstraktu i iskorištenje ekstrakcije.*

**Ekstrakcija ukupnih fenola**

Za ekstrakciju ukupnih fenola bilo je potrebno odvagati 500 mg praha, nakon čega je dodano 5 mL otapala etanol:octena kiselina:voda (50:8:42, v/v/v). Uzorak je usitnjen u otapalu sa staklenim štapićem kako bi membrana mikrokapsula bila razbijena te se na Vortex miješalici miješalo 1 minutu. Nadalje, na ultrazvučnoj kupelji vršila se ekstrakcija tijekom 20 minuta pri sobnoj temperaturi. Dobiveni ekstrakt se centrifugirao na 3000 okretaja tijekom 10 minuta. Dobiveni supernatant bio je profiltriran kroz filter papir i prebačen u Falcon kivetu. Dobiveni ekstrakt koristio se za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola metodom po Folin-Ciocalteu metodi.

**Ekstrakcija površinskih fenola**

Za ekstrakciju površinskih fenola odvagano je 500 mg praha u staklenu epruvetu, te je dodano 5 mL otapala etanol:metanol (50:50, v/v). Dobivena smjesa miješana je 1 minutu na Vortex miješalici. Nakon toga uzorak je filtriran kroz običan filter papir i prebačen u Falcon kivetu. Ovako pripremljen uzorak se koristio za spektrofotometrijsko određivanje površinskih fenolnih spojeva metodom po Folin-Ciocalteu metodi.

**Određivanje inkapsulacijskog kapaciteta**

Inkapsulacijski kapacitet određuje se prema formuli (5) (Saikia i sur., 2015).

$$\% EK = \frac{UF-PF}{UF} \times 100 \quad (5)$$

- EK – inkapsulacijski kapacitet [%]
- UF – ukupni fenoli [mg/g]
- PF – površinski fenoli [mg/g]

**Određivanje nasipne mase**

Određuje se prema modificiranoj metodi Murakamija i suradnika (2001) na način da je prvo izvagana masa praznog graduiranog cilindra, potom je u njega usipan uzorak i očitana volumen koji je zauzeo. Cilindar s uzorkom je također izvagan. Nasipna masa se određuje kao omjer mase uzorka koji se nalazi u cilindru i volumena uzorka koji je zauzeo u cilindru. Računa se prema formuli (6).

$$\text{Nasipna gustoća} \left[ \frac{g}{cm^3} \right] = \frac{m_{UZORKA} [g]}{V_{UZORKA} [cm^3]} \quad (6)$$

### **Određivanje indeksa apsorpcije vode i indeksa topljivosti u vodi**

Indeks apsorpcije vode (WAI) i indeks topljivosti u vodi (WSI) određeni su prema metodi Anderson i sur. (1969).

Prvo je izvagano 2,5 g praha u tariranu kivetu od 50 mL za centrifugiranje. Potom se dodalo 30 mL destilirane vode (ispirane i stjenke kivete) nakon toga uzorci su bili ostavljeni da stoje 30 minuta uz povremeno miješanje u intervalima od 5 minuta. Zatim su uzorci bili centrifugirani pri 3000 okretaja tijekom 15 minuta. U prethodno osušene i izvagane posudice za sušenje, supernatant se dekantirao i sušio do konstantne mase na temperaturi od 105 °C.

Masa gela dobivenog nakon dekantiranja po jedinici suhe tvari početnog uzorka predstavlja WAI, računa se prema formuli (7).

$$WAI [gg^{-1}] = \frac{\text{masa gela}}{\text{masa suhe tvari u početnom uzorku}} \quad (7)$$

WSI je omjer mase suhe tvari u supernatantu i mase suhe tvari u početnom uzorku izraženu u postocima, računa se prema formuli (8).

$$WSI [\%] = \frac{\text{masa suhe tvari u supernatantu}}{\text{masa suhe tvari u početnom uzorku}} \times 100 \quad (8)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Sve se veći interes pokazuje za primjenu zelenih ekstrakcijskih tehnika poput SWE-a u različitim industrijama (prehrambenoj, kemijskoj i farmaceutskoj) kao adekvatna zamjena za klasične metode ekstrakcije. Razlog je taj što se sve više osjete posljedice negativnog ljudskog djelovanja na okoliš, te se pojavila potreba za pronalaskom metoda čijom primjenom ne dolazi do zagađenja okoliša. Industrijska konoplja je posljednjih godina popularnija nego ikad zbog brojnih blagotvornih učinaka na zdravlje. Sve je veća potražnja na tržištu za različitim preparatima koji sadržavaju bioaktivne komponente ove biljke te je važno ispitati učinkovitost ekstrakcije kanabinoida zelenim tehnikama kako bi se pronašla zadovoljavajuća zamjena za klasične metode ekstrakcija s organskim otapalima, koja se na posljetku može implementirati u razne industrije gdje se javlja potreba za ekstraktima konoplje.

Samljeveni uzorci osušenog cvijeta industrijske konoplje pomiješani su s vodom prije ekstrakcije u omjeru 1/20 g/ml. Supkrična ekstrakcija vodom provedena je pri tlaku od 30 bara na slijedećim temperaturama: 100 °C, 112,5 °C, 137,5 °C, 125 °C, 150 °C, 175 °C, 200 °C, 225 °C, 250 °C i 275 °C. Supkrična voda je otapalo čija temperatura mora biti u određenom temperaturnom rasponu, odnosno mora biti na temperaturi iznad 100 °C (temperatura vrenja vode) i ispod kritične točke koja iznosi 374 °C pri tlaku na kojem ostaje u tekućem stanju. Voda u ovakvom stanju postaje manje polarna pa se može primijeniti kao otapalo i za nepolarne spojeve. Svaka ekstrakcija je trajala 10 min te se provodila uz stalno miješanje pomoću teflonskog magnetnog mješača. Sastav dobivenih ekstrakata ispitan je pomoću HPLC uređaja na prisutnost i količinu slijedećih kanabinoida: CBD, CBDA, CBG, CBGA, CBN,  $\Delta$ 9-THC, THCA, THCVA, CBCA, CBC i CBDVA. Dobiveni rezultati su prikazani u **Tablici 3**.

**Tablica 3.** Sastav kanabinoida u ekstraktima dobivenih na navedenim temperaturama

	100°C	112,5°C	125°C	137,5°C	150°C
<b>CBD (µg/mg)</b>	0,26	0,23	9	2,24	10,86
<b>CBDA (µg/mg)</b>	0,93	0,22	0,94	BDL*	BDL*
<b>CBD+CBDA – ukupni (µg/mg)</b>	1,19	0,45	9,85	2,24	10,86
<b>CBG (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	0,33	BDL*	BDL*
<b>CBGA (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	0,4	BDL*	BDL*
<b>CBN</b>	BDL*	BDL*	BDL*	BDL*	BDL*
<b>Δ9-THC (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	0,8	0,82	0,86
<b>THCA (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	0,39	BDL*	BDL*
<b>THCVA (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	0,56	0,09	0,16
<b>Δ9-THC+ THCA – ukupni (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	1,19	0,84	0,81
<b>CBCA (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	0,55	BDL*	BDL*
<b>CBC (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	1	0,7	1,07
<b>CBDVA (µg/mg)</b>	BDL*	BDL*	0,17	BDL*	BDL*
<b>*BDL-Ispod granica detekcije (<i>Below Detection Limit</i>)</b>					

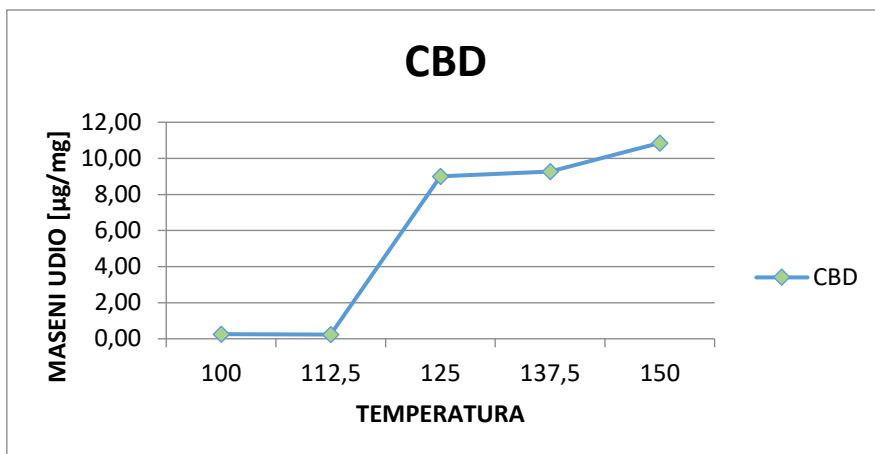
Ekstrakcije provedene na temperaturama iznad 150°C pokazale su se neuspješnima, odnosno udio kanabinoida u dobivenim ekstraktima bio je ispod granice detekcije HPLC-a. Potencijalan razlog bi mogao biti degradacija nekih od ekstrahiranih produkata, iako je u većini znanstvenih radova navedeno da degradacija započinje pri 220 °C, moguće je da zbog različite lokacije i uvjeta uzgoja do degradacije dolazi i na nižim temperaturama (Drinić, 2020). Prema rezultatima vidljivo je da CBD predstavlja najdominantniji kanabinoid u dobivenim ekstraktima. (Slika 15), a također je sadržan i u većim koncentracijama u usporedbi s ostalim

kanabinoidima. Najveća koncentracija CBD-a dobivena je pri 150 °C i iznosi 10,86 µg/mg. Prema rezultatima dobivenim u radu Drinić (2020) najveća količina CBD-a detektirana je pri 140 °C (0,0183±0,0025 µg/mg). Uspoređujući rezultate može se zamijetiti kako korištenjem iste metode ekstrakcije (SWE), pri tlaku od 30 bara tijekom 10 min pri temperaturi od 140 °C, ekstrahirano je manje CBD-a u odnosu na sve provedene ekstrakcije ovog rada u temperaturnom rasponu od 100 °C do 150 °C. Razlog toga može biti različit kanabinoidni sastav same biljke, odnosno početnog uzorka. Nadalje, uspoređujući dobivene rezultate s drugim ekstrakcijskim tehnikama poput ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (Jambrović, 2021) gdje je sadržaj CBD-a varirao od 5,86 µg/mg ekstrakta do 18,44 µg/mg ekstrakta može se primijetiti da sadržaj CBD-a značajno ovisi i o primijenjenoj ekstrakcijskoj tehnici. U navedenom istraživanju, sadržaj CBD-a ovisio je o omjeru suhe tvari i etanola i trajanju primjene tretmana ultrazvuka na uzorak. Odnosno, došlo je do porasta udjela CBD-a s povećanjem omjera suhe tvari i etanola te vremena trajanja ultrazvučne ekstrakcije. Jambrović (2021) navodi da povišenje temperature tijekom ekstrakcije ultrazvukom (sa 23 °C na najviše 38 °C), ne predstavlja bitan parametar koji utječe na samu ekstrakciju za razliku od SWE kod koje je ishod ekstrakcije isključivo vezan uz promjenu temperature.

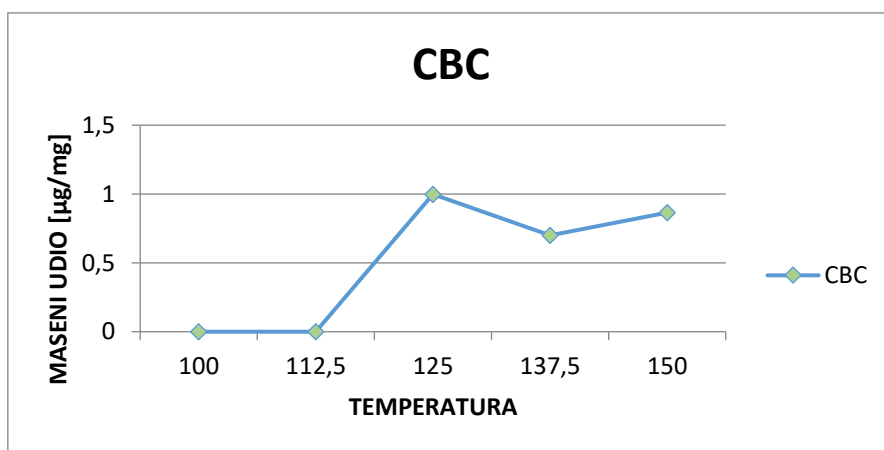
Sadržaj Δ9-THC u dobivenim ekstraktima je u koncentracijama od 0,80 do 0,86 µg/mg (**Slika 17**), što ga prema rezultatima, uz CBD i CBC (**Slika 16**), uvrštava u najdominantnije kanabinoide dobivene u ekstraktima konoplje. U radu Drinić (2020) THC nije bio u granicama detekcije.

Svim ostalim kanabinoidima koncentracije u dobivenim ekstraktima su manje ili približne 1 µg/mg. CBN je jedini kanabinoid koji nije prisutan ni u jednom dobivenom ekstraktu. Najvjerojatniji razlog tomu je što CBN nije bio prisutan u početnom uzorku osušenih cvjetova industrijske konoplje, također ni jedna temperatura provedenih ekstrakcija nije potaknula konverziju THC-a u CBN.

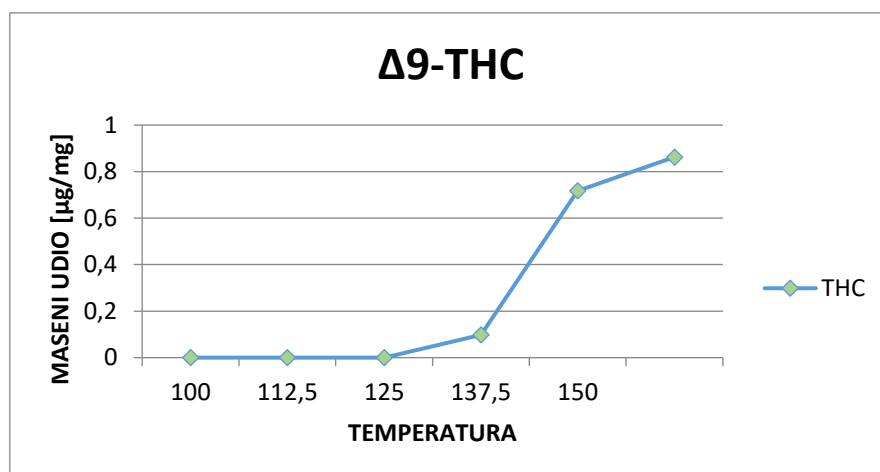




Slika 15. Grafički prikaz utjecaja temperature ekstrakcije na dobiveni udio CBD-a



Slika 16. Grafički prikaz utjecaja temperature ekstrakcije na dobiveni udio CBC-a



Slika 17. Grafički prikaz utjecaja temperature ekstrakcije na dobiveni udio Δ9-THC-a

Rezultati dobiveni određivanjem ukupnih fenola (mg/g suhe tvari) i antiradikalne aktivnosti (izraženi kao % DPPH) ekstrakata prikazani su u **Tablici 4.**

**Tablica 4.** Izmjerene vrijednosti ukupnih fenola (mg/g suhe tvari) i antiradikalne aktivnosti (% DPPH) dobivenih ekstrakata putem SWE na različitim temperaturama

TEMPERATURA (°C)	UKUPNI FENOLI (mg/g suhe tvari)	DPPH (%)
100	14,38	21,77
112,5	11,20	49,21
137,5	17,86	30,25
125	17,20	65,11
150	23,89	68,82
175	35,69	74,43
200	39,38	72,70
225	42,84	74,96
250	41,92	71,91
275	39,38	72,12
*Korelacija između ukupnih fenola i antiradikalne aktivnosti: 0,761		

Vrijednosti su dobivene metodama po Folin-Ciocalteu metodi i DPPH metodom. Obje navedene metode se temelje na spektrofotometrijskim mjerenjima. Za određivanje ukupnih fenola korištena je metoda po Folin-Ciocalteu kod koje dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa nastaje obojeni produkt plave boje iz razloga što dolazi do oksidacije fenolnih grupa iz uzorka, ostatak nereduciranog reagensa je žute boje (Bogadi, 2021). Pomoću spektrofotometra mjeri se apsorbancija pri 765 nm kojom se određuje intenzitet nastalog obojenja u odnosu na slijepu probu. Vrijednosti ukupnih fenola povećavale su se sve do 225 °C (42,84 mg/g suhe tvari), nakon čega počinju postupno padati. Do sličnog zaključka se došlo i u radu Drinić (2020) u kojem su vrijednosti ukupnih fenola rasle sve do temperature od 220 °C. U navedenom istraživanju vrijednosti su se kretale u rasponu od 1,0025 do 2,2602 mg/g, a najveća vrijednost

je postignuta na zadnjoj primijenjenoj temperaturi. Vjerojatan razlog pada vrijednosti ukupnih fenola nakon 225 °C je taj što se povišenjem temperature kod primjene supkritične ekstrakcije smanjuje dielektrična konstanta vode. Ona na temperaturi od 220 °C ima vrijednost 31, to je ujedno i približna vrijednost dielektrične konstante metanola ( $\kappa=33$ ) i etanola ( $\kappa=25$ ) (Drinić, 2020).

Za određivanje antiradikalne aktivnosti spojeva sadržanih u ekstraktima najboljom, jednostavnom i standardnom metodom smatra se DPPH metoda. Ona se temelji na redukciji DPPH iona prilikom hvatanja protona iz antioksidansa. Tijekom ovih reakcija dolazi do promjene boje iz ljubičaste u žutu. Provođenje reakcije uzorka s DPPH u metanolu olakšava se ekstrakcija spojeva koji su nositelji antiradikalne aktivnosti. Mjerenjem apsorbancije prati se promjena intenziteta boje pri valnoj duljini od 517 nm (Mishra i sur., 2012). Vrijednosti antiradikalne aktivnosti ekstrakata konoplje rastu porastom temperature do 175 °C, nakon čega ostaje pri vrijednostima u rasponu od 74,43 do 71,91 % DPPH sve do zadnje ekstrakcije provedene na temperaturi od 275 °C.

Prema ekstrahiranim kanabinoidima i njihovim koncentracijama u ekstraktima vidljivih iz **Tablice 3**, ispostavilo se da je optimalna temperatura za provođenje SWE na uzorku *Cannabis sativa* L. 125 °C. Iz tog razloga provedena je još jedna supkritična ekstrakcija vodom na toj temperaturi, pri tlaku od 30 bara i trajanju 10 minuta, ali ovaj put koristeći veću količinu uzorka u svrhu dobivanja ekstrakta koji će biti korišten kao pojna smjesta za sušenje raspršivanjem.

Sušenje raspršivanjem jedna je od metoda koja omogućuje produljenje stabilnosti bioaktivnih komponenata (kanabinoida) pretvorbom iz tekućeg u suhi ekstrakt koji se može upotrebljavati kao takav ili se može koristiti u pripremi nekih novih farmaceutskih proizvoda. Sušenje ekstrakta industrijske konoplje provedeno je primjenom maltodekstrina kao nosača u količini koja iznosi 50 % mase suhe tvari dobivenog ekstrakta. U **Tablici 5** prikazane su fizikalno-kemijske karakteristike dobivenog suhog ekstrakta industrijske konoplje kao i iskorištenje ekstrakcije.

**Tablica 5.** Iskorištenje ekstrakcije i fizikalno-kemijske karakteristike suhog ekstrakta industrijske konoplje

<b>FIZIKALNA SVOJSTVA:</b>	
Udio suhe tvari u ekstraktu (%)	1,41
Udio suhe tvari u suhom ekstraktu (%)	93,67
Sadržaj vlage (%)	6,33
Ukupni fenoli (mg/g)	68,31
Površinski fenoli (mg/g)	15,10
Inkapsulacijski kapacitet (%)	77,90
Nasipna masa (g/cm <sup>3</sup> )	0,35
WAI (g/g)	0,17
WSI (%)	97,10
Iskorištenje sušenja (%)	98,72
DPPH (Ekstrakt ukupnih fenola (% inhibicije DPPH))	38,84
DPPH (Ekstrakt površinskih fenola (%))	17,43

Proces sušenja smatra se efikasnim ukoliko je iskorištenje veće od 50 % u laboratorijskim uvjetima (Bhandari i sur., 1997). Prema dobivenom iskorištenju u iznosu od 98,72 % proces sušenja ekstrakta raspršivanjem sa dodatkom 50 % maltodekstrina pokazao se vrlo uspješnim.

Značajnu ulogu na stabilnost, veličinu čestica i reološka svojstva praha ima sadržaj vlage. Smatra se da je suhi ekstrakt zadovoljavajućih karakteristika u pogledu ljepljivosti kada je sadržaj vlage u rasponu od 3,9 do 5,9 %. U dobivenom prahu sadržaj vlage iznosi 6,33 %, što bi značilo da nema zadovoljavajuće karakteristike kada je riječ o ljepljivosti. Naime, manji sadržaj vlage povezan je i sa smanjenom mogućnošću mikrobiološke kontaminacije, kao i prevenciju oksidacijskih reakcija, što rezultira stabilnošću ekstrakta tijekom duljeg vremenskog perioda (Drinić, 2020).

Indeks topljivosti u vodi (WSI) i indeks apsorpcije vode su važne karakteristike suhih ekstrakata. Mjeru topljivosti ekstrakta u vodi predstavlja WSI od koje se zahtjeva visoka vrijednost, dok je WAI iskazuje sposobnost ekstrakta da apsorbira vodu te je poželjno da bude što manja (Vidović i sur., 2014). Dobiveni prah ima visoku vrijednost WSI (97,10 %), što je vrlo poželjna karakteristika suhog ekstrakta ovakvog tipa iz razloga što ima veliku mogućnost

primjene u proizvodnji instant proizvoda kod kojih je jedan od proizvodnih zahtjeva što brža topljivost u vodi. Vrijednost WAI iznosi 0,17 g/g.

Nasipna masa praha predstavlja bitnu karakteristiku u vidu formulacije gotovih farmaceutskih proizvoda poput kapsula i tableta koji su ograničeni po volumenu (Vidović i sur., 2014). Poželjno je da bude što veća da bi se mogla postići željena koncentracija u ograničenom volumenu farmaceutskih proizvoda određenih bioaktivnih spojeva prisutnih u suhom ekstraktu. U prahu dobivenom nakon sušenja raspršivanjem nasipna masa iznosi 0,35 g/cm<sup>3</sup>.

Koncentracija ukupnih fenola u prahu iznosi 68,31 mg/g, a vrijednost površinskih fenola iznosi 15,10 mg/g. Pa tako inkapsulacijski kapacitet iznosi 77,90 %. On direktno ovisi o koncentraciji ukupnih fenola, tj. obrnuto je proporcionalan koncentraciji površinskih fenola. Dobiveni rezultat ukazuje na dobro zadržavanje fenola nakon provedene inkapsulacije (Tandara, 2017).

Antiradikalna aktivnost izražena kao % inhibicije DPPH kod ekstrakta ukupnih fenola iznosi 38,84 %, dok kod površinskih fenola ima vrijednost od 17,43 % što također ukazuje na to da je sušenjem raspršivanjem moguće inkapsulirati aktivne spojeve cvijeta industrijske konoplje.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, određivanja kanabinoida u ekstraktima cvijeta industrijske konoplje dobivenih primjenom supkritične vode uz sušenje raspršivanjem, prema dobivenim rezultatima i provedenom raspravom, može se zaključiti slijedeće:

- Optimalna temperatura za provođenje ekstrakcije na uzorcima osušenih cvjetova *Cannabis sativa* L. supkritičnom vodom je 125 °C (pri tlaku od 30 bara i vremenu od 10 min) iz razloga što je na toj temperaturi detektirano najviše različitih kanabinoida u većim koncentracijama nego primjenom ostalih temperatura.
- Na temperaturama iznad 150 °C započinje degradacija spojeva, te su se SWE na 175 °C, 200 °C, 225 °C, 250 °C i 275 °C pokazale neuspješnima zbog vrlo niskih koncentracija (ispod limita kvantifikacije HPLC-a) kanabinoida u dobivenim ekstraktima.
- Kanabidiol (CBD) je spoj koji je ekstrahiran u najvećoj količini u usporedbi s ostalim kanabinoidima u ekstraktu. Najveća količina zabilježena je pri 150 °C i iznosi 10,86 µg/mg.
- Najviša koncentracija ukupnih fenola u ekstraktu izmjerena je pri temperaturi od 225 °C i iznosi 42,84 mg/g suhe tvari, nakon čega vrijednosti počinju padati. Na istoj temperaturi ekstrakt ima i najveću vrijednost antiradikalne aktivnosti koja iznosi 74,96 % DPPH.
- Iskorištenje sušenja primjenom sušenja ekstrakta raspršivanjem iznosi 98,72 % što ukazuje na vrlo dobro iskorištenje procesa.
- Inkapsulacijski kapacitet dobivenog praha iznosi 77,90 %, što označava dobro zadržavanje fenola unutar kapsula.
- Dobiveni prah ima visoki indeks topljivosti u vodi koji iznosi 97,10 %, što mu daje mogućnost primjene u razvoju novih funkcionalnih instant proizvoda.

## 6. LITERATURA



- Anderson RA, Conway HFM, Pfeiffer VF, Griffin EJ: Gelatinization of corn grits by roll- and extrusion cooking. *Cereal Science Today* 14:4-12, 1969.
- Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. *Cannabis sativa*: The Plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science* 7: 2-14, 2016.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists, Official methods of analysis, 16. izd., Arlington VA, USA, 1995.
- Baswan SM, Klosner AE, Glynn K, Rajgopal A, Malik K, Yim S, Stern N: Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD) for Skin Health and Disorders. *Clinical Cosmetic Investigational Dermatology* 13: 927-942, 2020.
- Bhandari B, Datta N i Howes T: Problems associated with spray drying of sugar rich foods. *Drying Technology* 15: 671–684, 1997.
- Bogadi D: Ekstrakcija fenolnih spojeva iz kora mandarine primjenom visokonaponskog električnog pražnjenja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2021.
- Chang C, Zhongli P: Cannabidiol and terpenes from hemp – ingredients for future foods and processing technologies. *Journal of Future Foods* 1 (2): 113-127, 2021.
- Čolak M: Analitički postupci u kontroli kakvoće preparata s medicinskom marihuanom. *Diplomski rad*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.
- Domac R: Flora Hrvatske. Školska knjiga, Zagreb, 2002.
- Drinić Z: Ekstrakcija industrijske konoplje (*Cannabis Sativa* L.). *Doktorska disertacija*, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2020.
- Gazdek D: Marihuana u medicinske svrhe – javnozdravstveni aspekt. *Liječnički vjesnik* 136: 7-8, 2014.
- Gülck T, Møller B L: Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plants Science* 25 (10): 985-1004, 2020.
- HAH, Hrvatska agencija za hranu, 2015. [https://www.hah.hr/pregledupisnika/?preuzmi\\_misljenje=44](https://www.hah.hr/pregledupisnika/?preuzmi_misljenje=44) [22.7.2022]
- Hanuš LO, Meyer SM, Munoz E, Tagliatalata-Scafati O, Appendino G: Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Products Report* 33 (12): 1357-1392, 2016.
- Holy J: Terapijski potencijal medicinske konoplje. *Završni specijalistički rad*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2019.
- Horvatić T: Učinci fitokanabinoida na endokanabinoidni sustav. *Diplomski rad*, Medicinski fakultet, Zagreb, 2019.

- ITIS, Integrated Taxonomic Information System, 2018. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=19109#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19109#null) [22.7.2022.]
- Izzo A, Borrelli F, Capasso R, V. Di Marzo, Mechoulam R: Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences* 30: 515–527; 2009.
- Jakobek L, Šeruga M, Novak I, Medvidovic-Kosanovic M: Flavonols, phenolic acids and antioxidant activity of some red fruits. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 103:369–377, 2007.
- Jambrović M: Ultrazvučna ekstrakcija kanabinoida iz cvjetova industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). *Završni rad*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2021.
- Jokić S, Aladić K, Šubarić D: Subcritical water extraction laboratory plant design and application. *Annual of the Croatian Academy of Engineering*, 21:247-258, 2017.
- Jovanović I: Korištenje kanabisa (*Cannabis Sativa* L.) i njegov potencijal u budućnosti. *Završni rad*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2020.
- Liu H-W, Mander L: *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier Science, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2010.
- Marioti K, Marcelo MCA, Ortiz RS, Borille BT, Reis M, Fett MS, Ferrao MF, Limberger RP: Seized Cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography-mass spectrometry and chemometric analysis. *Science & Justice* 56: 35-41, 2016.
- Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK: Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 130:1036–1043, 2012.
- Murakami H, Yoneyama T, Nakajima K, Kobayashi M: Correlation between loose density and compactibility of granules prepared by various granulation methods. *International Journal of Pharmaceutics* 216: 159-164, 2001.
- Pertwee RG, Cascio MG: Known pharmacological action of delta9tetrahydrocannabinol and of four other chemical constituents of cannabis that activate cannabinoid receptors. U: *Handbook of Cannabis*, Oxford University Press, New York ,str. 148 – 152, 2014.
- Pollastro F, Minassi A, Fresu LG: Cannabis phenolics and their bioactivities. *Current Medicinal Chemistry* 25 (10): 1160-1185, 2018.
- Russo E, Marcu J: Cannabis Pharmacology: The usual suspects and a few promising leads. *Advances in Pharmacology* 80: 67-134, 2017.
- Saikia, S, Mahnot, N., Mahanta CL: Optimisation of phenolic extraction from Averrhoa carambola pomace by response surface methodology and its microencapsulation by spray and freeze drying. *Food Chemistry* 171: 144-152, 2015.

- Schuetz M, Savile C, Webb C, Rouzard K, Fernandez JR, Perez E: Cannabigerol: The mother of cannabinoids demonstrates a broad spectrum of anti-inflammatory and anti-microbial properties important for skin. *Journal of Investigative Dermatology* 141:480, 2021.
- Small E, Marcus D: Poglavlje: Hemp: A new crop with new uses for north america. U: *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, SAD, str. 284–326, 2002.
- Tandara M: Zadržavanje fenolnih spojeva u prahovima ekstrakta cvijeta trnine tijekom sušenja raspršivanjem. *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2017.
- Tomašić Paić A: Svojstva kanabinoidnih receptora ljekovite biljke *Cannabis sativa*. *Medicinski vjesnik* 44: 147-162, 2012.
- VanDolah J H, Bauer BA, Fauck K F: Clinicians' guide to cannabidiol and hemp oils. *Mayo Clinic Proceedings* 94 (9): 1840-1851, 2019.
- Vidović S, Vladić J, Vaštag Ž, Zeković Z, Popović Lj: Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique. *Powder Technology* 258: 209-215, 2014.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Kindl M: Phytochemical aspects and therapeutic perspective of cannabinoids in cancer treatment. U *Natural Products and Cancer Drug Discovery*, InTech, Rijeka, str. 111-139, 2017.