

# Utjecaj klasične i ultrazvukom potpomognute maceracije na udio kanabidiola i kanabidiolne kiseline iz cvatova industrijske konoplje

---

Čogelja, Anita

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:109:710435>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**

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**

**Anita Čogelja**

**UTJECAJ KLASIČNE I ULTRAZVUKOM POTPOMOŽNE MACERACIJE  
NA UDIO KANABIDIOLA I KANABIDIOLNE KISELINE IZ CVATOVA  
INDUSTRIJSKE KONOPLJE**

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 VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj elektroničkim putem 18.-20. svibnja 2022.

**Mentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić*

**Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Marija Banožić*, mag. nutr. *Martina Jakovljević Kovač*

### Utjecaj klasične i ultrazvukom potpomognute maceracije na udio kanabidiola i kanabidiolne kiseline iz cvatova industrijske konoplje

*Anita Čogelja*, 0011157024

#### Sažetak:

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) je biljka s dugom tradicijom primjene u medicinske, farmaceutske i prehrambene svrhe te kao sirovina za proizvodnju različitih materijala. Posljednjih godina postala je predmet interesa brojnih znanstvenika zbog visokog udjela bioaktivnih spojeva-kanabinoida. Izolacija različitih skupina bioaktivnih spojeva iz biljnih materijala se primjenjivala još u drevnim civilizacijama i danas se koristi u gotovo svim sferama prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih otapala pri klasičnoj i ultrazvukom potpomognutoj maceraciji na iskorištenje i sadržaj bioaktivnih spojeva, točnije kanabidiola (CBD) i kanabidiolne kiseline (CBDA) iz cvatova industrijske konoplje. Kao otapala u procesu ekstrakcije korišteno je osam komercijalno dostupnih hladno prešanih biljnih ulja badema, sezama, jojobe, argana, sjemenki grožđa, konoplje, avokada i marelice. U ekstraktima su primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD) identificirani i kvantificirani CBD, u rasponu od 0,04 % do 0,66 % te CBDA u rasponu od 0,21 % do 2,21 %. Analizirani kanabinoidi su pokazali najbolju topljivost u hladno prešanom ulju jojobe. Antiradikalna aktivnost je određena DPPH metodom i utvrđeno je da svi ispitani uzorci pokazuju antioksidativno djelovanje pri čemu se udio inhibicije DPPH radikala kretao od 91,281 % do 99,903 %.

**Ključne riječi:** CBD, CBDA, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, maceracija, dekarboksilacija

**Rad sadrži:** 42 stranice  
12 slika  
6 tablica  
1 prilog  
61 literaturnu referencu

**Jezik izvornika:** Hrvatski

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

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i> | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Stela Jokić</i>      | član-mentor   |
| 3. doc. dr. sc. <i>Krunoslav Aladić</i>  | član-komentor |
| 4. doc. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i>     | zamjena člana |

**Datum obrane:** 29. 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. VI. held on May 18-20, 2022.

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

**Technical assistance:** *Marija Banožić*, PhD; *Martina Jakovljević Kovač*, MSc

### **The Effect of Classical and Ultrasonically Assisted Maceration on the Content of Cannabidiol and Cannabidiol Acid from Industrial Hemp Inflorescences**

*Anita Čogelja*, 0011157024

#### Summary:

Industrial hemp (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) is a plant with a long tradition of use for medical, pharmaceutical and food purposes and as a raw material for the production of various materials. In recent years, it has become the subject of interest of many scientists due to the high content of bioactive compounds-cannabinoids. Isolation of different groups of bioactive compounds from plant materials has been applied since ancient civilizations and is used today in almost all spheres of the food, pharmaceutical and cosmetic industries. The aim of this research was to examine the influence of different solvents during classic and ultrasound-assisted maceration on the utilization and content of bioactive compounds, specifically cannabidiol (CBD) and cannabidiol acid (CBDA) from the inflorescences of industrial hemp. Eight commercially available cold-pressed vegetable oils of almond, sesame, jojoba, argan, grape seed, hemp, avocado and apricot were used as solvents in the extraction process. CBD, in the range of 0.04% to 0.66% and CBDA in the range of 0.21% to 2.21%, were identified and quantified in the extracts using high performance liquid chromatography with a diode array detector (HPLC-DAD). The analyzed cannabinoids showed the best solubility in cold-pressed jojoba oil. The antiradical activity was investigated using the DPPH method and it was determined that all tested samples showed antioxidant activity, with the share of DPPH radical inhibition ranging from 91.281% to 99.903%.

**Key words:** CBD, CBDA, ultrasound-assisted extraction, maceration, decarboxylation

**Thesis contains:** 42 pages  
12 figures  
6 tables  
1 supplement  
61 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, full prof.      | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.           | supervisor   |
| 3. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof. | co-mentor    |
| 4. <i>Ante Lončarić</i> , PhD, assistant prof.    | stand-in     |

**Defense date:** September 29, 2022

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

*Neizmjerno sam zahvalna svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na pruženom znanju, srdačnosti i stručnom vodstvu prilikom izrade diplomskog rada.*

*Zahvaljujem komentoru doc. dr. sc. Krunoslavu Aladiću, dr. sc. Mariji Banožić i mag. nutr. Martini Jakovljević Kovač na pomoći i savjetima.*

*Za kraj, posebno hvala mojim roditeljima, sestrama i Robertu na bezuvjetnoj potpori, ljubavi i strpljenju tijekom čitavog studija.*

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Taksonomija i botanička svojstva industrijske konoplje .....	4
2.1.2. Upotreba industrijske konoplje .....	7
2.1.3. Bioaktivne komponente industrijske konoplje .....	7
2.1.4. Kanabidiol (CBD) .....	11
2.1.5. Kanabidiolna kiselina (CBDA) .....	12
2.1.6. CBD ulje .....	12
<b>2.2. EKSTRAKCIJA</b> .....	<b>13</b>
2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) .....	13
2.2.2. Klasična maceracija .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2. MATERIJALI</b> .....	<b>17</b>
3.2.1. Kemikalije .....	17
3.2.2. Uređaji .....	18
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>18</b>
3.3.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju .....	18
3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) .....	20
3.3.3. Klasična maceracija .....	21
3.3.4. Identifikacija i kvantifikacija kanabinoida HPLC-DAD metodom .....	22
3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje antiradikalne aktivnosti DPPH metodom .....	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA KANABINOIDA HPLC-DAD METODOM</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2. ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI DPPH METODOM</b> .....	<b>30</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>33</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>35</b>
<b>7. PRILOZI</b> .....	<b>41</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

A	Apsorbancija (engl. <i>Absorbance</i> )
2-AG	2-arahidonoilglicerol (engl. <i>2-arachidonoylglycerol</i> )
CBC	Kanabikromen (engl. <i>Cannabichromene</i> )
CBCA	Kanabikromenska kiselina (engl. <i>Cannabichromenic acid</i> )
CBCAS	Sintaza kanabikromenske kiseline (engl. <i>Cannabichromenic acid synthase</i> )
CBD	Kanabidiol (engl. <i>Cannabidiol</i> )
CBDA	Kanabidiolna kiselina (engl. <i>Cannabidiolic acid</i> )
CBDAS	Sintaza kanabidiolne kiseline (engl. <i>Cannabidiolic acid synthase</i> )
CBE	Kanabielsoin (engl. <i>Cannabielsoin</i> )
CBG	Kanabigerol (engl. <i>Cannabigerol</i> )
CBGA	Kanabigerolna kiselina (engl. <i>Cannabigerolic acid</i> )
CBL	Kanabiciklol (engl. <i>Cannabicyclol</i> )
CBN	Kanabinol (engl. <i>Cannabinol</i> )
CBND	Kanabinodiol (engl. <i>Cannabinodiol</i> )
CBT	Kanabitriol (engl. <i>Cannabitriol</i> )
COX-2	Ciklooksigenaza-2 (engl. <i>Cyclooxygenase-2</i> )
DAD	Detektor niza dioda (engl. <i>Diode-array detector</i> )
DMAPP	Dimetilalil pirofosfat (engl. <i>Dimethylallyl pyrophosphate</i> )
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (engl. <i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> )
FAAH	Amid hidrolaza masne kiseline (engl. <i>Fatty acid amide hydrolase</i> )
GOT	Geranilpirofosfat: olivetolat geraniltransferaza (engl. <i>Geranyl pyrophosphate: olivetolic acid geranyltransferase</i> )
GPP	Geranil pirofosfat (engl. <i>Geranyl pyrophosphate</i> )

HPLC	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i> )
IPP	Izopentenil pirofosfat (engl. <i>Isopentenyl pyrophosphate</i> )
MAGL	Monoacilglicerol lipaza (engl. <i>Monoacylglycerol lipase</i> )
MCT	Trigliceridi srednjeg lanca (engl. <i>Medium chain triglycerides</i> )
OA	Olivetolična kiselina (engl. <i>Olivetolic acid</i> )
Ph. Eur.	Europska farmakopeja (engl. <i>European Pharmacopoeia</i> )
PTFE	Politetrafluoroetilen (engl. <i>Polytetrafluoroethylene</i> )
$\Delta^8$ -THC	$\Delta^8$ -tetrahidrokanabinol (engl. <i><math>\Delta^8</math>-tetrahydrocannabinol</i> )
$\Delta^9$ -THC	$\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (engl. <i><math>\Delta^9</math>-tetrahydrocannabinol</i> )
THCA	Tetrahidrokanabinolna kiselina (engl. <i>Tetrahydrocannabinolic acid</i> )
THCAS	Sintaza tetrahidrokanabinolne kiseline (engl. <i>Tetrahydrocannabinolic acid synthase</i> )
UAE	Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. <i>Ultrasound-assisted extraction</i> )



## **1. UVOD**

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*), biljka iz porodice Cannabaceae i roda *Cannabis* poznata je od vremena starih civilizacija zbog širokih mogućnosti upotrebe. Korištena je u građevinske svrhe, u tekstilnoj te prehrambenoj industriji. Specifičnog je i prepoznatljivog izgleda zbog morfologije listova.

Konoplja sadrži brojne bioaktivne komponente poput kanabinoida, flavonoida, terpena i alkaloida. Najpoznatiji spojevi su fitokanabinoidi, specifični samo za konoplju. Ovoj skupini pripada kanabidiol (CBD) i kanabidiolna kiselina (CBDA) koji nemaju psihoaktivna svojstva. Fitokanabinoidi se sintetiziraju u svim dijelovima biljke, a najviše u cvjetovima. Industrijska konoplja u svom prirodnom obliku sadrži kiselinske oblike kanabinoida koji se aktiviraju porastom temperature i procesom dekarboksilacije prelaze u svoje odgovarajuće dekarboksilirane analoge.

Industrijska konoplja definirana je prema važećem zakonu Republike Hrvatske „Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (‘Narodne novine’, br. 39/19)“ kao konoplja (*Cannabis sativa* L.) s ukupnim sadržajem  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola (THC) 0,2 % i manjim, čije sorte se nalaze na Zajedničkoj sortnoj listi Europske unije i nije uvrštena u Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga (N.N, 39/19).

U ovom radu biti će riječ o utjecaju komercijalnih hladno prešanih biljnih ulja avokada, badema, konoplje, marelice, jojobe, argana, sezama i ulja sjemenki grožđa kao otapala u procesu maceracije i ultrazvukom potpomognute ekstrakcije na udio kanabidiola i kanabidiolne kiseline dobivenih iz cvatova industrijske konoplje. Identifikacija i kvantifikacija dobivenih spojeva provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD) te je dodatno u dobivenim ekstraktima određena antiradikalna aktivnost pomoću spektrofotometrijske metode.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA

### 2.1.1. Taksonomija i botanička svojstva industrijske konoplje

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) dvodomna je jednogodišnja biljka iz porodice Cannabaceae i roda *Cannabis*. Smatra se jednom od prvih biljaka koju je kultivirao čovjek prije 10 000 godina u središnjoj Aziji zahvaljujući brojnim mogućnostima upotrebe i iskoristivosti svih dijelova biljke (Russo i sur., 2008). Stare civilizacije koristile su je prvenstveno zbog čvrstoće vlakana za izradu tkanina, konopa, papira, jedara, za prehranu, a zbog psihoaktivnih svojstava cvjetova za terapijske i rekreacijske svrhe (Bonini i sur., 2018). Preko Kine su je Skiti, nomadski narodi i plemena iranskoga podrijetla, proširili na antičke europske civilizacije. Spominje se u kineskim spisima Chinese materia medica, u svetim hinduističkim spisima Atharveda, u Kumranskim spisima stare židovske sekte Esena, u Herodotovim i Galenovim djelima zbog svojih medicinskih i psihotropnih svojstava. U srednjem vijeku proširila se upotreba industrijske konoplje u Europi zbog kvalitete proizvoda dobivenih od različitih dijelova biljke (Tomašić Paić, 2012).

1445. godine u Mainzu je na najfinijem konopljinom papiru tiskana prva Biblija Johannesa Gutenberga. Na papiru od konoplje skicirana je 1776. godine i Američka deklaracija nezavisnosti. Zanimljivo je da je prve hlače Levi Strauss u 19. stoljeću izradio od konoplje, a Henry Ford 1941. godine je izradio cjelokupnu autokaroseriju od biorazgradive plastike dobivene upravo od vlakana konoplje (Tomašić Paić, 2012).

Unatoč svojoj širokoj primjeni u građevini, industriji prehrane, tekstilnoj industriji, ova je biljka postala i ostala kontroverzna zbog svojih psihoaktivnih učinaka, te je godinama zabranjivan njezin uzgoj.

Kako su svi oblici konoplje diploidni ( $2n=20$ ) i spolno kompatibilni, a biljka je tisućljećima kultivirana i prilagođavana različitim utilitarnim potrebama od strane čovjeka, ne čude velike geografske, morfološke i kemijske varijacije biljke (CFIA, 2020).

Prva klasifikacija konoplje seže u 1753. godinu kada je izdan Linnéov Species Plantarum kao preteča moderne botaničke nomenklature.

Taksonomska klasifikacija konoplje prikazana **Tablicom 1**, dugo je bila predmet rasprave u botanici.

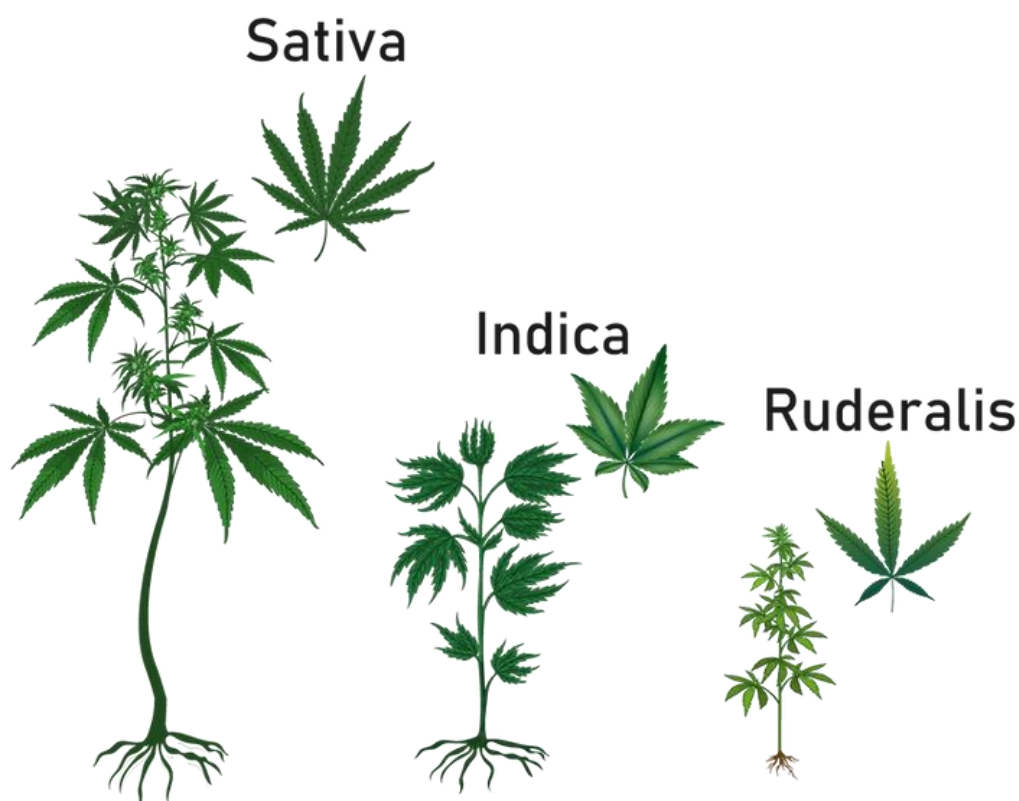
**Tablica 1** Klasifikacija *Cannabis sativa* L. prema integriranom taksonomskom informacijskom sustavu (ITIS, 2022)

<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>
<b>Vrsta</b>	<i>Cannabis sativa</i> L.

Većina autora opisuje je kao vrlo raznoliku, ali monospecifičnu biljku (McPartland, 2018) s tri podvrste: *Cannabis sativa* subsp. *sativa* (industrijska konoplja), *Cannabis sativa* subsp. *indica* (indijska konoplja) i *Cannabis sativa* subsp. *ruderalis* (divlja konoplja) te četiri varijeteta: *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* var. *sativa*, *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* var. *spontanea*, *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* var. *indica* i *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* var. *kafiristanica* (Cerino i sur., 2021).

Drugi pak autori označavaju konoplju kao polispecifičnu biljku s infraspecifičnim oblicima (Clarke i Merlin, 2013; Emboden, 1974; Hilling i Mahlberg, 2004). U ovom slučaju *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis* su različite vrste iz roda *Cannabis*.

Navedene podvrste prikazane na **Slici 1** ponajprije se razlikuju po morfologiji, omjeru delta-9-tetrahidrokanabinola (THC) i kanabidiola (CBD) te geografskom podrijetlu (McPartland, 2018).



Slika 1 Morfološke razlike podvrsta *Cannabis sativa* L. (McPartland, 2018)

### Izgled biljke

Biljke su uspravne s jednostavnim do dobro razgranatim stabljikama i vrlo varijabilnom visinom ovisno o genetskoj konstituciji i okolišnim čimbenicima, većinom 0,2 do 5 metara, iako sorte u kultiviranim nasadima mogu narasti preko 10 metara. Morfologiju korijena određuju karakteristike tla i dostupnost vode, a korijen je obično bočno razgranati. Glavni korijen u nedostatku vlage može doprijeti do 2,5 m u dubinu. Ženske biljke imaju bolje razvijen korijenov sustav od muških. Stabljika konoplje je uspravna i zelene boje te je šuplja. U početku je zeljasta, a starenjem polako odrvenjava (Butorac, 2009). Stabljika se sastoji od 6 do 15 članaka. Na stabljiku otpada 60 do 65 % mase biljke (Butorac, 2009).

List konoplje je prepoznatljivog prstastog složenog oblika. Sastoji se od peteljke i plojke. Listovi na biljci su smješteni nasuprotno, a na vrhu su poredani naizmjenično (Butorac, 2009). Broj listova varira, a uvijek ih je neparan broj između 3 i 13 i na njih otpada 15 do 20 % mase. Plojka je s donje strane dlakava. Cvjetovi su skupljeni u gornjoj trećini stabljike i čine cvat. Listovi su ovisno o sorti svjetlije ili tamnije zelene boje.

Cvate oko 20 dana u razdoblju od srpnja do kolovoza. Muške i ženske biljke počinju se morfološki razlikovati prije cvatnje. Ženske biljke su niže i gušće, bolje razvijenog korijena, tamnije zelene boje stabljike, svijetlozelenih sjedećih cvjetova bez peteljki, a sastoje se od ovojnog listića, perigona i tučka s dvije njuške. Ženske biljke donose sjeme. Muški cvjetovi su grozdasto raspoređeni na cvjetnim stapkama na vrhu stabljike, a sastoje se od perigona i pet prašnika. Konoplja se oprašuje vjetrom.

Plod konoplje je dvokrilni orašac, koji je ujedno i sjeme, okruglasto-jajastog oblika, glatke i sjajne površine, različite boje od tamno zelene, zelenosmeđe, sive pa čak i crne. Omotan je tvrdom ljuskom koja štiti sjeme (Butorac, 2009). Sjeme se sastoji od ljuske ploda, sjemene ljuske, endosperma i klice (Obranović i Ozmec, 2014). U endospermu je sadržan škrob, a u ostalim dijelovima sjemenke ulje. Po svom kemijskom sastavu sadrži 25-38 % ulja, oko 25 % bjelančevina te značajan udio vlakana, vitamina i mineralnih tvari (Obranović i Ozmec, 2014).

### **2.1.2. Upotreba industrijske konoplje**

Iz različite morfologije muških i ženskih biljaka, proizlazi i različita namjena i ekonomski značaj. Muške biljke imaju veći postotak vlakana bolje kakvoće od ženskih biljaka koje se odlikuju čvrstoćom, elastičnošću, dugotrajnošću i otpornošću na vodu, pa se upotrebljavaju za proizvodnju užadi, konopaca, jedara, platna, izradu odjeće i obuće, cerada, šatora, ribarskih mreža, vatrogasnih cijevi i opreme, vreća, kočnih mehanizama automobila. Drvenasti dio stabljike se koristi za izradu papira (za slikarska platna, cigarete, filtre za čaj i kavu), celuloze, izolacijske trake za električne kondenzatore, te se upotrebljava i za ogrjev. Od konopljinog sjemena dobiva se ulje koje se koristi u prehrani, kozmetici, proizvodnji boja i lakova zbog brzog sušenja.

### **2.1.3. Bioaktivne komponente industrijske konoplje**

Konoplja sadrži brojne medicinski aktivne tvari poput kanabinoida, terpenoida, flavonoida te alkaloida (Appendino i sur., 2011). Do sada je iz industrijske konoplje ekstrahirano 538 prirodnih spojeva u koje spadaju ugljikohidrati, masne kiseline i njihovi esteri, amidi, amini, fitosteroli, fenolni spojevi (Andre i sur., 2016; Pollastro i sur., 2018).

Najaktivniji spojevi konoplje su kanabinoidi, ciklički terpeniski spojevi s 21 atomom ugljika u svojoj strukturi koji se akumuliraju većinom u trihomima ženskih cvjetova (Taura i sur., 2007; Brenneisen, 2007). S obzirom na mjesto nastanka dijele se u tri skupine: endokanabinoidi,

fitokanabinoidi i sintetski kanabinoidi (Cascio i Pertwee, 2014). Ljudski organizam sam sintetizira endokanabinoide anandamid i 2-arahidonoilglicerol (2-AG). Oni se vežu na CB1 receptore živčanog sustava i imaju ulogu neurotransmitera i CB2 receptore imunološkog sustava. Anandamid kasnije biva razgrađen FAAH enzimom, a 2-arahidonoilglicerol MAGL enzimom. Sintetski kanabinoidi su artificijelno stvoreni.

Fitokanabinoidi najviše su zastupljeni u ženskim cvjetovima i u nadzemnim dijelovima biljke, a manje u ostalim dijelovima biljke, odnosno u sjemenu i korijenju (Ross i sur., 2000).

Fitokanabinoidi predstavljaju skupinu od 110 kanabinoida specifičnih samo za konoplju i dijele se u 11 grupa (Scheau i sur., 2020): kanabigerol (CBG), kanabikromen (CBC), kanabidiol (CBD), (-)- $\Delta^9$ -*trans*-tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC), (-)- $\Delta^8$ -*trans*-tetrahidrokanabinol ( $\Delta^8$ -THC), kanabiciklol (CBL), kanabielsoin (CBE), kanabinol (CBN), kanabinodiol (CBND), kanabitriol (CBT) te zadnju skupinu koja uključuje kanabinoide neobične strukture poput onih koji sadrže furanov prsten (Hanuš i sur., 2016; Hill i sur., 2012; Sirikantaramas i Taura, 2017; Izzo i sur., 2009). Kemijski gledano fitokanabinoidi imaju lipidnu strukturu koja sadrži alkilrezorcinol i monoterenske ostatke u svojoj molekuli (Hanuš i sur., 2016; Hill i sur., 2012).

Konoplja sadrži preko dvjesto terpenoida, skupine hlapljivih spojeva koji joj daju karakterističan miris, a uključuju monoterpene, sekviterpene i ostale spojeve nalik terpenima (Small, 2016). Terpenoidi *Cannabis sativa*-e su  $\alpha$ -pinen, limonen,  $\beta$ -mircen, D-linalool, kariofilin oksid i  $\beta$ -kariofilen koji je ujedno i najzastupljeniji u samoj biljci i njezinim ekstraktima (Guennewich i sur., 2007).

Iako je udio monoterpena u samoj biljci veći od sekviterpena, oni tijekom zriobe, sušenja i pohrane ishlape što u konačnici rezultira većim udjelom sekviterpena (Hood i sur., 1973). Terpeni se nalaze u sadržaju trihoma te takav eksudat štiti samu biljku od insekata, vjetra, vanjskih utjecaja, te pospješuju oprašivanje (McPartland i sur., 2000).

Terpeni imaju širok raspon djelovanja, samostalno ili sinergistički s kanabinoidima na neurotransmitterske receptore, ionske kanale, stanične membrane i brojne glasničke sustave, pa im se pripisuju antitumorska, protuupalna, anksiolitička, antidepresivna, kemoprotektivna svojstva, a djeluju i na propusnost kože zbog čega se koriste kao dodaci transdermalnim pripravcima.

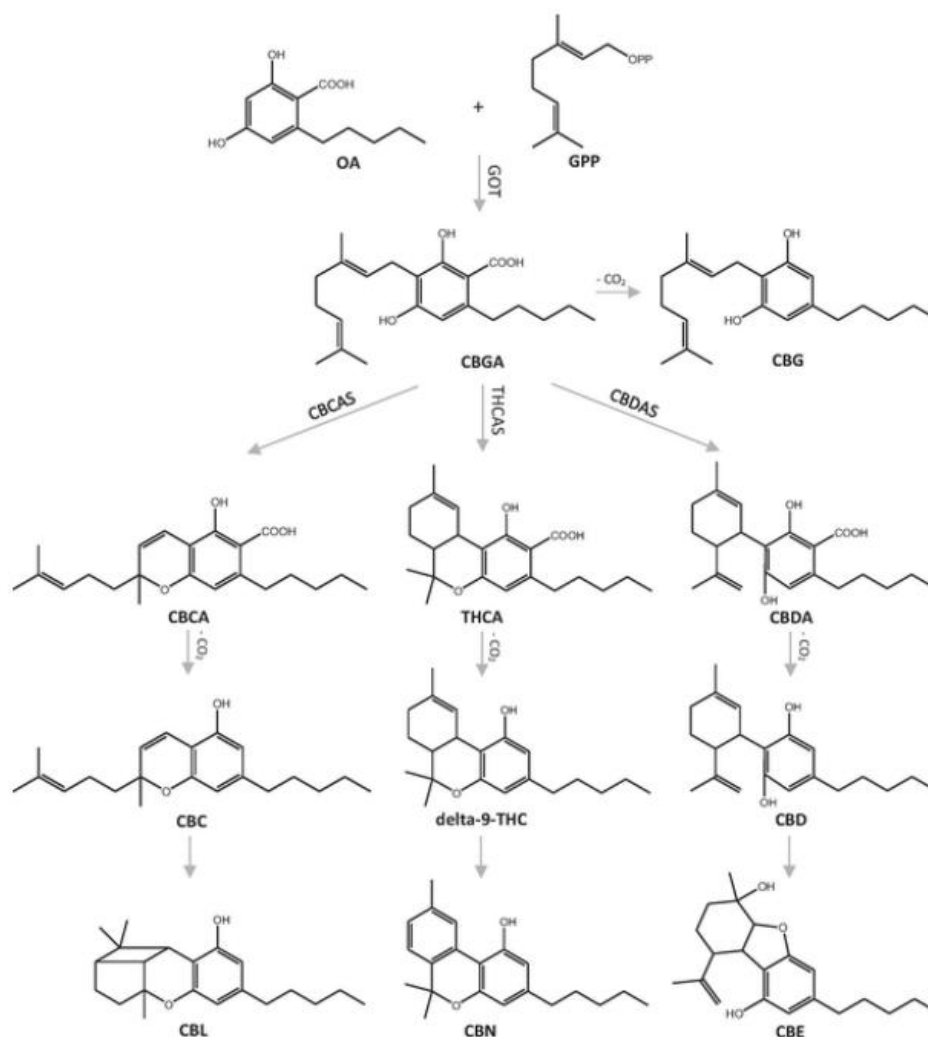


## Biosinteza kanabinoida i terpenoida

U konoplji se kanabinoidi biosintetiziraju i akumuliraju kao kanabinoidne kiseline, te se naknadno dekarboksiliraju u neutralne oblike. Dekarboksilacija kanabinoida u neutralne oblike je neenzimatska i odvija se pod utjecajem topline, svjetla, sušenja i u lužnatom mediju (Small i Cronquist, 1976).

Prvi korak u biosintezi kanabinoida i terpena je zajednički i podrazumijeva spajanje izopentenil pirofosfata (IPP) i dimetilalil pirofosfata (DMAPP) u geranil pirofosfat (GPP) (Reekie i sur., 2017; Rehman i sur., 2016). Spajanjem acetyl-CoA i malonil-CoA nastaje poliketid iz kojega ciklizacijom, aromatizacijom i redukcijom nastaje olivetolična kiselina (OLA) ili njen propilni analog (Shoyama i sur., 1975). Olivetolična kiselina se zatim spaja s geranil difosfatom uz CBGA-sintazu (CBGAS/GOT) i tvori kanabigeroličnu kiselinu (CBGA), koja je prekursor svih ostalih fitokanabinoida (Fellermeier i Zenk, 1998). Reakcija biosinteze kanabinoida zatim može poći u različitim smjerovima. U Reakciji tipa A uz enzim CBCA sintazu nastaje kanabikromen (CBC) iz kojeg reakcijom ciklizacije nastaje kanabiciklol (CBL) (Reekie i sur., 2017).

U reakciji tipa B stvara se CBD čijom oksidacijom nastaje nestabilni spoj CBD-9,10-epoksid iz kojega potom nastaje kanabielsoin (CBE) (Reekie i sur., 2017; Shani i Mechoulam, 1974).  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinolična kiselina ( $\Delta^9$ -THCA) nastaje iz reakcije tipa C uz prisustvo THCA sintaze, dok kanabinol (CBN) nastaje nakon neenzimske oksidacijske aromatizacije  $\Delta^9$ -THC-a (Taura i sur., 1995; Cunningham, 2019). Osnovni koraci u biosintezi fitokanabinoida prikazani su na **Slici 2**.



**Slika 2** Biosinteza fitokanabinoida (Prema: Holy J: Terapijski potencijal medicinske konoplje. *Specijalistički rad*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2018.)

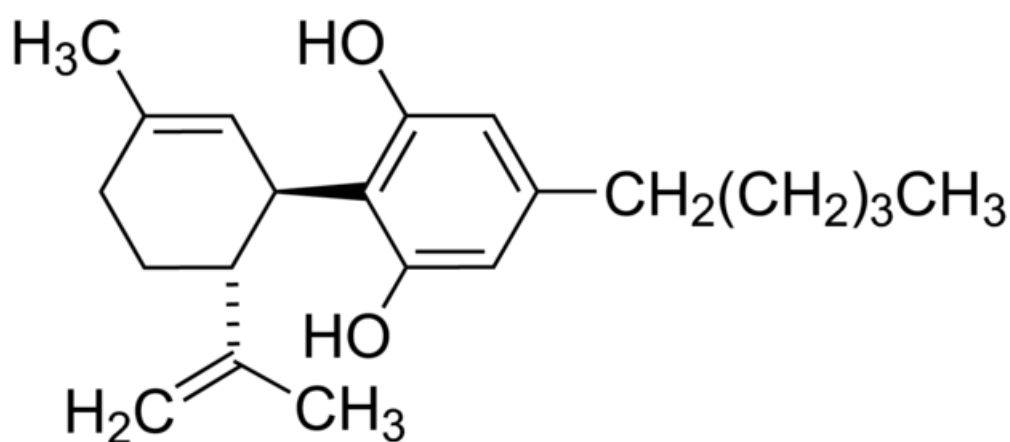
OA-olivetolična kiselina; GPP-geranil pirofosfat; GOT-geranilpirofosfat: olivetolat geraniltransferaza; CBGA-kanabigerolna kiselina; CBG-kanabigerol; CBCAS-sintaza kanabikromenske kiseline; THCAS-sintaza tetrahidrokanabinolne kiseline; CBDAS-sintaza kanabidiolne kiseline; CBCA-kanabikromenska kiselina; THCA-tetrahidrokanabinolna kiselina; CBDA-kanabidiolna kiselina; CBC-kanabikromen; delta-9-THC-  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol; CBD-kanabidiol; CBL-kanabiciklol; CBN-kanabinol; CBE-kanabielsoin

Iako su geni koji kodiraju za sintezu kanabinoida prisutni u svim biljnim stanicama, najviše ih se sintetizira u sekretornim žlijezdama, stoga se genetskim inženjeringom mogu stvoriti vrste biljke bez žlijezdi koje neće sintetizirati kanabinoide. Onaj ostatak kanabinoida koji se sintetizira u tkivima biti će dostatan za zadovoljavanje svoje funkcionalne uloge u biljci (Tomašić Paić, 2012).

U ovom radu više će biti riječ o CBD-u i CBDA ekstrahiranih iz industrijske konoplje.

### 2.1.4. Kanabidiol (CBD)

Kanabidiol (CBD) je predominantni fitokanabinoid industrijske konoplje kemijske formule  $C_{21}H_{30}O_2$  i molekularne mase 314,4617 g/mol (**Slika 3**). Otkriven je 1940. godine kao treći po redu fitokanabinoid. Čini 40 % ekstrakta industrijske konoplje. Za razliku od poznatijeg THC-a, kanabidiol nema psihoaktivno djelovanje. Na sobnoj temperaturi kanabidiol je bezbojna kristalna krutina. U jako bazičnom mediju u prisutnosti zraka oksidira u kinone. U kiselom mediju ciklizira u THC, a isto se događa i prilikom pirolize.



**Slika 3** Kemijska struktura kanabidiola (Preuzeto s: <https://truphys.com/the-therapeutic-value-of-cbd/>)

Kanabis proizvodi CBD-karboksilnu kiselinu istim metaboličkim putem kao i THC, sve do predzadnjeg koraka, gdje CBDA-sintaza obavlja katalizu umjesto THCA-sintaze (Guennewich i sur., 2007).

#### Djelovanje kanabidiola

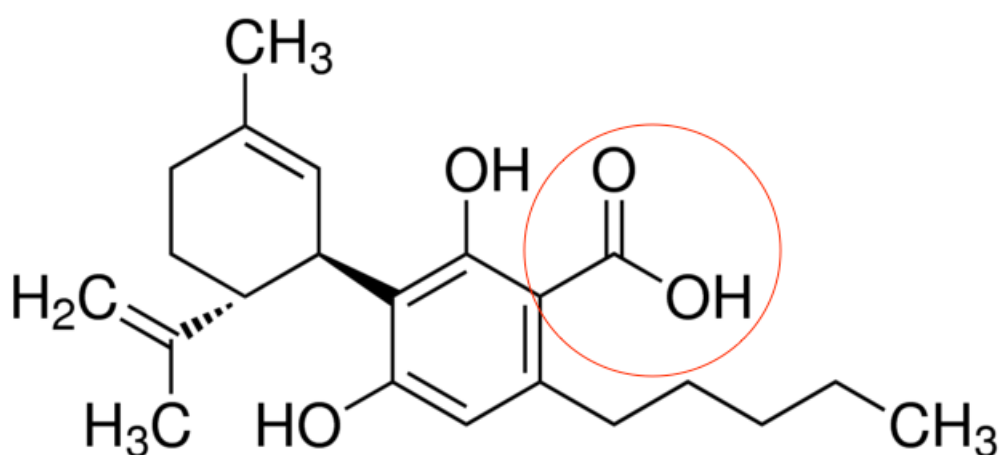
Kanabidiol ima analgetsko djelovanje jer je endokanabinoidni sustav uključen u osjet boli, pomaže pri suzbijanju kroničnih bolova kod malignih oboljenja te se može kombinirati i s analgeticima jer nema neželjenih nuspojava, a čak može spustiti dozu analgetika potrebnih za suzbijanje bolova. CBD potiče metabolizam ugljikohidrata i sprječava prekomjerno lučenje inzulina. Ima protuupalno djelovanje, sprječava razvoj ateroskleroze. Pripravci koji sadrže CBD poput ulja, balzama i krema djeluju blagotvorno, antioksidativno na kožu s obzirom da se najviše endokanabinoidnih receptora nalazi na koži. Pomažu pri liječenju površinskih rana, akni, psorijaze i melanoma.

Neki su autori retrospektivnim studijama dokazali da kanabidiol pomaže pri ublažavanju kronične i neuropatske boli, anksioznosti, depresije, nuspojava kemoterapije (Bonn-Miller i sur., 2014; Gulbransen i sur., 2020; Lucas i Walsh, 2017).

Za sada je na tržištu lijek Epidyolex kojeg propisuje specijalist djeci s Dravet i Lennox-Gastaut sindromom. U oba slučaja se radi o rijetkim i vrlo teškim oblicima epileptičke encefalopatije, većinom farmakorezistentne. Lijek Nabilon koristi se kod onkoloških pacijenata podvrgnutih kemoterapiji da bi olakšao nuspojave iste i također ga propisuje specijalist. Sativex se koristi za ublažavanje simptoma multiple skleroze.

### 2.1.5. Kanabidiolna kiselina (CBDA)

Kanabidiolna kiselina (CBDA) kemijske formule  $C_{22}H_{30}O_4$  je kanabinoid kojeg proizvode stabljike, lišće i cvjetovi konoplje (**Slika 4**). Neenzimskom dekarboksilacijom CBDA, kao što je ranije opisano, nastaje CBD. CBDA djeluje kao inhibitor enzima COX-2 u endokanabinoidnom sistemu, pa joj je djelovanje prvenstveno protuupalno. CBDA se nalazi izvorno u neprerađenim biljkama.



**Slika 4** Kemijska struktura kanabidiolne kiseline (Preuzeto s: <https://truphys.com/the-therapeutic-value-of-cbd/>)

### 2.1.6. CBD ulje

CBD ulje je ulje proizvedeno od cvijeta kanabisa koje najčešće sadrži niske razine THC-a te visoke koncentracije kanabidiola (CBD), jednog od najzastupljenijih kanabinoida. U zemljama Europske unije, pa tako i u Republici Hrvatskoj dozvoljeno je CBD ulje s manje od 0,2 % THC-a (EMCDDA, 2018). Kao i CBD, ni CBD ulje nema psihoaktivno djelovanje.

Da bi se proizvelo ulje s manje THC-a koriste se sorte industrijske konoplje koje genetski sadrže niske razine THC-a, poput "*Carmagnole*" ili primjerice široko uzgajane sorte "*Tiborszallasi*" ili se koriste metode ekstrakcije pri samoj proizvodnji.

Postoje četiri vrste CBD ulja: CBD ulje punog spektra koje sadrži sve spojeve i kanabinoide kanabisa i THC u koncentraciji od 0,3 %, CBD ulje širokog spektra koje također sadrži sve kanabinoide osim THC-a zatim CBD izolati, koji sadrže samo CBD ulje te NANO CBD ulje s manjim molekulama koje je pogodno za topikalnu upotrebu direktno na kožu. Ulje se može pronaći u različitim koncentracijama: CBD ulje 5 %, CBD ulje 10 %, CBD ulje 25 %, itd. Ulja većih ili manjih koncentracija uzimaju se ovisno o tipu bolesti i planu doziranja. Na tržištu su dostupna i CBD ulja s dodatkom MCT ulja koje povećava bioraspoloživost samog CBD-a.

## **2.2. EKSTRAKCIJA**

Ekstrakcija je brza i učinkovita tehnološka operacija koja se temelji na razdvajanju i koncentriranju tvari na osnovu njene različite topljivosti u različitim otapalima, a može se provoditi primjenom različitih otapala i metoda (Šain, 2019).

Dolazi do izdvajanja određene tvari iz čvrste ili tekuće faze prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od drugih komponenata smjese. S obzirom na agregatna stanja dviju faza, ekstrakcija se može podijeliti na ekstrakciju čvrsto-tekuće, tekuće-tekuće i plinovito-tekuće.

Također, postoji niz tehnika ekstrakcija čiji izbor ovisi o ciljanoj komponenti koja se želi izolirati. Dijele se na konvencionalne i suvremene tehnike ekstrakcije. Neke od konvencionalnih metoda su destilacija, vodena ekstrakcija, ekstrakcija nehlapljivim otapalima te ekstrakcija organskim otapalima uključujući maceraciju, perkolaciju i digestiju dok se suvremenim metodama ekstrakcije smatraju ekstrakcija superkričnim fluidima, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom te hladnom plazmom (Mujić i Jokić, 2018).

### **2.2.1. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)**

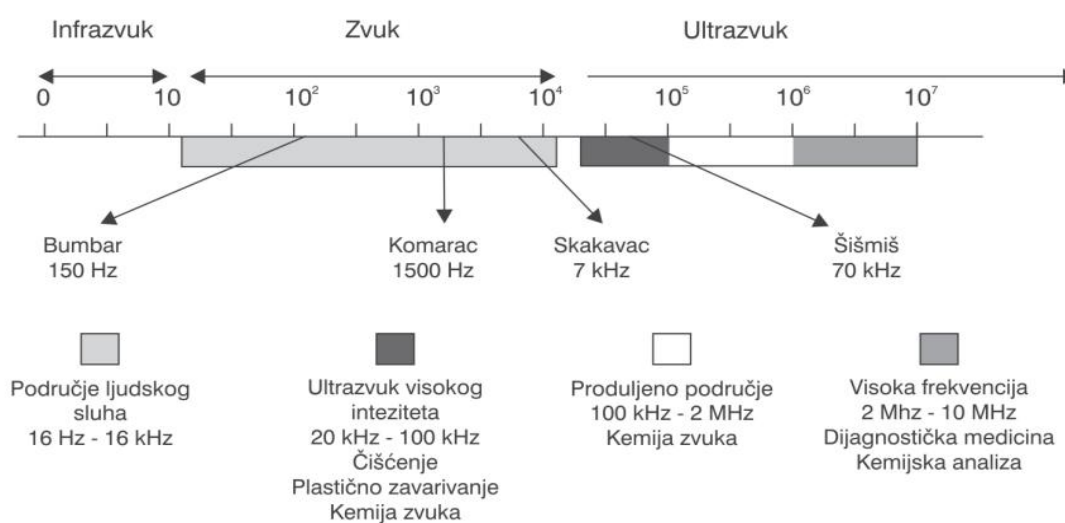
Ultrazvuk je mehanička vibracija u krutom ili tekućem mediju, a frekvencije iznad 20 kHz. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koja

omogućuje visoku reproducibilnost u kraćem vremenu (Caili i sur., 2006), jednostavnije rukovanje, niže temperature te korištenje manjih količina otapala (Chemat i sur., 2008).

Također, UAE je jednostavnija, učinkovitija i jeftinija tehnika ekstrakcije u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije (Wei i Yang, 2014), ali i u usporedbi s mikrovalnom ekstrakcijom i ekstrakcijom superkritičnim fluidom (Sun i sur., 2011).

Djelovanjem ultrazvučnih valova na tekućinu nastaju promjene tlaka koje uzrokuju pojavu kavitacije. Tijekom tretiranja ultrazvukom, kavitacije uzrokuju bubrenje stanica te probijanje staničnih stijenki (Vinatoru, 2001), što povećava brzinu difuzije kroz staničnu stjenku te jednostavnije ispiranje sastojaka stanice. Uz otapalo, temperaturu i pritisak, za optimiziranje procesa potrebno je dobro posložiti faktore ultrazvučnog tretiranja poput frekvencije, vremena tretiranja, snage ultrazvuka te distribucije ultrazvučnih valova.

Ultrazvuk se dijeli na ultrazvuk niskog intenziteta, tzv. dijagnostički ultrazvuk i ultrazvuk visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta je ultrazvuk frekventijskog raspona iznad 2 MHz (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Primjenjuje se kao analitička tehnika jer njegovom primjenom ne dolazi do promjene fizičkih i kemijskih svojstva materijala. Ultrazvuk visokog intenziteta je ultrazvuk nižih frekvencija u rasponu od 20 do 100 kHz i može uzrokovati fizičke i kemijske promjene u ispitivanoj tvari. Područja podjele zvuka prema frekvencijama prikazana su na **Slici 5**.



**Slika 5** Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Herceg i sur., 2009)

### 2.2.2. Klasična maceracija

Izolacija različitih skupina bioaktivnih komponenti iz biljnih materijala se primjenjivala još u drevnim civilizacijama i danas se koristi u gotovo svim sferama prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije.

Postupak maceracije je najstariji način dobivanja biljnih ekstrakata tehnikom ekstrakcije čvrsto-tekuće, a primjenjuje se za biljne materijale koji sadrže termolabilne komponente. Maceracija označava jednokratnu ekstrakciju propisano usitnjenog biljnog materijala s propisanim otapalom na sobnoj temperaturi tako što se biljni materijal prelije, ako nije drugačije propisano, s pet dijelova otapala i u dobro zatvorenoj posudi, zaštićenoj od direktne sunčeve svjetlosti, macerira nekoliko dana do šest tjedana uz mućkanje i miješanje najmanje dva puta dnevno. Potom se dobiveni macerat odvoji od biljne sirovine cijedenjem i naknadnim prešanjem, ostavi dva dana na hladnom mjestu zaštićenom od svjetlosti te filtrira.

Pri proizvodnji macerata primarni je cilj osigurati što bolji prinos i kvalitetu proizvoda što ovisi o nizu čimbenika: vrsti i polarnosti otapala, omjeru količine biljnog materijala i otapala, vremenu ekstrakcije, temperaturi te o kemijskim i fizikalnim karakteristikama samog materijala koji se ekstrahira. Prema tome, važno je osigurati optimalne uvjete za ekstrakciju kako bi se postigao maksimalni ekstrakcijski kapacitet.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**



### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj osam različitih komercijalno dostupnih hladno prešanih biljnih ulja (avokada, badema, konoplje, marelice, jojobe, argana, sezama i ulja sjemenki grožđa) kao otapala u procesu ekstrakcije (maceracije i ultrazvučne ekstrakcije) na sadržaj CBD-a i CBDA iz cvatova industrijske konoplje. Kvantifikacija CBD-a i CBDA provest će se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD). Dodatno će se u dobivenim ekstraktima odrediti i antiradikalna aktivnost pomoću spektrofotometrijske metode na UV/VIS spektrofotometru.

### 3.2. MATERIJALI

Prilikom izrade ovog rada korišteni su osušeni cvatovi industrijske konoplje (Hemp Agro d.o.o, Selci, Hrvatska).

Komerijalna hladno prešana ulja:

- Avokado hladno prešano ulje (Fagron Hrvatska d.o.o.),
- Badem hladno prešano ulje (Fagron Hrvatska d.o.o.),
- Konoplja hladno prešano ulje (Fagron Hrvatska d.o.o.),
- Marelica hladno prešano ulje (Fagron Hrvatska d.o.o.),
- Jojoba hladno prešano ulje (Tehnoproces d.o.o.),
- Arganovo hladno prešano ulje (Tehnoproces d.o.o.),
- Sezam hladno prešano ulje (Tehnoproces d.o.o.),
- Ulje sjemenki grožđa (Tehnoproces d.o.o.).

#### 3.2.1. Kemikalije

Za pripremu uzoraka za HPLC analizu korišten je metanol HPLC čistoće (Baker J.T. (Gliwice, Poljska)) i propan-2-ol (Fisher Scientific, Loughborough, UK).

Pri HPLC analizi za pripremu mobilnih faza korišten je metanol HPLC čistoće (Baker J.T. (Gliwice, Poljska), miliQ voda (Milipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka) i mravlja kiselina 98-100 % (Fisher Scientific, Loughborough, UK). Za usporedbu dobivenih rezultata korišteni su standardi kanabidiola (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,6 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka) i kanabidiolne kiseline (100 µg/mL u metanolu, čistoće 98,3 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka).

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti primjenom DPPH metode korišten je DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dobavljen od proizvođača Sigma Aldrich (SAD).

#### 3.2.2. Uređaji

Uređaji koji su korišteni za izradu ovog rada su:

- Analitička vaga (Crystal - 200 CAL CE, Gibertini Elettronica, Italija),
- HPLC sustav Agilent 1260 Infinity 0 II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD),
- Laboratorijski Mlin Grindomix GM200,
- Spektrofotometar UV/VIS LLG Labware; Model: LLG-uniSPEC 2,
- Sušionik, Thermo Scientific Heratherm,
- Ultrazvučna kupelj ELMA, Elmasonic P 120 H.

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema uzoraka za ekstrakciju

Prije provođenja eksperimenta ekstrakcije odnosno maceracije potpomognute ultrazvukom (UAE) i klasične maceracije primjenom različitih hladno prešanih biljnih ulja kao otapala iz cvatova industrijske konoplje, uzorak se usitnio na laboratorijskom mlinu Grindomix GM 200 pri 5000 okr/min u ukupnom trajanju od jedne minute (**Slika 6**).



**Slika 6** Laboratorijski mlin Grindomix GM 200 s usitnjenim uzorkom (Izvor: autor)

Po 5 g tako dobivenog homogeniziranog uzorka je izvagano u svaku Erlenmeyerovu tikvicu od 50 mL i menzurom dodano po 25 mL ulja (omjer 1:5 kao prema Ph.Eur.; 5 g uzorka na 25 ml ulja) kako je prikazano **Tablicom 2**.

**Tablica 2** Priprema uzoraka za ekstrakciju

Otapalo	UZORCI 1 (EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA UAE)		UZORCI 2 (KLASIČNA MACERACIJA)	
	Količina otapala (mL)	Masa industrijske konoplje (g)	Količina otapala (mL)	Masa industrijske konoplje (g)
Badem hladno prešano ulje	25	5,0054	25	5,0104
Sezam hladno prešano ulje	25	5,0214	25	5,0285
Jोजना hladno prešano ulje	25	5,0055	25	5,0090
Arganovo hladno prešano ulje	25	5,0004	25	5,0103
Ulje sjemenki grožđa	25	5,0205	25	5,0154
Konoplja hladno prešano ulje	25	5,0005	25	5,0175
Avokado hladno prešano ulje	25	5,0120	25	5,0189
Marelica hladno prešano ulje	25	5,0289	25	5,0132

### 3.3.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Pripremljene smjese za ekstrakciju u Erlenmeyerovim tikvicama su se dobro promiješale staklenim štapićem u svrhu homogenizacije i prekrile parafilmom. Prema planu rada, provedeno je osam eksperimenata ekstrakcije kanabinoida odnosno kanabidiola (CBD) i kanabidiolne kiseline (CBDA) iz industrijske konoplje u ultrazvučnoj kupelji (Elma, Elmasonic P 70 H, 37 kHz, 50 W) (**Slika 7**) bez zagrijavanja tijekom 30 minuta. Tikvice s materijalom i otapalom postavljene su na istom razmaku unutar vodene kupelji te tijekom ekstrakcije dodatno miješanje nije primjenjivano.



**Slika 7** Ultrazvučna kupelj ELMA, Elmasonic P 120 H (Izvor: autor)

Nakon iscrpljivanja, dobiveni ekstrakti su profiltrirani preko porculanskog Büchnerovog lijevka na čijoj je perforiranoj površini smješten ravni celulozni filter papir, a sam lijevak je pričvršćen na bocu za odsisavanje dok je vakuum osiguran pomoću vakuum pumpe. To omogućava potpuno razdvajanje tekuće od krute faze, odnosno dobivanje konačnog macerata. **Slika 8** prikazuje sustav vakuum filtracije. Nakon toga su se pripremili uzorci za HPLC analizu.



Slika 8 Sustav vakuum filtracije (Izvor: autor)

### 3.3.3. Klasična maceracija

Preostalih osam uzoraka pripremljenih u Erlenmeyerovim tikvicama ostavljeno je na tamnom i hladnom mjestu da se maceriraju šest tjedana, kako bi u ulje prešle sve komponente iz biljke koje su topljive u ulju (Slika 9). Nakon tog vremena, mali dio uzoraka iz svih macerata je odmah podvrgnut vakuu filtraciji pomoću Büchnerovog lijevka, a potom je pušten na HPLC analizu te je dodatno određena antiradikalna aktivnost. Preostali dio maceriranih uzoraka je podvrgnut procesu dekarboksilacije, vakuu filtraciji, a potom HPLC analizi i određena je antiradikalna aktivnost.



Slika 9 Ekstrakti nakon klasične maceracije (Izvor: autor)

## Dekarboksilacija

Dekarboksilacija je kemijski proces koji se provodi zagrijavanjem biljnog materijala ili ekstrakta pri povišenoj temperaturi pri čemu dolazi do uklanjanja karboksilne skupine i oslobođenja ugljikovog dioksida nekog spoja.

Kako je već ranije spomenuto, kanabinoidi se u industrijskoj konoplji u značajnoj mjeri nalaze u obliku karboksilnih kiselina, a zagrijavanjem pri povišenoj temperaturi prelaze u neutralniji i stabilniji oblik. Stoga su kiselinski oblici kanabinoida preteče traženih dekarboksiliranih oblika koji imaju najveću biološku aktivnost (Kenneth i sur., 2021).

Tikvice s uzorcima su se prekrile aluminijskom folijom i stavile u laboratorijski sušionik na temperaturu od 120 °C u periodu od 30 minuta, a potom su izvađene i ostavljene da se ohlade dok nisu postigle sobnu temperaturu od približno 23 °C.

### 3.3.4. Identifikacija i kvantifikacija kanabinoida HPLC-DAD metodom

Za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti 100 µl macerata otopljeno je u 1,9 mL propan-2-ola, nakon čega je uzeto 100 µL otopine i razrijeđeno do 2 mL s metanolom. Uzorci su filtrirani kroz politetrafluoroetilen (PTFE) filtere s veličinom pora 0,45 µm.

Za analizu kanabinoida u uljnim ekstraktima korišten je HPLC sustav Agilent 1260 Infinity 0 II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) (**Slika 10**) opremljen:

- kvarternom pumpom (G7111B),
- grijačem kolone (G7116A) temperaturnog raspona od 10 do 85 °C,
- DAD detektorom (G7115A),
- autosamplerom (automatski uzorkivač) (G7129A) kapaciteta od 36 viala,
- sakupljačem frakcija (G1364E).



**Slika 10** HPLC sustav Agilent 1260 Infinity 0 II (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2022)

Obrada podataka i upravljanje sustavom vršilo se pomoću računalnog programa ChemStation.

Navedeni sustav korišten je za odvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju kanabinoida iz uljnih ekstrakata. Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone InfinityLab Poroshell 120 C-C18, duljine 150 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm i veličinom čestica 4  $\mu\text{m}$ .

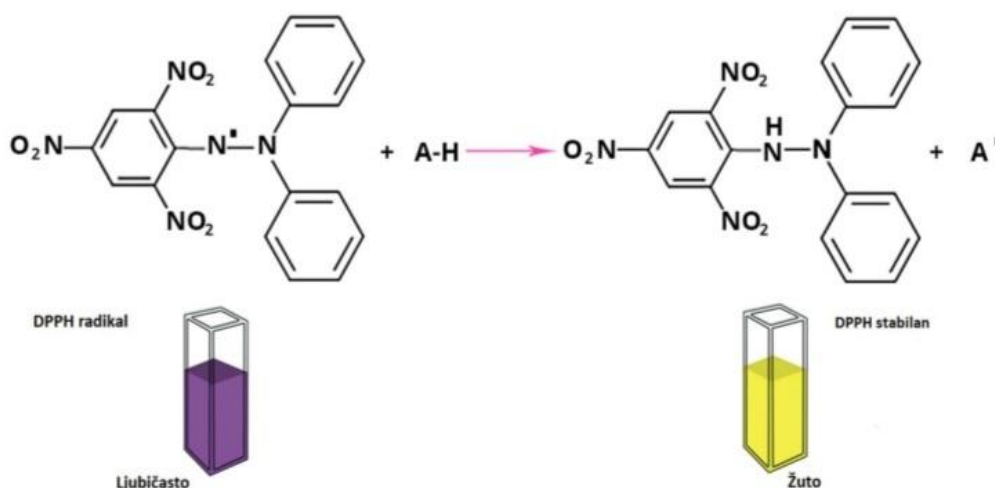
Odvajanje analiziranih spojeva provedeno je gradijentnim eluiranjem pri brzini protoka od 1 mL/min tijekom 67 minuta, pri čemu je kao faza A korištena 0,1 % mravlja kiselina u miliQ vodi (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka), a kao faza B 0,05 % mravlje kiseline u metanolu. Gradijent je postavljen kako slijedi: 0,00-7,05 min 40 % A; 7,05-49,37 min 23 % A; 49,37-67,00 min 5 % A nakon čega je uslijedilo razdoblje od 10 min gdje su se uvjeti analize vratili na početnu vrijednost. Volumen injektiranja bio je 35  $\mu\text{L}$ , valna duljina UV detekcije bila je 210 i 230 nm, a analiza je provedena na 50 °C.

Identifikacija kanabinoida provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara izdvojenih pikova sa standardima, dok je kvantifikacija izvršena pomoću metode vanjskog

standarda preko kalibracijskih krivulja (**Prilog 1**). Vrijeme zadržavanja za CBD je 31,793 min dok je za CBDA 35,253 min. Standardna kalibracijska krivulja za CBD je izrađena u rasponu koncentracija 5,00-100  $\mu\text{g/mL}$ , a za CBDA 1,00-50,00  $\mu\text{g/mL}$ . Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s  $R^2 = 0,99868$  za CBD i s  $R^2 = 0,99921$  za CBDA.

### 3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje antiradikalne aktivnosti DPPH metodom

Antioksidacijska aktivnost u maceratima ispitivana je DPPH metodom koja se zasniva na redukciji DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) slobodnog radikala u prisustvu antioksidansa što se očituje promjenom boje otopine iz ljubičaste u žutu (**Slika 11**). Intenzitet žute boje ovisi o količini antioksidanasa u uzorku i određuje se spektrofotometrijski.



**Slika 11** Redukcija i promjena boje DPPH radikala (preuzeto s:

<http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe>)

DPPH je stabilni slobodni radikal, vrlo pogodan za *in vitro* ispitivanja antiradikalne aktivnosti, koji zbog svog nesporenog elektrona intenzivno apsorbira u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini od 517 nm. Sva mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi kako bi se eliminirao rizik toplinske razgradnje ispitivanih molekula.

Pripremljena je 0,2 mM otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u propan-2-olu tako što je izvagano 0,0059 g slobodnog radikala na analitičkoj vagi (Crystal-200 CAL CE,



Gibertini Elettronica, Italija) i otpipetirano 50 mL propan-2-ola. Dobiveni ekstrakt je razrijeđen tako što je otpipetirano 0,5 mL ekstrakta i 9,5 mL propan-2-ola. U 1,2 mL razrijeđenog ekstrakta koncentracije 1 mg/mL dodano je 0,5 mL svježe pripremljene otopine DPPH. Pripremljene su i slijepe probe maceriranog uzorka tako što je pomiješano 1,2 mL razrijeđenog uzorka i 0,5 mL propan-2-ola. Tako pripremljeni uzorci u epruvetama na navoj ostavljeni su na tamnom mjestu, zaštićeni od svjetlosti, u trajanju od 30 minuta. Nakon isteka vremena, pripremljeni uzorci su preneseni u staklene kivete od optičkog stakla i mjerena je apsorbancija u UV/VIS spektrofotometru (**Slika 12**) pri valnoj duljini od 517 nm. Mjerenja su provedena u tri paralele za svaki razrijeđeni uzorak s otopinom DPPH te po jedna paralela za svaki razrijeđeni uzorak s propan-2-olom. Analizirane su i slijepe probe koje su pripremljene miješanjem 1,2 mL propan-2-ola i 0,5 mL otopine DPPH bez uzorka pri čemu su mjerenja provedena kroz tri paralele.

Identičan postupak je proveden za uzorke koji su odmah nakon maceracije filtrirani i za uzorke koji su nakon provedene maceracije, a prije filtracije bili podvrgnuti procesu dekarboksilacije.



**Slika 12** Spektrofotometar UV/VIS LLG Labware; Model: LLG-uniSPEC 2 (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2022)

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Znanost još uvijek traži odgovore o učinkovitosti kanabinoida i sigurnosti njihove primjene na kožu, međutim, proizvodnja i primjena pripravaka na bazi kanabidiola (CBD) evidentno raste. CBD-u se pripisuje antioksidacijsko, protuupalno i analgetsko djelovanje te povoljan učinak na smanjenje bora i hidrataciju kože. Jedan od najčešće korištenih oblika CBD-a je ulje. Industrijska konoplja u svom prirodnom obliku sadrži kiselinske oblike kanabinoida tipa kanabidiolne kiseline (CBDA), a kada se oni aktiviraju porastom temperature (procesom dekarboksilacije) prelaze u odgovarajući dekarboksilirani analog CBD. U okviru ovog diplomskog rada ispitane su različite tehnike ekstrakcije biljke industrijske konoplje (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*). Od suvremenih metoda ekstrakcije primijenjena je ultrazvučna ekstrakcija, a od klasičnih metoda maceracija, bez i s provedbom dekarboksilacije.

#### **4.1. IDENTIFIKACIJA I KVANTIFIKACIJA KANABINOIDA HPLC-DAD METODOM**

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti postala je metoda izbora za određivanje kanabinoida u složenim matricama jer omogućuje izravnu analizu neutralnih i kiselih kanabinoida, davajući potpuni kemijski profil kanabisa (Citti i sur., 2017) i ne utječe na promjenu strukture kanabinoida pa se s njom mogu analizirati tvari bez prethodne derivatizacije. Provođenjem dekarboksilacije prije instrumentalne analize, pokreće se toplinska razgradnja fitokanabinoidne kiseline CBDA u neutralni analog CBD u svrhu točnosti i profiliranja kanabinoida. Potencijalan nedostatak predstavlja slaba rezolucija u nizu kanabinoida koja je posljedica strukturnih sličnosti analiziranih kanabinoida. Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda detektiran je neutralni kanabinoid CBD u rasponu od 0,04 % do 0,66 % te njegov prirodni kiseli oblik, CBDA u rasponu od 0,21 % do 2,21 % u ekstraktima cvatova industrijske konoplje (**Tablice 3-5**).

**Tablica 3** Udjeli kanabidiola (CBD) i kanabidiolne kiseline (CBDA) u ekstraktima industrijske konoplje (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) dobivenih primjenom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (UAE)

UZORCI	CBD (%)	CBDA (%)
Badem hladno prešano ulje	0,00	1,40±0,01
Sezam hladno prešano ulje	0,00	2,04±0,12
Jojoba hladno prešano ulje	0,00	2,21±0,02
Arganovo hladno prešano ulje	0,00	1,23±0,15
Ulje sjemenki grožđa	0,00	2,13±0,16
Konoplja hladno prešano ulje	0,00	1,96±0,13
Avokado hladno prešano ulje	0,00	1,96±0,03
Marelica hladno prešano ulje	0,00	1,91±0,02

**Tablica 4** Udjeli kanabidiola (CBD) i kanabidiolne kiseline (CBDA) u ekstraktima industrijske konoplje (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) dobivenih primjenom klasične maceracije prije dekarboksilacije

UZORCI	CBD (%)	CBDA (%)
Badem hladno prešano ulje	0,07	0,74
Sezam hladno prešano ulje	0,11	1,03
Jojoba hladno prešano ulje	0,04	0,67
Arganovo hladno prešano ulje	0,04	0,50
Ulje sjemenki grožđa	0,08	0,82
Konoplja hladno prešano ulje	0,08	0,93
Avokado hladno prešano ulje	0,09	1,14
Marelica hladno prešano ulje	0,12	1,55

**Tablica 5** Udjeli kanabidiola (CBD) i kanabidiolne kiseline (CBDA) u ekstraktima industrijske konoplje (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) dobivenih primjenom klasične maceracije nakon dekarboksilacije

UZORCI	CBD (%)	CBDA (%)
Badem hladno prešano ulje	0,53	0,45
Sezam hladno prešano ulje	0,33	0,24
Jojoba hladno prešano ulje	0,66	0,35
Arganovo hladno prešano ulje	0,41	0,33
Ulje sjemenki grožđa	0,61	0,38
Konoplja hladno prešano ulje	0,56	0,40
Avokado hladno prešano ulje	0,63	0,21
Marelica hladno prešano ulje	0,53	0,21

Primjenom različitih tehnika ekstrakcije uočene su razlike u kemijskom sastavu dobivenih ekstrakata iz cvatova biljke *Cannabis sativa* ssp. *sativa*. Naime, kod primjene ultrazvuka, koncentracije CBD-a bile su ispod limita detekcije uređaja što može biti povezano s nedostacima same metode ekstrakcije poput nastanka degradacijskih produkata i slobodnih radikala pod utjecajem ultrazvuka.

U maceratima koncentracije CBD-a su se kretale od 0,04-0,66 %. Za razliku od ovog istraživanja, Dei Cas i sur. (2020) su istraživali kvalitetu dostupnih CBD ulja na talijanskom tržištu. Analizirali su 8201 ulje i pri tome pokazali da najveće varijacije u sastavu ulja ne ovise o metodi ekstrakcije već varijetetima same biljke iz koje je ulje proizvedeno.

Iz **Tablice 4** može se primijetiti da je tehnikom klasične maceracije najviše CBD-a ekstrahirano iz uzoraka s biljnim uljem marelice (0,12 %) i sezama (0,11 %). Istom metodom iz uzoraka s uljem jojobe i argana ekstrahirane su neznatne količine CBD-a (0,04 %). Nakon provedene dekarboksilacije, ekstrahirane su nešto veće količine CBD-a (**Tablica 5**). Iskazani rezultati proizlaze iz činjenice da se kanabinoidi, prirodno prisutni u industrijskoj konoplji, nalaze u obliku kiselina poput kanabidiolne kiseline (CBDA), a porastom temperature tijekom

procesa dekarboksilacije, kako je već ranije spomenuto, prelaze u neutralni dekarboksilirani oblik, kanabidiol (CBD).

Metodom ultrazvučne ekstrakcije ekstrahiran je CBDA (**Tablica 3**) čime je dobiveno više CBDA nego klasičnom maceracijom čvrsto-tekuće prije i nakon procesa dekarboksilacije (**Tablica 4 i 5**) uz prednost minimiziranja vremena. Casiraghi i sur. (2021) ispitivali su ultrazvučnu ekstrakciju kanabinoida za medicinsku upotrebu iz biljke *Cannabis sativa* L., a kao otapalo su koristili maslinovo ulje. U rezultatima su dokazali da je ultrazvučnom ekstrakcijom dobivena ista, ako ne i viša koncentracija CBD-a i THC-a nego klasičnom maceracijom uz značajno kraće vrijeme ekstrakcije. Dekarboksilacija je nužni korak u procesu ekstrakcije kako bi se izbjegla prisutnost kiselih oblika CBDA i THCA (Casiraghi i sur., 2021).

Najveći udio CBDA ultrazvučnom ekstrakcijom dobiven je u uzorcima koji sadrže hladno prešano ulje jojobe ( $2,21 \pm 0,02$  %), ulje sjemenki grožđa ( $2,13 \pm 0,16$  %) te sezama ( $2,04 \pm 0,12$  %) dok su najniže vrijednosti uočene kod ekstrakata s arganovim ( $1,23 \pm 0,15$  %) i bademovim uljem ( $1,40 \pm 0,01$  %) (**Tablica 3**).

Nadalje, može se uočiti da je primjenom klasične ekstrakcije dobivena veća količina CBDA iz uzoraka koji nisu dekarboksilirani u odnosu na količinu CBDA dobivenu u dekarboksiliranim ekstraktima (**Tablica 4 i 5**). Primjerice, količina CBDA ekstrahirana iz uzorka s uljem marelice iznosi 1,55 % dok je količina ekstrahirana iz dekarboksiliranog uzorka svega 0,21 % što je posljedica termolabilnosti molekule CBDA zbog koje dolazi do njene degradacije, odnosno prelaska u CBD oblik.

## 4.2. ODREĐIVANJE ANTIRADIKALNE AKTIVNOSTI DPPH METODOM

DPPH metoda, široko je primjenjivana zbog jednostavnosti i brzine mjerenja antioksidativne sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala i doniranja vodikovih atoma (Shalaby i Shanab, 2013). Jedna od prednosti ove metode je da DPPH radikal reagira s cijelim antioksidansom, a dovoljno vremena omogućuje da reagira i sa slabim antioksidansima. Također se može koristiti u ispitivanjima hidrofilnih i lipofilnih antioksidansa kao i u organskim i vodenim otapalima. Metoda se izvodi u otopini propan-2-ola jer se time olakšava ekstrakcija antioksidansa iz uzorka. Polarnija otapala su pogodnija za ekstrakciju kanabinoida, naročito kanabinoida u kiselom obliku. DPPH radikal reagira s različitim spojevima poput askorbinske kiseline, aromatskih aminokiselina, glutationa itd., a sam reakcijski mehanizam između

antioksidansa i DPPH radikala ovisi o strukturnoj konformaciji antioksidansa (Bondet i sur., 1997).

Značajna antioksidacijska aktivnost industrijske konoplje potječe od polifenola, točnije flavonoida koji djeluju kao antioksidansi (Panche i sur., 2016).

Podaci prikazani u **Tablici 6** dokazuju da svi ispitivani uzorci pokazuju antioksidativno djelovanje koje se očituje u sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, sprječavanju procesa oksidacije i redukciji metalnih iona ciljnih molekula. Antioksidacijska aktivnost ekstrakata u procesu hvatanja slobodnih radikala procijenjena je DPPH metodom koja se temelji na mjerenju sposobnosti redukcije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala u prisutnosti antioksidansa iz uzorka.

**Tablica 6** Rezultati određivanja antiradikalne aktivnosti u uljnim ekstraktima industrijske konoplje (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) dobivenih primjenom klasične maceracije prije i nakon dekarboksilacije

Uzorci	% inhibicije DPPH radikala prije dekarboksilacije	% inhibicije DPPH radikala nakon dekarboksilacije
Badem hladno prešano ulje	96,663	94,752
Sezam hladno prešano ulje	97,201	95,530
Jojoba hladno prešano ulje	91,281	91,399
Arganovo hladno prešano ulje	94,618	94,558
Ulje sjemenki grožđa	99,354	93,586
Konoplja hladno prešano ulje	93,864	99,903
Avokado hladno prešano ulje	91,927	91,281
Marelica hladno prešano ulje	99,677	93,489

Kod određivanja antiradikalne aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje DPPH metodom prije procesa dekarboksilacije uočeno je da najveću antiradikalnu aktivnost imaju biljni ekstrakti koji sadrže hladno prešano ulje marelice (99,677 % inhibicije DPPH radikala) i ulje sjemenki grožđa (99,354 % inhibicije DPPH radikala), a najmanju antiradikalnu aktivnost od

ispitivanih ekstrakata imaju uzorci s hladno prešanim uljem jojobe (91,281 % inhibicije DPPH radikala) i avokada (91,927 % inhibicije DPPH radikala) (**Tablica 6**).

Nadalje, kod određivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakta industrijske konoplje DPPH metodom nakon provedenog procesa dekarboksilacije najvišu antiradikalnu aktivnost pokazuju ekstrakti s hladno prešanim uljem konoplje (99,903 % inhibicije DPPH radikala) i sezama (95,530 % inhibicije DPPH radikala), a najnižu uzorci s uljem avokada (91,281 % inhibicije DPPH radikala) i jojobe (91,399 % inhibicije DPPH radikala).

Također je vidljivo da su vrijednosti reduciranog DPPH radikala u uzorcima koji sadrže hladno prešano ulje badema, sezama, argana, sjemenki grožđa, avokada i marelice blago niže ili opadaju nakon dekarboksilacije u odnosu na vrijednosti u uzorcima prije procesa dekarboksilacije.

Kod uzorka s hladno prešanim uljem konoplje nakon dekarboksilacije značajno je veći udio inhibiranog DPPH radikala te blago veća vrijednost kod uzorka s uljem jojobe što znači da ta ulja prirodno sadrže neke spojeve koji degradiraju pod utjecajem topline ili prelaze u oblike s većom antioksidacijskom aktivnošću.



## **5. ZAKLJUČCI**

Identifikacija i kvantifikacija kanabinoida prisutnih u dobivenim ekstraktima, u svim uzorcima, provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (HPLC-DAD).

Također je provedena analiza određivanja antiradikalne aktivnosti uljnih ekstrakata dobivenih primjenom klasične maceracije (prije i nakon dekarboksilacije) pomoću spektrofotometrijske metode.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- prema dobivenim rezultatima utvrđen je značajan utjecaj procesnih parametara inovativne tehnike ekstrakcije UAE i klasične ekstrakcije na sadržaj ciljnih spojeva, kanabidiola i kanabidiolne kiseline, u ekstraktima industrijske konoplje,
- HPLC-DAD metodom identificirano je prisustvo CBDA u svim uzorcima dobivenim UAE tehnikom i klasičnom maceracijom (prije i nakon dekarboksilacije) dok je prisustvo CBD-a identificirano samo u uzorcima dobivenim klasičnom maceracijom,
- klasična maceracija s termičkom dekarboksilacijom se pokazala najučinkovitijom tehnikom za ekstrakciju kanabidiola (CBD) dok se UAE pokazala učinkovitom za ekstrakciju kanabidiolne kiseline (CBDA),
- najveći udio CBD-a iz svih uzoraka, dobiven je primjenom klasične maceracije s dekarboksilacijom i iznosi 0,66 %, a najveći udio CBDA je dobiven UAE tehnikom i iznosi  $2,21 \pm 0,02$  % u uzorcima s hladno prešano ulje jojobe,
- od osam različitih komercijalno dostupnih hladno prešanih biljnih ulja korištenih kao otapala, u ovom istraživanju, analizirani kanabinoidi su pokazali najbolju topljivost u hladno prešanom ulju jojobe,
- DPPH metodom je utvrđeno da svi ispitani uzorci dobiveni klasičnom maceracijom, prije i nakon dekarboksilacije, pokazuju antioksidativno djelovanje,
- vrijednosti reduciranog DPPH radikala kod većine uzoraka su blago niže ili opadaju nakon provedene dekarboksilacije,
- od svih macerata prije provedbe dekarboksilacije, uzorak s hladno prešanim uljem marelice pokazuje najbolju sposobnost inhibicije DPPH radikala od 99,677 %, a od dekarboksiliranih macerata, uzorak s uljem konoplje od 99,903 %.

## **6. LITERATURA**

- Andre CM, Hausman JF, Guerriero G: *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science* 7:19, 2016.
- Appendino G, Chianese G, Tagliatela-Scafati O: Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *Current Medical Chemistry* 18:1085-1099, 2011.
- Babić J, Ačkar Đ, Jokić S, Strelec I, Jozinović A: Katalog opreme (Equipment catalogue), Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022. <http://www.ptfos.unios.hr/images/dokumenti/katalog-opreme-ptf-2022.pdf>
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *Academic Press* 30:609-615, 1997.
- Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A: *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology* 227:300-315, 2018.
- Bonn-Miller MO, Boden MT, Bucossi MM, Babson KA: Self-reported cannabis use characteristics, patterns and helpfulness among medical cannabis users. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse* 40:23-30, 2014.
- Brenneisen R: Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. U *Marijuana and the Cannabinoids*, str. 17-49. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2007.
- Butorac J: *Predivo bilje*. Kugler d. o. o., Zagreb, 2009.
- Caili F, Haijun T, Quanhong L, Tongyi C, Wenjuan D: Ultrasound assisted extraction of xyloglucan from apple pomace. *Ultrasonic Sonochemistry* 13:511-516, 2006.
- Cascio MG, Pertwee RG: Known Pharmacological Actions of Nine Nonpsychotropic Phytocannabinoids'. U *Handbook of Cannabis*, str. 137-156. Oxford Academic, Oxford, 2014.
- Casiraghi A, Gentile A, Casagni E, Roda G, Minghetti P: Ultrasound-assisted extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* for medicinal purpose. U *La chimica guida lo sviluppo sostenibile*, str. 1-1. Società Chimica Italiana, Milano, 2021.
- Cerino P, Buonerba C, Cannazza G, D'Auria J, Ottoni E, Fulgione A, Di Stasio A, Pierri B, Gallo A: A review of hemp as food and nutritional supplement. *Cannabis and cannabinoid research* 6:19-27, 2021.
- CFIA, Canadian Food Inspection Agency: The Biology of *Cannabis sativa* L. (Cannabis, hemp, marijuana). CFIA, 2020.
- Chemat F, Tomao V, Virot M: Ultrasound assisted extraction in food analysis. U *Handbook of food analysis instruments*, str. 85-103. Semih Ötles, Boca Raton, 2008.

- Citti C, Braghiroli D, Vandelli MA, Cannazza G: Pharmaceutical and biomedical analysis of Cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 147:565-579, 2017.
- Clarke RC, Merlin MD: Cannabis: Evolution and Ethnobotany. University of California Press, Berkeley, 2013.
- Cunningham CW: Plant-Based Modulators of Endocannabinoid Signaling. *Journal of Natural Products* 82:636-646, 2019.
- Dei Cas M, Casagni E, Casiraghi A, Minghetti P, Fornasari DMM, Ferri F, Arnoldi S, Gambaro V, Roda G: Phytocannabinoids Profile in Medicinal Cannabis Oils: The Impact of Plant Varieties and Preparation Methods. *Frontiers in Pharmacology* 11:570616, 2020.
- Drmić H, Režek Jambrak A: Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 2:22-33, 2010.
- EMCDDA, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction: Cannabis legislation in Europe: an overview. Publications Office of the European Union. EMCDDA, Luxembourg, 2018.
- Emboden WA: Cannabis-A Polytypic Genus. *Economic Botany* 28:304-310, 1974.
- Fellermeier M, Zenk MH: Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Letters* 427:283-5, 1998.
- Gulbransen G, Xu W, Arroll B: Cannabidiol prescription in clinical practice: an audit on the first 400 patients in New Zealand. *BJGP Open* 4, 2020.
- Guennewich N, Page JE, Köllner TG, Degenhardt J, Kutchan TM: Functional expression and characterization of trichome-specific (-)-limonene synthase and (+)- $\alpha$ -pinene synthase from *Cannabis sativa*. *Natural Product Communications* 2:223-232, 2007.
- Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliabata-Scafati O, Appendino G: Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports* 33:1357-1392, 2016.
- Herceg Z, Brnčić M, Režek Jambrak A, Rimac Brnčić S, Badanjak M, Sokolić I: Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* 59:65-69, 2009.
- Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ: Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacology & Therapeutics* 133:79-97, 2012.
- Hillig KW, Mahlberg PG: A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American Journal of Botany* 91:966-975, 2004.
- Holy J: Terapijski potencijal medicinske konoplje. *Specijalistički rad*. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2018.

- Hood LV, Dames ME, Barry GT: Headspace volatiles of marijuana. *Nature* 242:402-403, 1973.
- ITIS, Integrated Taxonomic Information System, [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) pristupljeno 18.09.2022.
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R: Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences* 30:515-527, 2009.
- Lucas P, Walsh Z: Medical cannabis access, use, and substitution for prescription opioids and other substances: A survey of authorized medical cannabis patients. *International Journal of Drug Policy* 42:30-35, 2017.
- McPartland JM: *Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. Cannabis and Cannabinoid Research* 3:203-212, 2018.
- McPartland JM, Clarke RC, Watson DP: *Hemp diseases and pests: management and biological control*. CABI, Wallingford, 2000.
- Mujić I, Jokić S (2018) Ekstrakcija i ekstraktori biljnih sirovina. Studio HS internet d.o.o., Osijek.
- Obranović M, Ozmec N (2014) Konoplja, praktični savjeti za zdravlje i ljepotu. Planetopija, Zagreb.
- Olejar KJ, Hatfield J, Arellano CJ, Gurau AT, Seifried D, Heuvel BV, Kinney CA: Thermochemical conversion of cannabis biomass and extraction by pressurized liquid extraction for the isolation of cannabidiol. *Industrial Crops and Products* 170:113771, 2021.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR: Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science* 5: 1-15, 2016.
- Pollastro F, Minassi A, Fresu LG: Cannabis Phenolics and their Bioactivities Current Medicinal Chemistry. *Bentham Science Publishers* 25:1160-1185, 2018.
- Reekie TA, Scott MP, Kassiou M: The evolving science of phytocannabinoids. *Nature Reviews Chemistry* 2:0101, 2017.
- Rehman R, Hanif MA, Mushtaq Z, Al-Sadi AM: Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. *Food Reviews International* 32:117-160, 2016.
- Ross SA, Mehmedic Z, Murphy TP, Elsohly MA: GC-MS analysis of the total delta9-THC content of both drug- and fiber-type cannabis seeds. *Journal of Analytical Toxicology* 24:715-717, 2000.
- Russo EB, Jiang HE, Li X, Sutton A, Carboni A, del Bianco F, Mandolino G, Potter DJ, Zhao YX, Bera S, Zhang YB, Lü EG, Ferguson DK, Hueber F, Zhao LC, Liu CJ, Wang YF, Li CS:

- Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *Journal of Experimental Botany* 59:4171-4182, 2008.
- Scheau C, Badarau I, Mihai L, Scheau A, Costache DO, Constantin C, Calina D, Caruntu C, Costache R, Caruntu A: Cannabinoids in the pathophysiology of skin inflammation. *Molecules* 25:652-675, 2020.
- Shani A, Mechoulam R: Cannabielsoic acids: Isolation and synthesis by a novel oxidative cyclization. *Tetrahedron* 30:2437-2446, 1974.
- Shalaby EA, Shanab SMM: Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 7:529-538, 2013.
- Shoyama Y, Yagi M, Nishioka I, Yamauchi T: Biosynthesis of cannabinoid acids. *Phytochemistry* 14:2189-2192, 1975.
- Sirikantaramas S, Taura F: Cannabinoids: biosynthesis and biotechnological applications. U *Cannabis sativa L.-Botany and Biotechnology*, str. 183-206. Springer International Publishing, Champaign, 2017.
- Small E: *Cannabis: A complete guide*. CRC Press, Boca Raton, 2016.
- Small E, Cronquist A: A practical and natural taxonomy for Cannabis. *Taxon* 25:405-435, 1976.
- Sun Y, Liu D, Chen J, Ye X, Yu D: Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- $\beta$ -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry* 18:243-249, 2011.
- Šain A: Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2019.
- Taura F, Morimoto S, Shoyama Y, Mechoulam R: First direct evidence for the mechanism of  $\Delta^9$ -THC biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 117:9766-9767, 1995.
- Taura F, Sirikantaramas S, Shoyama Y, Morimoto S: Phytocannabinoids in Cannabis sativa: recent studies on biosynthetic enzymes. *Chemistry and Biodiversity* 4:1649-1663, 2007.
- Tomašić Paić A: Svojstva kanabinoidnih receptora ljekovite biljke *Cannabis sativa*. *Medicinski Vjesnik* 44:147-162, 2012.
- Vinatoru M: An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry* 8:303-313, 2001.
- WEB 1 <https://truphys.com/the-therapeutic-value-of-cbd/> pristupljeno 17.09.2022.
- WEB 2 <http://chimactiv.agroparistech.fr/en/aliments/antioxydant-dpph/principe> pristupljeno 17.09.2022.

Wei MC, Yang YC: Extraction characteristics and kinetic studies of oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis diffusa* under ultrasound-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology* 130:182-192, 2014.

Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (2019) *Narodne novine* 39 (NN 39/2019)



## **7. PRILOZI**

**Prilog 1** HPLC-DAD kromatogram određivanja kanabidiola i kanabidiolne kiseline