

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Srovnání vybraných kvalitativních a kvantitativních
charakteristik extraktů medicijního konopí
připravených různými extrakčními metodami**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Fridolín Tlustý

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Adéla Fraňková, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Srovnání vybraných kvalitativních a kvantitativních charakteristik extraktů medicínálního konopí připravených různými extrakčními metodami" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval Ing. Adéle Fraňkové, PhD. Za odborné vedení, cenné rady, vstřícný přístup a čas, který mi během zpracování práce věnovala. Dále děkuji Ing. Janu Tauchenovi, PhD, za podporu během realizace experimentů.

Srovnání vybraných kvalitativních a kvantitativních parametrů extraktů medicijního konopí připravených různými extrakčními metodami

Souhrn

Pojem medicijní konopí je v povědomí lidí už několik let a trh zaplavuje nepřehledné množství extraktů a jiných výrobků z konopí. Nejen u kanabinoidů, ale i u dalších látek obsažených v rostlinách konopí bylo zjištěno velké množství benefitů pro lidské zdraví. Z rostlin konopí se pomocí extrakčních technik získávají konopné extrakty. Kvalita a kvantita účinných látek v extraktech je závislá na genotypu konopí a zároveň i na způsobu jakým jej extrahujeme.

Proto byly v této práci sledovány vybrané kvalitativní a kvantitativní parametry extraktů medicijního konopí odrůdy McLove. Použité konopí bylo skladováno za různých podmínek a extrahováno různými technikami. Porovnávány byly extrakty připravené pomocí super kritické fluidní extrakce (SFE), při rozdílných tlacích (130/210 barů). K extrakci byla využita i macerace v ethanolu nebo extrakce pomocí butanu i dimethyletheru (DME). Obsah účinných látek ve finálních extraktech byl analyzován metodou HPLC-UV. Sledován byl například i vliv stavu rostlinného materiálu před extrakcí na výsledný obsah sledovaných kanabinoidů. Tento obsah se mezi variantami statisticky významně nelišil. Jediné, co mělo v tomto ohledu vliv, byl extrakční tlak použitý u super kritické fluidní extrakce na materiál, který byl usušený a následně zamražený.

Podle statistického vyhodnocení dat je zřejmé, že výběr rozpouštědla a extrakční techniky má zásadní vliv na výsledný spektrum kanabinoidů v extraktu. Vidět to můžeme na příkladu extrakce CBDVA mezi butanem a ethanolem. Díky technice extrakce ethanolem bylo vyextrahováno skoro 4x více kanabinoidu CBDVA než technikou používající butan.

Další postup extrakce kanabinoidů, by se měl nadále zaměřovat na problematiku farmaceutického přípravku. Takový přípravek nesmí ohrožovat zdraví uživatele, a musí být tedy regulatorně schválen.

Klíčová slova: extrakční metody, kanabinoidy

Comparison of selected qualitative and quantitative properties of cannabis extracts produced by different extraction techniques

Summary

The concept of medicinal cannabis has been known to people for several years and the market is flooded with an inexhaustible amount of extracts and other cannabis products. Not only cannabinoids, but also other substances contained in cannabis plants have been found to have a large number of benefits for human health. Hemp extracts are obtained from cannabis plants using extraction techniques. The quality and quantity of active substances in the extracts depends on the genotype of cannabis and also on the way in which we extract it.

Therefore, selected qualitative and quantitative parameters of McLove medicinal cannabis extracts were monitored in this work. Used hemp was stored under different conditions and extracted by different techniques. Extracts prepared by super critical fluid extraction (SFE) at different pressures (130/210 bar) were compared. Maceration in ethanol or extraction with butane and dimethyl ether (DME) were also used for the extraction. The content of active substances in the final extracts was analyzed by HPLC-UV method. For example the state in which the plant material was before extraction and its effect on the final content of the monitored cannabinoids was monitored as well. This content did not differ significantly between the statistical variants. The only effect in this regard was the extraction pressure used in the super critical fluid extraction on the material, which was dried and subsequently frozen.

From the statistical evaluation of the data, it is clear that the choice of solvent and extraction technique has a major impact on the resulting spectrum of cannabinoids in the extract. We can see this in the example of CBDVA extraction between butane and ethanol. Thanks to the ethanol extraction technique, almost 4 times more cannabinoid CBDVA was extracted than with the butane technique.

Further cannabinoid extraction should continue to focus on pharmaceutical issues. Such a product must not endanger the health of the user and must be regulatory approved.

Keywords: extract metod, cannabinoids

Obsah

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Konopí (Cannabis sativa L.)	11
3.1.1	Historie a současnost	12
3.2	Legislativa konopí	13
3.2.1	Aktuální legislativa v Evropě	13
3.2.2	Legislativa pro Českou republiku	14
3.3	Použití medicijního konopí	15
3.3.1	Onemocnění, na které je možno předepsat medicijní konopí	15
3.3.1.1	Chronické bolesti	15
3.3.1.2	Neurologie	16
3.3.1.3	Onkologie	16
3.3.1.4	Dermatovenerologie	17
3.3.1.5	Psychiatrie	17
3.3.2	Formy aplikace konopných drog	17
3.3.2.1	Aplikace inhalací	17
3.3.2.2	Aplikace perorálně	18
3.3.2.3	Transdermální aplikace	18
3.4	Biologicky aktivní látky konopí	19
3.4.1	Fytokanabinoidy	19
3.4.1.1	Kanabinol (CBN)	21
3.4.1.2	Kanabidiolová kyselina (CBDA)	22
3.4.1.3	Kanabidiol (CBD)	22
3.4.1.4	Tetrahydrokanabinolová kyselina (THCA)	23
3.4.1.5	Kanabinolová kyselina (CBNA)	24
3.4.1.6	Kanabigerol (CBG)	24
3.4.1.7	Kanabichromen (CBC)	24
3.4.1.8	Tetrahydrokanabivarin (THCV)	25
3.5	Výroba konopných extraktů	25
3.5.1	Macerace	25
3.5.2	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	26
3.5.3	Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (ASE)	26
3.5.4	Rozpouštědla	27

3.5.4.1	Ethanol	27
3.5.4.2	Methanol.....	27
3.5.4.3	Butan	28
3.5.4.4	Chloroform	28
3.5.4.5	Hexan	28
3.5.4.6	Dimethylether (DME)	29
4	Materiál a metodika	30
4.1	Rostlinný materiál použitý k extrakci	30
4.2	Příprava rostlinného materiálu	30
4.3	Příprava extraktů	30
4.3.1	Extrakční metoda č. 1 - Macerace	30
4.3.2	Extrakční metodad č 2 a 3 - butan a dimethylether (DME).....	31
4.3.3	Extrakční metoda č. 4 kritická fluidní extrakce (extrakce CO ₂).....	31
4.4	Příprava extraktů pro analýzu obsahu kanabinoidů	31
4.5	Chromatografická analýza extraktů.....	31
4.6	Validace metody HPLC-UV	32
4.7	Statistické vyhodnocení	32
5	Výsledky	33
5.1	Obsah kanabinoidů v extraktech.....	33
5.2	Vliv stavu rostlinného materiálu na finální extrakt kanabinoidů.....	34
5.3	Složení extraktů kanabinoidů.....	34
5.3.1	Kanabinoidy ve formě kyselin	36
5.3.2	Majoritní kanabinoidy	37
5.3.3	Minoritní kanabinody	38
6	Diskuze	39
7	Závěr	42
8	Literatura.....	43
9	Seznam použitých zkratek a symbolů	52

1 Úvod

Konopí seté je více a více zkoumáno pro své léčebné účinky. Je to tedy návrat konopí do tradiční medicíny (Russo et al. 2015)? Svědčí o tom narůstající počet studií, které se zabývají extrakcí a účinky kanabinoidů jako je například CBD. Například CBD tvoří z 98 % antikonvulzivní (křeče potlačující) léčivo, které bylo v červnu 2018 schváleno FDA (Moreno et al. 2020). Aby se však konopí mohlo naplno vrátit jako uznávaný a doporučovaný farmaceutický přípravek, je zapotřebí, aby získalo regulační schválení na území států EU. Avšak v současné době neexistuje ucelený standardizovaný postup extrakce konopných kanabinoidů za účelem léčby daného onemocnění. Výběrem extrakčního činidla totiž ovlivňujeme složení kanabinoidů ve finálním extraktu (Russo et al. 2015).

Na oblibě získávají i konopné výrobky jako je konopný čaj. Ten je bohužel neúčinný, neboť ani díky horké vodě nevyextrahujeme kanabinoidy, které jsou lipofilní povahy. Oproti tomu olejové přípravky, které obsahují například výše zmiňovaný CBD, opravdu kanabinoidy nabídnout mohou, ale stále je potřeba daný olej nějak standardizovat (Pacifci et al. 2017).

Vliv na výsledný extrakt tedy nemá jen samotné extrakční činidlo. To nám samo o sobě nabízí například volbu polarity, a tím selektivity. Důležitý je i samotný postup extrakce. K rozdílným finálním extraktům dochází při dané technice i změnou teploty, či v případě SFE použitého tlaku. Měla by se tedy používat organická rozpouštědla, která nebudou toxická a neohrozí tak koncového uživatele (Pacifci et al. 2017).

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cíl práce

Cílem práce je porovnat obsah a složení kanabinoidů v konopných extraktech získaných různými extrakčními technikami.

Hypotéza

Extrakční metody mají vliv na obsah kanabinoidů v extraktu.

3 Literární rešerše

3.1 Konopí (*Cannabis sativa* L.)

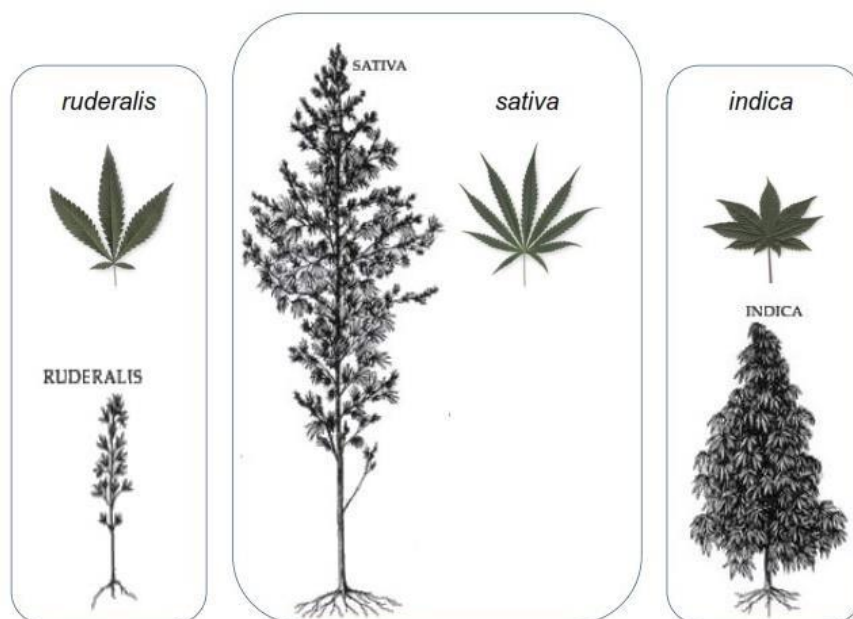
Cannabis sativa L., je jednoletá dvoudomá rostlina. Jendá se o široce rozšířený botanický druh vyskytující se planě, avšak je pěstována i člověkem. Než se vytvořila samostatná skupina *Cannabaceae* (konopovité), bylo konopí zpočátku zařazováno do řádu *Urticaceae* (kopřivovité), čeledi morušovitých (*Moraceae*). Konopí dále rozlišujeme na další tři druhy, které se pravděpodobně vyvinuly na základě pěstebních technik a selekce člověka (Rätsch 1994).

Prvním je konopí seté (*Cannabis sativa* L.), které odborně popsal švédský botanik Carolus Linnaeus (Carl Linné) v roce 1737 (Rätsch 1994). Samčí rostliny jsou zpravidla štíhlejší, vyšší a dříve dozrávají. Můžeme najít i jednodomé konopí vytvářející na jedné rostlině květenství obou pohlaví. Ojediněle se vyskytují i typy hermafroditů, které jsou neplodné. Až výběrové dlouholeté šlechtění dalo vzniku jednodomým variantám, jejichž význam v současném produkčním zemědělství převládá (Miovský a spol. 2008).

Dalším druhem je konopí indické (*Cannabis indica* L.). Rostlina dosahuje výšky pouze 1,2 metru. Oproti ostatním druhům, obsahuje tento druh velké množství psychoaktivních látek. V Indii ho roku 1785 popsal francouzský biolog Jean Baptiste de Lamarck.

Posledním druhem je konopí plané nebo také rumištní (*Cannabis ruderalis* L.). Jedná se o poměrně nižší rostlinu dorůstající výšky okolo 60 centimetrů, s tenkým stonkem a stejně jako u konopí setého, i zde je nízký obsah psychoaktivních látek. Poslední známý druh objevil v roce 1924 botanik Janischewsky.

Všechny zmíněné druhy konopí jsou vyobrazeny pod tímto textem (viz Obrázek 1).



Obrázek 1 Rostliny a listy druhů konopí (<http://canntelligence.com/cannabis-and-phytocannabinoids/>)

3.1.1 Historie a současnost

Usuzujeme, že konopí s největší pravděpodobností pochází z území centrální Asie odkud se lidským přičiněním rozšířilo do celého světa.

O pěstování konopí v evropských zemích jsou doloženy důkazy například z Německa, Rakouska nebo Švýcarska. Již velmi brzy byl totiž objeven potenciál vláken stonku této rostliny. Také semena konopí byla našimi předky konzumována již od počátku, kdy byla důležitým zdrojem bílkovin a oleje, který se používal například v lampách ke svícení (Bercea 2019).

Důvodem jeho rozšíření byl tedy bezesporu jeho užitek z pěstování jako olejno-přádné rostliny a vysoká schopnost adaptace na změnu podmínek pěstování. Vývoj civilizace a mořeplavby je díky tomu s konopím úzce svázán (Valíček 2000).

V Severní Americe nelze nezmínit v souvislosti s konopím jméno Harry J. Anslinger. Byl to vedoucí amerického Úřadu pro narkotika, který prosadil zákaz marihuany v osmačtyřiceti státech USA, jako reakci na narůstající počet užívání této lehké drogy v souvislosti s prohibicí alkoholu na začátku dvacátého století (Valíček 2000).

Konopí seté je po staletí známo svými nepopíratelně léčivými schopnostmi. V současnosti se v klinickém světě aplikace konopí pohybuje od roztroušené sklerózy po epilepsii, neuropatickou bolest, artritidu, nevolnost a zvracení, které je způsobeno chemoterapií.

Konopí je také využíváno k stimulaci chuti k jídlu při onemocnění HIV/AIDS. Dále se využívá u pacientů s depresemi, úzkostnými stavy, poruchy spánku, psychosy, glaukomu nebo Touretteho syndromu (Whiting et al. 2015). I přes tyto všechny zdravotní benefity je konopí označováno za nejkontroverznější rostlinu dnešní doby. Jedná se totiž o nejrozšířenější lék, který je zneužíván kvůli svým intoxikačním účinkům. Tyto intoxikační účinky vyplývají z psychotropní aktivity nejznámější složky, a tou je Δ -9-trans-tetrahydrokanabinol (9-THC nebo jednoduše THC) (Mercoline et al. 2008).

3.2 Legislativa konopí

V současné době je konopí podle Světové zdravotnické organizace a její komise Expert Committee on Drug klasifikováno hned ve dvou kategoriích. Stalo se tak kvůli dokumentaci z roku 1961, kdy WHO zadokumentovalo konopí jako takové a samostatně ještě psychoaktivní látku THC. Konopí tedy nalezneme v kategorii I. i v kategorii IV., kam patří ty nejnebezpečnější látky bez výrazného lékařského a terapeutického využití, jako je například heroin. Expertní komise WHO se v roce 2019 rozhodla doporučit OSN, ať je marihuana z výše zmíněné kategorie IV. vymazána (Mayor 2019).

3.2.1 Aktuální legislativa v Evropě

EU nemá vlastní úpravu klasifikace drog a tuto klasifikaci přejímá od OSN. Sankce za drogové delikty přenechává Evropská Unie na uvážení členského státu, který má své vlastní zákony (Zábranský a spol. 2006).

Již několik zemí Evropské unie začalo experimentovat s modely, které zahrnují legální prodej a užívání marihuany. Tyto modely zahrnují proslulé coffee shopy v Holandsku, cannabis social cluby ve Španělsku, či dekriminalizační opatření v České republice. Mezi nejnovější vývoj určitě patří prohlášení, ke kterému došlo v prosinci 2018 v Luxemburgu, kde nově zvolená vláda ohlásila, že ke své politické agendě přidává legalizaci rekreační marihuany (Moser 2019).

Snahou EU o odstranění rozdílů, v přístupu ke konopí jednotlivých členských zemí EU v oblasti trestněprávních otázek, můžeme považovat vyjádření Evropské komise, kdy v roce 2003 navrhla rámcové rozhodnutí o zavedení minimálních pravidel týkajících se obchodu s drogami. Tím Komise oddělila nakládání s drogami za účelem zisku a za účelem jiným, a na

tento účel by mělo být pohlíženo jako na jednání s cílem osobního užívání. Toto rozhodnutí bylo vládami členských států přijato v roce 2004 (Zábranský a spol. 2006).

Jiná situace je u technického konopí. Takové konopí má nízký obsah THC na úkor vyššího obsahu CBD a je ho tedy možné normálně pěstovat do 100 m² bez povinnosti nahlašovat to kontrolním úřadům.

V souvislosti s kanabinoidy jsou zajímavé nové směrnice pro potravinové výrobky s obsahem kanabinoidů. Ty byly přidány v lednu 2019 Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) k Regulacím (EU) 2015/2283. Dle těchto směrnic budou takové výrobky potřebovat povolení coby „nová potravina“ příslušnou národní agenturou. Proces schválení „nové potraviny“ obvykle trvá tři roky. Nové směrnice EFSA, i když nejsou pro členské země EU závazné, tak zřejmě budou mít významný dopad na trh s CBD výrobky v Evropské unii. Mnohé členské země EU dovolují jen takové CBD výrobky, které jsou připraveny z technického konopí, nikoliv z konopí s vysokým obsahem THC. Z podstatné části evropského trhu tak mohou být na tři roky nebo déle odstraněny potraviny s obsahem CBD (Moser 2019).

3.2.2 Legislativa pro Českou republiku

Zákon o návykových látkách (zákon 40/2009) § 285 o Nedovoleném pěstování rostlin obsahujících omamnou nebo psychotropní látku, se tento zákon vyjadřuje více než jasně: “Kdo neoprávněně pro vlastní potřebu pěstuje v množství větším než malém rostlinu konopí, bude potrestán odnětím svobody až na šest měsíců, peněžitým trestem nebo propadnutím věci.” Toto množství se dále vysvětluje jako odpovídající množství 1 gramu THC extraktu. Podle výše zmiňovaného zákona je tedy pěstování více jak 5 rostlin konopí nebo držení 10 gramů marihuany považováno za množství větší než malé. Toto omezení platí na rostliny nebo sušinu, která obsahuje více než 0,3 % THC z hmotnosti. Takové konopí lze v ČR legálně využívat jen pro vědecké nebo léčebné účely. Výrobky s CBD ani technické konopí takto regulováno není, kromě nahlašování pěstební plochy, kdy je v České republice možné pěstovat konopí s obsahem THC do 0,3 % pokud celková pěstební plocha nepřesáhne 100 m².

Tento legislativní rámec je komplikací pro lidi, kteří by rádi užívali medicínálního konopí na jejich neduhy. Jejich finanční situace jim to však nedovoluje. Tito lidé se pak většinou obrací na černý trh, anebo se dopouštějí trestního jednání tím, že si medicínální konopí pěstují sami pro svou spotřebu. V jednání je návrh zákona, který by tuto situaci s pěstováním

konopí pro vlastní spotřebu mohl řešit. Lidé by mohli pěstovat až 5 rostlin. Mohli by i bezúplatně předávat až 30 gramů konopné sušiny nebo 6 gramů čistého THC jiné dospělé osobě (Vymazal 2018).

Legálně lze konopí získat na základě vyhlášky č. 236/2015 Sb, která stanovuje podmínky pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití. Tato vyhláška upravuje povolené množství účinných látek konopí. Tyto hlavní účinné látky jsou označovány jako kanabinoidy. Nejvýznamnější z nich jsou Δ -9-trans-tetrahydrokanabinol (THC) a kanabidiol (CBD). Obsah těchto účinných látek by se měl pohybovat od 0,3 % do 21 % u THC a od 0,1 % do 19 % u CBD. Konopí obsahuje mimo tyto kanabinoidy další látky, kterými jsou zejména silice, flavonoidy, terpeny a alkaloidy. Vyhláška například upravuje i kritéria a limity pro těžké kovy nebo mikrobiologickou jakost. Formou konopí pro léčebné použití jsou podle vyhlášky považovány pouze celá nebo nařezaná usušená vrcholičnatá květenství tmavě zelené, šedo-zelené až hnědozelené barvy složená do hustých klasů. Drobné květy jsou obaleny listeny, porostlými z horní strany žláznatými chlupy.

Nově je součástí novely zákona č. 48/1997 Sb., o veřejném zdravotním pojištění, i nové ustanovení (§32): „Ze zdravotního pojištění se při poskytování ambulantní zdravotní péče hradí individuálně připravovaný léčivý přípravek s obsahem konopí pro léčebné použití předepsaný podle jiného právního předpisu, a to ve výši 90 % ceny pro konečného spotřebitele, v množství nejvýše 30 g konopí pro léčebné použití měsíčně.“ Prováděcí právní předpis stanoví, že maximální množství vydaného konopí pro jednoho pacienta na období jednoho měsíce je 180 g (SAKL 2020).

3.3 Použití medicínálního konopí

3.3.1 Onemocnění, na které je možno předepsat medicínální konopí

3.3.1.1 Chronické bolesti

Dle aktuálně platné legislativy České republiky a vyhlášky č. 236/2015 Sb., „Smí být konopí předepisováno pacientům, kteří jsou postiženi chronickou neutišitelnou bolestí, spojenou zejména v souvislosti s onkologickými onemocněními.“ Mezi další chronicky neutišitelnou bolest zařazujeme bolest s degenerativním onemocněním pohybového

systému, systémovým onemocněním pojiva a imunopatologickými stavy, neuropatická bolest, bolest při glaukomu). Mnohdy je glaukom i bez projevující se bolesti, avšak neléčený glaukom může zapříčinit vážné poškození zraku (SAKL 2020).

3.3.1.1.1 Glaukom

Glaukom neboli zelený zákal je onemocnění oka, způsobené zvýšeným množstvím a tlakem nitrooční tekutiny, vyplňující prostor mezi čočkou a rohovkou. Kanabinoidy, jenž se dostanou do krve, tak způsobí snížení nitroočního tlaku, a to bez ohledu na způsob aplikace. Avšak díky vlastnostem kanabinoidů jako je lipofilita, tedy mimořádně špatná rozpustnost ve vodě, nelze dopravit látky přímo do oka za použití vodných roztoků. Jako způsoby aplikace se tedy nabízejí požití, kouření, inhalace či intravenózní aplikace látky (Jarvinen et al. 2002).

3.3.1.2 Neurologie

Člověk léčící se na neurologii nebo geriatrii může dostat medicínální konopí na spasticitu a s ní spojenou bolest u roztroušené sklerózy nebo při poranění míchy. Konopí se vydává i pacientům s nebolestivou úpornou spasticitou, která zásadním způsobem omezuje v pohybu, mobilitě, nebo dýchání pacienta. Mezi další zdravotní komplikace spojené s neurologií patří Parkinsonova choroba a další zdravotní komplikace mající původ v neurologickém onemocnění, úrazu páteře s poškozením míchy, či úrazu mozku (SAKL 2020).

Léčení příznaků roztroušené sklerózy pomocí konopí uznávají lékaři již od 19. století. Jeho analgetické účinky pro revmatické stavy a svalové křeče jsou neopomenutelné. Výsledky testů (Pertwee 2002) prokázaly, že v pokusech s $\Delta 9$ -THC podávaná látka snížila spasticitu, rigiditu (ztuhlost) a třes. Zlepšila se dokonce schopnost chodit, psát a ovládat močový měchýř.

3.3.1.3 Onkologie

U pacientů léčících se s onemocněním HIV napomáhá proti zvracení vyvolaném onkologickou léčbou a následně i zvyšuje apetit, což je u tohoto onemocnění také přínosné (SAKL 2020). Běžně se pacientům s HIV/AIDS podávají standardní antihistaminika (prometazin, cyklizin), antagonisté serotonin-3 receptorů, neuroleptika, budivé aminy a další. Problémem této léčby jsou vedlejší účinky, aplikace podávaných léků a jejich omezená účinnost. Především si pacienti stěžují na nežádoucí sedaci/útlum/ospalost, která ovšem provází i tabletové formy syntetického $\Delta 9$ -THC nebo jeho derivátu nabilonu (Di Marzo and Petrocellis 2006).

3.3.1.4 Dermatovenerologie

Medicínální konopí se v těchto odvětvích užívá k povrchové léčbě dermatóz, slizničních lézí jako je lupénka nebo ekzém. Pokud je pokožka poškozená, tak v těle začnou probíhat zánětlivé procesy, a to může být pro člověka například s ekzémem velmi nepříjemný problém. Pokožka může být krom poškození i citlivá například na pyl, srtst i mýdlo. To může způsobit zarudnutí a svědění. Využívají se tedy protizánětlivé účinky kanabinoidů v konopných mastí. Konopné masti, oleje či krémy tlumí zánětlivou reakci, mírní podráždění a urychlují hojení. Navíc mají oproti mastím obsahujících steroidy nebo kortikoidy zásadní výhodu v žádných závažných vedlejších účincích (Pertwee 2006).

3.3.1.5 Psychiatrie

Gilles de la Tourette syndrom, též známý pouze jako Tourettův syndrom, jenž je vrozené neuropsychiatrické onemocnění, které je charakteristické svými pohybovými a zvukovými projevy člověka postiženého touto nemocí (SAKL 2020).

Prospěšný vliv THC na Gilles de la Tourette byl popsán v kontrolovaných studiích. Podávané THC snížilo počet tiků, přičemž se nijak nezhoršil neuropsychologický stav pacientů (Müller-Vahl et al. 2003).

3.3.2 Formy aplikace konopných drog

3.3.2.1 Aplikace inhalací

Jedná se nepochybně o nejrozšířenější a nejsnazší možnost aplikace. Sušina, která je kouřena, je nejčastěji složena buď z květů a okvětních lístků samičích rostlin. Účinky se dostavují relativně rychle, a to od několika desítek sekund až minuty (Fergusson et al. 2003).

3.3.2.1.1 Kouření

Kouření konopí je pravděpodobně jedna z nejstarších metod, jak lze konopí konzumovat. Kouřit můžeme skrze různá zařízení jako jsou fajfky a vodní dýmky. Avšak nejčastějším způsobem aplikace ve formě konopné cigarety neboli jointu. Časté jsou i takzvané blunty, dy balíme sušenou bylinku do speciálního papírku. Tyto metody, ale nejsou úplně nejlepším

řešením pro ty, kteří se chtějí vyhnout zbytečným a nežádoucím účinkům spojených s kouřením (Miovský a spol. 2008).

3.3.2.1.2 Vaporizace

Jednou z dnes velmi oblíbených a moderních metod aplikace marihuany a konopných olejů je vaporizování. Vaporizování se provádí speciálním zařízením, které nazýváme vaporizér. Téměř každý zdravotní problém spojený se samotným kouřením může být odstraněn díky používání této inhalační techniky. Vaporizér nahřeje konopí na přesně danou teplotu, tak aby docházelo k uvolnění THC, CBD a dalších kanabinoidů. Nedochází tak ke zbytečnému spalování, uvolňování dehtu a dalších karcinogenních látek obsažených v kouři. Z vaporizéru můžeme inhalovat páry z jakékoli sušené byliny, či jejího extraktu. Na trhu se dají v dnešní době sehnat i krystaly čistého CBD určené k vaporizaci (Miovský a spol. 2008).

3.3.2.2 Aplikace perorálně

Další podání aktivních látek do těla pacienta je perorálně, tedy požitím a následným vstřebáním prostřednictvím sliznic našeho trávicího traktu. Kanabinoidy můžeme pozřít v potravě nebo vypít společně s nápojem. Důležitá je lipofilní povaha, tedy rozpustnost v tucích, olejích a alkoholu. Většinou u tohoto druhu aplikace je potřeba mnohem více rostlinného materiálu, než je tomu u aplikace inhalací (přibližně 4x více) (Tart 1971).

3.3.2.3 Transdermální aplikace

Tato alternativa se hodí pro specifické skupiny pacientů (zejména těch s narušenou imunitou), protože účinná látka je aplikována přes neporušenou pokožku. Jedná se tedy o náplast nebo krém aplikovaný na pokožku pacienta. Tato metoda podávání THC a dalších kanabinoidů zatím nedosahuje požadovaného efektu, neboť kanabinoidy se kůží vstřebávají poměrně pomalu a v nedostatečné míře (Stinchcomb et al. 2004).

3.4 Biologicky aktivní látky konopí

Stejně jako jiné rostliny i konopí obsahuje rozsáhlou paletu biologicky aktivních látek. Ty dělíme na primární a sekundární metabolity. Primární metabolity tvoří základ pro syntézu dalších látek. Naproti tomu sekundární metabolity jsou sloučeniny, které jsou pro dané skupiny rostlin charakteristické. Mezi tyto sekundární metabolity patří: kanabinoidy, terpeny, flavonoidy, fotosyntetické pigmenty, enzymy, aldehydy, glykoproteiny, alkoholy, jednoduché kyseliny, ketony, fenoly, mastné kyseliny a další. Tato diplomová práce se zaměřuje právě na zmíněné kanabinoidy.

3.4.1 Fytokanabinoidy

Fytokanabinoidy jsou kanabinoidy, které nalezneme v rostlinám jako je konopí, ale i v třapatce nachové (*Echinacea purpurea*), plamatce zelné (*Acmella oleracea*), smilu listnatém (*Xerochrysum bracteatum*), játrovce (*Radula marginata*) nebo čajovníku čínském (*Camellia sinensis*). Kanabinoidy také mohou být syntetizovány živočichy, tuto skupinu nazýváme endokanabinoidy (Cibdol 2019).

U konopí bylo dosud identifikováno na 113 různých fytokanabinoidů izolovaných z *Cannabis sativa* L (Aizpurua-Olaizola et al. 2016).

Chemicky patří kanabinoidy mezi isoprenoidy a lze je zjednodušeně charakterizovat jako fenolické terpeny. Jejich strukturu tedy v základu tvoří fenol. Kanabinoidy tak rozlišujeme ve třech hlavních místech: isoprenylový zbytek, resorcinylová část a resorcinolový postranní řetězec. Strukturně se tedy rozdělují podle resorcinylového postranního řetězce na dvě hlavní skupiny, a to alkyl- a betaalkyl- fytokanabinoidy. Ty můžeme dále v těchto skupinách dělit na lineární a monocyklické podle isoprenylového zbytku (Hanuš a spol. 2016). Avšak díky objevům a synteticky přibývajícím fytokanabinoidům je toto rozdělování neuspokojivé. Proto Hanuš a spol. (2020) navrhuje novou klasifikaci (viz Obrázek 2). Podle tohoto návrhu, "klasické" fytokanabinoidy jsou ty, jejichž resorcinylový postranní řetězec je odvozen od lineárního alifatického polyketidového startéru, zatímco jejich analogy odvozené z aromatických startérů lze označit jako aralkylové fytokanabinoidy.

Třída sloučeniny reziduum	Ketidový startér	Top. vztah postranní	
		řetězec/isoprenyl	Isoprenyl
Alkylové fytoKANABINOIDY	alifatický	para	typ Terpenyl (C10)
Aralkyl fytoKANABINOIDY	aromatický	para	typ Terpenyl (C10)
Abnormální řady	alifatický nebo aromatický	ortho	Isoprenyl
Seskví (deprenyl) řady (C15)	alifatický nebo aromatický	ortho nebo para	seskviterpenyl deprenyl (C5)

Obrázek 2 Hlavní třídy fytoKANABINOIDŮ

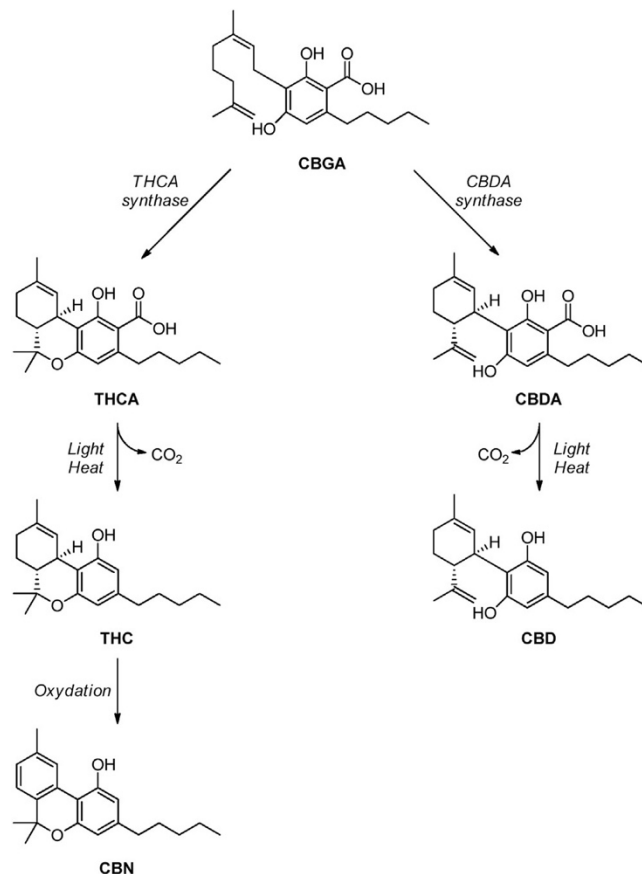
Většina z těchto fytoKANABINOIDŮ (viz Obrázek 3) jsou deriváty tří nejvíce zastoupených kyselých KANABINOIDŮ, a to kyseliny Δ 9-tetrahydroKANABINOLové (THCA), kyseliny KANABICHROMOVÉ (CBCA) a kyseliny KANABIDIOLOVÉ (CBDA). Oxidací těchto matečných kyselin dochází k neenzymatické transformaci a degradaci při vystavení látky tepla, světla nebo vlivem času. Dochází tak například k přeměně z CBDA na CBD (Degenhardt et al. 2017).

CBDA a THCA jsou hlavními složkami květenství konopí a tzv. „kmenové buňky“ ostatních KANABINOIDOVÝCH kyselin. Dalšími minoritními KANABINOIDY jsou KANABICHROMENOVÁ kyselina (CBCA) a kyselina KANABINOLOVÁ (CBNA). Všechny tyto sloučeniny po dekarboxylaci vedou ke vzniku neutrálních derivátů, respektive KANABICHROMENU (CBC), KANABIGEROLU (CBG) a KANABINOLU (CBN), které vznikají i oxidací THC v důsledku dlouhodobého skladování (McPartland and Russo 2001).

Biologický účinek KANABINOIDŮ je způsoben jejich vazbou se specifickou strukturou buněčné membrány, kterou nazýváme KANABINOIDNÍ RECEPTOR. Těmito hlavními receptory jsou CB1 a CB2. CB1 nalezneme v celém těle, ale převážně pak v mozku a míše. Tyto receptory reagují na zpracování emocí, fungování paměti nebo regulují chuť k jídlu. Zatímco CB2 jsou především v buňkách imunitního systému. Jakmile se tyto receptory aktivují pomocí určitého KANABINOIDU, odpovědí je práce na snížení zánětu, což je tedy odpověď imunitního systému (Di Marzo et al. 2004).

Tento systém je tedy spojován s různými prospěšnými léčebnými a terapeutickými vlastnostmi. KANABINOIDY tedy můžeme použít jako analgetika, antibakteriální, antidiabetická,

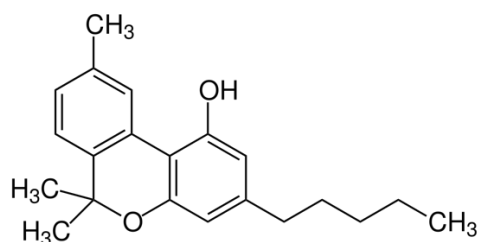
antiemetická, antiepileptická, protizánětlivá, antiproliferační, antipsychotika, antispasmodika apod (Welling et al. 2016).



Obrázek 3 Schematické znázornění biosyntetické cesty THCA a CBDA z CBGA, tvorba THC a CBD světlem a / nebo teplem a oxidací THC na CBN (Citti et al. 2018).

3.4.1.1 Kanabinol (CBN)

Jako největší benefit CBN (viz Obrázek 4) se jeví hypnotická schopnost kanabinolu. Nejedná se o hypnózu, ale spíše o usnadnění usínání či vyvolání spánku. Stejných výsledků se docílí za použití polovičního množství, oproti konvečně používanému diazepamu (Choi et al. 2020). Mezi další zdravotní benefity CBN můžeme zařadit pomoc při léčbě zeleného zákalu (glaukomu) nebo jeho analgetické účinky. Kanabinol stejně jako THC snižuje nitrooční tlak a bolestivost například svalů. Avšak oproti THC nemá tolik psychoaktivní účinky (Appendino et al. 2008).



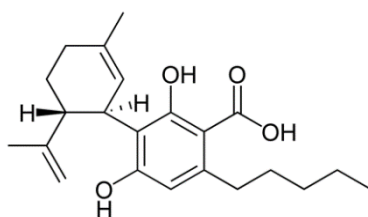
Obrázek 4 Cannabinol Structural Formula V1. <https://www.cleanpng.com/png-tetrahydrocannabinol-cannabis-cannabinoid-tetrahyd-5183098>

3.4.1.2 Kanabidiolová kyselina (CBDA)

Kanabidiolová kyseliny (CBDA) (viz Obrázek 5) je mateřská sloučenina nepsychoaktivního kanabidiolu (CBD) (viz Obrázek 6) a je získáváno z konopí při nízkých teplotách a lisováním pod vysokým tlakem. Vlivem tepla by totiž došlo k předchozím textu zmiňované tvorbě CBD na úkor CBDA.

CBDA by mohlo nahradit THC co by antiemetikum. THC je totiž podáváno pacientům po chemoterapii proti zvracení. CBDA je na rozdíl od THC nepsychoaktivní (Cluny et al. 2011; Bolognini et al. 2013).

Podle Takeda et al. (2016) CBDA funguje jako inhibitor migrace buněk MDA-MB-231. Jedná se o chemickou inhibici cyklooxygenázy-2, jejíž exprese byla detekována u ~ 40 % invazivních karcinomů prsu. Nicméně molekulární mechanismus odpovědný za CBDA-indukovanou dolní regulaci COX-2 v buňkách MDA-MB-231 dosud nebyl objasněn.



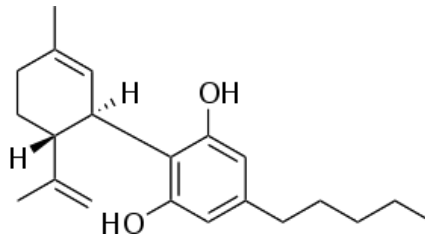
Obrázek 5 Kanabidiolová kyselina (CBDA). <http://www.cannapedia.cz/cs/rozdeleni/cbda>

3.4.1.3 Kanabidiol (CBD)

Psychoaktivní účinek kanabidiolu je považován za méně výrazný než u THC, jelikož se navazuje na CB1 receptory jen minimálně, a proto se někdy uvádí, že je zcela nepsychoaktivní. Kanabidiol zmírňuje psychotické symptomy, které se vyskytují například u schizofrenie. Výsledky dokonce naznačují, že by CBD mohlo být efektivnější než standardní antipsychotika. Díky tomu, že je CBD nepsychoaktivní, bývá doporučováno pro léčbu starších lidí a hlavně dětí (Bisogno et al. 2001).

Mezi další benefity kanabidiolu patří stimulace určité oblasti v mozku a tím pomáhat s depresemi a úzkostí. S tím jsou spojené i silné neuroprotektivní a antioxidační účinky. Tyto účinky by tedy mohly být nápomocné při Alzheimerově chorobě nebo ztrátě paměti (Mechoulam et al. 2002).

Kanabidiol se v lékařství využívá i k stimulaci růstu zlomených kostí nebo snižování neurotoxicity a zánětlivosti u lidí postižených cukrovkou (Rajesh et al. 2010; Kogan et al. 2015).



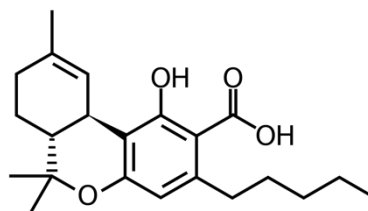
Obrázek 6. Kanabidiol (CBD). www.cannapedia.cz/cs/rozdeleni/cbda

3.4.1.4 Tetrahydrokanabinolová kyselina (THCA)

Tetrahydrokanabinolová kyselina (viz Obrázek 7) je prekurzorem hlavního psychoaktivního kanabinoidu Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (THC). Využívána je například jako analgetikum proti bolesti při postižení rakovinou nebo snížení spasticity (stav zvýšeného svalového napětí) spojené s roztroušenou sklerózou (Zirpel et al. 2018).

THCA by mohlo být užitečné i v boji s rakovinou jako takovou, a nejen jako analgetikum. Příkladem může být studie De Petrocellis et al. (2012), kteří popisují pozitivní účinky THCA při léčbě rakoviny prostaty.

Při boji s rakovinou je THCA zřejmě využitelné i jako antiemetikum. Podle výzkumu Rock et al. (2013) se zdá, že THCA by mohlo být daleko efektivnější při potlačování proti náhlé nevolnosti nebo zvracení než psychoaktivní THC.



Obrázek 7 Tetrahydrokanabinolová kyselina (THCA). <http://www.cannapedia.cz/cs/rozdeleni/thca>

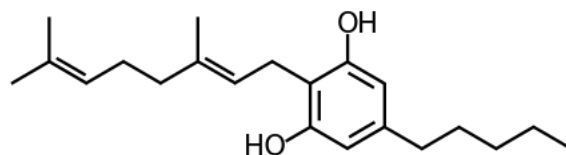
3.4.1.5 Kanabinolová kyselina (CBNA)

Kyselina kanabinolová vzniká vlivem času (přesněji působením vzduchu) z kyseliny tetrahydrokanabinolové. Vystavení THCA vzduchu, zapříčiní oxidaci na CBNA, a ta se následně jako zbytek kanabinoidních kyselin vlivem tepla nebo UV záření karboxyluje na kanabinol (CBN). Terapeutické účinky jsou dosti podobné jako u výšše zmíněného kanabinolu (CBN). Kyselina kanabinolová pomáhá mírnit bolest, působí antibakteriálně a napomáhá ke klidnějšímu spánku (Earlenbaugh 2015).

3.4.1.6 Kanabigerol (CBG)

Kanabigerol (viz Obrázek 8) patří mezi nepsychoaktivní kanabinoidy a najdeme ho převážně v odrůdách technického konopí, jež obsahují velmi malé množství THC (Valdeolivas et al. 2014).

Zároveň studie ukazují, že by kanabigerol mohl mít neuroprotektivní účinky. To se ukázalo při testech na myších, které měly Huntingtonovou chorobou. Podle dalších výzkumů by CBG měl být velice prospěšný v léčbě gastrointestinálních chorob, jako například ulcerózní kolitidy a Crohnovy choroby, a dokonce by měl inhibovat i nádorové bujení v tlustém střevě (Valdeolivas et al. 2014; Naftali 2020).



Obrázek 8. Kanabigerol. <http://www.cannapedia.cz/cs/rozdeleni/cbg>

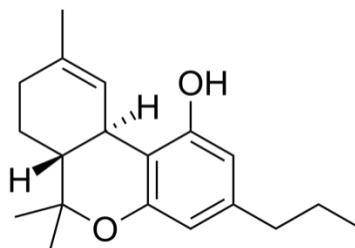
3.4.1.7 Kanabichromen (CBC)

Kanabinoid, který byl prvně extrahován z *Cannabis sativa* L., ale postupně byl objeven i u druhů *Rhododendron* nebo u některých hub. Má mírné anti-nociceptivní a protizánětlivé účinky a umocňuje některé účinky Δ 9-tetrahydrokanabinolu. Jak CBC vyvolává tyto účinky není prozatím přesně známo. Existuje totiž jen málo informací o jeho účinnosti na kanabinoidní receptory (Pollastro et al. 2018).

3.4.1.8 Tetrahydrokanabivarin (THCV)

Jedná se o další ne-psychoaktivních fytokanabinoid. Konkrétně Δ^9 -tetrahydrokanabivarin (Δ^9 -THCV) (viz Obrázek 9), který v byl v roce 2013 testován v klinických studiích na pomoc v léčbě epilepsii a diabetes typu 2 (Borrelli et al. 2013).

Wargent et al. v roce 2013 publikovali, že použití THCV by mohl využít k léčbě proti intoleranci glukózy související s obezitou.



Obrázek 9. Tetrahydrokanabivarin (THCV). <http://www.cannapedia.cz/cs/rozdeleni/thcv>

3.5 Výroba konopných extraktů

Extrakty konopí lze získávat celou řadou různých tradičních (např. macerace) i méně tradičních metod (extrakce CO_2). Způsob extrakce a použité rozpouštědlo mohou mít vliv na kvalitu získaného extraktu. Například při použití vyšších teplot během extrakce, dochází k oxidaci mateřských kanabinoidů kyselé povahy. Jejich obsah je pak následně ve výsledném extraktu nízký až nulový. Vliv jednotlivých metod je popsán níže.

3.5.1 Macerace

Jedná se o nejtradičnější a nejjednodušší metodu extrakce látek z rostlinných druhů, kdy za použití vody rozpustíme většinu rostlinných složek. U kanabinoidů je nutné použití nepolárnějších rozpouštědel, než je voda. Mezi běžná použitelná rozpouštědla patří organické látky, jako je ethanol, ether, chloroform a methanol. Vzniklý extrakt se zkoncentruje odstraněním rozpouštědla za sníženého tlaku (Płotka-Wasyłka et al. 2017).

Jedná se o metodu finančně nenákladnou a nenáročnou co se instrumentace a pracnosti týče. Další nevýhodami k termolabilitě analytu můžeme připočít časovou náročnost extrakce a slabší solvatační schopností rozpouštět za nižších teplot. Nedochozí k vysrážení části rozpuštěných látek z roztoku, což usnadňuje další zpracování (Pluháčková a spol. 2018).

3.5.2 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Metoda superkritické fluidní extrakce se uplatňuje při extrakci celé řady látek. Její hlavní výhodou je, že namísto organických rozpouštědel využívá netoxický a levný oxid uhličitý za superkritických podmínek. Rozpustnost analytu v superkritické fázi lze snadno upravovat volbou tlaku a teploty.

Superkritická fluidní extrakce je používána zejména ke stanovení organických polutantů v pevných environmentálních matricích, ale může být využita také pro studium desorpčních procesů a biodostupnosti. V potravinářství se využívá k extrakci kofeinu, odstranění tuku z bramborových lupínků, ořechů nebo k extrakci esenciálních olejů. (de Melo et al. 2014).

Při extrakci konopných látek jako jsou kanabinoidy, může být k superkritickému rozpouštědлу přidán modifikátor. Tím může být například methanol nebo ethanol. Dosáhne se tím jiné polaroty, než má samotné CO₂. To je totiž za standardních málo účinné při rozpouštění polárních sloučenin. Proto se přidává modifikátor, který by měl být zcela mísitelný s nadkritickým CO₂ (sc-CO₂) a kapalinou při pokojové teplotě (Eggers et al. 2003).

Pluháčková a spol. (2018) uvádí, že SFE je velmi ohleduplná k životnímu prostředí, ale možnosti automatizace jsou u této metody omezené a doposud neumožňuje zpracování velkého množství vzorků zároveň. Zato ASE (extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku) má vynikající extrakční účinnost, ale omezenou selektivitu a s požadovanými analyty se koextrahuje velké množství balastních látek.

3.5.3 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (ASE)

Jedná se o extrakční techniku, která vytváří pomyslný stupeň mezi extrakcí pomocí Soxhletova extraktoru a SFE. Představena byla původně pod označením ASE (Accelerated Solvent Extraction). Avšak toto označení bylo zaregistrováno jako ochranná známka ASE®. To má za následek, že lze tuto extrakční techniku v literatuře najít pod různými názvy. Mezi nejčastěji používané patří PLE (Pressurized Liquid Extraction), PSE (Pressurized Solvent Extraction), ESE (Enhanced Solvent Extraction). Je to technika automatizovaná a využívající zvýšené teploty a tlaku pro dosažení extrakce látek. Pro extrakci jsou využívána rozpouštědla běžná pro klasické extrakce kapalinami (methanol, acetonitril, aceton, n-hexan). Extrakce jsou prováděny při teplotách v rozmezí 50 až 200 °C a tlacích do 20,7 MPa, čímž se významně zvyšuje extrakční účinnost (Kettle 2013).

3.5.4 Rozpouštědla

Každé rozpouštědlo má jiné vlastnosti, díky kterým rozpouští jiné látky a mi tím získáváme jiný profil extraktu. Proto vlastnosti finálního extraktu přímo závisejí na volbě vhodného rozpouštědla. Obecně by rozpouštědlo mělo mít dobrou selektivitu, tj. schopnost oddělení pouze té složky, o kterou máme zájem. Nemělo by být, drahé, korozivní, hořlavé a mělo by se dát snadno regenerovat z extraktu. Při výběru rozpouštědel k extrakci kanabinoidů, kdy se předpokládá podávání extraktu pacientům, bychom měli volit i rozpouštědla, která nebudou toxická a neohrozí tak koncového uživatele. Výběrem vhodného rozpouštědla tedy získáme jiný profil kanabinoidů, kdy každý profil se bude uplatňovat při jiných zdravotních problémech (Schreiberová a kol. 2011).

3.5.4.1 Ethanol

Ethanol je čirá, netoxická kapalina, která je bipolárním rozpouštědlem. Rozpouští tedy lipofilní i hydrofilní látky. Nevýhoda ethanolu se může jevit v množství energie potřebné k extrakci, oproti například extrakci za využití CO₂ při SFE (Kopac 2019).

Brighenti et al. (2017) poukazují na výhodu ethanolu namísto ostatních běžně používaných rozpouštědel jako je methanol nebo n-hexan. Pomocí ethanolu totiž dosáhneme ve výsledném extraktu vyšší výtěžnosti kyselých kanabinoidů, než při použití methanolu či n-hexenu. Jeho nevýhodu naopak vidí v jeho nízké selektivitě. Citti et al. (2018) označují ethanol nejběžněji používaným rozpouštědlem k extrakci kanabinoidů z důvodu jeho vysoké extrakční účinnosti. Ta je dána vysokou afinitou ethanolu k struktuře kanabinoidů.

3.5.4.2 Methanol

Methanol je polárnější kapalina než například bipolární ethanol. Avšak oproti ethanolu je toto polární rozpouštědlo velice toxické. Už 30 ml vstřebaného methanolu může být pro člověka fatální. Výhodou methanolu je jeho schopnost rozpouštět nepolární látky jako jsou kanabinoidy, a proto je jejich významným organickým rozpouštědlem. Nevýhodu můžeme tedy vidět v jeho toxicitě a že jeho páry mohou vytvořit se vzduchem u procesu macerace výbušný plyn (Široký 2006).

Oproti dichlormethanu nebo chloroformu má methanol menší dopad na životní prostředí (Duvivier et al. 2016).

Wianowska et al. (2015) srovnávala použití methanolu a n-hexanu k extrakci kanabinoidů. Rozpouštědla byla ve výsledku celkem podobná. Jen methanol se mnohem lépe osvědčil při extrakci kyselého kanabinoidu THCA při metodě PLE.

3.5.4.3 Butan

Butan (n-butan) je možná jedno z vůbec prvních rozpouštědel, které se k extrakci kanabinoidů začalo používat. Mezi nevýhody extrakce butanem patří jeho vysoká pořizovací cena a ve výsledku nízký výtěžek. Nebezpečné se použití butanu jeví z hlediska nízkého bodu varu, vysoké hořlavosti a toxicitě jeho par při vdechnutí. Butan je i přesto stále hojně využíván a dává vzniknout produktům jako je butan hash oil, budder, shatter, live resin nebo wax (Helcman 2019).

Na vysokou koncentraci kanabinoidů v extraktu za použití butanu upozorňuje i Mehmedic et al. (2010), kdy extrakci konopného květenství za použití butanu získali takzvaný butanový hush olej (hovorově dab(s)). Tato substance připomíná tvrdší voskovitý koncentrát. Výsledkem tedy byla látka s vyšší koncentrací THC ve srovnání s tradičními formami konopí.

3.5.4.4 Chloroform

Chloroform, někdy také nazývaný trichlormethan, je bezbarvá těkavá kapalina se zřetelným zápachem. Jedná se o nehořlavou látku, která je nepolární, avšak ještě mírně rozpustná ve vodě. Navíc je snadno mísitelný s většinou organických rozpouštědel. K extrakci kanabinoidů se používá v kombinaci s methanolem (Cheremisinoff and Rosenfeld 2010).

3.5.4.5 Hexan

Jedná se o organické vysoce nepolární rozpouštědlo, od kterého se v potravinářském průmyslu ustupuje pro jeho toxicitu. Nahrazen při výrobě rostlinných olejů by mohl být například butanem. Oproti butanu má, ale nepopíratelně lepší výnosnost extraktů (Rapinel et al. 2017).

Jako další pozitiva u n-hexanu zmiňuje Kostić et al. (2013). jeho nízké náklady, vysokou efektivitu při extrakci a hlavně selektivitu.

3.5.4.6 Dimethylether (DME)

Organické rozpouštědlo používané v potravinářském průmyslu (odtučně bílkovinné potraviny živočišného původu, zejména kolagen a želatina), protože je netoxické, nekarcinogenní a nezatěžuje životní prostředí (Úřední věstník Evropské unie 2016).

Dimethylether narozdíl od butanu nemusí obsahovat žádné pachové příměsi. Sám o sobě má jemnou a rozpoznatelnou vůni. Oproti butanu má DME výhodu i ve vznětlivosti a ceně. Ty jsou v obou případech oproti butanu nižší. Díky nižší vznětlivosti je celý proces extrakce bezpečnější. Navíc unikátní molekulární struktura dimethyletheru slibuje účinnější extrakci a tím pádem čistější, kvalitnější i objemnější extrakt. Ten má být navíc obohacený o přirozenou vůni extrahovaných rostlinných materiálů bylin (Hempyreum 2018; Dexso 2019).

4 Materiál a metodika

4.1 Rostlinný materiál použitý k extrakci

K extrakci byly použity rostliny konopí, vypěstované na pracovišti pro výzkum léčebného konopí. Zvolena byla sklizeň 2017/2018 vyšlechtěného kultivaru MCLOVE s obsahem THC v rozmezí 15-19 % a s obsahem CBD do 1 %.

4.2 Příprava rostlinného materiálu

Sklizené květenství rostlin konopí nebylo homogenizováno a bylo zpracováno různými technikami. Část konopí byla usušena při 40 °C, a následně skladována při pokojové teplotě nebo zmražena při -80 °C. Část byla zmražena v čerstvém stavu nebo rovnou extrahovaná při ambientní teplotě a extrakt následně zmražen.

4.3 Příprava extraktů

Získané květenství bylo extrahováno pomocí čtyř extrakčních metod a čtyř různých druhů rozpouštědel. První metodou byla macerace, při které bylo použito 80% lékařského lihu. Druhá a třetí metoda proběhla ve stejném extraktoru firmy Dexso s rozdílnými rozpouštědly, a to butanen a dimethyletherem (DME). Poslední využitou metodou byla super kritická fluidní extrakce (SFE), kde jako rozpouštědlo sloužil zkapalněný nosný plyn – CO₂. U extraktů byla hodnocena výtěžnost a zastoupení jednotlivých kanabinoidů. Všechny extrakce proběhly ve třech nezávislých opakováních.

4.3.1 Extrakční metoda č. 1 - Macerace

Ethanolový extrakt byl připraven z homogenizovaného květenství uvedených odrůd v poměru 1:7. U tohoto typu extrakce byl využit 80% lékařský líh (Lach-Ner, CZ) ve kterém se po dobu 14 dnů materiál maceroval. Po uplynutí dané doby byl extrakt přefiltrován pomocí vakuové filtrace. Poté bylo extrakční činidlo odpařeno na vakuové odparce (Heidolph 4000, DE) při teplotě 40 °C a rychlosti rotace v rozmezí 150–200 otáček za minutu (RPS).

4.3.2 Extrakční metodad č 2 a 3 - butan a dimethylether (DME)

K tvorbě extraktu byl využit Dexso Oil extraktor. Prázdna kolona byla naplněna nehomogenizovaným květenstvím o hmotnosti 35 gramů. Do extraktoru se vpustil butan ze zásobních lahví firmy Rsonic (1x 1 l lahev). Extrakt byl spolu s butanem jímán do teflonového papíru. Butan se následně nechal samovolně odpařit v disgestoři. Stejným způsobem byla provedena extrakce dimethyletherem v 99,9% čistotě.

4.3.3 Extrakční metoda č. 4 kritická fluidní extrakce (extrakce CO₂)

Na tento typ extrakce byl využit přístroj SuperC tabletop CO₂ extractor (OCO labs, USA). Nejprve se do prázdné kolony (z jedné strany uzavřené) nasypalo několik skleněných kuliček. Ty mají za úkol rozptýlit vpuštěný CO₂. Následně se před kuličky vložila vata, která zabránila kontaktu mezi rostlinným materiálem a kuličkami. Po naplnění kolony homogenizovaným květenstvím, se kolona uzavřela. Následně byl vpuštěn CO₂ z tlakové bomby. Během prvních 10 minut probíhalo tlakování na 50 bar, kdy CO₂ prostoupivší materiálem navázalo extrahované látky. Po uplynulé době se zvýšil tlak na 130 bar a při teplotě 43 °C se otevřel výstup. Oxid uhličitý se na výstupu z přístroje odpařil a zbyla pouze vyextrahovaná čistá látka. Samotná extrakce trvala přibližně 45 minut.

4.4 Příprava extraktů pro analýzu obsahu kanabinoidů

Všechny extrakty byly do dalšího zpracování uchovávány v -20°C. Pro analýzu kanabinoidů pomocí kapalinové chromatografie byly naváženy 2mg extraktu a následně rozpuštěny v methanolu o 96% čistotě. Výsledná koncentrace extraktu byla 10 mg/ml. Po rozpuštění byly vzorky centrifugovány a následně předány ke stanovení na HPLC-UV. Každý vzorek byl připraven ve třech opakováních.

4.5 Chromatografická analýza extraktů

Pro analýzu extraktů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrometrickým detektorem (HPLC-UV). Společně se vzorky extraktů kanabinoidů bylo analyzováno i 11 standardů sledovaných kanabinoidů zakoupených u firmy Cerilliant Corporation: kyselina tetrahydrokanabinolová, tetrahydrokanabinol, kyselina

kanabidivarinová, kanabidivarin, kyselina kanabidiolová, kanabidiol, kyselina kanabigerolová, kanabigerol, tetrahydrokanabivarin, kanabinol, kanabichromen. Aparatura se skládala z UltiMate 3000 HPLC system (Thermo Fisher, Waltham, USA), který byl vybaven UV/VIS detektorem. Analýza kanabinoidů byla provedena na koleně Excel SuperC18 column (250 × 4,6 mm, 3 μm, 90 Å; ACE, Aberdeen, Scotland). Sloučeniny byly separovány pomocí gradientové eluce za použití vody + 0,075% FA (A) a ACN + 0,5% FA (B) jako mobilní faze v následujícím gradientu (A: B): 0', 30:70; 1', 30:70; 10', 0:100; 12', 0:100; 14', 30:70. Teplota kolony byla nastavena na 40 °C. Dávka byla 10 μL a průtok byl 1 ml/min. UV spektra kanabinoidů byla zaznamenávána při vlnových délkách mezi 190 a 400nm. Kvantifikace byla prováděna s použitím šesti kalibračních bodů (100, 50, 20, 10, 5, and 2 μg/mL). Vyhodnocení získaných dat bylo provedeno v software Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher, Waltham, USA).

4.6 Validace metody HPLC-UV

Mez detekce (LOD) a mez kvantifikace (LOQ) metody byly vypočteny ze standardních křivek jako poměr 3: 1 a 10: 1 (signál: šum). Údaje o přesnosti v jeden den a mezi následujícími dny byly získány opakovanou injekcí standardního roztoku (v koncentraci 200 ug / ml) a vybraného vzorku konopí. Pro stanovení variability výsledků v rámci jednoho dne byly vzorky injektovány 5krát za jeden den. Pro stanovení mezidenní variability bylo provedeno dvojí provedení v několika různých dnech během tří týdnů. Přesnost byla vypočtena jako průměrná odchylka mezi teoretickou a skutečnou koncentrací standardu od odpovídajících kalibračních křivek.

4.7 Statistické vyhodnocení

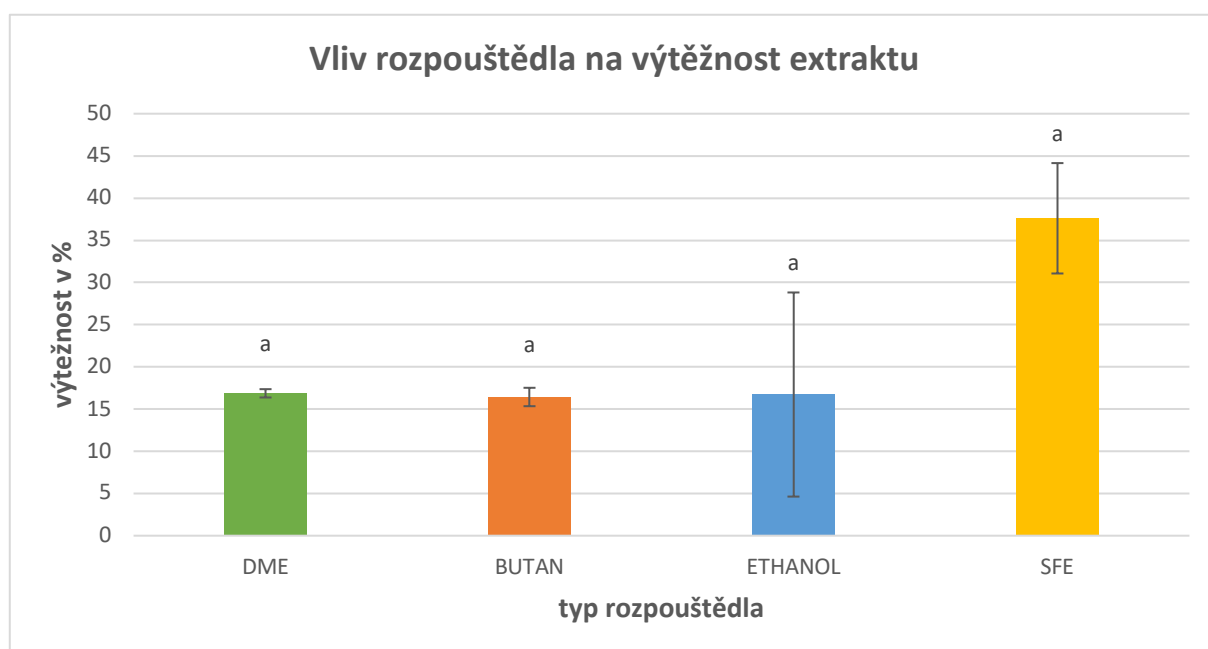
K vyhodnocení dat byl využit program Microsoft Office Excel a jeho rozšíření o analýzu dat. Pro sledování vlivu použitého typu extrakce a použitých rozpuštědel na kvantitativní zastoupení kanabinoidů byla použita metoda analýzy rozptylu bez opakování (ANOVA). Při zjištění statisticky významných rozdílů byly hodnoty následně analyzovány pomocí post hoc testu – Tukeyův test v programu IBM SPSS Statistics.

5 Výsledky

Srovnávány byly tři vybrané kvalitativní a kvantitativní vlastnosti extraktů medicínálního konopí připraveného různými extrakčními technikami. První charakteristikou byla výtěžnost daných extrakčních technik. V rámci druhé charakteristiky byl sledován vliv stavu rostlinného materiálu u jednotlivých extrakcí na finální spektrum kanabinoidů. Třetím kritériem byl obsah kanabinoidů v závislosti na typu extrakce.

5.1 Obsah kanabinoidů v extraktech

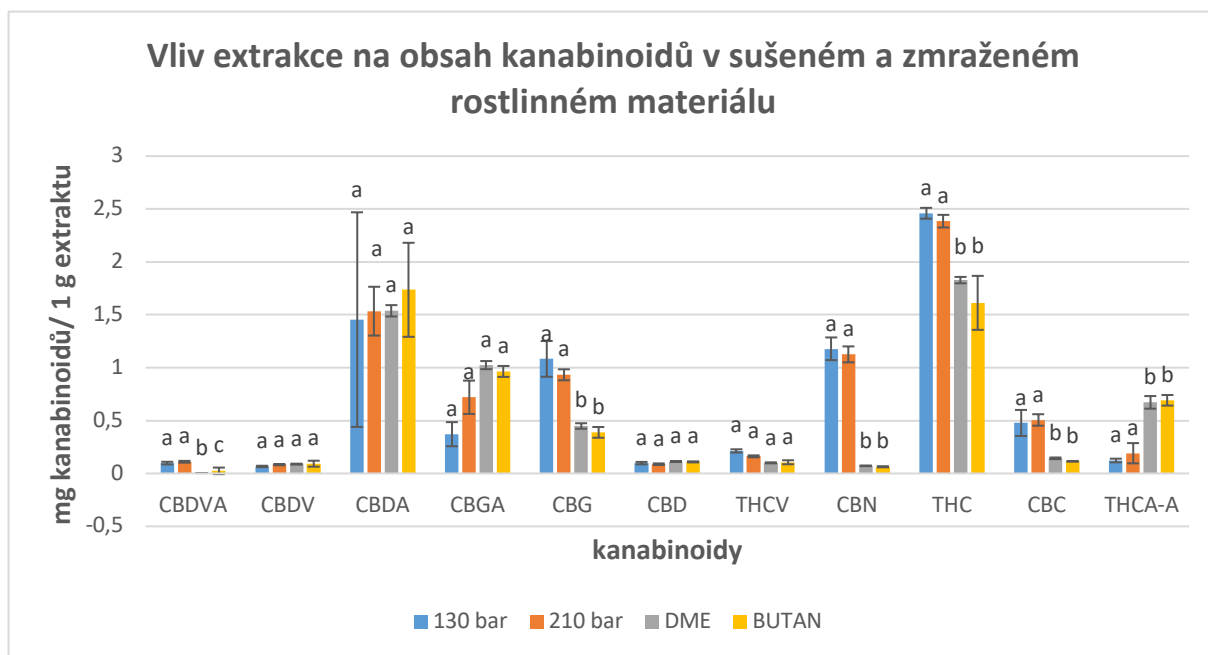
Z hlediska výtěžnosti (viz Graf 1) bylo procentuálně nejúspěšnější rozpouštědlem superkritický CO₂ při SFE. Jeho výtěžnost byla až trojnásobná oproti ostatním. Avšak podle testu homogenity není výtěžnost extraktu pomocí techniky SFE statisticky významně rozdílná od ostatních způsobů extrakce.



Graf 1 Vliv rozpouštědla na výtěžnost extraktu. Vysvětlivky ke grafu: d+a – dry+ambient, d+f – dry+frozen, DME – dimethylether, SFE – superkritická fluidní extrakce, Stejná písmena znázorňují statisticky nevýznamné rozdíly obsahu kanabinoidů v závislosti na typu extrakci, kdy $p < 0,05$

5.2 Vliv stavu rostlinného materiálu na finální extrakt kanabinoidů

Až na výjimku neexistoval statisticky významný rozdíl v účinnosti extrakce v závislosti na stavu konopí před extrakcí. Příklad statisticky významného rozdílu nastal pouze v případě extrahovaného materiálu u techniky SFE, kdy byl materiál sušený a následně zmražený (viz Graf 2). Největší rozdíl nastal u kanabinoidů CBG, CBN, CBC, THC a THCA-A. Krom posledního THC-A byla extrakce pomocí SFE statisticky úspěšnější.

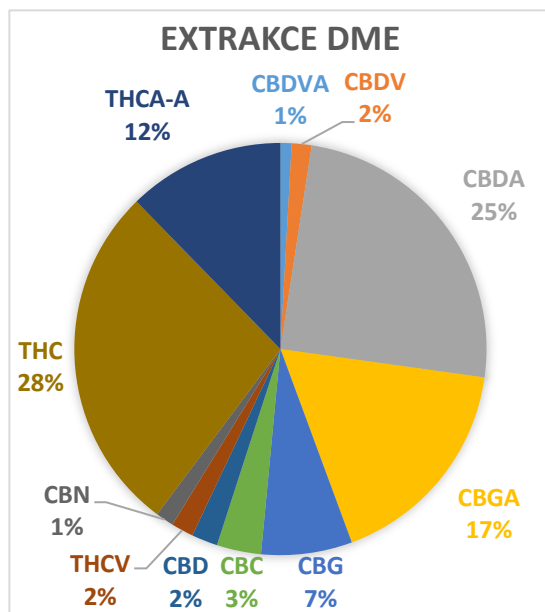


Graf 2 Vliv způsobu extrakce na sušený a zamražený rostlinný materiál. Vysvětlivky zkratk ke grafu: DME – dimethylether, CBDVA – kyselina kanabidivarinová, CBDV – kanabidivarin, CBDA – kyselina kanabidiolová, CBGA – kyselina kanabigerolová, CBG – kanabigerol, CBD – kanabidiol, THCV – tetrahydrokanabivarin, CBN – kanabiol, THC – Δ -9-trans-tetrahydrokanabiol, CBC – kanabichromen, THCA-A – kyselina Δ 9-tetrahydrokanabiolová, Stejná písmena znázorňují statisticky nevýznamné rozdíly obsahu kanabinoidů v závislosti na typu extrakci, kdy $p < 0,05$

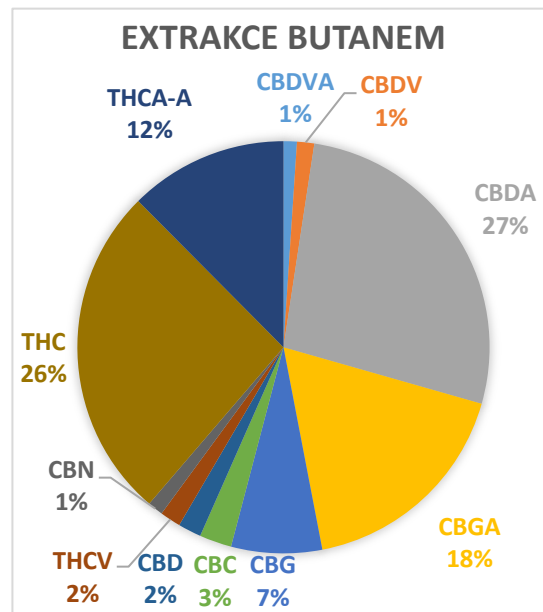
5.3 Složení extraktů kanabinoidů

Na výšeových grafech 3 až 6 níže můžeme vidět, že se zastoupení jednotlivých kanabinoidů liší podle druhu použitého rozpouštědla. Je zde znázorněno procentuální zastoupení identifikovaných kanabinoidů, vypočítané z celkového součtu 11 sledovaných kanabinoidů. Nejvíce zastoupeným identifikovaným kanabinoidem u testovaných extrakčních metod je tetrahydrokanabiol (THC). U extrakce DME činil podíl THC ze všech identifikovaných kanabinoidů 28 % u extrakce butanem 26 % a extrakce SFE 31 %. U extrakce ethanolem je ovšem na prvním místě jiný kanabinoid. Je jím kanabiol (CBN) s podílem 31 %. K nejvýraznější

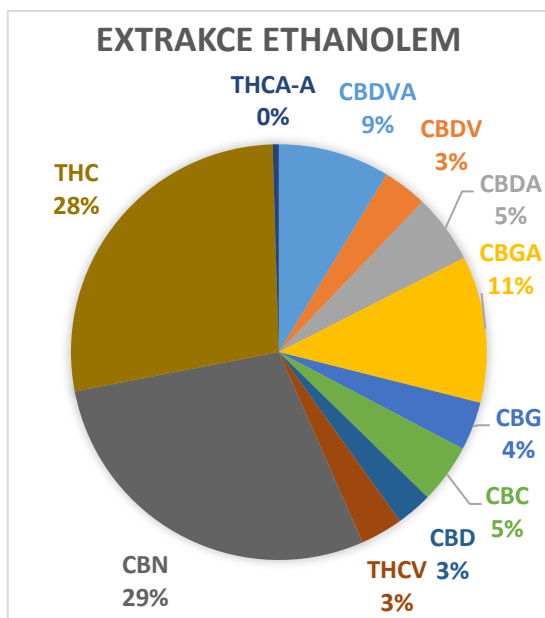
změně došlo v extrakci ethanolem oproti extrakci butanu nebo DME. U ethanolu je množství THCA téměř nulové (DME i butan 12 %). Zároveň ethanolový extrakt obsahuje téměř 4násobné množství CBDVA oproti ostatním extraktům.



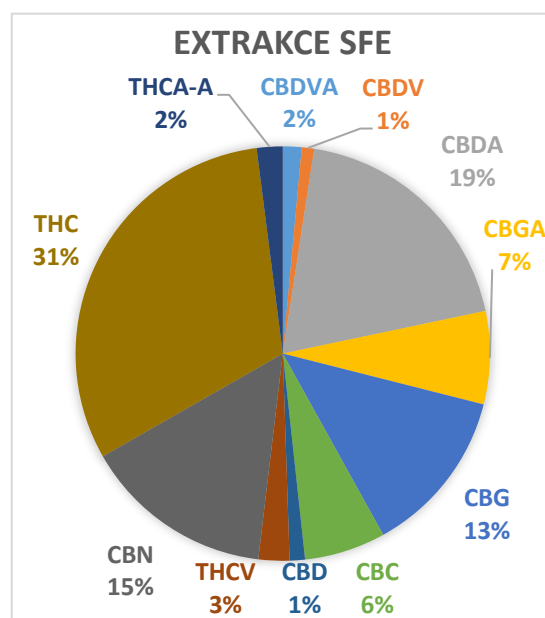
Graf 3



Graf 4



Graf 5



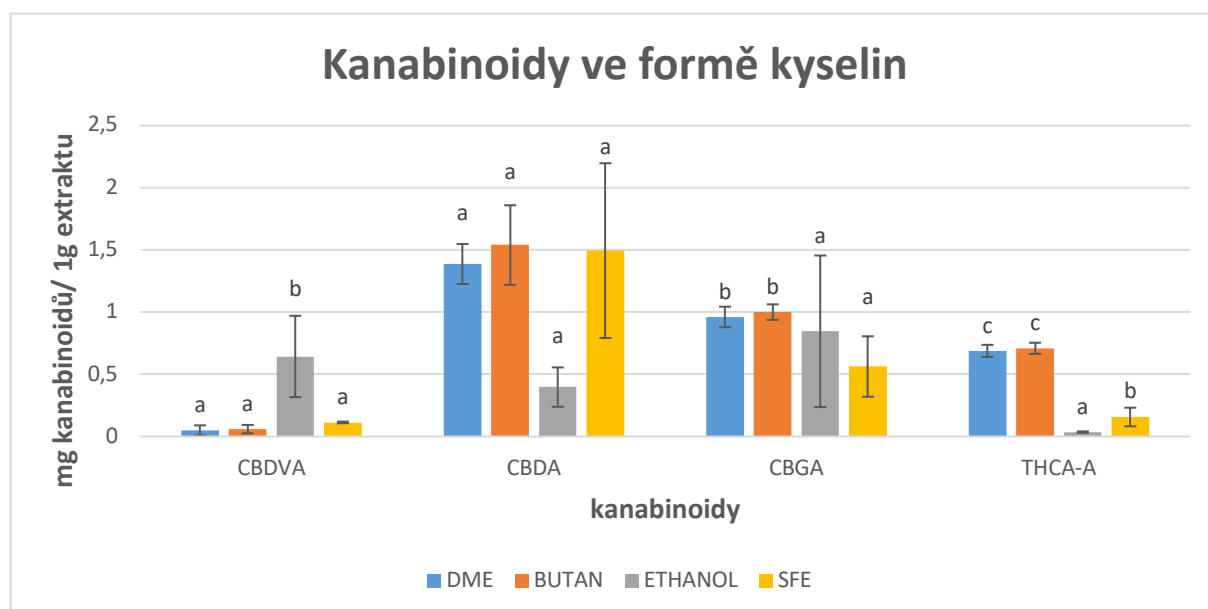
Graf 6

Vysvětlivky zkratk ke grafům: DME – dimethylether, SFE – superkritická fluidní extrakce, THCA – kyselina Δ^9 -tetrahydrokanabinolová, CBDVA – kyselina kanabidivarinová, CBDV – kanabidivarin, CBDA – kyselina kanabidiolová, CBGA – kyselina kanabigerolová, CBG – kanabigerol, CBC – kanabichromen, CBD – kanabidiol, THCV – tetrahydrokanabivarin, CBN – kanabinol, THC – Δ^9 -trans-tetrahydrokanabinol

Na následujících grafech budou znázorněny změny v obsahu kanabinoidů v extraktech použitých při různých technikách extrakce. Kanabinoidy byly od sebe pro lepší přehlednost odděleny podle jejich formy, či podobného množství. Rozděleny byly tedy na kyselé kanabinoidy, majoritní a minoritní kanabinoidy.

5.3.1 Kanabinoidy ve formě kyselin

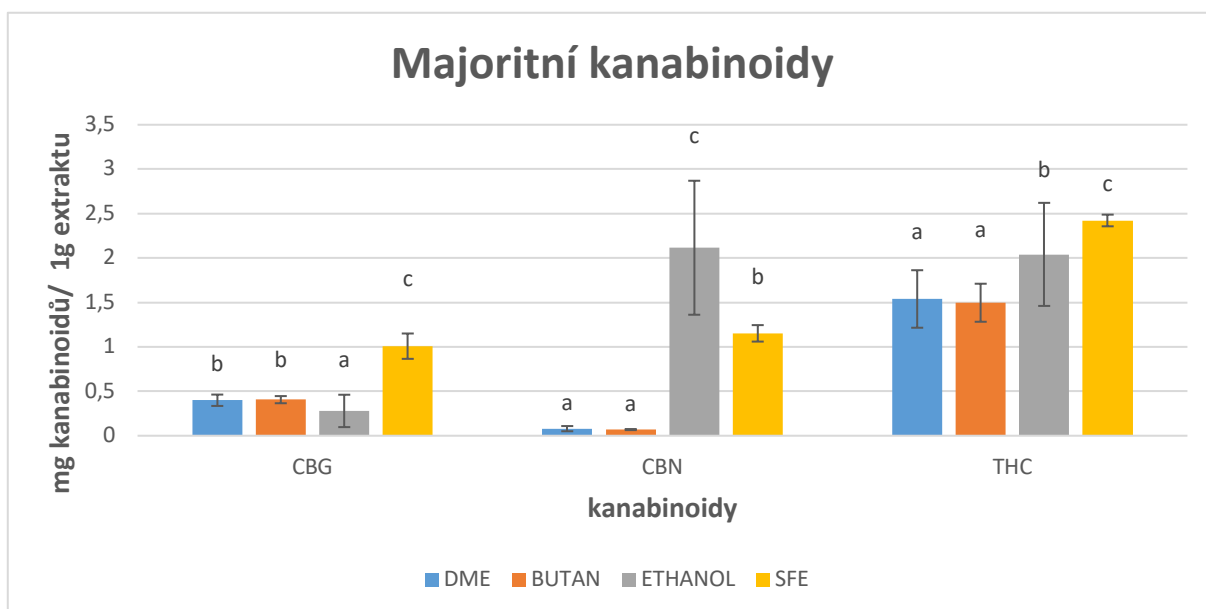
Obsah 4 vybraných kanabinoidů ve formě kyselin je znázorněn v Grafu 7. Nejvíce zastoupeným identifikovaným kanabinoidem u testovaných extrakčních metod je kanabidiolová kyselina (CBDA), dále pak kyselina kanabigerolová (CBGA). Celkově pro extrakci kanabinoidů vyšla nejvhodněji extrakce pomocí butanu, kde bylo zaznamenáno procentuálně nejvíce vyextrahovaných kyselých kanabinoidů s relativně nízkou odchylkou. Jednou výjimkou, kde bylo úspěšnější jiné extrakční činidlo, je u extrakce CBDVA. Extrakce ethanolem převyšuje ostatní skoro 4násobně v obsahu kanabinoidu CBDVA, avšak tato metoda vykazuje velké odchylky, stejně jako ve většině ostatních případů.



Graf 7 Kanabinoidy ve formě kyselin. Vysvětlivky zkratk ke grafu: DME – dimethylether, SFE – superkritická fluidní extrakce, CBDVA – kyselina kanabidivarinová, CBDA – kyselina kanabidiolová, CBGA – kyselina kanabigerolová, THCA – kyselina Δ^9 -tetrahydrokanabinolová, Stejná písmena znázorňují statisticky nevýznamné rozdíly obsahu kanabinoidů v závislosti na typu extrakci, kdy $p < 0,05$

5.3.2 Majoritní kanabinoidy

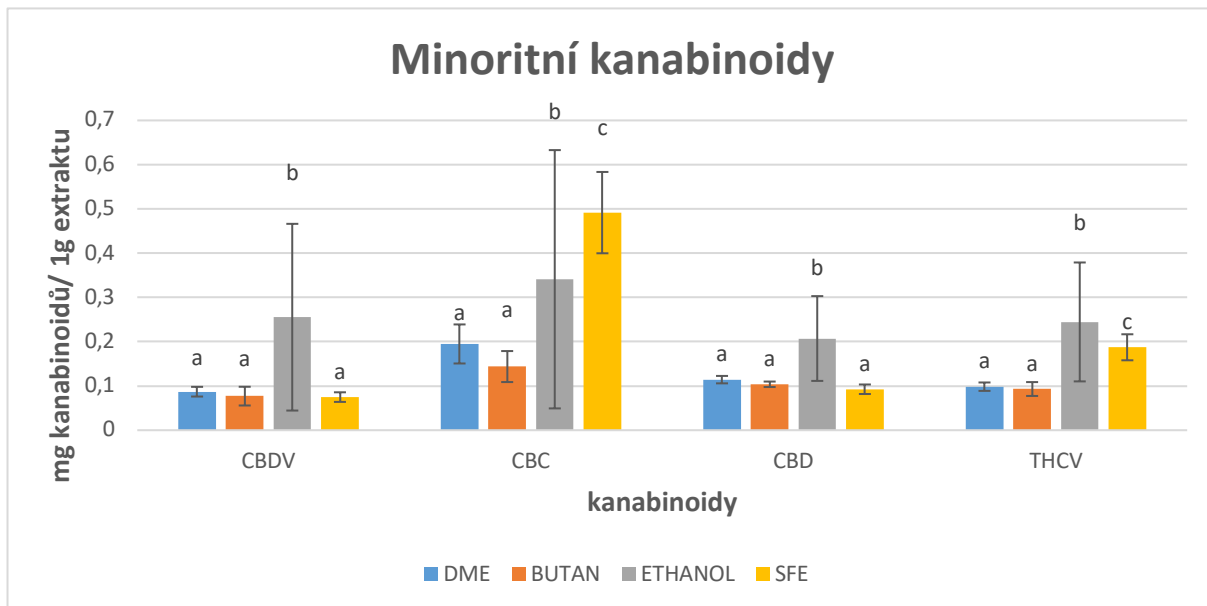
Mezi majoritní kanabinoidy byly vybrány tři s největším procentuálním zastoupením oproti ostatním identifikovaným kanabinoidům (viz Graf 8). Nejvíce zastoupeným identifikovaným kanabinoidem u testovaných extrakčních metod byl kanabinoid THC. Extrakce pomocí SFE byla statisticky nejúčinnější způsob extrakce pro kanabinoidy THC a CBG. Jak už bylo vidět výšše na koláčových grafech, ethanol byl nejúspěšnější v extrakci CBN oproti ostatním extrakčním činidlům. V případě extrakce pomocí DME a butanu byl obsah vyextrahovaných kanabinoidů srovnatelný a oproti ostatním technikám nízký.



Graf 8 Majoritní kanabinoidy. Vysvětlivky zkratk ke grafu: DME – dimethylether, SFE – superkritická fluidní extrakce, CBG – kanabigerol, CBN – kanabinol, THC – Δ -9-trans-tetrahydrokanabinol. Stejná písmena znázorňují statisticky nevýznamné rozdíly obsahu kanabinoidů v závislosti na typu extrakci, kdy $p < 0,05$

5.3.3 Minoritní kanabinoidy

Obsah 4 vybraných kanabinoidů, které měly jedno z nejmenších procentuálních zastoupení oproti ostatním identifikovaným kanabinoidům můžeme vidět na grafu 9. Tyto kanabinoidy tu označují jako minoritní. Jejich množství je vztaženo k celkovému množství 1 g extraktu. Nejvíce zastoupeným identifikovaným minoritním kanabinoidem u testovaných extrakčních metod je kanabichromen (CBC). Oproti ostatním minoritním kanabinoidům byl tento kanabinoid velmi dobře extrahován metodou SFE. Pouze v tomto jednom případě byla jiná technika účinnější než extrakce pomocí ethanolu. Extrakce pomocí ethanolu byla statisticky významnější než ostatní techniky, avšak i v těchto případech se objevují u extrakce ethanolem velké směrodatné odchylky.



Graf 9 Minoritní kanabinoidy. Vysvětlivky zkratk ke grafu: DME – dimethylether, SFE – superkritická fluidní extrakce, CBDV – kanabidivarin, CBC – kanabichromen, CBD – kanabidiol, THCV – tetrahydrokanabivarin. Stejná písmena znázorňují statisticky nevýznamné rozdíly obsahu kanabinoidů v závislosti na typu extrakci, kdy $p < 0,05$

6 Diskuze

Množství informací ohledně přínosu extrakce konopí pomocí dimethyletheru (DME) nebo butanu je na internetu velice sporadické. Veškerý výzkum se v posledních letech zaměřuje na techniku SFE a jí podobné, jako je dynamická macerace (DM), extrakce pomocí ultrazvuku (UAE) nebo extrakce za použití mikrovln (MAE). Jelikož u těchto extrakcí dochází k větším výtěžnostem s ušetřením vstupních financí na extrakční činidla než u extrakce například butanem. Spousta informací ohledně extrakcí je také na pochybných webech, kde si spíše rekreační uživatelé sdílejí své postřehy. Tyto weby, u kterých se často v názvech objevují slova jako grower nebo weed, nepůsobí zrovna dojmem vědecky podložených údajů, či jako věrohodný zdroj informací. Nicméně i zde se dají nalézt zajímavé informace, je však třeba k nim přistupovat velmi kriticky a v rámci možností je ověřit. Existuje nemálo lidí, kteří jsou dotlačeni zákony k nelegálnímu pěstování a užívání konopí. Jejich zdravotní problémy v kombinaci s finanční situací jim nedávají jinou volbu. Takovýto člověk, který dvě dekády potají pěstuje pro vlastní spotřebu, toho může vědět z praxe o pěstování a extrakci konopí více než akademický člověk. Vědec, jenž pracuje na pracovišti, které nemá oprávnění k tomu s konopím zacházet, by se tak dopouštěl trestného činu.

V našem případě byl pozorován nejmenší rozdíl v obsahu kanabinoidů a celkovém množství extraktu mezi extrakcemi DME a butan. Mezi těmito extrakcemi byly naměřeny nejmenší rozdíly v obsahu kanabinoidů a celkovém množství extraktu. S ohledem na fakt, že obě extrakční metody byly provedeny ve stejném extraktoru i za stejných podmínek, je pravděpodobné, že za drobné rozdíly ve finálním extraktu mohou vlastnosti, jako je polarita daného rozpouštědla. Krom kanabinoidů CBDA a THC, které se mezi sebou liší jen o 2 %, mají techniky stejné spektrum vyextrahovaných kanabinoidů. Pokud bychom mohli vybírat jen z těchto dvou extrakčních činidel na základě dostupných informací, měli bychom u DME vyzdvihnout jeho nižší náklady na extrakci. Navíc výrobce firmy Dexso na svých stránkách uvádí, že unikátní molekulární struktura dimethyletheru slibuje účinnější extrakci oproti butanu, a tím pádem čistější, kvalitnější i objemnější extrakt (Hempyreum 2018; Dexso 2019). To se ovšem podle statistického vyhodnocení nepotvrdilo.

Tato dvě extrakční činidla se osvědčila pro extrakci kanabinoidů ve formě kyselin, tedy jejich matečných forem. Nejlépe dopadla technika extrakce pomocí butanu v kombinaci s extraktorem od firmy DEXSO. Pro extrakci těchto kyselých kanabinoidů je důležitá teplota. To zmiňují ve svých pracích například i Wang et al. (2016) nebo Lewis-Bakker et al. (2019). Toto tvrzení ohledně teploty neplatilo pouze u kanabinoidu CBDVA. I přes vyšší teplotu, která nastává při odpařování extrakčního činidla, tedy ethanolu po maceraci, se podle statistického vyhodnocení tato technika extrakce osvědčila.

Pokud se zaměříme na způsob extrakce s ohledem na celkovou výnosnost extraktů, vyjde nám jako nejlepší řešení extrakce CO₂ pomocí SFE. Avšak spojením více technik do jedné, by se dalo zřejmě dosáhnout lepší účinnosti extrakce. To zmiňují ve své práci i Rovetto and Aieta (2017). Podle nich je technika SFE ideální pro extrakci kanabinoidů, ale k dosažení lepších výsledků, by se podle nich dalo dosáhnout kombinací techniky SFE a ethanolu jako pomocného rozpouštědla. Po sérii pokusů zaznamenali úspěch s pulzním přidáváním ethanolu. Dodávající pomocné rozpouštědlo umožnilo dosažení vysokého výtěžku v kratším čase a se sníženou spotřebou jak primárního rozpouštědla, tak pomocného rozpouštědla. Proces extrakce s pulzním přidáváním ethanolu navýšil úspěšnost oproti samotné extrakci SFE bez ethanolu o 92 %. Tuto úspěšnost přisuzují (pulzním) změnám polarity způsobené ethanolem.

Ethanolu jako pomocného rozpouštědla použili i Brighenti et al. (2017). Ti porovnávali různé druhy extrakcí oproti extrakci SFE bez pomocného rozpouštědla při extrakci CBDA, CBGA a CBD. Oproti použití SFE porovnávali dynamickou maceraci (DM), extrakci pomocí ultrazvuku (UAE) a extrakci za použití mikrovln (MAE). Mezi UAE a SFE nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Tyto dvě extrakce poskytovaly nejnižší množství CBDA, CBGA i CBD. Avšak statisticky významný rozdíl byl při extrakci CBDA technikou DM. Efektivnost DM oproti MAE byla o 9 % vyšší a oproti extrakcím SFE či UAE byla vyšší dokonce o 37 %. Po sérii měření dospěli k závěru, že samotné SFE lze nahradit technikou DM. Dynamická macerace po dobu 45 minut ethanolem při pokojové teplotě se v jejich měření ukázala jako nejvhodnější technika pro extrakci kanabinoidů. Stejně jako v předchozí studii přisuzují úspěch změně polarity způsobené ethanolem.

Ethanol je zřejmě méně specifickým extrakčním činidlem, než například DME a butan. Pozorovat jsme to mohli vizuálně na extraktech. Oproti extraktům DME a butanu, které byly béžové až medové, byl extrakt získaný ethanolem sytě zelený. Polarita ethanolu nebo vyšší teplota během procesu odpařování je zřejmě efektivnější pro extrakci balastních látek jako

jsou barviva nacházející (zelený chlorofyl) se v rostlinném materiálu konopí, které však v čistých extraktech kanabinoidů nechceme (Helcman 2019).

Pokud se podaří standardizovat přípravky z medicínálního konopí, pak by tyto přípravky mohly sloužit jako alternativa k dosud používaným lékům, které mají mnoho nežádoucích účinků. Pomocí různých extrakčních činidel tedy získáváme extrakty o různém spektru kanabinoidů. Pokud tedy budeme chtít vytvořit extrakt za účelem hypnotických efektů CBN, budeme volit techniku macerace ethanolem, kdy jsme zmíněného CBN získali nejvíce. Standardizovaný postup se správným výběrem extrakčního činidla by tedy měl minimalizovat riziko pacienta před intoxikací a zároveň pomoci v léčbě (Russo et al. 2015).

V budoucnu by bylo vhodné zaměřit se mimo jiné i na účinnost těchto látek proti jiným chorobám. Některé kanabinoidy využíváme pouze jako antiemetikum při léčbě rakoviny, ale například De Petrocellis et al. zmiňuje ve své práci (2012) nebo že by THCA by mohlo být použito i při léčbě rakoviny jako takové. Nebo například v letošním roce publikoval Naftali (2020) možnou pomoc kanabinoidů v léčbě ulcerózní kolitidy.

7 Závěr

Cílem předložené práce bylo porovnat obsah a složení kanabinoidů v konopných extraktech získaných různými extrakčními technikami a zjistit, zdali má extrakční technika vliv na obsah těchto látek ve výsledném extraktu.

Na základě výzkumu bylo zjištěno, že použití různých technik extrakce vede k rozdílnému obsahu kanabinoidů v extraktech. Byly pozorovány rozdíly v účinnosti, kdy každá technika prokázala vhodnost k extrakci jiných kanabinoidů.

Na výtěžnost byly hodnoceny rostlinné materiály bez rozdílu, za jakých podmínek byly skladovány nebo jestli byly před skladováním sušeny. Nejvyšší výtěžnost měla v tomto případě technika SFE.

Pokud budeme hodnotit vliv skladování a formu, ve které byl rostlinný materiál extrahován, tak kromě extrakce pomocí SFE neexistuje statisticky významný rozdíl. Ovšem pokud se extrahoval sušený a následně mražený materiál, existoval statisticky významný rozdíl mezi SFE a zbylými extrakcemi. Vidět je to například u kanabinoidů CBG, CBN, CBC, THC a THCA-A (viz Graf 2).

Následně se hodnotil profil kanabinoidů rozdělených podle určitých skupin, kdy si byly jednotlivé kanabinoidy podobné.

První hodnocenou skupinou kanabinoidů byly kanabinoidy v jejich neoxidovatelné formě, tedy ve formě kyselin. Podle průměrných hodnot měření docházíme k závěru, že nejúčinnější extrakcí pro tyto kyselé kanabinoidy je extrakce za pomoci butanu. Je tomu tak zřejmě díky nižším teplotám spojeným s touto extrakcí a zřejmě i lepší polaritou butanu oproti DME, kterým se extrahovalo za podobných podmínek. Nejzajímavější je ale extrakce CBDVA pomocí ethanolu. Ethanol vyextrahoval až 4násobně více v porovnání s butenem.

Majoritní kanabinoidy, do kterých jsem v této práci zařadil kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN) a Δ -9-trans-tetrahydrokanabinol (THC), se jako nejúčinnější extrakce jevila extrakce za použití SFE.

Naopak pro extrakci minoritních kanabinoidů, kam jsem zařadil kanabidivarin (CBDV), kanabichromen (CBC), kanabidiol (CBD), tetrahydrokanabivarin (THCV) byla nejúspěšnější extrakce za pomoci ethanolu.

Podle zjištěných výsledků tedy byla přijata hypotéza: Extrakční metody mají vliv na obsah kanabinoidů v extraktu.

8 Literatura

Agarwal S, Sairam RK, Srivastava GC, Meena RC. 2005. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. - Biol. Plant. **49**: 541–550.

Aizpurua-Olaizola O, Soydaner U, Öztürk E. 2016. Evolution of the Cannabinoid and Terpene Content during the Growth of Cannabis sativa Plants from Different Chemotypes. J Nat Prod **79**: 324–331

Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. 2016. Cannabis sativa: The plant of the thousand and one molecules. Frontiers in Plant Science. **7**: 1–17.

Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Rahman MM. 2008. Antibacterial Cannabinoids from Cannabis sativa: A Structure–Activity Study. Journal of Natural Products, **71**: 1427–1430

Bahia A, Al Mansouri S, Al Amori M, Nurulain MN, Ojha S. 2014. “ β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice,”. Physiology and Behavior. **135**: 119–124.

Bercea V. 2019. The History of Cannabis in Europe. Straininsider. [online]. 2019-05-07 [cit. 2020-03-14]. Available from <https://straininsider.com/history-cannabis-europe/>.

Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L. 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. British Journal of Pharmacology. **134**: 845-852.

Bisset NG, Wichtl M. 2004. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on A Scientific Basis, 3rd edn. Medpharm Scientific Publishers: Stuttgart; CRC Press: Boca Raton, FL.

Bolognini D, Rock E, Cluny N, Cascio M, Limebeer C, Duncan M, Pertwee R. 2013. Cannabidiolic acid prevents vomiting in *Suncus murinus* and nausea-induced behaviour in rats by enhancing 5-HT_{1A} receptor activation. British Journal of Pharmacology, **168**: 1456–1470.

Borrelli F, Fasolino I, Romano B, Capasso R, Maiello F, Coppola D, Orlando P, Battista, G, Pagano E, Di Marzo V, Izzo AA. 2013. Biochem Pharmacol. **85**: 1306-1316.

Booth JK, Page JE, Bohlmann J. 2017. Terpene synthases from Cannabis sativa. PLOS ONE, **12**.

Brighenti V, Pellati F, Steinbach M, Maran D, Benvenuti S. 2017. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **143**: 228–236.

Carlini E. 2004. The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) on humans. *Toxicol*. **44**: 461–467.

Cheremisinoff NP, Rosenfeld PE. 2010. *Handbook of Pollution Prevention and Cleaner Production*. William Andrew Publishing. ISBN 9780080964461

Choi S, Huang BC, Gamaldo CE. 2020. Therapeutic Uses of Cannabis on Sleep Disorders and Related Conditions. *Journal of Clinical Neurophysiology* **37**:39–49.

Cibdol. 2019. Other plants containing cannabinoids. [online]. 2018-12-12 [cit. 2020-03-14]. Available from <https://www.cibdol.cz/blog/672-jake-rostliny-krome-konopi-obsahuji-kanabinoidy>.

Citti C, Braghiroli D, Vandelli MA, Cannazza G. 2018. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **147**:565–579.

Cluny NL, Naylor RJ, Whittle BA, Javid FA. 2011. The effects of cannabidiolic acid and cannabidiol on contractility of the gastrointestinal tract of *Suncus murinus*. *Archives of Pharmacal Research* **34**:1509–1517.

Degenhardt F, Stehle F, Kayser O. 2017. The Biosynthesis of Cannabinoids, in: Preedy, V. (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies*. Elsevier 13–23.

De Petrocellis L, Ligresti A, Schiano Moriello A, Iappelli M, Verde R, Stott CG, Di Marzo V. 2012. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *British Journal of Pharmacology* **168**:79–102.

Marzo VD, Bifulco M, Petrocellis LD. 2004. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**:771–784.

Marzo VD, Petrocellis LD. 2006. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annual Review of Medicine* **57**:553-574.

Duvivier WF, Peeters RJP, van Beek TA, Nielen MWF. 2016. Evidence based decontamination protocols for the removal of external Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) from contaminated hair. *Forensic Science International* **259**:110–118.

Eggers R, Jaeger P, Tzia C, Liadakis G. 2003. Extraction Optimization in Food Engineering. Marcel Dekker Inc. New York. 95–136.

Earlenbaugh E. 2015. What Is CBN (Cannabinol) & What Are the Benefits of This Cannabinoid? Publikováno 12. května 2015. [cit. 2020-04-11] Available from <https://www.leafly.com/news/science-tech/what-is-cbn-and-what-are-the-benefits-of-this-cannabinoid>.

Fergusson DM, Horwood LJ, Lynskey MT, Madden AF. 2003. Early reactions to cannabis predict later dependence. Archives of General Psychiatry **60**:1033-1039.

Hanuš OL, Meyer MS, Muñoz E. 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. Nat Prod Rep **33**:1357–1392.

Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliatalata-Scafati O, Appendino G. 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. Natural Product Reports **33**:1357–1392.

Helcman M. 2019. Metody extrakce. Magazín Legalizace. Publikováno 15. dubna 2019. [cit. 2020-04-08] Available from <https://magazin-legalizace.cz/3506-metody-extrakce>.

Helcman M. 2020. THCA a CBDA: Různorodé a komplexní. Magazín Legalizace. Publikováno 16. ledna 2020. [cit. 2020-06-08] Available from <https://magazin-konopi.cz/thca-a-cbda-ruznorode-a-komplexni/>.

Hempyreum.org - News aggregator about Hemp and Cannabis [cit. 2020-03-12] Available from <http://www.hempyreum.org/en/66753>.

Huff RM, Pitts RJ. 2019. An odorant receptor from *Anopheles gambiae* that demonstrates enantioselectivity to the plant volatile, linalool. PLOS ONE **14**.

Hrbek V. 2018. Izolační a separační metody. Extrakce kapalinou (LLE, LSE, PLE, MASE, SFE). Přednášky z Vysoké školy chemicko-technologická v Praze

Schreiberová L, Schreiber I, Hasal P, Příbyl M, Jahoda M, Kosek J, Šnita D, Lindner J. 2011. Chemické inženýrství I. VŠCHT Praha. Praha. 3. vydání ISBN: 978-80-7080-778-1.

Jarvinen T, Pate DW, Laine K. 2002. Cannabinoids in the treatment of glaucoma. Pharmacology and Therapeutics **95**:203-220.

Kettle A. 2013. Recent Advances in Pressurized Fluid Extraction. Special Issues. **31**:28–33

Kodíček M. Terpeny. Biochemické pojmy : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2020-04-21]. Available from [www: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=terpeny](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=terpeny)

Kogan NM, Melamed E, Wasserman E, Raphael B, Breuer A, Stok KS, Bab I. 2015. Cannabidiol, a Major Non-Psychotropic Cannabis Constituent Enhances Fracture Healing and Stimulates Lysyl Hydroxylase Activity in Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* **30**:1905–1913

Komori T, Fujiwara R, Tanida M, Nomura J, Yokoyama MM. 1995. Effects of citrus fragrance on immune function and depressive states. *Neuroimmunomodulation* **2**: 174–180.

Kostić MD, Joković NM, Stamenković OS, Rajković KM, Milić PS, Veljković VB. 2013. Optimization of hempseed oil extraction by n-hexane. *Industrial Crops and Products* **48**:133–143

Kovářová A, Mikšátková P, Hájková K, Kuchař M. 2016. ANALÝZA FYTOKANABINOIDŮ V KOSMETICKÝCH A LÉČEBNÝCH PŘÍPRAVCÍCH METODOU GC-MS a LC-MS. Available from <https://uchpl.vscht.cz/files/uzel/0010733/y84vSywC4vjgMO94lwNDMwA.pdf?redirected>.

Kopac. 2019. CO₂ versus etanolová extrakce: jaký je rozdíl? Available from <https://420intel.com/articles/2019/03/08/co2-v-ethanol-extraction-what's-difference>.

Lee GY, Lee C, Park GH, Jang JH. 2017. Amelioration of Scopolamine-Induced Learning and Memory Impairment by α -Pinene in C57BL/6 Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1–9.

Legault J, Pichette A. 2007. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **59**:1643–1647.

Lewis-Bakker MM, Yang Y, Vyawahare R, Kotra LP. 2019. Extractions of Medical Cannabis Cultivars and the Role of Decarboxylation in Optimal Receptor Responses. *Cannabis and Cannabinoid Research*.

Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. - *Methods Enzymol* **148**:350-382.

Lou J, Teng Z, Zhang L, Yang J, Ma L, Wang F, Tian X, An R, Yang M, Zhang Q, Xu L, Dong Z. 2017. β -Caryophyllene/Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Inclusion Complex Improves Cognitive Deficits in Rats with Vascular Dementia through the Cannabinoid Receptor Type 2 - Mediated Pathway. *Frontiers in Pharmacology* 8-2.

Mansouri H, Asrar Z, Szopa J. 2009. Effects of ABA on primary terpenoids and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in *Cannabis sativa* L. at flowering stage. - *Plant Growth Regul* **58**:269-277.

Mansouri H, Asrar Z. 2012. Effects of abscisic acid on content and biosynthesis of terpenoids in *Cannabis sativa* at vegetative stage. *Biologia Plantarum* **56**:153–156.

Mayor S. 2019. WHO proposes rescheduling cannabis to allow medical applications. Published 05 February 2019. online [cit.2020-04-07] Available from <https://www.bmj.com/content/364/bmj.l574.full>.

McPartland JM, Russo EB. 2001. Cannabis and cannabis extracts greater than the sum of their parts? *cannabis ther, HIV/AIDS* **1**:103–132.

Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. 2002. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *Journal of Clin Pharmacology* **42**:16-20.

Mehmedic Z, Chandra S, Slade D, Denham H, Foster S, Patel AS, Ross SA, Khan IA, ElSohly MA. 2010. Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *Journal of Forensic Sciences* **55**:1209-1217.

De Melo MMR, Silvestre AJD, Silva CM. 2014. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids* **92**:115-176.

Mercolini L, Musenga A, Comin I, Baccini Conti CM, Raggi MA. 2008. Determination of plasma and urine levels of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and its main metabolite by liquid chromatography after solid-phase extraction, *J. Pharm. Biomed. Anal* **47**:156–163.

Miovský M, Bláha T, Dědičová M, Dvořáček J, Gabrhelík R, Gabrielová H, Gajdošíková H, Hanuš LO, Horáček J, Krměník P, Kubů P, Miovská L, Ouštěcká-Neradová AB, Nerad JM, Radimecký J, Ruman M, Sivek V, Šejvl J, Šulcová A, Vacek J, Vopravil J, Vorel F, Zábanský T. (2008). *Konopí a konopné drogy, adiktologické kompendium*, Praha: Grada

Moser S. 2019. The Legal Situation of Hemp, Marijuana and CBD in the EU in. 11.3.2019. available from <https://straininsider.com/legal-situation-cannabis-europe/>.

Müller-Vahl KR, Prevedel H, Theloe K, Kolbe H, Emrich HM, Schneider U. 2003. Treatment of Tourette Syndrome with Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC): No Influence on Neuropsychological Performance. *Neuropsychopharmacology* **28**:384–388.

Naftali T. 2020. An overview of cannabis based treatment in Crohn's disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*.

Nerad JM, Radimecký J, Ruman M, Sivek V, Šejvl J, Šulcová A, Vacek J, Vopravil J, Vorel F, Zábanský T, Hanuš OL, Krměník P, Šulcová A. 2008. *Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium*. Grada. Praha. ISBN: 978-80-247-0865-2.

Nurdjannah N, Bermawie N. 2012. Handbook of Herbs and Spices. 2 ed. Cambridge. UK: Woodhead Publishing 197-215.

Pacifici R, Marchei E, Salvatore F, Guandalini L, Busardò FP, Pichini S. 2017. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, Clin. Chem. Lab. Med 1–9.

Panfili G, Fratianni A, Irano M. 2003. Normal phase high- performance liquid method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. - J. Agr. Food. Chem **51**:3940-3944.

Pertwee RG. 2002. Cannabinoids and multiple sclerosis. Pharmacology and Therapeutics **95**:165-174.

Pertwee RG. 2009. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. British Journal of Pharmacology **147**:163–171.

Piomelli D, Russo EB. 2016. The Cannabis sativa Versus Cannabis indica Debate: An Interview with Ethan Russo, MD. Cannabis and Cannabinoid Research **1**: 44–46.

Pluháčková H, Běláková S, Benešová K, Svoboda Z, Horáčková L, Boško R. 2018. Metodika šetrné extrakce z rostlinné matrice. ISBN: 978-80-7509-619-7.

Plotka-Wasyłka J, Rutkowska M, Owczarek K, Tobiszewski M, Namieśnik J. 2017. TrAC Trends Anal. Chem **91**:12–25.

Pollastro F, Caprioglio D, Del Prete D, Rogati F, Minassi A, Tagliatela-Scafati O, Munoz E, Appendino G. 2018. Cannabichromene. NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS **13**:1189-1194.

Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J. a kol. 1998. Fyziologie rostlin. Academia. Praha

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Patel V, Saito K, Matsumoto S, Pacher P. 2010. Cannabidiol Attenuates Cardiac Dysfunction, Oxidative Stress, Fibrosis, and Inflammatory and Cell Death Signaling Pathways in Diabetic Cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology **56**:2115–2125.

Rätsch Ch. 1994. Konopí, léčebný prostředek v dějinách lidstva. Brno. Datel. ISBN 80-7563-105-2

Rapinel V, Rombaut N, Rakotomanomana N, Vallageas A, Cravotto G, Chemat F. 2017. An original approach for lipophilic natural products extraction: Use of liquefied n -butane as alternative solvent to n -hexane. *LWT - Food Science and Technology* **85**:524–533.

Rock EM, Kopstick RL, Limebeer CL, Parker LA. 2013. Tetrahydrocannabinolic acid reduces nausea-induced conditioned gaping in rats and vomiting in *Suncus murinus*. *British Journal of Pharmacology* **170**:641–648.

Rovetto LJ, Aieta NV. 2017. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *The Journal of Supercritical Fluids* **129**: 16–27.

Russo EB. 2001. *Handbook of Psychotropic Herbs: A Scientific Analysis of Herbal Remedies for Psychiatric Conditions*. Haworth Press: Binghamton, NY.

Russo EB, McPartland JM. 2003. Cannabis is more than simply delta(9)-tetrahydrocannabinol, *Psychopharmacology (Berl)* **165**:431-433.

Russo EB. 2011. Taming THC: Potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* **163**:1344-1364.

Russo EB, Mead AP, Sulak D. 2015. “Current status and future of cannabis research,” in *Clinical Researcher* 58–63.

Státní agentura pro konopí pro léčebné použití (SAKL). Informace o konopí pro léčebné použití pro pacienty available from <http://www.sakl.cz/assets/user/PDF/Informačn%C3%AD%20brožura%20pro%20pacienty.pdf>.

Stinchcomb AL, Valiveti S, Hammell DC, Ramsey DR. 2004. Human skin permeation of Δ8-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **56**:291–297.

Široký M. 2006. Otrava methanolem. *Prevence úrazů, otrav a násilí*. 2, 141-143.

Špaldon E. 1986. *Rostlinná výroba (celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy zemědělské)*. Státní zemědělské nakladatelství. Praha.

Takeda S, Himeno T, Kakizoe K, Okazaki H, Okada T, Watanabe K, Aramaki H. 2016. Cannabidiolic acid-mediated selective down-regulation of c-fos in highly aggressive breast cancer MDA-MB-231 cells: possible involvement of its down-regulation in the abrogation of aggressiveness. *Journal of Natural Medicines* **71**:286–291.

Tart CT. 1971. *On Being Stoned. A Psychological Study of Marijuana Intoxication*. Palo Alto: Science and Behavior Books.

The Novel Food Regulation (EU) no. 2015/2283 - <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32015R2283>

Úřední věstník Evropské unie. 2016. Použití dimethyletheru jako extrakčního rozpouštědla při výrobě kolagenu a želatiny. Available from https://www.potravinainfo.cz/33/pouziti-dimethyletheru-jako-extrakcniho-rozpoustedla-pri-vyrobe-kolagenu-a-zelatiny-uniqueidgOkE4NvrWuMEMv3uZDmFhfCq_CXbW7r86iZlrc5-dg/

Valdeolivas S, Navarrete C, Cantarero I, Bellido ML, Muñoz E, Sagredo O. 2014. Neuroprotective Properties of Cannabigerol in Huntington's Disease: Studies in R6/2 Mice and 3-Nitropropionate-lesioned Mice. *Neurotherapeutics* **12**:185–199.

do Vale TG, Furtado EC, Santos JG.Jr, Viana GS. 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) n.e. Brown. *Phytomed* **9**:709–714.

Valíček P. 2000. Rostlinné omamné drogy. 1. vyd. Benešov. Start. 191 s. ISBN 8086231097.

Veress JI, Szanto L, Leisztner J. 1990. *Chromatogr* **520**:339–347.

Vigushin DM, Poon GK, Boddy A, English J, Halbert GW, Pagonis C. 1998. Phase I and pharmacokinetic study of d-limonene in patients with advanced cancer. Cancer Research Campaign Phase I/II Clinical Trials Committee. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**:111–117.

Vymazal L. 2014. Bezpečnostní list methanol. Available from <http://krizport.firebrno.cz/ohrozeni/methanol#vlastnosti>.

Vymazal T. 2018. Sněmovní tisk 331 Novela z. o návykových látkách. Publikováno 14. 11. 2018. Online [cit.2020-04-07] Available from <https://www.psp.cz/sqw/historie.sqw?o=8&t=331>.

Wang M, Wang YH, Avula B, Radwan MM, Wanas AS, van Antwerp J, Parcher JF, ElSohly MA, Khan IA. 2016. Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. *Cannabis and Cannabinoid Research* **1**(1), 262–271.

Wargent ET, Zaibi MS, C Silvestri C, Hislop DC, Stocker CJ, Stott CG, Guy GW, Duncan M, Di Marzo V, Cawthorne MA. 2013. The cannabinoid D9-tetrahydrocannabivarin (THCV) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity. *Citation: Nutrition & Diabetes* **3**:1-10.

Welling MT, Liu L, Shapter T, Raymond CA, King GJ. 2015. Characterisation of cannabinoid composition in a diverse *Cannabis sativa* L. germplasm collection. *Euphytica* **208**:463–475.

Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, Keurentjes JC, Lang S, Misso K, Ryder S, Schmidtkofer S, Westwood M, Kleijnen J. 2015. Cannabinoids for medical use a systematic review and meta-analysis, *JAMA* **313**:2456.

Wianowska D, Dawidowicz AL, Kowalczyk M. 2015. Transformations of Tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinolic acid and cannabinol during their extraction from *Cannabis sativa* L. *Journal of Analytical Chemistry* **70**:920–925.

Wood TB, Spivey WTN, Easterfield TH. 1899. Cannabinol. Part I. *Journal of the Chemical Society* **75**:20-36.

Yang H, Woo J, Pae AN, Um MY, Cho NC, Park KD, Yoon M, Kim J, Lee CJ, Cho S. 2016. Alpha-Pinene, a major constituent of pine tree oils, enhances non-rapid eye movement sleep in mice through GABAA-benzodiazepine receptors. *Molecular Pharmacology*. **90**:530-539.

Zábranský T, Mravčík V, Korčíšová B, Řehák V. 2006. Hepatitis C Virus Infection among Injecting Drug Users in the Czech Republic-Prevalence and Associated Factors. *European Addiction Research* **12**:151-160.

Zákona č. 40/2009 Sb: § 283

Zirpel B, Degenhardt F, Zammarelli C, Wibberg D, Kalinowski J, Stehle F, Kayser O. 2018. Optimization of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase production in *Komagataella phaffii* via post-translational bottleneck identification. *Journal of Biotechnology* 272-273. 40–47.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

ABA – kyselina abscisová

AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome, Syndrom získané imunitní nedostatečnosti

CB – Kanabinoidní receptor

CBC – kanabichromen

CBCA – kyselina kanabichromová

CBD – kanabidiol

CBDA – kyselina kanabidiolová

CBG – kanabigerol

CBGA – kyselina kanabigerolová

CBN – kanabinol

CBNA – kyselina kannabinolová

DM – dynamická macerace

DME – dimethylether

EFSA – European Food Safety Authority

EU – Evropská Unie

FDA – U.S. Food and Drug Administration, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA

GABA – kyselina gama-aminomáselná

HIV – Human Immunodeficiency Virus

MAE – extrakce pomocí mikrovln

NIDA – National Institute on Drug

OSN – Organizace Spojených Národů

PLE – Pressurized Liquid Extraction, Zrychlená extrakce rozpouštědlem

SFE – Superkritická fluidní extrakce

THCA – kyselina Δ 9-tetrahydrokanabinolová

THC/9-THC – Δ -9-trans-tetrahydrokanabinol

THCV – Tetrahydrokanabivarin

UAE – extrakce pomocí ultrazvuku

