

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Analýza nutričního složení konopí setého a konopných výrobků**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Dominika Kaczorová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.</b>
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne.....

*podpis diplomanta*

### **Poděkování**

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Petrovi Tarkowskému, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Sanje Čavar Zeljković, Ph.D., Mgr. Tiborovi Béresovi, Ph.D., Mgr. Monice Jarošové, Ph.D., Ing. Václavu Dvořáčkovi, Ph.D a Bc. Ondřeji Vrobelovi za jejich věnovaný čas, trpělivost, ochotu pomoci a poradit. Mé poděkování také patří společnosti Hempoint, s.r.o. za poskytnutý materiál a institucím VÚRV, v.v.i., CRH a RCPTM za realizaci mé experimentální části.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Dominika Kaczorová
Název práce	Analýza nutričního složení konopí setého a konopných výrobků
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení genetických zdrojů zelenin, léčivých rostlin a speciálních plodin; Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i.; pracoviště Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je velice perspektivní rostlina díky zemědělskému, průmyslovému a medicínálnímu využití. Teoretická část diplomové práce se zabývá využitím konopí setého v potravinářství a nutričním složením konopných potravinových výrobků. V potravinářství jsou zejména využita semena technického konopí, která obsahují všechny esenciální aminokyseliny a mají unikátní složení esenciálních omega-3 a omega-6 mastných kyselin. Ze semen se za studena lisuje panenský konopný olej a zbylé výlisky se mohou dále zpracovávat na různé produkty. V této práci bylo analyzováno nutriční složení konopných výrobků dostupných na českém trhu a byla hodnocena jejich kvalita. Případně byly vlastnosti konopných výrobků srovnány s jinými výrobky. Obsah bílkovin byl stanoven kjeldahlizací a nejvyšší množství bylo stanoveno v konopném proteinovém izolátu Bio konopný protein Hempoint. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecyl síranem sodným (SDS-PAGE) poskytla kvalitativní informace o proteinovém složení konopného izolátu, které je rozdílné v porovnání s jinými proteinovými izoláty. Ve stejném výrobku byla také potvrzena přítomnost všech esenciálních aminokyselin (kromě tryptofanu) metodou ultra vysoce účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS/MS). Analýza mastných kyselin pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) potvrdila specifické složení polynenasycených mastných kyselin v konopných olejích. Konopné výrobky také obsahovaly významné množství minerálních látek, které bylo stanoveno pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Vyšší obsah fytoKANABINOIDNÍCH látek ze skupiny tetrahydroKANABINOLŮ bylo stanoveno ve výrobku Bio konopný čaj: Výběr z palic Hempoint. Hodnoty parametrů hodnotících kvalitu olejů a tuků (peroxidové a jodové číslo, číslo kyselosti) poukázaly na nižší oxidační stabilitu konopných olejů díky vyššímu obsahu polynenasycených mastných kyselin. Výsledná kvalitativní i kvantitativní data konopných výrobků ve většině případů odpovídala deklarovaným údajům.

Klíčová slova	konopí, konopné produkty, protein, aminokyseliny, mastné kyseliny, olej, semena, minerální látky, kvalita
Počet stran	102
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Dominika Kaczorová
Title	Analysis of the nutritional composition of <i>Cannabis sativa</i> and hemp products
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Genetic Resources for Vegetables, Medicinal and Special Plants, Crop Research Institute, Olomouc
Supervisor	doc.RNDr. Petr Tarkowski, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

*Cannabis sativa* L. is a very perspective plant due to its agronomical, industrial and medicinal use. The theoretical part of the diploma thesis is about the use of *Cannabis sativa* in the food industry and the nutritional composition of hemp food products. In the food industry, the hemp seeds are mainly used and they contain all essential amino acids and have a unique composition of essential omega-3 and omega-6 fatty acids. Virgin hemp oil is cold-pressed from the hemp seeds and a residual hemp meal can then be processed to other products. In the thesis, the nutritional composition of hemp products which are available on the Czech market was analyzed and their quality was evaluated. Eventually, the properties of the hemp products were compared with different ones. The protein content was determined by the Kjeldahl analysis and the highest amount was determined in a hemp protein isolate Bio konopný protein Hempoint. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) provided qualitative information about the protein composition of hemp isolate which is different in comparison with other protein isolates. The presence of all essential amino acids (except tryptophan) was confirmed via ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) in the same product. The analysis of fatty acids via gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) confirmed the specific composition of polyunsaturated fatty acids in hemp oils. The hemp products also contained significant amounts of minerals determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The higher content of phytocannabinoid compounds from tetrahydrocannabinol group was determined in the product Bio konopný čaj: Výběr z palic Hempoint. The values of the parameters for evaluation of oil and fat quality (peroxide, iodine and acidic value) showed lower oxidation stability of the hemp oils due to their higher content of polyunsaturated fatty acids. The final qualitative and quantitative data of the hemp products corresponded with the declared data in most of the cases.

Keywords	<i>Cannabis</i> , hemp products, protein, amino acids, fatty acids, oil, seeds, minerals, quality
Number of pages	102
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	9
<b>2</b>	<b>Současný stav řešené problematiky</b> .....	10
2.1	Konopí seté .....	10
2.1.1	Klasifikace .....	10
2.1.2	Anatomie a morfologie .....	11
2.1.3	Růst .....	12
2.1.4	Konopné potravinové výrobky .....	12
2.1.4.1	Konopné semeno .....	14
2.1.4.2	Konopný olej .....	14
2.1.4.3	Konopný proteinový izolát .....	15
2.1.4.4	Konopná mouka .....	16
2.1.4.5	Silice .....	17
2.2	Nutriční složení konopných výrobků .....	17
2.2.1	Makronutrienty .....	17
2.2.1.1	Proteiny .....	17
2.2.1.1.1	Proteinové složení konopí a jeho vlastnosti .....	18
2.2.1.1.2	Srovnání rostlinných a živočišných zdrojů bílkovin .....	20
2.2.1.1.3	Regulace syntézy proteinů .....	23
2.2.1.2	Aminokyseliny .....	26
2.2.1.2.1	Aminokyselinové složení konopí a jiných zdrojů .....	27
2.2.1.3	Lipidy a mastné kyseliny .....	30
2.2.1.3.1	Obsah mastných kyselin v konopí .....	32
2.2.1.3.2	Srovnání rostlinných zdrojů lipidů .....	34
2.2.1.3.3	Metabolismus esenciálních mastných kyselin .....	36
2.2.1.3.4	Stabilita olejů z hlediska jejich složení mastných kyselin .....	37
2.2.2	Mikronutrienty .....	42
2.2.2.1	Vitamíny a minerální látky .....	42
2.2.2.1.1	Obsah vitamínů a minerálních látek v konopí a jiných zdrojích .....	44
2.3	Metody .....	46
2.3.1	Stanovení celkových proteinů .....	46
2.3.2	Elektroforetická separace proteinů konopí .....	48
2.3.3	Stanovení aminokyselinového složení .....	49
2.3.4	Analýza obsahu mastných kyselin .....	51
2.3.5	Analýza fytokanabinoidů .....	52
2.3.6	Stanovení parametrů kvality olejů a tuků .....	54
2.3.7	Analýza obsahu minerálů .....	55
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b> .....	57
3.1	Materiál a přístroje .....	57
3.1.1	Chemikálie .....	57
3.1.2	Přístroje a pomůcky .....	59
3.1.3	Biologický materiál .....	61
3.2	Metody .....	62
3.2.1	Stanovení obsahu hrubých bílkovin Kjeldahlovou metodou .....	62
3.2.1.1	Příprava roztoků .....	62
3.2.1.2	Stanovení obsahu dusíku dle Kjeldahla .....	62
3.2.1.3	Stanovení sušiny .....	62
3.2.2	Elektroforetická separace proteinů .....	63
3.2.2.1	Příprava zásobních roztoků .....	63

3.2.2.2	Příprava gelů .....	64
3.2.2.3	Příprava vzorků .....	64
3.2.2.4	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecyl síranem sodným .....	65
3.2.3	Stanovení aminokyselinového složení konopného proteinového izolátu	65
3.2.3.1	Kyselá hydrolýza .....	65
3.2.3.2	Příprava vzorků a analýza metodou kapalinové chromatografie .....	65
3.2.4	Analýza mastných kyselin .....	67
3.2.4.1	Příprava kalibračních roztoků .....	67
3.2.4.2	Příprava methyl esterů mastných kyselin .....	67
3.2.4.3	Analýza mastných kyselin metodou plynové chromatografie .....	68
3.2.5	Stanovení obsahu fytokanabinoidů .....	69
3.2.5.1	Příprava vzorků .....	69
3.2.5.2	Analýza plynovou chromatografií .....	69
3.2.5.3	Analýza kapalinovou chromatografií .....	70
3.2.6	Stanovení peroxidového čísla .....	71
3.2.6.1	Standardizace roztoku thiosíranu sodného .....	71
3.2.6.2	Příprava vzorku a titrace .....	71
3.2.7	Stanovení čísla kyselosti .....	72
3.2.7.1	Standardizace odměrného roztoku hydroxidu draselného .....	72
3.2.7.2	Příprava vzorku a titrace .....	72
3.2.8	Stanovení jodového čísla .....	73
3.2.8.1	Příprava vzorku a titrace .....	73
3.2.9	Stanovení minerálních látek .....	73
3.2.9.1	Příprava kalibrační řady .....	73
3.2.9.2	Mineralizace vzorků .....	74
3.2.9.3	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem .....	74
<b>4</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>75</b>
4.1	Obsah hrubých bílkovin stanoven pomocí kjeldahlizace .....	75
4.2	Elektroforetická separace bílkovin .....	75
4.3	Aminokyselinové složení konopného proteinového izolátu .....	77
4.4	Obsah mastných kyselin .....	80
4.5	Obsah fytokanabinoidů .....	85
4.6	Parametry kvality konopných olejů .....	86
4.7	Obsah minerálních látek a stopových prvků .....	87
<b>5</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>101</b>

## **CÍLE PRÁCE**

Vypracovat literární rešerši s klíčovými slovy: konopný olej, semena, vitamíny, aminokyseliny, mastné kyseliny, konopný protein, minerály.

Proved'te srovnání nutričního složení vybraných odrůd technického konopí a konopných výrobků.



## 1 ÚVOD

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je olejnatá plodina, která znovu nachází své uplatnění v zemědělství i průmyslu v Evropské Unii. Technické konopí obsahuje malá množství  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu (< 0,3 %) a nemá žádné psychoaktivní účinky (Pojić *et al.*, 2014). Konopné semeno má vysokou nutriční hodnotu a jeho zpracováním jsou získány další cenné produkty.

Lisováním konopných semen za studena je získán panenský konopný olej, který je výjimečný díky specifickému složení esenciálních polynenasycených mastných kyselin. Poměr omega-3 a omega-6 mastných kyselin je v konopném oleji optimální pro lidské zdraví a udává oleji vlastnosti zdraví prospěšného zdroje tuků. Konopná semena také obsahují značné množství bílkovin a mohou být zdrojem minerálních látek a vitamínů. Vylisováním oleje ze semen zůstávají jako vedlejší produkt vylisky, které mohou být dalším mechanickým zpracováním převedeny na konopný proteinový izolát, který může sloužit jako doplněk stravy. V konopném proteinu jsou zastoupeny všechny esenciální aminokyseliny (Callaway, 2004). Navíc jsou konopné proteiny vysoce stravitelné (Wang *et al.*, 2008; House *et al.*, 2010) díky nepřítomnosti faktorů inhibujících trypsin a lepku (Callaway a Pate, 2009).

Panenský konopný olej má kratší expirační dobu než jiné rostlinné oleje, kvůli jeho nižší oxidační stabilitě. Konopný olej podléhá snadněji žluknutí díky vysokému obsahu polynenasycených mastných kyselin a není vhodné jej konzumovat déle jak dva měsíce po otevření láhve. Během skladování semen, lisování oleje ze semen, lahvování a skladování oleje je důležité dbát na řadu podmínek. Je nutné zabránit přístupu světla použitím tmavých lahví a vzdušného kyslíku užitím inertní atmosféry (Matthäus a Brühl, 2008).

K dispozici jsou momentálně také konopné bylinné čaje a soli, které jsou tvořeny sušenými květy a listím povolených technických odrůd konopí. V potravinových výrobcích by neměly být přítomny psychoaktivní kanabinoidy a jejich obsah by měl být monitorován.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Konopí seté

Konopí (latinsky *Cannabis*) je jednoletá, původně dvoudomá, cizosprašná, krytosemenná, olejná rostlina. Nejrozšířenějším druhem konopí je konopí seté (*Cannabis sativa* L.), které zahrnuje dva podstatně odlišné poddruhy: konopí plané (*Cannabis sativa* ssp. *Spontanea*) a konopí kulturní (*Cannabis sativa* ssp. *Culta*). Konopí kulturní má větší semeno než planá forma a také vyšší nároky na pěstování a nižší odolnost vůči chorobám (Miovský *et al.*, 2008). Konopí seté je typické pro mírné klimatické pásmo a je možné z něj vyšlechtit hospodářsky využívané odrůdy. Jako technické konopí jsou v zemích Evropské unie označovány odrůdy konopí setého, které splňují zákonný limit o obsahu tetrahydrokanabinolu (THC) méně jak 0,2 % (Ruman a Klvaňová, 2008; Ruman, 2014).

#### 2.1.1 Klasifikace

Konopí se dříve řadilo do čeledi morušovitých (*Moraceae*), dnes patří do samostatné čeledi konopovitých (*Cannabaceae*) společně s chmelem (*Humulus*) (Obr. 1). Rod konopí rozlišuje tři hlavní druhy: konopí seté, indické (*Cannabis indica*) a rumištní (*Cannabis ruderalis*). Jednotlivé druhy se liší výškou růstu, stavbou a obsahem delta-9-tetrahydrokanabinolu (Miovský *et al.*, 2008; Ruman a Klvaňová, 2008).

<b>Říše:</b>	rostliny ( <i>Plantae</i> )
<b>Podříše:</b>	cévnaté rostliny ( <i>Tracheobionta</i> )
<b>Oddělení:</b>	krytosemenné ( <i>Magnoliophyta</i> )
<b>Třída:</b>	vyšší dvouděložné ( <i>Rosopsida</i> )
<b>Řád:</b>	růžotvaré ( <i>Rosales</i> )
<b>Čeleď:</b>	konopovité ( <i>Cannabaceae</i> )
<b>Rod:</b>	konopí ( <i>Cannabis</i> )
<b>Druhy:</b>	seté ( <i>Sativa</i> ) indické ( <i>Indica</i> ) rumištní ( <i>Ruderalis</i> )

Obr. 1 Botanická klasifikace konopí (Ruman, 2014).

### 2.1.2 Anatomie a morfologie

Konopí seté dorůstá až do výšky 6 metrů a hlavní křulový kořen může dorůst až do hloubky 2 metrů. Konopí je původně dvoudomá rostlina, která tvoří samčí (poskonné) a samičí (hlavaté) rostliny. Samčí rostliny jsou většinou v růstové fázi vyšší, štíhlejší a oproti samičím rostlinám kvetou až o měsíc dříve. Samičí rostliny jsou tmavší, statnější a mají více listů. Po opylení vytvářejí semeno uvnitř květu (Ruman a Klvaňová, 2008). Díky dlouholetému výběrovému šlechtění byly získány jednodomé varianty, kde se na jedné rostlině vytváří květenství obou pohlaví (Miovský *et al.*, 2008).

Rostlina má kolmý, křulovitý a široce větvený kořen. Podle velikosti prostoru k růstu vytváří různě bohatý kořen. Průměrně kořenový systém tvoří 8-9 % z celkové biomasy rostliny. Nepostradatelné jsou pro rostlinu postranní vlásečnicové kořínky, které jsou z fyziologického hlediska nejdůležitější pro výživu a vývoj rostliny. Nadzemní část konopné rostliny se vyvíjí rychleji než část podzemní a samčí rostliny mají méně vyvinutý kořenový systém než rostliny samičí kvůli kratšímu vegetačnímu růstu. Pěstování konopí je značně náročné z hlediska kvality půdy, množství živin a vody v půdě (Miovský *et al.*, 2008; Chabbert *et al.*, 2013; Ruman, 2014).

Konopí vytváří přímý stonek silný od 3 milimetrů do 6 centimetrů. Vnitřek dutého stonku tvoří dřevnaté jádro a jeho povrch chrání ochmýřená kůra, pod kterou prorůstají svazky lýkových vláken (Ruman, 2014). Konopné vlákno je jedno z nejdelších a nejpevnějších v rostlinné říši a z více než 70 % ho tvoří celulosa. Až dvě třetiny stonku jsou tvořené dřevnatým jádrem, které se skládá převážně z hemicelulosity (Ruman a Klvaňová, 2008). Konopné listy jsou jednodílné, děložní, podlouhlého tvaru. Mají sytě zelenou barvu a jsou dlanitě složené. Nej hustěji je listím osazené květenství (Miovský *et al.*, 2008; Ruman, 2014).

Květenství samčích rostlin je uspořádáno v latách na dlouhých stopkách v úžlabí listů, kde se vytváří velké množství pylu v době plného kvetení. Samičí květy jsou umístěny ve větvích horní části rostliny a tvoří hrozny, které jsou hustě olistěné, krátké a složité. Zde dozrávají olejnatá semena (jednosemenné nažky) vejčitého tvaru. Květenství současně vylučuje pryskyřici, která obsahuje ochranné látky, jež pomáhají rostlině v boji proti škůdcům napadající rostlinu kvůli zdroji semen (Ruman, 2014). Na listenech se nachází největší množství žláznatých trichomů, které jsou zodpovědné za produkci kanabinoidů v odrůdách bohatých na THC. Tyto trichomy se také nacházejí na listech,

ale v mnohem menší koncentraci společně s nežláznatými trichomy, které neprodukují kanabinoidy (Chabbert *et al.*, 2013).

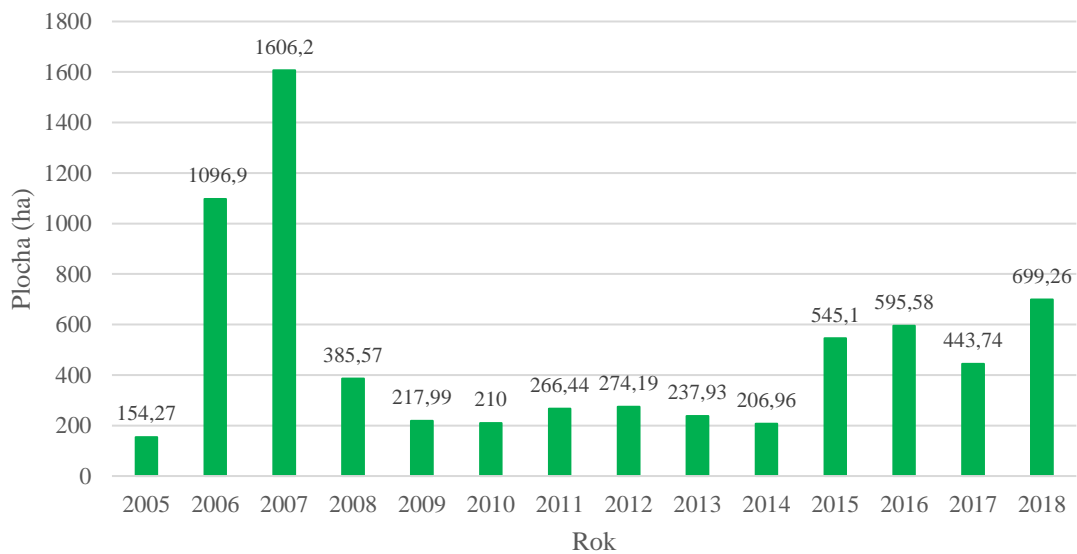
### **2.1.3 Růst**

Konopí může růst za jakýchkoli podmínek a zvládá i nepřívetivé podmínky. Ovšem vyšších výnosů lze dosáhnout při příznivých podmínkách, kdy půdě jsou dodávány všechny nutné faktory pro růst, voda a hnojiva. Půda by neměla být příliš mokrá, jelikož to pak neumožňuje rostlině růst normálně a měla by být neutrální (pH mezi 6-8). Optimální teplota pro růst byla stanovena na rozmezí 19-25 °C (Desanlis *et al.*, 2013). Pro správný vývoj potřebuje rostlina i dostatek světla, které určuje výšku rostliny a její celkovou kondici. Konopí je ekologicky šetrná rostlina, která se pěstuje i na konvenčních půdách bez chemie. Pěstování nevyžaduje herbicidní a pesticidní postřiky a efektivně odstraňuje oxid uhličitý z ovzduší. Jedna tuna konopí je schopna během svého růstu pohltit až 1,82 tuny CO<sub>2</sub> (Ruman, 2014). Jestliže se konopí pěstuje na vlákno, jeho vegetační doba činí zhruba 90-110 dnů. Rostliny pěstované pro získání semen mají o 30-40 dní delší vegetační dobu (Anon., 2007).

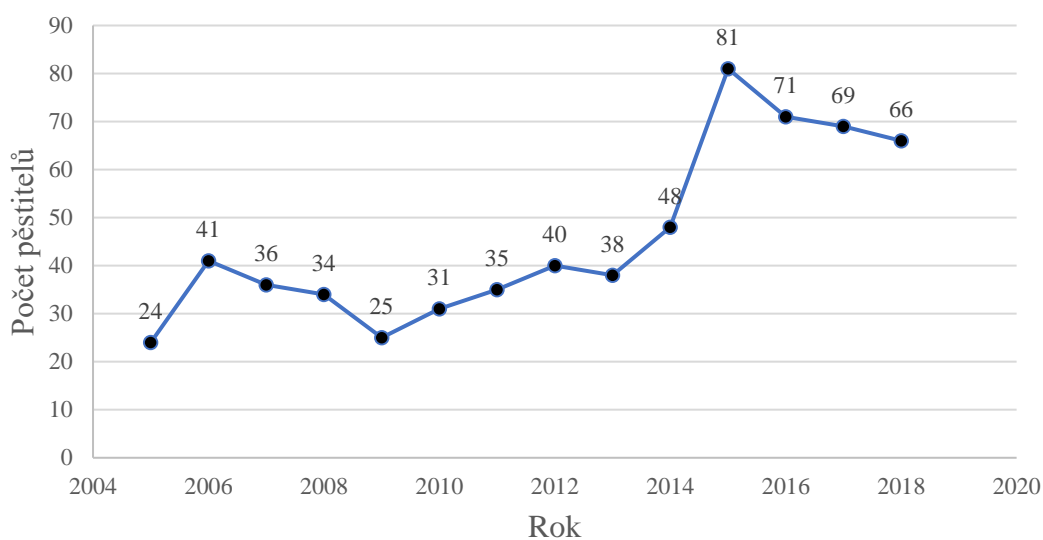
### **2.1.4 Konopné potravinové výrobky**

Konopí jako hospodářská surovina se využívá v řadě odvětvích průmyslu, nejvíce se zpracovává zejména semeno a stonek. Jeho následné užití také ovlivňuje typ pěstování a sklizeň. V České republice se smějí bez licence pěstovat odrůdy konopí s obsahem látek ze skupiny tetrahydrokanabinolů méně jak 0,3 % podle zákona číslo 167/1998 o návykových látkách (Ruman, 2014).

Sklizená plocha konopí v České republice byla nejvyšší v roce 2007 (Obr. 2), následně začala prudce klesat z důsledku poklesu ceny konopného vlákna kvůli hospodářské krizi (Hospodářské noviny, 2009). Největší počet pěstitelů konopí byl v zemi v roce 2015 (Obr. 3). Momentálně je v České republice 66 pěstitelů konopí a osetá plocha byla 699,26 hektarů (Celní správa České republiky, 2018).



Obr. 2 Sklizená plocha konopí v hektarech v České republice s předběžnými daty pro rok 2018 (ke dni 16.10.2018) (Celní správa České republiky, 2018).



Obr. 3 Počet pěstitelů konopí v České republice s předběžnými daty pro rok 2018 (ke dni 16.10.2018) (Celní správa České republiky, 2018).

### 2.1.4.1 Konopné semeno

Konopné semeno je na trhu k dispozici v neloupané i v loupané formě, slouží jako krmivo pro zvířata a je také vhodné pro lidskou konzumaci. Semena konopí jsou výborným zdrojem výživy, obsahují přibližně 30 % oleje, 25 % bílkovin a také značné množství vlákniny, vitaminů a minerálů (Tab. 1) (Callaway, 2004). Celé konopné semeno obsahuje přibližně pouze 2 % volných mono- a disacharidů glukosy, fruktosy a sacharosy. Nejvíce je obsažena sacharosa, trisacharid rafinosa je zcela nepřítomný (Mattila *et al.*, 2018). Semena se konzumují syrová, nebo také máčená či pražená. Psychotropní a omamné látky nejsou v semeni přítomné, jelikož se vyskytují pouze v pryskyřici a na současném trhu jsou semena dostupná z odrůd konopí se sníženým obsahem THC, tedy z technického konopí (Ruman, 2014). Dále se mohou zpracovávat a získávají se další cenné suroviny.

### 2.1.4.2 Konopný olej

Potravinářský konopný olej se získává lisováním semen za studena a obsahuje více než 80 % polynenasycených mastných kyselin. Zejména je výborným zdrojem esenciálních mastných kyselin: kyseliny linolové a alfa-linolenové, které patří do skupiny omega-6 a omega-3 mastných kyselin a je nutné je přijímat z potravy, jelikož lidské tělo není schopné jejich biosyntézy. Poměr omega-6 a omega-3 mastných kyselin je běžně v konopném oleji mezi 2:1 a 3:1, což je považováno za optimální pro lidské zdraví. Vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin snižuje koncentraci LDL-cholesterolu a krevní tlak. Konopný olej se také používá při léčbě řady akutních a chronických onemocněních, například pro zhojení ran a popálenin, při léčbě chřipky, kožních problémů, alergenních symptomů či zánětlivých onemocnění (Callaway, 2004).

Tab. 1 Typické výživové složení celého a loupaného semeno konopí (Callaway a Pate, 2009).

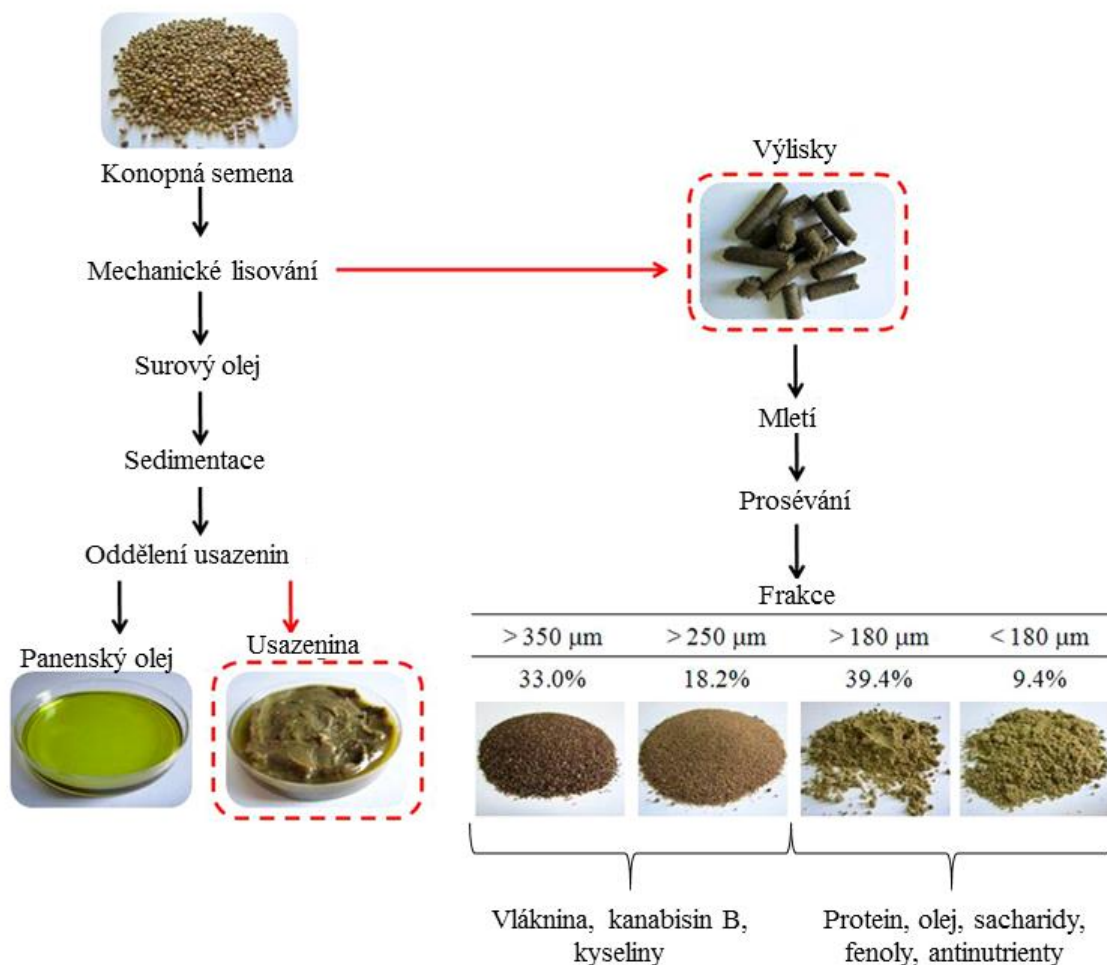
	<b>Celé semeno</b>	<b>Loupané semeno</b>
<b>Olej</b>	36 %	44 %
<b>Protein</b>	25 %	33 %
<b>Sacharidy</b>	28 %	12 %
<b>Vlhkost</b>	6 %	5 %
<b>Popel</b>	5 %	6 %
<b>Energie</b>	2200 kJ·100 g <sup>-1</sup>	2093 kJ·100 g <sup>-1</sup>
<b>Vláknina</b>	28 %	7 %
Stravitelná vláknina	6 %	6 %
Nestravitelná vláknina	22 %	1 %

Obsah oleje v semenech závisí na odrůdě, roku a místě pěstování a na klimatických podmínkách. Lisováním semen lze získat 60-80 % oleje a odrůdy vyšlechtěné pro produkci vláken nejsou vhodné pro produkci oleje, jelikož sklizený materiál z pole vykazuje heterogenní kvalitu. Ta je způsobena sběrem zralých semen společně s nezralými. Přítomnost nezralých semen vede k vysokému obsahu chlorofylu a vyšší vlhkosti, což vede ke změně chuti a vůni oleje. Vysoce kvalitní panenský konopný olej by měl mít světle až tmavě zelenou barvu a oříškovou chuť. Žluklost oleje je způsobena oxidací zejména nenasycených mastných kyselin, kterých konopný olej obsahuje velké množství. Doporučuje se láhve s konopným olejem uzavírat za přítomnosti dusíku (Matthäus a Brühl, 2008).

Olej pro lidskou konzumaci je nejlépe získáván z čerstvých, dobře omytých semen, které byly sušeny na vzduchu při nízké teplotě (< 25 °C). Finální vlhkost semen by měla být menší jak 10 % hmotnosti a je potřeba zamezit růstu plísní během sklizení až po čas sušení. Houbová infekce semen způsobuje zápach po rybách a amoniaku. Olej po lisování za studena je zfiltrován nebo ponechán k usazení 1-2 týdny a následně dekantován před lahvováním do skla. Během lisování a výroby oleje by měla být zachována inertní atmosféra, dokud olej není uzavřen v láhvi kvůli možné oxidaci. Olej by dále měl být chráněn před světlem a skladován při nízké teplotě pro zamezení nechtěné chuti a pachu oleje způsobených oxidací mastných kyselin a uvolňováním kyselin z triacylglyceridů (Callaway a Pate, 2009). Konopný olej není vhodné zahřívat a jeho konzumace po otevření lahve a skladování více než 2 měsíce se nedoporučuje. V porovnání s olejem jsou konopná semena méně náchylná k oxidaci během skladování díky jejich ochranné slupce (Matthäus a Brühl, 2008). Stejně podmínky pro skladování pak ovšem neplatí pro loupaná konopná semena, kdy je jejich slupka odstraněna.

#### **2.1.4.3 Konopný proteinový izolát**

Konopný bílkovinný izolát je vedlejším produktem při lisování oleje z konopných semen. Po vylisování olejového podílu ze semen zůstávají výlisky, které se mletím zpracovávají na konopný prášek a z něj se získává mechanickým zpracováním bílkovinný izolát (Obr. 4). Izolát poté slouží jako doplněk stravy pro doplnění denních příjmů bílkovin.



Obr. 4 Zjednodušené schéma zpracování konopných semen pro získání oleje. Výsledkem mechanického lisování je několik vedlejších produktů, které momentálně také nacházejí své využití. Vyznačeny jsou jednotlivé frakce mechanického zpracování konopných výlisků, ze kterých lze získat konopný proteinový izolát (Pojić *et al.*, 2014; převzato a upraveno).

Rostlinné bílkovinné izoláty jsou momentálně středem zájmu vzhledem k jejich větší udržitelnosti a menším výrobním nákladům oproti izolátům ze živočišných zdrojů (Gorissen *et al.*, 2018). Konopný proteinový izolát může obsahovat až 86 % bílkovin a je hypoalergenní a vysoce stravitelný (Mamone *et al.*, 2019).

#### 2.1.4.4 Konopná mouka

Konopná mouka se vyrábí pomletím semenných výlisků nebo celých semen. Odtučněním konopné mouky se poté získává bílkovinný izolát. Výlisky nebo mouka se přidávají do krmných směsí dobytka a jiných chovných zvířat. Krmené slepice snášejí vajíčka se zřetelně žlutým žloutkem díky vysokému obsahu karotenoidů v konopném semenu (Ruman a Klvaňová, 2008). Příklad konopných semen a pokrutin může zlepšovat



kvalitu vajec a masa s ohledem na obsah esenciálních omega-3 mastných kyselin (Yalcin *et al.*, 2018).

#### **2.1.4.5 Silice**

Z konopných květů lze destilací získat silice. Esence nachází uplatnění při dochucování čajů, nealkoholických nápojů a piva, při výrobě sladkostí a zmrzliny (Ruman a Klvaňová, 2008). Květy společně s listy se přidávají do bylinných čajů, solí a jiných potravin.

## **2.2 Nutriční složení konopných výrobků**

### **2.2.1 Makronutrienty**

#### **2.2.1.1 Proteiny**

Proteiny jsou organické sloučeniny o velké molekulové hmotnosti, které se skládají z aminokyselin spojených peptidovou vazbou. Proteiny mohou tvořit vazby s dalšími organickými sloučeninami, poté se nazývají konjugované. Příkladem mohou být glykoproteiny, kdy se polypeptid kovalentně váže s jednou nebo více molekulami sacharidů. Takový proces se nazývá glykosylace a výsledný produkt pak glykoprotein. Dalšími možnými konjugovanými proteiny mohou být lipoproteiny (vazba s lipidy) a nukleoproteiny (vazba s nukleovou kyselinou). Aminokyseliny, polymerizující monomery nutné pro vznik proteinu, jsou biosyntetizovány řadou biochemických procesů zahrnující transkripci a translaci. Lidské tělo je schopné syntetizovat jen část aminokyselin, 8 z nich musí přijímat z potravy a označují se jako esenciální (Yildiz, 2010).

Proteiny, společně s lipidy a sacharidy, jsou zdrojem energie pro živý organismus. Jsou nezbytnou složkou potravy, jelikož slouží jako hlavní zdroj dusíku. Hlavními zdroji rostlinných proteinů jsou semena, dále také ovoce, zelenina a okopaniny. Aminokyselinové složení semen je odlišné od potravin živočišného původu, často rostlinné zdroje proteinů mají nedostatek některé esenciální aminokyseliny. Ovšem správně vyvážená kombinace různých rostlinných zdrojů bílkovin může poskytnout vysoce nutričně kvalitní a plnohodnotnou proteinovou směs (Velíšek a Hajšlová, 2009; Gorissen *et al.*, 2018).

### 2.2.1.1.1 Proteinové složení konopí a jeho vlastnosti

Konopné semeno obsahuje 24,8 g bílkovin a výlisky ze semen 33,5 g ve 100 g čerstvé hmoty, jsou výborným zdrojem stravitelného proteinu. Globulární protein albumin a edestin jsou dva hlavní proteiny konopného semene a oba jsou bohaté na esenciální aminokyseliny důležité pro lidské zdraví. Semeno také obsahuje významné množství aminokyselin obsahujících síru, cysteinu a methioninu, a vysoký podíl argininu a kyseliny glutamové (Callaway, 2004). Konopné semeno navíc neobsahuje žádný gluten, což ho dělá významným zdrojem rostlinného proteinu pro lidi trpící celiakií, autoimunitní intolerancí na lepek. Dalším důležitým faktem je nepřítomnost faktorů inhibující trypsin v konopném semeni, které mohou být nalezeny v sóji a jiných rostlinných produktech (Callaway a Pate, 2009). Inhibitory trypsinu potřebují pro svou inaktivaci tepelné zpracování. Konopné semeno obsahuje velice málo antinutričních faktorů, tudíž je lépe stravitelné a může být konzumováno bez tepelného zpracování. Konopný proteinový izolát získaný při lisování oleje ze semen může obsahovat až 86 % proteinů, z čehož zásobní protein edestin tvoří okolo 65 % z celkových bílkovin. Peptidomickou analýzou bylo zjištěno, že pouze omezené množství potenciálně bioaktivních a/nebo alergenních peptidových sekvencí po *in vitro* trávení přežilo gastrointestinální trávení (statický model). Navíc všechny známé konopné alergeny, zahrnující protein podobný thaumatinu a proteiny přenášející lipidy, byly zcela odstraněny při výrobním procesu izolátu, ani žádné bílkovinné fragmenty nebyly přítomny po gastrointestinálním trávení. Konopný proteinový izolát tedy může být součástí hypoalergenních potravin (Mamone *et al.*, 2019).

Aminokyselinové složení konopných proteinů albuminu a globulinu je srovnatelné, liší se pouze v menších odlišnostech. Ve vodě nerozpustný globulin má vyšší obsah aromatických a hydrofobních aminokyselinových zbytků a také vyšší obsah sirných aminokyselin, zejména methioninu oproti albuminu. Vyšší obsah aromatických a hydrofobních aminokyselin může vést ke zvýšení interakcí protein-protein v polypeptidovém řetězci. Výsledkem je tedy rigidnější konformační struktura, která způsobuje snížení rozpustnosti proteinu, což potvrzuje závislost vlastností proteinu na schopnosti proteinu interagovat s vodnou fází. Obsah větvených aminokyselin je opět vyšší v globulinu, což může z globulinu dělat nutričně kvalitnější protein v porovnání s albuminem, jelikož větvené aminokyseliny jsou důležité pro svalový metabolismus.

Ve vodě rozpustný albumin má méně disulfidových vazeb, tudíž má otevřenější flexibilnější strukturu (Malomo a Aluko, 2015).

Konopný proteinový izolát je lépe stravitelný než sójový proteinový izolát. Po *in vitro* inkubaci konopného proteinové izolátu s enzymy pepsinem a trypsinem byly proteinové složky lépe stravitelné a byly získány oligopeptidy o molekulové hmotnosti menší než 10,0 kDa. Po trávení *in vitro* pouze za přítomnosti pepsinu byla stravitelnost konopného proteinového izolátu srovnatelná se sójovým. Po inkubaci s trypsinem a pepsinem zároveň byla stravitelnost konopného izolátu stanovena na 88-91 % oproti 71 % sójového izolátu. Konopný protein může být vzhledem k lepší stravitelnosti kvalitnějším zdrojem proteinů pro lidskou konzumaci než izolát sójový (Wang *et al.*, 2008).

Protein z konopných semen je vysoce stravitelný, ať už v jeho přirozené formě nebo jako výlisky z konopných semen. Odstranění slupky navíc přispívá k lepší stravitelnosti proteinů, pravděpodobně díky odstranění složek neutrální detergentní vlákniny, které by mohly limitovat stravitelnost proteinů. Nutriční kvalita bílkovin se dá vyjádřit metodou určení PDCAAS skóre (protein digestibility-corrected amino acids score). Hodnotu skóre konopných proteinů limituje obsah lysinu, který je v porovnání s jinými zdroji u konopného proteinu nižší. Tato metoda je primárně zaměřena na relativní schopnost bílkovinných zdrojů poskytnout všechny potřebné aminokyseliny. Jako reference slouží množství aminokyselin potřebné ve stravě u dětí, u kterých je vyžadováno vyšší množství lysinu. V porovnání s ostatními proteinovými zdroji se konopné zdroje (zejména loupané konopné semeno) se svou hodnotou PDCAAS řadí mezi některé luštěniny (fazole, čočka) a mají vyšší hodnotu než celozrnné produkty, jako například celozrnná pšenice (Tab. 2). Nicméně celkové složení aminokyselin, zahrnující bohaté zastoupení argininu, udává konopnému proteinu vlastnosti zdraví prospěšného rostlinného bílkovinného zdroje pro lidskou stravu (House *et al.*, 2010).

Tab. 2 Hodnota PDCAAS skóre pro zdroje konopného proteinu v porovnání s jinými zdroji potravinového proteinu (House *et al.*, 2010).

<b>Bílkovinový zdroj</b>	<b>PDCAAS (%)</b>
Kasein	100
Vaječný bílek	100
Hovězí	92
Sójový proteinový izolát	92
Cizrna (konzervovaná)	71
Hrachová mouka	69
Fazole (konzervované)	68
Loupané konopné semeno	61
Pinto fazole (konzervované)	57
Ovesné vločky	57
Čočka (konzervovaná)	52
Konopné semeno	51
Mouka z konopných semen	48
Celozrnná pšenice	40
Mandle	23

### 2.2.1.1.2 Srovnání rostlinných a živočišných zdrojů bílkovin

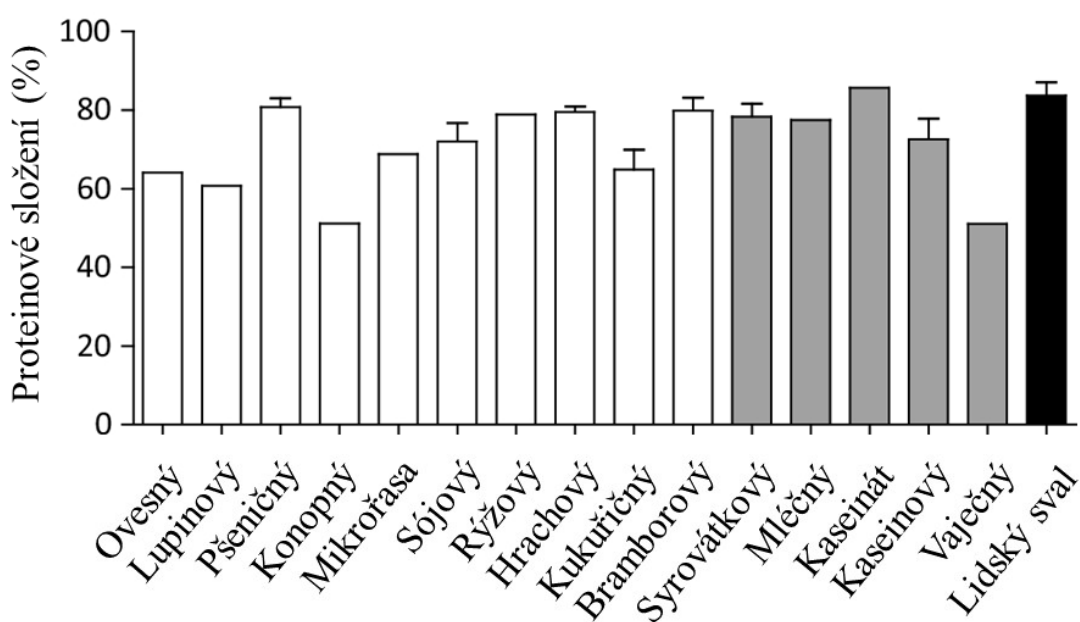
Callaway (2004) ve své práci srovnal bílkovinový obsah konopného semene a jiných rostlinných i živočišných zdrojů (Tab. 3). Konopné semeno mělo ze srovnávaných vzorků druhý nejvyšší obsah bílkovin, vyšší obsah měly sójové boby. Ovšem ve srovnání s živočišnými zdroji bílkovin (vaječný bílek a syrovátkový prášek) mělo konopné semeno téměř dvakrát vyšší podíl bílkovin.

Gorissen *et al.* (2018) ve své studii srovnali proteinové a aminokyselinové složení komerčně dostupných proteinových izolátů rostlinného i živočišného původu. V minulosti byly zaznamenány podstatné rozdíly ve vlastnostech bílkovin mezi různými zdroji bílkovin rostlinného původu. Důvodem mohlo být provedení nezávislých analýz a hodnocení pouze jediného zdroje bílkovin nebo srovnání pouze některých zdrojů rostlinných bílkovin.

Tab. 3 Typické bílkovinové složení (%) jednotlivých potravin (Callaway, 2004).

<b>Potravina</b>	<b>Bílkovinový obsah (%)</b>
Brambora	2
Pšenice	14
Kukuřice	11
Rýže	9
Sójové boby	32
Konopné semeno	25
Řepka	23
Vaječní bílek	13
Syrovátkový prášek	13

Proto v této studii použili stejné analytické postupy na velkém výběru proteinových izolátů široce dostupných na trhu, aby byl získán komplexnější přehled o jejich složení. Obsah bílkovin v izolátech byl stanoven Dumasovou spalovací metodou pro určení celkového dusíku. Množství bílkovin je poté vypočítáno vynásobením standardním faktorem 6,25 pro přeměnu dusík – protein. Faktor přeměny byl použit pouze jediný pro všechny analyzované vzorky, a to kvůli přímému porovnání mezi rozmanitými zdroji bílkovin. Bílkovinový obsah v izolátech se pohyboval v rozmezích 51 až 86 % (Obr. 5). Rostlinné izoláty měly obsah bílkovin 51 až 81 %. Nejméně bílkovin na čerstvou hmotu obsahoval konopný izolát, nejvíce poté pšeničný. Živočišné zdroje obsahovaly 51 až 86 % bílkovin, nejméně obsahoval vaječný izolát a největší obsah bílkovin měl kaseinát. Lyofilizovaná tkáň lidského kosterního svalu obsahovala 84 % bílkovin. Proteinové izoláty se lišily v obsahu bílkovin také mezi různými dodavateli. Vzorek konopného proteinového izolátu byl od jednoho výrobce (Gorissen *et al.*, 2018).



Obr. 5 Průměrný ( $\pm$  SEM) bílkovinový obsah v procentech na čerstvou hmotu proteinových izolátů a lidského kosterního svalu. Hodnoty byly stanoveny dle obsahu dusíku a vynásobeny standardním faktorem přeměny 6,25. Bílé sloupce reprezentují rostlinné zdroje, šedé živočišné a černý sloupec lidský sval (Gorissen *et al.*, 2018; převzato a upraveno).

Tabulka 4 znázorňuje reprezentativní množství bílkovin nebo proteinového izolátu, které je nutné zkonzumovat, aby lidské tělo získalo 2,7 g leucinu nebo 10,9 g esenciálních aminokyselin, což je množství leucinu nebo esenciálních aminokyselin přítomných v 25 g čistého syrovátkového proteinu (nebo také v 32 g syrovátkového proteinového izolátu), kde bylo dokázáno, že toto množství ve velké míře stimuluje syntézu svalových proteinů u lidí (Gorissen *et al.*, 2017; Gorissen *et al.*, 2018). Z tabulky lze vyčíst variabilitu v rostlinných zdrojích bílkovin. Pro získání 2,7 g leucinu musí být zkonzumováno 20 až 54 g bílkovin rostlinného původu, které je možné získat z 31 g práškového kukuřičného izolátu proteinu nebo až ze 105 g práškového izolátu konopí. Z deseti rostlinných proteinů zahrnutých v této analýze je bramborový protein jediným zdrojem bílkovin, který splňuje požadavky Světové zdravotnické organizace pro všechny esenciální aminokyseliny. Při konzumaci bramborových bílkovin, jako jediného zdroje bílkovin v potravě při doporučené denní konzumaci bílkovin  $0,66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$ , by se mělo získat dostatečné množství všech esenciálních aminokyselin (WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007; Gorissen *et al.*, 2018).

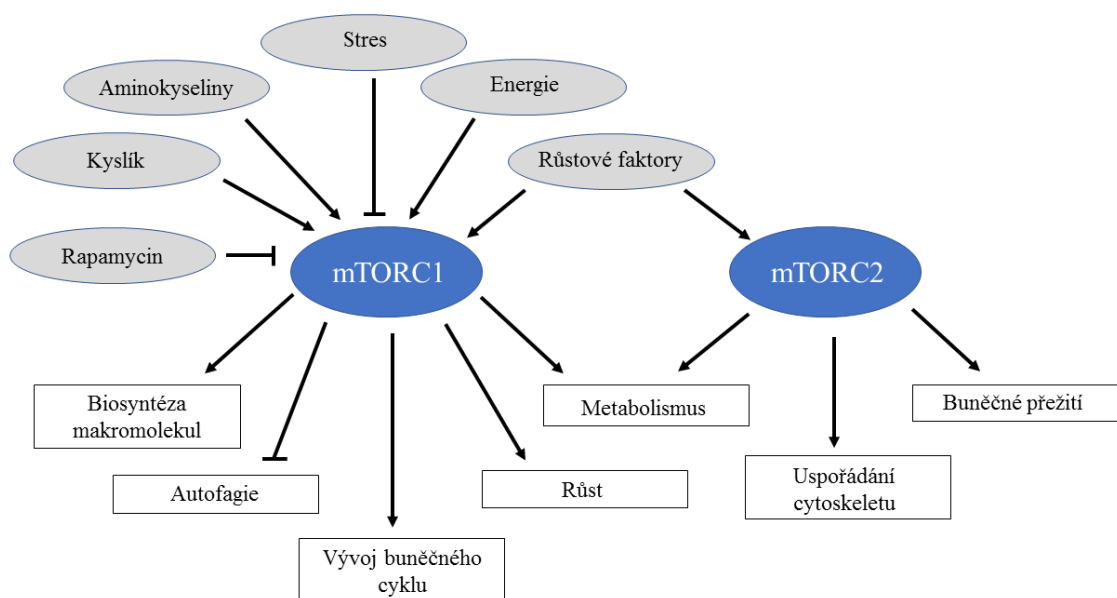
Tab. 4 Reprezentativní množství proteinu proteinového izolátu a množství surového proteinového izolátu nutného pro získání 2,7 g leucinu nebo 10,9 g esenciálních aminokyselin (Gorissen *et al.*, 2018).

Typ proteinového izolátu	Přísun leucinu		Přísun esenciálních aminokyselin	
	Množství proteinu (g)	Množství surového materiálu (g)	Množství proteinu (g)	Množství surového materiálu (g)
Ovesný	47	73	51	79
Lupinový	52	86	50	83
Pšeničný	45	55	49	60
Konopný	54	105	48	93
Mikrořasa	48	69	48	69
Sójový	40	55	40	55
Rýžový	37	47	39	49
Hrachový	38	48	37	46
Kukuřičný	20	31	34	52
Bramborový	33	41	30	37
Syrovátkový	25	32	25	32
Mléčný	31	39	28	36
Kaseinát	30	35	28	33
Kaseinový	34	47	32	44
Vaječný	39	77	34	66

### 2.2.1.1.3 Regulace syntézy proteinů

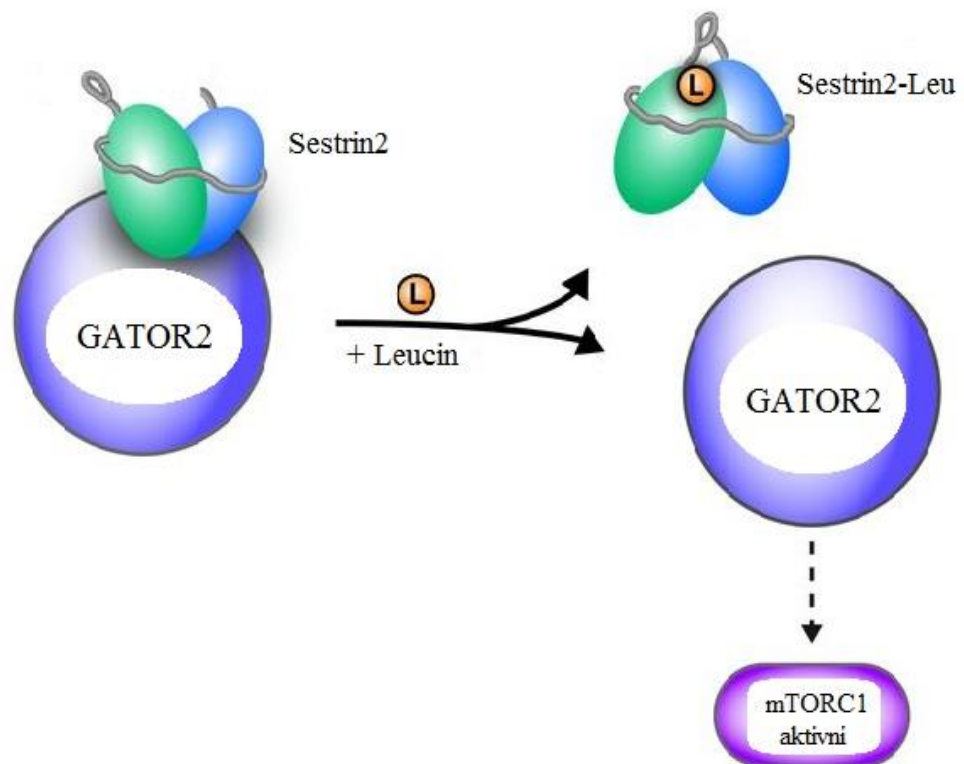
Většina organismů si osvojila mechanismus pro účinný přechod mezi anabolickým a katabolickým stavem, který jim umožňuje přežít a růst v prostředí, kdy přísun živin se mění. U savců je příkladem takového mechanismu signální dráha řízená proteinovou kinasou mTOR (mammalian nebo mechanistic TOR). mTOR je atypická serin/threonin proteinová kinasa, která patří do enzymové rodiny fosfoinositid-3-kinas (PI3K) a reguluje iniciaci translace. Název TOR (target of rapamycin) je odvozen od rapamycinu, což je makrolid produkovaný bakterií *Streptomyces hygroscopicus* a TOR je jeho cílovou molekulou. mTOR interaguje s řadou proteinů a tvoří s nimi dva rozdílné komplexy: mTOR komplex 1 (mTORC1) a 2 (mTORC2). Komplexy mTOR jsou odlišně citlivé na rapamycin, stejně tak jako na přítomnost růstových faktorů a následné odpovědi na tyto podněty mohou být u komplexů různé (Obr. 6) (Laplante a Sabatini, 2012).

Vzrůstající intracelulární dostupnost aminokyselin v kosterních svalových buňkách plní dvě funkce: poskytuje substrát pro biosyntézu polypeptidů nebo řídí aktivaci (fosforylaci) regulačních mechanismů translace mRNA. Některé aminokyseliny mohou přímo aktivovat mechanismus syntézy svalových proteinů aktivací komplexu mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) a následně dochází k downstream anabolické signalizaci a stimulaci syntézy svalového proteinu (Atherton *et al.*, 2010).



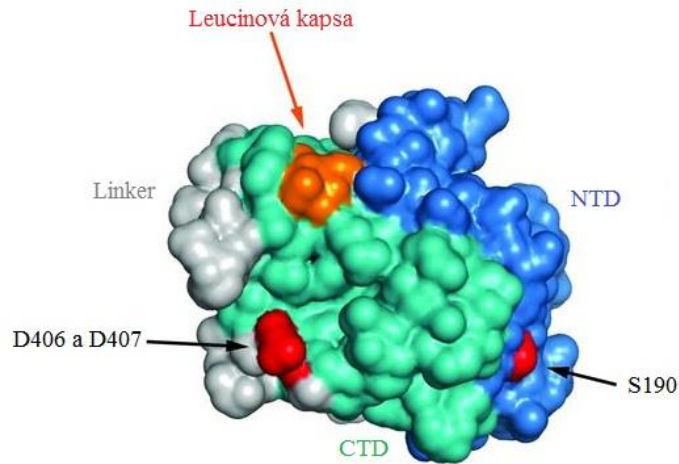
Obr. 6 Schéma dvou odlišných komplexů mTOR kinasy, jejich regulace a forma odpovědi na různé podněty a faktory (Laplante a Sabatini, 2012; upraveno).

Za anabolismus svalových proteinů, který je indukován přítomností aminokyselin, jsou primárně zodpovědné esenciální aminokyseliny (Volpi *et al.*, 2003). Nejvýznamnější funkci ze všech aminokyselin má rozvětvená aminokyselina leucin. Cytosolický leucin přenáší signál na mTORC1 regulací nukleotidového stavu heterodimerické Rag guanosin trifosfatasy (GTPasa) a dochází k translokaci mTORC1 z cytosolu na lysosomální membránu, kde je komplex aktivován. Do této regulační dráhy jsou také zapojeny GTPasa aktivující proteinový komplex GATOR1 a pentamerický proteinový komplex GATOR2. Protein Sestrin2 slouží jako leucinový senzor a interaguje s regulátorem GATOR2 (Obr. 7). Sestrin2 je monomerní alfa-helikální globulární protein, který obsahuje vazebné místo pro leucin (Obr. 8). Vazebné místo obsahuje kyselinu glutamovou a arginin, kdy nabitě volné aminové a karboxylové skupiny postranního řetězce vážou hydrofobní leucin z obou stran kapsy proteinu a tvoří solné můstky (Saxton *et al.*, 2016). Proto obsah leucinu tvoří klíčovou vlastnost bílkovinných zdrojů, jelikož může regulovat syntézu proteinů.



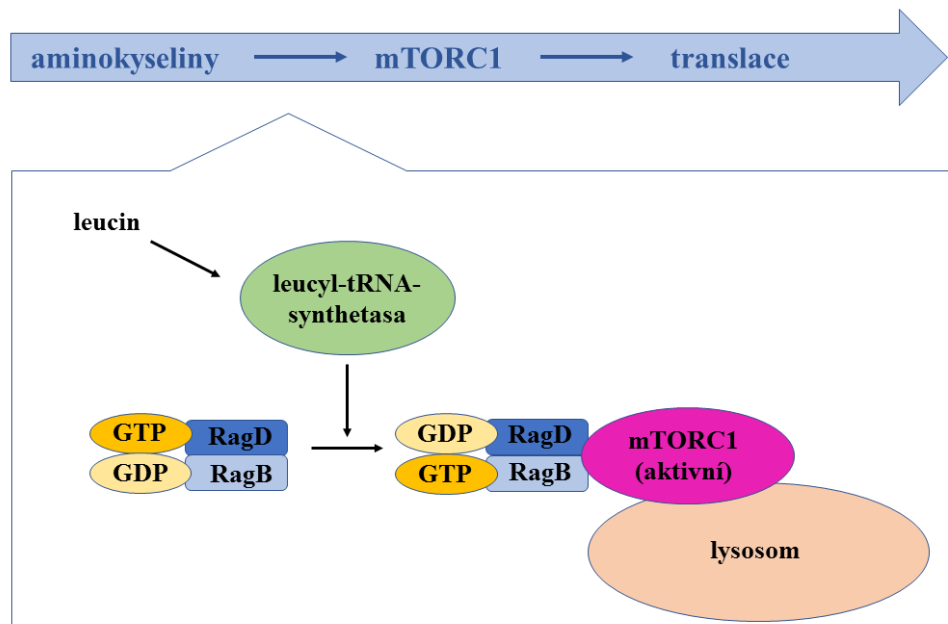
Obr. 7 Model reprezentující interakci mezi leucinem a proteinem Sestrin2. Vazba leucinu na Sestrin2 způsobuje konformační změnu a disociaci proteinu od komplexu GATOR2. Následně GATOR2 aktivuje dráhu mTORC1 (Saxton *et al.*, 2016; převzato a upraveno).





Obr. 8 Strukturální model proteinu Sestrin2. Barevně vyznačené jsou domény, červená barva reprezentuje vazebné místo pro komplex GATOR2, oranžová vazebnou kapsu pro leucín (Saxton *et al.*, 2016; převzato a upraveno).

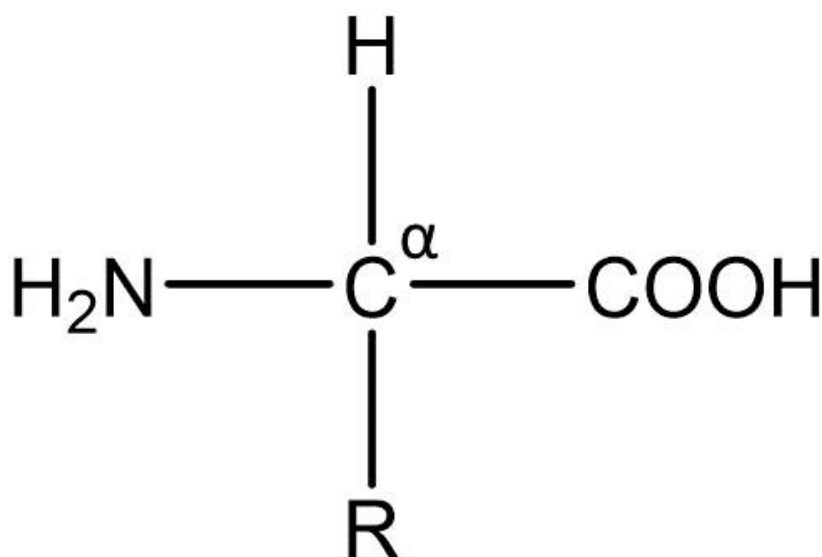
Kritickou roli v aktivaci komplexu mTORC1 pravděpodobně hraje i enzym leucyl-tRNA synthetasa, který je citlivý na intracelulární koncentraci leucinu a spouští molekulární děje, které vedou k aktivaci mTORC1. Enzym se přímo váže na Rag GTPasu a slouží tedy jako GTPasa-aktivační protein pro Rag GTPasu, která následně aktivuje mTORC1 (Obr. 9) (Han *et al.*, 2012).



Obr. 9 Schéma regulace mTORC1 enzymem leucyl-tRNA-synthetasou (Han *et al.*, 2012; upraveno).

### 2.2.1.2 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou organické kyseliny obsahující nejméně jednu aminoskupinu a současně karboxylovou skupinu. V přírodě se nachází 22 proteinogenních aminokyselin, které jsou vázány v bílkovinách nebo se vyskytují jako volné látky. V bílkovinách se nachází výhradně  $\alpha$ -aminokyseliny a s výjimkou glycinu se jedná o opticky aktivní sloučeniny. Uhlík v poloze 2, označovaný jako  $\alpha$ , je vždy substituovaný  $-\text{NH}_2$  a  $-\text{COOH}$  skupinou, molekulou vodíku a  $-\text{R}$  skupinou. R skupina může reprezentovat další molekulu vodíku či postranní řetězec, který může obsahovat případně další  $-\text{NH}_2$  nebo  $-\text{COOH}$  skupiny (Obr. 10). Podle polaritý postranního řetězce a iontové formy v neutrálním prostředí lze aminokyseliny řadit do několika skupin. Dále je možné aminokyseliny dělit, podle schopnosti lidského těla si je syntetizovat, na esenciální, semiesenciální a neesenciální. Mezi esenciální aminokyseliny patří valin, leucin, isoleucin, threonin, methionin, lysin, fenylalanin a tryptofan. Člověk je nucen tyto aminokyseliny přijímat z potravy, jejich obsah v potravinách je z výživového hlediska signifikantní. Aminokyseliny zastoupené v potravě v malém množství mohou být označovány jako limitující, jelikož určují rozsah proteosyntézy a mají podíl na výživové hodnotě stravy. Semiesenciální aminokyseliny jsou arginin a histidin, kdy rychle rostoucí organismus (u malých dětí) není schopen si je v dostatečné míře syntetizovat (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obr. 10 Strukturální vzorec aminokyselin.

### 2.2.1.2.1 Aminokyselinové složení konopí a jiných zdrojů

Callaway (2004) srovnal aminokyselinové složení konopných semen a jiných potravin rostlinného i živočišného původu (Tab. 5). Konopné semeno obsahuje nutričně významné množství všech esenciálních aminokyselin a má výjimečně vysoké množství argininu. Oproti ostatním zdrojům má také značný obsah aminokyselin obsahujících síru, methioninu a cystinu. Na obrázku 11 je grafické srovnání obsahu aminokyselin v proteinu z konopného semene, sójových bobů a vaječného bílku. Jako je tomu u většiny rostlinných zdrojů bílkovin, i konopné semeno postrádá dostatečné množství esenciální aminokyseliny lysinu, tudíž není vhodné jako jediný zdroj proteinu ve stravě pro děti mladší 10 let dle požadavků na obsah esenciálních aminokyselin FAO/WHO (WHO & FAO, 1995; Callaway a Pate, 2009).

Biologická hodnota bílkovin je obecně limitována obsahem esenciálních aminokyselin lysinu (deficientní v cereáliích a jiných rostlinných zdrojích), methioninu (deficientní v kravském mléku a mase), threoninu (deficientní v pšenici a rýži) a tryptofanu (deficientní v kaseinu, kukuřici a rýži) (Belitz *et al.*, 2009)

Tab. 5 Typické aminokyselinové složení potravin. Jednotlivé hodnoty aminokyselin jsou uvedeny v gramech na 100 g (Callaway, 2004).

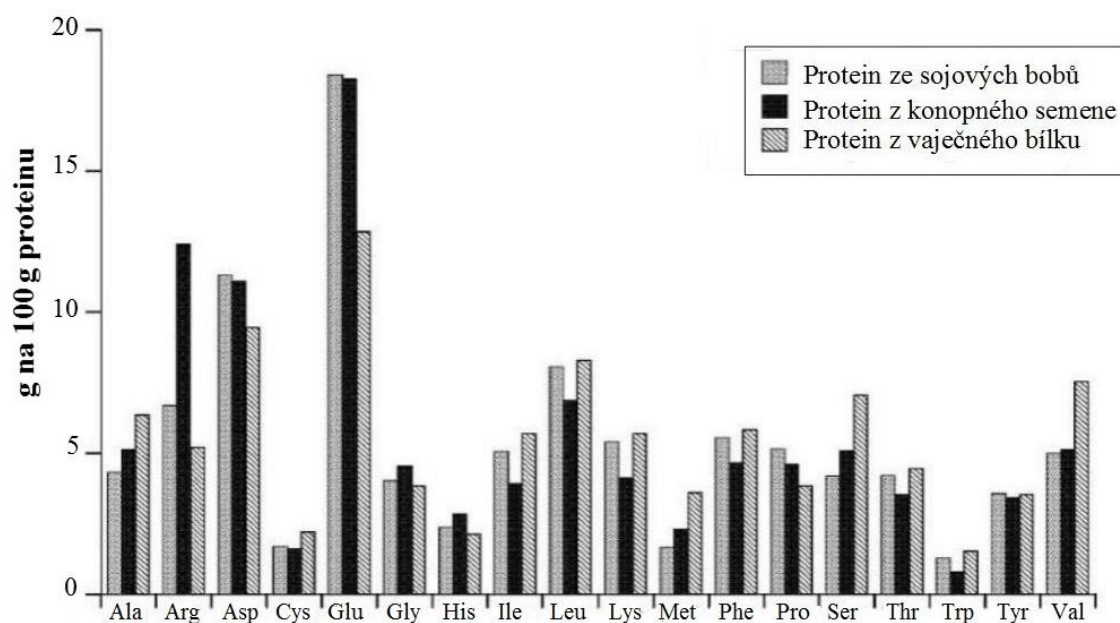
Aminokyselina	Brambora	Pšenice	Kukuřice	Rýže	Řepka
Alanin	0,09	0,50	0,72	0,56	1,05
Arginin	0,10	0,61	0,40	0,62	1,49
Asparagová kyselina	0,34	0,69	0,60	0,86	1,82
Cystin	0,02	0,28	0,15	0,10	0,39
Glutamová kyselina	0,37	4,00	1,80	1,68	4,41
Glycin	0,10	0,71	0,35	0,47	1,28
Histidin*	0,03	0,27	0,26	0,19	0,72
Isoleucin*	0,08	0,53	0,35	0,35	1,00
Leucin*	0,11	0,90	1,19	0,71	1,80
Lysin*	0,10	0,37	0,33	0,31	1,49
Methionin*	0,02	0,22	0,18	0,17	0,46
Fenylalanin*	0,08	0,63	0,46	0,43	1,05
Prolin	0,09	1,53	0,85	0,40	1,59
Serin	0,08	0,70	0,47	0,48	1,10
Threonin*	0,07	0,42	0,34	0,34	1,13
Tryptofan*	0,02	0,51	0,04	0,09	0,31
Tyrosin	0,06	0,40	0,36	0,33	0,69
Valin*	0,10	0,61	0,46	0,51	1,26

\*esenciální aminokyselina

Tab. 5 Typické aminokyselinové složení potravin. Jednotlivé hodnoty aminokyselin jsou uvedeny v gramech na 100 g (Callaway, 2004) (pokračování).

Aminokyselina	Sójové boby	Konopné semeno	Vaječný bílek	Syrovátkový prášek
Alanin	1,39	1,28	0,83	0,61
Arginin	2,14	3,10	0,68	0,39
Asparagová kyselina	3,62	2,78	1,23	1,49
Cystin	0,54	0,41	0,29	0,17
Glutamová kyselina	5,89	4,57	1,67	2,40
Glycin	1,29	1,14	0,50	0,29
Histidin*	0,76	0,71	0,28	0,29
Isoleucin*	1,62	0,98	0,74	0,85
Leucin*	2,58	1,72	1,08	1,40
Lysin*	1,73	1,03	0,74	1,15
Methionin*	0,53	0,58	0,47	0,23
Fenylalanin*	1,78	1,17	0,76	0,49
Prolin	1,65	1,15	0,50	0,43
Serin	1,54	1,27	0,92	0,64
Threonin*	1,35	0,88	0,58	1,02
Tryptofan*	0,41	0,20	0,20	0,25
Tyrosin	1,14	0,86	0,46	0,47
Valin*	1,60	1,28	0,98	0,91

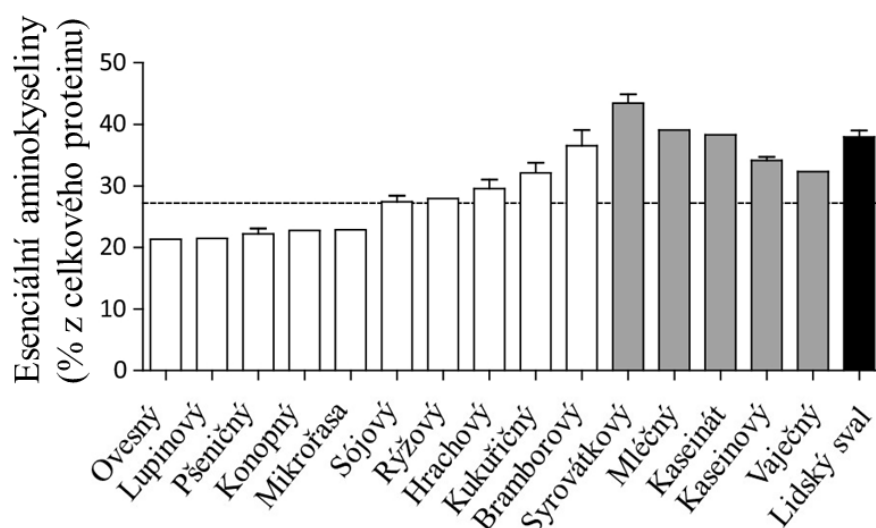
\*esenciální aminokyselina



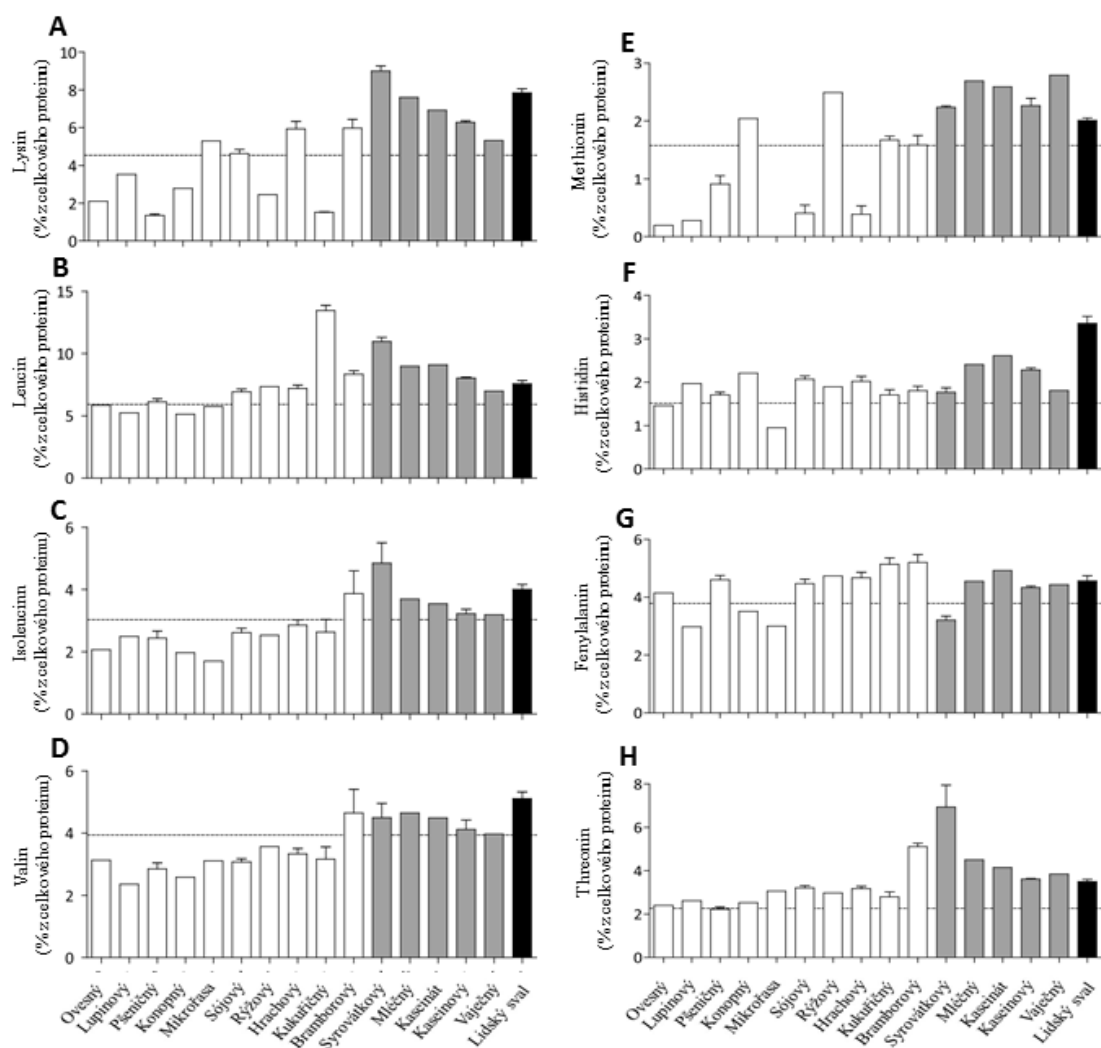
Obr. 11 Grafické znázornění aminokyselinového profilu bílkovin sójových bobů, konopného semene a vaječného bílku. Ala = alanin, Arg = arginin, Asp = kyselina asparagová, Cys = cystein, Gly = glycin, His = histidin, Ile = isoleucin, Leu = leucin, Lys = lysin, Met = methionin, Phe = fenylalanin, Pro = prolin, Ser = serin, Thr = threonin, Trp = tryptofan, Tyr = tyrosin, Val = valin (Callaway, 2004; převzato a upraveno).

Analýzu aminokyselinového složení rostlinných a živočišných proteinových izolátů provedli Gorissen *et al.* (2018) pomocí UPLC-MS/MS. Aminokyselinové složení bylo srovnáno se složením lidského kosterního svalu, které by mělo mít „ideální“ aminokyselinové složení se zaměřením na syntézu svalových proteinů. Všechny aminokyseliny jsou potřebné pro syntézu proteinů a nedostatek jedné nebo více z nich může ovlivnit odpověď pro syntézu proteinů po jídle. Obsah esenciálních aminokyselin byl nižší u rostlinných zdrojů oproti živočišným zdrojům a lidskému kosternímu svalu (Obr. 12). Konopný proteinový izolát měl nižší obsah esenciálních aminokyselin, než jsou požadavky WHO/FAO/UNU. Tyto požadavky by nebyly splněny, jestliže by konopný proteinový izolát byl jediným zdrojem bílkovin v potravě během dne. Tyto požadavky dále nesplnily pšeničný, ovesný, lupinový izolát a izolát z mikrořasy. Nejvyšší obsah esenciálních aminokyselin měl izolát syrovátkový.

Konopný proteinový izolát obsahoval nejmenší množství leucinu (5,1 %) z analyzovaných vzorků. Leucin je nepostradatelný pro aktivaci proteinové syntézy. Nejvyšší množství leucinu z rostlinných zdrojů obsahovaly izoláty kukuřičný a bramborový. Průměrný obsah leucinu všech rostlinných izolátů byl opět nižší oproti živočišným zdrojům. Obdobně je tomu i s obsahem lysinu a methioninu v rostlinných izolátech, ovšem je velká odlišnost ve složení mezi jednotlivými rostlinnými zdroji (Obr. 13).



Obr. 12 Průměrný ( $\pm$  SEM) obsah esenciálních aminokyselin v procentech z celkového proteinu z bílkovinových zdrojů a lidského kosterního svalu. Bílé sloupce reprezentují rostlinné zdroje, šedé živočišné a černý sloupec lidský sval. Přerušovaná čára znázorňuje požadavky na aminokyseliny v potravě pro dospělého člověka (WHO/FAO/UNU Expert Consultation, 2007). Tryptofan nebyl měřen (Gorissen *et al.*, 2018; převzato a upraveno).



Obr. 13 Průměrný ( $\pm$  SEM) obsah esenciálních aminokyselin lysinu (A), leucinu (B), isoleucinu (C), valinu (D), methioninu (E), histidinu (F), fenylnalaninu (G) a threoninu (H) v procentech z celkového proteinu z bílkovinných zdrojů a lidského kosterního svalu. Bílé sloupce reprezentují rostlinné zdroje, šedé živočišné a černý sloupec lidský sval. Přerušovaná čára znázorňuje požadavky na aminokyseliny v potravě pro dospělého člověka dle WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007) (Gorissen *et al.*, 2018; převzato a upraveno).

### 2.2.1.3 Lipidy a mastné kyseliny

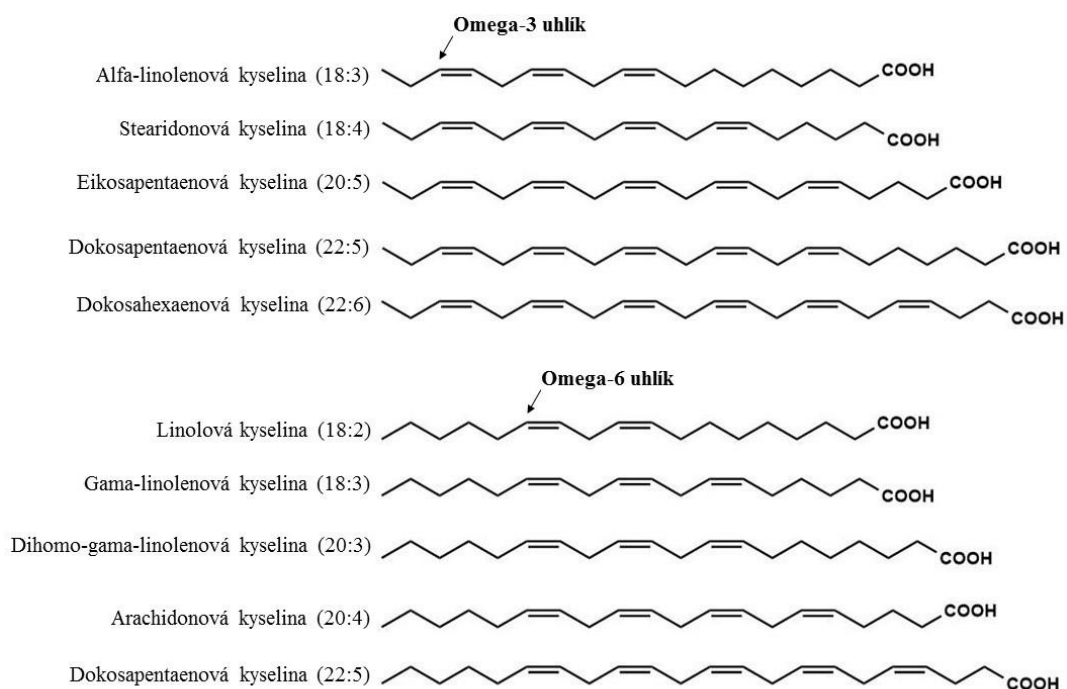
Lipidy jsou podle struktury klasifikovány na jednoduché nebo složené. Stavebními prvky jednoduchých a složených lipidů jsou mastné kyseliny a alkoholy. Jednoduché lipidy zahrnují acylglyceroly, etherové acylglyceroly, steroly a jejich estery a vosky. Jednoduše řečeno mohou být jednoduché lipidy hydrolyzovány na dvě různé složky, obvykle na alkohol a mastnou kyselinu. Složené lipidy jsou fosfolipidy, glykolipidy a sfingolipidy. Tyto struktury tvoří tři nebo více rozdílných sloučenin po hydrolyze.

Lipidy mohou být dále rozděleny podle jejich fyzikálních vlastností při pokojové teplotě (tekuté oleje a pevné tuky) a jejich polaritě (neutrální a polární lipidy). Neutrální lipidy jsou mastné kyseliny, alkoholy, glyceridy a steroly. Fosfolipidy a glykolipidy jsou polární molekuly (O'Keefe, 2002).

Mastné kyseliny jsou monokarboxylové kyseliny s dlouhým, nerozvětveným a alifatickým řetězcem, který je nasycený nebo nenasycený. Přírodně vyskytující se mastné kyseliny mají řetězec s 4-28 uhlíky. Tuková tkáň živočichů obsahuje vysoké množství mastných kyselin s dlouhým nasyceným řetězcem, zatímco většina rostlinných olejů obsahuje značný podíl mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin (Arvanitoyannis *et al.*, 2010).

Esenciální mastné kyseliny jsou polynenasycené, jelikož obsahují dvě nebo více dvojných vazeb v hydrofobním uhlíkatém řetězci (Obr. 14) a lidé a ostatní savci nejsou schopni jejich biosyntézy. Jsou součástí buněčné membrány a zajišťují její tekutost. V lidském těle se běžně vyskytují dva typy esenciálních mastných kyselin: skupina omega-6 mastných kyselin odvozených od kyseliny *cis*-linolové (18:2) a skupina omega-3 mastných kyselin odvozených od kyseliny alfa-linolenové (18:3). Existuje ještě skupina omega-9 mastných kyselin odvozených od kyseliny olejové (18:1). Kyselina olejová ovšem není esenciální, jelikož si ji savci mohou vytvořit z jednoduchých prekurzorů. Všechny tři skupiny nenasycených kyselin jsou metabolizovány stejnou sadou enzymů na metabolity s dlouhými řetězci (Das, 2006b).

Savčí buňky nemohou přeměnit omega-6 mastné kyseliny na omega-3, jelikož postrádají enzym omega-3-desaturasu. Skupiny omega-6 a omega-3 mastných kyselin jsou metabolicky a funkčně vzdálené a často mají důležité protichůdné fyziologické funkce. Zatímco buněčné proteiny jsou dané geneticky, složení polynenasycených mastných kyselin v buněčné membráně ve velké míře záleží na příjmu ze stravy. Vyšší poměr omega-6/omega-3 mastných kyselin, jak je tomu převážně v západní stravě, může vést k patogenezi řady nemocí zahrnujících kardiovaskulární onemocnění, rakovinu, osteoporózu a zánětlivé a autoimunitní onemocnění. Naopak zvýšený příjem omega-3 kyselin může pomoci v prevenci srdečních chorob a jiných onemocnění (Simopoulos, 1991; Simopoulos, 2006).

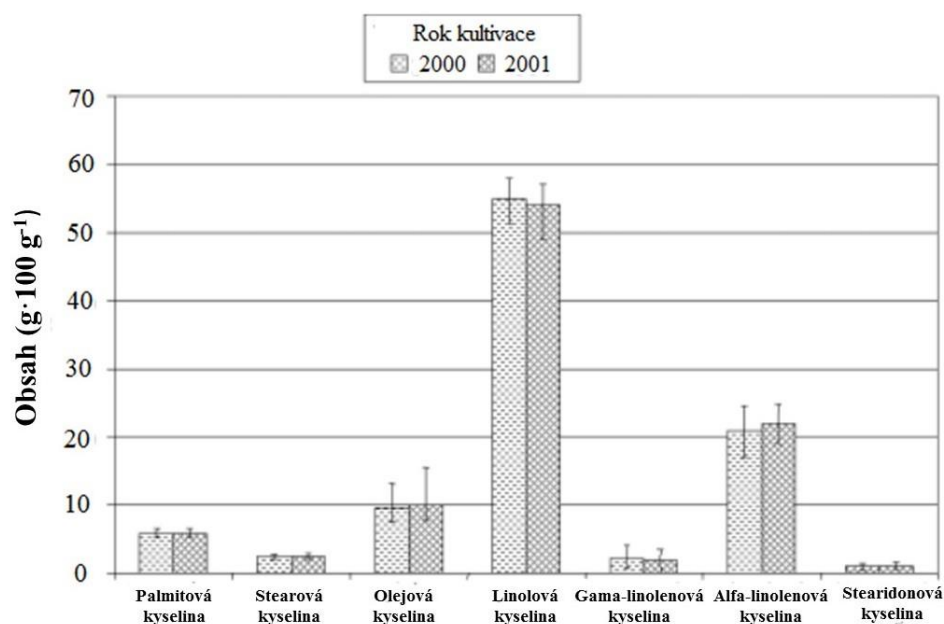


Obr. 14 Názvy (počet uhlíků a dvojných vazeb) a struktury omega-3 a omega-6 mastných kyselin (Doughman *et al.*, 2007).

### 2.2.1.3.1 Obsah mastných kyselin v konopí

Loupaná konopná semena obsahují 44 % oleje, celé neloupané semeno 36 % a konopné výlisky 11 %. Konopný olej obsahuje více než 80 % polynenasycených mastných kyselin a je významným zdrojem esenciálních mastných kyselin, zejména kyseliny linolové, patřící do skupiny omega-6 mastných kyselin, a kyseliny alfa-linolenové, patřící do skupiny omega-3 mastných kyselin a jejich množství v oleji převládá. Poměr omega-6 a omega-3 mastných kyselin je obvykle v konopném oleji mezi 2:1 a 3:1 a tento poměr je považován za optimální pro lidské zdraví (Callaway, 2004). Součet množství kyseliny linolové a linolenové v oleji může dosahovat až 80 g na 100 g oleje (Obr. 15). Naopak obsahuje malé množství nasycených mastných kyselin, přibližně 9 g na 100 g oleje. V obsahu nasycených mastných kyselin jsou zejména zastoupeny kyseliny palmitová a stearová (Matthäus a Brühl, 2008).





Obr. 15 Obsah mastných kyselin v konopném oleji ze semen a porovnání mezi dvěma roky kultivace (Matthäus a Brühl, 2008; převzato a upraveno).

Obsah mastných kyselin v oleji závisí na roku kultivace, klimatických podmínkách, lokalitě a genotypu (Matthäus *et al.*, 2006). V minulosti nebyla zjištěna významná změna ve složení esenciálních mastných kyselin mezi odrůdou pěstovanou pro olejnaté semeno v jižní Evropě a odrůdou pro vlákno pěstovanou ve střední Evropě (Tab. 6) (Callaway, 2004). Ovšem byla pozorována změna v zastoupení kyseliny gama-linolenové a stearidonové v konopném semeni mezi severními a jižními odrůdami. Nejvyšší koncentrace těchto mastných kyselin byla nalezena u odrůd konopí z extrémního severního klimatu (Callaway *et al.*, 1997). Pravděpodobně vysoce nenasycené mastné kyseliny chrání semeno před zamrznutím během zimních měsíců a konopný olej se začíná zhušťovat až při několika denním skladováním při teplotách méně jak  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Callaway a Pate, 2009).

Tab. 6 Profil mastných kyselin (%) konopných semen pěstovaných pro získání oleje a vlákna (Callaway, 2004).

Mastná kyselina	Konopné semeno pěstované pro oleje	Konopné semeno pěstované pro vlákno
Palmitová	5	8
Stearová	2	3
Olejová	9	11
Linolová	56	55
Alfa-linolenová	22	21
Gama-linolenová	4	1
Stearidonová	2	< 1

### 2.2.1.3.2 Srovnání rostlinných zdrojů lipidů

Množství oleje v konopných semenech je přibližně mezi 28 a 35 gramy na 100 gramů semen. Obsah oleje je lehce nižší v porovnání se semeny řepky ( $45 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) a vyšší oproti sójovým bobům ( $20 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Matthäus a Brühl, 2008). Callaway (2004) provedl srovnání složení mastných kyselin v konopném semenu a jiných olejnatých semenech (Tab. 7). Konopné semeno obsahovalo všechny stanovované mastné kyseliny a 84 % polynenasycených mastných kyselin, což bylo druhé nejvyšší procentuální množství ze zkoumaných semen. O procento vyšší obsah těchto kyselin měly semena pupalky. Konopné semeno obsahovalo také značné množství esenciálních mastných kyselin: kyseliny linolové, stearidonové, alfa- a gama-linolenové. Kyselina stearidonová byla stanovena už jen v černém rybíze a v minimálním množství v pšeničných klíčcích. Vyšší obsah kyseliny alfa-linolenové byl změřen ve lněném semenu a kyselina gama-linolenová byla v některých plodinách zcela nepřítomná.

Triacylglyceroly jsou tvořeny jednou molekulou glycerolu a třemi mastnými kyselinami, které jsou s glycerolem spojeny esterovou vazbou (Obr. 16). Mastné kyseliny nacházející se na vnější pozici triacylglycerolu (pozice 1 a 3) v potravinových olejích jsou jednoduše hydrolyzovány během trávení pankreatickými a lipoproteinovými lipasami, převážně ve dvanáctníku. Zbývající mastná kyselina v prostřední pozici (pozice 2) nově vytvořeného monoacylglyceridu je uchována v chylomikronech, kde může být vytvořen nový triacylglycerol z ostatních mastných kyselin v těle (Callaway a Pate, 2009).

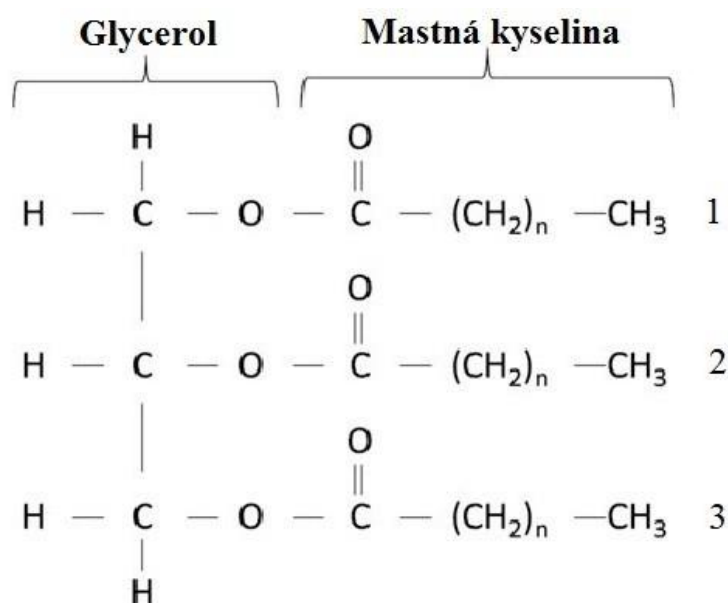
Tab. 7 Typický profil (%) mastných kyselin konopného semene a jiných olejnatých semen (Callaway, 2004).

Plodina	Palmitová kyselina	Stearová kyselina	Olejová kyselina	Linolová kyselina	Alfa-linolenová kyselina
Konopné semeno	5	2	9	56	22
Černý rybíz	7	1	11	48	13
Lněné semeno	6	3	15	15	61
Pupalka	6	1	8	76	0
Slunečnice	5	11	22	63	< 1
Pšeničné klíčky	3	17	24	46	5
Řepka	4	< 1	60	23	13
Sója	10	4	23	55	8
Brutnák	12	5	17	42	0
Kukuřice	12	2	25	60	1
Olivy	15	0	76	8	< 1

Tab. 7 Typický profil (%) mastných kyselin konopného semene a jiných olejnatých semen (Callaway, 2004) (pokračování).

Plodina	Gama-linolenová kyselina	Stearidonová kyselina	Polynenasycené mastné kyseliny	Poměr omega-6/omega-3
Konopné semeno	4	2	84	2,5
Černý rybíz	17	3	81	4,1
Lněné semeno	0	0	76	0,2
Pupalka	9	0	85	> 100,0
Slunečnice	0	0	63	> 100,0
Pšeničné klíčky	5	< 1	56	10,2
Řepka	0	0	36	1,8
Sója	0	0	63	6,9
Brutnák	24	0	66	> 100,0
Kukuřice	0	0	60	60,0
Olívy	0	0	8	> 100,0

Dále může tento monoacylglycerid sloužit jako prekurzor pro střešní nebo jaterní fosfolipidovou syntézu. Je tedy značně výhodné, aby se v centrální pozici triacylglycerolu nacházely esenciální mastné kyseliny pro dlouhodobé zdravotní účinky potravinových olejů. Z komerčních olejů je pravděpodobně konopný olej jediným zdrojem, který dokáže dodat obě esenciální mastné kyseliny (linolovou a linolenovou) v centrální pozici triacylglycerolu ve významném množství, jelikož LnLLn, LLL a LLnLn tvoří až 45 % ze všech triacylglycerolů (Tab. 8) (Callaway a Pate, 2009).



Obr. 16 Struktura triacylglycerolu představující glycerol a tři mastné kyseliny vázané esterovou vazbou. Označeny jsou jednotlivé pozice mastných kyselin na glycerolové kostře (Mills *et al.*, 2017; převzato a upraveno).

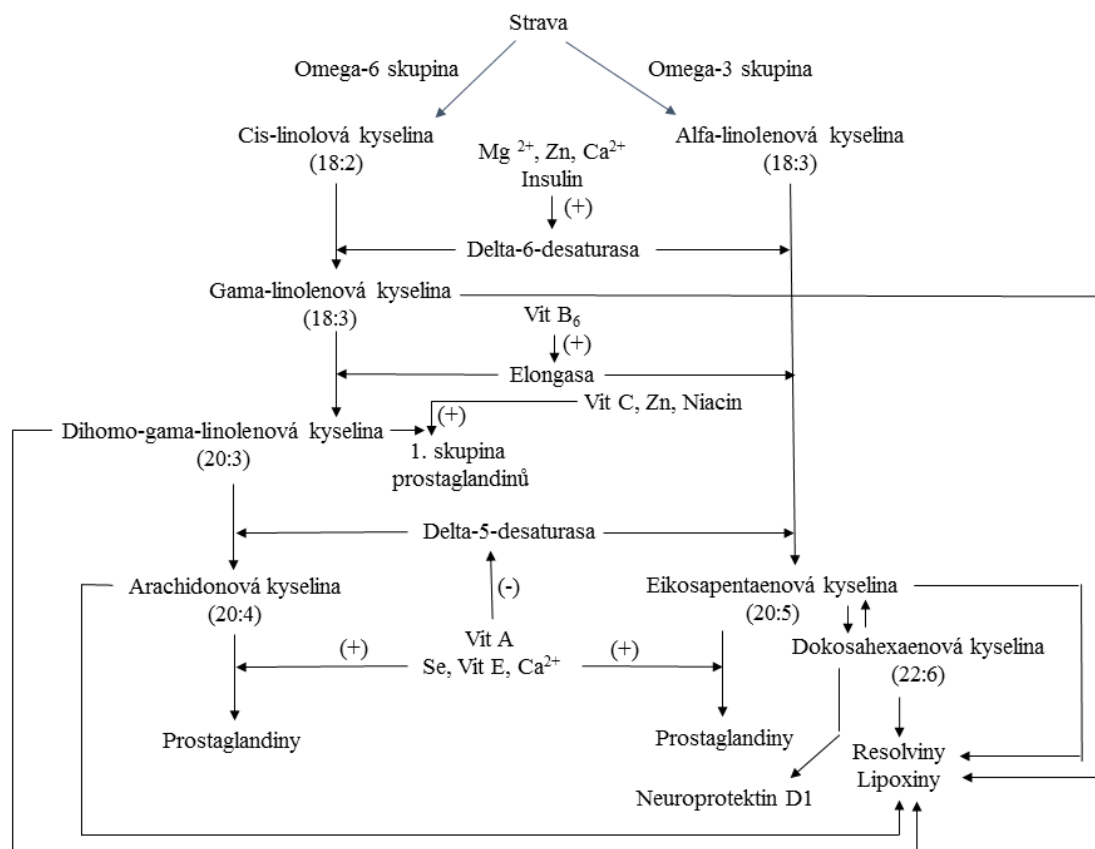
Tab. 8 Stereospecifita (pozice 1, 2, 3) převažujících triacylglycerolů vyskytující se v konopném oleji a srovnání s ostatními rostlinnými oleji. Ln = kyselina alfa-linolenová, L = kyselina linolová, O = kyselina olejová, P = kyselina palmitová. (Data získána z Krist *et al.*, 2006; Karupaiyah a Sundram, 2007; Callaway a Pate, 2009).

Typ olej	Triacylglyceroly		
Konopný olej	LnLLn	LLL	LLnLn
Lněný olej	LnLnLn	LnLnL	LnLnO
Řepkový olej	OOO	LOO	OOLn
Olivový olej	OOO	OOP	OLO
Kukuřičný olej	LLL	LOL	LLP
Sójový olej	LLL	LLO	LLP
Slunečnicový olej	LLL	OLL	LOO

### 2.2.1.3.3 Metabolismus esenciálních mastných kyselin

Poměr omega-6 a omega-3 mastných kyselin je jedním z kritérií ovlivňující prospěšnost olejů pro lidské zdraví. Esenciální mastné kyseliny linolová a alfa-linolenová, které je nutné přijímat z potravy kvůli neschopnosti lidského organismu si je biosyntetizovat, spolu soupeří o vazebné místo enzymu delta-6-desaturasy. Delta-6-desaturasa katalyzuje klíčovou reakci přeměny esenciálních mastných kyselin na polynenasycené mastné kyseliny a limituje rychlost počáteční desaturace (Stoffel *et al.*, 2008). Kyselina linolová je metabolizována na dihomogama-linolenovou a arachidonovou kyselinu, kyselina linolenová na kyselinu eikosapentaenovou a dokosahexaenovou. Některé z těchto mastných kyselin s dlouhými řetězci jsou prekurzorem dalších metabolitů, jako jsou prostaglandiny, tromboxany, leukotrieny, lipoxiny a resolviny (Obr. 17) (Das, 2006a).

Úkolem desaturas je odstranění 2 atomů vodíku, zatímco elongasa přidává 2 uhlíky. Tři skupiny polynenasycených mastných kyselin spolu soutěží o stejnou sadu enzymů. Enzymy metabolizují skupiny mastných kyselin s touto preferencí: omega-3 > omega-6 > omega-9. Ovšem aktivity desaturas v lidském těle jsou pomalé (delta-5 > delta-6). Přeměna linolové a alfa-linolenové kyseliny na jejich příslušné metabolity může být v některých případech nedostatečná. Během některých nemocí a stárnutí může nastat situace, kdy je potřeba metabolity přímo suplementovat (Das, 2006b).

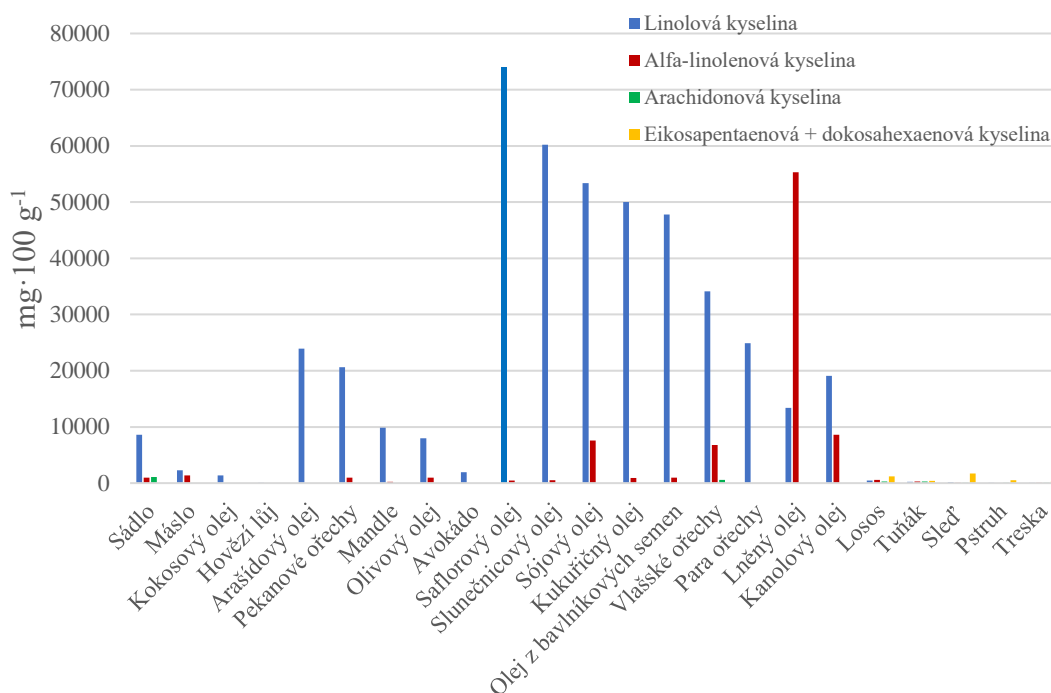


Obr. 17 Schéma znázorňující metabolismus esenciálních mastných kyselin a vliv faktorů na aktivitu delta-6 a delta-5-desaturasy a elongasy a tvorbu prostaglandinů. (+) Zvýšení aktivity enzymu nebo narůst tvorby produktů. (-) Inhibice aktivity enzymu nebo pokles tvorby produktu (Das, 2006a).

Přeměna kyseliny alfa-linolenové na metabolity s dlouhými řetězci, zejména na dokosahexaenovou kyselinu, je větší u žen než u mužů. Tato odlišnost v metabolismu u pohlaví by měla být brána v úvahu při doporučení denní konzumace polynenasycených mastných kyselin (Burdge, 2006). Na obrázku 18 jsou graficky znázorněny obsahy esenciálních a polynenasycených mastných kyselin v různých složkách potravy.

#### 2.2.1.3.4 Stabilita olejů z hlediska jejich složení mastných kyselin

Chemická nestabilita rostlinných olejů je primárně dána mírou nenasycenosti mastných kyselin a jejich procentuálním obsahem. Tato chemická odlišnost vysvětluje, proč jsou relativně nasycené oleje palmový a kokosový stabilnější než vysoce nenasycené oleje konopný a lněný. Palmový a kokosový olej jsou také v pevném stavu při pokojové teplotě, na rozdíl od konopného a lněného oleje, které jsou tekuté i při nízkých teplotách (Callaway a Pate, 2009).



Obr. 18 Obsah polynenasycených mastných kyselin v živočišných a rostlinných zdrojích tuku. Data jsou vyjádřena v mg na 100 g porce. V grafu jsou znázorněny obsahy kyseliny linolové, alfa-linolenové, arachidonové a suma kyselin eikosapentaenové a dokosahehexaenové. (Data jsou vypracována z těchto zdrojů: Hughes a Dhiman, 2002; Benatti *et al.*, 2004; Das, 2006b).

Konopný olej není vhodný pro přípravu jídel, které musí být vystaveny vyšším teplotám po delší dobu. Panenský konopný olej vykazuje značně kratší oxidační stabilitu v Rancimatově testu při 120 °C v porovnání s panenským olivovým a řepkovým olejem. Panenské lněné a olivové oleje mají oxidační stabilitu přibližně 4 a 6 hodin, panenský konopný olej je oxidačně zkažený za méně jak jednu hodinu. Konopný olej také není doporučeno konzumovat po skladování déle jak 2 měsíce v otevřené láhvi (Parker *et al.*, 2003; Matthäus a Brühl, 2008). Náchylnost k oxidaci je také zvýšena přítomností chlorofylu. Panenský konopný olej musí být během skladování chráněn před světlem. Nedostatečná opatření mohou být snadno detekovatelná, olej mění svou barvu ze zelené na žlutou. Vystavení světlu musí být zabráněno během výroby a poté musí být olej skladován v tmavé láhvi (Matthäus a Brühl, 2008; Callaway a Pate, 2009).

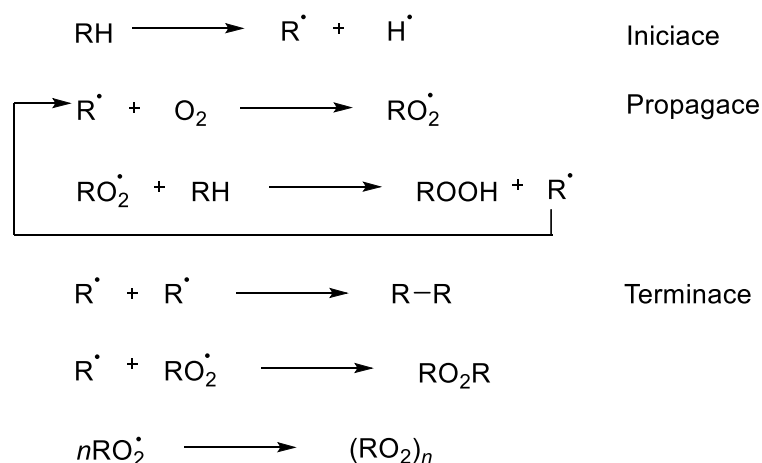
V dnešní době se konopné oleje extrahují převážně lisováním semen za studena. Ve srovnání s extrakcí rozpouštědly nebo za vysokých teplot se nedosahuje stejného extrakčního výtěžku, ale výhodou této techniky jsou menší degradační změny v oleji. Olej není také potřeba chemicky ošetřovat a obsahuje přírodní antioxidanty. Jeden z parametrů pro vyjádření oxidační stability oleje je stanovení peroxidového čísla, jelikož nenasycené vazby mastných kyselin v konopném oleji jsou vysoce náchylné k oxidaci vzdušným

kyslíkem. Vysoké teploty a přístup vzduchu způsobují zvýšení hodnot peroxidového čísla, kterým se stanovuje obsah primárních oxidačních produktů (Tab. 9) (Siger *et al.*, 2008; Dimić *et al.*, 2009).

Během autooxidace olejů dochází ke tvorbě primárních, sekundárních a terciárních oxidačních produktů, kdy následně olej není vhodný ke konzumaci. Faktory, které ovlivňují míru autooxidace, jsou množství přítomného kyslíku, stupeň nenasycenosti, přítomnost antioxidantů a prooxidantů (měď, organické sloučeniny, jakou jsou lipoxidasy a molekuly obsahující hem skupinu), skladovací teplota a vystavení světlu. Autooxidační reakce lze rozdělit do tří částí: iniciace, propagace a terminace (Obr. 19). Během iniciace dochází k odstranění atomu vodíku z uhlíku vedle dvojné vazby (allylová pozice). Z atomu vodíku se stává volný radikál, který se spojuje s kyslíkem a tvoří peroxy volný radikál. Vzniklý radikál odstraňuje další atom vodíku z molekul a vzniká molekula peroxidu vodíku. Jakmile oxidační degradace začne, zahrnuje do reakce další, do té doby nezúčastněné, molekuly. Tyto reakce probíhají neustále, dokud volné radikály mohou reagovat mezi sebou. V terminační fázi dochází ke vzniku neaktivních produktů (deMan, 1999; Callaway a Pate, 2009).

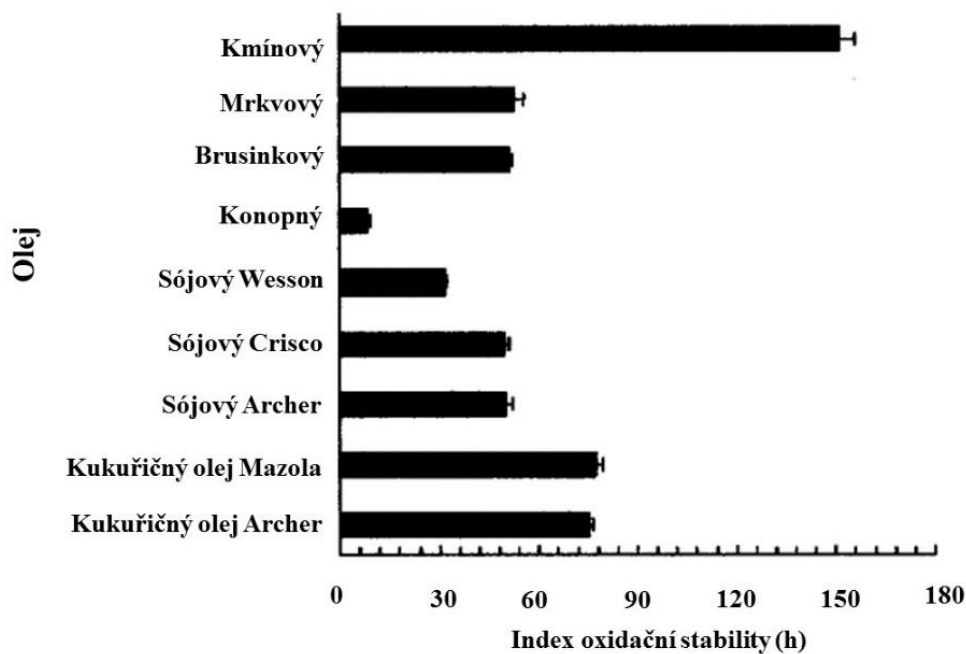
Tab. 9 Hodnoty peroxidového čísla olejů lisovaných za studena pro odlišné odrůdy konopí na počátku a po indukčním čase, metoda zrychleného oxidačního testu (Rancimat) při 100 °C a proudění vzduchu 18-20 l·h<sup>-1</sup> (Dimić *et al.*, 2009).

Odrůda	Počáteční hodnota peroxidového čísla (mmol·kg <sup>-1</sup> )	Hodnota peroxidového čísla po indukci (mmol·kg <sup>-1</sup> )
Novosadska	6,42	6,8
Secuieni	6,43	6,4
Beniko	4,51	6,4
Felina 34	4,26	7,0
Futura 75	4,24	7,6
Tiborszallási	4,10	6,8
Carmagnola S.	5,20	6,6



Obr. 19 Jednotlivé kroky autooxidační reakce a vznik produktů (deMan, 1999).

Na obrázku 20 jsou graficky znázorněny hodnoty indexu oxidační stability pro konopný olej a oleje z jiných surovin. Indexy byly vyjádřeny jako počet hodin potřebných pro vytvoření měřitelné žluklosti vzorků oleje při Rancimatově testu. Konopný olej měl z měřených vzorků nejnižší hodnotu indexu, tudíž ke zkažení konopného oleje je potřeba nejkratší doba a je vysoce náchylný k oxidaci (Parker *et al.*, 2003).



Obr. 20 Hodnoty indexu oxidační stability komerčních olejů lisovaných za studena. Oleje byly testovány v triplicátech, pouze konopný olej v duplikátu (Parker *et al.*, 2003; převzato a upraveno).



Další změna probíhající v olejích je hydrolýza lipidů, kdy dochází k uvolňování mastných kyselin z vazeb chemickými nebo enzymatickými reakcemi a tvorbě volných mastných kyselin. I když původní příčiny a následky oxidační a hydrolytické degradace jsou odlišné, vzájemně spolu interagují a společně se podílejí na redukci trvanlivosti olejů (Frega *et al.*, 1999). Obsah volných mastných kyselin v olejích a tucích se vyjadřuje pomocí hodnot čísla kyselosti. V tabulce 10 jsou uvedeny maximální hodnoty peroxidového čísla a čísla kyselosti dle vyhlášky č. 90/2000 Sb. Ministerstva zemědělství (Vyhláška MZe č. 90/2000 Sb.). Vyhláška už momentálně není platná, v roce 2016 byla nahrazena vyhláškou č. 397/2016 (Vyhláška MZe č. 397/2016 Sb.). Zde už ovšem nejsou uvedeny žádné maximální hodnoty pro parametry hodnotící kvalitu olejů.

Poustková *et al.* (2010) zkoumali kvalitu konopného oleje podle jeho získání. Jedním ze stanovených parametrů bylo číslo kyselosti, peroxidové a jodové číslo (Tab. 11). Jodové číslo vyjadřuje obsah nenasycených vazeb v oleji. První olej byl ze semen lisován za studena, druhý olej extrahován pomocí CO<sub>2</sub>. Olej extrahovaný měl vyšší hodnotu peroxidového čísla, což bylo zapříčiněno pravděpodobně procesem mletí semen a následné časové prodlevě před samotnou extrakcí. Hodnoty u obou olejů je ovšem nutné považovat za zvýšené, u vzorků už probíhala autooxidace. Olej lisovaný měl vyšší hodnotu čísla kyselosti, tudíž obsahoval více volných mastných kyselin. Jodové číslo bylo u obou olejů srovnatelné a odpovídalo hodnotám 154-165 g I<sub>2</sub>·100 g<sup>-1</sup> z předešlé studie (Anwar *et al.*, 2006). V průběhu skladování olejů docházelo ke zvýšení peroxidového čísla a následně jeho poklesu způsobeným přeměnou primárních oxidačních produktů (hydroperoxidů) na sekundární (aldehydy, oxokyseliny) (Obr. 21).

Tab. 10 Hodnoty čísla kyselosti a peroxidového čísla. Uvedené hodnoty platí obecně pro všechny rostlinné tuky a oleje a jejich směsi (Vyhláška MZe č. 90/2000 Sb.).

<b>Parametr</b>	<b>Maximální hodnota</b>
Číslo kyselosti (mg KOH·g <sup>-1</sup> )	0,6
Číslo kyselosti pro oleje lisované za studena a takto deklarované (mg KOH·g <sup>-1</sup> )	4,0
Číslo peroxidové (mekv. per. kysl.·kg <sup>-1</sup> )	10,0
Číslo peroxidové pro oleje lisované za studena a takto deklarované (mekv. per. kysl.·kg <sup>-1</sup> )	15,0

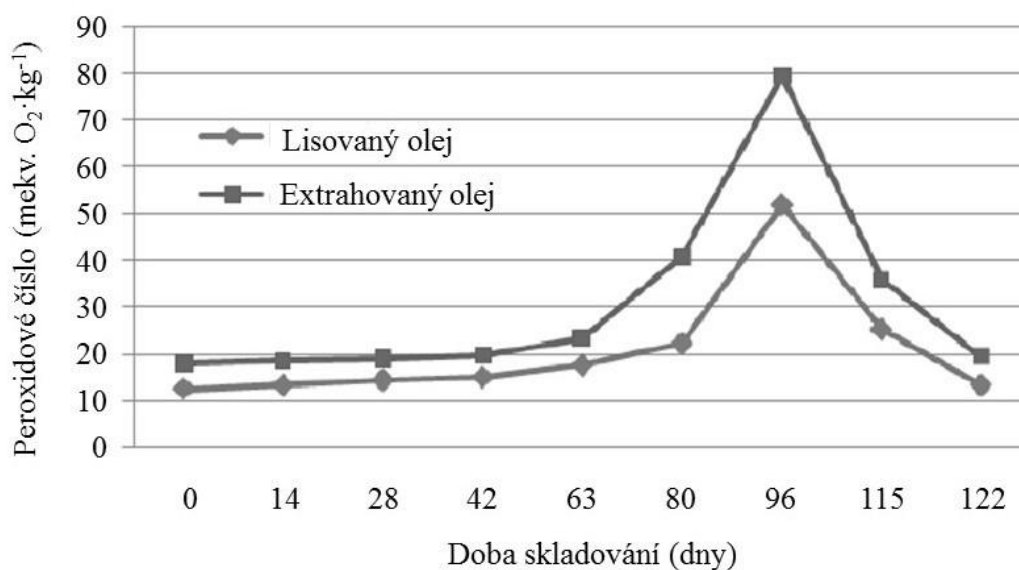
Tab. 11 Parametry určující kvalitu olejů pro konopný olej lisovaný za studena a pro konopný olej extrahovaný pomocí CO<sub>2</sub>. Oba oleje byly získány ze stejných semen (Poustková *et al.*, 2010).

Parametr	Olej lisovaný	Olej extrahovaný
Peroxidové číslo (mekv. O <sub>2</sub> ·kg <sup>-1</sup> )	12,62	18,20
Jodové číslo (g I <sub>2</sub> ·100 g <sup>-1</sup> )	155,67	154,43
Číslo kyselosti (mg KOH·g <sup>-1</sup> )	4,14	0,96

## 2.2.2 Mikronutrienty

### 2.2.2.1 Vitaminy a minerální látky

Vitaminy jsou široká skupina organických sloučenin a jedná se o esenciální mikronutrienty. Vitaminy *in vivo* mají několik funkcí. Slouží jako koenzymy nebo jejich prekurzory (niacin, thiamin, riboflavin, biotin, kyseliny pantothenová, vitamin B<sub>6</sub>, vitamin B<sub>12</sub>, folát), nebo jako součásti antioxidačního obranného systému (kyselina askorbová, některé karotenoidy, vitamin E). Jejich další funkce může být v genové regulaci (vitamin A a D) či mají speciální funkce, jako například vitamin A (zrak), kyselina askorbová (hydroxylační reakce) nebo vitamin K (karboxylační reakce) (Gregory III, 2007). Vitaminy se dělí do dvou skupin podle jejich fyzikálních vlastností: na lipofilní a hydrofilní vitaminy. Lipofilní vitaminy jsou rozpustné v tucích a jedná se o vitaminy A, D, E a K. Hydrofilní vitaminy jsou rozpustné ve vodě a sem patří vitaminy skupiny B a vitamin C (Velíšek a Hajšlová, 2009).



Obr. 21 Graf závislosti peroxidového čísla konopného oleje na době skladování. Oba oleje byly získány ze stejných semen. První olej byl lisován za studena, druhý extrahován ze semen pomocí CO<sub>2</sub> (Poustková *et al.*, 2010; převzato a upraveno).

Během chemických a fyzikálních jevů může docházet k potencionálním ztrátám vitaminů kvůli jejich stabilitě bez ohledu na to, jestli se vitaminy vyskytovaly v potravinách přirozeně nebo byly do nich přidány. K nevyhnutelným ztrátám dochází během výroby, distribuce, prodeje, skladování, přípravy jídel a také během zacházení a distribuce ovoce, zeleniny a plodin po sklizni (Gregory III, 2007).

Minerální látky jsou pevné, krystalické, chemické prvky, které nelze rozložit nebo syntetizovat běžnými chemickými reakcemi. Přestože minerální látky představují minoritní část složek potravy, mají důležitou roli v chemii potravin a výživě. (Singh *et al.*, 2007). Minerální látky lze podle jejich množství klasifikovat do tří skupin: majoritní (makroelementy), minoritní minerální prvky a stopové prvky (mikroelementy). Majoritní minerální látky se mohou v potravinách vyskytovat až v jednotkách hmotnostních procent a jedná se o sodík, draslík, hořčík, vápník, chlor, fosfor a síru. Mezi minoritní minerální látky patří železo a zinek a jejich hmotnostní koncentrace může být několik desítek až stovek  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Stopové prvky jsou zastoupeny v nízkých koncentracích, řadí se sem například hliník, kobalt, bor, chrom, měď, fluor, selen, mangan a jód (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Dostupnost a reaktivita minerálních látek závisí ve velké míře na jejich rozpustnosti ve vodě, jelikož většina nutrientů je dodána a metabolizována organismy ve vodném prostředí. Prvky skupiny I.A a VII.A (Obr. 22) se vyskytují v potravinách převážně jako volné ionty ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  a  $\text{F}^-$ ). Tyto ionty jsou velmi rozpustné ve vodě a mají nízkou afinitu k většině ligandů, proto se vyskytují jako volné ionty ve vodném roztoku. Většina ostatních minerálních látek se vyskytuje jako slabé komplexy, cheláty nebo ve vazbě s kyslíkem (Miller, 2007).

I-A	II-A	III-B	IV-B	V-B	VI-B	VII-B	VIII	VIII	VIII	I-B	II-B	III-A	IV-A	V-A	VI-A	VII-A	O
H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	Ln	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Th	Pa	U												

Obr. 22 Periodická tabulka přirozeně se vyskytujících prvků. Šedé jsou prvky, které jsou označovány jako esenciální pro živočichy a lidi (Miller, 2007; převzato).

### 2.2.2.1.1 Obsah vitaminů a minerálních látek v konopí a jiných zdrojích

Konopné semeno obsahuje značné množství vitaminů a prospěšných minerálních látek (Tab. 12). Vitamin E v tabulce reprezentuje součet dvou tokoferolů: alfa-tokoferolu ( $5 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) a gama-tokoferolu ( $85 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ), jejichž celkové množství v semeni je  $90 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Dle Matthäus *et al.* (2006) převažuje v konopném oleji gama-tokoferol, jehož podíl z celkových tokoferolů je 85 %. Množství ostatních tokoferolů je nižší. Alfa- a delta-tokoferoly jsou zastoupeny po 5 % procentech, obsah beta-tokoferolu a plastochromanolu-8 je menší než 1 %. Oomah *et al.* (2002) vyjádřili poměr tokoferolů v konopném oleji 5:2:90:3 příslušící pro alfa/beta/gama/delta-tokoferol.

Mattila *et al.* (2018) změřili obsah minerálních látek v nutričně hodnotných plodinách (Tab. 13, 14) metodou optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES). Kadmium bylo stanoveno pomocí atomové absorpční spektrometrie v režimu elektrotermické atomizace (ET-AAS). Všechna studovaná semena byla bohatým zdrojem hlavních minerálů (Ca, K, Mg, P, S) a stopových prvků (Cu, Fe, Mn, Zn). Slupky z konopných semen obsahovaly o 30-65 % méně hlavních prvků a zinku než celé semeno. Měď a hořčík byly více distribuovány v celém semeni, které zároveň obsahovalo poměrně vysoké množství zinku. Nejvyšší množství manganu bylo ze studovaných vzorků změřeno v konopném semenu a jeho slupkách. Pohanka obsahovala nejvyšší množství mědi a železa.

Tab. 12 Typické nutriční hodnoty ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) pro vitaminy a minerály v konopném semeni (Callaway, 2004).

Vitamin nebo minerální látka	Hmotnostní koncentrace ( $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ )
Vitamin E	90,0
Thiamin (B1)	0,4
Riboflavin (B2)	0,1
Fosfor (P)	1160
Draslík (K)	859
Hořčík (Mg)	483
Vápník (Ca)	145
Železo (Fe)	14
Sodík (Na)	12
Mangan (Mn)	7
Zinek (Zn)	7
Měď (Cu)	2

Tab. 13 Průměrný obsah minerálních látek ve vzorcích plodin. Hodnoty jsou uvedeny v g na 100 g suché hmoty (Mattila *et al.*, 2018).

Vzorek	Vápník	Draslík	Hořčík	Fosfor	Síra
Bob obecný, celý	0,103	1,33	0,150	0,656	0,212
Bob obecný, loupaný a mletý	0,049	1,50	0,127	0,798	0,285
Lupina, celá	0,310	0,086	0,221	0,470	0,287
Pohanka, celá a mletá	0,022	0,584	0,270	0,544	0,212
Pohanka, otruby	0,029	1,17	0,55	1,23	0,356
Quinoa, celá	0,053	1,00	0,260	0,54	0,17
Quinoa, perlová	0,021	0,29	0,066	0,11	0,077
Lněné semeno	0,233	0,940	0,382	0,656	0,212
Konopné semeno, celé	0,127	0,921	0,496	1,17	0,278
Konopné semeno, slupka	0,166	0,529	0,221	0,393	0,141
Řepkové semeno, press cake	0,872	1,32	0,544	1,39	0,61

Tab. 14 Průměrný obsah minerálních látek a kadmia ve vzorcích plodin. Hodnoty jsou uvedeny v mg na 100 g suché hmoty (Mattila *et al.*, 2018).

Vzorek	Měď	Železo	Mangan	Zinek	Kadmium
Bob obecný, celý	1,66	2,65	1,44	4,85	0,0016
Bob obecný, loupaný a mletý	2,1	3,3	1,00	7,20	0,0005
Lupina, celá	0,64	2,37	2,91	3,40	0,0022
Pohanka, celá a mletá	0,66	3,51	1,96	3,94	0,0047
Pohanka, otruby	6,4	5,9	4,7	7,6	0,0152
Quinoa, celá	0,66	2,8	4,3	3,8	0,0039
Quinoa, perlová	0,25	1,5	0,46	2,4	0,0036
Lněné semeno	1,34	3,48	1,75	5,17	0,0269
Konopné semeno, celé	1,89	4,38	10,5	6,97	0,0015
Konopné semeno, slupka	1,80	3,06	12,1	2,92	0,0015
Řepkové semeno, press cake	0,60	0,43	5,60	5,87	0,0162

## 2.3 Metody

### 2.3.1 Stanovení celkových proteinů

Techniky pro analýzu proteinů v potravinách musí být robustní. To znamená, že musí být aplikovatelné pro široké spektrum vzorků, pro čerstvé potraviny, tak i pro potraviny zpracované. Robustní techniky lze také použít pro potraviny v různých fyzikálních stavech (kapalina, emulze, gely, pasty, prášek) a z různého původu (rostlinné a živočišné zdroje). Analýzy pro stanovení proteinů by měly mít minimální předpřípravu vzorku, jelikož taková příprava způsobuje chybovost a snižuje analytickou přesnost. Některé významné metody pro stanovení proteinů jsou uvedeny v tabulce 15. Kjeldahlova metoda dává přesná měření proteinů bez ohledu na skupenský stav vzorku a stala se referenční metodou v mnoha mezinárodních organizacích. Nicméně znepokojivé může být použití nebezpečných a potenciálně toxických chemikálií během analýzy. Dumasova spalovací metoda je srovnatelně rychlejší, levnější, snadnější, bezpečnější a šetrnější k životnímu prostředí. U obou metod ovšem může docházet k interferenci kvůli přítomnosti jiných zdrojů dusíku ve vzorku (Owusu-Apenten, 2002).

Kjeldahlova metoda byla publikována roku 1883. Původní metoda byla značně modifikována během let. Klíčovými kroky analýzy jsou rozložení vzorku, neutralizace, destilace, zachycení amoniaku a titrace zásobním roztokem kyseliny (Owusu-Apenten, 2002).

Tab. 15 Metody pro analýzu proteinů z potravin, seřazeny přibližně chronologicky (Owusu-Apenten, 2002).

<b>Rok</b>	<b>Technika</b>
1831	Dumas
1843	Nesslerovo činidlo
1849	Biuretová metoda
1859	Alkalické fenolové činidlo (Berthelotova metoda)
1883	Kjeldahlova metoda
1927	Folin-Ciocalteuova metoda
1944	Vázání barviva
1951	Lowryho metoda
1960	Přímá alkalická destilace
1960	Blízká infračervená spektroskopie
1971	Berthelotova reakce modifikace
1975	Lowryho metoda modifikace
1976	Bradfordova metoda
1985	Bicinchoninová metoda

Kjeldahlova metoda je oficiální metodou pro stanovení hrubé bílkoviny v krmivech, zrna a olejnatých semenech Asociace oficiálních analytických chemiků (AOAC Official Method 2001.11) (Association of Official Analytical Chemists International, 2002). I když se jedná o poměrně starou metodu, je stále aktuální pro analýzu proteinů v potravinách a vhodná pro jejich vzájemné srovnání (Mattila *et al.*, 2018).

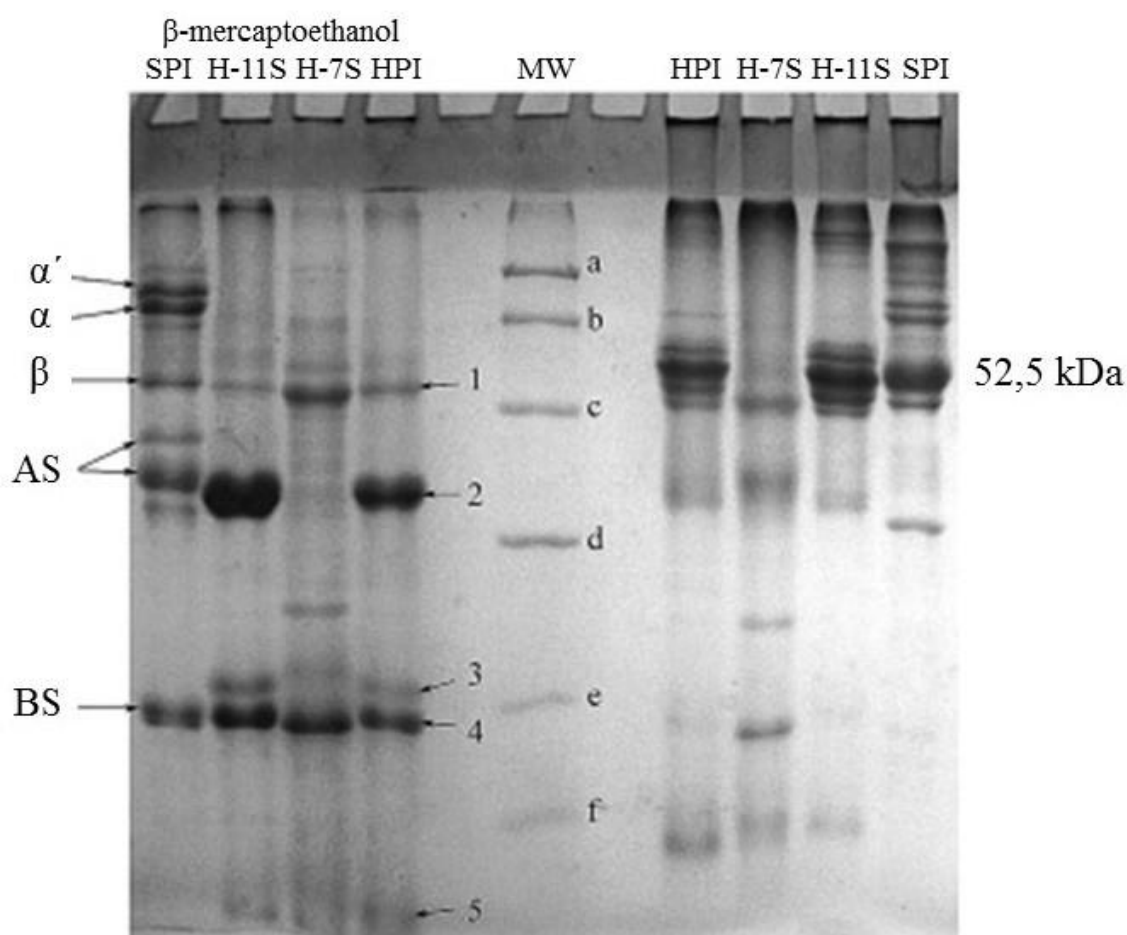
Samotná destilace a titrace se v dnešní době už nemusí provádět manuálně. Automatickou nebo semiautomatickou destilaci, titraci a kalkulaci lze provést na přístroji Kjeltec™ (Obr. 23), který nachází uplatnění v laboratořích s rutinní analýzou vzorků pomocí kjeldahlizace. Integrovaný bezpečnostní systém zajišťuje bezpečný a jednoduchý proces během analýzy (Foss Analytical).



Obr. 23 Přístroj Kjeltec™ 2300 (vlevo) pro automatickou destilaci a kolorimetrickou titrací analýzy vzorků metodou kjeldahlizace. Na obrázku je také umístěno topné hnízdo Tecator™ Digester 20 Auto Lift, kde probíhá mineralizace vzorku v kyselině sírové (Euritmic Grup, převzato).

### 2.3.2 Elektroforetická separace proteinů konopí

Hlavní proteiny přítomné v konopném proteinovém izolátu jsou edestin a albumin. Separaci a charakterizaci proteinů lze provést pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného (SDS-PAGE) podle Laemmliho (Laemmli, 1970), během let došlo k modifikacím metody. Separace probíhá v diskontinuálním systému v 5% zaostřovacím a 12,5% separačním gelu, rozpouštěcí pufr obsahuje 1,0 % SDS (w/v). Výsledkem jsou oddělené proteinové frakce (Obr. 24). Pufr může také obsahovat  $\beta$ -mercaptoethanol, který přerušuje disulfidové vazby mezi podjednotkami (Wang *et al.*, 2008).



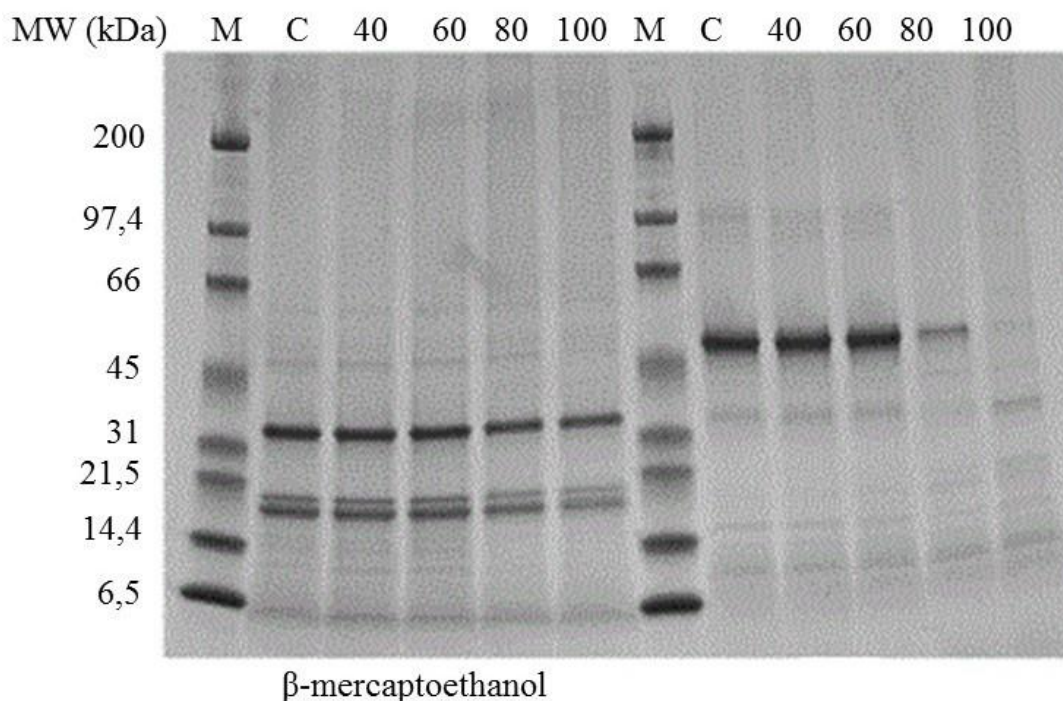
Obr. 24 Profily proteinových frakcí konopného a sójového proteinového izolátu po SDS-PAGE v přítomnosti  $\beta$ -mercaptoethanolu (levá část gelu) nebo jeho nepřítomnosti (pravá část gelu). SPI: sójový proteinový izolát; HPI: konopný proteinový izolát; H-11S: konopný proteinový izolát bohatý na 11S; H-7S: konopný proteinový izolát bohatý na 7S; MW: molekulová hmotnost; molekulové markery a, b, c, d, e, f: 97,4; 66,2; 43; 31; 20,1; 14,4 kDa; AS: kyselá podjednotka sójového glycininu; BS: bazická podjednotka sójového glycininu;  $\alpha'$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ : odpovídající hlavní podjednotky sójového  $\beta$ -konglycininu (Wang *et al.*, 2008; převzato a upraveno).



Edestin (přibližná molekulová hmotnost 300 kDa) je tvořen šesti identickými podjednotkami, kdy každá obsahuje kyselou a bazickou podjednotku, které jsou spojené disulfidovou vazbou. V redukovaném prostředí (přítomnost  $\beta$ -mercaptoethanolu) lze podjednotky rozdělit. Kyselá podjednotka má přibližnou molekulovou hmotnost 34,0 kDa a bazická 18 a 20 kDa (Obr. 25). Bez přítomnosti redukčního činidla je možné pozorovat hlavní band odpovídající zhruba 52 kDa a jednotce složené z kyselé a bazické podjednotky spojené disulfidovou vazbou (Raikos *et al.*, 2015).

### 2.3.3 Stanovení aminokyselinového složení

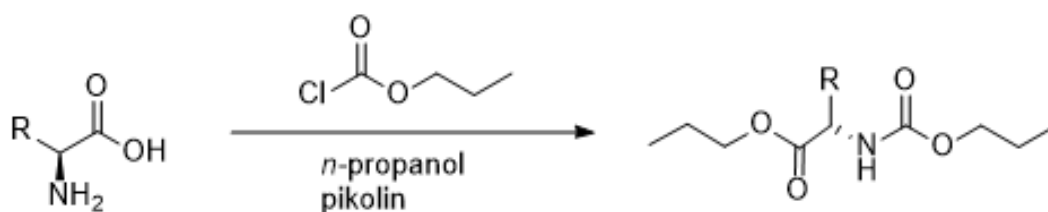
Před analýzou aminokyselinového složení proteinů je potřeba nejprve vzorek proteinu zhydrolyzovat  $6\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kyselinou chlorovodíkovou při  $110\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 16-72 hodin. Pro běžnou hydrolýzu je dostatečná 20-hodinová doba (Glew *et al.*, 1997). Prodloužená zahřívací doba se volí v případě, jestliže je potřeba docílit větší výtěžnosti alifatických aminokyselin (valin, isoleucin), jejichž vazby jsou do určité míry rezistentní vůči hydrolýze a pro jejich uvolnění z vazeb je potřeba delší doba inkubace (72 hodin). Dalším řešením je zvýšení teploty (Pickering a Newton, 1990).



Obr. 25 Profil SDS-PAGE pro konopný proteinový izolát v přítomnosti (levá část) a nepřítomnosti (pravá část)  $\beta$ -mercaptoethanolu. MW: molekulová hmotnost; M: markery molekulové hmotnosti; C: kontrola; 40, 60, 80, 100: stupně Celsia při teplotní denaturaci vzorku (Raikos *et al.*, 2015; převzato a upraveno).

Při kyselé hydrolyze dochází k destrukci tryptofanu, pro jehož stanovení je potřeba uskutečnit oddělenou bazickou hydrolyzu, například pomocí  $4,2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydroxidu draselného obsahující 1% thiodiglykol (w/v) (Hugli a Moore, 1972). Kyselá hydrolyza má také negativní vliv na výtěžnost siřných aminokyselin, proto je cystein před hydrolyzou nejprve oxidován permravněcí kyselinou na kyselinu cysteovou (Hirs, 1967). Po kyselé hydrolyze také není možné stanovit množství glutaminu a asparaginu v proteinu, jelikož v kyselém prostředí dochází k deaminaci těchto aminokyselin na kyselinu glutamovou a asparagovou. Ve výsledku se stanovené množství kyseliny glutamové uvádí jako součet původního množství kyseliny glutamové a glutaminu. Obdobně je tomu u kyseliny asparagové a asparaginu. Do roztoku kyseliny chlorovodíkové se také mohou přidávat protektanty, například fenol či  $\beta$ -mercaptoethanol, které minimalizují degradaci některých specifických aminokyselin (Pickering a Newton, 1990). I když má kyselá hydrolyza pomocí  $6\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl řadu limitujících faktorů, je stále aktuální metodou pro předpřípravu aminokyselin (Gorissen *et al.*, 2018; Mattila *et al.*, 2018) a je součástí metod daných Evropskou komisí pro analýzu a určení aminokyselin (European Commission, 1998).

Po hydrolyze se vzorky připravují pro chromatografickou analýzu. V této práci byly aminokyseliny převedeny na chlorformiátové deriváty. Tyto deriváty umožňují použití hmotnostního spektrometru jako detektoru. Derivatizace probíhá pomocí *n*-propyl chlorformiátu v *n*-propanolu. Derivatizační činidlo se váže na funkční skupiny aminokyselin (na karboxylovou i amino skupinu) (Obr. 26) a zvýšení lipofility umožňuje separaci sloučenin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s reverzní fází (Kritikos *et al.*, 2015).



Obr. 26 Schéma derivatizační reakce aminokyselin pomocí *n*-propyl chlorformiátu v *n*-propanolu (Kritikos *et al.*, 2015).

### 2.3.4 Analýza obsahu mastných kyselin

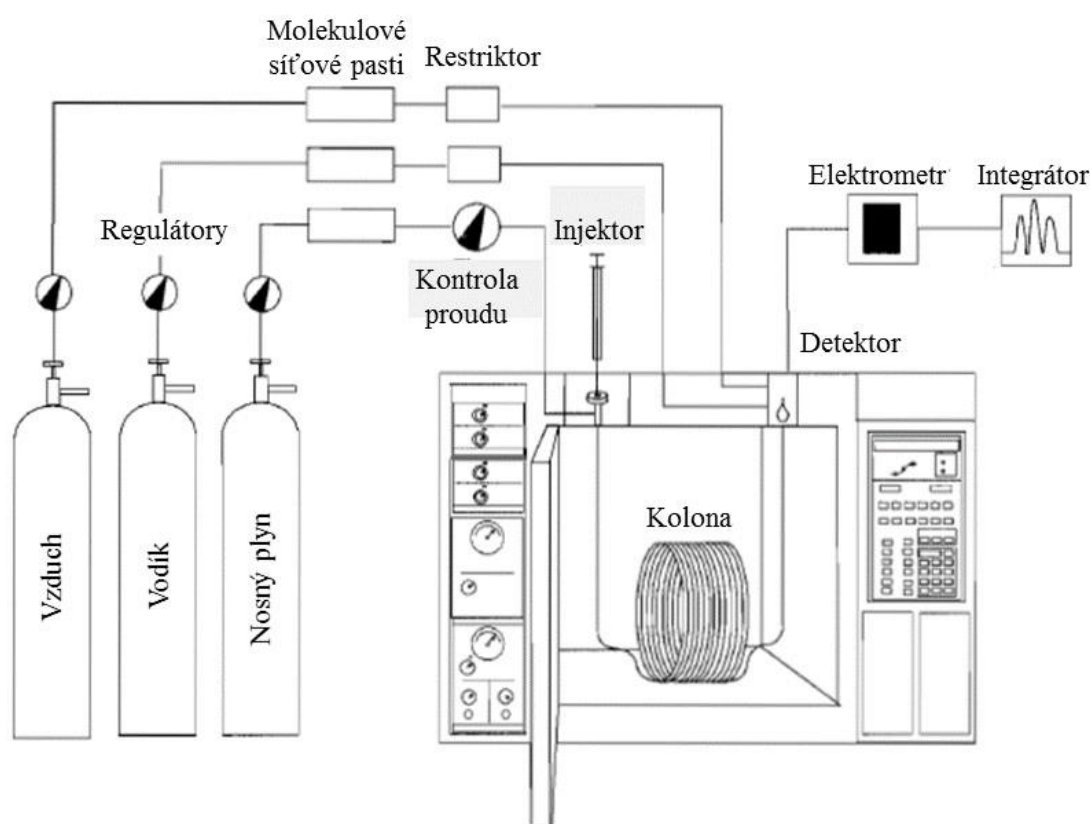
Mastné kyseliny je nutné před kvantitativní a kvalitativní analýzou pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) převést na těkavé deriváty, v této práci konkrétně na methyl estery mastných kyselin. I když mají methyl estery omega-3 a omega-6 mastných kyselin podobné fyzikální (například bod varu) a chemické (délka řetězce) vlastnosti, mohou být také separovány a detekovány (Tang a Row, 2013). Existují dva typy nejčastěji používaných derivatizačních činidel pro přípravu methyl esterů: činidla kyselá a bazická. Kyselá činidla zahrnují kyselinu sírovou, chlorovodíkovou, trifluorid bóru a acetyl chlorid v methanolu. Bazická činidla jsou hydroxid draselný v methanolu nebo methanolát sodný. Po derivatizaci jsou methyl estery mastných kyselin extrahovány hexanem a rozpouštědlo je odpařeno pod dusíkem nebo pomocí vakuové odpary. Mastné kyseliny je také možné derivatizovat na isopropyl a butyl estery nahrazením methanolu isopropanolem a butanolem a takový postup se například využívá pro analýzu mastných kyselin v mléčných výrobcích. Před samotnou derivatizací je potřeba lipidy extrahovat, a to například pomocí směsi chloroform:methanol nebo Soxhletovou extrakcí kyselou hydrolyzou (Dobson, 2008).

Plynová chromatografie (GC) je dynamická separační metoda pro detekci těkavých organických sloučenin. GC jako instrumentální technika byla představena v 50. letech 20. století a stala se primárním nástrojem používaným v mnoha laboratořích. První hlavní složkou je nosný plyn, který musí být inertní a většinou se jedná helium, dusík, vodík nebo směs argonu a methanu. Další komponentou je vstupní port (GC inlet), který vnáší vzorek do proudu nosného plynu. Objem při nástřiku je možný rozdělit (split injection) a pouze frakce analyzovaného objemu vzorku se dostává do kapilární kolony. Třetí komponentou je kolona, jejíž úkolem je rozdělení analytů ve vzorku. Ve většině plynových chromatografů se používá kapilární kolona a jejími hlavními parametry jsou délka, průměr, koncentrace kapalné stacionární fáze a typ kapalné fáze. Důležité je, aby separované analyty měly různou afinitu ke stacionární fázi díky jejich fyzikálně-chemickým interakcím a tato vlastnost se nazývá selektivita kolony. Jakmile analyt vstoupí do detektoru, zaznamenává se jeho retenční čas. Detektor je čtvrtou hlavní komponentou GC. Vlastnosti ovlivňující výběr detektoru jsou selektivita a citlivost. Molekuly v hmotnostním selektivním detektoru jsou bombardovány elektrony. Tvoří se fragmenty iontů a ty přechází na analyzátor. Zde jsou filtrovány podle jejich  $m/z$ . Poslední komponentou je pak datový systém, kde dochází k přeložení elektrického signálu

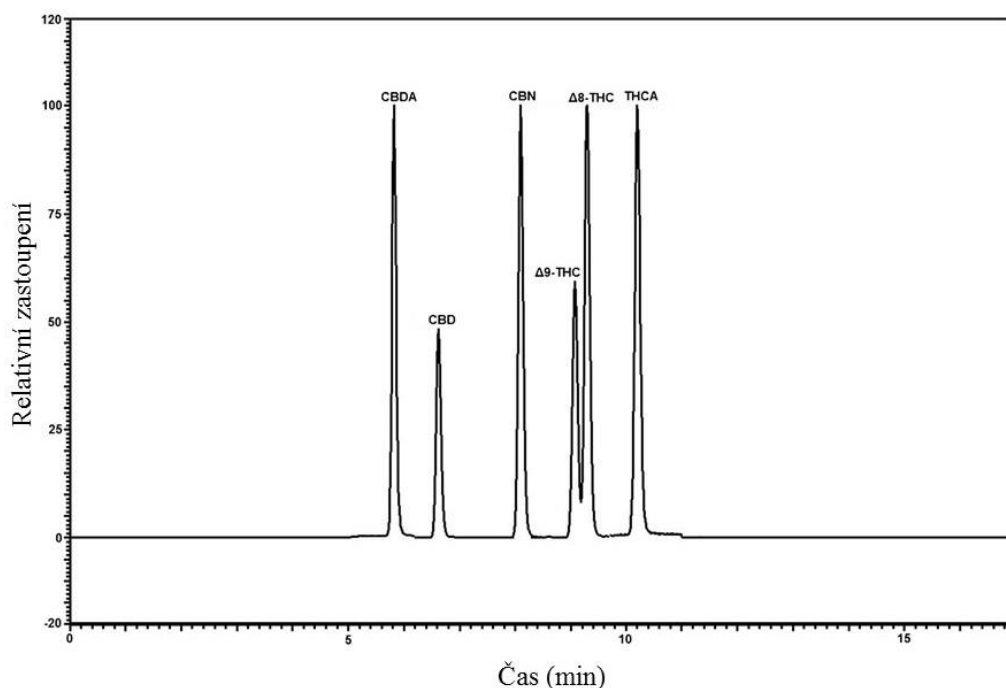
z detektoru na chromatogram. Plocha píků představuje koncentraci daného analytu (Van Sant, 1997). Na obrázku 27 je zobrazen typický plynový chromatograf.

### 2.3.5 Analýza fytoKANabinoidů

Jedním z nejvíce používaných přístupů pro analýzu kanabinoidů je plynová chromatografie (GC). Nicméně tato metoda má svá omezení. Před samotnou chromatografickou separací dochází k zahřátí extrahovaného vzorku kvůli přechodu z kapalně fáze do plynné. Vysoké teploty ovšem zapříčiňují dekarboxylaci kanabinoidních kyselin a stávají se z nich neutrální sloučeniny. Tudíž výsledná hodnota je součtem koncentrace kyseliny a její neutrální formy v původním vzorku. Řešením je derivatizace vzorku před samotnou analýzou. Nicméně, dosažení 100% derivatizace pro GC je obtížné (Citti *et al.*, 2018). Výhodnější je z tohoto hlediska analýza pomocí HPLC-MS (Obr. 28), kde není potřeba derivatizace kanabinoidů před analýzou (De Backer *et al.*, 2009). Navíc teplotně labilní sloučeniny nemusí být vystaveny příliš vysokým teplotám před a během separace.



Obr. 27 Typický plynový chromatograf (Van Sant, 1997; převzato a upraveno).



Obr. 28 UHPLC-MS/MS chromatogram hlavních kanabinoidů. CBDA = Kyselina kanabidiolová, CBD = Kanabidiol, CBN = Kanabinol,  $\Delta$ 9-THC =  $\Delta$ 9-tetrahydrokanabinol,  $\Delta$ 8-THC =  $\Delta$ 8-tetrahydrokanabinol THCA = Kyselina tetrahydrokanabinolová (Béres *et al.*, 2019; převzato a upraveno).

Metody LC-MS a GC-MS pro stanovení kanabinoidů vykazují podobnou citlivost (v rozmezí  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Metoda stanovení pomocí plynové chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) vykazuje o něco menší citlivost a je také méně selektivní než předchozí metody. S ohledem na preciznost jsou tyto metody srovnatelné a přijatelné. U všech metod je ovšem klíčovým faktorem příprava extrémně nehomogenního materiálu: homogenizace a následná extrakce. Analytická přesnost se liší u metod s ohledem na stanovovaný kanabinoid. GC-FID projevovала nižší hodnoty koncentrací  $\Delta$ 9-tetrahydrokanabinolu. Důvodem může být použití extérní kalibrace oproti vnitřní kalibraci u GC-MS a UHPLC-MS/MS. Překvapivě nižší hodnoty koncentrace kyseliny kanabidiolové byly naměřeny metodou UHPLC-MS/MS. To mohlo být způsobeno použitím značeného kanabidiolu jako vnitřního standardu pro kvantifikaci kyseliny a možného rozkladu kanabinoidních kyselin v MS ESI zdroji. Výběr vhodných vnitřních standardů je tedy podstatným faktorem pro kvantifikaci (Béres *et al.*, 2019).

Ve výrobcích z technického konopí by běžně neměly být přítomny psychoaktivní kanabinoidy. Ovšem během zrání, sklizně a zpracování může docházet ke vnější kontaminaci semenných slupek s listeny, listím a pryskyřicí a nedostatečným omytím semen může dojít k přenosu THC a jiných metabolitů do potravin (Matthäus a Brühl,

2008; Callaway a Pate, 2009). Z tohoto důvodu je nutné přítomnost těchto látek ve výrobcích vyloučit.

### **2.3.6 Stanovení parametrů kvality olejů a tuků**

Peroxidové číslo se dle České technické normy (ČSN EN ISO 3960 (58 8765), 2017) stanovuje v živočišných a rostlinných tucích a olejích jodometrickou titrací. Zjišťuje se množství kyslíku, který se chemicky váže na olej nebo tuk ve formě peroxidu, zejména hydroxidu. Metoda je aplikovatelná pro všechny rostlinné a živočišné oleje a tuky, mastné kyseliny a jejich směsi s hodnotou peroxidového čísla od 0 do 30 milliekvivalentů aktivního kyslíku na kilogram. Během analýzy se uvolňuje jód, který se po přidavku indikátoru (škrobový maz) titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného do odbarvení.

Číslo kyselosti se určuje dle České technické normy (ČSN EN ISO 660 (58 8756), 2015). Tato mezinárodní norma zahrnuje tři metody: dvě titrační a jednu potenciometrickou. Norma je aplikovatelná pro rafinované a surové rostlinné oleje nebo živočišné tuky a není použitelná pro vosky. Metody ovšem nejsou schopné rozlišit minerální kyseliny, volné mastné kyseliny a další organické kyseliny. Ve stanoveném čísle kyselosti jsou tedy zahrnuty jakékoli mastné minerální kyseliny, které jsou ve vzorku přítomny. Jednou z možných metod je titrační stanovení kyselin na fenolftalein alkoholickým roztokem hydroxidu draselného. Mastné kyseliny mohou během skladování olejů vypadávat z triacylglycerolů a zvyšuje se množství volných mastných kyselin, což může mít vliv na kvalitu oleje.

Posledním parametrem stanoveným v této práci je jodové číslo, které se také stanovuje podle České technické normy (ČSN EN ISO 3961 (58 8761), 2015). Jodové číslo vypovídá o skladbě mastných kyselin v olejích a tucích. Vyjadřuje míru nenasyčenosti lipidového vzorku (Tab. 16). Vzorek se inkubuje s Hanušovým činidlem ( $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok jódmonobromidu v kyselině octové) a na závěr se uvolněný jód titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného po přidání indikátoru.

Tab. 16 Hodnoty jodové čísla pro vybrané oleje metodou dle Wijse (Vyhláška MZe č. 90/2000 Sb.). Jodové číslo konopného oleje je uvedeno dle Anwar *et al.* (2006).

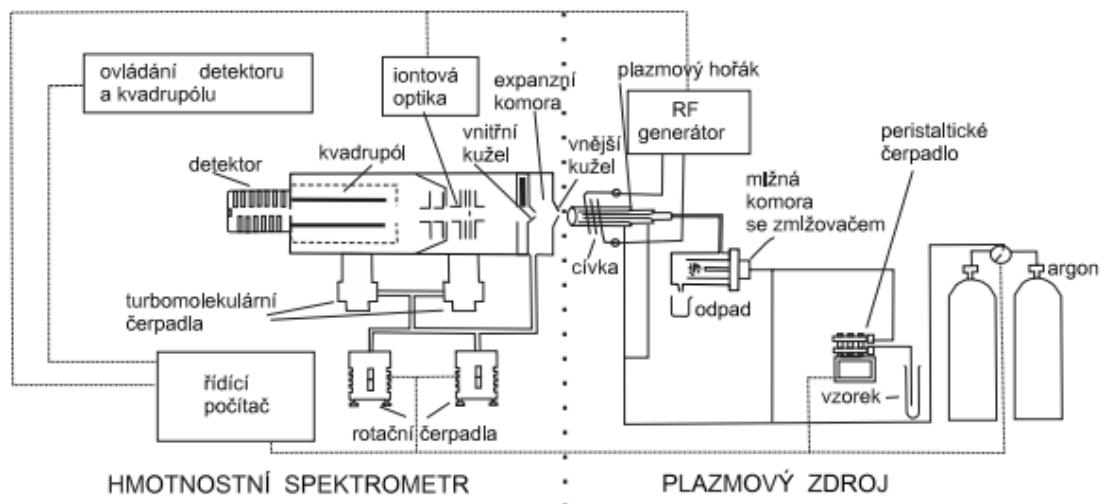
Olej	Jodové číslo (g I <sub>2</sub> ·100 g <sup>-1</sup> )
Řepkový	105-126
Palmový	50-55
Slunečnicový	118-141
Sójový	124-139
Kokosový	6,3-10,6
Olivový	80-88
Konopný	154-165

### 2.3.7 Analýza obsahu minerálů

Obsah minerálních látek byl v této práci stanoven pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). ICP-MS je velice atraktivní technikou díky její schopnosti stanovit stopové i ultrastopové koncentrace esenciálních či toxických prvků v biologickém vzorku. Tato technika má extrémně nízké limity detekce a umožňuje kvantifikaci až na úrovni ppt. Výhody ICP-MS oproti jiným metodám jsou multiprvková analýza, rychlost, nízké limity detekce, široký lineární dynamický rozsah a schopnost rozlišení isotopů. Nejčastěji je vzorek před samotnou analýzou převeden do kapalného stavu, nejčastěji pomocí silné kyseliny (Thomas, 2013). V této diplomové práci byl proveden mikrovlnný rozklad v uzavřeném systému za použití kombinace kyseliny dusičné s peroxidem vodíku (Jarošová *et al.*, 2014).

Kyselina dusičná je nenáročná pro manipulaci a má oxidační kapacitu pro organické látky v biologických vzorcích. Dle Würfels a Jackwerth (1985) a Würfels *et al.* (1989) jsou 2 ml HNO<sub>3</sub> dostatečné pro efektivní rozklad 100 mg biologické matrice při teplotní kontrole. Peroxid vodíku eliminuje přítomnost pevných částic a snižuje zbytkový obsah uhlíku (Wu *et al.*, 1997).

Na obrázku 29 je schéma ICP-MS systému. Vzorek je peristaltickým čerpadlem přenesen do zmlžovače, kde se přeměňuje na jemný aerosol proudem argonu přibližně 1 l·min<sup>-1</sup>. Malé kapičky aerosolu, které představují 1-2 % vzorku, jsou odděleny od větších kapek v mlžné komoře. Jemný aerosol je poté přenesen do plazmatu. V plazmě se tvoří pozitivně nabitě ionty a ty jsou směřovány přes interface a iontovou optiku do hmotnostního spektrometru, kde dochází k separaci iontů podle poměru *m/z*. Rozseparované ionty poté dopadají na detektor, který převádí proud iontů na měřitelný elektrický signál (Thomas, 2013).



Obr. 29 Schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem (Mihaljevič *et al.*, 2004; převzato).



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a přístroje

#### 3.1.1 Chemikálie

2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)

Acetonitril (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)

Akrylamid (Merck, Darmstadt, Německo)

Bisakrylamid (Merck, Darmstadt, Německo)

Bromkresolová zeleň (Supelco, Pensylvánie, USA)

Bromfenolová modř (Supelco, Pensylvánie, USA)

Certifikovaný referenční materiál vodný roztok fortifikovaný stopovými prvky

Environmental matrix reference materiál TMDA-64,3 (Environment Canada, Kanada)

Coommassie Brilliant Blue R-250 Dye (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{CaCO}_3$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , Cu v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , Fe v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{KNO}_3$  v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , Mn v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , Mg v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  v 0,05%  $\text{H}_2\text{SO}_4$

(v/v) (Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , Se v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

CRM – vodný kalibrační roztok ASTASOL,  $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , Zn v 2%  $\text{HNO}_3$  (v/v)

(Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)

Dichroman draselný (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)

Dodecyl síran sodný (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Ethanol 96% p.a. (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)  
Ethylacetát (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
EZ:faast™ kit For Free (Physiological) Amino Acid Analysis By LC-MS (Phenomenex Inc, Kalifornie, USA)  
Fenolftalein (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Glycerol bezvodý (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)  
Glycin (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Hanušovo činidlo (Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe, Německo)  
Helium (SIAD Czech spol. s.r.o., Rajhradice Česká republika)  
Hexan (Chromservis, s.r.o., Praha, Česká republika; (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Hydroxid draselný p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Hydroxid sodný p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Chlorid vápenatý práškový p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Chloroform (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)  
Interní standard pro ICP-MS, obsahuje prvky Sc, Ge, In a Bi (Agilent Technologies, Inc., Kalifornie, USA)  
Jodid draselný (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Katalyzátorové tablety (směs síranu draselného a měďnatého)  
Kyselina boritá p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Kyselina dusičná Analpure (Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)  
Kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Kyselina mravenčí (Merck, Darmstadt, Německo)  
Kyselina octová 99% p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Kyselina sírová 96% p.a. (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)  
Kyselina šťavelová dihydrát (Erba Lachema, s.r.o., Brno, Česká republika)  
Kyselina trichloroctová (Merck, Darmstadt, Německo)  
Matricový referenční materiál pro kontrolu jakosti METRANAL 3 Jahodové listí (Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)  
Matricový referenční materiál pro kontrolu jakosti METRANAL 8 Zelená řasa (Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)  
Methanol LC-MS Chromasolv™ (Honeywell, Severní Karolína, USA)  
Methanolát sodný 25% roztok (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)

Methyl červeň (Supelco, Pensylvánie, USA)  
Methyl oranž (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Mravenčan amonný (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Peroxid vodíku p.a. (Analytika, spol. s.r.o., Praha, Česká republika)  
Peroxodisíran amonný p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Proteinový marker SigmaMarker™ 6,500-200,000 Da (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Redestilovaná voda (Milli-Q)  
Standardní směs methyl esterů mastných kyselin Supelco 37 Component FAME Mix in dichloromethane (Supelco, Pensylvánie, USA)  
Standardy značených a neznačených kanabinoidů o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup> (Lipomed, Arlesheim, Švýcarsko), kromě CBDA (THC Pharm, Frankfurt nad Mohanem, Německo)  
Škrob  
Thiosíran draselný pentahydrát (Penta s.r.o., Praha, Česká republika)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Tuning solution pro ICP-MS (Agilent Technologies, Inc., Kalifornie, USA)  
Uhličitan sodný bezvodý p.a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)  
Undekan (Sigma-Aldrich s.r.o., Missouri, USA)  
Voda pro HPLC/LC-MS (VWR International, Pensylvánie, USA)

### **3.1.2 Přístroje a pomůcky**

Analytické váhy KERN 870-13 Digital scale (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)  
Analytické váhy MS 205 DUIM (Mettler-Toledo, Ohio, USA)  
Analytické váhy XA 110/2X (Radwag USA LLC, Radom, Polsko)  
Automatické pipety eppendorf 0,5-5000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)  
Elektrická sušárna Nüve FN 500P s nucenou cirkulací (Nüve Sanayi Malz. İma ve Ticaret A.Ş., Akyurt/Ankara, Turecko)  
Exsikátor s porcelánovou deskou a silikagelem  
Hliníkové vysoušečky  
ICP-MS 7700 (Agilent Technologies, Inc., Kalifornie, USA)  
Kapalinový chromatograf UltiMate™ 3000 s MS TSQ Quantum Access Max trojitý kvadrupól (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

Kapilární kolona pro GC-MS Agilent HP-5MS UI (5% fenyl methyl siloxan) (Agilent Technologies, Inc., Kalifornie, USA)

Kjeltec™ 2300 Analyzer Unit (FOSS Analytical, Hilleroed, Dánsko)

Kolona Luna Omega Polar C18 UHPLC (Phenomenex, Kalifornie, USA)

Mikrocentrifuga Labnet PRISM (Labnet International Inc., Edison, USA)

Mikrovlnný mineralizátor MLS 1200 Mega (Milestone, USA)

Mikrozkumavky 1,5ml a 2,0ml (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Orbitální třepačka PSU-20i (Biosan, Riga, Lotyšsko)

Oscilační kulový mlýn Mixer-Mill MM 400 (Retsch GmbH, Haan, Německo)

Plynový chromatograf Agilent 7890A GC spojené s HP 5975C MSD spektrometrem (Agilent Technologies, Inc., Kalifornie, USA)

Spalovací hnízdo Tecator™ Digestor (FOSS Analytical, Hilleroed, Dánsko)

Systém pro přípravu ultračisté vody Milli-Q (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Špičky pro pipety eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Ultrazvuková lázeň Bandelin Sonorex Digitec (BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlín, Německo)

Ultrazvuková lázeň Ultrasonic cleaner AU-32 (Agrolab, Carpi MO, Itálie)

Vertikální elektroforetický systém Owl™ Dual-gel model P9DS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)

Vakuová odparka (Labconco Corporation, Kansas City, USA)

Vortex Classic Advanced Vortex Mixer (VELP Scientifica, Srl, Usmate Velate MB, Itálie)

Vortex V-1 plus (Biosan, Riga, Lotyšsko)

### 3.1.3 Biologický materiál

Konopné potravinové výrobky byly poskytnuty společností Hempoint, s.r.o.. Pro srovnání byly ostatní potraviny pořízeny na českém trhu. Seznam výrobků je uveden v tabulce 17. Pro odlišení byly stejné výrobky Hempoint, lišící se stářím, označeny rokem jejich expirace uvedeným na obalu při analýze obou výrobků. Pro elektroforetickou separaci byly standardní odrůdy pšenice poskytnuty Výzkumným ústavem rostlinné výroby, v.v.i.

Tab. 17 Seznam konopných produktů a jiných potravinových výrobků, výrobce nebo původ a datum expirace.

Vzorek	Výrobce	Datum expirace
Bio konopný olej 2018	Hempoint	2/2018
Bio konopný olej 2019	Hempoint	1/2019
Bio konopný olej	Wolfberry	8/2019
Bio konopný olej	Health Link	9/2019
Kokosový olej	-	-
Slunečnicový olej	-	-
Bio loupané konopné semínko 2018	Hempoint	6/2018
Bio loupané konopné semínko 2020	Hempoint	2/2020
Bio konopné semínko natural (neloupané) 2018	Hempoint	12/2018
Bio konopné semínko natural (neloupané) 2019	Hempoint	10/2019
Bio konopný protein 2018	Hempoint	6/2018
Bio konopný protein 2019	Hempoint	4/2019
Konopná semena loupaná 1	Původ Čína	9/2019
Konopná semena loupaná 2	Původ Čína	12/2019
Sójový proteinový izolát	-	-
Syrovátkový proteinový izolát	-	-
Bio Kaneláda	Hempoint	3/2018
Konopky kokos	Hempoint	1/2018
Konopky mák	Hempoint	1/2018
Konopné křupky	Hempoint	2/2018
Bio konopný čaj: Ték	Hempoint	8/2019
Bio konopný čaj: Výběr z palic	Hempoint	11/2018
Bylinková sůl	Hempoint	9/2019

## 3.2 Metody

### 3.2.1. Stanovení obsahu hrubých bílkovin Kjeldahlovou metodou

#### 3.2.1.1 Příprava roztoků

##### Titrační činidlo

50 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v přiměřeném množství destilované vody. Roztok byl přenesen do odměrné baňky o objemu 2 l a doplněn po rysku. Roztok byl přelit do velké nádoby a baňka byla vypláchnuta 2 l destilované vody. Obsah baňky byl přidán k roztoku  $\text{H}_3\text{BO}_3$  v nádobě.

0,05 g bromkresolové zeleni bylo rozpuštěno v 50 ml methanolu a k roztoku bylo přidáno 35 ml roztoku methyl červeně (0,05 g methyl červeně v 50 ml methanolu). Následně bylo přidáno 2,5 ml 4% vodného roztoku NaOH. Roztok byl doplněn do 1 l destilovanou vodou. Poté byl přidán do velké nádoby obsahující  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

#### 3.2.1.2 Stanovení obsahu dusíku dle Kjeldahla

Kvantitativní stanovení dusíku proběhlo pomocí poloautomatizované Kjeldahlovy metody. Nejprve bylo naváženo 0,5 g konopného výrobku ve třech opakováních a navážka byla převedena do Kjeldahlovy tuby s jednou tabletou katalyzátoru (směs  $\text{K}_2\text{SO}_4$  a  $\text{CuSO}_4$ ). Bylo přidáno 15 ml koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a tuba byla umístěna do spalovacího hnízda. Vzorek byl mineralizován 1 hodinu 35 minut při 420 °C.

Po ochlazení byly vzorky analyzovány na přístroji Kjeltec™ 2300. Zde docházelo k uvolnění amoniaku působením 35% roztoku NaOH. Amoniak byl pohlcován v nadbytečném objemu odměrného roztoku  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Nadbytek  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byl stanoven titrací odměrným roztokem NaOH (titrační činidlo) na barevný indikátor methyl červeně.

Obsah dusíkatých látek byl přepočítán na obsah hrubých bílkovin pomocí univerzálního faktoru 6,25.

#### 3.2.1.3 Stanovení sušiny

Do hliníkových váženek o známé hmotnosti bylo naváženo 5 g konopných potravin ve třech opakováních. Vzorky byly sušeny v elektrické sušárně při 132 °C po dobu 4 hodin. Poté byly váženky se vzorky ponechány k ochlazení v exsikátoru a zváženy.

## **3.2.2 Elektroforetická separace proteinů**

### **3.2.2.1 Příprava zásobních roztoků**

#### **Gelový pufr, pH 8,8**

Bylo naváženo 45,5 g Tris(hydroxymethyl)aminometanu (Tris) a navážka byla rozpuštěna ve 450 ml destilované vody. Koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou bylo pH upraveno na 8,8 a objem byl doplněn na 500 ml destilovanou vodou.

#### **Gelový pufr, pH 6,8**

Bylo naváženo 6,1 g Tris a přidáno 4,12 ml koncentrované HCl a špetka bromfenolové modři. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 200 ml.

#### **Extrakční roztok**

Se 48 ml destilované vody bylo smícháno 30 ml gelového pufru, pH 6,8, 24 ml 10% roztoku SDS, 12 ml 4% roztoku glycerolu, 6 ml mercaptoethanolu a byla přidána špetka bromfenolové modři.

#### **Akrylamid a BIS**

150 g akrylamidu a 4 g bisakrylamidu byly rozpuštěny v přiměřeném objemu destilované vody a objem byl doplněn do 500 ml.

#### **Elektrodový pufr**

30,3 g Tris, 144 g glycinu a 10 g SDS byly rozpuštěny v destilované vodě a objem byl doplněn do 1 l. Poté byl roztok zředěn 10× destilovanou vodou.

#### **Fixační činidlo**

200 g kyseliny trichloroctové bylo rozpuštěno v destilované vodě a objem doplněn do 1 l.

#### **Směsný roztok**

Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové a 650 ml destilované vody.

## Barvicí roztok

0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250 bylo rozpuštěno v 1 l směsného roztoku.

### 3.2.2.2 Příprava gelů

Dělicí a zaostřovací gely byly připraveny z komponentů uvedených v tabulce 18. Polymerizace gelu začala přidavkem persíranu (peroxodisíranu) amonného, který byl přidán jako poslední komponent. Gely byly rychle promíchány a následně ihned nanášeny do prostoru mezi skly. Nejprve byl nanášen dělicí gel, který byl převrstven destilovanou vodou. Gel byl ponechán polymerovat 30 minut, voda byla poté slita a povrch gelu vysušen pomocí filtračního papíru.

Na zpolymerovaný dělicí gel byl přenesen gel zaostřovací a byl opatrně vložen hřeben. Hřeben byl vyjmut přibližně za 30 minut po ztuhnutí gelu.

### 3.2.2.3 Příprava vzorků

Pro elektroforetickou separaci konopných proteinů byla zvolena metoda, která je běžně používána pro separaci pšeničných proteinů v zrně standardních odrůd. Do 1,5 ml zkumavek bylo naváženo přibližně 10 g Bio konopného proteinu Hempoint, 25 g homogenizovaných Bio loupaných konopných semínek Hempoint a Bio konopných semínek natural Hempoint, 6 mg sójového proteinového izolátu a 5 mg syrovátkového proteinového izolátu. Navážka byla přizpůsobena danému materiálu tak, aby obsahovala 5-6 mg proteinu ve vzorku, což je množství pšeničných proteinů, které je touto metodou vizualizováno.

Ke vzorkům bylo přidáno 200 µl extrakčního pufru a vzorky byly inkubovány 2 hodiny za laboratorní teploty. Následně byly povařeny ve vroucí vodní lázni 2 minuty. Poté byly vzorky centrifugovány (4 min, 21 200 g, laboratorní teplota).

Tab. 18 Objemy komponent dělicího a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE. AA = akrylamid, SDS = dodecyl síran sodný, TEMED = N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin.

Komponenta	AA BIS	10% SDS	Persíran amonný	Gelový pufr, pH 8,8	Gelový pufr, pH 6,8	Destilovaná voda	TEMED
Dělicí gel	24 ml	0,72 ml	0,72 ml	36 ml	-	12 ml	42,6 µl
Zaostřovací gel	4 ml	0,26 ml	0,26 ml	-	13,4 ml	8,8 ml	10,6 µl



### **3.2.2.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecyl síranem sodným**

Skla s připravenými gely byla vložena do komory vertikálního elektroforetického systému chlazeného na 10 °C a byl přidán elektrodový pufr. Vzorke byly nanášeny do jamek gelu v objemu 15 µl a bylo také nanášeno 15 µl proteinového markeru. Elektroforéza byla spuštěna prvních 30 minut při 50 mA (400 V, 100 W) pro zaostření, poté při 60 mA (400 V, 100 W) 3 hodiny pro dělení.

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do fixačního roztoku a v něm ponechán 30 minut na třepačce. Roztok byl slit, gel byl přelit směsným roztokem a ponechán v něm 30 minut. Následně byl gel přenesen do barvicího roztoku a inkubován přes noc. Poté byl roztok slit a přidán směsný roztok na 30 minut. Směsný roztok byl slit a byla přidána destilovaná voda. Po několika hodinách bylo možné gel vyhodnotit.

### **3.2.3 Stanovení aminokyselinového složení konopného proteinového izolátu**

#### **3.2.3.1 Kyselá hydrolýza**

Bylo naváženo 5 mg konopného proteinového izolátu Bio konopný protein Hempoint. Navážka byla převedena do zkumavky a byly přidány 3 ml 6mol·l<sup>-1</sup> roztoku HCl. Prostor nad kapalinou byl vyplněn dusíkem, zkumavky uzavřeny a umístěny do elektrické sušárny. Kyselá hydrolýza byla provedena při 110 °C po dobu 22 hodin. Po ukončení hydrolýzy byly zkumavky ihned ochlazeny. Pro analýzu bylo odebráno 5, 10 nebo 50 µl vzorku, objemy byly zneutralizovány roztokem uhličitanu sodného v poměru 1:3 (vzorek v HCl:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), pH takto připraveného vzorku bylo ověřeno. Po přidání roztoku interních standardů Reagent 1 muselo být v rozpětí 1,5-6,0. Objem přidávaného Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> byl upraven v případě, že i po přidání roztoku Reagent 1 bylo pH > 6,0 nebo < 1,5.

#### **3.2.3.2 Příprava vzorků a analýza metodou kapalinové chromatografie**

Proteinový hydrolyzát byl připraven, purifikován a derivatizován pro analýzu LC-MS pomocí EZ:faast<sup>TM</sup> kitu pro volné aminokyseliny. 100 µl Reagent 1 (roztok interních standardů homoargininu, methioninu-d<sub>3</sub> a homofenylalaninu, koncentrace 0,2 mmol·l<sup>-1</sup>) bylo přidáno ke vzorku ve skleněné zkumavce a stejný objem byl napipetován do zkumavek pro roztoky kalibrační řady. Kalibrační řada se pohybovala v rozmezí

koncentrací 20-200 nmol·mol<sup>-1</sup> a byla vytvořena pipetováním 10, 25, 50, 75 a 200 µl standardní směsi aminokyselin o koncentraci 200 nmol·ml<sup>-1</sup> (SD1). Následně byla provedena extrakce pevnou fází, kdy takto připravené roztoky vzorků a standardů byly nanášeny na sorbent kolony po dobu minimálně 1 minuty. Aminokyseliny navázané na sorbentu byly promyty 200 µl Reagent 2 (*n*-propanol) a eluovány pomocí Reagent 3 (roztok *n*-propanolu a hydroxidu sodného). Poté bylo přidáno 50 µl Reagent 4 (chloroform) pomocí mikrodispenseru, který byl součástí kitu. Obsah zkumavky byl vortexován 5-8 sekund a ponechán 1 minutu v klidu. Promíchání a ustálení bylo opakováno a následně bylo přidáno 100 µl Reagent 5 (iso-oktan). Obsah zkumavek byl řádně promíchán a ponechán v klidu k ustálení. Poté bylo odebráno 100 µl horní vrstvy, rozpouštědlo odpařeno a derivatizované aminokyseliny byly rozpuštěny v roztoku mobilních fází (10mmol·l<sup>-1</sup> mravenčan amonný ve vodě: 10mmol·l<sup>-1</sup> mravenčan amonný v methanolu, 1:2, v/v). Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS dle podmínek v tabulce 19. Vyhodnocení bylo provedeno v softwaru Thermo Xcalibur 3.1.66.10.

Tab. 19 Podmínky chromatografického stanovení aminokyselin.

Parametr	Údaj/hodnota
Kapalinový chromatograf	UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific)
Kolona	EZ.feast™ AAA-MS (250 × 2,0 mm, velikost částic 4 µm) (Phenomenex)
Průtok	0,25 ml·min <sup>-1</sup>
Mobilní fáze	A: 10mmol·l <sup>-1</sup> mravenčan amonný ve vodě B: 10mmol·l <sup>-1</sup> mravenčan amonný v methanolu
Eluce	Gradient: 0 min 68 % B, 13 min 83 % B, 13,01 min 68 % B, 17 min 68 % B
Teplota kolony	35 °C
Nástřik	1 µl
Ionizace a mód MS	ESI +
Kvantifikace	MRM (multiple reaction monitoring)
Kolizní energie	10-15 eV
Napětí na elektrospreji	3 kV
Teplota vaporizéru/iontové trubice	350 °C/320 °C

## 3.2.4 Analýza mastných kyselin

### 3.2.4.1 Příprava kalibračních roztoků

Jednotlivé body kalibrační křivky byly připraveny ředěním roztoku směsi standardů methyl esterů mastných kyselin. Body byly ředěny hexanem s undekanem a výsledný obsah undekanu v roztoku musel být zachován (0,1 %). Jednotlivé koncentrace methyl esterů mastných kyselin jsou dány výrobcem a každý bod byl 2× méně koncentrovaný než bod předešlý.

### 3.2.4.2 Příprava methyl esterů mastných kyselin

V případě nehomogenního materiálu byla nejprve přiměřená navážka homogenizována pomocí oscilačního kulového mlýnu (3 min, 27 Hz). Následně bylo do 1,5ml zkumavky naváženo 20-50 mg ve třech opakováních dle očekávaného množství lipidů ve vzorku. Bylo přidáno 500  $\mu$ l extrakčního činidla ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH, 2:1, v/v). Vzorky byly řádně promíchány na vortexu a sonifikovány po dobu 10 minut. Následně byly zkumavky se vzorky centrifugovány (5 min, 21 200 g, laboratorní teplota). Poté byl supernatant přenesen do nové 1,5ml zkumavky a extrakční krok byl opakován. Získaný supernatant byl přidán do zkumavky se supernatantem z první extrakce. Rozpouštědlo bylo odpařeno ve vakuové odparce při 35 °C.

Vzorky byly derivatizovány dle Carvalho a Malcata (2005) s modifikacemi. K extrahovaným lipidům bylo přidáno 500  $\mu$ l 0,5 mol.l<sup>-1</sup> methanolátu sodného v methanolu. Obsah zkumavky byl řádně promíchán a ponechán 5 minut v klidu při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 100  $\mu$ l destilované vody, obsah opět promíchán a bylo přidáno 500  $\mu$ l hexanu. Obsah zkumavky byl ponechán k ustálení fází a vrchní vrstva rozpouštědel byla přenesena do nové zkumavky. Extrakční krok s hexanem byl opakován a vrchní vrstva byla přidána k prvnímu extraktu. Rozpouštědlo bylo odpařeno ve vakuové odparce při 35 °C. Do zkumavky byl poté přidán 1 ml 0,1% undekanu v hexanu (vnitřní standard) a vzorek byl zcela rozpuštěn. Vzorek byl následně ředěn 10× a 100× z důvodu obsahu vysoce koncentrovaných mastných kyselin, které byly vyšší jak nejvyšší bod kalibrační přímky. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí GC-MS.

Příprava vzorků rostlinných olejů začínala až přidáním 500  $\mu$ l 0,5 mol.l<sup>-1</sup> methanolátu sodného v methanolu a vzorek byl sonifikován. Poté byl postup identický.

V případě vzorku Bio Kaneláda Hempoint byl kvůli nehomogenním vlastnostem vzorku zvolen jiný postup. Výrobek byl nejprve sonifikován v ultrazvukové lázni (30 min, laboratorní teplota). Poté byl celý obsah výrobku přenesen do kádinky a důkladně zamíchán. Do ocelové patrony byl navážen 1 g vzorku a bylo přidáno 20 ml extrakčního činidla. Vzorky byly homogenizovány pomocí oscilačního kulového mlýnu (3 min, 27 Hz) a poté byl obsah přenesen do 50ml zkumavky. Zkumavky byly centrifugovány a následně byl odebrán 1 ml extraktu. Rozpouštědlo bylo odpařeno ve vakuové odparce (35 °C) a dále byl postup stejný přidáním 500  $\mu\text{l}$  0,5mol.l<sup>-1</sup> methanolátu sodného v methanolu.

### 3.2.4.3 Analýza mastných kyselin metodou plynové chromatografie

Kvalitativní a kvantitativní analýza methyl esterů mastných kyselin byla provedena pomocí GC-MS. Chromatografické podmínky jsou uvedeny v tabulce 20 a vzorky a standardy byly měřeny za stejných podmínek metody. Kvantifikace byla provedena pomocí programu MSD ChemStation E.02.02.1431 (Agilent Technologies, Inc.).

Tab. 20 Podmínky chromatografického stanovení mastných kyselin.

Parametr	Údaj/hodnota
Plynový chromatograf	Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc.)
Kolona	HP-5MS UI (30,0 m × 250,0 $\mu\text{m}$ , film 0,25 $\mu\text{m}$ )
Nosný plyn	Helium (1,2 ml·min <sup>-1</sup> )
Detektor	HP 5975C MSD
Objem nástřiku; dávkování	2 $\mu\text{l}$ ; split 5:1
Teplotní program	40 °C 2 min, + 10 °C·min <sup>-1</sup> až do 200 °C, poté + 2 °C·min <sup>-1</sup> do 250 °C
Ionizace	EI (electron impact)
Ionizační energie	70 eV
Skenovací rozpětí a čas	40-540 $m/z$ ; 2,96 s
Mód MS	SIM (single-ion-monitoring)
Teplota nástřiku	230 °C
Teplota detektoru	230 °C

### 3.2.5 Stanovení obsahu fytoKANABINOIDŮ

Stanovení obsahu fytoKANABINOIDŮ v konopných produktech bylo provedeno podle Béres *et al.* (2019).

#### 3.2.5.1 Příprava vzorků

Vzorky konopných potravin byly nejprve homogenizovány. Poté bylo naváženo 50 mg konopného produktu a byly přidány 2 ml 96% ethanolu. Vzorky byly 15 minut sonifikovány při laboratorní teplotě a poté centrifugovány (10 minut, 21 200 g, laboratorní teplota).

#### 3.2.5.2 Analýza plynovou chromatografií

Bylo odebráno 100  $\mu$ l ethanolickeho extraktu vzorků a přidáno do 900  $\mu$ l ethylacetátu. V případě vzorků Bio konopný čaj: Ték, Bio konopný čaj: Výběr z palic a Bylinková sůl (vše Hempoint) bylo odebráno 10  $\mu$ l ethanolickeho extraktu vzorků a přidáno do 990  $\mu$ l ethylacetátu. Vzorky byly analyzovány pomocí GC-MS bez derivatizace jako předběžné ověření přítomnosti KANABINOIDŮ ve vzorcích dle podmínek v tabulce 21. KANABINOIDNÍ kyseliny jsou degradovány a je detekován jejich alkohol. Jestliže fytoKANABINOIDY byly přítomné ve vzorcích, byly poté analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS.

Tab. 21 Podmínky chromatografického stanovení fytoKANABINOIDŮ metodou GC-MS.

Parametr	Údaj/hodnota
Plynový chromatograf	Agilent 7890A GC (Agilent Technologies, Inc.)
Kolona	HP-5MS UI (30,0 m $\times$ 250,0 $\mu$ m, film 0,25 $\mu$ m)
Nosný plyn	Helium (1,2 ml·min <sup>-1</sup> )
Detektor	HP 5975C MSD
Objem nástřiku; dávkování	5 $\mu$ l; split 1:9
Teplotní program	180 °C 2 minuty, poté 20 °C·min <sup>-1</sup> do 310 °C
Ionizace	EI (electron impact)
Ionizační energie	70 eV
Skenovací rozpětí a čas	29-520 <i>m/z</i> ; 2,96 s
Mód MS	SIM (single-ion-monitoring)
Teplota nástřiku	260 °C
Teplota detektoru	230 °C

### 3.2.5.3 Analýza kapalinovou chromatografií

Kalibrační přímky byly vytvořeny pro tyto kanabinoidy: kyselinu kanabidiolovou (CBDA), kanabidiol (CBD), kanabinol (CBN),  $\Delta$ 9-tetrahydrokanabinol ( $\Delta$ 9-THC),  $\Delta$ 8-tetrahydrokanabinol ( $\Delta$ 8-THC) a kyselinu tetrahydrokanabinolovou (THCA) a koncentrace byly v rozmezí 5-10 000 ng·ml<sup>-1</sup> v 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v 70% acetonitrilu (v/v).

10  $\mu$ l ethanického extraktu vzorků bylo přidáno do 240  $\mu$ l 0,1% roztoku kyseliny mravenčí v 70% acetonitrilu (v/v). Ze zředěného vzorku bylo odebráno 10  $\mu$ l a přidáno do 190  $\mu$ l roztoku kyseliny mravenčí s rozpuštěnými interními standardy. Interní standardy zahrnovaly značené kanabinoidy  $\Delta$ 9-THC-d<sub>3</sub>, CBN-d<sub>3</sub> a CBD-d<sub>3</sub>, a jejich koncentrace ve vzorcích a ve všech bodech kalibrační přímky byly 500 ng·ml<sup>-1</sup>. Připravené vzorky, včetně kalibrační řady, byly přímo analyzovány bez derivatizace pomocí UHPLC-MS/MS (Tab. 22).

Tab. 22 Podmínky chromatografického stanovení fytoKANABINOIDŮ metodou UHPLC-MS/MS.

Parametr	Údaj/hodnota
Kapalinový chromatograf	UltiMate™ 3000 (Thermo Fisher Scientific)
Kolona	Luna Omega Polar C18 UHPLC (100 × 2,1 mm, velikost částic 1,6 $\mu$ m) (Phenomenex)
Průtok	0,3 ml·min <sup>-1</sup>
Mobilní fáze	A: 0,1% mravenčí kyselina v LC-MS vodě (v/v) B: 0,1% mravenčí kyselina v acetonitrilu (v/v)
Eluce	Gradient: 60 % B do 80 % B za 11 min, do 100 % B v 12,5 min, rekalibrace začátečních podmínek 4,5 min
Teplota kolony	40 °C
Nástřik	2 $\mu$ l
Ionizace a mód MS	ESI +, ESI – (kanabinoidní kyseliny)
Kvantifikace	MRM (multiple reaction monitoring)
Kolizní energie	20 eV (THCA 30 eV)
Napětí na elektrospreji	3 kV
Teplota vaporizéru/iontové trubice	350 °C/320 °C

## 3.2.6 Stanovení peroxidového čísla

### 3.2.6.1 Standardizace roztoku thiosíranu sodného

Pro přípravu  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  odměrného roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  bylo naváženo 6,205 g pentahydrátu thiosíranu sodného a navážka byla převedena do 250ml odměrné baňky. Navážka byla rozpuštěna v malém objemu destilované vody a bylo přidáno 0,5 g pevného uhličitanu sodného. Baňka byla umístěna do vodní lázně a po rozpuštění doplněna po rysku a řádně promíchána.

Bylo naváženo 0,07355 g dichromanu draselného pro předpokládanou spotřebu 15 ml odměrného roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Navážka byla převedena do titrační baňky a zředěna přiměřeným objemem destilované vody. Bylo přidáno 3-5 ml  $2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 1 g pevného jodidu draselného. Obsah baňky byl zamíchán a titrován odměrným roztokem  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  do slabě nažloutlého odstínu. Poté bylo přidáno několik mililitrů škrobového mazu (0,2% roztok škrobu, w/v) a obsah baňky byl titrován do slabě modrozeleného odstínu. Titrace byla provedena 3×.

### 3.2.6.2 Příprava vzorku a titrace

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 8 g konopného oleje s přesností na 0,0001 g. Poté bylo přidáno 10 ml chloroformu a 15 ml kyseliny octové. Olej byl ve směsi rozpuštěn a byl přidán 1 ml nasyceného roztoku KI. Baňka byla uzavřena, promíchána a uložena na tmavé místo po dobu 20 minut. Následně bylo přidáno 50 ml destilované vody a promícháno. Poté bylo přidáno 5 ml škrobového mazu, obsah byl promíchán a titrován za stálého míchání odměrným roztokem  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  thiosíranu sodného do trvalého odbarvení vrchní (vodné) vrstvy. Slepý pokus byl proveden stejným způsobem s vynecháním zkušební vzorku. Každý vzorek byl stanoven 3×.

Peroxidové číslo bylo vypočítáno dle vzorce:

$$\text{PČ} = 1000 \cdot c \cdot (V_1 - V_2) / m [\mu\text{mol } (\frac{1}{2} \text{ ROOH}) \cdot \text{g}^{-1}]$$

( $V_1$  = spotřeba odměrného roztoku při titraci vzorku v ml;  $V_2$  = spotřeba odměrného roztoku pro slepý pokus v ml;  $c$  = koncentrace odměrného roztoku thiosíranu sodného v  $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $m$  = navážka oleje v g).

### 3.2.7 Stanovení čísla kyselosti

#### 3.2.7.1 Standardizace odměrného roztoku hydroxidu draselného

Bylo naváženo 2,80525 g pevného KOH. Navážka byla rozpuštěna v přiměřeném množství ethanolu v 500ml odměrné baňce. Po rozpuštění byla baňka doplněna po rysku a řádně protřepána (i před každým použitím). Byl připraven  $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  odměrný roztok KOH v ethanolu.

Bylo naváženo 0,63035 g dihydrátu kyseliny šťavelové. Navážka byla převedena do 100ml odměrné baňky a doplněna destilovanou vodou po rozpuštění v ultrazvukové lázni. Obsah byl řádně promíchán.

Do titrační baňky bylo odpipetováno 10 ml kyseliny šťavelové a zředěno 50 ml destilované vody. Poté byly přidány 3 kapky indikátoru methylovanž (0,1% roztok). Roztok byl titrován odměrným roztokem KOH. Jakmile roztok změnil barvu z červené na oranžově-žlutou, bylo přidáno 10 ml 20% roztoku  $\text{CaCl}_2$ . Roztok opět zčervenal a obsah byl dotitrován do žlutého zbarvení. Standardizace byla provedena 3×.

#### 3.2.7.2 Příprava vzorku a titrace

Bylo naváženo 5 g konopného oleje s přesností na 0,001 g a vzorek byl kvantitativně převeden do 250ml titrační baňky. Do baňky bylo přidáno 50 ml diethyletheru a obsah byl třepán do rozpuštění vzorku. Po rozpuštění byl přidán 1 ml 1% roztoku fenolftaleinu a obsah míchán 1 minutu. Ihned byla provedena titrace odměrným roztokem  $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  hydroxidu draselného v ethanolu do slabě růžového zbarvení, které vydrželo déle jak 15 sekund. Slepý pokus byl proveden stejným způsobem s vynecháním zkušebního vzorku. Každý vzorek byl stanoven 3×.

Číslo kyselosti bylo vyjádřeno jako množství KOH v mg potřebného k neutralizaci kyselin v 1 g vzorku:

$$\text{ČK} = 56,11 \cdot c \cdot (V_1 - V_2) / m \text{ [mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{]}$$

( $V_1$  = spotřeba odměrného roztoku při titraci vzorku v ml;  $V_2$  = spotřeba odměrného roztoku pro slepý pokus v ml;  $c$  = koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného v  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $m$  = navážka oleje v g).



## 3.2.8 Stanovení jodového čísla

### 3.2.8.1 Příprava vzorků a titrace

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 0,150 g konopného oleje s přesností na 0,0001 g. Bylo přidáno 25 ml chloroformu a vzorek byl zcela rozpuštěn. Poté bylo přidáno 25 ml Hanušova činidla ( $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok jódmonobromidu). Baňka byla uzavřena, obsah zamíchán a baňka byla uložena do tmy po dobu 1 hodiny. Poté bylo přidáno 20 ml 20% roztoku jodidu draselného (w/v), uzávěr byl opláchnut destilovanou vodou a bylo přidáno 100 ml destilované vody.

Obsah baňky byl titrován za stálého míchání  $0,1\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  odměrným roztokem thiosíranu sodného (kapitola 3.2.6.1) do oranžového zbarvení. Poté byl přidán 1 ml škrobového mazu (0,2% roztok škrobu, w/v) a obsah byl titrován až do odbarvení. Slepý pokus byl proveden stejným způsobem s vynecháním zkušební vzorku. Každý vzorek byl stanoven 3×.

Jodové číslo bylo vyjádřeno jako množství jódu v gramech, které se mohlo adovat na 100 g oleje:

$$J\check{C} = 100 \cdot c \cdot (V_1 - V_2) \cdot 0,1269 / m \text{ [g I}_2\cdot 100 \text{ g}^{-1}\text{]}$$

( $V_1$  = spotřeba odměrného roztoku při titraci vzorku v ml;  $V_2$  = spotřeba odměrného roztoku pro slepý pokus v ml;  $c$  = koncentrace odměrného roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  v  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $m$  = navážka oleje v g).

## 3.2.9 Stanovení minerálních látek

Stanovení minerálních látek v konopných produktech metodou ICP-MS bylo uskutečněno podle Jarošová *et al.* (2014).

### 3.2.9.1 Příprava kalibrační řady

Pro prvkovou analýzu byly sestaveny kalibrační řady pro 9 prvků. Koncentrace jednotlivých bodů řady byly 10 000, 5 000 (2 500), 1 000, 500, 100, 50, 10, 1 a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Základní roztok byl připraven pipetováním 250  $\mu\text{l}$  vodného roztoku certifikovaného referenčního materiálu (CRM: Mg, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn a Se) do 25ml odměrné baňky s 1 ml  $\text{HNO}_3$  a doplněním milli-Q vodou. Zbylé body kalibrační řady byly

připraveny ředěním do odměrné baňky o objemu 25 ml. Každý roztok dané koncentrace obsahoval 1 ml HNO<sub>3</sub>. Roztok interního standardu pro ICP-MS byl připraven pipetováním 500 µl standardu do 50ml odměrné baňky s milli-Q vodou a doplněn.

### 3.2.9.2 Mineralizace vzorků

Na analytických vahách bylo naváženo cca 100 mg vzorku nebo referenčního materiálu (Jahodové listí, Zelená řasa). Navážka byla převedena do teflonových patron a byly přidány 2 ml koncentrované HNO<sub>3</sub> a 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nádoba byla řádně uzavřena a vložena do mikrovlnného mineralizátoru. Byl spuštěn program 1 (Tab. 23). Jeden rozkladný proces zahrnoval 6 vzorků. Po ukončení mineralizace a ochlazení při laboratorní teplotě byla nádoba pootevřena. Roztok byl přenesen do zkumavky o známé hmotnosti a společně s obsahem byla zkumavka zvážena. Pro analýzu některých prvků bylo potřeba vzorky zředit 100× a to pipetováním 100 µl koncentrovaného vzorku do 10ml odměrné baňky, která byla doplněna milli-Q vodou.

### 3.2.9.3 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Analýza vzorků a referenčního materiálu byla provedena na přístroji ICP-MS a byla uskutečněna ve dvou modech, bez přídavku kolizního plynu a s přídavkem helia. Před samotnou analýzou proběhlo promývání zředěným roztokem HNO<sub>3</sub> a interní kalibrace přístroje, která vyžadovala Tuning solution pro ICP-MS dodávané výrobcem. Během měření docházelo ke spotřebovávání interního standardu pro ICP-MS od výrobce, kterým byla kontrolována činnost zařízení. Pro kontrolu analýzy byl také použit Certifikovaný referenční materiál vodného roztoku fortifikovaného stopovými prvky TM 64,2 obsahující roztok minerálních látek a kovů o daných koncentracích.

Tab. 23 Zvolený program mikrovlnného mineralizátoru pro rozklad vzorků (program 1).

Čas (min)	Výkon (W)
2	250
2	0
5	400
2	0
2	500
2	0
6	600
5	Ventilace

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Obsah hrubých bílkovin stanoven pomocí kjeldahlizace

Obsah bílkovin v konopných výrobcích Hempoint byl stanoven poloautomatizovanou kjeldahlovou metodou (Tab. 24). Samotnému stanovení předcházela mineralizace vzorků v koncentrované kyselině sírové ve spalovacím hnízdě. Na přístroji pak proběhla automatická destilace a kolorimetrická titrace pro analýzu dusíku a bílkovin dle Kjeldahla.

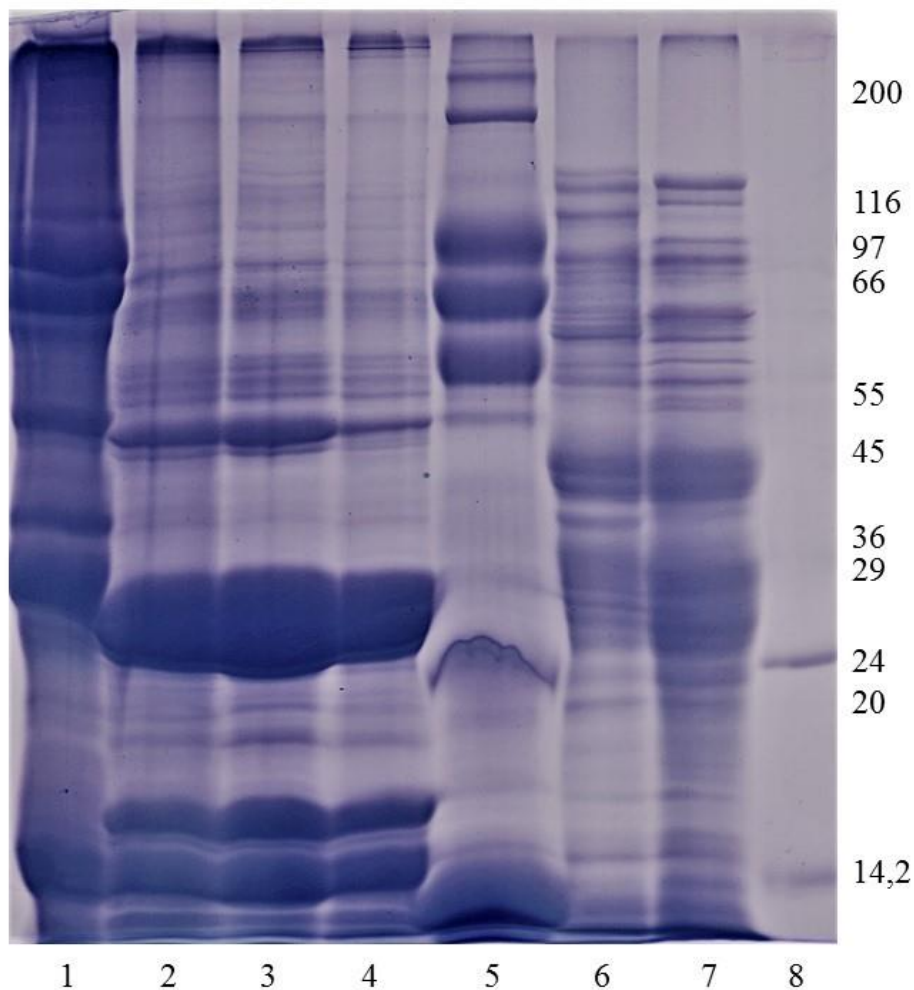
Bílkovinové množství v konopných produktech klesalo v tomto pořadí: Bio konopný protein > Bio loupané konopné semínko > Bio Kaneláda > Bio konopné semínko natural > Konopky kokos > Konopné křupky.

### 4.2 Elektroforetická separace bílkovin

Elektroforetická separace proteinů byla provedena v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného po inkubaci vzorků s mercaptoethanolem. Výsledkem jsou jednotlivé frakce proteinů příslušící dané molekulové hmotnosti (Obr. 30). Z pořízeného záznamu lze vyčíst, že sójový, syrovátkový a konopný proteinový izolát značky Hempoint se značně liší v zastoupení proteinů. Konopná semena obsahují také jiné proteiny než pšeničná zrna. U konopných produktů byla největší koncentrace proteinů pozorována v oblasti přibližně 26,5 kDa.

Tab. 24 Obsah bílkovin v konopných výrobcích, stanoveno pomocí kjeldahlizace. Pro přepočítání byl použit univerzální faktor 6,25. Uveden je také obsah sušiny ve výrobcích (n = 3).

Vzorek	Obsah bílkovin (g·100 g <sup>-1</sup> )	Obsah sušiny (%)	Obsah bílkovin v sušině (%)
Bio konopný protein Hempoint	49,976 ± 0,176	90,172	55,423 ± 0,195
Bio loupané konopné semínko Hempoint	31,750 ± 0,215	94,125	33,732 ± 0,229
Bio konopné semínko natural (neloupané) Hempoint	23,485 ± 0,073	92,509	25,386 ± 0,079
Konopné křupky Hempoint	10,951 ± 0,170	96,685	11,327 ± 0,176
Bio Kaneláda Hempoint	23,770 ± 0,259	96,366	24,666 ± 0,269
Konopky kokos Hempoint	20,860 ± 0,317	95,027	21,951 ± 0,334



Obr. 30 SDS-PAGE proteinů konopných produktů, sójového a syrovátkového proteinového izolátu a dvou standardních odrůd pšenice. Vpravo jsou vyznačené molekulové hmotnosti proteinů markeru (kDa). 1 = sójový proteinový izolát; 2 = Bio konopný protein Hempoint; 3 = Bio loupané konopné semínko Hempoint; 4 = Bio konopné semínko natural Hempoint; 5 = syrovátkový proteinový izolát; 6 = Mironowska, standardní odrůda pšenice; 7 = Brigand, standardní odrůda pšenice; 8 = proteinový marker (kDa).

Elektroforetický záznam byl vyhodnocen pomocí softwaru ImageJ 1.52a. Byly porovnány poměry intenzity dominantních bandů u konopných produktů pro vyjádření relativního zastoupení proteinů ve vzorcích. Bandy při přibližných molekulových hmotnostech 50:26,5:15,5:14 kDa měly tyto poměry: pro Bio konopný protein Hempoint 11:64:12:13, Bio loupané konopné semínko Hempoint 14:60:13:13 a Bio konopné semínko natural Hempoint 8:64:15:13. Syrovátkový proteinový izolát měl odlišné složení. Poměry intenzit hlavních bandů při molekulových hmotnostech 210:180:97:64:55:50:28:24:10 kDa byly 3:5:17:14:19:3:4:17:18. V případě vzorku sójového izolátu nebylo možné provést porovnání z důvodu zvýšeného pozadí.

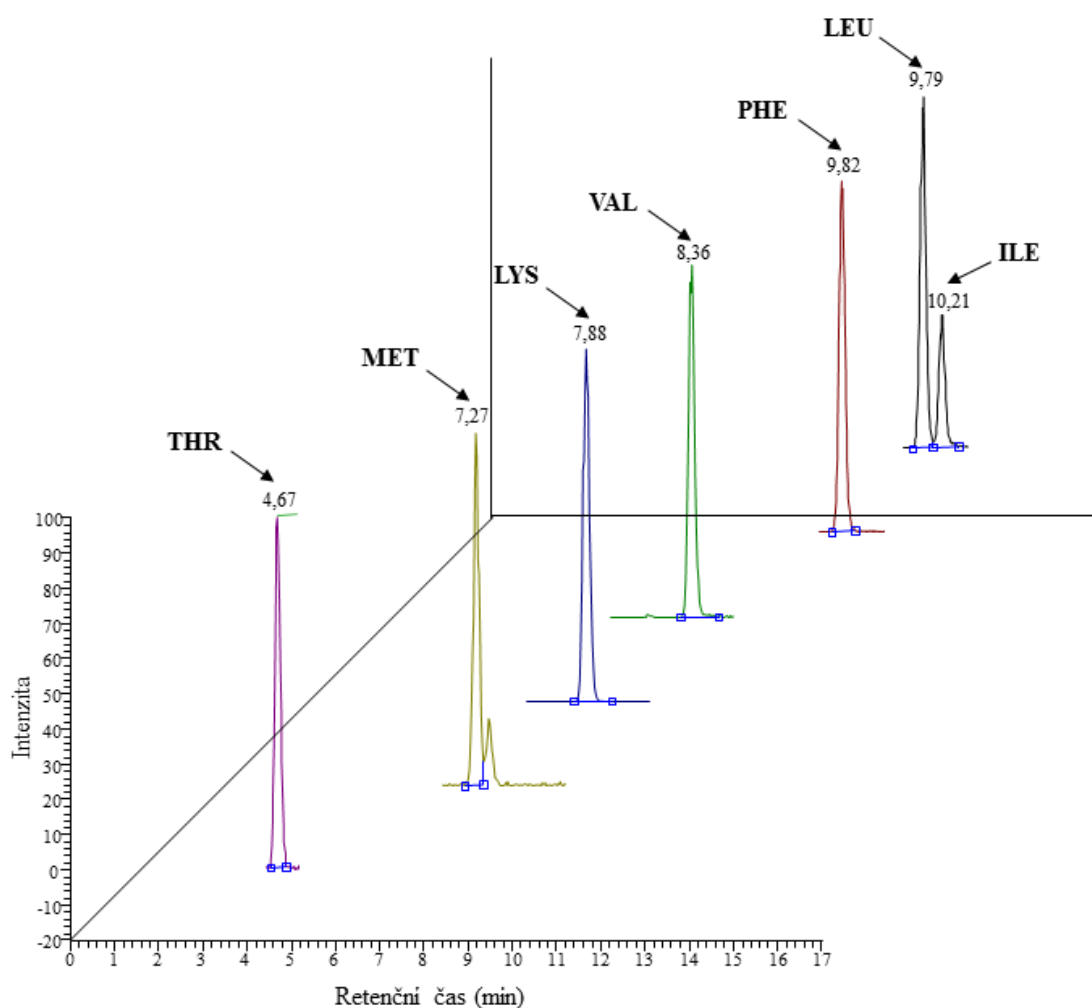
### 4.3 Aminokyselinové složení konopného proteinového izolátu

Složení aminokyselin v proteinovém izolátu Bio konopný protein Hempoint bylo stanoveno z hydrolyzátu pomocí UHPLC-MS/MS. Obsah jednotlivých aminokyselin byl vypočítán z rovnice kalibrační přímky (Tab. 25).

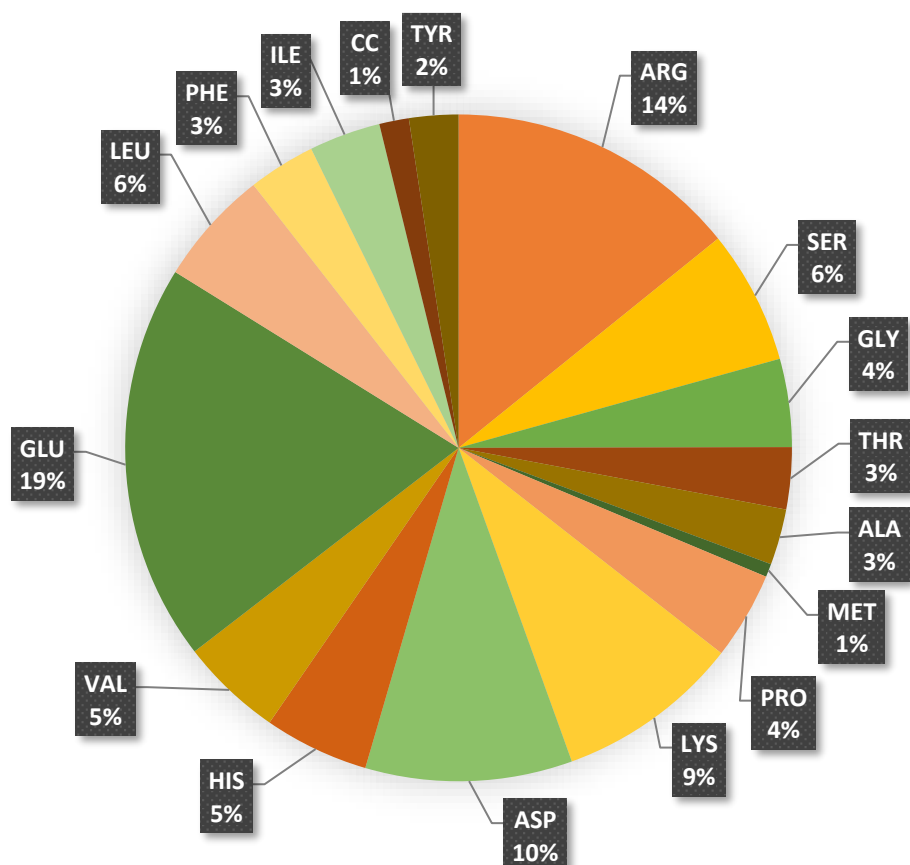
Tab. 25 Rovnice kalibrační přímky jednotlivých aminokyselin, příslušné korelační koeficienty a MRM přechody.

Aminokyselina	Rovnice	Korelační koeficient	MRM přechod (m/z)
Arginin	$y = 0,0175894x - 0,0586323$	0,9973	303 → 70 303 → 128
Serin	$y = 0,000676753x + 0,000119235$	0,9970	234 → 146 234 → 174
Glycin	$y = 0,000815493x - 0,00289662$	0,9947	204 → 118 204 → 144
Threonin	$y = 0,00127276x + 0,0170594$	0,9914	248 → 160 248 → 188
Alanin	$y = 0,000952749x - 0,00216454$	0,9984	218 → 88 218 → 130
Methionin	$y = 0,00430855x + 0,000328619$	0,9951	278 → 190 278 → 218
Prolin	$y = 0,00223887x - 0,0048484$	0,9936	244 → 114 244 → 156
Lysin	$y = 0,00635206x - 0,0318487$	0,9955	361 → 170 361 → 301
Kyselina asparagová	$y = 0,00113177x + 0,0173361$	0,9950	304 → 130 304 → 216
Histidin	$y = 0,00146528x + 0,00325179$	0,9969	370 → 110 370 → 196
Kyselina glutamová	$y = 0,000780833x + 0,0061898$	0,9913	318 → 172 318 → 258
Valin	$y = 0,0019683x - 0,00387272$	0,9915	246 → 116 246 → 158
Leucin	$y = 0,00431328x - 0,00232782$	0,9981	260 → 130 260 → 172
Fenylalanin	$y = 0,00637562x + 0,0452861$	0,9970	294 → 120 294 → 206
Isoleucin	$y = 0,00283938x - 0,00220541$	0,9944	260 → 130 260 → 172
Cystin	$y = 0,00940083x + 0,00927886$	0,9996	497 → 248 497 → 437
Tyrosin	$y = 0,00627102x + 0,032158$	0,9982	396 → 136 396 → 308

V konopném proteinovém izolátu Hempoint byly identifikovány všechny esenciální aminokyseliny (kromě tryptofanu) (Obr. 31). Aminokyselinové složení konopného proteinového izolátu a jejich přibližný procentuální obsah jsou uvedeny v grafu (Obr. 32). Zaokrouhlená procenta aminokyselin odpovídají průměrným hodnotám duplikátu. Tryptofan nebyl v této analýze měřen, tudíž není v grafu zahrnutý. Uvedený obsah kyseliny asparagové a glutamové odpovídá součtu množství kyseliny a jejího příslušného aminu (kyselina asparagová + asparagin; kyselina glutamová + glutamin). V konopném proteinovém izolátu jsou nejvíce zastoupeny kyselina glutamová, arginin a kyselina asparagová. U obou kyselin přispívá k jejich množství přítomnost deaminové formy glutaminu a asparaginu po kyselé hydrolýze.



Obr. 31 Chromatografická separace esenciálních aminokyselin v reálném vzorku Bio konopný protein Hempoint. THR = threonin, MET = methionin, LYS = lysin, VAL = valin, PHE = fenylalanin, LEU = leucin, ILE = isoleucin.



Obr. 32 Graf procentuálního obsahu aminokyselin v proteinu z konopného proteinového izolátu značky Hempoint. Procentuální obsah Asp odpovídá součtu obsahu kyseliny asparagové a asparaginu. Procentuální obsah Glu odpovídá součtu obsahu kyseliny glutamové a glutaminu. Aminokyselina cystein byla stanovena ve formě disulfidu cystinu. Tryptofan nebyl měřen a není v grafu započítán (n = 2). ARG = arginin, SER = serin, GLY = glycin, THR = threonin, ALA = alanin, MET = methionin, PRO = prolin, LYS = lysin, ASP = kyselina asparagová, HIS = histidin, VAL = valin, GLU = kyselina glutamová, LEU = leucin, PHE = fenylalanin, ILE = isoleucin, CC = cystin.

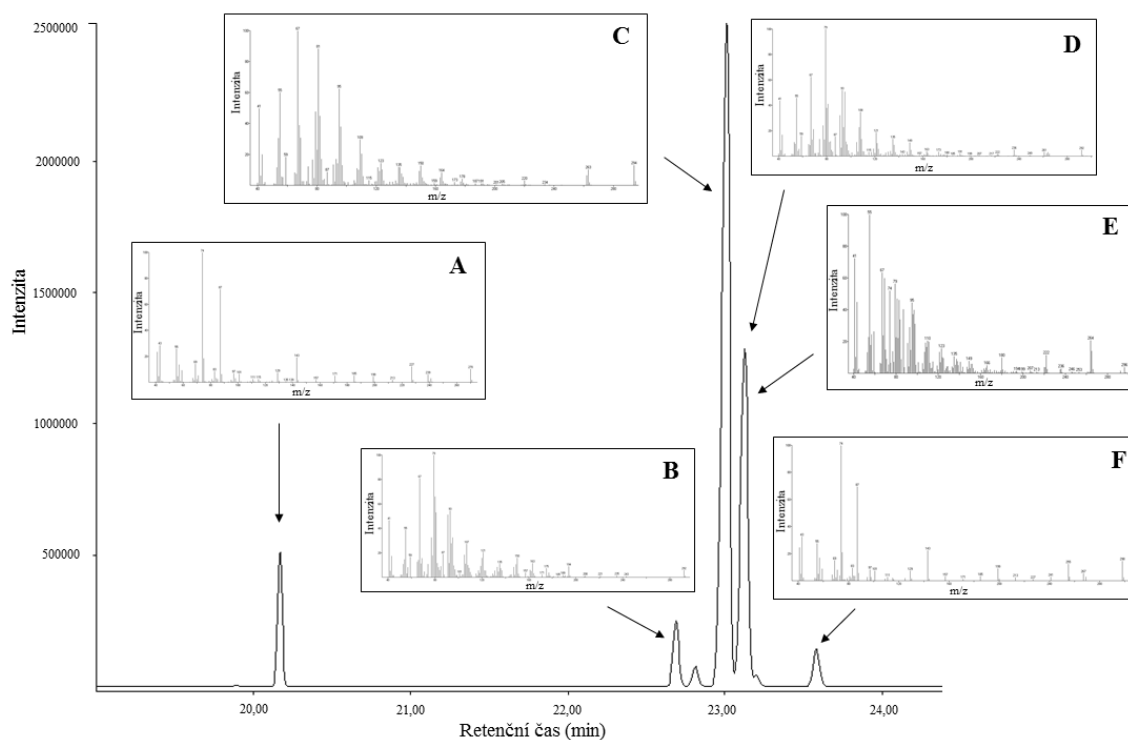
## 4.4 Obsah mastných kyselin

Koncentrace jednotlivých methyl esterů mastných kyselin byly vypočítány z rovnice kalibrační přímky (Tab. 26). Methyl estery mastných kyselin byly identifikovány podle jejich retenčních časů a hmotnostního spektra (Obr. 33). Následně bylo pro výpočet koncentrace příslušných mastných kyselin zahrnuto ředění a původní navážka. Koncentrace kyseliny alfa-linolenové byla vypočítána z rovnice kalibrační křivky kyseliny gama-linolenové z důvodu její absence v chromatogramu kalibrační směsi.

Tab. 26 Stanovované mastné kyseliny obsažené v kalibrační směsi standardů methyl esterů mastných kyselin, rovnice kalibrační křivky (lineární funkce), příslušné korelační koeficienty, Kovatsovy indexy a cílové ionty a kvalifikátory pro identifikaci. U mastných kyselin je uveden počet uhlíků a dvojných vazeb a triviální název. KK = korelační koeficient, KI = Kovatsův index.

Mastná kyselina		Rovnice	KK	KI	Cílový iont; kvalifikátory
C4	Máselná	$y = 1582,2 x - 130,76$	0,9999	0	<b>74</b> ; 43, 87, 102
C6	Kapronová	$y = 3215,3 x - 228,41$	0,9998	926	<b>74</b> ; 87, 99, 130
C8	Kaprylová	$y = 4054,1 x - 234,32$	0,9997	1125	<b>74</b> ; 87, 127, 158
C10	Kaprinová	$y = 4588,7 x - 544,51$	0,9999	1326	<b>74</b> ; 87, 143, 186
C11	Undekanová	$y = 2329,3 x - 442,09$	0,9995	1425	<b>74</b> ; 87, 143, 200
C12	Laurová	$y = 4702,3 x - 668,32$	0,9998	1526	<b>74</b> ; 87, 143, 214
C13	Tridekanová	$y = 2315,0 x - 547,30$	0,9989	1626	<b>74</b> ; 87, 143, 228
C14:1	Myristolejová	$y = 877,34 x - 273,93$	0,9972	1714	<b>55</b> ; 74, 166, 240
C14	Myristová	$y = 4569,5 x - 545,44$	0,9998	1726	<b>74</b> ; 87, 143, 199
C15:1	Pentadecenová	$y = 925,30 x - 278,42$	0,9981	1814	<b>55</b> ; 69, 220, 254
C15	Pentadekanová	$y = 2258,6 x - 415,12$	0,9997	1825	<b>74</b> ; 87, 143, 256
C16:1	Palmitolejová	$y = 735,37 x - 250,56$	0,9974	1906	<b>55</b> ; 69, 236, 268
C16	Palmitová	$y = 6461,4 x - 727,74$	0,9997	1925	<b>74</b> ; 87, 143, 270
C17:1	Heptadecenová	$y = 789,59 x - 285,53$	0,9968	2007	<b>55</b> ; 69, 250, 282
C17	Heptadekanová	$y = 1413,6 x - 425,61$	0,9984	2026	<b>74</b> ; 87, 143, 284
C18:3	Gama-linolenová	$y = 1522,0 x - 256,13$	0,9998	2080	<b>79</b> ; 67, 194, 292
C18:2	Linolová	$y = 823,45 x - 283,33$	0,9978	2097	<b>67</b> ; 109, 150, 294
C18:1	Olejová	$y = 2257,1 x - 342,40$	0,9999	2104	<b>55</b> ; 41, 264, 296
C18:2	Linolelaidová	$y = 1622,2 x - 274,30$	0,9999	2109	<b>67</b> ; 41, 95, 294
C18:1	Elaidová	$y = 1385,2 x - 190,43$	0,9996	2127	<b>69</b> ; 55, 222, 296
C18	Stearová	$y = 3949,4 x - 527,35$	0,9998	2127	<b>74</b> ; 87, 143, 255
C20:4	Arachidonová	$y = 680,45 x - 321,89$	0,9873	2260	<b>79</b> ; 91, 150, 318
C20:5	Eikosapentaenová	$y = 752,29 x - 296,60$	0,9927	2267	<b>79</b> ; 91, 119, 287
C20:3	Eikosatrienová	$y = 606,14 x - 283,72$	0,9981	2278	<b>67</b> ; 79, 150, 320
C20:2	Eikosadienová	$y = 793,40 x - 326,64$	0,9985	2298	<b>67</b> ; 81, 109, 322
C20:1	Eikosenová	$y = 1114,2 x - 345,64$	0,9992	2304	<b>55</b> ; 69, 292, 324
C20	Arachová	$y = 3850,7 x - 799,89$	0,9998	2329	<b>74</b> ; 87, 143, 326
C21	Heneikosanová	$y = 1825,6 x - 785,08$	0,9959	2430	<b>74</b> ; 87, 143, 340
C22:6	Dokosaheptaenová	$y = 645,64 x - 368,32$	0,9870	2452	<b>79</b> ; 91, 119, 215
C22:2	Dokosadienová	$y = 579,82 x - 284,96$	0,9939	2500	<b>67</b> ; 81, 109, 178
C22:1	Eruková	$y = 773,52 x - 198,00$	0,9994	2504	<b>55</b> ; 97, 320, 352
C22	Behenová	$y = 3652,9 x - 828,25$	0,9996	2530	<b>74</b> ; 87, 143, 354
C23	Trikosanová	$y = 1706,7 x - 671,99$	0,9968	2631	<b>74</b> ; 87, 143, 368
C24:1	Nervonová	$y = 688,70 x - 371,39$	0,9959	2706	<b>55</b> ; 69, 97, 348
C24	Lignocerová	$y = 3423,2 x - 109,82$	0,9988	2732	<b>74</b> ; 87, 143, 382

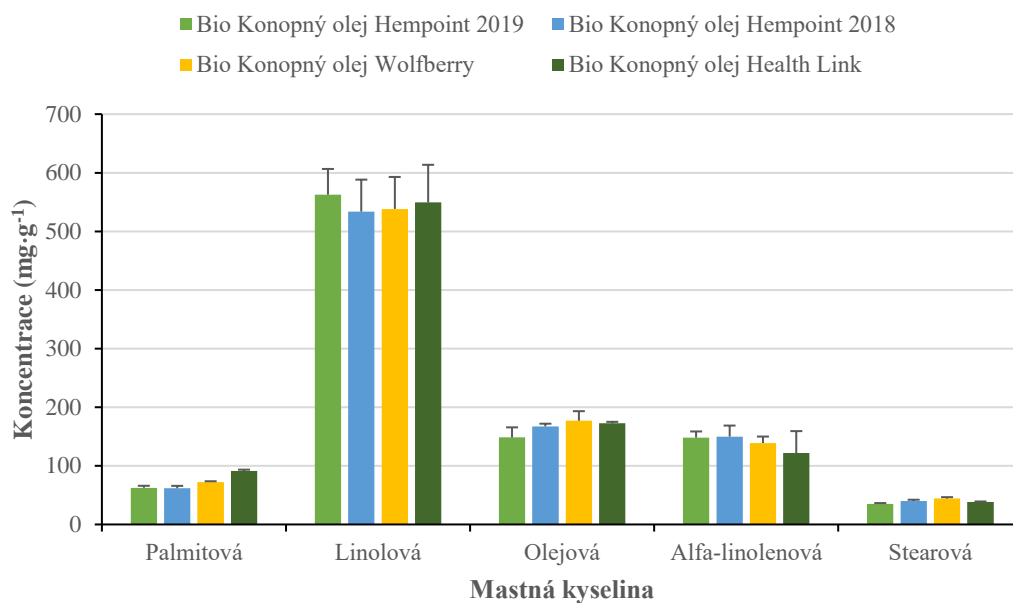




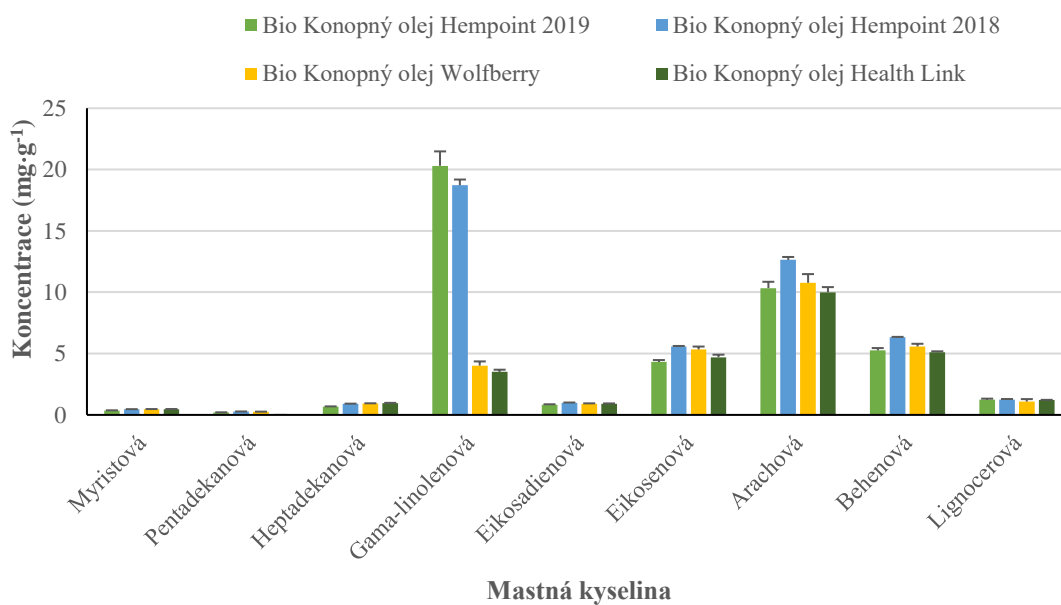
Obr. 33 GC-MS chromatogram hlavních methyl esterů mastných kyselin a jejich hmotnostní spektra v reálném vzorku Bio konopný olej Hempoint 2019. A = methyl ester kyseliny palmitové, B = methyl ester kyseliny gama-linolenové, C = methyl ester kyseliny linolové, D = methyl ester kyseliny alfa-linolenové, E = methyl ester kyseliny olejové, F = methyl ester kyseliny stearové.

Bio konopné oleje měly srovnatelné koncentrace hlavních mastných kyselin (Obr. 34). Nejvyšší koncentraci měla kyselina linolová, její zastoupení bylo 53-56% v olejích. Dále byly zastoupeny kyseliny olejová, alfa-linolenová, palmitová a stearová. V nižších koncentracích byly poté stanoveny kyseliny gama-linolenová, arachová, eikosenová, behenová, lignocerová, eikosadienová, heptadekanová, myristová a pentadekanová (Obr. 35). Dle této analýzy měly konopné oleje značky Hempoint vyšší obsah kyseliny gama-linolenové než srovnávací konopné oleje jiných značek.

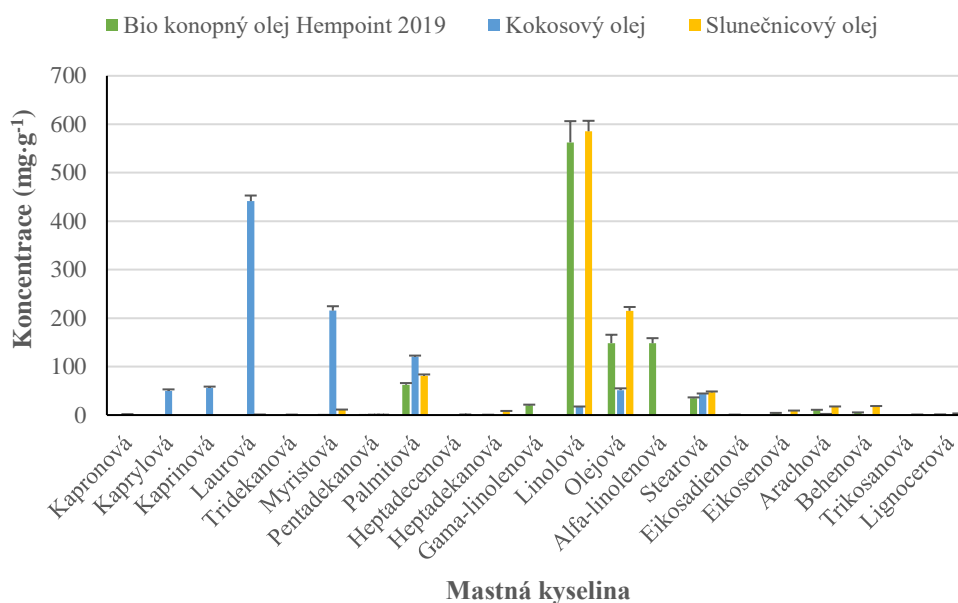
Kokosový olej obsahuje více mastných kyselin s krátkým řetězcem než konopný a slunečnicový olej (Obr. 36). V jeho složení převažují zejména nasycené kyseliny laurová a myristová. Z nenasycených mastných kyselin jsou v nízkých koncentracích přítomny pouze kyseliny linolová a olejová. Slunečnicový olej má téměř stejný obsah kyseliny linolové (omega-6 mastná kyselina) jako konopný olej. U obou olejů koncentrace kyseliny linolové převažuje, ovšem slunečnicový olej postrádá další polynenasycené mastné kyseliny, jako například isomery kyseliny linolenové. Kyselina linolenová je také nepřítomna v kokosovém oleji.



Obr. 34 Hmotnostní koncentrace ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) hlavních mastných kyselin testovaných konopných olejů ( $n = 3$ ).

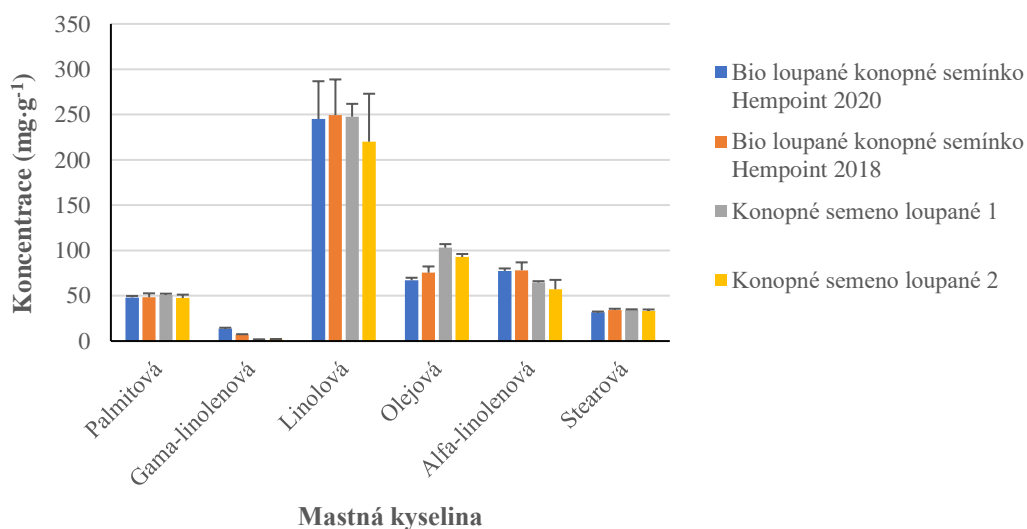


Obr. 35 Hmotnostní koncentrace ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) méně zastoupených mastných kyselin v testovaných konopných olejích ( $n = 3$ ).



Obr. 36 Hmotnostní koncentrace ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) mastných kyselin Bio konopného oleje Hempoint, kokosového a slunečnicového oleje ( $n = 3$ ).

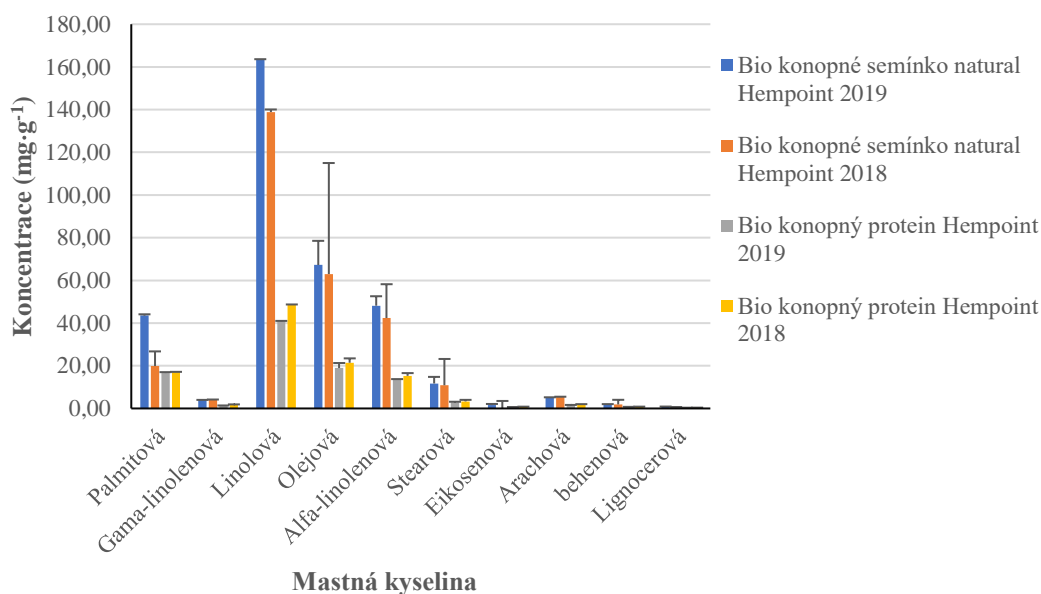
Srovnání bio loupaných konopných semen Hempoint s konopnými semeny dostupnými na trhu je znázorněno v grafu (Obr. 37). Složení hlavních mastných kyselin se mezi vzorky nijak značně nelišilo. V nízkých koncentracích byly ve vzorcích zastoupeny kyseliny heptadekanová, eikosenová, arachová, behenová a lignocerová, které v grafu nejsou uvedeny. Konopné loupané semeno Hempoint obsahuje přibližně 250 mg kyseliny linolové a 77 mg kyseliny alfa-linolenové na 1 g semene.



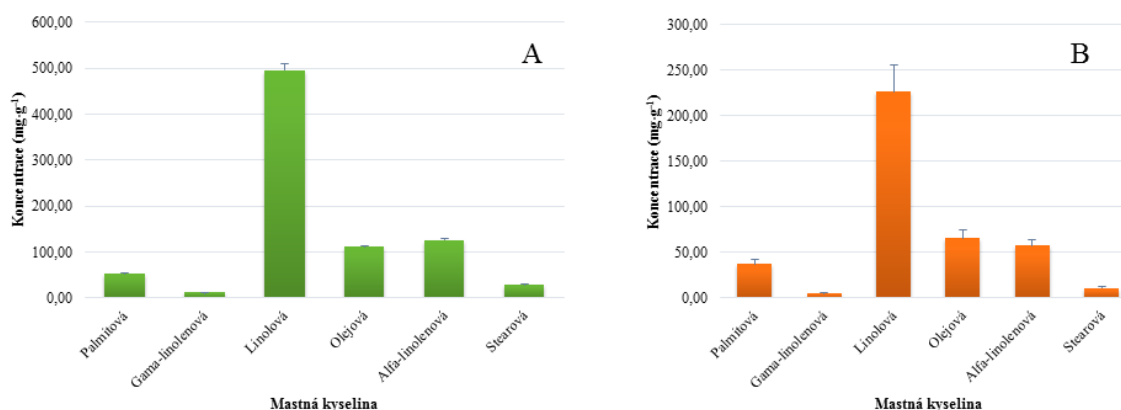
Obr. 37 Hmotnostní koncentrace mastných kyselin v loupaných konopných semenech značky Hempoint v bio kvalitě a dva vzorky konopných semen dostupných na českém trhu ( $n = 3$ ).

V porovnání konopná neloupaná semena obsahují 150 mg linolové a 45 mg alfa-linolenové kyseliny na 1 g (Obr. 38), jelikož značný podíl hmotnosti semene tvoří slupka. Značně nízký obsah mastných kyselin zůstává v konopném proteinovém izolátu Hempoint po vylisování oleje ze semen. Ve 100 g izolátu se nachází přibližně 4,5 g linolové a 1,5 g alfa-linolenové kyseliny.

Produkt Bio Kaneláda Hempoint je vyroben rozmixováním loupaných konopných semen s konopným olejem. Jeho kvalita je tudíž srovnatelná s Bio konopným olejem a Bio loupanými konopnými semínky a složení mastných kyselin se neliší (Obr. 39). Obdobné složení lze pozorovat také u produktu Konopyky makové (Obr. 39), jehož základní surovinou je konopné loupané semeno. V tomto vzorku byly také přítomny mastné kyseliny s krátkým řetězcem, kyselina laurová a kaprinová.



Obr. 38 Hmotnostní koncentrace mastných kyselin v konopných neloupaných semenech značky Hempoint v bio kvalitě a v konopném proteinovém izolátu (n = 3).



Obr. 39 Hmotnostní koncentrace konopných výrobků značky Hempoint (n = 3). A = Bio Kaneláda, B = Konopky mák.

## 4.5 Obsah fytoKANABINOIDŮ

Ve většině produktů Hempoint nebyla detekována přítomnost psychoaktivních kanabinoidů pomocí GC-MS. V případě výrobků Bio konopný čaj: Ték, Bylinková sůl a Bio konopný čaj: Výběr z palic byly detekovány přítomné dekarboxylované metabolity a byla provedena analýza kanabinoidů pomocí UHPLC-MS/MS (Tab. 27). Hodnota psychoaktivních látek odpovídá součtu  $\Delta$ 9-tetrahydrokanabinolu a kyseliny tetrahydrokanabinolové.

Bio konopné čaje jsou tvořeny sušenými bio konopnými listy a květy. Bylinková sůl obsahuje mořskou sůl, listy a květy konopí povolených odrůd.

Tab. 27 Procentuální obsah kanabinoidů v potravinových výrobcích stanoven metodou UHPLC-MS/MS (n = 3). CBDA = Kyselina kanabidiolová, CBD = Kanabidiol, CBN = Kanabinol, THC =  $\Delta$ 9-tetrahydrokanabinol, THCA = Kyselina tetrahydrokanabinolová.

Produkt	CBDA	CBD	CBN	THC	THCA	Psychoaktivní látky
Bio konopný čaj: Ték	1,82 ± 0,14	0,36 ± 0,03	< 0,01	0,05 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,24 ± 0,02
Bylinková sůl	1,22 ± 0,11	0,39 ± 0,05	< 0,01	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Bio konopný čaj: Výběr z palic	1,85 ± 0,13	0,32 ± 0,08	< 0,01	0,05 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,31 ± 0,02

## 4.6 Parametry kvality konopných olejů

V tabulce 28 jsou uvedeny hodnoty parametrů hodnotících kvalitu a stabilitu olejů. Všechny konopné oleje byly bio kvality a lisované za studena. Bio konopný olej Hempoint 2018 byl otevřen v měsíci jeho expirace a poté byla láhev uzavřena a uchována při 4 °C. Stanovení peroxidového čísla a čísla kyselosti proběhlo za 7 měsíců po uplynutí doby expirace a otevření láhve. Bio konopný olej Hempoint 2019 byl ihned analyzován po otevření láhve v měsíci jeho expirace, kdy byl obdržen. Bio konopný oleje Wolfberry a Health Link byly také analyzovány po otevření láhve, oběma olejům ovšem nevypršela expirační doba v času analýzy. Olej Wolfberry měl ještě 7 měsíců do expirace a olej Health Link 8 měsíců.

Bio konopné oleje značky Hempoint, lišící se stářím a časem po expiraci při analýze, měly srovnatelné množství peroxidů a hydroperoxidů. Nejvyšší obsah peroxidů a hydroperoxidů byl stanoven v Bio konopném oleji značky Wolfberry. Nejnižší hodnota peroxidového čísla byla stanovena v Bio konopném oleji Health Link.

Vzorek oleje značky Hempoint sedm měsíců expirovaný měl pětkrát menší množství volných mastných kyselin, vyjádřeno pomocí čísla kyselosti, než olej stejné značky stanovený v měsíci jeho expirace. Taktéž oleje značek Wolfberry a Health Link měly hodnoty čísla kyselosti nižší v porovnání s Bio konopným olejem Hempoint 2019.

Hodnota jodového čísla byla přibližně stejná pro všechny konopné oleje, v rozmezí 151,4-163,4 g jódu na 100 g oleje, což odpovídá vyššímu obsahu nenasycených mastných kyselin v konopných olejích.

Tab. 28 Hodnoty stanovených parametrů hodnotících kvalitu rostlinných olejů: peroxidového čísla, čísla kyselosti a jodového čísla. Pro orientaci je také uvedeno datum expirace oleje (n = 3).

Vzorek	Bio konopný olej Hempoint 2018	Bio konopný olej Hempoint 2019	Bio konopný olej Wolfberry	Bio konopný olej Health Link
Datum expirace	02/2018	01/2019	8/2019	9/2019
Peroxidové číslo ( $\mu\text{mol } (\frac{1}{2} \text{ ROOH}) \cdot \text{g}^{-1}$ )	11,680 $\pm$ 0,015	10,433 $\pm$ 0,635	> 30,0	6,586 $\pm$ 0,318
Číslo kyselosti (mg KOH $\cdot$ 100 g $^{-1}$ )	0,945 $\pm$ 0,016	4,952 $\pm$ 0,084	1,907 $\pm$ 0,358	1,182 $\pm$ 0,066
Jodové číslo (g I $_2$ $\cdot$ 100 g $^{-1}$ )	163,4 $\pm$ 6,5	153,8 $\pm$ 13,0	156,7 $\pm$ 3,3	151,4 $\pm$ 5,4

## 4.7 Obsah minerálních látek a stopových prvků

Hmotnostní koncentrace minerálních látek a stopových prvků v konopných produktech byly vypočítány z rovnice kalibrační přímky (Tab. 29). Nejvyšší koncentrace byly naměřeny v konopném proteinovém izolátu (Tab. 30), který se zpracovává z vedlejšího produktu lisování oleje ze semen. Semena obsahují značné množství fosforu, hořčíku, draslíku a vápníku. Oproti loupaným semenům mělo neloupané semeno větší množství vápníku, manganu, železa a mědi. Nicméně neloupané semeno obsahovalo menší množství hořčíku, fosforu, draslíku a selenu. V konopných olejích byly detekovány některé prvky, které zůstávají v olejovém podílu během lisování semen.

Tab. 29 Rovnice kalibrační křivky pro výpočet koncentrace jednotlivých prvků a příslušné korelační koeficienty.

<b>Prvek</b>	<b>Rovnice</b>	<b>Korelační koeficient</b>
Hořčík	$y = 314,62x + 5784$	0,9999
Fosfor	$y = 6,0653x + 957,83$	0,9997
Draslík	$y = 193,98x + 15035$	0,9999
Vápník	$y = 10,3x + 921,74$	0,9997
Mangan	$y = 2439,1x + 66234$	0,9996
Železo	$y = 4994x + 138606$	0,9997
Měď	$y = 9784,6x + 292007$	0,9997
Zinek	$y = 1239x + 27161$	0,9996
Selen	$y = 33,605x + 745,73$	0,9997

Tab. 30 Koncentrace minerálních látek v konopných produktech v  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$ , ppm) (n = 3).  
LOD = pod limitem detekce.

Vzorek	Mg	P	K	Ca
Bio loupané konopné semínko Hempoint	5745 ± 991	15547 ± 2804	9742 ± 1602	598 ± 155
Konopná loupaná semena 1	5216 ± 757	12322 ± 1522	9436 ± 720	880 ± 86
Konopná semena loupaná 2	4929 ± 1165	12002 ± 2531	9544 ± 2671	819 ± 166
Bio konopné semínko natural Hempoint	3446 ± 334	8395 ± 809	6072 ± 368	1223 ± 139
Bio konopný protein Hempoint	7408 ± 79	18828 ± 925	14055 ± 975	2058 ± 404
Bio konopný olej Hempoint	11 ± 1,3	51 ± 2,6	LOD	45 ± 15
Bio konopný olej Wolfberry	8 ± 0,4	28 ± 2,4	LOD	< 24,2
Bio konopný olej Health Link	7 ± 0,8	< 22	LOD	45 ± 17

Tab. 30 Koncentrace minerálních látek v konopných produktech v  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  ( $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$ , ppm) (n = 3).  
LOD = pod limitem detekce (*pokračování*).

Vzorek	Mn	Fe	Cu	Zn	Se
Bio loupané konopné semínko Hempoint	125 ± 12	210 ± 19	26 ± 3	205 ± 25	0,107 ± 0,045
Konopná loupaná semena 1	102 ± 19	179 ± 34	16 ± 3	148 ± 25	0,113 ± 0,016
Konopná semena loupaná 2	118 ± 16	206 ± 32	20 ± 2	158 ± 19	0,147 ± 0,064
Bio konopné semínko natural Hempoint	285 ± 9	249 ± 11	28 ± 1	160 ± 14	LOD
Bio konopný protein Hempoint	239 ± 27	388 ± 47	32 ± 3	262 ± 24	0,075 ± 0,001
Bio konopný olej Hempoint	2,05 ± 0,49	LOD	LOD	LOD	LOD
Bio konopný olej Wolfberry	1,34 ± 0,05	LOD	LOD	LOD	LOD
Bio konopný olej Health Link	1,18 ± 0,15	LOD	LOD	LOD	LOD



## 5 DISKUSE

Stanovený obsah bílkovin kjeldahlizací v konopném proteinovém izolátu Bio konopný protein Hempoint (Tab. 24) byl o několik gramů vyšší, než bylo deklarováno výrobcem na produktu ( $47 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). Vyšší obsah byl také stanoven pro produkt Bio loupané konopné semínko Hempoint, kdy rozdíl činil 4,5 %. Vyšší stanovené množství bílkovin v testovaných výrobcích může být dáno přítomností dalších dusíkatých látek v semenech. Neloupané semeno Bio konopné semínko natural mělo naopak o 2,5 % menší obsah bílkovin oproti uvedenému údaji na výrobku. V případě výrobků Bio Kaneláda, Konopky kokos a Konopné křupky Hempoint nebyly nutriční údaje uvedeny na obale výrobku a výsledky byly předány výrobcí.

Separaci konopných proteinů pomocí SDS-PAGE (Obr. 30) bylo zjištěno, že konopný proteinový izolát si zachoval kvalitu proteinů ze semen. Při lisování oleje ze semen nedocházelo ke ztrátám žádného proteinu a ve výliscích byly zachovány stejné proteinové poměry.

Z elektroforetického záznamu bylo také možné vyčíst, že tato metoda, optimalizována pro analýzu pšenice, nebyla vhodná pro stanovení konopných proteinů při zachování těchto podmínek. Na gel bylo naneseno příliš velké množství proteinu konopných produktů, i když navážka vzorků byla upravena tak, aby obsahovala přibližně stejné množství nanášeného proteinu, jako tomu bylo v případě pšeničných zrn standardních odrůd. Separace v tomto případě nebyla kvalitní a nebylo možné pozorovat frakce jednotlivých podjednotek při dané molekulové hmotnosti, jako je tomu v literatuře. Kvalitně rozseparované frakce nebyly také pozorovány v případě sójového proteinového izolátu.

Aminokyselinové složení konopného proteinového izolátu značky Hempoint (Obr. 32) bylo srovnatelné se složením v konopném semeni dle Callaway (2004). Ve vzorku byl stanoven o procento nižší obsah sirných aminokyselin methioninu a cystinu. Tato skutečnost mohla být dána kyselou hydrolýzou, kdy vzorek nebyl před hydrolýzou oxidován pomocí permravní kyseliny. U rozvětvených aminokyselin leucinu, isoleucinu a valinu nebyly pozorovány nižší hodnoty obsahu, přestože byla zvolena kratší doba hydrolýzy (22 h místo doporučených 72 h). Obsah leucinu byl 6 % v konopném proteinovém izolátu obdobně jako v případě analýzy proteinových izolátů (5,1 % leucinu) v publikaci Gorissen *et al.* (2018). Obsah leucinu a lysinu je limitujícím faktorem kvality proteinů. Množství lysinu  $5,8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  proteinu je požadováno pro výživu dětí ve věku

2-5 let podle Světové zdravotnické organizace (Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation, 1985). Konopné proteiny mají obecně nižší obsah lysinu, než je vyžadováno (House *et al.*, 2010). V experimentální části této práce byl procentuální obsah lysinu v proteinu stanoven na 9 %. V porovnání s konopným proteinem v semenu dle Callaway (2004), kdy byl procentuální obsah lysinu 4 %, došlo k nadhodnocení výsledku touto metodou.

Limitujícím faktorem použití EZ:faast<sup>TM</sup> kitu pro analýzu aminokyselin přítomných v konopném proteinu je nízké rozmezí kalibrační řady (20-200 nmol·ml<sup>-1</sup>), kdy kalibrační body jsou doporučeny výrobcem. Jednotlivé aminokyseliny jsou v konopném proteinu zastoupeny v jednotkách až desítkách procent. Nanášené množství aminokyselin na sorbent pro extrakci pevnou fází je limitováno. Je nutné zvolit vhodné ředění vzorku a následně provést kvantifikaci v rámci kalibrační křivky. Během experimentů bylo vyzkoušeno přidání nižšího kalibračního bodu 2 nmol·ml<sup>-1</sup>. Nicméně v tomto bodě byla pozorována chybná kvantifikace, v případě některých standardů aminokyselin se pohybovala v minusových hodnotách a byly pozorovány odchylky v opakovaném dávkování stejného roztoku. Výsledná koncentrace, kvantifikována v rozmezí 2-20 nmol·ml<sup>-1</sup>, nebyla tudíž brána jako věrohodná a nadále tento bod nebyl aplikován. V nejvyšším bodu kalibrace byla v některých případech pozorována saturace detektoru a pokles naměřené plochy vnitřního standardu.

Navíc chemikálie a materiál pro kyselou hydrolyzu vzorku nebyly součástí kitu a to i v případném použití kitu pro analýzu hydrolyzátu (v této práci byl použit kit pro volné fyziologické aminokyseliny). Tyto faktory omezují použití tohoto kitu.

Při analýze mastných kyselin došlo pravděpodobně k metodické chybě, kdy touto chromatografickou metodou a použitou kolonou nebyl detekován methyl ester kyseliny alfa-linolenové ve směsi standardů. Methyl ester kyseliny byl ovšem přítomen v chromatogramu reálného vzorku a koeluoval s esterem kyseliny olejové (Obr. 33). Kyselina byla identifikována pomocí hmotnostního spektra a ověřena v databázi softwaru NIST MS Search (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Version 2.0). Kalibrovaná byla na methyl ester kyseliny gama-linolenové, jelikož se jedná o isomery a mají stejnou molekulovou hmotnost.

Obsah mastných kyselin v Bio konopném oleji Hempoint (Obr. 34) byl srovnatelný s dříve publikovanými daty (Callaway, 2004). Rozdíl byl pouze u kyseliny alfa-linolenové a olejové, kdy v oleji byl stanoven nižší obsah kyseliny alfa-linolenové a vyšší obsah kyseliny olejové. Stanovené koncentrace mastných kyselin odpovídaly

výrobce deklarovaným údajům na obale Bio konopného oleje Hempoint 2019 v případě kyseliny linolové a mononenasyčených mastných kyselin zastoupeny kyselinou olejovou. Obsah alfa- a gama-linolenové kyseliny byl naměřen nižší, než uvádí výrobce, což v případě kyseliny alfa-linolenové může být dáno chybnou kvantifikací kvůli koeluci kyseliny s kyselinou olejovou.

Loupaná konopná semena obsahují více tuků na 100 g než konopná semena neloupaná dle výrobce. Tento údaj byl také potvrzen naměřením vyššího obsahu mastných kyselin v loupáném semenu oproti neloupanému (Obr. 37, 38). V Bio konopném proteinu Hempoint 2019 byl naměřen přibližně stejný průměrný obsah lipidů, jak bylo deklarováno výrobcem ( $8,7 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). Sečtením koncentrací všech stanovených mastných kyselin byl odvozen obsah lipidů  $9,75 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Výrobce také na reklamě produktu uváděl, že tento produkt obsahuje dokonalou rovnováhu všech nenasycených mastných kyselin omega-3, 6 a 9. Mastné kyseliny jsou ovšem téměř kvantitativně odstraněny z výlisků lisováním oleje ze semen. Oproti loupáným semenům tedy obsahují přibližně pětkrát menší podíl tuků.

Získané profily mastných kyselin potvrzují, že konopné oleje značky Hempoint nebyly falšované jinými oleji a největší podíl tvoří polynenasycené mastné kyseliny, což bylo potvrzeno také stanovením jodového čísla (Tab. 28). V dnešní době patří oleje k nejvíce falšovaným potravinám, zejména panenské olivové oleje. V roce 2018 byl olivový olej dle americké databáze (US Pharmacopeia's Food Fraud Database) druhou nejvíce pančovanou potravinou (United States Pharmacopeia, 2018).

Při porovnání tří druhů rostlinných olejů měly oleje konopný a slunečnicový téměř identický obsah kyseliny linolové (Obr. 36). Ovšem v případě slunečnicového oleje byla další nejvíce zastoupenou kyselinou kyselina olejová a zcela postrádal isomery kyseliny linolenové. Zejména esenciální kyselina alfa-linolenová, patřící do skupiny omega-3 mastných kyselin, je v signifikantním množství obsažena v konopném oleji a podílí se na zdraví prospěšném poměru omega-6 a omega-3 mastných kyselin.

Jelikož nebyly k dispozici všechny standardy omega-3 a omega-6 mastných kyselin, nelze s přesností stanovit poměr těchto kyselin. Pokud by byl porovnán obsah esenciálních mastných kyselin linolové (omega-6) a alfa-linolenové (omega-3), které tvořily největší podíl mastných kyselin těchto dvou skupin, poměr těchto kyselin by odpovídal poměru 3,8:1 v Bio konopném oleji 2019. Tento poměr je stále nižší v porovnání s poměry jiných olejů (Tab. 7).

V případě výrobku Bio Kaneláda Hempoint byl také zvolen odlišný postup přípravy vzorku z důvodu jeho nehomogenity. Vzorek byl v několika krocích homogenizován a byla zvolena vyšší navážka a větší objem extrakčního činidla. Tento postup měl značný vliv na snížení odchylek stanovení mastných kyselin v replikátech.

Obdobné složení lze pozorovat také u produktu Konopky makové (Obr. 39), jehož základní surovinou je konopné loupané semeno. Zdrojem méně zastoupených mastných kyselin, které se původně nevyskytují v konopném semenu, mohou být další přidané suroviny, jako je rostlinný tuk, sušené polotučné mléko či mák.

Ve výrobku Bio konopný čaj: Výběr z palic se hodnota psychoaktivních látek stanovená metodou UHPLC-MS/MS ( $0,31 \pm 0,02$  %) (Tab. 27) pohybovala na hranici stanovenou legislativou České republiky (0,3 % obsahu látek ze skupiny tetrahydrokanabinolů) (Zákon č. 273/2013 Sb.). U ostatních vzorků nebyly naměřeny nadlimitní hodnoty. Dle výrobce jsou bylinné čaje a soli tvořeny listím a květy odrůdy konopí Carmagnola, která se vyznačuje nízkým obsahem THC ( $< 0,3$  %) a vyšším obsahem látek ze skupiny kanabidiolů (CBD).

Nejvyšší obsah peroxidů a hydroperoxidů byl stanoven v Bio konopném oleji značky Wolfberry (Tab. 28). Stanovená hodnota peroxidového čísla nebyla u tohoto oleje očekávána, jelikož produktu nevypršela expirační doba a měření bylo provedeno následně po otevření láhve. Hodnota peroxidového čísla byla zvýšená pro oba oleje značky Hempoint ( $> 10,0$  mekv. $O_2 \cdot kg^{-1} = 10,0$   $\mu mol$  ( $\frac{1}{2}$  ROOH)  $\cdot g^{-1}$ ). Ve vyhlášce č. 90/2000 (Vyhláška MZe č. 90/2000 Sb.) byla ovšem pro oleje lisované za studena povolena maximální hodnota peroxidového čísla  $15,0$  mekv. $O_2 \cdot kg^{-1}$  a tento limit nebyl u olejů značky Hempoint překročen. Nicméně vyhláška už momentálně není aktuální a v nahrazující vyhlášce nejsou limity uvedeny (Vyhláška MZe č. 397/2016 Sb.). U konopného oleje Hempoint, který byl 7 měsíců expirovaný, byla očekávána vyšší hodnota peroxidového čísla než u oleje stejné značky, který v době analýzy teprve expiroval. Stanovené hodnoty byly srovnatelné s hodnotou peroxidového čísla konopného oleje lisovaného za studena v publikaci Poustková *et al.* (2010). Zvýšené hodnoty mohly být způsobeny způsobem skladování semen, lisování oleje ze semen a následným lahvováním a skladováním oleje. Oxidace lipidů může být zapříčiněna lisováním oleje, jestliže není prováděna za inertní atmosféry a materiál lisovače je tvořen přechodnými kovi (železo, měď). Ty pak mohou i ve stopovém množství katalyzovat degradaci lipidů (Callaway a Pate, 2009). Obsah volných mastných kyselin, vyjádřen číslem kyselosti, byl očekáván nejvyšší v sedm měsíců expirovaném vzorku konopného

oleje Hempoint. Zde byl ovšem obsah stanoven nejnižší ze všech vzorků, pro což nebylo nalezeno vysvětlení.

Ze získaných dat měření minerálních látek v konopných produktech pomocí ICP-MS (Tab. 30) vyplynulo, že největší množství minerálních látek zůstává ve výliscích, vedlejším produktu lisování oleje ze semen, ze kterých byl získán konopný proteinový izolát. Minerální látky se tudíž hromadily v pevném, neolejnatém podílu semene. Některé minerální látky (Ca, Mn, Fe, Cu) byly v signifikantním množství zastoupeny ve slupkách semene, což bylo zjištěno porovnáním hodnot loupaného a neloupaného konopného semene. Nicméně neloupané semeno obsahovalo nižší množství hořčíku, fosforu, draslíku a selenu. Z toho vyplývá, že tyto prvky se nacházely ve větším množství v jádře semen.

Dle výrobce obsahuje Bio loupané konopné semínko Hempoint průměrně  $12 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  železa a v této práci bylo naměřeno větší množství  $21 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ . Dále byly na obale uvedeny minerální látky (bez obsahových hodnot) fosfor, hořčík, zinek, měď, mangan, draslík (a železo) v Hempoint výrobcích Bio loupané konopné semínko, Bio konopné semínko natural a Bio konopný protein. Přítomnost těchto prvků v produktech byla potvrzena. Některé minerální látky se také podařilo naměřit v konopných olejích, jejichž obsah na výrobcích nebyl uveden.

Získaná data byla porovnána s výsledky Callaway (2004) (Tab. 12). V této publikaci nebylo uvedeno, zda bylo analyzováno loupané nebo neloupané semeno. V Bio loupaném konopném semínku Hempoint bylo naměřeno větší množství hořčíku, fosforu, draslíku, manganu, železa, mědi a zinku. Naopak bylo stanoveno 2,5-krát menší množství vápníku. Ve srovnání s publikovanými daty byly naměřené hodnoty obsahu hořčíku, fosforu, draslíku a vápníku nižší v Bio konopném semínku natural Hempoint (celé, neloupané semeno). Ovšem byl stanoven vyšší obsah manganu, železa, mědi a zinku. V semenech se také podařila určit koncentrace selenu. Řádově se všechny minerální látky pohybovaly ve stejném rozmezí jako ve srovnávané publikaci. Stanovená množství minerálních látek pro neloupané konopné semeno Hempoint také korespondovala s výsledky práce Mattila *et al.* (2018) (Tab. 13,14). Nicméně koncentrace zinku, manganu a železa byla dvakrát až pětkrát vyšší v semenu Hempoint.

## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce je věnována nutričnímu složení konopných potravinových výrobků. Teoretická část je zaměřena na konopí seté, v současnosti dostupné konopné potravinové výrobky a na jejich nutriční složení, které je zde porovnáno s jinými potravinovými výrobky. V experimentální části byl stanoven obsah jednotlivých nutrientů, fytoKANABINOIDŮ a byly určeny hodnoty parametrů popisujících kvalitu olejů a tuků ve výrobcích.

Nejvyšší obsah proteinů ( $49,976 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) byl stanoven poloautomatizovanou metodou dle Kjeldahla v konopném proteinovém izolátu Bio konopný protein Hempoint. Stanovené množství také přibližně odpovídalo deklarovanému množství ( $47 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ). Konopné loupané semeno obsahovalo 32 % bílkovin a neloupané semeno 23,5 %.

Elektroforetická separace proteinů SDS-PAGE optimalizovaná pro analýzu pšenice nebyla vhodnou volbou pro kvalitativní analýzu konopných proteinů. Ovšem bylo pozorováno, že konopný proteinový izolát si zachoval kvalitu proteinů ze semen a lišil se v proteinovém zastoupení v porovnání se sójovým a syrovátkovým proteinovým izolátem.

V konopném proteinovém izolátu byly identifikovány všechny esenciální aminokyseliny (kromě tryptofanu) pomocí UHPLC-MS/MS. Ve výrobku byly nejvíce zastoupeny kyseliny glutamová a asparagová a arginin. Získané výsledky jsou ve shodě s literárními údaji.

Získaná kvalitativní i kvantitativní data GC-MS analýzy mastných kyselin v konopných olejích odpovídala dříve publikovaným výsledkům. Konopné oleje nebyly falšované přidáním jiných olejů a obsahovaly vysoký podíl omega-3 a omega-6 mastných kyselin v porovnání s jinými druhy olejů. Zastoupení esenciální linolové kyseliny v olejích bylo 53-56%. U konopných olejů různých značek nebyl pozorován významný rozdíl ve složení mastných kyselin, kromě obsahu gama-linolenové kyseliny. V ostatních produktech, získaných zpracováním semene, byly naměřeny stejné dominantní mastné kyseliny jako v konopných olejích. Zjištěný poměr analyzovaných omega-6 a omega-3 mastných kyselin byl 3,8:1.

Signifikantní obsah fytoKANABINOIDŮ byl naměřen v konopných produktech obsahujících listy a květy konopí. Nejvyšší hodnota obsahu látek ze skupiny tetrahydroKANABINOLŮ byla naměřena v produktu Bio konopný čaj: Výběr z palic Hempoint ( $0,31 \pm 0,02 \%$ ).

Parametry hodnotící kvalitu olejů a tuků se lišily v jednotlivých výrobcích konopného oleje a také podle jejich stáří. Zvýšená hodnota peroxidového čísla odpovídala nízké oxidační stabilitě konopných olejů. V případě Bio konopného oleje Wolfberry byla hodnota peroxidového čísla nad limitem metody ( $< 30,0 \mu\text{mol } (\frac{1}{2} \text{ROOH}) \cdot \text{g}^{-1}$ ). Nejvyšší obsah volných mastných kyselin, odpovídající číslu kyselosti, byl naměřen v Bio konopném oleji Hempoint, kterému vypršela expirační doba v čase jeho analýzy. Ve vzorku Bio konopného oleje Hempoint, který expiroval několik měsíců dříve než předchozí vzorek, byl neočekávaně naměřen pětkrát menší obsah volných kyselin. Hodnoty jodového čísla byly srovnatelné pro všechny konopné oleje a potvrzovaly obsah nenasycených mastných kyselin z předešlé GC-MS analýzy. Hodnoty také korespondovaly s publikovanými daty v literatuře.

V konopných produktech byly stanoveny koncentrace hořčíku, fosforu, draslíku, vápníku, manganu, železa, mědi, zinku a selenu metodou ICP-MS. Nejvyšší obsah minerálních látek byl průměrně naměřen v konopném proteinovém izolátu, který se získává mechanickým zpracováním výlisků semen. Nejnižší obsah byl naměřen v konopných olejích a některé koncentrace prvků byly pod limitem detekce. Minerální látky jsou tedy nejvíce obsaženy v odtučněném podílu semene. Vápník, železo, mangan a měď jsou také ve významném množství zastoupeny ve slupkách semene.

Konopné potravinové výrobky mají vysokou nutriční hodnotu. Konopná semena jsou významným zdrojem esenciálních aminokyselin a minerálních látek. Konopné oleje lisované za studena obsahují nízké množství nasycených mastných kyselin a mají specifický obsah esenciálních polynenasycených mastných kyselin omega-6 a omega-3. Během konzumace konopného oleje je důležité dbát na skladovací podmínky z důvodu jeho náchylnosti k oxidaci. Konopný proteinový izolát, získán z odtučněných semen, obsahuje téměř 50 % bílkovin a může sloužit jako zdraví prospěšný doplněk stravy. Vhodný je zejména při alternativním stravování pro doplnění esenciálních aminokyselin v kombinaci s dalšími rostlinnými případně živočišnými zdroji bílkovin.

## 7 LITERATURA

- Anon. (2007): *Konopí - biomasa pro život*. 1. vydání, Konopa, Chvaleč, Česká republika, 26 stran.
- Anwar F., Latif S., Ashraf M. (2006): Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **83**(4), 323-329.
- Arvanitoyannis I.S., Varzakas T.H., Kiokias S., Labropoulos A.E. (2010): Lipids, Fats, and Oils. In: *Advances in food biochemistry*. 1. vydání, (Yildiz F. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 131-202.
- Association of Official Analytical Chemists International (2002): AOAC Official Method 2001.11 Protein (Crude) in Animal Feed, Forage (Plant Tissue), Grain, and Oilseeds. Zdroj: <https://edoc.site/4211-aoac-official-method-200111-protein-crude-in-animal-feed-pdf-free.html> (9.3.2019).
- Atherton P.J., Smith K., Etheridge T., Rankin D., Rennie M.J. (2010): Distinct anabolic signalling responses to amino acids in C2C12 skeletal muscle cells. *Amino Acids* **38**, 1533-1539.
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P. (2009): *Food Chemistry*. 4. vydání, Springer Science & Business Media, Berlín, Německo, 1070 stran.
- Benatti P., Peluso G., Nicolai R., Calvani M. (2004): Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *Journal of the American College of Nutrition* **23**, 281-302.
- Béres T., Černochová L., Zeljković S. Ć., Benická S., Gucký T., Berčák M., Tarkowski P. (2019): Intralaboratory comparison of analytical methods for quantification of major phytocannabinoids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-11.
- Burdge G. C. (2006): Metabolism of  $\alpha$ -linolenic acid in humans. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* **75**, 161-168.
- Callaway J.C., Tennilä T., Pate D.W. (1997): Occurrence of “omega-3” stearidonic acid (*cis*-6,9,12,15-octadecatetraenoic acid) in hemp (*Cannabis sativa* L.) seed. *Journal of the International Hemp Association* **3**, 61–63.
- Callaway J. C. (2004): Hempseed as a nutritional resource: an overview. *Euphytica* **140**, 65-72.
- Callaway J. C., Pate D. W. (2009): Hempseed oil. In: *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*. 1. vydání, (Moreau R., Kamal-Eldin A. eds.), AOCS Press, Urbana, Illinois, USA, 185-213.
- Carvalho A. P., Malcata F. X. (2005): Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies. *Journal of agricultural and food chemistry* **53**, 5049-5059.
- Celní správa České republiky (2018): <https://www.celnisprava.cz/cz/clo/spolecne-zemedelske-politiky-a-zvlastnich-kompetenci/Documents/Data%20o%20p%C4%9Bstov%C3%A1n%C3%AD%20konop%C3%AD%20do%20C5%99%C3%ADjna%202018.pdf> (12.12.2018).
- Citti C., Braghiroli D., Vandelli M. A., Cannazza G. (2018): Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: a critical review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **147**, 565-579.
- ČSN EN ISO 3960 (58 8765) (2017): *Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení peroxidového čísla - Jodometrické (vizuální) stanovení koncového bodu*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika, 24 stran.
- ČSN EN ISO 3961 (58 8761) (2015): *Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení jodového čísla*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika, 16 stran.
- ČSN EN ISO 660 (58 8756) (2015): *Živočišné a rostlinné tuky a oleje - Stanovení čísla kyselosti a kyselosti*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha, Česká republika, 16 stran.
- Das U. N. (2006a): Essential fatty acids-a review. *Current pharmaceutical biotechnology* **7**, 467-482.
- Das U. N. (2006b): Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology* **1**, 420-439.



- De Backer B., Debrus B., Lebrun P., Theunis L., Dubois N., Decock L., Verstraete A., Hubert P., Charlier, C. (2009): Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B* **877**, 4115-4124.
- deMan J. M. (1999): Chemical and physical properties of fatty acids. In: *Fatty acids in foods and their health implications*. 2. vydání, (Chow Ch.K. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 17-45.
- Desanlis F., Cerruti N., Warner P. (2013): Hemp Agronomics and Cultivation. In: *Hemp: industrial production and uses*. 1. vydání, (Bouloc P., Allegret S., Laurent A. eds.), CABI, Wallingford, Velká Británie, 98-124.
- Dimić E., Romanić R., Vujasinović, V. (2009): Essential fatty acids, nutritive value and oxidative stability of cold pressed hempseed (*Cannabis sativa* L.) oil from different varieties. *Acta alimentaria* **38**, 229-236.
- Dobson G. (2008): Analysis of Fatty Acids in Functional Foods with Emphasis on  $\omega$ 3 Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid. In: *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*. 2. vydání, (Hurst W.J. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 85-146.
- Doughman S. D., Krupanidhi S., Sanjeevi C. B. (2007): Omega-3 fatty acids for nutrition and medicine: considering microalgae oil as a vegetarian source of EPA and DHA. *Current diabetes reviews* **3**, 198-203.
- Euritmic Grup: [http://www.euritmicgrup.ro/UserFiles/File/PDF-uri%20produse/203\\_en\\_FOSS%20-%20Kjeldahl.pdf](http://www.euritmicgrup.ro/UserFiles/File/PDF-uri%20produse/203_en_FOSS%20-%20Kjeldahl.pdf) (10.3.2019).
- European Commission (1998): Commission directive 98/64/EC of 3 September 1998 establishing community methods of analysis for the determination of amino acids, crude oils and fats, and olaquinox in feeding stuffs and amending directive 71/393/EEC. *Official Journal of the European Communities* **257**, 14-28.
- Foss Analytical: <https://www.myfoss.com/en/kjeltec> (10.3.2019).
- Frega N., Mozzon M., Lercker G. (1999): Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, 325-329.
- Glew R. H., VanderJagt D. J., Lockett C., Grivetti L. E., Smith G. C., Pastuszyn A., Millson M. (1997): Amino acid, fatty acid, and mineral composition of 24 indigenous plants of Burkina Faso. *Journal of food composition and analysis* **10**, 205-217.
- Gorissen S.H., Horstma A.M., Franssen R., Kouw I.W., Wall B.T., Burd N.A., de Groot L.C., van Loon L.J. (2017): Habituation to low or high protein intake does not modulate basal or postprandial muscle protein synthesis rates: a randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* **105**, 332-342.
- Gorissen S. H., Crombag J. J., Senden J. M., Waterval W. H., Bierau J., Verdijk L. B., van Loon L. J. (2018): Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates. *Amino acids* **50**, 1685-1695.
- Gregory III J.F. (2007). Vitamins. In: *Fennema's food chemistry*. 4. vydání, (Damodaran S., Parkin K. L., Fennema O.R. eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 439-522.
- Han J.M., Jeong S.J., Park M.C., Kim G., Kwon N.H., Kim H.K., Ha S.H., Ryu S.H., Kim S. (2012): Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* **149**, 410-424.
- Hirs C. W. (1967): Performic acid oxidation. *Methods in enzymology* **11**, 197-199.
- Hospodářské noviny (2009): <https://byznys.ihned.cz/c1-38178210-zajem-o-technicke-konopiroste-cesi-ho-vsak-seji-stale-mene> (18.12.2018).
- House J. D., Neufeld, J., Leson G. (2010): Evaluating the quality of protein from hemp seed (*Cannabis sativa* L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**, 11801-11807.
- Hughes C. L., Dhiman T. R. (2002): Dietary compounds in relation to dietary diversity and human health. *Journal of medicinal food* **5**, 51-68.
- Hugli T. E., Moore S. (1972): Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 2828-2834.

- Chabbert B., Kurek B., Beherec O. (2013): Physiology and Botany of Industrial Hemp. In: *Hemp: industrial production and uses*. 1. vydání, (Bouloc P., Allegret S., Laurent A. eds.), CABI, Wallingford, Velká Británie, 27-47.
- Jarošová M., MilDe D., Kuba M. (2014): Elemental analysis of coffee: a comparison of ICP-MS and AAS methods. *Czech Journal of Food Sciences* **32**, 354-359.
- Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation (1985): *In Energy and protein requirements*. World Health Organization, Geneva, Švýcarsko, 206 stran.
- Karupaiah T., Sundram, K. (2007): Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications. *Nutrition & metabolism* **4**, 16.
- Krist S., Stuebiger G., Bail S., Unterweger H. (2006): Analysis of volatile compounds and triacylglycerol composition of fatty seed oil gained from flax and false flax. *European journal of lipid science and technology* **108**, 48-60.
- Kritikos N, Tsantilli-Kakoilidou A., Loukas Y.L., Dotsikas Y (2015): Liquid chromatography coupled to quadrupole-time of flight tandemmass spectrometry based quantitative structure–retentionrelationships of amino acid analogues derivatized via n-propylchloroformate mediated reaction. *Journal of Chromatography A* **1403**, 70-80.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**, 680.
- Laplante M., Sabatini D.M (2012): mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274-293.
- Malomo S. A., Aluko R. E. (2015): A comparative study of the structural and functional properties of isolated hemp seed (*Cannabis sativa* L.) albumin and globulin fractions. *Food Hydrocolloids* **43**, 743-752.
- Mamone G., Picariello G., Ramondo A., Nicolai M. A., Ferranti P. (2019): Production, digestibility and allergenicity of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolates. *Food Research International* **115**, 562-571.
- Matthäus B., Schumann E., Brühl L., Kriese U. (2006): Hempseed oil-influence of the genotype on the composition in a two-year study. *Journal of Industrial Hemp* **10**, 45-65.
- Matthäus B., Brühl L. (2008): Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *European Journal of Lipid Science and Technology* **110**, 655-661.
- Mattila P., Mäkinen S., Eurola M., Jalava T., Pihlava J. M., Hellström J., Pihlanto A. (2018): Nutritional Value of Commercial Protein-Rich Plant Products. *Plant Foods for Human Nutrition* **73**, 108-115.
- Mihaljevič M., Strnad L., Šebek, O. (2004): Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii. *Chemické listy* **98**, 123-130.
- Miller D.D. (2007). Minerals. In: *Fennema's food chemistry*. 4. vydání, (Damodaran S., Parkin K. L., Fennema O.R. eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 523-570.
- Mills C. E., Hall W. L., Berry S. E. E. (2017): What are interesterified fats and should we be worried about them in our diet?. *Nutrition bulletin* **42**, 153-158.
- Miovský M. a kolektiv (2008): *Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium*. 1. vydání, Grada Publishing a.s., Praha, 548 stran.
- O'Keefe S.F. (2002): Nomenclature and Classification of Lipids. In: *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. 2. vydání, (Akoh C. C., Min D. B. eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1-40.
- Oomah B. D., Busson M., Godfrey D. V., Drover J. C. (2002): Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food chemistry* **76**, 33-43.
- Owusu-Apenten R. (2002): *Food Protein Analysis: Quantitative Effects On Processing*. 1. vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 488 stran.
- Parker T. D., Adams D. A., Zhou K., Harris M., Yu, L. (2003): Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of food science* **68**, 1240-1243.
- Pickering M., Newton P. (1990): Amino acid hydrolysis: Old problems, new solutions. *Lc Gc* **8**, 778-781.

- Pojić M., Mišan A., Sakač M., Hadnadev T.D., Šarić B., Milovanović I., Hadnadev M. (2014): Characterization of Byproducts Originating from Hemp Oil processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 12436-12442.
- Poustková I., Babička L., Kouřimská L., Siegrová G., Staruch L. (2010): Quality of hemp seed oil depending on its obtaining. *Potravinářstvo Slovak Journal of Food Sciences* **4**, 53-57.
- Raikos V., Duthie G., Ranawana V. (2015): Denaturation and oxidative stability of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) Protein isolate as affected by heat treatment. *Plant foods for human nutrition* **70**, 304-309.
- Ruman M., Klvaňova L. (2008): *Konopí: staronový přítel člověka*. 1.vydání, Konopa, Chvaleč, Česká republika, 31 stran.
- Ruman M. (2014): *Cannabis - konopí: průvodce světem univerzální rostliny*. 1. vydání, Malý princ, Praha, Česká republika, 311 stran.
- Saxton R.A., Knockenhauer K.E., Rachel L. Wolfson R.L., Chantranupong L., Pacold M.E., Wang T., Schwartz T.U., Sabatini D.M (2016): Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science* **351**, 53-58.
- Siger A., Nogala-Kalucka M., Lampart-Szczapa E. (2008): The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids* **15**, 137-149.
- Simopoulos A. P. (1991): Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American journal of clinical nutrition* **54**, 438-463.
- Simopoulos A. P. (2006): Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & pharmacotherapy* **60**, 502-507.
- Singh S., Gamlath S., Wakeling L. (2007): Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science & Technology* **42**, 916-929.
- Stoffel W., Holz B., Jenke B., Binczek E., Günter R. H., Kiss C., Karakesisoglou I., Thevis M., Weber A.-A., Arnhold S., Addicks K. (2008):  $\Delta 6$ -Desaturase (FADS2) deficiency unveils the role of  $\omega 3$ - and  $\omega 6$ -polyunsaturated fatty acids. *The EMBO journal* **27**, 2281-2292.
- Tang B., Row K. H. (2013): Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. *Journal of chromatographic science* **51**, 599-607.
- Thomas R. (2013): *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. 3.vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 446 stran.
- United States Pharmacopeia (2018): *US Pharmacopeia's Food Fraud Database* (<https://www.foodfraud.org/>).
- Van Sant M.J. (1997): Gas Chromatography. In: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 1. vydání, (Settle F.A. ed.), Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey, USA, 125-146.
- Velišek J., Hajšlová J. (2009): *Chemie potravin I*. 3. vydání, OSSIS, Tábor, Česká republika, 602 stran.
- Volpi E., Kobayashi H., Sheffield-Moore M., Mittendorfer B., Wolfe R. (2003): Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *American Society for Clinical Nutrition* **78**, 250-258.
- Vyhláška č. 90/2000 Sb. Ministerstva zemědělství: Vyhláška Ministerstva zemědělství, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 328/1997 Sb., kterou se provádí §18 písm. a), d), h), i), j) a k) zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů, pro mléko a mléčné výrobky, zmrzliny a mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Zdroj: <http://www.sagit.cz/info/sb00090> (9.3.2019).
- Vyhláška č. 397/2016 Sb. Ministerstva zemědělství: Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Zdroj: [https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=397/2016&typeLaw=zakon&what=Cislo\\_zakona\\_smlouvy](https://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=397/2016&typeLaw=zakon&what=Cislo_zakona_smlouvy) (9.3.2019).
- Wang X. S., Tang C. H., Yang X. Q., Gao W. R. (2008): Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chemistry* **107** 11-18.
- WHO & FAO Joint Expert Consultation Report (1995): Fats and oils in human nutrition. *Nutrition Reviews* **53**, 202-205.

- WHO/FAO/UNU Expert Consultation (2007): Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organization Technical Report Series* **935**, 1–265.
- Wu S.L., Feng X.B., Wittmeier A. (1997): Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **12**, 797–806.
- Würfels M., Jackwerth E. (1985): Investigations on the carbon balance in decomposition of biological materials with nitric acid. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **322**, 345-358.
- Würfels M., Jackwerth E., Stoeppler M. (1989): Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid: Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. *Analytica Chimica Acta* **226**, 1-16.
- Yalcin H., Konca Y., Durmuscelebi F. (2018): Effect of dietary supplementation of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) on meat quality and egg fatty acid composition of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of animal physiology and animal nutrition* **102**, 131-141.
- Yildiz F. (2010): Amino acids, Oligopeptides, Polypeptides, and Proteins. In: *Advances in food biochemistry*. 1. vydání, (Yildiz F. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 51-100.
- Zakon č. 273/2013 Sb.: *ZÁKON ze dne 22. srpna 2013, kterým se mění zákon č. 167/1998 Sb., o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a některé další zákony*. Sbirka zákonů České republiky, Ročník 2013, 2925-2939.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

$\Delta 8$ -THC	$\Delta 8$ -tetrahydrokanabinol
$\Delta 9$ -THC	$\Delta 9$ -tetrahydrokanabinol
AA	Akrylamid
BIS	Bisakrylamid
CBD	Kanabidiol
CBDA	Kyselina kanabidiolová
CBN	Kanabinol
Da (kDa)	Dalton (kilodalton)
GC	Plynová chromatografie
EI	Electron impact
ESI	Ionizace elektrosprejem
ET-AAS	Atomová absorpční spektrometrie v režimu elektrotermické atomizace
FID	Plamenový ionizační detektor
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	Optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
LC	Kapalinová chromatografie
$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	Mol na litr
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
TOR	Target of rapamycin
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PDCAAS	Protein digestibility-corrected amino acids score
SDS	Dodecyl síran sodný
SIM	Single ion monitoring
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
THC	Tetrahydrokanabinol
THCA	Kyselina tetrahydrokanabinolová
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UHPLC	Ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie

UPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
v/v	Objem na objem
w/v	Hmotnost na objem