

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Kvalitativní vlastnosti konopných olejů v závislosti na
způsobu výroby**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Eliška Dvořáková

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci Kvalitativní vlastnosti konopných olejů v závislosti na způsobu výroby, jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 25.6.2020

Poděkování

Největší poděkování patří především vedoucí mé práce Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D. za poskytnutou odbornou pomoc, věnovaný čas, trpělivost a nové dovednosti, které jsem se díky této práci mohla naučit. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Tomáši Skalovi, Ing. Petrovi Hraběti, Ph.D. a Ing. Čestmíru Mizerovi, Ph.D. za pomoc s extrakcemi olejů. V neposlední řadě děkuji rodině a přátelům za veškerou podporu.

Kvalitativní vlastnosti konopných olejů v závislosti na způsobu výroby

Souhrn

Diplomová práce porovnávala výtěžnost a kvalitu konopných olejů vyrobených různými šetrnými metodami. Literární rešerše se zaměřila na popis konopného oleje a na vybrané metody výroby rostlinných olejů. V experimentální části byly získány konopné oleje z pěti odrůd konopí – lisováním, extrakcí dimethyl etherem (DME) a superkritickou fluidní extrakcí (SFE). V olejích byl identifikován obsah tokoferolů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem a také obsah mastných kyselin pomocí plynové chromatografie. Dále bylo provedeno titrační stanovení čísla kyselosti olejů a subjektivně pomocí zraku porovnána barva olejů. Oleje získané extrakcí DME obsahovaly nejvíce tokoferolů ($848,76 \pm 14,83$ mg/kg), nízké číslo kyselosti ($1,18 \pm 0,13$ mg KOH/g), neobsahovaly trans nenasycené mastné kyseliny, měly tmavě zelenou barvu a výtěžnost dosáhla na průměrnou hodnotu $23,84 \pm 7,48$ %. Lisované oleje byly hodně světlé, obsahovaly dobré množství tokoferolů ($650,21 \pm 268,73$ mg/kg), nízké číslo kyselosti ($0,76 \pm 0,29$ mg KOH/g), ale výtěžnost byla pouze $9,26 \pm 1,98$ %. Oleje získané SFE obsahovaly nízké množství tokoferolů ($458 \pm 199,14$ mg/kg), nejvyšší číslo kyselosti ($4,24 \pm 0,61$ mg KOH/g), všechny obsahovaly trans nenasycené mastné kyseliny, měly velmi světlou barvu a výtěžnost této metody byla jen $4,96 \pm 1,21$ %. Z výsledků tedy vyplynulo, že způsob výroby ovlivnil výtěžnost i kvalitu konopných olejů, jako nejlepší metoda se osvědčila extrakce dimethyl etherem.

Klíčová slova: konopný olej, dimethyl ether, lisování, superkritická fluidní extrakce

Influence of extraction techniques on qualitative properties of hemp oil

Summary

The diploma thesis compared the yield and quality of hemp seed oils produced by various eco-friendly methods. Literary research was focused on the description of hemp seed oil and selected methods of vegetable oils production. In the experimental part, hemp seed oils from five varieties of cannabis were obtained – by pressing, dimethyl ether (DME) extraction and supercritical fluid extraction (SFE). The content of tocopherols in oils was determined by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector and the content of fatty acids by gas chromatography. Then the acid value of the oils was determined by titration and the color of the oils was compared visually. The oils obtained by DME extraction contained the most tocopherols (848.76 ± 14.83 mg/kg), low acid value (1.18 ± 0.13 mg KOH/g), no trans unsaturated fatty acids, were of dark green color and the average yield was 23.84 ± 7.48 %. The pressed oils were very bright with a good amount of tocopherols (650.21 ± 268.73 mg/kg), low acid value (0.76 ± 0.29 mg KOH/g), but the yield was only 9.26 ± 1.98 %. The oils obtained by SFE contained a low amount of tocopherols (458 ± 199.14 mg/kg), the highest acid value (4.24 ± 0.61 mg KOH/g), trans unsaturated fatty acids and a their color was very light. Moreover yield of this method was only 4.96 ± 1.21 %. The results showed that the production method influenced the yield and quality of hemp seed oils, dimethyl ether extraction proved to be the best method.

Keywords: hemp seed oil, dimethyl ether, pressing, supercritical fluid extraction

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl a hypotéza práce	2
3. Literární rešerše.....	3
3.1 Konopí seté.....	3
3.1.1 Botanická charakteristika konopí	3
3.2 Konopná semena.....	4
3.2.1 Využití konopných semen	4
3.3 Konopný olej	6
3.3.1 Vlastnosti konopného oleje.....	6
3.3.2 Využití konopného oleje.....	8
3.4 Složení konopného oleje.....	9
3.4.1 Mastné kyseliny	9
3.4.2 Fytosteroly	10
3.4.3 Těkavé látky	10
3.4.4 Chlorofyly.....	10
3.4.5 Karotenoidy	10
3.4.6 Polyfenoly.....	11
3.4.7 Methylosalicylát	11
3.4.8 Kanabinoidy.....	11
3.4.9 Vitamin E.....	12
3.5 Výroba konopného oleje.....	13
3.5.1 Příprava semen	14
3.5.2 Lisování	14
3.5.3 Extrakce rozpouštědlem.....	15
3.5.4 Superkritická fluidní extrakce.....	17
3.6 Vliv způsobu získávání oleje na jeho kvalitu	19
4. Materiál a metody	21
4.1 Konopná semena.....	21
4.2 Výroba olejů	21
4.2.1 Lisování za studena.....	21
4.2.2 Extrakce dimethyl etherem	21
4.2.3 Extrakce superkritickým oxidem uhličitým.....	23
4.3 Stanovení obsahu tokoferolů	23
4.3.1 Příprava vzorků.....	23

4.3.2	Analýza	23
4.3.3	Identifikace látek	23
4.4	Stanovení mastných kyselin	24
4.4.1	Derivatizace mastných kyseliny	24
4.4.2	Analýza	25
4.4.3	Identifikace látek	25
4.5	Stanovení sušiny	25
4.6	Stanovení čísla kyselosti	25
4.7	Statistické zpracování dat	26
5.	Výsledky	27
5.1	Výtěžnost oleje	27
5.2	Číslo kyselosti (ČK)	28
5.3	Obsah tokoferolů	29
5.4	Mastné kyseliny	36
5.5	Barva olejů	43
6.	Diskuze	44
6.1	Výtěžnost olejů	44
6.2	Obsah tokoferolů	45
6.3	Mastné kyseliny	45
6.4	Barva	46
6.5	Číslo kyselosti (ČK)	46
7.	Závěr	48
8.	Literatura	49
9.	Seznam grafů, obrázků a tabulek	58

1. Úvod

Konopná semena a produkty z nich jsou v některých částech světa využívány již tisíce let, ale celosvětově se jejich oblíbenost zvyšuje až v posledních letech. Pěstování, zpracování i distribuce průmyslového konopí jsou vysoce regulované a vyžadují licenci. Díky liberalizaci právních předpisů tak v současné době roste výroba i spotřeba konopných produktů a do budoucna se nadále očekává další nárůst (Market Research Report 2020).

Konopný olej se rychle dostal do povědomí lidí díky svému unikátnímu složení a všestrannému využití. Nejčastěji je získáván lisováním za studena a extrakcí rozpouštědlem, zejména petroletherem. Lisování umožňuje získat oleje vyšší kvality, ale s nižší výtěžností. Extrakce rozpouštědlem je zase relativně levná a účinná metoda, ale je spojena s přítomností toxického zbytku v olejích a ty tak vyžadují další úpravu. Trendem ve výrobě jsou tedy ekologické metody bez použití toxických rozpouštědel, které zajišťují vysokou výtěžnost i kvalitu oleje a které snižují náklady i vznik odpadu při výrobě. Mezi takové patří superkritická fluidní extrakce, kde je nahrazeno organické rozpouštědlo netoxickou, levnou, nehořlavou a recyklovatelnou alternativou, která lze snadno odstranit z oleje (např. oxid uhličitý, voda). Takové oleje se často využívají v kosmetice a nesmí se rafinovat. Další inovativní metodou je extrakce dimethyl etherem, který má spoustu příznivých vlastností a je proto vhodný jako náhrada za běžně používaná rozpouštědla. Nadále se zkoumají i další metody, které by byly co nejvíce vhodné pro extrakci rostlinných olejů (Aiello et al. 2020; Sakuragi et al. 2016; Sapkale et al. 2010).

2. Cíl a hypotéza práce

Cílem práce bylo porovnat kvalitativní parametry konopných olejů získaných různými extrakčními technikami.

Hypotéza: Způsob extrakce konopných semen má vliv na výtěžnost a výslednou kvalitu konopného oleje.

3. Literární řešerše

3.1 Konopí seté

Konopí seté (*Cannabis sativa L.*) je nejrozšířenějším druhem konopí, které může být plané i člověkem pěstované (Mioviský 2011). Původem je to asijská rostlina, která byla využívána již před 10 000lety. V dnešní době je konopí pěstováno ve více než 30 zemích světa a významná část produkce pochází zejména z Číny, Kanady a Francie (Thomas & Elsohly 2016). Konopí se využívá především v potravinářství, farmacii, kosmetice a pro výrobu tkanin a papíru z lýkových vláken (Callaway 2004).

3.1.1 Botanická charakteristika konopí

Konopí je jednoletá dvoudomá i jednodomá rostlina z čeledi konopovité (*Cannabaceae*), která roste ze semen na otevřených slunných místech. Dosahuje výšky až 5 metrů v průběhu šestiměsíčního růstu (Honzík et al. 2012; Mioviský 2011; Fišar 2006). Samčí rostliny jsou vyšší a štíhlejší, mají světlejší listy a šedo zelený vrchol. Dozrávají až o 6 týdnů dříve než samičí rostliny. Samičí rostliny jsou naopak nižší a silnější, mají více listů a tmavší barvu. U dvoudomého porostu je přibližně 53 % samčích a 47 % samičích rostlin. U jednodomých odrůd se samčí rostliny vyskytují zřídka a jejich výskyt se zvyšuje s klesajícím stupněm množení osiva (Honzík et al. 2012). Květenství samčích rostlin je žlutozelené barvy a je seskupeno v latách na dlouhých stopkách. Během kvetení (20-25 dní) vytvářejí velké množství pylu, které vítr dokáže roznést až 12 km daleko. Samičí květy bývají v horní části rostliny, kde vytvářejí hustě olistěné krátké složité hrozny (Mioviský 2011).

Hlavní křlový kořen roste obvykle do hloubky 30–40 cm, na minerálních půdách s nízkou hladinou spodní vody prorůstá až do hloubky 2 m. Stonek je přímá asi 3–60 mm silná lodyha. Mladý stonek je kulatý, dužnatý, vyplněný dřevovitým pletivem. Zelená barva stonku v období plného vegetačního růstu přechází v plné zralosti do citronově zelené, stonek dřevnatí a při přezrání začíná vlivem povětrnostních podmínek hnědnout. Podle druhu konopí bývá většinou šestihranný nebo čtyřhranný, ale v dolní části zůstává kulatý. V lýkové části je 14-19 % vláknů, které zvyšuje pevnost stonku (Mioviský 2011). Listy jsou dlanitě dělené 3–13 čtené, mají kopinatý tvar a pilovitý okraj s krátkými řapíky (Honzík et al. 2012; Mioviský 2011). Konopná semena jsou popsána v následující kapitole.

3.2 Konopná semena

Plodem konopí jsou jednosemenné vejčité nažky (semena), které mohou být šedozelené, tmavě hnědé až černé s jemným mramorováním (Honzík et al. 2012; Miovský 2011). Semena mají malý obsah endospermu a velký podkovitě stočený klíček. Jejich velikost je závislá na odrůdě, ale průměrně jsou semena 2-5 mm dlouhá, 2-4 mm široká a s tloušťkou 2,3-3,8 mm (Miovský 2011).

Obsahují 20-25 % bílkovin, zejména edestin, který tvoří 60-80 % všech bílkovin, přičemž zbytek tvoří albumin (Callaway & Pate 2008). Jsou to bílkoviny bohaté na aminokyseliny, hlavně na methionin, cystein, arginin a kyselinu glutamovou (Taheri-Garavand et al. 2010; Callaway 2004). Konopná semena neobsahují lepek a koncentrace antinutričních látek jako je kyselina fytová, kondenzované taniny a inhibitory trypsinu, je u nich velmi nízká (Russo & Reggiani 2015; Callaway & Pate 2008).

Semena dále obsahují 20-30 % sacharidů, 25-35 % oleje a 10-15 % nerozpustné vlákniny a velké množství minerálů (Taheri-Garavand et al. 2010; Callaway 2004). Zastoupení jednotlivých minerálů a vitamínů je uvedeno v tabulce 1. Množství oleje v semenech závisí na odrůdě, klimatických podmínkách, místě pěstování, technice a době sklizně a dalších faktorech (Matthäus & Brühl 2008). U konopí probíhá sklizeň, když jsou semena v prostřední třetině květenství ve voskové zralosti a na vrcholku zelená nebo když jsou semena v dolní polovině květenství v plné zralosti (Meiner & Mediavilla 1998).



Obrázek 1: Konopná semena (westworld.com)

3.2.1 Využití konopných semen

Semena konopí jsou v lidské výživě využívána po tisíce let. Syrová, vařená, pečená a olej z nich vyrobený, se v Číně využívají jako potravinu i lék již 3000 let a dodnes se zde také prodávají pražená semena jako občerstvení pouličními prodejci. Konopná semena jsou dlouho používána jako potravinu a krmivo pro zvířata i ve zbytku Asie, ve východní Evropě a Kanadě.

V Rusku byl lisovaný konopný olej ze semen používán jako náhrada za dražší a méně zdravé tuky. V Lotyšsku jsou konopná semena součástí místní kuchyně a používají se pro některé tradiční pokrmy jako je např. konopné máslo (Callaway 2004). Ve střední a jižní Evropě byla dříve konopná semena hlavně vedlejším produktem pěstovaného konopí (Carus 2017).

Produkce semen se v současné době zvyšuje, mezi lety 2010 a 2013 se v Evropě zvýšila ze 6000 tun na 11500 tun, což bylo způsobeno rostoucí poptávkou na trhu s potravinami. V Evropské unii bylo v roce 2015 vyprodukováno 11500 tun konopných semen a dalších 10000 tun bylo dovezeno, zejména z Číny (Carus 2017).

Tabulka 1: Typické nutriční hodnoty (mg/100 g) pro vitamíny a minerály v konopných semenech – odrůda Finola (Callaway & Pate 2010)

Fosfor	1160
Draslík	859
Hořčík	483
Vápník	145
Vitamin E	90
Železo	14
Sodík	12
Mangan	7
Zinek	7
Měď	2
Thiamin (B1)	0,4
Riboflavin (B2)	0,2

Většina konopných semen se používá v neloupaném stavu, což jsou nejméně zpracovaná a tím i nejlevnější konopná semena, a to hlavně (až 72 %) jako krmivo pro zvířata (ptáci, ryby) a pro výrobu konopného oleje. Naproti tomu loupaná semena se využívají hlavně pro výživu lidí a jen minimálně pro zvířata (Carus et al. 2013).

3.2.1.1 Konopný olej

Nejdražším produktem z konopných semen je konopný olej (Carus et al. 2013). Konopný olej se vyrábí z čerstvých a dobře vyčištěných semen, která byla sušena na vzduchu při teplotě nižší než 25°C po dobu několika dnů až týdnů, kdy dojde k poklesu vlhkosti z původních

15-25 % na méně než 10 %. Po sušení je potřeba zkontrolovat, zda nedošlo k rozvoji plísní, které mohou způsobovat ostrý zápach oleje po rybách a amoniaku. Semena mohou také získávat nežádoucí pachů a zápach v důsledku oxidace, proto by měl být konopný olej lisovaný ze semen starých maximálně jeden rok. Správná příprava semen je důležitým předpokladem pro výslednou kvalitu oleje (Callaway & Pate 2008).

Pokud nebude olej vyrobený z kvalitních semen, může dojít k oxidaci a skladovatelnost oleje tak může být relativně krátká, v nejlepším případě pouze několik měsíců. Semena by se měla skladovat při optimální teplotě -4 až 15 °C a v inertní atmosféře. Tuto atmosféru je vhodné dodržovat po celou dobu zpracování semen až do plnění lahví olejem a jejich uzavření. V praxi se však konopná semena v inertní atmosféře neskladují. Velmi nízké teploty skladování také nejsou moc často využívány, kvůli vysokým nákladům na zařízení a údržbu (Suriyong et al. 2015; Callaway & Pate 2008).

3.3 Konopný olej

3.3.1 Vlastnosti konopného oleje

3.3.1.1 Chut'

Čerstvý za studena lisovaný konopný olej z kvalitních semen obsahuje kombinaci chutí citrusů, máty a pepře, ale velice často může mít i oříškovou až lehce trávovou chuť (Morar et al. 2010; Callaway & Pate 2008). Tyto složky se mohou lišit podle odrůdy a podmínek pěstování. Největší vliv má především sušení semen a jejich skladování. Chuť oleje je výsledkem těkavých terpenů, proto rychlé sušení při zvýšených teplotách (nad 25°C) vede ke ztrátě typické chuti (Callaway & Pate 2008).

3.3.1.2 Barva

Barva konopného oleje bývá tmavě zelená až světle olivová v závislosti na různých podmínkách lisování (např. různá teplota). Čerstvý za studena lisovaný olej bývá jasně zelený až tmavě zelený. Starší za studena lisovaný olej je olivově zelený až žlutý a rafinovaný olej je zpravidla bezbarvý až světle žlutý (WVFC 2014; Morar et al. 2010). Olej lisovaný za studena bývá tmavší než olej extrahovaný rozpouštědlem, což může být způsobeno intenzivní mechanickou destrukcí buněk konopných semen a destrukcí chloroplastů (Hannides et al. 2014).

3.3.1.3 *Vliv teploty*

Bod tuhnutí označuje hodnotu, kdy se snižuje viskozita a olej přestává téct. Bod tuhnutí konopného oleje je $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Callaway & Pate 2008). Bod zakouření označuje hodnotu, kdy se olej začne přepalovat. Konopný olej má bod zakouření při $165\text{ }^{\circ}\text{C}$, ale lze ho zahřívat až na teplotu $246\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu maximálně 30 minut. Do této teploty se nezvyšuje množství trans mastných kyselin, pokud se dodrží krátká doba zahřívání. Při několikahodinovém zahřívání konopného oleje na teplotu $200\text{-}220\text{ }^{\circ}\text{C}$ se však množství trans mastných kyselin zvýší. Teplota $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ již okamžitě zhoršuje kvalitu konopného oleje a vede k tvorbě významného množství trans mastných kyselin (Callaway & Pate 2008; Mölleken 1998).

3.3.1.4 *Kvalitativní ukazatelé*

Pro hodnocení kvality tuků se používá několik metod, které hodnotí různé parametry. Peroxidové číslo stejně jako p-anisidinové a thiobarbiturové, stanovuje stupeň oxidace tuku. Je ukazatelem obsahu primárních oxidačních produktů (peroxy, hydroxyperoxy). Doporučené limity peroxidového čísla pro oleje jsou: méně než 3, když olej opouští továrnu, méně než 5 po otevření lahve a méně než 10 během celého užívání (Popa et al. 2017).

Číslo kyselosti udává obsah volných mastných kyselin a vyjadřuje se jako množství KOH (v mg), které je potřebné k jejich neutralizaci v 1 g tuku. Kvalita olejů klesá s rostoucí hodnotou tohoto čísla, protože právě volné mastné kyseliny ovlivňují vůni, chuť a další vlastnosti oleje (Liang et al. 2015; Callaway & Pate 2008). Obsah volných mastných kyselin v konopném oleji se pohybuje v rozmezí 0-2 % (Liang et al. 2015).

Jodové číslo vyjadřuje nenasycenost oleje. Čím vyšší je hodnota jodového čísla, tím je v tuku větší množství nenasycených mastných kyselin. U tekutých olejů bývá tedy vyšší hodnota než u pevných tuků. Podle Chen et al. (2010), Callaway & Pate (2008) a Anwar et al. (2006) je hodnota jodového čísla konopného oleje obvykle $154\text{-}169\text{ g I}_2\cdot 100\text{ g}^{-1}$.

Číslo zmydlení se vyjadřuje jako množství KOH (v mg), které je potřebné k neutralizaci mastných kyselin a k hydrolyze esterů mastných kyselin v 1 g tuku. U konopného oleje bývá tato hodnota mezi 168 a 193 mg KOH.g⁻¹ (Borhade 2013; Callaway & Pate 2008; Anwar et al. 2006). Jako nezmýdlnitelný podíl se označují doprovodné látky v oleji, které nejdou hydrolyzovat (steroly, vosky, fosfatidy, uhlovodíky, vitaminy...). Nezmýdlnitelný podíl konopného oleje bývá v rozmezí 0,7-2,2 % (Anwar et al. 2006).

3.3.2 Využití konopného oleje

Konopný olej se používá hlavně ve výživě lidí, malá část se využívá v kosmetice a jen minimální podíl připadá ke krmení zvířat (Carus et al. 2013). Celosvětový trh s konopným olejem představuje v roce 2019 4,6 miliard USD a pravděpodobně do roku 2025 bude činit až 26,6 miliard USD (Markets and Markets 2019). Předpokládá se, že se právě díky léčivým přínosům urychlí poptávka po produktech s konopným olejem. V průběhu let se výrobci zaměřili na výzkum a vývoj nových inovativních produktů. Od roku 2008 do roku 2017 přibýlo na světovém trhu 111 výrobků obsahující konopný olej jako účinnou látku (Markets and Markets 2019; Research and Markets 2018).

3.3.2.1 Zdravotní přínosy konopného oleje

Konopný olej je znám pro své výživové a zdraví prospěšné vlastnosti. Ve srovnání s jinými rostlinnými oleji je bohatým zdrojem esenciálních mastných kyselin, obsahuje také významné množství tokoferolů a tokotrienolů, fytosterolů, fosfolipidů, karotenoidů, chlorofylu a minerálů (Liang 2017; Mikulcová 2017). Jeho zdravotní přínosy jsou přisuzovány především jeho žádoucím poměru omega-3 a omega-6 mastných kyselin 3:1, který je považován za optimální pro lidskou výživu (Callaway 2004). Tyto kyseliny a jejich metabolické produkty jsou pro život nezbytné, tělo je samo nedokáže produkovat a jsou důležité pro zrání mozku, pomáhají zmírňovat projevy revmatoidní artritidy a alergií (Aladić et al. 2014; Leizer et al. 2000). Konopný olej tak může být náhradou rybího oleje, který obsahuje významné množství omega-3 mastných kyselin (Layton & Reuter 2018). Omega-3 má inhibiční účinek na rakovinu a růst nádorů, snižuje krevní tlak a hladinu cholesterolu v krvi, má pozitivní účinek na metabolismus tuků a zvyšuje celkovou rychlost metabolismu (Aladić et al. 2014). Jejich nedostatek se může podílet na rozvoji vývojových vad a autizmu (Leizer et al. 2000).

3.3.2.2 Využití konopného oleje v kosmetice

Konopný olej nalézá velké využití v kosmetickém průmyslu. Je ideální pro výrobu různých tělových krémů a mýdel díky dobré absorpci kůží. Přípravky s konopným olejem jsou antimikrobiální, protizánětlivé a udržují pH a vlhkost pokožky. Tradiční receptury s obsahem konopného oleje se používají lokálně k léčbě otoků a ekzémů. Konopný olej také zmírňuje projevy atopické dermatitidy a problémy spojené s procesem stárnutí kůže (Aladić et al. 2014; Borhade 2013).

3.4 Složení konopného oleje

3.4.1 Mastné kyseliny

Mastné kyseliny se vyskytují jako volné nebo estericky vázané a jsou z hlediska výživy nejdůležitější složkou lipidů. Obsah mastných kyselin je důležitým kritériem při hodnocení olejů, protože určuje vhodnost oleje pro různé způsoby využití (Matthäus & Brühl 2008).

Konopný olej je mimořádný zdroj polynenasycených mastných kyselin, obsahuje jich přibližně 75-85 % z celkového množství složek oleje (Callaway & Pate 2010). Průměrně obsahuje 11-12 % kyseliny olejové (Montserrat-de la Paz et al. 2014; Kriese et al. 2004; Kovářová et al. 2002). Dále je konopný olej ceněný pro obsah esenciálních mastných kyselin, protože obsahuje asi 55–58 % kyseliny linolové (omega-6), 16–20 % kyseliny α -linolenové (omega-3) a menší množství kyseliny γ -linolenové (omega-6) a kyseliny stearidonové (omega-3) (Bouayoun et al. 2018; Montserrat-de la Paz et al. 2014; Callaway & Pate 2010; Matthäus & Brühl 2008). Obsah jednotlivých mastných kyselin v konopném oleji podle Kovářové et al. (2002) je uvedený v tabulce 2.

Tabulka 2: Zastoupení mastných kyselin v konopném oleji podle Kovářové et al. (2002)

Kyselina linolová	57,25 %
Kyselina linolenová	17,05 %
Kyselina olejová	12,21 %
Kyselina palmitová	6,20 %
Kyselina gama linolenová	3,01 %
Kyselina stearová	2,72 %
Kyselina arachová	0,84 %
Kyselina eikosenová	0,70 %
Kyselina laurová	<0,05 %
Kyselina eruková	<0,05 %
Kyselina myristová	<0,05 %
Kyselina palmitolejová	<0,05 %
Kyselina behenová	<0,05 %

3.4.2 Fytosteroly

Fytosteroly jsou známé jako rostlinné steroly a jsou součástí nezmýdelnitelného podílu tuku. Jsou to látky bezbarvé, tepelně stabilní a snižující LDL-cholesterol v krvi (O'Brien 2004). Konopný olej obsahuje 280 až 670 mg fytosterolů na 100 g oleje. Nejvyššího zastoupení (až 190-349 mg/100 g) dosahuje β -sitosterol, u kterého byly prokázány antivirové a protizánětlivé účinky (Leizer et al. 2000). Další fytosteroly nalezené v konopném oleji jsou kampesterol (73,6 mg/100 g), Δ 5-avenasterol (55,5 mg/100 g) a stigmasterol (13,4 mg/100 g) (Montserrat-de la Paz et al. 2014; Ghazani & Marangoni 2013; Matthäus & Brühl 2008; Vanhanen et al. 2005; Leizer et al. 2000).

3.4.3 Těkavé látky

Pro konopný olej je typický výskyt terpenů, alkenů a alkoholů. V konopném oleji se průměrně vyskytuje 7 seskviterpenů a 11 monoterpenů, které společně tvoří hlavní složky těkavých látek a to podílem 63,34 až 88,99 % (Zhou et al. 2017). Tyto sloučeniny se podílejí na vzniku charakteristické vůně oleje. Nejvyššího zastoupení dosahuje β -karyofylen, dále α -pinen, β -pinen, β -myrcen, limonen, dipenten, linalool a kamfen (Zhou et al. 2017; Leizer et al. 2000).

3.4.4 Chlorofyly

Chlorofyly jsou pigmenty rozpustné v tucích a jsou spolu s jejich deriváty silné prooxidanty. Přítomnost velkého množství chlorofylů činí olej velmi citlivým na fotooxidaci, která mění barvu oleje ze zelené na žlutou (Liang 2017; Matthäus & Brühl 2008). Chlorofyly a další pigmenty se z jedlých olejů obvykle odstraňují procesem bělení (Liang 2017).

Celkový obsah chlorofylů v konopném oleji se může pohybovat od 98,6 μ g/g do 228,79 μ g/g v závislosti na způsobu získávání. Podíl chlorofylu-a může být 59,22-193,50 μ g/g a chlorofylu-b 35,39-39,45 μ g/g (Liang 2017; Teh & Birch 2013).

3.4.5 Karotenoidy

Karotenoidní barviva tvoří především skupinu žlutých, oranžových a červených pigmentů, které doprovázejí chlorofyly v chloroplastech rostlin (Šivel et al. 2013; Douša 2006). Je známo asi 700 přirozeně se vyskytujících karotenoidních pigmentů, z toho 50 sloučenin vykazuje aktivitu vitamínu A, jehož nedostatek vede k šerosleposti (Šivel et al. 2013). V rostlinných olejích se nacházejí dvě skupiny karotenoidů – xantofyly a karoteny (Liang 2017).

V konopném oleji se vyskytují tři hlavní karotenoidy – lutein a zeaxanthin, které patří mezi xantofyly a β -karoten, který patří mezi karoteny. Jejich obsah závisí na odrůdě konopí. Obsah luteinu bývá v rozmezí od 1,5 do 3,4 mg na 100 g oleje. Zeaxanthin se nachází v menším množství, od 0,2 do 0,5 mg na 100 g. Množství β -karotenu může být od 0,2 do 5,34 mg na 100 g oleje (Irakli et al. 2019; Aladić et al. 2014).

3.4.6 Polyfenoly

Polyfenoly jsou známé jako přírodní hydrofilní antioxidanty a antimikrobiální látky, které jsou přítomné ve většině rostlinných olejích (Liang 2017). Celkový obsah těchto látek v konopném oleji se pohybuje v rozmezí 44-188 mg na 100 g oleje (Siger et al. 2008). Hlavní polyfenolovou skupinou v konopném oleji jsou lignany (Irakli et al. 2019).

V konopném oleji jsou dominantními sloučeninami cannabisin (51,1-159,1 mg/100 g), N-trans-caffeoyltyramine (14,8-83,2 mg/100 g), kyselina p-hydrobenzoová (0,006-3 mg/100 g), kyselina protokatechová (0,4-1,6 mg/100 g) a kyselina skořicová (0,2-7,3 mg/100 g). Méně je zastoupená kyselina sinapová (0,003 mg/100 g), kyselina vanilinová (0,002 mg/100 g) a kyselina p-kumarová (0,002 mg/100 g) (Irakli et al. 2019; Siger et al. 2008). Důležitou skupinou polyfenolů jsou flavonoidy, které se v konopném oleji vyskytují přibližně v množství 19,5 mg na 100 g (Teh & Birch, 2013).

3.4.7 Methyلسalicylát

Methyلسalicylát je bezbarvá viskózní kapalina se sladkým zápachem a je pravděpodobně produkována jako ochrana rostlin proti býložravcům. V konopném oleji je přítomen jen ve stopovém množství, má však spoustu prospěšných vlastností. Je to ester, který může být hydrolyzován na kyselinu salicylovou, která je účinnou a běžnou složkou aspirinu a většiny ostatních salicylátů. Farmakologické účinky methyلسalicylátu jsou tedy podobné účinkům aspirinu. Methyلسalicylát je často součástí léků a v nízkých koncentracích (do 0,04 %) se používá také jako ochucovadlo ve žvýkačkách, cukrovinkách a jako antiseptikum v ústních vodách (Bell & Duggin 2002; Leizer et al. 2000).

3.4.8 Kanabinoidy

Kanabinoidy tvoří významnou skupinu biologicky účinných látek konopí (Downer & Campbell 2010). Dva hlavní kanabinoidy produkovány květenstvím konopí jsou delta-9-tetrahydrokanabinol (THC) a kanabidiol (CBD) (Citti et al. 2019). Technické konopí má obsah THC do 0,2 %. Toto množství se v zemích EU nesmí překročit (Saastamoinen et al. 2016). Obsah THC se sleduje kvůli jeho známému farmakologickému a toxikologickému účinku

(Holler et al. 2008). Konopí s obsahem THC nad 0,3 % se užívá pro léčebné účely, jako je léčba chronických bolestí, Parkinsonovy choroby a dalších. Na druhé straně je konopí s vyšším obsahem THC také zneužíváno pro své omamné účinky, většina psychoaktivních účinků konopí pochází z této látky (Appendino et al. 2008).

V konopném oleji se kromě THC a CBD může vyskytovat dalších 30 kanabinoidů (např. CBN, CBG, CBDV, CBDA, THCA) (Citti et al. 2019). Primárně se ale zjišťuje obsah THC, který bývá v rozmezí 0-118 mg na 1 kg oleje (Layton & Reuter 2018; Petrovic et al. 2015). Semena konopí sama o sobě THC neobsahují, ale do konopného oleje se může menší množství dostat během zpracování z pryskyřice (Layton & Reuter 2018; Petrovic et al. 2015; Ruman & Včeláková 2008).

CBD se v konopném oleji obvykle vyskytuje ve stopovém množství, ale i přesto má jeho obsah značný význam. U CBD byl prokázán pozitivní účinek při léčbě epilepsie, neurogenerativních onemocnění, zmírňuje bolest, kožní problémy a pomáhá při úzkosti (Citti et al. 2019; Leizer et al. 2000). Podle Světové zdravotnické organizace (2018) CBD nevykazuje účinky svědčící o možném zneužití nebo vzniku závislosti.

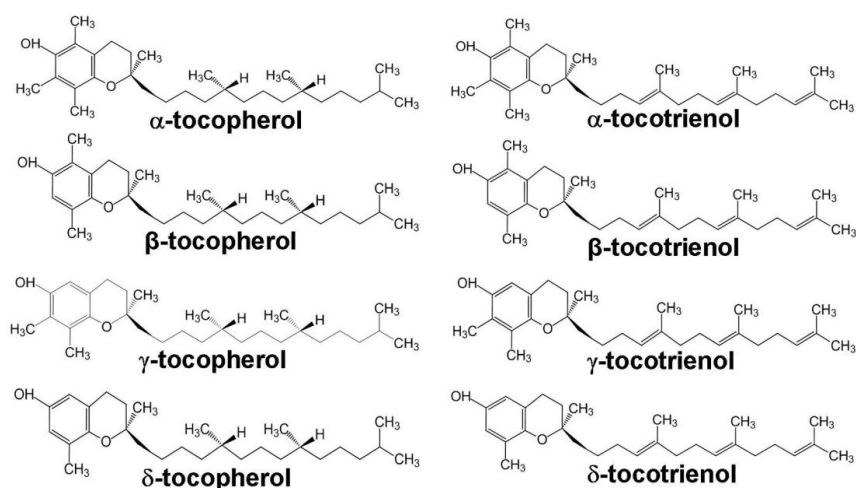
3.4.9 Vitamin E

Vitamin E je nejvýznamnějším lipofilním antioxidantem, který chrání nenasycené lipidy před poškozením volnými radikály. Zpomaluje proces stárnutí organismu a působí v prevenci vzniku rakoviny a kardiovaskulárních chorob (Khan et al. 2015; Aladić et al. 2014). Přírodní tokoferoly se vyskytují v olejnatých semenech, proto rostlinné oleje tvoří jeden z důležitých zdrojů vitamínu E (Khan et al. 2015; Douša 2006).

Účinnost vitamínu E vykazuje osm základních strukturně příbuzných derivátů chromanu (tzv. tokochromanoly). Jejich společným základem jsou tokol (2-methyl-2-(4', 8',12'-trimethyltrideca)-chroman-6-ol) a tokotrienol (2-methyl-2-(4', 8',12'-trimethyldeca-3',7',11-trienyl)-chroman-6-ol), které obsahují chromanový cyklus s nasyceným nebo nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem o 16 atomech uhlíku. Čtyři formy s nasyceným terpenoidním postranním řetězcem, které jsou odvozeny od tokolu, se nazývají tokoferoly (α -, β -, γ -, δ -) a čtyři formy s nenasyceným postranním řetězcem odvozené od tokotrienolu jsou tokotrienoly (α -, β -, γ -, δ -). V potravinách se vyskytuje všech osm biologicky aktivních tokoferolů a tokotrienolů. Samotný tokol a tokotrienol se v přírodě nevyskytují. Nejvyšší vitaminovou účinnost vykazuje α -tokoferol (Khan et al. 2015; Douša 2006). Vzorce jednotlivých tokoferolů a tokotrienolů jsou na obrázku 2.

Při pokojové teplotě jsou tokoferoly bezbarvé až nažloutlé viskózní oleje, které jsou rozpustné v tučných a lipofilních rozpouštědlech. Snadno se oxidují, jsou citlivé na vzdušný kyslík a rozkládají se v UV světle. Pod 40°C jsou tokoferoly stabilní vůči silným alkáliím a za vyšších teplot se rozkládají. V kyselém prostředí jsou tokoferoly stabilní a nerozkládají se ani při teplotě 100°C (Douša 2006; Eitenmiller & Lee 2004).

Konopný olej obsahuje průměrně 77-110 mg celkového vitamínu E na 100 g (Callaway & Pate 2010; Matthäus & Brühl 2008; Oomah et al. 2002). Z toho 3-6,3 mg připadá na α -tokoferol, 0,5-5,6 na β -tokoferol, 70-85 mg na γ -tokoferol a 1,6-2,8 na δ -tokoferol (Callaway & Pate 2008; Oomah et al. 2002). Tento obsah v konopném oleji závisí na odrůdě, podmínkách pěstování, způsobu zpracování a podmínkách skladování (Matthäus & Brühl 2008).



Obrázek 2: Přírodní tokoferoly a tokotrienoly (OMICS International).

3.5 Výroba konopného oleje

Rostlinné oleje a tuky se v současné době získávají především lisováním a extrakcí, kterým může předcházet různý způsob úpravy v závislosti na druhu semen (Savoire et al. 2012; Poustková et al. 2010). Olejnatost surovin rozhoduje o výběru metody výroby – olejiny, které obsahují méně než 25-30 % oleje, se nelisují. Pro konopný olej se většinou používá lisování za studena. Lisování se zdá být oproti extrakci rozpouštědly přijatelnější metodou z hlediska bezpečnosti, zdraví, ekonomiky a environmentálních důvodů (Yusuf et al. 2014).

3.5.1 Příprava semen

Bez ohledu na způsob získávání olejů, je nezbytné provést nejprve úpravu semen. Způsoby předúpravy semen mohou zahrnovat třídění, čištění, vaření, loupání, vločkování, krájení a drcení (Yusuf 2018; Savoire et al. 2012).

Olejnata semena mívají před čištěním asi 2 % nečistot, které zahrnují písek, půdu, prach, semena plevelů, kovy atd. K čištění se používá prosévání, proud vzduchu, magnetická síla a separace pomocí gravitace (Leticia et al. 2012).

U vaření se kombinují dva parametry – teplota a čas. Účinek těchto parametrů na výtěžek z lisování závisí především na druhu semen a jejich obsahu vody. Vařením se rozkládají buněčné stěny, aby mohl olej lépe proniknout, snižuje se viskozita oleje, reguluje se obsah vlhkosti, nastává inaktivace enzymů a ničení mikroorganismů. Používá se teplota okolo 87 °C po dobu 120 minut. Delší doba může mít negativní vliv na obsah cenných látek oleje (např. tokoferoly, fytosteroly) a způsobit ztmavení oleje (Savoire et al. 2012; Leticia et al. 2012).

Loupáním se odděluje semeno od tvrdé skořápky či slupky, které bývají bohaté na vlákninu, ale chudé na obsah oleje. Vločkování se používá k částečnému rozbití semen a zvětšení povrchové plochy. Narušuje buněčnou strukturu semen a usnadňuje pronikání rozpouštědla (Leticia et al. 2012).

Každý způsob úpravy má své vlastní výhody, obecně lze ale říci, že cílem je snadnější uvolnění oleje ze semen, dobrá kvalita a vysoká výtěžnost oleje (Savoire et al. 2012). Oproti některým jiným olejnatým semenům se konopné semeno nemusí zbavovat slupek, ale provádí se jako předúprava drcení (Sladký 2004).

3.5.2 Lisování

Mechanické lisování je nejstarší a nejpoužívanější způsob získávání olejů. Metoda kombinuje účinek několika parametrů – výtěžek oleje závisí na rychlosti rotace lisu, na tlaku, teplotě a obsahu vody v semenech (Savoire et al. 2012). Velkou výhodou lisování je nepoužívání chemických přípravků a produkce olejů vysoké kvality. Dalšími výhodami jsou nízké pořizovací náklady, nízká spotřeba energie pro provoz a pracovní síla nemusí být kvalifikovaná. Oproti extrakci rozpouštědlem je ale výtěžek oleje z lisování nižší (Leticia et al. 2012).

K lisování olejů se obvykle používají šnekové lisy, které dosahují tlaku 1600 až 3000 bar. Teplota při lisování stoupá až na 170 °C, protože dochází k tření povrchu semen a tím tedy

i ke zvýšení teploty, což sice ulehčuje lisování, ale vyšší teplotou než 50 °C trpí kvalita oleje a snižuje se obsah nenasycených mastných kyselin (Sladký 2004). Rozlišují se proto dva typy lisování, a to lisování za tepla a lisování za studena. Lisování za tepla může mít nepříznivý účinek na oxidační stabilitu a na zachování obsahu cenných látek v oleji. Vysoká teplota může ale poskytovat vyšší výtěžek, což je způsobeno sníženou viskozitou oleje ze semen. To zvyšuje tok oleje během lisování a je možné získat až 80 % dostupného oleje v semenech (Yusuf 2017). Teplota semen u olejů lisovaných za studena nepřesáhne 50 °C a je zachován obsah cenných látek (Yusuf 2017; Kaválek 2016). Díky tomu převažuje poptávka po olejích lisovaných za studena (Yusuf 2017).

Konopný olej se po samotném lisování nechává usadit alespoň jeden až dva týdny. Dále nastává filtrace oleje, díky níž se oddělí pevné částičky (tzv. prolis) ze surového oleje. Filtruje se nejčastěji deskovými naplavovacími filtry, kde jako filtrační médium po naplavení slouží prolis. Výlisky po lisování konopných semen jsou zdrojem aminokyselin a bílkovin a jsou vhodné pro zpracování v potravinářském nebo krmivářském průmyslu. Po filtraci se olej plní do nádob a uskladní se (Kaválek 2016; Callaway & Pate 2008).

3.5.3 Extrakce rozpouštědlem

Extrakce patří mezi separační metody, při které dochází k přechodu složky ze směsi látek v tuhé či kapalné fázi do jiné kapalné fáze. Výhodou použití extrakce rozpouštědlem je vysoká výtěžnost oleje (Leticia et al. 2012).

Extrakci ovlivňuje použitá surovina a její kvalita, rozpouštědlo, úprava semen před extrakcí a vlastní způsob extrakce. Použití rozpouštědla se považuje za nevýhodu metody, protože se po extrakci musí zbytek rozpouštědla z oleje odstranit, aby nedošlo k poškození zdraví lidí. Rozpouštědlo navíc nemůže splnit všechna kritéria jako je chemická inertnost vůči ostatním složkám, nízká toxicita, nízká výbušnost a nehořlavost, nízká viskozita a povrchové napětí a další. Významnou podmínkou úspěšné extrakce je také správná úprava semen, kdy dochází k narušení pletiv (Leticia et al. 2012; Poustková et al. 2010).

3.5.3.1 Hexan

Hexan je těkavá organická sloučenina získaná z ropy. Je hořlavý, výbušný a toxický (Citeau et al. 2018). Používá se jako extrakční činidlo pro širokou škálu nepolárních organických sloučenin a je povolen k použití jako extrakční rozpouštědlo při výrobě potravin, ale pouze s určitým omezením. To se týká obsahu reziduí a použití pro vybrané potraviny (Mikkelsen et al. 2014). Je jedním z nejpoužívanějších rozpouštědel pro extrakci rostlinných

olejů, u kterých Evropská unie stanovila maximální množství zbytkového hexanu na 1 mg/kg (Yousefi & Hosseini 2017). Přesto, že je extrakce hexanem technicky i ekonomicky výhodný proces, je jeho používání problematické. Může díky svým vlastnostem negativně ovlivňovat zdraví pracovníků a životní prostředí (Citeau et al. 2018).

3.5.3.2 *Petrolether*

Petrolether je jedním z nejčastěji používaných rozpouštědel při extrakci rostlinných materiálů. Je to čirá bezbarvá kapalina, hořlavá, nefluoreskující a téměř nerozpustná ve vodě (MZ ČR 2009). Rozlišuje se petrolether s nízkou teplotou varu (40-60 °C) a petrolether s vyšší teplotou varu (60-80 °C). Petrolether je mísitelný s ethanolem a je běžně používaným rozpouštědlem díky jeho relativně nízkým nákladům ve srovnání s jinými organickými rozpouštědly. V samotném petroletheru se rozpouštějí nepolární sloučeniny (Daniel & Mammen 2016).

3.5.3.3 *Dimethyl ether*

Dimethyl ether (DME) je bezbarvý plyn, který se využívá jako rozpouštědlo, palivo, aerosol, pohonná látka a chladivo (Sakuragi et al. 2016). Používá se jako extrakční rozpouštědlo při zpracování různých produktů např. vaječných bílkovin a fosfolipidů, rostlinných lipidů, ovocných cukrů, kolagenu a derivátů kolagenu, které pak mohou být přidány do potravin a doplňků stravy (Gaynor 2017). Pro kolagen je stanovené nejvyšší povolené množství reziduí DME na 3 mg/kg. Při přípravě želatiny je nejvyšší povolené množství 0,009 mg/kg (EFSA 2015). Složky extrahované pomocí DME mohou být použity pro přípravu konečných potravinářských výrobků v koncentraci 0,5-10 % (Gaynor 2017).

DME je dodáván jako zkapalněný plyn pod tlakem. Je hořlavý, ale při hoření nevytváří toxické látky. Je šetrný k životnímu prostředí, biologicky rozložitelný a může být tak vhodnou alternativou k běžně používaným rozpouštědlům (Sakuragi et al. 2016). Obvykle se DME vyrábí ze syntetického plynu (tzv. syngas), který obsahuje směs CO a H₂, případně množství CO₂ do 3 %. Dále se dá vyrábět dehydratací methanolu, který je produkován syngasem. Syngas lze vyrábět z fosilních paliv (např. uhlí) nebo z biomasy (Falco 2017).

3.5.4 Superkritická fluidní extrakce

Superkritická fluidní extrakce (SFE) je fyzikální a separační metoda, při které nedochází k uvolňování tepla ani k chemické reakci a která se využívá k extrakci pevného vzorku superkritickou tekutinou (Klouda 2003). Superkritická tekutina má ve svém kritickém bodě vlastnosti plynu i kapaliny (Patil et al. 2014). Hustota těchto tekutin se mění v závislosti na změně teploty a tlaku, proto může mírné zvýšení tlaku hustotu o hodně zvýšit (Pourmortazavi et al. 2014). Při výběru superkritické tekutiny jsou rozhodující tři základní faktory – rozpustnost, difúze a matrice. Extrahovaná látka musí být tedy v tekutině dostatečně rozpustná a transport látky dostatečně rychlý. Extrakci vzorku může negativně ovlivnit adsorpce analytu na povrchu tuhé matrice, záchyt molekul analytu na složitých organických molekulách matrice a snaha molekul analytu pronikat skrz buněčné stěny biomatrice (Leticia et al. 2012; Sapkale et al. 2010). Účinnost extrakce závisí také na teplotě, tlaku a na době kontaktu mezi tekutinou a materiálem (Leticia et al. 2012).

System SFE obsahuje pumpu, zdroj CO₂ nebo jiného extrakčního činidla, zdroj modifikátoru, extrakční nádobu se vzorkem ve vyhřívané peci, sběrnou nádobu a systémy pro udržování tlaku. Oxid uhličitý je čerpán pumpou do zahřívající části, kde se dostane do superkritických podmínek. Dále pokračuje ke vzorku, kde rychle proniká skrz a rozpouští materiál, který má být extrahován. Rozpuštěný materiál se odvádí za nízkého tlaku pryč do sběrné nádoby. Oxid uhličitý může být poté ochlazován, znovu stlačen a recyklován nebo se vypustí do atmosféry (Sapkale et al. 2010).

V současné době se superkritická fluidní extrakce využívá v potravinářském průmyslu (extrakce cholesterolu z potravin, extrakce rostlinných a živočišných tuků a olejů, dekofeinace kávy a čaje), farmaceutickém průmyslu (extrakce účinných látek z rostlin – konopí seté, měsíček lékařský atd.), méně také v oblasti chemie, toxikologie, životního prostředí, textilu, petrochemie a polymerů (Ahmad et al. 2019; Pourmortazavi et al. 2014).

3.5.4.1 Oxid uhličitý

Běžně se pro SFE používá oxid uhličitý. Superkritický oxid uhličitý má nízkou viskozitu a rychle tak proniká přes vzorek. Nad kritickou teplotu 31,1 °C a tlak 73,8 bar ho nelze dalším zvyšováním tlaku zkapalnit. Optimální tlak pro jeho použití je 100-300 bar a teplota 40-50 °C. Oxid uhličitý je netoxický, nevybušný, snadno dostupný, levný a jednoduše odstranitelný z extraktu ve srovnání s organickými rozpouštědly. Je to za normálních podmínek plyn, proto se po dokončení extrakce lehce odpaří (Budisa & Schulze-Makuch 2014; Da Porto

et al. 2012; Poustková et al. 2010; Herrero et al. 2006). Je nepolární, rozpouští nepolární a málo polární sloučeniny. Po přidání malého množství polárního modifikátoru (ethanolu, methanolu, acetonitrilu) se s ním dají extrahovat i polární sloučeniny (Patil et al. 2013).

3.5.4.2 *Voda*

Superkritická voda je zajímavou alternativou k oxidu uhličitému. Má svůj kritický bod při teplotě 374 °C a tlaku 221 bar. Síť vodíkových můstků, kterou voda obsahuje, se se vzrůstající teplotou narušuje. Po překročení kritického bodu síť zaniká a vznikají samostatné shluky molekul vody bez vzájemných interakcí. Při 400 °C je síť vodíkových vazeb již úplně rozbita. Přítomné vodíkové můstky mění při překročení kritického bodu vody svoji strukturu. Mezi původně lineárními vodíkovými vazbami, vznikají rozštěpené vodíkové vazby, kde je dipólový moment obou molekul vody v jednom směru. Následkem toho mění voda své rozpouštěcí vlastnosti. V superkritické stavu se voda stává nepolárním rozpouštědlem (Zychová et al. 2013; Herrero et al. 2006; Ayala & De Castro 2001).

Výhodou použití superkritické vody je její nízká cena, vysoká účinnost a nulová toxicita. Může poskytovat vyšší výtěžek z pevných vzorků. Je nehořlavá a šetrná k životnímu prostředí. Používá se hlavně v medicíně a potravinářství, kde je vyžadovaná minimální kontaminace toxickým rozpouštědlem (Marcus 2018; Zychová et al. 2013; Herrero et al. 2006).

3.5.4.3 *Výhody a nevýhody SFE*

Výhodou je vysoký stupeň automatizace, použití maximálně jen malého množství organického rozpouštědla a získání čistého oleje bez přítomnosti použitého rozpouštědla (Sapkale et al. 2010). Jedná se o poměrně rychlou extrakci díky vyšší difuzivitě a nižší viskozitě. Selektivitu metody je možno nastavit pomocí změny teploty, tlaku a přidavkem modifikátoru (Zougagh et al. 2004). Výtěžek oleje se blíží výtěžku z extrakce rozpouštědlem, ale s kvalitou, kterou mají oleje lisované a zachovávají se tepelně labilní sloučeniny (Khaw et al. 2017; Leticia et al. 2012).

Hlavní nevýhody SFE jsou vysoké počáteční náklady, nutná kvalifikace pracovníků, potřeba tlakového zařízení a nutná pečlivá optimalizace extrakčních parametrů. Po extrakci se vždy musí provést čištění zařízení (Pourmortazavi et al. 2014; Patil et al. 2013; Zougagh et al. 2004).

3.6 Vliv způsobu získávání oleje na jeho kvalitu

Způsob získávání konopného oleje má vliv na jeho výsledné vlastnosti a kvalitu. Olej lisovaný za studena, olej extrahovaný superkritickým CO₂ a olej extrahovaný pomocí hexanu vykazují odlišné peroxidové číslo, které je pravděpodobně způsobeno odlišnou úpravou semen před samotným procesem výroby. Semeno se před lisováním obvykle nemele, ale je ihned lisováno. U extrakce dochází po předúpravě semene k časové prodlevě, aby došlo k uvolnění oleje (Borhade 2013; Poustková et al. 2010).

Olej vyrobený extrakcí superkritickým CO₂ vykazuje vyšší obsah látek nezmýdelnitelného podílu, a to díky působení právě CO₂ na látky nezmýdelnitelného podílu (např. fosfolipidy), které se nachází v buněčných membránách. Číslo kyselosti je u oleje získaného extrakcí CO₂ nejnižší, obsahuje tedy menší množství volných mastných kyselin (Borhade 2013; Poustková et al. 2010). Olej získaný superkritickým CO₂ obsahuje vyšší množství tokoferolů a chlorofylů než olej lisovaný za studena (Liang 2017; Teh & Birch 2013; Aladić et al. 2014). Konkrétní hodnoty kvalitativních ukazatelů u jednotlivých olejů jsou uvedené v tabulce 3.

Při použití extrakce superkritickým CO₂ může být vyšší obsah chlorofylů a karotenů u oleje extrahovaného delší dobu (180-210 minut) a za tlaku 400 bar než při 300 bar. Naopak nižší teplota 40 °C je pro obsah chlorofylů, karotenů a tokoferolů příznivější než teplota 60 °C. Obsah mastných kyselin není na výši tlaku a teploty tak závislý a jejich hodnoty zůstávají téměř beze změny (Aladić et al. 2014).

Nejvyšší výnos konopného oleje lze získat při tlaku 300 bar a teplotě 40 °C nebo při tlaku 400 bar a teplotě 80 °C, oboje s použitím 40kg CO₂ na 1 kg semen. Nejvyšší oxidační stabilitu vykazuje olej získaný při 400 bar a 80 °C (Da Porto et al. 2012).

Tabulka 3: Kvalitativní charakteristiky lisovaného konopného oleje, extrahovaného superkritickým CO₂ (Poustková et al. 2010) a extrahovaného hexanem (Borhade 2013)

Ukazatel	Lisovaný	Extrahovaný CO₂	Extrahovaný hexanem
Peroxidové číslo (mekv O ₂ .kg ⁻¹)	12,62	18,2	7,2
Číslo zmýdelnění (mg KOH.g ⁻¹)	189,7	193,33	190,2
Jodové číslo (g I ₂ .100 g ⁻¹)	155,67	154,43	163,5
Číslo kyselosti (mg KOH.g ⁻¹)	4,14	0,96	2,15
Nezmýdelnitelný podíl (% hm.)	1,44	2,27	0,26

4. Materiál a metody

Pro experimentální část práce byla použita semena pěti odrůd *Cannabis sativa* L. – Fedora, Finola, KC Virtus, Santica a Tiborszallasi, ze kterých byl získáván konopný olej. K výrobě byla použita metoda lisování za studena, extrakce dimethyl etherem a extrakce superkritickým oxidem uhličitým. Extrakce byla provedena ve třech nezávislých opakováních. U vyextrahovaných olejů byl zjišťován rozdíl obsahu tokoferolů, mastných kyselin a číslo kyselosti. V samotných semenech byla stanovena sušina.

4.1 Konopná semena

Použitá semena konopí pochází z rostlin pěstovaných v Masojedech ve Středočeském kraji, kde je pro tuto oblast typická půda luvisol. Získaná semena byla skladována při teplotě 5 °C na tmavém a suchém místě.

4.2 Výroba olejů

4.2.1 Lisování za studena

Semena se před lisováním nijak neupravovala, pouze se zahřívala při teplotě 50 °C pro snazší uvolnění oleje a následně byla ihned lisována v nádobě s průměrem 60 mm pomocí hydraulického lisovacího stroje (TEMPOS, CZ). Pro jednu extrakci bylo použito 100 g semen. Lisování probíhalo silou 200 kN po dobu 5 min. Získané oleje byly skladovány při -20 °C.

4.2.2 Extrakce dimethyl etherem

Před extrakcí se semena namlela elektrickým mlýnkem (IKA, A 11 basic, DE) a následně umístila do extraktoru z eloxovaného hliníku (Dexso Professional viz Obrázek 3). Na jednu extrakci bylo použito 100 g semen. Extrakce byla provedena pomocí dimethyl etheru ve spreji o objemu 500 ml (Dexso Organic Degreaser DME) do kádinky, která byla umístěna pod extraktorem (Obrázek 4). Na jednu extrakci byl použit jeden sprej DME, olej se začal uvolňovat průměrně po 8 min od stlačení plynu. Po ukončení extrakce byl olej za stálého míchání zahříván na teplotu 25 °C, aby došlo k odpaření přebytečného DME. Oleje se skladovaly při -20 °C.



Obrázek 3: Extrakce oleje pomocí extraktoru Dexso Professional



Obrázek 4: Olej získaný extrakcí DME

4.2.3 Extrakce superkritickým oxidem uhličitým

Semena se před extrakcí namlela elektrickým mlýnkem (IKA, A 11 basic, DE) a následně byla dávkována do extrakční nádoby, jejíž uzávěry byly utěsněné skelnou vatou. Pro jednu extrakci bylo použito 25 g semen. Extrakce probíhala na přístroji Spe-ed SFE Helix (USA) a pro extrakci byl použit oxid uhličitý. Jednotlivé parametry extrakce jsou uvedeny v tabulce 4. Extrakce probíhala 20 minut, oleje byly zachytávány do vialek a následně skladovány při -20 °C.

Tabulka 4: Použité parametry pro SFE

Tlak čerpadla CO ₂	400 bar
Tlak extrakční nádoby	400 bar
Ohřívač CO ₂	40 °C
Ohřívač nádoby	40 °C
MMV ohřívač	120 °C

4.3 Stanovení obsahu tokoferolů

4.3.1 Příprava vzorků

K přípravě vzorků pro stanovení tokoferolů bylo nejprve naváženo 100 mg oleje do odměrné baňky o objemu 10 ml. Poté byl po rysku baňky doplněn isopropanol (analytické čistoty, VWR Chemicals, CZ). Baňky byly uzavřeny zátkou a umístěny do ultrazvukové lázně (Bandelin Sonorex Digitec, DE) na 10 minut. Vzorky byly následně přefiltrovány přes PTFE 0,45 µm filtr do vialek o objemu 2 ml.

4.3.2 Analýza

K měření byl použit systém Ultimate 3000 HPLC (Thermo Fisher Scientific, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) s fluorescenčním detektorem Ultimate 3000 RS. Separace probíhala isokratickou elucí na koloně Develosil 5µ RP AQUEOUS (250 mm × 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) opatřené předkolonou ZORBAX SB-C18 (12,5 mm × 4,6 mm, 5 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Mobilní fáze se skládala z metanolu a deionizované vody v poměru 97:3. Použité provozní parametry jsou uvedeny v tabulce 5.

4.3.3 Identifikace látek

Identifikace látek byla provedena porovnáním jejich retenčních časů a spekter s analytickými standardy. Ke kvantifikaci byla použita plocha píku a externí kalibrace

v koncentračním rozmezí 0,025-0,50 µg/ml analytu (desetibodová kalibrace). Výsledný obsah byl vyjádřen v mg/kg oleje průměrnými hodnotami ze tří opakování.

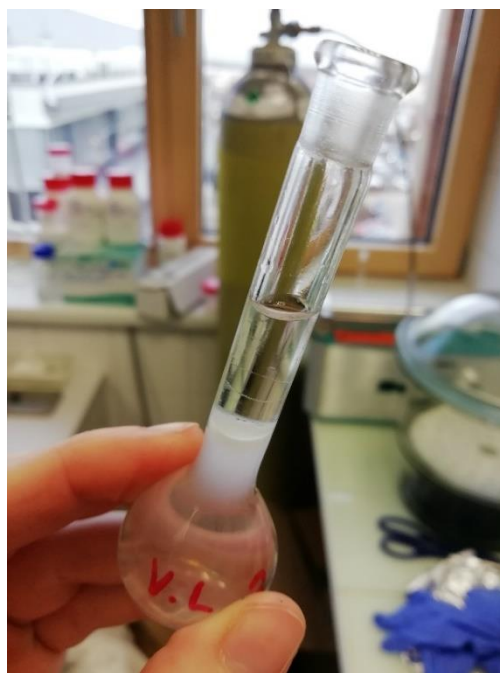
Tabulka 5: Použité podmínky pro analýzu tokoferolů

Průtok mobilní fáze	1 ml/min
Doba analýzy	33 minut
Teplota autosampleru	20 °C
Teplota kolony	30 °C
Objem nástřiku	10 µl
FLD detekce	při 242 nm (excitace) a 330 nm (emise)

4.4 Stanovení mastných kyselin

4.4.1 Derivatizace mastných kyselin

K přípravě vzorků bylo odpipetováno 50 µl oleje do odměrné baňky. K oleji byl přidán 1 ml petroletheru a 1 ml 0,4 M hydroxidu sodného v methanolu (chemikálie analytické čistoty, VWR Chemicals, CZ). Baňka se protřepala, utěsnila zátkou a nechala stát 20 min. Následně se ke vzorku přidala destilovaná voda, baňka se opět protřepala a po vytvoření zřetelného rozhraní (Obrázek 5) se odpipetovala horní vrstva do vialky.



Obrázek 5: Viditelné rozdělení vzorku na dvě části

4.4.2 Analýza mastných kyselin

Kvantitativní analýza mastných kyselin byla provedena pomocí metody GC/FID a kvalitativní pomocí GC/MS. Obě analýzy probíhaly za stejných podmínek – pro separaci látek byla použita kolona Rt-2560 s rozměry 100 m × 0,25 mm × 0,2 μm. Analýza probíhala 45 minut, nastavený teplotní program začínal nejprve na teplotě 70 °C, která se udržovala po dobu 2 minut. Následně se teplota postupně zvyšovala rychlostí 5 °C/min na 225 °C, kde se udržovala 9 minut. Nakonec se teplota zvýšila až na finálních 240 °C rychlostí 10 °C/min na dobu 6,5 minuty. Průtok H₂ byl nastaven na 30 ml/min, průtok vzduchu na 400 ml/min a doplňovací tok na 30 ml/min. Objem nástřiku vzorku byl 1 μl se vstupní teplotou 225 °C a průtokem 1,2 ml/min.

Systém GC/FID se skládal z pece 7890 A a plamenově ionizačního detektoru (Agilent, Santa Clara, USA), systém GC/MS obsahoval pec 7890 A a 5975 C hmotnostní spektrometr (Agilent). Teplota iontového zdroje byla 230 °C a teplota kvadrupólu 150 °C. Hmotnostní spektra byla získána skenovacím režimem v rozsahu 40-400 m/z.

4.4.3 Identifikace mastných kyselin

Identifikace byla provedena porovnáním jednotlivých získaných hmotnostních spekter s knihovnou spekter NIST ver. 2,0f (USA) a dále s porovnáním spekter 37 dostupných standardů (FAME mix, Supelco, CZ).

4.5 Stanovení sušiny

Do předem vysušených váženek bylo naváženo 5 g namletých semen. Sušení probíhalo při teplotě 105 °C (sušárna Memmert, DE) po dobu 24 hodin do konstantní hmotnosti. Poté byly váženky opět zváženy a vypočten rozdíl hmotnosti před a po sušení.

4.6 Stanovení čísla kyselosti

Do titrační baňky bylo naváženo 2,5 g oleje, ke kterému bylo přidáno 25 ml neutralizovaného a vytemperovaného 96% ethanolu na teplotu 60-65 °C a 1 ml 1% fenolftaleinu (obě chemikálie byly dodány od VWR Chemicals, CZ). Vzorek se ihned titroval 0,01 M odměrným roztokem KOH (Penta, ČR) do růžovofialového zbarvení stálého 30 sekund. Stanovení se provedlo u každého oleje dvakrát. Ze spotřeby odměrného roztoku KOH bylo vypočteno množství KOH v mg na 1 g oleje, k výpočtu byl použit vzorec uvedený níže. Číslo kyselosti daného oleje se vyjádřilo jako průměr z obou stanovení.

$$X = \frac{a \times c \times M}{n}$$

a – spotřeba odměrného roztoku KOH v ml

c – koncentrace odměrného roztoku KOH

M – molární hmotnost KOH v g/mol

n – navážka oleje v g

4.7 Statistické zpracování dat

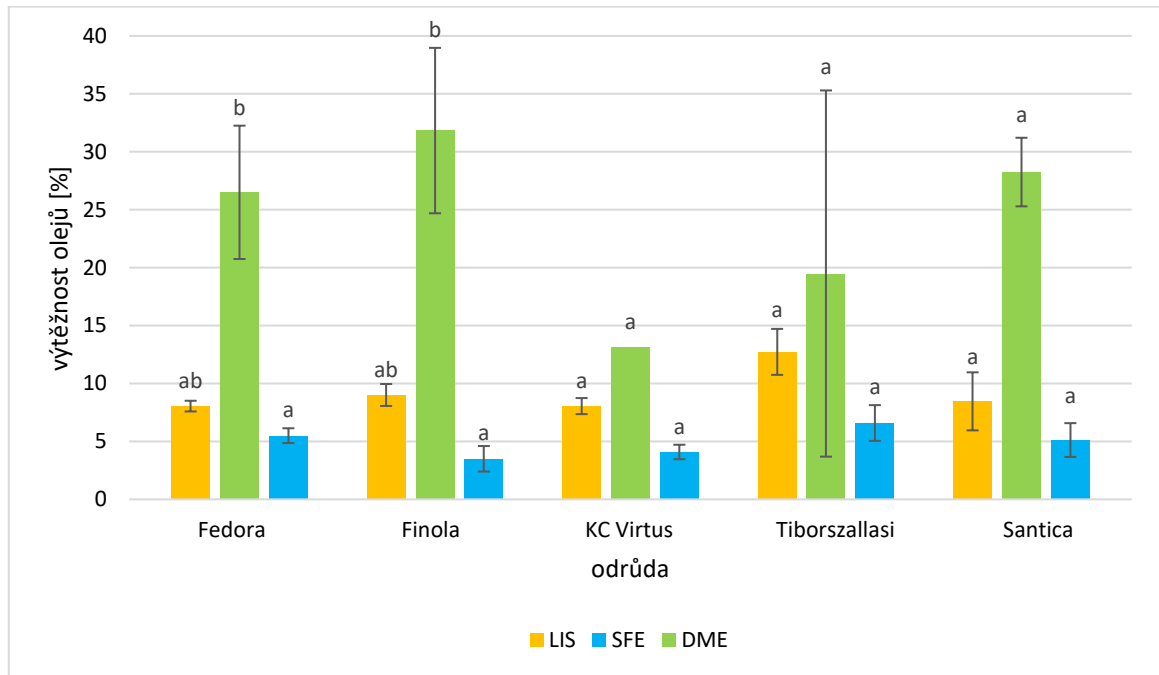
Získané hodnoty byly zpracovány v programu Statistica 12. Byla zde nejprve testována normalita souborů dat. V případě, že data pocházela z normálního rozdělení, byla pro vyhodnocení použita jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA a následně Tukeyho test. Pokud se normalita nepotvrdila, byl použit Kruskal-Wallisův test.

5. Výsledky

5.1 Výtěžnost oleje

Na základě získaného množství oleje a stanovené sušiny v semenech, byla vypočítána výtěžnost oleje na sušinu semen. U každé odrůdy a dané metody byl vypočítán průměr ze tří opakování. Výsledné hodnoty jsou znázorněny v grafu 1.

Graf 1: Porovnání průměrných výtěžností extrakčních metod



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem. Stejně písmeno (a, b) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl mezi vzorky v rámci jedné odrůdy (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

Nejvíce oleje bylo získáno extrakcí dimethyl etherem, kde byla průměrná výtěžnost všech olejů $23,84 \pm 7,48$ %. Nejvyšší výtěžnost zde vykazuje odrůda Finola ($31,83 \pm 7,14$ %), naopak nejnižší KC Virtus ($13,15 \pm 0$ %). U této metody byl olej z odrůdy KC Virtus získán pouze v jednom opakování, protože nedošlo k uvolnění oleje u zbylých dvou extrakcí.

Lisováním bylo dosaženo průměrné výtěžnosti $9,26 \pm 1,98$ %, nejvíce u odrůdy Tiborszallasi ($12,73 \pm 1,98$ %) a nejméně u odrůd Fedora ($8,05 \pm 0,46$ %) a KC Virtus ($8,05 \pm 0,69$ %).

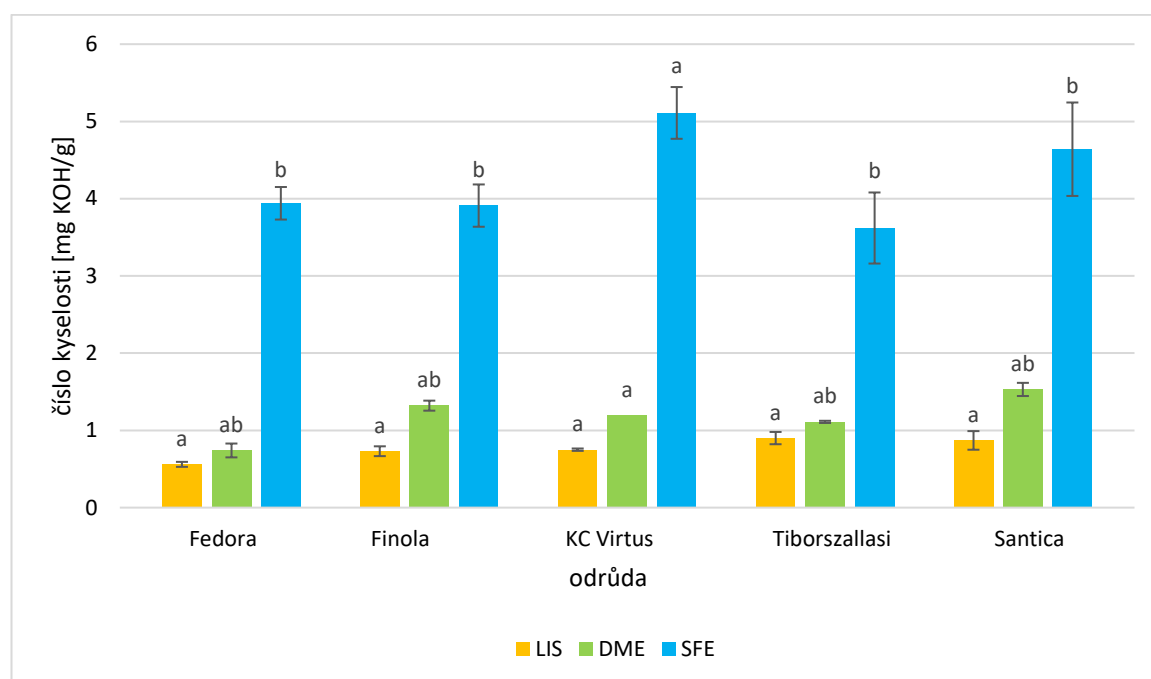
Extrakcí superkritickým oxidem uhličitým bylo získáno nejméně oleje, průměrná výtěžnost byla pouze $4,96 \pm 1,21$ %. Nejvíce oleje bylo získáno u odrůdy Tiborszallasi ($6,59 \pm 1,54$ %) a nejméně u odrůdy Finola ($3,5 \pm 1,10$ %).

5.2 Číslo kyselosti (ČK)

Číslo kyselosti každého oleje se vyjádřilo jako průměr ze dvou stanovení jednoho vzorku. Výsledné číslo kyselosti dané odrůdy u každé metody je vyjádřeno jako průměrná hodnota ze tří nezávislých extrakcí daného oleje. Hodnoty jsou znázorněné v grafu 2.

Jednoznačně nejvyšší čísla kyselosti vykazují oleje získané extrakcí superkritickým oxidem uhličitým, kde je průměrná hodnota $4,24 \pm 0,61$ mg KOH/g. Nejmenší hodnoty čísel kyselosti jsou u lisovaných olejů, kde je průměr pouze $0,76 \pm 0,29$ mg KOH/g. Průměrná hodnota u olejů extrahovaných dimethyl etherem je $1,18 \pm 0,13$ mg KOH/g.

Graf 2: Porovnání průměrných čísel kyselosti olejů u všech odrůd



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem. Stejně písmeno (a, b) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl mezi vzorky v rámci jedné odrůdy (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

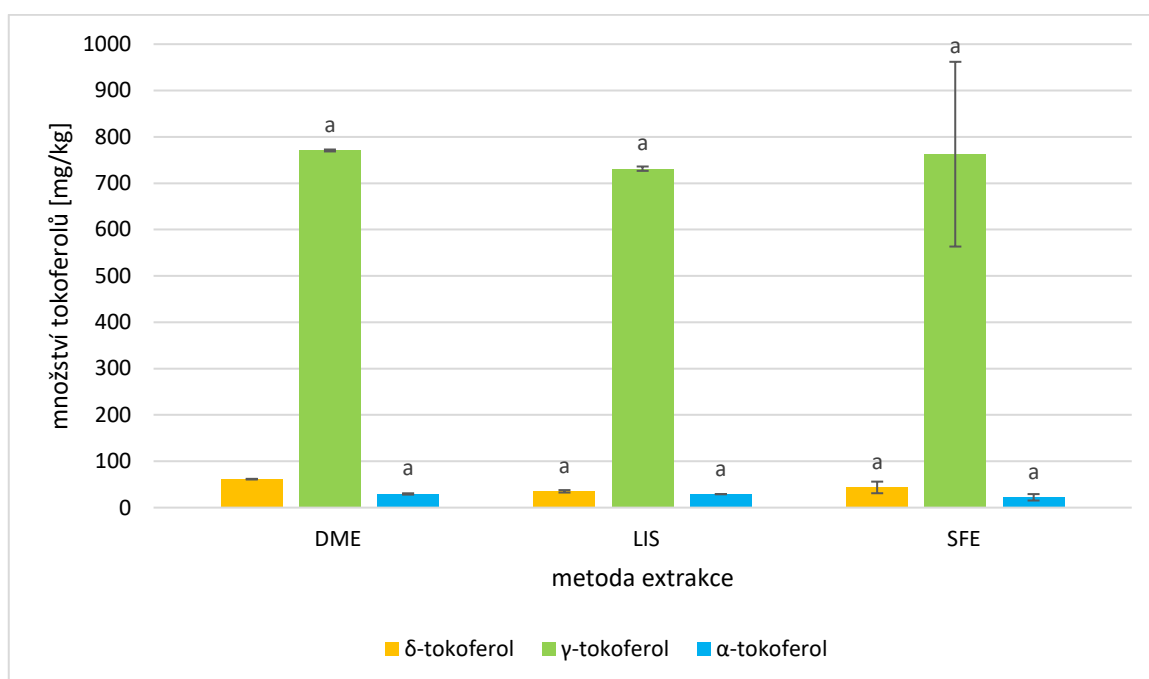
U olejů získaných extrakcí DME vykazují nejvyšší hodnotu ČK oleje z odrůdy Santica ($1,53 \pm 0,09$), nejnižší je u odrůdy Fedora ($0,74 \pm 0,09$). U lisovaných olejů je nejvyšší hodnota u olejů z odrůdy Tiborszallasi ($0,9 \pm 0,08$) a nejnižší u odrůdy Fedora ($0,56 \pm 0,03$). U olejů vyrobených pomocí SFE je nejvyšší hodnota u odrůdy KC Virtus ($5,11 \pm 0,34$), nejnižší u odrůdy Tiborszallasi ($3,62 \pm 0,46$).

5.3 Obsah tokoferolů

V olejích byl identifikován α , β , γ , δ -tokoferol a žádný tokotrienol. Výsledné zastoupení jednotlivých tokoferolů v každé odrůdě a dané metodě je vyjádřené jako průměr získaných hodnot ze tří opakování.

U odrůdy Fedora bylo nalezeno nejvíce tokoferolů v olejích získaných extrakcí DME, kde je průměrné množství celkových tokoferolů 862,51 mg/kg. U lisovaných olejů je tato hodnota 828,4 mg/kg a u olejů získaných SFE 795,59 mg/kg. Zastoupení jednotlivých tokoferolů je znázorněno v grafu 3.

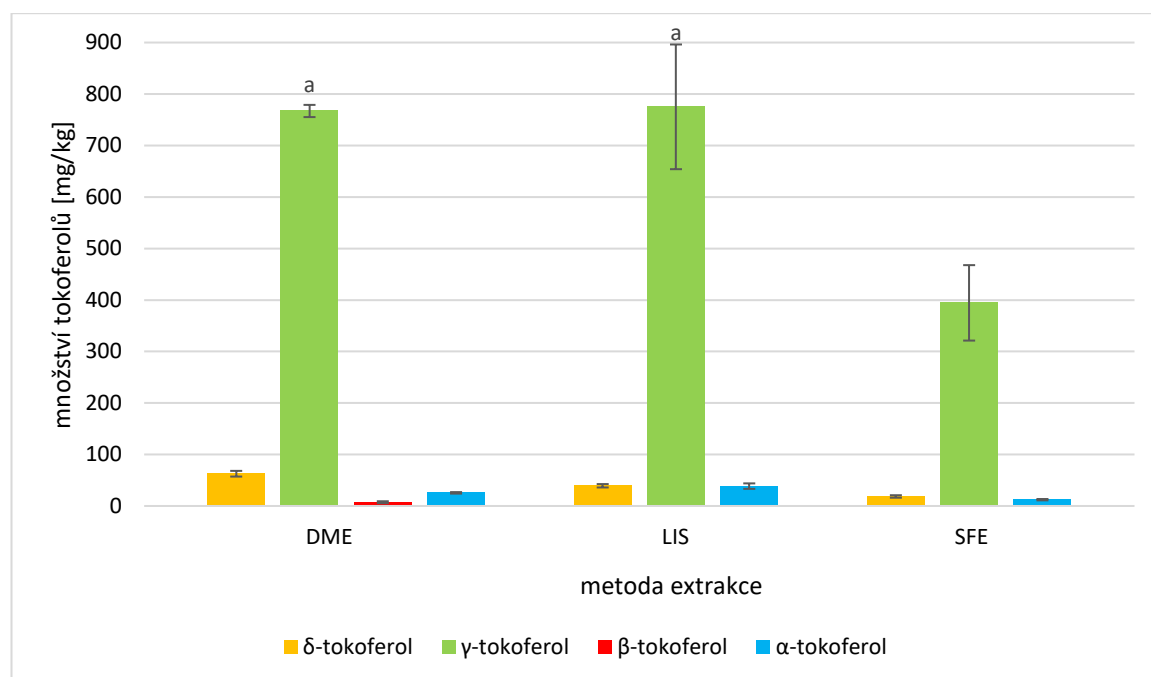
Graf 3: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Fedora [mg/kg]



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem. Písmeno (a) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů v závislosti na extrakci (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

Nejvíce zastoupený je γ -tokoferol s průměrnou hodnotou $754,69 \pm 20,56$ mg/kg. Jeho množství je nejvyšší u olejů získaných DME ($770,61 \pm 2,11$ mg/kg), naopak nejnižší u lisovaných olejů ($731,35 \pm 4,73$ mg/kg). δ -tokoferol se vyskytuje v průměrném množství $46,87 \pm 13,67$ mg/kg a α -tokoferol v průměrném množství $27,27 \pm 13,52$ mg/kg. Množství tokoferolů je velmi vyrovnané při porovnání jednotlivých metod. V olejích nebyl identifikován β -tokoferol.

Graf 4: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Finola [mg/kg]

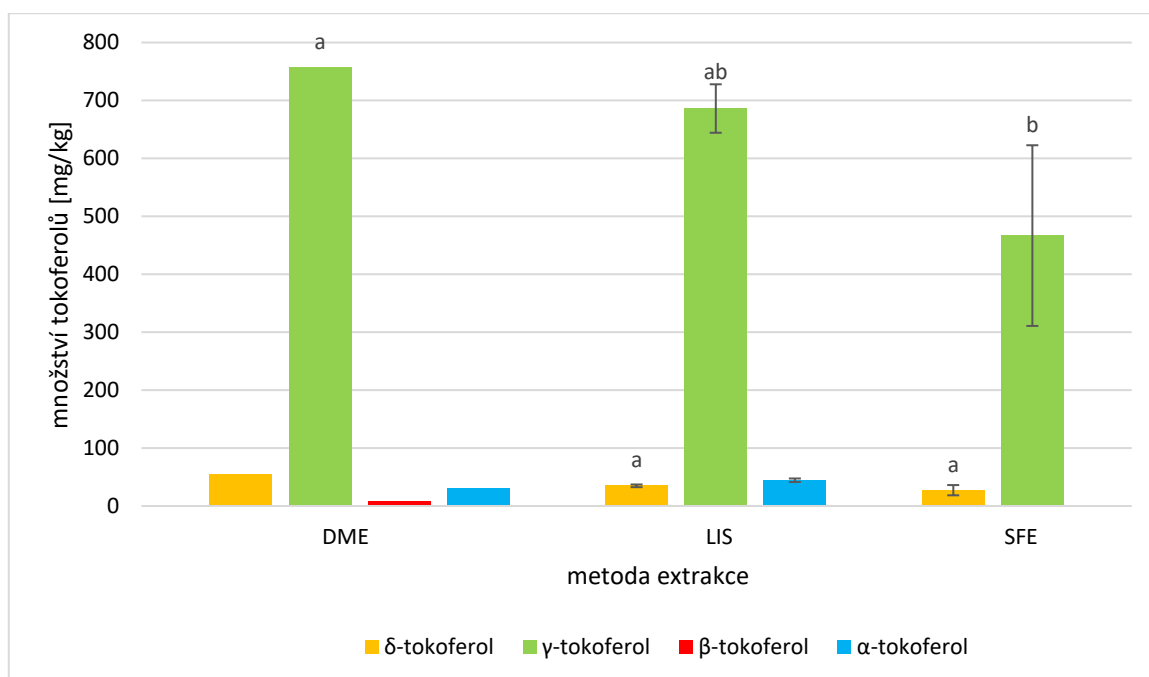


Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem. Písmeno (a) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů v závislosti na extrakci (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

V olejích z odrůdy Finola bylo nejvíce tokoferolů identifikováno v olejích získaných extrakcí dimethyl etherem (862,53 mg/kg). Lisované oleje mají průměrně 853,06 mg/kg a oleje získané metodou SFE pouze 425,2 mg/kg. Množství jednotlivých tokoferolů u olejů z odrůdy Finola je zobrazeno v grafu 4.

Nejvyššího průměrného množství $645,58 \pm 217,51$ mg/kg dosahuje γ -tokoferol. Nejvíce se ho vyskytuje v lisovaných olejích ($775,2 \pm 121,1$ mg/kg), nejméně v olejích získaných SFE ($394,47 \pm 73,25$ mg/kg). V olejích získaných DME byl identifikován β -tokoferol v malém množství $7,27 \pm 1,92$ mg/kg. Ve všech olejích se vyskytuje δ -tokoferol s průměrnou hodnotou $40,14 \pm 22,1$ mg/kg, α -tokoferol v množství $25,45 \pm 13,17$ mg/kg.

Graf 5: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda KC Virtus [mg/kg]

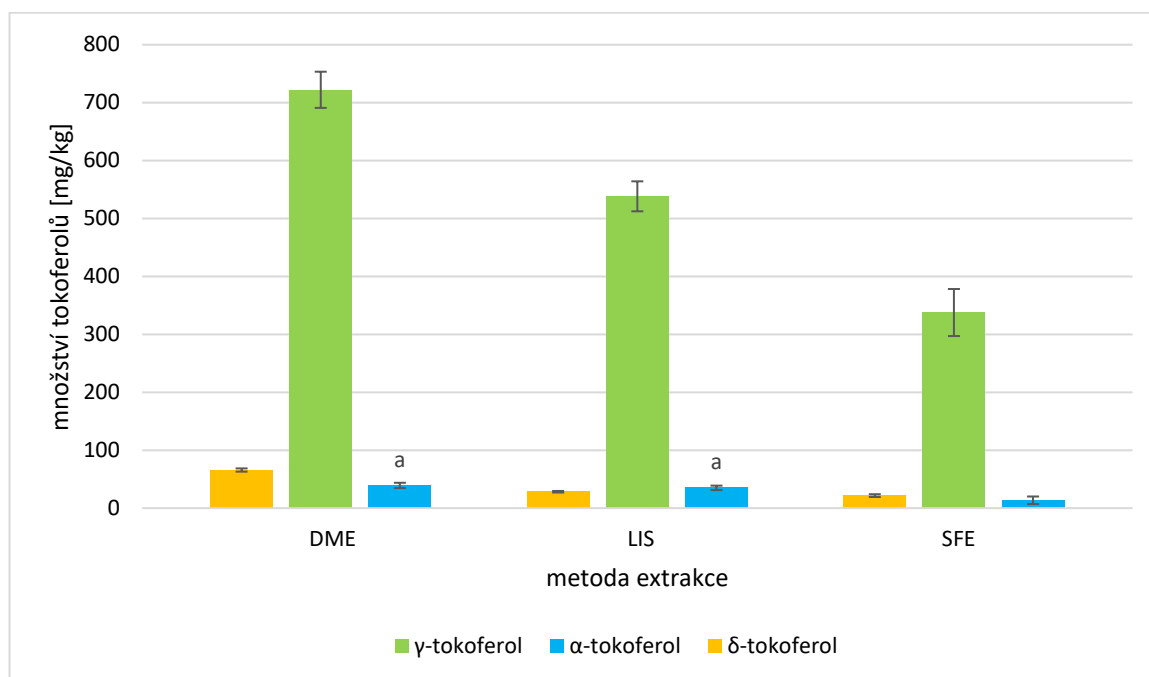


Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem. Stejné písmeno (a, b) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů v závislosti na extrakci (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

U odrůdy KC Virtus bylo identifikováno nejvyšší množství tokoferolů v olejích vyrobených pomocí DME (848,97 mg/kg), dále v lisovaných olejích (765,34 mg/kg) a nejméně v olejích získaných metodou SFE (494,02 mg/kg). Zastoupení jednotlivých tokoferolů je zobrazeno v grafu 5.

Nejvíce zastoupený je zde γ -tokoferol, který v průměru dosahuje $636,46 \pm 151,13$ mg/kg. Jeho nejvyšší množství je v olejích extrahovaných DME ($756,54 \pm 0$ mg/kg), nejnižší v olejích získaných metodou SFE ($466,75 \pm 155,96$ mg/kg). Ve všech olejích byl identifikován δ -tokoferol v průměrném množství $38,79 \pm 13,95$ mg/kg. α -tokoferol se vyskytl v lisovaných olejích a získaných extrakcí DME, a to v průměrném množství $37,46 \pm 6,99$ mg/kg. β -tokoferol se vyskytl pouze v oleji získaném extrakcí DME v množství 7,66 mg/kg.

Graf 6: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Santica [mg/kg]

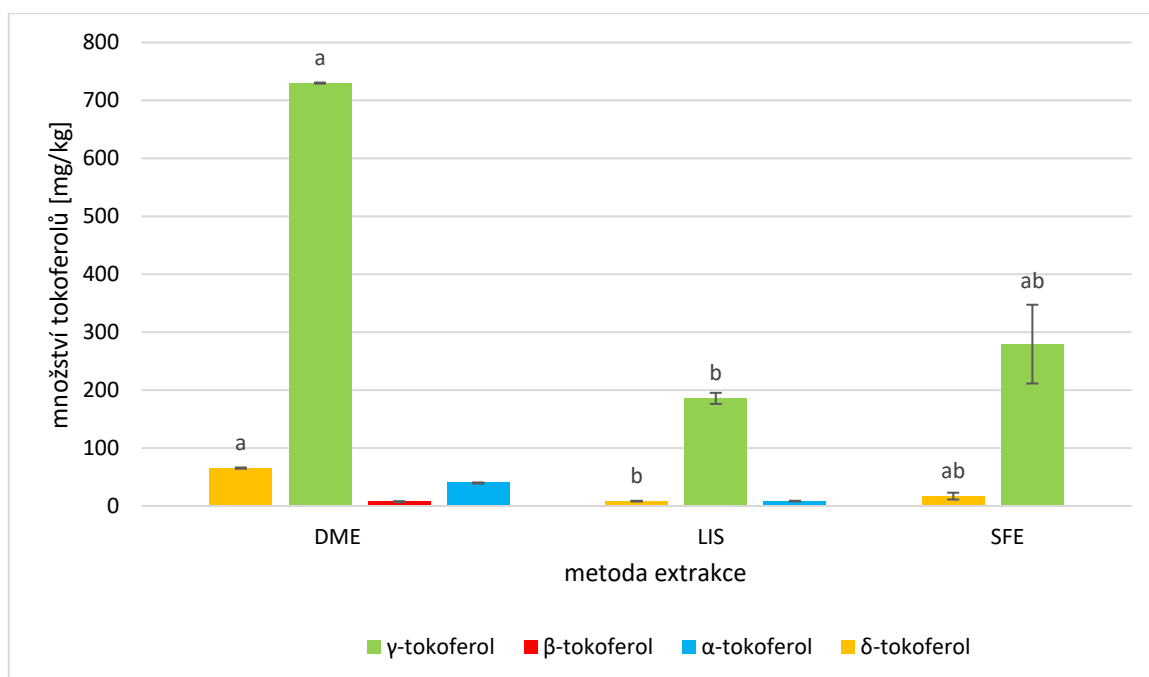


Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem. Písmeno (a) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů v závislosti na extrakci (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

V olejích z odrůdy Santica bylo identifikováno nejvíce tokoferolů v olejích získaných DME, kde je průměrně 827,27 mg/kg tokoferolů. V lisovaných olejích je průměrné množství 601,67 mg/kg a v olejích získaných pomocí SFE 372,98 mg/kg. Zastoupení tokoferolů je znázorněno v grafu 6.

Nejvíce zastoupeným tokoferolem je γ -tokoferol s průměrným množstvím $532,73 \pm 192,97$ mg/kg. Jeho nejvyšší množství je v olejích extrahovaných DME ($722,18 \pm 31,22$ mg/kg), nejnižší množství v olejích získaných SFE ($337,7 \pm 40,62$ mg/kg). Ve všech olejích se dále vyskytuje α -tokoferol ($29,32 \pm 13,74$ mg/kg) a δ -tokoferol ($38,60 \pm 23,82$ mg/kg), β -tokoferol nebyl identifikován.

Graf 7: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Tiborszallasi [mg/kg]

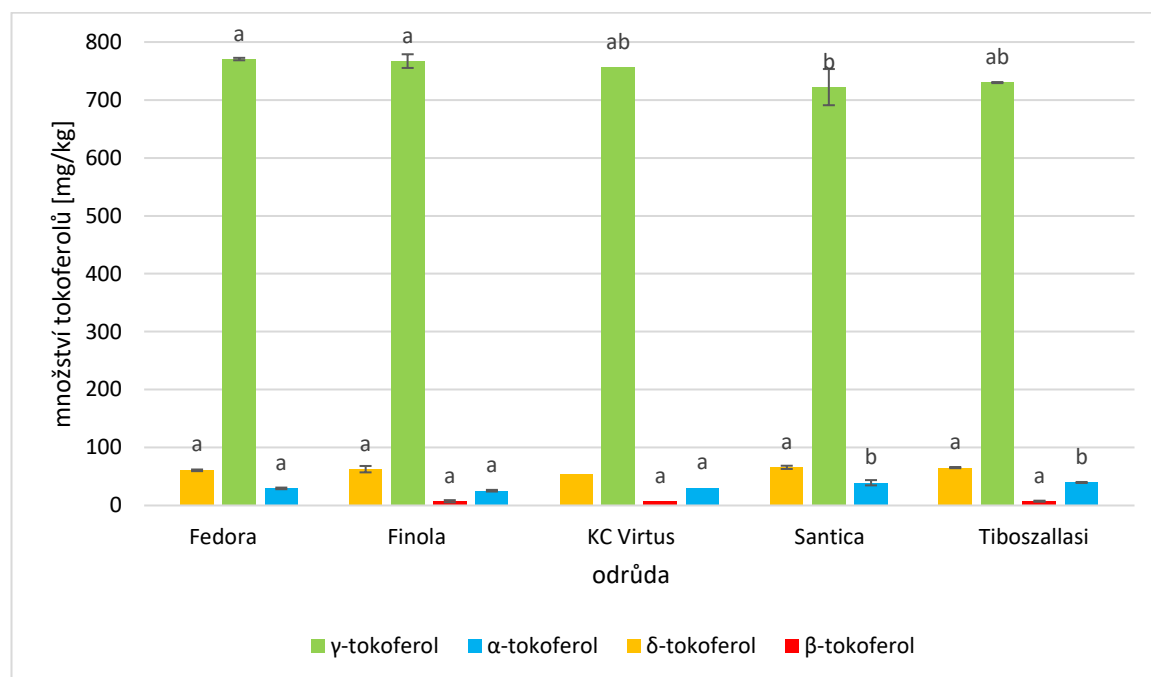


Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem. Písmeno (a) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů v závislosti na extrakci (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

U odrůdy Tiborszallasi bylo identifikováno nejvyšší množství tokoferolů v olejích získaných extrakcí DME, a to s průměrnou hodnotou 842,51 mg/kg. V olejích ze SFE bylo průměrně 296,5 mg/kg tokoferolů a nejméně v lisovaných olejích, kde je průměrně pouze 202,6 mg/kg tokoferolů. Zastoupení jednotlivých tokoferolů u odrůdy Tiborszallasi je znázorněno v grafu 7.

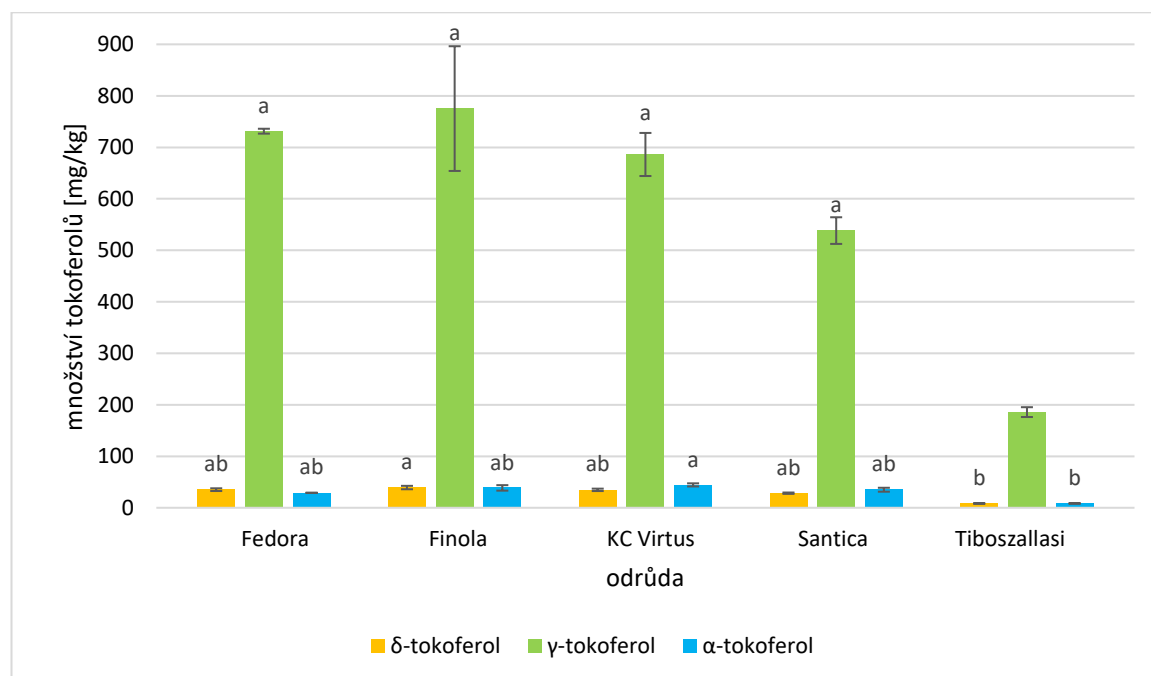
Nejvíce se v olejích vyskytuje γ -tokoferol ($398,42 \pm 290,97$ mg/kg), jeho nejvyšší množství je v olejích z DME ($730,02 \pm 1,7$ mg/kg) a nejnižší v olejích lisovaných ($185,79 \pm 9,53$ mg/kg). Ve všech olejích se nachází δ -tokoferol ($30,27 \pm 30,73$ mg/kg), v olejích lisovaných a získaných DME se vyskytuje ještě α -tokoferol ($24,07 \pm 22,10$ mg/kg). Pouze v olejích z DME byl identifikován β -tokoferol, v množství $7,39 \pm 1,38$ mg/kg.

Graf 8: Porovnání průměrného množství tokoferolů u olejů získaných extrakcí DME



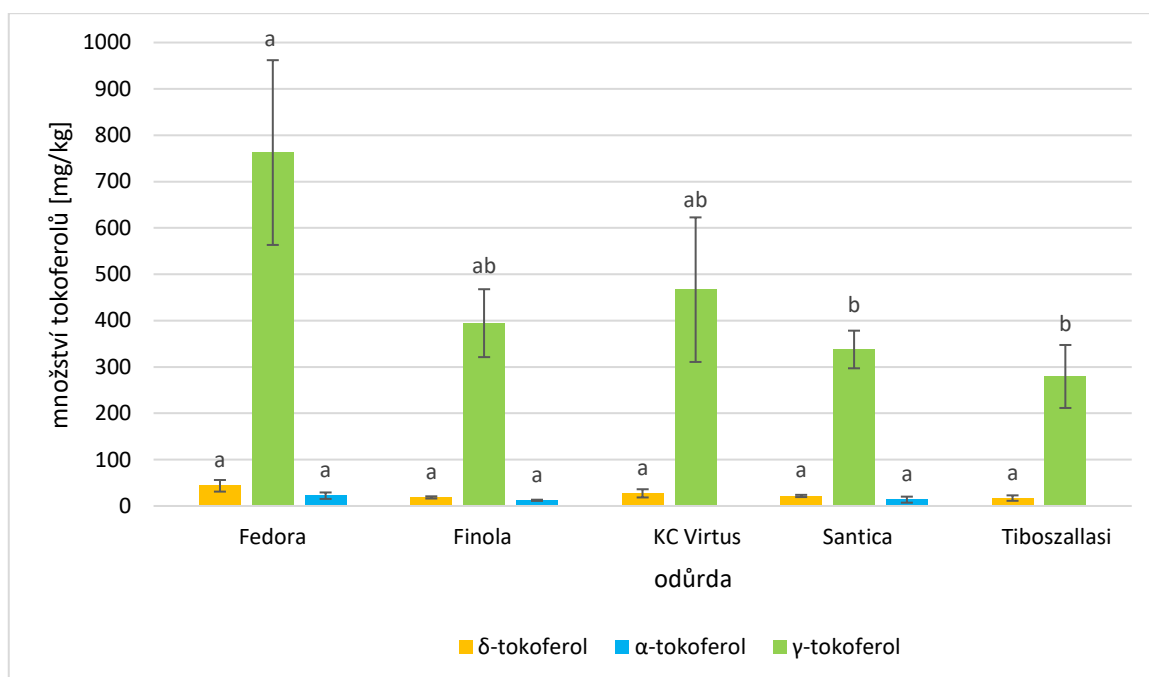
Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Stejné písmeno (a, b) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů mezi odrůdami (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

Graf 9: Porovnání průměrného množství tokoferolů u olejů získaných lisováním



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Stejné písmeno (a, b) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů mezi odrůdami (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

Graf 10: Porovnání průměrného množství tokoferolů u olejů získaných SFE



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Stejné písmeno (a, b) vyjadřuje statisticky nevýznamný rozdíl v rámci jednotlivých skupin tokoferolů mezi odrůdami (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$)

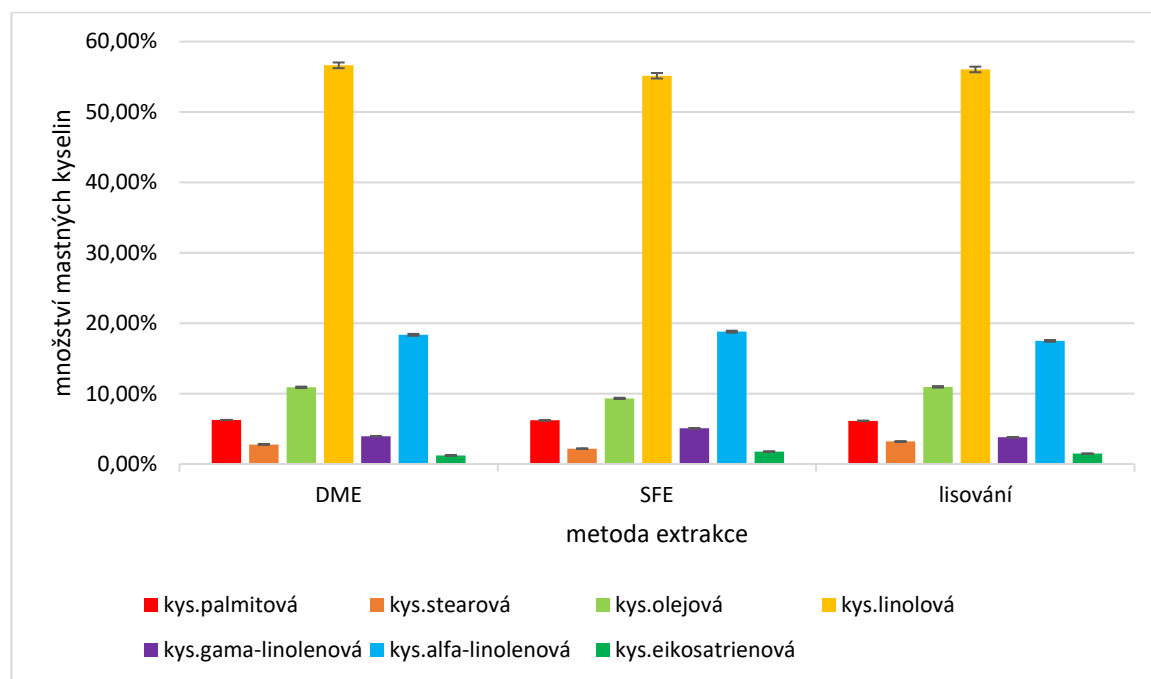
Z grafu 9 je zřejmé, že nejméně tokoferolů u lisovaných olejů obsahuje odrůda Tiborszallasi a Santica. U olejů získaných pomocí DME je množství vyrovnané (viz graf 8). Odrůdy Finola, KC Virtus a Tiborszallasi navíc obsahují i β -tokoferol, který se v žádných jiných olejích nevyskytl. U olejů získaných SFE bylo nejvíce tokoferolů identifikováno v odrůdě Fedora, naopak nejméně v odrůdě Tiborszallasi (viz graf 10). Odrůdy KC Virtus a Tiborszallasi zde vůbec neobsahují α -tokoferol. Množství tokoferolů v olejích se liší v závislosti na použité metodě, ale zejména u metody SFE závisí množství i na odrůdě konopí.

5.4 Mastné kyseliny

V olejích bylo identifikováno celkem 20 mastných kyselin. Mezi extrakčními metodami není statisticky významný rozdíl v zastoupení jednotlivých mastných kyselin (na hladině významnosti $\alpha = 0,05$).

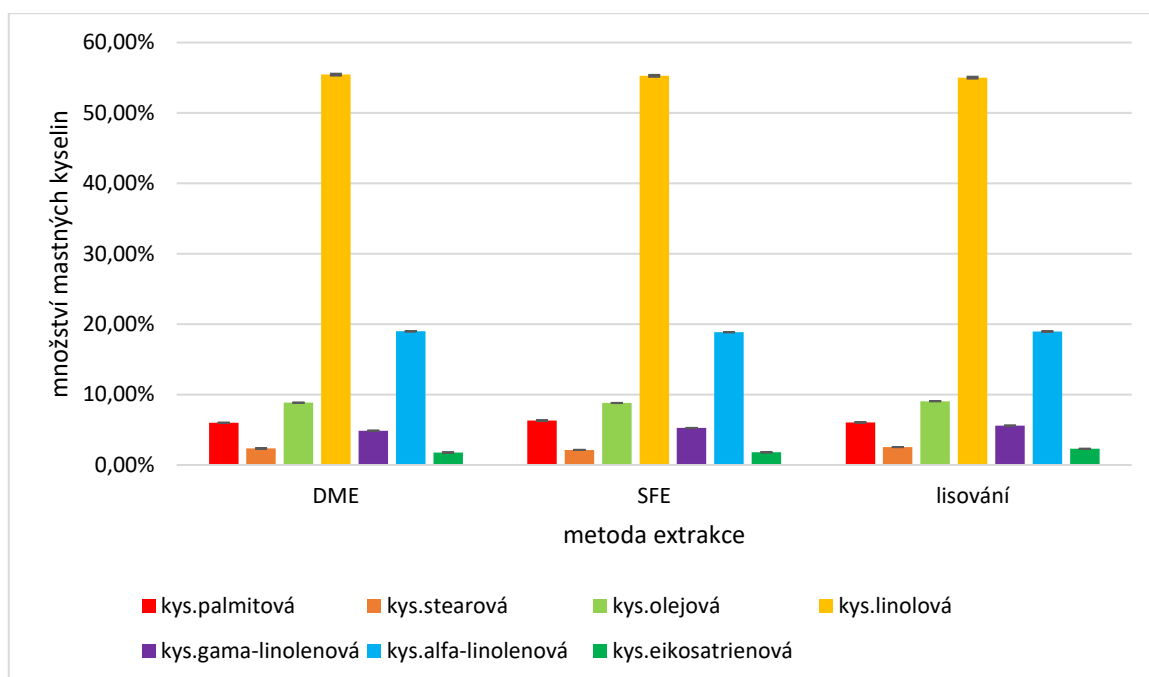
V odrůdě Fedora bylo nalezeno 18 mastných kyselin, z toho pouze 7 přesáhlo 1 % z celkového množství (viz graf 11). Nejzastoupenější mastnou kyselinou je zde kyselina linolová s průměrným množstvím $55,94 \pm 0,71$ %, dále kyselina alfa-linolenová ($18,22 \pm 0,73$ %), kyselina olejová ($10,40 \pm 0,92$ %), kyselina palmitová ($6,20 \pm 0,06$ %), kyselina gama-linolenová ($4,27 \pm 0,73$ %), kyselina stearová ($2,72 \pm 0,56$ %) a kyselina eikosatrienová ($1,48 \pm 0,32$ %).

Graf 11: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) - odrůda Fedora



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem.

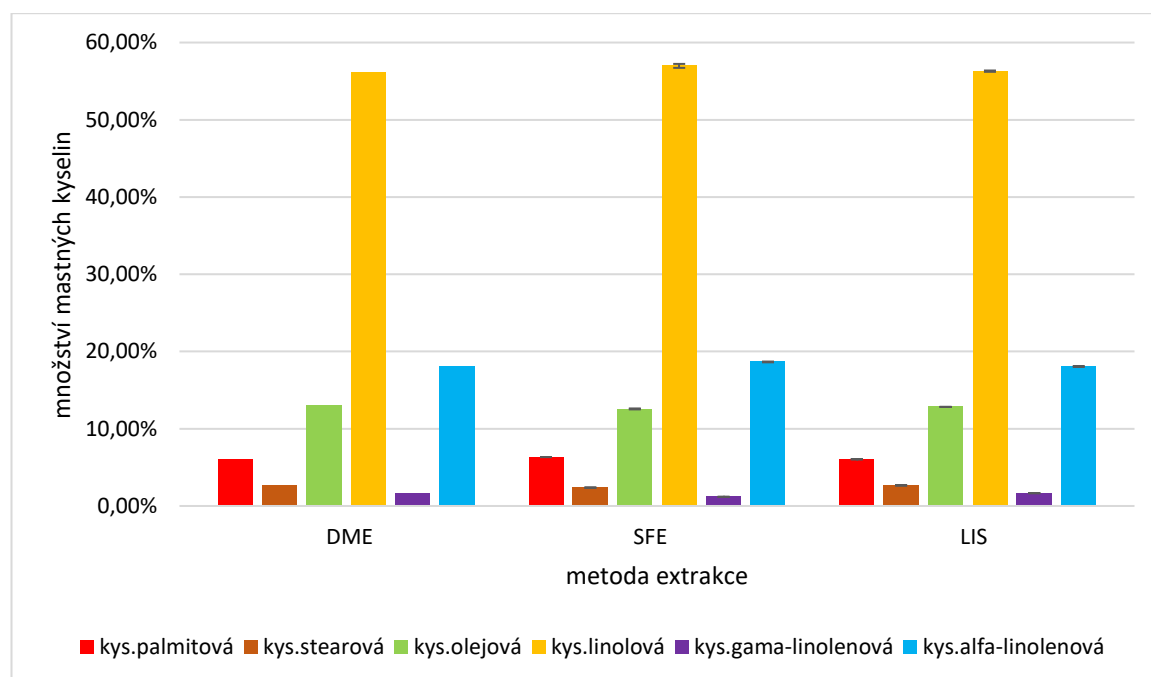
Graf 12: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) - odrůda Finola



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem.

V olejích získaných z odrůdy Finola bylo identifikováno 19 mastných kyselin, z nichž je pouze 7 přítomných v množství nad 1 % (viz graf 12). Nejvíce zastoupenou je kyselina linolová ($55,24 \pm 0,24$ %), dále kyselina alfa-linolenová ($18,93 \pm 0,07$ %), kyselina olejová ($8,90 \pm 0,14$ %), kyselina palmitová ($6,12 \pm 0,25$ %), kyselina gama-linolenová ($5,23 \pm 0,42$ %), kyselina stearová ($2,34 \pm 0,23$ %) a kyselina eikosatrienová ($1,95 \pm 0,34$ %). Mezi zastoupením těchto kyselin v olejích získaných různými způsoby výroby není žádný výrazný rozdíl.

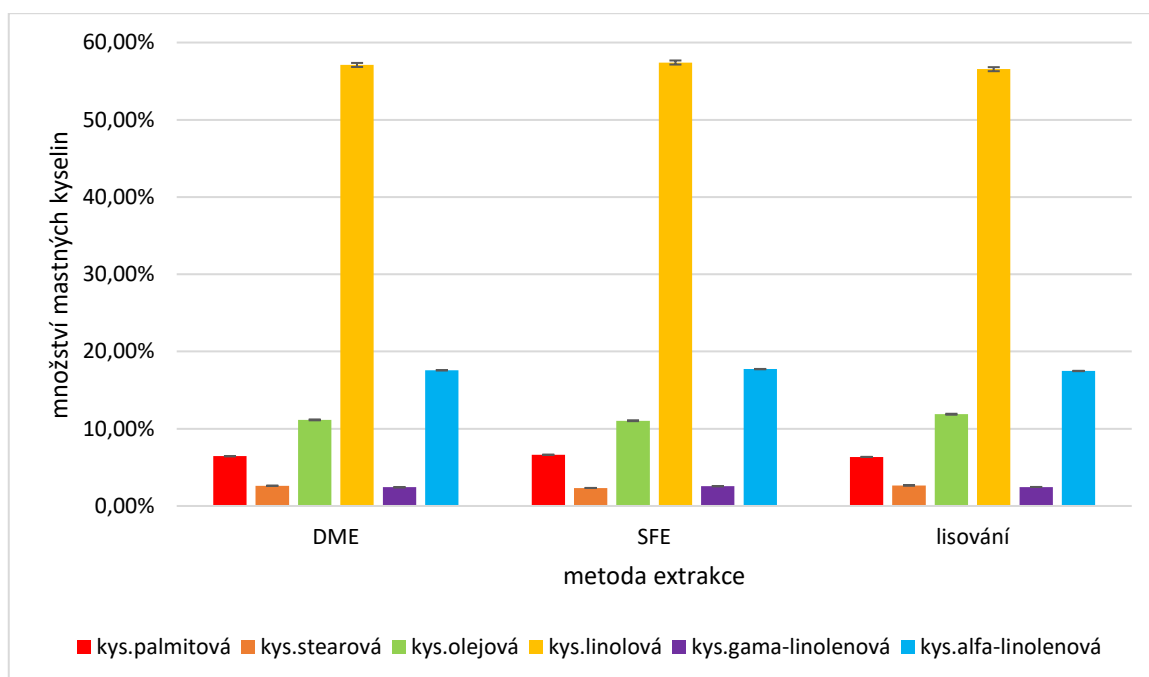
Graf 13: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) v odrůdě KC Virtus



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem.

Oleje získané z odrůdy KC Virtus obsahují 18 mastných kyselin, z toho 6 kyselin přesahuje 1 % z celkového množství mastných kyselin (viz graf 13). Oleje obsahují nejvíce kyseliny linolové ($56,46 \pm 0,54$ %), kyseliny alfa-linolenové ($18,24 \pm 0,42$ %), kyseliny olejové ($12,80 \pm 0,21$ %), kyseliny palmitové ($6,13 \pm 0,23$ %), kyseliny stearové ($2,58 \pm 0,21$ %) a kyseliny gama-linolenové ($1,51 \pm 0,34$ %).

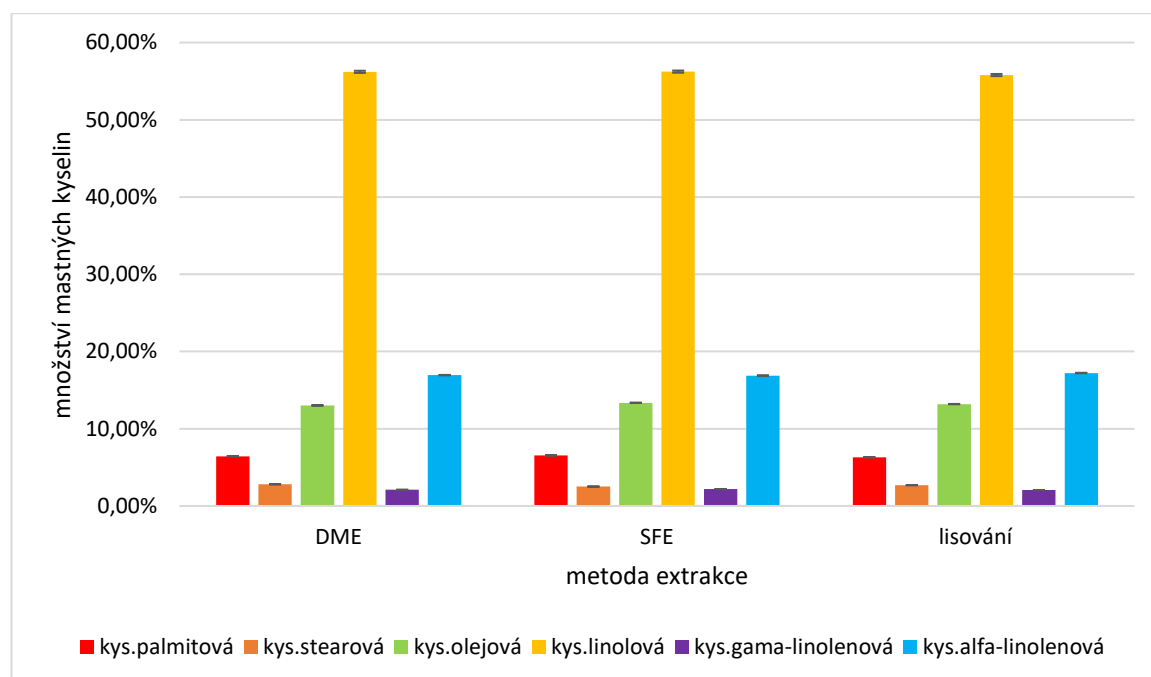
Graf 14: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) v odrůdě Santica



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem.

V olejích vyrobených z odrůdy Santica bylo identifikováno 19 mastných kyselin, z nichž 6 v množství vyšším než 1 % z celkového množství kyselin (viz graf 14). Kyselina linolová vykazuje nejvyšší množství s průměrnou hodnotou $57,02 \pm 0,46$ %. Dalšími zastoupenými kyselinami jsou kyselina alfa-linolenová ($17,59 \pm 0,13$ %), olejová ($11,36 \pm 0,51$ %), palmitová ($6,48 \pm 0,12$ %), stearová ($2,54 \pm 0,23$ %) a gama-linolenová ($2,48 \pm 0,07$ %).

Graf 15: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) v odrůdě Tiborszallasi



Úsečky v grafu vyjadřují směrodatnou odchylku. Zkratky: SFE – superkritická fluidní extrakce, DME – extrakce dimethyl etherem.

V olejích vyrobených z odrůdy Tiborszallasi bylo nalezeno celkem 18 mastných kyselin. Množství 1 % a vyšší z celkového množství vykazuje pouze 6 kyselin (viz graf 15). Nejvíce zastoupenou kyselinou je kyselina linolová ($56,08 \pm 0,25$ %), následuje kyselina alfa-linolenová ($17,01 \pm 0,18$ %), olejová ($13,19 \pm 0,17$ %), palmitová ($6,44 \pm 0,12$ %), stearová ($2,67 \pm 0,15$ %) a gama-linolenová ($2,11 \pm 0,07$ %).

Tabulka 6: Průměrné množství mastných kyselin (do 1 %) u všech olejů

mastná kyselina [%]	SFE					LIS					DME				
	Fedora	Finola	KC.	Santica	Tibors.	Fedora	Finola	KC.	Santica	Tibors.	Fedora	Finola	KC.	Santica	Tibors.
arachová	0,63±0,01	0,61±0,01	0,53±0,01	0,52±0,03	0,64±0,02	0,56±0,49	0,59±0,51	0,82±0,01	0,73±0,02	0,82±0,12	0,59±0,52	0,87±0,11	0,81±0	0,89±0,10	0,80±0,07
behenová	0,21±0	0,19±0	0,03±0	0,17±0,01	0,22±0,01	0,33±0	0,23±0,20	0,31±0	0,29±0,02	0,23±0,20	0,21±0,18	0,36±0,02	0,31±0	0,22±0,15	0,32±0,03
eikosadienová	0,05±0,01														
eikosatrienová			0,69±0,01	0,9±0,02	0,75±0,01			0,65±0,01	0,9±0,04	0,84±0,20			0,64±0	0,86±0,01	0,76±0,03
eikosenová	0,32±0,01	0,35±0,02	0,33±0,01	0,31±0,01	0,32±0,01	0,39±0	0,27±0,23	0,39±0,02	0,37±0,03	0,28±0,04	0,26±0,03	0,4±0,02	0,39±0	0,37±0,02	0,37±0,01
elaidová	0,02±0,01	0,02±0	0,01±0	0,01±0	0,02±0			0,02±0	0,01±0,01						
eruková	0,01±0,01	0,01±0	0,01±0		0,01±0			0,02±0	0,02±0						
heptadecylová	0,05±0,02	0,05±0,01	0,04±0	0,04±0,02	0,04±0,02			0,04±0	0,04±0	0,04±0	0,06±0		0,04±0	0,05±0	
laurová								0,04±0,02							
lignocerová	0,06±0,02	0,06±0,03	0,05±0	0,06±0,01	0,06±0	0,14±0	0,15±0	0,12±0,02	0,12±0	0,14±0,01	0,12±0	0,14±0	0,12±0	0,13±0,04	0,13±0,01
myristoolejová	0,01±0	0,02±0,01	0,02±0	0,02±0											
myristová	0,07±0	0,09±0	0,05±0	0,05±0,01	0,05±0,01			0,03±0	0,04±0	0,03±0	0,06±0		0,03±0	0,04±0	
palmitoolejová	0,12±0	0,13±0,02	0,12±0	0,13±0,01	0,13±0,01	0,14±0	0,11±0	0,1±0	0,13±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01	0,14±0	0,10±0	0,12±0	0,12±0
pentadecylová	0,02±0,01	0,02±0	0,02±0	0,02±0	0,02±0			0,02±0	0,02±0	0,02±0			0,03±0,01		
trikosanová	0,04±0,01		0,04±0,01	0,04±0,01						0,05±0	0,04±0	0,04±0	0,04±0	0,05±0	0,04±0

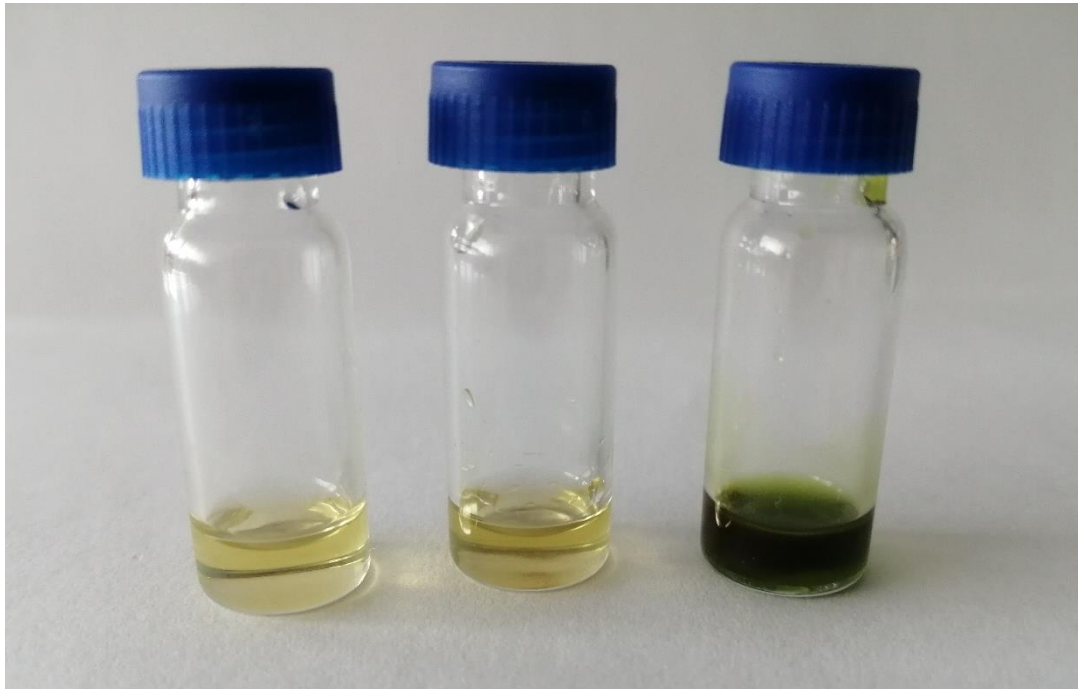
Použité zkratky: KC. - KC Virtus, Tibors. – Tiborszallasi

Mastné kyseliny, které v olejích nepřesahují 1 % z celkového množství kyselin, jsou uvedeny v tabulce 6. Tyto kyseliny se již často liší u jednotlivých metod výroby. Nejvíce kyselin obsahují oleje získané SFE, naopak nejméně oleje extrahované DME.

Nejvyššího množství dosahuje kyselina arachová a eikosatrienová (kys. Meadova), které se vyskytují ve všech odrůdách. Kyselina eikosatrienová se u odrůd Fedora a Finola vyskytuje v množství nad 1 %. Kyselina laurová se vyskytla jen v odrůdě Santica (SFE) a kyselina eikosadienová jen v odrůdě Fedora (SFE). Kyselina elaidová a eruková nebyly vůbec identifikovány v olejích získaných DME. Kyselina myristolejová je pouze v olejích ze SFE.

5.5 Barva olejů

Získané oleje vykazují odlišnou barvu v závislosti na způsobu výroby. Oleje vyrobené metodou SFE mají světle žlutou barvu a jsou nejsvětější. Lisované oleje mají nepatrně tmavší barvu než předchozí. Oleje získané extrakcí DME jsou nejtmavší. Mají tmavě zelenou barvu a zároveň jsou tak jedinými oleji se zeleným odstínem. Barva olejů se nijak neliší v závislosti na odrůdě.



Obrázek 6: Zleva: olej získaný metodou SFE, olej lisovaný, olej získaný extrakcí DME

6. Diskuze

Na základě provedené experimentální části lze zhodnotit hlavní výhody i nevýhody jednotlivých metod. Superkritická fluidní extrakce byla velmi náročná na obsluhu a bylo nutné neustále kontrolovat tlak průtoku mobilní fáze. Extrakce zabrala nejvíce času v porovnání s ostatními metodami, a navíc na přístroji nelze provádět více extrakcí současně. Po jednotlivých odrudách bylo vždy potřeba provést čištění přístroje, které zabralo stejně času jako samotná extrakce.

Extrakce dimethyl etherem a lisování za studena jsou relativně rychlé a jednoduché metody. Samotná extrakce DME se obešla bez jakékoliv další manipulace a mohlo probíhat více extrakcí najednou, což představuje velkou výhodu a úsporu času. Lisování mohlo sice probíhat pouze jedno, ale trvalo jen 5 min. Obě metody se náročností vyrovnají, ale DME extrakce navíc nepotřebuje složité vybavení. Další výhody, které se týkají kvality olejů vyrobených jednotlivými metodami, vyplývají z následujících kapitol.

6.1 Výtěžnost olejů

Z výsledků je zřejmé, že existuje rozdíl ve výtěžnosti olejů v závislosti na použité metodě výroby. Extrakce DME poskytuje nejvyšší množství oleje na sušinu semen (až 31,83 %). Stejného množství dosáhl i Subratti et al. (2019) při extrakci namletých konopných semen. Výtěžnost z lisování je nižší, než u extrakce DME, ačkoliv bylo uvolňování oleje podpořeno zahříváním (kondicionáním) semen. Semena se ale před lisováním mechanicky neupravovala, což mohlo způsobit nižší výtěžnost. Do budoucna by bylo zajímavé sledovat vliv různých druhů předúpravy semen na výtěžnost a kvalitu lisovaného oleje. Ke stejnému výsledku, kdy výtěžnost olejů získaných rozpouštědlem převýšila výtěžnost olejů lisovaných, došli i Çakaloğlu et al. (2018), Yilmaz & Güneşer (2017) a Ixtaina et al. (2011).

Extrakcí superkritickým oxidem uhličitým bylo získáno nejméně oleje (4,96 %). Podle studií od Devi & Khanam (2019) a Aladić et al. (2015) by však tato metoda měla zajistit maximální výtěžnost u konopných semen (přes 35 %) při extrakci dlouhé 240-300 min a tlaku 300-400 bar. Grijó et al. (2019) prováděl tuto extrakci při tlaku 400 bar po dobu 240 min a výtěžnost dosáhla na 43 %. V rámci tohoto pokusu však trvala extrakce pouze 20 min, protože již nedocházelo k uvolňování oleje.

6.2 Obsah tokoferolů

Obsah tokoferolů je u olejů velmi proměnlivý. Nejméně tokoferolů bylo nalezeno v olejích vyrobených metodou SFE, kde jich je průměrně $458 \pm 199,14$ mg/kg, nejméně pak u odrůdy Tiborszallasi (296,5 mg/kg). Toto množství je stále vyšší, než bylo nalezeno během analýzy v konopném oleji vyrobeném SFE, kterou popsal Grijó et al. (2019). Výroba proběhla za stejného tlaku i teploty, ale po dobu 240 min a celkově zde bylo nalezeno jen 192 mg/kg tokoferolů. Naproti tomu Aiello et al. (2019) provedl v rámci své studie extrakci konopného oleje metodou SFE za stejné teploty, ale nižšího tlaku (300 bar) po dobu 195 min a celkové průměrné množství tokoferolů zde přesáhlo 800 mg/kg. Aladić et al. (2015) provedl také extrakci za tlaku 300 bar, ale tokoferolů bylo nalezeno jen 292 mg/kg. Z toho lze usoudit, že tlak pravděpodobně není rozhodujícím parametrem pro zachování obsahu tokoferolů. U zmíněných studií je ale shoda v zastoupení jednotlivých tokoferolů, kdy také nebyl v těchto olejích nalezen β -tokoferol.

Lisované oleje obsahují průměrně $650,21 \pm 268,73$ mg/kg tokoferolů. Je zde velký rozdíl mezi odrůdami, zejména Tiborszallasi jich obsahuje výrazně méně než ostatní. Nicméně toto průměrné množství se o moc neliší s množstvím, které v lisovaných konopných olejích identifikovali Teh & Birch (2013) a Latif & Anwar (2009), kde bylo průměrně 592 a 691 mg/kg tokoferolů.

Oleje získané extrakcí DME jsou na obsah tokoferolů nejbohatší, obsahují průměrně $848,76 \pm 14,83$ mg/kg tokoferolů. Podle analýz od Aiello et al. (2019) a Grijó et al. (2019) je toto množství podobné tomu, které bylo identifikováno v olejích extrahovaných hexanem (746-1000 mg/kg). Extrakce DME se tak v tomto případě vyrovnala extrakci hexanem, a navíc převyšuje hexan dalšími výhodami, které již byly zmíněny.

6.3 Mastné kyseliny

Kyselina linolová (55,24-57,02 %), alfa-linolenová (17,01-18,93 %), olejová (8,9-13,19 %), palmitová (6,12-6,44 %), stearová (2,34-2,72 %), gama-linolenová (1,51-5,23 %), arachová (0,6-0,75 %), behenová (0,18-0,26 %), palmitoolejová (0,04-0,13 %) lignocerová (0,05-0,09 %), myristová (0,01-0,09 %) a jejich zastoupení přibližně odpovídá tomu, které popsali v konopných olejích Zhou et al. (2017), Da Porto et al. (2012), Kiralan et al. (2010), Callaway (2004), Parker et al. (2003) a Kovářová et al. (2002).

Oleje získané superkritickou fluidní extrakcí obsahují rozmanitější skladbu minoritních mastných kyselin než oleje z ostatních metod. Některé zdroje uvádějí v různých olejích

vyrobených metodou SFE mnohem více zástupců některých skupin látek než u jiných metod výroby, jsou to např. polyfenoly, fytoosteroly, terpeny a aldehydy (Grijó et al. 2019; Anjaneyulu et al. 2017; Marongiu et al. 2004). U mastných kyselin se ale uvádějí zpravidla jen ty nejvíce zastoupené, a ty se od sebe neliší v závislosti na způsobu extrakce. Nicméně se ve všech těchto olejích objevila v malém množství kyselina elaidová, která se řadí mezi trans nenasycené mastné kyseliny. Jedná se o trans formu kyseliny olejové a nejčastěji se vyskytuje v margarínech. V lisovaných olejích se vyskytla pouze u dvou odrůd a v olejích extrahovaných DME úplně chybí. Trans nenasycené mastné kyseliny představují v každodenní stravě problém, protože se podílí např. na vzniku aterosklerózy a ischemické chorobě srdeční. Zvyšují také hladinu nežádoucího LDL cholesterolu a snižují hladinu HDL cholesterolu (Ohmori et al. 2016).

6.4 Barva

V současné době neexistuje standardizovaná škála pro hodnocení barvy konopných olejů, proto proběhlo hodnocení pouze subjektivně pomocí zraku. Barva získaných olejů se liší v závislosti na způsobu výroby. Oleje získané DME obsahují nejvíce barviv, což by ale například podle Subratti et al. (2019), Aladić et al. (2015) a Hannides et al. (2014) měly obsahovat lisované oleje, kde díky mechanické destrukci dojde k lepšímu uvolnění chlorofylů.

Oleje získané SFE se jeví jako nejsvětlejší. Při delší době extrakce by ale mělo dojít k nárůstu uvolněných barviv. V analýze, kterou prováděl Aladić et al. (2015), stouplо množství chlorofylů z 12 na 146 mg/kg a množství karotenoidů z 8 na 56 mg/kg během 30-210 min extrakce. Na druhou stranu Sun et al. (2019) provedl extrakci konopných semen stejnou metodou po dobu 210 min a získaný olej byl stále velmi světlý a světlejší než olej extrahovaný rozpouštědlem.

6.5 Číslo kyselosti (ČK)

Volné mastné kyseliny se považují za důležitý index kvality olejů. Kvalita olejů klesá s rostoucí hodnotou čísla kyselosti, volné mastné kyseliny mohou ovlivňovat chuť i vůni, a navíc mají tyto oleje horší skladovatelnost kvůli vyšší náchylnosti na oxidaci (Liang et al. 2015; Paradiso et al. 2010; Callaway & Pate 2008).

Oleje ze SFE mají mnohem vyšší ČK než ostatní metody, průměrně $4,24 \pm 0,61$ mg KOH/g. Dostupná literatura uvádí různá čísla kyselosti u konopných olejů získaných SFE, kde se tato hodnota pohybuje v rozmezí 0,51-1,74 mg KOH/mg (Grijó et al. 2019; Sun et al. 2019; Bala et al. 2016). ČK u olejů ze SFE by tak měla být pravděpodobně více podobná těm u olejů

lisovaných a extrahovaných DME. Vzhledem k tomu, že tyto oleje mají nejvyšší ČK, jsou i nejvíce náchylné na oxidaci a mají horší skladovatelnost.

Lisované oleje mají průměrnou hodnotu ČK $0,76 \pm 0,29$ mg KOH/g. Podle Teh & Birch (2013) bylo ČK lisovaných konopných olejů 1,76 mg KOH/g, podle Oseyko et al. (2019) 1,6-2,6 mg KOH/g a podle Poustkové et al. (2010) zase 4,14 mg KOH/g. Tyto hodnoty se od sebe velmi liší, ale odpovídají hodnotám, které stanovil Morar et al. (2010) v deseti lisovaných konopných olejích. Čísla kyselosti jsou zde v rozmezí 0,65 až 4,45 mg KOH/g. Vliv na ČK může mít staří semen a podmínky skladování, proto je hodnota ČK velmi proměnlivá (Balešević-Tubić et al. 2010). V provedeném pokusu mají lisované oleje nejnižší ČK a měly by tak být nejméně náchylně na oxidaci.

Oleje získané extrakcí DME mají průměrnou hodnotu ČK $1,18 \pm 0,13$ mg KOH/g. Tuto hodnotu lze porovnat s ČK konopných olejů extrahovaných jinými rozpouštědly, např. petroletherem, kde bylo stanoveno číslo 1,86 mg KOH/g a s číslem 2,15 mg KOH/g, které bylo stanoveno v oleji vyrobeném extrakcí hexanem (Senila et al. 2020; Borhade 2013). Pokud je mi známo, v literatuře doposud nebyla publikována data o konopných olejích z extrakce DME, a proto nelze tato čísla více porovnat.

7. Závěr

Experimentální část práce prokázala, že existuje vliv způsobu výroby konopných semen na výtěžnost a výslednou kvalitu konopného oleje, hypotéza se tedy potvrdila. Superkritická fluidní extrakce se neosvědčila jako vhodná metoda pro výrobu konopných olejů. Tyto oleje dopadly nejhůře ve všech hodnocených kritériích. Získané hodnoty se však s dostupnou literaturou téměř neshodovaly. Jistě by tak bylo vhodné se touto extrakcí i nadále zabývat, protože dostupné zdroje naopak popisují metodu SFE jako vhodnou pro extrakci konopných olejů.

Extrakce dimethyl etherem zajistila nejvyšší výtěžnost i obsah tokoferolů, dále nízké číslo kyselosti a zelenou barvu, která je u konopného oleje žádoucí. Navíc v olejích nebyly vůbec identifikovány trans nenasycené mastné kyseliny a doba extrakce byla poměrně krátká. Tato metoda se v experimentu ukázala jako nejlepší pro výrobu konopného oleje. Lisované oleje se kvalitou přiblížily olejům z DME, ačkoliv poskytlo lisování nízkou výtěžnost oleje ze semen. V dnešní době, kdy se stále více klade důraz na ekologii a kvalitu potravin, má extrakce DME velký potenciál nahradit stávající extrakce rozpouštědly.

8. Literatura

- Ahmad T, Masoodi FA, Rather SA, Wani SM, Gull A. 2019. Supercritical Fluid Extraction: A Review. *The Journal of Biological Chemistry* **5**:114-122.
- Aiello A, Pizzolongo F, Scognamiglio G, Romano A, Masi P, Romano R. 2020. Effects of supercritical and liquid carbon dioxide extraction on hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *International Journal of Food Science and Technology*:1-9.
- Aladić K, Jokic S, Moslavac T, Tomas S, Vidovic S, Vladic J, Šubaric D. 2014. Cold Pressing and Supercritical CO₂ Extraction of Hemp (*Cannabis sativa*) Seed Oil. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **4**:481-490.
- Aladić K, Jarni K, Barbir T, Vidovic S, Vladic J, Bilic M, Jokic S. 2015. Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Industrial Crops and Products* **76**:472-478.
- 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* **84**:323-329.
- Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM. 2008. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *Journal of Natural Products* **71**:1427–1430.
- Ayala RS, De Castro MDL. 2001. Continuous Subcritical Water Extraction as a Useful Tool for Isolation of Edible Essential Oils. *Food Chemistry* **75**:109-113.
- Anjaneyulu B, Satyannarayana S, Kanjilal S, Siddaiah V, Prasanna Rani KN. 2017. A comparative study of solvent and supercritical CO₂ extraction of *Simarouba glauca* seed oil. *International Journal of Fats and Oils* **68**.
- Bala M, Madhu B, Tyagi SK, Gupta RK. 2016. Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of Safflower Seed Oil Using Response Surface Methodology. *Asian Journal of Chemistry* **28**:1579-1583.
- Balešević-Tubić S, Tatic M, Dordevic V, Nikolic Z, Dukic V. 2010. Seed viability of oil crops depending on storage conditions. *HELIA* **33**:153-160.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. *Edible Fats and Oils*. Food Chemistry 640-653.

- Bell AJ, Duggin G. 2002. Acute methyl salicylate toxicity complicating herbal skin treatment for psoriasis. *Emergency Medicine* **14**:188-190.
- Borhade SS. 2013. Chemical Composition and Characterization of Hemp (*Cannabis sativa*) Seed oil and essential fatty acids by HPLC Method. *Scholars Research Library, Archives of Applied Science Research* **5**:5-8.
- Borhade SS. 2013. Synthesis and Analytical Study of Fatty Acid Methyl Ester of *Cannabis sativa* (Hemp) Seed Oil in the Presence of Triglycerides. *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*: 6-9.
- Bouayoun T, Stambouli HA, Ez Zoubi Y, El Bouri A, Farah A, Tabyaoui M. 2018. Hemp seed oil: Chemical characterization of three non-drug varieties cultivated in Morocco. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* **5**:37-41.
- Budisa N, Schulze-Makuch D. 2014. Supercritical Carbon Dioxide and Its Potential as a Life-Sustaining Solvent in a Planetary Environment. *Life* **4**:331-340.
- Çakaloğlu B, Özyurt VH, Ötleş S. 2018. Cold press in oil extraction. *Ukrainian Food Journal* **7**:640-654.
- Callaway JC, Pate DW. 2010. *Hempseed Oil. Hempseed NEW*. Australia.
- Callaway JC, Pate DW. 2008. *Hempseed Oil*. Departments of Pharmaceutical Chemistry and Neurobiology. Finland.
- Callaway JC. 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* **140**: 65–72
- Carus M. 2017. *The European Hemp Industry: Cultivation, processing and applications for fibres, shivs, seeds and flowers*. European Industrial Hemp Association.
- Carus M, Karst S, Kauffmann A, Hobson J, Bertucelli S. 2013. *The European Hemp Industry: Cultivation, processing and applications for fibres, shivs, seeds and flowers*. European Industrial Hemp Association.
- Citeau M, Slabi SA, Joffre F, Carré P. 2018. Improved rapeseed oil extraction yield and quality via cold separation of ethanol miscella. *Oilseeds & fats Crops and Lipid* **25**:1-9.
- Citti C, Linciano P, Panseri S, Vezzalini F, Forni F, Vandelli MA, Cannazza G. 2019. Cannabinoid Profiling of Hemp Seed Oil by Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Frontiers in Plant Science*.

- Daniel M, Mammen D. 2016. Analytical methods for Medicinal Plants and Economic Botany. Scientific Publishers. India.
- Da Porto C, Decorti D, Tubaro F. 2012. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products* **36**:401-404.
- Devi V, Khanam S. 2019. Comparative study of different extraction processes for hemp (*Cannabis sativa*) seed oil considering physical, chemical and industrial-scale economic aspects. *Journal of Cleaner Production* **207**:645-657.
- Douša M. Fyzikálně-chemické vlastnosti karotenoidů. Available at <http://hplc1.sweb.cz/> (accessed September 04, 2019).
- Downer EJ, Campbell VA. 2010. Phytocannabinoids, CNS cells and development: a dead issue? *Drug Alcohol Rev.* **29**:8-91.
- EFSA-European Food Safety Authority. 2015. Scientific Opinion on the safety of use of dimethyl ether as an extraction solvent under the intended conditions of use and the proposed maximum residual limits. *EFSA Journal* **13**:4174.
- Eitenmiller R, Lee J. 2004. Vitamin E: Food Chemistry, Composition, and Analysis. Marcel Dekker, New York, Basel.
- Falco MD. 2017. Dimethyl Ether (DME) Production. Oil-Gas portal.
- Fišar Z. 2006. Fytokannabinoidy. *Chemické listy: Referáty*:233–242.
- Gaynor P. 2017. GRAS Notice for the Use of Dimethyl Ether as an Extraction Solvent. Office of Food Additive Safety.
- Ghazani SM, Marangoni AG. 2013. Minor Components in Canola Oil and Effects of Refining on These Constituents: A Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **90**:923-932.
- Grijó DR, Piva GK, Osorio IV, Cardozo-Filho L. 2019. Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extraction with pressurized n-propane and supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* **143**:268-274.
- Hannides AK, Glazer BT, Sansone FS. 2014. Extraction and quantification of microphytobenthic Chl a within calcareous reef sands. *Limnology and Oceanography Methods* **12**:126-138.

Hemp seed in westword.com. Available at

<https://images1.westword.com/imager/u/745xauto/9890793/hemp-seed-shutterstock.jpg>.

(accessed September 04, 2019).

Herrero A, Cifuentes A, Ibáñez E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry* **98**:136-148.

Holler J, Bosy T, Dunkley CH, Levine B, Past M, Jacobs A. 2008. 9 - Tetrahydrocannabinol Content of Commercially Available Hemp Products *Journal of Analytical Toxicology* **32**:8.

Honzík R, Bjejková M, Muñoz J, Váňa V. 2012. Pěstování konopí setého *Cannabis sativa* L. pro výrobu bioplynu. *Metodika pro praxi. Výzkumný ústav rostlinné výroby*.

Chen T, He J, Zhang J, Zhang H, Qian P, Hao J, Li L. 2010. Analytical characterization of Hempseed (seed of *Cannabis sativa* L.) oil from eight regions in China. *Journal of Dietary Supplements*: **7**:117-129.

Irakli M, Tsaliki E, Kalivas A, Kleisiaris F, Sarrou E, Cook CM. 2019. Effect of Genotype and Growing Year on the Nutritional, Phytochemical, and Antioxidant Properties of Industrial Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seeds. *Antioxidants* **8**:491.

Ixtaina VY, Martínez ML, Spotorino V, Mateo CM, Maestri DM, Diehl BWK, Nolasco SM, Tomás MC. 2011. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**:166-174.

Kaválek M. 2016. Technologie výroby konopného oleje. *Zemědělský týdeník-Polnohospodárky týždenník*:6.

Khan S, Lisa SA, Obaid M, Chowdhury K. 2015. Tocopherol content of vegetable oils/ fats and their Oxidative deterioration during storage. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* **4**:1537-1548.

Khaw KY, Parat MO, Shaw PN, Falconer JR. 2017. Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review. *Molecules* **22**:1186.

Kiralan M, Gul V, Kara SM. 2010. Fatty acid composition of hempseed oils from different locations in Turkey. *Spanish Journal of Agricultural Research* **8**:385-390.

Klouda P. 2003. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda – nakladatelství Pavko, Ostrava.

- Kovářová M, Abrham Z, Jevič P, Šedivá Z, Kocánová V. 2002. *Ekonomika pěstování a využití nepotravinářských plodin*. Výzkumný ústav zemědělské techniky Praha.
- Kriese U, Schumann E, Weber WE, Beyer M, Brühl L, Matthäus. 2004. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica* **137**:339-351.
- Latif S, Anwar F. 2009. Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *European Journal of Lipid Science and Technology* **111**:1042–1048.
- Layton C, Reuter WM. 2018. Analysis of Cannabinoids in Hemp Seed Oils by HPLC Using PDA Detection. PerkinElmer: Liquid Chromatography.
- Leizer C, Ribnicky D, Poulev A, Dushenkov S, Raskin I. 2000. The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods* 4. The Haworth Press.
- Leticia AM, Pighinelli T, Gambetta R. 2012. Oil Presses. Oilseeds, Uduak G. Akpan, IntechOpen.
- Liang J. 2017. Value-addition of cold pressed hemp seed oil and oil by-products through ultrasonic bleaching and heat treatment: Evaluation of chlorophyll, oxidative stability and antioxidant activity. Department of Human Nutritional Sciences University of Manitoba Winnipeg.
- Liang J, Aachary AA, Thiyam – Holländer U. 2015. Hemp seed oil: Minor components and oil quality. *Lipid Technology* **27**:231-233.
- Marcus Y. 2018. Extraction by Subcritical and Supercritical Water, Methanol, Ethanol and Their Mixtures. Institute of Chemistry.
- Market Research Report. Available at <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-hemp-market> (accessed February 16, 2020).
- Markets and Markets. Available at <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-hemp-market-84188417.html> (accessed October 24, 2019).

- Marongiu B, Piras A, Porcedda S. 2004. Comparative Analysis of the Oil and Supercritical CO₂ Extract of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:6278-6282.
- Matthäus B, Brühl L. 2008. Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *European Journal of Lipid Science and Technology* **7**:655–661.
- Meiner CH, Mediavilla V. 1998. Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *Journal of the International Hemp Association* **5**:16-20.
- Mikkelsen SH, Warming M, Syska J, Voskian A. 2014. Survey of n-hexane. Danish Ministry of the Environment: Environmental Protection Agency.
- Mikulcová V, Kašpárková V, Humpolíček P, Buňková L. 2017. Formulation, Characterization and Properties of Hemp Seed Oil and Its Emulsions. *Molecules* **5**:700.
- Ministerstvo zdravotnictví ČR. 2009. Český lékopis. Grada.
- Miovský M. 2011. Konopí a konopné drogy. Adiktologické kompendium.
- Mölleken H. 1998. Trans-fatty acids in heated hemp seed oil. *Journal of the International Hemp Association* **5**:21-23.
- Montserrat-de la Paz S, Marín-Aguilar F, García-Gimenez MD, Fernández-Arche A. 2014. Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. Genotypes.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **5**.
- Morar MV, Dragan K, Bele C, Matea C, Tarta I, Suharovschi R, Semeniuc C. 2010. Researches Regarding the Processing of the Hemp Seed by Cold Pressing. *Bulletin UASVM Agriculture* **67**:284–290.
- Natural R,R,R-tocopherols and R,R,R-tocotrienols.. in OMICS International. Available at <https://www.omicsonline.org/articles-images/2155-9899-4-137-g001.html> (accessed September 04, 2019).
- O'Brien RD. 2004. *Fats and oils: Formulating and Processing for Applications*. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Ohmori H, Fujii K, Kadochi Y, Moris S, Nishiguchi Y, Fujiwara R, Kishi S, Sasaki T, Kuniyasu H. 2016. Elaidic Acid, a Trans-Fatty Acid, Enhances the Metastasis of Colorectal Cancer Cells. *Pathobiology* **84**:144–151.

- Oomah BD, Busson M, Godfrey DV, Drover JCG. 2002. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry* **76**:33-43.
- Oseyko M, Sova M, Lutsenko M, Kalyna V. 2019. Chemical aspects of the composition of industrial hemp seed products. *Ukrainian Food Journal* **8**:544-558.
- Paradiso VM, Gomes T, Nasti R, Caponio F, Summo C. 2010. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. *Food Research International* **43**:1389-1394.
- Parker TD, Adam DA, Zhou K, Harris M, Yu L. 2003. Fatty Acid Composition and Oxidative Stability of Cold-pressed Edible Seed Oils. *Food Chemistry and Toxicology* **68**:1240-1243.
- Patil AA, Bhusari SS, Shinde DB, Wakte PS. 2013. Optimization of process variables for phyllanthin extraction from *Phyllanthus amarus* leaves by supercritical fluid using a Box-Behnken experimental design followed by HPLC identification. *Acta Pharm* **63**:193-207.
- Patil AA, Sachin BS, Wakte PS, Shinde DB. 2014. Optimization of supercritical fluid extraction and HPLC identification of wedelolactone from *Wedelia calendulacea* by orthogonal array design. *Journal of Advanced Research* **5**:629-635.
- Petrović M, Debeljak Ž, Kezi N, Džidara P. 2015. Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils. *Food Chemistry* **170**:218–225.
- Popa M, Glevitzky I, Dumitrel GA, Glevitzky M, Popa D. 2017. Study on peroxide values for different oils and factors affecting the quality of sunflower oil. *Scientific Papers* **6**.
- Pourmortazavi SM, Rahimi-Nasrabadī M, Hajimirsadeghi SS. 2014. Supercritical fluid technology in analytical chemistry—review. *Cur Analyt Chem* **10**:3–28.
- Poustková I, Babička L, Kouřimská L, Siegrová G, Staruch L. 2010. Quality of hemp seed oil depending on its obtaining. *Potravinářstvo* **4**:53-57.
- Research and Markets: Global Hemp Oil Market Size. Available at <https://www.researchandmarkets.com/reports/4701631/global-hemp-oil-market-size-market-share> (accessed October 24, 2019).
- Ruman M, Včeláková M. 2008. Konopí – léčivá pochoutka. *Potravinářská Revue* **2**:31-34.
- Russo R, Reggiani R. 2015. Protein concentration and amino acid profile in hempseed and flaxseed meal. conference: Eucarpia International Symposium on Protein Crops.

- Saastamoinen M, Eurola M, Hietaniemi V. 2016. Oil, Protein, Chlorophyll, Cadmium and Lead Contents of Seeds in Oil and Fiber Flax (*Linum usitatissimum* L.) Cultivars and in Oil Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivar Finola Cultivated in South-Western Part of Finland. *Journal of Food Chemistry & Nanotechnology* **2**:73-76.
- Sakugari K, Li P, Otaka M, Makino H. 2016. Recovery of Bio-Oil from Industrial Food Waste by Liquefied Dimethyl Ether for Biodiesel Production. *Energies* **9**.
- Senila L, Neag E, Cadar O, Kovacs MH, Bezce A, Senila M. 2020. Chemical, Nutritional and Antioxidant Characteristics of Different Food Seeds. *Applied Sciences* **10**:1-16.
- Subratti A, Lalgee LJ, Jalsa NK. 2019. Liquefied dimethyl ether (DME): A green solvent for the extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **12**:1-5.
- Sun J, You X, Wei P, Zhang Y, Liu G, Li M, Zhou K, Wang Y. 2019. Optimal process of supercritical carbon dioxide extracting Bama hempseed oil and its physicochemical property. *Journal of Food Science & Technology* **4**:912-923.
- Suriyonga S, Krittigamasa N, Pinmaneeb S, Punyalueb A, Vearasilp S. 2015. Influence of storage conditions on change of hemp seed quality. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* **5**:170–176.
- Sapkale GN, Patil SM, Surwase US, Bhatbhage PK. 2010. Supercritical fluid extraction. *International Journal of Chemical Sciences* **8**:729-743.
- Savoire R, Lanoisellé JL, Vorobiev E. 2012. Mechanical Continuous Oil Expression from Oilseeds: A Review. *Food Bioprocess Technol.* Springer.
- 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.
- Sladký V. 2004. Konopí, šance pro zemědělství a průmysl. *Ústav zemědělských a potravinářských informací*:7-17.
- Šivel M, Klejdus B, Kráčmar S, Kubáň V. 2013. Lutein – významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické listy* **107**:456-463.
- Taheri-Garavand A, Nassiri A, Gharibzahedi SMT. 2010. Physical and mechanical properties of hemp seed. *International Agrophysics* **26**:211-215.

- Teh SS, Birch EJ. 2013. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *Journal of Food Composition and Analysis* **1**:26-31.
- Thomas BF, Elsohly MA. 2016. *The Analytical Chemistry of Cannabis. Quality Assessment, Assurance, and Regulation of Medicinal Marijuana and Cannabinoid Preparations*. Elsevier.
- Vanhanen L, Marín-Aguilar F, Azadmard-Damirchi S, Dutta PC. 2005. Phytosterols in New Zealand specialty oils. *Proceeding of the Nutrition Society of New Zealand*:56-59.
- World Health Organization. 2018. *Cannabidiol (CBD). Critical Review Report*. Geneva.
- WVFC – West Virginia Farmers Cooperative. 2014. Available at <https://wvhemp.org/about-agricultural-hemp/resources>(accessed September 04, 2019).
- Yilmaz E, Güneşer BA. 2017. Cold pressed versus solvent extracted lemon (*Citrus limon* L.) seed oils: yield and properties. *Journal of Food Science and Technology* **54**:1891–1900.
- Yousefi M, Hosseini H. 2017. Evaluation of Hexane Content in Edible Vegetable Oils Consumed in Iran. *Journal of Experimental and Clinical Toxicology* **1**.
- Yusuf AK. 2017. A Review of Methods Used for Seed Oil Extraction. *International Journal of Science and Research (IJSR)*: 233-238.
- Yusuf AK, Olaniyan AM, Atanda EO, Sulieman IA. 2014. Effect of heating temperature and seed condition on the yield and quality of mechanically expressed groundnut oil. *International Journal of Technology Enhancements and Emerging Engineering Research* **2**:73-78.
- Zhou Q, Huang F, Zheng CH, Guo P, Li W, Liu CH, Wan CH. 2017. Physicochemical properties and volatile components of hempseed oils in Bama region. *Oil Crop Science* **2**:13-22
- Zougagh M, Valcárcel M, Ríos A. 2004. Supercritical fluid extraction: a critical review of it analytical usefulness. *Trends in Analytical Chemistry* **23**:399-405.
- Zychová M, Růžičková M, Macák J, Janda V. 2013. Vlastnosti a použití superkritické vody. *Chemické Listy* **107**:126-135.

9. Seznam grafů, obrázků a tabulek

Grafy

- Graf 1: Porovnání průměrných výtěžností extrakčních metod
- Graf 2: Porovnání průměrných čísel kyselosti olejů u všech odrůd
- Graf 3: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Fedora
- Graf 4: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Finola
- Graf 5: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda KC Virtus
- Graf 6: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Santica
- Graf 7: Průměrné množství tokoferolů v oleji – odrůda Tiborszallasi
- Graf 8: Porovnání průměrného množství tokoferolů u olejů získaných extrakcí DME
- Graf 9: Porovnání průměrného množství tokoferolů u olejů získaných lisováním
- Graf 10: Porovnání průměrného množství tokoferolů u olejů získaných SFE
- Graf 11: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) - odrůda Fedora
- Graf 12: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) - odrůda Finola
- Graf 13: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) - odrůda KC Virtus
- Graf 14: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) - odrůda Santica
- Graf 15: Zastoupení mastných kyselin (nad 1 %) - odrůda Tiborszallasi

Obrázky

- Obrázek 1: Konopná semena
- Obrázek 2: Přírodní tokoferoly a tokotrienoly
- Obrázek 3: Extrakce oleje pomocí extraktoru Dexso Professional
- Obrázek 4: Olej získaný extrakcí DME
- Obrázek 5: Viditelné rozdělení vzorku na dvě části (stanovení MK)

Tabulky

- Tabulka 1: Typické nutriční hodnoty (mg/100 g) pro vitamíny a minerály v konopných semenech – odrůda Finola
- Tabulka 2: Zastoupení mastných kyselin v konopném oleji
- Tabulka 3: Kvalitativní charakteristiky lisovaného konopného oleje, extrahovaného superkritickým CO₂ a extrahovaného hexanem
- Tabulka 4: Použité parametry pro SFE
- Tabulka 5: Použité podmínky pro analýzu tokoferolů
- Tabulka 6: Průměrné množství mastných kyselin (do 1 %) u všech olejů