



**Vliv přídatku technického konopí *Cannabis sativa* na an-  
tioxidační aktivitu u laboratorních potkanů**

Diplomová práce

*Vedoucí práce:*  
Mgr. Ing. Eva Mrkvicová, Ph.D.

*Vypracovala:*  
Bc. Lenka Urbánková, Dis.

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci na téma **Vliv přídatku technického konopí Cannabis sativa na antioxidační aktivitu u laboratorních potkanů** vypracoval/a samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

### **Poděkování**

Poděkování bych chtěla věnovat především vedoucí mé diplomové práce Mgr. Ing. Evě Mrkvicové Ph.D. za odborné vedení a konzultace, doc. RNDr. Ing. Pavlu Stratilovi, Ph.D. a Mgr. Olze Kryštofové, Ph.D. za vedení během laboratorního výzkumu a dále všem kolegům, kteří se podíleli na realizaci pokusu a v neposlední řadě patří můj velký dík mým spolužákům a rodině za vytvoření příznivých podmínek pro mé studium.

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývá vlivem přídatku technického konopí na organismus. V krmném pokusu byl sledován vliv zkrmování technického konopí na přírůstky a anti-oxidační aktivitu u laboratorních potkanů kmene Wistar albino. Pokus byl prováděn se 20 samci potkana a ti byli dále rozděleni do 4 skupin, z nichž dvě byly krmeny konopnou směsí a dvě směsí kontrolní. Během pokusu byli potkani 1x týdně váženi a přírůstky zaznamenávány, stejně tak byla zjišťována i spotřeba krmiva. Ke stanovení obsahu polyfenolových látek byla použita spektrofotometrická metoda s Folin-Ciocalteu reagentem. Antioxidační aktivita byla zjišťována u jednotlivých vzorků krmiv a z jaterní tkáně pokusných potkanů. Stanovení proběhlo metodami FRAP a TEAC. Výsledky měření antioxidační aktivity jaterní tkáně se ukázaly neprůkazné u obou metod. Prokazatelné rozdíly antioxidační aktivity byly zjištěny pouze u vzorků krmných směsí. Ke zpracování výsledků byla použita ANOVA statistická metoda s využitím Scheffeho testu.

**Klíčová slova:** technické konopí, laboratorní potkan, antioxidační aktivita, polyfenolové látky, FRAP, TEAC.

## **Abstract**

This thesis studies an influence of hemp added to feed rations on the organism of tested animals. In this feeding experiment the effect of supplied hemp to weight increments and antioxidant activity was observed. The tested animals were rats of strain Wistar albino. The experiment was performed with 20 male rats which were divided into 4 groups. Two groups were fed with hemp mixture and other two with control mixture. During the experiment subjects were weighed once a week and weight gain and feed consumptions were recorded. Spectrofotometric method Folin-Ciocalteu for determinations of polyphenolic compounds was used. Antioxidant activity was measured for the individual samples of feed and liver tissues of tested animals. They were FRAP and TEAC method used. The results of measurement of antioxidant activity in liver tissue proved inconclusive for both methods. Demonstrable differences were found only in samples of feed. The processing was used ANOVA statistical method using the Scheffe test.

**Key words:** Cannabis, laboratory rat, antioxidant activity, polyphenolic compounds, FRAP, TEAC,

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	CÍL .....	9
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
3.1	Botanická charakteristika konopí ( <i>Cannabis</i> ) .....	10
3.2	Historie .....	12
3.3	Obsahové látky v konopí .....	13
3.3.1	Kanabinoidy .....	13
3.4	Konopí ve výživě zvířat a člověka .....	16
3.5	Antinutriční látky v konopí .....	18
3.6	Technické konopí .....	18
3.7	Konopí a legislativa .....	20
3.8	Antioxidanty .....	22
3.8.1	Antioxidační aktivita .....	22
3.8.2	Mechanismus účinku .....	23
3.8.3	Volné radikály .....	23
3.8.4	Škodlivé účinky radikálů .....	24
3.8.5	Vliv antioxidantů na zdraví .....	25
3.8.6	Polyfenolové sloučeniny .....	25
3.9	Potkan jako laboratorní zvíře .....	27
4	MATERIÁL A METODIKA .....	28
4.1	Metodika krmného pokusu .....	28
4.2	Stanovení celkových polyfenolů .....	30
4.2.1	FC metoda .....	30
4.3	Metody stanovení antioxidační aktivity .....	30
4.3.1	Metoda FRAP .....	30
4.3.2	Metoda TEAC .....	31
4.3.3	Biuretova reakce .....	32
4.4	Chemikálie .....	32
4.5	Přístroje .....	32
4.6	Příprava vzorků .....	33
4.6.1	Rostlinné vzorky .....	33
4.6.2	Živočišné vzorky .....	33

5	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	34
5.1	Přírůstky hmotnosti a spotřeba krmiva .....	34
5.2	Výsledky antioxidační aktivity jaterní tkáně.....	35
5.2.1	Hmotnosti jater .....	35
5.2.2	Výsledky stanovení bílkovin, fenolových látek a antioxidační aktivity v jaterní tkáni potkana .....	38
5.3	Antioxidační aktivita krmných směsí.....	40
6	ZÁVĚR .....	41
7	SEZNAM ZKRATEK.....	42
8	SEZNAM OBRÁZKŮ .....	43
9	SEZNAM TABULEK A GRAFŮ .....	43
10	PŘÍLOHY .....	44
11	SEZNAM PŘÍLOH.....	49
12	POUŽITÉ ZDROJE .....	50

# 1 ÚVOD

Konopí seté je plodina využívaná lidstvem po celém světě od starověku až po současnost. I když se míra jeho využívání v nejrůznějších obdobích lišila, nacházelo a nachází své uplatnění v mnoha odvětvích.

Konopí je ceněno zejména pro svoji všestrannost. Konopné stonky poskytují vlákna zpracovávaná v textilním, stavebním nebo papírenském průmyslu, konopná semena jsou využívána ve výživě lidí i zvířat a stejně tak i olej z nich lisovaný, nachází četné využití v potravinářském, kosmetickém či farmaceutickém průmyslu. Konopné rostliny lze díky jejich rychlému růstu využít i k produkci biomasy pro energetické účely.

Vedle účinků protizánětlivých, antirevmatických, imunostimulačních a mnohých dalších je konopí i silným přírodním antioxidantem, čehož bylo využito v této práci, která se zabývá antioxidantními účinky konopí a optimálními metodami jejich stanovení.

Pokusy byly provedeny na laboratorních potkanech kmene Wistar albino.

Se zvířaty bylo zacházeno v souladu s vyhláškou č. 419/2012 Sb. na ochranu pokusných zvířat, v platném znění.



## **2 CÍL**

Cílem práce bylo zjistit vliv výlisků z konopí setého na antioxidační status měřený v jaterní tkáni laboratorních potkanů, sledování přírůstků hmotnosti a spotřeby krmiva.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Botanická charakteristika konopí (*Cannabis*)

Konopí se botanicky řadí do řádu *Rosales*, v němž byla vytvořena samostatná čeleď *Cannabaceae*, kam kromě konopí řadíme již pouze rod *Humulus*. (RÄTSCH, 2013)

Konopí je jednoletá, většinou dvoudomá rostlina s přímou lodyhou, která se v horní polovině větví. Lístky jsou kopinaté, pilovité, podlouhlé, ke koncům zúžené a na rubu pokryté trichomy. Rostlina je vysoká 80 - 200 cm s vrcholičnatým květenstvím, plod jsou nažky. Samičí rostliny bývají větší než rostliny samčí. Jsou statnější, více olistěné a mají tmavší zbarvení a dospívají o 4 až 6 týdnů později. Jsou významnější z hlediska hospodářského i vzhledem k obsahu psychoaktivních látek. (VALÍČEK, 2003)

Rozlišujeme tři hlavní odrůdy konopí, a to konopí seté, konopí indické a konopí rumištní. Všechny druhy i variety konopí se dají vzájemně křížit a šlechtitelským výběrem je možné zvýšit nebo naopak snížit obsah účinných látek. (RÄTSCH, 2013)

#### **Konopí seté**

Nejrozšířenějším druhem je konopí seté, které dorůstá výšky až 4 m, má poměrně velké listy, ale řídké olistění. Semena jsou hladká se světle šedým až hnědým zbarvením. Obsah účinných látek je různý podle odrůdy a podmínek pěstování. Původně bylo vypěstováno jako textilní rostlina, ale přibližně v polovině 80. let 20. století byla vyšlechtěna odrůda s téměř nulovým obsahem THC, tzv. technické konopí. (MIOVSKÝ, 2008)

#### **Konopí indické**

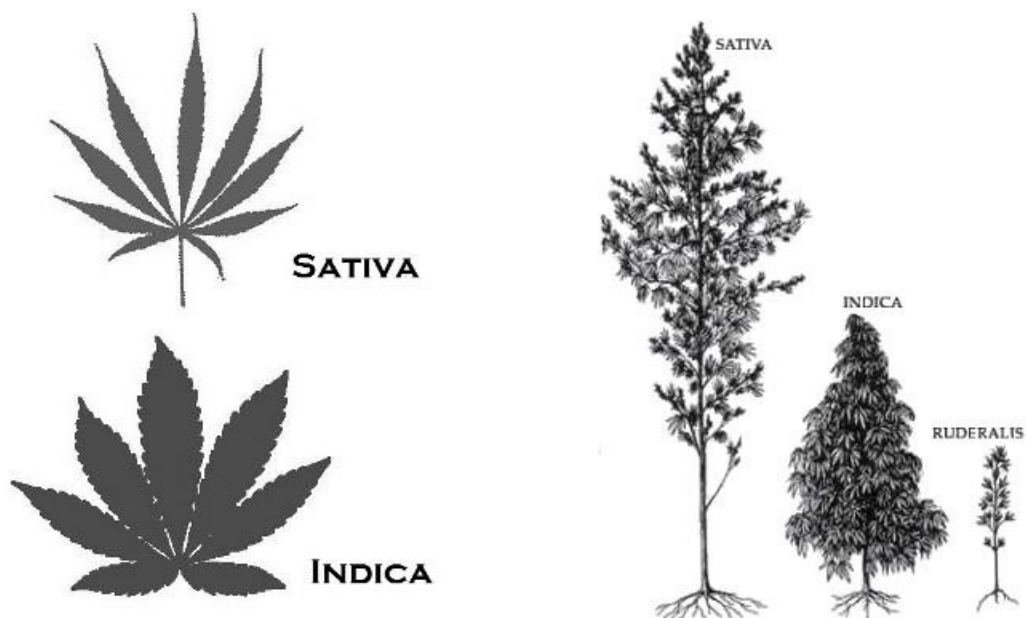
Konopí indické je nízkého vzrůstu, dorůstá výšky kolem jednoho až dvou metrů, má kónický tvar a hustě se větví. (BOOTH, 2004)

Listy jsou až dvanáctičetné a zaoblenější než u konopí setého, rovněž stonek je méně vláknitý. Semena mají tmavé zbarvení, jsou hladká a mramorovaná. Konopí indické má velmi vysoký obsah psychoaktivních látek a lze jej využít k farmaceutickým účelům. (ADAMS, 2012)

## Konopí rumištní

Konopí rumištní je nejnižšího vzrůstu ze všech tří odrůd. Dorůstá maximálně 0,6 m. Má tenký nevětvený stonek, téměř bez listů. Semena mají na povrchu tmavou mozaiku s viditelnou oddělovací vrstvou. Na rozdíl od ostatních druhů, není kvetení tohoto druhu ovlivňováno světelnou periodou, proto je využíváno ke šlechtění ranějších hybridů. (ADAMS, 2012)

Zemí původního výskytu konopí rumištního je Rusko, ale v současné době se vyskytuje i v Číně, Kazachstánu, Turecku či v Íránu. (VALÍČEK, 2003)



Obrázek 1: Rozdíly ve vzhledu jednotlivých odrůd  
<http://marijanka.cz/botanika-konopi/>

## 3.2 Historie

Konopí seté (*cannabis sativa*) pochází pravděpodobně z centrální části Asie, odkud se pro svoji poměrně vysokou adaptabilitu a rozsah využití, rozšířilo lidským působením do celého světa. Nejstarší údaje o využívání konopí jsou datovány již před sedmi tisíci lety ve staré Babylonii. Ovšem prvenství za největší rozsah v pěstování a všestranném využívání této rostliny v dějinách patří Číně, kde se z ní vyráběly sítě, lana, látky a její semena byla s rýží, ječmenem, pšencem a sójou nejstarším používaným zrním. Jako potrava byla semena konopí využívána až do 2. století, poté byla nahrazena chutnějšími a produktivnějšími obilninami. (DUPAL, 2004)

Ze semen se lisoval olej, využívaný při vaření, do lamp ke svícení, do barev a k dalším účelům, zbytky po lisování byly využívány jako krmivo pro domácí zvířata. (DUPAL, 2004)

Ve starém Řecku bylo konopí využíváno k výrobě lan a látek a od 9. století se jeho využívání rozšířilo i na zbytek Evropy. Konopí se dále používalo jako léčivo při dýchacích a kožních onemocněních, žloutence nebo kolice. Ve 14. století byla Evropa dovezena z Číny technologie výroby papíru. (konopi.org, 2016)

V roce 1737 odborně popsal rod *cannabis sativa* jako první botanik Carl Linné, který objevil rostlinu v Indii v Himalájích a o několik let později, v roce 1785, objevil a popsal další druh *cannabis indica* francouzský biolog Jean Baptiste de Lamarck, který ji našel ve východní Indii. Třetí dnes uznávaný druh rodu *cannabis* objevil a popsal ruský botanik Dimitrii E. Janischewsky v jihovýchodní části Ruska, a to *cannabis ruderalis*. (MIOVSKÝ, 2008)

Od počátku 20. století bylo konopí po celém světě využíváno k výrobě široké škály výrobků, například kosmetiky, mýdel, oděvů, lan, vláken, příkrývek, papírenského zboží atd. Z Evropských zemí byli největšími pěstiteli Francie, od poloviny 80. let se přidalo Španělsko a od roku 1993 se rozmohlo pěstování technického konopí i ve Velké Británii. Zbytky z vypěstovaného konopí se využívaly jako podestýlka pro hospodářská zvířata, vlákna se dodávala do papíren a výrobcům izolačních materiálů. Do budoucna se počítalo s pěstováním konopí jako zrniny, tedy s cíleným pěstováním pro získání konopných semen. (BOOTH, 2004)

V České republice se konopí začalo pěstovat na počátku 17. století, hlavně pro výrobu plachet, a lan pro lodě a pro armádní účely. Na počátku 20. století pak produkce poklesla, a to z důvodu dovozu levnějšího bavlněného vlákna. (ŠIROKÁ, 2009)

Pěstební plocha konopí postupně klesala a pěstování bylo ukončeno v roce 1988, hlavně z důvodu náročnosti na ruční práci při sklizni a posklizňové úpravě stonku. Potřeba konopného vlákna pro textilní průmysl v České republice byla řešena dovozem konopí z jiných zemí, především z Maďarska (ŠNOBL, 2004).

### 3.3 Obsahové látky v konopí

Podle nejnovějších údajů o chemickém složení, obsahuje konopí 1031 látek. (MIOVSKÝ, 2008)

Mezi sekundární metabolity patří kanabinoidy, flavonoidy, stilbenoidy, terpeny, alkaloidy a lignany a další primární i sekundární metabolity. Nejvýznamnější a nejznámější jsou látky kanabinoidní povahy, které se vyskytují pouze v této rostlině. (MIOVSKÝ, 2008)

Vedle kanabinoidů bylo v konopí zjištěno na 35 sacharidů, 20 jednoduchých kyselin, 18 aminokyselin, množství proteinů, amidů, aminů, alkoholů, vitamínů a dalších látek. (KUBÁNEK, 2008)

Konopí dále obsahuje až 120 terpenoidních látek, z nichž jsou nejvíce zastoupeny mono a seskviterpeny, které odpovídají za výrazný pach rostliny, především jsou to pinen, limonen a myrcen. (PEČ, DUŠEK, 2009)

#### 3.3.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou podle původu rozdělovány na fytoKANabinoidy, pocházející z konopných rostlin, endokanabinoidy, které se tvoří v tělech živočichů a vyráběné syntetické kanabinoidy. (ALI, 2012)

Kanabinoidní látky jsou produkovány především žláznatými trichomy rostlin, ačkoliv byly detekovány i ve stonku, pylu, semenech a kořenech. (PEČ, DUŠEK, 2008)

Význam kanabinoidů pro rostlinu zatím není zcela znám, odborníci však předpokládají, že mohou sloužit jako ochrana před UV zářením, houbovými chorobami, hmyzem či býložravými zvířaty. (GUY a kol., 2004)

**Delta-9-trans-tetrahydrokanabinol (THC)** je hlavní psychoaktivní látkou obsaženou v konopí. Vyskytuje se ve všech odrůdách v různém množství a může tvořit až 95 % všech přítomných kanabinoidů. Nejsilnější odrůdy konopí mohou obsahovat až 12 % THC, avšak aby mohla být rostlina posuzována jako dostatečně psychoaktivně účinná, musí obsahovat minimálně 1 % THC. (DUPAL, 2004)

**Delta-8-trans-tetrahydrokanabinol** má podobné účinky jako THC, ale v nižší míře. V rostlině konopí se nachází ve velmi malém množství, proto bývá většinou přiřazován k THC. (DUPAL, 2004)

**Kanabidiol (CBD)** je rovněž obsažen téměř ve všech odrůdách v různém množství, ale na rozdíl od THC nemá psychoaktivní účinky, ale působí antibakteriálně a sedativně. (DUPAL, 2004)

CBD vykazuje tlumivé účinky, zmírňuje bolesti, snižuje nitrooční tlak a působí proti psychoaktivním efektům THC. Může také posunout počátek působení marihuany, ale může její vliv až dvakrát prodloužit. Pokud rostlina obsahuje nižší množství THC a vysoké množství CBD, dochází k vyvolání útlumu, pocitu slabosti a otupělosti. (CONRAD, 2001)

Některé zdroje uvádí, že je CBD prekurzorem tvorby THC při biosyntéze v rostlinných buňkách, avšak toto tvrzení bylo vyvráceno nálezem určitých odrůd, které CBD neobsahují, a tím bylo prokázáno, že vznik THC a CBD v rostlině probíhá zcela nezávisle na sobě. (MIOVSKÝ, 2008)

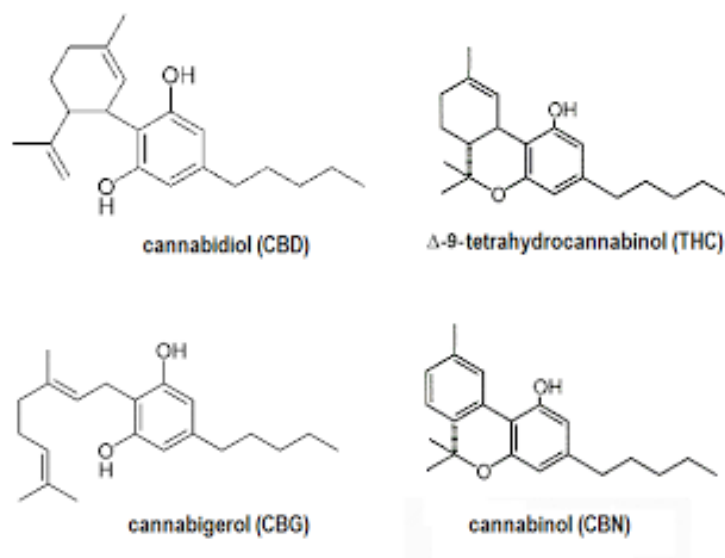
**Kanabinol (CBN)** je látka, která vzniká oxidací THC. Samotná rostlina jej produkuje jen ve velmi malém množství. Větší obsah vzniká při nesprávném skladování, tj. při přístupu vzduchu ke sklizenému materiálu. (KING a kol., 2004).

Tento kanabinoid má slabé psychoaktivní účinky (asi 10 % účinku THC). Způsobuje pocit únavy, ospalost a závratě. Z těchto důvodů je jeho obsah v rostlině nežádoucí. (DUPAL, 2004)

**Kanabichromen (CBC)** se v rostlině konopí nachází v nízkých koncentracích, většinou ne více než 20 % všech přítomných kanabinoidů. Vykazuje silné antibakteriální

účinky a působí příznivě při zánětech. Nevykazuje psychoaktivní účinky. (DUPAL, 2004)

**Kanabigerol (CBG)** je látka, nevykazující psychoaktivní účinky, ale předpokládá se, že může zvyšovat účinky ostatních kanabinoidů. V technickém konopí je zpravidla obsaženo více CBG než v ostatních odrůdách, což je patrně způsobeno šlechtěním, kdy rostlina produkuje CBG místo THC. (SESHATA, 2013)



*Obrázek 2: Struktura kanabinoidů*  
<http://cannabinoidpharmacopoeia.blogspot.cz/2011/02/cannabidiol-thc.html>

### 3.4 Konopí ve výživě zvířat a člověka

Ve výživě lidí či zvířat lze využít semena konopí jako cenný zdroj potravy. Obsahuje množství vitamínů (zejména vitamín A), minerálních látek, aminokyselin, nenasycené mastné kyseliny, především kyselinu linolovou a  $\alpha$ -linolenovou, a to v poměru 3:1. (BOOTH, 2004)

Konopné semeno obsahuje 20-25 % bílkovin, 25-30 % lipidů, 20-30 % sacharidů a 10-15 % vlákniny. (LEIZER a kol., 2000)

V konopném semeni jsou obsaženy všechny základní aminokyseliny a jsou vhodné pro lidskou výživu. Jejich obsah je nejvyšší v loupáném semenu, ve slupkách je obsah nižší (asi 10 %). (HOUSE a kol. 2010)

V semeni konopí jsou obsaženy všechny esenciální aminokyseliny, výjimečný je zvýšený obsah argininu a limitující aminokyselinou je zde lysin. (CALLAWAY, 2002)

Konopná semena se v potravinářství využívají buď surová, nebo ve formě oleje, který je získáván buď lisováním za studena, nebo při zvýšené teplotě. Z důvodu prevence oxidace mastných kyselin a zachování aktivity enzymů by neměl být konopný olej vystavován slunečnímu záření nebo zahříván na teplotu vyšší než 45° a proto se v potravinářství využívá studené či super studené lisování. (SLADKÝ, 2004)

Olej z konopných semen je charakteristický vysokým obsahem nenasycených n-6 mastných kyselin, a to kyseliny linolové (50 – 70 %) a kyseliny gamma-linolenové (1-6 %), dále také vysokým obsahem n-3 mastné kyseliny alfa-linolenové (15 – 25 %). Nasyčené mastné kyseliny jsou zde zastoupeny především kyselinou palmitovou (6 – 9 %) a stearovou (1 – 3 %). (DEFERNE,PATE, 1996).

Konopný olej má lehce oříškovou chuť a lze jej použít do salátů, pomazánek nebo k přípravě marinád. (ŠMIROUS, 2013)

Konopná mouka se vyrábí mletím pokrutin, ale je poměrně těžká, proto je vhodné ji kombinovat s dalšími moukami. K dochucení vína či piva, případně k výrobě sirupů lze využít extrakty z květů či listů konopí. (RUMAN, 2008)

Zatímco konopné semeno je pro zvířata vynikajícím krmivem, jsou zcela odlišné výsledky při krmení celou rostlinou, jelikož listy konopí jsou pokryty žlázami produkujícími pryskyřici. Ačkoliv jeleni, divoká prasata králíci a ostatní savci ve volné přírodě okusují rostliny konopí, tak savci obecně si samotné konopí k potravě nevybírají. JAIN a ARORA (1988) prováděli pokusy při krmení dobytka, kdy krmili zvířata konopím



obsahujícím omamné látky, a u těchto zvířat se projevily různé stupně poruch koordinace. Oproti tomu LETNIAK a kol. (2000) prováděl experimentální studie s použitím konopné siláže a nebyly zjištěny žádné výrazné rozdíly mezi použitím konopné, ječmenné a ovesné siláže, z čehož vyplývá, že fermentací konopí se snižuje obsah jeho omamných látek. (SMALL, MARCUS, 2002)

Pro účely výživy hospodářských zvířat lze dále využít semena, resp. konopné pokrutiny, které vznikají lisováním konopného oleje. Pokrutiny se vyznačují vysokým obsahem minerálních látek a kvalitních tuků (s opt. poměrem n-6:n-3 polynenasycených mastných kyselin) a jsou vhodné zejména do směsí pro plemenná zvířata. (MUSTAFA a kol., 2001)



*Obrázek 3: Konopné produkty*  
<http://www.vivamagonline.com/upcoming-ingredients-cannabis-hemp-oil/>

### 3.5 Antinutriční látky v konopí

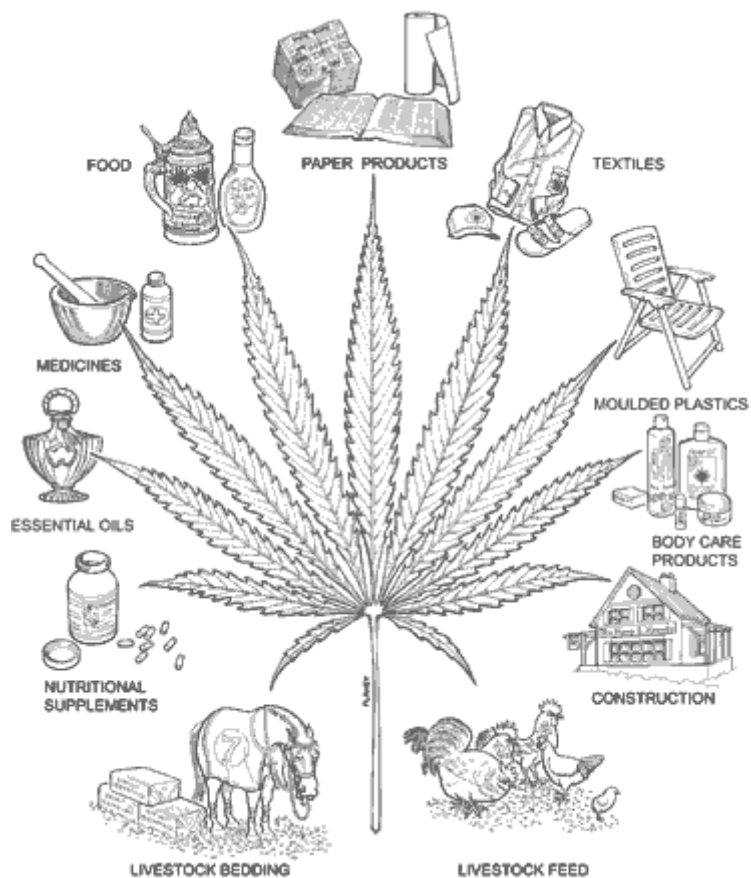
Antinutriční látky, jsou látky vyskytující se v potravinách, které snižují využitelnost a stravitelnost živin, narušují metabolismus minerálních látek a vitamínů a snižují celkovou výživnou hodnotu potraviny. Mezi antinutriční látky obsažené v semenu konopí patří kyselina fytoová, která snižuje stravitelnost bílkovin a zvyšuje vylučování aminokyselin a minerálních látek. Její obsah v konopném semenu je podobný obsahu v sojových bobech či slunečnicových semenech. V semenu jsou také obsaženy tanniny (třísloviny), které mají nepříznivý vliv na stravitelnost bílkovin. Výhodou konopného semene je, že neobsahuje jedny z nejzávažnějších antinutričních látek, a to inhibitory proteas (např. trypsinu), které jsou obsaženy například v luštěninách, obilovinách či brukvovitých plodinách. Protože jsou to převážně proteiny, jsou varem snadno denaturovány a inaktivovány. (ODANI,ODANI, 1998)

### 3.6 Technické konopí

Technické konopí je odrůda konopí s velmi nízkým obsahem THC. Podle platných norem jej nesmí obsahovat více než 0,3 %. (BOOTH, 2004)

Konopí je jednou z nejběžnějších víceúčelových rostlin na světě. Ještě do počátku 20. století byla jednou z nejvyužívanějších přadných rostlin pro americký i evropský průmysl. (PACIFICO a kol., 2006).

V dnešní době je využíván především k technickým účelům v automobilovém (termoplasty a termosety z konopné vlákniny), stavebním průmyslu (izolační materiály) a textilním průmyslu. (KARUS, 2004)



*Obrázek 4: Využití konopí*

*(SMALL, MARCUS, 2002)*

### 3.7 Konopí a legislativa

Na konopné drogy se začaly zákony více ohlížet až 1. polovině 20. století, kdy byly vydány první vyhlášky, které regulovaly pěstování konopí jako hospodářské plodiny. V roce 1937 byl v USA vydán zákon o dani z marihuany, podle kterého musely být osoby, které pěstovaly nebo vlastnily marihuanu evidovány a byly povinny z ní platit daň. V Evropě proběhla v roce 1912 Mezinárodní opiová konvence v Haagu pro boj proti používání narkotik, která v České republice nabyla působnosti v roce 1920. O pár let později v roce 1925 se konala druhá opiová konvence, tentokrát v Ženevě, ke které bylo obesláno 36 států a vydala doplňující ustanovení pro zamezení výroby a distribuci narkotik. (legalizace.cz, 2000)

V současné době je aktuální Jednotná úmluva o omamných látkách, která sjednocuje předchozí konvence, zákony a úmluvy, dále Úmluva o psychotropních látkách a Úmluva OSN proti nedovolenému obchodu s omamnými a psychotropními látkami. Všechny tyto úmluvy udávají, že drogy mohou být použity pouze pro lékařské a vědecké využití, případně výhradně pro vlastní účely. (CONRAD, 2001)

V návaznosti na tyto nařízení se objevily teorie, že pěstování konopí není nelegální, pokud je pěstitel využívá pro vlastní potřebu a prokáže, že jej využívá k léčebným účelům. Podle nejvyššího soudu se ale dopustí pěstitel trestného činu, pokud rostlinu usuší a začne ji zpracovávat na drogu (sušení, drcení, louhování) a tato rostlina obsahuje větší než povolené množství THC (tzn. 0,3 %). (EICHLER, 2007)

Základními právními normami, upravujícími drogovou problematiku v České republice jsou v současné době:

**Trestní zákon č. 140/1961 Sb.**, který byl novelizován v letech 1994 a 1995, zejména pak vybrané oddíly:

- **§ 187** – Nedovolená výroba a držení omamných a psychotropních látek a jedů – který udává, že osoba, která bez povolení vyrobí, vyveze, doveze či jinému nebo pro jiného přechovává omamnou nebo psychotropní látku nebo jed, bude potrestána pokutou nebo odnětím svobody až na 3 roky či více, v návaznosti na prokázaná obvinění,

- **§ 187a** – udává, že osoba, která přechovává bez povolení omamné a psychotropní látky nebo jedy, ve větším než malém množství, bude potrestán peněžním trestem nebo odnětím svobody,

- **§ 188** – udává, že ten, kdo vyrobí, případně opatří sobě nebo jiné osobě předmět, určený k nedovolené výrobě či zpracování omamné nebo psychotropní látky nebo jedu, může být potrestán pokutou, odnětím svobody nebo zabavením věcí,

- **§188a** – šíření toxikomanie – ten, kdo podněcuje nebo podporuje jiného ke zneužívání návykové látky (kromě alkoholu) nebo ten, kdo zneužívání látky šíří, bude potrestán zákazem činnosti, pokutou či odnětím svobody na 1 rok nebo více. (legalizace.cz, 2000)

Pěstováním konopí se přímo zabývá **zákon ze dne 20.5.2004**, měnící zákon **167/1998 Sb. O návykových látkách**, ve znění pozdějších předpisů a zákon **2/1969 Sb. O zřízení ministerstev a jiných ústředních orgánů státní správy České republiky**, ve znění pozdějších předpisů:

- **§5** – jestliže je konopí získáváno, skladováno nebo zpracováno k průmyslovým a pokusnickým účelům nebo je s ním obchodováno za těmito účely, není vyžadováno povolení k zacházení s ním,

- **§15** – je zakázáno získávat konopnou pryskyřici nebo látky ze skupiny tetrahydrokanabinoidů,

- **§24** – je zakázáno pěstovat druhy a odrůdy konopí, obsahující více než 0,3 % THC,

- **§29** – udává ohlašovací povinnosti pro osoby, pěstující mák nebo konopí. (eagri.cz, 2015)

## 3.8 Antioxidanty

Antioxidanty jsou látky, které zpomalují oxidační procesy nebo přímo brání jejich vzniku. (PASSWATER, 2002)

Látky, přirozeně se vyskytující v potravinách, vykazující antioxidační kapacitu, jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu, neboť zvyšují trvanlivost potravin a příznivě ovlivňují zdraví. Některé studie prokázaly, že při pravidelné konzumaci potravin rostlinného původu, může docházet ke snížení rizika chronických onemocnění spojených s oxidativním poškozením. (GALLARDO a kol., 2006)

Antioxidanty můžeme rozdělit **podle původu** na endogenní a exogenní. Endogenní antioxidanty jsou produkovány přímo v organismu a nejčastěji se jedná o enzymy, koenzymy a sírné sloučeniny (např. glutathion, superoxiddismutasy, katalasa, atd.). Exogenní antioxidanty je nutno přijímat v potravě a patří mezi ně některé vitamíny (C, E), karotenoidy, bioflavonoidy a další polyfenolové sloučeniny. (PASSWATER, 2002)

**Dle místa účinku** rozlišujeme antioxidanty, které působí v organismu a chrání buněčné molekuly před poškozením kyslíkovými radikály a antioxidanty působící mimo organismus, chránící potravinu a krmivo před škodlivými oxidačními procesy. (PASSWATER, 2002)

Velký význam se v poslední době přikládá přírodním látkám. Nejvýznamnějšími jsou polyfenolové sloučeniny, mezi něž patří flavonoidy, isoflavony, fenolové kyseliny, katechiny a další. Jsou obsaženy ve všech rostlinách, zejména v ovoci, zelenině, léčivých rostlinách, čajích, koření a vláknině. V řadě experimentů bylo prokázáno, že látky polyfenolové povahy mají vyšší antioxidační účinek než je účinek antioxidačních vitamínů. (RICE-EVANS a kol., 1996)

### 3.8.1 Antioxidační aktivita

Antioxidační aktivita je schopnost látek inhibovat degradaci jiných sloučenin, způsobenou oxidativními procesy. Rozlišujeme zde dva pojmy, a to celková antioxidační kapacita (Total Antioxidant Capacity, TAC) a celková antioxidační aktivita (Total Antioxidant Activity, TAA). Zatímco antioxidační kapacita vyjadřuje množství oxidantu potřebného k reakci s přítomným antioxidantem ve vzorku, antioxidační aktivita udává informace o počáteční dynamice průběhu antioxidace v závislosti na určité koncentraci antioxidantu. Pro měření antioxidační aktivity látek lze využít metody chemické i fyzi-

kální. Chemické analýzy jsou založeny na reakci určitého činidla, které reakcí s přítomnými antioxidanty dává barevné produkty nebo dochází k poklesu zbarvení. Intenzita zbarvení při reakci se měří spektrofotometricky a obsah antioxidantních látek se následně vyhodnotí porovnáním absorpance měřeného vzorku a standardu. Fyzikální metody stanovení antioxidantní aktivity se zabývají změnami fyzikálních vlastností látek v průběhu antioxidantních procesů. (ZLOCH a kol., 2004)

### **3.8.2 Mechanismus účinku**

Antioxidanty působí různými mechanismy účinku. Jedním z nich je reakce antioxidantů s volnými radikály (např. kyselina askorbová a její deriváty, karotenoidy, fenolové sloučeniny), dále sloučeniny schopné redukce vzniklých hydroperoxidů (cystein, glutathion, fytochelatin, lipoová kyselina), případně mohou vázat do komplexů kovy s oxidační schopností jako je železo a měď nebo přímo eliminují již přítomný kyslík. (VELÍŠEK, 1999)

Antioxidantní látky se dělí na primární, které působí jako prevence proti vzniku volných radikálů (glutathionperoxidasa), sekundární, eliminující vzniklé řetězce volných radikálů (vit. A, E, C, glutathion) a terciální antioxidanty, napravující a odděluující poškozenou část molekuly (lipasy, transferasy, peptidasy). Jednotlivé složky antioxidantního řetězce na sebe vzájemně navazují a doplňují se. (SURAI, 2002)

### **3.8.3 Volné radikály**

Z chemického hlediska je volným radikálem jakákoliv molekula, atom či ion, který má ve valenční vrstvě nepárové elektrony a je schopen alespoň krátkodobé samostatné existence. Volné radikály vznikají odejmutím párového elektronu z orbitalu molekuly. Radikál poté může reagovat s kyslíkem, který se naváže na místo chybějícího elektronu, za vzniku peroxidového radikálu. Tento peroxidový radikál se následně snaží doplnit svůj orbital odnětím chybějícího elektronu z jiné sloučeniny a řetězová reakce pokračuje, dokud spolu nezreagují dva radikály nebo nedojde k reakci s antioxidantem. Významným zdrojem kyslíkových radikálů je např. oxidativní fosforylace v dýchacím řetězci, kdy oxidací vzdušným kyslíkem vznikají jako vedlejší produkty superoxid a hydroxylový volný radikál. (HOLEČEK, 2005)

Volné radikály mohou na organismus působit toxicky, ale jsou i velmi významné pro určité fyziologické procesy, např. při přenosu energie, působí jako faktory imunitního systému a signální molekuly buněčné regulace. (ŠTÍPEK, 2000)

#### 3.8.4 Škodlivé účinky radikálů

Volné radikály mají v biologických systémech řadu škodlivých účinků, k nejznámějším patří:

**Peroxidace membránových i nemembránových lipidů**, kdy se tvoří hydroperoxydy lipidů, reaktivní aldehydy, oxysteroly, isoprostany, isoleukotrieny, a další. (ESTERBAUER a kol., 1991)

Peroxidované lipoproteiny mají škodlivý vliv na buněčné membrány, na funkci membránových receptorů a transmembránových transportních kanálů. Může dojít až ke smrti buňky a to v důsledku poškození  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ase, jelikož dojde ke zvýšení hladiny draselných iontů uvnitř buňky a také k aktivaci buněčných fosfolipas a proteolytických enzymů. (ESTERBAUER a kol., 1991)

V důsledku lipoxidace lipidů dochází ke vzniku žlutohnědého fluorescenčního pigmentu lipofuscinu, který se s věkem akumuluje v buňkách všech živočichů v podobě malých granul v sekundárních lysozomech. (STRATIL, 2005)

**Oxidativní poškození sacharidů** vede ke vzniku peroxidů, oxoaldehydů a deoxyderivátů sacharidů (zejména glukózy), popřípadě deoxynukleotidů. Polysacharidy jsou fragmentovány, zvyšuje se neenzymová glykace proteinů a tím i narušení biochemických funkcí. (SOHAL, 1981)

**Oxidativní poškození nukleových kyselin** vzniká v důsledku reakce kyslíkových radikálů se sacharido-fosfátovou páteří nebo bází nukleových kyselin (RNA, DNA). Může dojít k fragmentaci řetězce nebo k mutacím, zejména na molekule mitochondriální DNA, která je nejbližší respiračnímu řetězci a tudíž je nejzávažněji poškozena. (RICHTER a kol., 1997)

**Reakcí volných radikálů s proteiny** dochází k narušení proteinové struktury, funkce, případně mohou být proteiny označeny a následně likvidovány imunitním systémem (jsou rozpoznány jako cizí). (FERNANDEZ, 1994)



### **3.8.5 Vliv antioxidantů na zdraví**

Reakce některých látek s kyslíkem vedou ke vzniku sloučenin, negativně působících na zdraví organismů. Oxidační procesy v organismu se mohou podílet na vzniku nej-různějších onemocnění, jako je rakovina, artritidy, kornatění cév, neurodegenerativní onemocnění a celkové stárnutí organismu. (MOURE a kol., 2001)

Mechanismus účinku antioxidačních látek v prevenci vzniku a rozvoje onemocnění dosud není zcela znám a je předmětem intenzivních lékařských výzkumů. Antioxidanty mají kromě již zmiňovaných vlastností i účinky antivirové, antibakteriální a protizánětlivé a tím i antialergické a antikarcinogenní. (MOURE a kol., 2001)

Mnohé výzkumy prokázaly, že při pravidelném a dostatečném příjmu různých antioxidantů se zlepšuje odolnost organismu a nejaktivněji se antioxidanty projevují po vstřebání do krevního oběhu a v cílových tkáních. (ZLOCH a kol., 2004)

### **3.8.6 Polyfenolové sloučeniny**

Polyfenolové sloučeniny jsou látky přírodní povahy, které patří mezi sekundární metabolity rostlin. Strukturně jsou to látky, které mají zabudovaný jeden či více aromatických nebo heterocyklických řetězců, jehož součástí bývá i jedna či více hydroxylových skupin a jejich funkčních derivátů. V současné době je stanoveno více než 8000 látek polyfenolové povahy. (KLEJDUS, 2004)

Tyto látky mohou zastávat různou úlohu, mohou tvořit meziprodukty při tvorbě živočišných pigmentů (např. melatoninu), vyskytují se jako složky rostlinných buněk (např. lignin) nebo tvoří rostlinné pigmenty (např. antokyany). Mezi jejich vlastnosti patří účinky redukční, antioxidační a chelatační. (VELÍŠEK, 1999)

Polyfenolové látky jsou součástí většiny druhů rostlin, do organismu živočichů se dostávají sekundárně potravou. (SHAHIDI, NACZK, 2003)

Fenolové látky a jejich deriváty vykazují významné účinky protizánětlivé, antioxidační, hepatoprotektivní, antimikrobiální, antivirové, antialergické, ale také napomáhají v prevenci nádorových onemocnění nebo Alzheimerovy či Parkinsonovy choroby. (VELÍŠEK, 1999)

Polyfenolové sloučeniny lze podle chemické struktury rozdělit do skupin na flavonoidy, lignany, stilbeny a fenolové kyseliny.

**Flavonoidy** jsou velmi početnou skupinou, zahrnující množství podskupin lišících se strukturou, výskytem i funkcí. Patří mezi ně flavanoly, flavanony, flavonoly, flavony, isoflavony, antokyanidiny. (TRNA, TÁBORSKÁ, 2011)

Vyskytují se v plodech, květech i listech různých druhů rostlin. Převažujícími účinky flavonoidů jsou účinky antioxidační a dále mají schopnost snižovat riziko vzniku srdečně-cévních onemocnění a aterosklerózy, snižují hladinu cholesterolu, působí antiflogisticky, antibakteriálně a vazodilatačně. (ZLOCH a kol., 2004)

**Fenolové kyseliny** zahrnují především kyselinu benzoovou a její deriváty a kyselinu skořicovou a její deriváty. Mezi deriváty kyseliny benzoové řadíme kyselinu salicylovou, vanilovou, protokatechovou, 4-hydroxybenzoovou, gallovou a syringovou. Nejvýznamnější z nich je kyselina gallová a její deriváty, které jsou součástí tanninů. Tanniny vznikají esterifikací jednoduchých cukrů (zejména glukosy) kyselinou gallovou a ellagovou a jejich nejrozšířenějšími zástupci jsou gallotanniny a ellagotanniny. (VELÍŠEK, 1999)

**Lignany** se nachází v různých rostlinných materiálech (např. ve dřevě, obilovinách, pryskyřicích, bobulích, čajových listech, ořechách, atd.) Nejvyšší obsah se vyskytuje ve lněném semeni. (VELÍŠEK, 1999)

V trávicím traktu člověka se lignany rozkládají na tzv. enterolignany, enterodiol a enterolakton, které mají povahu fytoestrogenů. (NURMI a kol., 2003)

Dalšími účinky jsou účinky bakteriostatické, antioxidační, antivirotické a protirakovinné. (MILDER a kol., 2006)

**Stilbeny** nejsou v rostlinných materiálech příliš časté. Nejvýznamnějším z nich je resveratrol, který vykazuje antifungicidní účinky a vyskytuje se především ve slupkách a semenech červených odrůd vinné révy a v podzemnici olejné. (TRNA, TÁBORSKÁ, 2011)

### 3.9 Potkan jako laboratorní zvíře

Divoký potkan se do Evropy dostal v 18. století lodní dopravou z Indie a Číny a začal zde vytlačovat původní kysu obecnou a později se rozšířil i na území Afriky a Ameriky. Od kysy se odlišuje ocasem, který je kratší než tělo, lysý a šupinatý a krátkými ušními boltci (při přehnutí nedosahují k očím). (JEBAVÝ, 2011).

Laboratorní potkan je jedno z prvních zvířat chovaných pro laboratorní účely (první záznam o experimentálním využití potkana pochází z roku 1856). Jedná se o variantu *rattus norvegicus alba* a využívají se především ve farmakologii, toxikologii a onkologii, dále v chirurgických výzkumech. Mezi hlavní výhody využití těchto zvířat patří snadná manipulace s nimi, nenáročný chov a dostatečné prozkoumání jejich fyziologie i anatomie. (JEBAVÝ, 2011, CLARAC a kol., 1998)

Jelikož každé zvíře je přenašečem nejrůznějších bakterií, parazitů a virů, využívají se pro laboratorní účely jedinci z tzv. SPF (Specified pathogen free – chovy prosté patogeních organismů) či GF chovů ( Germ free – chovy prosté zárodků). Laboratorní zvířata musí být evidována a chována v souladu se zákonem o ochraně zvířat proti týrání. (JEBAVÝ, 2011)

#### **Značení zvířat**

K trvalému značení zvířat se využívá vrubování nebo tetování do ušních boltců. K dočasnému značení je nejčastěji využito nanášení barevných skvrn na různé části těla, případně vyholování těchto částí (hlava, končetiny, kořen ocasu, boky). Ke značení se využívají různá trvanlivá barviva (např. zředěná kyselina pikrová). (JEBAVÝ, 2011)

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Metodika krmného pokusu

Krmný pokus proběhl v prostorách pavilonu M v areálu agronomické fakulty Mendelovy univerzity v Brně. K pokusu bylo použito 20 samců potkana kmene Wistar albino ve věku 6 týdnů s průměrnou hmotností 183 g, zakoupených z chovného uživatelského zařízení lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Zvířata byla rozdělena do 4 skupin, přičemž dvěma skupinám byla zkrmována směs konopí a zbylé dvě skupiny byly krmeny směsí kontrolní. Do každé skupiny bylo zařazeno 5 potkanů, kteří byli pro snadnější identifikaci odlišeni vyholením a obarvením odlišných tělesných partií.

Každá ze skupin byla umístěna v jednom plastovém boxu, jehož dno bylo pro lepší absorpci moče pokryto filtračním papírem a kovovým roštem, k roštu byla připevněna skleněná Petriho miska, která sloužila jako nádoba na krmnou směs. Box byl přikryt víkem s otvorem pro napáječku, aby měla zvířata neustále přístup k pitné vodě.

Během celého pokusu byla tedy zvířata krmena pouze buď konopnou směsí, nebo směsí kontrolní. Monodieta byla zvolena z důvodu následné lepší prokazatelnosti vlivu krmiva na stanovovanou antioxidační aktivitu.

Složení krmných směsí a zastoupení komponent je uvedeno v tabulce 1:

Komponenta	Zastoupení ve směsi (%)	
	Konopná směs	Kontrola
Konopí pokrutiny	40,00	
Pšenice 11,6% NL	22,30	53,30
Škrob kukuřičný	22,90	13,40
Kukuřice	12,00	10,00
Sojový extrahovaný šrot		10,00
Sója 37% NL		9,00
Řepkový olej	0,65	2,00
Vápenec mletý VJM c. 10 (37,5% Ca)	0,95	0,70
Monokalciumfosfát (24,5% P)	0,30	0,85
Methionin	0,45	0,45
Lysin	0,45	0,30

*Tabulka 1: Procentické zastoupení jednotlivých komponent ve směsích*

Konopná směs obsahovala převažující množství konopných pokrutin, jejichž složení je zobrazeno v tabulce 2:

	Sušina (%)	Popel (%)	N-látky (%)	Tuk (%)	Vláknina (%)
Konopí pokrutiny	92,74	6,72	27,64	8,99	30,19
	100	7,25	29,80	9,70	32,55

*Tabulka 2: Složení konopných pokrutin*

Ve vzorku konopí byl stanoven obsah minerálních látek, který byl 17,16 mg/kg Cu, 2490 mg/kg Ca, 5702 mg/kg Mg, 81,54 mg/kg Zn, 98,2 mg/kg Mn, 108,1 mg/kg Fe, 11,34 mg/kg Na, 10096 mg/kg K, 0,393 mg/kg Pb a 0,0061 mg/kg Hg. Z kanabinoidů byl zastoupen pouze CBD v množství 0,02%.

Živinové množství zkrmovaných pokusných směsí je uvedeno v tabulce 3:

Krmná směs	Sušina původní (%)	Sušina 100%			
		Popel (%)	NL (%)	Tuk (%)	Vláknina (%)
Konopí 40%	89,47	4,30	15,45	4,60	12,14
Konopí 40%	100	4,81	17,27	5,14	13,57
Kontrola	90,01	3,55	15,16	4,75	1,98
Kontrola	100	3,94	16,84	5,28	2,20

*Tabulka 3: Obsah živin v krmných směsích*

Krmný pokus trval cca 12 týdnů. Po prvních čtyřech týdnech bylo poloviční množství zkušebních potkanů usmrceno, okamžitě jim byla odebrána krev do vakuových heparinových zkumavek a byla odebrána játra, která byla zvážena a uložena v uzavřených označených sáčcích. V krvi i játrech byla stanovena antioxidační aktivita pomocí metody FRAP na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Krmný pokus dále pokračoval se zbývajícím potkany dle stejné metodiky až po finální usmrcení, kdy byla při pitvě opět odebrána játra, vložena do sáčků a zamrazena při teplotě - 80°C do dalšího stanovení.

## 4.2 Stanovení celkových polyfenolů

Pro stanovení fenolových sloučenin byla použita metoda s Folin-Ciocalteuovým reagentem, která je využívána nejčastěji. Dalšími využívanými metodami jsou stanovení dle Price a Butlera a metoda s 4-aminoantipyrinem, tyto metody jsou ale využívány v menší míře.

### 4.2.1 FC metoda

Základem metody je oxidačně-redukční reakce, kdy se oxidují fenolové sloučeniny (ale také oxidovatelné formy jiných sloučenin) v alkalickém prostředí a dochází k redukci fosfowolframového-fosfomolybdenového komplexu za vzniku modrého zbarvení. (STRATIL, 2005)

**Pracovní postup:** Do plastové zkumavky bylo odměřeno 500  $\mu\text{l}$  FC činidla (10x ředěného redestilovanou vodou) a 100  $\mu\text{l}$  vzorku, roztok byl promíchán a nechal se 10 minut stát, poté bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  7,5 % roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  v redest. vodě, vznikl modrý roztok. Po cca 30 minutách trvání reakce byla měřena absorbance při vlnové délce 750 nm. Jako blank byla směs bez vzorku a jako standard byla použita kyselina gallová. Množství obsažených fenolových látek bývá vyjádřeno v mmol nebo mg ekvivalentu kyseliny gallové (případně ferulové nebo katechinu) na gram suché či mokré hmoty vzorku. (SINGLETON a kol., 1999, VINSON a kol., 1998, VINSON a kol., 2001)

## 4.3 Metody stanovení antioxidační aktivity

### 4.3.1 Metoda FRAP

Metoda FRAP patří mezi oxidačně redukční metody a její podstatou je měření schopnosti antioxidantů inhibovat redukci iontů železitých na železnaté. Antioxidační látky mohou redukovat železité ionty na železnaté za vzniku modrého zbarvení, které má absorpční maximum při vlnové délce 593 nm.

**Pracovní postup:** Vzorek jater o hmotnosti 0,05-0,13 g byl homogenizován 2x15 s, 7200 otáček s 1 ml předem vychlazeného pufru (PBS). K homogenizaci byl použit přístroj Precellys Evolution s homogenizačními zkumavkami Lysing kit CK 14.

10 µl homogenátu bylo v tripletech aplikováno na 96 jamkovou destičku společně se standardním roztokem (kys. askorbová) a slepým vzorkem (destilovaná voda). Dále bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku, inkubováno 8 minut při 37°C a změřena absorbance při vlnové délce 593 nm. S pomocí kalibrační závislosti absorbance na koncentraci standardu byly vyhodnoceny jednotlivé vzorky.

Složení pracovního roztoku:

A: 300 mM acetátový pufr pH 3,6

B: 10 mM TPTZ ve 40 mM HCl

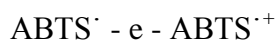
C: 20 mM FeCl<sub>3</sub>

Pracovní roztok FRAP vznikl smícháním roztoků A, B a C v poměru 10:1:1

#### 4.3.2 Metoda TEAC

Metoda TEAC je jednou z nejpoužívanějších pro stanovení koncentrace volných radikálů, protože je rychlá, poměrně jednoduchá a lze jí stanovit jak látky samotné, tak i směsné vzorky. (MARTINKOVÁ, 2009)

Během stanovení dochází k neutralizaci radikalkationtu, vzniklého oxidací molekuly ABTS (2, 2-azinobis(3-etyl-2, 3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát)), což je syntetický chromofor, který je modrozelený a reakcí s antioxidantem přechází na bezbarvý radikál ABTS<sup>•+</sup>.



Stanovení probíhá spektrofotometricky (nejčastěji při 734 nm) a sleduje se pokles zbarvení. Koncentrace antioxidantu ve vzorku je vypočtena za použití standardu troloxu, což je ve vodě rozpustný derivát tokoferolu (vitaminu E). Výsledek je uváděn jako Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC).

**Pracovní postup:** Do zkumavky bylo napipetováno 975 µl pracovního roztoku ABTS a 25 µl vzorku, směs byla promíchána a po 20 minutách reakce byla měřena absorbance při 734 nm. Blank byl 1 ml roztoku PBS.

### 4.3.3 Biuretová reakce

Celkové bílkoviny byly stanoveny Biuretovou reakcí, která je založena na reakci bílkovin a peptidů s měďnatými ionty v alkalickém prostředí za vzniku červenofialového komplexu. Intenzita zbarvením úměrná množství peptidových vazeb ve vzorku. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce 540 nm. Podmínkou reakce je přítomnost alespoň dvou – CO – NH<sub>2</sub> nebo – CO – NH – peptidových skupin. Biuret vzniká tepelnou úpravou močoviny a je nutné jej před samotným měřením chránit před přímým světlem. (SKORŠEPA a kol., 2008)

## 4.4 Chemikálie

Methanol, kyselina chlorovodíková, hydrogenfosforečnan sodný (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O), chlorid sodný, peroxidisíran draselný, hydroxid sodný, chlorid železitý, acetátový pufr, tekutý dusík byly stupně čistoty p. a.

Kyselina gallová (Sigma Aldrich Německo), Trolox (≥ 97 %, Sigma), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) diamonná sůl (ABTS, ≥ 98 %, Sigma), Folin-Ciocalteu reagent (Sigma), 2, 2-difenyl-1-pikrylhydrazil (DPPH, ≈ 90,0 %, Sigma), kyselina askorbová (≥ 99 %, Sigma), redestilovaná voda.

## 4.5 Přístroje

- analytické váhy (přesnost 0,1 mg), Precisa 240 A
- centrifuga Eppendorf centrifuge 5417 R
- spektrofotometr HELIOS γ, UNICAM
- automatický spektrofotometr BS – 200 Chemistry analyzer, MINDRAY
- ultrazvuková jehla BANDELIN SONOPLUS,
- vertex VERTEX GENIE 2,
- homogenizátor PRECELLYS EVOLUTION



## 4.6 Příprava vzorků

### 4.6.1 Rostlinné vzorky

Pro analýzu byly použity vzorky zkrmované konopné směsi a kontrolní směsi.

Jednotlivé vzorky byly důkladně pomlety a homogenizovány. Na analytických vahách bylo do uzavíratelné plastové lahvičky s víčkem odváženo 0,5 g vzorku, přidáno 10 ml směsi metanol/voda (50:50 obj. %) s kyselinou chlorovodíkovou (konc. 1,2 mol.l<sup>-1</sup>), lahvička byla uzavřena a umístěna do vodní lázně k inkubaci při 82-83<sup>0</sup>C po dobu 2,5 hod s protřepáváním každých 30 minut. Po inkubaci bylo do zchladlých lahviček přidáno 10 ml methanolu a vzorky se nechaly 15 minut centrifugovat při 10 000 otáčkách. Supernatant byl zneutralizován pomocí hydroxidu sodného. U rostlinných vzorků byla stanovena antioxidační aktivita metodou TEAC a obsah celkových polyfenolů metodou s FC reagentem.

### 4.6.2 Živočišné vzorky

Pro stanovení živočišných vzorků byla použita játra laboratorních potkanů, která byla odebrána při ukončení krmného pokusu a zamražena.

Pro stanovení byly naváženy 2 g tkáně a byly zhomogenizovány ve třecí misce s přísadkem tekutého dusíku a 1,5 ml redestilované vody. Po homogenizaci byl každý ze vzorků dále sonikován po dobu 2 minut pomocí ultrazvukové jehly a vortexován 20 minut. Následně byly vzorky 20 minut centrifugovány při 16 400 otáčkách (rpm) a teplotě 4<sup>0</sup>C. Ze supernatantu bylo odebráno 100 µl do eppendorfovy zkumavky a přidáno 900 µl redestilované vody. Takto připravené vzorky byly analyzovány s použitím automatického spektrofotometru metodami DPPH, TEAC a FCM a s použitím spektrofotometru Helios metodou TEAC.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Přírůstky hmotnosti a spotřeba krmiva

Průměrný denní přírůstek činil u skupiny krmené konopnou směsí 9,83 g, zatímco u kontrolní skupiny byl 11,53 g. Podrobnější hodnoty jsou uvedeny v tabulce 4.

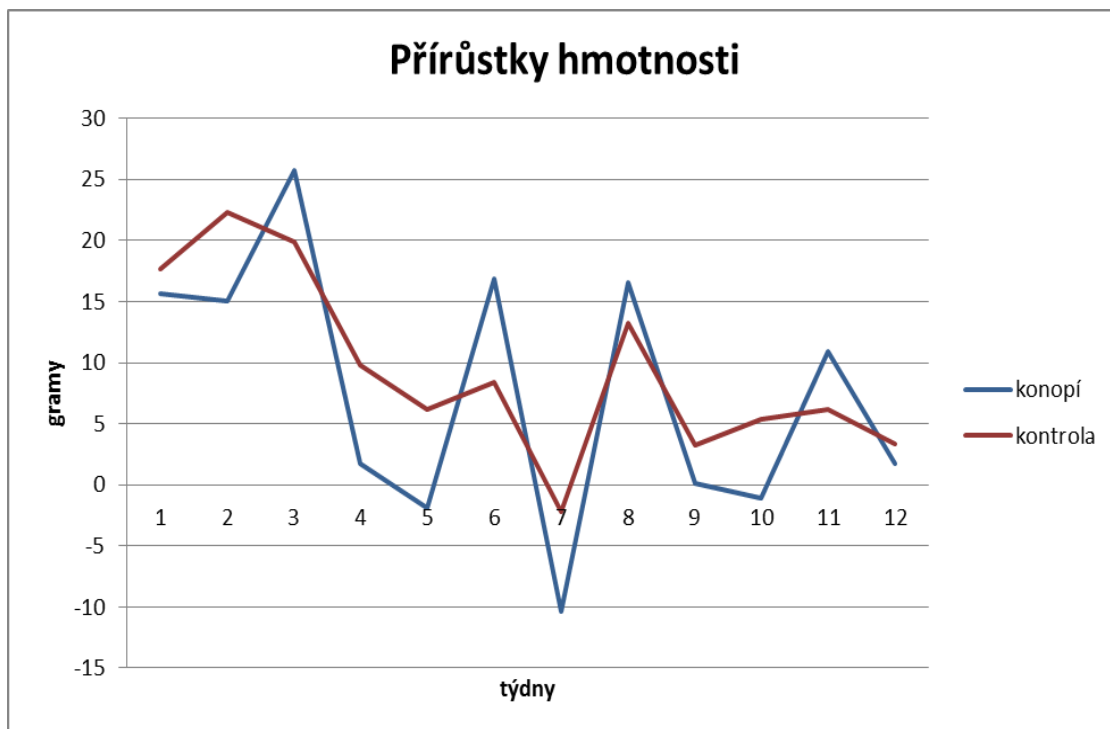
Krmná směs	Počáteční hmotnost (g)	Konečná hmotnost (g)	Průměrný denní přírůstek (g)	Celkový přírůstek (g)
Konopí	185,00	260,52	9,83	75,54
Kontrola	180,08	279,27	11,53	99,19

Tabulka 4: Živá hmotnost potkanů a přírůstky.

V průběhu pokusu bylo zkrmeno celkem 11,183 kg konopné směsi a 11,025 kg směsi kontrolní. Krmivo bylo navažováno každé 2-3 dny a před každou navážkou byly nejprve zváženy zbytky. Spotřeba konopné směsi byla nepatrně vyšší, rozdíl činil 1,41 %. Z výsledků tedy vyplývá, že ačkoliv bylo zkrmeno více konopné směsi než směsi kontrolní, byl celkový přírůstek u kontrolní skupiny vyšší, tudíž můžeme říct, že konopné výlisky nemají v tomto směru pozitivní vliv.

Pokusní potkani byli váženi vždy jedenkrát týdně a průměrné denní přírůstky jsou znázorněny v grafu č. 1.

V průběhu pokusu došlo ke značným výkyvům v hodnotách přírůstků, což bylo pravděpodobně způsobeno nevhodně zvolenou technologií ustájení, kdy docházelo ke znečištění krmiva umístěného na Petriho miskách.



*Graf 1: Průměrné denní přírůstky u skupin a kontrola.*

## 5.2 Výsledky antioxidační aktivity jaterní tkáně

### 5.2.1 Hmotnosti jater

Játra byla potkanům odebrána ihned po usmrcení. Před uložením byla zaznamenána jejich hmotnost, která je uvedena v tabulce 5.

Průměrná hmotnost jater potkanů, kterým byla zkrmována směs konopí byla o 0,95 g nižší než u potkanů krměných kontrolní směsí.

Byl proveden přepočítání hmotností jaterní tkáně na procentuální podíl z hmotnosti celého těla.

Skupina	Potkan	Hmotnost jater (g)	Podíl z tělesné hmotnosti (%)
Konopí 40%	O	6,88	2,84
	LP	7,46	2,63
	PP	8,79	3,12
	PZ	8,41	3,46
	LZ	9,07	3,77
Konopí 40%	H	8,84	3,58
	O	7,78	3,19
	LP	7,38	2,91
	PP	8,70	2,92
	LZ	8,66	3,38
Kontrola	H	9,46	3,48
	O	7,52	3,13
	PP	8,48	2,92
	LZ	9,75	3,07
	PZ	8,52	3,33
Kontrola	H	9,27	3,9
	O	8,79	3,41
	LP	9,73	3,35
	PZ	10,22	3,91
	LZ	9,77	4,03

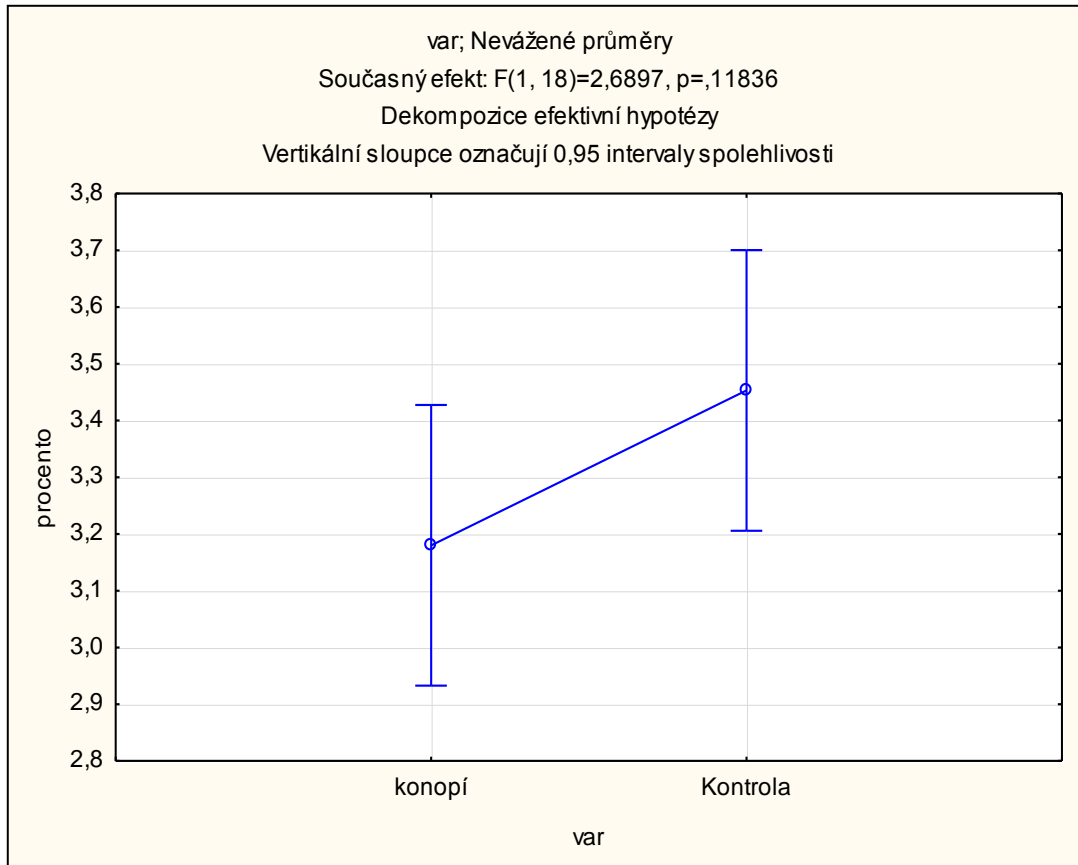
*Tabulka 5: Hmotnosti jater*

Využitím Sheffeho testu při hodnocení jedenofaktorové analýzy variace bylo zjištěno, že hmotnostní rozdíly mezi játry kontrolní skupiny a skupiny konopí, nejsou statisticky průkazné (viz. tabulka 6).

	Průměr ± směrodatná odchylka
Konopí	3,18 ± 0,3634
Kontrola	3,45 ± 0,3808

*Tabulka 6: Průměrná hmotnost potkaních jater (%)*

V následujícím grafu jsou znázorněny rozdíly průměrných hodnot hmotností jater potkanů krměných směsí s konopnými pokrutinami a směsí kontrolní.



*Graf 2: Průměrné hmotnosti jater potkanů (%)*

## 5.2.2 Výsledky stanovení bílkovin, fenolových látek a antioxidační aktivity v jaterní tkáni potkana

### *Stanovení antioxidační aktivity metodou FRAP*

Hodnoty antioxidační aktivity jaterní tkáně u skupiny konopí jsou nepatrně vyšší než u skupiny konopí, ale i přesto jsou výsledky dle Sheffeho testu statisticky neprůkazné ( $P > 0,05$ ).

	Konopí	Kontrola
	Průměr ± směrodatná odchylka	Průměr ± směrodatná odchylka
FRAP ( $\mu\text{mol EAK/g}$ )	125,84 ± 21,6503	102,98 ± 17,3834
Protein (mg/ml)	21,65 ± 4,9428	22,72 ± 3,1035
FRAP/protein ( $\mu\text{mol/g}$ )	4,65 ± 0,2657	4,51 ± 0,2781

*Tabulka 7: Výsledky biochemického rozboru jaterní tkáně*

Rozdíly z jaterní tkáně v našem pokusu byly neprůkazné, ale BENDOVIÁ (2014) a HOLEKSOVIÁ (2015) ve svých pracích zjišťovaly antioxidační aktivitu u potkanů krmených pšenicí a stejně jako v našem případě byly rozdíly z jaterní tkáně neprůkazné, ale u vzorků krve prokazatelné byly.

### *Měření metodami, TEAC a FCM*

Druhé měření antioxidační aktivity jater potkanů proběhlo po ukončení krmného testu, a to na ústavu chemie a biochemie Mendelovy univerzity v Brně na automatickém spektrofotometru (BS – 200, MINDRAY) a pro porovnání i v laboratoři ústavu výživy zvířat a pícninářství na spektrofotometru Helios unicam. Stanovení proběhlo metodou TEAC a dále byl stanoven celkový obsah polyfenolových sloučenin a celkové bílkoviny. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 8.

	Konopí	Kontrola
	Průměr ± směrodatná odchylka	Průměr ± směrodatná odchylka
Celk. protein (g/l)	120,73 ± 4,1306	121,37 ± 6,3001
TEAC (μmol ET/g)	9,08 ± 0,6958	9,39 ± 0,3692
FCM (mmol EGK/g)	10,55 ± 0,4083	10,19 ± 0,4953

*Tabulka 8: Výsledky měření antioxidační aktivity*

Pro srovnání výsledků bylo provedeno stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC na spektrofotometru Helios unicam, výsledky jsou zaznamenány v tabulce 9.

Z výsledků je patrné, že játra potkanů obou sledovaných skupin vykazovala téměř shodné hodnoty, tudíž přírůstek konopí patrně nemá výrazný vliv na antioxidační status. Rovněž statistické zpracování ukázalo rozdíly výsledků dle Sheffeho testu jako neprůkazné u všech použitých stanovení.

	Konopí	Kontrola
	Průměr ± směrodatná odchylka	Průměr ± směrodatná odchylka
TEAC (μmol ET/g)	11,44 ± 0,3220	11,68 ± 0,1951

*Tabulka 9: Hodnoty antioxidační aktivity dle metody TEAC*

### 5.3 Antioxidační aktivita krmných směsí

U jednotlivých vzorků byl změřen obsah celkových polyfenolových látek metodou s FCM reagentem a antioxidační aktivita metodou TEAC. Obě měření byla provedena na ústavu výživy zvířat a pícninářství Mendelovy univerzity. Výsledky z těchto měření jsou znázorněny v tabulce 10.

	Konopí	Kontrola
	Průměr ± směrodatná odchylka	Průměr ± směrodatná odchylka
FCM ( $\mu\text{mol EGK/g}$ )	66,87 ± 0,5970	41,53 ± 1,3078
TEAC ( $\mu\text{mol ET/g}$ )	43,94 ± 1,0240	31,67 ± 0,3681

*Tabulka 10: Obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivita u pokusných krmných směsí*

U tohoto stanovení vyšly oba rozdíly statisticky průkazné ( $P < 0,05$ ). Obsah celkových polyfenolových sloučenin u konopné směsi byl o 37,8 % vyšší než u kontrolní směsi a obsah antioxidačních látek byl vyšší o 27,9 %.



## 6 ZÁVĚR

V diplomové práci byl sledován vliv zkrmování technického konopí na přírůstky hmotnosti a antioxidační aktivitu u laboratorního potkana kmene Wistar albino. Krmný pokus probíhal po dobu 12 týdnů v prostorách Ústavu výživy zvířat a pícninářství Mendelovy univerzity v Brně.

U potkanů krmených konopnou krmnou směsí byly zjištěny nižší přírůstky hmotnosti než u skupiny kontrolní, přestože celková spotřeba směsi byla u skupiny konopí o 1,41 % vyšší. To mohlo být pravděpodobně způsobeno příliš vysokým podílem konopí v krmné směsi.

Pro chemickou analýzu byly odebrány vzorky jaterní tkáně a použitého krmiva. Byla zjištěna hmotnost jater potkanů z obou skupin. Mezi těmito hodnotami nebyl stanoven statisticky průkazný rozdíl.

Ke stanovení antioxidační aktivity vzorků jaterní tkáně a použitého krmiva byly použity metody TEAC a FRAP a pro zjištění obsahu celkových polyfenolů metoda s FC reagentem. Ve vzorcích jater nebyl zjištěn statisticky průkazný rozdíl u žádné z použitých metod stanovení. Rozdíly byly stanoveny pouze u vzorků krmiva, kde byl u konopné směsi naměřen o 37,8 % vyšší obsah polyfenolových látek a o 27,9 % vyšší množství antioxidačních látek.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

THC	=	delta-9-trans-tetrahydrokanabiol
CBD	=	kanabidiol
CBN	=	kanabinol
CBC	=	kanabichromen
CBG	=	kanabigerol
ATP	=	adenosintrifosfát
RNA	=	ribonukleová kyselina
DNA	=	deoxyribonukleová kyselina
SPF	=	specified patogen free – chovy prosté patogenních organismů
GF	=	germ free – chovy prosté zárodků
NL	=	dusíkaté látky
O	=	ocas (pro značení zvířat)
H	=	hlava (pro značení zvířat)
PZ	=	pravá zadní (pro značení zvířat)
LZ	=	levá zadní (pro značení zvířat)
PP	=	pravá přední (pro značení zvířat)
LP	=	levá přední (pro značení zvířat)
UV	=	ultrafialové záření
TAA	=	Total antioxidant aktivity – celková antioxidační aktivita
TAC	=	Total antioxidant capacity – celková antioxidační aktivita
ABTS	=	2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonát) diamonná sůl
PBS	=	fosfátový pufr
PSD	=	persulfát draselný
FCM	=	metoda s Folin-Ciocalteu reagentem
TEAC	=	trolox equivalent antioxidant capacity – metoda pro stanovení antioxidační kapacity
FRAP	=	ferric reducing antioxidant power – metoda pro stanovení antioxidační kapacity
EGK	=	ekvivalent gallové kyseliny
ET	=	ekvivalent troloxu
EAK	=	ekvivalent askorbové kyseliny

## 8 SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Rozdíly ve vzhledu jednotlivých odrůd</i> .....	11
<i>Obrázek 2: Struktura kanabinoidů</i> .....	15
<i>Obrázek 3: Konopné produkty</i> .....	17
<i>Obrázek 4: Využití konopí</i> .....	19

## 9 SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

<i>Tabulka 1: Procentické zastoupení jednotlivých komponent ve směsích</i> .....	28
<i>Tabulka 2: Složení konopných pokrutin</i> .....	29
<i>Tabulka 3: Obsah živin v krmných směsích</i> .....	29
<i>Tabulka 4: Živá hmotnost potkanů a přírůstky</i> .....	34
<i>Tabulka 5: Hmotnosti jater</i> .....	36
<i>Tabulka 6: Průměrná hmotnost potkaních jater (%)</i> .....	36
<i>Tabulka 7: Výsledky biochemického rozboru jaterní tkáně</i> .....	38
<i>Tabulka 8: Výsledky měření antioxidační aktivity</i> .....	39
<i>Tabulka 9: Hodnoty antioxidační aktivity dle metody TEAC</i> .....	39
<i>Tabulka 10: Obsah celkových polyfenolů a antioxidační aktivita u pokusných krmných směsí</i> .....	40
<i>Graf 1: Průměrné denní přírůstky u skupin a kontrola</i> .....	35
<i>Graf 2: Průměrné hmotnosti jater potkanů (%)</i> .....	37

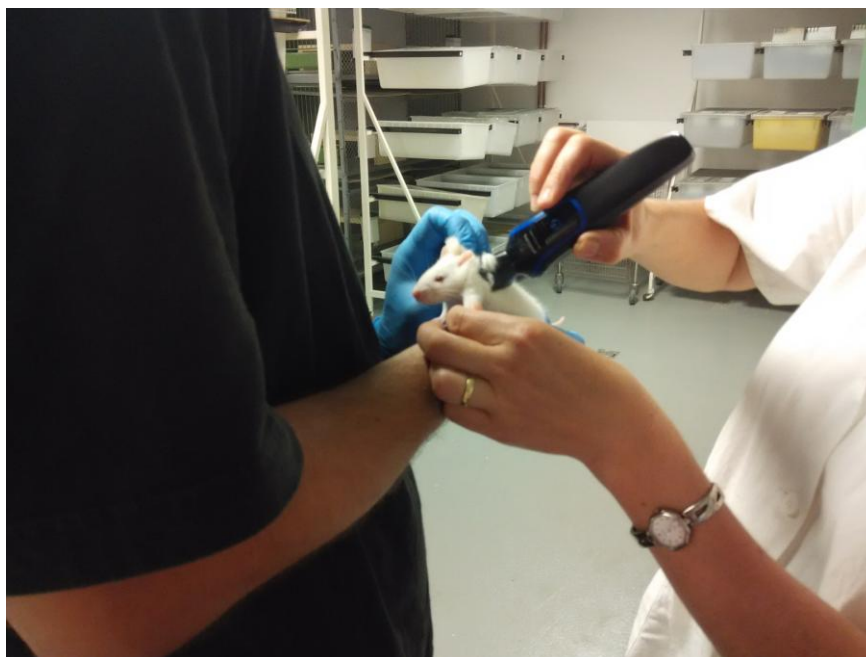
## 10 PŘÍLOHY



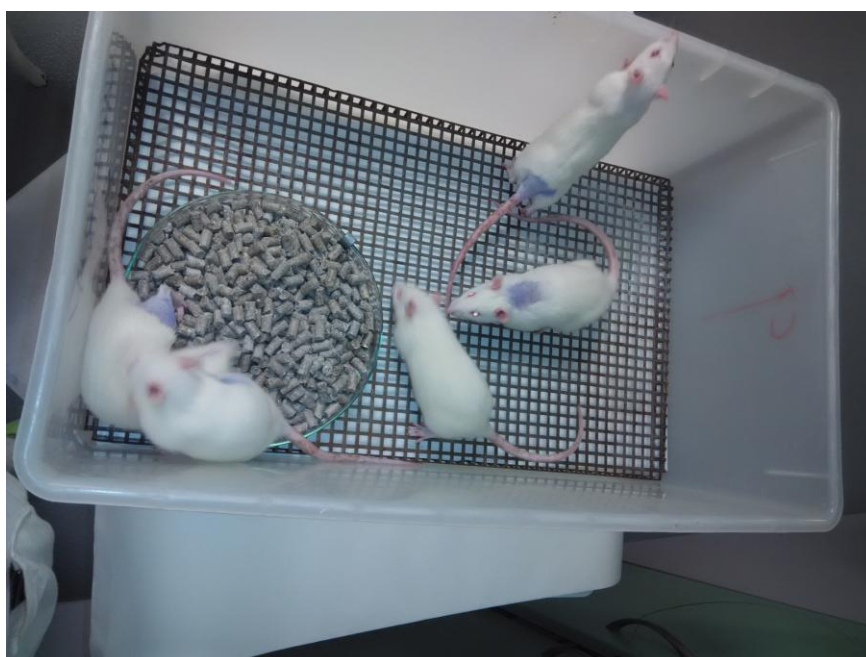
*Příloha 1: Krmná směs konopí (URBÁNKOVÁ, 2015)*



*Příloha 2: Značení potkanů (MRKVICOVÁ, 2015)*



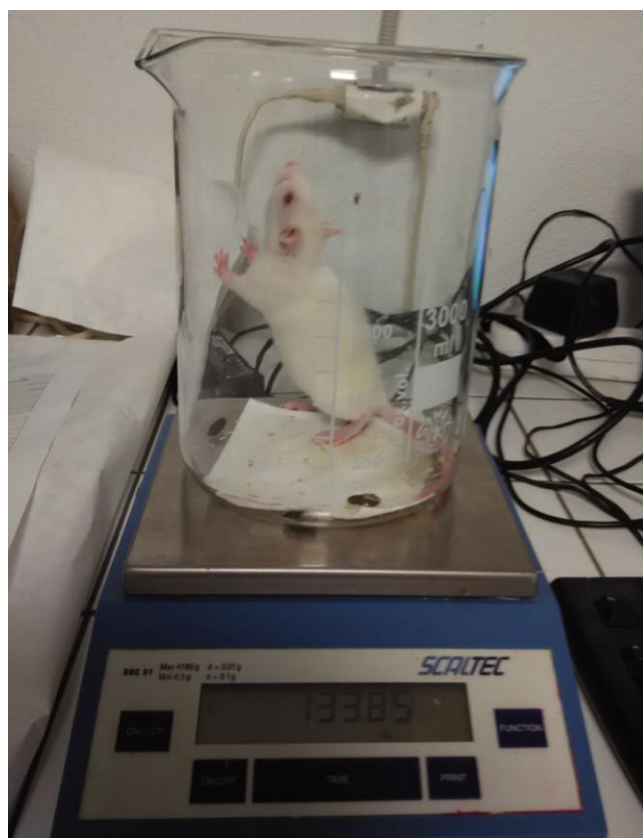
*Příloha 3: Značení potkanů 2 (MRKVICOVÁ, 2015)*



*Příloha 4: Ustájení potkanů (URBÁNKOVÁ, 2015)*



*Příloha 5: Vážení potkanů (URBÁNKOVÁ, 2015)*



*Příloha 6: Vážení potkanů 2 (URBÁNKOVÁ, 2015)*





*Příloha 7: Automatický spektrofotometr (URBÁNKOVÁ, 2016)*



*Příloha 8: Centrifuga (BENDOVÁ, 2014)*



*Příloha 9: Ultrazvuková jehla (BENDOŤÁ, 2014)*



## 11 SEZNAM PŘÍLOH

<i>Příloha 1: Krmná směs konopí (URBÁNKOVÁ, 2015)</i> .....	44
<i>Příloha 2: Značení potkanů (MRKVICOVÁ, 2015)</i> .....	44
<i>Příloha 3: Značení potkanů 2 (MRKVICOVÁ, 2015)</i> .....	45
<i>Příloha 4: Ustájení potkanů (URBÁNKOVÁ, 2015)</i> .....	45
<i>Příloha 5: Vážení potkanů (URBÁNKOVÁ, 2015)</i> .....	46
<i>Příloha 6: Vážení potkanů 2 (URBÁNKOVÁ, 2015)</i> .....	46
<i>Příloha 7: Automatický spektrofotometr (URBÁNKOVÁ, 2016)</i> .....	47
<i>Příloha 8: Centrifuga (BENDOVIÁ, 2014)</i> .....	47
<i>Příloha 9: Ultrazvuková jehla (BENDOVIÁ, 2014)</i> .....	48

## 12 POUŽITÉ ZDROJE

ADAMS, P., 2012: *Weedology* Positive Publishers, 352 s, ISBN: 978-90-7658-335-8,

ALI, E. M. M., 2012: *Antimicrobial Activity of Cannabis sativa L. Chinese Medicine* [online]., vol. 03, issue 01 [cit. 2016-02-24]. DOI: 10.4236/cm.2012.31010. Dostupné z: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/cm.2012.31010>,

BOOTH, M., 2004: *Konopí: dějiny*. 1. vyd. v českém jazyce. Překlad Jaroslava Kočová. Praha: BB art, ISBN 80-734-1348-5,

BOTANIKA KONOPÍ, 2012: *Marijanka.cz* [online], [cit. 2016-04-22], Dostupné z: <http://marijanka.cz/botanika-konopi/>,

CALLAWAY J.C, 2002: *Hemp as food at high latitudes*. *Journal of Industrial Hemp* 7(1): 105-117,

CLARAC, F. L.; VINAY, CAZALETS, J.; FADY, J.; JAMON, J., 1998: *Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat*. *Brain Research Reviews*, 28(1-2), 35-43. ISSN 0165-0173,

CONRAD, CH., 2001: *Konopí pro zdraví*. Praha: Pragma, ISBN 80-7205-834-7,

DEFERNE J., PATE D. W., 1996: *Hemp seed oil: A source of valuable essential fatty acids*. *Journal of the International Hemp Association* 3(1): 1, 4-7,

DUPAL, L., 2004: *Kniha o marihuaně*. Vyd. 2. Praha: Mat'a, 135 s. ISBN 80-7287-082-3,

EICHLER, P., 2007: *Povolení pěstovat "trávu" nic nezmění, říká expert*, iDnes.cz [online], [cit. 2016-04-06] Dostupné na www: <[http://zpravy.idnes.cz/povoleni-pestovat-travu-nic-nezmenirika-expert-f6k-/domaci.asp?c=A070221\\_133824\\_domaci\\_pei](http://zpravy.idnes.cz/povoleni-pestovat-travu-nic-nezmenirika-expert-f6k-/domaci.asp?c=A070221_133824_domaci_pei)>,

ESTERBAUER H., SCHALER, R. J., ZOLLNER, H., 1991: *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*, Free Radic. Biol. Med. 11, 81-128,

FERNANDEZ, G., 1994: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 72, 193-197,

GALLARDO C., JIMENEZ L., GARCÍA-CONESA M., 2006: *Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions*, Food Chemistry 99, s. 455–463,

GUY, G., WHITTLE, W. B., ROBSON P., 2004: *The medicinal uses of cannabis and cannabinoids*. Chicago: Pharmaceutical Press, ISBN 0853695172,

HISTORIE KONOPÍ. *Konopi.org* [online]. ©2011-2016 [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://www.konopi.org/historie-konopi>,

HISTORIE ZÁKONŮ. *Legalizace* [online]. 2009 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://www.legalizace.cz/legislativa/historie-zakonu/>,

HOLEČEK, V., 2005: *Volné radikály a antioxidanty*. Celostatnimedicina.cz [Online], [cit. 2016-03-12]. Dostupné na: <http://www.celostnimedicina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm> ,

HOUSE J.D., NEUFELD, J., LESON G. 2010: *Evaluating the quality of protein from hemp seed (Cannabis sativa L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method*. J Agric Food Chem 58: 11801–11807,

JAIN, M. C., ARORA, N., 1998: *Ganja (cannabis sativa) refuse as cattle feed*, Indian J. Anim. Sci., 58:865-867,

JEBAVÝ, L., 2011: *Chov laboratorních zvířat*: [učební text pro vyučovaný předmět Chov laboratorních zvířat]. Vyd. 1. Praha: Česká Zemědělská univerzita, s. 50. ISBN 978-80-213-2178-6,

KARUS, M. et VOGT, D. 2004. *European hemp industry. Cultivation, processing and product lines*. Euphytica 140: 7-12,

KING, L, CARPENTIER CH., GRIFFITHS, P., 2004: *An overview of cannabis potency in Europe*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 71 p. ISBN 92-916-8184-9,

KLEJDUS, B., 2004: *Separace a identifikace isoflavinů v rostlinném materiálu. Habilitační práce*. Univerzita Palackého v Olomouci, 51 s.,

KONOPI, SOUVISEJÍCÍ ZÁKON, 2015: Konopa [online], [2016-04-22]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/ostatni/100064741.html>,

MUSTAFA, A. F. a kol., 2001: *Konopí ve výživě jalovic*, University of Saskatchewan, Kanada. Dostupné z: <http://naschov.cz/konopi-ve-vyzive-jalovic/>,

KUBÁNEK, V., 2008: *Konopí a mák: (pěstování, výroby, legislativa)*. V Tribunu EU vyd. 1. Brno: Tribun EU, 152 s. ISBN 978-80-7399-438-9,

LEIZER, C. a kol., 2000: *The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition*. Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods, 2 (4): 35-53. ISSN 1089-4179,

LETNIAK, R., C. WEEKS, S. B., WHITING, A., 2000. *Low THC hemp (Cannabis sativa L.)*. Res. Rpt. 99-10028-R11999 - Hemaruka, Alberta. [www.agric.gov.ab.ca/crops/special/hemp/hemplowthc.html](http://www.agric.gov.ab.ca/crops/special/hemp/hemplowthc.html),

MARTINKOVA, Z., 2009: *Stanovení antioxidační aktivity fenolických látek v pivu*, Bakalářská práce [online], [cit. 2016-03-18] Dostupné na: <http://dspace.upce.cz/handle/10195/34585>,

- MILDER, I. E. J., a kol. , 2006: *Intakes of 4 dietary lignans and cause-specific and all-cause mortality in the Zutphen Elderly Study*. American Journal of Clinical Nutrition. 84, 2, s. 400-405. Dostupný z WWW: <<http://bit.ly/H2uytV>>,
- MIOVSKÝ, M., 2008: *Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium*. Vyd. 1. Praha : Grada publishing, 548 s. ISBN 978-80-247-0865-2,
- MOURE A., CRUZ M., FRANCO D., DOMÍNGUEZ M., SINEIRO J., DOMÍNGUEZ H., PARAJÓ C., 2001: *Natural antioxidants from residual sources*, Food Chemistry 72 (2), p. 145-171),
- NURMI, T., a kol., 2003: *Lignans in selected wines*. Food Chemistry, 83, 2, s. 303-309. Dostupný z www: <<http://bit.ly/Hry6my>>,
- ODANI S., ODANI S., 1998: *Isolation and primary structure of a methionine- and cysteine-rich seed protein of Cannabis sativa*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 62(4): 650- 654,
- PASSWATER, R. A., 2002: *O antioxidantech*; Praha: Pragma, ISBN 80-7205-897-5,
- PACIFICO, D., MISELLI, F., MICHELER, M. CORBONI, A., RANALLI, P., MANDOLINO, G. 2006. *Genetics and marker – assisted selection of the chemotype in cannabis sativa L.*, Molecular Breeding, 17: 257 – 268,
- PAULOVÁ, H., BOCHOŘÁKOVÁ, H., TÁBORSKÁ, E., 2004: *Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro*. Chemické listy, č. 98, 174 – 179,
- PEČ, J., DUŠEK, J., 2008: *Konopí, konopná droga a související léčivé přípravky*. Fyto-terapie. Praha: Univerzita Karlova v Praze, s. 189-193,
- RÄTSCH, CH., 2013: *Marihuana jako lék: etnomedicína, užívání a recepty na léčení konopím*. Vyd. 1. Olomouc: Fontána, ISBN 978-80-7336-703-9,

- RICE-EVANS, CA., MILLER, NJ., PAGANGA, G., 1996: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids., *Free Radic Biol Med.*;20(7):933-56,
- RICHTER, C., SCHWEIZER, M., 1997: *Oxidative stress and the molecular Biology of Antioxidant defens*, Scandalios, J. G., (ed.), Cold Spring Harber laboratory Press, s. 169-200,
- RUMAN, M., 2008: *Konopí: staronový přítel člověka*. Chvaleč : Konopa, 31 s. ISBN 978-80-254-1825-3,
- SESHATA, 2013: *Cannabinoid Science 101: What is Cannabigerol?*. SENSI SEEDS B.V. [Http://sensiseeds.com/](http://sensiseeds.com/) [online]., [cit. 2016-04-19]. Dostupné z: <http://sensiseeds.com/en/blog/cannabinoid-science-101-what-is-cannabigerol/>,
- SHAHIDI, F., NACZK, M., 2003: *Phenolic in food and nutraceuticals*, CRC Přes, Boca Raton,
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R. M., 1999: *Methods in etymology* 299, s. 152-178,
- SKORŠEPA, M., VACULČÍKOVÁ, D., CEJPEK, K., 2008: *Biochemické experimentálne metódy*, Banská Bystrica, ISBN 978-80-8083-570-5,
- SLADKÝ, V., 2004: *Konopí, šance pro zemědělství a průmysl*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 64 s., 4 s. barev. obr. příl. Zemědělské informace. ISBN 80-727-1145-8,
- SMALL E., MARCUS D. 2002.: *Hemp: A new crop with new uses for North America*, In: Janick J., Whipkey A. (eds.). Trends in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, VA,
- SOHAL, R. S., 1981: *Age pigments*, Amsterdam: Elsevier/North Press,
- STRATIL, P., 2005: *Přírodní antioxidanty*, Disertační práce,

SURAI, P. F, 2002: *Natural Antioxidants in Avian Nutrition and Reproduction*. 1.vyd. Nottingham University Press, ISBN 1-897676-95-6. 5, 280 s.,

ŠIROKÁ, M., 2009: *Konopí seté – energetická a průmyslová plodina třetího tisíciletí*, Biom.cz [online], [cit. 2016-03-26]. Dostupné z www: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/konopi-sete-energiticka-a-prumyslova-plodina-tretiho-tisicileti>>. ISSN: 1801-2655,

ŠMIROUS, P., 2013: *Lnářský Svaz ČR. Zápisník Len a konopí 2013*. Šumperk: AGRITEC s.r.o, ISBN 978-80-87360-14-9,

ŠNOBL J., 2004: *Rostlinná výroba IV*. Česká zemědělská univerzita, Praha,

ŠTÍPEK, S., 2000: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 314 s., ISBN: 80-7169-704-4.,

THE FOUR MAJOR PHYTOCANNABINOIDS, 2011: *A Cannabinoid pharmacopoeia* [online], [cit. 2016-04-22]. Dostupné z: <http://cannabinoidpharmacopoeia.blogspot.cz/2011/02/cannabidiol-thc.html>,

TRNA, J., TÁBORSKÁ, E., 2011: *Přírodní polyfenolické antioxidanty* [online], [cit. 2016-3-11]. Dostupné z www: <<http://bit.ly/H1pReR>>,

Upcoming Ingredients: Cannabis (Hemp) Oil. VIVA [online]. 2014 [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://www.vivamagonline.com/upcoming-ingredients-cannabis-hemp-oil/>,

VALÍČEK, P., 2003: *Léčivé rostliny a omamné drogy*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 94 s. ISBN 80-7157-725-1,

VELÍŠEK, J., 1999: *Chemie potravin, 3. díl*, OSSIS Tábor, 342 s., ISBN: 80-902391-5-3,

VINSON, J. A., HAO, Y., SU, X., ZUBÍK, L., 1998: Phenol antioxidant quantity and quality in four: vegetables, J. Agricultura Food Chemistry 64/9, s. 3630-3634,

VINSON, J. A., PROCH, J., BOSE, P., 2001: Flavonoids and other polyphenols, Methods in enzymology 335, s. 103-114,

ZLOCH Z., ČEKALOVSKÝ J., AUJEZDSKÁ A., 2004: *Stanovení obsahu polyfenolů a celkové antioxidační kapacity v potravinách rostlinného původu*, Plzeň,