

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality a bezpečnosti potravin**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Obsah biologicky aktivních látek v různých  
genotypech konopí (*Cannabis sativa* L.)**

**Diplomová práce**

**Bc. David Faigl**

**Kvalita kvality a bezpečnosti potravin**

**Ing. Anežka Kosmáková Janatová, Ph.D.**

**© 2023 ČZU v Praze**



## Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Obsah biologicky aktivních látek v polyploidních genotypech konopí (*Cannabis sativa* L.)" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne \_\_\_\_\_

## Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval své vedoucí diplomové práce Ing. Anežce Kosmákové Janatové, Ph.D., za její odborné rady, ochotu a vřelý přístup. Dále bych rád poděkoval panu Ing. Tomáši Skálovi za konzultace zejména k praktické části. V neposlední řadě patří dík též mé rodině a přátelům, kteří mě podporovali a motivovali.

# Obsah biologicky aktivních látek v různých genotypech konopí (*Cannabis sativa* L.)

## Souhrn

V této práci byl studován obsah majoritních i minoritních kanabinoidů v různých genotypech konopí, pěstovaného v kontrolovaných podmínkách na FAPPZ ČZU.

V literární části je nejprve shrnuta botanika a taxonomie konopí, následována popisem kulturně-historického vývoje soužití této unikátní rostliny s člověkem. Další kapitola se zaměřuje na českou legislativu zabývající se touto problematikou v kontextu evropském a světovém. Rozebrána je z pohledu ilegální psychotropní látky i léčebného prostředku a je sledován její vývoj v čase. Následující část je dedikována biologicky aktivním látkám, pozornost je věnována zejména kanabinoidům a terpenoidům; kromě obecné charakteristiky je zahrnuta jejich klasifikace a biosyntéza. Nejvýznamnější obsahové látky (z kanabinoidů např. THC, CBD, z terpenů myrcen, pinen a další) jsou charakterizovány jednotlivě, včetně farmakologických účinků, významu pro rostlinu a souvislostmi mezi nimi. U terpenů, jenž jsou zodpovědné za rozmanité a typické aroma konopí, je vylíčeno, jakým způsobem jej konkrétní sloučenina ovlivňuje.

Nakonec jsou v rešerši popsány nejběžněji používané instrumentální metody ke stanovení těchto látek, jmenovitě plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Vyjma základních principů, na kterých jsou tyto přístroje založeny, jsou zmíněny též rozdíly mezi danými metodami, jejich přednosti a nevýhody pro danou analýzu.

Mezi genotypy vybrané pro tento výzkum patřily Nurse Jackie 1, Shaman 5, Blueberry 3, CBD Caramel 6 a Forbidden fruit 2, 3, 5, 6 a 8. Od každé odrůdy byly vypěstovány 3 rostliny, celkem tedy 27. Byly zaznamenány výnosy květenství pro každou rostlinu a stanovena ztráta sušením.

Po homogenizaci byly připraveny ethanolové extrakty ve 3 různých koncentracích. Vlastní stanovení probíhalo na HPLC s UV detektorem. Data byla zpracována v programu Chromeleon. Tímto způsobem byl zjištěn procentuální obsah THC, CBD, CBG, jejich odpovídajících prekurzorových kyselin a minoritních kanabinoidů THCV, CBDV a CBN. Pro statistické vyhodnocení byla zvolena jednofaktorová ANOVA s využitím post-hoc metody Fisher LSD test. Na základě výsledků byly mezi sebou dané genotypy porovnány.

Nejvyšší obsah celkového THC byl zjištěn u odrůdy Forbidden fruit 5 s hodnotou 10,502 %. Genotyp CBD Caramel 6 měl nejvyšší koncentraci CBD (4,486 %). Obsahu CBG mírně přesahujícího 1 % dosáhly 2 odrůdy, Forbidden fruit 2 (1,017 %) a 3 (1,008 %). U Nurse Jackie 1 byl stanoven nejvyšší obsah neutrálního THC (1,412 %) a CBN (0,364 %), produktu degradace THC, a minoritního kanabinoidu THCV (0,009 %). Jediná další odrůda, u které byl detekován CBN, je Forbidden fruit 5 s koncentrací 0,011 %. Přítomnost CBDV byla zjištěna u tří genotypů, Blueberry 3, Forbidden fruit 5 (oba 0,001 %) a CBD Caramel 6 (0,003 %).

**Klíčová slova:** Konopí, genotyp, kanabinoidy, kanabinoidní kyseliny, HPLC-UV

# Content of biologically active substances in different genotypes of cannabis (*Cannabis sativa* L.)

## Summary

In this work, the content of major and minor cannabinoids in different genotypes of cannabis grown under controlled conditions at FAPPZ ČZU was studied.

In the literature section, the botany and taxonomy of cannabis is first summarized, followed by a description of the cultural and historical development of coexistence of this unique plant with humans. The next chapter focuses on the Czech legislation dealing with this issue in the European and world context. It is discussed from the perspective of an illegal psychotropic substance and a therapeutic agent and its evolution over time is traced. The following section is dedicated to biologically active substances, with particular attention paid to cannabinoids and terpenoids; in addition to their general characteristics, their classification and biosynthesis are covered. The most important constituents (among the cannabinoids, e.g. THC, CBD, among the terpenes, myrcene, pinene and others) are characterised individually, including their pharmacological effects, their importance for the plant and the relationship between them. For terpenes, which are responsible for the diverse and characteristic aroma of cannabis, the way in which a particular compound affects it is described.

Finally, the most commonly used instrumental methods for the determination of these compounds are described, namely gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC). In addition to the basic principles on which these instruments are based, the differences between the methods, their advantages and disadvantages for a given analysis are also discussed.

The genotypes selected for this research included Nurse Jackie 1, Shaman 5, Blueberry 3, CBD Caramel 6 and Forbidden fruit 2, 3, 5, 6 and 8. Three plants of each variety were grown, for a total of 27 plants. Inflorescence yields were recorded for each plant and loss to drying was determined.

After homogenization, ethanol extracts were prepared at 3 different concentrations. The actual analysis was carried out on HPLC with UV detector. Data were processed in Chromeleon software. In this way, the percentage of THC, CBD, CBG, their corresponding precursor acids and the minor cannabinoids THCV, CBDV and CBN were determined. One-factor ANOVA was chosen for statistical evaluation using the Fisher LSD post-hoc test. Based on the results, the genotypes were compared with each other.

The highest total THC content was found in the Forbidden fruit 5 cultivar with a value of 10.502 %. The CBD Caramel 6 genotype had the highest CBD concentration (4.486 %). Two varieties, Forbidden fruit 2 (1,017 %) and 3 (1,008 %), had a CBG content of slightly more than 1 %. Nurse Jackie 1 had the highest neutral THC content (1,412 %) and CBN (0,364 %), a product of THC degradation, and the minor cannabinoid THCV (0,009 %). The only other variety for which CBN was detected was Forbidden fruit 5 with a concentration of 0,011 %. The presence of CBDV was detected in three genotypes, Blueberry 3, Forbidden fruit 5 (both 0,001 %) and CBD Caramel 6 (0,003 %).

**Keywords:** Cannabis, genotype, cannabinoids, cannabinoid acids, HPLC-UV

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce.....</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Taxonomie a botanika konopí (<i>Cannabis sativa</i> L.).....</b>	<b>11</b>
<b>3.2</b>	<b>Historie.....</b>	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Legislativa.....</b>	<b>15</b>
<b>3.4</b>	<b>Biologicky aktivní látky .....</b>	<b>18</b>
3.4.1	Kanabinoidy .....	18
3.4.1.1	Biosyntéza kanabinoidů.....	19
3.4.1.2	Klasifikace kanabinoidů .....	19
3.4.1.3	THC .....	20
3.4.1.4	CBD .....	21
3.4.1.5	CBG .....	21
3.4.1.6	CBC .....	22
3.4.2	Terpeny .....	23
3.4.2.1	Biosyntéza terpenů.....	23
3.4.2.2	Klasifikace terpenů .....	24
3.4.2.3	Myrcen.....	25
3.4.2.4	$\beta$ -karyofylen.....	26
3.4.2.5	Pinen .....	27
3.4.2.6	Limonen.....	28
3.4.2.7	Linalool.....	28
3.4.2.8	Nerolidol.....	29
3.4.2.9	Karofylen oxid.....	29
3.4.2.10	Terpinolen a $\alpha$ -terpineol .....	29
<b>3.5</b>	<b>Instrumentální metody .....</b>	<b>31</b>
3.5.1	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií .....	31
3.5.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	32
<b>4</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Rostliny konopí .....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Biologický materiál .....	33
4.1.2	Pěstování.....	34
4.1.3	Zpracování.....	34
<b>4.2</b>	<b>Stanovení kanabinoidů .....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Homogenizace .....	35

4.2.2	Příprava vzorků .....	35
4.2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	35
<b>4.3</b>	<b>Vyhodnocení .....</b>	<b>36</b>
4.3.1	Stanovení sušiny .....	36
4.3.2	Statistické metody .....	36
<b>5</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Výnosy sušeného květenství .....</b>	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Obsah kanabinoidů .....</b>	<b>39</b>
5.2.1	Obsah majoritních kanabinoidů .....	39
5.2.2	Obsah minoritních kanabinoidů .....	40
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>44</b>



# 1 Úvod

Konopí seté (*Cannabis sativa* L.) je neobyčejně všestrannou rostlinou, využívanou člověkem již po tisíce let. Nachází uplatnění při výrobě vláken a získávání oleje ze semen, jako energetická plodina s pozitivním vlivem na půdní prostředí, jako terapeutický prostředek pro léčbu či zmírnění příznaků mnoha chorob a v neposlední řadě i jako rekreační omamná látka.

Konopí obsahuje široké spektrum chemických sloučenin, dosud je jich známo přes 1600. Kromě primárních metabolitů, jako jsou sacharidy, dusíkaté látky (proteiny, nukleové kyseliny), mastné kyseliny, disponuje též širokou škálou sekundárních metabolitů (Hanuš et al. 2016). Ty slouží rostlinám především jako obrana proti škůdcům (Taura 2009). Mnoho z nich je biologicky aktivních, mezi nejvýznamnější a nejvíce studované skupiny patří kanabinoidy a terpenoidy, jež jsou spolu s dalšími látkami (flavonoidy, alkaloidy,..) produkovány žlaznatými trichomy ve formě silně aromatické lepkavé pryskyřice.

Nejvíce zastoupenými kanabinoidy jsou THC ( $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol) a CBD (kanabidiol), v konopí jich však bylo popsáno více než 160 (Hanuš et al. 2016). Jednotlivé genotypy mají rozdílná spektra a poměry těchto biologicky aktivních látek, které se navíc vzájemně synergicky ovlivňují (Russo 2011). Profil biologicky aktivních látek předurčuje výsledný terapeutický efekt. Z tohoto důvodu je důležité analyzovat a charakterizovat jejich složení, což umožňuje selektovat odrůdy léčebného konopí nejvhodnější pro specifické fyziopatologické stavy a dosáhnout tak lepších výsledků při léčbě.

## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Hlavním cílem práce je stanovení obsahu významných biologicky aktivních látek v různých genotypech konopí. Zejména majoritních a minoritních kanabinoidů. Vyplývající hypotézou je, že množství sledovaných látek bude u jednotlivých genotypů odlišné. Získaná data mohou být použita pro další studie, například biologické či antimikrobiální aktivity.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Taxonomie a botanika konopí (*Cannabis sativa* L.)

Konopí seté je řazeno do čeledi konopovité (*Cannabaceae*). Ta se v současnosti skládá z konopí (*Cannabis*), chmelu (*Humulus*) a osmi dalších rodů, jež byly dříve součástí čeledi břestovcovité (*Celtidaceae*). Čeleď zahrnuje zhruba 170 druhů (McPartland 2018)

Prvním člověkem, který odborně popsal konopí jako konopí seté (*Cannabis sativa* L.) byl Carl Linné. Taxonomické zařazení je předmětem diskuzí již od 19. století (Basyal & Regmi 2021). Dnes mezi botaniky převládá názor, že konopí je jediným druhem. Toto tvrzení bylo v posledních desetiletích podpořeno analýzou genetické informace (Simiyu et al. 2022). Ten se dále dělí na poddruhy: konopí seté (*C. sativa* ssp. *sativa*), indické (*C. sativa* ssp. *indica*) a rumištní (*C. sativa* ssp. *ruderalis*). Původně byly popsány jako samostatné druhy, z čehož pramení mnohdy užívaná, ne však zcela správná a přesná nomenklatura – „*C. sativa*, *C. indica*“ (McPartland & Guy 2017)

Konopí je jednoletá, dvoudomá, vzácně jednodomá rostlina. Lodyha je vzpřímená, v závislosti na podmínkách prostředí a genetické odrůdě může dosahovat výšky až pěti metrů. Dlaňovité listy jsou složeny z pěti až sedmi lístků kopinatého tvaru s ostře pilovitým okrajem, jenž se zužují na obou koncích (Bonini et al. 2018).

Kořenový systém konopí je dobře vyvinutý (Andre et al. 2016) Hlavní kořen dosahuje délky od 30 cm do 2 m (Amaducci et al. 2008), postranní kořeny od 20 do 100 cm. Konopí čerpá vodu a živiny (včetně relativně vysokého obsahu vápníku) z hlubších vrstev půdního profilu. Pohybem těchto složek do svrchních částí zeminy se následně stávají využitelné pro rostliny s mělkým kořenovým systémem (např. obilniny, okopaniny). Tím se zvyšuje úrodnost a zlepšuje půdní struktura (Strzelczyk et al. 2021).

Samičí květy postrádají okvětní lístky a mají jeden či dva pestíky. Z pestíku obaleného drobným palistem vyčnívají dvě dlouhé blizny. Květy nemají řapíky, jsou přilehlé a pokrývají je charakteristické chloupky, zvané trichomy. Samčí květy mají pět nažloutlých okvětních lístků a prašníků, které po odkvětu opadávají. Jsou posazené na řapících, což usnadňuje větru uvolňování pylu (Strzelczyk et al. 2021)

Plodem je jednosemenná nažka. Průměrná velikost semen se pohybuje v rozmezí 3 až 5 mm, v závislosti na odrůdě a dalších faktorech (Yadav 2014). Zralá semena jsou hnědě až tmavě šedě zbarvená, často s charakteristickou mozaikou (Callaway 2004).

### 3.2 Historie

Dle paleobotanických studií se konopí vyskytovalo již před 11700 lety ve střední Asii, poblíž pohoří Altaj (Crocq 2020). V důsledku domestikace a díky schopnosti přizpůsobit se různým klimatickým podmínkám, i značně nepříznivým, se rozšířilo nejprve po Eurasii a následně do celého světa (Pisanti & Bifulco 2019). Konopí bylo zdrojem vláken pro výrobu provazů a sítí, potravy a oleje ze semen (Crocq 2020). V severozápadní Číně byl nalezen hrob muže, pohřbeného kolem roku 750 př. n. l., s 800 g zachovaného konopí. Zjištěný vysoký obsah THC, poukazuje na skutečnost, že se nejednalo pouze o sesbírané divoké rostliny, ale o odrůdy

kultivované lidmi a vybrané na základě jejich potence. Jde tak o zatím pravděpodobně nejstarší důkaz použití konopí jako farmakologicky aktivní látky, ať už dané kultuře sloužilo jako léčivý či věštický prostředek (Russo et al. 2008).

Nejpravděpodobnější způsob šíření konopí do Evropy a Středomoří je prostřednictvím Skythů nebo proto-Skythů, kteří se přesunuli ze Střední Asie přes Rusko asi před 3500 lety, i když pokud jde o evropské země, některé paleobotanické důkazy dokazují přítomnost divokého pylu v Rumunsku, Bulharsku a Maďarsku již kolem 10200-8500 let př. n. l. Zbytky konopí byly nalezeny v hrobech Skythů datovaných do roku 450 př. n. l., které byly nalezeny v Německu, na Sibiři a na Ukrajině. Skythové, jak dokládá řecký historik Hérodotos z Halikarnassu (484-425 př. n. l.), používali konopí především při pohřebních obřadech a hostinách formou vykuřování a relaxačních saun, ale také jako vlákno. Spekuluje se, že sami Skythové se mohli naučit používat konopí od Asyřanů a Thráků v oblasti východního Balkánského poloostrova a v Dácii (2600 př. n. l.), kteří znali rituální užívání konopí k usnadnění vizí a transu. Jeho starověká definice Quonubu nebo Qunnapu se poprvé objevuje na hliněné tabulce datované do doby Aššurbanipala, posledního velkého krále novoasyrské říše (asi 600 př. n. l.). Asyrský termín má stejný radix jako všechna v té době používaná slova definující konopí, židovské Quanneb nebo Kaneh, perské Quonnab, arabské Quannob, řecké Kannabas až po dodnes používané latinské Cannabis. Asyrský lid byl dobře obeznámen s hlavními vlastnostmi konopí a používali jej k lokální léčbě otoků a pohmožděnin, při depresích, impotenci, artritidě, ledvinových kamenech a gynekologických poruchách (Pisanti & Bifulco 2019).

Vývoj konopí a interakce s lidmi trvá tisíciletí a jeho domestikace bude pokračovat i v budoucnosti. Ať už první lidé používali konopí nejprve jako zdroj vlákna, potravy nebo látek ovlivňujících mysl, postupně vyvinuli různé zemědělské techniky, aby zvýšili výnos a kvalitu všech těchto produktů, což vedlo ve dvacátém století ke šlechtění kultivarů konopí speciálně pro výrobu vlákna, semen nebo drog na základě místních kulturních preferencí. Příroda a člověk spolupracovali při řízení domestikace konopí, ale představovali též protichůdné síly, které vyvolaly rozdílné výsledky. Například izolace, umělá selekce a příbuzenské křížení, které člověk zavedl během domestikace, omezily genetickou rozmanitost, zatímco přirozené křížení a míšení genomů ji podpořilo (Clarke & Merlin 2016)

Moderní historie léčebného konopí začíná v 19. století, kdy byla poprvé použita vědecká metoda při studiu jeho farmakologických a toxikologických vlastností. Prvním, kdo podle našich znalostí použil experimentální metodu při studiu konopí, byl irský lékař William Brooke O'Shaughnessy, který působil v Indii, kde prováděl své experimenty. Po návratu do Evropy šířil poznatky o nesčetných farmakologických účincích konopí mezi lékařskou komunitu (MacGillivray 2017). Uvědomil si, že odrůda konopí pěstovaná v Indii, se liší od evropské odrůdy používané hlavně pro výrobu vláken (*C. sativa*), co se týče farmakologických vlastností. Proto důsledně přistoupil ke zkoumání rostlinných extraktů, přičemž jako testovací zvířata použil různé druhy zvířat včetně myší, psů, koček a králíků. Jakmile zjistil bezpečnost konopí, využil místní recepty k přípravě alkoholových tinktur z konopí, které podával některým svým pacientům postiženým revmatismem, cholerou nebo tetanem, a dokonce i kojenci trpícím křečemi. Pacienti na léčbu dobře reagovali, a tak vyvodil, že rostlinný extrakt má silné analgetické a myorelaxační vlastnosti, a navrhl jej jako lék proti křečím. Četné, ale neúčinné byly pokusy významných chemiků o identifikaci a izolaci účinných látek z O'Shaughnessyho alkoholových tinktur z konopí, což se nakonec podařilo až v roce 1964 (Pisanti & Bifulco

2019). Díky studiím a poznatkům, které učinil O'Shaughnessy ve Velké Británii, a dále díky práci barona Sylvestra de Sacy (1758-1838) ve Francii, který přeložil do francouzštiny dosud neznámé arabské rukopisy informující – mimo jiné – o léčivých a psychotropních vlastnostech konopí, zájem o tento nový rod, a hlavně o jeho pryskyřici "hašiš", rychle rostl a šířil se po celé Evropě (Booth 2005). V roce 1890 zveřejnil osobní lékař královny Viktorie sir J. Russell Reynolds v prestižním lékařském časopise *The Lancet* svá lékařská pozorování o vlastnostech konopí, přičemž tuto rostlinu považoval za nejužitečnější pro léčbu bolestivých patologií (Pisanti & Bifulco 2019).

Spolu se zvýšeným lékařským využitím konopí se ve Francii rychle objevila nová móda – užívání květenství a pryskyřice konopí jako psychoaktivní drogy, kterou zavedl francouzský psychiatr Jacques Joseph Moreau, zaujatý pozorováním obvyklých uživatelů během cesty po Blízkém východě. Stejně jako předtím O'Shaughnessy přijal experimentální metodu k podrobnému studiu psychoaktivních účinků konopí a pro svůj přístup je považován za otce moderní psychofarmakologie. V roce 1840 ji vyzkoušel nejprve na sobě a poté na svých studentech a podrobně analyzoval její akutní účinky. Následně podával konopí svým duševně nemocným pacientům a pozoroval, že je užitečné pro zvýšení chuti k jídlu, usnadnění spánku a zklidnění. Velmi brzy se jeho psychotropní využití rozšířilo i mimo terapeutické použití a řada umělců jej chtěla vyzkoušet osobně. Nejznámější příklad představuje "Club des Hashischins" (Klub jedlíků hašiše), který působil v letech 1844-1849 v pařížském hotelu de Pimodanin a který navštěvovali mimo jiné významní spisovatelé a básníci jako Victor Hugo, Alexandre Dumas, Charles Baudelaire, Honoré de Balzac, Théophile Gautier a malíř Ferdinand Boissard. Drogu, která se používala při sezeních, poskytl sám Moreau (Booth 2005).

V tomto období zaujímala Itálie vedoucí postavení v experimentech s konopím. Italští vědci Carlo Erba, lékárník a zakladatel slavné italské farmaceutické společnosti, a Giovanni Polli, lékař a ředitel vědeckého časopisu "*Annals of Chemistry applied to Medicine*", totiž do Itálie importovali první pokusy s konopím. Ve slavném experimentu, který se uskutečnil 19. června 1847 v Miláně, Polli spolu s Francescem Viganò a Pietrem Mordaretem testovali jako dobrovolníci účinky rostliny za přítomnosti velké skupiny dalších lékařů a vědců. Výsledky byly popsány v anonymní podobě, kde byli experimentátoři označeni písmeny A, B a C. Takové "konopné zkušenosti" se staly mezi vědci a lékaři velmi populární a byly prováděny další pokusy s hašišem, včetně pozorování a přesného zaznamenávání (Pisanti & Bifulco 2019).

Carlo Erba se stejně jako jeho angličtí kolegové neúspěšně pokusil izolovat účinné látky rostliny a v roce 1849 zahájil činnost laboratoře pro obchod s galenickými preparáty konopí, které byly předtím testovány na bezpečnost a účinnost proti migréně, nevolnosti a artritidě. Tyto přípravky měly velký úspěch a podpořily podnikatelskou činnost lékárníka. Obavy mu však dělaly zejména náklady spojené s dovozem léku z Egypta a nutností mít dostatečné zásoby rostliny, aby bylo možné uspokojit rostoucí poptávku. Tento problém částečně vyřešil jiný lékárník, Pietro Burgo, který experimentoval s olejem z konopí získaným z odrůdy *sativa* hojně pěstované v Itálii za nízkou cenu. K podobnému závěru dospěl v roce 1887 i lékař Raffaele Valieri, vedoucí starobylé "nemocnice pro nevléčitelně nemocné" v Neapoli, který ve svém spise "O místním konopí a jeho přípravcích místo *C. indica*" uvádí, že inhalace místního konopí *C. sativa*, jehož produkce byla v Itálii a zejména v Kampánii velká, byla účinná u pacientů s několika patologickými stavy od migrény, neuralgie, nespavosti, hysterie až po astma, plicní emfyzém a exoftalmickou strumu. Pozoroval, že italský kmen konopí je stejně účinný jako *C.*

*indica*, pokud se podává ve dvojnásobné dávce, ale s nižšími náklady na výrobu. To bylo způsobeno, jak je nyní známo, rozdílným obsahem účinných kanabinoidů u obou druhů. Druhá polovina 19. století se vyznačovala postupným nárůstem využití konopí v medicíně a lze ji označit za zlatý věk konopí. V tomto období bylo provedeno mnoho vědeckých studií v Evropě i ve Spojených státech a počet publikací o konopí rychle rostl. Současně se době několik laboratoří po celém světě (např. Bristol-Meyers a Squibb ve Spojených státech a Merck v Německu) uvedlo na trh různé komerční preparáty (tinkтуры, pilulky a extrakty), které byly předepisovány a užívány především pro své analgetické, protizánětlivé a antispastické vlastnosti. V roce 1899 si farmakolog Walter Ernest Dixon všiml, že inhalace konopí je ve srovnání s jinými způsoby užití obzvláště účinná, protože vyvolává konzistentní a rychlý farmakologický účinek. Shoemaker uvedl jeho účinnost u velkého počtu pacientů léčených s neuralgií, migrénou, gastralgii, enteralgii a mozkovými nádory. Kromě toho bylo také užitečné pro léčbu závislosti na opiátech a v této indikaci se používalo několik let. V roce 1915 anglický lékař Sir William Osier definoval konopí jako nejlepší lék na silné bolesti hlavy a četné jiné nemoci. Mnoho lékařů jej předepisovalo při migréně, neklidu, bolestech a nespavosti (Fankhauser 2002).

Užívání léčebného konopí se začalo snižovat na počátku 20. století. Důvodů tohoto poklesu je více. Velká spotřeba léků na bázi konopí způsobila, že se zřetelně projevila variabilita v účinnosti i terapeutických dávkách mezi pacienty. Kromě toho se v těchto letech staly komerčně dostupnými první analgetika a protizánětlivé léky, jako je aspirin, které měly lepší účinnost, farmakologický profil s předem stanoveným dávkováním a nebyly psychoaktivní. I když slavný úvodník z časopisu *Medical and Surgical Reporter* z New Yorku upozornil, že oproti mnoha jiným lékům, u konopí nikdy nebyl zdokumentován případ otravy. Ve 20. století se objevily první obavy z nekontrolovaného šíření konopí pro rekreační účely. V roce 1925 byla v Ginevře podepsána druhá Mezinárodní opiová úmluva, kterou podepsaly Spojené státy, Německo, Velká Británie, Francie, Itálie, Nizozemsko, Portugalsko, Rusko, Čína, Japonsko, Persie a Siam s cílem regulovat a kontrolovat spotřebu, obchodování a užívání opia, kokainu a dalších drog. Úsilí Egypta, Spojených států amerických a Číny bylo dostat do seznamu zakázaných látek také hašiš. Užívání konopí bylo důležitým kulturním prvkem v Indii, která se proti tomuto návrhu silně postavila, takže nebyl schválen. Vývoz *C. indica* do zemí, kde nebylo povoleno, byl však výslovně zakázán. K definitivnímu pádu konopí došlo ve Spojených státech, kde byla prohibiční politika přijata díky úsilí Harryho Anslingera, vedoucího Federálního úřadu pro narkotika, který v roce 1937 zavedl "zákon o dani z marihuany". Tento zákon omezoval placení daně ve výši 1 dolaru za každý obchod týkající se konopí pro lékařské nebo průmyslové využití a 100 dolarů pro všechny ostatní účely. Konopí nebylo zakázáno, ale stalo se natolik prohibičním kvůli svým nákladům a trestům spojeným s porušením zákona (pokuty až 2000 dolarů nebo dokonce vězení), že byly přerušeny všechny pokusy o lékařské využití konopí (Pisanti & Bifulco 2019). Nic s tím nezmohla ani opozice, představovaná Americkou lékařskou asociací prostřednictvím Dr. Williama Woodwarda, který i nadále prosazoval farmakologický potenciál této rostliny navzdory její psychoaktivitě. V roce 1941 bylo konopí Spojenými státy definitivně vyřazeno z Národního slovníku a formuláře lékopisu (Pisanti & Bifulco 2017). V roce 1960 bylo vzhledem k velké potřebě drog, včetně konopí, k rekreačním účelům odsouzeno a zařazeno mezi návykové látky (Booth 2005).

Základní výzkum konopí však probíhal na několika místech po celém světě. V Izraeli se vědcům (Gaoni a Mechoulam) nakonec podařilo vyřešit zásadní problém a poprvé identifikovat molekulární chemickou strukturu kanabinoidů, účinných látek konopí, a zejména nejrozšířenějšího THC ( $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol), který je zodpovědný za jeho psychoaktivitu. Toto zjištění podnítilo studie těchto sloučenin, které dosáhly dalšího vrcholu v roce 90. letech, kdy se začal zkoumat endokanabinoidní systém, jeho receptory a metabolismus. Endogenní molekuly působící na tento signální systém, pojmenované endokanabinoidy, byly objeveny (Pisanti et al. 2007; Proto et al. 2012). Poznání takového endogenního fyziologického systému, který při narušení dává vzniknout četným patologiím nebo se na nich alespoň podílí, byl průlomový. Začala nová éra s obnoveným vědeckým zájmem o farmakologické vlastnosti konopí, který vedl k publikování tisíců prací a klíčových zjištění podporujících terapeutickou hodnotu této rostliny u mnoha fyziopatologických stavů (Bifulco & Pisanti 2009; Aquila et al. 2009; Kaur et al. 2016). V posledních dvou desetiletích se řada farmaceutických společností pokoušela vyvinout nová syntetická léčiva schopná cílit na endokanabinoidní systém a posilovat nebo blokovat jeho funkce v závislosti na fyziopatologickém kontextu. Tato strategie vedla v roce 2006 ke schválení CB1 antagonisty rimonabantu pro léčbu obezity, potenciálního lékového trháku, který bohužel nesplnil velká očekávání a v roce 2008 byl pozastaven z trhu kvůli depresím a sebevražednému chování hlášenému u pacientů a brzy poté v roce 2009 stažen Evropskou komisí (Bifulco & Pisanti 2009).

V posledních letech několik zemí po celém světě zavedlo nové, liberálnější politiky týkající se konopí, které umožňují jeho lékařské užívání, a dokonce ho dekriminálnízují nebo legalizují pro rekreační účely, jako je tomu ve státech Washington, Colorado, Oregon a Aljaška ve Spojených státech (Bifulco & Pisanti 2015). Zvýšené rozšíření konopných lékařských, kosmetických a nutričních produktů souvisí s trendem péče o zdraví přirozenějším způsobem. Léčebné konopí nyní díky tolerantnější politice po celém světě prožívá nový zlatý věk. Toto téma má obrovský význam z hlediska veřejného zdraví. Investuje se mnoho zdrojů a úsilí do rozsáhlých, robustních a randomizovaných klinických studií, prováděných dle konsolidovaných standardů a metod, jež poskytnou více statisticky významných dat a přesvědčivých vědeckých důkazů o léčebných přínosech, ale i negativních účincích konopí, a produktů z něj vyrobených (Pisanti & Bifulco 2019).

### 3.3 Legislativa

Užívání psychoaktivních návykových látek patří k aktuálním problémům veřejného zdraví ve vyspělých zemích. Z nich je v Evropě nejčastěji užívanou nelegální látkou konopí. Přestože sociálně-zdravotní zátěž užívání konopí není tak velká jako v případě alkoholu a tabáku, nelze jeho dopad na veřejné zdraví podceňovat (Čecho et al. 2017). Zatímco příležitostné užívání marihuany nemusí nutně vést ke zdravotním následkům, její pravidelné užívání je spojeno s četnými důsledky, jako je zvýšené riziko duševních poruch včetně závislosti, změněný vývoj u dospívajících (Ramström 2004), respirační onemocnění (Joshi et al. 2014), jakož i sociální dopady, jako jsou ovlivněné školní výsledky, rizikové chování a delikvence (Bachman et al. 2007).

V současné době se stále častěji vedou veřejné debaty o částečné dekriminálnízaci, tj. legalizaci pro rekreační užívání. Takové legislativní změny mají své opodstatnění, aby se

předešlo nevhodné stigmatizaci příležitostných rekreačních uživatelů ze strany veřejnosti (Kleiman 2011). Analýza využívající údaje o užívání konopí mladistvými v 38 zemích Evropy a Severní Ameriky ukázala pozitivní korelaci mezi mírou dekriminlizace a prevalencí pravidelného užívání konopí. Výsledky však byly poměrně různorodé, což naznačuje, že důležitou roli hrají specifické faktory historického a kulturního pozadí (Shi et al. 2015).

Několik analýz evropské protidrogové politiky naznačuje, že neexistuje přímá souvislost mezi mírou kriminalizace nebo zpřísněním protidrogového zákona a mírou užívání drog (a naopak) (Giupponi et al. 2020). Relevantních srovnávacích analýz legislativy je však stále nedostatek (Kleiman 2011) a zkušenosti z Ameriky by měly být jen velmi opatrně implementovány do specifických podmínek transformujících se zemí střední Evropy. Pro sledování dostupnosti konopí lze za vhodný ukazatel považovat celoživotní užívání u dospívajících (Bogt et al. 2006). V tomto ohledu je klíčovou cílovou skupinou populace dospívajících, protože tento věk je spojen zejména s iniciací a rozvojem užívání nelegálních látek (Kázmér et al. 2017). Evropský projekt školních průzkumů o alkoholu a jiných drogách (ESPAD) poskytuje relevantní a reprezentativní údaje pro hodnocení epidemiologické situace ve společnosti. Zdá se, že obliba konopí v zemích V4 roste, také nejvyšší prevalenci celoživotního užívání mezi dospívajícími lze pozorovat v České republice (Čecho et al. 2017).

Česká republika je postkomunistickou zemí; v době komunismu bylo držení jakékoli drogy považováno za trestný čin a bylo zařazeno pod stejné ustanovení jako nedovolená výroba, dovoz, vývoz a nabídka drog. S přechodem k demokracii po roce 1989 došlo k rozsáhlejším změnám trestního práva (Belackova & Stefunkova 2018).

V červenci 1990 bylo držení nelegálních drog pro vlastní potřebu dekriminlizováno, tj. vyjmuta z trestního zákoníku a považováno pouze za správní delikt. Takové "odstranění trestních sankcí" za držení drog pro osobní potřebu dobře odpovídá tomu, jak byla dekriminlizace definována (Jelsma 2011); držení drog pro jiného však zůstalo trestným činem (Belackova & Stefunkova 2018).

V roce 1998 vznikl politický tlak na zrušení dekriminlizace v reakci na vznikající otevřené drogové scény; v důsledku toho bylo nalezeno kompromisní řešení, a to takové, které zavedlo trestný čin osobního držení drog v "množství větším než malém" (dle novely zákona č. 112/1998 Sb.), tentokrát klasifikovaný samostatně a mírněji než distribuce drog, platný od roku 1999. Držení "malého množství" pro osobní potřebu zůstalo správním deliktem (tj. dekriminlizovaným); to se týkalo všech druhů drog, ale v různém množství pro každou drogu a pro každého pachatele. Do roku 2010 byly k dispozici pouze interní pokyny pro policii a státní zastupitelství při rozhodování o tom, co je "větší" nebo "malé" množství drogy, a soudy byly povinny zvážit všechny okolnosti trestného činu (např. společenskou nebezpečnost); neexistovaly žádné formálně závazné zákony nebo podzákoné předpisy, kterými by se řídilo vymáhání zákonů (Zeman 2007).

V roce 2010 byl v České republice přijat nový trestní zákoník, jehož součástí byl zákon č. 40/2009 Sb., který se více zaměřil na formální ("jak je psáno") než materiální (tj. zohlednění okolností trestného činu) pojetí trestního práva. Pokud jde o drogové trestné činy, došlo k drobným úpravám, jejichž cílem bylo rozlišovat mezi různými druhy drog, které měly původ v doporučeních vědeckého hodnocení změny z roku 1999 (Zábranský et al. 2001). Nejprve byla stanovena nižší trestní sazba za osobní držení konopí (ve "větším než malém množství") než u jiných drog; na druhou stranu byla zvýšena maximální trestní sazba za tento trestný čin



spáchaný za přitěžujících okolností. Za druhé bylo poprvé kodifikováno osobní pěstování "rostlinných drog" (trestný čin v případě držení "většího než malého množství", správní delikt v případě "malého množství"); do té doby bylo osobní pěstování konopí považováno za držení pro vlastní potřebu, ale někdy také za (pokus o) výrobu drogy (Belackova & Stefunkova 2018).

Vláda rovněž definovala množství konopí (množství "větší než malé"), které lze přechovávat bez daných trestních sankcí. Podle nařízení vlády č. 467/2009 Sb. bylo maximálním množstvím přechovávané drogy 15 g sušiny a 5 g hašiše. Ústavní soud však krátce poté (v roce 2013) vyhlášku týkající se držení pro osobní potřebu zrušil s odůvodněním, že trestní odpovědnost nemůže stanovit vláda; místo toho vydal Nejvyšší soud pokyny k množstvím, která by se měla používat v soudních řízeních (Mravčík 2015). Kupodivu vyhláška týkající se pěstování rostlinných drog nebyla napadena a zůstává v platnosti. Právní předpisy definují maximálně 10 g sušiny marihuany a 5 g hašiše jako malé množství, jeho přechovávání je považováno za přestupek a je finančně postihováno až do výše 15 000 Kč, nikoli však odnětím svobody. Držení většího množství je považováno za trestný čin, za který hrozí trest odnětí svobody až na 1 rok. V případě distribuce je obvykle trestem odnětí svobody až 5 let (Čecho et al. 2017).

Použití konopí pro léčebné účely je v České republice schváleno od roku 2013. Konopí pro léčebné použití musí v České republice splňovat kvalitativní požadavky na léčivé přípravky určené k výdeji v lékárnách. Jedná se o sušené samičí květy obsahující velké množství účinných látek, mezi hlavní patří tetrahydrokanabinol a kanabidiol, jejichž obsah se pohybuje od 0,3 % do 21 % u THC a od 0,1 % do 19 % u CBD. Konopí je regulováno zákonem o návykových látkách (167/1998 Sb.) a vyhláškou o stanovení podmínek pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití (236/2015 Sb.). V současné době je předepsáváno jako podpůrná či doplňková léčba ke zmírnění symptomů doprovázejících některá závažná onemocnění. Je indikováno např. při chronické neutišitelné bolesti (zejména v souvislosti s onkologickými onemocněními, degenerativním onemocněním pohybového systému, neuropatií, spasticitou), neurologickém třesu způsobeném Parkinsonovou chorobou, úrazu míchy nebo mozku, Tourettově syndromu. V neposlední řadě též ke stimulaci apetitu v souvislosti s léčbou onkologického onemocnění či HIV.

Pacienti v České republice mohou legálně získat buď konopí dovezené ze zahraničí, jenž musí splňovat všechny požadavky na kvalitu a obsah účinných látek, vycházející z platných právních předpisů. Povolení k dovozu je udělováno Ministerstvem zdravotnictví ČR, konkrétně Inspektorátem omamných a psychotropních látek. Cena není v ČR nijak regulována a vychází z hodnoty, za kterou jej distributor uvádí na trh. Případně konopí vypěstované v ČR, které spadá pod správu Státního ústavu pro kontrolu léčiv (respektive pod Státní agenturu pro konopí pro léčebné použití). Ta uděluje licence k pěstování konopí a zajišťuje ostatní související činnosti, jako je dohled nad pěstováním, distribuce do lékáren a veškeré informační povinnosti vůči Ministerstvu zdravotnictví a Policii ČR. Cena není regulována a vychází z nejnižší nabídky v rámci výběrového řízení.

Tento systém se ukázal jako velmi neefektivní, což se v průběhu let projevovalo zejména nedostatkem léčebného konopí v lékárnách a jeho vysokou cenou.

## 3.4 Biologicky aktivní látky

O skupině látek se říká, že jsou biologicky aktivní (označované také jako farmakologicky aktivní), pokud mají účinek na organismus, ať už pozitivní či negativní (Landa & Juřica 2020).

V konopí je přítomno přes 1600 známých chemických sloučenin, více než 180 z nich je klasifikováno jako kanabinoidy (Hanuš et al. 2016), které lze zařadit do 11 strukturních rodin (Kinghorn et al. 2017). Další významnou skupinou látek nacházejících se v konopí jsou terpeny, u kterých se navrhuje, že synergicky zvyšují farmakologický účinek konzumovaného konopí (Russo 2011).

V konopí je obsaženo také mnoho dalších látek, jako jsou aminokyseliny, sacharidy, organické kyseliny, mastné kyseliny a dusíkaté látky (Kopustinskiene et al. 2022).

### 3.4.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou (až na několik výjimek) specifickou složkou rostlin konopí, v lidském těle interagují s příslušnými receptory, jenž jsou součástí endokanabinoidního systému (ECS), který se podílí na regulaci mnoha fyziologických procesů, včetně bolesti, nálady, chuti k jídlu a imunitních funkcí. Předpokládá se, že jsou prospěšné v řadě fyziopatologických procesů (Izzo et al. 2009).

Nejrozšířenějšími kanabinoidy (přírodně přítomnými ve formě odpovídající karboxylové kyseliny) jsou  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC neboli THC, hlavní psychoaktivní kanabinoid), kanabidiol (CBD) a kanabichromen (CBC); ty doplňují další, jako jsou:  $\Delta^8$ -trans-tetrahydrokanabinolem ( $\Delta^8$ -THC), kanabigerolem (CBG), kanabinodiolem (CBND), kanabielsoinem (CBE), kanabicyklem (CBL), kanabinolem (CBN), kanabitriolem (CBT). Mezi další patří tetrahydrokanabivarin (THCV), kanabigerovarín (CBGV), kanabivarichromen (CBCV), kanabidivarín (CBDV) a další homologické, ale méně známé a prozkoumané (Kinghorn et al. 2017).

Rod *Cannabis* zahrnuje tři druhy definované podle obsahu fyto-kanabinoidů: *C. sativa* L. s nízkým obsahem THC, *C. indica* Lam. s vysokým obsahem THC, a přechodný druh, *C. ruderalis* Janisch (Appendino et al. 2011; Hartsel et al. 2016); protože se však tyto tři druhy snadno kříží a mnoho existujících kultivarů jsou hybridy, prosazuje se monotypická klasifikace *C. sativa* s dělením na chemotypy, nikoliv druhy (Pellati et al. 2018). Odrůdy využívané pro reakční konzumaci, které se vyznačují vysokým obsahem  $\Delta^9$ -THC, často nejsou morfologicky odlišitelné od odrůd s nízkým obsahem THC. Biosyntéza probíhá u všech druhů stejnými cestami (Tahir et al. 2021).

Konopí lze rozdělit na tři chemotypy podle poměru THC/CBD, přičemž první skupina má nejvyšší obsah THC a nižší obsah CBD, druhý typ má střední poměr THC/CBD (přibližně 1:1). Posledním typem je technické konopí s nízkým obsahem THC, které není psychoaktivní. Kanabinoidy konopí posledního zmíněného typu jsou především kanabinoidní kyseliny, jako je kyselina kanabidiolová a kanabigerolová, a jejich dekarboxylované deriváty, CBD a CBG. Ostatní kanabinoidy, jako je CBC a produkty rozkladu THC, se v konopí vyskytují v menším množství (Kopustinskiene et al. 2022).

#### 3.4.1.1 Biosyntéza kanabinoidů

Kanabinoidy jsou biosyntetizovány ve žláznatých trichomech jako fytoprotektanty: v čerstvé biomase je 95 % THC, CBD a CBC obsaženo jako jejich kyselé prekurzory: kyselina tetrahydrokanabinolová (THCA), kyselina kanabidiolová (CBDA) a kyselina kanabichromenová (CBCA). Ty se během skladování, při zahřívání nebo za alkalických podmínek dekarboxylují na známější formy (Taura 2009).

Ve srovnání s biosyntézou terpenů je biosyntéza kanabinoidů prioritou dosavadního omezeného výzkumu biosyntézy metabolitů v konopí. Velká část základní biosyntetické dráhy kanabinoidů byla charakterizována. Primárním meziproduktem větvení biosyntézy kanabinoidů je kyselina kanabigerolová (CBGA). CBGA vzniká prenylací aromatické kyseliny olivetové s geranylovou částí. Nedávno byla klonována aromatická prenyltransferáza (aPT) a bylo prokázáno, že je aktivní v metabolicky upravených kvasinkách při produkci CBGA, a příbuzný konopný membránový protein s prenyltransferázovou aktivitou byl již dříve popsán v patentové literatuře. Bylo prokázáno, že podobné enzymy prenylují acylflorglucinoly za vzniku hořkých kyselin u chmele, blízkého příbuzného konopí. Přesný původ prekurzorů mastných kyselin kyseliny olivetové není znám. Byly publikovány geny tří různých kanabinoidních syntáz, konkrétně THCA syntázy (THCAS), CBDA syntázy (CBDAS) a syntázy kyseliny kanabichromenové (CBCAS). Geny a enzymy zodpovědné za mnoho minoritních kanabinoidů, včetně variant s propylovým postranním řetězcem, však zůstávají neznámé (Tahir et al. 2021).

#### 3.4.1.2 Klasifikace kanabinoidů

Fytokanabinoidy lze rozdělit do tří skupin na základě rozdílů v délce jejich C<sub>3</sub>-řetězce, což má vliv na chromatografickou separaci fytokanabinoidů, která vede ke kratším retenčním časům s klesajícím počtem uhlíkových řetězců v důsledku klesající lipofility. Tři řady fytokanabinoidů jsou následující: orcinolová řada, varinolová řada a nejčastěji se vyskytující a známá jako „klasická“, olivetolová řada (Madden et al. 2023).

Fytokanabinoidy olivetolové řady, označované také jako "klasické fytokanabinoidy", všudypřítomné a nejdominantnější ve všech variantách konopí, přičemž nejrozšířenějšími kanabinoidními sloučeninami jsou THC a CBD. Kanabinoidy této řady jsou nejvíce zkoumány a je na ně zaměřena většina prováděných výzkumů v oblasti medicíny a účinnosti (Hanuš et al. 2016). Z analytického hlediska má tato skupina nejdelší pětiuhlíkatý řetězec své resorcinylové části, což vede k delším retenčním časům při chromatografické separaci ve srovnání s jejich varinolovými protějšky (Berman et al. 2018). Syntetické cesty kanabinoidů všech tří řad se navzájem velmi podobají (Madden et al. 2023).

Fytokanabinoidy varinolové řady se nyní staly hlavním cílem selektivního šlechtění rostlin konopí díky svým nově objeveným léčivým vlastnostem (Ocque et al. 2019). Mezi farmakologicky aktivní varinolové sloučeniny patří: psychoaktivní delta-8-tetrahydrokanabivarin ( $\Delta$ 8-THCV), delta-9-tetrahydrokanabivarin ( $\Delta$ 9-THCV), jakož i nepsychoaktivní kanabidivarin (CBDV) a kanabivarin (CBV) (Franco et al. 2020).

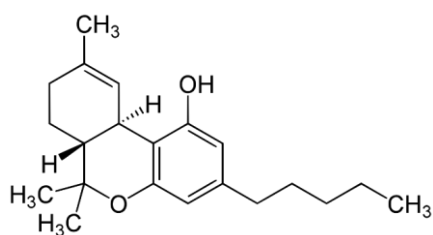
Rostoucí zájem o tuto řadu umožňuje selektivní šlechtění rostlin konopí s cílem vyvinout chemotyp vyvážený s psychoaktivními a nepsychoaktivními sloučeninami a zvýšenými léčivými vlastnostmi (Hanuš et al. 2016). Bylo zjištěno, že *Cannabis indica* vykazuje

varinolové fytoKANABINOIDY v mnohem větším množství než *Cannabis sativa* a křížení těchto druhů vytváří nekonečnou možnost selektivně zvýšit produkci varinolových KANABINOIDŮ (Hartsel et al. 2016). Varinolová řada se od ostatních liší tříuhlíkatým alkylovým zbytkem na své resorcinylové části, kratší uhlovodíkový řetězec má za následek snížení lipofility a kratší chromatografickou retenci v HPLC s reverzní fází (Ocque et al. 2019).

FytoKANABINOIDY orcinolové řady lze odlišit tím, že obsahují pouze jeden uhlíkatý alkylový zbytek resorcinylové části (Hartsel et al. 2016). Jedná se o minoritní fytoKANABINOIDY a většinou se vyskytují v ne-konopných druzích, jako je *Rhododendron* a *Helichrysum*, kvetoucí rostlina pocházející z jižní Afriky se schopností produkovat KANABINOID typu CBG. Cannabigerol (CBG), který je v afrických kulturách hojně využíván jako léčivý prostředek k léčbě zánětů a infekcí (Lourens et al. 2008). V *Helichrysum* nebyly identifikovány žádné známé psychoaktivní látky. Nicméně, některé druhy *Helichrysum* jsou součástí rekreačních rituálních praktik (Pollastro et al. 2017). Tyto KANABINOIDY lze nalézt také v některých nepálských a brazilských vzorcích konopí ve velmi nízkých koncentracích (Hanuš et al. 2016).

### 3.4.1.3 THC

THC (viz Obr. 1) je nejvýznamnější a hlavní účinnou složkou rostlin konopí. Jedná se o neutrální KANABINOID vznikající dekarboxylací jeho prekurzoru, kyseliny THCA, světlem nebo teplem (Dussy et al. 2005). Je psychoaktivní složkou a u lidí vyvolává euforické účinky vazbou na receptory CB1 v rámci endokanabinoidního systému (Zhuang et al. 1998). THC vyvolává nejen euforii, ale také zhoršuje kognitivní schopnosti, učení a paměťové dovednosti (Hampson et al. 1998). V poslední době bylo objeveno a podrobně studováno mnoho léčivých vlastností. Ukázalo se, že má antiemetické vlastnosti, které jsou užitečné při léčbě chemoterapií, a také analgetické, protizánětlivé a neuroprotektivní vlastnosti (Madden et al. 2023).



Obr. 1 – Strukturní vzorec THC

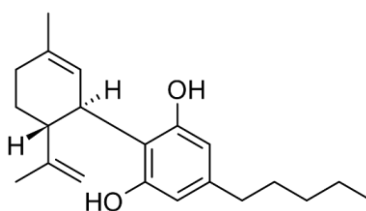
Decarboxylací THCA se syntetizuje také izomer  $\Delta^9$ -THC, a to  $\Delta^8$ -THC. Liší se umístěním dvojné vazby v pyranovém kruhu. Ačkoli je  $\Delta^8$ -THC považován za psychoaktivní složku konopí, má nižší psychoaktivitu než  $\Delta^9$ -THC (Abrahamov et al. 1995). Podobně jako  $\Delta^9$ -THC vykazoval i  $\Delta^8$ -THC silné antiemetické vlastnosti (Madden et al. 2023).

THCA, kyselý prekurzor obou sloučenin THC, je ve své podstatě nep psychoaktivní. Bylo zjištěno, že má antiproliferativní účinky, což dokazuje účinnou inhibici růstu karcinomu prostaty (De Petrocellis et al. 2013). Tento kyselý KANABINOID se díky svým antispastickým a antikonvulzivním vlastnostem ukázal být účinný také proti různým epileptickým stavům a v

současné době je ve Spojených státech pro svou nízkou cenu volen jako jeden z hlavních prostředků proti záchvatům (Sulak et al. 2017).

#### 3.4.1.4 CBD

CBD (viz Obr. 2) je stejně jako THC jedním z hlavních fytkanabinoidů obsažených v rostlinách konopí a není psychoaktivní. Vykazuje širokou škálu farmakologických funkcí, což z něj činí jeden z dosud nejrozsáhleji zkoumaných fytkanabinoidů. Studie určily CBD jako úspěšnou protizánětlivou a antiartritickou látku (Costa et al. 2004). CBD projevoval antiproliferační účinek a bylo zjištěno, že je úspěšný při léčbě buněk lidského karcinomu prsu. Mezi další farmakologické potenciály patří analgetické a anxiolytické použití (Madden et al. 2023).

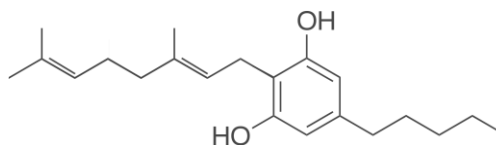


Obr. 2 – Strukturální vzorec CBD

CBD vzniká dekarboxylací CBDA, která se biosyntetizuje z kyseliny kanabigerolové (CBGA) prostřednictvím CBDA-syntázy. CBDA je kyselou prekurzorovou formou také CBND, CBE a CBF a ve své podstatě není psychoaktivní (Madden et al. 2023). CBDA, podobně jako mnoho dalších kanabinoových kyselin, vykazuje antiproliferativní účinek, který byl určen úspěšnou inhibicí migrace některých buněk rakoviny prsu (Takeda et al. 2012). Je také úspěšným antibiotikem, které vyvolalo inhibiční účinek na spory *Bacillus cereus* (Madden et al. 2023).

#### 3.4.1.5 CBG

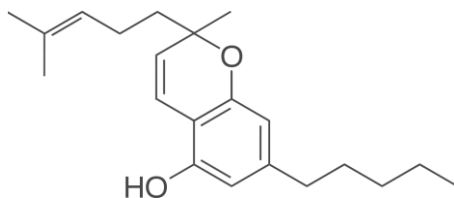
CBG (viz Obr. 3) je prvním kanabinoidem v biosyntetické dráze těchto sloučenin v rostlině, není psychoaktivní a nachází se ve velkém množství v některých odrůdách konopí. Má antibakteriální vlastnosti (Appendino et al. 2008). CBG se stal velmi zajímavým díky svým antiproliferačním vlastnostem u lidského karcinomu prsu (Ligresti et al. 2006) a antioxidačním vlastnostem, přičemž studie prokázaly úspěšnost CBG v ochraně makrofágů RAW264.7 před oxidačním stresem (Giacoppo et al. 2017).



Obr. 3 – Strukturální vzorec CBG

### 3.4.1.6 CBC

CBC (viz Obr. 4) je dalším významným kanabinoidem, který se hojně vyskytuje v rostlinách *Cannabis sativa*. Není psychoaktivní a má širokou škálu farmakologických vlastností, včetně: protizánětlivých, antibakteriálních a protiplísňových účinků (Madden et al. 2023).



Obr. 4 – Strukturní vzorec CBC

### 3.4.2 Terpeny

Za aroma konopí jsou zodpovědné terpenoidy, nikoli kanabinoidy. V rostlině jich bylo zaznamenáno více než 200 (Rothschild et al. 2005; Brenneisen 2007), ale pouze několik studií se zaměřilo na jejich farmakologii (McPartland & Russo 2001). Jejich výtěžnost je ve většině rozborů konopí menší než 1 %, ale mohou představovat 10 % obsahu trichomů (Potter 2009). Obvykle převažují monoterpeny (limonen, myrcen, pinen), tyto těkavé látky sice před zpracováním vykazují ztráty jen asi kolem 5 %, ale při sušení a skladování se jejich výtěžnost snižuje, což vede k vyššímu relativnímu podílu seskviterpenoidů (zejména karyofylenu), jak se také často vyskytuje v extraktech (Ross & ElSohly 1996). Zdá se, že v rostlině působí "fytochemický polymorfismus" (Baser & Buchbauer 2015), protože produkce upřednostňuje látky jako limonen a pinen v květech, které jsou repelentní vůči hmyzu (Nerio et al. 2010), zatímco spodní vějířovité listy vyjadřují vyšší koncentrace hořkých seskviterpenoidů, které působí proti spásání zvířaty (Potter 2009). Zdá se, že z evolučního hlediska se terpenoidy vyskytují ve složitých a variabilních směsích s výraznou strukturní rozmanitostí, které slouží různým ekologickým rolím. Složení terpenoidů je pod genetickou kontrolou (Langenheim 1994) a některé enzymy produkují více produktů, což opět podporuje Mechoulamův "zákon palčivosti". Konkrétní směs mono- a seskviterpenoidů určí viskozitu a u konopí je to jistě využito k praktickému prospěchu, protože pozoruhodná lepivost konopných exudací zachycuje hmyz, a tak v kombinaci s insekticidními fytokanabinoidními kyselinami poskytuje synergickou mechanicko-chemickou obrannou strategii proti predátorům (Russo 2011).

Stejně jako bylo pozorováno u kanabinoidů, produkce terpenoidů se zvyšuje s působením světla, ale klesá s úrodností půdy (Langenheim 1994), což podporují i zkušenosti ze skleníků, které ukazují vyšší výnosy, pokud rostliny těsně před sklizní pociťují relativní nedostatek dusíku (Potter 2004), což upřednostňuje květní růst před listovým. Složení je však mnohem více dáno geneticky než prostředím (Baser & Buchbauer 2015), a přestože je konopí alogamní a pro udržení kvality obvykle vyžaduje opakované selektivní šlechtění, lze tento problém prakticky obejít vegetativním množením vysoce výkonných rostlin v kontrolovaných podmínkách prostředí (Potter 2009) a ukázalo se, že takové techniky poskytují pozoruhodnou konzistenci v přísných tolerancích, jak by vyžadovala správná výrobní praxe pro jakýkoli léčivý přípravek (Fischedick et al. 2010).

#### 3.4.2.1 Biosyntéza terpenů

Složení terpenů je fenotypový znak, který vykazuje velké rozdíly mezi různými odrůdami konopí. Většina terpenů vyskytujících se v konopí jsou uhlovodíky, které jsou přímými produkty enzymů – terpenových syntáz (TPS) (Chen et al. 2011; Booth et al. 2017), na rozdíl od složitějších terpenů, které vyžadují modifikaci jinými enzymy, např. cytochromem P450. Chemická rozmanitost terpenů konopí proto odráží rozmanitost enzymů TPS kódovaných v rodině genů (Cs)TPS konopí (Booth & Bohlmann 2019).

Terpeny obsažené v konopné pryskyřici, stejně jako izoprenoidní část kanabinoidní struktury, se vytvářejí prostřednictvím izoprenoidního biosyntetického systému, který vzniká cestou kyseliny mevalonové (MEV) v cytosolu a cestou methylethylerythritolfosfátu (MEP) v plastidech. Monoterpeny a kanabinoidy mají společný desetiuhlíkatý isoprenoidní prekurzor,

geranyldifosfát (GPP, C<sub>10</sub>), zatímco seskviterpeny vznikají z patnáctiuhlíkatého isoprenoidu farnesyldifosfátu (FPP, C<sub>15</sub>). Pomocí GPP nebo FPP jako substrátů vytvářejí monoterpenové syntetázy a seskviterpenové syntetázy různé struktury mono- a seskviterpenů, které se nacházejí v konopné pryskyřici (Booth & Bohlmann 2019). Analýza genomu a transkriptomových sekvencí konopí odrůdy Purple Kush identifikovala více než 30 různých genů CsTPS (Booth et al. 2017). V roce 2019 bylo funkčně charakterizováno a publikováno pouze devět CsTPS (Chen et al. 2011; Booth et al. 2017). Stejně jako u mnoha jiných rostlinných TPS (Chen et al. 2011) je osm z devíti charakterizovaných CsTPS multiproduktovými enzymy, které vytvářejí několik různých terpenových struktur buď z GPP, nebo FPP (Booth et al. 2017). Víceproduktová povaha CsTPS může vysvětlovat, proč se některé terpeny, jako například  $\alpha$ -humulen a  $\beta$ -karyofylen, obvykle vyskytují současně v různých vzorcích konopí. CsTPS zodpovědné za mnoho různých terpenů nalezených v konopí nejsou dosud známy (Booth & Bohlmann 2019).

Rozdíly ve složení rodiny genů CsTPS a rozdíly v expresi genů CsTPS pravděpodobně vysvětlují pozorované rozdíly terpenových profilů u různých druhů. Míra variability velikosti, složení a exprese rodiny genů CsTPS a faktory, které ovlivňují expresi genů CsTPS, však nejsou z větší části známy (Booth et al. Bohlmann, 2019). Například u jiných rostlin bylo prokázáno, že variabilita terpenové biosyntézy na úrovni genomu, transkriptomu, proteomu a biochemie je příčinou fenotypových vnitrospecifických rozdílů terpenových profilů (Hall et al. 2011; Drew et al. 2016). Terpenové profily se mohou také podstatně měnit v důsledku rozdílné exprese genů CsTPS v průběhu vývoje rostlin nebo v reakci na faktory prostředí. Kromě toho může vývojově nebo tkáňově specifická exprese CsTPS ovlivnit variabilitu terpenových profilů v konopných produktech. Žádný z těchto faktorů variability terpenů, které mohou přispívat ke špatné reprodukovatelnosti terpenového složení, nebyl u konopí systematicky studován (Booth & Bohlmann 2019).

Kyslíková funkčnost jednoduchých terpenových alkoholů vyskytujících se v konopí, jako je linalool nebo bisabolol, může být důsledkem enzymatické aktivity CsTPS, jak bylo prokázáno u TPS v jiných druzích rostlin (Booth et al. 2017). Další terpenové deriváty zjištěné v konopí mohou vznikat neenzymaticky v důsledku oxidace nebo v důsledku tepelně či UV zářením indukovaných změn uspořádání během zpracování nebo skladování, jako je karyofylenoxid,  $\beta$ -elemen nebo deriváty myrcenu (Marchini et al. 2014; Booth et al. 2017). Tyto neenzymatické modifikace mohou přidat úroveň variability, která je nezávislá na rostlinném genomu a biochemii. Pokud se terpenová analýza provádí se sušeným rostlinným materiálem, mohou být další příčinou terpenové variability variabilní kvantitativní ztráty terpenů, zejména těkavějších monoterpenů (Ross & ElSohly 1996).

#### 3.4.2.2 Klasifikace terpenů

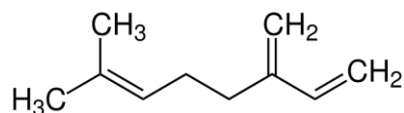
Terpeny jsou uhlovodíky tvořené opakující se jednotkou isoprenu. Dělí se do tříd podle počtu opakování isoprenových jednotek: hemiterpeny (1 jednotka, C<sub>5</sub>), monoterpeny (2 jednotky, C<sub>10</sub>), seskviterpeny (3 jednotky, C<sub>15</sub>), diterpeny (4 jednotky, C<sub>20</sub>), sesterpeny (5 jednotek, C<sub>25</sub>), triterpeny (6 jednotek, C<sub>30</sub>), karotenoidy (8 jednotek, C<sub>40</sub> atomů uhlíku), gummy (více než 100 jednotek, více než C<sub>500</sub>). Terpenoidy jsou modifikované třídy terpenů, které obsahují atomy kyslíku, čímž vznikají alkoholy, aldehydy nebo ketony. V konopí bylo dosud popsáno 110 terpenů a 121 terpenoidů (Hanus & Hod 2020).



### 3.4.2.3 Myrcen

Myrcen (viz Obr. 5) je klasifikován jako acyklický monoterpen. Myrcen existuje ve dvou izomerních formách, a to  $\beta$ -myrcen (7-methyl-3-methylen-1,6-oktadien) a  $\alpha$ -myrcen (2-methyl-6-methylen-1,7-oktadien). Nejběžnější je přirozeně se vyskytující izomer  $\beta$ -myrcen, který obsahuje isopropylidenovou skupinu a v literatuře se často označuje jako "myrcen". Druhým je  $\alpha$ -myrcen, který existuje v isopropenylové formě. V  $\beta$ -myrcenu jsou tři dvojně vazby (dvě z nich jsou konjugované) a dimethylový terminál (Behr & Johnen 2009).

Myrcen (7-methyl-3-methylen-1,6-oktadien) je oblíbená potravinářská přísada používaná jako aromatická látka při výrobě potravin a nápojů (Surendran et al. 2021). Dále se používá ve spotřebních výrobcích, jako je kosmetika, mýdla a detergenty. Využívá se též jako výchozí surovina pro výrobu komerčně významných vůní a aromat, jako jsou mentol, nerol, geraniol a linalool (Behr & Johnen 2009).



Obr. 5 – Strukturální vzorec myrcenu

$\beta$ -Myrcen je příjemně vonící, olefinický, acyklický nesubstituovaný monoterpen, který se přirozeně vyskytuje v mnoha rostlinných druzích, zejména v esenciálních olejích rostlin, jako je chmel, konopí, citronová tráva, verbena a vavřík, a také v citrusových plodech a citrusových šťávách (Surendran et al. 2021).

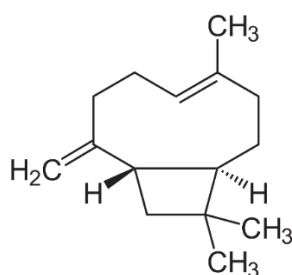
V pivovarnictví je  $\beta$ -myrcen jednou z nejsilnějších aromatických složek chmelových silic a ve všech analyzovaných odrůdách chmele je považován za nejvíce pachově aktivní těkavou látku (Buglass & Caven-Quantrill 2012). Myrcen do značné míry určuje "zelené chmelové aroma" v pivu a je primární látkou v suchých chmelových pivech (Haslbeck et al. 2017) s "bylinnou, pryskyřičnou, zelenou, balzamickou, svěží chmelovou" vůní (Dresel et al. 2015). Je také hlavní složkou chmelové silice a může tvořit až 70 % jejího objemu (Wolfe 2012).

$\beta$ -myrcen se významně podílí na aroma konopí. Pro  $\beta$ -myrcen je charakteristické, že dodává konopným odrůdám mírně sladký chuťový profil a zajišťuje kořeněné, zemité a pižmové tóny vůně (Surendran et al. 2021). Odrůdy konopí, které obsahují vysoké koncentrace myrcenu (> 0,5 % myrcenu), pravděpodobně vyvolávají sedativní vlastnosti ("gaučový efekt"), které jsou typicky připisovány odrůdám *Cannabis indica* (Piomelli & Russo 2016). Na druhou stranu kmeny s nízkým obsahem  $\beta$ -myrcenu (<0,5 %) pravděpodobně vyvolávají energičtější "high" (Hanuš & Hod 2020).  $\beta$ -myrcen může také hrát roli při napomáhání vstřebávání kanabinoidů přes hematoencefalickou bariéru, což zvyšuje jejich transport do mozku a posiluje psychoaktivní reakce; pro toto tvrzení však existuje jen omezené množství spolehlivých údajů (Hartsel et al. 2016).

Mezi uváděné biologické aktivity  $\beta$ -myrcenu patří analgetické, sedativní (Gurgel do Vale et al. 2002), antidiabetické (Surendran et al. 2021), antibakteriální, antioxidační (Ojeda-Sana et al. 2013), protizánětlivé (Rufino et al. 2015) a protinádorové účinky (Bai & Tang 2020).

#### 3.4.2.4 $\beta$ -karyofylen

$\beta$ -karyofylen (viz Obr. 6) je nejrozšířenějším seskviterpenem v konopí a je to též jediný terpen, u kterého je potvrzeno, že působí na lidský endokannabinoidní systém (Booth et al. 2017), bývá často označován jako tzv. atypický kanabinoid (Madiha Yusoff et al. 2021). Protože se zaměřuje na CB2 receptor, je terapeutickým cílem pro léčbu zánětů, bolesti a aterosklerózy (Gertsch et al. 2008). Ukázalo se, že přináší mnoho terapeutických benefitů, například při osteoartróze (Rufino et al. 2015), úzkosti a depresi (Bahí et al. 2014). Podílí se na štiplavosti černého pepře. Dále se vyskytuje také v rozmarýnu, hřebíčku a kopaibě (Madiha Yusoff et al. 2021).



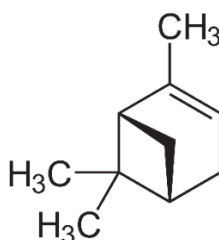
Obr. 6 – Strukturální vzorec  $\beta$ -karyofylenu

Evoluční funkce  $\beta$ -karyofylenu může být dána jeho schopností přitahovat dravý síťokřídý hmyz a zároveň inhibovat herbivorní hmyz (Langenheim 1994). Často je celkově převládajícím terpenoidem v extraktech z konopí, zejména pokud byly zpracovány za tepla za účelem dekarboxylace (Guy & Stott 2005). Působí protizánětlivě prostřednictvím PGE-1 (prostaglandin E1), jeho účinnost je srovnatelná s toxickým fenylbutazonem (Basile et al. 1988) a esenciální olej s jeho obsahem se vyrovnal etodolaku a indometacinu (Özbek et al. 2005). Na rozdíl od posledně jmenovaných látek však  $\beta$ -karyofylen vykazoval cytoprotektivní efekt v žaludku (Tambe et al. 1996), podobně, jak se v minulosti tvrdilo při léčbě duodenálních vředů ve Velké Británii pomocí extraktu z konopí (Russo 2011). K antimalarickým účinkům mohl přispět i  $\beta$ -karyofylen jako složka esenciálních olejů (Campbell et al. 1997).

Snad největším objevem týkajícím se karyofylenu bylo jeho prokázání jako selektivního plného agonisty CB2 (100 nM), prvního prokázaného fytoakanabinoidu mimo rod konopí. Následná práce prokázala, že tato složka potravy vyvolává protizánětlivou analgetickou aktivitu při nejnižší dávce 5 mg/kg u myši divokého typu, ale nikoli u myši s knockoutem CB2 (Gertsch et al. 2008). Vzhledem k tomu, že agonistům CB2 není přisuzována psychoaktivita, nabízí se  $\beta$ -karyofylen jako terapeutická sloučenina, ať už systémově, nebo v dermatologických aplikacích, např. při kontaktní dermatitidě (Karsak et al. 2007). Senzibilizační reakce jsou poměrně vzácné a pravděpodobně jsou způsobeny oxidovaným produktem (Sköld et al. 2006).

### 3.4.2.5 Pinen

Pinen (viz Obr. 7) je bicyklický terpenoidní uhlovodík s dvojnou vazbou (Winnacker 2018).  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinen jsou dva izomery, které se vyskytují v přírodě, např. v esenciálních olejích borovic. Patří mezi nejznámější zástupce široké rodiny monoterpenů. Využívají se např. jako fungicidy, aromata, antivirové a antimikrobiální látky (Silva et al. 2012). Kromě toho jsou  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinen složkami ledvinových a jaterních léčiv (Sybilska et al. 1994).



Obr. 6 – Strukturní vzorec pinenu

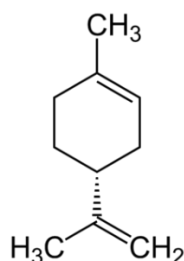
$\alpha$ -pinen je bezbarvá, ve vodě nerozpustná, ale v oleji a ethanolu rozpustná organická kapalina.  $\alpha$ -pinen byl zjištěn nejméně ve 40 různých esenciálních olejích (Berger 2007; Vespermann et al. 2017).  $\beta$ -pinen je rovněž bezbarvá organická kapalina, která je rozpustná v oleji, ale nerozpustná v ethanolu a ve vodě. Komerčně se získává destilací nebo přeměnou  $\alpha$ -pinenu (Berger 2007). Je považován za základní meziprodukt při výrobě chlazených mléčných výrobků, mentolu, jononů, linaloolu, geraniolu, citronellalu, citralu, citronellolu a cukrovinek. Používá se též v pekařských výrobcích (Vespermann et al. 2017). Pineny mají bicyklo[3.1.1]heptenové nebo -heptanové uhlíkaté skelety, účastní se proto reakcí přeskupování a otevírání kruhu, při nichž vznikají různé deriváty (Erman & Kane 2008).

Tyto dvě fytochemikálie vykazují rozmanité biologické aktivity, čehož se využívá k různým aplikacím, např. jako fungicidy, aromata a antivirové látky (Silva et al. 2012). Kromě toho jsou  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinen složkami ledvinových a jaterních léků (Sybilska et al. 1994). Díky svým toxickým účinkům na membrány se využívají jako antibakteriální prostředek (Alma et al. 2004). Bylo zjištěno, že  $\alpha$ - a  $\beta$ -pinen mají inhibiční účinky na rakovinu prsu a leukémii (Zhou et al. 2004). Použití pinenů přesahuje rámec přírodní medicíny, například se ukázalo, že jsou velmi užitečné při syntéze polymerů (Kamigaito & Satoh 2017; Thomsett et al. 2019). Polymery syntetizované z pinenů jsou kvalitnější než jiné polymery (Satoh et al. 2014). Bezpečnostní profil pinenů je považován za vynikající, což umožňuje jejich použití v různých chemických látkách, a jsou obecně uznávány jako bezpečné (Almirall et al. 1996).

Mezi rostliny, které obsahují  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, případně obojí, patří např: šalvěj rozmarýna (*Salvia rosmarinus* L.), levandule korunkatá (*Lavandula stoechas* L.), řebříček obecný (*Achillea millefolium* L.), koriandr setý (*Coriandrum sativum* L.), jalovec obecný (*Juniperus communis* L.) a mnoho dalších (Salehi et al. 2019).

### 3.4.2.6 Limonen

Limonen (viz Obr. 8), systematicky 1-methyl-4-(1-methylethenyl-cyklohexen), je jednou z nejběžnějších složek éterických olejů aromatických rostlin. Je široce rozšířen v několika rostlinných rodech, což lze přičíst jeho prekurzorové roli, z níž se odvozuje několik monocyklických terpenoidů. Většina monoterpenů nesoucích 1-p-menthenový skelet, jako jsou karveol, karvon,  $\alpha$ -terpineol, pulegon a 1,8-cineol, je odvozena od limonenu (Bertea et al. 2003). Limonen je opticky aktivní sloučenina a existuje ve dvou enantiomerních formách: d-limonen, je hlavní sloučeninou v esenciálních olejích ze slupek citrusových plodů a je levným vedlejším produktem zpracování pomerančů (Wang et al. 2008). Hojně se vyskytuje také v některých druzích rodu *Lippia* a *Artemisia* (Sayyah et al. 2004). L-limonen se nachází především v esenciálních olejích druhů *Pinus* (např. oleje z jehličí borovice) a *Mentha* (např. máta kopinatá). Racemický limonen je známý také jako dipenten (Erasto & Viljoen 2008).

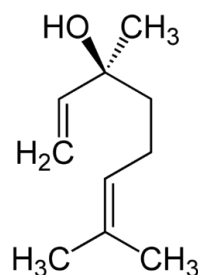


Obr. 7 – Strukturní vzorec limonenu

Limonen se široce používá jako chuťová a vonná přísada ve spotřebních výrobcích, jako jsou parfémy, nápoje, detergenty a mýdla. Dále se používá jako složka čisticích prostředků pro domácnost. Kromě použití v různých spotřebních výrobcích se limonen používá jako výchozí materiál pro syntézu různých přírodních produktů, jako je p-cymen. Široké uplatnění limonenu v průmyslu a domácnostech spolu s jeho náchylností k oxidaci podporované ozonem vyvolalo zájem výzkumu o zkoumání jeho různých biochemických a farmakologických vlastností (Erasto & Viljoen 2008).

### 3.4.2.7 Linalool

Linalool produkuje mnoho rostlin, přičemž linalool se často hojně hromadí v rostlinách z čeledí hluchavkovité (*Lamiaceae*) (např. máta), vavřínovité (*Lauraceae*) (např. skořice, palisandr) a routovité (*Rutaceae*) (citrusové plody). Linalool je nenasycený monoterpenový alkohol (viz Obr. 9) se specifickým popisem vůně: "lehká a osvěžující, květinově-dřevitá, se slabým citrusovým nádechem". Tato těkavá složka je chemickým meziproduktem při biosyntéze vitamínu E (Kamatou & Viljoen 2008). Linalool je také hlavní složkou mnoha esenciálních olejů, o nichž je známo, že vykazují řadu biologických aktivit, jako jsou antibakteriální a antiplazmové účinky (Van Zyl et al. 2006). Kromě toho byly zjištěny protizánětlivé, antihyperalgiecké a antinociceptivní účinky linaloolu na různých zvířecích modelech (Peana et al. 2002).

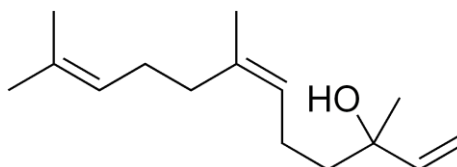


Obr. 8 – Strukturní vzorec linaloolu

Ve srovnání s ostatními složkami éterických olejů má linalool znatelnou rozpustnost ve vodě. Linalool existuje ve dvou enantiomerních formách, R-(-)-Linalool má vůni připomínající levanduli, zatímco S-(+)-linalool má spíše vůni petitgrainu (Kamatou & Viljoen 2008). Linalool se izoluje ze silic, nebo se vyrábí úplnou chemickou syntézou, případně syntézou z přírodního pinenu (Semikolenov et al. 2001).

#### 3.4.2.8 Nerolidol

Nerolidol je seskviterpenový alkohol (viz Obr. 10) se sedativními účinky, který je v nízkém množství obsažen v pomerančové a jiné citrusové kůře (Russo 2011). Byl účinnou látkou zvyšující penetraci 5-fluorouracilu kůží, což by mohla být užitečná vlastnost při léčbě růstu plísní, kde je rovněž inhibitorem (Langenheim 1994). Zdá se, že má antiprotozoální účinky proti parazitům, je silným antimalarikem (Rodrigues Goulart et al. 2004) a látkou působící proti leishmanióze (Arruda et al. 2005). Nerolidol není toxický a není senzibilizující (Lapczynski et al. 2008).



Obr. 9 – Strukturní vzorec nerolidolu

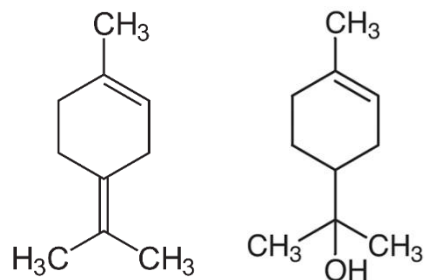
#### 3.4.2.9 Karofylen oxid

Karofylen oxid je seskviterpenoidní oxid společný pro meduňku lékařskou (*Melissa officinalis* L.) a *Melaleuca stypheloides* Sm., jehož esenciální olej obsahuje přibližně 43,8 % (Farag et al. 2004). V rostlinách slouží jako insekticidní, protižravý prostředek, a jako širokospektrální antimykotikum (Langenheim 1994). Karofylen oxid prokázal antimykotickou účinnost na modelu klinické onychomykózy srovnatelnou s léčivý ciklopiroxolaminem a sulkonazolem (Yang et al. 1999).

#### 3.4.2.10 Terpinolen a $\alpha$ -terpineol

$\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol (viz Obr. 11) a 4-terpineol jsou tři blízce příbuzné monoterpenoidy. Bylo prokázáno, že 4-terpineol má velmi dobrou schopnost vychytávat

radikály a vykazuje silné antioxidační účinky (McPartland & Russo 2001). Terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol a  $\alpha$ -pinen prokázaly na dávce závislé antibiotické vlastnosti proti *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* a *Propionibacterium acnes* (Raman et al. 1995). Podobné studie prokázaly antimikrobiální aktivitu proti široké škále patogenních organismů, s výjimkou *Pseudomonas*. Éterický olej s hlavními složkami  $\alpha$ -terpineolem a  $\alpha$ -karyofylenem má též mírné antimalarické působení (Campbell et al. 1997).



Obr. 10 – Strukturní vzorec terpinolenu (vlevo) a  $\alpha$ -terpineolu (vpravo)

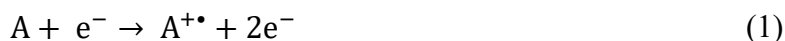
### 3.5 Instrumentální metody

K analýze chemického složení vzorků konopí se využívají instrumentální analytické metody, konkrétně plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, dále jen GC-MS (z angl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie, ve zkratce HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

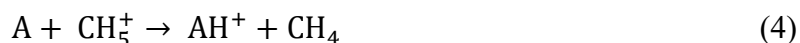
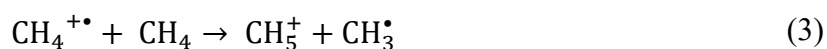
#### 3.5.1 Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

GC-MS je jednou z nejpoužívanějších analytických metod současné doby. Její velká výhoda spočívá v rychlé a přesné kvalitativní i kvantitativní analýze látek, jak v plynném, tak v kapalném nebo pevném skupenství. V prvním běhu se látka nastříkne přes septum do vyhřívané komory, kde se vypaří. Páry jsou poté unášeny nosným plynem do kolony, kde dochází k separaci složek mezi dvěma fázemi, tzv. mobilní a stacionární fází. Tyto dvě fáze se mimo jiné liší nějakou základní fyzikálně-chemickou vlastností, např. polaritou. V mobilní fázi je vzorek unášen napříč kolonou, zatímco o stacionární fázi je vzorek zpomalován v závislosti na míře interakce, tj. ve výše zmíněném případě by měla polárnější část vzorku silněji interagovat s polárnější stacionární fází, a mělo by docházet k jejímu detekovatelnému zpomalení oproti jiným látkám ve vzorku. Různě velkým záchytem látek o stacionární fázi dochází tedy k jejich separaci, a látky tak v různém pořadí vstupují do druhé části zařízení – hmotnostního spektrometru (Karasek & Clement 2012).

Chemické species se při vstupu do hmotnostního spektrometru nejdříve dostanou k ionizátoru, kde dochází k ionizaci molekul. Nejpoužívanější způsoby ionizace látek v plynné fázi jsou typicky elektronová ionizace, chemická ionizace nebo ionizace elektromagnetickým polem. Při elektronové ionizaci dochází k emisi elektronu ze žhavené katody, které jsou následně urychleny potenciálem okolo 70 eV. Takto urychlené elektrony poté interagují se vstupujícími molekulami způsobující jejich ionizaci dle následující rovnice (Karasek & Clement 2012).



V chemické ionizaci dochází k zavádění pomocného plynu (např. CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>), který je interakcí s elektrony ionizován. Takto ionizovaný plyn pak teprve reaguje se vzorkem dle rovnic popsanych níže. K ionizaci dochází typicky přenosem kladného náboje z ionizovaného pomocného plynu na vzorek.



Při ionizaci polem se užívá velice silného elektrického pole udržovaného mezi nabitým vláknem a elektrodou s potenciálem 8–12 kV, které ionizuje molekulu kvantově mechanickým vytunelováním valenčního elektronu na elektrodu.

Ionizovaný analyt je poté urychlován v magnetickém poli, a následně vstupuje do iontového separátoru, kde dochází k vychýlení iontů ze své dráhy v závislosti na jejich hmotnosti. Po separaci vstupují ionty na detektor, ze kterého je po zpracování signálu počítačovou technikou získáno hmotnostní spektrum (Karasek & Clement 2012).

Vzhledem k vysoké teplotě dochází k dekarboxylaci kanabinoidů na jejich neutrální formy a nelze tudíž stanovit přirozeně se vyskytující karboxylové kyseliny, z tohoto důvodu je GC-MS vhodnější pro stanovení terpenů.

### **3.5.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie**

HPLC je podobně jako GC-MS široce používanou analytickou metodou. Je založena na stejném principu, avšak mobilní fází zde oproti GC není nosný plyn, ale kapalina. Ta je díky vysokotlakému čerpadlu tlačena kolonou. Kapalinová chromatografie se podle typu stacionární fáze typicky dělí na permeační chromatografii, adsorpční chromatografii, ionexovou chromatografii, dále existují i speciální typy chromatografií jako např. chromatografie chirální (Lough & Wainer 1995).

V permeační chromatografii je stacionární fází gel a k separaci dochází na základě velikosti částic analytu a velikosti pórů gelu. V adsorpční chromatografii dochází k separaci založené na povrchových interakcích vzorku s adsorbentem. V ionexové chromatografii dochází k oddělení iontů pomocí specifické interakce s nabitým nosičem.

Používají se různé typy detektorů, např. UV detektor, DAD (detektor diodového pole) či hmotnostní spektrometr.

HPLC je oproti GC vhodná pro analýzu méně těkavých látek v kondenzovaném skupenství a je tak vhodnou analytickou metodou pro stanovení kanabinoidů (Lough & Wainer 1995)



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Rostliny konopí

#### 4.1.1 Biologický materiál

Pro tuto práci bylo vybráno 9 rozdílných genotypů; Blueberry 3, CBD Caramel 6, Forbidden fruit 2, 3, 5, 6 a 8, Nurse Jackie 1 a Shaman 5.

##### Blueberry

Blueberry vznikla křížením odrůd Purple Thai a Thai. Řadí se mezi odrůdy *indica* s poměrem 80/20. Historie šlechtění této odrůdy sahá až do 70. let, kdy americký šlechtitel DJ Short pracoval s řadou exotických landrace odrůd. Proslavila se zejména poté, co získala ocenění časopisu High Times Cannabis Cup 2000 za nejlepší *indica*.

Odrůda je typická svými červenými a fialovými odstíny, které se mění v průběhu zrání, obvykle až do levandulově modré barvy. Blueberry má nasládlou ovocnou chuť připomínající borůvky. Obsah THC je vysoký a účinek dlouhotrvající.

##### CBD Caramel

CBD Caramel je převážně *indica* (70/30) od společnosti Barneys Farm. Lze ji pěstovat v interiéru i venku. Poměr THC a CBD je vyrovnaný.

Rostlina má od počátku dynamický růst, takže vegetativní fáze může být omezena na minimum. Při kvetení vytváří pryskyřičnou strukturu květů podobnou sativě. Psychoaktivní účinky jsou mírné a uklidňující, vhodné pro pacienty, kteří se potřebují léčit a zároveň se obejít bez výraznějšího „high“.

##### Forbidden fruit

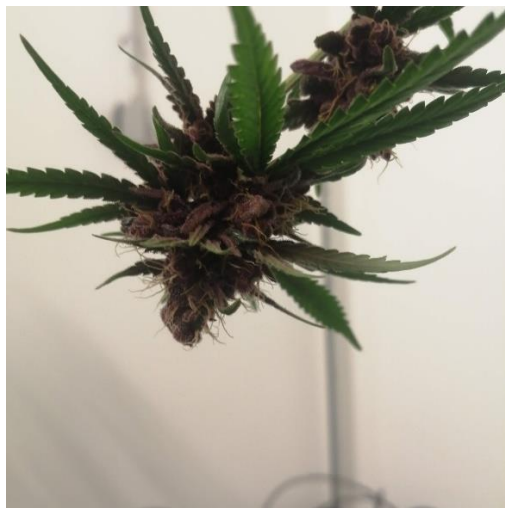
Forbidden Fruit je kříženec Cherry Pie x Tangie. Vyznačuje se hustou strukturou poupat s tmavě fialovými odstíny, tmavě zelenými listy a drátovitými oranžovými chloupky. Terpenový profil je směsí pižmových, sladkých třešňových tónů Cherry Pie a tropických chutí Tangie. Účinek indiky je silný, doprovázený hlubokým fyzickým uvolněním a duševní otupělostí. Je proto vhodná proti mírným fyzickým obtížím a stresu.

##### Nurse Jackie

Nurse Jackie je hybrid (85/15) s dominancí sativy, který původně vyšlechtila společnost Homegrown Natural Wonders, zkřížením odrůd Jack the Ripper a Medicine Woman. Vyznačuje se kyselou citronovou příchutí. I přes vysoký obsah THC zanechává jasnou mysl a není příliš zatěžující. Všechny fenotypy se táhnou do výšky, ale Nurse Jackie se může přiklonit buď ke kyselým, zakulaceným poupatům Medicine Woman, nebo k citrusově vonícím, špičatým květům charakteristickým pro Jack the Ripper.

### Shaman

Shaman je odrůda s dominancí sativy (87,5/12,5) vyšlechtěná Dutch Passion z odrůd Purple #1 a Skunk. Lze ji pěstovat v interiéru i venku. Během kvetení se zhruba 50 % rostlin zbarví do fialova. Pomáhá při depresi, úzkosti a chronické bolesti. Někteří také při vyšších dávkách pociťují mírné psychedelické stavy, což svědčí o silných opojných účincích, které jsou tomuto stimulujícímu genetickému kříženci vlastní.



Obr. 12 – Detail květenství odrůdy Shaman

#### **4.1.2 Pěstování**

Rostliny byly vypěstované na FAPPZ ČZU v laboratoři s kontrolovanými podmínkami, včetně regulace teploty, vlhkosti, koncentrace oxidu uhličitého, proudění vzduchu a světelného režimu. Bylo vypěstováno celkem 27 samičích rostlin 9 různých genotypů, po 3 jedincích od každé odrůdy.

#### **4.1.3 Zpracování**

##### Sklizení

Rostliny byly sklizeny mezi 7. a 11. týdnem kvetení. V ideální době zralosti, určené zejména, avšak nejen, dle barvy pestíků, kdy většina z nich měla nahnědlý odstín z původního bílého.

##### Sušení

Rostliny se nechaly sušit zavěšené v laboratoři s cirkulací vzduchu při teplotě 25 °C po několik týdnů (viz Obr. 12). Následně bylo usušené květenství ručně odděleno od stonků. Paličky byly zváženy a hmotnosti zaznamenány pro každou rostlinu, poté byly zabaleny do hermeticky uzavřených sáčků nepropustných pro světlo.



Obr. 13 – Brzká fáze sušení

## 4.2 Stanovení kanabinoidů

### 4.2.1 Homogenizace

Obsah každého sáčku byl vysypán, nahrubo zhomogenizován a rozprostřen, z různých míst byl odebrán reprezentativní vzorek o hmotnosti cca 3 g. Z Takto připravených vzorků bylo přesně odváženo 1,4 až 1,5 g. Toto množství bylo homogenizováno pomocí oscilačního kulového mlýnu (MM 200, Retsch, Německo) po dobu 2 minut. Homogenizovaný materiál byl kvantitativně převeden do 15ml zkumavek.

### 4.2.2 Příprava vzorků

Zkumavky byly doplněny takovým objemem ethanolu, aby výsledná koncentrace byla vždy přesně 1 g materiálu na 10 ml. Poté byly vloženy do ultrazvuku po dobu 30 minut. Následně se extrakty nechaly centrifugovat při 9000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut, čímž došlo k usazení pevného podílu. Dalším krokem byla filtrace pomocí stříkaček přes nylonové filtry do 2ml vialek.

Ředěním těchto extraktů byly připraveny série vzorků o třech koncentracích sušiny: 100 mg/ml (původní extrakt), 10 mg/ml a 1 mg/ml.

### 4.2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Stanovení probíhalo na HPLC UltiMate 3000 (Thermo Fisher, USA) s UV detektorem. Pro analýzu byla použita kolona Excel Super C18, jejíž teplota byla nastavena na 40 °C. Separace látek byla provedena gradientovou elucí, jako mobilní fáze byla použita voda s 0,075 % mravenčanu amonného (A) a acetonitril s 0,5 % mravenčanu amonného (B). Průběh gradientu (A:B) byl následující: 0', 30:70; 1', 30:70; 10', 0:100; 12', 0:100; 14', 30:70. Vzorky byly nastříkovány v objemu 10  $\mu$ l. Průtoková rychlost činila 1 ml/min. Vlnová délka pro kvantifikaci byla nastavena na 210 nm. Data byla zpracována v programu Chromeleon 7.2.

## **4.3 Vyhodnocení**

### **4.3.1 Stanovení sušiny**

Ke stanovení sušiny byl použit přibližně 1 g nahrubo zhomogenizovaného sušeného květenství. Měření probíhalo na infračervených vahách při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti s relativní přesností 0,05 %.

### **4.3.2 Statistické metody**

K analýze dat byla zvolena jednofaktorová ANOVA. S využitím post-hoc metody Fisher LSD test byly testovány prokazatelné rozdíly mezi hodnotami na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Výpočty probíhaly v programu STATISTICA (Statsoft, Tulsa, USA).

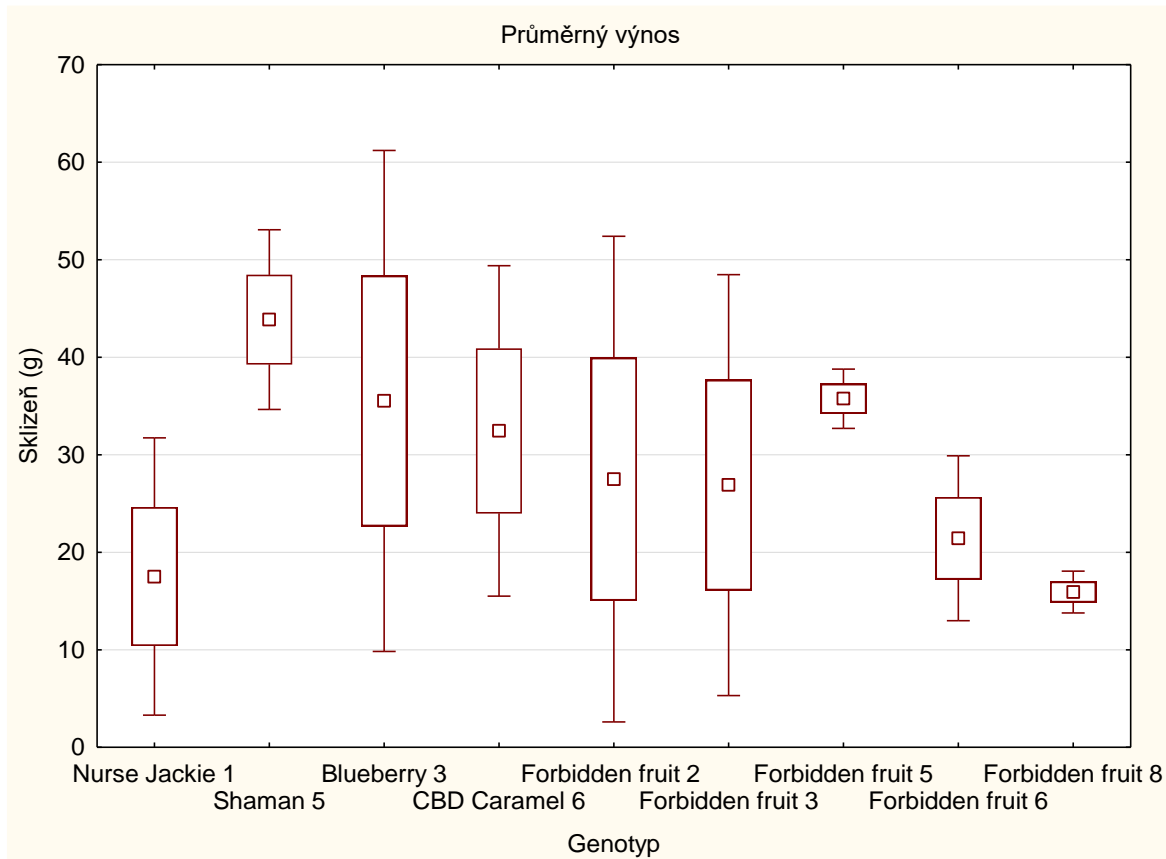
## 5 Výsledky

### 5.1 Výnosy sušeného květenství

**Tabulka 1** – Výnosy sušeného květenství jednotlivých rostlin včetně stanovení vlhkosti sušením při 105 °C do konstantní hmotnosti.

<b>Genotyp</b>	<b>Sklizeň (g)</b>	<b>Ztráta sušením (%)</b>	<b>Sušina (g)</b>
Nurse Jackie 1 (1)	21,63	8,06	19,89
Nurse Jackie 1 (2)	9,31	9,34	8,44
Nurse Jackie 1 (3)	21,61	9,56	19,54
Shaman 5 (1)	40,60	7,78	37,44
Shaman 5 (2)	47,12	9,5	42,64
Blueberry 3 (1)	27,32	7,94	25,15
Blueberry 3 (2)	28,92	8,29	26,52
Blueberry 3 (3)	50,32	7,77	46,41
CBD Caramel 6 (1)	42,06	7,91	38,73
CBD Caramel 6 (2)	26,07	9,19	23,67
CBD Caramel 6 (3)	29,21	7,23	27,10
Forbidden fruit 2 (1)	33,41	7,51	30,90
Forbidden fruit 2 (2)	35,90	8,74	32,76
Forbidden fruit 2 (3)	13,20	7,16	12,25
Forbidden fruit 3 (1)	39,32	9,44	35,61
Forbidden fruit 3 (2)	19,88	8,71	18,15
Forbidden fruit 3 (3)	21,48	8,33	19,69
Forbidden fruit 5 (1)	34,47	9,22	31,29
Forbidden fruit 5 (2)	35,34	11,49	31,28
Forbidden fruit 5 (3)	37,43	8,24	34,35
Forbidden fruit 6 (1)	17,01	8,73	15,53
Forbidden fruit 6 (2)	25,43	8,6	23,24
Forbidden fruit 6 (3)	21,86	9,4	19,81
Forbidden fruit 8 (1)	15,96	8,53	14,60
Forbidden fruit 8 (2)	16,98	8,84	15,48
Forbidden fruit 8 (3)	14,84	8,96	13,51

Nejvyššího výnosu dosáhl genotyp Shaman 5 s průměrnou hmotností sušeného květenství 43,9 g na rostlinu, jak je znázorněno v Grafu 1. Naopak nejnižší výnos měla odrůda Forbidden fruit 8 (15,9 g/rostlina). Nurse Jackie 1 měla průměrný výnos 17,5 g, druhá rostlina tohoto genotypu měla výnos pouhých 9,3 g, což je nejnižší hodnota ze všech sledovaných jedinců. Rostlina s nejvyšším výnosem byla Blueberry 3 (3) s 50,3 g sušeného květenství, průměr genotypu činí 35,5 g. Průměrný výnos genotypu CBD Caramel 6 byl 32,4 g. Z odrůd Forbidden fruit byl zaznamenán nejvyšší průměrný výnos u genotypu s číslem 6, jenž činí 35,7 g.



Graf 1 – Průměrný výnos jednotlivých odrůd

## 5.2 Obsah kanabinoidů

### 5.2.1 Obsah majoritních kanabinoidů

**Tabulka 2** – Obsah THC, THCA a celkového THC vyjádřený v procentech

Genotyp	THC	THCA	THC (celk.)
Nurse Jackie 1	1,412 ±0,03	6,822 <sup>ab</sup> ±0,49	8,234 <sup>ab</sup> ±0,47
Shaman 5	1,267 ±0,01	5,571 <sup>ab</sup> ±2,97	6,838 <sup>ab</sup> ±2,96
Blueberry 3	0,797 ±0,06	5,475 <sup>ab</sup> ±2,45	6,273 <sup>ab</sup> ±2,41
CBD Caramel 6	0,823 ±0,17	2,900 <sup>a</sup> ±0,46	3,723 <sup>b</sup> ±0,34
Forbidden fruit 2	0,879 ±0,75	4,357 <sup>a</sup> ±3,81	5,236 <sup>b</sup> ±4,55
Forbidden fruit 3	0,822 ±0,72	4,483 <sup>a</sup> ±4,04	5,305 <sup>b</sup> ±4,66
Forbidden fruit 5	1,154 ±0,07	9,348 <sup>b</sup> ±0,15	10,502 <sup>a</sup> ±0,11
Forbidden fruit 6	0,873 ±0,32	7,162 <sup>b</sup> ±2,06	8,035 <sup>ab</sup> ±2,36
Forbidden fruit 8	1,357 ±0,31	7,792 <sup>b</sup> ±1,47	9,149 <sup>a</sup> ±1,74

Genotyp s nejvyšším obsahem celkového THC byl Forbidden fruit 5 s 10,50 %, jenž měl zároveň nejvyšší koncentraci THCA (9,35 %). Forbidden fruit 6 a 8 také dosahují vysokých hodnot celkového THC. Naopak nejnižší koncentraci celkového THC vykazuje odrůda CBD Caramel 6 s hodnotou 3,72 %. Nejvyšší hodnotu neutrálního THC (1,41 %) měla Nurse Jackie 1.

**Tabulka 3** – Obsah CBD, CBDA a celkového CBD vyjádřený v procentech

Genotyp	CBD	CBDA	CBD (celk.)
Nurse Jackie 1	0,001 <sup>b</sup> ±0,00	0,192 <sup>b</sup> ±0,04	0,193 <sup>b</sup> ±0,04
Shaman 5	0,004 <sup>b</sup> ±0,01	0,269 <sup>b</sup> ±1,53	0,272 <sup>b</sup> ±1,81
Blueberry 3	0,192 <sup>ab</sup> ±0,34	1,263 <sup>ab</sup> ±1,61	1,456 <sup>ab</sup> ±1,87
CBD Caramel 6	0,566 <sup>a</sup> ±0,09	3,920 <sup>a</sup> ±0,23	4,486 <sup>a</sup> ±0,17
Forbidden fruit 2	0,061 <sup>ab</sup> ±0,09	0,347 <sup>b</sup> ±0,13	0,407 <sup>b</sup> ±0,21
Forbidden fruit 3	0,036 <sup>b</sup> ±0,06	0,161 <sup>b</sup> ±0,05	0,198 <sup>b</sup> ±0,09
Forbidden fruit 5	0,006 <sup>b</sup> ±0,00	0,110 <sup>b</sup> ±0,01	0,117 <sup>b</sup> ±0,01
Forbidden fruit 6	0,003 <sup>b</sup> ±0,00	0,185 <sup>b</sup> ±0,05	0,188 <sup>b</sup> ±0,05
Forbidden fruit 8	0,030 <sup>b</sup> ±0,04	0,436 <sup>b</sup> ±0,42	0,466 <sup>b</sup> ±0,45

Nejvyšší koncentraci celkového CBD, téměř 4,5 %, měl genotyp CBD Caramel 6. Ten měl také nejvyšší hodnoty CBDA a neutrálního CBD. Odrůda s druhým nejvyšším obsahem celkového CBD byla Blueberry 3 s necelými 1,5 %. Ostatní genotypy nepřesáhly koncentraci 0,5 %. Forbidden fruit 5 má obsah vůbec nejnižší s 0,12 %.

## 5.2.2 Obsah minoritních kanabinoidů

**Tabulka 4** – Obsah CBG, CBGA a celkového CBG vyjádřený v procentech

Genotyp	CBG	CBGA	CBG (celk.)
Nurse Jackie 1	0,038 <sup>b</sup> ±0,01	0,165 ±0,05	0,203 ±0,06
Shaman 5	0,065 <sup>ab</sup> ±0,01	0,158 ±0,06	0,223 ±0,07
Blueberry 3	0,038 <sup>b</sup> ±0,01	0,432 ±0,13	0,470 ±0,14
CBD Caramel 6	0,069 <sup>ab</sup> ±0,01	0,139 ±0,03	0,207 ±0,04
Forbidden fruit 2	<b>0,207<sup>a</sup></b> ±0,16	0,811 ±0,74	<b>1,017</b> ±0,89
Forbidden fruit 3	0,170 <sup>ab</sup> ±0,21	<b>0,838</b> ±1,12	1,008 ±1,32
Forbidden fruit 5	0,074 <sup>ab</sup> ±0,01	0,186 ±0,04	0,259 ±0,04
Forbidden fruit 6	0,079 <sup>ab</sup> ±0,04	0,357 ±0,06	0,436 ±0,09
Forbidden fruit 8	0,136 <sup>ab</sup> ±0,05	0,389 ±0,12	0,525 ±0,16

Nejvyšší podíl celkového CBG (přes 1 %), neutrálního CBG a jeho prekurzoru CBGA mají genotypy Forbidden fruit 2 a 3, s velmi blízkými hodnotami. Obsah celkového CBG kolem 0,5 % má kromě odrůd Forbidden fruit 6 a 8 také Blueberry 3. Ostatní genotypy lehce přesahují hranici 0,2 %.



**Tabulka 5** – Obsah THCv, CBDv a CBN vyjádřený v procentech

<b>Genotyp</b>	<b>THCV</b>	<b>CBDV</b>	<b>CBN</b>
Nurse Jackie 1	<b>0,009<sup>a</sup></b> ±0,001	0	<b>0,364<sup>a</sup></b> ±0,32
Shaman 5	0,006 <sup>ab</sup> ±0,002	0	0
Blueberry 3	0,004 <sup>ab</sup> ±0,002	0,001 <sup>b</sup> ±0,002	0
CBD Caramel 6	0,003 <sup>ab</sup> ±0,002	<b>0,003<sup>a</sup></b> ±0,002	0
Forbidden fruit 2	0,003 <sup>ab</sup> ±0,002	0	0
Forbidden fruit 3	0,001 <sup>b</sup> ±0,000	0	0
Forbidden fruit 5	0,003 <sup>ab</sup> ±0,001	0,001 <sup>b</sup> ±0,001	0,011 <sup>b</sup> ±0,02
Forbidden fruit 6	0,002 <sup>b</sup> ±0,002	0	0
Forbidden fruit 8	0,004 <sup>ab</sup> ±0,003	0	0

Nurse Jackie 1 měla nejvyšší zjištěný obsah THCv a též CBN (0,36 %), produktu degradace THC. Jediný další genotyp s detekovaným obsahem CBN byl Forbidden fruit 5. Obsah CBDv byl nejvyšší u odrůdy CBD Caramel 6 (0,003 %), kromě tohoto genotypu byl stanoven také u Blueberry 3 a Forbidden fruit 5.

## 6 Diskuze

Průměrný výnos všech genotypů činil 27,95 g. Výnosy se lišily i v rámci stejných genotypů, což je zajímavé, protože trojice rostlin měly stejný genetický základ a zdánlivě i stejné podmínky, tato data však nebyla statisticky hodnocena. Jediným rozdílem bylo tedy umístění v pěstírně.

Janatová et al. (2018) ve svém výzkumu dosáhli průměrného výnosu 21,02 g, jenž je mírně nižší. V experimentu Vanhove et al. (2011) byly zkoumány čtyři chemotypově obdobné genotypy konopí jako v této práci. Rostliny byly pěstovány ve 4 odlišných variantách pěstebních podmínek. K osvětlení použili 400 W a 600 W zářivky, s hustotou 16 a 20 rostlin/m<sup>2</sup>. Při nižší hustotě rostlin na metr čtvereční a osvětlení 400 W bylo dosaženo přibližně stejných výnosů.

Průměrný obsah celkového THC byl  $7,04 \pm 3,0$  %, Janatová et al. (2018) ve své studii naměřili průměrné obsahy v šesti cyklech v rozmezí od  $15,69 \pm 2,6$  % do  $19,31 \pm 2,47$  %, nejednalo se ovšem o plně totožnou skladbu genotypů. Nejvyšší hodnota celkového THC 10,502 % byla zjištěna u genotypu Forbidden fruit 5, podobných výsledků dosáhly i odrůdy Forbidden fruit 6 (8,035 %) a Forbidden fruit 8 (9,149 %). Forbidden fruit 2 a 3 měly obsah celkového THC nižší (5,236 % a 5,305 %, respektive). Javůrková (2022) ve svém výzkumu stanovila obsahy THC stejných genotypů konopí vyšší. Zároveň jsou obsahy výrazně nižší, než je udáváno šlechtiteli. Nejnižší obsah THC měl CBD Caramel 6, jak bylo očekáváno, jelikož se jedná o genotyp šlechtěný na vyrovnaný poměr THC/CBD, proto měl také výrazně vyšší obsah CBD než ostatní odrůdy. Druhou odrůdou se znatelným obsahem CBD (1,456 %) byla Blueberry 3, tato hodnota je výrazně vyšší, než jakou stanovila Javůrková (2022) ve svém experimentu (0,078 %).

Hodnoty CBG mírně přesahující 1 % dosáhly pouze 2 genotypy, Forbidden fruit 2 a 3. Z odrůd Forbidden fruit měl nejnižší obsah genotyp s číslem 5, ke stejnému výsledku došla také Javůrková (2022). Vzhledem k tomu, že CBG je prvním článkem v biosyntetické dráze kanabinoidních sloučenin (Appendino et al. 2008), lze jeho nízkou hodnotou u genotypu Forbidden fruit 5 z části vysvětlit nejvyšší hladinu celkového THC v důsledku vyšší konverze CBG.

Obsahy THCV byly zanedbatelné, s nejvyšší koncentrací 0,009 % u genotypu Nurse Jackie 1, ta měla též nejvyšší stanovenou hodnotu CBN (0,364 %), produktu degradace THC, a též nejvyšší obsah neutrálního THC, jenž vzniká dekarboxylací z přirozeně se vyskytující THCA. Z tohoto lze usuzovat, že při procesu sušení byly rostliny této odrůdy vystaveny větší zátěži (např. umístění příliš blízko ventilace). To může být jeden z faktorů, proč obsah celkového THC u této odrůdy (8,234 %) byl výrazně nižší oproti hodnotě, kterou ve svém výzkumu stanovila Janatová et al. (2018), jenž činila 17,41 %.

Obsah CBDV byl zjištěn pouze u 3 genotypů; Blueberry 3, CBD Caramel 6 a Forbidden fruit 5. Genetika těchto odrůd je z převážné části *indica*, na rozdíl od Nurse Jackie 1 či Shamana, jenž jsou převážně sativového typu, u kterých nebyl kanabidivarin detekován. To souhlasí s výzkumy, které potvrzují, že CBDV se vyskytuje v genotypech typu *indica* (Hillig & Mahlberg 2004).

## 7 Závěr

Lze konstatovat, že hypotéza o odlišném množství kanabinoidů v různých odrůdách konopí byla potvrzena. Genotypy využití v této práci pocházejí ze specificky selektovaných mateřských rostlin v rámci diplomových prací Ing. Natálie Javůrkové a Ing. Leony Beránkové, bez jejichž přínosu by tato studie nebyla možná.

Stanovení obsahu kanabinoidů je důležité pro charakterizaci jednotlivých genotypů léčebného konopí, tak aby mohli být předepisovány pacientům „na míru“, podle požadovaných terapeutických účinků. Získaná data by měla být porovnána s daty antimikrobiální aktivity, které ve své diplomové práci souběžně stanovoval Bc. Martin Káda. Do budoucna by bylo zajímavé se zaměřit na odrůdy s vyšším obsahem minoritních kanabinoidů, jako je např. CBG, které jsou ve výzkumech často opomíjeny, přestože se ukazuje, že mohou mít pozitivní vliv na řadu patologických stavů.

## 8 Literatura

- Abrahamov A, Abrahamov A, Mechoulam R. 1995. An efficient new cannabinoid antiemetic in pediatric oncology. *Life Sciences* **56**:2097–2102.
- Alma MH, Nitz S, Kollmannsberger H, Digrak M, Efe FT, Yilmaz N. 2004. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:3911–3914.
- Almirall M, Montaña J, Escribano E, Obach R, Berrozpe JD. 1996. Effect of d-limonene, alpha-pinene and cineole on in vitro transdermal human skin penetration of chlorpromazine and haloperidol. *Arzneimittel-Forschung* **46**:676–80.
- Amaducci S, Zatta A, Pelatti F, Venturi G. 2008. Influence of agronomic factors on yield and quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) fibre and implication for an innovative production system. *Field Crops Research* **107**:161–169.
- Andre CM, Hausman JF, Guerriero G. 2016. *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules. *Frontiers in Plant Science* **7**. Frontiers Media S.A.
- Appendino G, Chianese G, Tagliatela-Scafati O. 2011. Cannabinoids: Occurrence and Medicinal Chemistry. *Current Medicinal Chemistry* **18**:1085–1099.
- 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.
- Aquila S, Guido C, Laezza C, Santoro A, Pezzi V, Panza S, Andò S, Bifulco M. 2009. A new role of anandamide in human sperm: Focus on metabolism. *Journal of Cellular Physiology* **221**:147–153.
- Arruda DC, D’Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SRB. 2005. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**:1679–1687.
- Bachman JG, O’Malley PM, Schulenberg JE, Johnston LD, Freedman-Doan P, Messersmith EE. 2007. *The Education-Drug Use Connection*. Psychology Press.
- Bahi A, Al Mansouri S, Al Memari E, Al Ameri M, Nurulain SM, Ojha S. 2014.  $\beta$ -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiology & Behavior* **135**:119–124.
- Bai X, Tang J. 2020. Myrcene Exhibits Antitumor Activity Against Lung Cancer Cells by Inducing Oxidative Stress and Apoptosis Mechanisms. *Natural Product Communications* **15**:1934578X2096118.
- Baser KHC, Buchbauer G. 2015. *Handbook of Essential Oils*. CRC Press.

- Basile AC, SertiÉ JAA, Freitas PCD, Zanini AC. 1988. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. *Journal of Ethnopharmacology* **22**:101–109.
- Basyal P, Regmi P. 2021. Ethnobotany, Taxonomy and Phytochemistry of *Cannabis sativa*. Page Narrative Review Article *International Journal of Medicine & Biomedical Sciences*.
- Behr A, Johnen L. 2009. Myrcene as a Natural Base Chemical in Sustainable Chemistry: A Critical Review. *ChemSusChem* **2**:1072–1095.
- Belackova V, Stefunkova M. 2018. Interpreting the Czech drug decriminalization: The glass is half full – Response to Cervený, J., Chomynová, P., Mravčík, V., & van Ours, J.C. (2017). Cannabis decriminalization and the age of onset of cannabis use. *International Journal of Drug Policy* **52**:102–105.
- Berger RG. 2007. *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer.
- Berman P, Futoran K, Lewitus GM, Mukha D, Benami M, Shlomi T, Meiri D. 2018. A new ESI-LC/MS approach for comprehensive metabolic profiling of phytocannabinoids in *Cannabis*. *Scientific Reports* **8**:14280.
- Bertea C, Schalk M, Mau CJD, Karp F, Wildung MR, Croteau R. 2003. Molecular evaluation of a spearmint mutant altered in the expression of limonene hydroxylases that direct essential oil monoterpene biosynthesis. *Phytochemistry* **64**:1203–1211. Elsevier Ltd.
- Bifulco M, Pisanti S. 2009. End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? An opinion. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**:594–594.
- Bifulco M, Pisanti S. 2015. Medicinal use of cannabis in Europe. *EMBO reports* **16**:130–132.
- Bonini SA, Premoli M, Tambaro S, Kumar A, Maccarinelli G, Memo M, Mastinu A. 2018, December 5. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. Elsevier Ireland Ltd.
- Booth JK, Bohlmann J. 2019. Terpenes in *Cannabis sativa* – From plant genome to humans. *Plant Science* **284**:67–72.
- Booth JK, Page JE, Bohlmann J. 2017. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. *PLOS ONE* **12**:e0173911.
- Booth M. 2005. *Cannabis: A History*. Macmillan.
- Brenneisen R. 2007. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. Pages 17–49 *Marijuana and the Cannabinoids*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Buglass AJ, Caven-Quantrill DJ. 2012. Applications of natural ingredients in alcoholic drinks. Pages 358–416 *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*. Elsevier.

- Callaway JC. 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. Page Euphytica. Kluwer Academic Publishers.
- Campbell W, Gammon D, Smith P, Abrahams M, Purves T. 1997. Composition and Antimalarial Activity in Vitro of the Essential Oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Medica* **63**:270–272.
- Čecho R, Baška T, Švihrová V, Hudečková H. 2017. Legislative Norms to Control Cannabis Use in the Light of Its Prevalence in the Czech Republic, Poland, Slovakia, and Hungary. *Central European Journal of Public Health* **25**:261–265.
- Chen F, Tholl D, Bohlmann J, Pichersky E. 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal* **66**:212–229.
- Clarke RC, Merlin MD. 2016. Cannabis Domestication, Breeding History, Present-day Genetic Diversity, and Future Prospects. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**:293–327. Taylor and Francis Inc.
- Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G. 2004. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **369**:294–299.
- Crocq MA. 2020. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience* **22**:223–228. Les Laboratoires Seriver.
- De Petrocellis L, Ligresti A, Schiano Moriello A, Iappelli M, Verde R, Stott CG, Cristino L, Orlando P, Di Marzo V. 2013. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo : pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *British Journal of Pharmacology* **168**:79–102.
- Dresel M et al. 2015. Comparison of the Analytical Profiles of Volatiles in Single-Hopped Worts and Beers as a Function of the Hop Variety. *Page Yearbook*. Available from [www.brauwissenschaft.de](http://www.brauwissenschaft.de).
- Drew DP, Andersen TB, Sweetman C, Møller BL, Ford C, Simonsen HT. 2016. Two key polymorphisms in a newly discovered allele of the *Vitis vinifera* TPS24 gene are responsible for the production of the rotundone precursor  $\alpha$ -guaiene. *Journal of Experimental Botany* **67**:799–808.
- Dussy FE, Hamberg C, Luginbühl M, Schwerzmann T, Briellmann TA. 2005. Isolation of  $\Delta^9$ -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of  $\Delta^9$ -THC in cannabis products. *Forensic Science International* **149**:3–10.
- Erasto P, Viljoen AM. 2008. Limonene-A Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance.

- Erman MB, Kane BJ. 2008. Chemistry Around Pinene and Pinane: A Facile Synthesis of Cyclobutanes and Oxatricyclo-Derivative of Pinane from cis- and trans-Pinanols. *Chemistry & Biodiversity* **5**:910–919.
- Fankhauser M. 2002. History of cannabis in Western medicine . The Haworth Integrative Healing Press, New York.
- Farag RS, Shalaby AS, El-Baroty GA, Ibrahim NA, Ali MA, Hassan EM. 2004. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research* **18**:30–35.
- Fischedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R. 2010. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* **71**:2058–2073.
- Franco R, Rivas-Santisteban R, Reyes-Resina I, Casanovas M, Pérez-Olives C, Ferreiro-Vera C, Navarro G, Sánchez de Medina V, Nadal X. 2020. Pharmacological potential of varinic-, minor-, and acidic phytocannabinoids. *Pharmacological Research* **158**:104801.
- Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen J-Z, Xie X-Q, Altmann K-H, Karsak M, Zimmer A. 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:9099–9104.
- Giacoppo S, Gugliandolo A, Trubiani O, Pollastro F, Grassi G, Bramanti P, Mazzone E. 2017. Cannabinoid CB2 receptors are involved in the protection of RAW264.7 macrophages against the oxidative stress: an in vitro study. *European Journal of Histochemistry* DOI: 10.4081/ejh.2017.2749.
- Giupponi L, Leoni V, Carrer M, Ceciliani G, Sala S, Panseri S, Pavlovic R, Giorgi A. 2020. Overview on Italian hemp production chain, related productive and commercial activities and legislative framework. *Italian Journal of Agronomy* DOI: 10.4081/ija.2020.1552.
- Gurgel do Vale T, Couto Furtado E, Santos JG, Viana GSB. 2002. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. *Phytomedicine* **9**:709–714.
- Guy GW, Stott CG. 2005. The development of Sativex® — a natural cannabis-based medicine. Pages 231–263 *Cannabinoids as Therapeutics*. Birkhäuser Basel, Basel.
- Hall DE, Robert JA, Keeling CI, Domanski D, Quesada AL, Jancsik S, Kuzyk MA, Hamberger B, Borchers CH, Bohlmann J. 2011. An integrated genomic, proteomic and biochemical analysis of (+)-3-carene biosynthesis in Sitka spruce (*Picea sitchensis*) genotypes that are resistant or susceptible to white pine weevil. *The Plant Journal* **65**:936–948.

- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. 1998. Cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**:8268–8273.
- Hanuš LO, Hod Y. 2020. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are They Important? *Medical Cannabis and Cannabinoids* **3**:25–60.
- Hanuš LO, Meyer SM, Muñoz E, Tagliatela-Scafati O, Appendino G. 2016. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports* **33**:1357–1392.
- Hartsel JA, Eades J, Hickory B, Makriyannis A. 2016. Cannabis sativa and Hemp. Pages 735–754 *Nutraceuticals*. Elsevier.
- Haslbeck K, Bub S, Schönberger C, Zarnkow M, Jacob F, Coelhan M. 2017. On the fate of  $\beta$ -myrcene during fermentation-the role of stripping and uptake of hop oil components by brewer's yeast in dry-hopped wort and beer. *BrewingScience* **70**:159–169. Fachverlag Hans Carl.
- Hillig KW, Mahlberg PG. 2004. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *American Journal of Botany* **91**:966–975.
- Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. 2009. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**:515–527.
- Janatová A, Fraňková A, Tlustoš P, Hamouz K, Božik M, Klouček P. 2018. Yield and cannabinoid contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use. *Industrial Crops and Products* **112**:363–367. Elsevier B.V.
- Javůrková N. 2022. Identifikace a relativní kvantifikace biologicky aktivních látek v různých genotypech léčebného konopí (*Cannabis sativa* L.) [MSc Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Jelsma M. 2011. The development of international drug control: Lessons learned and strategic challenges of the future. *International Drug Policy Consortium*.
- Joshi M, Joshi A, Barter T. 2014. Marijuana and lung diseases. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* **20**:173–179.
- Kamatou GPP, Viljoen AM. 2008. Linalool-A Review of a Biologically Active Compound of Commercial Importance.
- Kamigaito M, Satoh K. 2017. Sustainable Vinyl Polymers via Controlled Polymerization of Terpenes. Pages 55–90 *Sustainable Polymers from Biomass*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.



- Karasek FW, Clement RE. 2012. Basic gas chromatography-mass spectrometry: principles and techniques. Elsevier, Waterloo.
- Karsak M et al. 2007. Attenuation of Allergic Contact Dermatitis Through the Endocannabinoid System. *Science* **316**:1494–1497.
- Kaur R, R. Ambwani S, Singh S. 2016. Endocannabinoid System: A Multi-Facet Therapeutic Target. *Current Clinical Pharmacology* **11**:110–117.
- Kázmér L, Csémy L, Ružbarská I, Pavelka J, Hamřík Z, Kalman M. 2017. Trends in Lifetime Cannabis Use among Czech School-aged Children from 2002 to 2014. *Central European Journal of Public Health* **25**:S47–S50.
- Kinghorn AD, Falk H, Gibbons S, Kobayashi J. 2017. Phytocannabinoids. Springer International Publishing, Cham.
- Kleiman MAR. 2011. Cannabis policy: moving beyond stalemate. *Addiction* **106**:1194–1196.
- Kopustinskiene DM, Masteikova R, Lazauskas R, Bernatoniene J. 2022. Cannabis sativa L. Bioactive Compounds and Their Protective Role in Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* **11**:660.
- Landa L, Juřica J. 2020. Léčebné konopí v současné medicínské praxi. Grada Publishing, Praha.
- Langenheim JH. 1994. Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* **20**:1223–1280.
- Lapczynski A, Bhatia SP, Letizia CS, Api AM. 2008. Fragrance material review on nerolidol (isomer unspecified). *Food and Chemical Toxicology* **46**:S247–S250.
- Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V. 2006. Antitumor Activity of Plant Cannabinoids with Emphasis on the Effect of Cannabidiol on Human Breast Carcinoma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **318**:1375–1387.
- Lough JW, Wainer IW. 1995. High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. cRc press.
- Lourens ACU, Viljoen AM, van Heerden FR. 2008. South African Helichrysum species: A review of the traditional uses, biological activity and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology* **119**:630–652.
- MacGillivray N. 2017. Sir William Brooke O’Shaughnessy (1808–1889), MD, FRS, LRCS Ed: Chemical pathologist, pharmacologist and pioneer in electric telegraphy. *Journal of Medical Biography* **25**:186–196.

- Madden O, Walshe J, Kishore Patnala P, Barron J, Meaney C, Murray P. 2023. Phytocannabinoids - An Overview of the Analytical Methodologies for Detection and Quantification of Therapeutically and Recreationally Relevant Cannabis Compounds. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **53**:211–231.
- Madiha Yusoff I, Zulaiha Hanapi S, Yahayu M. 2021. Bioactive Terpenoids in Cannabis: A Critical Review Article in *Bioscience Research*. Available from <https://www.researchgate.net/publication/350176211>.
- Marchini M, Charvoz C, Dujourdy L, Baldovini N, Filippi J-J. 2014. Multidimensional analysis of cannabis volatile constituents: Identification of 5,5-dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane as a volatile marker of hashish, the resin of *Cannabis sativa* L. *Journal of Chromatography A* **1370**:200–215.
- McPartland JM. 2018. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research* **3**:203–212. Mary Ann Liebert Inc.
- McPartland JM, Guy GW. 2017. Models of Cannabis Taxonomy, Cultural Bias, and Conflicts between Scientific and Vernacular Names. *Botanical Review* **83**:327–381. Springer New York LLC.
- McPartland JM, Russo EB. 2001. Cannabis and Cannabis Extracts. *Journal of Cannabis Therapeutics* **1**:103–132.
- Mravčík V. 2015. (De)criminalisation of possession of drugs for personal use – A view from the Czech Republic. *International Journal of Drug Policy* **26**:705–707.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* **101**:372–378.
- Ocque AJ, Hagler CE, DiFrancesco R, Lombardo J, Morse GD. 2019. Development and validation of an assay to measure cannabidiol and  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in human EDTA plasma by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **1112**:56–60.
- Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S. 2013. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. *Food Control* **31**:189–195.
- Özbek H, Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Y, Öztürk A. 2005. THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF EUGENIA CARYOPHYLLATA ESSENTIAL OIL: AN ANIMAL MODEL OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY. Page Eur J Gen Med.
- Peana AT, D'aquila PS, Panin F, Serra G, Pippial P, Maretti MDL. 2002. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. Available from <http://www.urbanfischer.de/journals/phyto-med>.

- Pellati F, Borgonetti V, Brighenti V, Biagi M, Benvenuti S, Corsi L. 2018. Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed Research International* **2018**:1–15.
- Piomelli D, Russo EB. 2016. The Cannabis sativa Versus Cannabis indica Debate: An Interview with Ethan Russo, MD. *Cannabis and Cannabinoid Research* **1**:44–46.
- Pisanti S, Bifulco M. 2017. Modern History of Medical Cannabis: From Widespread Use to Prohibitionism and Back. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**:195–198.
- Pisanti S, Bifulco M. 2019, June 1. *Medical Cannabis: A plurimillennial history of an evergreen.* Wiley-Liss Inc.
- Pisanti S, Borselli C, Oliviero O, Laezza C, Gazzero P, Bifulco M. 2007. Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: Correlation to its tumor-suppressor efficacy. *Journal of Cellular Physiology* **211**:495–503.
- Pollastro F, De Petrocellis L, Schiano-Moriello A, Chianese G, Heyman H, Appendino G, Taglialatela-Scafati O. 2017. Amorfrutin-type phytocannabinoids from *Helichrysum umbraculigerum*. *Fitoterapia* **123**:13–17.
- Potter D. 2004. Growth and morphology of medicinal cannabis. The medicinal uses of Cannabis and cannabinoids.
- Potter D. 2009. THE PROPAGATION, CHARACTERISATION AND OPTIMISATION OF CANNABIS SATIVA L AS A PHYTOPHARMACEUTICAL A thesis submitted by.
- Proto MC, Gazzero P, Di Croce L, Santoro A, Malfitano AM, Pisanti S, Laezza C, Bifulco M. 2012. Interaction of endocannabinoid system and steroid Hormones in the control of colon cancer cell growth. *Journal of Cellular Physiology* **227**:250–258.
- Raman A, Weir U, Bloomfield SF. 1995. Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*. *Letters in Applied Microbiology* **21**:242–245.
- Ramström J. 2004. Adverse health consequences of cannabis use. National Institute of Public Health, Sweden.
- Rodrigues Goulart H, Kimura EA, Peres VJ, Couto AS, Aquino Duarte FA, Katzin AM. 2004. Terpenes Arrest Parasite Development and Inhibit Biosynthesis of Isoprenoids in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**:2502–2509.
- Ross SA, ElSohly MA. 1996. The Volatile Oil Composition of Fresh and Air-Dried Buds of *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products* **59**:49–51.

- Rothschild M, Bergstrom G, Wangberg S-Å. 2005. Cannabis sativa: volatile compounds from pollen and entire male and female plants of two variants, Northern Lights and Hawaiian Indica. *Botanical Journal of the Linnean Society* **147**:387–397.
- Rufino AT, Ribeiro M, Sousa C, Judas F, Salgueiro L, Cavaleiro C, Mendes AF. 2015. Evaluation of the anti-inflammatory, anti-catabolic and pro-anabolic effects of E-caryophyllene, myrcene and limonene in a cell model of osteoarthritis. *European Journal of Pharmacology* **750**:141–150.
- Russo EB et al. 2008. Phytochemical and genetic analyses of ancient cannabis from Central Asia. *Journal of Experimental Botany* **59**:4171–4182.
- Russo EB. 2011. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects LINKED ARTICLES. *British Journal of Pharmacology* **163**:1344–1364. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/bph.2011.163.issue-7> [www.brjpharmacol.org](http://www.brjpharmacol.org).
- Salehi B et al. 2019, November 1. Therapeutic potential of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene: A miracle gift of nature. MDPI AG.
- Satoh K, Nakahara A, Mukunoki K, Sugiyama H, Saito H, Kamigaito M. 2014. Sustainable cycloolefin polymer from pine tree oil for optoelectronics material: living cationic polymerization of  $\beta$ -pinene and catalytic hydrogenation of high-molecular-weight hydrogenated poly( $\beta$ -pinene). *Polym. Chem.* **5**:3222–3230.
- Sayyah M, Nadjafnia L, Kamalinejad M. 2004. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* **94**:283–287.
- Semikolenov VA, Ilyna II, Simakova IL. 2001. Linalool synthesis from  $\alpha$ -pinene: kinetic peculiarities of catalytic steps. *Applied Catalysis A: General* **211**:91–107.
- Shi Y, Lenzi M, An R. 2015. Cannabis Liberalization and Adolescent Cannabis Use: A Cross-National Study in 38 Countries. *PLOS ONE* **10**:e0143562.
- Silva ACR da, Lopes PM, Azevedo MMB de, Costa DCM, Alviano CS, Alviano DS. 2012. Biological Activities of  $\alpha$ -Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. *Molecules* **17**:6305–6316.
- Simiyu DC, Jang JH, Lee OR. 2022, May 1. Understanding Cannabis sativa L.: Current Status of Propagation, Use, Legalization, and Haploid-Inducer-Mediated Genetic Engineering. MDPI.
- Sköld M, Karlberg A-T, Matura M, Börje A. 2006. The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. *Food and Chemical Toxicology* **44**:538–545.
- Strzelczyk M, Lochynska M, Chudy M. 2021. Systematics and Botanical Characteristics of Industrial Hemp Cannabis Sativa L. *Journal of Natural Fibers*:1–23. Informa UK Limited.

- Sulak D, Saneto R, Goldstein B. 2017. The current status of artisanal cannabis for the treatment of epilepsy in the United States. *Epilepsy & Behavior* **70**:328–333.
- Surendran S, Qassadi F, Surendran G, Lilley D, Heinrich M. 2021. Myrcene - What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? *Frontiers in Nutrition* **8**.
- Sybilska D, Kowalczyk J, Asztemborska M, Ochocka RJ, Lamparczyk H. 1994. Chromatographic studies of the enantiomeric composition of some therapeutic compositions applied in the treatment of liver and kidney diseases. *Journal of Chromatography A* **665**:67–73.
- Tahir MN, Shahbazi F, Rondeau-Gagné S, Trant JF. 2021. The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of Cannabis Research* **3**. Springer Science and Business Media LLC.
- Takeda S, Okajima S, Miyoshi H, Yoshida K, Okamoto Y, Okada T, Amamoto T, Watanabe K, Omiecinski CJ, Aramaki H. 2012. Cannabidiolic acid, a major cannabinoid in fiber-type cannabis, is an inhibitor of MDA-MB-231 breast cancer cell migration. *Toxicology Letters* **214**:314–319.
- Tambe Y, Tsujiuchi H, Honda G, Ikeshiro Y, Tanaka S. 1996. Gastric Cytoprotection of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Sesquiterpene,  $\beta$ -Caryophyllene. *Planta Medica* **62**:469–470.
- Taura F. 2009. Studies on tetrahydrocannabinolic acid synthase that produces the acidic precursor of tetrahydrocannabinol, the pharmacologically active cannabinoid in marijuana. *Page Drug Discov Ther*. Available from [www.ddtjournal.com](http://www.ddtjournal.com).
- ter Bogt T, Schmid H, Nic Gabhainn S, Fotiou A, Vollebergh W. 2006. Economic and cultural correlates of cannabis use among mid-adolescents in 31 countries. *Addiction* **101**:241–251.
- Thomsett MR, Moore JC, Buchard A, Stockman RA, Howdle SM. 2019. New renewably-sourced polyesters from limonene-derived monomers. *Green Chemistry* **21**:149–156.
- Van Zyl RL, Seatlholo ST, Van Vuuren SF, Viljoen AM. 2006. *Journal of Essential Oil Research*/129. Page Nature Identical Essential Oil Constituents.
- Vanhove, W., Van Damme, P., Meert, N., (2011) Factors determining yield and quality of illicit indoor cannabis (*Cannabis* spp.) production. *Forensic Science International* **212**. 158-163
- Vespermann KAC, Paulino BN, Barcelos MCS, Pessôa MG, Pastore GM, Molina G. 2017. Biotransformation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene into flavor compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**:1805–1817.
- Wang Y, Yi L, Liang Y, Li H, Yuan D, Gao H, Zeng M. 2008. Comparative analysis of essential oil components in *Pericarpium Citri Reticulatae Viride* and *Pericarpium Citri Reticulatae* by GC–MS combined with chemometric resolution method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **46**:66–74.

- Winnacker M. 2018. Pinenes: Abundant and Renewable Building Blocks for a Variety of Sustainable Polymers. *Angewandte Chemie International Edition* **57**:14362–14371.
- Wolfe PH. 2012. A Study of Factors Affecting the Extraction of Flavor When Dry Hopping Beer. *Page Food Science and Technology*.
- Yadav VK AS. 2014. Microscopical and Chemical Study of Cannabis sativa. *Journal of Forensic Research* **05**. OMICS Publishing Group.
- Yang D, Michel L, Chaumont J-P, Millet-Clerc J. 1999. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia* **148**:79–82.
- Zábranský T, Mravčík V, Gajdošíková H, Miovský M. 2001. PAD: projekt analýzy dopadů novelizace drogové legislativy v ČR. ResAd, Praha.
- Zeman P. 2007. Legislation and Practice concerning Prosecution of Drug Offenses in the Czech Republic. *Journal of Drug Issues* **37**:45–72.
- Zhou J, Tang F, Mao G, Bian R. 2004. Effect of alpha-pinene on nuclear translocation of NF-kappa B in THP-1 cells. *Acta pharmacologica Sinica* **25**:480–4.
- Zhuang S, Kittler J, Grigorenko E V, Kirby MT, Sim LJ, Hampson RE, Childers SR, Deadwyler SA. 1998. Effects of long-term exposure to  $\Delta^9$ -THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Molecular Brain Research* **62**:141–149.