

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů (FAPPZ)



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

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Pavel Rechcigl

Obor studia: Rostlinná produkce

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

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 13.04 2018 _____

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucí diplomové práce paní Ing. Adéle Fraňkové, Ph.D. a konzultantce paní Ing. Anežce Janatové za jejich ochotu, trpělivost, cenné rady a poskytnuté materiály. Dále všem kamarádům, kteří mě po celou dobu podporovali.

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

Souhrn

V posledních letech se stále více dostává do povědomí využití léčebného konopí. Bylo zjištěno, že mimo kanabinoidů (THC, CBD a ostatních...) je v rostlinách konopí obsaženo i značné množství jiných látek např. terpenů nebo flavonoidů, které jsou prospěšné pro lidský organismus.

Z rostlin konopí se pomocí extrakčních technik získávají konopné extrakty, jejichž složení, kvalita a kvantita je závislá na genotypu konopí a způsobu extrakce. Předmětem této práce je porovnání kvalitativních a kvantitativních charakteristik výsledných extraktů připravených metodou super kritické fluidní extrakce (SFE), macerace v ethanolu, extrakce butanem a dimethyletherem (DME). Obsah účinných látek v získaných extraktech byl analyzován metodou GC/FID a GC/MS.

Na základě výsledků bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžek konopného extraktu byl získán extrakcí DME (10,16g), dále extrakcí butanem (9,36g), ethanolom (7,68g) a nejnižší u SFE (0,99g).

Při porovnávání terpenického profilu u jednotlivých extrakčních metod vyšlo najevo, že jsou prokazatelné rozdíly v obsahu extrahovaných látek, přičemž nejvyšší rozdíly byly naměřeny u metody SFE, která např. v obsahu karyofylenu převyšovala ethanolový extrakt 28x, butanový 11x a DME přibližně 9x. Podobně rozdíly byly zjištěny u humulenu, germacrenu, guaiolu a eudesmolu.

Klíčová slova: medicínální konopí, macerace, ethanol, butan, dimethylether, super kritická fluidní extrakce, výnos, obsah biologicky aktivních látek, terpeny

Comparison of selected qualitative and quantitative characteristics of medicinal cannabis extracts prepared by different extraction techniques

Summary

Public awareness about the use of therapeutic cannabis is increasing during the last years. In addition to cannabinoids (THC, CBD, etc.), many other chemicals, such as terpenes and flavonoids, beneficial for human body have been found in cannabis plants.

Composition, quality and quantity of the cannabis extracts extracted from cannabis plants depend on the cannabis genotype and used method of extraction. The aim of this work is a comparison of qualitative and quantitative characteristics of extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE), maceration in ethyl alcohol, butane extraction and dimethylether (DME) extraction. Levels of active substances in obtained extracts were analyzed using by GC/FID and GC/MS method.

Results show that the highest cannabis extract yield was obtained using DME extraction (10,16g), secondly butane extraction (9,36g), ethanol extraction (7,68g) and lowest using SFE (0,99g).

Significant differences in levels of extracted chemicals were detected when comparing terpenic profiles of individual extraction methods. The biggest differences were observed in SFE method, for example level of caryophyllene was 28x higher than in ethanol extract, 11x higher than in butane extract and 9x higher than in DME extract. Similar differences were found in levels of humulene, germacrene, guaiol and eudesmol.

Keywords: medicinal hemp, maceration, ethanol, butane dimethylether, super critical fluid extraction, yield, content of biologically active substances, terpenes

Obsah

1 Obsah

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2 | Historie konopí | 5 |
| 3 | Botanická charakteristika konopí..... | 6 |
| 4 | Biologické látky v konopí..... | 6 |
| 4.1 | Kanabinoidy | 7 |
| 4.1.1 | THC (delta-9-tetrahydrocannabinol) | 8 |
| 4.1.2 | CBD (kanabidiol)..... | 9 |
| 4.1.3 | CBG..... | 10 |
| 4.1.4 | CBN..... | 11 |
| 4.1.5 | CBC..... | 11 |
| 4.2 | Terpeny..... | 12 |
| 4.2.1 | Myrcene | 12 |
| 4.2.2 | Limonen | 12 |
| 4.2.3 | β -Karyofylen..... | 13 |
| 4.2.4 | Pinen | 13 |
| 4.2.5 | Linalool..... | 14 |
| 4.2.6 | Bisabolol..... | 14 |
| 4.2.7 | Humulen..... | 14 |
| 4.2.8 | Nerolidol | 14 |
| 4.2.9 | Synergie terpenů s kanabinoidy | 15 |
| 5 | Extrakční metody | 16 |
| 5.1 | Destilace | 16 |
| 5.2 | Extrakce tuky (enfleuráž) | 17 |
| 5.3 | Lisování..... | 17 |
| 5.4 | Soxhletova extrakce | 17 |
| 5.5 | Ultrazvuková extrakce | 17 |
| 5.6 | Super kritická fluidní extrakce (SFE) | 18 |
| 5.7 | Extrakce organickými rozpouštědly..... | 18 |
| 5.7.1 | Ethanol..... | 19 |
| 5.7.2 | Butan..... | 19 |
| 5.7.3 | Dimethylether (DME)..... | 20 |
| 6 | Materiál a metodika..... | 20 |

| | | |
|------------|--|-------------------------------------|
| 6.1 | Rostlinný materiál | 20 |
| 6.1.1 | Konopný kultivar | 21 |
| 6.1.2 | Tvorba extraktů..... | 21 |
| 6.1.3 | Homogenizace | 21 |
| 6.1.4 | Příprava vzorku pro měření obsahu terpenů, pomocí GC/FID | 24 |
| 6.1.5 | Použité zařízení | 27 |
| 7 | Výsledky | 27 |
| 7.1 | Výtěžek extraktů | 27 |
| 7.2 | Obsah terpenů | 28 |
| 7.3 | Celkové zastoupení terpenů ve vzorku..... | 30 |
| 8 | Diskuze | 32 |
| 9 | Závěr | 33 |
| 10 | Seznam zkratk..... | Error! Bookmark not defined. |
| 11 | Seznam použité literatury..... | 33 |

2 Historie konopí

První zmínky o konopí pochází z doby před pěti tisíci lety z pohřebišť v Rumunsku, kde archeolog Andrew Sherrat objevil důkazy o ceremoniálním použití konopí a kadidla (Holland, 2014). Podle Hanuše (2012) se jeho využití jako přadné rostliny datuje do doby před 18 000 lety na území dnešní Moravy.

Miovský (2008) uvádí, že v Číně byly popsány léčebné vlastnosti již před 4 700 lety, v nejstarším známém soupisu farmakologických prostředků. Konopí bylo údajně doporučováno proti malárii, zácpě, revmatickým bolestem, roztržitosti a ženským poruchám.

Konopí bylo zřejmě první rostlinou v Číně pěstovanou pro vlákno, bavlna do země dorazila z Indie o tisíce let později, stejně jako středozevní len. Původně bylo konopí v Číně pěstováno pro obživu, ale zjistilo se, že je výborným materiálem pro řemeslnou výrobu (Robinson, 1996).

Do Evropy se konopí dostalo dvěma základními cestami. Robinson (1996) uvádí, že první cesta pocházela z Asie do Starého kontinentu, kam konopí proniklo přes Rusko a Řecko, přinesli jej Skytové (ve starověku tak byly označovány nomádské kočovné národy, které žily u Černého moře, podél Dunaje a na jihu Ruska). Herodotos se zmiňoval o pohřbu pořádaném Skyty, kteří využívali semena konopí k rituálům a navození euforie. Druhá cesta do Evropy vedla především přes Španělsko z Afrických zemí.

Okolo roku 200 př.n.l. pochází z Řecka první zmínky o využití konopí k technickým účelům a to o výrobě konopných prostěradel a využití konopných lan. S určitou nadsázkou se dá říci, že velké zámořské objevy a následný rozvoj lodního obchodu by se bez konopí jen těžko uskutečnil. Plachty a provazy byly vyráběny z konopí, které jako jediné odolávalo slané vodě. Anglické označení plachty canvas, pochází z arabského slova kanafas, které má svůj původ v řeckém kannabis (Robinson, 1998).

S rozmachem Římské říše bylo široce využíváno konopí především v hospodářství. Jeho technické, oděvní a lékařské využití je doloženo mnoha písemnými i hmotnými důkazy (Miovský, 2008).

3 Botanická charakteristika konopí

Holland 2014 řadí konopí společně s chmelem (*Humulus*) a břestovcem (*Celtis*) do čeledi konopovitých (*Cannabaceae*). Podle Conrada (2001) bývalo *Cannabis* zařazováno do čeledi *Urticaceae* (kopřivovité), starší klasifikace ho řadila do čeledi *Moraceae* (morušovité).

Konopí je jednoletá dvoudomá rostlina tvořící na jedné rostlině samčí a na druhé samičí květenství. Semena, vytváří dva děložní lístky dlouhé přibližně 1,7 cm. Pravé lístky se formují jako protilehlý pár vyrůstající ze stonku v pravém úhlu k děložním lístkům. Počet lístku na listu se většinou s přibývajícemi listy zvyšuje, maximální počet bývá deset až jedenáct lístků (Holland 2014), někteří autoři uvádí, že u rostliny v plném růstu jsou listy obvykle až 13četné (Miovský et al., 2008). Konopí má kulovitý kořen s postranními vlásečnicovými kořínky, které se podílejí na výživě a vývoji rostliny.

Lodyha je čtyř až šestihranná, je pokrytá drobnými chloupky a může být dutá. Většina rostlin konopí patří mezi krátkodenní, aby mohla rostlina přejít do reprodukční fáze, potřebuje dlouhé zatemnění, obvykle čtrnáct a víc hodin. Během vegetativního růst je téměř nemožné rozpoznat samčí a samičí rostliny, ačkoli samičí rostlina bývá většinou menší a později nakvétá. V průběhu reprodukční fáze se změní uspořádání listů, přičemž rostliny samčí mají méně listů, než samičí.

Samčí květenství je uskupeno v úžlabních latách na velmi dlouhých stopkách, které vyrůstají z úžlabí listů. Doba květu se pohybuje přibližně od 20 do 25 dnů, po odkvetení rostlina umírá. Samičí květenství je rozložené v horní části rostliny v několika vrstvách a utváří hustě olistěné krátké složité hrozny. Květy obsahují svrchní dvoupouzdrý semeník s jedním vysunutým vajíčkem a dvěma dlouhými nitkovitými bliznami. Rostliny samičí přecházejí do květu o 3–10 dní déle než samčí. 14–15 dnů po dozrání je pyl schopný oplodnění. Doba od opylení až do dozrání semena se pohybuje od 30 do 40 dní (Conrad, 2001).

4 Biologické látky v konopí

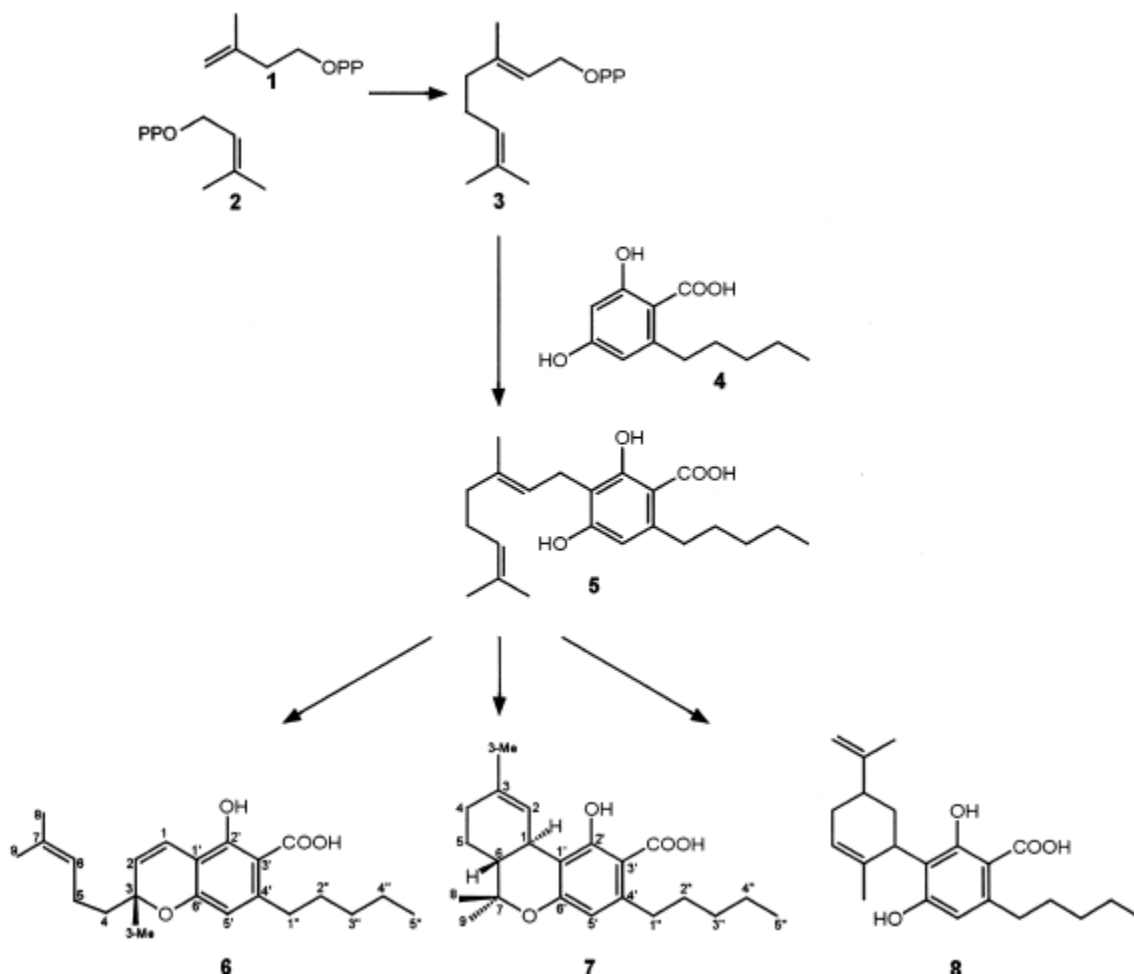
Konopí obsahuje rozsáhlou škálu biologicky aktivních látek, které zahrnují kromě primárních metabolitů, jako jsou cukry, tuky a bílkoviny i specifické sekundární metabolity. Mezi tyto sekundární metabolity patří: kanabinoidy, terpeny, flavonoidy, enzymy, aldehydy, glykoproteiny, alkoholy, jednoduché kyseliny, ketony, fenoly, mastné kyseliny a další. Jejich výzkum je předmětem mnoha odborných studií, v této práci zaměříme výhradně na kanabinoidy a terpeny.

4.1 Kanabinoidy

Kanabinoidy byly poprvé objeveny přibližně ve 40. letech 20. století. Nejedná o alkaloidy, což je v rostlinné říši psychoaktivních rostlin poměrně nezvyklé. Kanabinoidy představují skupinu sekundárních rostlinných metabolitů s charakteristickou strukturou, která nebyla doposud nalezena v jiných rostlinách. Dosud jich bylo určeno více než 100 a v rostlinách je nalezneme v podobě karboxylových kyselin, které se na aktivní formu přeměňují až postupnou oxidací v důsledku působení času a tepla. Nejznámějším kanabinoid je bezesporu Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC), který je známý především svým psychotropním působením (Flores-Sanchez, 2008).

Kanabinoidy můžeme rozdělit na endokanabinoidy nacházející se v živočišných tkáních, fyto-kanabinoidy, které jsou rostlinného původu a na látky synteticky připravené. U fyto-kanabinoidů není pravidlem, že se tvoří pouze v konopí, např. v roce 1994 byl izolován bibenzyl kanabinoid, což je látka kanabinoidní povahy získaná z mechorostu játrovky *Radula perrottetii* rostoucí na Novém Zélandu (Hanus LO, 2009).

Do základní skupiny kanabinoidů patří: delta-9-tetrahydrokanabinol (THC), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabichromen (CBC), kanbinol (CBN). Rostliny si zřejmě vytváří kanabinoidy tímto způsobem – nejprve rostlina tvoří kyselinu kanabigerolovou, z níž následně oxidací a cyklizací vznikne kyselina kanabichromenová, kyselina kanabidiolová a kyselina tetrahydrocannabinolová (obr.č.1). Vyjímkou je kyselina tetrahydrocannabinolová nevzniká obyčejnou cyklizací, ale prochází specifickou enzymatickou cestou (Holland, 2014).



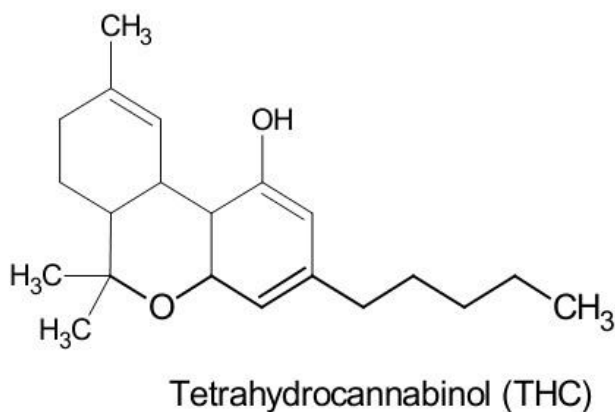
Obr.1: Vznik kyseliny kanabichromenové (6), kanabidiolové (7), tetrahydrocannabinolové (8) zdroj: Holland 2014

Kanabinoidy obsažené v konopné pryskyřici působí jako UV filtry a jejich úkolem je ochránit reprodukčně nejcennější část rostliny – květenství, dále rostlinu chrání před napadením škůdci (Andre et al., 2016).

4.1.1 THC (delta-9-tetrahydrocannabinol)

Delta-9-THC (obr.č.2) je pravděpodobně nejznámější složkou konopí, která je primárně zodpovědná za změněné stavy vědomí, které se po jeho užití projeví. V rostlině je THC obsaženo v přirozené formě jako nepсихоaktivní (neaktivní) THCA (kyselina delta-9-tetrahydrokanbinolová), a k její přímé přeměně (dekarboxylaci) na THC je třeba zahřátí na 154 °C a udržení této teploty po dobu 7 minut, při vyšších teplotách tento interval úměrně klesá (Backes, 2016). Tento proces nicméně může proběhnout také spontánně v rámci dlouhodobého skladování sušiny. THC se vyskytuje u všech druhů konopí a rostlina ho může

v závislosti na konkrétním genotypu a fenotypu obsahovat rozdílné množství: od 0,1 % až po téměř 95 % ze všech obsažených kanabinoidů. THC v některých případech představuje až 25 % váhy sušiny, což je na sekundární metabolit mimořádné množství. Řada klinických studií poukazuje na silně analgetické a protizánětlivé účinky THC, které také ulevuje od spasticity, potlačuje nevolnost a nechutenství, snižuje nitrooční tlak a má neuroprotektivní účinky (Roitman et al., 2014).



Obr. 2: Strukturní vzorec molekuly THC zdroj: <http://growmart.cz/mene-znamy-kanabinoid/>

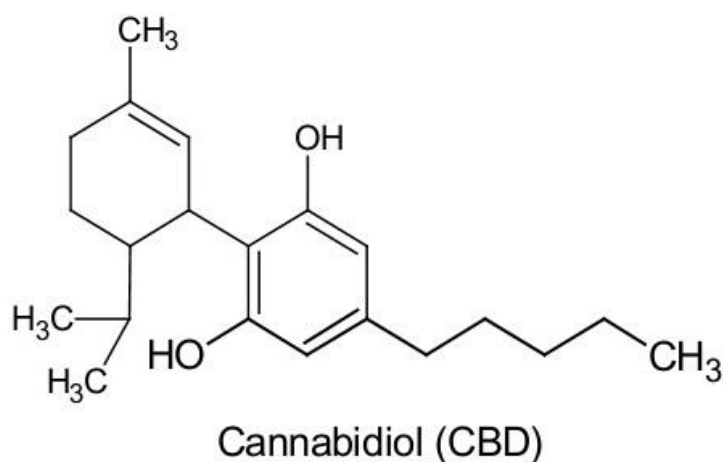
4.1.2 CBD (kanabidiol)

Kanabidiol – CBD (obr.č.3) je kanabinoid se zajímavým léčebným potenciálem, který nepůsobí psychoaktivně jako je tomu u THC (tlumí jeho povzbudivé účinky), a proto jeho využití v současnosti často diskutováno i díky možnostem jeho legálního využití v řadě zemí (Bhattacharyya, 2010). V konopí se přirozeně vyskytuje v podobě kyseliny kanabidiolové (CBDA), která je teplem přeměňována na aktivní formu CBD, k dekarboxylaci stačí teplota okolo 160 °C. Kanabidiol přirozeně vyvažuje psychoaktivní účinky THC a zdá se, že účinkuje na široké bázi jako homeostatický regulátor (Abrams, Guzman, 2015). Někteří autoři ve svých pracích popisují léčivé využití CBD jako protizánětlivé, zklidňující, antiepileptické, antipsychotické (Backes, 2016). Dále CBD zmírňuje příznaky schizofrenie, sociální fobie a úzkosti. Předmětem výzkumu je jeho cílené využití k potlačení psychoaktivních stavů vyvolaných užíváním vyšších dávek THC. CBD se vyskytuje ve vyšší míře i v některých odrůdách setého konopí s obsahem THC nižším, než 0,3 %, které je v řadě zemí včetně České republiky legální. Některé odrůdy byly cíleně šlechtěné na vysoký obsah CBD a nízký obsah THC. S postupující popularizací konopné léčby dochází v posledních letech k rozmachu trhu

s produkty obsahujícími CBD, které je extrahované z těchto odrůd a ředěné nejčastěji v konopném oleji. Mezi veřejností je o ně velký zájem a ceny jsou proto často velmi vysoké (Leweke, 2012). Jeden z produktů je např. 6% CBD olej vyráběný firmou Carun (obr.č 2), k jehož výrobě se využívají rostliny konopí pěstované v CHKO bez využívání pesticidů (<https://www.carun.cz/konopne-potraviny/konopny-olej-6-cbd-28>).



Obr. 3 Konopný olej 6% zdroj: <https://www.carun.cz/konopne-potraviny/konopny-olej-6-cbd-28>)

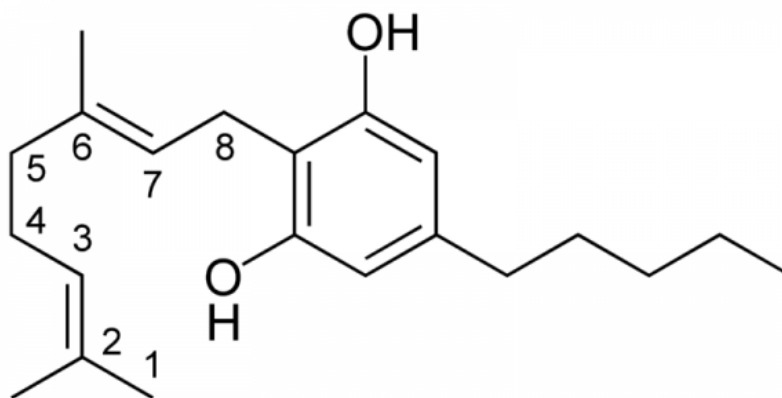


Obr. 4 Strukturní vzorec molekuly CBD zdroj: <http://growmart.cz/mene-znamy-kanabinoid/>

4.1.3 CBG

Kanabigerol – CBG (obr.č.4) je hned po THC a CBD třetím nejzastoupenějším kanabinoidem v konopí, patří mezi nepsychoaktivní kanabinoidy a nachází se převážně v odrůdách technického konopí, jejichž obsah THC je velmi nízký. CBG vzniká důsledkem působení

tepla na kyselinu kanabigerolovou (CBGA), která přichází o svou karboxylovou skupinu a přeměňuje se na kanabigerol. CBGA je také prekurzorem CBC, CBD a THC, protože se za pomoci určitých enzymů přeměňuje v rostlině též na THCA, CBDA a CBCA (Valdeolivas, 2015).



Obr. 5: Strukturní vzorec molekuly CBG zdroj: <http://www.cannapedia.cz/cs/rozdeleni/cbg>

4.1.4 CBN

CBN nevzniká narozdíl od většiny ostatních kanabinoidů dekarboxylací jeho kyselinové formy. Obsah, který nalezneme v rostlinách konopí bývá většinou výsledkem degradace THC, ke kterému dochází např. špatným skladováním, při kterém je THC znehodnocováno působením kyslíku. Kanabinol je slabě psychoaktivní a má sedativní účinky. Dále působí antibakteriálně, snižuje nitrooní tlak, působí jako analgetikum a podporuje růst kostí (Russo, 2011).

4.1.5 CBC

Kanabinoid CBC (kanabichromen) je jedním z nejvíce zastoupených kanabinoidů v rostlinách konopí. Jeho prekurzorem je kyselina kanabichromenová (CBCA). Dostupné výzkumy ukazují, že tento kanabinoid je nepsychoaktivní a mohl by mít silné analgetické, antibakteriální a protizánětlivé účinky. Některé studie ukazují, že by CBC spolu s THC a CBD mohlo mít silné antidepresivní účinky. Nejnovější studie také ukazují, že CBC stimuluje růst mozkových buněk (tzv. neurogeneze).

CBC nemá léčivé účinky jen samo o sobě, ale ukazuje se, že působí synergicky s ostatními kanabinoidy. Jednou z nejslibnějších vlastností tohoto kanabinoиду, je zejména jeho antiproliferační vlastnost - dokáže ovlivňovat růst nádorů v těle (DeLong, 2010).

4.2 Terpeny

Terpeny jsou látky, které tvoří rozsáhlou skupinu rostlinných látek, jejichž biosyntéza vychází z acetyl – CoA. Systetizují se acetát mevalonátovou cestou. Terpeny mají cyklickou nebo alifatickou strukturu. Jedná se o kyslíkaté, nebo bezkyslíkaté látky – alkoholy, aldehydy, ketony, étery, oxidy a karbonové kyseliny. Terpeny lze pokládat za polymery izoprénů. Podle počtu isoprénových jednotek, kterými jsou vytvářeny, dělíme do sedmi skupin: monoterpeny, hemiterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny, sekviterpeny a polyterpeny (Nováček 2009). Terpeny jsou těkavé a vytváří výrazný specifický zápach rostliny (Peč et Dušek, 2009). Dosud bylo v konopí popsáno více než 100 různých terpenů s převahou monoterpenů a seskviterpenů (Casano et al., 2011).

Mezi nejběžnější druhy terpenů nalezených v konopí patří: α -pinen, linalool, β -karyofylen, myrcen, bisabolol, humulen a limonen, které budou dále popsány.

4.2.1 Myrcene

Myrcen je nečastěji se vyskytující terpen, v konopných silicích některých odrůd může být zastoupen až ze 60%. Můžeme ho nalézt i v rostlinách chmele. Svou vůní připomíná křen. Myrcen je silné analgetikum, antibiotikum a působí protizánětlivě. Blokuje působení cytochromu, aflatoxinu B a dalších pro – mutagenních karcinogenů. Dále má uklidňující, relaxační a sedativní účinky. Synergickým působením s THC zvyšuje myrcen svůj psychoaktivní účinek. Bylo prokázáno, že smrtelná dávka u potkanů odpovídá 5 g na 1kg váhy, u člověka nebyla toxicita prokázána (Rufino et al., 2015). Další studie prokázala, že dávka v rozmezí 20-40 mg na kg váhy dokázala potlačit bolest u potkanů (Canná 2018).

4.2.2 Limonen

Limonen je druhý nejrozšířenější terpen v přírodě. Běžně se vyskytuje v citrónu a ostatních citrusech (Noma a Asakawa, 2010). Působí antimikrobiálně, má anti fungální a proti rakovinotvorné účinky. Zabraňuje odbourávání genu RAS, což je jeden z faktorů přispívající k tvorbě nádorů. Dále chrání před aspergilem a karcinogeny přítomnými v kouři. Limonen rychle a snadno proniká do hematoencefalitické bariery, což zvyšuje systolický tlak.

V některých případech používá ve formě spreje k léčení úzkosti a deprese. Mezi jeho další účinky patří stimulace imunitního systému a snížení bolesti při pálení žáhy (Peč et Dušek, 2009). Používá se jako příchut' v nealkoholických nápojích a cukroví a jako vonná látka v čisticích prostředcích a parfémeh (Jongedijk et al., 2016).

4.2.3 β -Karyofylen

β -karyofylen komunikuje s endokanabinoidním systémem, kde aktivuje výhradně kanabinoidní receptor CB₂ (Rozmístění receptorů CB₂ je omezeno převážně na buňky imunitního systému, jako jsou neutrofily, makrofágy, B-lymfocyty, monocyty, T-lymfocyty a mikroglie) a nevykazuje žádnou afinitu k receptoru CB₁. (CB₁ receptory se nachází v největší míře v mozku a nejvíce se projevují v bazálních gangliích hipokampu, mozkové kůře a v mozečku.) Z toho vyplývá, že β -karyofylen, který neaktivuje CB₁ receptor nemá psychoaktivní účinky (Russo, 2011). β -karyofylen se nachází mimo konopí v hřebíčku, bazalce, černém pepři, skořici a ve velmi malém množství i v levanduli. Vůni připomíná černý pepř nebo dřevo. V lékařství se osvědčil při léčbě některých druhů rakoviny. Dále působí protizánětlivé, má antibiotické a anestetické účinky, pomáhá při chronických bolestech a využívá se i jako prostředek proti nefrotoxicitě způsobované léky, které se používají při chemoterapii (Gertsch, 2008).

4.2.4 Pinen

Pinen patří mezi bicyklické monoterpeny, jehož vůně připomíná jedli či borovici. V přírodě existují dva strukturální izomery pinenu: α -pinen a β -pinen. Obě formy tvoří v přírodě velmi důležitou součást pryskyřice. α -pinene je jeden z nejčastějších terpenů vyskytujících se v přírodě a kromě rostlin konopí se nachází převážně v jehličnanech, ale i některých citrusech. Tento terpen má tendenci reagovat s dalšími chemickými látkami a vytvářet tak nové látky jako jsou další terpeny např. limonen. V lékařství se využívá díky jeho protizánětlivým vlastnostem, jako antiseptikum, ale také pro zvýšení bronchiální sekrece, což podporuje snazší vykašlávání hlenů, napomáhá ke zlepšení krátkodobé paměti, čehož by se mohlo využít při intoxikaci THC, která způsobuje zhoršování paměti (Perry, 2000). α -pinene můžeme najít ve vyšších koncentracích v oleji z jehličí, který měl slibné výsledky jako podpora léčby rakoviny a po dlouhé roky se používal i v tradiční Čínské medicíně. Vědci se také domnívají, že stejně jako CBD dokáže oslabovat psychoaktivní účinky THC (Turkez, 2013).

4.2.5 Linalool

Odrůdy konopí bohaté na tento terpen s připomínající vůní levandule mívají uklidňující a relaxační účinky. Linalool se po staletí používal při léčbě nespavosti, navíc se předpokládá, že snižuje pocity úzkosti, které mohou být způsobeny užíváním THC. Díky těmto vlastnostem může být vhodné jeho využití při léčbě psychóz a úzkostí. Linalool posiluje imunitní systém, výrazně snižuje záněty plic a pomáhá při navrácení kognitivních funkcí např. u Alzheimerovy choroby. Linalool se legálně využívá jako pesticid, dále jako vonná složka do jídel, kosmetiky, parfémů a dalších přípravků. Výpary při odpařování fungují jako účinný prostředek proti odpuzování hmyzu. V různých koncentracích je k nalezení také v některých citrusech, břize ale i různých druzích hub (Ying Gu, 2009).

4.2.6 Bisabolol

Bisabolol, také známý jako levomenol se nachází kromě konopí také v květech heřmánku, nebo v brazilském stromě Candia. Bisabolol je hojně využíván v kosmetickém průmyslu. V nedávné době si získal tento terpen i zájem lékařů, protože bylo zjištěno, že působí protizánětlivě, antioxidačně, antimikrobiálně a antimikrobiálně. (Brehm-Stecher, 2003)

4.2.7 Humulen

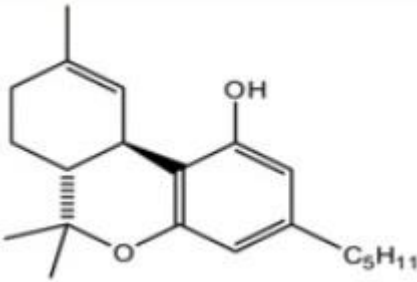
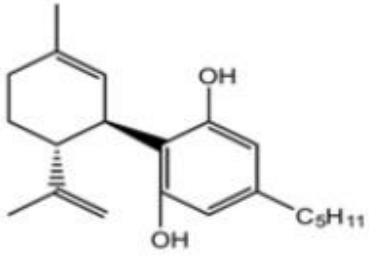
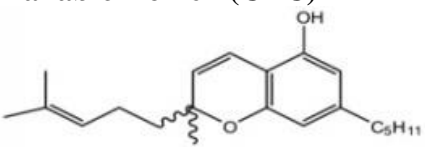
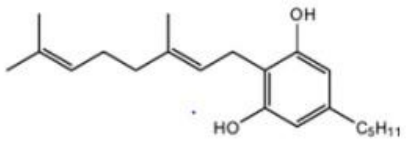
Humulen přispívá k chmelovému aroma konopí, má antibakteriální, analgetické, antiproliferativní, protizánětlivé a anorektické účinky. Tento terpen se vyskytuje také v chmelu otáčivém. Podílí se na složení lupulínu, což je látka, která je získávána ze žláz na chmelu, zároveň má desinfekční účinky, především zabíjí kvasinky (Giese et. al., 2015).

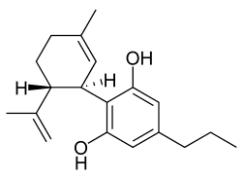
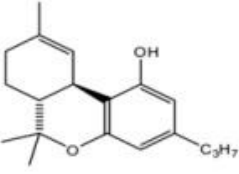
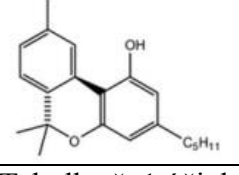
4.2.8 Nerolidol

Nerolidol, také známý jako peruviol, je přirozeně se vyskytující sesquiterpen nalezený v esenciálních olejích mnoha druhů rostlin a květin. Mimo konopí je přítomen např. v zázvoru, jasmínu, levanduly, tea tree a citronové trávě. Aroma nerolidolu připomíná čerstvou kůru. Používá se jako aromatický prostředek a v parfumerii. V současné době je také testován jako prostředek pro zvýšení průniku kůže pro transdermální podání terapeutických léků. Nerolidol má antioxidační, antifungální, protirakovinné a antimikrobiální účinky. Vzhledem k své hydrofobní povaze je nerolidol snadno propustný přes plazmatickou membránu a může interagovat s intracelulárními proteiny (Weng-Keong, 2016).

4.2.9 Synergie terpenů s kanabinoidy

Kanabinoidy v synergii s terpeny vykazují celou řadu léčivých účinků. Nejvíce však s nimi interaguje THC a CBD. V tab.č.1. je uveden synergismus terpenů a nejznámějších kanabinoidů (Russo, 2011).

| Kanabinoid | Účinky | Synergický terpen |
|---|---|--------------------------|
| Tetrahydrokanabinol (THC)  | analgetický | různé |
| | antioxidační, protizánětlivý | limonen |
| | bronchodilatační | pinen |
| | zmírnění Alzheimerovy choroby | linalool, limonen, pinen |
| | pomoc při duodenálních vředech | limonen, karyofylen |
| | uvolňuje svalstvo | linalool |
| | Zmírňující svědění | karyofylen |
| Kanabidiol (CBD)  | Antioxidační, protizánětlivý | limonen |
| | protiúzkostlivý | limonen, linalool |
| | Zmírňující křeče | limonen |
| | cytotoxický proti rakovinným buňkám prsu | linalool |
| | účinný proti Staphylococcus aureus, rezistentnímu vůči methycilinu (MRSA) | pinen |
| | snižuje tvorbu kožního mazu | limonen, linalool, pinen |
| | účinný při léčbě závislosti | karyofylen |
| Kanabichromen (CBC)  | analgetický protizánětlivý, | různé |
| | protiplísňový | karyofylen |
| | Antidepresivní (prokázáno u hlodavců) | limonene |
| Kanabigerol (CBG)  | protiplísňový | karyofylen |
| | Antidepresivní (prokázáno u hlodavců) | limonen |
| | antagonista serotoninu | limonen |
| | analgetický | různé |
| | účinný proti Staphylococcus aureus, rezistentnímu vůči methycilinu (MRSA) | pinen |

| | | |
|--|---|------------|
| | protizánětlivý | karyofylen |
| Kanabidivarin  | Snižuje funkci hipokampu | linaloon |
| Tetrahydrokanabiverin (THCV)  | l léčba metabolických poruch | - |
| | působí proti křečím | linalool |
| Kanabinol (CBN)  | sedativní | myrcen |
| | účinný proti Staphylococcus aureus, rezistentnímu vůči methycilinu (MRSA) | pinen |

Tabulka č. 1 účinky kanabinoidů v synergii s terpeny (Russo, 2011).

5 Extrakční metody

Pro extrakci aktivních rostlinných látek je k dispozici široká škála technologií. Volba závisí na ekonomické proveditelnosti a vhodnosti pro danou situaci. V současné době probíhá mnoho studií, které se zaměřují na jednotlivé extrakční metody. Nejčastěji se pro přípravu extraktů využívají následující metody. Zde si uvedeme některé z nich: destilace, lisování, extrakce tuky (enfleuráž), extrakce organickými rozpouštědly, extrakce v soxhletově extraktor, super kritická fluidní extrakce, extrakce kapalina – kapalina extrakce na tuhé fázi, ultrazvuková extrakce a další... Předmětem této práce je extrakce butanem, DME, ethanolem a super kritická fluidní extrakce, proto se zaměříme výhradně na ně.

5.1 Destilace

Destilace je separační metoda, umožňující oddělení kapalných látek s rozdílnými body varu. Jedná-li se o roztok dvou kapalin a každá z nich má odlišný bod varu, bude se při zahřívání roztoku vypařovat mnohem více látky s nižším bodem varu. Vznikající pára odchází do chladiče, kde následně kondenzuje. Tato metoda se v průmyslu uplatňuje nejčastěji při zpracování ropy, v potravinářství při výrobě destilátů a dále v organické a analytické chemii (Sundmacher, 2006).

5.2 Extrakce tuky (enfleuráž)

Tato metoda patří k nejstarším způsobům získávání vonných látek. Jedná se o metodu, během které jsou rostliny, nebo jejich části, kladeny do studeného oleje či tuku tak, aby po určité době došlo k uvolnění účinných látek. Později se extrakce zdokonalila v tzv. anfleráž, při níž se na natažené plátno nebo sklo rozetřela vrstva tuku a na něj se následně rozprostřely v jedné vrstvě např. květy (Wilson, 1995).

5.3 Lisování

Lisování je způsob získávání oleje z rostlinných pletiv metodou mechanického vytlačování. Nejstarší jsou lisy klínové a vřetenové. V současné době se využívají lisy hydraulické a šnekové, jejichž funkční podstata je zachována. Lisování může probíhat za tepla a za studena. Lisování za studena je považováno za nejstarší a nejšetrnější způsob získávání rostlinných olejů (Brát, 2014).

5.4 Soxhletova extrakce

Soxhletova extrakce byla vyvinuta von Soxhletem v roce 1879 a je považována za standardní extrakční metodu pro získání účinných látek z různých rostlinných zdrojů. Její značnou nevýhodou je pracnost, časová náročnost a velká spotřeba organických rozpouštědel. Vzhledem k tomu, že je tento proces velmi pomalý, dochází běžně k degradaci cílených látek. Ve většině případů se jako rozpouštědlo využívá vodný metanol, acetonitril nebo směs hexan-aceton (Bimark, 2012).

5.5 Ultrazvuková extrakce

Svou oblíbenost získala díky své jednoduchosti, nízkým pořizovacím nákladům a rychlosti v porovnání s jinými metodami jako je SFE (super kritická fluidní extrakce) a MAE (extrakce mikrovlnným zářením). Vzorek se v ultrazvukové lázni intenzivně pohybuje, a tím dochází k rozpadu shluků částic, přičemž tepelný rozklad je redukován. Zvýšená účinnost ultrazvukové extrakce je vysvětlována snížením velikosti částic, narušením buněčných stěn a zvýšením účinnosti přenosu hmoty buněčného obsahu při tvorbě a zániku kavitačních dutin (Bimark, 2012).

Ultrazvuk usnadňuje hydrataci a bobtnání rostlinných materiálů, což způsobuje rozšíření pórů buněčné stěny. To zvyšuje rychlost přenosu hmoty, a může dojít i k narušení buněčných stěn, což má za následek zvýšenou účinnost extrakce a nižší extrakční čas.

Některé rostlinné buňky jsou součástí žláz zaplněných esenciálním olejem. Vnější žlázy jsou charakterizovány velmi tenkým povrchem, který je možné ultrazvukem lehce rozrušit. Tím dojde k uvolnění esenciálního oleje do extrakčního rozpouštědla (Carmen, 2002).

5.6 Super kritická fluidní extrakce (SFE)

SFE je technologie získávání chuťových a vonných látek využívající způsob extrakce kapalinami v superkritickém stavu (nejčastěji se využívá CO₂, dále N₂O, methanol, propan, toluen, nebo amoniak). V případě použití CO₂ probíhá extrakce zkapalněným plynem za podmínek nad kritickým tlakem a teplotou (7,38 MPa a 31°C). CO₂ v nadkritickém stavu je nepolární rozpouštědlo a využívá se k extrakci nepolárních látek. Nadkritickým stavem rozumíme stav hmoty, kdy její tlak a teplota jsou vyšší, než odpovídající kritické hodnoty. V tomto stavu není možné rozlišit plyn od kapaliny, a proto se využívá termín tekutina (Machmudach, 2006). Nevýhodou extrakce oxidem uhličitým je jeho nízká polarita – s narůstající polaritou analytu, klesá jeho rozpustnost. Tento problém je řešen malým přídatkem polární organické látky (modifikátorem) do proudu nadkritického CO₂. Mezi běžně využívané modifikátory patří – methanol, ethanol, kyselina mravenčí, nebo octová, toluen, acetonitril, hexan, voda, nebo sirouhlík. Velkou výhodou SFE je, že díky snadnému odpaření rozpouštědla nehrozí rezidua, jako při extrakcích organickými látkami. Tato technologie je výhodná i při nanášení chuťových a vonných látek na různé nosiče – na trhu jsou k dispozici přípravky nepolárních látek zakotvených na polysacharidivčkových nosičích, které jsou lehce dispergelovatelné ve vodě a lze je snadno dávkovat - extrakty koření, silice, nebo v tucích nerozpustná barviva (Mchugh, 2013). SFE je využívána na extrakci léčivých a aromatických látek, např. oleoresin z rostlin *Calendula officinalis*, *Matricaria chamomilla*, *Piper nigrum* (Campos, 2005), karotenoidy ze *Solanum Lycopersicum* (Vagi, 2007), nebo Taxol ze stromu *Taxus brevifolia* (Jennings, 1992).

5.7 Extrakce organickými rozpouštědly

Jedná se o nejčastěji používané způsoby extrakce. Rozpouštědla jsou látky, se kterými se setkáváme v laboratořích, ale i v běžném životě. Nejzákladnějším rozpouštědlem je voda, a pokud je v ní rozpuštěná nějaká látka, mluvíme o vodném roztoku. Mezi další rozpouštědla patří např. benzín, aceton, ethanol, butan, DME a další... Každé rozpouštědlo má jiné vlastnosti, díky kterým může rozpouštět určité látky. Nejdůležitější vlastností ovlivňující rozpustnost, je podobnost polarit rozpouštědla a rozpouštěné látky - čím je podobnost polarit

větší, tím se látka snáz rozpouští. Rozpouštědla se proto dělí na polární a nepolární (Webchemie, 2018).

Nepolární rozpouštědla obsahují vazby mezi atomy s podobnými hodnotami elektronegativity, např. vodík a uhlík. Atomy takového typu sdílí společný elektronový pár rovnocenně a nevzniká mezi nimi žádný náboj – jsou tedy nepolární. (např. pentan, hexan, cyklohexan, benzen, toluen, chloroform).

Polární rozpouštědla mají částečný náboj - obsahují vazby mezi atomy s rozdílnou hodnotou elektronegativity (např. kyslík a vodík). Vazba mezi těmito atomy je silně polarizovaná - elektronegativnější kyslík více přitahuje společný vazebný pár od elektropozitivního vodíku. Důsledkem toho vzniká na kyslíku částečný záporný náboj, zatímco vodík získává částečný kladný náboj. (Master organic chemistry, 2018). Při přípravě rostlinných extraktů se nejčastěji používají methanol, ethanol, aceton, hexan, butan, nebo destilovaná voda.

5.7.1 Ethanol

Ethanol je bezbarvá kapalina mírného lihového zápachu. Je snadno zápalný a je proto klasifikován jako hořlavina 1. třídy. Ethanol je špatně rozpustný v nepolárních rozpouštědlech, naopak s polárními rozpouštědly (např. s vodou) se většinou mísí neomezeně. Bezvodý ethanol rozpouští přírodní a některé fenolové pryskyřice, estery, ethery celulosy atd. Ve směsích s benzenovými rozpouštědly rozpouští výborně alkydové pryskyřice, kumaronové pryskyřice a deriváty celulosy (Grimmer, 1956).

Ethanol se nejvíce používá při výrobě alkoholických nápojů, dále v lékařství a kosmetice (Šedivec, 1968). Velmi často je také využíváný k extrakcím léčivých látek např. silic z *Salvia officinalis* (Durlink, 2007), flavonoidů z listů *Moringa oleifera* (Sultana, 2009), nebo polyfenolů z *Sargassum pallidum* (YE 2009). Otrava ethanolem se nejčastěji stává při nadměrném požití alkoholických nápojů. Projevuje se útlumem centrálního nervového systému různého stupně od únavy až kóma u těžkých otrav. Letální dávka u dospělého člověka se pohybuje v rozmezí 5 – 6 ml etanolu/kg. U dětí do 10 let v případě požití více než 0,4 ml/kg čistého etanolu je nutná hospitalizace v nemocnici (Tis, 2018).

5.7.2 Butan

Butan má jako rozpouštědlo dvě významné vlastnosti – bod varu je při teplotě – 0,6°C, což znamená, že se při pokojových teplotách vypařuje a dále že při styku se sušeným konopím rozpouští výhradně psychotropní pryskyřici. Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o

hořlavinu, jsou během jeho výroby využívány předměty, které nemohou zapříčinit vznícení plynu (např. plasty). Stejně tak je snahou výrobců zamezit inhalaci výparů během manipulace a zasažení očí (Miovský, 2008). Butan je dále využíván při extrakcích přírodních látek např. oleje ze semen *Carapa guianensis* (Novello, 2015), nebo kanabinoidů z rostlin konopí (Varlet 2016).

Butan je asfyxant (látka způsobující narkózu) a jeho toxické účinky jsou dány vytlačováním kyslíku.

Inhalace butanu může způsobit ospalost, euforii, narkózu, srdeční aritmii asfyxii a omrzliny (Inchem, 2018).

5.7.3 Dimethylether (DME)

DME je bezbarvý plyn a nejjednodušší ether. Využívá se jako nízkoteplotní rozpouštědlo a extrakční činidlo, použitelné pro specializované laboratorní procedury. Jeho využití je omezeno nízkou teplotou varu (-23°C), nicméně tato vlastnost se žádoucí pro jeho snadné odstranění z reakčních směsí. Dále se využívá jako hnací plyn ve sprejích a jako prekurzor výroby dimethylsulfátu. DME je slibným palivem pro spalovací motory s šetrnějšími dopady na životní prostředí (Troy, 2006). Rozpouštědlo je využíváno také v potravinářském průmyslu, protože není toxické a ani karcinogenní. Firma Dexso uvádí, že DME obsahuje pouze 0,01% nečistot a na rozdíl od butanu neobsahuje žádné pachové příměsi a je méně vznětlivý (Roots 2018). Extrakční schopnost DME je mnohem vyšší než butanu, proto tato metoda dosahuje i vyššího výnosu konečného extraktu (Hempyreum, 2018).

6 Materiál a metodika

6.1 Rostlinný materiál

Rostliny konopí byly pěstovány na pracovišti pro výzkum léčebného konopí MCLOVE. Sklizené rostliny byly převezeny do laboratoří ČZU, kde byly následně zpracovány a využity pro výzkum.

6.1.1 Konopný kultivar

Pro tvorbu extraktů byl zvolen nově vyšlechtěný kultivar MCLOVE s obsahem THC v rozmezí 15-19% a obsahem CBD do 1%.

6.1.2 Příprava extraktů

Ze získaného sušeného květenství byly pomocí čtyř extrakčních metod a čtyř různých druhů rozpouštědel připraveny extrakty. První metodou byla macerace, při které bylo využito 96% lékařského lihu. Druhá a třetí metoda proběhla ve stejném extraktoru firmy Dexso s rozdílným rozpouštědly, nejprve proběhla extrakce butanen a následně dimethyletherem (DME). Poslední využitou metodou byla super kritická fluidní extrakce (SFE), kde jako rozpouštědlo sloužit zkapalněný nosný plyn – CO₂. U extraktů byla hodnocena výtěžnost a zastoupení jednotlivých terpenů. Pokusy proběhly ve třech opakováních s výjimkou SFE, která byla provedena dvakrát.

6.1.3 Homogenizace

Část sušeného květenství byla odlistěno a rozemleto elektrickým mlýnkem (Valentino – koncept KM-5001) na homogenní směs, která byla následně využita při maceraci.

Extrační metoda č. 1 - Macerace

Ethanolový extrakt byl připraven z homogenizovaného květenství uvedených odrůd v poměru 1: 7. U tohoto typu extrakce byl využit 96% lékařský líh (Lach-Ner,CZ) ve kterém se po dobu 14 dnů materiál maceroval. Po uplynutí dané doby byl extrakt přefiltrován pomocí vakuové filtrace (obr.č.5) a následně odpařen v na vakuové odparce Heidolph 4000, DE (obr.č.6) při teplotě 39°C a rychlosti rotace v rozmezí 150 – 200 otáček za minutu (RPS).



Obr. 6: Vakuová filtrace



Obr. 7: Heidolph 4000, DE

Extrační metoda č. 2 a 3 - Butan/ Dimethylether (DME)

K tvorbě extraktu byl využit Dexso Oil extraktor (obr.č.7). Prázdná kolona byla naplněna nehomogenizovaným květenstvím o hmotnosti 35g. Do extraktoru se vpustil butan ze zásobních lahví firmy Rsonic (1x 1l lahev). extrakt byl spolu s butanem jímán do teflonového papíru, butan se následně nechal samovolně odpařit v digestoři. Stejným způsobem byla provedena extrakce dimethyletherem v 99,9% čistotě (2x – 0,5l lahev Dexso – obr. 8).



Obr. 8: Dexso Oil extraktor, zdroj: <http://www.bloomshop.nl>



Obr. 9 Dexso lahev dimethyletheru, zdroj: <https://www.growgarden.cz/extraktory-oleje/2343-dimethylether-dexso-organic-degreaser-hnaci-plyn-ve-speji-500ml.html>

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

Na tento typ extrakce byl využit přístroj SuperC tabletop CO₂ extractor (obr.9) (OCO labs.USA). Nejprve se do prázdné kolony (z jedné strany uzavřené) nasypalo několik skleněných kuliček, které rozptýlí vpuštěný CO₂. Následně se před ně vložila vata, která zabránila kontaktu mezi materiálem a kuličkami. Po naplnění kolony homogenizovaným květenstvím, se kolona uzavřela a byl vpuštěn CO₂ z tlakové bomby. Během prvních 10 minut probíhalo tlakování na 50 bar – CO₂ prostoupí materiálem a naváže extrahované látky. Po uplynulé době se zvýšil tlak na 130 bar při teplotě 43°C a otevřel se výstup. Oxid uhličitý se na výstupu z přístroje odpaří a zbyde pouze vyextrahovaná čistá látka. Samotná extrakce trvá přibližně 45 minut.



Obr. 10 Přístroj SuperC, zdroj: <https://greenrushdaily.com>)

6.1.4 Příprava vzorku pro měření obsahu terpenů, THC a CBD pomocí GC/FID

Nejprve bylo do 20 ml zkumavky naváženo 25 mg extraktu, ke kterému bylo následně přidáno 10 ml tribenzylaminu (TBA, Sigma Aldrich, CZ). Takto připravený vzorek byl na 15 min vložen do ultrazvukové lázně (Bandelin sonorex digitech, DEU) (obr. č.10). 0,5 ml vyextrahovaného vzorku bylo převedeno do 2 ml GC krimpovací mikrozkušavky (vialky). Vialky byly umístěny na topnou jednotku, kde došlo k odpaření rozpouštědla a současně k dekarboxylaci. Následně bylo do vialky napipetováno 1,5 ml etanolu. Obsah THC a CBD byl stanoven na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem GC/FID (Agilent Technologies 6890N, USA) (obr.č.12). Identifikace jednotlivých terpenů proběhla na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem GC/FID (Agilent Technologies 7890A, USA) (obr.č. 13).

6.1.5 Příprava vzorku pro měření obsahu terpenů pomocí GC/FID a GC/QTOF

Do mikrozkušavek bylo odváženo 4 -7 mg extraktů, ty byly následně naředěny methanolem (Sigma Aldrich, CZ) na výslednou koncentraci 5 mg/ml, která byla analyzována pomocí GC/FID a GC/qTOFs. Methanol obsahoval interní standard – 2 decanol (Sigma Aldrich, CZ) v koncentraci 0,01 % (w/v). Každý extrakt byl připraven ve třech opakováních. Pro identifikaci byly terpeny změřeny pomocí GC/QTOF (Agilent technologies, USA) (obr. 13). Identifikace jednotlivých terpenů byla provedena na základě porovnání retenčních časů a hmotnostních spekter terpenů s dostupnými standardy a dále na základě porovnání s databází NIST a Kovatsových indexů.

Pro stanovení relativního zastoupení jednotlivých terpenů ve vzorku byly vzorky změřeny pomocí GC/FID. Podmínky analýzy byly v obou případech stejné.



Obr. 11 Bandelin sonorex digitech



Obr. č. 12 Agilent Technologies 6890N



Obr. 13 Agilent technologies 7890A

6.1.6 Použité zařízení

| | |
|-------------------|--|
| Kolona | 15 m x 0.25 mm, 0.25 µm |
| Mobilní fáze | 5% Difenyl – 95% Dimethylpolysiloxane |
| Nosný plyn | dusík, 1.1 ml/min, konstantní tok |
| Režim nástřiku | Split 280°C |
| Dělicí poměr | 20:1 |
| Teplotní program | 2 min při 200 °C, 10 °C/min 200-240 °C, 2 min při 240 °C |
| Teplota Detektoru | 300 °C |
| Nástřik | 1.5 µl |

Tabulka č. 2 Podmínky analýzy Agilent Technologies 6890N

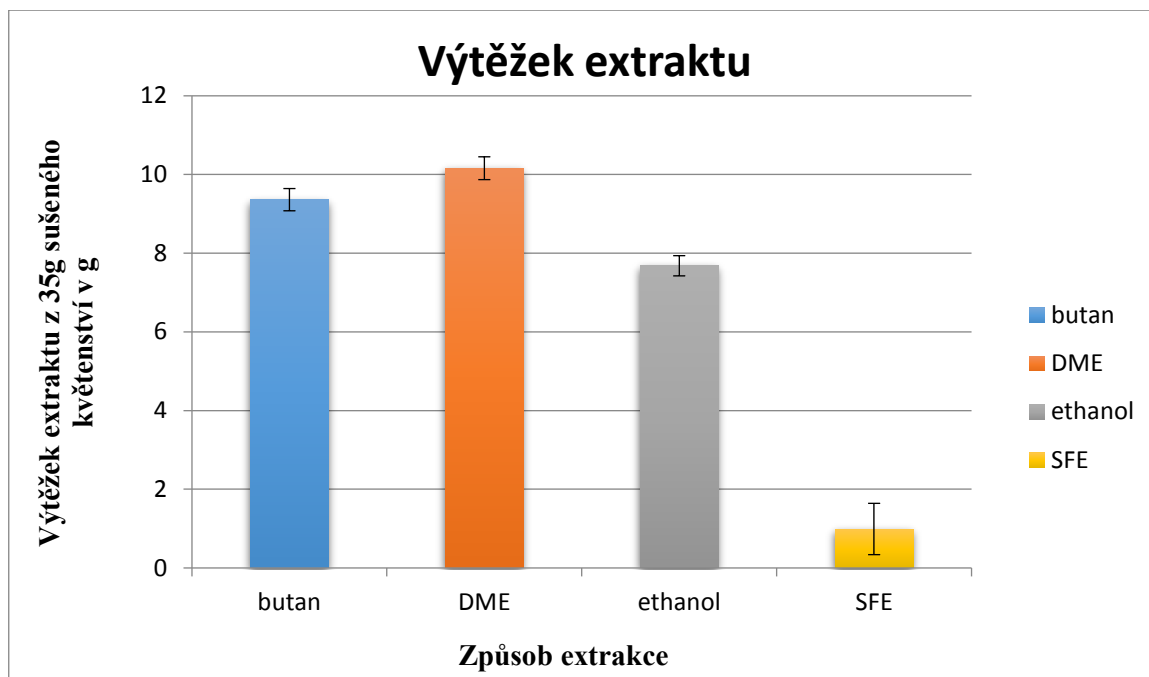
| | |
|-------------------|---|
| Kolona DB5 | 30 m x 0.25 mm, 0.25 µm 5% Difenyl – 95% Dimethylpolysiloxane |
| Nosný plyn | dusík, 1.0 ml/min, konstantní tok |
| Režim nástřiku | Split 230°C |
| Dělicí poměr | 10:1 |
| Teplotní program | Zahřívání 60°C, zvyšování teploty 3,5°C/ min na 150°C, poté na 30°C/min na 300°C po dobu 10 min |
| Teplota Detektoru | 300 °C |
| Nástřik | 1.5 µl |

Tabulka č. 2 podmínky analýzy Agilent technologies 7890A

7 Výsledky

7.1 Výtěžek extraktů

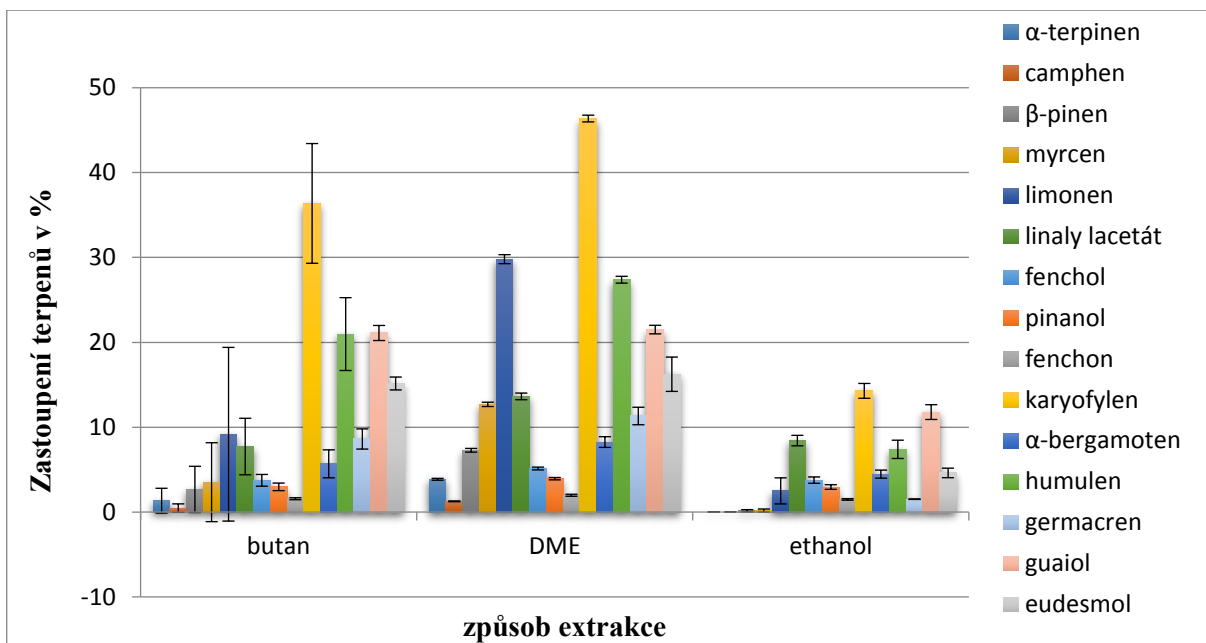
V následujícím grafu je znázorněna průměrná výtěžnost konopného extraktu získaného čtyřmi na sobě nezávislými způsoby extrakce. Z výsledku je patrné, že nejvyšší výtěžnost byla dosažena extrakcí dimethyleterem (10,16g), dále extrakcí butanem (9,36g), ethanolem (7,68g) a nejnižší výtěžek byl zjištěn u super kritické fluidní extrakce (0,99g).



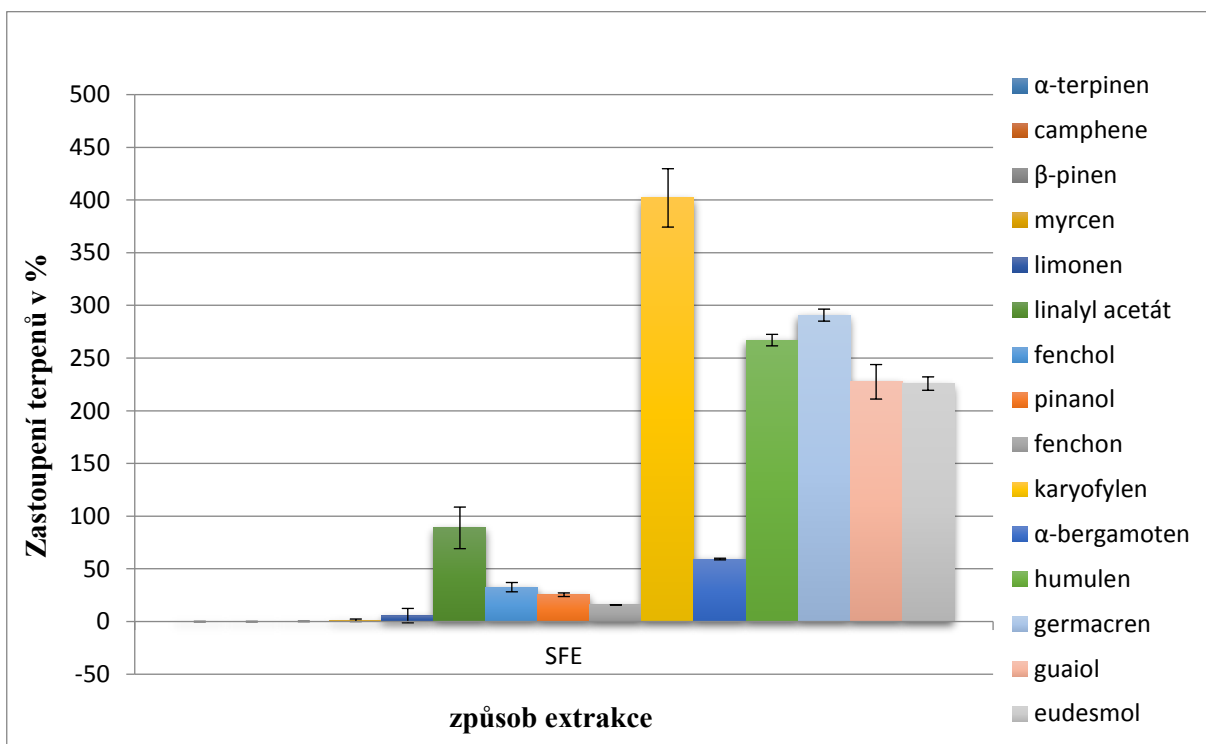
Graf 1. Výtěžnost konopného extraktu. Použité zkratky v grafu: SFE – super kritická fluidní extrakce, DME – dimethylether, THC – Tetrahydrocannabinol, CBD – kanabidiol. Úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku.

7.2 Obsah terpenů

Graf 2 a 3 znázorňuje průměrné zastoupení sledovaných terpenů v procentech vůči stanovenému internímu standardu, který byl ke vzorkům přidáván v koncentraci 0,01%. Z porovnávaných extrakčních metod je zřejmé, že nejvyšší naměřené hodnoty byly zjištěny u SFE. Např. obsah karyofylenu (402%) vyextrahovaného pomocí této metody je přibližně 28x vyšší, než u ethanolového extraktu (14,28%). SFE značně převyšuje v obsahu karyofylenu i ostatních metod - butan (36,37%), DME (46,37%). Nižší rozdíly mezi jednotlivými extrakcemi byly zaznamenány u myrcenu – ethanol (0,18%), SFE (1,21%), butan (3,56%) a DME (12,69%). Dále bylo zjištěno, že některé terpeny (α -terpinen, camphen) v extraktech získaných pomocí SFE a ethanolu chyběly.



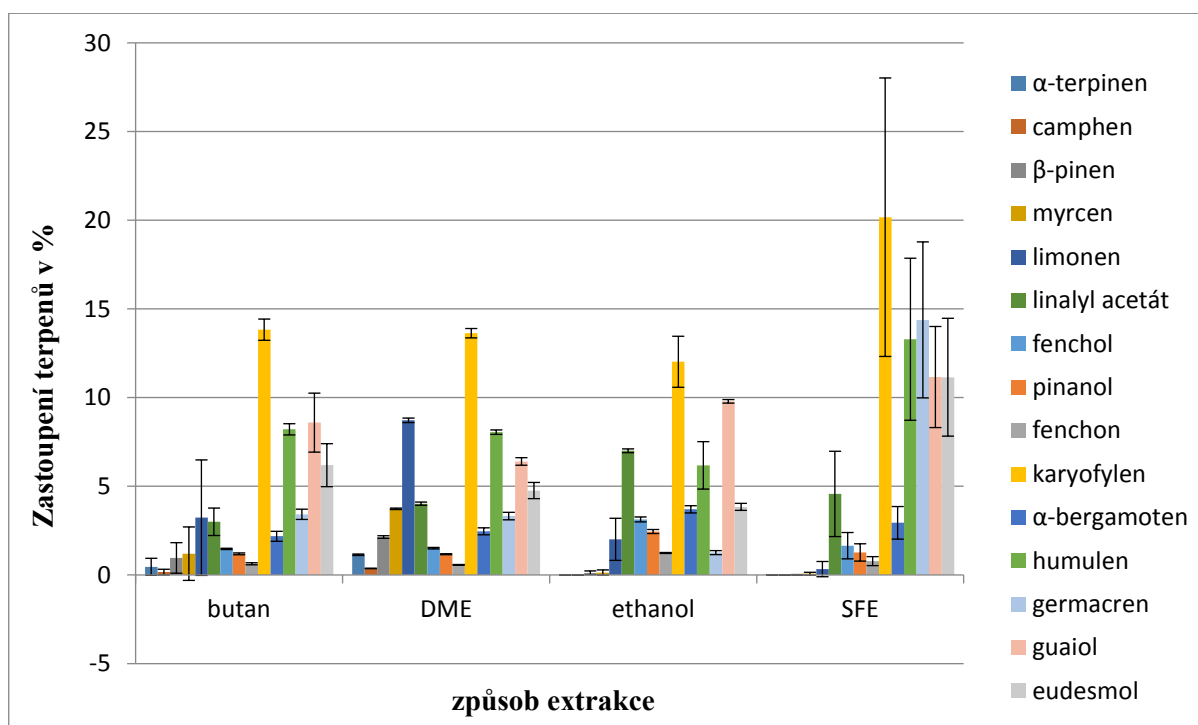
Graf 2. Obsah terpenů stanovený vůči internímu standardu. Úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku.



Obsah terpenů stanovený vůči internímu standardu. Úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku.

7.3 Celkové zastoupení terpenů ve vzorku

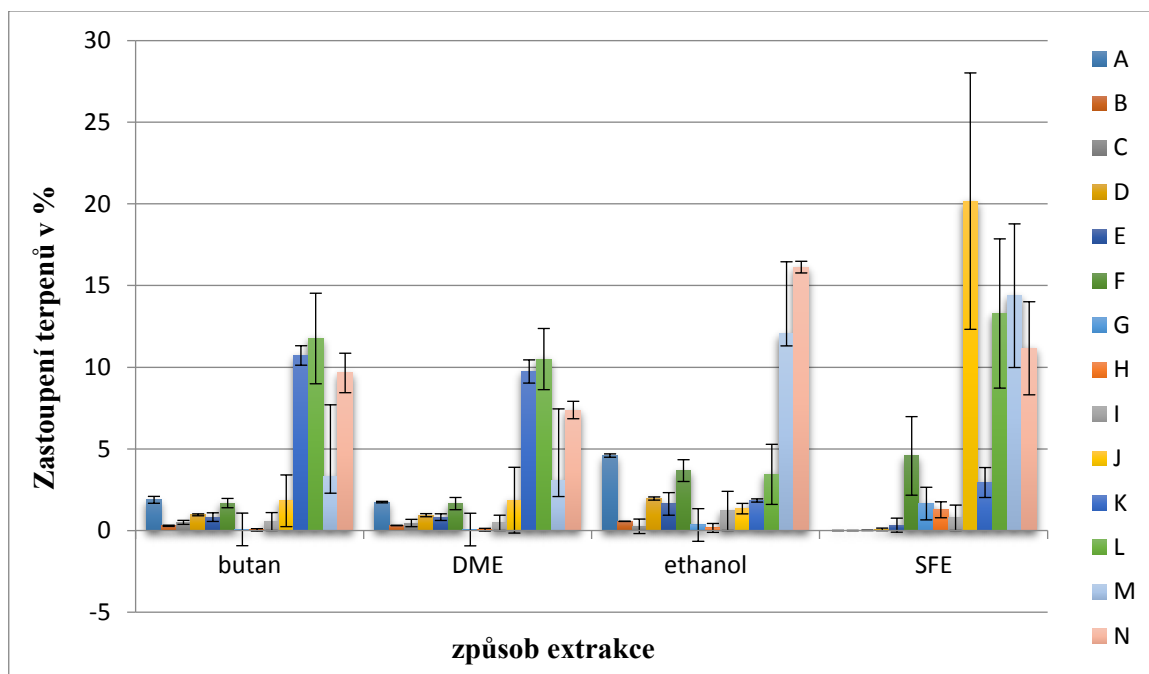
V grafu č. 4. je znázorněno procentuální zastoupení identifikovaných terpenů, vypočítané z celkového součtu 29 zjištěných terpenů. Nejvíce zastoupeným identifikovaným terpenem u testovaných extrakčních metod je karyofylen (SFE 20,17%, butan 13,83%, DME 13,63%, ethanol 12,02%). Následné zastoupení je u extrakčních metod odlišné. Ve vzorcích získaných extrakcí DME, byl druhým nejzastoupenějším terpenem limonen (8,72%), u SFE germacren (14,38%) a u extrakce ethanolom a butanem jim byl guaiol (9,79%) a (8,59%). Nejnížší zastoupení bylo naměřeno u α -terpinenu (butan 0,46%, DME 1,14%, ethanol a SFE 0%) a camphenu (butan 0,16%, DME 0,37%, ethanol a SFE 0%).



Graf 4. Procentuální zastoupení identifikovaných terpenů v celkovém součtu všech terpenů. Úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku.

Graf č.5 zobrazuje zastoupení neidentifikovaných terpenů. Pro jejich označení byla zvolena písmena abecedy. Z grafu je zřejmé, že terpen J dosahuje stejného procentuálního zastoupení jako karyofylen (20,17 %), v obou případech bylo toto procento naměřeno u SFE. U zbylých extrakčních metod bylo zastoupení terpenu J nízké (butan 1,82%, DME 1,86%, ethanol 1,34%). Další významný rozdíl v naměřených hodnotách byl zaznamenán u terpenu K. Zastoupení toho terpenu u extrakce butanem (10,72%) a DME (9,74%) bylo výrazně vyšší, než u ethanolu (1,84%) a SFE (2,94%). Nízké zastoupení terpenu L ve srovnání s ostatními

extrakčními metodami bylo zjištěno u ethanolu, jehož zastoupení (3,44%) bylo výrazně nižší, než u ostatních metod (butan (11,76%, DME 9,74%, SFE 13,29%). Terpeny A a B nebyly zjištěny u SFE a zastoupení terpenů C (0,01%), D (0,07%) je u této metody velmi nízké.



Graf 5. Procentuální zastoupení neidentifikovaných terpenů v celkovém součtu všech terpenů. Úsečky v grafu znázorňují směrodatnou odchylku.

8 Diskuze

Cílem této práce bylo porovnání několika tradičních a nových metod extrakce medicínálního konopí z hlediska kvalitativních a kvantitativních parametrů výsledného produktu. Podle stanovené hypotézy jsou nová extrakční činidla a způsoby extrakce z hlediska kvalitativního a kvantitativního hodnocení výsledného extraktu efektivnější v porovnání s tradiční extrakcí pomocí ethanolu.

Z výsledků je zřejmé, že nejvyšší výtěžek byl získán extrakcí dimethyletherem (10,16g), extrakcí butanem bylo získáno (9,36g) a ethanolom (7,68g). Nejnižší výtěžek byl zaznamenán u SFE (0,99g). Vzhledem k nedostatku informačních zdrojů, které by se zabývaly porovnáváním kvality a kvantity extrakčních metod, není možné získaná data porovnat s jinými autory. Můžeme proto předpokládat, že naměřené hodnoty jsou výsledkem rozdílných vlastností daných rozpouštědel extrahovat určité látky. Metodou SFE není možné extrahovat např. aminokyseliny, cukry, flavonoidy, chlorofyl, navíc ve srovnání s ostatními extrakčními metodami nezanechává SFE rezidua, což je výhodné z důvodu čistoty extraktu (Flaveko 2018).

Zastoupení identifikovaných terpenů se v případě použití ethanolu, DME a butanu významně nelišilo, výraznější rozdíl byl zaznamenán u SFE. Ve všech případech byl nejhojněji zastoupen karyofylen (SFE 20,17%, butan 13,83%, DME 13,63%, ethanol 12,02%) který byl už v minulosti označován za nejběžnější terpen v konopných extraktech (Guy a Stott, 2005).

Je tedy zřejmé, že SFE je schopna extrahovat výše zmíněné terpeny. Nicméně bylo prokázáno, že u SFE je složení extraktů ovlivněno tlakem CO₂ a délkou extrakce (Revenchon, 1995). K podobným závěrům došel ve své práci i (Catchpole 1996), který tvrdí, že výnos a obsah účinných látek je ovlivněn velikostí částic nadrceného vzorku a délkou extrakce. Můžeme tedy předpokládat, že změna extrakčních podmínek má vliv na obsah extrahovaných látek.

Absence některých terpenů v ethanolových extraktech se dá vysvětlit vytěkáním během doby, kdy byl extrakt odpařován, není však známo, proč tomu bylo i u extraktu získaném SFE, u kterého nedocházelo k následnému odpařování.

Nejmenší rozdíly v obsahu naměřených terpenů byly vyzorovány mezi extrakcí butanem a DME. S ohledem na fakt, že obě extrakční metody byly provedeny ve stejném extraktoru a za stejných podmínek, je pravděpodobné, že drobné rozdíly byly způsobeny vlastnostmi daného rozpouštědla. Jedinný významnější rozdíl v zastoupení terpenů, mezi extrakcemi byl

zaznamenán u limonenu, který byl více zastoupen u DME. Firma dexso, která extraktor poskytla garantuje účinnější extrakci pomocí DME ve srovnání s butanem (Roots, 2018).

9 Závěr

Na základě získaných výsledků můžeme tvrdit, že mezi čtyřmi extrakčními metodami existují rozdíly v zastoupení extrahovaných látek, jejich obsahu a výtěžnosti konopného extraktu.

Nejvyšší výtěžek konopného extraktu byl získán extrakcí DME, naopak nejnižší u SFE. Nejvyšší obsah účinných látek byl zaznamenán u SFE, dále u DME, butanu a nejméně u ethanolu. Potvrzuje se tím hypotéza, že z hlediska kvality je nejméně efektivní metodou ethanolová extrakce. Výsledky však není možné porovnat s jinými pracemi, protože se doposud podobným výzkumem nikdo nezabýval. Lze předpokládat, že naměřené hodnoty se mohou lišit v závislosti na kultivaru testované rostliny.

Pro množství získaného extraktu je nejvhodnější extrakce DME, pro obsah účinných látek SFE.

10 Seznam použité literatury

Abrams, D. I., & Guzman, M. (2015). Cannabis in Cancer Care. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 97(6), 575–586. <http://doi.org/10.1002/cpt.108>

Andre, C. M., Hausman, J.-F., & Guerriero, G. (2016). Cannabis sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Frontiers in Plant Science*, 7. <http://doi.org/10.3389/fpls.2016.00019>

Backes, M., Weil, A., & Kozák, J. (2016). *Konopná lékárna: praktický průvodce světem léčivé marihuany*. Olomouc: Fontána.

Bhattacharyya, S., Morrison, P. D., Fusarpoli, P., Martin-Santos, R., Borgwardt, S., Winton-Brown, T., Nosarti, C., O' Carroll, C. M., Seal, M., Allen, P., Mehta, M. A., Stone, J. M. 2010. Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology*. 35 (3). 764–774.

Bimark M., Rahman R. A., Taip F. S., Adzahan N. M., Sarker Md. Z. I., Ganjloo A.: Optimization of ultrasound-assisted extraction of crude oil from winter melon (*Benincasa*

hispidia) seed using response surface methodology and evaluation of its antioxidant activity, total phenolic content and fatty acid composition, *Molecules*, **17**, 11748–11762 (2012).

Brát, Jiří. *Tuky a oleje*. Praha: Sdružení českých spotřebitelů pro Českou technologickou platformu pro potraviny, 2014. Jak poznáme kvalitu?. ISBN isbn978-80-88019-00-8.

Brehm-Stecher, B. F. a E. A. JOHNSON. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apitone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2003, **47**(10), 3357-3360 [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1128/AAC.47.10.3357-3360.2003. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.47.10.3357-3360.2003>

Campos et al., 2005, Experimental data and modeling the supercritical fluid extraction of marigold (*Calendula officinalis*) oleoresin, *J Supercritical Fluids*, 34: 163-170

Carmen W. H.: A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants, *Anal. Bional. Chem.*, **373**, 23–30 (2002).

Casano, S. Grassi G., Martini V., Michelozzi, M. 2011. Variations in terpene profiles of different strains of *Cannabis sativa L.* *Acta horticulturae*. (925). ISSN: 05677572.

Catchpole, Owen J., John B. Grey, and Bruce M. Smallfield. "Near-critical extraction of sage, celery, and coriander seed." *The Journal of Supercritical Fluids* 9.4 (1996): 273-279.

Conrad, Ch. *Konopí pro zdraví: Fakta o léčivých účincích marihuany*. Praha : Pragma, 2001. 210 s. ISBN 80-7205-834-7.

Delong, G.T. Pharmacological evaluation of the natural constituent of *Cannabis sativa*, cannabichromene and its modulation by $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Drug and alcohol dependence*. Roč. 2010, čís. 112(1-2), s. 126-133. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2010.05.019. PMID 20619971

Durling, Nicola E., et al. "Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures." *Food Chemistry* 101.4 (2007): 1417-1424.

Giese, M. W., Lewis, M. A., Giese, L., & Smith, K. M. (2015). Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *Journal of AOAC International*, 98(6), 1503-1522.

Gertsch, Jürg, Marco LEONTI, Stefan RADUNER, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2008, **105**(26), 9099-9104 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.1073/pnas.0803601105. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0803601105>

Grimmer J., Málek M., Santholzer R.: Organická rozpouštědla, Praha: Státní nakladatelství technické literatury 1956

Guy GW, Stott CG. The development of Sativex- a natural cannabis-based medicine. In: Mechoulam R, editor. *Cannabinoids As Therapeutics*. Basel: Birkhäuser Verlag; 2005. pp. 231–263.

Holland, Julie. *Tráva: kompletní průvodce světem marihuany v medicíně, vědě, kultuře a politice*. Hodkovičky [Praha]: Pragma, c2014. ISBN 978-80-7349-408-7.

Hanus, L. O. 2009. Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Medicinal Research Reviews*. 29 (2). 213-71. DOI: 10.1002/med.20135. ISSN: 10981128.

Jennings et al., 1992, Supercritical extraction of taxol from the bark of Taxus, *J Supercritical Fluids*, 5: 1-6

Jongedijk, E., Cankar, K., Buchhaupt, M., Schrader, J., Bouwmeester, H., Beekwilder, J. 2016. Biotechnological production of limonene in microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100. 2927–38.

Leweke, F. M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C. W., Hoyer, C., ... Koethe, D. (2012). Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 2(3), e94. <http://doi.org/10.1038/tp.2012.15>

Machmudach, Siti, et al. Supercritical CO₂ extraction of nutmeg oil: Experiments and modeling. *The Journal of supercritical fluids*, 2006, 39.1: 30-39.

Mchugh, Mark; KRUKONIS, Val. *Supercritical fluid extraction: principles and practice*. Elsevier, 2013.

Miovský, Michal. *Konopí a konopné drogy: adiktologické kompendium*. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-0865-2.

Noma Y, Asakawa Y. Biotransformation of monoterpenoids by microorganisms, insects, and mammals. In: Baser KHC, Buchbauer G, editors. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010. pp. 585–736

Nováček, František. *Fytochemické základy botaniky*. Vyd. 2., dopl. Olomouc: Fontána, 2009. ISBN 978-80-7336-457-1.

Novello, Zuleica, et al. "Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of andiroba seeds oil obtained from pressurized n-butane." *Industrial Crops and Products* 76 (2015): 697-701.

Peč, J., Dušek, J. 2009. Konopí, konopná droga a související léčivé přípravky. *Praktické lékárenství*. Solen, s.r.o. Praha. 5 (4). 189-193. ISSN: 1803-5329

Perry, N. S., Houghton, P. J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E. K. 2000. In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 52. 895–902.

Reverchon, E., R. Taddeo, and G. Delta Porta. "Extraction of sage oil by supercritical CO₂: Influence of some process parameters." *The Journal of Supercritical Fluids* 8.4 (1995): 302-309.

Rijke de E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. Th.: Analytical separation and detection methods for flavonoids, *J. Chromatogr., A*, **1112**, 31–63 (2006).

Robinson, Rowan. *Velká kniha o konopí*. 1. Praha: Volvox Globator, 1997. 281 s. ISBN 80-7207-046-0.

Roitman, P., Mechoulam, R., Cooper-Kazaz, R., & Shalev, A. (2014). Preliminary, Open-Label, Pilot Study of Add-On Oral Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Chronic Post-Traumatic Stress Disorder. *Clinical Drug Investigation*, 34(8), 587–591. <http://doi.org/10.1007/s40261-014-0212-3>

Rufino, A., Ribeiro, M., Sousa, C., Judas, F., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Mendes, A. F. 2015. Immunopharmacology and inflammation: 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. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.01.018. ISSN: 00142999.

Russo, Ethan B. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2011, **163**(7), 1344-1364 [cit. 2018-02-02]. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x. ISSN 00071188. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x>

Sultana, Bushra, Farooq Anwar, and Muhammad Ashraf. "Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts." *Molecules* 14.6 (2009): 2167-2180.

Sundmacher, Kai; KIENLE, Achim (ed.). *Reactive distillation: status and future directions*. John Wiley & Sons, 2006.

Šedivec V., Flek J.: Příručka analýzy organických rozpouštědel. Nakladatelství technické literatury, Praha 1968

Troy A. Semelsberger, Rodney L. Borup, Howard L. Greene, Dimethyl ether (DME) as an alternative fuel, *Journal of Power Sources*, Volume 156, Issue 2, 2006, Pages 497-511, ISSN 0378-7753

Turkez, Hasan a Elanur AYDIN. In vitro assessment of cytogenetic and oxidative effects of α -pinene. *Toxicology and Industrial Health*[online]. 2013, **32**(1), 168-176 [cit. 2018-01-08]. DOI: 10.1177/0748233713498456. ISSN 0748-2337. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233713498456>

Vagi et al., 2007, Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products, *J Supercritical Fluids*, 40: 218–226

Valdeolivas, S., Navarrete, C., Cantarero, I. et al. *Neurotherapeutics* (2015) 12: 185.
<https://doi.org/10.1007/s13311-014-0304-z>

Varlet, Vincent, et al. "Drug vaping applied to cannabis: Is "Cannavaping" a therapeutic alternative to marijuana?." *Scientific reports* 6 (2016): 25599.

Wilson, Roberta. *Aromatherapy for vibrant health & beauty*. Garden City Park, N.Y.: Avery Pub. Group, c1995. ISBN 0895296276.

Ye, Hong, et al. "Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*." *European Food Research and Technology* 230.1 (2009): 101.

Ying Gu, Zhang Ting, Xi Qiu, Xuzhao Zhang, Xiaoxian Gan, Yongming Fang, Xiaohua Xu, Rongzhen Xu, Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors, In *Toxicology*, Volume 268, Issues 1–2, 2010, Pages 19-24, ISSN 0300-483X, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.11.013>.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X09005939>)

Internetové zdroje:

Webchemie [online]. [cit. 2018-02-12] dostupné z <<http://www.webchemie.cz/roztoky.html>>.

Master Organic Chemistry [online]. [cit. 2018-02-12] dostupné z
<<https://www.masterorganicchemistry.com/2012/04/27/polar-protic-polar-aprotic-nonpolar-all-about-solvents/>>.

Roots časopis s kořeny [online]. [cit. 2018-04-5] dostupné z
<<https://www.casopisroots.cz/dexso-revoluce-extrakce-oleju/>>.

Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations. [cit. 2018-04-5]
dostupné z <<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim945.htm>>.

Hempyreum.org - News aggregator about Hemp and Cannabis [cit. 2018-02-5] dostupné z <<http://www.hempyreum.org/en/66753>>.

Growmart [cit. 2018-03-7] dostupné z <<http://growmart.cz/mene-znamy-kanabinoid/>>.

Cannapedia Encyklopedie konopných odrůd [cit. 2018-03-7] dostupné z <<http://www.cannapedia.cz/cs/rozdeleni/cbg>>.

Toxikologické informační středisko [cit. 2018-04-7] dostupné z <<http://www.tis-cz.cz/index.php/informace-pro-verejnost/alkohol-drogy/alkohol>>.