

Ultrazvučna ekstrakcija kanabinoida iz cvjetova industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Jambrović, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:063977>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Maja Jambrović

0058210616

**ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA KANABINOIDA IZ CVJETOVA
INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*Cannabis sativa* L.)**

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: „Razvoj inovativnog postupka proizvodnje CBD ulja iz cvijeta industrijske konoplje i novih visokotehnoloških proizvoda - ekstrakata iz organskih poljoprivrednih sirovina“ (KK.01.2.1.02.0140) koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.

Mentor: doc. dr. sc. *Marko Obranović*

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Ultrazvučna ekstrakcija kanabinoida iz cvjetova industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Maja Jambrović, 0058210616

Sažetak: Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je biljka koja ima dugu tradiciju primjene kao hrana, sirovina za proizvodnju materijala ili medicinskih pripravaka. Zadnje desetljeće došla je u fokus znanstvenih istraživanja zbog velikog udjela bioaktivnih spojeva kanabinoida i njihovog glavnog predstavnika kanabidiola (CBD). Ultrazvučna ekstrakcija se sve više koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog svoje brzine, jednostavnosti i učinkovitosti. Cilj ovog rada bio je optimiziranje procesa ultrazvučne ekstrakcije kako bi se ekstrahirala što veća količina kanabinoida, prvenstveno CBD-a, skratilo vrijeme postupka te našli optimalni omjeri suhe tvari i otapala. Provedbom ultrazvučne ekstrakcije dobivena je veća količina kanabinoida u kraćem vremenskom periodu u odnosu na primjenu kontrolne ekstrakcije. Utvrđeno je da vrijeme te omjer suhe tvari i etanola imaju značajni statistički utjecaj na iskorištenje te udio CBD-a ($p \leq 0,05$), dok na udio ukupnih kanabinoida statistički značajnu vrijednost ima omjer suhe tvari i etanola ($p \leq 0,05$).

Ključne riječi: dekarboksilacija, kanabidiol, kanabinoidi, industrijska konoplja, ultrazvučna ekstrakcija

Rad sadrži: 33 stranica, 16 slika, 5 tablica, 53 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Marko Obranović

Pomoć pri izradi: Melisa Trputec, tehnički suradnik

Datum obrane: 16. rujna 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering
Laboratory for Oil and Fat Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology**

**Ultrasound assisted extraction of cannabinoids from hemp inflorescence
(*Cannabis sativa* L.)
Maja Jambrović, 0058210616**

Abstract: Hemp (*Cannabis sativa* L.) is a plant that has long tradition of use such as a food, raw material for the production of other finished materials or medical preparations. It has come into a focus of scientific research for its major amount of bioactive compounds called cannabinoids and their main compound cannabidiol (CBD) for the last decade. Ultrasonic extraction is used more and more in the food and pharmaceutical industry for its speed, simplicity and efficiency. The aim of this study is to optimize the process of the ultrasonic extraction so it could be more effective at extracting greater amounts of cannabinoid, mainly CBD, to shorten the time of the process and to find the optimal ratio of dry matter and solvent. Using ultrasonic extraction a greater amount of cannabinoids was obtained in a shorter period of time compared to the application of control extraction. It was determined that the time and ratio of dry matter and ethanol have a significant statistical impact on utilization and the amount of CBD ($p \leq 0.05$), while the ratio of dry matter and ethanol ($p \leq 0.05$) has a statistically significant value on the amount of total cannabinoids.

Keywords: decarboxylation, cannabidiol, cannabinoids, hemp, ultrasound extraction

Thesis contains: : 33 pages, 16 figures, 5 tables, 53 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Marko Obranović

Technical support and assistance: technical associate Melisa Trputec

Defence date: September 16th 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Konoplja	2
2.1.1 Taksonomija konoplje	3
2.1.2. Botanička svojstva konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.)	4
2.1.3. Bioaktivne komponente industrijske konoplje	6
2.2. Ultrazvuk	8
2.2.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka	10
2.3. Ekstrakcija	11
2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Uzorak	14
3.1.2. Kemikalije	14
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.2. Metode	16
3.2.1. Dekarboksilacija uzorka konoplje	16
3.2.2. Kontrolna ekstrakcija etanolom uz zračno hladilo i kontrolna ultrazvučna ekstrakcija	16
3.2.3. Ultrazvučna ekstrakcija uzorka konoplje	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Dekarboksilacija	21
4.2. Kontrolna ekstrakcija etanolom uz zračno hladilo i kontrolna ultrazvučna ekstrakcija	21
4.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom	22
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Konoplja spada u biljke koje čovjek koristi još od davnih dana što se može prepisati njezinoj upotrebljivosti u različite svrhe. Konoplja ima vrlo važan agroekološki učinak jer nakon nje tlo ostaje u povoljnom biološkom i fizikalnom stanju, s dosta hranjiva, također se koristi u proizvodnji hrane, papira, građevinarstvu, ribarstvu, tekstilnoj industriji, kao hrana za životinje, kao ogrjevni materijal i u medicinske svrhe. U Republici Hrvatskoj dozvoljeno je uzgajati sorte industrijske konoplje, koje sadrže manje od 0,2 % Δ^9 -tetrahidrokanabinola (THC) u suhoj tvari biljke te je omogućeno iskorištavanje cijele biljke.

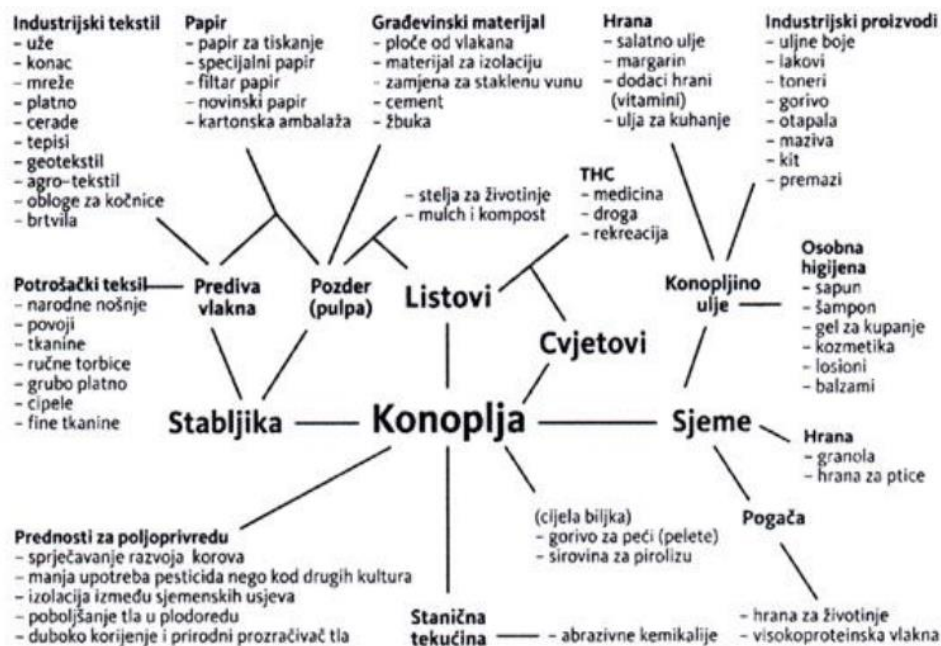
Kemijski sastav konoplje odlikuje se bogatstvom bioaktivnih komponenta. Kanabinoidi su najkarakterističniji spojevi vezani uz konoplju, iako ona sadrži brojne druge spojeve kao što su terpeni, flavanoidi, alkaloidi i ostali. Kanabinoidi se dijele u tri skupine: endokanabinoidi, sintetički kanabinoidi i fitokanabinoidi, a najpoznatiji i najviše istraživani fitokanabinoidi su Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) i kanabidiol (CBD) (Cerino i sur., 2021). Unazad nekoliko godina sve više se u procesu prerade hrane prednost daje tehnikama koje znatno štede energiju, skraćuju vrijeme procesa proizvodnje, primjenjuju blaže uvjete termičke obrade kako bi se u što manjoj mjeri narušila izvorna kakvoća sirovine, a da se pritom dobiju proizvodi visoke kvalitete, boljih organoleptičkih značajki i veće nutritivne vrijednosti. U svrhu minimalno procesirane hrane primjenjuju se sljedeće metode procesiranja: ultrazvuk, visoki hidrostatski tlak, oscilirajuće magnetsko polje, itd. Prilikom kontakta ultrazvučnih valova i namirnice dolazi do pojave sile koja ovisno o smjeru djelovanja uzrokuje kompresiju ili smicanje valova zbog čega dolazi do fizikalno kemijskih promjena u namirnici. Ultrazvuk se sve više primjenjuje u procesima ekstrakcije bioaktivnih komponenata. Princip ultrazvučne ekstrakcije se temelji na djelovanju ultrazvučnih valova na stanične stijenke biljnog materijala pri čemu dolazi do njihovog oštećenja, a to olakšava ulaz otapala u materijal te dolazi do povećanja efikasnosti izmjene mase (Lelas, 2006).

Cilj ovog eksperimentalnog rada je optimizacija procesa ultrazvučne ekstrakcije kanabinoida iz industrijske konoplje kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije, smanjilo vrijeme trajanje procesa te našli optimalni omjeri otapala i suhe tvari.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Konoplja

Konoplja nije nova biljka, njezina upotreba datira u daleku prošlost ,oko 6200 g.pr. Kr., što potvrđuju arheološki nalazi i drevni tekstovi pronađeni na području Kine gdje se osim kao vlakno koristila i u medicinske svrhe. Konoplja u današnje vrijeme poprima sve veći značaj i interes u svijetu zbog svog potencijala u proizvodnji čitavog niza proizvoda, a koji se primjenjuju u području medicine, građevinarstvu, poljoprivredi, prehrambenoj industriji, tekstilnoj industriji te u energetske svrhe. Smatra se da industrijska konoplja ima potencijala za zadovoljavanje većine čovjekovih potreba za hranom, odjećom, obućom, energijom, itd. (Božić-Ostojić i sur., 2015) (slika 1.). Različiti dijelovi biljke konoplje (npr. cvat, sjemenke) predstavljaju vrijedan resurs u proizvodnji hrane te kao dodatak prehrani. Cvat industrijske konoplje bogat je nepsihoaktivnim, ali biološki aktivnim kanabinoidima koji imaju snažno anksiolitičko i antikonvulzivno djelovanje, dok sjeme konoplje ima ugodan orašasti okus te je važan izvor esencijalnih aminokiselina i masnih kiselina, mineralnih tvari, vitamina i vlakana, a klice konoplje bogat su izvor antioksidansa (Cerino i sur., 2021).



Slika 1. Upotreba konoplje (Šimić, 2018)

Konoplja je biljka koja je prilagodljiva na klimatske uvjete i stanište u kojem se uzgaja. Ovisno o uvjetima i području uzgoja može mijenjati svoja morfološka i fiziološka svojstva. Konoplja najbolje uspijeva u toploj i nešto vlažnijoj kontinentalnoj klimi. Glavni proizvođači konoplje su Kina, Sjeverna Koreja, Čile (Butorac, 2009), Francuska, Italija i Nizozemska

(EIHA, 2018). Prema važećem zakonu Republike Hrvatske „Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (‘Narodne novine’ , br. 39/19)“ industrijska konoplja se definira kao konoplja (*Cannabis sativa* L.) s ukupnim sadržajem THC-a 0,2 % i manjim čije sorte se nalaze na Zajedničkoj sortnoj listi Europske unije i nije uvrštena u Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga (N.N, 39/19). Ovim zakonom omogućuje se korištenje cijele biljke, a konoplja se može uzgajati i proizvoditi i u medicinske svrhe uz odobrenje ministarstva nadležnog za zdravstvo na temelju podnesenog zahtjeva pravne osobe koja ima proizvodnu dozvolu Agencije za lijekove i medicinske proizvode za proizvodnju lijeka ili djelatne tvari sukladno Zakonu o lijekovima (N.N, 39/19).

2.1.1 Taksonomija konoplje

Konoplja pripada porodici Cannabinaceae i rodu *Cannabis*. Prema nekim autorima, u rod *Cannabis* se svrstavaju tri različite vrste- *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*, ali se prihvaća i klasifikacija *Cannabis sativa*-e kao monotipične vrste s tri podvrste: *Cannabis sativa* subsp. *sativa* (industrijska konoplja), *Cannabis sativa* subsp. *indica* (indijska konoplja), *Cannabis sativa* subsp. *rudelis* i 4 varijeteta: *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* var. *sativa*, *Cannabis sativa* L. subsp. *sativa* var. *spontanea*, *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* var. *indica* i *Cannabis sativa* L. subsp. *indica* var. *kafiristanica* (Cerino i sur., 2021). Morfološke razlike između tri podvrste *Cannabis sativa* L. prikazane su na slici 2..



Slika 2. Morfološke razlike podvrsta *Cannabis sativa* L. (Šain, 2019)

Taksonomska klasifikacija vrste *Cannabis sativa* L. prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Taksonomija vrste *Cannabis sativa* L. (ITIS, 2021)

Carstvo	Plantae
Koljeno	Tracheophyta
Razred	Magnoliopsida
Podrazred	Rosanae
Red	Rosales
Porodica	Cannabaceae
Rod	<i>Cannabis</i>
Vrsta	<i>Cannabis sativa</i> L.

2.1.2. Botanička svojstva konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je jednogodišnja dvodomna biljka s ljetnom vegetacijom. Poznata je po svom obliku, a najviše je prepoznatljiva zbog specifičnog oblika listova.



Slika 3. Muški cvat (lijevo), ženski cvat (desno) i plod industrijske konoplje (Lukačević, 2016)

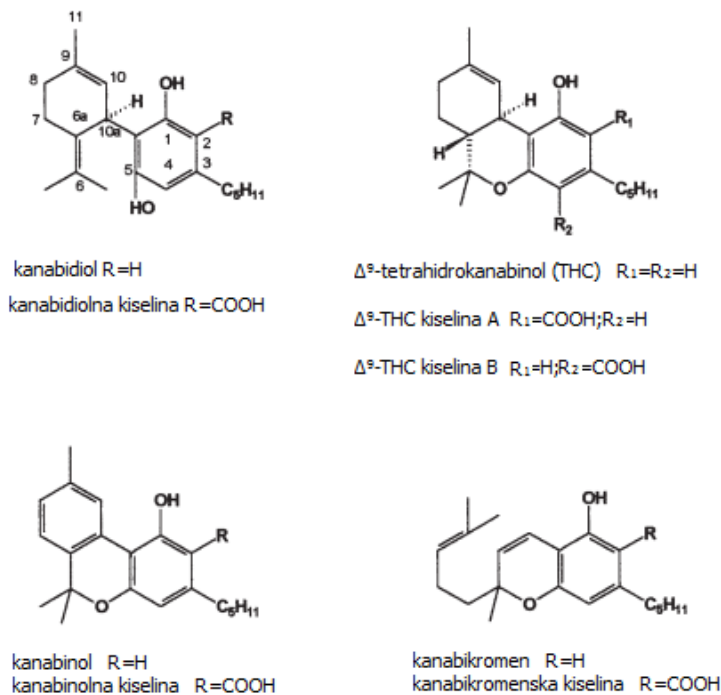
Konoplja ima vretenast korijen koji je dosta plitak i na njega otpada 8 do 10 % mase cjelokupne biljke (Butorac, 2009). Iz glavnog korijena razvija se sekundarno korijenje koje se tijekom vegetacije međusobno isprepliće. Ženske biljke imaju bolje razvijen korijenov sustav od muških. Stabljika konoplje je uspravna i zelene boje te je šuplja. U početku je zeljasta, a starenjem polako odrvenjuje (Butorac, 2009). Stabljika se sastoji od 6 do 15 članaka. Visina stabljike je od 2 do 5 m. Na stabljiku otpada 60 do 65 % mase biljke (Butorac, 2009). List konoplje je složen te se sastoji od peteljke koja pri dnu ima dva listića koja su srasla sa stabljikom, a liske su prstasto razdijeljene. Plojka lista je s gornje strane glatka, a donja strana je dlakava. Rubovi lista su nazubljeni. Listovi na biljci su smješteni nasuprotno, a na vrhu su poredani naizmjenično (Butorac, 2009). Broj listova varira, a uvijek ih je neparan broj (između 3 i 13). Ovisno o sorti i uvjetima proizvodnje boja lista može biti svjetlo ili tamnozeleno. Na listove otpada 15 do 20 % mase (Butorac, 2009). Konoplja je dvodomna, što znači da se cvjetovi nalaze na odvojenim biljkama, muškim i ženskim. Spolovi se razlikuju po morfološkoj obilježjima, biološkim osobinama i ekonomskom značaju, ali u ranom stadiju rasta teško se mogu razlikovati, već se tek netom prije cvatnje počinju razlikovati po boji i izgledu (ženske biljke su niže i gušće, dok su muške biljke obično više). Konoplja se oprašuje vjetrom. Muški cvjetovi su u obliku metlice smještene na vrhu stabljike. Muški cvjetovi se nalaze na cvjetnim stapkama te se sastoje od perigona i pet prašnik. Žućkasta boja cijele metlice muških biljaka potječe od velikog broja žutih cvjetova. Ženske biljke su tamnije zelene boje od muških biljaka i cvjetovi su skupljeni u cvat oblika klasa. Ženski cvjetovi su svjetlozelene boje, a sastoje se od ovojnog listića, perigona i tučka s dvije njuške. Ženske biljke donose sjeme. Cvatnja muških i ženskih biljaka može biti istovremena ili tako da ženske biljke cvatu 10 do 15 dana prije muških. Cvatnja muških biljaka traje 15 do 35 dana, a ženskih do 30 dana. Vrijeme od oplodnje do sazrijevanja sjemena traje 30 do 40 dana ovisno o sorti i uvjetima uzgoja. Postoje i jednodomne biljke kod kojih su muški i ženski cvjetovi na istoj stapci, a ponekad i na odvojenim stapkama. Plod konoplje je orašac, koji je ujedno i sjeme, a omotan je tvrdom ljuskom koja štiti sjeme (Butorac, 2009). Sjeme se sastoji od ljuske ploda, sjemene ljuske, endosperma i klice (Obranović i Ozmec, 2014). U endospermu je sadržan škrob, a u ostalim dijelovima sjemenke ulje. Sjeme je šareno i može biti različite boje, od sive, crne, svijetlozelene, smeđe i nijansi sličnih boja (slika 4.). Po svom kemijskom sastavu sadrži 25-38 % ulja, oko 25 % bjelančevina te značajan udio vlakana, vitamina i mineralnih tvari (Obranović i Ozmec, 2014).



Slika 4. Sjeme industrijske konoplje (Martić, 2018)

2.1.3. Bioaktivne komponente industrijske konoplje

U konoplji, provedbom opsežnog istraživanja, identificirano je stotinu različitih spojeva s potencijalnom biološkom aktivnošću, kao što su terpenoidi, kanabinoidi, fenolni spojevi, masne kiseline, proteini, aminokiseline, steroli, esteri, laktoni, aldehid, pigmenti itd. (Cerino i sur. 2021). Kanabinoidi se prema kemijskoj strukturi svrstavaju u grupu terpenofenolnih spojevi s 21-im ugljikovim atomom (Raharjo i Verpoorte, 2004). Kanabinoidi se dijele na fito-, endo- i sintetičke kanabinoide (Scheau i sur., 2020). Endokanabinoidi su lipofilne molekule koje se sintetiziraju u biološkim membranama (uglavnom u postsinaptičkim membranama u mozgu) (Pacher i sur., 2020) te u ljudskom organizmu djeluju kao endogeni agonisti kanabinoidnih receptora (Di Marzo, 2008), a 2 glavna spoja te skupinu su N-arahidonoiletanolamid (anandamid ili AEA) i 2-arahidonoilglicerol (2-AG) (Izzo i sur., 2009). Sintetski kanabinoidi podijeljeni su u 6 grupa u koje je svrstano stotinjak spojeva (Scheau i sur., 2020). Fitokanabinoidi su specifični samo za konoplju i broje više od 110 spojeva u 11 grupa (Scheau i sur., 2020), a glavni predstavnici ove skupine kanabinoida su THC (Δ^9 -tetrahidrokanabinol), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN) i kanabikromen (CBC) (Russo, 2011).



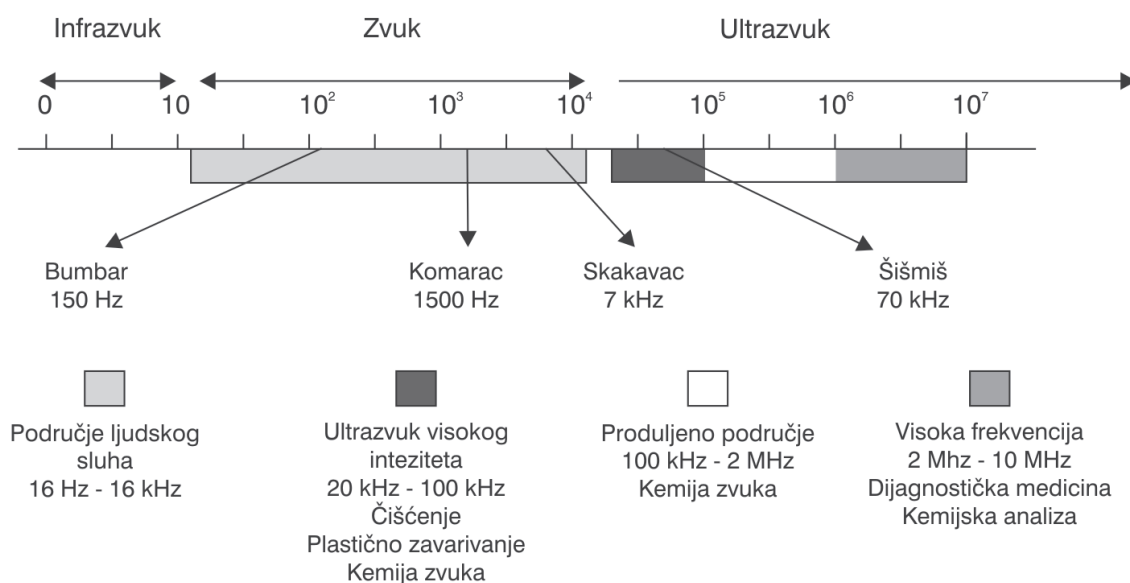
Slika 5. Struktura kanabinoida (Raharjo i Verpoorte, 2004)

Svježi uzorci konoplje u svom sastavu pretežito sadrže kanabinoide u formi karboksilnih kiselina i njihovih derivata (Giroud, 2002), no u takvom obliku oni su nestabilni te se lako dekarboksiliraju (npr. tijekom zagrijavanja iznad 120 °C, starenjem biljke, djelovanjem svjetla) (Foster i sur., 2019) i prelaze u stabilniji neutralni oblik. U industrijskoj konoplji najzastupljeniji kanabinoid je kanabidiol (CBD) u formi kiseline (CBDA). Kanabinoidi su najviše zastupljeni u ženskim cvjetovima i lišću, a manje u ostalim dijelovima biljke, dok ih sjeme uopće ne sadrži (Ameri, 1999). Kemijski sastav konoplje uvelike je određen genetikom, ali na njega također utječu uzgoj, žetva, sušenje i drugi čimbenici prilikom proizvodnje (Foster i sur., 2019). Kanabinoidi su lipofilni i lako se apsorbiraju odnosno vežu se na specifične membranske receptore (Ameri, 1999; Foster i sur., 2019). Industrijska konoplja u svojem kemijskom sastavu sadrži manje od 0,2 % psihoaktivne tvari THC (Δ^9 -tetrahidrokanabinol). Biološka aktivnost nepsihoaktivni kanabinoida (kanabidiol (CBD), kanabikromen (CBC), kanabinol (CBN), kanabigerol (CBG) itd.) u ljudskom organizmu može se objasniti njihovom interakcijom s endokanabinoidnim sustavom koji se sastoji od dva G-proteina povezanih s kanabinoidnim receptorima (CB₁ i CB₂) te dva endogena liganda (anandamid i 2-arahidonoglicerol). CB₁ receptori nalaze se u središnjem živčanom sustavu, ali su prisutni i u perifernom živčanom sustavu, jetri, reproduktivnom sustavu, štitnoj žlijezdi i u kostima. CB₂ receptori smješteni su unutar imunološkog sustava. Endokanabinoidni sustav je fiziološki uključen u regulaciju apetita, boli, pamćenja, raspoloženja, upala, inzulinske

osjetljivosti te u metabolizam masti i energije. U industrijskoj konoplji udio CBD je nekoliko puta veći u odnosu na udio THC. Smatra se da je taj odnos dovoljan za antagoniziranje subjektivnih i fizičkih učinaka THC-a u ljudi jer CBD reducira djelovanje THC-a (HAH, 2011.) tako što CBD djeluje antagonistički na CB₁ receptor odnosno kao inverzni agonist na CB₂ receptore (Izzo i sur., 2009). CBD je veliki ugljikovodik s dvije grupe alkohola što ga primarno čini nepolarnim. CBD je vrlo zanimljiv znanstvenicima te je on najistraživaniji i najzastupljeniji spoj koji se nalazi u cvatu konoplje. Iako se još uvijek provode detaljna istraživanja o njegovom djelovanju i zdravstvenoj koristi za čovjeka, znanstvenici su uspjeli utvrditi neke medicinske koristi tog spoja te on djeluje kao antioksidans, ima protuupalno djelovanje, pomaže pri bolestima kao što su psihoza, anksioznost, depresija te djeluje protiv mučnine. US Food and drugs administration (FDA) je 2018. godine odobrila korištenje CBD, u čistom obliku kao Epidiolex, za liječenje rijetkih oblika epilepsije (Williams, 2021), a odobrila ga je i EMA (European Medical Agency) (Cerino i sur., 2021). Osim kanabinoida u konoplji su zastupljeni i terpeni, koji osim što daju specifičan okus i aromu, imaju i višestruko biološko djelovanje. β-mircen uglavnom je smješten u cvatu konoplje, a spada u monoterpene. U istraživanju koje je provedeno na miševima oboljelih od osteoartritis, β-mircen je pokazao protuupalna svojstva (Cerino i sur., 2021) te je također ustanovljeno da djeluje kao analgetik (Rufino i sur., 2015). Limonen posjeduje antialergijsko djelovanje te smanjuje tjeskobu u ljudi. β-kariofilen spada u grupu seskviterpena te je otkriveno da ima snažne anksiolitičke efekte na miševima, djeluje protuupalno i posjeduje analgetska svojstva (Cerino i sur., 2021). Dva važna spoja sadržana u cvatu konoplje su flavoni kanaflavin A i B koji imaju snažno antioksidacijsko djelovanje te su pokazali smanjenu sintezu prostaglandina E₂ čime se omogućuje protuupalni učinak u ljudi (Cerino i sur., 2021).

2.2. Ultrazvuk

U posljednjih dvadesetak godina sve se više u procesima prehrambene industrije, ali i u drugim granama industrije (npr. farmaceutska) primjenjuje ultrazvučna tehnologija. Ultrazvuk je mehanička vibracija u krutom ili tekućem mediju, a frekvencija mu je iznad područja ljudskog sluha odnosno iznad 20 kHz (slika 6.).



Slika 6. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Herceg i sur., 2009.)

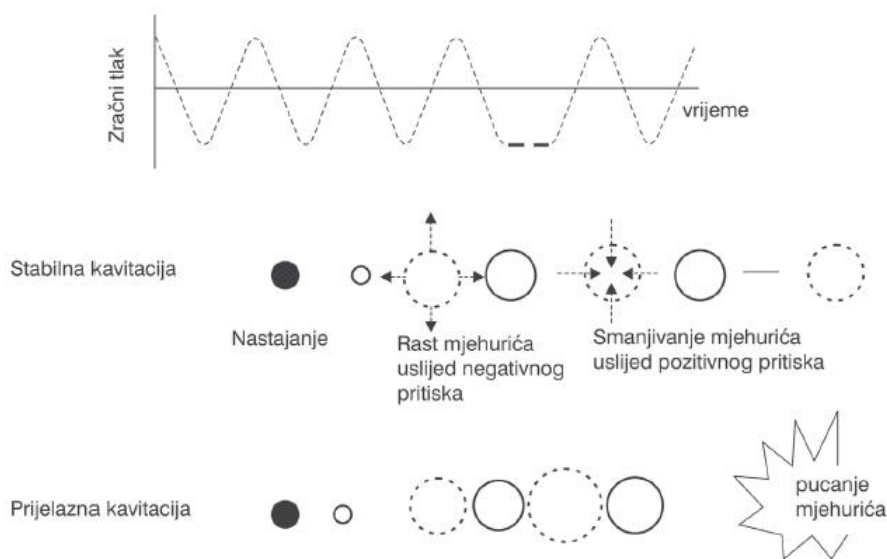
Ultrazvuk spada u tehniku minimalnog procesiranja hrane te je metoda ne-toplinske obrade hrane (Lelas, 2006). Ranije je upotreba ultrazvuka bila uglavnom ograničena na čišćenje i emulgiranje, dok se danas sve više istražuju i pronalaze prednosti primjene ultrazvuka na različitim područjima, npr. kristalizacije, sušenja, ekstrakcije, filtracije, zamrzavanja, homogenizacije itd. (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Prijenos akustične energije do prehrambenog proizvoda je trenutačan i širi se kroz cijeli volumen proizvoda čime se smanjuje ukupno vrijeme procesiranja te se ostvaruje ušteda energije (Herceg i sur., 2009). Ultrazvuk se dijeli na ultrazvuk niskog intenziteta tzv. dijagnostički ultrazvuk i ultrazvuk visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta je ultrazvuk intenziteta manjeg od 1 W cm^{-2} te mu je frekvencijski raspon viši od 2 MHz (Režek Jambrak i sur., 2010). Smatra se neinvazivnom tehnikom jer prilikom njegovog djelovanja ne dolazi do promjene fizičkih i kemijskih svojstva materijala. Primjenjuje se kao analitička tehnika, za ispitivanje određenih svojstava sastojaka hrane, strukturu, protok, kontrolu pakiranja, kemijski sastav, koncentraciju tvari u hrani te prisutnost stranih tijela (Brnčić i sur., 2009).

Ultrazvuk visokog intenziteta je ultrazvuk nižih frekvencija u rasponu od 20 do 100 kHz i može proizvesti snagu od $10\text{-}1000 \text{ W cm}^{-2}$ (Leadley i Williams, 2006). Njegovo djelovanje može uzrokovati fizičke promjene u materijalu i određene kemijske reakcije te se na tome zasniva upotreba ove tehnike u procesima prehrambene industrije. Ultrazvuk visoke snage, a niske frekvencije sadrži dovoljno energije za pucanje intramolekulskih veza te intenzitetom energije većim od 10 W cm^{-2} stvorit će kavitaciju. Istraživanja se većinom provode u frekvencijskom rasponu između 20 do 40 kHz. Upotrebljava se za čišćenje, otplinjavanje

tekućina, homogenizaciju tekućina, sušenje, ekstrakciju, destilaciju i uklanjanje nepoželjnih mikroorganizama (Lovrić, 2003).

2.2.1. Mehanizam djelovanja ultrazvuka

Ultrazvuk visokog intenziteta može se generirati na različite načine – pokretanjem tekućine, mlazom plina ili pomoću električne snage (Režek Jambrak, 2008). Prolaskom ultrazvuka kroz tekući medij stvaraju se longitudinalni valovi i područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995.), pri čemu nastaju sitni mjehurići plina odnosno dolazi do pojave kavitacije (slika 7.).



Slika 7. Stabilna i prijelazna kavitacija (Herceg i sur., 2009)

Svakom sljedećom ekspanzijom odnosno kompresijom mjehurići pare se šire i skupljaju. Djelovanjem ultrazvuka niskog intenziteta i male razine snage nastaju mjehurići čija veličina neznatno oscilira i to je takozvana „stabilna kavitacija“. Prolaskom ultrazvučnog vala visokog intenziteta i visoke razine snage kroz medij dolazi do snažnijih oscilacija u veličini, te nastaje tzv. „prijelazna kavitacija“. Uslijed negativnog tlaka dolazi do rasta mjehurića tj. povećava im se površina, a time i difuzija plinova. Tijekom svakog ciklusa ekspanzije i kompresije veličina mjehurića se povećava. Kada mjehurić postigne kritičnu veličinu dolazi do implodiranja mjehurića jer osigurana ultrazvučna energija nije dovoljna da bi se zadržala plinska faza te dolazi do brze kondenzacije, a to se sve događa pod utjecajem pozitivnog tlaka, odnosno u ciklusu kompresije, pri čemu se stvaraju visoke temperature (do 5500 K) i tlakovi (50 MPa). Nastala temperatura i tlak uzrokuju promjenu u fizikalno-kemijskim svojstvima okolnih molekula; molekule koje grade stanične stijenke se denaturiraju, dolazi do pucanja i razgradnje staničnih stijenki uslijed čega stanični sadržaj prelazi u otapalo i povećava se

brzina prijenosa mase (Drmić i Jambrak, 2010). Nastanak kavitacije ovisi o svojstvima proizvoda (npr. viskoznosti i površinskoj napetosti medija, gustoći, otopljenim plinovima...), intenzitetu ultrazvuka te frekvenciji kao najvažnijem faktoru za njezino stvaranje. U prehrambenoj industriji ultrazvučni valovi najčešće se generiraju pomoću električne energije. Osnovne komponente ultrazvučnog uređaja su generator snage, pretvarača i sustava dobavljanja. Generator snage pretvara standardnu električnu frekvenciju (50-60 Hz) u visoko promjenjivu frekvenciju (iznad 20 kHz) čime se osigurava elektricitet pretvaraču za željenu ultrazvučnu frekvenciju (Herceg i sur., 2009). Pretvarač pretvara električnu snagu ili mehaničke energiju u energiju zvuka. Princip rada pretvarača temelji se na piezoelektričnosti (elektrostrikcija) ili magnetostrikciji. Sustav dobavljanja predaje ultrazvuk procesu. Tipovi ultrazvučnog sustava su ultrazvučna kupelj i sustav ultrazvučne sonde.

2.3. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološki proces separacije pri čemu dolazi do izdvajanja određene tvari iz čvrste ili tekuće faze prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od drugih komponenata smjese. Ekstrakcija se dijeli s obzirom na agregatna stanja dviju faza na ekstrakciju čvrsto-tekuće, ekstrakciju tekuće-tekuće i ekstrakciju plinovito-tekuće. Proces se temelji na principu molekulske difuzije pri čemu otopina neke tvari dolazi u kontakt s čistim otapalom ili otopinom niže koncentracije te otopljena tvar prelazi s područja više koncentracije na područje niže koncentracije sve dok ne dođe do izjednačavanja koncentracija. Proces difuzije se opisuje Fick-ovim zakonom :

$$dS = -D * F * \frac{dc}{dx} * dz$$

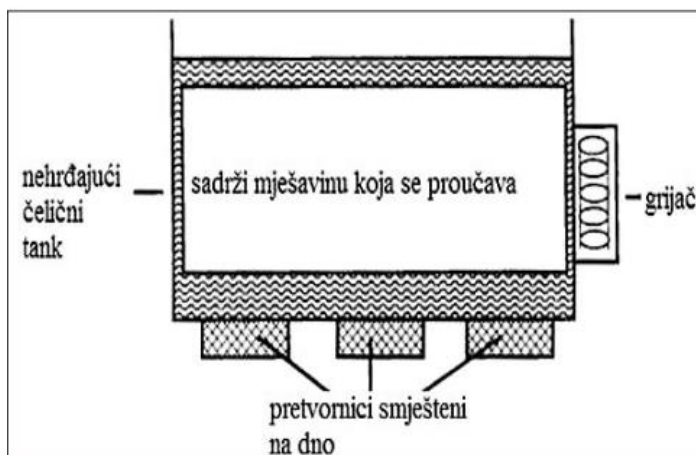
gdje dS označava količinu difundirane tvari (kg ili kmol), D (m^2/s) konstantu difuzije ili difuzivnost, F (m^2) površinu difuzije, c ($kmol/m^3$) molnu koncentraciju, z (s) vrijeme trajanja difuzije, a x (m) duljina puta difuzije. Ekstrakcija ima tri osnovne faze: miješanje hrane i otapala u jednom ili više stupnjeva, zadržavanje unaprijed određeno vrijeme te odvajanje otapala (Herceg, 2011). Tijekom vremena zadržavanja odvija se prijenos mase tj. topljiva tvar prelazi iz smjese u otapalo. Prijenos mase se odvija u 3 faze: 1. željena tvar se otapa u otapalu, 2. smjesa otopljene tvari i otapala kreće se iz unutrašnjosti namirnice na površinu i 3. otopljena tvar raspršena je u cijelom volumenu otapala (Herceg, 2011). Vrijeme potrebno za ekstrakciju osim o topljivosti topljive komponente ovisi i o temperaturi ekstrakcije, površini krute tvari izloženoj otapalu, viskoznosti otapala i protoku otapala. Ekstrakcija bi se trebala provoditi pri višim temperaturama zbog toga što se ubrzava proces ekstrakcija jer se povećava brzina kojom se topljiva komponenta otapa u otapalu te se povećava i brzina

difuzije komponente u volumen otapala. No temperature većinom ne prelaze 100 °C jer tada može doći do oštećenja željene supstance ili ekstrakcije nepoželjnih tvari. Brzina prijenosa mase izravno je proporcionalna dodirnoj površini, te se zbog toga uzorci prije ekstrakcije usitnjavaju do određenog stupnja (čime se smanjuje veličina čestica, a povećava dodirna površina) kako bi se povećala brzina ekstrakcije. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska kako bi otapalo moglo lakše prodrijeti u sloj krutih čestica te se pri većem protoku otapala povećava brzina ekstrakcije zbog toga što se smanjuje granični sloj između koncentrirane otopine i površine čestica. Za ekstrakciju vrlo bitan segment je odabir otapala. Otapalo se odabire ovisno o vrsti i svojstvima željene izolirane tvari te se prilikom tog odabira u obzir uzima polarnost, vrelište (što niže) i viskoznost (što niža) otapala. Također otapalo ne smije reagirati s ekstrahiranom tvari, mora imati stabilnost na toplinu, kisik i svjetlo te mora biti sigurno za upotrebu- ne zapaljivo, ne smije biti štetno za ljude te mora biti prihvatljivo i s ekološkog aspekta, a bitna je i cijena samog otapala – biraju se po mogućnosti što jeftinija te ona koja su pogodna za ponovnu upotrebu (Drmić i Jambrak, 2010). Za ekstrakciju se najviše koriste heksan, metanol, etanol, aceton i etil acetat. Organski spojevi se bolje otapaju u organskim otapalima nego u vodi te se stoga iz vodenih otopina ili suspenzija sirove tvari ekstrahiraju organskim otapalima odnosno u organsku fazu. Nakon provođenja ekstrakcije, otapalo je potrebno ukloniti. Postoje razni načini kako se može otapalo ukloniti npr. destilacije, otparavanje ili neka druga prikladnija tehnološka operacija (Drmić i Jambrak, 2010).

2.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija

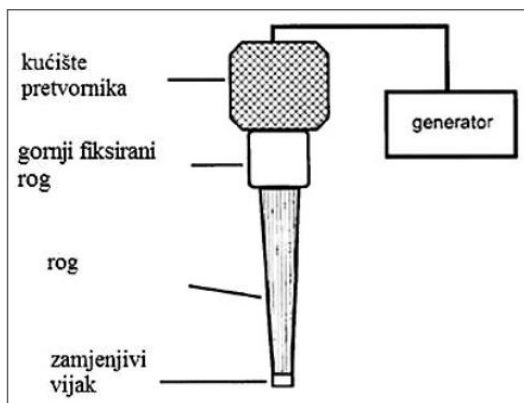
Ultrazvučna ekstrakcija je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE - „Ultrasound assisted extraction“). UAE ima sve veću važnost kao tehnološka operacija u prehrambenoj industriji zbog povećanja iskorištenja ekstrakcije komponenata iz biljnog i životinjskog materijala. Također, UAE je jednostavnija, učinkovitija i jeftinija tehnika ekstrakcije u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije (Wei i Yang, 2014), ali i u usporedbi s mikrovalnom ekstrakcijom i ekstrakcijom superkritičnim fluidom (Sun i sur., 2011). Mehanički učinci ultrazvuka prouzrokuju veće prodiranje otapala u stanične materijale zbog oštećenja bioloških staničnih stijenki te je time poboljšán transfer mase tj. otpuštanje sadržaja iz stanice (Herceg, 2009) što je ključna pojava koja povećava iskorištenje i brzinu ekstrakcije (Cravotto i Binello, 2016). Primjenom ultrazvučne ekstrakcije troši se manje otapala, visoka je ponovljivost ekstrakcije, ekstrakcija se može provesti pri nižim temperaturama (Wei i Yang, 2014), a smanjuje se i vrijeme ekstrakcije što su potvrdili Grassino i sur. (2015) koji su u svom istraživanju ekstrahirali pektin iz otpadaka rajčice dvjema metodama:

konvencionalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom, a rezultati pokazuju kao se ultrazvučnom ekstrakcijom dobiva kvalitetniji ekstrakt pektina te se u kraćem vremenskom periodu (15 min) dobije približna količina pektina kao i kada se ekstrakcija vrši konvencionalnom metodom (1440 min). UAE se smatra „zelenom ekstrakcijskom metodom“ (Anticono i sur.,2020) zbog toga što se mogu primijeniti ekološki prihvatljivija otapala, ali i zbog prije navedenih razloga. Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija je vrijedan alat u prehrambeno procesnom inženjerstvu te se sve više primjenjuje za dobivanje visoko vrijednih spojeva (npr. polifenoli, antocijani, aromatske tvari, polisaharidi i funkcionalni spojevi) koji zbog svojih svojstava pozitivno utječu na ljudski organizam te bi se primjena ultrazvučne ekstrakcije mogla iskoristiti i za povećanje vrijednosti prehrambenih proizvoda tako što bi se upotrijebili nusproizvodi, na primjer kora citrusa bogata je flavonoidima (Sun i sur. 2011), polifenoli su prisutni u kori banane i ljuski luka (Antolić,2020) te u pulpi jabuke koja zaostaje nakon proizvodnje cider-a (Virot i sur.,2010), a koji bi se također mogli upotrijebiti i u farmaceutskoj industriji. Djelovanjem ultrazvuk pri određenim uvjetima moguće je sigurno ekstrahirati termolabilne i nestabilne komponente što ultrazvučnu ekstrakciju čini potencijalnom tehnikom kojom bi se izbjegla degradacija termosenzibilnih komponenata (Chemat i sur., 2017). Za uspješnu provedbu ekstrakcije potpomognuta ultrazvukom važni su sljedeći procesni parametri: snaga ultrazvuka, frekvencija, interakcija uzorka i otapala, temperatura ekstrakcije te karakteristike reaktora. Ultrazvučna ekstrakcija može se odvijati u ultrazvučnoj kupelji ili s uronjenom sondom. Ultrazvučna kupelj je posuda koja je ispunjena procesnim medijem sa pretvaračem vezanim na bazu (Slika 8.).



Slika 8. Ultrazvučna kupelj (Brnčić i sur., 2009)

Sustav ultrazvučne sonde sastavljen je od jednog ili više metalnih klinova koji su vezani na pretvarač čime se osigurava intenzitet visoke snage te je ultrazvučna sonda direktno uronjena u otopinu (Slika 9.).



Slika 9. Sustav s direktno uronjenom sondom (Brnčić i sur., 2009)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorak

Prilikom izrade ovog rada korišteni su osušeni usitnjeni cvjetovi industrijske konoplje (*Cannabis sativa L. subsp. sativa*) ubrani u okolici Virovitice 2020. godine.

3.1.2. Kemikalije

96 %-tni etanol, vodene otopine amonijevog formijata, mravlja kiselina, vodena otopina acetonitrila, destilirana voda

3.1.3. Aparatura i pribor

Dekarboksilacija uzorka industrijske konoplje

- laboratorijski sušionik, INKO (Zagreb, Hrvatska)
- plitka limena posuda
- tehnička vaga (WLC 2/A2/C/2), RADWAG (Poljska)
- aluminijska folija

Ekstrakcija etanolom uz zračno hladilo i uparavanje ekstrakta

- analitička vaga (Analytical plus), Ohaus (SAD)
- boca štrcaljka

- filter papir
- Falcon epruveta (50 mL)
- laboratorijski pribor: mufa, teflonski magnet, stezaljka, željezni stalak
- magnetska mješalica s ugrađenom grijačom pločom
- metalna žlica
- rotacijski uparivač (Hei-VAP), Heidolph (Njemačka)
- stakleno laboratorijsko posuđe- boca za odsisavanje (500 mL), laboratorijska čaša (600 mL), menzura (500 mL), stakleni štapić, tikvica s okruglim dnom (500 mL), zračno hladilo, lijevak, satno staklo
- tehnička vaga (WLC 2/A2/C/2), RADWAG (Poljska)
- termometar (ETS-D5), IKA® (Njemačka)
- vakuumski koncentrator

Ultrazvučna ekstrakcija uzorka konoplje, vakumska filtracija i uparavanje ekstrakta

- analitička vaga (Analytical plus), Ohaus (SAD)
- boca štrcaljka
- Büchnerov lijevak
- filter papir
- Falcon epruveta (50 mL)
- metalna žlica
- plastična posuda
- rashladni ulošci
- rotacijski uparivač (Hei-VAP), Heidolph (Njemačka)
- stakleno laboratorijsko posuđe- laboratorijska čaša (600 mL), stakleni štapić, menzura (500 mL), tikvica s okruglim dnom (500 mL i 1 L), boca za odsisavanje (500 mL i 700 mL)
- tehnička vaga (WLC 2/A2/C/2), RADWAG (Poljska)
- termometar
- ultrazvučni procesor (UP400St), Hielschler (Njemačka) koji se sastoji od sonde (Ø 22, 2 mm)
- vakuumski koncentrator

Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti

- analitička vaga
- HPLC posude za uzorke s čepovima (vials)
- kapaljka
- laboratorijska čaša
- mikrofilteri
- odmjerna tikvica (10 mL)
- plastične šprice (2 mL)
- špatulica
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (1260 Infinity), Agilent Technologies (SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Dekarboksilacija uzorka konoplje

Proces dekarboksilacije uzorka konoplje provodi se prema radu Moreno i sur. (2020). U limenu posudu na tehničkoj vagi izvaže se 70 g uzorka osušenih i usitnjenih cvjetova industrijske konoplje te se ravnomjerno raspoređi po dnu posude koja se zatim pokrije aluminijskom folijom i stavi u laboratorijski sušionik na temperaturu od 120 °C i u vremenskom periodu od 30 minuta. Zatim se posuda s pokrivenim uzorkom hladi dok ne postigne sobnu temperaturu (~23 °C).

3.2.2. Kontrolna ekstrakcija etanolom uz zračno hladilo i kontrolna ultrazvučna ekstrakcija

Tablica 2. Plan kontrolne ekstrakcije

uzorak	suha tvar(g):etanol 96 % (mL)	vrijeme (min)	proveden proces dekarboksilacije prije ekstrakcije
k1	2:100	50	ne
k2	2:100	50	da
k3	50:375	6	ne

Ekstrakcija etanolom uz zračno hladilo se provodi, prema radu De Vita i sur. (2020), na uzorcima konoplje koji su dekarboksilirani te na uzorcima koji nisu prošli postupak dekarboksilacije, a provodi se po istom principu izvođenja. Ti uzorci predstavljaju kontrolne uzorke te se označuju kao k1- uzorak bez provedene dekarboksilacije, i k2- uzorak kod kojeg je proveden postupak dekarboksilacije. Na tehničkoj vagi izvaže se 2 g uzorka konoplje te se kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom u koju se doda 100 mL etanola (96 %) i magnet koji služi za miješanje otopine. Okrugla tikvica stavi se u vodenu kupelj na magnetski mješač s grijačem pločom (slika 10.). Ekstrakcija uz zračno hladilo se provodi 50 minuta na temperaturi od 90 °C. Zatim se otopina profiltrira i upari se u rotacijskom uparivaču pri vakuumu (350 mbar) i temperaturi od 60 °C tako da ostane oko 40 mL ekstrakta. Tako dobiveni ekstrakt se prebaci u Falcon epruvetu čiju masu smo prethodno izvagali na analitičkoj vagi i zapisali te se provodi daljnji postupak uparavanja uzorka do suhoga u vakuumskom koncentratoru.



Slika 10. Ekstrakcija etanolom uz zračno hladilo

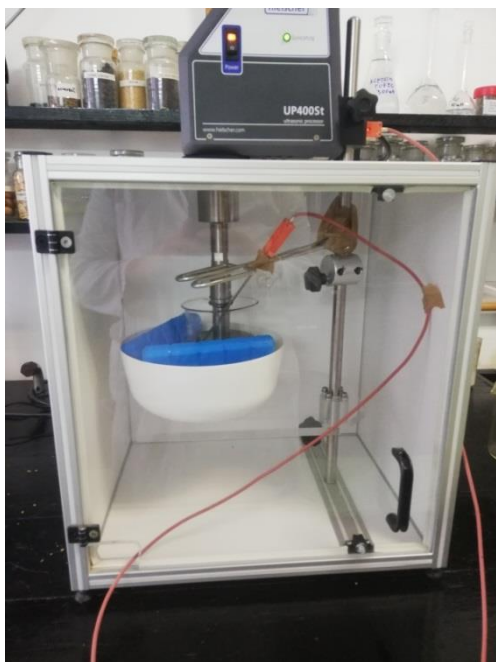
Uzorak k3 predstavlja kontrolni uzorak ultrazvučne ekstrakcije pri čemu se ekstrakcija provodi na uzorku konoplje koji nije prošao proces dekarboksilacije. Ultrazvučna ekstrakcija provodi se uranjenjem sonde ultrazvuka u laboratorijsku čašu u kojoj je pripremljeni uzorak konoplje (opis postupka pripreme uzorka opisan u poglavlju 3.2.3.) pri uvjetima koji su navedeni u tablici 2..

3.2.3. Ultrazvučna ekstrakcija uzorka konoplje

Na tehničkoj vagi se u laboratorijsku čašu (600 mL) izvaže određena masa uzorka konoplje. Određen volumen etanola (96 %) odmjerjen pomoću menzure prebaci se u laboratorijsku čašu s uzorkom te se dobivena smjesa promiješa staklenim štapićem u svrhu homogenizacije. Omjeri suhe tvari i etanola prikazani su u tablici 3.. Kod svih uzorka je provedena dekarboksilacija (opisana u poglavlju 3.2.1.) prije procesa ekstrakcije. Zatim se tako pripremljeni uzorak stavlja u vodenu kupelj, koja se sastoji od plastične posude s hladnom vodom i rashladnim ulošcima, te se u laboratorijsku čašu uranja ultrazvučna sonda, oko 2 cm, na displeju se podese parametri (100 % amplituda i snaga ~ 110 W) i pokreće se ultrazvuk (slika 11.). Ultrazvučna ekstrakcija provodi se određeno vrijeme prema planu pokusa što je prikazano u tablici 3.. Nakon ultrazvučne ekstrakcije najprije se izmjeri temperatura uzorka, a zatim se dobiveni ekstrakt profiltrira postupkom vakuum filtracije te se tako dobiveni filtrat uparava najprije na vakuumsko rotacijskom uparivaču, tako da ostane oko 40 mL ekstrakta, pri 60 °C i 250 mbar (slika 12.), kvantitativno prenese u Falcon epruvetu, koja je prethodno izvagana na analitičkoj vagi, te se dodatno uparava do suhog u vakuumskom koncentratoru.

Tablica 3. Plan pokusa

uzorak	suha tvar(g):etanola 96 % (mL)	vrijeme (s)
1	50:375	106
2	50:250	180
3	50:500	180
4	50:552	360
5	50:375	360
6	50:375	360
7	50:375	360
8	50:198	360
9	50:375	360
10	50:375	360
11	50:250	540
12	50:500	540
13	50:375	614



Slika 11. Ultrazvučna ekstrakcija uzorka konoplje



Slika 12. Uparavanje ekstrakta na rotirajućem uparivaču

3.2.4. Određivanje kanabinoida primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Do suhog upareni ekstrakt je tamnozeleno smolaste konzistencije te je potrebno, prije same provedbe kvantifikacije i identifikacije kanabinoida primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, pripremiti otopinu poznate koncentracije tako što se na analitičkoj vagi odvaži masa od 0,25 g u odmjernu tikvicu od 10 mL te se najprije doda mala količina etanola (96 %) kako bi se dobiveni suhi ekstrakt otopio te se odmijerna tikvica nadopuni etanolom (96 %) do oznake. Tako pripremljena otopina ekstrakta predstavlja uzorak za analizu te se pomoću šprice i mikrofiltera prebaci u HPLC vialu i podvrgava kromatografskoj analizi. U analizi je korištena kromatografska kolona Kinetix® C18 (150x4,6 mm, 2,6 µm, 100 Å) (Phenomenex, SAD). U sustav se automatskim injektorom injektira 20 µL uzorka, u dva ponavljanja. Mobilna faza je dvokomponentna (A i B) te se sastoji od A: 20 mM amonijevog formijata u mravljoj kiselini (pH 2,9) i B: acetonitrila. Provodi se izokratna elucija (A:B=24:76) pri protoku od 1,5 mL min⁻¹ i temperaturi kolone 40 °C. Detekcija analita to jest kanabinoida vrši se pomoću detektora s nizom dioda (engl. diode array detector, DAD) snimanjem pri valnoj duljini od 228 nm.

Identifikacija pikova na kromatogramima vršila se usporedbom retencijskih vremena poznatih čistih standarada s retencijskim vremenima uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U svijetu je sve veće zanimanje za uzgoj industrijske konoplje zbog njezine velike iskoristivosti u različitim područjima te iz tog razloga postaje sveprisutnija u našim životima, a poseban značaj ima u medicini zbog svog kemijskog sastava odnosno bioaktivnih spojeva koji bi mogli biti potencijalni lijek za različite bolesti. CBD ima nekoliko pozitivnih farmakoloških svojstava koji ga čine vrlo zanimljivim za korištenje u terapijske svrhe kod upala, dijabetesa, raka i neurodegenerativnih bolesti (Izzo i sur., 2009). FDA je 2018. godine na listu lijekova uvrstila lijek „Epidiolex“ kao lijek za određeni oblik epilepsije, a u čijem sastavu se nalazi više od 98 % kanabidiol (CBD) (Arzimanoglou i sur., 2020). Sušenje i homogenizacija praćena ultrazvučnom ekstrakcijom uz korištenje organskih otapala predstavlja dokazano efektivnu, ponovljivu i jednostavnu metodu pripreme uzorka za istraživanje kanabinoida (Hädener i sur., 2019). Cilj ovog rada bio je utvrditi količinu

ekstrahiranih kanabinoida prvenstveno kanabidiola i kanabidiolne kiseline, optimizacija procesa ekstrakcije kako bi se povećalo iskorištenje i smanjilo vrijeme trajanja ekstrakcije.

4.1. Dekarboksilacija

Dekarboksilacija je kemijski procesu u kojem dolazi do uklanjanja karboksilne skupine nekog spoja pri čemu se oslobađa CO₂. Dekarboksilacija predstavlja važan korak za izolaciju glavnih komponenata u konoplji kao što su kanabidiol, kanabinol, kanabigerol i drugi zbog toga što se u biljci konoplji kanabinoidi u značajnoj mjeri nalaze u formi karboksilnih kiselina, na primjer kanabidiolna kiselina (CBDA), i u tom obliku su nestabilni te ih se procesom neenzimske dekarboksilacije tj. zagrijavanjem pri određenoj povišenoj temperaturi kroz određeni vremenski period može lako prevesti u neutralniji stabilniji oblik, npr. kanabidiol (CBD). Dekarboksilacija se prirodno odvija na sobnoj temperaturi te su stoga vrlo važni čimbenici na količinu kanabinoida u biljci prije same ekstrakcije uvjeti i vrijeme skladištenja (Lindholst, 2010); Moreno i sur., 2020). Prema istraživanju Zaharia i sur. (2020) te Moreno i sur. (2020) konverzija CBDA u CBD pri nižim temperaturama (75°C- 80 °C) je vrlo spora te kako se povisuje temperatura postaje sve značajnija. Sam proces dekarboksilacije može se vršiti na biljci (svježem ili suhom uzorku) ili ekstraktu.

4.2. Kontrolna ekstrakcija etanolom uz zračno hladilo i kontrolna ultrazvučna ekstrakcija

Uzorci k1, k2 i k3 predstavljaju kontrolne uzorke. Uzorci k1 i k2 podvrgnuti su konvencionalnoj ekstrakciji etanolom uz zračno hladilo, dok je kod uzorak k3 provedena ultrazvučna ekstrakcija, a u tablici 4. prikazane su mase dobivenih ekstrakata te maseni udio CBDA, CBD i ukupnih kanabinoida u ekstraktu. Kod uzorka k3 ekstrahirala se najveća masa ekstrakta te je ekstrakcija provedena u kraćem vremenskom periodu i pri nižoj temperaturi u odnosu na uzorke k1 i k2. Udio CBDA je veći u uzorku k1 koji prije same ekstrakcije nije prošla proces dekarboksilacije nego u dekarboksiliranom uzorku k2, s obzirom na činjenicu da se u biljci kanabinoidi nalaze u formi karboksilne kiseline što je navedeno u poglavlju 4.1..

Tablica 4. Rezultati mase ekstrakta (smole) te maseni udio CBDA, CBD i ukupnih kanabinoida kontrolnih uzoraka

uzorak	masa ekstrakta (smole) (g)	maseni udio (mg/g ekstrakta (smole))		
		CBDA	CBD	ukupni kanabinoidi
k1	0,78	11,19	2,79	17,55
k2	0,30	3,14	10,57	18,58
k3	3,80	13,26	15,28	37,71

4.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

U ovom radu, prema planu pokusa, provodila se ultrazvučna ekstrakcija kanabinoida odnosno kanabidiola (CBD) iz industrijske konoplje. Prema planu eksperimenta provedeno je 13 pokusa, pri različitim zadanim uvjetima, a središnja točka pokus je pokus s omjerom suhe tvari (g):etanola (mL) -50:375 i vremenu- 540 s koji je ponavljan 5 puta (uzorci 5, 6, 7, 9, 10), te su se tako dobivenim ekstraktima određivala kemijska svojstva (udio ukupnih kanabinoida, udio kanabidiolne kiseline (CBDA) i kanabidiola (CBA)) i iskorištenje procesa. Nakon provedene dekarboksilacije, ekstrakcije te uparavanja ekstrakta do suhog vrši se vaganje Falcon epruveta te se dobivaju sljedeći rezultati masa prikazanih u tablici 4. Masa ekstrakt (m_e) predstavlja razliku mase Falcon epruvete nakon provedenog pokusa (m_{fe}) i mase prazne Falcon epruvete (m_f).

$$m_e = m_{fe} - m_f$$

Tablica 5. Rezultati mase ekstrakta (smole) i maseni udio CBDA, CBD i ukupnih kanabinoida u ekstraktu (smoli)

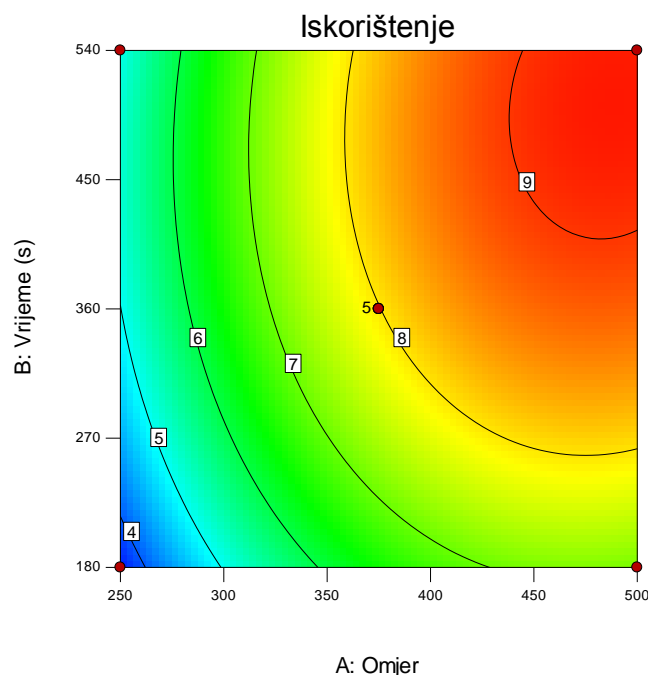
uzorak	masa ekstrakta (smole) (m_e) (g)	maseni udio (mg/g ekstrakta (smole))		
		CBDA	CBD*	ukupni kanabinoidi**
1	2,47	12,30	18,44	41,36
2	1,90	4,26	14,47	25,28
3	3,77	23,96	5,86	37,91
4	4,15	5,36	15,04	27,84
5	4,65	4,00	12,25	21,98
6	4,33	6,41	14,95	28,95
7	3,60	3,74	14,87	25,29
8	1,71	13,31	17,55	41,62
9	3,48	8,69	15,89	33,52
10	3,90	10,02	16,32	35,59
11	2,18	10,53	17,37	38,25
12	4,37	9,70	16,56	36,60
13	4,32	7,68	16,85	34,31

*statistički značajan utjecaj omjera suhe tvari i etanola te duljine trajanja ekstrakcije na udio spoja ($p \leq 0,05$)

** statistički značajan utjecaj omjera suhe tvari i etanola na udio spoja ($p \leq 0,05$)

Dobiveni eksperimentalni podaci obrađeni su u programu Design Expert v.11 software (StatEase, Minneapolis, USA). Proveden je statistički test ANOVA koji uključuju dvije nezvisne varijable testirane na tri razine (tablica 3.): omjer suhe tvari i etanola (50:250, 50:375 i 50:500) te vrijeme tretmana ultrazvukom (180, 360 i 540 sekundi) s ukupno 13 provedenih pokusa i 5 središnjih točaka, a određivao se njihov utjecaj na udio CBDA, CBD-a, ukupnih kanabinoida te iskorištenje procesa ekstrakcije. Granica statističke značajnosti je vrijednost $p \leq 0,05$. Dobiveni ekstrakti, čije su dobivene mase prikazane u tablici 5., su podvrgnuti daljnjoj analizi kako bi se procijenila količina ukupnih ekstrahiranih kanabinoida odnosno kanabidiolne kiseline (CBDA) i kanabidiola (CBD). Iz dobivenih rezultata, prikazanih u tablicama 4. i 5., može se vidjeti da se provedbom ultrazvučne ekstrakcije (uzorci od k3 do 13) dobije odnosno ekstrahira se veća masa tvari nego provedbom klasične ekstrakcije etanolom sa zračnim hladilom (uzorci k1 i k2). Masa ekstrakta uzorka 5, 6, 7, 9, 10 pri omjeru suhe tvari i etanola 50:375 i vremenu od 360 sekundi varira od 3,48 g do 4,65 g te je ujedno najveća masa dobivena ekstrakcijom masa uzorka 5. Najmanje ekstrakta se dobije pri omjeru suhe tvari i etanola 50:198 pri vremenu od šest minute, a masa dobivenog ekstrakta iznosi 1,71 g. Ultrazvučnom ekstrakcijom smanjeno je vrijeme trajanja procesa ekstrakcije te se štedi odnosno koristi se manja količina otapala za veću masu uzorka pri čemu se dobiva više ekstrahirane tvari. Do sličnog zaključka došli su Agarwal i sur. (2018) u svom istraživanju te su zapazili da se ultrazvučnom ekstrakcijom može dobiti dvostruko veće iskorištenje nego provedbom konvencionalne ekstrakcije što potvrđuje da primjena ultrazvuka štedi vrijeme, energiju i smanjuje troškove. Veća masa ekstrakta u kraćem vremenskom periodu posljedica je mehaničkog djelovanja ultrazvučnih valova na staničnu stijenku biljnog materijala (Khan i sur., 2010; Agarwal i sur. 2018). Također prilikom provedbe ekstrakcije potpomognute ultrazvukom dolazi do ne znatnog povišenja temperature uzorka, sa sobne temperature (23 °C) na približno najviše 38 °C što varira od uzorka do uzorka.

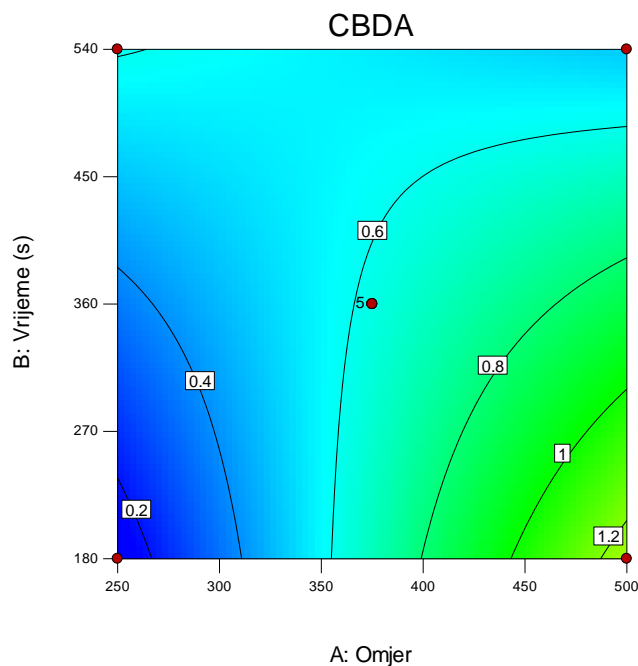
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
Iskorištenje
● Design Points
9.3
3.41
X1 = A: Omjer
X2 = B: Vrijeme



Slika 13. Grafički prikaz iskorištenja procesa

Prema grafičkom prikazu (slika 13.) najmanje iskorištenje procesa od 3,41 % je pri uvjetima omjer suhe tvari:etanol 50:250 i vremenu provedbe ultrazvučne ekstrakcije od 180 sekundi, dok je najveće iskorištenje procesa od 9,3 % pri uvjetima 50:500 i vremenu od 540 sekundi, dok je iskorištenje procesa središnje točke pokusa (omjer suhe tvari:etanol 50:375 i 360 sekundi) je 8 %. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da se povećanjem omjera suhe tvar:etanol te produljenjem trajanja ultrazvučne ekstrakcije povećava iskorištenje ekstrakcije kanabinoida. Statistički značajnu vrijednost na iskorištenje ekstrakcije imaju i omjer suhe tvari i etanola ($p=0,000$) i duljina trajanja ($p=0,029$) ultrazvučne. Za daljnju optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije potrebno je provesti pokuse koji bi uključivali veće omjere mase suhe tvari i etanola te pri kojima bi ekstrakcija trajala duže od 540 sekundi kako bi se mogli utvrditi optimalni uvjeti ekstrakcije za ekstrakciju koja bi omogućila najveći prinos ekstrakta s obzirom na energetsku i financijsku isplativost. Prema radu De Vita i sur. (2019) u kojem su uspoređivali iskorištenje ekstrakcije glavnih kanabinoida primjenom različitih metoda ekstrakcije, ultrazvučna ekstrakcija se pokazala kao punom boljom metodom za ekstrakciju kanabinoida u odnosu na iskorištenje ekstrakcije potpomognute mikrovalovima.

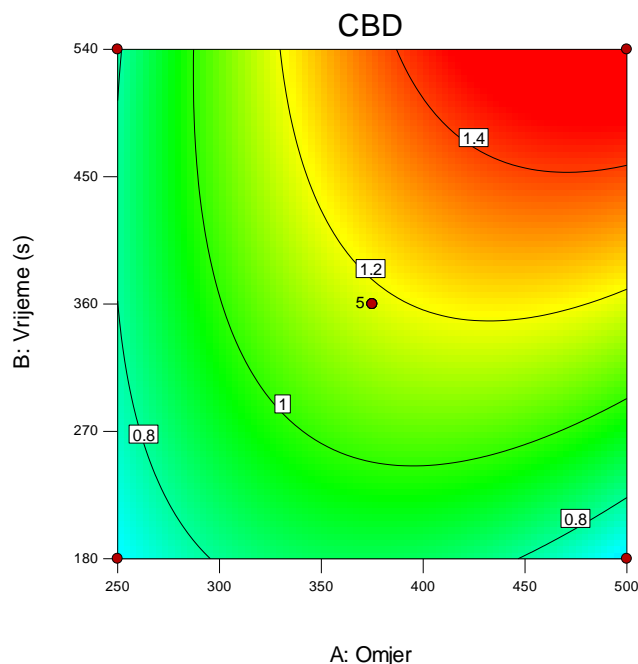
Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 CBDA
 ● Design Points
 1.80876
 0.1622
 X1 = A: Omjer
 X2 = B: Vrijeme



Slika 14. Grafički prikaz udjela kanabidiolne kiseline (CBDA)

U tablici 5. prikazan je maseni udio kanabidiolne kiseline te se može zamijetiti kako njezin udio varira od $3,74 \text{ mg g}^{-1}$ ekstrakta u uzorku 7 do $23,96 \text{ mg g}^{-1}$ ekstrakta u uzorku 3.. Prema grafičkom prikazu na slici 14. može se uočiti kako udio CBDA raste s obzirom na povećanje omjera suhe tvari i etanola, ali on ($p=0,063$) nema značajan statistički utjecaj na udjel CBDA, kao što ni duljina trajanja procesa ekstrakcije nema statistički značajnu vrijednost na udio kanabidiolne kiseline ($p=0,555$). U središnjoj točki pokusa (uzorci 5, 6, 7, 9, 10) udio je je veći od 0,65. Kako bi se još više smanjio udio CBDA u uzorcima potrebno je produžiti vrijeme trajanja procesa dekarboksilacije.

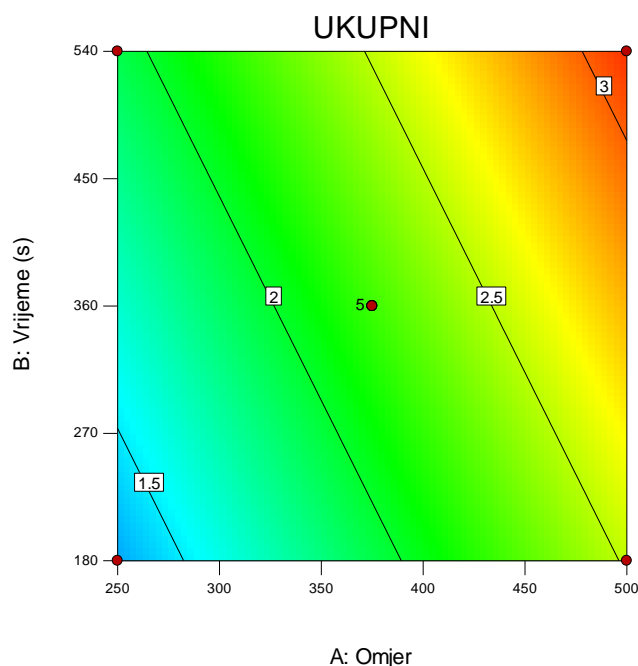
Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 CBD
 ● Design Points
 1.45698
 0.441985
 X1 = A: Omjer
 X2 = B: Vrijeme



Slika 15. Grafički prikaz udjela kanabidiola (CBD)

Udio kanabidiola (CBD) u ekstraktu (tablica 5.) varira od 5,86 mg g⁻¹ ekstrakta do 18,44 mg g⁻¹ ekstrakta. Prosječan udio uzorcima središnje točke pokusa je oko 14,86 mg g⁻¹ ekstrakta. Prema grafičkom prikazu na slici 15. koji prikazuje utjecaj omjera i suhe tvari te vremena na količinu CBD-a može se uočiti porast udjela CBD-a s obzirom na vrijeme trajanja ultrazvučne ekstrakcije te povećanjem omjera suhe tvari i etanola. Provedbom statističke obrade utvrdilo se da omjer suhe tvari i etanola te produljenje trajanja ultrazvučne ekstrakcije ima statistički značajan utjecaj na udio CBD-a (omjer (p=0,018) i vrijeme (p= 0,005)). S obzirom na navedenu činjenicu u poglavlju 4.1. kako se kanabinoidi u konoplji nalaze u formi kiseline te da dekarboksilacijom prelaze u stabilniji oblik može se primijetiti da je, ako usporedimo grafički prikaz udjela kanabidiolne kiseline (slika 14.) i grafički prikaz kanabidiola (slika 15.), u uzorku 12 odnosno pri uvjetima pokusa omjer suhe stvari:etanol 50:500 i vremenu ultrazvučne ekstrakcije 540 sekundi puno veći udio kanabidiola (približno oko 1,45) nego što je udio kanabidiolne kiseline (oko 0,5). Također možemo zamjetiti da je udio kanabidiolne kiseline za 2,75 puta manji od udjela kanabidiola u uzorku 2. Iz navedenih usporedbi možemo zaključiti da je udio CBDA u uzorcima ekstrakta za oko 3 puta manji od udjela CBD-a.

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
UKUPNI
● Design Points
3.19751
0.970815
X1 = A: Omjer
X2 = B: Vrijeme



Slika 16. Grafički prikaz udjela ukupnih kanabinoida

Iz grafičkog prikaza prikazanog na slici 16. možemo uočiti da se povećanjem trajanja ultrazvučne ekstrakcije, a pri istom omjeru suhe tvari i etanola povećava i udio kanabinoida u uzorku. Tako na primjer udio ukupnih kanabinoida pri omjeru suhe tvari i etanola 50:250 i trajanju ultrazvučne ekstrakcije od 180 sekundi iznosi 0,97, a pri trajanju ultrazvučne ekstrakcije od 540 sekundi udio iznosi oko 1,94 te pri omjeru suhe tvari i etanolu od 50 : 500 udio pri trajanju od 180 sekundi iznosi približno 2,53, a pri 540 sekundi oko 3,19, ali taj utjecaj nije statistički značajan jer je p-vrijednost veća (0,069) od zadane granične vrijednosti. Također se povećanjem omjera suhe tvari i etanola povećava i udio ukupnih kanabinoida u uzorku. Udio kanabinoida u središnjoj točki pokusa iznosi oko 2,25. Možemo zaključiti da se povećanjem volumena otapala tj. etanola povećava se i masa ekstrahiranih kanabinoida što se može prepisati kemijskom strukturi molekula, kao što je navedeno u poglavlju 2.1.3. kanabinoidi su nepolarne molekule i činjenici da se slično otapa u sličnom jer je etanol također nepolarnija molekula u odnosu na neka druga polarnija otapala te se etanol, uz metanol, smatra kao najprikladnije otapalo za ekstrakciju kanabinoida (Brighenti i sur. 2017; Baranauskaitė i sur., 2020). Omjer suhe tvari i etanola je u ovom istraživanju ima značajan statistički utjecaj na udio ukupnih kanabinoida ($p \leq 0,05$). Agarwal i sur. (2018) u svojem su radu zaključili kako se primjena ultrazvuka pokazala vrlo učinkovitom za ekstrakciju kanabinoida iz konoplje zbog veće količine kanabinoida u odnosu na ekstrakciju provedenu na konvencionalan način, što je potvrđeno na HPLC kromatogramima.

5. ZAKLJUČAK

- Provedbom ultrazvučne ekstrakcije dobije se veća masa ekstrakta nego što se dobije provedbom kontrolne ekstrakcije etanolom uz zračno hladilo, čime se i povećava iskoristivost samog procesa ekstrakcije. Vrijeme i omjer suhe tvari i etanola imaju statistički značajan utjecaj na iskorištenje procesa ekstrakcije ($p \leq 0,05$).
- U dekarboksiliranim uzorcima udio kanabidiola (CBD) je za oko 3 puta veća od udjela kanabidiolne kiseline (CBDA). Vrijeme te omjer suhe tvari i etanola imaju statistički značajnu vrijednost na udio CBD-a ($p \leq 0,05$), dok za udio CBDA to nije utvrđeno.
- Povećanjem omjera suhe tvari i etanola povećava se i udio ukupnih kanabinoida u uzorku te ono ima statistički značajnu vrijednost ($p \leq 0,05$).
- Za daljnju optimizaciju ultrazvučne ekstrakcije potrebno je provesti mjerenja koja bi uključivala veće omjere mase suhe tvari i etanola te produljiti vrijeme ekstrakcije.

6. LITERATURA

1. Agarwal C., Máthé K., Hofmann T., Csóka L. (2018) Ultrasound-assisted extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. optimized by response surface methodology. *Journal of Food Science* **83** (3): 700-710.
2. Anticono M., Blesa J., Frigola A., Esteve M. J. (2020) High biological value compounds extraction from citrus waste with non-conventional methods. *Foods* **9** (6): 811-835.
3. Antolić M. (2020) Karakterizacija polifenola iz ljuske luka i kore banane primjenom postupka frakcioniranja, završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet. < <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:158477>>
4. Arzimanoglou A., Brandl U., Cross J. H., Gil-Nagel A., Lagae L., Landmark C. J., Specchio N., Nabbout R., Thiele E. A., Gubbay O., ostali članovi The Cannabinoids International Experts Panel (2020) Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* **22** (1): 1–14.
5. Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology* **58**: 315-348.
6. Baranauskaite J., Marksa M., Ivanauskas L., Vitkevicius K., Liaudanskas M., Skyrius V., Baranauskas A. (2020) Development of extraction technique and GC/FID method for the analysis of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. spp. *santicha* (hemp). *Phytochemical Analysis* **31** (4): 516-521.
7. Božić-Ostojić Lj., Antunović S., Vujčić B., Martić M. (2015) Industrijska konoplja – biljka prošlosti i budućnosti. 8th International scientific/professional conference „Agriculture in nature and environment protection, Vukovar, Hrvatska, str. 133-137.
8. Brighenti V., Pellati F., Steinbach M., Marana D., Benvenuti S. (2017) Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **143**: 228–236
9. Brnčić M., Markučić D., Omelić M., Tripalo B., Ježek D. (2009) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri otkrivanju stranih tijela u prehrambenim sustavima. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4**: 18-22.
10. Brnčić M., Tripalo B., Penava A., Karlović D., Ježek D., Topić D.V., Bosiljkov T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4** (1-2): 32-37
11. Butorac, J. (2009.) Predivo bilje. Kugler, d. o. o., Zagreb, str. 5-23.

12. Cerino P., Buonerba C., Cannazza G., D'Auria J., Ottoni E., Fulgione A., Di Stasio A., Pierrri B., Gallo, A. (2021) A review of hemp as food and nutritional supplement. *Cannabis and cannabinoid research* **6** (1): 19–27.
13. Chemat S., Aissa A., Boumechhour A., Arous O., Ait-Amar H. (2017) Extraction mechanism of ultrasound assisted extraction and its effect on higher yielding and purity of artemisinin crystals from *Artemisia annua* L. leaves. *Ultrasonics sonochemistry* **34**: 310–316.
14. Cravotto G., Binello A. (2016) Low-frequency, high-power ultrasound-assisted extraction of food components. U: Innovative food processing technologies -Series in Food Science, Technology and Nutrition, Knoerzer K., Juliano P., Smithers G., ur., Woodhead Publishing, Elsevier Ltd., str. 3-29
15. De Vita D., Madia V. N., Tudino V., Saccoliti F., De Leo A., Messore A., Roscilli P., Botto A., Pindinello I., Santilli G., Scipione L., Costi R., Di Santo R. (2020) Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis. *Natural product research* **34** (20): 2952–2958.
16. Di Marzo V. (2008) Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nature Reviews Drug Discovery* **7**: 438–455
17. Drmić H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of Food Science and Technology* **2** (2): 22-33.
18. EIHA (2018), European Industrial Hemp Association (EIHA) Hemp cultivation & production in Europe in 2018 <[2018-Hemp-agri-report.pdf \(eiha.org\)](https://www.eiha.org/2018-Hemp-agri-report.pdf)> Pristupljeno 14. Srpnja 2021.
19. Foster B., Abramovici H., Harris C. (2019) Cannabis and cannabinoids: kinetics and interactions. *The American journal of medicine* **132** (11): 1266-1270.
20. Giroud C. (2002) Analysis of cannabinoids in hemp plants. *Chimia* **56**: 80-83.
21. Grassino Ninčević A., Brnčić M., Vikić-Topić D., Roca S., Dent M., Rimac Brnčić S. (2015) Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry* **198**: 93-100.
22. Hädener M., König S., Weinmann W. (2019) Quantitative determination of CBD and THC and their acid precursors in confiscated cannabis samples by HPLC-DAD. *Forensic Science International* **299**: 142-150.
23. HAH (2011) Znanstveno mišljenje o utjecaju na zdravlje proizvoda od konoplje koji se konzumiraju (ulje, sjemenke) <[ZNANSTVENO MIŠLJENJE. Znanstveno mišljenje o utjecaju na zdravlje proizvoda od konoplje koji se konzumiraju \(ulje, sjemenke\). - PDF Free Download \(docplayer.net\)](#)> Pristupljeno 24. travnja 2021.

24. Herceg Z. (2011) *Procesi u prehrambenoj industriji*. Zagreb, Plejada d.o.o., str 98-101.
25. Herceg Z., Brnčić M., Režek Jambrak A., Rimac Brnčić S., Badanjak M., Sokolić I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo* **59** (1): 65-69.
26. Herceg Z., Režek Jambrak A., Rimac Brnčić S., Krešić G. (2009) *Procesi konzerviranja hrane-Novi postupci*. U: *Procesi konzerviranja hrane-Novi postupci*, Herceg Z.,ur., Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, str. 55-67.
27. ITIS (2021), ITIS – Integrated Taxonomic Information System, https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19109#null | pristupljeno 19.3.2021.
28. Izzo A. A., Borrelli F., Capasso R., Di Mavzo V., Mechoulam R. (2009) Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**: 515 – 527.
29. Khan M. K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A-S., Dangles O., Chemat F. (2010) Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry* **119** (2): 851–858.
30. Leadley C.E., Williams A. (2006) Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. U: *Food processing handbook*, Brennan J. G. ,ur., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim , str. 214-220.
31. Lelas V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* **56** (4): 311-330.
32. Lindholm C. (2010) Long term stability of cannabis resin and cannabis extracts. *Australian Journal of Forensic Sciences* **42** (3): 181-190.
33. Lovrić T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva*. Hinus, Zagreb, str. 283.
34. Lukačević I. A. (2016) *Industrijska konoplja- morfološka obilježja, uzgoj i uporaba, završni rad*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.
35. Martić A. (2018) *Mogućnosti uzgoja industrijske konoplje za sjeme u Općini Križ*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet <[urn:nbn:hr:204:540713](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:hr:204:540713)>
36. Moreno T., Dyer P., Tallon S. (2020) Cannabinoid decarboxylation: a comparative kinetic study. *Industrial & engineering chemistry process design and development*, **59** (46): 20307-20315.
37. Obranović M., Ozmec N. (2014) *Konoplja, praktični savjeti za zdravlje i ljepotu, Planetopija*, Zagreb

38. Pacher P., Kogan N. M., Mechoulam R. (2020) Beyond THC and endocannabinoids. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **60** : 637-659.
39. Raharjo T., Verpoorte R. (2004) Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: a review. *Phytochemical analysis* **15** (2): 79-94.
40. Režek Jambrak A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke, doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb.
41. Režek Jambrak A., Lelas V., Herceg Z., Badanjak M., Werner, Z. (2010) Primjena ultrazvuka visoke snage u sušenju voća i povrća. *Kemija u industriji* **59**(4): 169-177.
42. Rufino A. T., Ribeiro M., Sousa C., Judas F., Salgueiro L., Cavaleiro C., Mendes A. F. (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.
43. Russo E.B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* **163** (7): 1344-1364.
44. Sala F.J., Burgos J., Condón S., Lopez P., Raso J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New methods of food preservation by combined processes*, Gould G.W. ,ur., Blackie Academic i Professional, London, str. 176–204
45. Scheau C., Badarau I., Mihai L., Scheau A., Costache D.O., Constantin C., Calina D., Caruntu C., Costache R., Caruntu A. (2020) Cannabinoids in the pathophysiology of skin inflammation. *Molecules* **25** (3): 652-675.
46. Sun Y., Liu D., Chen J., Ye X., Yu D. (2011) Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-*trans*- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry* **18** (1): 243-249.
47. Šain A. (2019) Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.), diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, < <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:491416>>
48. Šimić D. (2018) Potencijali proizvodnje industrijske konoplje u Osječko-baranjskoj županiji, diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, < <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:784609>>
49. Virost M., Tomao V., Le Bourvellec C., Renard M.C.G. C., Chemat F. (2010) Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* **17**: 1066–1074.

50. Wei M-C., Yang Y-C. (2014) Extraction characteristics and kinetic studies of oleanolic and ursolic acids from *Hedyotis diffusa* under ultrasound-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology* **130**: 182–192.
51. Williams C. (2021) A review of research into the health benefits of cannabidiol (CBD), studentski seminar, *The Neighborhood Academy*, <https://www.theneighborhoodacademy.org/editoruploads/files/Carrington_Williams_-_Review_of_CBD_Health_Benefits.pdf> pristupljeno 23.8.2021.
52. Zaharia L. S., Trofine I., Vaireanu D-I., Dabija G. (2020) The influence of temperature and heating time on the decarboxylation of Δ^9 -THCA and CBDA in the cannabis inflorescences. *UPB Scientific Bulletin Series B* **82**(3):73-84
53. Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (2019) *Narodne novine* **39** (NN 39/2019)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Maja Jambrović

ime i prezime studenta