

# Različite metode ekstrakcije kanabinoida iz cvijeta industrijske konoplje (Cannabis sativa L.)

---

Vacka, Tonka

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:108062>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Tonka Vacka**  
0058213894

**RAZLIČITE METODE EKSTRAKCIJE**  
**KANABINOIDA IZ CVIJETA 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:** izv. prof. dr. sc. Marko Obranović

**Zagreb, 2023.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Različite metode ekstrakcije kanabinoida iz cvijeta industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Tonka Vacka, 0058213894

**Sažetak:** Danas se u industrijskoj konoplji (*Cannabis sativa* L.) vidi veliki potencijal budući da ima široku primjenu, osobito u farmaceutskoj industriji. Bogata je kanabinoidima od kojih je dominantan kanabidiol (CBD). Korištenje naprednih metoda ekstrakcije smanjuje se vrijeme ekstrakcije, a povećava učinkovitost naspram klasičnih metoda. Cilj ovog rada bio je usporediti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima s klasičnom maceracijom u etanolu. Usporedbom ekstrakcija zaključeno je kako najveću količinu biološki aktivnih komponenata kanabinoida dobivamo ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom. Nakon ekstrakcije ultrazvukom koncentracija kanabidiola (CBD) je 22,72 % dok je kod mikrovalne ekstrakcije 21,73 %, a maceracije 16,74 %.

**Ključne riječi:** kanabidiol, kanabinoidi, industrijska konoplja, ultrazvuk, mikrovalovi

**Rad sadrži:** 25 stranica, 8 slika, 2 tablice, 45 literaturnih navoda, 0 priloga

**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:** izv. prof. dr. sc. Marko Obranović

**Pomoć pri izradi:** Melisa Trputec. Tehnički suradnik

**Datum obrane:** 14. rujan 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering  
Laboratory for Oil and Fat Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

Different methods of extracting cannabinoids from industrial hemp flowers (*Cannabis sativa* L.)  
Tonka Vacka, 0058213894

**Abstract:** Today, industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) is seen as having significant potential due to its wide range of applications, especially in the pharmaceutical industry. It is rich in cannabinoids, with cannabidiol (CBD) being the dominant one. The use of advanced extraction methods reduces extraction time and increases efficiency compared to basic extraction methods. The aim of this study was to compare ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction with maceration in ethanol. Through the extraction processes, it was concluded that the highest amount of bioactive cannabinoid components is obtained through ultrasound-assisted extraction and the decarboxylation of extracts. After ultrasound-assisted extraction, the concentration of cannabidiol (CBD) is 22.72 %, while after microwave-assisted extraction is 21,73 % and maceration is 16,74 %.

**Keywords:** cannabidiol, cannabinoids, industrial hemp, ultrasound, microwave

**Thesis contains:** 25 pages, 8 figures, 2 tables, 45 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Marko Obranović, Associate Professor

**Technical support and assistance:** Tehnical Associate Melisa Trputec

**Thesis defended:** 14<sup>th</sup> of September 2023.



## Sadržaj

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                  | <b>1</b>  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>                         | <b>2</b>  |
| 2.1. KONOPLJA .....                                  | 2         |
| 2.1.1. OPĆE KARAKTERISTIKE.....                      | 2         |
| 2.1.2. TAKSONOMIJA .....                             | 2         |
| 2.1.3. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE.....                | 3         |
| 2.1.4. UPOTREBA.....                                 | 4         |
| 2.1.5. KANABINOIDI .....                             | 4         |
| 2.1.6. DEKARBOKSILACIJA.....                         | 6         |
| 2.2. EKSTRAKCIJA .....                               | 6         |
| 2.3. MIKROVALOVI.....                                | 7         |
| 2.3.1. MIKROVALNA EKSTRAKCIJA.....                   | 7         |
| 2.4. ULTRAZVUK .....                                 | 8         |
| 2.4.1. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA .....                 | 9         |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>                   | <b>10</b> |
| 3.1. MATERIJALI.....                                 | 10        |
| 3.1.1. UZORAK .....                                  | 10        |
| 3.1.2. KEMIKALIJE.....                               | 10        |
| 3.1.3. APARATURA I PRIBOR .....                      | 10        |
| 3.2. METODE .....                                    | 12        |
| 3.2.1. EKSTRAKCIJA POMOĆU MAGNETSKE MIJEŠALICE ..... | 12        |
| 3.2.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA MIKROVALOVIMA .....  | 13        |
| 3.2.3. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA .....                 | 14        |
| 3.2.4. DEKARBOKSILACIJA I UKLANJANJE OTAPALA .....   | 15        |
| 3.2.5. HPLC ANALIZA KANABINOIDA U EKSTRAKTIMA .....  | 16        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>                 | <b>17</b> |
| <b>5. ZAKLJUČCI.....</b>                             | <b>21</b> |
| <b>6. POPIS LITERATURE .....</b>                     | <b>22</b> |

## 1. UVOD

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) koristila se od davnina, a trenutačno je posebno zanimljiva u medicinskom sektoru i kao dodatak prehrani. Unatoč svom statusu biljke uljarice, konoplja sadrži samo 20-30 % ulja u sjemenu, što je znatno niže u usporedbi s drugim industrijskim uljaricama. Na primjer, prosječan prinos ulja iznosi između 250 i 500 kg po hektaru (Carus, 2017; Buoloc i sur., 2013). Zbog svoje izuzetne prilagodljivosti različitim klimatskim uvjetima i staništima, postala je vrlo privlačna biljka za uzgoj. U Hrvatskoj, kao i u drugim dijelovima Europe, industrijska konoplja se najviše uzgaja zbog svojih smola bogatih kanabinoidima (Božić-Ostojić i sur., 2015).

Kanabinoidi koji se nalaze u industrijskoj konoplji su THC ( $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN) i kanabikromen (CBC) od kojih su najzastupljeniji CBD i  $\Delta^9$ -THC (Foster i sur., 2019; Russo, 2011). Kanabinoidi imaju potencijalne koristi kao antioksidansi, u liječenju psihoze, anksioznosti, depresije te ublažavanju mučnine (Cerino i sur., 2021). Kanabinoidi se izdvajaju pomoću ekstrakcije. Međutim, tradicionalna metoda ekstrakcije, poznata kao maceracija, ima relativno niski učinak u procesu dobivanja ulja iz industrijske konoplje. Kako bi se postigli bolji rezultati u smislu učinkovitosti i skraćanja vremena potrebnog za ekstrakciju, uvode se nove tehnologije poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ili ultrazvukom (Blekić i sur., 2011).

Cilj ovog rada bio je usporediti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima s klasičnom maceracijom u etanolu.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Konoplja

#### 2.1.1. Opće karakteristike

Konoplja pripada u najstarije kultivirane biljke. Čovjek je konoplju počeo uzgajati radi vlakna i radi korištenja u medicinske svrhe. Podrijetlo vuče s područja Azije. U današnje vrijeme industrijska konoplja dobiva sve veći značaj, zbog širokog spektra upotrebe. Potencijal industrijske konoplje mogao bi zadovoljiti veliku većinu ljudskih potreba za energijom, hranom, obućom i odjećom (Božić-Ostojić i sur., 2015). Konoplja je iznimno prilagodljiva biljka te s obzirom na stanište i klimatske uvjete mijenja svoja fiziološka i morfološka svojstva. U hladnijim krajevima uzgaja se radi sjemena, dok se u toplijim staništima, kao što je primjer Azija, uzgaja u medicinske svrhe. U Europi se, kao i u Hrvatskoj, konoplja najčešće uzgaja radi prerade njenih smola, ali također i za sjeme, vlakna ili radi dvostruke namjene (sjeme i vlakno ili sjeme i biomasa) (Cerino i sur., 2021).

Prema Uredbi komisije HZJZ-a (EU) 2022/1393 u proizvodima iz sjemenki konoplje i mljevenih sjemenki konoplje, (djelomično) odmašćenih sjemenki konoplje te samim sirovinama smije biti maksimalno 3mg/kg te u ulju sjemenki konoplje 7,5 mg/kg delta-9-tetrahidrokanabinola ( $\Delta^9$ -THC). Industrijska konoplja nije uključena na „Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga te tvari koje se mogu uporabiti za izradu droga“. Prema navedenim pravilima, zakon omogućava široko korištenje kompletnog biljnog organizma konoplje. Također, regulira se mogućnost uzgoja i proizvodnje konoplje u svrhe medicinske primjene, pod uvjetom da je dobiveno odobrenje nadležnog ministarstva za zdravstvo. Zahtjev za takvo odobrenje podnosi pravna osoba koja je posjeduje proizvodnu dozvolu od Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), prema „Zakonu o lijekovima (izdanje Narodnih novina br. 39/19)“.

#### 2.1.2. Taksonomija

Konoplja se svrstava u porodicu *Cannabinaceae* i rod *Cannabis*. Iako neki autori priznaju tri različite vrste unutar roda *Cannabis* - *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* i *Cannabis ruderalis*, postoji i prihvaćena klasifikacija koja identificira *Cannabis sativa* kao monotipičnu vrstu s tri podvrste: *Cannabis sativa* subsp. *sativa* (industrijska konoplja), *Cannabis sativa* subsp. *indica* (indijska konoplja) i *Cannabis sativa* subsp. *ruderalis* (Cerino i sur., 2021). U

Tablici 1 je prikazana taksonomska klasifikacija vrste *Cannabis sativa* L.

Tablica 1: Taksonomska klasifikacija vrste *Cannabis sativa* L.

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

### 2.1.3. Morfološke karakteristike

Konopljin korijen je vretenast, a njegova rasprostranjenost ovisi o vrsti i tipu tla u kojem se nalazi. Korijen muških jedinki lošije je razvijen od ženskih, zato što vegetacija kod muških biljaka traje kraće nego kod ženskih (Gadžo i sur., 2011).

U početnom stadiju rasta i razvoja konoplja je zeljasta te postepeno, kroz 3 do 4 tjedna, postaje čvrsta i odrveni (Gadžo i sur., 2011). Visina biljke ovisi o mnogo faktora s obzirom na to visina varira od 0,5 m do 5 m. Na masu stabljike otpada 65% od ukupne mase. Ukoliko se uzgaja u gušćem sklopu tada se uzgaja za vlakno, ili u rjeđem sklopu za sjeme. Stabljika biljke konoplje je šuplja (Gagro, 1998).

Konopljin list je složen, tvori ga peteljka koja ima dva palistića koja su sjedinjena sa stabljikom. Listovi na stabljici raspoređeni su nasuprotno, dok su pri vrhu naizmjenični kao što je i prikazano na slici 1 (Gagro, 1998.). Veličina lišća i njihov broj odlike su sorte, ali njihov broj uvijek je neparan od 3 do 13 listova (Gadžo i sur., 2011).

U prirodnom staništu konoplju pronalazimo kao diecijsku (dvodomnu) biljku. Seleksijskim uzgojem stvorene su jednodomne jedinice biljaka konoplje. Cvjetovi muških jedinki konoplje imaju cvat metlicu na vrhu stabljike i nalaze se na cvjetnim stapkama (Gadžo i sur., 2011). Cvjetovi ženskih jedinki konoplje imaju cvat u obliku klasa koji se nalazi u gornjoj trećini same stabljike. Ženske jedinice puno su zelenije i imaju sjeme. Ženske i muške biljke

mogu cvasti u isto vrijeme ili ženske cvatu prije muških, 10 do 15 dana prije (Gagro, 1998).

Biljka konoplje ima plod jajastog oblika, orašac te je plod također i sjeme. Zaštitu od mehaničkih oštećenja plodu pruža ljuska. Sjeme konoplje sastoji se od klice, sjemene ljuske, ljuske ploda i endosperma. Samo se u endospermu nalazi škrob, dok se u ostalim dijelovima sjemena nalazi ulje (Gagro, 1998).



**Slika 1:** Konopljin list (Hempica, 2019)

#### **2.1.4. Upotreba**

U svrhu proizvodnje vlakna, uzgajaju se stabljike konoplje. Nakon što se vlakno odvoji od stabljike, ostaje "pozder" koji se upotrebljava za ekološke građevinske materijale koji služe za toplinsku i zvučnu izolaciju, kao gorivo s visokim energetske sadržajem te za proizvodnju celuloze i papira (Buoloc i sur, 2013). Sjeme konoplje ima značajnu vrijednost kao sirovina za proizvodnju ulja, moguće je dobiti jestivo ili tehničko ulje iz sjemena (Šimić, 2018).

#### **2.1.5. Kanabinoidi**

Kroz temeljito istraživanje konoplje otkriveno je više od stotinu raznovrsnih spojeva te se pretpostavlja da imaju biološku aktivnost. Među tim spojevima se ubrajaju terpenoidi, kanabinoidi, fenolni spojevi, masne kiseline, proteini, aminokiseline, steroli, esteri, laktioni, aldehidi, pigmenti i mnogi drugi (Cerino i sur., 2021). Svojom kemijskom strukturom, kanabinoidi pripadaju skupini terpenofenolnih spojeva s prisutnošću 21 ugljikovog atoma.

Razvrstavanje kanabinoida uključuje fitokanabinoide, endokanabinoide i sintetske kanabinoide. Endokanabinoidi su hidrofobne molekule koje nastaju unutar staničnih membrana, posebno u postsinaptičkim membranama mozga. U ljudskom tijelu, oni djeluju kao endogeni agonisti za kanabinoidne receptore. U ovoj ulozi posebno se ističu dva ključna spoja: N-arahidonoiletanolamid (poznat i kao anandamid ili AEA) i 2-arahidonoilglicerol (skraćeno 2-AG) (Izzo i sur., 2009). Sintetski kanabinoidi su podijeljeni u šest grupa koje sadrže preko stotinu različitih spojeva. Fitokanabinoidi, prisutni samo u konoplji, broje preko 110 spojeva podijeljeni su u više grupa. Ključni predstavnici fitokanabinoida su THC ( $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabinol (CBN) i kanabikromen (CBC) (Foster i sur., 2019; Russo, 2011). Najzastupljeniji kanabinoid je kanabidiol (CBD), a u konoplji je uglavnom prisutan kao kiselina to jest kanabidiolna kiselina (CBDA). Najviše koncentracije kanabinoida mogu se pronaći u lišću i ženskim cvjetovima, dok su prisutni u manjim količinama u ostatku biljke. Sjeme konoplje, s druge strane, ne sadrži kanabinoide. Kemijski sastav konoplje određuje genetika, ali također ga oblikuju čimbenici poput uzgoja, žetve, sušenja i drugih proizvodnih procesa. Kanabinoidi su lipofilni spojevi koji se lako apsorbiraju i vežu za specifične membranske receptore (Ameri, 1999). U industrijskoj konoplji, udio CBD-a je znatno veći od udjela THC-a. Postoji vjerovanje da ovaj odnos između CBD-a i THC-a može djelovati kao mehanizam za umanjivanje subjektivnih i fizičkih učinaka THC-a na ljude, jer CBD ima sposobnost smanjivanja utjecaja THC-a. Znanstvenici su uspjeli identificirati različite medicinske koristi ovog spoja, uključujući njegovu ulogu kao antioksidansa i protuupalnog sredstva. Također, primjećuje se da ovaj spoj ima potencijalne koristi u liječenju psihoze, anksioznosti, depresije te ublažavanju mučnine. CBD je organski spoj s prisutne dvije alkoholne funkcionalne grupe što ga prvenstveno čini nepolarnim. Godine 2018., US Food and drugs administration (FDA) dala je odobrenje za uporabu čistog oblika CBD-a pod imenom Epidiolex u terapiji za epilepsiju. Osim toga, i Europska agencija za lijekove (EMA) je izdala odobrenje za istu svrhu (Cerino i sur., 2021). Uz kanabinoide, konoplja također sadrži i terpene, koji osim što pridonose karakterističnom okusu i aromi, imaju i raznovrsno biološko djelovanje. Glavni terpeni koji se nalaze u konoplji su:  $\beta$ -mircen, Limonen i  $\beta$ -kariofilen (Cerino i sur., 2021). U usporedbi s tradicionalnim uljaricama, konoplja se ističe po relativno nižem prinosu ulja po jedinici površine. Zbog sastava masnih kiselina, konopljinu ulje spada u kategoriju visokokvalitetnih jestivih ulja. Traženo je ulje u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i tehničkoj industriji. Koristi se i kao sastojak za boje i lakove. Nakon postupka prešanja za ekstrakciju ulja, ostaju uljane pogače koje su izvrсна



stočna hrana (Carus, 2017).

### **2.1.6. Dekarboksilacija**

Dekarboksilacija je kemijska reakcija u kojoj se eliminira ugljikov atom odnosno karboksilna skupina s određenog spoja, a kao produkt nastaje dekarboksilirani spoj i ugljični dioksid. U sirovom ekstraktu industrijske konoplje dominiraju kanabinoidi u obliku karboksilnih kiselina. Bioaktivni oblici koji su značajni u medicini nastaju upravo dekarboksilacijom te se tako izolira u maksimalnoj količini. Dekarboksilacijom kanabidiolne kiselina (CBDA) nastaje kanabidiol (CBD), a tom pretvorbom uočava se eksponencijalni pad količine CBDA. Ovaj proces se često događa pri izlaganju visokim temperaturama iznad 120°C, tijekom starenja biljke ili izloženosti svjetlu (Hartsel i sur. 2016).

## **2.2. Ekstrakcija**

Ekstrakcija je učinkovit tehnološki proces kojim se postiže razdvajanje i koncentriranje određenih tvari u kratkom vremenu. Proces razdvajanja oslanja se na molekulsku difuziju, koji se objašnjava Fickovim 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. Postoje tri faze prijenosa mase: 1. otapanje željene tvari u otapalu, 2. kretanje otopljene tvari u otapalu iz unutrašnjosti proizvoda na površinu 3. u cijelom volumenu otapala raspršena je otopljena tvar (Herceg, 2011). Otapalo koje se koristi u ekstrakciji mora zadovoljavati sljedeće kriterije: ne smije izazivati reakciju s tvari od interesa, treba imati visoku termostabilnost, stabilnost na kisik i svjetlo, visoka sigurnost pri upotrebi, nezapaljivo, jeftino, štetnost za ljude ne smije postojati, održivost s ekološkog aspekta tako što ne bi trebalo imati štetan utjecaj na okoliš i po mogućnosti bi se trebalo moći reciklirati ili koristiti ponovno. Kod odabira otapala za ekstrakciju, ove karakteristike su ključne kako bi se osigurala sigurnost, učinkovitost i ekološka prihvatljivost procesa (Drmić i Jambrak, 2010).

Postoje ekstrakcije čvrsto-tekuće, tekuće-tekuće i plinovito-tekuće s obzirom na različite agregatne faze smjese. Željenu tvar dobivenu ekstrakcijom treba dodatno obraditi kako bi se dobila u čistom obliku, može se koristiti uparavanje dobivene otopine ili kristalizacija otopine

(Lianfu i Zelong, 2008). Ekstrakcija je proces koji koristi različite konvencionalne metode, uključujući: destilaciju (direktna destilacija eteričnih ulja, destilacija vodenom parom ili destilacija vodom i parom), ekstrakciju otapalima (ekstrakcija otapalom/ima, maceracija, ekstrakcija s uljima), hladno prešanje, napredne tehnike (ekstrakcija superkritičnim fluidima, turbo – ekstrakcija, mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom) (Blekić i sur., 2011). Općenito za ekstrakcije čvrstih tvari povećava se međufazna površina (usitnjavanjem) i brzina gibanja faza u sredini otopine miješanjem za bolje uzajamno djelovanje te namakanje traje minimalno tri dana pri sobnoj temperaturi, a taj postupak se naziva maceracija. Nakon ekstrakcije treba se odvojiti trop odnosno biljni materijal, najčešće pomoću filtracije ili prešanja. Organske se tvari ekstrahiraju iz čvrstih tvari pri povišenim ili sobnim temperaturama. Kod ekstrakcije pri povišenoj temperaturi otapalo isparava te kako bi ga se ipak zadržalo koristi se povratno hladilo na kojem se otapalo hladi i vraća natrag u smjesu za ekstrakciju. Maceracija je spor postupak s relativno niskom učinkovitošću, stoga su sve više tražene napredne tehnike kao što su ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima i ultrazvukom (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

### **2.3. Mikrovalovi**

Mikrovalovi spadaju pod elektromagnetske valove valnih duljina 0,1 mm do 30 cm te frekvencije od 1 GHz do 300 GHz. Elektromagnetski valovi nastaju međudjelovanjem magnetskog i električnog polja. Frekvencije mikrovalova su slične frekvencijama titranja atoma i molekula u tvarima, zbog čega se koriste za istraživanje atomske strukture materijala (Puharić I., 2016). Kada mikrovalovi prolazeći kroz prostor susretnu elektriziranu česticu, ta čestica će pod djelovanjem mikrovalova apsorbirati dio energije i pokrenuti se, dok će val mikrovalova oslabiti za iznos izgubljene energije. (Taboršak i sur., 1983).

#### **2.3.1. Mikrovalna ekstrakcija**

Ekstrakcija mikrovalovima temelji se na tome da voda koja se nalazi u željenom materijalu te otapalo za ekstrakciju apsorbira energiju koju proizvode mikrovalovi. Molekule se sve intenzivnije kreću, dolazi do rotacije dipola, stanice se zagrijavaju te je povećan pritisak na staničnu stijenkicu stanica. Zbog ovog pritiska, stanična stijenkica puca, olakšavajući ulaz otapala u stanice i povećavajući površinu interakcije otapala i ciljane komponente (Mandal i sur., 2007; Wang i Weller, 2006). Prije ekstrakcije nužno je provoditi predtretmane: određivanje omjera



otapala i uzorka, odabrati optimalno otapalo računajući na njegovu polarnost te odrediti vrijeme i temperaturu ekstrakcije (Spigno i sur., 2007).

Kao kod svake ekstrakcije, tako i kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima jako je bitno odabrati dobro otapalo. Preporučljivo je da ima što višu dielektričnu konstantu, a to znači da dobro apsorbira energiju mikrovalova (Chen i sur., 2008), te visok faktor disipacije energije kako bi otapalo dobivenu energiju mikrovalova što bolje prenio okolnom mediju (Spigno i De Faveri, 2009). Kada se ekstrahiraju čvrste tvari bitno je povećati površinu između faza i brzinu kojom se gibaju faze, odnosno miješanja. Usitnjavanjem čvrste tvari te njegovom homogenizacijom postiže se povećanje površine između faza. Kada se poveća količina čvrste tvari neophodno je produžiti vrijeme ekstrakcije (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

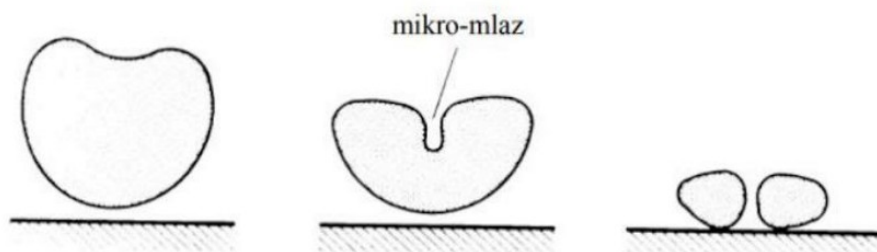
Općenito kod ekstrakcije vrijeme provođenja se produžuje kako bi prinos bio što veći, no kod mikrovalne ekstrakcije to nema veliki utjecaj (Wang i sur., 2008). Međutim, vrlo je bitno da se dobro odredi optimalno vrijeme mikrovalne ekstrakcije da se izbjegne termalna degradacija i oksidacija bioaktivnih spojeva. Iako se prinos značajno ne mijenja, preduga izloženost mikrovalovima utječe na antioksidacijsku aktivnost ekstrakta dobivenog ekstrakcijom, čak i ako temperature nisu visoke (Veggi i sur., 2013).

Snaga mikrovalne ekstrakcije prenosi energiju te lokalizirano zagrijava uzorak i uzrokuje oštećenje staničnih stijenki, što omogućuje bolji kontakt između otapala i ciljane tvari (Chan i sur., 2011; Hu i sur., 2008). Na povišenim temperaturama, učinkovitost ekstrakcijskog otapala se povećava jer se smanjuje njegova viskoznost i površinska napetost. Ovo olakšava prodiranje otapala dublje u materijal, što rezultira većom topljivošću željenih komponenata.

## **2.4. Ultrazvuk**

Ultrazvuk se nalazi u gornjem dijelu frekvencijskog područja zvuka, odnosno to su valovi frekvencijom viši od 20 kHz te se protežu do otprilike 107 Hz (Vukoja, 2018). Ultrazvučna tehnologija postala je sve češća tehnologija u prehrambenoj industriji te spada u ne-toplinske tretmane obrade hrane kako bi se dobio visoko vrijedan prehrambeni proizvod (Brnčić i sur., 2009.). Postoje dvije vrste korištenja ultrazvuka u prehrambene svrhe: visokih frekvencija i niskih intenziteta u analitičke svrhe te niskih frekvencija i visokih intenziteta u raznim oblicima obrade hrane jer ima mogućnost promjene svojstva proizvoda (Brnčić, 2006; Povey i Mason, 1995). U procesima obrade hrane izmjenjuju ciklusi sažimanja i ekspanzije te dolazi do konstantne promjene tlaka te nastaju mjehurići zraka odnosno dolazi do kavitacije (Bosiljkov

i sur., 2009). Kavitacija je fenomen u kojem se u tekućini stvaraju, povećavaju (ekspanzija) i potom urušavaju (implozija) mjehurići u trenutku. Posljednja faza kavitacije, implozija, uzrokuje lokalno povećanje temperature i tlaka koje mogu doseći iznose i do 5000 °C i 1000 bara. Ovo povećanje temperature i tlaka također stvara mikromlazove (slika 2) koji se brzinom od 100 m/s kreću kroz tekućinu (Crnić, 2015).



**Slika 2:** Prikaz razaranja krute čestice mikromlazom (Crnić, 2015)

#### **2.4.1. Ultrazvučna ekstrakcija**

Ultrazvučna ekstrakcija, "Ultrasound-assisted extraction" (UAE), poboljšava efikasnost ekstrakcije tako što otapalo lakše i brže prelazi u stanicu, bolji je prijenos mase i razbija staničnu stijenku te se intracelularni sastojci lakše otpuštaju (Ruiz i sur., 2003). Postoji više ultrazvučnih reaktora: sustav s direktno uronjenom sondom i ultrazvučne kupelji. U postavu reaktora uvijek se nalazi generator koji transformira električnu energiju u visokofrekventnu izmjeničnu struju, te pretvarač koji tu energiju konvertira u mehaničke vibracije, što rezultira stvaranjem kavitacija. Budući da se koriste otapala koja su ekološki prihvatljiva u manjim količinama, provodi se uz nižu temperaturu (Wei i Yang, 2014), smanjuje vrijeme provođenja ekstrakcije (Grassino i sur. 2015), UAE svrstava se u „zelene ekstrakcijske metode“ (Anticono i sur., 2020). Također, ultrazvučna ekstrakcija ima potencijal da unaprijedi prehrambene proizvode osiguravajući dobivanje vrijednih spojeva iz različitih sirovina, uključujući nusproizvode, što može pridonijeti boljoj iskorištenosti resursa, smanjenju otpada i stvaranju prehrambenih proizvoda s povećanom nutritivnom vrijednosti i korisnim svojstvima za ljudski organizam. Dakle, iz obrade citrusa ostaje nam kora koja je bogata flavonoidima (Sun i sur., 2011), a u kori banane i ljuski luka pronalazimo polifenole koji se čak mogu koristiti u farmaceutskoj industriji (Antolić, 2020).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Uzorak

Prilikom izrade ovog rada korišteni su osušeni dijelovi industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) sorte Futura 75 ubrani 2022. godine u Slavoniji. Osušeni dijelovi su prije ekstrakcije samljeveni u sitne komadiće kao što vidimo na slici 3.



**Slika 3:** Uzorak industrijske konoplje (vlastita fotografija)

##### 3.1.2. Kemikalije

96 %-tni etanol, destilirana voda

##### 3.1.3. Aparatura i pribor

a) Priprema uzorka

- analitička vaga (Analytical plus), Ohaus (SAD)
- tehnička vaga (WLC2/A2/C/2), RADWAG (Poljska)
- metalna žlica
- stakleno laboratorijsko posuđe - laboratorijska čaša (600 mL)

b) Ekstrakcija na magnetskoj miješalici uzorka konoplje

- termometar
- magnet
- magnetska miješalica
- stakleno laboratorijsko posuđe - povratno hladilo, laboratorijska čaša (600 mL), tikvica s okruglim dnom

c) Ekstrakcija mikrovalovima uzorka konoplje

- ETHOS (Advanced Microwave Extraction System), Milestone (Italija)
- posuđe za uređaj: magnet, keramički oblozi, plastične 'epruvete'

d) Ultrazvučna ekstrakcija uzorka konoplje

- ultrazvučni procesor (UP200Ht), Hielschler (Njemačka)

e) Filtracija obična i pod vakuumom

- metalna posuda
- filter papir
- Büchnerov lijevak
- boca štrcaljka
- stakleno laboratorijsko posuđe: stakleni štapić, tikvica s okruglim dnom (500 mL), boca za odsisavanje (500 mL), lijevak

f) Primarno uparavanje

- rotacijski uparivač (Hei-VAP), Heidolph (Njemačka)
- stakleno laboratorijsko posuđe - tikvica s okruglim dnom (500 mL i 1 L)

g) Vakuumom uparivač

- vakuum uparivač (Savant SPD2010), Thermo scientific (SAD)
- epruvete, kivete

h) Dekarboksilacija

- laboratorijski sušionik, INKO (Zagreb, Hrvatska)
- stakleno laboratorijsko posuđe - epruvete, satno staklo
  - i) Analiza tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti
- HPLC posude za uzorke s čepovima (vials)
- kapaljka
- stakleno laboratorijsko posuđe - laboratorijska čaša, odmjerna tikvica (10 mL)
- mikrofilteri
- plastične šprice (2 mL)
- špatulica
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (1260 Infinity), Agilent Technologies (SAD)

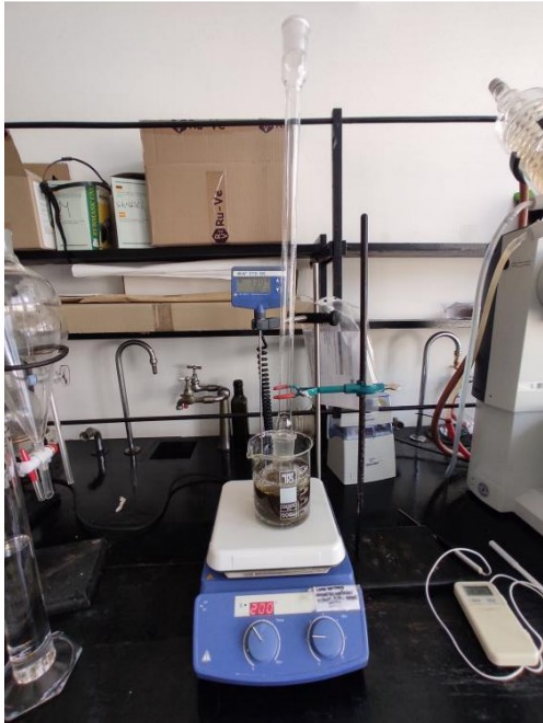
## **3.2. Metode**

Provode se tri različite vrste ekstrakcije, kontrolna ekstrakcija pomoću magnetske miješalice te dvije glavne metode ekstrakcije potpomognute mikrovalovima odnosno ultrazvučnim valovima.

### **3.2.1. Ekstrakcija pomoću magnetske miješalice**

Kontrolna ekstrakcija je modificirana po radu De Vita i sur. (2020). Izvaže se 25 g uzorka konoplje na tehničkoj vagi te se kvantitativno prenese u tikvicu s okruglim dnom. Zatim se doda magnet za miješanje otopine i 187 mL etanola (96 %) koji ima ulogu otapala. U vodenu kupelj stavi se tikvica s okruglim dnom te postavi na magnetski mješač s grijačom pločom (slika 4). Na tikvicu s okruglim dnom postavimo zračno hladilo i provodimo ekstrakciju 50 minuta na temperaturi od 75 °C. Otopina se filtrira pod vakuumom i upari se u rotacijskom uparivaču (slika 7) na temperaturi od 60°C do volumena od 25 mL ekstrakta. Dobiveni ekstrakt prebaci se u Falcon epruvetu i ponovi ovaj postupak dva puta.





**Slika 4:** Ekstrakcija pomoću magnetske miješalice (vlastita fotografija)

### **3.2.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima**

Ova metoda ekstrakcije potpomognute mikrovalovima optimirana je u radu Song i sur. (2022). Izvaže se 4 g uzorka konoplje na tehničkoj vagi te se kvantitativno prenese u plastičnu 'epruvetu'. Zatim se doda magnet za miješanje otopine i 30 mL etanola (96 %) koji ima ulogu otapala te se sve zajedno stavi u keramički oblog (slika 5). Postupak se ponovi 46 puta. Provodimo ekstrakciju 5 minuta na temperaturi od 60 °C, no cijelo proces traje 12 minuta – 5 min. zagrijavanje uređaja, 5 min. ekstrakcija, 1 min. hlađenje i 1 min. Dodatno hlađenje. Otopina se filtrira na papiru i upari se u rotacijskom uparivaču (slika 7) na tlaku od 200 mbar i temperaturi od 60°C do volumena od 50 mL ekstrakta. Dobiveni ekstrakt prebaci se u Falcon epruvetu.



**Slika 5:** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju (vlastita fotografija)

### **3.2.3. Ultrazvučna ekstrakcija**

Ultrazvučna ekstrakcija optimirana je u radu Jambrović (2021). Izvaže se 50 g uzorka konoplje na tehničkoj vagi te se kvantitativno prenese u staklenu čašu. Zatim se doda 375 mL etanola (96 %) koji ima ulogu otapala (slika 6). Provodimo ekstrakciju 2 minute. Postupak se ponovi 4 puta. Otopina se filtrira pod vakuumom i upari se u rotacijskom uparivaču (slika 7) na temperaturi od 60°C do volumena 25 mL ekstrakta. Dobiveni ekstrakt prebaci se u Falcon epruvetu.



**Slika 6:** Ultrazvučna sonda (vlastita fotografija)

### 3.2.4. Dekarboksilacija i uklanjanje otapala

Centrifugiramo svaki uzorak pojedinačno (uzorak iz mikrovalne, ultrazvučne i kontrolne ekstrakcije). Centrifugirane uzorke po 5 ml stavimo na satno staklo te u laboratorijski sušionik na 45 min i 100 °C na dekarboksilaciju. Proces dekarboksilacije uzorka konoplje provodio se prema radu Moreno i sur. (2020). Iste centrifugirane uzorke, ali po 10 ml stavimo u kivete te u vakuum koncentrator. Uzorci se prebace u kivete.



Slika 7: Rotacijski uparivač (vlastita fotografija)



### **3.2.5. HPLC analiza kanabinoida u ekstraktima**

Korišten je HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) opremljen kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A), temperaturnog raspona od 10 do 85 °C, DAD detektora (G7115A), autosamplera (automatskog uzorkivača) (G7129A) kapaciteta od 36 viala i sakupljača frakcija (G1364E). Obrada podataka i upravljanje sustavom vršilo se pomoću računalnog programa ChemStation. Navedeni sustav korišten je za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju kanabinoida iz ekstrakata. Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone InfinityLab Poroshell 120 C-C18, duljine 150 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm i veličinom čestica 4 µm. Primijenjen je postupak gradijentnog eluiranja pri brzini protoka od 1 mL/min tijekom 67 minuta, pri čemu je kao faza A korištena 0,1% mravlja kiselina u miliQ vodi (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka), a kao faza B 0,05% mravlja kiselina u metanolu. Gradijent je postavljen kako slijedi: 0,00-7,05 min 40% A; 7,05-49,37 min 23% A; 49,37-67,00 min 5% A, nakon čega je uslijedio period od 10 min gdje su se uvjeti analize vratili na početnu vrijednost. Volumen 30 injektiranja bio je 35 µL, valna duljina UV detekcije bila je 210 i 230 nm, a analiza je provedena na 50 °C. Identifikacija kanabinoida provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara izdvojenih pikova sa standardima, dok je kvantifikacija izvršena pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijskih krivulja.

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

Svi dijelovi biljke industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) imaju potencijalnu primjenu. Trenutno je vrlo interesantno korištenje u medicinske svrhe i kao dodatak prehrani. Iako se konoplja svrstava u biljku uljaricu, sadrži oko 20 - 30 % ulja u sjemenu što je u prosjeku puno niže od ostalih industrijskih uljarica odnosno prinos ulja je od 250 do 500 kg/ha (Carus, 2017; Buoloc i sur, 2013). U Hrvatskoj, kao i u ostalim dijelovima Europe, industrijska konoplja najviše uzgaja zbog njenih smola bogatih kanabinoidima. Budući da postoji puno mogućnosti prerade industrijske konoplje te je vrlo prilagodljiva na razne klime i staništa, postala je vrlo zanimljiva biljka za uzgoj (Božić-Ostojić i sur., 2015).

Bioaktivne komponente kanabinoidi iz konoplje izdvajaju se ekstrakcijom. Maceracija ima nisko iskorištenje u procesu proizvodnje ulja iz industrijske konoplje. Uvođenjem novih tehnologija poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ili ultrazvukom nastoje se postići bolji rezultat u smislu poboljšanja efikasnosti te kraćeg vremena potrebnog za ekstrakciju (Blekić i sur., 2011). Za analizu sastava ulja primijenjena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (High-performance liquid chromatography, HPLC). Cilj ovog rada bio je usporediti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima s klasičnom maceracijom u etanolu.

U tablici 2 prikazani su rezultati Tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uzorka dobivenih ekstrakcijama s magnetskom miješalicom, potpomognuta ultrazvučnim valovima i mikrovalovima. Ekstrakcija magnetskom miješalicom provodila se kao kontrolna metoda te je optimizirana u radu De Vita i sur. (2020). Suha homogenizirana industrijska konoplja u etanolu stavljena je na magnetski mješač s grijaćom pločom koji je služio da ubrza ekstrakciju pomoću veće brzine prijenosa mase i visoke temperature. Jambrović (2021) je optimizirala metodu ekstrakcije potpomognute ultrazvučnim valovima tako što se pomiješa etanol i homogenizirana industrijska konoplja gdje zadnjom fazom kavitacije dolazi do implozije te puca stanična stijenka u biljci, pa je olakšana difuzija kanabinoida (Ruiz i sur., 2003). Ponovno je napravljena smjesa etanola i homogenizirane industrijske konoplje te povrgnuta mikrovalovima. Ova metoda ekstrakcije potpomognute mikrovalovima optimirana je u radu Song i sur. (2022). Mikrovalovi prenose energiju na molekule otapala, stanice u biljci se zagrijevaju i dolazi do pritiska na staničnu stijenku koja puca, pa se ekstrakcija brže provodi (Mandal i sur., 2007; Wang i Weller, 2006). Nakon svih ekstrakcija prvo se uzorak podvrgne

filtraciji kako bismo odvojile čvrste tvari od otopine, zatim se otapalo uklanja u rotacijskom vakuum uparivaču. Dio uzoraka se dekarboksiliralo na visokoj temperaturi u sušioniku prema radu Moreno i sur. (2020), a drugi dio na vakuum koncentrator kako bi uzorak ostao karboksiliran. U sirovom ekstraktu većinom nalaze kanabinoidi u obliku karboksilnih kiselina koje su slabije aktivnosti od aktivnih oblika, a dekarboksilacijom dolazi do uklanjanja ugljikova dioksida te kao produkt nastaju aktivni oblici kanabinoida (Hartsel i sur. 2016). Moreno i sur. (2020) su optimizirali proces tako što su ekstrakte dekarboksilirali pri temperaturama od 80 do 160 °C, a drugi parametar se mijenjao u vremenskom razdoblju od 5 do 120 min. Pri povišenim temperaturama i vremenima došlo je do značajnog gubitka koncentracije kanabinoida, no gubitak se može smanjiti u nedostatku kisika što upućuje na mogućnost oksidacijskih reakcija. Također, ukazuju kako su niže temperature i duža vremena bolja za CBD, dok su više temperature i kraća vremena bolja za THC. Na kraju su uzorci analizirani HPLC analizom. Rezultati su iskazani kao postotak određenih kanabinoida u tekućem uzorku. Kako bi se omogućilo da u uzorku bude što više ekstrahiranih bioaktivnih komponenti jako je važan omjer čvrste tvari konoplje i otapala etanola. Omjer koji je korišten u ovom radu je 1:7,5 u korist etanola.

**Tablica 2:** Rezultati HPLC analize uzoraka dobivenih ekstrakcijom

| Kanabinoid (%)                                       | Sirovi ekstrakti |       |       | Dekarboksilirani ekstrakti |       |       |
|--|------------------|-------|-------|----------------------------|-------|-------|
|  | K                | UZV   | MW    | K                          | UZV   | MW    |
| Kanabidiol (CBD)                                     | 10,34            | 12,6  | 11,07 | 16,74                      | 22,72 | 21,73 |
| Kanabidiolna kiselina (CBDA)                         | 11,53            | 15,19 | 9,89  | 3,48                       | 3,92  | 2,33  |
| Kanabidiol (CBD+CBDA) - ukupni                       | 20,45            | 25,92 | 19,74 | 19,8                       | 26,16 | 23,77 |
| Kanabinol (CBN)                                      | 0,22             | 0,36  | 0,23  | 0,23                       | 2,08  | 0,25  |
| $\Delta^9$ -Tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC)   | 0,23             | 0,42  | 0,22  | 0,23                       | 0,38  | 0,32  |
| Tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA)                | < 0,01           | 0,11  | 0,07  | <0,01                      | <0,01 | <0,01 |
| Tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC+THCA) - ukupni | 0,23             | 0,52  | 0,28  | 0,23                       | 0,38  | 0,32  |
| Kanabikromenska kiselina (CBCA)                      | 0,29             | 0,39  | 0,23  | 0,53                       | 0,67  | 1,92  |
| Kanabikromen (CBC)                                   | 0,79             | 0,88  | 0,78  | 0,99                       | 1,2   | 1,17  |

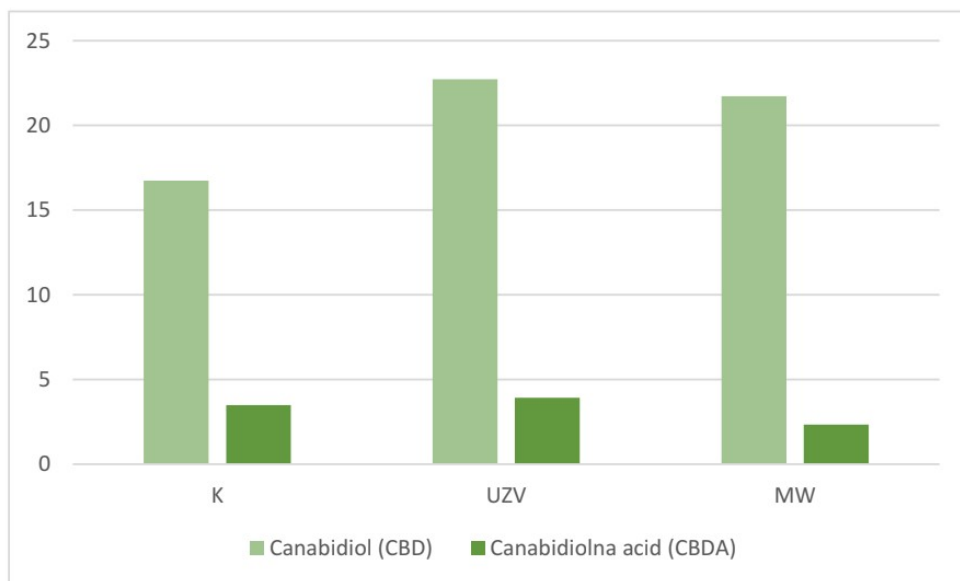
*K – kontrolna ekstrakcija; UZV – ekstrakcija potpomognuta ultrazvučnim valovima; MW - ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima*

Iz rezultata se očitava da u sirovim ekstraktima koncentracija kanabidiola (CBD) je između

10,34 i 12,6 %, a u dekarboksiliranim od 16,74 do 22,72 %. Dok njegove kiseline (CBDA) ima 9,89 do 15,19 % u sirovim, a 2,33 do 3,92 % u dekarboksiliranim ekstraktima. U provedenoj HPLC analizi pokazalo se da u uzorcima ima od 0,22 do 0,36 % kanabinola (CBN) kod sirovih ekstrakata, ali u dekarboksiliranom uzorku ultrazvučne ekstrakcija koncentracija CBN-a je 2,08 % što znači da je došlo do oksidacije. CBN nastaje oksidacijom  $\Delta^9$ -THC, njegove kiseline (THCA) ili izomera  $\Delta^8$ -tetrahidrokanabinol ( $\Delta^8$ -THC) zbog čega se u sirovim ekstraktima nalazi u jako niskim koncentracijama. CBN se najčešće koristi kao pokazatelj za loše ili dugotrajno skladištenje (Hartsel i sur. 2016). Do problema dolazi kod  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC) jer ekstrakti po gore navedenoj uredbi moraju imati manje od 0,3 % THC-a dok ga u ovom slučaju imaju od 0,22 do 0,42 % u karboksiliranim te od 0,23 do 0,38 % u dekarboksiliranim ekstraktima. Naime,  $\Delta^9$ -THC je halucinogena tvar u industrijskoj konoplji koja se veže na CB<sub>1</sub> receptore živčanog sustava (Garcia-Romeu, 2016), a izaziva blagu euforiju, pojačanu percepciju, opuštanje miškulature, povećanje srčane frekvencije i ima utjecaj na imunski odgovor. U najvećoj koncentraciji nalazi se u *Cannabis indica*, no sadrže ga i ostale vrste konoplje. Teško je uzgojiti biljku i optimizirati sve procese da proizvod uvijek ima manje od 0,3 %  $\Delta^9$ -THC jer to ovisi od mnogo čimbenika kao što su vremenski uvjeti, priprema poljoprivrednog zemljišta, udio tvari u zemlji, gnojidba i slično. No, to se može promijeniti tako što se tako dobiveni proizvod razrijedi na manju koncentraciju  $\Delta^9$ -THC-a (Maleš, 2016). Zatim kanabikromena (CBC) ima od 0,78 do 0,88 % u sirovim odnosno od 0,99 do 1,2 % u dekarboksiliranim ekstraktima dok njegove kiseline (CBCA) u uzorcima ima od 0,23 do 0,39 % u sirovim te 0,53 do 1,92 % u dekarboksiliranim ekstraktima. Također, ispitivani su bili i kanabigerol (CBG) i njegove kiseline (CBGA), tetrahidrokanabinolnu kiselinu (THCA), tetrahidrokanabivarinsku kiselinu (THCVA) te kanabidivarinsku kiselinu (CBDVA), koncentracija u navedenim mjerenjima manja od 0,11 % ili čak toliko mala da ju nije moguće očitati.

Na slici 8 uspoređene su metode ekstrakcije kod dekarboksiliranih uzoraka CBD-a ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je bolja od kontrolne ekstrakcije za 26,32 %, a od ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za 4,36 %. Koncentracija CBC-a pokazuje da je ekstrakcija ultrazvukom bolja od kontrolne ekstrakcije za 17,5 % dok je od ekstrakcije potpomognuta mikrovalovima bolja za 2,5 %. Koncentracija  $\Delta^9$ -THC povećana je za 39,48 % u ekstrakciji ultrazvukom u odnosu na kontrolnu ekstrakciju te 15,79 % naspram ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, no u ovom slučaju povećana koncentracija nije pozitivna

okolnost zbog gore navedenih psihoaktivnih učinaka  $\Delta^9$ -THC. Dakle, najveće vrijednosti se nalaze u uzorcima koji su bili ekstrahirani pomoću ultrazvučnih valova što dovodi do zaključka da je ultrazvučna ekstrakcija idealna za ekstrakciju većinu kanabionida iz *Cannabis sativa* L. Agarwal i sur. u svojoj studiji iz 2018. godine također su zaključili su da je primjena ultrazvuka pokazala iznimnu učinkovitost pri ekstrakciji kanabinoida iz konoplje. Ovaj rezultat potvrđen je kroz usporedbu s konvencionalnom metodom ekstrakcije, pri čemu je ultrazvučna ekstrakcija rezultirala većom količinom kanabinoida, a potvrđeno je HPLC analizom. Nadalje, u istraživanju koje potpisuju De Vita i sur. (2020), provedena je usporedba različitih metoda ekstrakcije glavnih kanabinoida. Rezultati su jasno ukazali da je ultrazvučna ekstrakcija znatno superiornija u odnosu na ekstrakciju uz pomoć mikrovalova, kada je u pitanju efikasnost ekstrakcije kanabinoida.



**Slika 8:** Usporedba dekarboksiliranih ekstrakata

## 5. ZAKLJUČCI

1. U svim ekstraktima cvijeta konoplje detektirani su: kanabidiol (CBD), kanabidiolna kiselina (CBDA), kanabinol (CBN),  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC), tetrahidrokanabinolna kiselina (THCA), kanabikromen (CBC), kanabikromenska kiselina (CBCA).
2. Dekarboksilacijom kontrolnog uzorka koncentracija kanabidiola (CBD) je povećana s 10,34 % na 16,74 %, ultrazvučnog uzorka s 12,6 % na 22,72 % te mikrovalnog uzorka s 11,07 % na 21,37 %.
3. Kanabidiol (CBD) se u najvećoj koncentraciji nalazi u uzorcima u kojima je provedena ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom - 22,72 %.
4. Nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u uzorku je došlo do značajnog porasta kanabinola (CBN) koji je indikator degradacije kanabinoida.

## 6. POPIS LITERATURE

- 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) Ameri, A. (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology* 58: 315-348.
- 3) 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.
- 4) Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 3, 32-47.
- 5) Bosiljkov T., Brnčić M., Tripalo B., Karlović S., Ukrainczyk M., Ježek D., Rimac Brnčić S. (2009) Impact of ultrasound-enhanced homogenization on physical properties of soybean milk. *Proceedings of the ninth International Conference on Chemical & Process Engineering ICHEAP 9*, Pg.1029-1034, Rome, May 10-13.
- 6) Bouloc P., Allegret S., Arnaud L. (2013) *Industrial Production and Uses*, CAB International
- 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) Brnčić i sur. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, Vol. 4 No. 1-2.
- 9) Brnčić M. (2006) Influence of ultrasound on properties of raw material for extrusion and finished extruded product. Ph.D. Thesis, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb.
- 10) Carus, M. (2017) *The European Hemp Industry: Cultivation, processing and applications for fibres, shivs, seeds and flowers.*
- 11) Cerino P., Buonerba C., Cannazza G., Auria J., Ottoni E., Fulgione A., Di Stasio A., Pierri, B., Gallo, A. (2021) A review of hemp as food and nutritional supplement. *Cannabis and cannabinoid research* 6 (1): 19–27.
- 12) Chan C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., Kung, F. W.-L. (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A.* 1218, 6213–6225.



- 13) Chen, L., Song, D., Tian, Y., Ding, L., Yu, A., Zhang, H. (2008) Application of on-line microwave sample-preparation techniques. *Trends Anal. Chem.* 27, 151–159.
- 14) Crnić, L. (2015) Oksidacijska desulfurizacija modelne otopine dizelskog goriva uz primjenu ultrazvuka (doktorska disertacija), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- 15) De Vita D., Madia V. N., Tudino V., Saccoliti F., De Leo A., Messori 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) Drmić H., Režek Jambrak A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian journal of Food Science and Technology* 2 (2): 22-33.
- 17) Eskilsson, S., Bjorklund E. (2000): Analytical-scale microwave-assisted extraction, *J. Chrom. A.* 902, 227–250.
- 18) Foster B., Abramovici H., Harris C. (2019) Cannabis and cannabinoids: kinetics and interactions. *The American journal of medicine* 132 (11): 1266-1270.
- 19) Gadžo, D., Đikić, M., Mijić, A. (2011) Industrijsko bilje, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, Sarajevo.
- 20) Gagro, M. (1998) Industrijsko i krmno bilje, Hrvatsko agronomsko društvo, Zagreb
- 21) Garcia-Romeu, A., Kersgaard, B., Addy, PH. (2016) Clinical applications of hallucinogens: A review. *Exp Clin Psychopharmacol*; 24:229–268.gar
- 22) 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.
- 23) Hartsel, J. A., Eades, J., Hickory, B., Makriyannis, A. (2016) Chapter 53 - Cannabis sativa and Hemp. In *Nutraceuticals*; Gupta, R. C., Ed.; Academic Press: Boston; pp 735–754.
- 24) Hempica (2019) Industrijska konoplja: Vrste, korištenje, uzgoj i po čemu se točno razlikuje od marihuane? <https://hempica.me/velike-price/industrijska-konoplja-vrste-koristenje-uzgoj-i-po-cemu-se-tocno-razlikuje-od-marihuane/>, preuzeto: 27.7.2023.
- 25) Herceg Z. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji, Plejada d.o.o., Zagreb, str 98-101.
- 26) Hu, Z., Cai, M., Liang, H. H. (2008) Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from *Radix bupleuri*. *Sep. Purif. Technol.* 61, 266–275.



- 27) Jambrović, M. (2021) Ultrazvučna ekstrakcija kanabinoida iz cvjetova industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- 28) Lianfu, Z., Zelong, L. (2008): Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrason. Sonochem.* 15, 731–737.
- 29) Maleš, Ž., Bojić, M., Bach-Rojecky, L. (2016) Indijska konoplja – nova nada za neizlječive u: Bol, peti vitalni znak, Z. Lončar, K. Rotim (ur.), Zagreb: Zdravstveno veleučilište; 229–239.
- 30) Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007) Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Phcog. Rev.* 1, 7–18.
- 31) Moreno T., Dyer P., Tallon S. (2020) Cannabinoid decarboxylation: a comparative kinetic study. *Industrial & engineering chemistry process design and development*, **59** (46): 20307-20315.
- 32) Povey, M., Mason, T. J. (1995) *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic & Professional, London.
- 33) Puharić, I. (2016) Mikrovalovi i njihove primjene (završni rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- 34) Ruiz J., Capote, F., Castro, M.D. (2003) Identification and quantification of trans fatty acids in bakery products by gas chromatography-mass spectrometry after dynamic ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography*, 1045, 203-210.
- 35) Russo E.B. (2011) Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid terpenoid entourage effects. *British Journal of Pharmacology* 163 (7): 1344-1364.
- 36) Song, Y., Furtos, A., Fuoco, D., Boumghar, Y., Patience, G. (2022) Meta-analysis and review of cannabinoids extraction and purification techniques, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*: 3108-3131.
- 37) Spigno, G., De Faveri, D. M. (2009) Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *J. Food Eng.* 93, 210–217.
- 38) Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D. M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 81, 200–208.

- 39) Šimić D. (2018) Potencijali proizvodnje industrijske konoplje u Osječko-baranjskoj županiji (diplomski rad) Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- 40) Taboršak, N., Anić, N., Anić, K. (1983) Primjena toplinske energije mikrovalova u prehrambenoj industriji, Prehrambeno biotehnološki institut Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- 41) Veggi, P. C., Martinez, J., Meireles, M. A. A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice, (Chemat, F., Cravotto, G., ured.), Springer Science, New York, str. 15-52.
- 42) Vukoja, A. (2018) Ultrazvuk i primjena (završni rad), Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.
- 43) Wang, L., Weller, C. L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 300–312.
- 44) Wang, Y., You, J., Yu, Y., Qu, C., Zhang, H., Ding, L. (2008) Analysis of ginsenosides in *Panax ginseng* in high pressure microwave-assisted extraction. *Food Chem.* 110, 161– 167.
- 45) 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.

## Izjava o izvornosti

Ja Tonka Vacka izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Vacka', written over a horizontal line.

Vlastoručni potpis