

# Uklanjanje klorofila iz etanolonog ekstrakta lista i cvijeta konoplje

---

Zadro, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

*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:159:700407>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-06**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022

Nikolina Zadro

UKLANJANJE KLOROFILA IZ  
ETANOLNOG EKSTRAKTA LISTA I  
CVIJETA KONOPLJE

**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.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju ulja i masti na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Marka Obranovića, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## *ZAHVALA*

*Zahvaljujem se mentoru, doc.dr.sc. Marku Obranović na odabranoj temi i vođenju kroz cijeli diplomski rad. Hvala Vam što ste uvijek našli vremena i imali strpljenja za sva moja pitanja.*

*Veliko hvala tehničkoj suradnici Melisi Trputec na pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada te prijateljskom pristupu.*

*Najveće hvala ide mojoj obitelji na bezgraničnoj ljubavi i strpljenju.*

*Posebna hvala mojim prijateljima, koji su bili dio mojih studentskih dana i učinili ih najposebnijim.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju ulja i masti

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Diplomski sveučilišni studij:** Prehrambeno inženjerstvo

UKLANJANJE KLOROFILA IZ ETANOLONOG EKSTRAKTA LISTA I CVIJETA KONOPLJE

*Nikolina Zadro, univ. bacc. ing. techn. aliment,  
0058218747*

**Sažetak:** Klorofil je biljni pigment koji se nalazi u zelenim dijelovima biljke i smatra se vizualno i senzorski nepoželjnim u ekstraktu industrijske konoplje. U ovom istraživanju testiran je utjecaj aktivnog ugljena na uklanjanje klorofila. Nakon preliminarnih istraživanja, odabrani su mljeveni pelet aktivnog ugljena i zemlja za bijeljenje. Uklanjanje klorofila rađeno je u etanolnom ekstraktu industrijske konoplje kroz 2 h i mjerenjima svakih 30 min uz različite postotke aktivnog ugljena (1.5 i 10 %). Početne vrijednosti ukupnog klorofila su bile  $9.3 \text{ mg mL}^{-1}$ , a karotenoida  $1.53 \text{ mg mL}^{-1}$ . Sadržaj klorofila je smanjen proporcionalno dodanoj količini aktivnog ugljena i vremenu tretmana. Pored klorofila došlo je i do smanjenja udjela karotenoida, kanabidiola (CBD) te ukupnih kanabinoida. Kratki tretmani su se pokazali puno učinkovitiji s obzirom na utjecaj na kanabinoide. Pri dugim tretmanima dolazi do potpunog uklanjanja kanabinoida i karotenoida. Potrebna su daljnja istraživanja radi optimiranja ovog procesa.

**Ključne riječi:** *industrijska konoplja, klorofil, aktivni ugljen, kanabinoidi, CBD*

**Rad sadrži:** 48 stranica, 20 slika, 3 tablice, 29 literaturnih navoda,

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Josip Čurko (predsjednik)
2. Doc. dr. sc. Marko Obranović (mentor)
3. Doc. dr. sc. Tibor Janči (član)
4. Prof. dr. sc. Marin Matošić (zamjena)

**Datum obrane:** 20. srpanj 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Oil and Fat Technology

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

**Graduate university study program:** Food Engineering

THE REMOVAL OF CHLOROPHYLL FROM ETHANOL EXTRACT OF CANNABIS LEAF AND FLOWER

*Nikolina Zadro*, univ. bacc. ing. techn. aliment  
0058218747

**Abstract:** Chlorophyll is a plant pigment found in its green parts, considered to be visually and sensorially undesirable in the industrial cannabis extract. This research tested the effect of active carbon on chlorophyll removal. After preliminary research, active carbon ground pellet and bleaching earth were chosen. The chlorophyll removal was done in ethanol extract of industrial cannabis in the period of 2 hours with measurements every 30 minutes with different active carbon percentages (1, 5 and 10 %). Initial measures of total chlorophyll were  $9.3 \text{ mg mL}^{-1}$ , and total carotenoid  $1.53 \text{ mg mL}^{-1}$ . The chlorophyll content was reduced proportionally to the amount of active carbon added and treatment duration. There was also a reduction in carotenoid portion, cannabidiol (CBD) and total cannabinoids. Short treatments were much more efficient considering the effect on cannabinoids. In other treatments there is a total cannabinoid and carotenoid removal. Further research is needed for optimization.

**Keywords:** *industrial cannabis, chlorophyll, activated carbon, cannabinoids, CBD*

**Thesis contains:** 48 pages, 21 figures, 3 tables, 29 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in:** The Library of the

Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD *Marko Obranović*, Assistant Professor

### Reviewers:

1. Josip Ćurko, PhD, Associate professor
2. Marko Obranović, PhD, Assistant professor
3. Tibor Janči, PhD, Assistant professor
4. Marin Matošić, PhD, Full professor

**Thesis defended:** 20. July 2022

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1 KONOPLJA.....	2
2.1.1 Botanička svojstva konoplje ( <i>Cannabis sativa</i> L.).....	2
2.1.2 Povijesni razvoj konoplje.....	3
2.2 CVJETOVI KONOPLJE.....	4
2.2.1 Sušenje .....	5
2.3 KLOROFIL .....	6
2.3.1 Vrste klorofila .....	7
2.3.2 Prisutnost klorofila .....	7
2.4 KANABIONIDI.....	8
2.4.1 CB1 i CB2 receptori.....	9
2.5 CBD ULJE.....	10
2.5.1 Terapeutski učinci CBD-a.....	11
2.6 ULTRAZVUK .....	11
2.6.1 Kavitacija .....	12
2.7 EKSTRAKCIJA ETANOLOM.....	13
2.8 DEKARBOKSILACIJA .....	14
2.8.1 Povijest procesa dekarboksilacije.....	14
2.9 AKTIVNI UGLJEN .....	15
2.9.1 Struktura aktivnog ugljena .....	15
2.9.2 Uklanjanje klorofila iz konoplje aktivnim ugljenom .....	17
2.9.3 Adsorpcijske izoterme .....	17
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>19</b>
3.1. Materijali .....	19
3.1.1. Uzorak .....	19
3.1.2. Kemikalije .....	19
3.1.3. Aparatura i pribor.....	19
Dekarboksilacija uzorka industrijske konoplje .....	19
3.2.1. Dekarboksilacija uzorka konoplje.....	20
3.2.2. Uklanjanje klorofila .....	20
3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida .....	21



3.2.4 Ultrazvučna ekstrakcija uzoraka konoplje.....	24
3.2.5. Određivanje kanabinoida primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti .....	25
3.2.6 Obrada podataka.....	26
<b>4.REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>27</b>
4.1 Preliminarna istraživanja uklanjanja klorofila i utjecaja na udio karotenoida .....	28
4.2 Mjerenje koncentracije klorofila nakon preliminarnih istraživanja-bijeljenje .....	32
4.3 Adsorpcijske izoterme .....	35
4.3 Mjerenje koncentracije CBD, CBDA i ukupnih kanabinoida .....	42
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>46</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>47</b>

# 1.UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je jedna od biljaka koju su ljudi koristili od davnina sa širokim potencijalom u primjeni. Ima vrlo važan agroekološki učinak jer poslije nje tlo ostaje u povoljnom biološkom i fizikalnom stanju, s puno hranjivih tvari. Primjenjuje se u proizvodnji hrane, proizvodnji papira, građevinarstvu, ribarstvu, tekstilnoj industriji, kao hrana za životinje, kao materijal za grijanje i u farmaceutskoj industriji.

Ekstrakt konoplje bogat je bioaktivnim komponentama. Najkarakterističniji spojevi vezan uz konoplju su kanabinoidi, iako sadrži mnoge druge spojeve kao terpene i flavonoide. Glavni predstavnici konopljinih kanabinoida su  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol (THC) i kanabidiol (CBD). Fokus današnje industrije je na proizvodima s visokom koncentracijom CBD-a i niskom koncentracijom THC-a (ispod 0,3 %) kako bi se zadovoljila zakonska regulativa.

Pri procesu etanolne ekstrakcije kanabinoida iz konoplje dolazi i do značajne ekstrakcije klorofila u konačnom proizvodu koji se smatra senzorski i vizualno nepoželjnim. Klorofil utiče na tamnu boju ekstrakta i povećanu gorčinu. Iako se ekstrakcija klorofila može zaobići ili značajno smanjiti primjenom superkritičnog CO<sub>2</sub>, ova tehnologija je i dalje znatno skuplja i zahtjeva visoku razinu obrazovanja i sigurnosti na radu. Proizvođači danas uglavnom koriste neki oblik maceriranja/potapanja biljke u etanolu, a sve više se primjenjuje u kombinaciji s ultrazvukom kako bi se poboljšao i ubrzao cijeli proces.

Cilj ovog rada je bio istražiti utjecaj dodatka aktivnog ugljena na udio klorofila u etanolnom ekstraktu dobivenom pomoću ultrazvučne ekstrakcije i njegov utjecaj na kanabinoide.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 KONOPLJA

#### 2.1.1 Botanička svojstva konoplje (*Cannabis sativa* L.)

Konoplja je jednogodišnja, dvodomna, zeljasta kritosjemenjača. Na jednoj stapki se nalaze listovi, koji su prstasto razdvojeni, te svaki pojedini prst na listu ima nazubljene rubove. Broj tih listića na listu varira. Prvi u nizu parovi listova imaju najčešće samo jedan listić, dok sljedeći mogu imati i do 13 njih. Najčešće ih imaju sedam do devet, što ovisi o genetici i uvjetima u okolišu. Penjući se prema vrhu izboja, broj listića se ponovo smanjuje, tako da samo jedan listić može biti cijeli list. Pri donjim dijelovima biljke listovi rastu jedan nasuprot drugog, te dolaze u paru a kasnije rastu naizmjenično.

Po nekim određenim pravilima, cvjetovi konoplje su dvodomni, no opisane su i jednodomne biljke. Kod jednodomnih primjeraka ponekad su i muški i ženski cvjetovi na jednoj stapki, a nekada su na odvojenim stapkama. Razlika između muških i ženskih cvjetova je ta što su muški cvjetovi složeni u obliku metlica i poprilično labavi, dok su ženski cvjetovi složeni grozdasto (Fathordoobady i sur., 2019)



**Slika 1.** Muški cvat (lijevo), ženski cvat (desno) i plod industrijske konoplje (Lukačević, 2016)

Dosad poznate oblike konoplje oprašuje vjetar. Konoplja je diploidna biljka, što znači da nije umjetno uzgojena jer su poliploidne biljke umjetno uzgojene. Sjeme konoplje karakteristično

je jer se koristi kao hrana već dugi niz godina, te sadrži svih 11 esencijalnih aminokiselina (Mihelčić, 2017).

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* (*Ruderalna konoplja*) 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)

Razlikujemo više vrste konoplje. Vrste se svrstavaju prema njihovoj namjeni. Razlikuju se psihoaktivne odnosno medicinske konoplje sa sadržajem THC-a većim od 0,2 % u biljci i industrijske tj. ukrasne konoplje. Njihov sadržaj THC-a je ispod 0,2 %. Visina do koje konoplja može narasti varira ovisno o podvrsti. Može narasti od 50 cm do 8 m. Najviša razina u Europi koju doseže je oko 4 m, no prema nekim istraživanjima visina koja se smatra realnom je 2 m. Ukoliko govorimo o korijenju konoplje ako su uvjeti tla odgovarajući, može prodrijeti i do 140 cm u dubinu što dovodi do bitne razlike ako uspoređujemo sa drugim biljkama (Mihelčić, 2017).

### 2.1.2 Povijesni razvoj konoplje

Konoplja se prije sijala na iscrpljenim, nabijenim tlima kako bi pripremila i razrahlila tlo za kasniji uzgoj zahtjevnijih biljaka, npr. žitarice. Iz istog razloga se konoplja upotrebljavala na područjima stepa ugroženih dezertifikacijom. Konoplja je zapravo bila priprema za druge biljke nakon što bi ona popravila kvalitetu tla. Karakteristično ime za konoplju u Kini je 'MA. U

starim spisima pronađeno je kako su Kinezi koristili konoplju kao sredstvo protiv malarije, reume te drugih zdravstvenih tegoba. Zanimljiva je spoznaja da se konoplja u hinduističkim obredima koristi kao zaštita od zla, te da se Buda u svom putu prema prosvjetljenju hranio samo sjemenkama konoplje. Najstariji nalazi konoplje u Europi stari su oko 5,500 godina i potiču s područja Njemačke. Na području današnje Litve je pronađeno sjemenje od oko 2,500 godina pr. Krista. Skiti su u području današnje južne Rusije uzgajali ruderalnu konoplju radi hrane, ali i radi izrade i izvoza užadi od nje još oko 700. god. pr. Kr. Ova zanimljiva i karakteristična biljka se stoljećima koristila u razne svrhe. Tako je poznato da je merovinska kraljica Adelheid bila sahranjena u odjeći od konoplje, te da je Karlo Veliki donio prvi zakon o konoplji. Mnoga oružja su prije izrađivana pomoću konopljinih vlakana, kao što je npr. dugački luk. U 13. stoljeću u Europu stiže još jedan način primjene konoplje za proizvodnju papira. Na tom papiru je napisana Gutenbergova Biblija, koja se čuva sve do danas. U pomorstvu je primjena konoplje bila jako važna. Užad i jedra su se proizvodila od konoplje, jer je vlakno konoplje puno otpornije na slanu vodu, te upija puno manje vode od pamučnih tkanina. Pojavom novih vlakna u Europi (sisal, sintetička vlakna) sredinom 20. Stoljeća istiskuju konoplju sa samog vrha. Čak je i njezin uzgoj nakon 2. svjetskog rata zabranjen (Edwards i Whittington, 1992).

## **2.2 CVJETOVI KONOPLJE**

Kao što smo već prethodno naveli, konoplja je jednogodišnja biljka poznate vrste kanabisa te se uzgaja diljem svijeta. Stabljika konoplje je uspravna, ne razgranata, robusna te naraste do 150 cm visine. Listovi su prekriveni kratkim dlačicama, te su u donjem dijelu stabljike nasuprotni a u gornjem dijelu naizmjenični. Listovi su smješteni na dugim peteljka. Razdijeljeni su na 3-9 lančastih dijelova. Na rubovima su nazubljeni i na obje strane dlakavi. Važno je napomenuti da je konoplja dvodomna biljka. Razlikujemo muške i ženske biljke (Slika 3). Cvjetovi ženske biljke su jednospolni te ih karakterizira poprilično neugledan izgled.



**Slika 3.** Prikaz morfološke razlike između ženskih i muških cvjetova (Tisaj, 2020)

Kod muških cvjetova je karakteristika ta da su skupljeni u metličaste cvatove na samom vrhu stabljike. Ocvijeće kod muških cvjetova je sastavljeno od svijetlozelenih listića i imaju 5 prašnika. Antene prašnika su na dugim prašničkim nitima te vire iz cvijeta. Ženski cvjetovi se nalaze u pazušcima pricvjetnih listića, koje čine tučak s nadraslom plodnicom koja ima jedan sjemeni zametak. Vrijeme cvata je oko 20 dana, a razdoblje rasta se odvija od srpnja do kolovoza. Plod ove biljke je oraščić, te ga možemo prepoznati po jajastom obliku i svijetlo smeđoj boji sa mrežastim šarama. Konoplja sadrži oko 750 prirodnih kemijskih spojeva. Obilje kemijskih spojeva u cvjetovima kanabisa proizilaze iz biosinteze osobito terpena i kanabinoida u izvan staničnoj sekretarnoj šupljini, poznatoj kao trihoma (Lukačević, 2016).

### 2.2.1 Sušenje

Najčešća i osnovna tehnika očuvanja bilja i zadržavanja bioaktivnih tvari je sušenje. Ovisno o odabiru metode sušenja i parametrima, postiže se različita kemijska i biološka aktivnost. Odabir metode sušenja ima velik utjecaj na sadržaj hlapljivih eteričnih ulja unutar bilja.

Tijekom procesa sušenja dolazi do povećanja ili smanjenja koncentracije hlapljivih tvari ili do stvaranja novih kemijskih spojeva. U posljednje vrijeme sve je više fokus stavljen na upotrebu sekundarnih metabolita iz cvjetova konoplje, koje karakterizira nizak sadržaj tetrahidrokanabinola (THC). Eterična ulja koja su ekstrahirana iz cvjetova konoplje se koriste u kozmetici, kao sastojci koji se koriste u proizvodnji krema, sapuna, šampona. Također njihovu primjenu možemo pronaći u prehrambenoj industriji, kao aromu za alokoholna i bezalokolna

pića i aditive u pečenju. Tijekom procesa sušenja mogu se dogoditi sljedeće promjene u sastavu eteričnog ulja- povećanje ili smanjenje koncentracije hlapljivih tvari ili stvaranje novih kemijskih spojeva. Najčešće korištena metoda sušenja je konvekcijsko sušenje (CD), postupak s kontinuiranim protokom vrućeg zraka za uklanjanje vlage iz biološkog materijala. Razvojem tehnologije, pojavile su se alternative za bolje performanse sušenja, poput vakuumsko-mikrovalnog sušenja (VMD) i kombinirane metode koje se sastoje od konvekcijskog prethodnog sušenja nakon čega slijedi vakuumsko-mikrovalna završna obrada sušenja (CPD-VMFD). Metoda VMD omogućuje brže sušenje materijala uz izbjegavanje visoke temperature. Ovo višestepeno sušenje, spajanje dviju metoda CD-a i VMD-a omogućuje zadovoljavajući stupanj sušenja materijala jer nudi prednosti VMD metode s visokim performansama koje ima CD (Kwasnica i sur., 2020).

## 2.3 KLOROFIL

Prve spoznaje i izoliranje klorofila spoznali su Joseph Bienaimé Caventou i Pierre Joseph Pelletier 1817. godine. Tijekom svog rada, bili su upoznati sa činjenicom da zelene biljke koriste ugljikov dioksid, a oslobađaju kisik. 1883. godine njemački filozof Julius von Sachs pokazao je da klorofil nije raspršen po cijeloj biljnoj stanici, već da se nalazi u posebnim strukturama, a to su kloroplasti. Pojam klorofil je zapravo „naziv“ koji obuhvaća skup spojeva, pigmenta koji su kompleksi tetra pirolskog porfirinskog prstena s magnezijem. Na reducirani porfirinski kromofor esterskom vezom vezan je terpenoidni alkohol fitol koji molekulu klorofila čini lipofilnom. Molekula klorofila sadrži porfirinsku glavu čija je veličina približno 1,5x1,5 nm, a fitilni lanac je dužine oko 2 nm. U klorofilu su prisutne konjugirane dvostruke veze koje omogućuju uklanjanje  $\pi$  elektrona u prstenovom sustavu. Za apsorpciju svjetlosne energije najvažnije je vezivanje dvovalentnog magnezijevog atoma na dušikove atome porfirinskog prstena. Ovisno o supstituentima, primarno vinilnim i metilnim skupinama na 3/30 položajima 3 i 7, molekule klorofila u većoj mjeri apsorbiraju sunčevu svjetlost pojedinih valnih duljina (Pangestuti i Kim, 2011).

Klorofil ili biljno zelenilo dolazi od grčke riječi chloros (zeleni) i phyllon (list) i on je zeleni biljni pigment koji je smješten u kloroplastima (u svim zelenim dijelovima biljke) te je nužan u procesu fotosinteze. Sve zelene biljke, alge i jedna skupina primitivnih fotosintetskih bakterija imaju u sebi klorofil.

U središtu klorofila nalazi se magnezijev ion i bočna ugljikovodična skupina, fitol. S obzirom da je magnezij metalni ion, klorofil se naziva metalobiomolekulom, kao i hemoglobin. Budući

da klorofil u svojoj jezgri ima magnezij, često se naziva „zelenom krvlju“. To je neophodno za rast biljaka te njihovo održavanje života na Zemlji. Također omogućava biljkama da sintetiziraju vlastitu hranu i čine osnovu cijelog prehrambenog lanca (Smoljo, 2018).

### 2.3.1 Vrste klorofila

Različite boje biljaka nastaju zbog prisutnosti drugih pigmenata zajedno s klorofilom, kao što su karotenoidi (odgovara crvenoj, narandžastoj ili žutoj boji). Fotosustavi nastaju u suradnji ostalih pigmenata tzv. „pomoćni pigmenti“. Postoje četiri vrste klorofila, to su: A, B, C i D.

Klorofil A najbrojnija vrsta zastupljena u skoro svim organizmima koji vrše fotosintezu (oko 75 % svih pronađenih zelenih pigmenata). Klorofil A i mnogi njegovi derivati, poznatiji pod nazivom klorini, po strukturi su dihidroporfirini.

Klorofil B može se naći u biljkama, zelenim algama i euglenofitima (jednostanične alge). Ova vrsta klorofila povećava valne duljine svjetlosti koje biljka može zarobiti pa je veća koncentracija klorofila B u zasjenjenim biljkama. Klorofil B uvijek se u prirodi nalazi uz klorofil A te je u manjim količinama od klorofila A, a njihov omjer varira između 1:2 i 1:5. Klorofil C prisutan je u nekim skupinama kao što su dijatomeje, dinoflagelati i smeđe alge, dok se klorofil D nalazi se u crvenim algama (Singh i sur., 2020).

Većina lišća tijekom zime mijenja boju zbog smanjena količine klorofila, a pomoćni pigmenti se značajno ne razlikuju i prema tome se vide njihove boje koje čine listove općenito žutim. Ukoliko govorimo o prehrani također možemo spomenuti klorofil. Nalazi se u povrću (posebno zelenom). Što je biljka zelenija to sadrži više klorofila. Tako visoku koncentraciju klorofila imaju brokula, špinat, kelj, blitva, peršin...Određenim postupcima kuhanja ili dehidracije dolazi do promjene u strukturi klorofila, što znači da pri povećanju temperature opada koncentracija klorofila i istodobno se povećava količina feofitina. Klorofil je dobar izvor antioksidativnih hranjivih tvari, kao što su vitamin A, C i E, te je dobar izvor i magnezija koji je neophodan za život (Ranall i Venturi, 2004).

### 2.3.2 Prisutnost klorofila

Sadržaj klorofila nam govori zapravo o zrelosti sjemena. Visok sadržaj klorofila nije poželjan u prehrambenoj industriji, jer boji ulje i ograničava upotrebu ulja. Klorofil i njegovi derivati potječu iz sjemena konoplje i zadržavaju se u ulju tijekom hladnog prešanja. Kao fotoosjetljiv pigment, klorofil je osjetljiv na foto-oksidaciju i djeluje kao prooksidans u uljima. Postupci



izbjeljivanja i rafiniranja jestivih ulja mogu smanjiti klorofil na nisku razinu. Ultrazvučno izbjeljivanje uklanja do 99 % klorofila iz ulja konoplje (Saastamoinen i sur., 2016).

Dva glavna izomera pronađena u ulju sjemenki konoplje su klorofil a i klorofil b. Oba izomera imaju maksimalnu apsorpciju na valne duljine između 640 i 670 nm, tako da se njihova količina u metanolu ekstrakta dietil etera može brzo odrediti spektrofotometrijom. Za ulje sjemenki konoplje karakteristična je intenzivna tamno zelena boja sa visokim sadržajem klorofila. Visok sadržaj klorofila može imati štetne učinke na ulje sjemenki konoplje. S obzirom da su klorofili osjetljivi na fotooksidaciju pri izlaganju svjetlosti, dolazi do promjene boje ulja iz tamnozelene u žutu. Osim toga, visok sadržaj klorofila dovodi do nestabilnosti slobodnih masnih kiselina u ulju, ubrzavajući užeglost te rezultira užeglom aromom. Ako govorimo o CBD ulju i procesu ekstrakcije etanolom, etanol se miješa sa zelenim lišćem gdje nastaje klorofil. Rezultat je tamna tekućina gorkog i travnatog okusa. Nakon toga potrebno je dodatno filtriranje kako bi se uklonio klorofil, ali neke dodatne metode filtracije također mogu ukloniti vrijedne kanabinoide iz sastava ulja (Jingbang Liang, 2017).

Ukoliko govorimo o ulju, važno je razlikovati CBD ulje i ulje konoplje. Glavna razlika između ulja konoplje i CBD ulja je upravo u tome što se dobivaju iz različitih dijelova biljke konoplje te stoga imaju različite spojeve i hranjive tvari. Razlika je također i u količini CBD-a sadržanog u ulju. Iako je ulje sjemenki konoplje bogato omega kiselinama, CBD se može naći tek u tragovima, dok CBD ulje može imati od 2 % do 99,9 % CBD-a, ovisno o proizvodu, čistoći i porijeklu. U svom prirodnom stanju, biljna tvar *Cannabis sativa* L. sadrži klorofil zbog kojeg biljka izgleda zeleno. Ako je ulje filtrirano kako bi se uklonio fitokompleks, moglo bi izgledati više zlatne boje. Ekstrakcijom etanolom ostaje klorofil koji ulju daje zelenu boju (Qamar i sur., 2022).

## **2.4 KANABIONIDI**

Kanabinoidi su, najjednostavnije rečeno, prirodni aktivni sastojci konoplje. Sve do danas iz industrijske konoplje je izolirano više od 80 različitih kanabionida koji izravno utječu na endokanabinoidni sustav kod čovjeka. Shvaćanje tog endokanabinoidnog sustava će nam zapravo pomoći u shvaćanju kanabionida. Najpoznatiji su kanabidiol (CBD), kanabidivarin (CBDV), delta-9-tetrahidokanabinol (delta-9-THC) i kanabigerol (CBG). Unutar biljke kanabionidi se sintetiziraju i akumuliraju u obliku karboksilnih (organskih) kiselina (CBDA, THCA, CBCA i CBGA), koje se zatim pretvaraju u neutralne oblike dekarboksilacijom. Kanabidol je prvi izolirani fito-kanabionid otkriven u ekstraktu ulja konoplje, te 1930. godine

dolazimo do sastava njegove kemijske strukture. Nakon toga, iste godine dolazi do izolacije kanabidola, prirodnoga aromatskog terpenoida (-)-kanabidiola i (-)-trans- $\Delta^9$  - tetrahidrokanabinola ( $\Delta^9$  -THC) ili dronabinola (sintetički THC). Glavni psihoaktivni sastojak marihuane otkriven je 1940. godine. Tim otkrićem se podigla velika prašina, te brojne znanstvenoistraživačke grupe počinju sa radom i proučavanjem. Djelovanje THC-a ostaje nepoznato sve dok Allyn Howlett i njegove kolege nisu došli do zanimljivih spoznaja. Oni naime otkrivaju kanabionidni CB1 receptor u mozgu. 1992 godine dr. Mechoulama u laboratoriju u Izraelu izolira glavni endogeni kanabinoid anandamid i 2-arahidonoil glicerol . Ovi spojevi su derivati arahidonske kiseline ( $\omega$ -6). THC je zapravo najučinkovitiji fitokanabionid, te je odgovoran za motoričke poremećaje, psihomotorne napetosti, uzbuđenost, arefleksiju, euforiju i neraspoloženja, tjeskobu, uspavanost, oslabljeno pamćenje (Tomačić Paić, 2012).

#### 2.4.1 CB1 i CB2 receptori

Kanabinoidi u našem tijelu utječu na receptore CB1 koji se nalazi u našem živčanom sustavu te CB2 koji je smješten unutar imunološkog sustava. CB1 receptor se pojavljuje unutar i izvan centralnog živčanog sustava, za razliku od CB2 receptora koji je otkriven isključivo u perifernom sustavu. Međudjelovanjem endogenih liganada s kanabinoidnim receptorima, endokanabinoidi reguliraju stanične razine CAMP-a (molekula koje djeluju kao sekundarni glasnik u važnim biološkim procesima te sudjeluju u prijenosu signala) kroz G-protein posredovane interakcije sa adenilil-ciklazom, i moduliraju funkcionalna svojstva naponski reguliranih ionskih te ligand-reguliranih ionskih kanala poput serotoninškoga 5-HT<sub>3</sub> receptora, nikotinskoga acetilkolina, i glicin receptora. Smatralo se kako upravo lipofilni  $\Delta^9$  -THC stvara nespecifične interakcije sa staničnim membranama mijenjajući njihovu fluidnost i strukturu te da tako utječe na većinu staničnih tipova. No, (-)- $\Delta^9$  -THC se veže na dva G-protein kanabinoidna receptora CB1 i CB2, otkrivena u tkivu sisavaca. CB1 receptor koji je otkriven 1990. godine, razlog je mnogih bolesti kao što su: pretilost, ovisnost o alkoholu, Parkinsonova bolest itd. Terapeutsku primjenu imaju CB2 receptori ligandi, kao prilagođivači imuniteta za supresiju tumora i upala. CB2 receptori su smješteni izvan središnjeg živčanog sustava, te je zanimljivo da CB2 receptori agonisti (kemijske tvari koje se vežu za receptore stanica i potiču odgovor stanice) dovode do analgezije (uklanjanja ili odsustva boli bez gubitka svijesti) neuropatskih bolova. Iz tog razloga su agonisti koji selektivno aktiviraju CB2 dovode do efektivne analgezije bez neželjenih psihoaktivnih učinaka na središnji živčani sustav, a koji su povezani s CB1 receptorom. Ukoliko govorimo o CB2 receptorima, njihovo izražavanje je

ograničeno na imunosna tkiva kao što su slezena, krajnici i na hematopoetske matične stanice. Također je nađen i u mikroglijanim, u malignim gliomalnim stanicama, kao i stanicama tumora kože. Utvrđena je i neočekivano velika raspodjela CB1 receptora u mozgu, ali i u plućima, jetri, slezeni i bubrežima (Grotenhermen, 2005).

CB1 transkript i protein pronađeni su u regijama mozga uključenim u nekoliko vitalnih funkcija središnjega živčanog sustava. Neke od tih funkcija su učenje i pamćenje, motivacija i spoznaja, percepcija boli, neuroendokrina kontrola i mnoge druge funkcije. Endokanabinoidni sustav uključen je u različite patofiziološke procese u centralnom i perifernom tkivu. Ti procesi uključuju hormonalnu regulaciju unosa hrane, kardiovaskularne, gastrointestinalne, imunološke, bihevioralno-kognitivne, antiproliferativne i reproduktivne funkcije (Tomačić Paić, 2012).

## **2.5 CBD ULJE**

Ulje kanabidiola (CBD) u biti je koncentrirani ekstrakt otapala napravljen od cvjetova ili lišća kanabisa koji je otopljen u jestivom ulju poput suncokreta, konoplje ili maslinovog ulje. Korištena otapala mogu varirati od relativno bezopasnih organskih otapala (etanol, izopropil alkohol) na više štetne (petroleter, medicinski benzin itd.) ili super- kritične tekućine (butan, CO<sub>2</sub>). Primijenjena otapala imaju utjecaj na okus, boju i viskoznost konačnog proizvoda. Prilikom proizvodnje CBD ulja koristi se postupak vinterizacije. Vrlo niske temperature mogu dodatno izvući terpene, klorofil i kanabinoide iz biljke, a hlađenje ili vinterizacija se koristi kada se isti postupak nije koristio prilikom stvaranja sirovog ekstrakta (Bogale i sur., 2021).

Kanabigerol (CBG) je fitokanabinoid prisutan u biljnom rodu Cannabis i nalazi se u CBD uljima punog i širokog spektra. CBG se kao i CBD veže na CB1 i CB2 receptore te nije psihoaktivan. CBD djeluje kao snažni antioksidans tako što putem blokiranja enzima hidrolaze masno kiselinskih amida (FAAH 42) aktivira unutarnju molekulu endokanabinoida anandamid. Kada je enzim potisnut, proizvodi visok nivo anandamida koji se pod utjecajem te energije raspada na arahidonsku kiselinu i etanolamin koji svojim brojnim terapijskim djelovanjem utječu na smanjivanje boli i upalnih procesa, liječenje mučnine i povraćanje, regulaciju apetita, potiče moždanu aktivnost i očuvanje memorije, utječe na raspoloženje i koncentraciju. U 2011. godini objavljeno je istraživanje u kojem se ispitivao anksiolitički učinak. Istraživanje je provedeno tako što je jedna skupina sat ipol prije javnog nastupa konzumirala CBD te su rekli

da su osjećali manju tjeskobu i nelagodu tijekom nastupa. Također su imali bolju koncentraciju od skupine koja je dobila placebo efekt (Narayanan i sur. 2020).

### 2.5.1 Terapeutski učinci CBD-a

Danas se CBD koristi za liječenje širokog spektra zdravstvenih stanja. Sve je zapravo počelo slučajnim otkrićem roditelja koji su eksperimentirali liječenje svoje djece ozbiljnog oblika epilepsije u djece, Dravetov sindrom. Ovaj učinak je sada pod kliničkim ispitivanjem s farmaceutskim proizvodom Epidiolex. Ostala medicinska stanja kojima CBD pomaže kod liječenja su Parkinsonova bolest, shizofrenija te anksiozni poremećaj. Iako se istraživanja CBD-a svakodnevno vrši, većina trenutnih upotreba CBD-a nije (još) potkrijepljeno kliničkim podacima. Svima nama poznati primjer liječenja CBD uljem je liječenje raka. Određena istraživanja govore da su neki kanbinoidi sposobni spriječiti razvijanje stanica raka, s druge strane postoje određene naznake da se neke vrste raka mogu čak i ubrzati ukoliko su izložene kanabionidima. Česti problemi s kojim se liječnici susreću su odbijanje pacijenata liječenja raka kemoterapijom jer čvrsto vjeruje u ljekovita svojstva kanabinoida. CBD ulje se sve više promovira i kao tretman radi sprječavanja određenih bolesti. Danas je korištenje CBD ulja sve više rašireno. Ukoliko su korisnici CBD ulja uglavnom odrasli, dobro informirani i razumni potrošači, njegova široka upotreba bi bila možda prihvatljiva i ograničena. Međutim, to nije slučaj jer se aktivno prodaje kod upotrebe djece, starijih osoba, pa čak i kod ljubimaca. Neselektivno korištenje CBD-a može dovesti do različitih problema među ovim potrošačima. Na primjer, CBD pokazuje potencijal za liječenje epilepsije kod djece, no treba se zapitati što donose dugoročni učinci visokih doza CBD-a na moždane funkcije. Zbog toga se svakodnevno vrti pitanje je li CBD lijek ili dodatak prehrani. Glavna razlika je ta što se lijek smatra nesigurnim za korištenje dok se ne dokaže da je siguran, dok se dodatak prehrani smatra sigurnim dok se ne dokaže da je nesiguran (Narayanan i sur. 2020).

## 2.6 ULTRAZVUK

Ultrazvuk je tematika o kojoj se danas sve više govori i istražuje. Razlog je njegova potencijalna primjena u prehrambenoj industriji, za analizu i modifikaciju prehrambenih proizvoda. Možemo razlikovati različite frekvencije koje primjenjujemo. Ukoliko je primijenjena visoka frekvencija, govorimo o dijagnostičkom ultrazvuku niske energije, a ako je frekvencija niska, govorimo o ultrazvuku visoke energije. Dijagnostički ultrazvuk, kojem je intenzitet manji od  $1 \text{ W cm}^{-2}$ , djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više. Karakterističan je po tome što ne

uzrokuje fizičke i kemijske promjene u svojstvima medija na koji se primjenjuje te se zato smatra neinvazivnom tehnikom. Koristi se kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, sastava viskoznosti, mjerenja teksture, kontrolu pakiranja, koncentracije tvari u hrani. Ultrazvuk visokog intenziteta sa rasponom frekvencija od 20 do 100 kHz te visokih intenziteta u rasponu od 1 do 1000  $\text{Wcm}^{-2}$ , može izazvati fizičke promjene materijala te neke kemijske reakcije u materijalima na kojima je primijenjen. Njegova je namjena višestruka. Koristi se za čišćenje, homogenizaciju tekućina, sušenje, omekšavanje mesa, ekstrakciju, emulgiranje, destilaciju, kristalizaciju, sterilizaciju... U prehrambenoj industriji bitan je potencijal za primjenu ultrazvuka kao metode ne-toplinske obrade hrane budući da može uzrokovati inaktivaciju enzima i mikroorganizama, poboljšanje emulgiranja i dispergiranja ili ubrzavanja određenih kemijskih reakcija. Ultrazvuk visokog intenziteta možemo dobiti na više načina: pokretanjem tekućine, mlazom plina ili na način koji je najpoznatiji u prehrambenoj industriji, a to je pomoću električne energije. Generator pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije od cca. 25 kHz (25000 ciklusa po sekundi) električne energije. Električna ili mehanička energija se pretvara u energiju zvuka pomoću ultrazvučnih pretvarača (Jambrović, 2021).

### 2.6.1 Kavitacija

Širenjem zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi koji dovode do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije i stvaranja ekspanzivnih vrtloga. Rezultat oscilacija tlaka do kojih dolazi u mediju je taj što mjehurići osciliraju te uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije. Kada mjehurić dosegne određenu kritičnu veličinu, on nema mogućnost učinkovite apsorpcije energije, a bez ulazne energije šupljina se ne može samo održavati te se mjehurić urušava sam u sebe. Veličina do koje mjehurić najviše može dosegnuti, tj. njegova kritična veličina ovisi o primijenjenoj frekvenciji i mediju koji se testira. Iz tog razloga dolazi do stvaranja ciklusnih fluktacija tlaka, te one dovode do stvaranja velikog broja udubljenja. Pri stvaranju kavitacije najvažniji faktor je frekvencija ultrazvuka. Ukoliko su frekvencije više od 1 MHz male su šanse za kavitaciju, a iznad 2.5 MHz nema kavitacije. Pored frekvencije i intenziteta ultrazvuka, kavitacija ovisi o svojstvima proizvoda kao što su viskoznost medija, gustoći, površinskoj napetosti medija... Temperatura je obrnuto proporcionalna početku kavitacije. Intenzitet kojom se kavitacija odvija u mediju ovisi o koligativnim svojstvima tog medija kao što su tlak pare, površinska napetost, viskoznost i gustoća. Da bi se formirali mjehurići kavitacije u tekućem mediju potrebna je

energija koja je razmjerna površinskoj napetosti i tlaku para. Prema tome, što je veća površinska napetost tekućine, biti će veća energija koja je potrebna za stvaranje kavitacijskih mjehurića, a posljedično će biti veća energija udarnog vala koji se proizvodi kada mjehurić implodira (Škof, 2020).

## **2.7 EKSTRAKCIJA ETANOLOM**

U medicini se alkohol koristi od davnina za ekstrakciju kemijskih spojeva iz biljaka. Kao otapalo najčešće su korišteni butan ili etanol. Ukoliko promatramo butan i etanol, butan je bolje otapalo, no ekstrakcija etanolom se smatra ipak sigurnijom. Razlog tome je što tragovi otapala nakon ekstrakcije mogu ostati prisutni u konačnom proizvodu. S obzirom da je etanol siguran za konzumaciju, tragovi etanola neće imati štetne posljedice na zdravlje u gotovom CBD ulju, što nije slučaj kod butana (Jokić i sur., 2011).

Metoda ekstrakcije etanolom se može izvoditi tako da se etanol kroz kapljice propušta kroz spremnik sa konopljom ili se konoplja namače u etanolu. Etanol tada ekstrahira CBD i druge spojeve iz biljke. Poslije procesa ekstrakcije alkohol zagrijavanjem isparava, a ono što preostaje su molekule CBD-a te drugi spojevi. Etanol gotovo potpuno ispari te ova metoda omogućuje postizanje izuzetno visoke koncentracije CBD-a u krajnjem proizvodu. Industrijskom metodom proizvodnje etanol metodom može se dobiti koncentrat 99 % čistog CBD-a. Ukoliko promatramo metodu ekstrakcije etanola u usporedbi sa CO<sub>2</sub> metodom, relativno je jeftina i jednostavna. No, glavni problem ove metode je zapravo sigurnost. Ova metoda zahtjeva oprez i provedene određene sigurnosne mjere, iz razloga jer je visoko koncentrirani alkohol izuzetno zapaljiv. Tragovi otapala često zaostaju u krajnjem proizvodu, što može predstavljati problem osobama s intolerancijom na alkohol. Dok se industrijska proizvodnja često obavlja u nekoliko složenih koraka destilacije, u najosnovnijem obliku etanol metoda može se izvesti pomoću stvari koje možete naći u svakoj kuhinji (vjerojatno uz iznimku 90 % alkohola). Etanol metodom se postiže mnogo koncentracije CBD-a u konačnom proizvodu, te kod industrijske proizvodnje etanol metodom se može dobiti koncentrat 99 % čistog CBD-a. S obzirom da CBD nije topiv u vodi, za ovu je metodu potrebno koristiti visoko koncentrirani prehrambeni alkohol (90 %). Ono što je jako važno spomenuti je da se metodom ekstrakcije etanolom mnogo više klorofila izvuče, dok se ekstrakcijom super kritičnim CO<sub>2</sub> izvuče mnogo manje klorofila no puno više voskova (Sunghyun Hong i sur., 2015).

## 2.8 DEKARBOKSILACIJA

Dekarboksilacija je kemijski proces koji uklanja karboksilnu skupinu i oslobađa ugljikov dioksid. Dekarboksilacija je vrlo spor proces koji se prirodno odvija u biljkama, no ubrzanje procesa dekarboksilacije se odvija izlaganjem toplini, svjetlu i kisiku. Nakon sušenja konoplje provodi se proces dekarboksilacije pri temperaturi koja će biti najbolji rezultat najveće količine CBD-a, ali uz što manji vremenski period. Dekarboksilacija je važan proces jer provodi izolaciju komponenata u konoplji iz biološki inaktivnih oblika u aktivne, kao što su kanabidol, kanabigerol i dr. U konoplji se kanabinoidi u značajnoj mjeri nalaze u formi karboksilnih kiselina, npr. kanabidiolna kiselina (CBDA) te su u tom procesu nestabilni te ih se procesom ne enzimске dekarboksilacije tj. zagrijavanjem pri određenoj povišenoj temperaturi kroz određeni vremenski period može lako prevesti u neutralniji stabilniji oblik npr. kanabidol (CBD). Važno je primijeniti stroge kontrole temperature kada dekarboksilirate konoplju, koliko god je to moguće. Dok je toplina potrebna za dekarboksilaciju, ekstremne temperature mogu uništiti mnoge važne biljne komponente koji doprinose pozitivnim zdravstvenim ishodima, poput terpena. Svaki pojedinačni terpen može imati svoje terapijske zdravstvene prednosti, ali također nosi vlastitu osjetljivost na toplinu (Moreno i sur., 2020).

Cilj dekarboksilacije konoplje je zagrijavanje cvijeta na relativno niskim temperaturama kako bi se omogućila dekarboksilacija bez uništavanja drugih korisnih biljnih tvari kao što su terpeni ili flavonoidi. Sirovi cvijet konoplje sadrži tetrahidrokanabinolnu kiselinu (THCA), ne opijajuću tvar koja se može pretvoriti u opojnu tvar tetrahidrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC) kroz proces dekarboksilacije. Proces dekarboksilacije može se izvesti ili na biljnom materijalu prije ekstrakcije ili izravno na ekstrahiranoj oleorezini. Međutim, prvi proces je općenito poželjniji jer nudi dvije ključne prednosti u kombinaciji s ekstrakcijom s CO<sub>2</sub>, a to su su: vlaga prisutna u biljci uklanja se tijekom dekarboksilacije, te su kanabinoidne kiseline mnogo polarnije od svojih neutralnih analoga i stoga manje topive u CO<sub>2</sub> (Moreno i sur., 2020).

### 2.8.1 Povijest procesa dekarboksilacije

Proces dekarboksilacije spomenuli su još 1970. Kimura i Okamoto, kada su primijenili toplinu (110 °C) na različite frakcije biljke kanabisa kako bi odredili podjelu THCA kao funkciju THC-a. Kanter je opisao proces dekarboksilacije kao neophodan korak u određivanju THC-a pomoću HPLC-a i odredio da su najbolji uvjeti na relativno visokoj temperaturi (200 °C) i kratkom

vremenu reakcije (3 min). Prvu kinetičku studiju proveli su Veress i sur., koji su istraživali dekarboksilaciju THCA i CBDA na staklenoj površini kao i na različitim površinama sorbenta u otvorenoj peći i opisali je kao reakciju prvog reda. Perrotin-Brune proučavao dekarboksilaciju THCA u biljnom materijalu kanabisa koristeći vakuumsku pećnicu. Opisana je kao reakcija pseudo-prvog reda kataliziranu kratkolančanim organskim kiselinama prisutnim u cvjetovima. Citti i sur. proučavali su dekarboksilaciju CBDA u ulju sjemenki konoplje u otvorenim i zatvorenim reaktorima. Koliko je poznato, jedinu objavljenu studiju koja je potkrijepljena dekarboksilacijom tri glavne kanabinoidne kiseline (THCA, CBDA i CBGA) proveo je Wang, koji je istraživao dekarboksilaciju ekstrakata kanabisa u vakuumskoj peći kako bi dobio odgovarajuće konstante brzine prvog reda. Iako je rjeđa pojava, proces dekarboksilacije može se provesti na ekstrahiranoj oleorezini umjesto na biljnom materijalu, a praćenje tijekom reakcije u stvarnom vremenu može se provoditi pomoću IR spektroskopije kako bi se poboljšao proces (Moreno i sur., 2020).

## 2.9 AKTIVNI UGLJEN

Aktivni ugljen je odličan adsorbens zbog svoje velike površine i mikroporoznosti, strukture i visoke površinske reaktivnosti za pročišćavanje. Uklanja boje i mirise iz otopine, filtrira i uklanja štetne komponente iz plinova i tekućina, zato ima primjenu u gotovo svim granama industrije, od prehrambene, farmaceutske, kemijske, naftne i automobilske industrije kao i pročišćavanje pitke vode te industrijskih i komunalnih otpadnih voda (Grubišić Čabo, 2019).

### 2.9.1 Struktura aktivnog ugljena

Uobičajeni elementarni sastav aktivnog ugljena je: 88 % C, 0,5 % H, 0,5 % N, 1,0 % S i 6-7 % O. Udjel kisika je promjenjiv, a ovisi o vrsti materijala koji se aktivira i o uvjetima u procesu aktivacije. Struktura aktivnog ugljena je mikrokristalična te se razlikuje od strukture grafita. Ključna razlika je u međumolekularnoj udaljenosti koja kod grafita iznosi 0,335 nm, a kod aktivnog ugljena je između 0,34 i 0,35 nm. Aktivni ugljen sadrži strukturu sa slobodnim radikalima, odnosno strukturu s nesparenim elektronima. Ti ne spareni elektroni su stabilizirani i zaostali ured procesa karbonizacije, zbog pucanja veza na rubovima aromatskih ploča. Krajnji atomi ugljika imaju nezasićene valencije te iz tog razloga mogu međusobno djelovati s heteroatomima kao što su kisik, vodik, dušik i sumpor. To međudjelovanje dovodi do različitih vrsta površinskih skupina. Ako govorimo o veličini pora, temeljna razlika je praškasti i



granulirani aktivni ugljen (Slika 4). Aktivni ugljen u prahu ima tipičnu veličinu čestica manju od  $100 \times 10^{-6}$  m, a najčešće vrijednosti su oko  $15-25 \times 10^{-6}$  m. Čak polovina proizvodnje aktivnog ugljena je u praškastom oblik. Najčešće se primjenjuje tamo gdje otopljena tvar sporo difundira u pore i tamo gdje bi bilo potrebno mnogo vremena da se postigne ravnoteža ukoliko bi se upotrijebio granulirani oblik. Njegova primjena je u pročišćavanju industrijskih i komunalnih otpadnih voda, uklanjanju boje šećera, u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te za uklanjanje žive i dioksina iz struje dimnog plina. Pored svih gore navedenih prednosti aktivnog ugljena, između ostalog je i mogućnost mijenjanja količine ovisno o procesu. No, s druge strane javlja se problem gdje ga je teško regenerirati jer većina industrijskih procesa vode do gubitka ugljena te je regeneracija neisplativa (Lorena Koren, 2021.).



**Slika 4.** Različiti oblici aktivnog ugljika (Grubišić Čabo, 2019).

Ako pak govorimo o granuliranom aktivnom ugljenu, njegova prosječna veličina čestica je između 1-5 mm. Koristi se za pročišćavanje voda (za poboljšavanje boje, okusa i mirisa, uklanjanje pesticida), za uklanjanje boja iz prehrambenih proizvoda, za uklanjanje aromatskih spojeva tijekom sanacije voda i zemljišta. Njegova prednost u odnosu na praškasti aktivni ugljen je niža cijena te činjenica da se može regenerirati te nakon toga ponovo upotrijebit. Međutim, granulirani aktivni ugljen mora imati, uz odgovarajuću veličinu mikropora, i visoku prividnu gustoću, visoku tvrdoću i nizak indeks abrazije. Za ispunjenje ovih zahtjeva potrebno je puno istraživanja i razvoja (Grubišić Čabo, 2019).

Struktura aktivnog ugljena je takva da je čvrst, porozan, ugljikov materijal koji se dobije iz različitih izvora, kao što su treset, ugljen, katran, kokos, drvo, celulozni ostatak i dr. Također se dobije i iz nekih otpadnih materijala iz različitih industrija. Veličina i raspored pora, specifična površina (koja doseže do  $2500 \text{ m}^2 / \text{g}$  pa i više), granulacija i adsorpcijski kapacitet, čine aktivni ugljen izvrsnim adsorbensom. Pored svih prednosti koje ima, još uvijek ima jedan od velikih nedostataka, a to je visoka cijena. Iz tog razloga se često kao zamjena za aktivni ugljen koriste i neki drugi prirodni materijali poput zeolita, glina, biopolimera i sl. Njihova

adsorpcijska učinkovitost je niža od učinkovitosti aktivnog ugljena, ali su ekonomski prihvatljiviji (Lorena Koren, 2021).

### 2.9.2 Uklanjanje klorofila iz konoplje aktivnim ugljenom

Ukoliko govorimo o primjeni aktivnog ugljena kod konoplje, koristi se za otklanjanje klorofila iz konoplje točnije za otklanjanje obojenih nečistoća.

Aktivni ugljen jedna je od najpopularnijih opcija za uklanjanje klorofila i drugih neželjenih neaktivnih pigmenata iz etanolnih ekstrakata. Dok je aktivni ugljen vrlo učinkovit u uklanjanju pigmenata, također je vrlo učinkovit u uklanjanju aktivnih spojeva. Također rezultira mnogo nižim prinosima zbog velike raspodjele veličine pora i krhkosti čestica aktivnog ugljena. Drugi problem s aktivnim ugljenom je njegovo prirodno podrijetlo i zagađenje koje nosi. Aktivni ugljen se obično dobiva iz kokosovih ljuski ili smole ili drveta. Pepeo ovih proizvoda sadrži veliki udio teških metala. Kada se ugljik razgradi tijekom upotrebe, ti se metali raspoređuju po ulju u vrlo malim česticama. Postaje vrlo teško, ako ne i nemoguće, ukloniti ih filtriranjem. Možda je najčešća tvrdnja o aktivnom ugljenu da, iako dobro uklanja boju, uklanja i željene kanabinoide (Mousavi i sur., 2016).

### 2.9.3 Adsorpcijske izoterme

Općenito gledajući adsorpcijska izoterma je bezdimenzionalna krivulja koja prikazuje fenomen reguliranja zadržavanja/otpuštanja ili mobilnosti tvari iz poroznog medija koji se nalazi u tekućini ili tvari koja je otopljena u tekućini na krutu fazu pri konstantnoj temperaturi i pH-vrijednosti. Adsorpcijska ravnoteža (odnos adsorbata vezanog na adsorbens i ostatka adsorbata u otopini) postiže se tijekom dovoljno dugog vremena kontakta adsorbata i adsorbensa kada više nema vezanja ili otpuštanja adsorbata. Općenito, matematička korelacija koja daje važnu ulogu za mogućnost modeliranja i aplikacije dobivenih rezultata se grafički prikazuje kao odnos adsorbensa i rezidualne koncentracije adsorbata. Također, fizikalno-kemijski parametri zajedno s termodinamičkim pretpostavkama pružaju uvid u mehanizam adsorpcije, površinska svojstva i afinitet adsorbensa prema adsorbatu. Danas se koristi čitav niz adsorpcijskih izoterma kao što su na primjer Langmuirova, Freundlichova, Redlich–Petersonova, Koble–Corriganova, Temkinova, te Brunauer, Emmett, Teller (BET), no može se reći da niti jedna u potpunosti ne

definira sve moguće sustave adsorbent-adsorbat. Ipak, među znanstvenicima najčešće primjenjivane izoterme su Freundlichova i Langmuirova (Ćurko, 2013).

## 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

##### 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 uzoraka 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. Posuda se zatim prekrije aluminijskom folijom, te ide u sušionik na temperaturi 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. Uklanjanje klorofila

##### 3.2.2.1 Aktivnim ugljenom – peleti, mljeveni peleti, granule i mljevene granule

Za provođenje ekstrakcije koristili smo aktivni ugljen u obliku peleta i kao granulirani oblik. Oba oblika aktivnog ugljena smo dodatno i samljeli. Postupak smo provodili uz pomoć magnetske miješalice. Koristili smo otopinu od 50 mL etanolnog ekstrakta u koju smo dodali 1, 5 i 10 % aktivnog ugljena. Uzorak smo uzimali u razdoblju nakon 1, 2, 3, 4, i 24h. Uzorci su profiltrirani preko filter papira i razrijeđeni s etanolom (96 %) u omjeru 200 mL otopini i 2800 mL etanola. Tako razrijeđeni uzorci su dalje mjereni na spektrofotometru uz 96 % etanol kao slijepa proba.

##### 3.2.2.2 Zemljom za bijeljenje

Prilikom ekstrakcije koristili smo 5 % zemlju za bijeljenje koju smo zagrijavali. Zagrijavanje smo provodili na magnetskoj miješalici na temperaturi od 70 °C. Postupak je trajao 2 sata, a uzorak smo uzimali na svakih 30 min.

### 3.2.3 Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida

#### Princip metode:

Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra pri čemu je apsorpcijski maksimum za klorofil *a* (Ch-*a*) u plavom (~430 nm) te u crvenom dijelu spektra (~660 nm), dok se apsorpcijski maksimumi za klorofil *b* (Ch-*b*) nalaze između dvaju maksimuma klorofila *a* (Ch-*a*) i to na oko 450 i 640 nm (Abou-Arab i sur., 2010; Barba i sur., 2015).

#### Aparatura i pribor:

- Spektrofotometar (VWR UV-1600PC Spectrophotometer)
- Staklene kivete
- Mikropipete Eppendorf (100 mL i 1000 mL)
- Staklene epruvete i stalak za epruvete
- Staklena čaša, volumena 50 mL

#### Reagensi:

- 96 % -tni etanol

#### Postupak određivanja:

Dobivene ekstrakte cvijeta konoplje za kvantitativno određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida je potrebno prethodno razrijediti s 96 %-tnim etanolom te se potom mjeri apsorbanacija na 470 nm, 649 nm i 664 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, gdje se umjesto uzorka uzima 96 %-tni etanol. Svako mjerenje provedeno je u paraleli. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbanacije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

#### Razrjeđenja:

Uzorci pod brojevima 1 – 4 razrijeđeni su 5 puta: na 1 mL ekstrakta dodano je 4 mL 96 %-tnog etanola. Uzorci pod brojevima 5 – 12 razrijeđeni su 10 puta: na 300  $\mu$ L ekstrakta dodano je 2700  $\mu$ L 96 %-tnog etanola. Uzorci pod brojevima 13 – 16 razrijeđeni su 15 puta: na 200  $\mu$ L ekstrakta dodano je 2800  $\mu$ L 96 %-tnog etanola.

Udjeli klorofila *a* i *b* te karotenoida računaju se prema slijedećim jednadžbama. Uzorke smo filtrirali preko običnog filter papira (Sumanta i sur., 2014):

#### Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [1]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [2]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2,13C_a - 97,63 C_b) / 209 \quad [3]$$

gdje su:

A = apsorbancija

$C_a$  = klorofil *a*

$C_b$  = klorofil *b*

$C_{(x+c)}$  = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

Dobivene vrijednosti masenih koncentracija ( $\text{mg L}^{-1}$ ) potom su preračunate i izražene kao  $\text{mg mL}^{-1}$ .

### *Langmuirov adsorpcijski model*

Langmuirova adsorpcijska izoterma prvenstveno je nastala kako bi objasnila adsorpciju iz plinovite na krutu fazu aktivnog ugljena te je tradicionalno korištena za prikazivanje uspješnosti adsorpcije raznih bioloških adsorbensa. U svome matematičkom obliku, ova izoterma pretpostavlja da se adsorpcija odvija u monomolekularnom sloju adsorbirane tvari na fiksnom broju mjesta vezanja koja su jednaka i bez lateralnih interakcija adsorbiranih tvari. Osim toga, ova izoterma pretpostavlja homogenu adsorpciju tvari koje imaju jednaku sorpcijsku energiju i entalpiju. Grafički prikaz ove izoterme prikazan je kao plato, koji predstavlja adsorpcijsku ravnotežu pri kojoj više nema vezanja ili otpuštanja tvari. Matematički prikaz Langmuirove adsorpcijske izoterme u eksponencijalnom obliku prikazan je jednadžbom (4) te u linearnom obliku jednadžbom (5):

$$q_e = \frac{Q_o * K_L * \gamma_e}{1 + K_L * \gamma_e} \quad (4)$$

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{Q_o} + \frac{1}{K_L * Q_o} * \frac{1}{\gamma_e} \quad (5)$$

gdje je:  $q_e$  masa adsorbirane tvari po jedinici mase adsorbensa ( $\text{mg/g}$ )

$Q_o$  maksimalni jednoslojni kapacitet vezanja adsorbata ( $\text{mg/g}$ )

$K_L$  konstanta povezana sa energijom sorpcije ( $\text{L/mg}$ )

$\gamma_e$  koncentracija tvari u otopini pri ravnotežnim uvjetima ( $\text{mg/L}$ )

Podaci opisani Langmuirovom jednadžbom prikazuju se krivuljom ovisnosti  $1/q_e$  i  $1/\gamma_e$  koja ima linearan oblik sa odsječkom  $1/(K_L \cdot Q_0)$  i nagibom  $1/Q_0$ . Utvrđivanje konstanti u adsorpcijskim izotermama provodi se u cilju definiranja vrste adsorpcije u pojedinom sustavu adsorbat – adsorbens, a što je važan podatak pri proračunima i projektiranju adsorpcijskih uređaja. Adsorpcijske izoterme daju, dakle, uvid u kapacitet pojedinog adsorpcijskog materijala za adsorpciju pojedine vrste otopljene tvari.

Osim toga, konstante dobivene izračunom Langmuirovog modela mogu se upotrijebiti kako bi se izračunala izvedivost adsorpcije ovisno o početnoj koncentraciji  $C_0$ . Tako su Weber i Chakravorti prema nelinearnom obliku Langmuirovog izraza pretpostavili da oblik izoterme može predstavljati učinkovitost adsorpcije te su to prikazali izrazom (6) gdje se određuje bezdimenzionalni koeficijent separacije  $R_L$ :

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L + C_0} \quad (6)$$

gdje je  $K_L$  konstanta povezana sa energijom sorpcije (L/mg) i  $C_0$  početna koncentracija tvari (mg/L). U ovom kontekstu niže vrijednosti  $R_L$  upućuju da je adsorpcija učinkovita ( $0 < R_L < 1$ ), neučinkovita ( $R_L > 1$ ), linearna ( $R_L = 0$ ) i ireverzibilna ( $R_L = 0$ ).

#### *Freundlichov adsorpcijski model*

Freundlichov adsorpcijski model objašnjava ne-idealnu i reverzibilnu adsorpciju. Ovaj model može se primijeniti na višeslojnu adsorpciju s neuniformiranom raspodjelom energije adsorpcije i afiniteta preko heterogene površine adsorbensa. Ovakav prikaz adsorpcijskog modela govori da je količina adsorbiranog materijala suma svih tvari koje su adsorbirane, da se prvo vežu ona mjesta koja imaju jaču energiju veze te da tijekom vremena dolazi do smanjenja energije adsorpcije (ili brzine) do trenutka postizanja ravnoteže. Nagib ove izoterme se kreće od 0 do 1 i predstavlja intenzitet adsorpcije ili intenzitet heterogenosti površine, pa nagib blizu 0, predstavlja visoku heterogenost. Matematički prikaz ovog modela dan je u jednadžbi (7) u eksponencijalnom obliku i jednadžbi (8) u linearnom obliku:

$$q_e = K_F \cdot \gamma_e^{1/n} \quad (7)$$

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log \gamma_e \quad (8)$$

gdje je:  $q_e$  masa adsorbirane tvari po jedinici mase adsorbensa ( $\text{mg g}^{-1}$ )



$\gamma_e$  koncentracija tvari u otopini pri ravnotežnim uvjetima ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$K_F$  Freundlichova konstanta izoterme koja predstavlja kapacitet adsorpcije ( $\text{mg g}^{-1} \cdot (\text{L g}^{-1})^n$ )

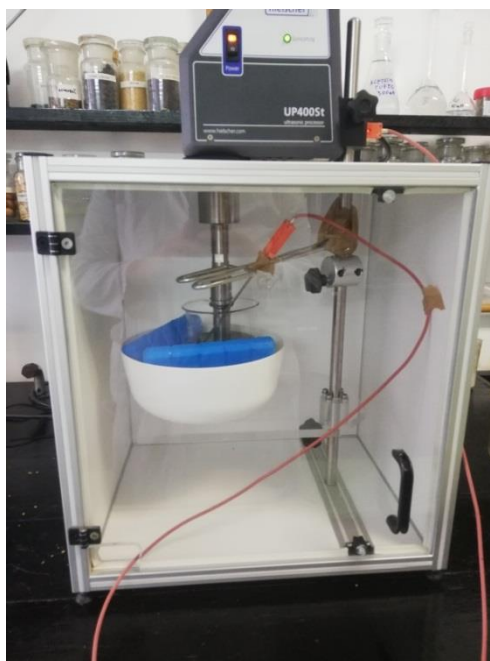
$n$  konstanta intenziteta adsorpcije

Parametar  $K_F$  u Freundlichovoj jednadžbi prvenstveno se odnosi na kapacitet adsorbensa za pojedini adsorbat, a  $1/n$  je funkcija adsorpcijske sile. Za fiksne vrijednosti  $\gamma_e$  i  $1/n$ , porastom vrijednosti parametra  $K_F$  raste i kapacitet  $q_e$ . Osim toga, za fiksne vrijednosti  $K_F$  i  $q_e$ , smanjenje vrijednosti  $1/n$  predstavlja jaču adsorpcijsku vezu. Kada parametar  $1/n$  teži vrlo malim vrijednostima, adsorpcijski kapacitet  $q_e$  postaje neovisan o promjeni vrijednosti ravnotežne koncentracije otopljene tvari  $\gamma_e$ , dok za velike vrijednosti parametra  $1/n$  adsorpcijske veze slabe i vrijednost  $q_e$  se značajno mijenja s malim promjenama ravnotežne koncentracije  $\gamma_e$ . Grafički se prikazuje prema jednadžbi (9) u linearnom obliku u log-log dijagramu gdje se crta pravac u ovisnosti  $\log q_e$  o  $\log \gamma_e$  sa odsječkom y-osi  $\log K_F$  i nagibom  $1/n$ .

### 3.2.4 Ultrazvučna ekstrakcija uzoraka konoplje

Na tehničkoj vagi izvažite masu uzoraka kanabisa u laboratorijsku čašu (600 mL). Volumen etanola (96 %) izmjeren u čaši prebačen je u laboratorijsku čašu zajedno s uzorkom, a dobivena smjesa je miješana staklenom šipkom radi homogenizacije. Omjer suhe tvari i etanola prikazan je u tablici

Svi uzorci su dekarboksilirani (opisano u odjeljku 3.2.1) prije procesa ekstrakcije. Tako pripremljen uzorak stavlja se u vodenu kupelj koja se sastoji od plastične posude napunjene hladnom vodom i rashladnog cilindra, a ultrazvučna sonda, otprilike 2 cm, uronjena je u laboratorijsku čašu) i pokrenite ultrazvuk (Slika 5). Ultrazvučna ekstrakcija provedena je prema optimiranim parametrima u Završnom radu (Jambrović, 2021). Ukratko, uvjeti ekstrakcije 6 min, 50 g konoplje u 375 mL etanola, 100 % amplitude. Nakon ultrazvučne ekstrakcije izmjerena je temperatura uzorka, zatim je ekstrakt profiltriran i filtrat je prvo uparen na vakuuskom rotacijskom uparivaču. Oko 40 mL ekstrakta je kvantitativno prebačeno u Falcon epruvetu na 60 °C i 250 mbar (Slika 6), prethodno izvagane na analitičkoj vagi i dalje isparene do suhog u vakuuskom koncentratu.



**Slika 5.** Ultrazvučna ekstrakcija uzorka konoplje (osobne fotografije)



**Slika 6.** Uparavanje ekstrakta na rotirajućem uparivaču (osobne fotografije)

### 3.2.5. Određivanje kanabinoida primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti

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

odvaže 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 odmjerna 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<sup>-1</sup> 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.

### 3.2.6 Obrada podataka

Statistička obrada podataka korištena je kako bi se utvrdio utjecaj vremena tretmana i postotka aktivnog ugljena na udio pojedinih klorofila, karotenoida, CBDA, CBD i ukupnih kanabinoida u etanolnom ekstraktu industrijske konoplje. Provedena je analiza varijance (ANOVA), (Microsoft Inc. 2019).

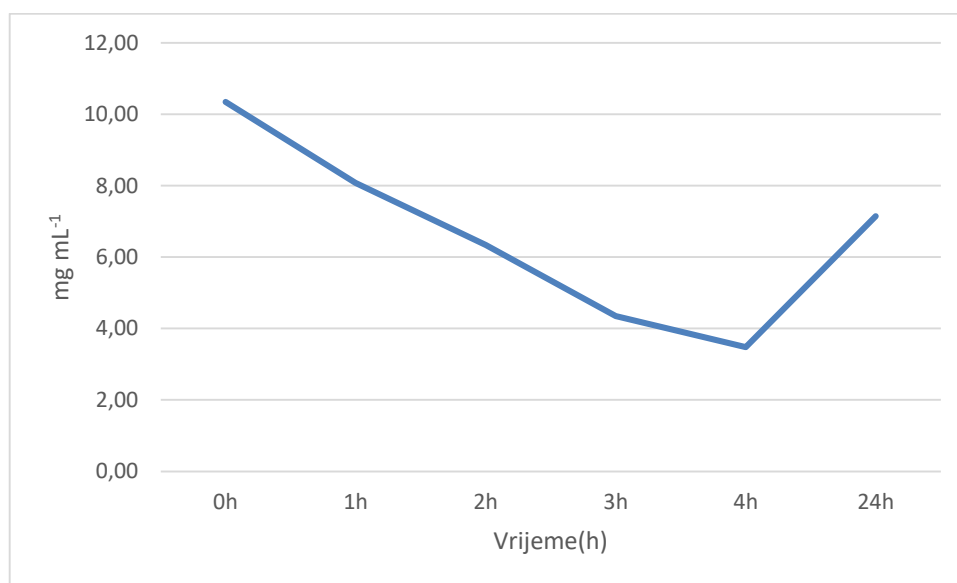
## **4.REZULTATI I RASPRAVA**

U svijetu je sve veće zanimanje za uzgoj industrijske konoplje zbog njezine velike iskoristivosti u različitim područjima te iz tog razloga postaje sve prisutnija u našim životima. Klorofil je biljni pigment koji se nalazi u zelenim dijelovima biljke i smatra se vizualno i senzorski nepoželjnim u ekstraktu industrijske konoplje te je glavni cilj našeg istraživanja zapravo bio ukloniti klorofil iz ekstrakta lista i cvijeta konoplje pomoću aktivnog ugljena. Prvo su provedena preliminarna istraživanja u kojima se pratio udio otklanjanja klorofila i utjecaj na karotenoide pomoću 4 oblika aktivnog ugljena (sitni ugljen, sitni ugljen mljeveni, peleti, peleti mljeveni). Nakon preliminarnih istraživanja, odabrani su mljeveni pelet aktivnog ugljena i zemlja za bijeljenje, jer su se pokazali kao najučinkovitiji u procesu otklanjanja klorofila. Uklanjanje klorofila provedeno je u etanolnom ekstraktu industrijske konoplje u razdoblju od 2 h i mjerenjima svakih 30 min uz različite postotke aktivnog ugljena (1, 5 i 10 %). Iz rezultata možemo zaključiti da je sadržaj klorofila smanjen proporcionalno dodanoj količini aktivnog ugljena i vremenu tretmana. Nažalost, pored klorofila došlo je i do smanjenja udjela karotenoida, kanabidiola (CBD) i ukupnih kanabinoida te smo također promatrali njihove promjene kroz 2 sata gdje smo koristili uzorke tretirane s 1, 5 i 10 % mljevenih peleti aktivnog ugljena.

#### 4.1 Preliminarna istraživanja uklanjanja klorofila i utjecaja na udio karotenoida

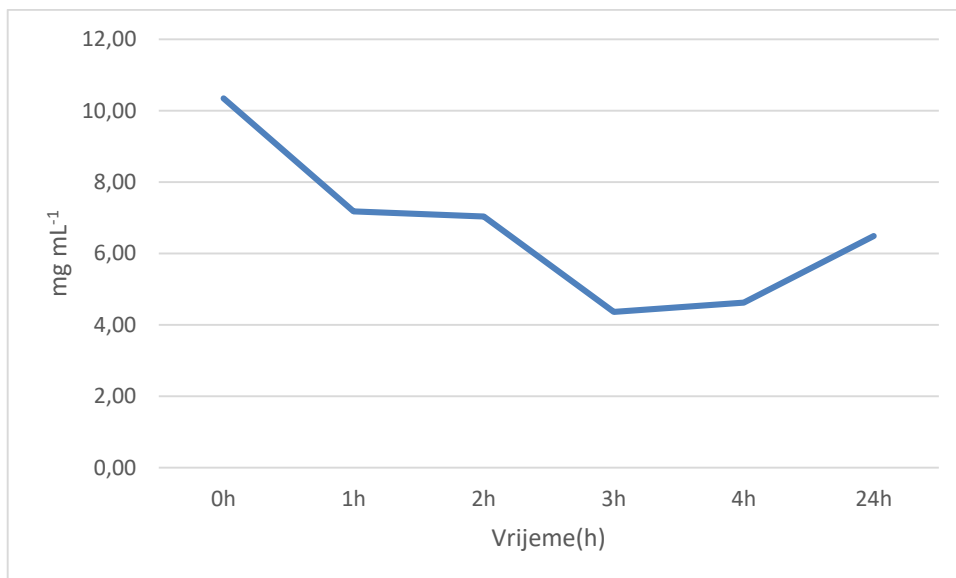
Oblici ispitivanog aktivnog ugljena:

- Sitni ugljen
- Sitni ugljen mljeveni
- Peleti
- Peleti mljeveni



**Slika 7.** Utjecaj dodatka aktivnog ugljena (1 %) na koncentraciju ukupnog klorofila- sitni ugljen

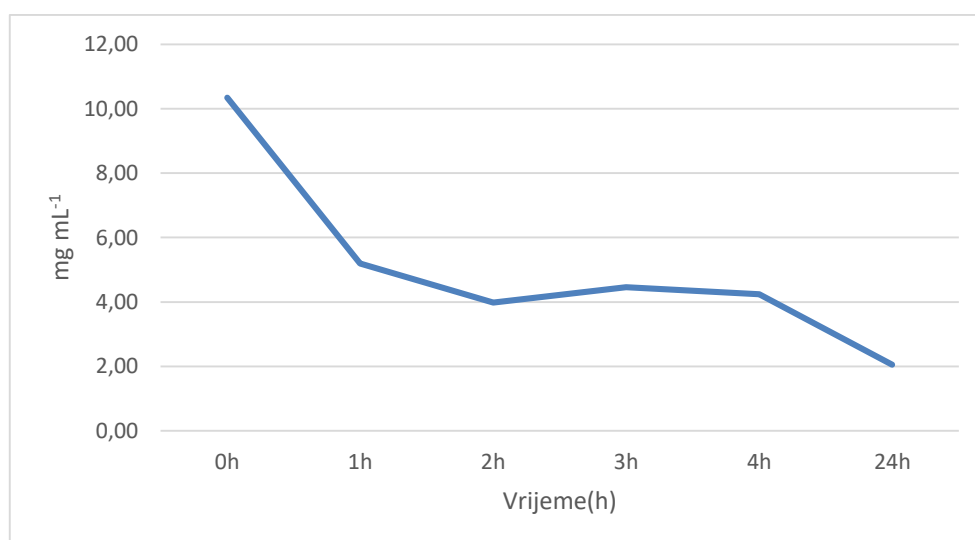
Kod preliminarnih istraživanja, za određivanje koncentracije klorofila provedene su analize u laboratoriju primjenom aktivnog ugljena u više oblika (sitni ugljen, sitni ugljen mljeveni, peleti i peleti mljeveni). Istraživanje se provodilo u periodu od 24h. Najprije su praćene promjene svakih 1h u prvih četiri sata te nakon toga smo uzorak ostavili i ponovno promotrili nakon 20h. Prva analiza za uklanjanje klorofila bila je provedena primjenom sitnog ugljena. Iz dobivenog grafa (slika 7.) uočavamo da dodavanjem 10 mg mL<sup>-1</sup> sitnog ugljena u otopinu etanolnog ekstrakta počinje opadati koncentracija klorofila. U prvih četiri sata, na svakih sat vremena, možemo primijetiti da koncentracija ravnomjerno opada. Pa tako iz prikazanog grafa vidimo da se koncentracija klorofila nakon 4h smanjila ispod 4 mg mL<sup>-1</sup>. U daljnjem periodu primjećujemo nagli porast koncentracije, tj otpuštanje klorofila vezanog na aktivni ugljen. Nakon 24h kada smo ponovno izvršili očitavanje, koncentracija raste na skoro 8 mg mL<sup>-1</sup>.



**Slika 8.** Utjecaj dodatka aktivnog ugljena (1 %) na koncentraciju ukupnog klorofila - sitni ugljen/mljeveni

Za drugu analizu koristili smo drugačiji oblik aktivnog ugljena (sitni ugljen/mljeveni) koji smo također dodavali u otopinu etanolnog ekstrakta i pratili kroz period od 24h (slika 8.). Početna koncentracija klorofila kroz prva četiri sata postepeno opada. Kroz prvih sat vremena, koncentracija pada sa  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  na  $7 \text{ mg mL}^{-1}$  i ostaje ista kroz sljedećih 1h. U periodu između 2-3h ponovno počinje opadati te je nakon tri sata iznosila  $\pm 4 \text{ mg mL}^{-1}$ . Zaključujemo da se u ovom periodu ponovno smanjila za  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ . Daljnjim djelovanjem sitnog ugljena/mljevenog koncentracija minimalno raste te do 24h poraste na približno  $6 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Zaključujemo da je koncentracija nakon 24h skoro jednaka koncentraciji klorofila koja je bila u prvih sat vremena nakon tretmana sitnim ugljenom/mljevenim.

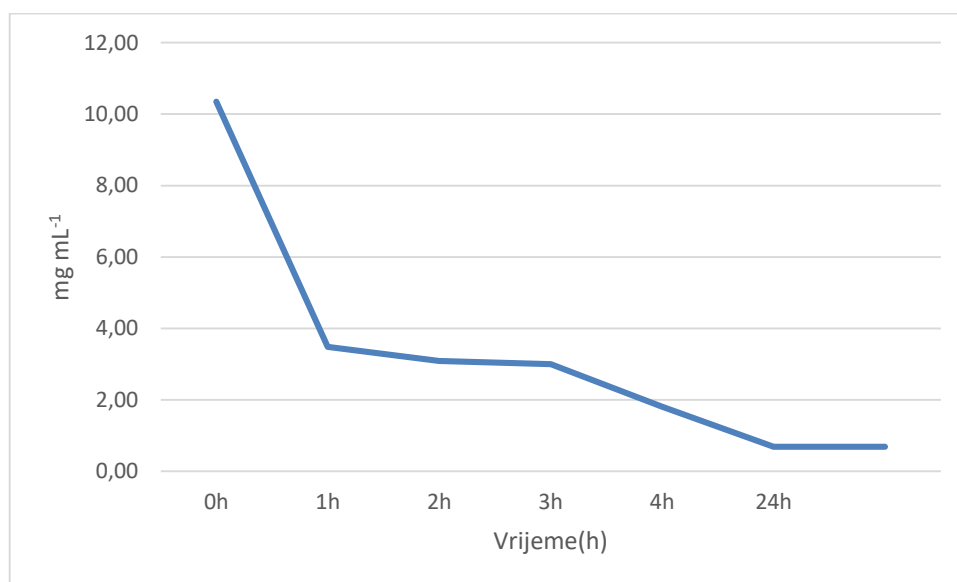


**Slika 9.** Utjecaj dodatka aktivnog ugljena (1 %) na koncentraciju ukupnog klorofila – peleti

Za razliku od prve dvije analize, u trećoj analizi koristili smo peleti aktivnog ugljena koje smo također dodavali u otopinu etanolnog ekstrakta.

Nakon početne koncentracije klorofila od  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  iz dobivenog grafa (slika 9.) uočavamo znatni pad koncentracije klorofila već u prvih sat vremena gdje se koncentracija duplo smanjila te je u sljedećih sat vremena nastavila lagano opadati i nakon 2h je iznosila  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ . Kroz naredna 2h, koncentracija se nije znatno mijenjala, ali nakon četvrtog sata opada na  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  u periodu od 20h.

Iz ovog grafa možemo zaključiti da se koncentracija klorofila znatno smanjila te primjećujemo da je metoda primjenom peleti mnogo efikasnija i bolja uspoređujući sa prošle dvije metode gdje smo primjenjivali sitni ugljen i sitni ugljen/mljeveni.



**Slika 10.** Utjecaj dodatka aktivnog ugljena (1 %) na koncentraciju ukupnog klorofila - peleti/mljeveni

Zadnja analiza koju smo provodili bila je primjenom peleti/mljevenog aktivnog ugljena i iz prikazanog grafa (slika 10.) možemo sa sigurnošću reći da je najbolja od dosad spomenutih metoda.

Kroz prvih sat vremena primjećujemo jako veliki pad i smanjenje koncentracije klorofila na čak  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ . Prateći dalje u naredna dva sata, vidimo da je koncentracija skoro bez promjena, ali u periodu između 3-4h nastavlja opadati do 24h i skoro postiže potpuni nestanak.

Nakon sve četiri provedene analize ustvrdili smo da je najefikasnija metoda za uklanjanje klorofila metoda primjenom peleti/mljevene jer i nakon 24h od tretiranja primjećujemo da se koncentracija ne povećava.

Na temelju provedenih preliminarnih istraživanja odlučeno je da nastavak istraživanja radimo s mljevenim peletima u različitim postotcima (1, 5 i 10 %), u kraćem vremenskom intervalu od 2h i mjerenjima koncentracije klorofila i karotenoida svakih 30 min.



## 4.2 Mjerenje koncentracije klorofila nakon preliminarnih istraživanja-bijeljenje

**Tablica 1.** Mjerenje koncentracije pigmenata u etanolnim otopinama industrijske konoplje nakon tretmana mljevenim peletima aktivnog ugljena i zemlje za bijeljenje

	mg mL <sup>-1</sup>	BEZ DEKARBOKSILACIJE					DEKARBOKSILACIJA 30 min na 130 C					
		0min	30min	60 min	90 min	120 min	mg mL <sup>-1</sup>	0h	30min	60 min	90 min	120 min
<b>1% akt ugljena u 50ml</b>	Klorofil a (C <sub>a</sub> ) <sup>£ δ</sup>	6,66	6,61	3,09	3,83	4,61	Klorofil a (C <sub>a</sub> ) <sup>£ δ</sup>	6,79	4,29	4,69	4,51	2,55
	Klorofil b (C <sub>b</sub> ) <sup>δ</sup>	2,70	2,61	1,53	1,38	1,76	Klorofil b (C <sub>b</sub> ) <sup>δ</sup>	2,89	1,41	1,51	1,51	1,71
	Karotenoidi <sup>£ δ</sup>	1,53	1,53	0,59	0,93	1,08	Karotenoidi <sup>£ δ</sup>	1,48	1,08	1,19	1,12	0,30
<b>5% akt ugljena u 50ml</b>	Klorofil a (C <sub>a</sub> ) <sup>£ δ</sup>	6,66	1,46	1,97	1,75	1,30	Klorofil a (C <sub>a</sub> ) <sup>£ δ</sup>	6,79	1,39	1,75	1,33	1,62
	Klorofil b (C <sub>b</sub> ) <sup>δ</sup>	2,70	0,98	1,98	1,78	0,39	Klorofil b (C <sub>b</sub> ) <sup>δ</sup>	2,89	0,48	1,29	0,88	2,39
	Karotenoidi <sup>£ δ</sup>	1,53	0,16	nd	nd	0,31	Karotenoidi <sup>£ δ</sup>	1,48	0,32	0,14	0,15	nd
<b>10% akt ugljena u 50ml</b>	Klorofil a (C <sub>a</sub> ) <sup>£ δ</sup>	6,66	0,98	0,44	0,35	0,21	Klorofil a (C <sub>a</sub> ) <sup>£ δ</sup>	6,79	0,40	0,49	0,83	0,44
	Klorofil b (C <sub>b</sub> ) <sup>δ</sup>	2,70	1,98	0,75	0,75	0,35	Klorofil b (C <sub>b</sub> ) <sup>δ</sup>	2,89	0,54	0,97	1,71	0,90
	Karotenoidi <sup>£ δ</sup>	1,53	nd	nd	nd	nd	Karotenoidi <sup>£ δ</sup>	1,48	nd	nd	nd	nd
<b>5% zemlja za bijeljenje uz zagrijavanje na 70°C u 50ml</b>	Klorofil a (C <sub>a</sub> )	6,66	3,09	4,09	4,10	5,86	Klorofil a (C <sub>a</sub> )	6,79	3,71	4,43	3,90	3,80
	Klorofil b (C <sub>b</sub> )	2,70	1,39	1,68	1,99	2,29	Klorofil b (C <sub>b</sub> )	2,89	1,28	2,45	1,75	1,75
	Karotenoidi	1,53	0,64	0,91	0,79	1,34	Karotenoidi	1,48	0,92	0,74	0,81	0,77

<sup>£</sup> vrijeme tretmana ima značajan utjecaj (p≤0,05)

<sup>δ</sup> % aktivnog ugljena ima značajan utjecaj (p≤0,05)

Nakon preliminarnih istraživanja provedeno je mjerenje koncentracije klorofila bijeljenjem kroz 120 minuta. U tablici 1. su prikazane promjene koncentracije klorofila a ( $C_a$ ), klorofila b ( $C_b$ ) i karotenoida na svakih 30 minuta. Prvo istraživanje vršilo se s uzorcima prije procesa dekarboksilacije, a drugo nakon dekarboksilacije u periodu od 30 minuta pri 130 °C. Analize su provedene sa 1, 5 i 10 % ugljenom kao i sa 5 % zemljom za bijeljenje. Koristili smo otopinu od 50 mL etanolnog ekstrakta u koju smo dodali 1, 5 i 10 % aktivnog ugljena.. U istraživanju bez procesa dekarboksilacije, sa 1 % aktivnim ugljenom, primjećujemo da je koncentracija klorofila a ( $C_a$ ) nakon sat vremena smanjena za 53,60 % , međutim u periodu između 1-2h ponovno primjećujemo porast, te nakon 2h je koncentracija klorofila smanjena za 30,7 % u odnosu na počenu vrijednost. Također do smanjenja dolazi i kod klorofila b ( $C_b$ ) gdje je smanjen za 43,3 % u prvih sat vremena te smanjenje karotenoida za 86 % . Određivanje koncentracije klorofila primjenom 5 % aktivnog ugljena, u prvom satu provođenja procesa koncentracija klorofila se smanjuje čak za 70,42 % , te nakon 2h ona opada za još 34 % Koncentracija klorofila b ( $C_b$ ) je također u prvih sat vremena smanjena za 26,6, te nakon te koncentracije u sljedećih sat vremena je opala naglo za 80 % . I Koncentracija karatonoida je nažalost smanjena za 79,7 % , a vidimo da su u periodu između 1-2h čak smanjeni i ispod 0. Korištenjem 10 % aktivnog ugljena smanjenje klorofila je također prisutno. Koncentracija klorofila a ( $C_a$ ) i klorofila b ( $C_b$ ) su znatno smanjene za 96,8 % ( $C_a$ ) i 87 % ( $C_b$ ) nakon 2 sata u odnosu na početnu koncentraciju. Što se tiče karotenoida zaključili smo da u zadanom periodu oni nisu detektirani.

Određivanje koncentracije klorofila primjenom zemlje za bijeljenje (5 % uz zagrijavanje na 70 °C), klorofil a ( $C_a$ ), klorofil b ( $C_b$ ) kao i karotenoidi imali su veoma blago smanjenje koncentracije ovim tretmanom. Klorofil a ( $C_a$ ) se smanjio tek za 12 % , klorofil b ( $C_b$ ) za 15 % i karotenoidi za 12 % , u odnosu na početne koncentracije.

Promatranjem rezultata pri provođenju procesa dekarboksilacije, primjenom 1 % aktivnog ugljena iz rezultata uočavamo da koncentracija klorofila a ( $C_a$ ) u prvih sat vremena pada za 30 % u odnosu na početnu koncentraciju te u sljedećih sat vremena još za 45,6 % opada. kao i koncentracija karotenoida koja je smanjena za 72,2 % s obzirom na početnu vrijednost, dok se koncentracija klorofila b ( $C_b$ ) smanjila za 47 % u prvih sat vremena te nakon 2 h provođenja procesa narasla za 13 % u odnosu na zadnju vrijednost. Određivanje koncentracije klorofila primjenom 5 % aktivnog ugljena koncentracija klorofila a ( $C_a$ ) opada te je nakon 2 sata opala čak za 81 % Koncentracija klorofila b ( $C_b$ ) varira gdje u prvih sat vremena dolazi do pada

koncentracije za 55 %, gdje nakon toga vrijednost skače za 80 % i vraća se približno početnoj koncentraciji. Gledajući rezultate dobivene za karotenoide, vidimo da je njihova koncentracija nakon 2 sata opala ispod 0.

Određivanje koncentracije klorofila primjenom 10 % aktivnog ugljena dolazi do značajnog pada koncentracije klorofila a ( $C_a$ ) za 93,5 % i klorofila b za 68,8 % ( $C_b$ ) nakon 2 sata. U oba slučaja vidimo blagi porast koncentracije između 1-2 sata nakon čega slijedi ponovno smanjenje. Pogledamo li koncentraciju karotenoida vidimo da njihova koncentracija nije definirana.

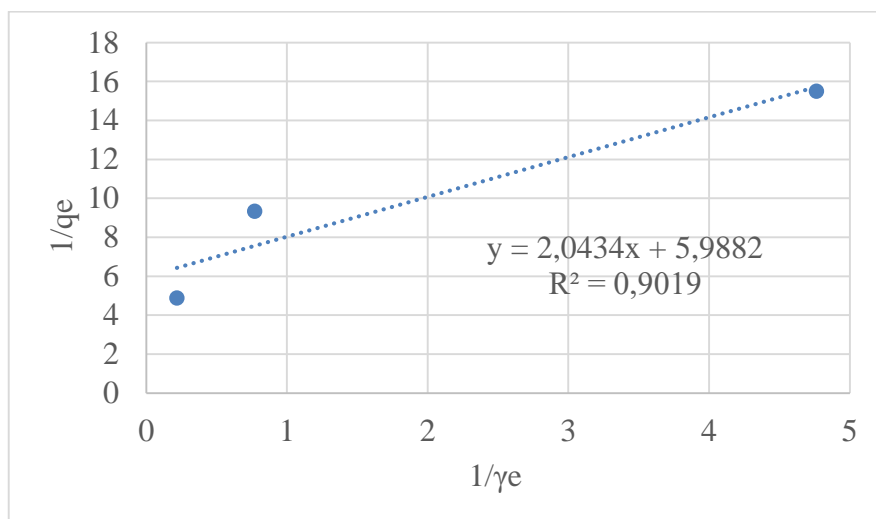
Određivanje koncentracije klorofila primjenom zemlje za bijeljenje (5 % uz zagrijavanje na 70 °C) primjećujemo postepeno smanjenje i nakon 2 sata se koncentracija klorofila a ( $C_a$ ) smanjuje za 44 % , a koncentracija klorofila b ( $C_b$ ) tek za 23,58 % nakon 2 sata tretmana. Vrijednost karotenoida pri tretmanu od 2 sata opada za 42,5 %.

Na kraju promatrajući sve rezultate dolazimo do zaključka da je najbolji učinak na smanjenje klorofila ali i karotenoida imao 10 % aktivni ugljen u periodu od 2 sata.

U svom istraživanju (Liang i sur., 2017.) su se bazirali na smanjenju klorofila u hladno prešanom ulju sjemenki konoplje pomoću ultrazvučnog izbjeljivanja. Tijekom ovog istraživanja korištene su 3 različite gline, Sepiolite (SP), aktivirani bentonit (ABT) i industrijska glina (IC). Sadržaj klorofila je značajno smanjen od 0,056 mg mL<sup>-1</sup> u neobrađenom ulju na 0,014 mg mL<sup>-1</sup> (IC + 20 % snage ultrazvuka), 0,009 mg mL<sup>-1</sup> (ABT +20 % snage ultrazvuka) i 0,007 mg mL<sup>-1</sup> (SP + 20% snage ultrazvuka) u uljima tretirana sepiolitom, aktiviranim bentonitom i industrijskom glinom. Učinkovitost ultrazvuka izbjeljivanja u smanjenju ukupnog sadržaja klorofila iznosila je 86,1 % (IC + 20 % snage ultrazvuka) > 82,4% (ABT +20 % snage ultrazvuka) > 73,7% (SP + 20% snage ultrazvuka). U našem istraživanju u kojem smo koristili aktivni ugljen u više oblika i zemlju za bijeljenje, možemo sa sigurnošću reći da je najefikasnija metoda za uklanjanje klorofila metoda primjenom peleti/mljevene. Koristili smo 1, 5, i 10 % aktivni ugljen peleti/ mljevene. Sadržaj klorofila nakon 2 sata značajno je smanjen sa 9,3 mg mL<sup>-1</sup> na 5,21 mg mL<sup>-1</sup> (1 % aktivni ugljen), 3,53 mg mL<sup>-1</sup> (5 % aktivni ugljen), 1,1 mg mL<sup>-1</sup> (10 % aktivni ugljen) i 6,09 mg mL<sup>-1</sup> (zemlja za bijeljenje). Smanjenje klorofila iznosi 88,17 % > (10 % aktivni ugljen), > 62,04 % (5 % aktivni ugljen), > 43,97 % (1 % aktivni ugljen), > 34,51 % (zemlja za bijeljenje). Najbolje rezultate je imao 10 % aktivni ugljen. Prilikom primjene te metode klorofil se skoro u potpunosti otklonio. Za razliku od istraživanja (Liang i sur., 2017), koji su koristili ultrazvuk pri procesu bijeljenja, mi smo u našem istraživanju koristili magnetsku miješalicu. Uspoređujući rezultate ovih dvaju istraživanja, možemo reći da

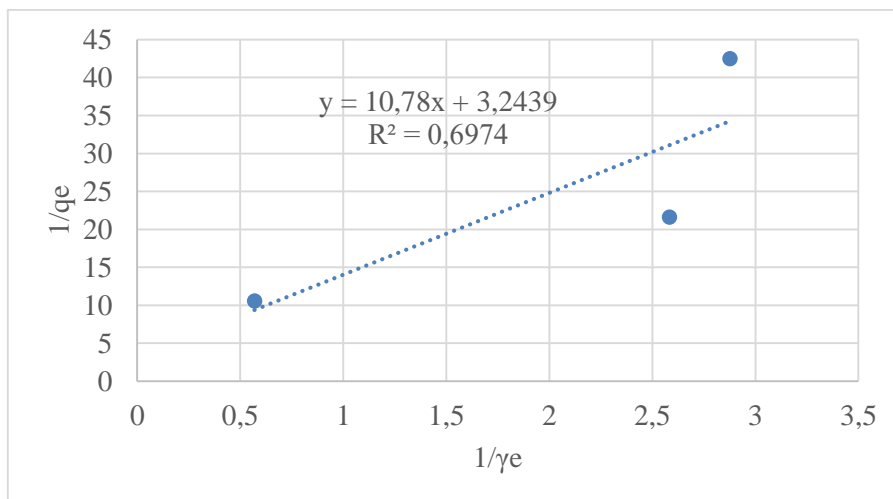
je u oba slučaja postignut cilj smanjenja klorofila. Uz smanjenje klorofila, nažalost, došlo je i do smanjenja karotenoida. U istraživanju (Liang i sur., 2017) sadržaj karotenoida se znatno smanjio nakon ultrazvučnog izbjeljivanja. Sadržaj karotena je smanjen sa  $0,023 \text{ mg mL}^{-1}$  u neobrađenom ulju na  $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,004 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $0,002 \text{ mg mL}^{-1}$ . U našem istraživanju sadržaj karotenoida je smanjen sa  $1,53 \text{ mg mL}^{-1}$  na  $0,93 \text{ mg mL}^{-1}$  (1 % aktivni ugljen),  $0,31 \text{ mg mL}^{-1}$  (5 % aktivni ugljen), nisu detektirani (10 % aktivni ugljen),  $1,34 \text{ mg mL}^{-1}$  (zemlja za bijeljenje). Na temelju ovih rezultata jest očito da je poboljšano brzo otklanjanje pigmentata u oba slučaja.

### 4.3 Adsorpcijske izoterme



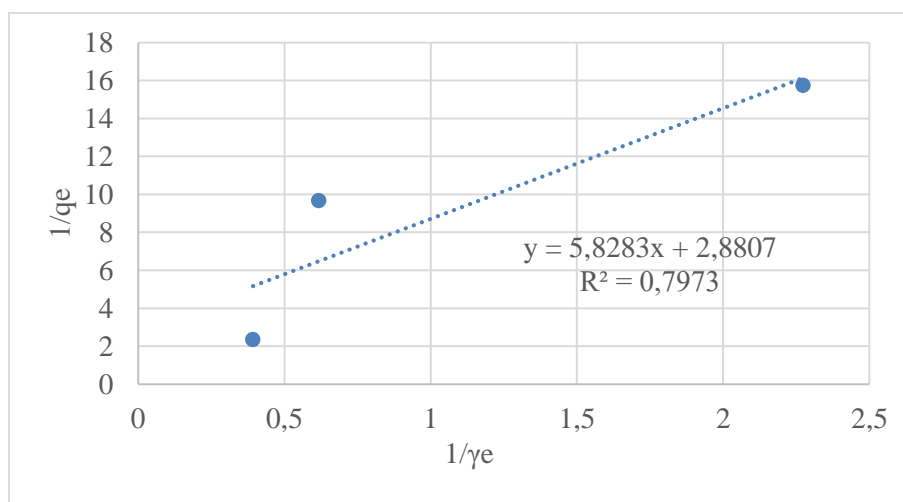
**Slika 11.** Langmuirova izoterma adsorpcije klorofila a ( $C_a$ ) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **prije dekarboksilacije**

Ukoliko promatramo koeficijent determinacije ( $R^2$ ) za graf (slika 11.) adsorpcije klorofila a ( $C_a$ ) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu prije dekarboksilacije, vidimo da njegova vrijednost iznosi 0,9019.



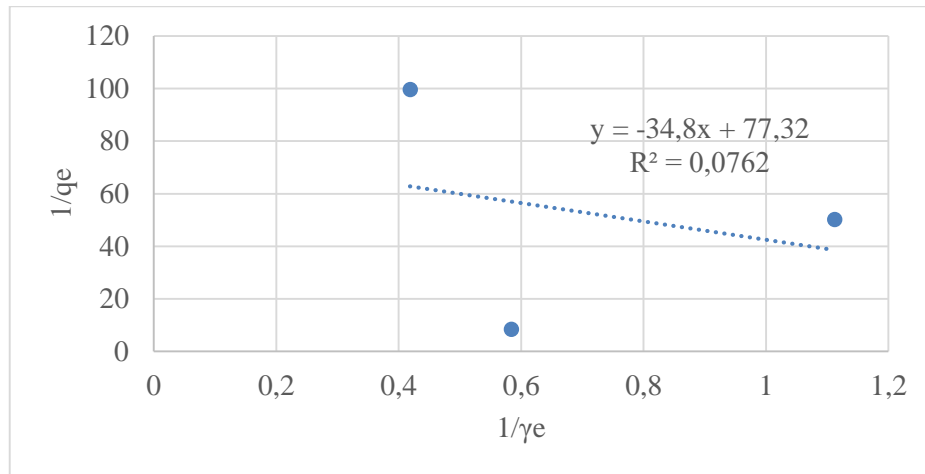
**Slika 12.** Langmuirova izoterma adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **prije dekarboksilacije**

Promatrajući graf (slika 12.) adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu prije dekarboksilacije, uočavamo da koeficijent determinacije ( $R^2$ ) iznosi 0,6974.



**Slika 13.** Langmuirova izoterma adsorpcije klorofila a (Ca) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **nakon dekarboksilacije**

Promatranjem grafa (slika 13.) adsorpcije klorofila a (Ca) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu, nakon dekarboksilacije, vidimo da je vrijednost koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) 0,797.



**Slika 14.** Langmuirova izoterma adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **nakon dekarboksilacije**

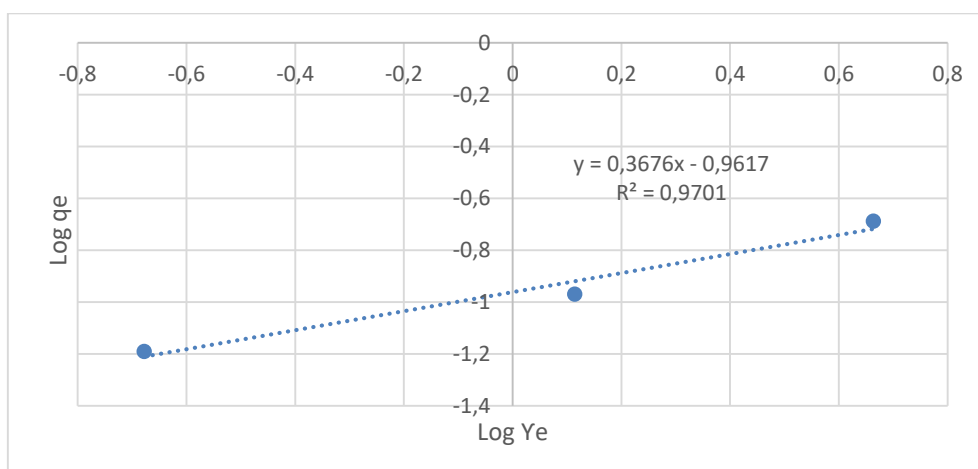
Kod grafa (slika 14.) adsorpcije klorofila b ( $C_b$ ) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu, nakon dekarboksilacije, koeficijent determinacije ( $R^2$ ) iznosi 0,0762.

Ukoliko govorimo o koeficijentu determinacije, poznato je da što su vrijednosti bliže 1 to je model reprezentativniji. Promatrajući ova četiri grafa, dolazimo do zaključka da je najreprezentativniji model za klorofil a (Ca) prije dekarboksilacije, s obzirom da njegova vrijednost iznosi 0,9019. Model koji je najmanje reprezentativan je za klorofil b (Cb) nakon dekarboksilacije i njegova vrijednost iznosi  $R^2=0,076$ .

**Tablica 2.** Langmuirove konstante za adsorpciju klorofila a (Ca) i b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu

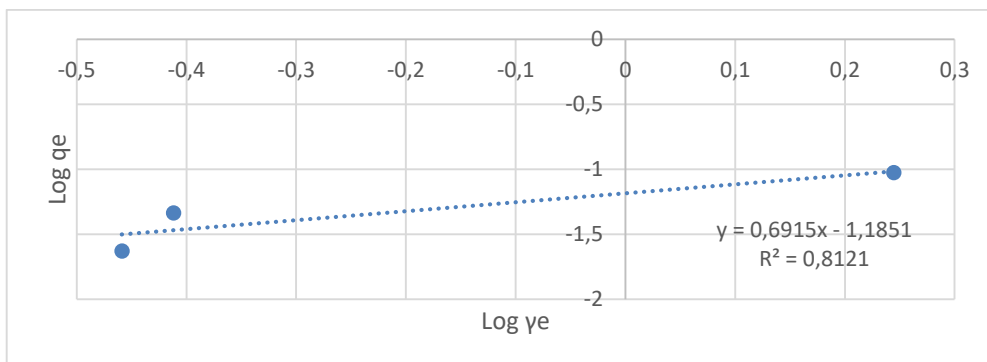
	Adsorbens	Klorofil	Q <sub>o</sub> (mg/g)	K <sub>L</sub>
				(L/mg)
<b>Prije dekarboksilacije</b>	Mljeveni peleti	C <sub>a</sub>	0,167	2,93
	Mljeveni peleti	C <sub>b</sub>	0,308	0,3
<b>Nakon dekarboksilacije</b>	Mljeveni peleti	C <sub>a</sub>	0,347	0,49
	Mljeveni peleti	C <sub>b</sub>	0,013	-2,22

Promatrajući tablicu 2. vidimo da je vrijednost KL oba slučaja obrade ekstrakta veća za klorofil a (Ca). No, iako je Q<sub>o</sub> za klorofil b (Cb) bio viši, što samim tim upućuje na veću količinu vezanja za aktivni ugljen, s obzirom da ima manju konstantu KL tada je ipak snaga vezanja znatno lošija u odnosu na klorofil a (Ca).



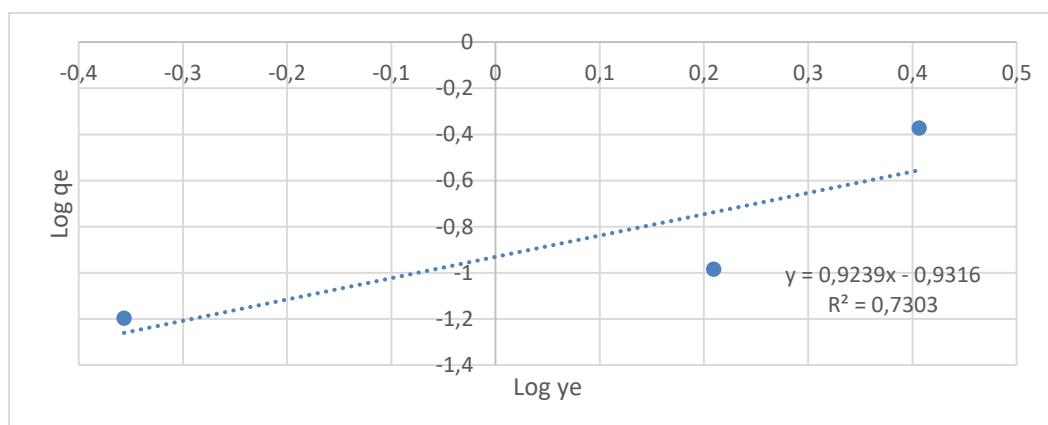
**Slika 15.** Freundlichova izoterma adsorpcije klorofila a (Ca) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **prije dekarboksilacije**

Promatranjem Freundlichovu izotermu (slika 15.) adsorpcije klorofila a (Ca) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu prije dekarboksilacije, vidimo da je koeficijent determinacije ( $R^2$ ) 0,9701. S obzirom da je rezultat približno 1, možemo reći da je ovaj model reprezentativan.



**Slika 16.** Freundlichova izoterma adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **prije** dekarboksilacije

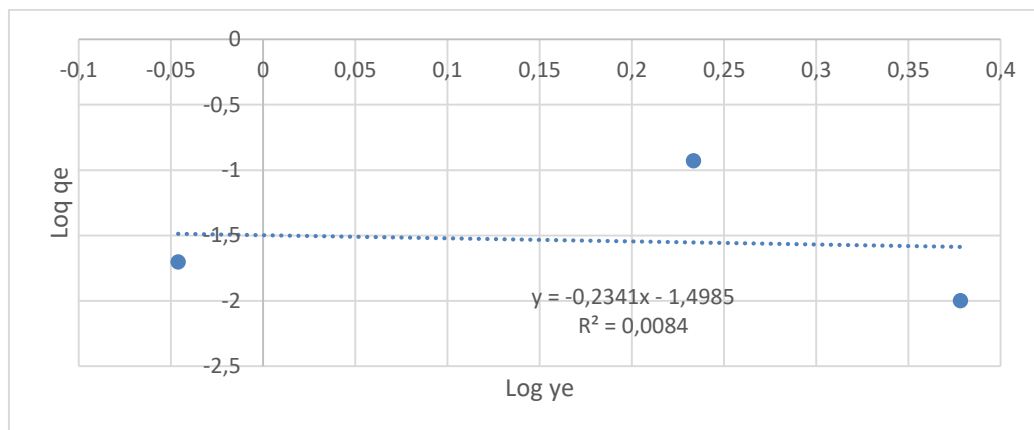
Koeficijent determinacije ( $R^2$ ), za Freundlichovu izotermu (slika 16.) adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu prije dekarboksilacije, iznosi 0,8121.



**Slika 17.** Freundlichova izoterma adsorpcije klorofila a (Ca) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **nakon** dekarboksilacije

Promatranjem grafa (slika 17.) za Freundlichovu izotermu adsorpcije klorofila a (Ca) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu nakon dekarboksilacije možemo primjetiti da Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) iznosi 0,7303





**Slika 18.** Freundlichova izoterma adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu kroz 2 h pri sobnoj temperaturi; ekstrakt konoplje **nakon dekarboksilacije**

Koeficijent determinacije ( $R^2$ ) za posljednji graf (slika 18.) Freundlichove izoterme adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu nakon dekarboksilacije, vidimo da njegova vrijednost iznosi 0,0084.

Promatrajući sva četiri grafa dolazimo do zaključka da je najreprezentativniji graf za Freundlichovu izotermu adsorpcije klorofila a ( $C_a$ ) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu prije dekarboksilacije, tj. koeficijent determinacije ( $R^2$ ) za taj graf je približno 1. Najmanje reprezentativan graf je posljednji graf, Freundlichove izoterme adsorpcije klorofila b (Cb) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu nakon dekarboksilacije. Vrijednost koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) za taj graf je prilično niska i iznosi tek 0,0084.

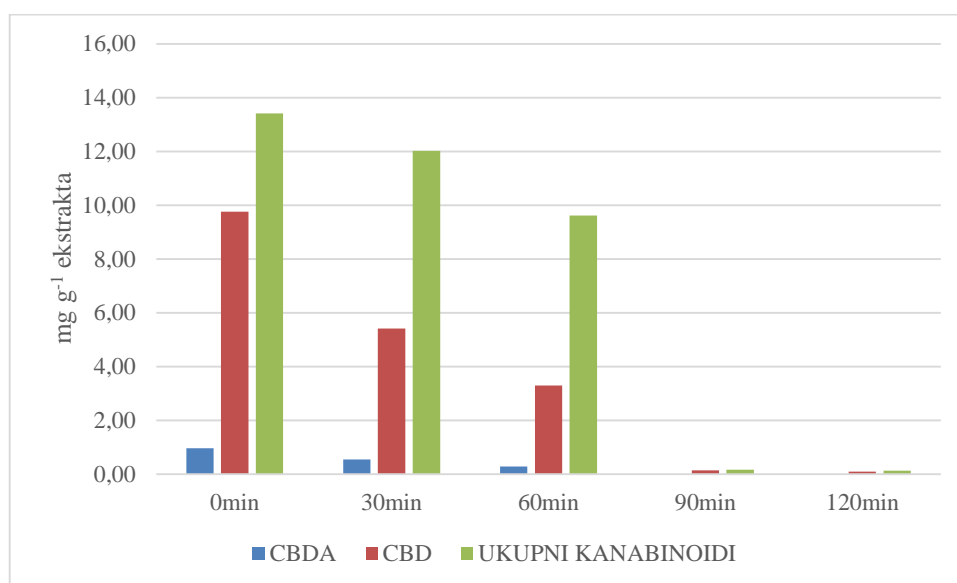
**Tablica 3.** Freundlichove konstante za adsorpciju klorofila a ( $C_a$ ) i b ( $C_b$ ) na mljevene pelete aktivnog ugljena u etanolnom ekstraktu

	Adsorbens	Klorofil	$K_F$	1/n	$R^2$
			(mg/g)·(L/g) <sup>n</sup>		
<b>Prije dekarboksilacije</b>	Mljeveni peleti	Ca	0,11	0,368	0,9701
	Mljeveni peleti	Cb	0,01	0,692	0,8121
<b>Nakon dekarboksilacije</b>	Mljeveni peleti	Ca	0,12	0,932	0,7303
	Mljeveni peleti	Cb	0,03	1,499	0,0084

Promatrajući tablicu 3. primjećujemo da je Kf za klorofil a (Ca) u oba slučaja obrade ekstrakta ima najveću vrijednost, dok za klorofil b (Cb) također u oba slučaja obrade ekstrakta pak ima najmanju vrijednost. I/n je zapravo najbolji pokazatelj u kojem se intenzitetu klorofil vezao na aktivni ugljen. U ovom slučaju je to klorofil a (Ca) bez dekarboksilacije. S obzirom da klorofil b (Cb) u oba slučaja ima loše vrijednosti, dolazimo do zaključka da klorofil a (Ca) ima znatno bolju uspješnost vezanja na aktivni ugljen nego klorofil b (Cb).

### 4.3 Mjerenje koncentracije CBD, CBDA i ukupnih kanabinoida

Za određivanje promjene koncentracije CBD, CBDA i ukupnih kanabinoida kroz 2 sata koristili smo uzorke tretirane s 1, 5 i 10 % mljevenih peleti aktivnog ugljena. Rezultate su prikazani kroz sljedeće grafove.



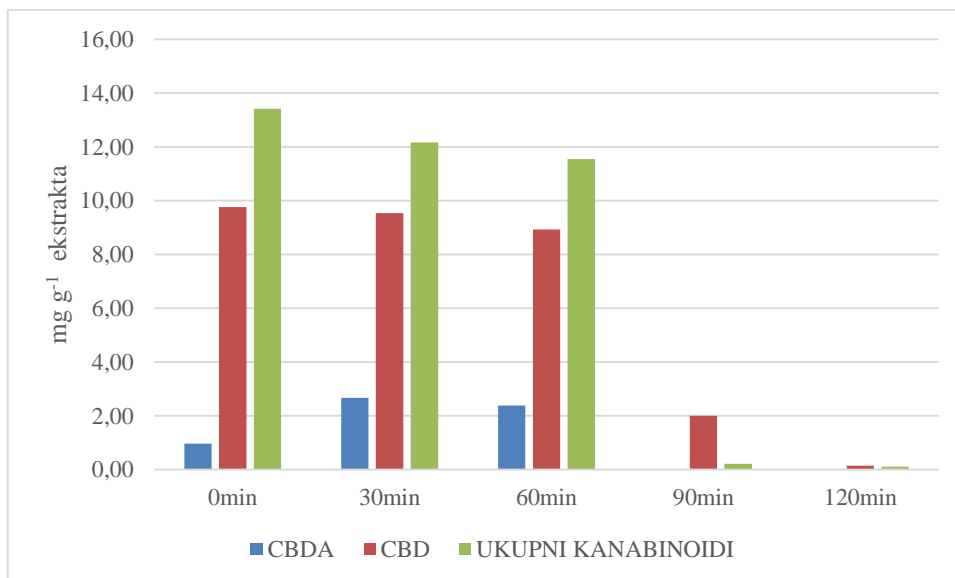
δ % aktivnog ugljena ima značajan utjecaj na CBD i ukupne kanabinoide ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 19.** Mjerenje koncentracije CBD, CBDA i ukupnih kanabinoida - 1 % mljevenih peleti

Prvo istraživanje provedeno je sa 1 % mljevenom peleti aktivnog ugljena. Iz prikazanog grafa (slika 19.) vidimo da koncentracija CBD-a i ukupnih kanabinoida postepeno opada u prvih sat vremena. Količina ukupnih kanabinoida nakon 30 minuta iznosi  $12 \text{ mg g}^{-1}$ , a u sljedećih 30 minuta nastavlja padati i iznosi  $9 \text{ mg g}^{-1}$ . Što se tiče CBD-a, u prvih 30 minuta iznosio je  $< 6 \text{ mg g}^{-1}$ , a već nakon 1h je pao na  $< 4 \text{ mg g}^{-1}$ .

Koncentracija CBDA-a također postepeno opada, ali vidimo da je od početka u znatno manjoj koncentraciji u odnosu na ostale komponente.

Daljnijim promatranjem procesa vidimo nagli pad koncentracije svih komponenti. Nakon 1 sat i 30 minuta ukupnih kanabinoidi su prisutni u minimalnim količinama ali ubrzo nestaju kao i CBDA i CBD do kraja procesa.



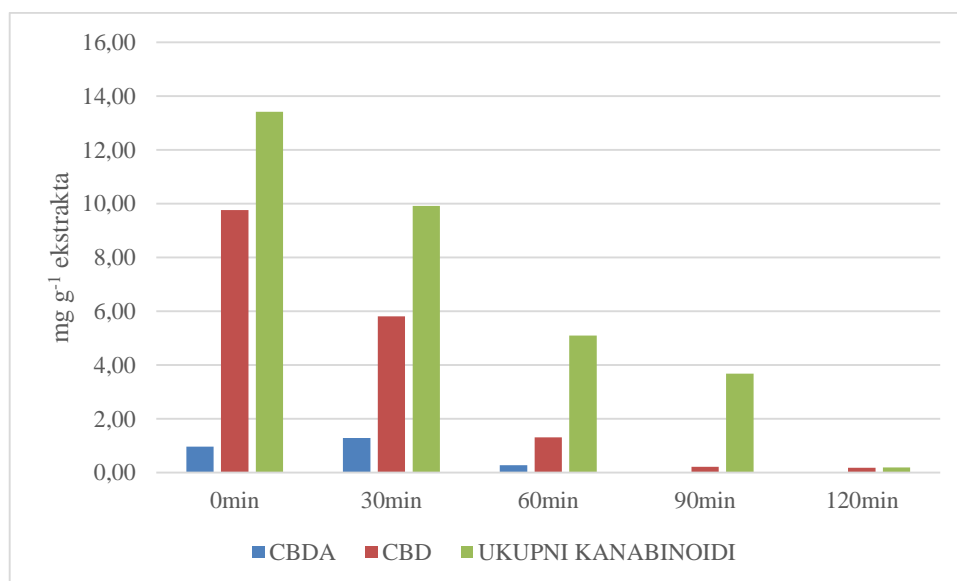
<sup>δ</sup> % aktivnog ugljena ima značajan utjecaj na CBD i ukupne kanabinoide ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 20.** Mjerenje koncentracije CBD, CBDA i ukupnih kanabinoida- 5 % mljevenih peleta

Drugo istraživanje provedeno je sa 5 % mljevenim peletima aktivnog ugljena. Promatrajući prikazani graf (slika 20.) na početku procesa ukupni kanabinoide iznose  $< 14 \text{ mg g}^{-1}$ . U prvih pola sata koncentracije ukupnih kanabinoide opada te iznosi  $12 \text{ mg g}^{-1}$ . Sljedećih pola sata tek neprimjetno opadne.

Ukoliko promatramo CBD vidimo da koncentracija minimalno opada. Na početku samog procesa koncentracija CBD-a je iznosila  $< 10 \text{ mg g}^{-1}$ , nakon pola sata je koncentracija opala za samo  $0,2 \text{ mg g}^{-1}$  u rasponu od 1h iznosila  $< 9 \text{ mg g}^{-1}$ . Što se tiče CBDA-a, njegova koncentracija na početku samog procesa iznosi  $< 1 \text{ mg g}^{-1}$ . Nakon 30 min koncentracija se penje na  $< 3 \text{ mg g}^{-1}$  te u sljedećih pola sata padne na  $< 2,5 \text{ mg g}^{-1}$ .

Nakon sat i pol koncentracija CBD-a znatno pada i iznosi  $2 \text{ mg g}^{-1}$ , a koncentracija ukupnih kanabinoide je jedva prisutna. Poslije 2 sata provođenja procesa samo je mala količina CBD-a i ukupnih kanabinoide prisutna.



<sup>δ</sup> % aktivnog ugljena ima značajan utjecaj na CBD i ukupne kanabinoide ( $p \leq 0,05$ )

**Slika 21.** Mjerenje koncentracije CBD, CBDA i ukupnih kanabinoida- 10 % mljevenih peleta.

Treće istraživanje provedeno je sa 10 % mljevenom peleti aktivnog ugljena. Ukupni kanabionidi i CBD (slika 21.) postepeno opadaju u prvih sat i pol. Koncentracija ukupnih kanabionida u prvih 30 min je sa  $< 14 \text{ mg g}^{-1}$  opala na  $10 \text{ mg g}^{-1}$ , zatim nakon 1h na  $5 \text{ mg g}^{-1}$  i nakon sat i pol na približno  $4 \text{ mg g}^{-1}$ .

Koncentracija CBD-a se u prvih 30 min s  $10 \text{ mg g}^{-1}$  spustila na  $6 \text{ mg g}^{-1}$ , a nakon 1 sat na približno  $1 \text{ mg g}^{-1}$ . Nakon sat i pol iznosi  $0,22 \text{ mg g}^{-1}$ .

Nakon 2 sata koncentracija CBD-a i ukupnih kanabionida je vidljiva u minimalnim količinama. Za razliku od navedenih komponenti, kod CBDA-a uočavamo da je u prvih 30 minuta u maloj količini narasla koncentracija ali nakon toga do 2 sata u potpunosti nestaju.

Promatrajući rad (Culbert i sur, 2021), čije se istraživanje temeljilo na promjeni sastava u soku od grožđa zahvaćenog dimom kao posljedica tretmana aktivnim ugljikom i utjecaj na fenolne spojeve i okus dima u vinu. Aktivni ugljen je korišten kako bi otklonio sve nepotrebne komponente, kao i u našem istraživanju. Prilikom provođenja našeg istraživanja koristili smo 1, 5 i 10 % mljevene peleti. Dva komercijalno dostupna aktivna ugljena su korištena u radu (Culbert i sur, 2021), (PS1300 i CASPF) i procijenjena su na 1, 2 i 4 g/L sa sokom od dimom zahvaćenog grožđa Pinot Noir i Chardonnay. Tretmani PS1300 i CASPF uklonili su 92 % fenolnih glikozida u soku crnog pinota zahvaćenog dimom, a oba ugljena uklonila su gotovo sve (tj. 98-99%) fenolne glikozide u Chardonnayju zahvaćenom dimom, pri najvećoj brzini doze (4 g/L). Koncentracija slobodnih hlapljivih fenola u vinima bila je slično niža nakon obrade. Senzorna analiza potvrdila je da su vina tretirana s aktivnim ugljikom imala smanjenu

aromu i okus dima u usporedbi s onima iz neobrađenih kontrola. Glavni problem koji uspoređujemo sa našim istraživanjem jeste taj što aktivni ugljen pored toga što otkloni negativne komponentne, otkloni i one komponentne koje su potrebne. Kao što je u našem istraživanju pored otklanjanja pigmenata (koje je bilo potrebno otkloniti) otklonio i kanabionide koji su poželjni. Kanabionidi su nakon dva sata provođenja tretmana bili vidljivi tek u minimalnim količinama. U ovom istraživanju (Culbert i sur, 2021) tretman je negativno utjecao na poželjna osjetilna svojstva kao što su boja i voćni atributi. Tretmani sa ugljikom uspjeli su smanjiti „ ozbiljnost „ dimnih aroma i okusa u vinu, uz smanjenje mnogih ugodnih "voćno/cvjetnih" atributa.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

1. Svi oblici ispitivanog aktivnog ugljena imaju utjecaj na smanjenje koncentracije klorofila u etanolnim ekstraktima industrijske konoplje dok mljeveni peleti pokazuju najbolja svojstva
2. Dodatak aktivnog ugljena u obliku mljevenih peleta ima negativan utjecaj na koncentracije poželjnih sastojaka ekstrakta – smanjenje koncentracije karotenoida, kanabidiola (CBD) ( $p \leq 0,05$ ) i ukupnih kanabinoida ( $p \leq 0,05$ ).
3. Kod uzoraka prije i nakon dekarboksilacije - vrijeme tretmana (min) i udio aktivnog ugljena (%) imaju značajan utjecaj na koncentraciju klorofila a ( $C_a$ ) i karotenoida dok udio ugljena ima značajan utjecaj na koncentraciju klorofila b ( $C_b$ ); ( $p \leq 0,05$ )
4. Klorofil se bolje uklanja iz etanolnih otopina uzoraka koji nisu prošli proces dekarboksilacije prije ultrazvučne ekstrakcije
5. Primjena Langumierovih i Freundlichovih matematičkih modela adsorpcijskih izoterma pokazala se primjerena kod uzoraka dobivenih prije dekarboksilacije i to samo za klorofil a ( $C_a$ )
6. Potrebna su daljnja istraživanja za optimiranje ovog procesa

## 6. LITERATURA

Abou-Arab AE, Abou-Arab AA, Abu-Salem MF (2010) Physicochemical assessment to natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii* plant. *Afr J Food Sci* **4**, 269–281. doi:10.4236/ajps.2014.524368

Barba FJ, Grimi N, Vorobiev E (2015) Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J Food Eng* **149**, 222–228. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.10.028

Bogale K, Raup-Konsavage W, Dalessio S, Vrana K, Coates MD (2019) Cannabis and Cannabis Derivatives for Abdominal Pain Management in Inflammatory Bowel Disease. *Med Cannabis Cannabinoids* **6**, 1–10. doi:10.1159/000517425

Culbert JA, Jiang W, Bilogrevic, E, Likos D, Francis IL, Krstic MP i sur. (2021) Compositional Changes in Smoke-Affected Grape Juice as a Consequence of Activated Carbon Treatment and the Impact on Phenolic Compounds and Smoke Flavor in Wine. *J Agr Food Chem*, **69**, 10246–10259. doi:10.1021/acs.jafc.1c02642

Ćurko J (2013) Uklanjanje arsena(V) iz vode procesom filtracije uronjivim mikrofiltracijskim membranama uz prethodnu adsorpciju, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Edwards KJ, Whittington G (1992) Male and Female Plant Selection in the Cultivation of Hemp, and Variations in Fossil Cannabis Pollen Representation. *Holocene* **2**, 85–87. doi:10.1177/095968369200200111

Fathordoobady F, Singh A, Kitts DD, Pratap Singh A (2019) Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Rev Int* **46**, 1–21. doi:10.1080/87559129.2019.1600539

Grotenhermen F (2003) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin Pharmacokinet* **42**, 327–360. doi:10.2165/00003088-200342040-00003



Grubišić Čabo HJ (2019) Optimizacija razgradnje fenola na aktivnom ugljenu šaržnim postupkom, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split.

Hong S, Sowndhararajan K, Joo T, Lim C, Cho H, Kim S, i sur. (2015) Ethanol and supercritical fluid extracts of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) increase gene expression of antioxidant enzymes in HepG2 cells. *Asian Pac J Reprod* **4**, 147–152. doi:10.1016/s2305-0500(15)30012-9

Jambrović M (2021) Ultrazvučna ekstrakcija kanabinoida iz cvjetova industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Jokić S, Nagy B, Velić D, Bucić-Konjić A, Bilić M (2011) Kinetički modeli za ekstrakciju uljarica superkritičnim CO<sub>2</sub>. *Croat J Food Sci Technol* **3**, 39-54.

Koren L (2021) Adsorpcija bakar(II) iona iz vodenih otopina pomoću otpadnih materijala, Metalurški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kwaśnica A, Pachura N, Masztalerz K, Figiel A, Zimmer A, Kupczyński R i sur. (2020) Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (*Cannabis sativa* L.). *Foods* **9**, 1118. doi:10.3390/foods9081118

Lukačević A (2016) Industrijska konoplja morfološka obilježja, uzgoj i uporaba, Poljoprivredni fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Microsoft Inc. (2019) Microsoft Excel, verzija 2019 <<http://www.microsoft.com/>>. Pristupljeno 15. lipnja 2022.

Mihelčić D (2022) Primjena konoplje u poljoprivredi i tržišne perspektive njezinih prerađevina i proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek.

Moreno T, Dyer P, Tallon S (2020) Cannabinoid Decarboxylation: A Comparative Kinetic Study. *Ind Eng Chem Fund* **59**, 20307-20315 doi:10.1021/acs.iecr.0c03791

Mousavi SMS, Dehghanzadeh R, Ebrahimi SM (2017) Comparative analysis of ozonation (O<sub>3</sub>) and activated carbon catalyzed ozonation (ACCO) for destroying chlorophyll a and reducing dissolved organic carbon from a eutrophic water reservoir. *Chem Eng J* **314**, 396–405. doi:10.1016/j.cej.2016.11.159

Narayanan S, Neto FL, Tanco K, Lopez G, Liu W, Bruera E, i sur. (2020) Cannabidiol (CBD) Oil, Cancer, and Symptom Management: A Google Trends Analysis of Public Interest. *Jacm* **0**, 1-3. doi:10.1089/acm.2019.0428

Nelson KM, Bisson J, Singh G, Graham JG, Chen SN, Friesen B, i sur. (2020) The Essential Medicinal Chemistry of Cannabidiol (CBD) *J Med Chem* **37**, 12137-12155 doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00724

Qamar S, Torres YJM, Parekh HS, Falconer JR, 2022 Fractional Factorial Design Study for the Extraction of Cannabinoids from CBD-Dominant Cannabis Flowers by Supercritical Carbon Dioxide. *Sc* **10**, 93. <https://doi.org/10.3390/pr10010093>

Pangestuti R, Kim SK (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Food* **3**, 255–266. doi:10.1016/j.jff.2011.07.001

Saastamoinen M, Eurola M, Hietaniemi V (2016) Oil, Protein, Chlorophyll, Cadmium and Lead Contents of Seeds in Oil and Fiber Flax (*Linum usitatissimum* L.) Cultivars and in Oil Hemp (*Cannabis sativa* L.) Cultivar Finola Cultivated in South-Western Part of Finland. *J Food Chem Nanotechnol* **2**, 73-76.

Smoljo J (2018) Razvoj metode za fluorimetrijsko određivanje klorofila a, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Sudalai A, Aher R, Kumar B (2013) One-Pot Synthesis of Cyclic Carbonates from Aldehydes, Sulfur Ylide, and CO<sub>2</sub>. *Synlett* **25**, 97–101. doi:10.1055/s-0033-1340072

Šain A (2019) Optimiranje uvjeta ekstrakcije biološki aktivnih komponenata iz industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Škof M (2020) Hidrodinamički kavitacijski reaktori – koncept, analiza hidrodinamičkih uvjeta i primjena, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Tisaj L (2020) Tranzicija: od marihuane do konoplje, Filozofski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.

Tomačić Paić A (2012) Svojstva kanabinoidnih receptora ljekovite biljke *Cannabis sativa*. *Med Vjesn* **44**, 147-162.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja (Nikolina Zadro) izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis