

# Biološka aktivnost i fizikalno-kemijski parametri ekstrakata industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)

---

Vinčić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:237233>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Prijediplomski studij Biotehnologija

Martina Vinčić  
0058218175

**BIOLOŠKA AKTIVNOST I FIZIKALNO-KEMIJSKI  
PARAMETRI EKSTRAKATA INDUSTRIJSKE  
KONOPLJE (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)**

ZAVRŠNI RAD

**Predmet:** Proizvodnja jakih alkoholnih pića

**Mentor:** dr. sc. Karla Hanousek Čiča

Zagreb, 2023.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Prijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Biološka aktivnost i fizikalno-kemijski parametri ekstrakata industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)**

**Martina Vinčić, 0058218175**

**Sažetak:** Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*), kao gospodarski važna podvrsta konoplje (*Cannabis sativa* L.), u posljednja dva desetljeća predmet je brojnih istraživanja zbog prisutnosti biološki aktivnih spojeva biljke te potencijalnih zdravstvenih dobrobiti. Cilj ovog rada bio je provesti biološku evaluaciju osam pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje određivanjem njihove antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti te odrediti i usporediti njihove fizikalno-kemijske parametre (ukupne fenole, pH-vrijednost i kromatske parametre). Ekstrakti su pripremljeni dekokcijom i maceracijom osušene i usitnjene industrijske konoplje, pri čemu su kao otapala korišteni voda, etanol (70 vol. %) te alkoholni i jabučni ocat. Koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u pripremljenim ekstraktima kreće se u rasponu 31,1-256,59 mg GAE L<sup>-1</sup> te su uzorci pokazali nizak antioksidacijski potencijal i zanemarivu antimikrobnu aktivnost. Na promatrane parametre utječu vrsta ekstrakcijskog otapala, vrsta biljnog materijala i vrijeme maceracije. Budući da je najveća koncentraciju ukupnih fenola određena u octenim maceratima, postoji određeni potencijal zamjene biljnih tinktura octenim maceratima.

**Ključne riječi:** industrijska konoplja, ekstrakcija, polifenoli, antioksidacijska aktivnost, antimikrobna aktivnost

**Rad sadrži:** 35 stranica, 8 slika, 10 tablica, 34 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** dr. sc. Karla Hanousek Čiča

**Datum obrane:** 8. rujna 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Food Engineering  
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Biological activity and physicochemical parameters of industrial hemp extracts (*Cannabis sativa*  
*L. subsp. sativa*)**

**Martina Vinčić, 0058218175**

**Abstract:** Industrial hemp (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*), as an economically important subspecies of hemp (*Cannabis sativa* L.), has been the subject of numerous studies in the last two decades due to the presence of biologically active plant compounds and potential health benefits. The aim of this research was to carry out a biological evaluation of eight prepared industrial hemp extracts by determining their antioxidant and antimicrobial activity and to determine and compare their physicochemical parameters (total phenols, pH-value and chromatic parameters). Extracts were prepared by decoction and maceration of dried and crushed industrial hemp, with water, ethanol (70 vol %), alcohol and apple cider vinegar used as solvents. The concentration of total phenolic compounds in the prepared extracts range from 31.1 to 256.59 mg GAE L<sup>-1</sup>, and the samples have shown low antioxidant potential and negligible antimicrobial activity. The observed parameters are affected by the type of extraction solvent, the type of plant material and the maceration time. Since the highest concentration of total phenols was determined in vinegar macerates, there is a certain potential of replacing herbal tinctures with them.

**Keywords:** industrial hemp, extraction, polyphenols, antioxidant activity, antimicrobial activity

**Thesis contains:** 35 pages, 8 figures, 10 tables, 34 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** Karla Hanousek Čiča, PhD

**Thesis defended:** September 8, 2023

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA ( <i>CANNABIS SATIVA</i> L. SUBSP. <i>SATIVA</i> ) .....	2
2.1.1. POVIJEST UZGOJA I UPORABA .....	2
2.1.2. BOTANIČKA KLASIFIKACIJA .....	3
2.1.3. MORFOLOŠKE OSOBINE.....	4
2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI .....	6
2.2.1. KANABINOIDI .....	6
2.2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI.....	7
2.2.3. TERPENI I TERPENOIDI.....	8
2.3. EKSTRAKCIJSKI POSTUPCI.....	8
2.3.1. KONVENCIONALNE METODE .....	10
2.3.2. NEKONVENCIONALNE METODE .....	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI.....	11
3.1.1. BILJNI MATERIJAL – INDUSTRIJSKA KONOPLJA.....	11
3.1.2. POSTUPAK PRIPREME EKSTRAKATA .....	11
3.1.3. TEST MIKROORGANIZMI .....	12
3.1.4. HRANJIVE PODLOGE .....	12
3.1.5. KEMIKALIJE I UREĐAJI .....	13
3.2. METODE .....	14
3.2.1. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI FRAP METODOM .....	14
3.2.2. ISPITIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI DPPH METODOM .....	15
3.2.3. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI.....	17
3.2.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA SPEKTROFOTOMETRIJSKI POMOĆU FOLIN-CIOCALTEU REAGENSA .....	18
3.2.5. ODREĐIVANJE pH-VRIJEDNOSTI .....	19
3.2.6. ODREĐIVANJE KROMATSKIH PARAMETARA.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4.1. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST .....	21
4.2. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST .....	22
4.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA (TPC) .....	25
4.4. pH-VRIJEDNOST.....	27
4.5. KROMATSKI PARAMETRI .....	28

5. ZAKLJUČCI.....	31
6. POPIS LITERATURE .....	32

## 1. UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) jedna je od najstarijih kultiviranih biljaka čija kultura seže unazad 6 000 godina (Fike, 2016). Smatra se jednom od prvih biljaka koja se, osim u prehrambene svrhe, počela koristiti u tekstilne svrhe te za dobivanje različitih ljekovitih pripravaka.

Usprkos dugoj povijesti, istraživanje i razvoj metoda uporabe ove biljke donedavno su bili u stagnaciji zbog zabrana uzgoja u većini zapadnih zemalja. Izvan upotrebe stavljena je zbog prisustva kanabinoida  $\Delta$ 9-tetrahidrokanabinola (THC) koji ima snažna psihoaktivna svojstva te su zbog njegove prisutnosti neke podvrste ove biljke podložne zlouporabi. Međutim, sredinom 90-ih godina prošloga stoljeća započinje komercijalni uzgoj industrijske konoplje pod posebnim zakonskim regulacijama, uslijed potrebe za ekološki prihvatljivijom i održivom proizvodnjom (Rupasinghe i sur., 2020). Ubrzani rast stanovništva, težnja prema ekološki održivoj proizvodnji te povećana potražnja za proizvodima kao što su razni dodaci prehrani i novi lijekovi, kvalitetni kozmetički proizvodi ili visoko nutritivna organska hrana ponovno su na tržištu stvorili mjesto za kultivaciju i istraživanje konoplje.

Teme brojnih istraživanja postaju antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje biogenih spojeva prisutnih u biljci konoplje. Antioksidacijska aktivnost spojeva izoliranih iz konoplje proučava se s ciljem pronalaska lijekova za razne neurodegenerativne bolesti, kronična upalna stanja i tumore. Ispitivanja antimikrobne aktivnosti provode se s ciljem pronalaska inhibitornih spojeva koji se mogu razviti u nove antimikrobne lijekove, zbog rastućeg svjetskog problema rezistencije patogena na antibiotike.

Cilj ovog rada bio je provesti biološku evaluaciju osam pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje određivanjem njihove antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti te odrediti i usporediti njihove fizikalno-kemijske parametre. Ekstrakti su pripremljeni dekokcijom i maceracijom osušene i usitnjene industrijske konoplje, pri čemu su kao otapala korišteni voda, etanol (70 vol. %) te alkoholni i jabučni ocat. Istraživanje antioksidacijske aktivnosti provedeno je pomoću FRAP i DPPH metode, dok je antimikrobna aktivnost određena disk difuzijskom metodom prema deset odabranih test mikroorganizama. Ispitani fizikalno-kemijski parametri su: ukupni fenoli, pH-vrijednost i kromatski parametri ekstrakata industrijske konoplje. Iz dobivenih rezultata bilo je potrebno zaključiti koje je otapalo optimalno za pripremu ekstrakta industrijske konoplje.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. INDUSTRIJSKA KONOPLJA (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*)

#### 2.1.1. Povijest uzgoja i uporaba

Duga povijest primjene konoplje započela je prije otprilike 8 500 godina, a njena aktivna kultivacija razvila se unazad 4 000-6 000 godina (Fike, 2016). Potječe iz središnje Azije, Kine i sjeverozapadnog dijela Himalaja, gdje još uvijek raste kao divlja vrsta. Kao prediva biljka, predstavljala je važan izvor vlakana, ali se koristila i kao prehrambena namirnica te u ljekovitim pripravcima. S tih prostora proširila se u Japan i Indiju, a kasnije i prema Africi te Europi (Gadžo i sur., 2011). U Indiji se njezino sjeme koristilo kao lijek, a osušeni ženski cvjetovi kao opojna droga („hašiš“ ili „marihuana“). Nakon otkrića Amerike, konoplja se proširila i duž tog kontinenta (Butorac, 2009). Migracija konoplje diljem svijeta potvrđuje njenu iznimnu prilagodljivost različitim klimatskim uvjetima te njenu gospodarsku važnost.

Poistovjećivanje industrijske konoplje s „marihuanom“, koja sadrži psihoaktivnu komponentu, dovelo je 30-ih godina prošloga stoljeća u Kanadi i Sjedinjenim Američkim Državama do zakonskih zabrana proizvodnje te su državne investicije usmjerene prema drugim ratarskim kulturama. Proizvodnja industrijske konoplje nastavila se u zemljama u kojima nisu postojale zabrane, no pojava sintetskih materijala poput najlona, poliestera i akrila te pojava pamuka i filipinske konoplje kao novih izvora vlakana uzrokovala je sve manju zainteresiranost za uzgoj ove biljke u industrijske svrhe. Međutim, tijekom 90-ih godina prošloga stoljeća ponovno se pojavio interes za uzgojem konoplje pod posebnim zakonskim regulacijama, zbog sve bržeg rasta stanovništva i potrebe za novim izvorima lijekova, hrane i biomaterijala te ekološki prihvatljivijom i održivom proizvodnjom (Rupasinghe i sur., 2020; Fike, 2016).

Na tržištu je danas zabilježeno preko 25 000 različitih proizvoda koji potječu od industrijske konoplje. Primarni proizvod komercijalnog uzgoja konoplje je vlakno iz stabljike. Vlakno konoplje nalazi se u kategoriji srednje grubih vlakana i karakterizira ga izrazita čvrstoća, elastičnost te otpornost na različite vremenske uvjete. Duga vlakna konoplje koriste se za izradu specijalnih papira, primjerice papira za cigarete ili izradu novčanica, za izolacijske trake električnih kondenzatora ili vrijednosne papire. Ovisno o kvaliteti dugog vlakna, ono se može se koristiti i za neke odjevne predmete, izradu brodske užadi, vreća ili ribarskih mreža. Kratka vlakna konoplje, koja su slabijih tehnoloških osobina, mogu se koristiti primjerice za proizvodnju kartona ili novinskog papira. Primjenom vlakna konoplje u proizvodnji papira rješavaju se veliki ekološki problemi nekontrolirane sječe šuma te se omogućuje veći broj



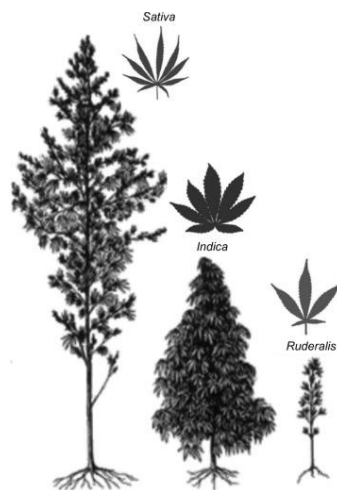
ciklusa recikliranja papira. Nadalje, važan proizvod su i sjemenke konoplje. Sjemenke konoplje bogate su uljem i proteinima, te se iz ulja može dobiti jestivo ili tehničko ulje, ovisno o postupku ekstrakcije. Tehničko ulje našlo je primjenu u proizvodnji boja i lakova, te u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Hladno prešano ulje konoplje slično je maslinovom ulju po boji i okusu te ima široku primjenu u prehrambenoj industriji. Oljuštene sjemenke konoplje koriste se u prehrani te se zbog svog kemijskog sastava smatraju funkcionalnom hranom. Zbog sličnog proteinskog sastava sjemenkama soje, koriste se u proizvodnji prehrambenih proizvoda kao što su mlijeko, tofu sir ili sladoled. Iz odmašćenih sjemenki konoplje dobiva se brašno koje se miješa sa pšeničnim brašnom i koristi u pekarstvu (Cerino i sur., 2021; Fike, 2016; Đurić i sur., 2015; Gadžo i sur., 2011). Danas su najveći naporu usmjereni u istraživanje bioaktivnih spojeva industrijske konoplje s ciljem njihove uporabe u razvoju novih farmaceutika, visokokvalitetnih kozmetičkih proizvoda te funkcionalne hrane i raznih dodataka prehrani.

U Republici Hrvatskoj i zemljama članicama Europske unije Zakonom o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga (Zakon, NN 39/19) uveden je pojam industrijske konoplje, koji podrazumijeva podvrstu konoplje (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) s ukupnim sadržajem THC-a 0,2 % i manjim, čije se sorte nalaze na Zajedničkoj sortnoj listi Europske unije i koja nije uvrštena u Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga. Ovim zakonom u Republici Hrvatskoj je od 2019. godine dozvoljen uzgoj cijele biljke industrijske konoplje, te je time omogućena njena uporaba u građevinskoj, tekstilnoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, industriji papira, autoindustriji te u proizvodnji biogoriva. Uzgajivači industrijske konoplje u Republici Hrvatskoj moraju biti registrirani u Evidenciji proizvođača industrijske konoplje koju vodi Ministarstvo poljoprivrede.

### **2.1.2. Botanička klasifikacija**

Konoplja je jednogodišnja zeljasta biljka koja pripada redu *Urticales*, porodici *Cannabinaceae*, rodu *Cannabis* (Đurić i sur., 2015). Smatra se da podjela konoplje na niže sistematske jedinice unutar roda *Cannabis* nije jedinstvena zbog iznimne varijabilnosti vrste uzrokovane tisućama godina kultivacije, križanja i selekcije. 1753. godine Carl Linne po prvi puta opisuje vrstu *Cannabis sativa* L. kao jedinstvenog predstavnika svoje vrste. Međutim, već 30 godina kasnije Lamarck prepoznaje biljku s biološkim osobinama koje se razlikuju od onih opisanih u Linneovom *Species Plantarum* te imenuje novu vrstu *Cannabis indica* Lam. Najnovija taksonomska inovacija u razumijevanju roda *Cannabis* dogodila se 1924. godine, kada je ruski botaničar Janischewsky definirao *Cannabis ruderalis* Janisch. kao treću vrstu konoplje (Schultes i sur., 1974).

Do sada je predloženo nekoliko načina klasifikacije konoplje, međutim najzastupljenija botanička podjela konoplje u znanstvenoj i stručnoj literaturi je ona koju su predložili autori Schultes, Klein, Plowman i Lockwood 1974. godine. Njihova je podjela na tri vrste: industrijska (*Cannabis sativa* L.), indijska konoplja (*Cannabis indica* Lam.) te divlja (ruderalna) konoplja (*Cannabis ruderalis* Janisch.) (slika 1). Dio botaničke struke zastupa i drugu podjelu koju su predložili Small i Cronquist 1976. godine, prema kojoj postoji samo jedna vrsta *Cannabis sativa* L. Ona se može podijeliti u dvije podvrste: *Cannabis sativa* subsp. *indica*, koja sadrži relativno visoke količine psihoaktivne tvari  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinola (THC), i *Cannabis sativa* subsp. *sativa*, koja sadrži značajno niže koncentracije THC-a. Ove dvije podvrste mogu dalje biti podijeljene na divlje i kultivirane: unutar podvrste *sativa*, varijetet *sativa* je kultivirana biljka, a varijetet *spontanea* divlja, dok je unutar podvrste *indica* varijetet *indica* kultivirana, a varijetet *kafiristanica* divlja biljka (Rupasinghe i sur., 2020). Sukladno ovim podjelama, većina varijeteta moderne industrijske konoplje pripada podvrsti *sativa*, dok varijeteti medicinske konoplje pripadaju podvrsti *indica*. Međutim, postojanje brojnih hibrida pred znanstvenike postavlja zahtjevan zadatak usavršavanja klasifikacije ove biljke.



**Slika 1.** Morfološke razlike između *Cannabis sativa* L., *Cannabis indica* Lam. i *Cannabis ruderalis* Janisch. (Malík i sur., 2021)

### 2.1.3. Morfološke osobine

Korijen konoplje je vretenast i slabe asimilacijske moći (slika 2). Iz glavnog se korijena razvija bočno korijenje, koje se tijekom rasta međusobno isprepliće. U rahlim tlima prodire do 2 m dubine te raste 1-2 m u širinu, dok u težim tlima raste samo 30-40 cm u dubinu (Butorac, 2009). Razgranat korijenov sustav u rahlima tlima sprječava eroziju tla te može asimilirati vodu i hranjiva iz dubljih slojeva, zbog čega dolazi do povećanja plodnost tla. Također, konoplji omogućuje sposobnost apsorpcije teških metala iz tla (Strzelczyk i sur., 2021).

Stabljika konoplje je uspravna, zelene boje i zeljasta, a starenjem odrveni. Visina stabljike ovisi o dnevnoj svjetlosti, vrsti tla, opskrbljenosti tla hranjivima, vlažnosti tla, veličini vegetacijskog prostora i spolu biljke. Može postići visinu od 0,5 do 5 m. Raste u visinu povećanjem broja nodija, koji nisu jasno izraženi, te epiderma stabljike sadrži grube dlačice. Sastoji se od celuloze, hemiceluloze, pentoze, pektina i lignina (Butorac, 2009).

Najprepoznatljiviji dio konoplje je list (slika 2). List konoplje složene je građe s dugom peteljkom i prstasto podijeljenom plojkom. Plojka lista je s donje strane dlakava, a s gornje glatka te se sastoji od 1-13 segmenata. Prvi par listova je jednostavan i sastoji se od jednog segmenta. Listovi su nazubljeni i na vrhu šiljasti. Svaki sljedeći par listova do sredine stabljike ima krupnije plojke sa većim brojem nazubljenih listića, dok se pri vrhu biljke broj segmenata ponovno smanjuje. Broj i veličina listova su odlika vrste, međutim uvijek ih je neparan broj. Prosječna dužina segmenata je 5 do 18 cm (Gadžo i sur., 2011; Butorac, 2009).



**Slika 2.** Korijenov sustav (lijevo) i listovi (desno) konoplje (Sancya, 2022; Strzelczyk i sur., 2021)

Cvjetovi konoplje su dvodomni, što znači da se u prirodi muški i ženski cvjetovi nalaze na odvojenim biljkama. U nekim se predjelima uzgaja i jednodomna biljka obzirom da dvodomne biljke sazrijevaju neujednačeno (Gadžo i sur., 2011). Cvjetovi muških biljaka („bjelojke“) smješteni su na vrhovima i bočnim stranama stabljike te se sastoje od perigona i pet prašnika. Žute su boje, imaju dugu stapku, a cvat je rahliji. Cvjetovi ženskih biljaka („crnojke“) su sjedeći, a smještaju se u pazušcima listova i zauzimaju gornju trećinu stabljike. Sastoje se od ovojnog listića, perigona i tučka sa dvije njuške te čine zbijeni cvat (Gadžo i sur., 2011; Butorac, 2009). Cvjetovi ženskih biljaka prekriveni su karakterističnim dlačicama koje se nazivaju trihomi. One su zadužene za proizvodnju smola koje sadrže psihoaktivnu tvar  $\Delta$ 9-tetrahidrokanabinol (THC) (Strzelczyk i sur., 2021). U cvjetovima ženskih biljaka indijske konoplje razina  $\Delta$ 9-tetrahidrokanabinola (THC) dostiže 20-30 %, dok je kod industrijske konoplje 100 puta niža (0,3 %).

Plod konoplje je okruglastog oblika te je omotan čvrstom ljuskom (perikarp), čija je zadaća štititi sjemenku. Boja ploda varira od svijetlozelene preko sive i smeđe do crvene, a promjer se

kreće u rasponu 3-4 mm. Na poprečnom presjeku ploda mogu se zamijetiti ljuske ploda, sjemenne ljuske, endosperm i klica. U endospermu se nalazi škrob, a u ostalim dijelovima sjemenke nalazi se ulje. Sjemenke konoplje sadrže 25-38 % ulja, 22 % bjelančevina, 16 % celuloze, 5 % ugljikohidrata i 19 % mineralnih tvari (Gadžo i sur., 2011; Butorac, 2009).

## **2.2. BIOAKTIVNI SPOJEVI**

Opsežna istraživanja industrijske konoplje unazad dva desetljeća omogućila su identifikaciju velikog broja različitih spojeva s potencijalnom biološkom aktivnošću, uključujući više od 120 terpenoida, 100 kanabinoida, 34 glikozidne komponente, 25 nekanabinoidnih fenola i 2 pigmenta (Cerino i sur., 2021).

### **2.2.1. Kanabinoidi**

Biološki najaktivnije komponente industrijske konoplje su kanabinoidi, vrsta terpensko-fenolnih spojeva, koji se uglavnom nakupljaju u šupljinama trihoma ženskih cvjetova. Fitokanabinoidi su prirodno prisutni spojevi specifični za vrste iz roda *Cannabis*. To su lipofilni spojevi i mogu se podijeliti na neutralne kanabinoide (koji ne posjeduju karboksilnu skupinu) i kanabinoidne kiseline (koje posjeduju karboksilnu skupinu) (Cásedas i sur., 2022).

Najpoznatiji kanabinoid je  $\Delta$ 9-tetrahidrokanabinol (THC), koji posjeduje psihotropna svojstva. Drugi važni kanabinoidi sa slabijim ili nikakvim psihotropnim svojstvima su kanabidiolna kiselina (CBDA), kanabidiol (CBD), kanabigerol (CBG), kanabikromen (CBC), kanabinol (CBN), kanabiciklol (CBL) i kanabidiol (CBND). Svi varijeteti industrijske konoplje sadrže navedene kanabinoidne spojeve, no njihove koncentracije variraju od vrlo niskih do onih čija je detekcija u potpunosti nemoguća. Koncentracija nepsihoaktivnih kanabinoida u industrijskoj konoplji pri tome je značajno veća od koncentracije psihoaktivnog  $\Delta$ 9-tetrahidrokanabinola (THC) te je nepsihoaktivne kanabinoide moguće ekstrahirati uglavnom iz sjemenki konoplje (Fathordoobady i sur., 2019).

Ulje sjemenki konoplje u današnje vrijeme postaje od sve veće važnosti zbog mnogobrojnih zdravstvenih dobrobiti i ubraja se u funkcionalnu hranu. Kanabinoidi prisutni u ulju sjemenki imaju antiepileptičko, antikonvulzivno, antineurodegenerativno, antiemetičko i analgetičko djelovanje. Dokazana su i protuupalna te antibakterijska svojstva ovih spojeva. Kanabidiol (CBD), kao najzastupljeniji kanabinoid u ulju sjemenki konoplje, posjeduje antikonvulzivna, antispazmodička, anksiolitička, antireumatoidna, neuroprotektivna, protuupalna i antibiotska svojstva te ublažava osjećaj mučnine. Također, znanstveno je dokazano da pomaže i pri liječenju Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, nekih oblika

tumora, neplodnosti i dermatitisa te ublažava simptome epilepsije, multiple skleroze (MS) i amiotrofične lateralne skleroze (ALS). Neurodegenerativne bolesti često su praćene kroničnim upalama, koje su povezane s oksidativnim stresom u organizmu. Kanabidiol (CBD) ima antioksidacijska svojstva koja ovise o njegovoj kemijskoj strukturi, te pokazuje neuroprotektivne učinke smanjenjem oksidacijskih parametara i povećanjem vitalnosti stanica (Cásedas i sur., 2022; Rupasinghe i sur., 2020; Fathordoobady i sur., 2019).

### **2.2.2. Polifenolni spojevi**

Polifenoli su prirodno prisutni spojevi koji se isključivo nalaze u biljkama. To su sekundarni metaboliti s antioksidacijskim i antimikrobnim djelovanjem, kojima se biljka štiti od patogena, oksidativnog stresa, ultraljubičastog zračenja i ekstremnih klimatskih uvjeta te koji potiču rast i diobu stanica, a stimuliraju i proces fotosinteze. Ne sudjeluju direktno u procesu fotosinteze ili procesu staničnog disanja, međutim biljci su prijeko potrebni za preživljavanje u okolišu. Sintetiziraju se uglavnom u kloroplastu. Fenoli su topljivi u vodi i mogu se podijeliti u dvije skupine: fenoli koji se sintetiziraju tijekom razvoja biljnog tkiva i inducirani fenoli koji se sintetiziraju kao odgovor na već spomenute vanjske stresore, odnosno biljci služe kao obrambeni mehanizam. Polifenoli doprinose i senzorskim karakteristikama biljaka, osobito boji, okusu, aromi i trpkosti (Zaini i sur., 2022).

Iz industrijske konoplje do sada su izolirani prenilirani flavonoidi, fenol-amidi, fenolne kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline) i lignanamidi, koji su specifični metaboliti biljaka iz roda *Cannabis*. Flavonoidi se mogu podijeliti na flavone, flavonole, flavanone, antocijanine i halkone, a u industrijskoj konoplji najzastupljeniji su flavonski glikozidi luteolin-7-O-glukuronid i apigenin glukuronid. Polifenolni spojevi, osobito flavonoidi, poznati su po antioksidacijskim, protuupalnim, antimikrobnim i antitumorskim svojstvima. Iz toga razloga smatraju se korisnim komponentama zdrave prehrane te se proizvodi na bazi polifenolnih spojeva u posljednjih nekoliko godina reklamiraju kao nutraceutici, budući da se njihovim unošenjem u organizam mogu spriječiti razne bolesti. Flavonoidi smanjuju rizik od nastanka bolesti kao što su neki oblici tumora, kronična upalna stanja, neurodegenerativni poremećaji, kardiovaskularne bolesti te hipoglikemija. Antioksidacijska svojstva flavonoida predmet su interesa i u kozmetičkoj industriji, budući da oksidacijski stres dovodi do starenja kože (Cásedas i sur., 2022; Izzo i sur., 2020).

Lignanamidi su podvrsta lignana te su također vrlo moćni antioksidansi, koji se sastoje uglavnom od kanabisina tipa A, B, C i M. Lignanamidi izolirani iz sjemenki industrijske konoplje mogu inhibirati reakcije acetilkolinesteraze, čija je zadaća razgradnja acetilkolina,

iznimno važnoga neurotransmitera u središnjem i perifernom živčanom sustavu. Ovi spojevi stoga imaju potencijal liječenja neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti, regulacijom razine acetilkolina u organizmu (Zaini i sur., 2022).

Polifenoli, kao i kanabinoidi, utječu na redoks ravnotežu u organizmu, modificirajući ukupnu razinu i aktivnost oksidansa i antioksidansa. Oni prekidaju lančane reakcije slobodnih radikala, neutralizirajući ih ili prevodeći ih u manje aktivne oblike. Nadalje, reduciraju oksidacijske uvjete sprječavajući tvorbu superoksidnih radikala te reduciraju proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (ROS) keliranjem iona prijelaznih metala (Cásedas i sur., 2022).

### **2.2.3. Terpeni i terpenoidi**

Terpeni su hlapljivi ugljikovodici koji se sastoje od međusobno povezanih izoprenskih jedinica. Terpenoidi su terpeni koji u svojoj strukturi sadrže kisik. Mogu se podijeliti na monoterpena (sadrže dvije izoprenske jedinice), seskviterpena (tri izoprenske jedinice), diterpena (četiri izoprenske jedinice) i triterpena (šest izoprenskih jedinica). Terpenski spojevi vrlo su važni sekundarni metaboliti industrijske konoplje jer su diterpeni preteče za sintezu fenolnih terpenoida, odnosno već spomenutih kanabinoida.

Glavni predstavnici monoterpena u konoplji su limonen,  $\beta$ -mircen,  $\alpha$ -pinen i linalol, a  $\alpha$ -terpinolen i trans-ocimen javljaju se u tragovima. Od seskviterpena prevladavaju E-kariofilen, kariofilen oksid, E- $\beta$ -farnezen i  $\beta$ -kariofilen. Terpeni i polifenolni spojevi imaju sinergistički učinak te su nosioci antioksidacijske aktivnosti i arome proizvoda industrijske konoplje, od čega potječe i blagotvorno djelovanje na zdravlje ljudi.

Poput već spomenutih liganamida,  $\alpha$ -pinen i  $\beta$ -pinen također imaju inhibicijsko djelovanje na aktivnost acetilkolinesteraze u mozgu. Time doprinose poboljšanju pamćenja i smanjenju kognitivne disfunkcije. Njihova aroma podsjeća na miris bora i posjeduje antiseptičko djelovanje. Za protuupalno djelovanje biljaka iz roda *Cannabis* odgovoran je između ostalog i  $\beta$ -kariofilen, spoj s aromom papra, koji ima gastroprotektivno, analgetičko, antikancerogeno, antifungalno, antibakterijsko, antidepresivno, antiproliferacijsko, antioksidacijsko, anksiolitičko, i neuroprotektivno djelovanje. Kariofilen oksid, čija aroma podsjeća na miris matičnjaka, posjeduje antifungalna i insekticidna svojstva (Sommano i sur., 2020).

## **2.3. EKSTRAKCIJSKI POSTUPCI**

Općenito, ekstrakcija je ravnotežni separacijski proces u kojemu dolazi do izdvajanja određene tvari iz krute ili tekuće faze pomoću prikladnog selektivnog otapala, pri čemu je ta tvar slične polarnosti kao otapalo ili ima bolju topljivost od ostalih komponenata smjese. Proces

ekstrakcije biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala uključuje četiri stupnja: (1) otapalo difundira u čvrstu fazu, (2) željena komponenta iz čvrste faze otapa se u otapalu, (3) smjesa otopljenih tvari i otapala difundira do međufazne granične površine i (4) otopljena tvar raspršuje se u volumenu otapala. Kvaliteta biljnih ekstrakata ovisi o odabranom biljnom materijalu, izboru otapala i upotrijebljenoj ekstrakcijskoj metodi. Ekstrakcijske metode mogu se podijeliti na konvencionalne/klasične i nekonvencionalne/nove metode.

Efikasnost ekstrakcije ovisi o veličini čestica sirovine, topljivosti komponente u otapalu, svojstvima otapala, omjeru sirovine i otapala te o vremenu potrebnom za ekstrakciju i temperaturi ekstrakcije. Prilikom ekstrakcije tvari iz čvrste faze potrebno je povećati dodirnu površinu između faza, stoga se biljni materijal usitnjava, čime se povećava brzina prijenosa mase. Izbor otapala za ekstrakciju ovisi o vrsti i svojstvima komponente koju je potrebno ekstrahirati. Otapalo mora biti odgovarajuće polarnosti (na temelju zakona sličnosti i miješanja), ne smije reagirati s ekstraktom ili razgrađivati se, mora imati što nižu točku ključanja i viskozitet, mora biti stabilno obzirom na toplinu, kisik i svjetlo, treba biti sigurno pri uporabi i ekološki prihvatljivo te imati nisku cijenu. Visoke temperature ekstrakcije povećavaju brzinu otapanja željene komponente i brzinu difuzije komponente u volumen otapala. Međutim, previsoke temperature mogu dovesti do gubitka otapala, ekstrakcije nepoželjnih komponenata i oštećenja ciljane termolabilne komponente, zbog čega temperature ekstrakcijskih postupaka rijetko prelaze 100 °C. Učinkovitost ekstrakcije raste s povećanjem vremena trajanja ekstrakcije u određenom vremenskom intervalu, no daljnje produljenje vremena ekstrakcije nema utjecaja na efikasnost ukoliko je postignuta ravnotežna koncentracija otopljenih tvari unutar i izvan čvrste faze. Što je veći omjer otapala i čvrste faze, to će biti veći prinos ekstrakcije, međutim veliki omjeri otapala i čvrste faze uzrokuju produljenje trajanja procesa ekstrakcije i prekomjernu potrošnju ekstrakcijskog otapala (Zhang i sur., 2018; Drmić i Režek Jambrak, 2010).

Organska otapala, poput metanola i etanola, tradicionalna su otapala za ekstrakciju i ispitivanje biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala. Međutim, određene skupine ljudi, kao što su djeca, trudnice, oboljeli od dijabetesa, gihta ili pankreatitisa te ljudi koji svakodnevno koriste određene lijekove, moraju ograničiti unos etanolnih ekstrakata. Iz tog razloga, danas se razvijaju ekstrakcijske metode koje umjesto alkohola koriste različite vrste octeva kao ekstrakcijsko otapalo za pripremu prehrambenih ili medicinskih proizvoda (Kalemba-Droždž i sur., 2020).

### **2.3.1. Konvencionalne metode**

Maceracija je najstarija i najjednostavnija metoda ekstrakcije bioaktivnih komponenti iz biljnog materijala. Zasniva se na potapanju biljnog materijala u odgovarajuće otapalo u zatvorenom spremniku, uz povremeno miješanje. Može potrajati od nekoliko dana do nekoliko tjedana, a odvija se pri sobnoj temperaturi. Biljni materijal je nakon provedene ekstrakcije potrebno ukloniti procesom filtracije ili dekantiranjem. Nedostaci ove metode su dulje vrijeme ekstrakcije i niski prinosi tvari od interesa, ali je primjenjiva za termolabilne komponente.

Dekokcija je ekstrakcijska tehnika koja uključuje kuhanje biljnog materijala tijekom 15-60 minuta ili prelijevanje proključale vode preko uzorka bilja, nakon čega se smjesa ostavlja stajati na sobnoj temperaturi određeno vrijeme. Ova metoda pogodna je za ekstrakciju termostabilnih i vodotopljivih fitokemikalija. Biljni materijal se od ekstrakta odvaja filtracijom. Nedostatak metode je ekstrakcija velikog broja nepoželjnih komponenti.

Perkolacija je najpoznatiji postupak pripreme tekućih ekstrakata kao što su tinkture. Izvodi se u uređaju koji se naziva perkolator. Tijekom perkolacije otapalo polako (kap po kap) prolazi kroz biljni materijal i tako se obogaćuje prisutnim fitokemikalijama, uz kontinuiran dotok svježeg otapala s vrha. Stalnim ispiranjem zasićenog otapala iz uređaja postiže se veća učinkovitost metode nego kod postupka maceracije (Bitwell i sur., 2023; Zhang i sur., 2018).

### **2.3.2. Nekonvencionalne metode**

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) široko je primjenjiva metoda u kojoj mehanički učinak akustične kavitacije nastale ultrazvukom povećava propusnost stanične stijenke biljnog materijala, a time i kontaktnu površinu između otapala i uzorka. Pripada jeftinijim metodama nove generacije te se može koristiti pri ekstrakciji u velikom i malom mjerilu. Ekstrakcija ultrazvukom skraćuje vrijeme ekstrakcije, smanjuje potrebnu količinu otapala i pogodna je za termolabilne komponente, međutim u nekim slučajevima postoji opasnost od nastanka slobodnih radikala fitokemikalija prisutnih u biljnom materijalu.

Ekstrakcija superkritičnim tekućinama (SFE) jedna je od najnovijih i najraširenijih tehnika ekstrakcije. Superkrična tekućina posjeduje fizikalna svojstva tekućine i plina, odnosno pri kritičnom tlaku i temperaturi tekuća i plinovita faza postaju nerazdvojne. Iako naginje plinovitom karakteru, superkrični fluid posjeduje mogućnost otapanja željene komponente poput tekućine. Na izlazu iz uređaja ekstrakt se od otapala odvaja zbog naglog porasta temperature i pada tlaka. U komercijalne svrhe najčešće se koristi superkrični CO<sub>2</sub>, koji je odlično otapalo za nepolarne komponente, dok se topljivost polarnih komponenata povećava dodatkom etanola ili metanola (Bitwell i sur., 2023; Azwanida, 2015).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Biljni materijal – industrijska konoplja

Kao biljni materijal korištena je osušena i usitnjena industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*), prije (originalni biljni materijal) i nakon provedenog postupka ultrazvučne (UZV) ekstrakcije biljnih smola za proizvodnju CBD ulja (biljni materijal nakon UZV ekstrakcije).

##### 3.1.2. Postupak pripreme ekstrakata

Ekstrakti industrijske konoplje u ovom radu pripremljeni su primjenom 2 metode ekstrakcije (dekokcija i maceracija) u kojima su korištena 4 različita otapala (voda, etanol (70 vol. %), alkoholni i jabučni ocat). Ekstrakti su pripremljeni iz originalnog uzorka biljnog materijala i biljnog materijala dobivenog nakon provedene ultrazvučne (UZV) ekstrakcije biljnih smola za proizvodnju CBD ulja (tablica 1).

**Tablica 1.** Pripremljeni ekstrakti industrijske konoplje

Broj uzorka	Masa industrijske konoplje (g)	Volumen otapala (mL)	Ekstrakt industrijske konoplje	
1	2,01	100	octeni macerati	(jabučni ocat, originalni biljni materijal)
2	2,00	100		(jabučni ocat, biljni materijal nakon UZV ekstrakcije)
3	2,01	100		(alkoholni ocat, originalni biljni materijal)
4	2,01	100		(alkoholni ocat, biljni materijal nakon UZV ekstrakcije)
7	1,99	100	dekokcija (originalni biljni materijal)	
8	2,00	100	dekokcija (biljni materijal nakon UZV ekstrakcije)	
9	2,01	100	tinktura (originalni biljni materijal)	
10	2,01	100	tinktura (biljni materijal nakon UZV ekstrakcije)	

Dekokcije su provedene tako da je odvagana masa industrijske konoplje od 2 g prelivena sa 100 mL proključale vode u bocama s čepom, a zatim je kuhanje biljnog materijala nastavljeno u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 25 minuta. Tinkture industrijske konoplje pripremljene su prelijevanjem 100 mL 70 %-tnog etanola preko 2 g odvagane mase biljnog materijala u bocama s čepom. Octeni macerati pripremljeni su tako da je odvagana masa

industrijske konoplje od 2 g prelivena sa 100 mL alkoholnog ili jabučnog octa u bocama s čepom. Nakon provedene pripreme uzoraka postupak ekstrakcije provodio se pri sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu. Kraj ekstrakcije određen je na temelju ustaljene koncentracije ukupnih fenola, mjerenjem koncentracije ovih spojeva na tjednoj bazi. Nakon završetka ekstrakcije biljni materijal je uklonjen filtracijom kroz filter papir, a dobiveni ekstrakti pohranjeni su na +4 °C.

### 3.1.3. Test mikroorganizmi

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje odabrano je 10 različitih test mikroorganizama (tablica 2) koje se kao trajne kulture čuvaju u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Optimalna temperatura za rast navedenih bakterijskih vrsti je 37 °C, dok je optimalna temperatura rasta kvasaca 28 °C.

**Tablica 2.** Test mikroorganizmi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje

<b>Gram-pozitivne bakterije</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
<b>Gram-negativne bakterije</b>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Salmonella enterica s. Typhimurium</i>
<b>Kvasci</b>	<i>Candida albicans</i>
	<i>Candida utilis</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### 3.1.4. Hranjive podloge

Tijekom određivanja antimikrobne aktivnosti pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje u ovom radu korištene su: hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija te hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca.

#### Hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterija

Tijekom ispitivanja antimikrobne aktivnosti Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija korištena je Mueller-Hinton agar podloga, MHA (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), čiji je sastav definiran tablicom 3. Za uzgoj bakterija korišten je Mueller-Hinton bujon, MHB, jednakog sastava kao MHA, ali bez dodatka agara.

**Tablica 3.** Sastav Mueller-Hinton agara (MHA)

Sastojci	g L <sup>-1</sup> destilirane vode
Mesni ekstrakt	2,0
Kiseli hidrolizat kazeina	17,5
Škrob	1,5
Agar	17,0

Hranjive podloge za održavanje i uzgoj kvasaca

Kulture kvasaca se tijekom ispitivanja antimikrobne aktivnosti naciepljuju na YPD hranjivu podlogu, čiji je sastav definiran tablicom 4. Za uzgoj kvasaca korištena je ista hranjiva podloga, ali bez dodatka agara.

**Tablica 4.** Sastav YPD podloge za kvasce

Sastojci	g L <sup>-1</sup> destilirane vode
Glukoza	20,0
Pepton	10,0
Kvaščev ekstrakt	5,0
Agar	20,0

Sve hranjive podloge pripravljene su tako da se navedeni sastojci otope u 1 L destilirane vode, nakon čega se provodi sterilizacija pri 121 °C tijekom 15 minuta. Hranjive podloge je nakon sterilizacije potrebno ohladiti na 55 °C, a zatim se razlijevaju u odgovarajuće sterilne Petrijeve zdjelice. Pripravljene Petrijeve zdjelice pohranjuju se u hladnjak do korištenja na +4 °C.

**3.1.5. Kemikalije i uređaji**

Pri eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije i uređaji:

- destilirana voda
- 100 %-tni etanol (Gram-mol, Zagreb, Republika Hrvatska)
- alkoholni ocat (Kisko, Republika Hrvatska, 9 % octene kiseline)
- jabučni ocat (Kisko, Republika Hrvatska, 5 % octene kiseline)
- Folin-Ciocalteu reagens (Supelco, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev karbonat (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Francuska)
- DMSO, dimetil-sulfoksid (Lach-Ner, s.r.o., Továrni, Češka)
- antimikrobni disk papirići s kanamicinom 50 µg (Biolab Inc., Budimpešta, Mađarska)
- antimikrobni disk papirići s nistatinom 100 µg (Biolab Inc., Budimpešta, Mađarska)
- sterilna voda
- ledena octena kiselina (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)
- bezvodni natrijev acetat (Gram-mol, Zagreb, Republika Hrvatska)

- TPTZ, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- željezo (III)-klorid-heksahidrat (Kemika, Zagreb, Republika Hrvatska)
- 37 %-tna HCl, klorovodična kiselina (CARLO ERBA Reagents S.A.S., Francuska)
- 40 mM otopina HCl, klorovodična kiselina
- DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrozyl (Fluka, Sigma-Aldrich, Njemačka)
- 96 %-tni etanol (Kefo, Ljubljana, Slovenija)
- autoklav ("Sutjeska" fabrika medicinskih uređaja i instrumenata, Beograd, Srbija)
- termostat (Termo medicinski aparati Bodalec, Republika Hrvatska)
- vibromješač, MS 3 digital (IKA, SAD)
- analitička vaga (Mikrotehna, Zagreb, Republika Hrvatska)
- spektrofotometar, Specord 50 plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka)
- hladnjak sa zamrzivačem (Končar, Republika Hrvatska)
- mikrobiološki zaštitni kabinet (Klimaoprema, Zagreb, Republika Hrvatska)
- pH-metar, Lab 855 (SI Analytics, Mainz, Njemačka)
- pH-elektroda, BlueLine 14 pH (SI Analytics, Mainz Njemačka)
- vaga (KERN & Sohn GmbH, Balingen, Njemačka)
- vodena kupelj (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Njemačka)
- uparivač, Rotavapor R-R-205 (Büchi, Švicarska)
- vodena kupelj, Heating Bath B-490 (Büchi, Švicarska)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

#### Princip metode

FRAP metoda bazira se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. Reakcija se odvija u kiselom mediju pri pH=3,6 kako bi se održala dobra topljivost željeza (Benzie i Strain, 1999).

#### Postupak rada

Kako bi se provelo ispitivanje antioksidacijske aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje potrebno je pripremiti FRAP reagens. FRAP reagens se priprema miješanjem 50 mL 0,3 M acetatnog pufera, 5 mL 10 mM otopine TPTZ reagensa i 5 mL 20 mM otopine željezovog (III)-klorida. Otopina TPTZ reagensa i otopina željezovog (III)-klorida dodaju se u acetatni pufer istovremeno kako bi se postigla blijedo-ružičasta boja reagensa. Acetatni pufer dobije se otapanjem 0,93 g bezvodnog (0,186 g/100 mL) natrijevog acetata u 8 mL ledene octene kiseline

u odmjernoj tikvici od 500 mL. Nakon otapanja odmijerna tikvica se do oznake nadopuni s destiliranom vodom. Za pripremu TPTZ reagensa treba se odvagati 0,0312 g TPTZ-a u odmjernu tikvicu od 10 mL i nadopuniti do malo ispod oznake s 40 mM HCl, a zatim se dodaje 1-2 kapi 37%-tne HCl za potpuno otapanje TPZT-a. Otopina željezovog (III)-klorida priprema se tako da se odvaži 0,0541 g željezovog (III)-klorida u odmjernu tikvicu od 10 mL te se odmijerna tikvica nadopuni do oznake s destiliranom vodom.

Antioksidacijska aktivnost ekstrakata industrijske konoplje ispitana je u originalnim uzorcima. Reakcijske smjese za uzorke pripremaju se tako da se u staklene epruvete odpipetira 240  $\mu$ L destilirane vode, 80  $\mu$ L uzorka i 2080  $\mu$ L pripremljenog FRAP reagensa. Sadržaj epruveta se dobro promiješa te epruvete s reakcijskom smjesom termostatiraju 5 minuta na 37 °C. Nakon toga slijedi mjerenje apsorbancije na 595 nm pomoću spektrofotometra Specord 50 plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka). Svaki uzorak mjeren je u 2 paralele. Slijepa proba priprema se s 80  $\mu$ L etanola umjesto uzorka.

#### Izrada baždarnog dijagrama

Izrada baždarnog pravca zahtjeva pripremu 2,5 mM otopine Trolox-a u etanolu. Iz tako pripremljene otopine priređuju se razrijeđenja otopine Trolox-a koncentracija 0,5; 1,0; 1,25; 1,75; 2,0 mM. Uzorci za baždarni dijagram pripremaju se na isti način kao što je objašnjeno u postupku rada, ali se umjesto uzorka dodaju priređene koncentracije otopine Trolox-a.

#### Račun

Iz baždarnog dijagrama dobije se jednadžba pravca pomoću koje se računa antioksidacijska aktivnost ekstrakata industrijske konoplje:

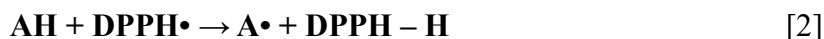
$$y = 1,00338x - 0,0051 \quad [1]$$

pri čemu je  $y$  apsorbancija pri 595 nm, a  $x$  je antioksidacijska aktivnost izražena u ekvivalentima Trolox-a (mM).

### **3.2.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom**

#### Princip metode

Mjerenje antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH metode temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1,-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal zbog nesporenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (517 nm) (Kazazić, 2004). U prisutnosti elektron donora-AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje u žutu, što se prati mjerenjem apsorbancije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995). Reakcija se može prikazati sljedećom jednadžbom:



### Priprema reagensa

DPPH reagens priprema se otapanjem 0,03943 g DPPH u 96 %-tnom etanolu u odmjerneju tikvici od 10 mL. Ova otopina služi za pripremu svježe 0,1 mM otopine DPPH reagensa svaki dan tokom rada, tako da se 5 mL originalne otopine prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopuni do oznake sa 96 %-tnim etanolom.

### Postupak rada

Ekstrakti industrijske konoplje su za određivanje antioksidacijske aktivnosti razrijeđeni 5 puta. Reakcijske smjese za provedbu metode pripremaju se tako da se u staklene epruvete odpipetira 200  $\mu\text{L}$  etanola i 2 mL pripremljenog DPPH reagensa. Slijepa proba priprema se na isti način, ali se umjesto uzorka koristi 200 mL čistog etanola (96 vol. %). Sadržaj epruveta se dobro promiješa te se reakcijske smjese pohranjuju na tamno mjesto tijekom 30 minuta. Nakon toga slijedi spektrofotometrijsko mjerenje apsorbancije na 517 nm pomoću spektrofotometra Specord 50 plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka) (slika 3). Svaki uzorak mjeren je u 2 paralele.

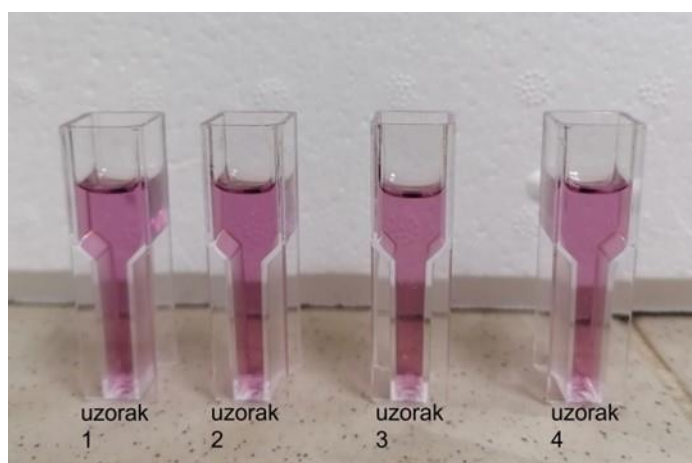
### Račun

Postupak inhibicije DPPH radikala uzoraka računa se prema jednačbi:

$$\% \text{inhibicije} = \left[ \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \right] * 100 \quad [3]$$

$A_0$  – apsorbancija otopine DPPH radikala (slijepa proba)

$A_t$  – apsorbancija reakcijske smjese



**Slika 3.** Uzorci ekstrakata industrijske konoplje pripremljeni za mjerenje apsorbancije i određivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom (*vlastita fotografija*)

### 3.2.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti

#### Čuvanje mikroorganizama

Test mikroorganizmi čuvaju se na odgovarajućem kosom agaru u hladnjaku pri +4 °C. Sve vrste test mikroorganizama trajno su pohranjene pri -70 °C uz dodatak glicerola (50 vol. %).

#### Priprava prekonoćnih kultura mikroorganizama

Za pripremu prekonoćnih kultura koriste se revitalizirane i identificirane čiste kulture bakterija i kvasaca, koje se aseptičnom tehnikom rada pomoću mikrobiološke ušice precijepe s hranjivog kosog agara u 10 mL odgovarajućeg hranjivog bujona. Tako pripremljene kulture inkubiraju se u termostatu tijekom 24 h pri 37 °C za bakterije i 28 °C za kvasce.

#### Priprava suspenzije test mikroorganizama

Suspenzije test mikroorganizama pripremljene su tako da se u epruvete, u koje je prethodno dodano 1 mL sterilne vode, prenese 100 µL pripremljenih prekonoćnih kultura test mikroorganizama. Sadržaj epruveta zatim se homogenizira te se 100 µL takve suspenzije prenese u epruvete u koje je prethodno dodano 5 mL sterilne vode. Ciljana koncentracija stanica u ovako pripremljenim suspenzijama test mikroorganizama je  $10^6$  st mL<sup>-1</sup>.

#### Princip metode

Antimikrobna aktivnost ekstrakata industrijske konoplje određivana je disk difuzijskom metodom, koja omogućuje utvrđivanje osjetljivosti mikroorganizama na više agenasa ili na više različitih koncentracija istog agensa istovremeno. Metoda se temelji na određivanju promjera zone inhibicije rasta mikroorganizma koja se pojavljuje oko diska natopljenog ispitivanim spojem, a koji je prethodno postavljen na čvrstu hranjivu podlogu inokuliranu test mikroorganizmom. Do inhibicije rasta mikroorganizma dolazi zbog difuzije antimikrobnog agensa u hranjivu podlogu.

#### Postupak rada

Disk difuzijska metoda provedena je za svih 8 pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje kako bi se usporedila njihova antimikrobna aktivnost. Korištene otopine, pribor i posuđe prethodno su sterilizirani te su svi postupci određivanja provedeni u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu. Volumeni pripremljenih tinktura industrijske konoplje od 10 mL prethodno su otpareni u uparivaču Rotavapor R-R-205 (Büchi, Švicarska), a zatim je tako dobiveni suhi ekstrakti otopljen u jednakom volumenu DMSO (dimetil-sulfoksid). Etanol posjeduje antimikrobnu aktivnost, stoga je potrebno upotrijebiti drugo otapalo kako tijekom provedbe disk difuzijske metode ne bi došlo do pojave lažno pozitivnih rezultata. Test mikroorganizmi koji su korišteni pri određivanju antimikrobne aktivnosti navedeni su u tablici 2.

Pripremljene homogenizirane suspenzije čistih mikrobnih kultura test mikroorganizama

naciepljuju se na Mueller-Hinton i YPD agar u Petrijevoj zdjelici pomoću sterilnog vatenog štapića namočenog u suspenziju pojedinog test mikroorganizma. Inokulum je potrebno nanijeti ravnomjerno na površinu agara, razmazivanjem u tri smjera. Svaki test mikroorganizam naciepljen je na dvije hranjive podloge. Zatim se za svaki pojedini test mikroorganizam na jedan agar pomoću sterilne pincete postavlja šest dijagnostičkih filter diskova promjera 6 mm, a na drugi se agar postavlja pet dijagnostičkih filter diskova i jedan antimikrobni disk papirić s kanamicinom ili nistatinom kao pozitivnom kontrolom za bakterije, odnosno kvasce. Diskove treba postaviti na površinu agara tako da disk cijelom površinom prijanja uz agar, a njihov raspored mora osiguravati dobro vidljive zone inhibicije, jasne za očitavanje. Na svaki disk se zatim aplicira po 10  $\mu$ L pojedinog pripremljenog ekstrakta industrijske konoplje, a kao pozitivne kontrole apliciraju se i korištena otapala: alkoholni ocat, jabučni ocat te DMSO (dimetil-sulfoksid). Octevi se kao pozitivne kontrole apliciraju zbog prisutnosti octene kiseline, koja posjeduje antimikrobnu aktivnost (Fraise i sur., 2013). Nakon postavljanja diskova, Petrijeve zdjelice stavljaju se u hladnjak na 30 minuta kako bi antimikrobne tvari počele difundirati u hranjivu podlogu, a potom se inkubiraju u termostatu pri 37 °C, odnosno 28 °C, ovisno o vrsti test mikroorganizma koja je naciepljena. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti očitavaju se mjerenjem zone inhibicije izražene u milimetrima oko svakog dijagnostičkog diska nakon 24 sata.

#### **3.2.4. Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa**

##### Princip metode

Određivanje sadržaja ukupnih fenola u ovom radu provedeno je kolorimetrijskom metodom pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, odnosno smjese fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline. Metoda se temelji na reakciji oksidacije svih prisutnih fenolnih spojeva, dok se kiseline iz Folin-Ciocalteu reagensa reduciraju u wolfram-oksidi i molibden-oksidi, koji reakcijskoj smjesi daju plavo obojenje. Nakon pojave plavog obojenja, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog obojenja na 760 nm, pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. Kao standard koristi se galna kiselina (Singleton i Rosi, 1965). Rezultat se izražava kao mg ekvivalenata galne kiseline po L ekstrakta ( $\text{mg GAE L}^{-1}$ ).

##### Postupak rada

Za određivanje sadržaja ukupnih fenola svi uzorci razrijeđeni su 5 puta. U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 300  $\mu$ L uzorka, 500  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Sastojci se u odmjernoj tikvici dobro promiješaju i nakon 5 minuta se doda 1,5 mL natrijevog



karbonata, nakon čega se tikvica do oznake nadopuni destiliranom vodom. Odmjerne tikvice se termostatiraju na 50 °C tijekom 20 minuta, a nakon toga se spektrofotometrijski mjeri apsorbancija na 760 nm pomoći spektrofotometra Specord 50 plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka). Svaki uzorak mjeren je u 2 paralele. Slijepa proba priprema se na isti način kao i uzorak, ali se umjesto 300 µL dodaje ista količina otapala.

#### Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca korištene su standardne otopine galne kiseline (GAE) koncentracija 100, 150, 200, 250 i 300 mg L<sup>-1</sup>.

#### Račun

Iz baždarnog dijagrama dobije se jednadžba pravca pomoću koje se računa koncentracija ukupnih fenola u uzorcima:

$$y = 0,0041x + 0,0204 \quad [4]$$

pri čemu je  $y$  apsorbancija pri 760 nm, a  $x$  je masena koncentracija ukupnih fenola izražena u mg L<sup>-1</sup>. Dobiveni rezultati pomnoženi su s 5 budući da su uzorci razrijeđeni 5 puta.

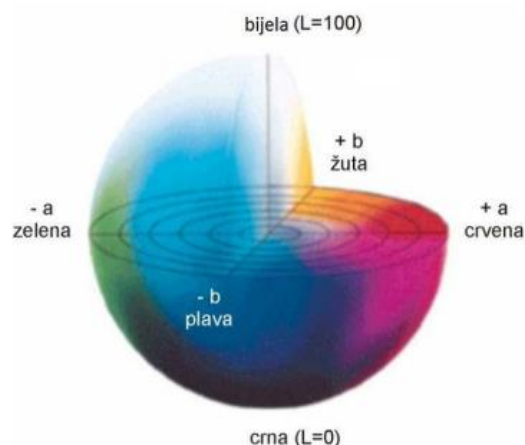
### **3.2.5. Određivanje pH-vrijednosti**

Određivanje pH-vrijednosti ekstrakata industrijske konoplje provedeno je pomoću laboratorijskog pH-metra Lab 855 (SI Analytics, Mainz, Njemačka) i pH-elektrode BlueLine 14 pH (SI Analytics, Mainz, Njemačka), uranjanjem pH-elektrode u uzorke. Prije provedbe analize pH-elektroda kalibrirana je amonijačnim puferom pH=4. Izmjerene su i pH-vrijednosti otapala koja su korištena tijekom pripreme ekstrakata.

### **3.2.6. Određivanje kromatskih parametara**

#### Princip metode

Kromatski parametri pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje određeni su spektrofotometrijskom metodom prema CIELAB sustavu (fr. Commission Internationale de l'Eclairage) (OIV, 2022). CIELAB je trodimenzionalni prostor boja baziran na percepciji boje standardnog promatrača (slika 4). U CIELAB sustavu, boje su opisane pomoću tri osi: dvije kromatske,  $a$  (crvena i zelena) i  $b$  (plava i žuta), te je svjetlina  $L$  akromatska os.



**Slika 4.** CIELAB prostor boja (Liu i Yang, 2019)

#### Postupak rada

Mjerenje kromatskih parametara pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje provedeno je pomoću spektrofotometra Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Njemačka) s izvorom svjetlosti D65. Spektrofotometrom su mjerene vrijednosti transmitancije, svakih 10 nm u području valnih duljina od 380 do 780 nm. Iz dobivenih vrijednosti transmitancije tj. propusnosti određeni su parametri: svjetlina ( $L$ ) čije se vrijednosti kreću u intervalu od 0 (crno) do 100 (prozirno/bijelo); komponenta crvene/zelene boje ( $a$ ) koja nema brojčani interval, međutim ukoliko je  $a$  pozitivan određuje crvenu boju, a ako je negativan određuje zelenu boju; komponenta žute/plave boje ( $b$ ) koja također nema brojčani interval, međutim ukoliko je  $b$  pozitivan određuje žutu boju, a ako je negativan određuje plavu boju. Kromatski parametri  $C$  (zasićenje boje) i  $h$  (kut boje) određuju ton boje (OIV, 2022).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je provesti biološku evaluaciju osam pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L. subsp. *sativa*) određivanjem njihove antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti te odrediti i usporediti njihove fizikalno-kemijske parametre: ukupne fenole, pH-vrijednost i kromatske parametre.

### 4.1. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje određena je primjenom FRAP (eng. ferric reducing/antioxidant power) i DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metode. Rezultati provedenih analiza prikazani su u tablici 5.

**Tablica 5.** Rezultati ispitivanja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata pomoću FRAP i DPPH metode

1. tjedan			2. tjedan		
Broj uzorka	FRAP (mM Troloxa)	DPPH (% inhibicije)	Broj uzorka	FRAP (mM Troloxa)	DPPH (% inhibicije)
1	1,58 ± 0,49	35,46 ± 3,39	1	0,56 ± 0,02	30,43 ± 0,41
2	0,98 ± 0,07	25,06 ± 2,07	2	0,33 ± 0,02	25,99 ± 1,57
3	0,71 ± 0,03	19,04 ± 2,81	3	0,72 ± 0,02	17,58 ± 0,08
4	0,56 ± 0,01	13,49 ± 2,07	4	0,56 ± 0,02	17,64 ± 4,96
7	0,64 ± 0,02	0,00 ± 0,00	7	0,48 ± 0,00	0,00 ± 0,00
8	0,66 ± 0,01	0,00 ± 0,00	8	0,68 ± 0,01	0,00 ± 0,00
9	0,61 ± 0,02	14,37 ± 0,83	9	0,57 ± 0,01	12,85 ± 3,21
10	0,53 ± 0,06	10,22 ± 0,74	10	0,45 ± 0,01	7,94 ± 1,98
0,025mM Trolox		37,26 ± 0,02	0,025mM Trolox		37,26 ± 0,02

Vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom kreće se u rasponu od 0,53 do 1,58 mM Troloxa tijekom 1. tjedna te od 0,33 do 0,72 mM Troloxa tijekom 2. tjedna ekstrakcije. Najveća antioksidacijska aktivnost određena pomoću FRAP metode nakon 2. tjedna zapažena je u uzorcima macerata alkoholnog octa (3 i 4), a najniža u pripremljenim dekokcijama (7 i 8). Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom kao postotak inhibicije DPPH radikala kreće se u rasponu od 0 do 35,46 % tijekom 1. tjedna te od 0 do 30,43 % tijekom 2. tjedna maceracije. Pri tome, najveći je postotak inhibicije DPPH radikala nakon 2. tjedna ekstrakcije zabilježen u maceratima jabučnog octa (1 i 2), a najniži u pripremljenim dekokcijama (7 i 8). Pad vrijednosti antioksidacijske aktivnosti uočava se nakon 1. tjedna ekstrakcije. Nadalje, vrijednosti antioksidacijske aktivnosti više su u uzorcima pripremljenim iz originalnog biljnog materijala (1, 3, 7 i 9). Rezultati su uspoređeni sa standardnim antioksidacijskim spojem 0,025 mM Trolox-om, koji je uzrokovao 37,26 % inhibicije DPPH

radikala.

Obzirom da u pripremljenim ekstraktima industrijske konoplje nisu određivane druge skupine spojeva s antioksidacijskim potencijalom, pretpostavlja se da se antioksidacijska aktivnost ekstrakata ne može pripisati samo prisutnim fenolnim spojevima već je ona rezultat sinergističkog djelovanja svih ekstrahiranih bioaktivnih spojeva industrijske konoplje (Hanousek Čiča, 2022). Međutim, budući da su fenolni spojevi jedni od nosioca antioksidacijske aktivnosti, navedena razlika u vrsti ekstrakta koji pokazuje maksimalnu vrijednost antioksidacijske aktivnosti mogla bi se objasniti prisutnošću fenolnih spojeva u jabučnom octu koji je korišten kao otapalo u procesu ekstrakcije. Prema Zhang i sur. (2021), jabučni ocat sadrži određenu količinu fenolnih spojeva kao što su hidroksicimetne kiseline, flavonoidi i manji broj derivata dihidrokalkona. Sadržaj fenolnih spojeva u jabučnom octu, a posljedično i antioksidacijska aktivnost, ovise o sirovini iz koje je ocat proizveden te o postupku proizvodnje. Povećana koncentracija ukupnih fenola u pripremljenim maceratima jabučnog octa (1 i 2), u odnosu na druge uzorke, mogla bi stoga utjecati na rezultate mjerenja antioksidacijske aktivnosti. Razlika u dobivenim vrijednostima maksimalne antioksidacijske aktivnosti posljedica je i različitih mehanizama na kojima se temelje korištene metode, koji su već opisani u metodama rada. Pojedini antioksidansi različito doprinose antioksidacijskoj aktivnosti ovisno o izabranoj metodi, stoga niti jedan test ne može točno odražavati sve antioksidanse prisutne u biljnom ekstraktu.

Budući da u znanstvenoj zajednici ne postoji standardizirana metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Hanousek Čiča, 2022), dobivene rezultate u ovom istraživanju nije moguće usporediti s dostupnim literaturnim podacima o antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje. Također, antioksidacijska aktivnost octenih macerata općenito je do sada vrlo slabo istražena te literaturni podaci o njihovoj antioksidacijskoj aktivnosti nisu dostupni.

#### **4.2. Antimikrobna aktivnost**

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti provedeno je disk difuzijskom metodom, mjerenjem promjera zona inhibicije rasta test mikroorganizama. Svrha ispitivanja bila je odrediti pokazuju li pripremljeni ekstrakti industrijske konoplje antimikrobnu aktivnost prema odabranim test mikroorganizmima. Antimikrobna aktivnosti ljekovitog i aromatičnog bilja postala je predmet istraživanja u posljednja dva desetljeća zbog rasta globalnog zdravstvenog problema rezistencije patogena na postojeće antibiotike, uzrokovanog širokom i neciljanom upotrebom antibiotika. Međutim, usporedba rezultata prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti spojeva iz ljekovitih biljnih vrsta i ostalih prirodnih izvora često je otežana zbog nepostojanja

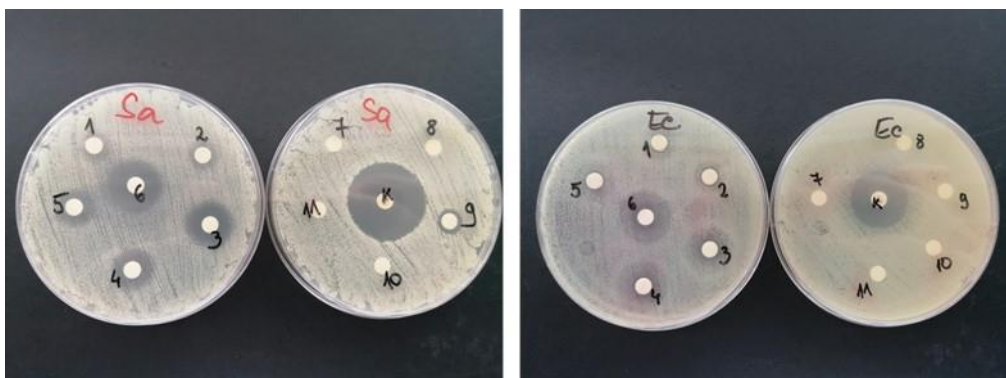
standardizirane metode provedbe ispitivanja (Balouiri i sur., 2016). Rezultati antimikrobne aktivnosti dobivenih ekstrakata industrijske konoplje dobiveni u ovom istraživanju prikazani su u tablicama 6-7 i na slici 5.

**Tablica 6.** Promjeri zona inhibicije rasta test mikroorganizama nastalih primjenom dobivenih ekstrakata industrijske konoplje

Uzorak 10 µL/disk	Promjer zone inhibicije (mm)						
	Gram-pozitivne bakterije				Gram-negativne bakterije		
	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica s. Typhimurium</i>
1	-	-	-	-	8	7	7
2	-	-	-	-	8	8	9
3	-	11	13	-	9	8	9
4	-	12	-	-	8	9	9
jabučni ocat	-	-	-	-	8	8	7
alkoholni ocat	11	15	15	15	9	10	10
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	8	10	9	8	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
DMSO	-	-	-	-	-	-	-
kanamicin 50 µg/disk	21	20	30	18	23	17	23

**Tablica 7.** Promjeri zona inhibicije rasta test-mikroorganizama, kvasaca, nastalih primjenom dobivenih ekstrakata industrijske konoplje

Uzorak 10 µL/disk	Promjer zone inhibicije (mm)		
	Kvasci		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
1	-	8	-
2	-	-	-
3	-	8	-
4	-	8	-
jabučni ocat	-	7	-
alkoholni ocat	8	8	7
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
DMSO	-	-	-
nistatin 100 µg/disk	16	23	16



**Slika 5.** Prikaz zona inhibicije rasta Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus* (lijevo) i Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (desno) nastalih primjenom pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje

Rezultati prikazani u tablicama 6-7 pokazuju da ispitivani uzorci imaju neznatnu antimikrobnu aktivnost prema odabranim test mikroorganizmima. Ispitivani uzorci octenih macerata industrijske konoplje (1, 2, 3 i 4) pokazali su slabo inhibitorno djelovanje prema mikroorganizmima: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* s. *Typhimurium* i *Candida utilis*. Međutim, obzirom da su pozitivne kontrole, jabučni i alkoholni ocat, također pokazale inhibicijski učinak na navedene mikroorganizme te da su promjeri zona inhibicije rasta nastali ispitivanim uzorcima octenih macerata (7-13 mm) i pozitivnim kontrolama (7-15 mm) otprilike jednake veličine, može se zaključiti kako inhibicijsko djelovanje ispitanih octenih macerata potječe od korištenog otapala, a ne od spojeva ekstrahiranih iz biljnog materijala. Pripremljene dekokcije (7 i 8) nisu pokazale inhibitorni učinak niti prema jednom od odabranih test mikroorganizama. Ispitivani uzorci tinktura (9 i 10) nisu pokazali inhibicijski učinak na rast Gram-negativnih bakterija, kao niti kvasaca, međutim tinktura pripremljena iz originalnog biljnog materijala (9) inhibirala je rast svih Gram-pozitivnih bakterija. Prema Fathordoobady i sur. (2019) faktori koji utječu na antibakterijska svojstva ekstrakta industrijske konoplje te na ukupni prinos bioaktivnih komponenti su: okoliš i klimatski uvjeti u kojima konoplja raste, dio biljke upotrijebljen za pripremu ekstrakta, ekstrakcijska metoda, metoda kojom se ispituje antimikrobna aktivnost, vrsta test mikroorganizma te vrsta upotrijebljenog otapala. Na primjer, u organskim otapalima poput acetona, metanola ili etanola dobivaju se veći prinosi kanabinoida, dok su ti prinosi u vodenim ekstraktima niži. Budući da inhibitorno djelovanje tinktura industrijske konoplje nije uočljivo ukoliko je uzorak pripremljen iz biljnog materijala dobivenog nakon provedene UZV ekstrakcije biljnih smola (10), može se zaključiti da antibakterijsko djelovanje tinkture pripremljene iz originalnog biljnog materijala potječe od ekstrahiranih kanabinoidnih komponenti industrijske konoplje ili sinergističkog djelovanja kanabinoida i polifenolnih

spojeva. Međutim, promjeri zona inhibicije rasta (npr. 9 mm za *Staphylococcus aureus*) značajno su manji od promjera zona inhibicije pozitivne kontrole, odnosno standardiziranog antibiotika kanamicina (30 mm). Iz tog razloga ne može se govoriti o značajnom antimikrobnom potencijalu pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje.

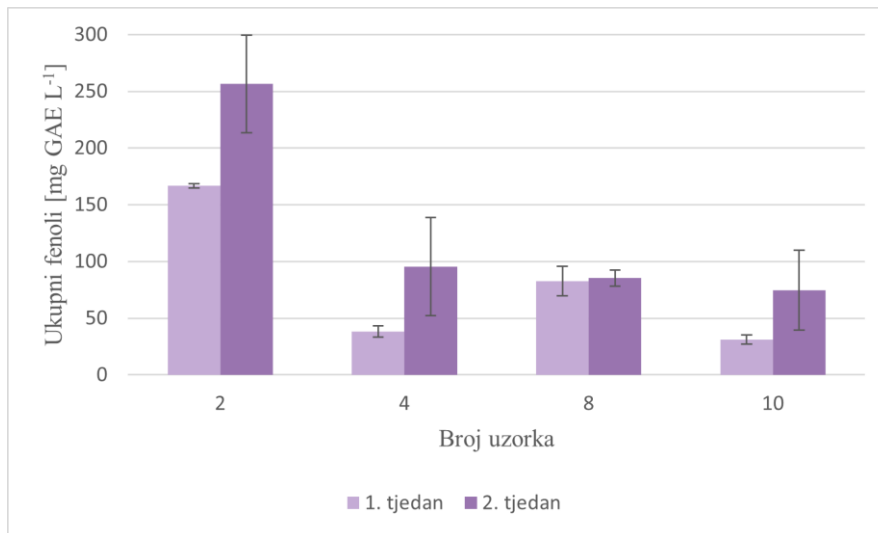
Literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti octenih macerata industrijske konoplje nisu poznati, međutim, Motiejauskaitė i sur. (2023) proveli su ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih u deioniziranoj vodi, metanolu (70 vol. %) i površinski aktivnom otapalu Triton X-100. Rezultati istraživanja za metanolne ekstrakte slažu se s dobivenim rezultatima za priređene tinkture (9 i 10), odnosno oni također inhibiraju rast Gram-pozitivnih bakterija *Bacillus subtilis* i *Listeria monocytogenes*, dok prema odabranim Gram-negativnim bakterijama i kvascu *Candida albicans* nisu pokazali inhibitorno djelovanje. Međutim, metanolni ekstrakti ne pokazuju inhibicijski učinak na rast Gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, dok ispitane tinkture pokazuju. Također, Motiejauskaitė i sur. (2023) zabilježili su i inhibicijske učinke vodenih ekstrakata na određene Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije.

### 4.3. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

U pripremljenim ekstraktima industrijske konoplje sadržaj ukupnih fenolnih spojeva određen je spektrofotometrijskom metodom pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 6-7 kao prosječne vrijednosti izmjerenih koncentracija ukupnih fenola u pojedinim uzorcima nakon 1. i 2. tjedna ekstrakcije. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva izražen je kao mg ekvivalenata galne kiseline po L ekstrakta ( $\text{mg GAE L}^{-1}$ ).



**Slika 6.** Koncentracije ukupnih fenola tijekom 2 tjedna maceracije u uzorcima pripremljenim iz originalnog biljnog materijala



**Slika 7.** Koncentracije ukupnih fenola tijekom 2 tjedna maceracije u uzorcima pripremljenim iz biljnog materijala dobivenog nakon ultrazvučne ekstrakcije biljnih smola

Koncentracije ukupnih fenolnih spojeva kreću se u rasponu od 50,55 do 205,49 mg GAE L<sup>-1</sup> u uzorcima pripremljenima iz originalnog biljnog materijala (1, 3, 7 i 9) te od 31,1 do 256,59 mg GAE L<sup>-1</sup> u uzorcima pripremljenima iz biljnog materijala dobivenog nakon ultrazvučne ekstrakcije biljnih smola (2, 4, 8 i 10). Obzirom da je u svim ispitanim uzorcima izmjerena određena koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, potvrđeno je da se isti mogu ekstrahirati različitim otapalima. Vidljivo je da se koncentracije fenolnih spojeva u različitim vrstama otapala razlikuju, odnosno da vrsta otapala ima velik utjecaj na količinu fenolnih spojeva koji se ekstrahiraju. U smjesi koja služi kao baza za ekstrakciju jedno otapalo može povećati topljivost polifenolnih spojeva, dok drugo može utjecati na njihovu desorpciju. Tako, na primjer, dodatak vode u dvokomponentnim sustavima povećava polarnost medija, a pucanjem vodikovih veza olakšava se ekstrakcija polifenola. Prema tome, za ekstrakciju polifenolnih spojeva najprikladnije otapalo je mješavina otapala različitih polarnosti, jer se tako pospješuje ekstrakcija spojeva različitih polarnosti iz biljnog materijala. Vodeni ekstrakti sadrže veće količine polarnih spojeva, dok organski ekstrakti imaju veći udio manje polarnih spojeva (Jovanović i sur., 2017). Najveća koncentracija ukupnih fenola nakon ekstrakcije zabilježena je u maceratima jabučnog octa (1 i 2) (205,49 odnosno 256,59 mg GAE L<sup>-1</sup>), dok su najniže koncentracije nakon 2. tjedna ekstrakcije uočene u pripremljenim dekokcijama (7 i 8) (81,28 odnosno 85,43 mg GAE L<sup>-1</sup>). Na koncentraciju ukupnih fenola utjecaj ima i vrsta biljnog materijala, pa su njihove koncentracije više u uzorcima pripremljenima iz originalnog biljnog materijala (1, 3, 7 i 9), zbog veće količine prisutnih bioaktivnih spojeva. Jedino odstupanje je macerat jabučnog octa (2), u kojemu je koncentracija ukupnih fenola viša kada je on pripremljen iz biljnog materijala dobivenog nakon UZV ekstrakcije biljnih smola. Visoka



koncentracija fenolnih spojeva u maceratima jabučnog octa (1 i 2), u odnosu na koncentraciju istih u ostalim uzorcima, može se objasniti prisustvom fenolnih spojeva u samome otapalu prije početka procesa ekstrakcije.

Osim vrste otapala i kvalitete biljnog materijala, na prinos bioaktivnih spojeva utjecaj ima i vrijeme trajanja ekstrakcije. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u svim uzorcima raste tijekom 2 tjedna ekstrakcije, što potvrđuje da s povećanjem vremena ekstrakcije raste i koncentracija ekstrahiranih spojeva iz biljnog materijala, ali do uspostave koncentracijske ravnoteže. Može se primijetiti da najveći rast koncentracije ukupnih fenola pokazuju octeni macerati (1, 2, 3 i 4) i da su njihove konačne koncentracije nešto veće ili približno jednake koncentracijama ukupnih fenola u pripremljenim tinkturama (9 i 10). Uzimajući to u obzir, iako maceracijom industrijske konoplje nisu postignute visoke koncentracije ukupnih fenola, istraživanje potvrđuje da postoji određeni potencijal primjene octenih macerata raznog ljekovitog i aromatičnog bilja u djece, trudnica i oboljelih koji ne smiju konzumirati etanolne ekstrakte (tinkture).

Literaturni podaci o sadržaju ukupnih fenolnih spojeva (TPC) u octenim maceratima industrijske konoplje nisu poznati. Međutim, Motiejauskaitė i sur. (2023) proveli su izolaciju biološki aktivnih komponenti iz cvjetova industrijske konoplje koristeći različita ekstrakcijska otapala, točnije primjenom deionizirane vode, metanola (70 vol. %) i površinski aktivnog otapala Triton X-100. Rezultati ovog istraživanja slažu se s dobivenim rezultatima za pripremljene tinkture (9 i 10) i dekokcije (7 i 8) industrijske konoplje. Metanolni ekstrakti pokazali su više koncentracije ukupnih fenolnih spojeva, kao i pripremljene tinkture industrijske konoplje, dok se deionizirana voda pokazala kao slabo učinkovito ekstrakcijsko otapalo. Viša koncentracija ukupnih fenolnih spojeva u ekstraktima industrijske konoplje mogla bi se postići ponavljanjem eksperimenta nekom drugom ekstrakcijskom metodom, npr. nekom od novih nekonvencionalnih metoda.

#### **4.4. pH-vrijednost**

pH-vrijednosti ekstrakata industrijske konoplje i otapala korištenih kao baze izmjerene su pomoću pH-metra, uranjanjem pH-elektrode u uzorke. pH-vrijednost alkoholnog octa iznosila je 2,61; jabučnog octa 3,22; vode 6,44; a etanola (70 vol. %) 6,84. Dobivene pH-vrijednosti ekstrakata prikazane su u tablici 8.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da su pH-vrijednosti svih uzoraka više u odnosu na pH-vrijednosti čistih otapala, stoga se može zaključiti da je promjena pH-vrijednosti nakon dodatka bilja posljedica ekstrakcije različitih spojeva iz biljnog materijala. Uzorci analizirani nakon 1. tjedna ekstrakcije pokazuju nešto više pH-vrijednosti nego uzorci analizirani nakon 2. tjedna, što upućuje na to da trajanje ekstrakcije utječe na sadržaj spojeva ekstrahiranih iz biljnog materijala. U skladu s pH-vrijednostima početnih otapala, najnižu pH-vrijednost pokazali su macerati pripremljeni pomoću alkoholnog octa (3 i 4), dok su najvišu pH-vrijednost pokazale pripremljene tinkture (9 i 10). Vrsta biljnog materijala nema utjecaja na pH-vrijednost, budući da se pH-vrijednosti uzoraka pripremljenih iz različitih biljnih materijala ne razlikuju značajno. U eksperimentu provedenom u radu Kalemba-Droždž i sur. (2020), u kojemu je uspoređen biološki potencijal octenih macerata, dekokcija i tinktura različitog voća i aromatičnog bilja, konačne pH-vrijednosti slažu se s dobivenim rezultatima. pH-vrijednosti octenih macerata bile su najniže, a najviše pH-vrijednosti izmjerene su u analiziranim tinkturama.

**Tablica 8.** pH-vrijednosti ekstrakata industrijske konoplje

1. tjedan		2. tjedan	
Uzorak	pH	Uzorak	pH
1	3,53	1	3,51
2	3,50	2	3,48
3	3,17	3	3,15
4	3,15	4	3,11
7	8,33	7	8,06
8	7,91	8	7,18
9	8,40	9	8,42
10	8,43	10	8,37

#### 4.5. Kromatski parametri

Kromatski parametri pripremljenih ekstrakata industrijske konoplje određeni su spektrofotometrijski primjenom CIELAB sustava (fr. Commission Internationale de l'Eclairage) (OIV, 2022). Dobivene vrijednosti kromatskih parametara u uzorcima nakon 1. tjedna ekstrakcije prikazane su u tablici 9, dok su rezultati mjerenja nakon 2. tjedna ekstrakcije prikazani u tablici 10. Svi pripremljeni ekstrakti su obojeni, međutim razlikuju se po svojim kromatskim parametrima (slika 8).



**Slika 8.** Različita obojenja konačnih ekstrakata industrijske konoplje pripremljenih iz biljnog materijala dobivenog nakon UZV ekstrakcije biljnih smola

**Tablica 9.** Kromatski parametri ekstrakata nakon 1. tjedna

Uzorak	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>h</i>
1	86,2334	-0,7986	27,8592	27,8706	1,5995
2	91,4291	-1,6050	24,2580	24,3110	1,6369
3	91,0658	-0,5055	25,0973	25,1024	1,5909
4	92,3722	-0,7296	23,3625	23,3739	1,6020
7	64,9020	10,6476	67,3440	68,1805	1,4140
8	70,3388	7,2119	61,4893	61,9108	1,4540
9	80,5722	-16,5393	69,8703	71,8012	1,8012
10	85,5765	-18,4562	66,6911	69,1978	1,8408

**Tablica 10.** Kromatski parametri ekstrakata nakon 2. tjedna

Uzorak	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>h</i>
1	85,3016	-0,3670	28,5731	28,5755	1,5836
2	91,0783	-1,1499	25,1588	25,1851	1,6165
3	91,7746	-0,6683	24,3817	24,3909	1,5982
4	93,3508	-0,8742	23,0193	23,0359	1,6088
7	65,6773	11,7984	65,0853	66,1460	1,3915
8	72,5013	6,0845	53,7004	54,0440	1,4580
9	78,7879	-14,1707	69,1996	70,6356	1,7728
10	84,7568	-17,6665	68,4265	70,6703	1,8235

Parametar *L* definira svjetlinu, odnosno bistroću, ispitivanog ekstrakta te se njegova vrijednost kreće u intervalu od 0 (crno) do 100 (prozirno/bijelo). Vrijednosti parametra *L* u ispitanim uzorcima kreću se u rasponu od 64,9020 do 92,3722 nakon 1. tjedna i od 65,6773 do 93,3508 nakon 2. tjedna ekstrakcije. Pri tome u oba slučaja najniže vrijednosti, odnosno najmanju svjetlinu, pokazuju pripremljene dekokcije (7 i 8), a najveću svjetlinu pokazuju macerati alkoholnog octa (3 i 4). Također, može se primijetiti da uzorci pripremljeni iz

originalnog biljnog materijala (1, 3, 7 i 9) pokazuju nešto niže vrijednosti svjetline od uzoraka pripremljenih iz biljnog materijala dobivenog nakon provedene UZV ekstrakcije biljnih smola (2, 4, 8 i 10). Uzrok tome je manja količina komponenti koje su topljive u pojedinoj bazi nakon provedene UZV ekstrakcije biljnog materijala. Zamjećuje se i da vrijednosti parametra  $L$  nakon 2. tjedna ekstrakcije padaju u odnosu na 1. tjedan u uzorcima macerata jabučnog octa (1 i 2) i u pripremljenim dekokcijama (7 i 8), dok u uzorcima macerata alkoholnog octa (3 i 4) i u tinkturama (9 i 10) ta vrijednost raste. Time se potvrđuje da vrsta otapala i vrijeme ekstrakcije uvelike utječu na ispitivane parametre. Parametar  $a$  definira komponentu crvene/zelene boje. U svim uzorcima prisutna je komponenta zelene boje ( $a < 0$ ), osim u uzorcima dekokcija (7 i 8) u kojima prevladava komponenta crvene boje. Pri tome, važno je napomenuti da je izrazito zelena boja pripremljenih tinktura (9 i 10) posljedica ekstrakcije pigmenta klorofila, budući da je etanol jedno od pogodnih otapala za ekstrakciju različitih pigmenata (Palta, 1990). Parametar  $b$  definira komponentu žute/plave boje. Primjećuje se da je u svim uzorcima prisutna komponenta žute boje ( $b > 0$ ). Važno je istaknuti da su vrijednosti parametra  $b$  značajno veće od vrijednosti parametra  $a$ , stoga se zaključuje da u uzorcima prevladavaju komponente žute boje. Dobivene vrijednosti slažu se sa subjektivnim vizualnim doživljajem promatrača. Parametar  $C$  označava vrijednost zasićenja boje te je ta vrijednost najveća u uzorcima tinktura (9 i 10), a najmanja u uzorcima macerata alkoholnog octa (3 i 4). Može se primijetiti da je u svim uzorcima zasićenje boje veće ukoliko su pripremljeni iz originalnog biljnog materijala (1, 3, 7 i 9). Parametar  $h$  definira kut boje u trodimenzionalnom CIELAB sustavu, a njegove su vrijednosti u uzorcima od 1,3915 do 1,8408. Pri tome, najveći kut boje posjeduju pripremljene tinkture (9 i 10), a najmanji dekokcije (7 i 8). Također, veći kut boje pokazuju uzorci pripremljeni iz biljnog materijala dobivenog nakon UZV ekstrakcije biljnih smola (2, 4, 8 i 10).

Budući da su istraživanja pogodnosti zamjene tinktura ljekovitog i aromatičnog bilja octenim maceratima tek u začetcima, a istraživanja industrijske konoplje slična ovome nisu poznata, ne postoji mnogo podataka za usporedbu kromatskih parametara u literaturi. Međutim, dobiveni kromatski parametri za tinkture (9 i 10) slažu se s rezultatima istraživanja od Hanousek Čiča (2022) za vodeno-etanolne (70 vol. %) macerate imele. Rezultati se razlikuju samo u parametru  $a$ , obzirom na to da macerati imele slabo prelaze u područje komponente crvene boje ( $a > 0$ ), a dobivene tinkture industrijske konoplje posjeduju komponentu zelene boje ( $a < 0$ ). Mjerenje kromatskih parametara biljnih ekstrakata od iznimne je važnosti kako bi se osigurala željena kvaliteta konačnog proizvoda u smislu boje i bistroće, koje imaju veliki psihološki utjecaj na potrošača.

## 5. ZAKLJUČCI

1. U svim ispitanim uzorcima zabilježena je određena antioksidacijska aktivnost, pri čemu su najveću antioksidacijsku aktivnost imali uzorci u kojima je korišten jabučni ocat kao otapalo (1 i 2).
2. Tinktura industrijske konoplje pripravljena iz originalnog biljnog materijala (9), koja sadrži ekstrahirane kanabinoidne komponente, inhibirala je rast Gram-pozitivnih bakterija, dok ostali ekstrakti nisu pokazali antimikrobno djelovanje prema testiranim bakterijama i kvascima.
3. Tijekom procesa ekstrakcije pomoću odabranih otapala dolazi do ekstrakcije fenolnih spojeva iz industrijske konoplje. Na njihovu koncentraciju utječu vrsta ekstrakcijskog otapala, vrsta biljnog materijala i vrijeme maceracije. Najvišu koncentraciju ukupnih fenola pokazali su macerati jabučnog octa (1 i 2) te ona iznosi 205,49 odnosno 256,59 mg GAE L<sup>-1</sup>. Dobiveni rezultati pokazali su da postoji određeni potencijal zamjene biljnih tinktura octenim maceratima.
4. pH-vrijednost ispitanih uzoraka ovisi o vrsti ekstrakcijskog otapala i vremenu maceracije. Industrijska konoplja bogata je baznim spojevima, budući da pH-vrijednosti ispitanih uzoraka rastu u odnosu na pH-vrijednosti početnih otapala.
5. Kromatski parametri ispitanih uzoraka ovise o ekstrakcijskom otapalu, vremenu maceracije i vrsti biljnog materijala. U gotovo svim uzorcima zabilježena je prisutnost zelene i žute boje, no u dekokcijama (7 i 8) je prisutnija komponenta crvene boje. Svjetlina, odnosno bistroća uzoraka, niža je ukoliko su uzorci pripravljeni iz originalnog biljnog materijala (1, 3, 7 i 9).

## 6. POPIS LITERATURE

Azwanida, N.N. (2015) A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants* **4**(3), 196. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* **6**, 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Benzie, F.F., Strain, J.J. (1999) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem* **239**, 70-76.

Bitwell, C., Sen, S.I., Luke, C., Kakoma, M.K. (2023) A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African* **19**. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT* **28**, 25-30.

Butorac, J. (2009) *Predivo bilje*, Kugler, d.o.o., Zagreb, str. 5-19.

Cásedas, G., Moliner, C., Maggi, F., Mazzara, E., López, V. (2022) Evaluation of two different *Cannabis sativa* L. extracts as antioxidant and neuroprotective agents. *Front. Pharmacol.* **13**. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1009868>

Cerino, P., Buonerba, C., Cannazza, G., D'Auria, J., Ottoni, E., Fulgione, A., i sur. (2021) A review of hemp as food and nutritional supplement. *Cannabis Cannabinoid Res.* **6**, 19-27. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0001>

Drmić, H., Režek-Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**(2), 22-33. <https://orcid.org/0000-0001-7676-6465>

Đurić, N., Kresović, B., Glamočlija, Đ. (2015) Sistemi konvencionalne i organske proizvodnje ratarskih useva, Institut PKB Agroekonomik, Padinska Skela, str. 251-256.

Fathordoobady, F., Singh, A., Kitts, D.D., Pratap Singh, A. (2019) Hemp (*Cannabis Sativa* L.) Extract: Anti-Microbial Properties, Methods of Extraction, and Potential Oral Delivery. *Food Reviews International*. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1600539>

Fike (2016) Industrial Hemp: Renewed Opportunities for an Ancient Crop. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**(5-6), 406-424. <https://doi.org/10.1080/07352689.2016.1257842>

Fraise, A.P., Wilkinson, M.A.C., Bradley, C.R., Oppenheim, B., Moiemmen, N. (2013) The antibacterial activity and stability of acetic acid. *Journal of Hospital Infection* **84**, 329-331. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.05.001>

Gadžo, D., Đikić, M., Mijić, A. (2011) Industrijsko bilje, 1. izd., Poljoprivredno-prehrambeni fakultet Univerziteta u Sarajevu, str. 167-177.

Hanousek Čiča, K. (2022) Fitokemijski profil, funkcionalna svojstva i fizikalno-kemijski parametri tradicionalne istarske travarice biske (disertacija), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Izzo, L., Castaldo, L., Narváez, A., Graziani, G., Gaspari, A., Rodríguez-Carrasco, Y., i sur. (2020) Analysis of Phenolic Compounds in Commercial *Cannabis sativa* L. Inflorescences Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Molecules* **25**(3), 631. <https://doi.org/10.3390/molecules25030631>

Jovanović, A., Petrović, P., Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski B. (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine* **37**, 45-49. <http://dx.doi.org/10.5937/leksir1737045J>

Kalemba-Drożdż, M., Kwiecień, I., Szewczyk, A., Cierniak, A., Grzywacz-Kisielewska, A. (2020) Fermented Vinegars from Apple Peels, Raspberries, Rosehips, Lavender, Mint, and Rose Petals: The Composition, Antioxidant Power, and Genoprotective Abilities in Comparison to Acetic Macerates, Decoctions, and Tinctures. *Antioxidants* **9**(11), 1121. <https://doi.org/10.3390/antiox9111121>

Kazazić, S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol* **55**, 279-290.

Liu, G.H., Yang, J.Y. (2019) Exploiting color volume and color difference for salient region detection - ResearchGate. [https://www.researchgate.net/figure/The-ellipsoid-shape-for-Lab-color-space-Source-46\\_fig2\\_332834212](https://www.researchgate.net/figure/The-ellipsoid-shape-for-Lab-color-space-Source-46_fig2_332834212) . Pristupljeno 26. lipnja 2023.

Malík, M., Velechovský, J., Tlustoš, P. (2021) The overview of existing knowledge on medical cannabis plants growing. *Plant Soil Environ.* **67**, 425–442. <https://doi.org/10.17221/96/2021-PSE>

Motiejauskaitė, D., Ullah, S., Kundrotaitė, A., Žvirdauskienė, R., Bakšinskaitė, A., Barčauskaitė, K. (2023) Isolation of Biologically Active Compounds from *Cannabis sativa* L. Inflorescences by Using Different Extraction Solvents and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Antioxidants* **12**(5), 998. <https://doi.org/10.3390/antiox12050998>

OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivincultural Origin (2022) Determination of chromatic characteristics, OIV-MA-BS-27, International Organisation of Vine and Wine, Paris.

Palta, J.P. (1990) Leaf chlorophyll content. *Remote Sensing Reviews* **5**(1), 207-213. <https://doi.org/10.1080/02757259009532129>

Rupasinghe, H.P.V., Davis, A., Kumar, S.K., Murray, B., Zheljazkov, V.D. (2020) Industrial Hemp (*Cannabis sativa* subsp. *sativa*) as an Emerging Source for Value-Added Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Molecules* **25**(18), 4078. <https://doi.org/10.3390/molecules25184078>

Sancya, P. (2022) Hemp production could be a sustainable economic future for indigenous communities, but barriers remain - Northeastern Global News. <https://news.northeastern.edu/2022/10/07/hemp-production-indigenous-communities/> . Pristupljeno 3. srpnja 2023.



Schultes, R. E., Klein, W. M., Plowman, T., Lockwood, T. E. (1974) *Cannabis*: an example of taxonomic neglect. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University* **23**(9), 337-367. <https://www.jstor.org/stable/41762285>

Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J of Enol Vitic* **16**, 144 – 158.

Sommano, S.R., Chittasupho, C., Ruksiriwanich, W., Jantrawut, P. (2020) The Cannabis Terpenes. *Molecules* **25**(24), 5792. <https://doi.org/10.3390/molecules25245792>

Strzelczyk, M., Lochyńska, M., Chudy, M. (2021) Systematics and Botanical Characteristics of Industrial Hemp *Cannabis Sativa* L. *Journal of Natural Fibers*. <https://doi.org/10.1080/15440478.2021.1889443>

Zaini, N.S., Karim, R., Razis, A.F.A., Zawawi, N. (2022) Utilizing Nutritional and Polyphenolic Compounds in Underutilized Plant Seeds for Health Application. *Molecules* **27**(20), 6813. <https://doi.org/10.3390/molecules27206813>

Zakon o suzbijanju zlouporabe droga (2019), *Narodne novine* **39/19**, Zagreb.

Zhang, Q., Lin, L., Ye, W. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med* **13**, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zhang, S., Hu, C., Guo, Y., Wang, X., Meng, Y. (2021) Polyphenols in fermented apple juice: Beneficial effects on human health. *Journal of Functional Foods* **76**. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104294>

## Izjava o izvornosti

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

*Martina Vincic*

---

Vlastoručni potpis