

Ekstrakcija bioaktivnih sastavnica iz cvatova industrijske konoplje superkričnim CO2

Jokić, Stela

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:880816>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ekstrakcija bioaktivnih sastavnica iz cvatova industrijske konoplje superkričnim CO₂

Jokić, Stela

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:880816>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Stela Jokić

**EKSTRAKCIJA BIOAKTIVNIH SASTAVNICA IZ CVATOVA INDUSTRIJSKE
KONOPLJE SUPERKRITIČNIM CO₂**

Specijalistički rad

Zagreb, 2023.

PSS studij: „ Dermatofarmacija i kozmetologija“

1. Mentor specijalističkog rada: prof. dr. sc. Sanda Vladimir - Knežević

Specijalistički rad obranjen je dana **12. svibnja 2023.** godine, na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

2. prof. dr. sc. Željka Vanić

3. prof. dr. sc. Sanda Vladimir - Knežević

4. prof. dr. sc. Verica Dragović - Uzelac

Rad ima 79 listova.

Svijet ljekovitih biljaka i njihovih aktivnih sastojaka te istraživanje novih znanstvenih spoznaja u tom području fascinira me već dulji niz godina.

Kada se zađe u njihov svijet, ljekovite biljke prave su „zavodnice“ i šarmiraju svojim moćnim učincima na ljudsko zdravlje - svaka od njih posebna je na svoj način. Ako Vas zanima ono što nam je kroz njih nesebično dano, uz pomoć ovog rada, krenite na svoje ljekovito putovanje!

Ono što iz vlastitog iskustva mogu zabilježiti jest da ćete tijekom tog putovanja susretati ljude koji Vas oblikuju i profesionalno usmjeravaju. Neizmjereno sam zahvalna svojoj mentorici, prof. dr. sc. Sandi Vladimir-Knežević, na iskrenoj podršci tijekom izrade ovog specijalističkog rada. Njezini savjeti, znanje i iskustvo bili su mi stalan podsjetnik i poticaj uvijek ići naprijed, prema novim izazovima.

Najiskrenije zahvaljujem i svim svojim kolegama i prijateljima na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada, kao i mojoj boljoj polovici koja me uvijek bodrila kroz sve moje izazove.

S mnogo ljubavi i zahvalnosti ovaj rad posvećujem svojem nedavno preminulom ocu koji je uvijek vjerovao u mene.

SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Definirati optimalne uvjete izolacije kanabinoida i terpena iz cvata industrijske konoplje primjenom "zelene" ekstrakcije ugljikovim dioksidom u superkričnom stanju (sCO₂); kvantificirati dobivene ekstrakte na udio kanabinoida i terpena; te odrediti antioksidacijske i antimikrobne učinke sCO₂ ekstrakata.

Materijal i metode: Za istraživanje su korišteni osušeni cvatući vršni dijelovi industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) sorte Futura 75 s hrvatskog tržišta. Ekstrakcija ciljanih bioaktivnih sastavnica provedena je primjenom sCO₂. Eksperimentalna matrica napravljena je prema dizajnu centralnog kompozitnog plana pokusa, a analizom varijance procjenjen je stupanj točnosti primijenjene metodologije. Identifikacija i kvantifikacija isparljivih sastavnica sCO₂ ekstrakata provedena je u vezanom sustavu plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS), dok su kanabinoidi određeni metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC-DAD). Antioksidacijska svojstva dobivenih ekstrakata određena su primjenom DPPH testa, dok je antibakterijska aktivnost ispitana mikrodilucijskom metodom za određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija.

Rezultati: Analiza plinskom kromatografijom i spektrometrijom masa (GC-MS) pokazala je β-mircenski kemotip sCO₂ ekstrakata, s visokim udjelom α-pinena i β-pinena te nizom drugih monoterpena s manjim udjelima, dok je najzastupljeniji seskviterpen bio β-kariofilen. Glavni kanabinoidi sCO₂ ekstrakata bili su CBDA i CBD, praćeni manje zastupljenim CBCA, CBC, THCA-A, THC, CBGA, CBG, CBDVA, dok CBN i THCVA nisu detektirani. sCO₂ ekstrakt dobiven pri tlaku 320 bara i temperaturi 40 °C, s najvećim sadržajem CBDA, imao je najbolja antioksidacijska svojstva. Svi ekstrakti su pokazali dobro antibakterijsko djelovanje na vrste *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus*. sCO₂ ekstrakt s najvećim udjelom CBD-a, koji sadrži i visok udio α-pinena, β-pinena, β-mircena i limonena, pokazao je najbolje antibakterijsko djelovanje. Uspostavljeni su optimalni uvjeti za sCO₂ ekstrakciju kanabinoida i terpena iz industrijske konoplje. Temperatura od 60 °C pokazala se optimalnom za sve ispitivane odzive, dok je tlak pokazao različit učinak ovisno o ciljanim spojevima. Za monoterpe optimalan je bio niži tlak, dok je viši tlak bio pogodan za ekstrakciju seskviterpena. Primjena viših tlakova bila je poželjna i za ekstrakciju CBD-a. Postupkom dekarboksilacije kao predtretmana biljnog materijala prije sCO₂ ekstrakcije dobiveni su ekstrakti s visokim prinosom CBD-a kao dominantnom sastavnicom.

Zaključak: Optimiran je proces sCO₂ ekstrakcije za dobivanje ekstrakata industrijske konoplje s antioksidacijskim i antibakterijskim svojstvima te potencijalom topikalne primjene u medicinske i kozmetičke svrhe. Istraživanje je potvrdilo selektivnost primijenjene tehnike za ekstrakciju ciljanih terpena i kanabinoida iz cvatova industrijske konoplje.

Ključne riječi: industrijska konoplja, superkrična CO₂ ekstrakcija, CBD, kanabinoidi, terpeni, topikalna primjena

SUMMARY

The objective of the research: To define the optimal conditions for isolation of cannabinoids and terpenes from industrial hemp inflorescences by applying "green" supercritical carbon dioxide extraction (sCO₂); to quantify the obtained extracts on the content of cannabinoids and terpenes; and to determine the antioxidant and antimicrobial activities of sCO₂ extracts.

Material and methods: Dried inflorescences of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) of Croatia-grown Futura 75 variety were used for the research. Extraction of target bioactive compounds using sCO₂ was carried out. The experimental matrix was made according to the central composite design, and the analysis of variance was used to assess the degree of accuracy of the applied methodology. Identification and quantification of volatile compounds of sCO₂ extracts was determined by gas chromatography-mass spectrometry combined system (GC-MS), while cannabinoids were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD). The antioxidant properties of the obtained extracts were determined by a DPPH scavenging assay, while antibacterial activity was tested by a microdilution method for the determination of minimal inhibitory concentrations.

Results: Analysis with gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) showed β -myrcene chemotype in sCO₂ extracts, with a high content of α -pinene and β -pinene and a number of other monoterpenes in smaller proportions, while the most dominant sesquiterpene was β -caryophyllene. The main cannabinoids of sCO₂ extracts were CBDA and CBD, followed by less common CBCA, CBC, THCA, THC, CBGA, CBG, and CBDVA, while CBN and THCVA were not detected. sCO₂ extract obtained at a pressure of 320 bar and a temperature of 40 °C, with the highest CBDA content, exhibited the best antioxidant properties. All extracts exhibited good antibacterial effect against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *S. aureus*. sCO₂ extract with the highest content of CBD, which also contains a high content of α -pinene, β -pinene, β -myrcene and limonene, showed the best antibacterial activity. Optimal conditions have been established for the sCO₂ extraction of cannabinoids and terpenes from industrial hemp. The temperature of 60 °C proved to be optimal for all studied responses, while pressure had a different effect depending on the compounds targeted. For monoterpenes, lower pressure was optimal, while higher pressure was suitable for the extraction of sesquiterpenes. The application of higher pressures was also desirable for CBD extraction. By using decarboxylation as a pretreatment of plant material before sCO₂ extraction, extracts with a high yield of CBD were obtained.

Conclusion: sCO₂ extraction process for obtaining industrial hemp extracts with antioxidant and antibacterial activities and with the potential of topical application for medical and cosmetic purposes has been optimized. The provided research confirmed the selectivity of the applied technique for the extraction of targeted terpenes and cannabinoids from industrial hemp inflorescences.

Keywords: industrial hemp, supercritical CO₂ extraction, CBD, cannabinoids, terpenes, topical use

Sadržaj

1.	UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1.	Industrijska konoplja.....	2
1.2.	Bioaktivne sastavnice konoplje.....	4
1.2.1.	Kanabinoidi.....	5
1.2.2.	Terpeni.....	8
1.3.	Topikalna primjena konoplje	11
1.4.	Ekstrakcija superkritičnim CO ₂	13
1.5.	Potencijalna primjena sCO ₂ ekstrakata u kozmetičkim pripravcima	19
1.5.1.	Prednosti i izazovi inkorporiranja sCO ₂ ekstrakata u kozmetičke proizvode.....	20
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA	22
3.1.	Biljni materijal	23
3.2.	Kemikalije i standardi.....	24
3.3.	Ekstrakcija superkritičnim CO ₂	25
3.3.1.	Predtretman uzorka dekarboksilacijom	27
3.4.	Fitokemijska analiza CO ₂ ekstrakata	27
3.4.1.	GC-MS analiza isparljivih sastavnica sCO ₂ ekstrakata	27
3.4.2.	HPLC analiza kanabinoida u sCO ₂ ekstraktima	29
3.5.	Biološki učinci sCO ₂ ekstrakata.....	31
3.5.1.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	31
3.5.2.	Određivanje antibakterijske aktivnosti.....	31
3.6.	Optimizacija procesa ekstrakcije i statistička analiza	35
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	36
4.1.	Ekstrakcija bioaktivnih sastavnica industrijske konoplje superkritičnim CO ₂	36
4.1.1.	Utjecaj tlaka i temperature na prinos ekstrakcije.....	37
4.1.2.	Utjecaj tlaka i temperature na udio terpena u sCO ₂ ekstraktima.....	42
4.1.3.	Utjecaj tlaka i temperature na kanabinoide u sCO ₂ ekstraktima.....	53
4.2.	Antioksidacijska i antibakterijska aktivnost sCO ₂ ekstrakata	58
4.3.	Optimizacija procesa sCO ₂ ekstrakcije	63
4.4.	Utjecaj predtretmana dekarboksilacijom na sastav sCO ₂ ekstrakta	65
5.	ZAKLJUČAK	69
6.	LITERATURA	70
7.	ŽIVOTOPIS	79

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Prirodni produkti su sve traženiji u dermatologiji i kozmetologiji iz razloga održivosti i zaštite okoliša. Također mogu doprinijeti poboljšanju ishoda liječenja kroničnih kožnih bolesti i u njezi kože. Jedna od biljaka, koja je i predmet ovog istraživanja, a čija se ljekovita svojstva polako otkrivaju je industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.). Glavne sastavnice ove biljne vrste su kanabinoidi i terpeni, a najzastupljeniji su u cvatovima. Industrijska konoplja, za razliku od medicinske konoplje, sadrži manje od 0,3% psihoaktivnog kanabinoida tetrahidrokanabinola (THC), dok su ostali nepsihoaktivni kanabinoidi prisutni u značajno većem udjelu (1).

Industrijska konoplja danas predstavlja obećavajući obnovljivi resurs, koji nema samo potencijal primjene u izradi tekstila, papira ili biogoriva, već i u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (2). Stoga izrada visokovrijednih ekstrakata s definiranim sastavom željenih bioaktivnih tvari ima sve veću važnost. Današnja znanstvena istraživanja su u velikoj mjeri usmjerena na iznalaženje ekološki prihvatljivih zelenih metoda ekstrakcije, izolacije i pročišćavanja kanabinoida te razvoj metoda za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Ekološke zahtjeve suvremene proizvodnje biljnih ekstrakata za medicinsku i kozmetičku primjenu gotovo u potpunosti zadovoljava ekstrakcija ugljikovim dioksidom u superkritičnom stanju (sCO₂) jer predstavlja "čistu tehnologiju" bez sekundarnih proizvoda štetnih za zdravlje i okoliš. sCO₂ ekstrakti industrijske konoplje bogati terpenima i/ili kanabinoidima bez psihoaktivnog djelovanja imaju veliki potencijal primjene u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Istražuje se blagotvorno djelovanje kanabinoida na koži te mogućnost njihovog terapijskog učinka kod različitih kožnih bolesti poput ekcema, akni, svrbeža kože, sistemske skleroze i alopecije (3, 4). Među kanabinoidima se ističe kanabidiol (CBD) koji se već nalazi u brojnim topikalnim pripravcima, a pripisuje mu se antioksidacijsko, protuupalno i analgetsko djelovanje te povoljan učinak na smanjenje bora i hidratiziranje kože (5).

Predloženim istraživanjem optimirat će se postupak sCO₂ ekstrakcije za dobivanje medicinski prihvatljivih ekstrakata industrijske konoplje koja predstavlja obećavajući obnovljivi resurs s aspekta održivog razvoja. Taj bi se zeleni tehnološki postupak mogao implementirati u

proizvodni sustav za ekstrakciju kanabinoida i terpena, s ciljem njihove topikalne primjene u medicinske i kozmetičke svrhe.

1.1. Industrijska konoplja

Cannabis sativa L. (konoplja) jedna je od najkontroverznijih biljaka današnjice vezano za mogućnost zlouporabe njezinih psihoaktivnih svojstava, a s druge strane, konoplja ima veliki potencijal primjene u različitim industrijama. Jedina je vrsta roda *Cannabis* unutar porodice Cannabaceae. U literaturi se razlikuju podvrste i varijeteti ove vrste kao što su indijska, industrijska (Slika 1) i ruderalna konoplja, međutim, danas se konoplja kategorizira i prema fitokemijskom profilu, ponajviše prema udjelu kanabinoida (6).



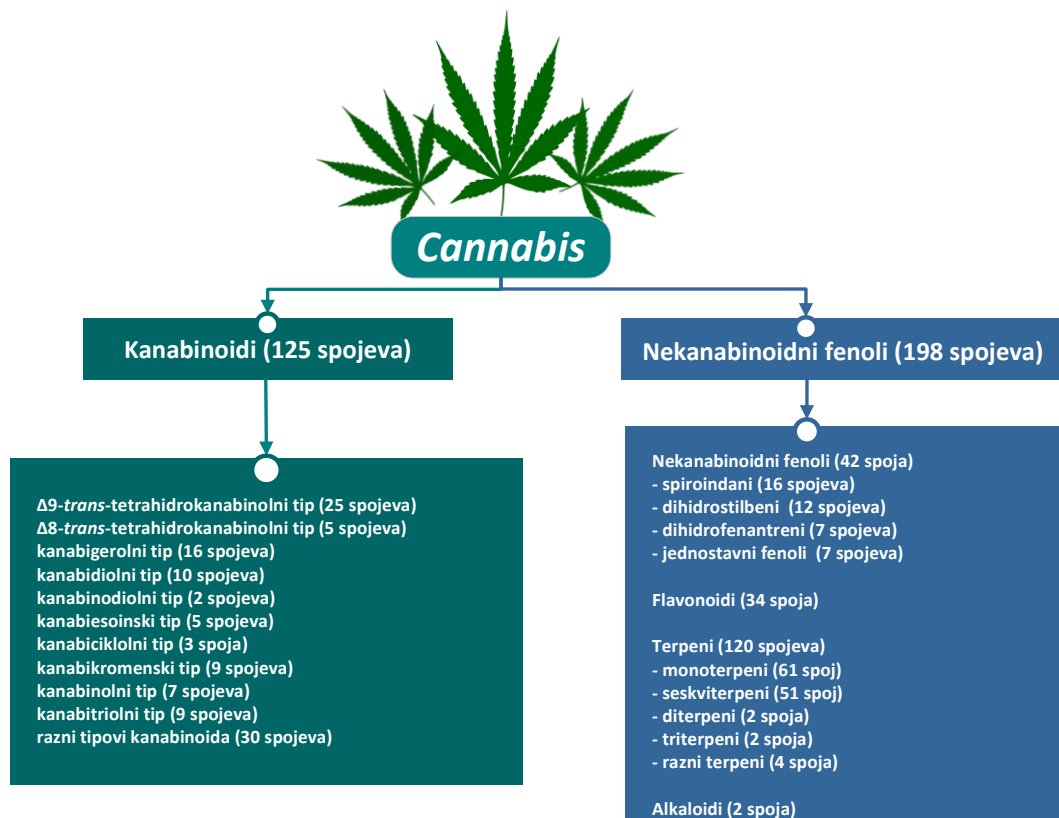
Slika 1. Industrijska konoplja (Izvor: autor)

Prema važećem zakonu Republike Hrvatske „Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga” (7) industrijska konoplja se definira kao konoplja (*Cannabis sativa* L.) s ukupnim sadržajem THC-a 0,2 % i manjim čije sorte se nalaze na Zajedničkoj sortnoj listi Europske unije i nije uvrštena u Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga. Ovim zakonom omogućuje se korištenje cijele biljke, a konoplja se može uzgajati i proizvoditi i u medicinske svrhe, uz odobrenje ministarstva nadležnog za zdravstvo na temelju podnesenog zahtjeva pravne osobe koja ima proizvodnu dozvolu Agencije za lijekove i medicinske proizvode za proizvodnju lijeka ili djelatne tvari sukladno Zakonu o lijekovima (NN, 39/19). Stoga se industrijska konoplja smatra legalnom biljkom koja je pod pojačanim nadzorom i kontrolama. Upotrebljava se za proizvodnju raznih prerađevina kao što su odjeća, konopci, papir, građevinski materijal, razna platna i tkanine, te gorivo. U Hrvatskoj se posljednjih godina uzgajaju sljedeće sorte: Santhica 27, KC Dora, Fedora 19, Felina 32, Finola, Futura 75, USO 31 i Monoica (8).

Vrsta *Cannabis sativa* ima vrlo dugu tradiciju primjene u liječenju. Medicinska uporaba konoplje u Europi počela je sredinom 19. stoljeća, u Engleskoj i Francuskoj, odakle se proširila na cijelu Europu i Sjevernu Ameriku. Američka farmakopeja uvodi monografiju o konoplji 1850. godine, dok je Britanska farmakopeja predstavlja nešto kasnije, 1888. godine. U drugoj polovici 19. stoljeća objavljeno je preko 100 znanstvenih radova o terapijskoj vrijednosti konoplje. Početkom 20. stoljeća razvijeni su prvi farmaceutski pripravci, ekstrakti i tinkture na bazi konoplje. Sajusova analitička ciklopedija praktične medicine (1924) navodi primjenu konoplje kao sedativa ili hipnotika kod nesanice, melankolije i bjesnoće, kao analgetika kod migrene, raka, neuralgije, čira na želucu, dismenoreje i reume, ali i za poboljšanje apetita, kod dispepsije, proljeva, kolere, nefritisa i vrtoglavice. Monografija konoplje izostavljena je iz Britanske farmakopeje 1932. godine, a iz Američke farmakopeje 1941. godine (9).

1.2. Bioaktivne sastavnice konoplje

Zanimanje za bioaktivne sastavnice konoplje u stalnom je porastu nakon otkrića jedinstvene skupine spojeva - fitokanabinoida. Najmanje 90 fitokanabinoida izolirano je iz konoplje i karakterizirano u ranim 1940-im. Važan pomak napravljen je 1964. godine kada je Raphael Mechoulam izolirao i po prvi put karakterizirao tetrahidrokanabinol (THC) kao glavnu psihoaktivnu sastavnicu. Osim kanabinoida, koji su najpoznatiji i najproučavaniji spojevi, konoplja biosintetizira i druge sekundarne metabolite kao što su terpeni, ugljikovodici, dušikovi spojevi, ugljikohidrati, flavonoidi, masne kiseline, nekanabinoidni fenoli (Slika 2), jednostavni alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline, esteri, laktani i druge (10). Razlika u kemijskom sastavu industrijske i medicinske konoplje je u sadržaju pojedinih kanabinoida (11).



Slika 2. Glavne bioaktivne sastavnice konoplje (12)

Nekanabinoidni fenoli podijeljeni su u sljedeće grupe:

1. Spiroindanska grupa: kanabispiran, izokanabispiran i drugi;
2. Dihidrostilbenska grupa: kanabistilben I i II;

3. Dihidrofenantrenska grupa: kanitren 1 i 2;
4. Fenil-metil eteri i fenolni glikozidi: floriglucinol glikozid (10, 12).

Flavonoidi konoplje se svrstavaju u skupine flavona i flavonola. U cvatu su prisutni flavoni kanaflavin A i B koji imaju snažno antioksidacijsko djelovanje i protuupalni učinak kroz inhibiciju sinteze prostaglandina E2 (13). Ostali zastupljeni spojevi su apigenin, luteolin, kaempferol, kvercetin (14, 15). Flavoni i flavonoli konoplje imaju širok raspon bioloških učinaka od kojih su najznačajnija protuupalna, antikancerogena i neuroprotektivna svojstva (16, 17). Pored navedenog, pokazalo se da flavonoidi utječu na farmakokinetiku THC-a (18, 19).

Dva alkaloida iz skupine spermidina su također detektirana (kanabisativ i anhidrokanabisativ), kolin, muskarin, izoleucin, betain i neurin, amidi (*N-trans*-feruloiltiramin, *N-p*-kumaroiltiramin i *N-trans*-kafeoiltiliramin), lignanamidi (grosamid, kanabisin A, B, C i D), jednostavni amidi (piperidin, hordenin, metilalamin, etilamin i pirolidin), proteini (edestin, zeatin i zeatin nukleozid), enzimi (edestinaza, glukozidaza, polifenoloksidaza, peptidaza, peroksidaza i adenzin-5-fosfataza) i aminokiseline. Konoplja sadrži i niže alifatske alkohole (metanol, etanol, okt-1-en-3-ol), aldehide (acetaldehid, izobutiraldehid, pentanal), ketone (aceton, heptan-2-on, 2-metilhept-2-en-6-on) i kiseline (arabinska, azelaična, glukonska). Identificirani su i fitosteroli kempsterol, ergosterol, β -sitosterol i stigmasterol. Vitamin K je jedini vitamin koji se nalazi u konoplji. Od pigmenata prisutni su ksantofil i karoten, a od elemenata Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn i Hg (10).

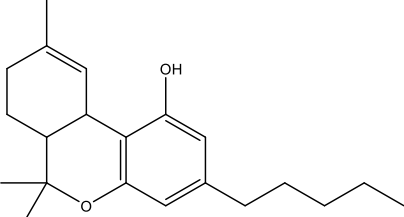
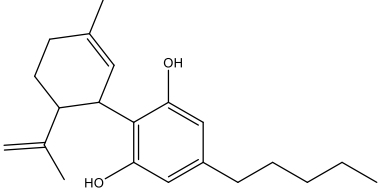
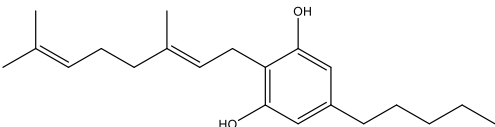
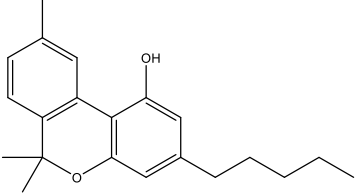
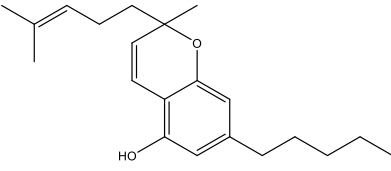
1.2.1. Kanabinoidi

Kanabinoidi se dijele na fitokanabinoide, endokanabinoide i sintetske kanabinoide (20). Endokanabinoidi su lipofilne molekule koje se sintetiziraju u organizmu te djeluju kao endogeni agonisti kanabinoidnih receptora, a dva glavna spoja te skupine su *N*-arahidonoiletanolamid (anandamid ili AEA) i 2-arahidonoilglicerol (2-AG) (21-23). Sintetski kanabinoidi podijeljeni su u šest skupina u koje je svrstano stotinjak spojeva (20). Fitokanabinoidi su specifični samo za konoplju i broje više od stotinu spojeva podijeljenih u 11 skupina:

1. Kanabigerolna skupina: kanabigerolna kiselina (GBGA), kanabigerol (GBG) i njegovi derivati;
2. Kanabikromenska grupa: kanabikromenska kiselina (CBCA), kanabikromen (CBC) i njegovi derivati;
3. Kanabidiolna grupa: kanabidiolna kiselina (CBDA), kanabidiol (CBD) i njegovi derivati;
4. Δ 9-tetrahidrokanabinolna grupa: Δ 9-tetrahidrokanabinolna kiselina (Δ 9-THCA, češće samo THCA), Δ 9-tetrahidrokanabinol (Δ 9-THC, češće samo THC) i njegovi derivati;
5. Δ 8-tetrahidrokanabinolna grupa: Δ 8-tetrahidrokanabinolna kiselina (Δ 8-THCA) i Δ 8-tetrahidrokanabinol (Δ 8-THC);
6. Kanabiciklolna grupa: kanabiciklolna kiselina (CBLA), kanabiciklol (CBL) i njegov derivat kanabiciklovarin (CBLV);
7. Kanabielzoinska grupa: kanabielzoinska kiselina (CBEA), kanabielzoin (CBE) i njegovi derivati;
8. Kanabinolna grupa: kanabinolna kiselina (CBNA), kanabinol (CBN) i njegovi derivati;
9. Kanabinodiolna grupa: kanabinodiol (CBND) i njegovi derivati;
10. Kanabitriolna grupa: kanabitriol (CBT) i njegovi derivati;
11. Kanabinoidi različite strukture (20, 24).

Glavni predstavnici fitokanabinoida su THC, CBD, CBG, CBN i CBC čije su strukture prikazane u Tablici 1. Hoće li se konoplja, primjerice, koristiti kao izvor vlakana ili će služiti u terapeutske svrhe ovisi o udjelima THC-a i CBD-a, kao važnih farmakološki aktivnih sastavnica. Za razliku od THC-a, CBD ne djeluje psihotropno. Navedene molekule nisu direktan produkt biosinteze u biljci, već odgovarajuće kiseline THCA i CBDA kao njihovi prekursori. Kemijska reakcija potaknuta toplinom dovodi do dekarboksilacije kiselina te nastaju odgovarajući dekarboksilirani neutralni oblici. Daljnjim procesima oksidacije nastaju drugi kanabinoidi poput CBN-a koji se stvara iz THC-a tijekom produljenog skladištenja. CBDA i THCA su glavne sastavnice u cvatovima konoplje, a druge manje zastupljene kiseline su CBCA, CBGA i CBNA (25).

Tablica 1. Strukture najzastupljenijih fitokanabinoida i njihovo djelovanje pri topikalnoj primjeni (25)

Kanabinoid	Biološki učinci pri topikalnoj primjeni
<p style="text-align: right;">THC</p> 	protuupalni antioksidacijski analgetski antikancerogeni antibakterijski
<p style="text-align: right;">CBD</p> 	antibakterijski antifungalni antioksidacijski fotoprotektivni smanjenje bora hidratacija kože
<p style="text-align: right;">CBG</p> 	analgetski antibakterijski antifungalni fotoprotektivni
<p style="text-align: right;">CBN</p> 	sedativni antibakterijski antioksidacijski fotoprotektivni
<p style="text-align: right;">CBC</p> 	protuupalni antibakterijski antifungalni fotoprotektivni

Kanabinoidi u ljudskom tijelu utječu na receptore CB1, koji se nalaze u našem živčanom sustavu, te receptore CB2 unutar imunskog sustava. Smatra se da imaju regulacijsku ulogu u raznim fiziološkim procesima poput apetita, osjeta boli, raspoloženja, pamćenja, upale, utjecaja na inzulin te na metabolizam masti i energiju (23, 26). Dekarboksilacijom THCA nastaje psihoaktivni THC koji pokazuje veći afinitet za receptor CB1 preko kojeg ostvaruje djelovanje na organizam. Osim što dolazi do vezanja na spomenute receptore, THC stupa i u mnoge druge molekularne interakcije te uzrokuje protuupalno, antikancerogeno, analgetsko,

neuro-antioksidacijsko i spazmolitičko djelovanje (26). THC uzrokuje i određene nuspojeve, poput anksioznosti, kolinergičkog deficita i smanjenja učinkovitosti imunskog sustava (19). Najzastupljeniji fitokanabinoid u industrijskoj konoplji je CBDA. Dekarboksilirani produkt CBD važan je spoj jer smanjuje nuspojave koje uzrokuje THC (27). U uvjetima *in vitro* i *in vivo* CBD je pokazao djelovanje protiv tjeskobe i mučnine te antioksidacijska, protuupalna i imunomodulacijska svojstva (28). Nadalje, pokazao se učinkovit u pretkliničkim modelima bolesti središnjeg živčanog sustava poput epilepsije, shizofrenije, neurodegenerativnih bolesti i multipleskleroze, ali i antibakterijsko i antifungalno djelovanje, posebice protiv meticilin rezistentne bakterije *Staphylococcus aureus* (29, 30). U industrijskoj konoplji udio CBD-a je nekoliko puta veći u odnosu na udio THC-a. Smatra se da je taj odnos dovoljan za antagoniziranje učinaka THC-a u organizmu (31). CBD djeluje antagonistički na CB1 receptor, odnosno kao inverzni agonist na CB2 receptora (22). US Food and drugs administration (FDA) je 2018. godine odobrila korištenje CBD-a u čistom obliku (lijek Epidiolex) za liječenje rijetkih oblika epilepsije, a odobrila ga je i Europska agencija za lijekove (13).

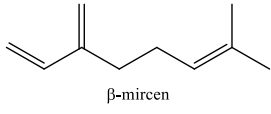
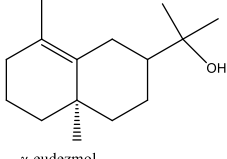
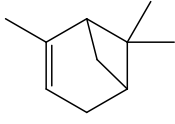
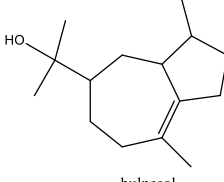
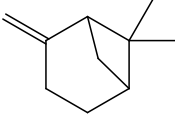
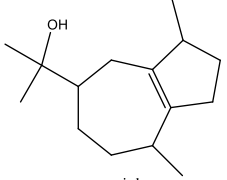
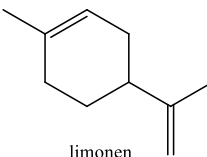
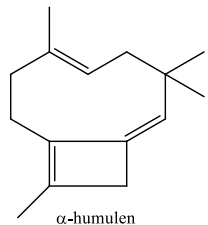
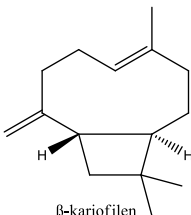
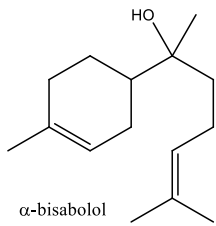
CBN je produkt razgradnje THC-a i agonist CB1 i CB2 receptora. Djeluje neuroprotektivno, protuupalno, analgetski, poboljšava kvalitetu sna te smanjuje očni tlak (32, 33). CBC pokazuje protuupalni, antikancerogeni, antikonvulzivni i antimikrobni učinak (34, 35). CBG je biosintetski prekursor CBC-a, CBD-a i THC-a. Ustanovljeno je da smanjuje očni tlak, poboljšava apetit, djeluje antiemetički, antioksidacijski, protuupalno, antitumorski, anksiolitički i neuroprotektivno (34, 36). Izomer THC-a, Δ^8 -THC, strukturno se razlikuje samo po položaju dvostruke veze u cikloheksanskom prstenu. Istraživanja upućuju na njegova antiemetička i antikancerogena svojstva (36, 37).

1.2.2. Terpeni

Osim kanabinoida, konoplja sadrži oko 140 različitih terpena koji su prvenstveno sastavnice eteričnog ulja. Terpeni konoplji daju njezin specifičan miris te pojačavaju njezina ljekovita svojstva, a dominantni spojevi su monoterpeni (38). Prema Novak i sur. (39) najzastupljeniji monoterpeni su mircen (21,1-35,0 %), α -pinen (7,2-14,6 %), α -terpinolen (7,0-16,6 %), *trans*-

kariofilen (12,2-18,9 %) i α -humulen (6,7-8,7 %). Njihovi udjeli u eteričnom ulju uvelike ovise o provedenom procesu izolacije eteričnog ulja, o uvjetima okoliša u kojem raste biljka, sorti konoplje te o njenom stupnju zrelosti (10). Strukture najzastupljenijih terpena u konoplji te njihovi biološki učinci pri topikalnoj primjeni prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Strukture najzastupljenijih terpena i njihovo djelovanje pri topikalnoj primjeni (38)

Terpen	Biološki učinci pri topikalnoj primjeni	Terpen	Biološki učinci pri topikalnoj primjeni
 <p>β-mircen</p>	antiseptički antioksidacijski antibakterijski antifungalni pojačavanje transdermalne apsorpcije	 <p>γ-eudezmol</p>	antitumorski (protiv melanoma)
 <p>α-pinen</p>	antiseptički analgetički antibakterijski antifungalni protuupalni	 <p>bulnesol</p>	antitusivni ekspektorirajući
 <p>β-pinen</p>	antiseptički analgetički antibakterijski antifungalni protuupalni	 <p>gvajol</p>	protuupalni antibakterijski antiparazitski antioksidacijski
 <p>limonen</p>	antibakterijski antifungalni antiproliferativni	 <p>α-humulen</p>	antibakterijski antioksidacijski antifungalni protuupalni
 <p>β-kariofilen</p>	analgetički protuupalno antioksidacijski antibakterijski antiproliferativni	 <p>α-bisabolol</p>	antioksidacijski protuupalni antimikrobni analgetski

α -Pinen i β -pinen su ciklički monoterpenski izomeri značajno zastupljeni i u vrstama roda *Pinus*. Kao inhibitor acetilkolinesteraze, α -pinen poboljšava kognitivne funkcije, osobito pamćenje. Limonen je monoterpen koji se nalazi ne samo u industrijskoj konoplji, već i u citrusima. Glavna je komponenta aromatičnih mirisa karakterističnih za četinjače i lisnato drveće. Nadalje, dodatak je prehrani i sastojak je mirisa u kozmetici i sredstvima za čišćenje. Posjeduje antioksidacijska i antikancerogena svojstva. Nakon udisanja vrlo brzo ulazi u krvotok. Pomaže u apsorpciji drugih terpena kroz kožu i druga tkiva u tijelu. Učinkovit je sastojak antifungalnih masti jer zaustavlja rast mnogih vrsta gljivica i bakterija. Mircen je glavna komponenta eteričnih ulja mnogih biljaka, uključujući i hmelj i konoplju. Ključna je komponenta za sintezu drugih monoterpena. On je antipsihotik, antioksidans i analgetik te djeluje protuupalno, sedativno, spazmolitički i antikancerogeno (40, 41).

Humulen je prirodni seskviterpen koji se nalaze u hmelju i konoplji, a prisutan je i u mnogim drugim biljkama, primjerice u klinčiću, bosiljku, mravincu, crnom papru i ružmarinu. Često se pojavljuje zajedno sa svojim izomerom β -kariofilenom. Upravo ova dva izomera konoplji daju karakterističan miris. β -Kariofilen, izomer humulena i biciklički seskviterpen, glavni je sastojak mnogih eteričnih ulja (klinčića, ružmarina, konoplje i hmelja). Jedini je terpen za koji se zna da djeluje na endokanabinoidni sustav, odnosno selektivno veže za CB2 receptor. Kariofilen ima gastroprotektivna, analgetska, antikancerogena, antifungalna, antibakterijska, antidepresivna, protuupalna, antiproliferativna, antioksidacijska i neuroprotektivna svojstva. Prisutnost β -kariofilena u mnogim eteričnim uljima značajno doprinosi njihovom antivirusnom učinku (38, 40). Bisabolol je prirodni monociklički seskviterpen slatkog i cvjetnog mirisa zbog kojeg se koristi u kozmetologiji. Pridonosi zacjeljivanju kože, ublažava iritaciju te posjeduje protuupalna i antimikrobna svojstva. Gvajol je seskviterpen koji se, osim u konoplji, nalazi u ulju čempresa i bora. Poznato je da ima protuupalna, analgetska, anksiolitička i diuretična svojstva te se primjenjuje kod artritisa, gihta i povišenog krvnog tlaka. U konoplji se nalaze i neki drugi važni terpeni kao što su selin-3,7(11)-dien i γ -selinen kojima nisu istraženi biološki učinci (38).

1.3. Topikalna primjena konoplje

Službeno odobravanje medicinske primjene konoplje (*Cannabis sativa* L.) i kanabinoida diljem svijeta potaknulo je istraživanja u području dermatologije i kozmetologije. Iako je topikalna primjena kanabinoida tek u početnoj fazi, evidentno raste interes za takvim pripravcima. Znanost još treba dati brojne odgovore o učinkovitosti kanabinoida i sigurnosti njihove primjene na koži, međutim, proizvodnja i primjena dermatoloških i kozmetičkih pripravaka svakodnevno raste (3). Nedavno je objavljeno istraživanje o učestalosti i razlozima topikalne primjene konoplje u kanadskoj populaciji. Topikalni pripravak je najmanje jednom koristilo 24,3 % ispitanika koji su anketirani. Najčešća dermatološka stanja uključivala su atopijski dermatitis (25 %), akne (19 %) i njegu kože protiv starenja (16 %), dok su ukočenost zglobova (30%), glavobolja i migrena (27%) bili najčešća nedermatološka stanja. Kreme (26 %) su bile najzastupljeniji oblik pripravaka na bazi konoplje (42).

U Tablici 3 su prikazane neke kožne bolesti koje su najčešće tretirane s kanabinoidima. Najčešći kanabinoid koji se koristi za topikalnu primjenu u različitim kožnim oboljenjima je CBD. Dokazano je da masti i kreme koji sadrže aktivne komponente konoplje imaju antibakterijsko djelovanje te ubrzavaju zacjeljivanje rana. Kanabinoidi se mogu apsorbirati kroz kožu te ostvariti protuupalni učinak. U koži postoji veliki broj kanabinoidnih receptora pa se kanabinoidi mogu primijeniti u liječenju nekih kožnih bolesti poput psorijaze, dermatitisa, osipa, rana i dr. Oláh i sur. (43) su u svojoj studiji pokazali učinak CBD-a u smanjenju proizvodnje sebuma, što ima povoljan učinak na akne. Topikalni pripravci na bazi CBD-a koriste se u standardnoj rutini njege kože zbog svojih antioksidacijskih svojstava koji dokazano pomažu u borbi protiv starenja.

Na osnovu zahtjeva Europskog udruženja industrijske konoplje (engl. *European Industrial Hemp Association* - EIHA) ukinute su zabrane za primjenu kanabinoida (pod Ref. II / 306: Narkotički proizvodi) te je CBD uključen u Međunarodnu nomenklaturu za kozmetičke sastojke (INCI) (44). No, prije negoli CBD postane pouzdana terapijska opcija, dermatolozi ističu da bi istraživanja trebala odgovoriti na pitanja o dozi CBD-a koja pomaže kod pojedinog kožnog

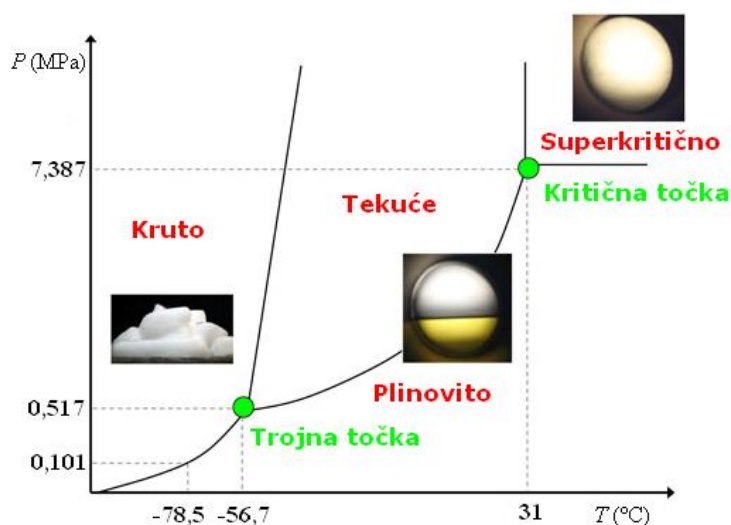
problema, interakcijama CBD-a s drugim lijekovima koje pacijent uzima i nuspojavama primjene CBD-a na kožu. S obzirom na sve navedeno postoji potreba za temeljitim istraživanjem prije nego što se kanabinoidi mogu smatrati sigurnim i učinkovitim terapijskim sredstvima za razne kožne bolesti (45, 46).

Tablica 3. Najčešće kožne bolesti tretirane kanabinoidima (odabrana istraživanja)

Bolest	Predloženi mehanizam	Kanabinoid ili receptor	Lit.
Akne	Smanjeni eritem i smanjena produkcija sebuma	CB1/2 receptor	(47)
	Inhibicija lipogenih spojeva, suzbijanje proliferacije sebocita, inhibicija upalnih putova	CBD	(43)
	Izmijenjena vijabilnost i apoptoza sebocita, smanjenje lipogeneze slične aknama uzrokovane arahidonskom kiselinom, protuupalna djelovanja	CBC, CBG, CBDV, CBGV, THCV	(48)
	Inhibicija ciklooksigenaze i lipoksigenaza (<i>in vivo</i> model)	THC, CBD	(49)
Atopijski dermatitis	THC smanjuje proizvodnju kemokinskog liganda 2 (CCL2) putem proizvodnje keratinocita i interferona-gama (IFN) u T-stanicama	CB1, CB2	(50)
	Mast obogaćena CBD-om (2 puta dnevno, 3 mjeseca) značajno poboljšava parametre kože bez nadražujuće ili alergijske reakcije	CBD	(51)
Pruritus (svrbež)	CB1 i CB2 agonisti smanjuju svrbež zbog ekspresije receptora na kožnim osjetilnim živčanim vlaknima, mastocitima i keratinocitima	CB1/2	(52)
Psorijaza	Atiproliferacijski i imunomodulacijski mehanizmi	THC, CBD, CBG, CBN	(53)
	Inhibicija širenja keratinocita	CBD	(51)
	Inhibicija širenja keratinocita	THC, CBD	(54)
Melanom	THC pokreće apoptozu stanica melanoma indukcijom autofagije	THC	(55)
Kaposijev sarkom	CBD inhibira proliferaciju i inducira apoptozu endotelnih stanica Kaposijevog sarkoma zaraženih virusom herpesa	CBD	(56)
Sistemska skleroza	Miješani CB1/CB2 agonist smanjuje abnormalne aktivnosti fibroblasta	CB1/CB2	(57)

1.4. Ekstrakcija superkritičnim CO₂

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (engl. *Supercritical fluid extraction* – SFE) ili, prema navodima nekih autora, superkritična ekstrakcija, koja kao najčešće otapalo koristi ugljikov dioksid (CO₂) u superkritičnom stanju (sCO₂) se sve više primjenjuje u svrhu izolacije kanabinoida i terpena iz medicinske i industrijske konoplje. To je postupak u kojem se prijenos tvari bazira na činjenici da CO₂ postaje izuzetno dobro otapalo za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke ili u superkritičnom području (Slika 3). Kritična temperatura i kritični tlak te kritična gustoća definiraju kritičnu točku neke čiste tvari koja predstavlja krajnju točku razdvajanja plinske i tekuće faze. Iznad ili ispod tih kritičnih svojstava ne mogu zasebno postojati ni tekuća ni plinovita faza, zbog čega superkritični fluidi imaju svojstva i plinova i tekućina (58).



Slika 3. Fazni dijagram (tlak - temperatura) za CO₂ (58)

Kao najpoželjnije otapalo u procesima superkritične ekstrakcije pokazao se CO₂ jer je neotrovan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama, kao i zbog toga što je ekološki prihvatljiv i generalno prihvaćen kao sigurno GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) otapalo. Superkritični CO₂ ima nisku kritičnu temperaturu (31,1 °C), što ga čini idealnim za ekstrakciju termolabilnih prirodnih produkata. Nadalje, ovaj način ekstrakcije ima mnoge druge prednosti u odnosu na postupak ekstrakcije organskim otapalima:

- Superkritični fluidi imaju sposobnost otapanja kao i organska otapala, ali s boljom difuzijom, nižom viskoznosti i manjom površinskom napetosti fluida.
- Razdvajanje ekstrakta od otapala je lako i brzo zbog mogućnosti reguliranja topljivosti komponenata promjenom tlaka ili temperature.
- Dodavanjem suotapala (metanola, etanola, vode i dr.) u CO₂, moguće je poboljšati topljivost polarnih komponenti čime se postiže veća selektivnost prilikom separacije.
- Nema zaostajanja otapala u ekstraktu dok je prilikom upotrebe organskih otapala to moguće.
- Ekstrahiranje termolabilnih komponenata s minimalnim promjenama.
- Ekstrahiranje komponenata visokih temperatura ključanja na relativno niskim temperaturama.
- sCO₂ je zelena ekstrakcija.
- sCO₂ ekstrakcija može se primijeniti na sustave različitog kapaciteta - od analitičkih, poluindustrijskih postrojenja do velikih industrijskih postrojenja (58, 59).

Zbog svega navedenog, sCO₂ ekstrakcijom iz biljnog materijala moguće je dobiti ekstrakte prirodnog sastava bez tragova organskih otapala u svom originalnom sastavu koji se najčešće mijenja kada se koriste klasični postupci ekstrakcije. Ova tehnika ekstrakcije omogućuje da se iz biljnog materijala dobiju eterična i biljna ulja, začini i aromatične komponente, kao i komponente s različitim biološki aktivnim svojstvima. Ekstraktibilnost spojeva sa sCO₂ ovisi o prisutnosti individualnih funkcionalnih skupina u tim spojevima, njihovoj molekularnoj masi i polarnosti. Budući da je CO₂ nepolaro otapalo, najbolju učinkovitost pokazuje u ekstrakciji nepolarnih ili slabo polarnih spojeva niže molekularne mase, dok su spojevi veće molekularne mase slabo topljivi u superkritičnim fluidima. Postoje određena pravila za topljivost pojedinih komponenti u superkritičnom CO₂:

- Kisikovi organski spojevi s niskom ili srednjom molekularnom masom (ketoni, esteri, alkoholi) vrlo su topljivi;

- Većina nepolarnih organskih komponenti niske molekularne mase (alkani, alkeni, terpeni) imaju dobru topivost;
- Polarne organske tvari (npr. karboksilne kiseline) su topljive ako imaju pogodne molekularne mase;
- Prisutnost polarnih skupina (karboksilna, hidroksilna) obično smanjuje topljivost sastojaka;
- Slobodne masne kiseline i njihovi gliceridi imaju slabu topljivost;
- Pigmenti su slabo topljivi;
- Voda ima slabu topljivost ($< 0,5 \% \text{ m/m}$) na temperaturama ispod $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (58, 59).

Topljivost polarnih komponenti u superkričnom CO_2 može se poboljšati dodatkom malih količina drugih polarnih tvari, tzv. suotapala (engl. *co-solvent*) te se na taj način povećava ekstraktibilnost u odnosu na ekstrakciju superkričnim fluidima bez suotapala. Suotapalo se odabire na osnovi njegove toksičnosti, cijene i konačne primjene ekstrakta te ovisno o spojevima koji se ekstrahiraju (58).

Općenito, proces sCO_2 ekstrakcije odvija se u pet uzastopnih faza (58):

1) difuzija sCO_2 do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje;



2) prodiranje i difuzija sCO_2 kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala;



3) kontakt sCO_2 s otopljenom tvari na površini neizreagirane jezgre i ekstrakcija otopljene tvari;



4) difuzija otopljene tvari u sCO_2 kroz sloj vanjskog sfernog omotača krutog inertnog materijala na vanjsku površinu čestice;



5) difuzija otopljene tvari u sCO_2 kroz film superkričnog fluida koji okružuje česticu u glavnu struju fluida.

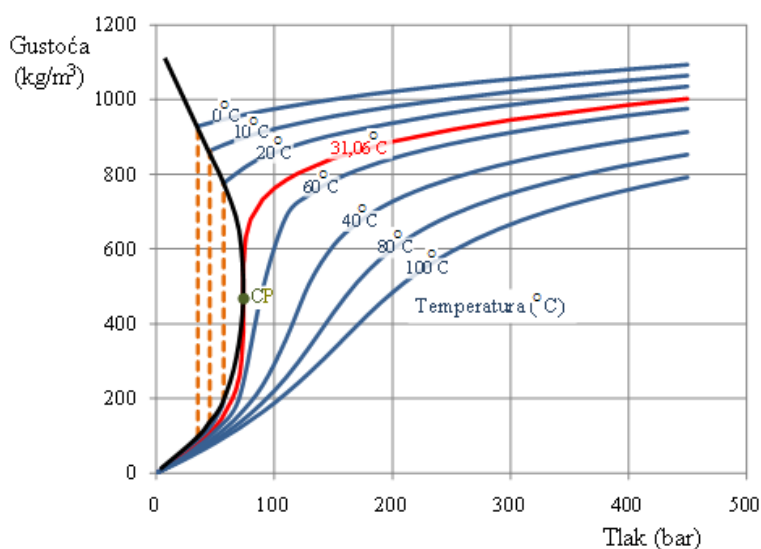


Mnogobrojni čimbenici utječu na proces ekstrakcije, a najznačajniji među njima su:

- tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije te protok otapala;
- gustoća, viskoznost i difuzivnost otapala i supstancije koja se ekstrahira;

- interakcije između molekula otapala, topljive komponente i netopljivog dijela krutog materijala (matriksa) u kome se nalazi topljiva komponenta, koje utječu na faznu ravnotežu i koeficijente difuzije;
- dodatak različitih suotapala;
- oblik, veličina i raspodjela veličina čestica materijala u sloju, poroznost čestica i
- poroznost sloja.

Od svega navedenog ipak se izdvajaju dva parametra s najvećim utjecajem, a to su tlak i temperatura ekstrakcije. S promjenom tlaka i temperature (promjena gustoće i dielektrične konstante) mijenja se sposobnost otapanja CO₂ u širokim granicama (Slika 4).



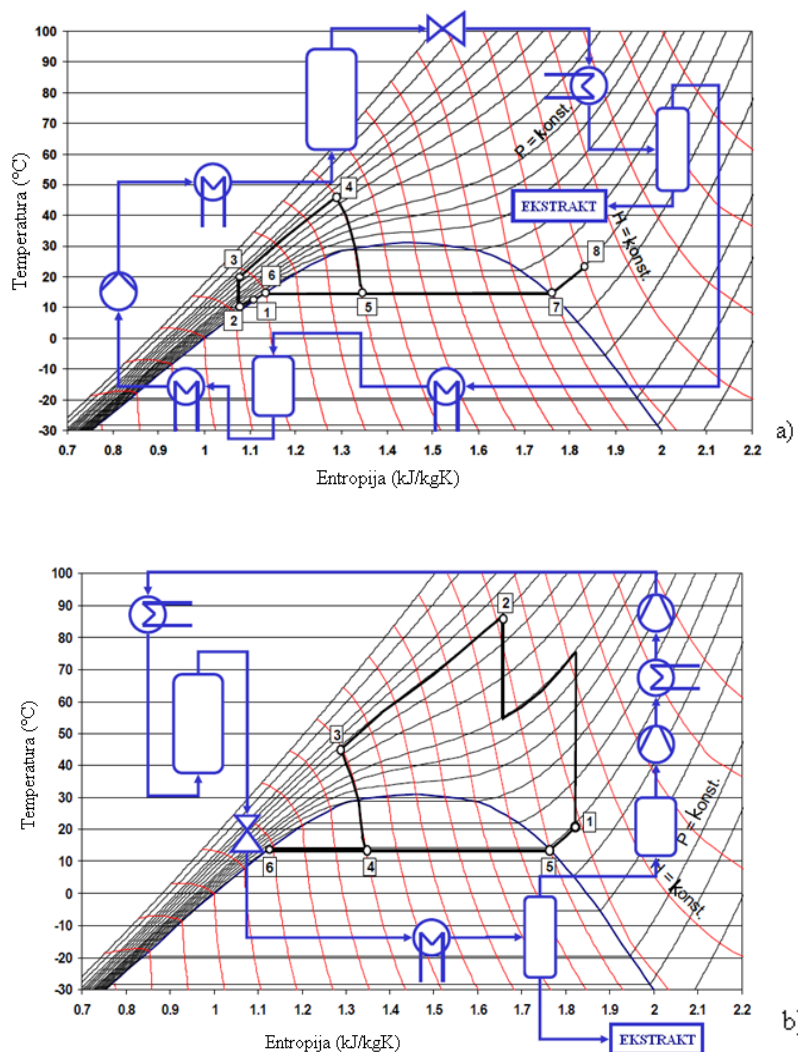
Slika 4. Ovisnost gustoće CO₂ o tlaku i temperaturi (58)

Principi na kojima se bazira ekstrakcija superkričnim fluidima su direktna korelacija topljivosti i gustoće utvrđene eksperimentima za superkrične fluide. Svaki plin iznad kritične točke pokazuje veliku promjenu gustoće (što osigurava selektivnost u ekstrakciji) povećanjem tlaka (iznad kritične temperature). Na taj način superkrični fluid postaje dobro otapalo za kompatibilne spojeve. Poslije faze otapanja, superkrični fluid se ponovno dovodi u stanje tlaka nižeg od kritičnog, pri kome djelomično ili u cjelini (selektivnost u raspodjeli) izgubi moć otapala i oslobodi dio ili cjelinu prethodno otopljene komponente.

Nedostatci sCO₂ ekstrakcije u usporedbi s drugim postupcima ekstrakcije su sljedeći:

- rad pri relativno visokim tlakovima;
- velik utrošak energije za komprimiranje plinova;
- složena regeneracija korištenih otapala → znatni energetske troškovi;
- veliki investicijski troškovi za procesnu opremu;
- kompleksnost procesa (58).

Princip sCO₂ ekstrakcije prikazan je na temperaturno-entropijskom dijagramu (Slika 5), a detaljno opisan u poglavlju 3.3. Ekstrakcija sCO₂ gdje je prikazana i procesna shema uređaja.



Slika 5. Dijagram temperatura-entropija za superkričnu ekstrakciju (58)

(a – Proces rada pumpe; b – Proces rada kompresorske jedinice)

Visokotlačna pumpa/kompresor komprimira CO₂ (koji se nalazi u spremniku) do željenog tlaka i dovodi ga u ekstraktor na njegovom dnu. U ekstraktoru se nalazi usitnjeni biljni materijal. On prelazi preko uzorka obavljajući ekstrakciju topljivih komponenti. Temperatura u ekstraktoru regulira se pomoću grijanog plašta i održava se konstantnom. Potom ekstrahirane komponente, nošene s CO₂, odlaze u separator gdje se pod sniženim tlakom i temperaturom provodi razdvajanje ekstrakta koji se skuplja na dnu separatora. Izdvojeni sCO₂ dalje se odvodi do kondenzatora u kojemu se vraća iz plinovitog u tekuće stanje. Iz kondenzatora se „pročišćeni“ CO₂ dalje odvodi u spremnik plina, odakle se ponovno koristi za iduću ekstrakciju. Ova tehnika ekstrakcije spada u najsuvremenije, najučinkovitije, ali i najskuplje postupke izolacije bioaktivnih komponenti iz prirodnih izvora. Dobivaju se vrlo čisti produkti jer je vrlo selektivan, provodi se na niskim temperaturama, bez mogućnosti kemijskih transformacija osjetljivih i nestabilnih komponenata, s potpunim uklanjanjem otapala. Stoga je ovaj način ekstrakcije od posebnog interesa za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Postoje slučajevi u kojima je primjena sCO₂ ekstrakcije mnogo ekonomičnija nego primjena nekog drugog klasičnog procesa, odnosno u slučaju kada potrebna investicijska ulaganja nisu glavni čimbenik u definiranju proizvodne cijene krajnjeg proizvoda. To je najčešće slučaj kod proizvodnje onih proizvoda koji imaju veliku vrijednost na tržištu ili tamo gdje su zakonski propisi (u pogledu zaštite životne sredine i zdravlja čovjeka) takvi da se u procesu ekstrakcije zahtijeva korištenje bezopasnog superkričnog otapala, ili gdje tržište zahtijeva proizvod izvrsne kvalitete koji se ne može dobiti bez primjene superkrične ekstrakcije (58).

Na osnovi navedenih činjenica jasno je da su najvažniji proizvodi koji su interesantni za tržište oni koji se dobivaju iz prirodnih sirovina i koji imaju potencijalnu primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Budući da se u sve većem broju zemalja zabranjuje uporaba organskih otapala u cilju zaštite životne sredine i krajnjeg potrošača, može se u budućnosti očekivati komercijalna primjena ovakvih procesa i u izolaciji kanabinoida i terpena iz medicinske i industrijske konoplje.

1.5. Potencijalna primjena sCO₂ ekstrakata u kozmetičkim pripravcima

Danas se kozmetička industrija suočava s raznolikim i svestranim tržištem koje naglo raste zbog značajnog interesa javnosti za prirodnu kozmetiku i sastojke biljnoga podrijetla. Nadalje, kozmetičko tržište pokreću inovacije znanstvene zajednice. Na konkurentnom globalnom tržištu uvijek se favorizira najjeftinija metoda za kozmetičke formulacije, a u većini slučajeva sintetski sastojci se biraju umjesto prirodnih. No, potrošači su sve bolje informirani o kozmetičkim sastojcima i preferiraju prirodne proizvode biljnoga podrijetla (60). Iako su postignuta znatna poboljšanja u pogledu sigurnosti kozmetičkih sastojaka, neki su još uvijek u kontroverzi, posebice paraben koji se koristi kao konzervans (61). Biljke predstavljaju najstariji izvor bioaktivnih spojeva s različitim biološkim svojstvima, uključujući: antioksidacijsko, antimikrobno, antienzimsko i protuupalno djelovanje. Štoviše, biljne sirovine su obično složena smjesa bioaktivnih spojeva, koji se ne mogu lako zamijeniti kemijski sintetiziranim analogima. Ti bioaktivni spojevi uključuju širok raspon kemijskih skupina kao što su fenolni spojevi (fenolne kiseline i flavonoidi), terpeni, steroidi, karotenoidi, steroli, steroidni saponini, masne kiseline, ugljikohidrati i peptidi. Za kozmetičku primjenu te spojeve je potrebno ekstrahirati odgovarajućim otapalom u odgovarajućoj količini, a nakon ekstrakcije otapalo treba potpuno ukloniti, bez tragova otapala u kozmetičkim sastojcima (62). Općenito, postupci ekstrakcije koji zahtijevaju korištenje velikih količina toksičnih organskih otapala, kao što su kloroform, diklormetan, dietil eter, tetraklorometan, metanol i dr., postaju polako pitanje prošlosti (63). Etanol ili njegove vodene otopine u različitim koncentracijama obično se koriste kao ekstrakcijska otapala u farmaceutskoj praksi, međutim, nakon ekstrakcije, uklanjanje etanola zahtijeva dodatne tehnološke operacije isparavanja ili sušenja (64). Stoga je briga o okolišu i zdravlju ljudi dovela upravo do razvoja novih tehnika ekstrakcije, kao što su sCO₂ ekstrakcija koje osiguravaju bolji prinos ekstrakcije, visoku kvalitetu ekstrakta, a provodi se na nižim temperaturama ekstrakcije tijekom kraćeg vremena. Štoviše, primjena superkritičnih tekućina često se povezuje s konceptima "zelene kemije", općenito priznate kao "sigurne" i "bez otapala" što te ekstrakte čini vrlo vrijednim u kozmetičkoj industriji (65). Ova tehnologija

je jedinstvena između ostalog i po svojoj selektivnosti. Nadalje, udovoljava zahtjevima organske kvalitete i strogim kriterijima kozmetičkih standarda, kao npr. BDIH (*Association of German Industries and Trading Firms*), COSMOS (*Cosmetics Organics and Natural Standard*), ICADA (*International Cosmetic and Devide Association*), NATRUE (*The International Natural and Organic Cosmetic Association*), NPA (*Natural Product Association*) i NSF/ANSI 305 (*American National Sanitation Foundation*). Prema zahtjevima ovih standarda, organski i prirodni kozmetički proizvodi se izrađuju od odabranih sastojaka/sirovina, uglavnom biljnoga podrijetla, koje su obrađene dozvoljenim postupcima. Brojna istraživanja ukazuju da prirodne sirovine zaslužuju mnogo više pažnje u toksikološkom smislu, kako bi se utvrdilo jesu li sigurne. Sigurnost, učinkovitost i kvaliteta kozmetičkih proizvoda moraju biti na prvom mjestu (66). Iz perspektive okoliša, već je spomenuto u prethodnom poglavlju da sCO₂ ekstrakcija proizvodi u osnovi ekstrakte bez otapala i istovremeno osigurava da se i one termički osjetljive komponente očuvaju. Štoviše, sCO₂ kao otapalo može se lako i potpuno ukloniti iz ekstrakta (67). Kako kozmetički segment sa sastojcima biljnoga podrijetla pokazuje sve veći tržišni rast, kozmetička industrija je prisiljena razvijati više proizvoda biljnog porijekla koji će moći zamijeniti sintetske kemikalije. sCO₂ definitivno može ispuniti ta očekivanja. Za ovu tehnologiju zelene ekstrakcije predložene su različite primjene i to u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (65, 68). Nasuprot tome, malo je pozornosti posvećeno blagotvornim učincima inkorporiranja sCO₂ ekstrakata u kozmetičke proizvode. Stoga su znanstvene studije koje se temelje na razvoju, evaluaciji i primjeni sCO₂ ekstrakata u topikalnim formulacijama i istovremeno zadovoljavanje potrošača izazov.

1.5.1. Prednosti i izazovi inkorporiranja sCO₂ ekstrakata u kozmetičke proizvode

COSMOS kao međunarodna norma za prirodnu i organsku kozmetiku definira dopuštene sastojke kozmetičkog proizvoda i ambalaže, uzimajući u obzir ukupni utjecaj proizvoda na ljude i okoliš (69). Zakonom je propisano da se ekstrakti biljnoga podrijetla mogu proizvoditi s bilo kojim oblicima vode ili s otapalom biljnoga podrijetla, kao što su: etilni alkohol, glicerol, biljna ulja, med i sCO₂. Ako je potrebna upotreba organskih otapala, otapalo treba potpuno ukloniti

iz konačnog proizvoda. Zabranjena je također uporaba aromatskih, alkoksiliranih, halogeniranih otapala na bazi dušika ili sumpora (70). No, inkorporacija sCO₂ ekstrakata u komercijalne kozmetičke proizvode složeno je pitanje, ponajviše zbog visokih investicijskih troškova cijene samih uređaja tj. sCO₂ ekstraktora. Štoviše, proizvode koji se sastoje od sCO₂ ekstrakta treba pripremati u skladu sa skupom pravila i već spomenutim kozmetičkim standardima. S druge strane, kozmetički proizvodi se lako mogu staviti na tržište jer se smatraju sigurnima i netoksičnim. Komercijalno dostupna baza podataka za kozmetičke sastojke (71) navela je 67 proizvoda koji se podudaraju s pretraživanjem po ključnim riječima "superkritičan", "sCO₂ ekstrakt" i "superkritični CO₂ ekstrakt" pri čemu je većina njih biljnoga podrijetla, a ostali su alge ili proizvodi fermentacijske tehnologije. Nadalje, postoji nekoliko studija u kojima je sCO₂ implementiran u kozmetičke formulacije (72-77), što sugerira da je ekstrakcija sCO₂ pouzdana tehnika za moguću primjenu u kozmetičkoj industriji.

Prema već spomenutoj zakonskoj regulativi, koja ne obvezuje proizvođače da specificiraju tehniku ekstrakcije na gotovim proizvodima, teško je procijeniti prisutnost sCO₂ ekstrakata na tržištu. No, imajući u vidu sve navedene prednosti sCO₂ ekstrakcije, očekuje se da će u skoroj budućnosti ova zelena tehnologija biti sve više zastupljena u komercijalnim kozmetičkim proizvodima. Ljekovito bilje nudi potencijalne sastojke za kozmetičke formulacije, a u kombinaciji znanosti i tehnologije moguće je otkriti i bolje razumjeti njihovo djelovanje. No, postoji opasnost od gubitka biološke raznolikosti uslijed klimatskih promjena koje mogu brzo utjecati na dostupnost biljaka i njihovih bioaktivnih spojeva (78).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Opći cilj ovog specijalističkog rada je optimirati postupak ekstrakcije superkričnim CO₂ (sCO₂) za dobivanje medicinski prihvatljivih ekstrakata industrijske konoplje koja predstavlja obećavajući obnovljivi resurs s aspekta održivog razvoja.

Specifični ciljevi su:

- a) provesti ekstrakciju bioaktivnih sastavnica iz cvatova industrijske konoplje primjenom sCO₂ te pri tome ispitati utjecaj parametara ekstrakcije (tlaka i temperature) na iskorištenje ekstrakcije i udio ciljanih bioaktivnih sastavnica u dobivenim ekstraktima;
- b) identificirati i kvantificirati dobivene ekstrakte s obzirom na udio kanabinoida primjenom visoko djelotvorne tekućinske kromatografije sa detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD) i terpena u vezanom sustavu plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS);
- c) odrediti antioksidacijske i antimikrobne učinke sCO₂ ekstrakata;
- d) statistički obraditi eksperimentalno dobivene podatke i definirati optimalne uvjete izolacije kanabinoida i terpena iz cvata industrijske konoplje primjenom "zelene" ekstrakcije (sCO₂) i metode odzivnih površina (korištenjem programa *Design Expert*[®]).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Osušeni cvatući vršni dijelovi industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.) sorte Futura 75 (Slika 6) s hrvatskog tržišta (Hemp Agro d.o.o., Selci, Hrvatska) prikupljeni 2021. godine koristili su se u ovom istraživanju. Podaci o samom uzorku su sljedeći:

- Majka uzgojena iz sjemena C S1545 E947550;
- Klonovi skidani u veljači 2021.;
- Sadnja 02. 05. 2021.;
- Branje 15. 10. 2021.;
- Obradivanje trimerima 25. 10. 2021.;
- Cvat spreman za ekstrakciju 10. 11. 2021.



Slika 6. Uzorak industrijske konoplje (Izvor: autor)

Priprema materijala za ekstrakciju obuhvatila je usitnjavanje (mljevenje) u laboratorijskom mlinu (MRC Sample mill C-SM/450-C, Holon, Izrael), klasiranje prosijavanjem na standardnoj seriji sita (Retsch AS 200, Njemačka) te utvrđivanje raspodjele veličine čestica prema prethodno opisanoj metodi (79). Inicijalni udio vlage u uzorku bio je 8,38 %.

3.2. Kemikalije i standardi

Superkritična CO₂ ekstrakcija provedena je primjenom CO₂ čistoće 99,97 % proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska). Pri HPLC analizi za pripremu mobilnih faza korišten je metanol HPLC čistoće Baker J.T. (Gliwice, Poljska), acetonitril HPLC čistoće Baker J.T. (Gliwice, Poljska), miliQ voda (Milipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka) i mravlja kiselina 98-100 % (Fisher Scientific, Loughborough, UK). Za usporedbu dobivenih rezultata korišteni su standardi kanabidiola (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,6 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka) i kanabidiolne kiseline (100 µg/mL u metanolu, čistoće 98,3 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka), kanabidivarinska kiselina (100 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,9 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka), kanabidiolna kiselina, (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,3 %) Cerilliant Corporation (Texas, SAD), kanabigerolna kiselina (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,3 %) Cerilliant Corporation (Texas, SAD), tetrahidrokanabivarinska kiselina (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 99,2 %), Cerilliant Corporation (Texas, SAD), tetrahidrokanabinolna kiselina (500 µg/mL u acetonitrilu, čistoće 98,5 %) Cerilliant Corporation (Texas, SAD), kanabinol (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,6 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka), kanabikromen (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,0 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka), kanabigerol (100 µg/mL u metanolu, čistoće 99,0 %), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka), i (-)-delta9-THC otopina 1,0 mg/mL u metanolu čistoće 99,2 %, Cerilliant Corporation (Texas, SAD).

Određivanje retencijskih indeksa isparljivih spojeva plinskom kromatografijom provedeno je primjenom smjese alkana C₉-C₂₅ proizvođača Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Njemačka). Za pripremu uzoraka za GC-MS analizu korišten je heksan, HPLC čistoće, Carlo Erba Reagents (Val de Reuil Cedex, Francuska).

U svrhu bioloških istraživanja korišteni su:

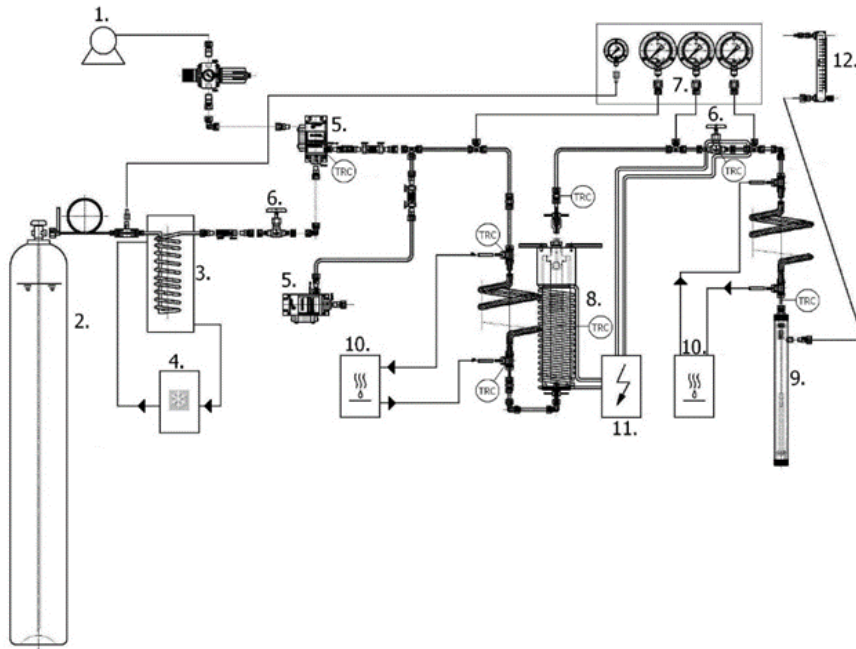
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Folin-Ciocalteu reagens, Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka),
- Müller Hintonov (MH) bujon (Fluka, BioChemica, Njemačka),

- gentamicin (BioChemica, Njemačka),
- bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*) su prikupljene iz različitih kliničkih uzoraka dobivenih iz Službe za mikrobiologiju Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Hrvatska,
- 2,3,5 - trifeniltetrazolij klorid (TTC) (VWR Chemicals, Leuven, Belgija),
- ekstrakt kvasca (Biolife Italiana, Milano, Italija),
- tehnički agar (Biolife Italiana, Milano, Italija),
- glicerol (Honeywell Riedel-de Haën, Seelze, Njemačka),
- 0,25M otopina PBS-a (fosfatni pufer, engl. *phosphate buffer saline*) podešene pH vrijednosti na 7,4 (VWR Chemicals, Leuven, Belgija).

3.3. Ekstrakcija superkričnim CO₂

Ekstrakcija biljnog materijala superkričnim CO₂ (sCO₂) provedena je u laboratorijskom uređaju za superkričnu ekstrakciju (Slika 7) koji je konstruiran na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek i detaljno opisan u doktorskoj disertaciji (80). Materijali korišteni za izradu ovog sustava su nehrđajući čelici AISI 316Ti i AISI 304. Svi dodatni priključni dijelovi za cijevi su također iste kvalitete materijala. Ekstraktor je vanjskog promjera 100 mm i visine 500 mm, a separator dimenzija Ø 50 x 5 mm. Tijekom postupka ekstrakcije, komprimirani CO₂ uveden je u ekstraktor pomoću visokotlačne pumpe (Haskel® MS-71), uz prethodno pothlađivanje na -5 °C pomoću rashladne kupelji punjene smjesom etilen glikol/etanol. Pomoću istostrujnog izmjenjivača topline stlačeni CO₂ zagrijavan je na željenu temperaturu ekstrakcije i uveden u ekstraktor u kojem se nalazio suhi materijal (usitnjeni cvatovi industrijske konoplje). Ekstraktor je zagrijavan pomoću centraliziranog sustava grijača na željenu temperaturu ekstrakcije. Mjerenje i regulacija temperature ekstraktora praćena je pomoću integriranog senzora temperature unutar ekstraktora i dodatnog senzora temperature koji mjeri temperaturu izlaznog plina. Nakon ekstraktora zadani tlak pri kojem se provodila ekstrakcija snižen je pomoću visokotlačnog ventila (B-HV) na željeni tlak u separatoru od 1,5 MPa. Ekstrakt je od

otapala odvojen u separatoru. Ventil i cijevi do separatora zagrijavani su na temperaturu 0 °C da bi se spriječilo stvaranje leda ili suhog leda unutar cijevi zbog velikog pada tlaka.



Slika 7. Shematski prikaz uređaja za superkričnu ekstrakciju (80)

1. Kompresor; 2. CO₂ spremnik; 3. Izmjenjivač toplote od nehrđajućeg čelika; 4. Rashladna kupelj; 5. Zrakom pogonjena hidraulična pumpa Haskel MS-71; 6. Ventili (B-HV); 7. Manometri; 8. Ekstraktor; 9. Separator; 10. Vodena kupelj; 11. Centralizirani sustav grijača od staklenih vlakana; 12. Mjerač protoka

U svrhu optimiranja metode ekstrakcije ispitan je utjecaj dva najvažnija procesna parametra superkrične ekstrakcije (tlak i temperatura) na prinos i koncentraciju aktivnih sastojaka ekstrakta industrijske konoplje. Protok CO₂ kontroliran je pomoću mjerača protoka (Matheson FM-1050, E800) te je održavan konstantnim (1,4 kg/h) tijekom cijelog procesa. Odabrano je vrijeme ekstrakcije od 30 minuta jer se upravo to vrijeme u preliminarnim istraživanjima pokazalo kao optimalno vrijeme u kojemu se može dobiti puni prinos ekstrakcije. Masa samljevenog uzorka bila je konstantna (100 g) tijekom svih eksperimenata. Uvjeti sCO₂ ekstrakcije određeni su prema dizajnu centralnog kompozitnog plana pokusa (engl. *Central Composite Design*, CCD) i prikazani su u Tablici 4. Dobiveni ekstrakti su odmah analizirani (HPLC i GC/MS analize te biološka aktivnost).

Tablica 4. Kodirane i nekodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu procesa

Nezavisna varijabla	Oznaka	Razina				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
Tlak (bar)	X_1	78,6	120	220	320	361,4
Temperatura (°C)	X_2	35,8	40,0	50,0	60,0	64,1

3.3.1. Predtretman uzorka dekarboksilacijom

Radi usporedbe kemijskog sastava dobivenih sCO₂ ekstrakata prema CCD (Tablica 4) napravljena je dekarboksilacija uzoraka cvatova industrijske konoplje kao predtretman koji je prethodio sCO₂ ekstrakciji. Uzorci su se podvrgnuli sušenju u sušioniku (Thermo Scientific Heratherm) na 120 °C tijekom 30-45 minuta. Tako osušeni uzorci su usitnjeni i na njima je provedena sCO₂ ekstrakcija na temperaturi 60 °C te tlakovima od 130 i 290 bar (odabrani kao optimalni tlakovi za pojedine bioaktivne sastavnice; vidi *Poglavlje 4.3. Optimizacija procesa sCO₂ ekstrakcije*).

3.4. Fitokemijska analiza CO₂ ekstrakata

3.4.1. GC-MS analiza isparljivih sastavnica sCO₂ ekstrakata

U 1 mL heksana otopljeno je 10 µg ± 2 µg sCO₂ ekstrakta te je otopina profiltrirana u 2 mL smeđu N9 GC bočicu kroz politetrafluoretilen (PTFE) filtre veličine pora 0,45 µm. Za usporedbu rezultata napravljena je i analiza samog polaznog uzorka (cvatova konoplje). Provedena je dvosatna ekstrakcija 1 g sirovine u 5 mL heksana te je otopina profiltrirana na prethodno opisan način. Identifikacija i kvantifikacija isparljivih spojeva (terpena) u dobivenim ekstraktima provedena je metodom plinske kromatografije spregnute s masenom spektrometrijom (GC-MS). Za analizu je korišten plinski kromatograf (Agilent Technologies, SAD), model 7890B u kombinaciji s Agilent Technologies (SAD) masenim detektorom, model 5977A, spojenim na računalo (Slika 8). Separacija spojeva provedena je na kapilarnoj koloni H5-5MS (dužine 30

m, unutarnjeg promjera 0,25 mm, debljine sloja stacionarne faze 0,25 μm , J&W, SAD). Analiza je provedena pri uvjetima navedenim u Tablici 5.



Slika 8. Vezani sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (Izvor: autor)

Tablica 5. Uvjeti za GC-MS analizu isparljivih spojeva u sCO_2 ekstraktima

GC kolona	HP-5MS nepolarna kapilarna kolona (5 % fenil-metilpolisiloksan stacionarna faza; 30 m duljina; 0,25 mm unutarnji promjer; 0,25 μm debljina stacionarne faze)
Plin nositelj	helij, protok: 1 mL/min
Injektor	temperatura: 250 °C, omjer dijeljenja: 1:50
Temperaturni program kolone	70 °C izotermno 2 min; porast od 70 °C do 200 °C po 3 °C/min; 200 °C izotermno 18 min
Uvjeti rada MS detektora	Temperatura ionskog izvora: 230 °C, temperatura kvadropola: 150 °C, energija ionizacije: 70 eV, interval snimanja masa: 40-450 masenih jedinica

Za svaki analizirani uzorak dobiven je kromatogram ukupne ionske struje, naziv spoja ili spojeva čiji spektar ili spektri su najsličniji spektru nepoznate komponente pojedinog pika iz kromatograma ukupne ionske struje i vrijeme zadržavanja pojedine komponente te relativni udio pojedine komponente izražen u postocima. Kvalitativna analiza provedena je integriranjem površina ispod pikova primjenom metode normalizacije (bez korekcijskih

faktora). Strukturna identifikacija spojeva dobivenih u ekstraktu provedena je usporedbom masenih spektara na odgovarajućem retencijskom vremenu i masenog spektra iz baze podataka Wiley 09 MS (Wiley, New York, NY, SAD) i NIST14 (Gaithersburg, MD, SAD). Retencijski indeksi spojeva u uzorku određeni su u odnosu na C₉-C₂₅ *n*-alkane za kolonu HP-5MS te uspoređeni s literaturnim vrijednostima.

3.4.2. HPLC analiza kanabinoida u sCO₂ ekstraktima

U 1 mL propan-2-ola otopljeno je 10 µg ± 2 µg sCO₂ ekstrakta, nakon čega je uzeto 100 µL otopine i metanolom razrijeđeno do 2 mL. Uzorci su filtrirani kroz politetrafluoroetilen (PTFE) filtre veličine pora 0,45 µm. Za usporedbu rezultata napravljena je i analiza samog polaznog uzorka (cvatova konoplje). Provedena je jednosatna ekstrakcija 1 g sirovine u 20 mL smjese otapala acetonitril:metanol (55:45% v/v) na magnetskoj mješalici pri 40 °C. Nakon filtriranja, 100 µL dobivenog ekstrakta razrijeđeno je metanolom do 2 mL. Uzorak za HPLC analizu profiltriran je kao što je prethodno navedeno. Za analizu kanabinoida u sCO₂ ekstraktima korišten je HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD) opremljen kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A), temperaturnog raspona od 10 do 85 °C, DAD detektora (G7115A), autosamplera (automatskog uzorkivača) (G7129A) kapaciteta od 36 viala i sakupljača frakcija (G1364E) (Slika 9). Obrada podataka i upravljanje sustavom vršilo se pomoću računalnog programa ChemStation. Navedeni sustav korišten je za odjeljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju kanabinoida iz sCO₂ ekstrakata. Kromatografsko razdvajanje postignuto je korištenjem kolone InfinityLab Poroshell 120 C-C18, duljine 150 mm, s unutarnjim promjerom od 4,6 mm i veličinom čestica 4 µm. Primijenjen je postupak gradijentnog eluiranja pri brzini protoka od 1 mL/min tijekom 67 minuta, pri čemu je kao faza A korištena 0,1% mravlja kiselina u miliQ vodi (Millipore Simplicity 185, Darmstadt, Njemačka), a kao faza B 0,05% mravlja kiselina u metanolu. Gradijent je postavljen kako slijedi: 0,00-7,05 min 40% A; 7,05-49,37 min 23% A; 49,37-67,00 min 5% A nakon čega je uslijedio period od 10 min gdje su se uvjeti analize vratili na početnu vrijednost. Volumen

injektiranja bio je 35 μL , valna duljina UV detekcije bila je 210 i 230 nm, a analiza je provedena na 50 $^{\circ}\text{C}$.

Identifikacija kanabinoida provedena je usporedbom vremena zadržavanja i spektara izdvojenih pikova sa standardima, dok je kvantifikacija izvršena pomoću metode vanjskog standarda preko kalibracijskih krivulja. Vrijeme zadržavanja za CBDVA bilo je 23,236 min, za CBD 31,793 min, za CBG 33,123 min, za CBDA 35,253 min, za CBGA 41,228 min, za CBN 43,252 min, za THC 47,047 min, za THCVA 48,210 min, za CBC 55,261 min, za THCA 60,492 min i za CBCA 62,358 min.

Standardna kalibracijska krivulja za CBDVA pripravljena je u rasponu od 1,25-125,0 $\mu\text{g/mL}$, za CBD 5,00-100 $\mu\text{g/mL}$, za CBG 1,875-75,00 $\mu\text{g/mL}$, za CBDA 1,00-50,00 $\mu\text{g/mL}$, za 5,00-100 $\mu\text{g/mL}$ 125,00 $\mu\text{g/mL}$, za CBN 1,00-50,00 $\mu\text{g/mL}$, za THC 3,125 -50,00 $\mu\text{g/mL}$, za THCVA 1,25-125,00 $\mu\text{g/mL}$, za CBC 1,875-75,00 $\mu\text{g/mL}$, za CBC 1,875-75,00 $\mu\text{g/mL}$, za THCA 1,25-125,00 $\mu\text{g/mL}$ te za CBCA 1,25-125,00 $\mu\text{g/mL}$. Linearnost kalibracijske krivulje potvrđena je s $R^2 = 0,99996$ za CBDVA, $R^2 = 0,99868$ za CBD, $R^2 = 0,99913$ za CBG, $R^2 = 0,99921$ za CBDA, $R^2 = 0,99995$ = za CBGA, $R^2 = 0,99910$ za CBN, $R^2 = 0,99995$ za THC, $R^2 = 0,99996$ za THCVA, $R^2 = 0,99810$ for CBC, $R^2 = 0,99994$ za THCA i $R^2 = 0,99996$ za CBCA.



Slika 9. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda
(Izvor: autor)

3.5. Biološki učinci sCO₂ ekstrakata

3.5.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost dobivenih ekstrakata određena je DPPH metodom detaljno opisanoj u radu Chang i sur. (81). 750 µL razrijeđenih ekstrakata (konačna koncentracija 250 µg/mL) pomiješano je s istom količinom 0,2 mM otopine DPPH radikala, tako da je konačna koncentracija DPPH radikala bila 0,1 mM. Smjesa je dobro promiješana i inkubirana na sobnoj temperaturi 30 minuta i mjerenje je provedeno pri valnoj duljini od 517 nm. Kao referentni spoj korištena je askorbinska kiselina (AA) u rasponu koncentracija 2-200 µg/mL. Svi eksperimenti provedeni su u 3 ponavljanja.

Sposobnost hvatanja slobodnih DPPH radikala je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije DPPH radikala} = \left(\frac{Ab + As - Am}{Ab} \right) \times 100$$

gdje su:

Ab – apsorbancija 0,1 mM otopine DPPH radikala pri $\lambda = 517$ nm

As – apsorbancija 0,1 mM otopine ekstrakta pri $\lambda = 517$ nm (slijepa proba spoja)

Am – apsorbancija 0,1 mM otopine smjese testiranih ekstrakata i DPPH radikala pri 517 nm.

3.5.2. Određivanje antibakterijske aktivnosti

Odabir bakterija i određivanje gustoće bakterijske suspenzije

Četiri korištene bakterije izolirane su iz različitih kliničkih uzoraka dobivenih s Mikrobiološkog odjela Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo u Osijeku (Hrvatska). Vrste *Bacillus subtilis* i *Escherichia coli* odabrane su kao dva najčešće korištena modelna organizma u istraživanjima koja predstavljaju Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. S druge strane, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* odabrane su kao humani patogeni koji također predstavljaju Gram pozitivne i Gram negativne bakterije. Navedene bakterije su čuvane u hladnjaku, u dubokom agaru na - 80 °C. Gustoća bakterijskih suspenzija određena je prema McFarlandovom standardu čiji je princip uspoređivanje sa suspenzijom poznatog zamućenja, a koja se nalazi u ampuli jednakog promjera. Uporaba McFarland standarda je neophodna pri standardizaciji mikrobioloških metoda, a standardi su sukladni brojevima na McFarland skali

(Tablica 6). U ovom istraživanju korišten je Standard 0.5 kod kojeg koncentracija bakterija iznosi $150 \times 10^6/\text{mL}$. Apsorbancija bakterijske suspenzije mjerena je u sterilnoj fiziološkoj otopini pri 600 nm. Gustoća bakterijske suspenzije, kao i antibakterijska aktivnost ekstrakata mjerene su na prijenosnom spektrofotometru (HACH DR/2010 Spectrophotometer).

Tablica 6. Vrijednost standarda na McFarland skali

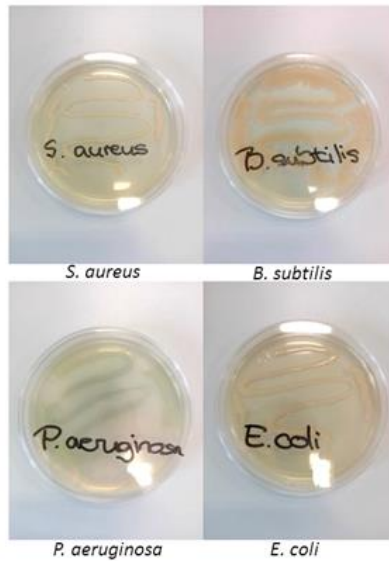
Standard	Koncentracija bakterija ¹ x10 ⁶ /mL	Teorijska optička gustoća ² na 550 nm
0,5	150	0,125
1	300	0,25
2	600	0,50
3	900	0,75
4	1200	1,00
5	1500	1,25

¹ Koncentracija bakterija ovisi o njihovoj veličini, a brojevi prikazuju prosječnu vrijednost.

² Vrijednosti odgovaraju optičkoj gustoći bakterijske suspenzije.

Hranjiva podloga

Bakterije su uzgojene u neselektivnom Müller Hintonovom (MH) bujonu. Za pripremu 100 mL hranjive podloge izvagano je 2,2 g Müller Hinto hranjivog medija, 0,5 g ekstrakta kvasca i 1,5 g agara. Zatim je dodano 1 mL glicerola te do 100 mL 0,25M otopini PBS-a (fosfatnom puferu, engl. *phosphate buffer saline*) s podešenom pH vrijednosti na 7,4. Sve je promješano te kuhano 10 minuta. Zatim je podloga autoklavirana na 121 °C tijekom 10 minuta. Nakon autoklavliranja, podloga se malo ohladila i izlila u Petrijeve posude. Dodatnim hlađenjem podloga se stvrdnula te su tada nasađene bakterijske kulture. Podloge s nasađenim bakterijama inkubirale su se pri 37 °C u trajanju od 16 sati (Slika 10).

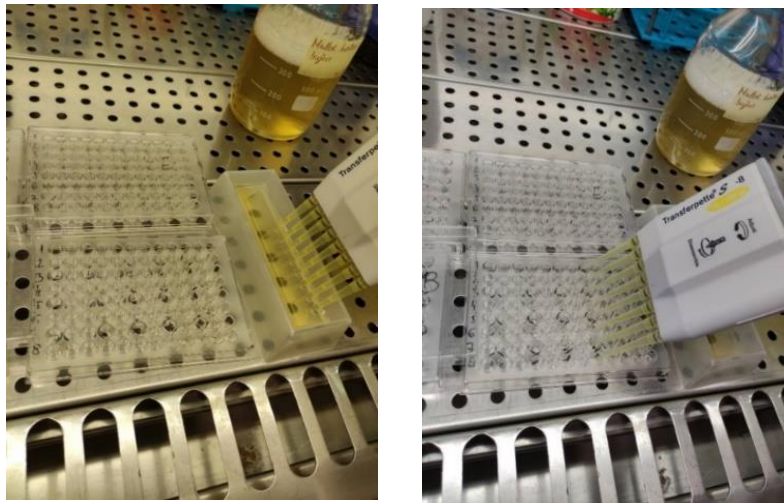


Slika 10. Prikaz bakterijskih kultura istraživanih sojeva nakon inkubacije (Izvor: autor)

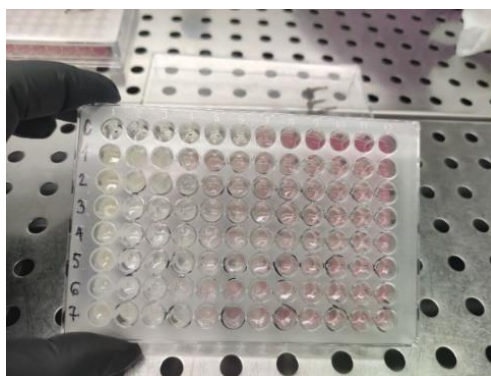
Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije

Za pripremu 1L Müller Hinton bujona izvađano je 22 g Müller Hinton hranjivog medija i dodano 1L destilirane vode, te zagrijavano do potpunog otapanja te autoklavirano 15 minuta pri 121 °C. Pripremljeni bujon se nakon sterilizacije i hlađenja pohranio u hladnjak. Pokus se izvodio na mikrotitarskim pločicama s 96 jažica (Slika 11). U svaku jažicu je otpipetirano 100 µL Müller Hinton bujona (MH bujon). U prvu jažicu u nizu je dodano 100 µL antibiotika gentamicina, koji je korišten kao pozitivna kontrola. Korišteni antibiotik je razrijeđen u omjeru 1:500. U drugu jažicu dodano je 100 µL otapala kao negativna kontrola. U svaku sljedeću jažicu u nizu dodano je 100 µL otopine pojedinog ispitivanog uzorka, te se nakon miješanja iz nje prenijelo 100 µL u drugu jažicu i dalje redom radi dvostrukih i serijskih razrjeđenja uzorka. U svrhu dobivanja serijskih razrjeđenja, multikanalnom pipetom je promiješano sve dodano u prve jažice u nizu i zatim preneseno po 100 µL u sljedeće (Slika 12). Nakon razrjeđenja ispitivanog uzorka, u svaku se jažicu dodalo 20 µL bakterijske suspenzije. Odnosno, u svaku je jažicu inokulirano 300×10^3 bakterija (gustoća korištene bakterijske suspenzije je 0,5 na McFarland skali, što iznosi 150×10^6 bakterija/mL). Tako priređena pločica je inkubirana 24 sata pri 37 °C. Nakon inkubacije, u svaku jažicu dodalo se 50 µL trifetil tetrazolij klorida (TTC, reagens tetrazolij klorid) koji je kao indikator reducirajućih tvari u podlozi, što je vidljivo prema promjeni boje

medija (Slika 12). Korišten je TTC reagens otopljen u sterilnoj fiziološkoj otopini u koncentraciji 0,5 mg/mL. Promjene nastale rastom, odnosno inhibicijom rasta bakterija, očitane su golim okom nakon dodavanja TTC reagensa i dodatne inkubacije u trajanju tri sata na 37 °C. Naime, promjena boje uz pojavu zamućenja ili taloga na dnu mikrotitar pločice su znak rasta bakterija. Pojava taloga i promjena boje dodatno se uspoređene s kontrolnim jažicama u kojima su inokulirane bakterije i otapalo, odnosno standardni antibiotk. Najveće razrjeđenje uzorka pri kojem nije došlo do pojave zamućenja i promjene boje predstavljao je minimalnu inhibitornu koncentraciju pojedinog uzorka.



Slika 12. Prikaz pripreme mikrotitarskih pločica za inkubaciju (Izvor: autor)



Slika 13. Prikaz mikrotitarskih pločica nakon reinkubacije sa TTC reagensom (Izvor: autor)

3.6. Optimizacija procesa ekstrakcije i statistička analiza

Optimizacija procesa ekstrakcije provedena je u odnosu na prinos ekstrakcije, koncentraciju odabranih bioaktivnih sastavnica industrijske konoplje i dobivenu biološku aktivnost. Za analizu utjecaja parametara sCO₂ ekstrakcije na ispitivane odzive te za optimizaciju procesa korištena je metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM), pri čemu je za ispitivanje utjecaja nezavisnih varijabli tijekom sCO₂ ekstrakcije na eksperimentalni odgovor korišten CCD. Procjena koeficijenata modela nelinearnom regresijskom analizom, statistička analiza (ANOVA) značajnosti ispitivanih parametra na promatrane ekstrakcijske procese te numerička optimizacija ispitivanih procesnih parametra provedena je primjenom softverskog paketa Design-Expert®, v.9 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Test statističkih razlika temeljio se na ukupnim kriterijima pogreške s razinom pouzdanosti od 95,0 %.

Adekvatnost dobivenih modela potvrđena je slijedećim parametrima: koeficijentom determinacije (R^2), p -vrijednostima za model i nedostatkom modela (engl. *lack of fit*). Na osnovi dobivenih matematičkih modela (polinoma) konstruirane su odzivne površine koje omogućavaju vizualni prikaz utjecaja ispitivanih parametara na promatrane odzive. Kao završni korak u metodi odzivnih površina provedeno je optimiranje promatranog procesa temeljeno na konceptu željene funkcije (engl. *Desirability function* – D). Optimiranje se provelo tako što je praćeni odziv preveden u individualnu željenu funkciju čije se vrijednosti kreću 0 – 1, pri čemu 0 predstavlja najlošiju vrijednost individualne željene funkcije, a 1 najbolju vrijednost za promatrani odziv. Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija (81).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ekstrakcija bioaktivnih sastavnica industrijske konoplje superkričnim CO₂

Ekološke zahtjeve suvremene proizvodnje biljnih ekstrakata za medicinsku i kozmetičku primjenu gotovo u potpunosti zadovoljava ekstrakcija ugljikovim dioksidom u superkričnom stanju (sCO₂) jer predstavlja "čistu tehnologiju" bez sekundarnih proizvoda štetnih za zdravlje i okoliš. Tehnika ekstrakcije pomoću sCO₂ sve se više primjenjuje u svrhu izolacije kanabinoida i terpena iz medicinske i industrijske konoplje. Dosadašnja istraživanja uglavnom su bila usmjerena na optimiranje uvjeta ekstrakcije, topljivost pojedinih kanabinoida u sCO₂, njihovo frakcioniranje te procjenu učinkovitosti ekstrakcije superkričnim fluidom u usporedbi s drugim ekstrakcijskim tehnikama (12). Perrotin-Brunel i sur. (82) su ispitali topljivosti nepsihoaktivnih kanabinoida u sCO₂ u usporedbi s THC-om, s ciljem njihovog odjeljivanja iz smjese. Za postizanje dobre topljivosti CBD-a i CBN-a bile su potrebne niže temperature nego za CBG i THC koji se dobro otapaju tek na visokim temperaturama, što se može povezati s razlikama u kemijskoj strukturi i točkama taljenja. Ustanovljeno je da, uz optimiranje tlaka i temperature, korištenje etanola kao suotapala značajno doprinosi učinkovitosti ekstrakcije, skraćuje vrijeme ekstrakcije te smanjuje omjer otapala i biljnog materijala za postizanje visokih prinosa. Pri tom je pulsni način primjene suotapala pokazao bolje rezultate u odnosu na nepromjenjivu koncentraciju suotapala (83). Gallo-Molina i sur. (84) su optimirali proces ekstrakcije, izolacije i pročišćavanja THC-a primjenom ekstrakcije superkričnim fluidima i ekstrakcije na čvrstoj fazi. Ekstrakti bogati CBD-om i pripadajućom kiselinom (CBDA) dobiveni su iz biomase zaostale nakon prerade industrijske konoplje optimiranim postupkom ekstrakcije sa sCO₂, uz frakcioniranje (85). Nadalje, opisan je posebno dizajniran postupak superkrične ekstrakcije 11 kanabinoida iz medicinske konoplje i pročišćavanja primjenom posebnih filtara i dodatnih komora za odjeljivanje (86).

sCO₂ ekstrakti industrijske konoplje bogati terpenima i kanabinoidima bez psihoaktivnog djelovanja imaju veliki potencijal primjene u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Istražuje se blagotvorno djelovanje kanabinoida na kožu te mogućnost njihovog terapijskog učinka kod

različitih kožnih bolesti poput ekcema, akni, svrbeža kože, sistemske skleroze i alopecije (3, 4). Stoga izrada visokovrijednih ekstrakata s definiranim sastavom željenih bioaktivnih tvari ima sve veću važnost. A istraživanja usmjerena na iznalaženje ekološki prihvatljivih zelenih metoda ekstrakcije, izolacije i pročišćavanja spojeva iz konoplje te razvoj metoda za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu su izrazito aktualna.

4.1.1. Utjecaj tlaka i temperature na prinos ekstrakcije

Optimiranjem procesnih parametara tlaka i temperature moguće je utjecati na svojstva sCO₂ te ekstrahirati određene biljne spojeve, uključujući i one kemijski osjetljive, što ovu tehniku čini vrlo učinkovitom i selektivnom (58, 88). Upravo su ta selektivnost i topljivost ključni kod izbora otapala u procesu ekstrakcije. Selektivnost otapala omogućava izdvajanje ciljanih komponenti iz polazne smjese. Osim navedenog, bitno je dati prednost otapalu poput CO₂ koje ima veću kemijsku i termičku stabilnost; netoksičnom i nezapaljivom otapalu, te jeftinom (58, 59). Pri proizvodnji biljnih ekstrakata primarni cilj je osigurati što bolji prinos i kvalitetu proizvoda što je i svrha ovoga rada. Stoga se u ovom istraživanju i krenulo od hipoteze da se u superkritičnom stanju, s promjenom tlaka i temperature (promjena gustoće i dielektrične konstante) mijenja sposobnost otapanja CO₂ u širokim granicama, što može utjecati na topljivost komponenti, konkretno terpena i kanabinoida. Sukladno navedenom, ispitan je utjecaj dvaju najvažnijih parametara sCO₂ ekstrakcije (tlaka i temperature) na prinos i sadržaj bioaktivnih sastavnica ekstrakata cvatova industrijske konoplje. Eksperimentalna matrica izrađena je prema CCD (Tablica 7), a analizom varijance (ANOVA) ocijenjen je stupanj točnosti primijenjene metodologije. Prinos ekstrakcije (izražen u postocima, %) izračunao se kao ukupna masa dobivenog ekstrakta (g) podijeljena s masom (100 g) biljnog materijala u ekstraktoru.

Tablica 7. Eksperimentalni uvjeti sCO₂ ekstrakcije bioaktivnih spojeva industrijske konoplje i dobiveni prinos ekstrakta prema CCD

Broj ekperimenta	Tlak (bar) X_1	Temperatura (°C) X_2	Prinos ekstrakta (%) Y
1	320	40	6,16
2	220	35,9	5,67
3	220	50	5,53
4	120	40	3,20
5	220	64,1	6,39
6	78,6	50	0,75
7	220	50	5,85
8	320	60	8,83
9	120	60	2,31
10	361,4	50	8,79
11	220	50	5,80
12	220	50	5,62
13	220	50	5,39

U Tablici 7 se može uočiti da je iskorištenje ekstrakcije variralo od 0,75 % (eksperiment br. 6) do 8,83 % (eksperiment br. 8), najvećim dijelom u ovisnosti o primjenjenom tlaku ekstrakcije od 78,6 bara do 361,4 bara. U istraživanju je odabran što širi raspon tlakova (sukladno dizajnu samog laboratorijskog uređaja za ekstrakciju), s time da je za donju granicu ekstrakcije odabran tlak od 78,6 bara koji je nešto viši od kritičnog tlaka otapala CO₂ (74 bara), a dobro je poznato da se eterična ulja i hlapljive komponente bolje ekstrahiraju pri nižim tlakovima. No, viši tlakovi daju puno veće prinose ekstrakcije i zbog toga je proces optimizacije neophodan. Nadalje, najniža korištena temperatura ekstrakcije od 35,9 °C malo je iznad kritične temperature otapala CO₂ (31,1 °C), dok je gornja granica temperature od 64,1 °C bila dovoljno niska da se izbjegnu promjene termolabilnih spojeva.

Poznato je da topljivost spojeva raste s povećanjem tlaka ekstrakcije pri konstantnoj temperaturi, što je direktno vezano s povećanjem gustoće superkritičnog fluida. Povećanje temperature izaziva smanjenje gustoće superkritičnog fluida, ali i povećanje tlaka pare tvari. Povećanje temperature pri višim tlakovima ima povoljan utjecaj na proces ekstrakcije, odnosno povećava topljivost tvari što je vidljivo i iz Tablice 7. To je rezultat činjenice da je na višim tlakovima povećanje tlaka pare komponente veće u odnosu na smanjenje gustoće

superkritičnog fluida pri povećanju temperature. Za svaku komponentu postoji vrijednost tlaka pri kojoj temperatura nema utjecaja na prinos ekstrakata i ta je vrijednost u literaturi poznata kao prijelazni tlak (engl. *crossover pressure*). Na tlakovima ispod prijelaznog tlaka, povećanjem temperature, a zbog smanjenja gustoće superkritičnog fluida, smanjit će se i njegova sposobnost otapanja (58).

Na temelju dobivenih rezultata ANOVE danih u Tablici 8, vidljivo je da je regresijski model za prinos ekstrakcije bio statistički visoko značajan (p -vrijednost $< 0,0001$), uz dobiveni koeficijent determinacije R^2 u vrijednosti od 0,9868, s neznatnim odstupanjem od modela tzv. "*lack of fit*" (p -vrijednost 0,0557), što ukazuje na statistički značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrani prinos ekstrakcije. Osim toga, tlak je bio statistički najznačajniji parametar za promatrani odziv (p -vrijednost $< 0,0001$), pokazujući očekivano povećanje prinosa ekstrakcije pri višem tlaku (Slika 14). Iz Tablice 8 se također može vidjeti da je temperatura imala statistički značajan utjecaj na prinos, ali ne toliko značajan kao tlak. Nadalje, kvadratni članovi varijabli tlaka i temperature pokazali su značajan utjecaj na prinos, dok interakcija između ta dva parametra ekstrakcije nije imala utjecaja (p -vrijednost 0,3578).

Tablica 8. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti promatranih prinosa ekstrakcije sa sCO_2

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p -vrijednost*
model	60,50	5	12,10	104,76	$< 0,0001^*$
X_1	54,33	1	54,33	470,38	$< 0,0001^*$
X_2	0,9855	1	0,9855	8,53	0,0223
X_1^2	3,15	1	3,15	27,31	0,0012 [*]
X_2^2	1,77	1	1,77	15,32	0,0058 [*]
$X_1 X_2$	0,1119	1	0,1119	0,9685	0,3578
ostatak	0,8085	7	0,1155		
nedostatak modela	0,6647	3	0,2216	6,16	0,0557
pogreška	0,1439	4	0,0360		
ukupno	61,31	12			
R^2	0,9868				

X_1 – tlak ekstrakcije; X_2 – temperatura ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

S ciljem određivanja regresijskih koeficijenata primijenjena je metoda najmanjih kvadrata. Polinom koji opisuje ponašanje prinosa ekstrakcije u ispitivanom eksperimentalnom području (Tablica 8) dan je sljedećom jednadžbom:

$$Y_1 = 5,64 + 2,61X_1 + 0,35X_2 - 0,50X_1^2 + 0,13X_2^2 + 0,89X_1X_2$$

gdje su kodirane vrijednosti:

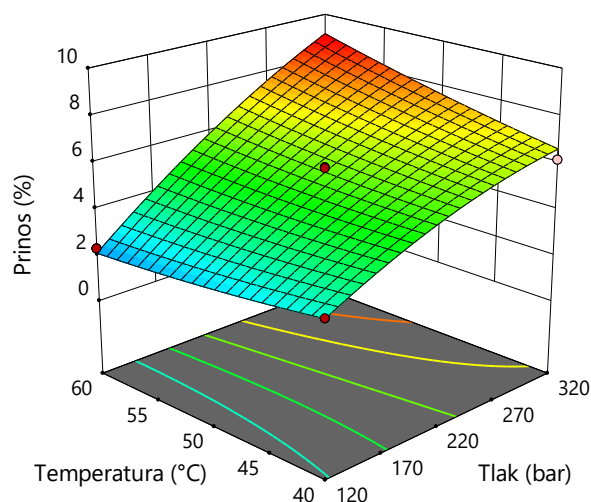
Y_1 – prinos ekstrakcije;

X_1 – tlak ekstrakcije;

X_2 – temperatura ekstrakcije.

Provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim eksperimentalnim dizajnom dobivena je kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti. Prinos ekstrakcije vizualno je prikazan na Slici 14 kao funkcija tlaka i temperature.

Vrlo slični rezultati za ekstrakcijski prinos dobiveni su i u nedavno objavljenoj doktorskoj disertaciji (88), gdje je ekstrakcijski prinos sorte industrijske konoplje *Helena* dobiven sCO₂ bio između 0,33 % i 7,13 %. Prinos ekstrakcije rastao je s porastom tlaka pri konstantnoj temperaturi, te je pri 40 °C bio u rasponu od 1,57 do 5,20 %, za 50 °C u rasponu od 0,78 do 5,71 % i za 60 °C u rasponu od 0,33 do 7,13 %. Također autorica je potvrdila da je utjecaj temperature pri konstantnom tlaku različit za različite tlakove. Pri tlaku od 100 bara porast temperature ima negativan utjecaj na prinos ekstrakcije, pa je najveći prinos ostvaren na temperaturi od 40 °C (1,57 %), na temperaturi od 50 °C prinos je bio manji (0,78 %), dok je na najvišoj temperaturi iznosio 0,33 %. Pri tlaku od 200 bara promjena temperature nije imala veći utjecaj na prinos ekstrakcije (dobivene vrijednosti bile su 4,66-5,22 %). Pri konstantnom tlaku od 300 bara povećanjem temperature dolazi do povećanja prinosa ekstrakcije. Najveći prinos ekstrakcije dobiven je pri tlaku od 300 bara i 60 °C i iznosio je 7,13 %. Iz navedenog se može zaključiti da povećanjem tlaka dolazi do povećanja prinosa ekstrakcije, dok povećanje temperature pri tlaku od 100 bara ima negativan utjecaj, pri tlaku od 200 bara nema značajniji utjecaj, a pri 300 bara ima pozitivan utjecaj.



Slika 14. Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa tijekom ekstrakcije u ovisnosti o tlaku i temperaturi

Povećanje prinosa ekstrakcije s povećanjem tlaka opaženo je u nekoliko drugih studija koje su ispitivale utjecaj tlaka na prinos superkritične ekstrakcije, kako tijekom ekstrakcije ulja iz sjemenki industrijske konoplje (80) tako i kanabinoida iz industrijske konoplje koja se sastojala od listova, cvjetova i nezrelih sjemenki (89) te kanabinoida iz cvjetova industrijske konoplje različitih sorti (83). Kitryté i sur. (89) istraživali su utjecaj tlaka (100-500 bara) i temperature (35-70 °C) na prinos ekstrakcije iz ostataka industrijske konoplje. Utvrđeno je da su optimalni procesni uvjeti 465 bara i 70 °C, što rezultira ekstrakcijskim iskorištenjem od 8,3 %. Nadalje, i 3D dijagram odzivnih površina za ekstrakcijski prinos ima vrlo sličan oblik kao što je dobiveno i u ovom radu. Attard i sur. (90) su u svojoj studiji pokazali da se čak do 33 % mase konoplje može izgubiti u obliku prašine tijekom obrade za proizvodnju vlakana. Prinos superkritične ekstrakcije iz različitih uzoraka prašine industrijske konoplje bio je u rasponu od 0,12 % do 1,57 % a najveći je ostvaren pri najvišem tlaku (400 bara) i temperaturi (65 °C). U studiji koju su proveli Rovetto i Aieta (83) prinos superkritične ekstrakcije iz listova i pupoljaka industrijske konoplje bio je 7,40-18,50 %. Gallo-Molina i sur. (84) ispitivali su prinos superkritične ekstrakcije iz cvatova industrijske konoplje u rasponu tlakova od 150 bara do 330 bara, temperature od 40 °C do 80 °C, te uz dodatak etanola kao suotapala (0-5 %). Dobiveni prinosi kretali su se u rasponu od 4,83 % do 26,36 %, a najviši prinos je ostvaren primjenom sljedećih

procesnih parametara ekstrakcije: 330 bara, 40 °C, uz primjenu 5 % etanola. U ovom istraživanju nije primijenjen dodatak suotapala s obzirom na samu konstrukciju uređaja za sCO₂ ekstrakciju koji nema dodatnu pumpu za organska otapala. Osim navedenog, vrlo je važno znati da prinos ekstrakcije ovisi o dijelu biljke iz kojeg se provodi ekstrakcija, a može varirati i ovisno o samoj biljci, tj. o sorti biljke, lokalitetu i uvjetima uzgoja (83).

4.1.2. Utjecaj tlaka i temperature na udio terpena u sCO₂ ekstraktima

U svim dobivenim sCO₂ ekstraktima identificirani su najvažniji bioaktivni spojevi (terpeni i kanabinoidi) te ustanovljena antioksidacijska i antibakterijska aktivnost. Superkritični CO₂ se već i u prijašnjim studijama pokazao dobrim otapalom za ekstrakciju hlapljivih spojeva kao što su terpeni iz konoplje (91). Mono- i seskviterpeni su uvelike odgovorni za karakterističnu aromu konoplje. Njihova biosinteza u konoplji je opisana u nekoliko radova (92-94). Terpeni su analizirani i u eteričnom ulju konoplje (40). U literaturi je prezentiran i osvrt na metode koje se koriste za izolaciju terpenskih spojeva iz konoplje (91), a koje uključuju: hidrodestilaciju (engl. *hydrodistillation*, HD), konvencionalnu ekstrakciju otapalom (engl. *conventional solvent extraction*, SE) i ekstrakciju sCO₂. Također su uspostavljeni i inovativni protokoli ekstrakcije i kromatografske separacije, uključujući plinsku i tekućinsku kromatografiju te naglašavajući njihove prednosti i nedostatke (95). U ovom radu terpeni su određeni u sCO₂ ekstraktima pri različitim uvjetima tlaka i temperature. Korištenje sCO₂ ima velike prednosti u odnosu na HD, kao što je korištenje niske temperature koja sprječava stvaranje toplinskih artefakata (u usporedbi s HD), te direktno iskorištenje terpena bez uporabe konvencionalnih organskih otapala. Kao što se i očekivalo kao rezultat provedene GC-MS analize, glavni terpenski spojevi u sCO₂ ekstraktima bili su monoterpeni (Tablica 9), budući da je poznato da su u konoplji zastupljeniji od seskviterpena (40). Glavna sastavnica ispitanih sCO₂ ekstrakata bio je aciklički monoterpen β-mircen (15,55-33,45 %) za koji je prije utvrđeno da je najrašireniji terpen u većini sorti kanabisa (40). Sukladno tome, ispitivana sorta pripada dominantnom kemotipu β-mircena. Osim tog kemotipa, općenito su za konoplju ustanovljeni i brojni drugi kemotipovi prema sljedećim glavnim sastavnicama: α-pinen, limonen, terpinolen, linalool, β-kariofilen,

selina-3,7(11)-dien, γ -selinen, 10-epi- γ -eudezmol, β -eudezmol, α -eudezmol, bulnesol i α -bisabolol (40). U biološkim istraživanjima β -mircen je pokazao antipsihotička, antioksidacijska, analgetska, protuupalna, sedativna i antikancerogena svojstva (96-98). Među ostalim monoterpenima, u ispitanim ekstraktima najzastupljeniji je bio biciklički α -pinen (5,13-12,88 %) i njegov izomer β -pinen (2,94-7,78 %). S obzirom na rezultate bioloških istraživanja, α -pinenu se pripisuje antibakterijsko, protuupalno, bronhodilatatorno, antiseptičko i gastroprotektivno djelovanje, dok β -pinen posjeduje antiseptička svojstva (99). Limonen, monociklički monoterpen, je također bio značajno zastupljen (2,99-6,65 %). Dokazani su brojni biološki učinci limonena, uključujući antibakterijski, antifungalni, gastroprotektivni, antiproliferativni, anksiolitički, antidepresivni, spazmolitički i imunostimulirajući (100, 101). Pored navedenih sastavnica, brojni su drugi monoterpeni detektirani u značajno manjim udjelima, a prikazani su u Tablici 9.

Iz klase seskviterpena najzastupljeniji je bio β -kariofilen (2,83-10,16 %), a kojemu su također ustanovljena brojna biološka djelovanja kao što su: antioksidacijsko, antifungalno, antibakterijsko, protuupalno, gastroprotektivno, analgetičko, antikancerogeno, antiproliferativno, antidepresivno, anksiolitično, analgetičko i neuroprotektivno djelovanje (102, 103). To je jedini terpen za kojeg je poznato da stupa u interakciju s tjelesnim endokanabinoidnim sustavom i koji se selektivno veže na CB2 receptor (104). Ujedno pokazuje i *in vitro* visoku selektivnost protiv Herpes simplex virusa tipa 1 (105). Od ostalih seskviterpena najzastupljeniji su bili alkoholi gvajol (1,26-4,80 %), γ -eudezmol (1,50-5,35 %) i bulnesol (1,00-4,21 %). Gvajolu je dokazan protuupalni, antimikrobni, analgetik i antitumorski učinak (106, 107), dok bulnesol djeluje antitusivno i ekspektorirajuće (108). U Tablici 9 se još dva seskviterpena ističu svojom zastupljenošću u ispitanim ekstraktima, a to su γ -selinen (1,34-4,60%) i selina-3,7(11)-dien (1,92-6,59%).

Rezultati provedenog istraživanja pokazali su veliku podudarnost kvalitativnog sastava i udjela glavnih terpenskih spojeva s prethodnim istraživanjima drugih autora. β -mircen i β -kariofilen su često detektirani kao glavni terpeni u konoplji koji svojim biološkim svojstvima značajno

doprinosu ljekovitim svojstvima same biljke (20, 40, 91, 95). No, ovo je istraživanje ukazalo i na značajne udjele α -pinena, β -pinena, gvajola, γ -eudezmola i bulnesola koji također posjeduju biološka svojstva. Osim toga, treba uzeti u obzir moguća sinergijska djelovanja kanabinoida i terpena u ljudi (19, 40) koja bi trebala razjasniti buduća istraživanja.

Tablica 9. Hlapljivi spojevi sCO₂ ekstrakata industrijske konoplje određeni primjenom plinske kromatografije spregnute spektrometrijom masa

No	Compound	RI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Cvat
1.	heksan-1-ol	875	0,06	0,06	0,08	0,09	0,10	0,06	0,09	0,08	0,11	0,09	0,09	0,08	0,09	0,06
2.	heptanal	903	0,17	0,10	0,10	0,04	0,10	0,04	0,14	0,11	0,04	0,16	0,09	0,13	0,12	0,14
3.	α-tujen	934	-	-	-	-	-	0,02	-	-	0,01	-	-	-	-	0,01
4.	α-pinen	941	6,82	6,46	6,03	7,89	6,41	12,88	6,77	6,94	10,58	5,14	6,12	5,13	5,55	6,81
5.	kamfen	956	0,15	0,15	0,16	0,11	0,16	0,40	0,17	0,17	0,32	0,12	0,16	0,13	0,15	0,16
6.	sabinen	980	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03
7.	β-pinen	983	3,59	3,55	3,66	5,11	3,40	7,78	3,85	3,63	6,38	2,94	3,70	3,02	3,23	3,41
8.	β-mircen	993	22,47	18,40	18,24	19,98	18,31	33,45	20,70	18,47	25,44	15,55	17,29	15,66	15,65	16,75
9.	α-felandren	1007	0,02	0,03	0,04	0,06	0,03	0,09	0,04	0,05	0,04	0,06	0,06	0,03	0,03	0,04
10.	Δ-3-karen	1014	0,03	0,02	0,03	0,05	0,03	0,06	0,03	0,04	0,04	0,04	0,05	0,02	0,02	0,03
11.	α-terpinen	1021	0,02	-	0,03	0,04	0,03	0,05	0,03	0,04	0,03	0,05	0,05	0,02	0,02	0,03
12.	limonen	1033	3,44	3,42	3,67	5,04	3,28	6,65	3,97	3,19	6,08	2,89	3,75	2,99	3,23	2,71
13.	1,8-cineol	1036	0,02	0,02	0,03	0,01	0,02	0,01	0,03	0,02	0,01	0,04	0,02	0,02	0,02	0,01
14.	(Z)-β-ocimen	1041	0,04	0,04	0,06	0,09	0,06	0,13	0,07	0,05	0,10	0,05	0,06	0,04	0,05	0,03
15.	(E)-β-ocimen	1052	1,24	1,28	1,38	2,08	1,34	3,10	1,61	1,11	2,36	1,11	1,51	1,20	1,21	1,04
16.	γ-terpinen	1063	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,03	0,03	0,04
17.	cis-sabinenhidrat	1071	0,05	0,05	0,07	0,06	0,07	0,03	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07	0,07	0,06	0,06
18.	oktan-1-ol	1072	0,03	0,04	0,06	0,03	0,07	0,03	0,07	0,07	0,03	0,10	0,06	0,07	0,07	0,07
19.	trans-linalool oksid	1076	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04	0,02	0,05	0,04	0,03	0,05	0,05	0,04	0,05	0,03
20.	α-terpinolen	1091	0,78	0,56	0,92	1,41	0,61	1,12	0,79	0,60	0,97	0,75	1,07	0,58	0,55	0,62
21.	linalool	1100	0,04	0,07	0,07	0,08	0,07	0,05	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,08	0,09	0,07
22.	nonanal	1105	0,13	0,05	0,08	0,05	0,09	0,03	0,08	0,12	0,03	0,14	0,07	0,13	0,08	0,16
23.	heksil-propanoat	1107	0,04	0,04	0,06	0,10	0,04	0,06	0,05	0,05	0,06	0,04	0,06	0,03	0,05	0,00
24.	fenhol	1115	0,52	0,61	0,64	0,65	0,66	0,33	0,68	0,57	0,55	0,62	0,68	0,66	0,65	0,54
25.	trans-pinokarveol	1142	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	0,00
26.	borneol	1169	0,17	0,18	0,21	0,17	0,21	0,10	0,24	0,20	0,12	0,22	0,23	0,22	0,23	0,18
27.	terpinen-4-ol	1179	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,02	0,04	0,04	0,02	0,05	0,05	0,04	0,05	0,04
28.	α-terpineol	1191	0,03	0,05	0,07	0,05	0,06	0,03	0,07	0,07	0,03	0,07	0,08	0,08	0,07	0,06

29.	heksil- butanoat	1193	0,60	0,66	0,73	0,91	0,62	0,52	0,79	0,51	0,96	0,54	0,77	0,67	0,63	0,48
30.	β -citronelol	1230	0,04	0,04	0,06	0,06	0,07	0,02	0,07	0,06	0,04	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07
31.	1H-indol	1294	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03
32.	α -jilangen	1373	0,07	0,09	0,09	0,05	0,10	0,04	0,09	0,09	0,11	0,10	0,09	0,09	0,07	0,08
33.	α -kopaen	1376	0,03	0,03	0,04	0,03	0,04	0,02	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04	0,05	0,06
34.	heksil- heksanoat	1388	0,10	0,11	0,11	0,14	0,12	0,04	0,14	0,08	0,12	0,10	0,15	0,13	0,11	0,08
35.	α -gurjunen	1408	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,04	0,02	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03
36.	<i>cis</i> - α - bergamoten	1415	0,07	0,09	0,09	0,11	0,09	0,05	0,09	0,07	0,12	0,09	0,09	0,08	0,11	0,08
37.	β-kariofilen	1419	7,09	8,53	8,45	9,88	8,34	3,94	10,16	7,49	2,83	7,56	8,31	7,99	8,15	7,18
38.	γ -elemen	1434	0,33	0,35	0,43	0,54	0,34	0,11	0,45	0,31	0,29	0,33	0,42	0,40	0,36	0,25
39.	<i>trans</i> - α - bergamoten	1437	0,53	0,61	0,60	0,75	0,58	0,29	0,62	0,50	0,78	0,52	0,59	0,58	0,66	0,48
40.	α -gvajen	1439	0,02	0,05	0,06	0,06	0,06	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,04
41.	gvaja-3,7-dien	1444	0,05	0,11	0,10	0,13	0,10	0,04	0,10	0,08	0,12	0,10	0,11	0,10	0,10	0,08
42.	α -humulen	1454	2,23	2,78	2,79	3,31	2,75	1,09	2,83	2,42	3,15	2,50	2,76	2,67	2,68	2,31
43.	<i>trans</i> - β -farnezen	1460	1,26	1,53	1,61	1,92	1,54	0,64	1,65	1,25	1,91	1,39	1,62	1,50	1,61	1,24
44.	α -amorfen	1466	0,02	0,04	0,04	0,05	0,06	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,06	0,06
45.	γ -muurolen	1476	0,24	0,32	0,31	0,38	0,33	0,12	0,34	0,30	0,32	0,33	0,34	0,34	0,33	0,28
46.	β -eudezmen	1483	0,11	0,09	0,11	0,22	0,43	0,03	0,12	0,35	0,39	0,39	0,13	0,11	0,14	0,34
47.	β -selinen	1485	0,96	1,15	1,16	1,32	1,19	0,38	1,19	1,02	1,07	1,07	1,19	1,14	1,12	0,95
48.	valencen	1492	0,46	0,55	0,57	0,65	0,58	0,17	0,58	0,48	0,53	0,53	0,59	0,52	0,53	0,00
49.	α -selinen	1493	0,91	1,10	1,11	1,24	1,13	0,35	1,14	0,98	1,00	1,02	1,13	1,10	1,05	1,38
50.	(<i>E,E</i>)- α -farnezen	1509	2,10	2,55	2,67	3,28	2,49	0,79	2,71	2,09	3,02	2,34	2,64	2,47	2,44	1,98
51.	γ -kadinen	1515	0,18	0,22	0,18	0,16	0,19	0,09	0,20	0,19	0,14	0,21	0,19	0,20	0,22	0,18
52.	bicklogermakren	1517	0,67	0,83	0,83	0,92	0,84	0,67	0,85	0,72	0,70	0,75	0,85	0,82	0,79	0,68
53.	β -kadinen	1518	0,51	0,63	0,60	0,68	0,66	0,26	0,65	0,58	0,55	0,59	0,62	0,67	0,62	0,58
54.	δ -kadinen	1524	0,46	0,60	0,57	0,67	0,61	0,18	0,62	0,54	0,52	0,59	0,62	0,61	0,61	0,00
55.	γ -selinen	1535	3,49	4,28	4,11	4,60	4,46	1,34	4,43	4,01	3,51	4,05	4,26	4,59	4,21	4,12
56.	selina-3,7(11)- dien	1541	4,98	6,13	5,84	6,49	6,31	1,92	1,99	5,67	4,82	5,68	6,05	6,59	5,98	5,69
57.	(<i>E</i>)- α -bisabolen	1549	0,69	0,88	0,84	0,93	0,73	0,27	0,83	0,73	0,72	0,80	0,83	0,90	0,78	0,75
58.	germakren B	1556	1,90	1,88	2,17	2,70	1,86	0,59	2,28	1,65	1,50	1,72	2,14	2,05	1,82	1,31
59.	nerolidol	1566	0,21	0,21	0,38	0,31	0,40	0,12	0,41	0,35	0,16	0,41	0,43	0,44	0,44	0,37
60.	kariofilen oksid	1581	0,60	0,72	0,76	0,67	0,77	0,31	0,77	0,69	0,33	0,73	0,80	0,78	0,80	0,75
61.	gvajol	1601	4,62	3,96	3,94	2,03	4,28	2,32	4,51	4,54	1,26	4,85	4,51	4,80	4,68	4,87

62.	ledol	1599	0,13	0,12	0,11	0,13	0,12	0,08	0,12	0,12	0,04	0,14	0,12	0,12	0,11	0,13
63.	γ-eudezmol	1623	5,27	4,48	4,43	2,36	4,66	3,03	4,92	5,14	1,50	5,35	5,05	5,55	5,07	5,53
64.	10-epi-γ eudezmol	1630	0,76	0,63	0,70	0,31	0,29	0,19	0,30	0,32	0,20	0,36	0,31	0,33	0,33	0,38
65.	dihyro-cis-α-kopaen-8-ol	1634	0,26	0,23	0,11	0,12	0,27	0,17	0,28	0,31	0,08	0,34	0,29	0,11	0,31	0,34
66.	hinesol	1637	0,11	0,11	0,29	0,04	0,11	0,08	0,12	0,13	0,03	0,01	0,06	0,30	0,12	0,16
67.	β-eudezmol	1649	2,21	1,77	1,92	0,85	1,89	1,26	2,00	2,21	0,55	2,37	2,05	2,17	2,07	2,53
68.	α-eudezmol	1652	2,71	2,13	2,28	1,02	2,27	1,51	2,40	2,69	0,67	2,85	2,44	2,59	2,49	2,53
69.	bulnesol	1666	4,01	3,19	3,06	1,52	3,58	2,35	3,69	4,21	1,00	4,37	3,70	3,99	3,83	4,73
70.	α-bisabolol	1683	1,89	1,83	1,83	0,90	1,61	1,00	1,90	2,01	0,51	2,20	2,01	2,10	2,07	2,09
71.	juniper kamfor	1692	0,44	0,39	0,43	0,18	0,43	0,27	0,46	0,56	0,14	0,60	0,46	0,48	0,46	0,65
72.	hekahidrofarnezi l-aceton	1846	0,06	0,10	0,13	0,13	0,14	0,04	0,17	0,13	0,05	0,16	0,16	0,16	0,17	0,23
73.	heneikosan	2100	0,01	0,03	0,06	0,01	0,04	0,01	0,05	0,04	0,01	0,05	0,05	0,06	0,05	0,10
74.	fitol	2116	0,02	0,01	0,22	0,05	0,01	0,01	0,24	0,20	0,03	0,37	0,29	0,01	0,34	0,23

Prema svim navedenim biološkim aktivnostima terpena, za daljnju statističku analizu odabrani su oni najzastupljeniji odnosno najznačajniji spojevi, a rezultati ANOVE za promatrane odzive prikazani su u Tablici 10. Na temelju dobivenih rezultata, regresijski modeli za sve ciljane terpeene imali su statističku značajnost ($p < 0,05$), što ukazuje na značajan utjecaj nezavisnih varijabli na promatrane odzive, a dobivene vrijednosti koeficijenata determinacije R^2 bile su u rasponu od 0,7532 do 0,9342. Nedostatak modela nije bio statistički značajan ($p > 0,05$) za sve promatrane odzive, što potvrđuje adekvatnost dobivenog polinoma jednadžbe drugog reda. Kada se promatra utjecaj pojedinačnih parametara, linearni član tlaka imao je najveći statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) na monoterpeene (α -pinen, β -pinen, β -mircen i limonen) kao i na gvajol. Od ostalih parametara, jedino je još kvadratni član temperature imao statistički značajan utjecaj, dok ostali parametri to nisu imali. U slučaju seskviterpena, kvadratni član tlaka i temperature imali su statistički značajan utjecaj na udio β -kariofilena, dok je samo linearni član tlaka imao značajan utjecaj na γ -eudezmol i bulnesol. Za sve promatrane odzive, interakcija između tlaka i temperature nije imala statistički značajnog utjecaja.

Tablica 10. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti odabranih terpena

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost*
α-pinen					
model	51,80	5	10,36	9,47	0,0051*
X ₁	30,64	1	30,64	28,00	0,0011*
X ₂	0,9380	1	0,9380	0,8573	0,3853
X ₁ ²	1,65	1	1,65	1,51	0,2589
X ₂ ²	18,45	1	18,45	16,87	0,0045*
X ₁ X ₂	0,8101	1	0,8101	0,7405	0,4180
ostatak	7,66	7	1,09		
nedostatak modela	6,12	3	2,04	5,32	0,0701
pogreška	1,54	4	0,3839		
ukupno	59,46	12			
R ² =0,8712					
β-pinen					
model	22,95	5	4,59	18,42	0,0007*
X ₁	15,44	1	15,44	61,96	0,0001*
X ₂	0,1507	1	0,1507	0,6045	0,4623
X ₁ ²	0,3782	1	0,3782	1,52	0,2578
X ₂ ²	6,94	1	6,94	27,86	0,0012*
X ₁ X ₂	0,0222	1	0,0222	0,0891	0,7740
ostatak	1,74	7	0,2492		
nedostatak modela	1,25	3	0,4178	3,40	0,1338
pogreška	0,4911	4	0,1228		
ukupno	24,70	12			
R ² =0,9294					
β-mircen					
model	220,57	5	44,11	4,27	0,0421*
X ₁	110,96	1	110,96	10,75	0,0135*
X ₂	0,2220	1	0,2220	0,0215	0,8875
X ₁ ²	22,37	1	22,37	2,17	0,1845
X ₂ ²	87,01	1	87,01	8,43	0,0229*
X ₁ X ₂	1,50	1	1,50	0,1452	0,7145
ostatak	72,27	7	10,32		
nedostatak modela	54,63	3	18,21	4,13	0,1022
pogreška	17,64	4	4,41		
ukupno	292,84	12			
R ² =0,7532					
limonen					
model	16,12	5	3,22	19,88	0,0005*
X ₁	12,02	1	12,02	74,12	< 0,0001*
X ₂	0,0438	1	0,0438	0,2701	0,6193
X ₁ ²	0,4160	1	0,4160	2,56	0,1533
X ₂ ²	3,59	1	3,59	22,13	0,0022*
X ₁ X ₂	0,0005	1	0,0005	0,0030	0,9578
ostatak	1,14	7	0,1622		
nedostatak modela	0,4926	3	0,1642	1,02	0,4716
pogreška	0,6429	4	0,1607		
ukupno	17,26	12			
R ² =0,9342					

β -kariofilen					
model	41,60	5	8,32	6,02	0,0178*
X ₁	6,11	1	6,11	4,42	0,0736
X ₂	5,98	1	5,98	4,33	0,0759
X ₁ ²	13,88	1	13,88	10,04	0,0157*
X ₂ ²	15,62	1	15,62	11,31	0,0120*
X ₁ X ₂	0,1693	1	0,1693	0,1226	0,7366
ostatak	9,67	7	1,38		
nedostatak modela	6,56	3	2,19	2,81	0,1721
pogreška	3,11	4	0,7785		
ukupno	51,27	12			
R ² =0,8114					
gvajol					
model	14,69	5	2,94	8,57	0,0068*
X ₁	11,16	1	11,16	32,55	0,0007*
X ₂	0,0197	1	0,0197	0,0576	0,8172
X ₁ ²	0,1190	1	0,1190	0,3472	0,5742
X ₂ ²	2,82	1	2,82	8,22	0,0241*
X ₁ X ₂	0,9472	1	0,9472	2,76	0,1404
ostatak	2,40	7	0,3428		
nedostatak modela	1,96	3	0,6547	6,01	0,0579
pogreška	0,4355	4	0,1089		
ukupno	17,09	12			
R ² =0,8596					
γ-eudezmol					
model	15,69	5	3,14	6,29	0,0159
X ₁	12,08	1	12,08	24,23	0,0017
X ₂	0,0676	1	0,0676	0,1356	0,7236
X ₁ ²	0,1332	1	0,1332	0,2671	0,6212
X ₂ ²	2,59	1	2,59	5,19	0,0567
X ₁ X ₂	1,23	1	1,23	2,46	0,1606
ostatak	3,49	7	0,4987		
nedostatak modela	2,85	3	0,9499	5,93	0,0592
pogreška	0,6411	4	0,1603		
ukupno	19,18	12			
R ² =0,8180					
bulnesol					
model	10,49	5	2,10	5,76	0,0201
X ₁	9,15	1	9,15	25,11	0,0015
X ₂	0,0067	1	0,0067	0,0184	0,8959
X ₁ ²	0,1296	1	0,1296	0,3556	0,5697
X ₂ ²	0,7073	1	0,7073	1,94	0,2062
X ₁ X ₂	0,6530	1	0,6530	1,79	0,2225
ostatak	2,55	7	0,3644		
nedostatak modela	2,05	3	0,6836	5,47	0,0672
pogreška	0,5001	4	0,1250		
ukupno	13,04	12			
R ² =0,8044					

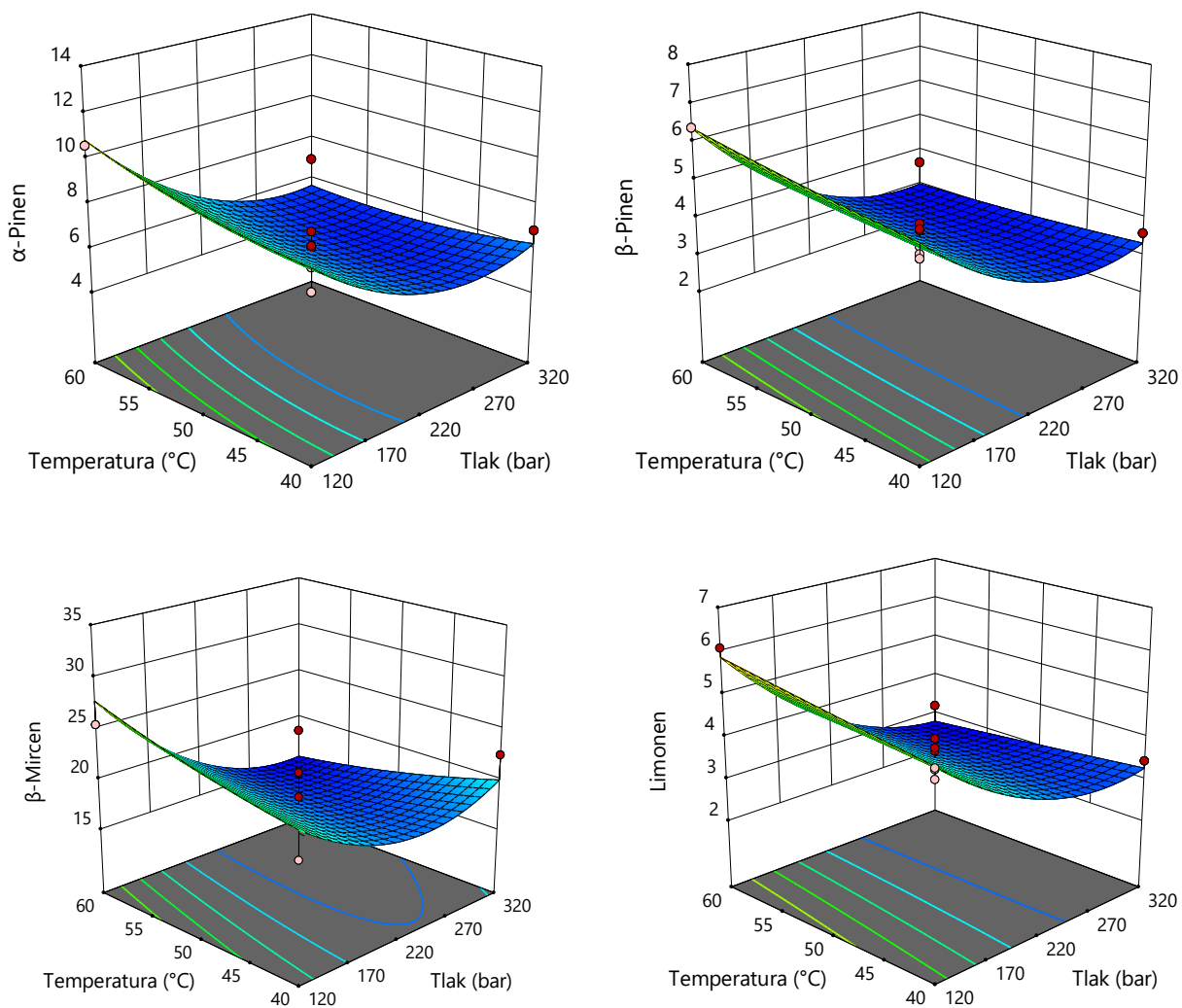
X₁ – tlak ekstrakcije; X₂ – temperatura ekstrakcije; *SS – suma kvadratnih odstupanja podataka od prosječne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca. *Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$.

Polinomi koji opisuju ponašanje monoterpena i seskviterpena u ispitivanom eksperimentalnom području ekstrakcije dani su u Tablici 11 (kodirane vrijednosti). Kod monoterpena i seskviterpena vidljiv je potpuno suprotan utjecaj tlaka na njihove udjele u ekstraktima. S povećanjem tlaka udio monoterpena se smanjuje (Slika 15), pa se za njihovu ekstrakciju preporučuje korištenje nižih tlakova. Nasuprot tome, Slika 16 pokazuje snažan utjecaj tlaka i posljedično povećanje količine gvajola, γ -eudezmola i bulnesola primjenom viših tlakova. U slučaju β -kariofilena, udio se povećava s tlakom do 300 bara, dok viši pritisci uzrokuju blagi pad udjela. Iz navedenog se može zaključiti da primjena viših tlakova pogoduje ekstrakciji seskviterpena.

Tablica 11. Procijenjeni koeficijenti polinoma jednadžbe drugog reda nakon implementacije CCD plana pokusa pri sCO₂ ekstrakciji (za monoterpene i seskviterpene)

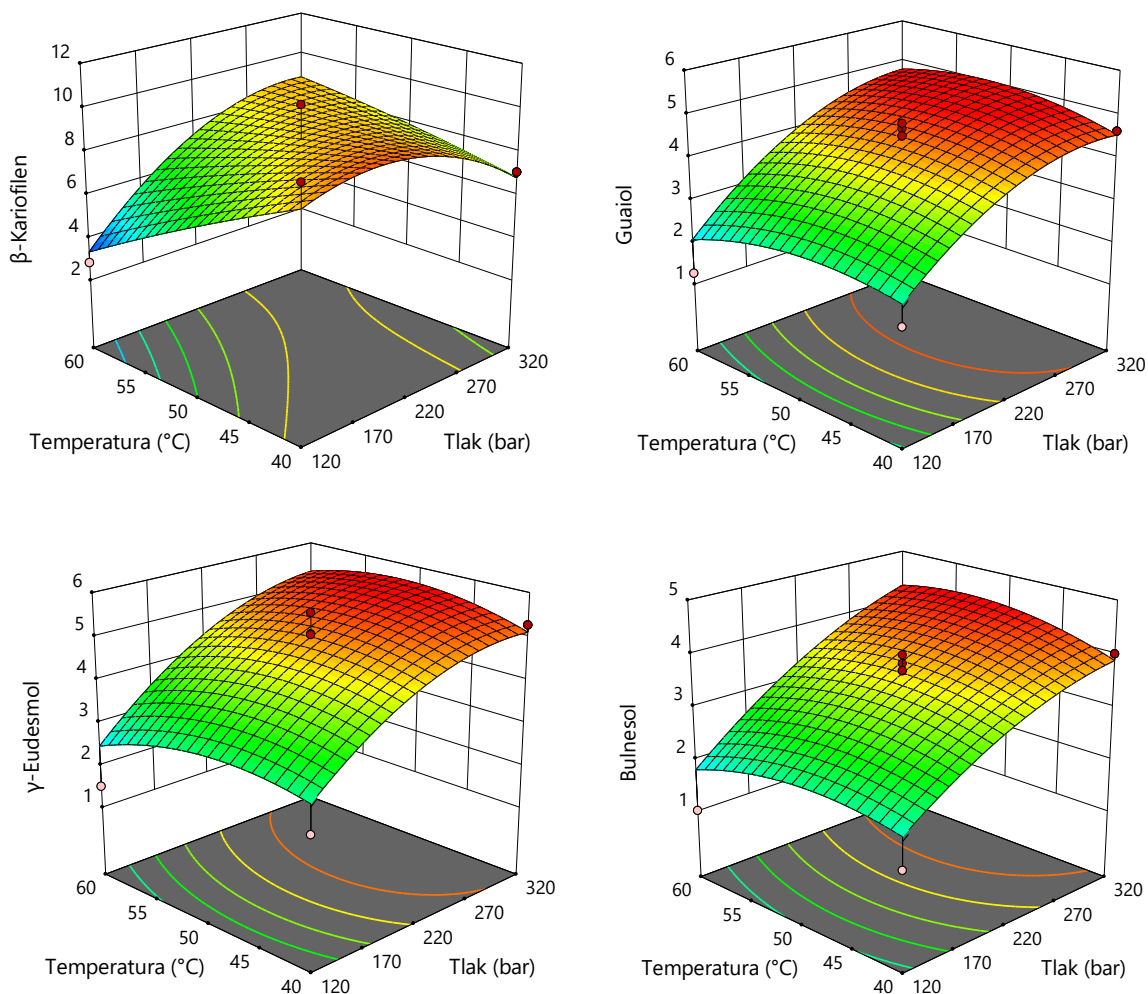
Koeficijent regresije	Polinom jednadžbe drugog reda za udjele ciljanih monoterpena i seskviterpena
monoterpeni	
α -pinen (Y ₂)	$5,92 - 1,96X_1 + 0,34X_1^2 + 1,63X_1^2 + 0,34X_2^2 - 0,64X_1X_2^2$
β -pinen (Y ₃)	$3,49 - 1,39X_1 + 0,14X_1^2 + 0,99X_1^2 + 0,06X_2^2 - 0,31X_1X_2^2$
β -mircen (Y ₄)	$17,51 - 3,72X_1 + 0,17X_1^2 + 3,54X_1^2 + 0,47X_2^2 - 2,36X_1X_2^2$
limonen (Y ₅)	$3,52 - 1,23X_1 + 0,07X_1^2 + 0,72X_1^2 + 0,01X_2^2 - 0,32X_1X_2^2$
seskviterpeni	
β -kariofilen (Y ₆)	$8,61 + 0,87X_1 - 0,86X_1^2 - 1,50X_1^2 - 0,16X_2^2 + 1,86X_1X_2^2$
gvajol (Y ₇)	$4,49 + 1,18X_1 - 0,05X_1^2 - 0,64X_1^2 - 0,37X_2^2 + 0,17X_1X_2^2$
γ -eudezmol (Y ₈)	$5,00 + 1,23X_1 - 0,09X_1^2 - 0,61X_1^2 - 0,42X_2^2 + 0,18X_1X_2^2$
bulnesol (Y ₉)	$3,65 + 1,07X_1 + 0,03X_1^2 - 0,32X_1^2 - 0,31X_2^2 + 0,18X_1X_2^2$

X₁ – tlak ekstrakcije; X₂ – temperatura ekstrakcije



Slika 15. Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina odabranih monoterpena u ovisnosti o tlaku i temperaturi ekstrakcije

U ovom istraživanju uspoređen je i udio terpena u sCO₂ ekstraktima s onima u polaznom biljnom materijalu (cvatovima konoplje). Uočena je velika sličnost s polaznom sirovinom (Tablica 9) u kontekstu zastupljenosti glavnih spojeva i određivanja kemotipa. Ovo je značajno poboljšanje u usporedbi s prethodnim istraživanjem kojeg su proveli Sexton i sur. (109) i pokazali da sCO₂ ekstrakt može imati drugačiji kemotip od onog koji je utvrđen u konopljinom cvatu zbog različite koncentracije izoliranih spojeva.



Slika 16. Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina odabranih seskviterpena u ovisnosti o tlaku i temperaturi ekstrakcije

4.1.3. Utjecaj tlaka i temperature na kanabinoide u sCO₂ ekstraktima

Opće je poznato da je konoplja glavni izvor kanabinoida koji se mogu analizirati tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. U ispitivanim sCO₂ ekstraktima ustanovljena je prisutnost glavnih kanabinoida koji uključuju kanabidiol (CBD), kanabidiolnu kiselinu (CBDA), tetrahidrokanabinol (THC), kanabikromen (CBC), kanabigerol (CBG), i kanabinol (CBN). Uz njih su identificirani i neki manje zastupljeni, kao što je kanabigerolna kiselina (CBGA), kanabikromenska kiselina (CBCA), kanabidivarna kiselina (CBDVA) i tetrahidrokanabinolna kiselina A (THCA-A). Udjeli kanabinoida u sCO₂ ekstraktima prikazani su u Tablici 12.

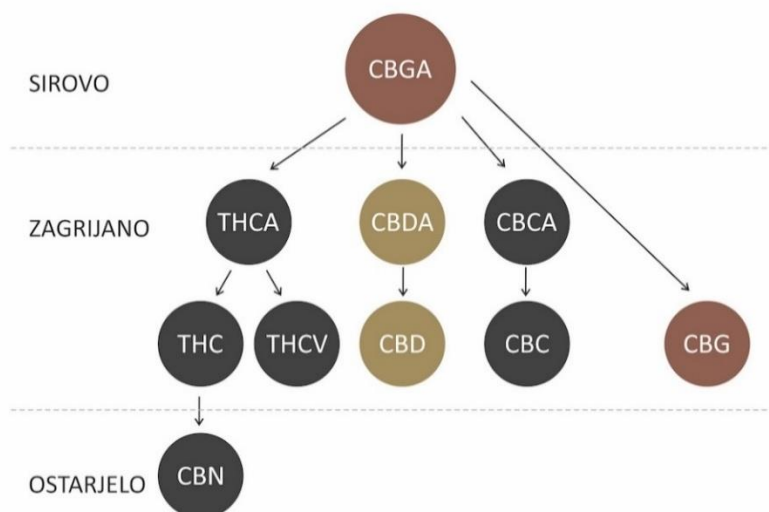
Tablica 12. Udjeli kanabinoida (%) u dobivenim sCO₂ ekstraktima prema CCD

E	CBCA	CBG	CBN	THC	CBDVA	CBD	CBDA	CBGA	THCVA	CBC	THCA-A
1	1,98	0,55	0,00	0,66	0,20	3,39	30,68	0,23	0,00	1,21	1,17
2	0,03	0,27	0,00	0,65	0,29	3,45	27,48	0,51	0,00	1,12	0,05
3	1,15	0,43	0,00	0,65	0,00	4,42	21,23	0,11	0,00	1,43	1,47
4	0,33	0,29	0,00	0,22	0,00	0,80	6,32	0,00	0,00	0,61	1,45
5	0,05	0,69	0,00	0,90	0,14	6,58	17,71	0,17	0,00	1,23	0,06
6	0,60	0,44	0,00	0,44	0,11	1,71	11,08	0,00	0,00	1,13	0,60
7	1,79	0,68	0,00	0,89	0,17	5,01	30,63	0,17	0,00	1,42	1,45
8	0,00	0,71	0,00	1,02	0,29	5,22	29,30	0,45	0,00	1,29	1,04
9	0,01	0,56	0,00	0,41	0,00	3,78	9,30	0,00	0,00	0,75	0,05
10	0,00	0,37	0,00	0,44	0,00	2,01	30,64	0,00	0,00	0,67	0,55
11	1,42	0,54	0,00	0,71	0,14	3,97	24,27	0,14	0,00	1,13	1,38
12	1,11	0,52	0,00	0,76	0,00	4,41	25,58	0,29	0,00	1,10	1,27
13	1,37	0,53	0,00	0,72	0,00	4,47	26,50	0,20	0,00	1,42	1,31
Cvat*	1,59	0,12	0,19	0,18	0,11	0,59	14,02	0,32	0,00	0,28	0,40

E- ekstrakt; *uzorak se odnosi na polazni material u postupku svih sCO₂ ekstrakcija; cvatovi industrijske konoplje

THCVA nije detektirana u sCO₂ ekstraktima kao ni u polaznoj sirovini (cvatovima industrijske konoplje) iz koje je provedena ekstrakcija. Budući da se radi o industrijskoj konoplji, neki od kanabinoida, poput THC-a (0,22-1,02 %), su očekivani u malim količinama. CBN u ekstraktima nije bio prisutan, što dokazuje da biljni materijal nije bio dugo skladišten da bi nastao razgradnjom. CBDA je bio dominantan spoj u biljnom materijalu (14,02 %), međutim, udio CBD-a kao njegovog produkta bio je svega 0,59 %. Nadalje, važno je osvrnuti se i na druge kanabinoide prisutne u ekstraktima jer se smatra da oni sinergijski djeluju te tako doprinose farmakološkim učincima konoplje. Udio CBG-a u cvatu industrijske konoplje iznosio je 0,12 %, dok su udjeli u sCO₂ ekstraktima bili nešto veći (0,27-0,69%). Za razliku od CBD-a, djelovanje CBG-a nije toliko istraženo, što će se sigurno u budućnosti promijeniti s obzirom na sve veći interes za CBG. Udio CBC-a u cvatu iznosio je 0,28 %, a vidljivo je njegovo povećanje u samim ekstraktima od 0,61% do 1,43% u ovisnosti o primjenjenom tlaku i temperaturi ekstrakcije. Određeni udio CBCA, kao glavnog prekursora, u biljnom materijalu iznosio je 1,59 %, dok su ekstrakti sadržavali CBCA u širokom rasponu od 0-1,98 %. U biljnom materijalu i ekstraktima

detektirani su također i kiselinski oblici drugih kanabinoida, ali u različitim količinama. Primjerice, udio CBGA je u polaznoj sirovini iznosio 0,32 %, a sCO₂ ekstrakti sažavali su 0-0,51 % CBGA. Tako je udio THCA-A u biljnom materialu iznosio 0,40 %, a u ekstraktima 0,05-1,47 %. Nadalje, iz rezultata u Tablici 12 može se vidjeti da je sadržaj ukupnih kanabidiola (CBD+CBDA) vrlo dobro ekstrahiran pomoću sCO₂. Udio CBDA bio je u rasponu od 6,32 % do 30,63 % u ovisnosti o primijenjenom tlaku i temperaturi, dok je sadržaj CBD-a iznosio 0,80-6,58 %. Dominantna prisutnost CBDA-a u odnosu na CBD je očekivan budući da prethodno nije provedena dekarboksilacija. Slika 17 zorno prikazuje nastanak kanabinoida iz CBGA kao glavnog prekursora kanabinoidnih kiselina, koje se pod utjecajem visoke temperature razgrađuju do svojih dekarboksiliranih analoga, primjerice THC-a i CBD-a (25). Kada THC oksidira uslijed izlaganja zraku i svjetlosti, razgradnjom nastaje CBN. Dakle, udio CBN-a se povećava što se više THC-a razgrađuje, a posebice je zastupljen u osušenim konopljinim cvatovima koji su dugo skladišteni. Dobri uvjeti skladištenja u hermetički zatvorenim posudama spriječit će stvaranje CBN-a koji u velikim količinama može izazvati paranoju. Prethodno su već spomenuta biološka djelovanja kanabinoida, a za industrijsku konoplju je posebice važan udio CBD-a i njegovog kiselog prekursora (CBDA) kojima se pripisuju analgetska, antibakterijska, antidijabetička, antiepileptička, protuupalna, antiproliferativna i antipsihotična svojstva (110).



Slika 17. Shema pretvorbe kanabinoida pod utjecajem temperature

Glavni fokus ovog istraživanja bio je dobivanje prirodnih ekstrakata bogatih terpenima i kanabinoidima te CBD-om kao ciljanim kanabinoidom. Nedavno objavljen pregledni rad ukazao je na veliki potencijal primjene biljnih sCO₂ ekstrakata kao sastojka učinkovitih i sigurnih kozmetičkih proizvoda (111). Upravo je CBD postao vrlo poželjan prirodni sastojak suvremenih kozmetičkih proizvoda zbog svojih protuupalnih i analgetskih učinaka te svojstva hidratiziranja kože i smanjenja bora (4). Stoga se na tržištu pojavljuje sve više proizvoda za njegu i ublažavanje starenja kože s ekstraktom konoplje ili čistog CBD-a, čemu najviše pridonose njihova snažna antioksidacijska svojstva. Nadalje, istražuje se i primjena CBD-a kod kožnih problema kao što su akne, dermatitis, psorijaza i druge bolesti, budući da CBD djeluje u staničnim procesima koji dovode do stvaranje akni, seboreje, psorijaze i dermatitisa (3, 4, 45). U tom kontekstu, ističe se veliki potencijal primjene sCO₂ ekstrakata konoplje u pripravcima za primjenu na kožu, a sCO₂ ekstrakcija se nameće kao suvremena tehnika koja osigurava dobivanje sigurnih ekstrakata za medicinsku i kozmetičku primjenu (63, 111).

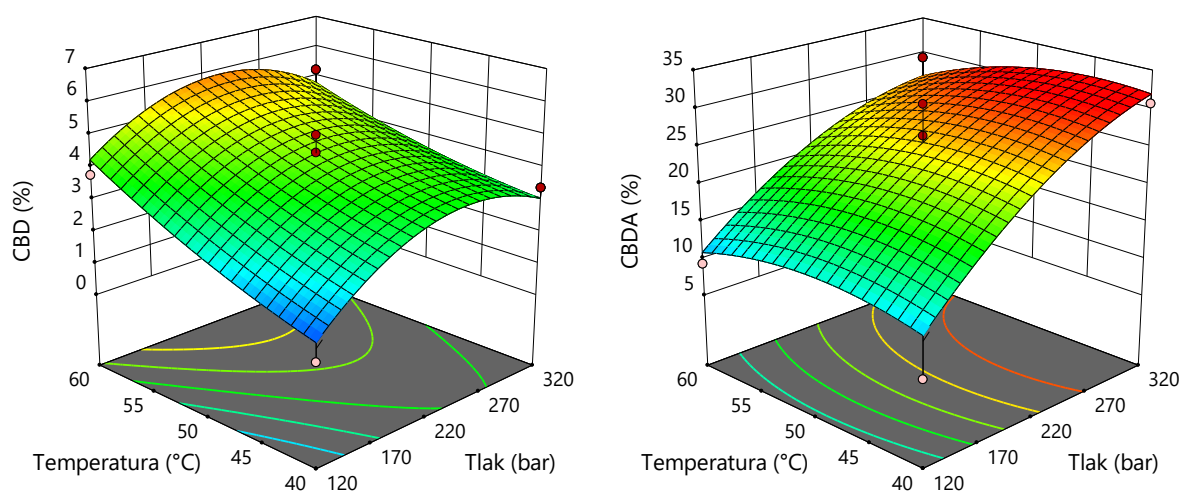
Zbog svega navedenog, u ovom istraživanju CBD je bio ciljani kanabinoid u procesu optimizacije u koju je uključen i CGDA kao njegov prekursor. Pri procjeni statističke značajnosti regresijskih jednadžbi za odabrane odzive (CBD i CBDA) korištena je ANOVA (Tablica 13).

Tablica 13. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za CBD i CBDA

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost*
CBD					
model	27,07	5	5,41	17,00	0,0009
X ₁	2,48	1	2,48	7,79	0,0269
X ₂	10,66	1	10,66	33,48	0,0007
X ₁ ²	0,3306	1	0,3306	1,04	0,3422
X ₂ ²	12,36	1	12,36	38,81	0,0004
X ₁ X ₂	0,4159	1	0,4159	1,31	0,2907
ostatak	2,23	7	0,3185		
nedostatak modela	1,68	3	0,5609	4,10	0,1031
pogreška	0,5467	4	0,1367		
ukupno	29,30	12			
R ² =0,9239					
CBDA					
model	762,17	5	152,43	8,37	0,0072
X ₁	648,40	1	648,40	35,59	0,0006

X_2	18,66	1	18,66	1,02	0,3452
X_1^2	4,75	1	4,75	0,2609	0,6252
X_2^2	66,76	1	66,76	3,66	0,0971
$X_1 X_2$	34,61	1	34,61	1,90	0,2106
ostatak	127,52	7	18,22		
nedostatak modela	80,55	3	26,85	2,29	0,2206
pogreška ukupno	46,97	4	11,74		
ukupno	889,69	12			
$R^2=0,8567$					

Regresijski modeli za oba ispitivana odziva bili su visoko statistički značajni prema p -vrijednostima (0,0009 za CBD i 0,0072 za CBDA), uz zadovoljavajuće koeficijente determinacije (R^2). Odstupanje od modela ($p > 0,05$) za svaki odziv naglašava da je polinomski model drugog reda prikladan i da bi se mogao koristiti za predviđanje eksperimentalnih vrijednosti. Vidljivo je također da su linearni član tlaka i temperature, kao i kvadratni član temperature imali statistički značajan utjecaj na udio CBD-a u sCO_2 ekstraktima. Kad je u pitanju CBDA, samo je tlak imao statistički značajan utjecaj ($p = 0,0006$), a Slika 18 pokazuje jasan trend učinkovitije ekstrakcije CBDA-e pri višim tlakovima. Na istoj se slici može uočiti da se općenito povećanjem temperature, ali i tlaka do 250 povećava udio CBD-a, dok daljnje povećanje tlaka dovodi do blagog opadanja u udjelima CBD-a. Nadalje, interakcije između tlaka i temperature nisu pokazale statistički značajan utjecaj na udjele CBDA i CBD u ekstraktima dobivenim pomoću sCO_2 .



Slika 18. Trodimenzionalni dijagram odzivnih površina CBD i CBDA u ovisnosti o tlaku i temperaturi ekstrakcije

Kitrytè i sur. (89) su pokazali da u sCO₂ ekstraktima industrijske konoplje pretežno dominiraju CBD i CBDA. Oni su ekstrahirali 93 % dostupnog CBD-a i CBDA iz biljnog materijala koji su činili oko 28 % ukupnog ekstrakta. Zaključili su da povećanje tlaka dovodi do smanjenja sadržaja kanabinoida u ekstraktu. Najveći sadržaj kanabinoida dobiven je u ekstraktu pri najnižem ispitivanom tlaku (100-500 bara) i temperaturi (35-75 °C) te iznosi 64,18 mg/g (89). Za razliku od navedenog, većina ostalih autora zaključuju da viši tlakovi pogoduju učinkovitijoj ekstrakciji kanabinoida. Tako su Vági i sur. (112) pokazali da su tlak od 350 bara i temperatura 45 °C prikladni parametri ekstrakcije kanabinoida s visokim prinosom, a da daljnje povećanje tlaka više nema utjecaja. Rovetto i Aieta (83) su najbolje rezultate postigli pri 340 bara i 55 °C, bez dodatka suotapala. Omar i sur. (113) su ispitali superkričnu ekstrakciju kanabinoida iz 13 različitih uzoraka medicinske konoplje, uz analizu utjecaja različitih procesnih parametara na prinos i kvalitetu ekstrakta (tlak od 100-250 bara, temperaturu od 35-55 °C i etanol kao suotapalo 0- 40%). Sadržaj CBD-a u dobivenim ekstraktima bio je između 1 mg/g i 13 mg/g. Perrotin-Brunel i sur. (114) pokazali su da topljivost CBD-a u sCO₂ raste s tlakom. Zanimljivo je da se najveća topljivost CBD-a postignuta na srednjoj temperaturi (53 °C). Ovo posebno ponašanje je teorijski moguće te je i ranije već uočeno u slučaju topljivosti CBN-a u sCO₂. Razlog ovoj neuobičajenoj pojavi mogao bi biti prijelaz iz ravnoteže krutina-superkrična tekućina u ravnotežu tekućina-superkrična tekućina. Talište čistog CBD-a (67 °C) i čistog CBN-a (77 °C) je blizu eksperimentalne temperature od 61 °C. Učinak smanjenja taljenja CO₂ mogao je izazvati taljenje na 61 °C, što je rezultiralo nižom topljivošću.

4.2. Antioksidacijska i antibakterijska aktivnost sCO₂ ekstrakata

Antioksidacijska aktivnost sCO₂ ekstrakata u koncentraciji od 250 µg/mL izražena je kao postotak inhibicije DPPH radikala (%) i prikazana u Tablici 14. Među ispitivanim ekstraktima, ekstrakt dobiven u eksperimentu broj 1 (320 bara; 40 °C), s najvišim sadržajem CBDA od 305,8 µg/mg, pokazao je najveću antioksidacijsku aktivnost (98,06 ± 0,92%). Najmanji antioksidacijski učinak (87,56 ± 0,69 %) utvrđen je za ekstrakt broj 4 (120 bara; 40 °C), s CBDA

udjelom od 87,56 µg/mg. Iz ovih rezultata te iz statističkih podataka danih u Tablici 13 može se zaključiti da je tlak imao najveći utjecaj na antioksidacijsku aktivnost. Ono što je vidljivo i na Slici 18, s povećanjem tlaka dobivaju se ekstrakti s boljim antioksidacijskim svojstvima.

Tablica 14. Antioksidacijska aktivnost sCO₂ ekstrakata izražena kao postotak inhibicije DPPH radikala (%) pri koncentraciji 250 µg/mL

Br. E	Inhibicija DPPH radikala (%)
1	98,06 ± 0,92
2	96,85 ± 1,37
3	95,58 ± 0,57
4	87,56 ± 0,69
5	94,17 ± 1,12
6	89,00 ± 1,87
7	97,85 ± 0,29
8	97,99 ± 0,92
9	89,07 ± 0,97
10	93,28 ± 0,87
11	97,20 ± 0,39
12	94,93 ± 0,54
13	97,09 ± 1,08

Br. E – broj eksperimenta; srednje vrijednosti izražene u postotcima (%) ± S.D

Dawidowicz i sur. (115) otkrili su da CBG, CBD, Δ9-THC, CBN, CBGA, CBDA i Δ9-THCA pokazuju antioksidacijsko djelovanje koje se očituje u njihovoj sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, redukcije metalnih iona i preveniranja procesa oksidacije. U ekstraktu broj 1 s najboljim učinkom je također određen visok sadržaj THCA-A od 11,7 µg/mg. McPartland i sur. (18) su istaknuli da THCA-A stabilnost u biljci postiže uz terpene koji služe kao zaštitni antioksidansi i vjerojatno inhibiraju dekarboksilaciju THCA u THC.

Antibakterijski učinak sCO₂ ekstrakata ispitan je u uvjetima *in vitro* na vrste *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus*. Rezultati su prikazani u Tablici 15 u kojoj su dane minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, engl. *minimal inhibitory concentration*) izražene u µg/mL.

Tablica 15. Minimalna inhibitorna koncentracije (MIC) sCO₂ ekstrakata protiv *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, i *Staphylococcus aureus* (µg/mL).

Br. eks.	MIC (µg/mL)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	36,64	36,64	18,32	36,64
2	33,01	33,02	33,02	66,03
3	28,11	28,11	28,11	28,11
4	19,20	38,41	19,20	19,20
5	23,44	23,44	23,44	46,88
6	10,42	10,42	10,42	20,84
7	17,59	29,59	29,59	29,59
8	14,67	58,70	29,35	29,35
9	13,79	27,58	13,79	13,79
10	24,95	24,95	24,95	24,95
11	16,74	33,48	33,48	33,48
12	17,08	34,16	34,16	34,16
13	12,02	48,09	24,05	24,05
C	0,781	0,781	0,781	1,563

C- ciprofloksacin

Svi ispitani sCO₂ ekstrakti pokazali su dobro antibakterijsko djelovanje na sve ispitane bakterijske sojeve. Ekstrakti su bili aktivniji protiv gram-pozitivnih bakterija nego protiv gram-negativnih bakterija. Najbolja antibakterijska aktivnost zabilježena je pri djelovanju na vrstu *B. subtilis* (stoga su ovi podaci korišteni za daljnju analizu i optimizaciju), a najniža aktivnost protiv bakterije *P. aeruginosa*. Razlog nejednakoj osjetljivosti bakterija na djelovanje ekstrakata može se povezati s razlikama u građi stanične stijenke. Gram-negativne bakterije imaju lipopolisaharidni sloj koji onemogućuje pasivnu difuziju hidrofobnih tvari u bakterijsku stanicu. Osjetljivost na određene antibakterijske tvari se može povećati inhibicijom sinteze ili transporta lipopolisaharida (116). Kao što je već navedeno, kanabinoidi se smatraju odgovornim za biološku aktivnost konoplje. CBD-u se pripisuje najveći potencijal u farmaciji, iako istraživanja pokazuju da CBG i CBC pokazuju snažno antibakterijsko djelovanje (117). Appendino i sur. (118) odredili su antibakterijsku aktivnost pet glavnih kanabinoida (CBD, CBC, CBG, THC i CBN) na šest sojeva *Staphylococcus aureus* otpornih na meticilin (MRSA). Svi su pokazali antibakterijsku aktivnost u rasponu vrijednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) od

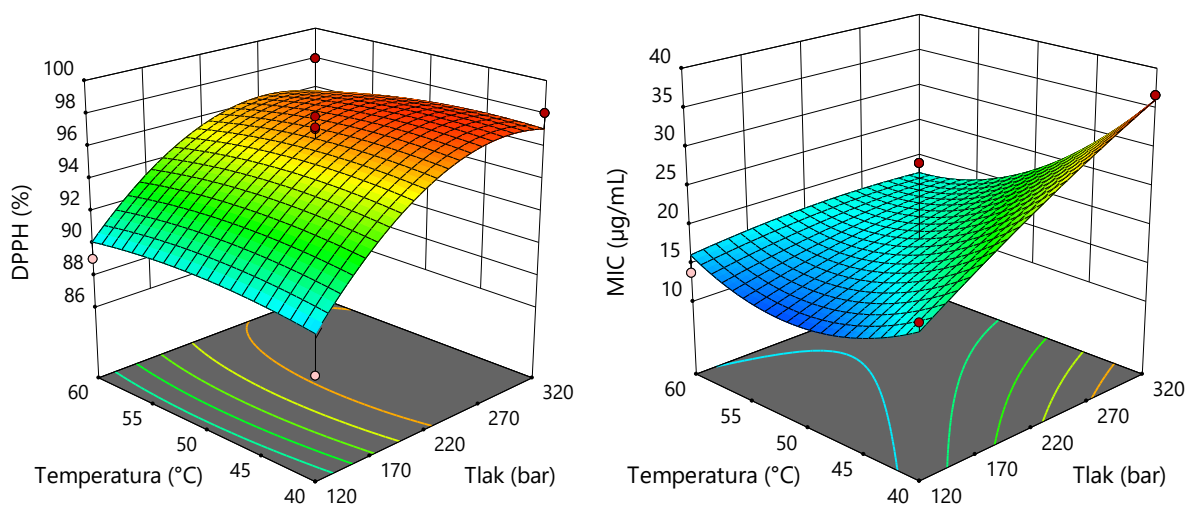
0,5-2 µg/mL. MIC je najniža koncentracija tvari koja sprječava vidljiv rast bakterija. U ovom istraživanju najniža MIC vrijednost (10,42 µg/mL) protiv vrste *S. aureus* dobivena je za ekstrakt broj 6, što odgovara sadržaju CBD-a od 0,7 µg/mL. Osim kanabinoida, hlapljivi terpeni prisutni u konoplji su vrlo značajna kemijska klasa spojeva antimikrobnih svojstava. Ističe se udio α -pinena, β -mircen i α -terpinolena iz skupine monosaharida, dok su β -kariofilen i α -humulen glavni seskviterpeni (119-122). Rezultati prikazani u Tablici 15 pokazuju da sCO₂ ekstrakti konoplje mogu biti vrlo učinkovita antibakterijska sredstva. Najučinkovitiji ekstrakt broj 6 ima najveći udio CBD-a od 67,15 µg/mg te udjele 12,88 µg/mg α -pinena, 7,78 µg/mg β -pinena 33,45 µg/mg β -mircena i 6,65 µg/mg limonena. U eksperimentu broj 6 korišten je najniži tlak (78,6 bara), što dokazuje da su niži tlakovi poželjni za dobivanje ekstrakata s boljim antibakterijskim djelovanjem. Na Slici 19 je također vidljivo da povećanjem tlaka rastu MIK vrijednosti, odnosno smanjuje se antibakterijski učinak.

Prema ANOVI (Tablica 16), linearni član tlaka i temperature pokazao je statistički značajan utjecaj na MIC aktivnost, kao i njihova međusobna interakcija dok su jedino linearni član tlaka ($p = 0,0039$) te kvadratni član temperature ($p = 0,0117$) pokazali statistički značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost dobivenih ekstrakata. S porastom tlaka raste značajno antioksidacijska aktivnost ekstrakata što je vidljivo sa Slike 19.

Tablica 16. Statistička analiza (ANOVA) prikladnosti aproksimacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti za antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost.

Izvor varijabilnosti	SS	df	MS	F-vrijednost	p-vrijednost*
DPPH					
model	134,67	5	26,93	5,93	0,0185
X ₁	81,11	1	81,11	17,87	0,0039
X ₂	0,6904	1	0,6904	0,1521	0,7081
X ₁ ²	0,6241	1	0,6241	0,1375	0,7217
X ₂ ²	51,99	1	51,99	11,45	0,0117
X ₁ X ₂	2,09	1	2,09	0,4616	0,5187
ostatak	31,77	7	4,54		
nedostatak modela	25,80	3	8,60	5,77	0,0619
pogreška	5,97	4	1,49		
ukupno	166,44	12			
R ² =0,8091					
MIC (<i>B. subtilis</i>)					

model	620,02	5	124,00	5,05	0,0280
X_1	188,85	1	188,85	7,70	0,0275
X_2	209,24	1	209,24	8,53	0,0223
X_1^2	68,56	1	68,56	2,79	0,1385
X_2^2	4,25	1	4,25	0,1732	0,6898
$X_1 X_2$	140,15	1	140,15	5,71	0,0482
ostatak	171,75	7	24,54		
nedostatak modela	31,65	3	10,55	0,3012	0,8241
pogreška ukupno	140,10	4	35,03		
$R^2=0,7831$	791,78	12			



Slika 19. Trodimenzionalni dijagrami odzivnih površina u ovisnosti o tlaku i temperaturi ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost (a) i antibakterijsku aktivnost (protiv *B. subtilis*) (b).

Zanimljiva je studija koju su proveli Blaskovich i sur. (123) u kojoj je CBD pokazao antibakterijsko djelovanje protiv širokog spektra Gram-pozitivnih bakterija, dok je izostao učinak na 20 vrsta Gram-negativnih bakterija, uključujući *E. coli* i *P. aeruginosa*. Prema rezultatima dobivenim u ovom radu, čini se da sadržaj CBD-a i najzastupljenijih terpena utječe na antibakterijsko djelovanje sCO₂ ekstrakta konoplje. No, ne može se sa sigurnošću tvrditi da veći sadržaj ovih komponenti poboljšava antibakterijsko djelovanje, budući da dobiveni ekstrakti sadrže i mnoge druge bioaktivne sastavnice, primjerice polifenole. Dobiveni rezultati u suglasju su s rezultatima istraživanja koje su proveli Issepi i sur. (124). Otkrili su da, za razliku od ekstrakta konoplje, CBD nije pokazao značajnu aktivnost prema sojevima *Staphylococcus*, pa se može zaključiti da terpeniski spojevi sinergistički djeluju s CBD-om. U drugoj studiji

Nissen i sur. (122) su pokazali antibakterijska aktivnost CBD-a i za monoterpena (α -pinen, β -pinen i β -mircen), posebice prema sojevima *Listeria* i *Enterococcus*.

4.3. Optimizacija procesa sCO₂ ekstrakcije

Optimizacija je neophodan korak u svakoj analitičkoj tehnici ili industrijskom procesu. U prošlosti se optimizacija tradicionalno provodila praćenjem utjecaja jednog parametra (varijable) na eksperimentalni odziv, pri čemu se mijenjao samo jedan parametar, dok su drugi održavani konstantnim. Osnovni nedostatak ove vrste optimizacije bio je što ne uključuje interaktivnost među ispitivanim varijablama. Pored toga, bilo je potrebno provesti veći broj eksperimenata, što znatno poskupljuje istraživanje. Ovaj problem je prevladan primjenom multivarijantnih statističkih tehnika poput metoda odzivnih površina (engl. *response surface methodology*, RSM) (125). Ova metoda predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika utemeljenih na uklapanju polinomske jednadžbe u eksperimentalne podatke, a koji moraju opisati ponašanje skupa podataka s ciljem izrade statističkih predviđanja. Primjenom RSM-a moguće je definirati utjecaj nezavisnih varijabli na zavisne te istovremeno optimirati razine varijabli kako bi se postigla najbolja učinkovitost procesa (126).

Optimizacijom procesnih parametara tlaka i temperature moguće je utjecati na svojstva sCO₂ i ekstrahirati određene bioaktivne spojeve, uključujući i kemijski osjetljive, što ovu tehniku čini vrlo učinkovitom i selektivnom (2, 58). Primijenjena numerička optimizacija sCO₂ ekstrakcije odabranih bioaktivnih spojeva i bioloških aktivnosti ekstrakata cvatova industrijske konoplje omogućila je provedbu procesa na najučinkovitiji način koji vodi do maksimalnog željenog učinka uz minimalne ulazne parametre. Cilj ovog rada bio je pronaći optimalne parametre za više ciljanih odziva. Prvi optimalni parametri su postavljeni s ciljem dobivanja ekstrakata s boljim prinosom ekstrakcije, bogatih CBD-om te s dobrim antioksidacijskim i antibakterijskim djelovanjem. Stoga je odabrana maksimalna vrijednost za prinos ekstrakcije u numeričkoj optimizaciji. Najbolja antibakterijska aktivnost u dobivenim ekstraktima sCO₂ uočena je protiv bakterije *B. subtilis*, te je u numeričkoj optimizaciji odabrana minimalna vrijednost, a za antioksidacijsko djelovanje maksimalna. Dodatna namjera je bila dobiti što veći udio CBD-a u

ekstraktima s potencijalnom primjenom na kožu, stoga je CBD uzet u obzir u procesu optimizacije. Optimalni uvjeti za sve odabrane slučajeve optimizacije dani su u Tablici 17.

Tablica 17. Optimalni uvjeti sCO₂ ekstrakcije u zavisnosti o ciljanim varijablama

Ciljana vrijednost	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	D*
Maksimalni prinos ekstrakcije, maksimalni udio CBD, maksimalna antioksidacijska aktivnost, minimalna MIC	284,78	60	0,817
Maksimalni prinos ekstrakcije, maksimalni udio CBD i CBDA, maksimalna antioksidacijska aktivnost, minimalna MIC	294,1	58,9	0,815
Maksimalni prinos ekstrakcije, maksimalni udio monoterpena, maksimalna antioksidacijska aktivnost, minimalna MIC	131,2	60	0,521
Maksimalni prinos ekstrakcije i udio seskviterpena, maksimalna antioksidacijska aktivnost, minimalna MIC	319,7	58,2	0,892
Maksimalni prinos ekstrakcije, maksimalni udio terpena i kanabinoida, maksimalna antioksidacijska aktivnost, minimalna MIC	166,9	55,7	0,503

*ukupna željena funkcija (engl. *desirability function*)

Druga optimizacija je postavljena tako da su CBD i CBDA bile ciljane komponente u ekstraktima jer su obje biološki aktivne. CBDA je sklona razgradnji u svoj odgovarajući dekarboksilirani analog CBD, što je bio i cilj daljnjeg eksperimenta sa dekarboksilacijom kao predtretmanom prije sCO₂ ekstrakcije. Može se vidjeti da se u obje optimizacije dobivaju vrlo slične vrijednosti za optimalni tlak (oko 300 bar) i temperaturu (oko 60 °C). Treća optimizacija provedena je s ciljem dobivanja ekstrakata bogatih monoterpenima (fokus je bio na najzastupljenijim: α-pinen, β-pinen, β-mircen i limonen). Četvrta optimizacija imala je cilj dobiti ekstrakate bogate seskviterpenima. U Tablici 17 je vidljivo da je optimalna temperatura za sve terpene iznosila 60 °C. Tlak niži od 131,2 bara bio je optimalan za sCO₂ ekstrakte bogate monoterpenima, a viši tlak od 319,7 bara za ekstrakte bogate seskviterpenima. Ranije je objašnjeno da je za različite skupine terpena uočen suprotan učinak tlaka na njihov udio. U slučaju monoterpena vidljivo je da s porastom tlaka njihov sadržaj opada, dok se kod seskviterpena povećava. Konačni optimalni parametri ekstrakcije s očekivanom nižom

funkcijom poželjnosti (0,503), što je bilo i za očekivati kada je u izračunu uključeno mnogo ciljanih varijabli, dobiveni su u slučaju kada je cilj dobiti sCO₂ ekstrakte s maksimalnom količinom terpena i kanabinoida, s visokim prinosom ekstrakcije te visokim antioksidacijskim i antibakterijskim djelovanjem. Omar i sur. (113) proveli su optimizaciju za uzorke marihuane i uočili dva suprotna trenda za terpene i kanabinoide te zaključili da su potrebni različiti optimalni uvjeti ekstrakcije (u smislu parametara ekstrakcije), ovisno o prirodi ciljanog spoja. U konačnici tlak od 100 bara i temperatura od 35 °C odabrani su kao optimalni parametri za ekstrakciju i terpena i kanabinoida. Za industrijsku konoplju, u ovom radu temperatura ekstrakcije od 60 °C pokazala se optimalnom temperaturom u svim odabranim slučajevima optimizacije. To samo dokazuje da je svaki uzorak specifičan (od sorte, vremena berbe, dijela biljke iz kojeg se ekstrahira željena komponenta, metode sušenja itd.) i da se za svaki uzorak moraju provesti eksperimentalna ispitivanja prije nego što se donesu konačni zaključci.

4.4. Utjecaj predtretmana dekarboksilacijom na sastav sCO₂ ekstrakta

Iz prethodno opisanih istraživanja vidljivo je da je moguće dobiti sCO₂ ekstrakte bogate i kanabinoidima i terpenima (tzv. ekstrakti punog spektra). Daljnji korak eksperimenta bio je dobiti ekstrakt bogat CBD-om kao potencijalna sastavnica medicinskih i kozmetičkih pripravaka budući da je CO₂ zeleno otapalo, a ekstrakt koji se dobiva potpuno prirodan bez zaostajanja štetnog otapala. Da bi dobili CBD kao dominantnu komponentu u ekstraktu proveden je predtretman koji je prethodio sCO₂ ekstrakciji, a to je proces dekarboksilacije koji podrazumijeva da se uzorak industrijske konoplje prvo zagrije u sušioniku na 120 °C tijekom 30-45 minuta, a potom tako osušen i usitnjen podvrgava superkritičnoj ekstrakciji. Konoplja u svom prirodnom obliku sadrži vrlo male količine CBD-a ili THC-a, ali zato sadrži njihove kiselinske oblike (CBDA i THCA). Povećanjem temperature dolazi do stvaranja odgovarajućih dekarboksiliranih analoga, npr. dominantno CBD-a ako se radi o industrijskoj konoplji ili THC-a ako se radi o medicinskoj konoplji. Kao što je već spomenuto, među kanabinoidima industrijske konoplje ističe se CBD koji se nalazi u brojnim topikalnim pripravcima. Stoga su

istraživanja koja uključuju suvremene metode ekstrakcije, izolacije i pročišćavanja CBD-a dobrodošla kako na nacionalnoj tako i na međunarodnoj razini (127).

Za procesne parametre ekstrakcije iz uzoraka na kojima je provedena dekarboksilacija odabrana je temperature od 60 °C te tlakovi od 290 bara i 130 bara. Navedeni parametri su odabrani sukladno dobivenim optimalnim vrijednostima za CBD i terpene (Tablica 17). Iz Tablice 18 vidljivo je da se u sCO₂ ekstraktu dobivenom pri tlaku od 290 bara nalazi CBD kao dominantni kanabinoid (68,3 %), a zatim CBC sa značajno manjim sadržajem (3,02 %). Kao što je navedeno u Tablici 12, u cvatovima konoplje dominantne komponente bile su CBDA (14,02 %) i CBCA (1,59 %) koje su povećanjem temperature prešle u odgovarajuće dekarboksilirane analoge. Uz CBD, CBC je također molekula s potencijalom primjene u njezi kože (128). Od ostalih kanabinoida u ekstraktu je bio prisutan još jedino THC (1,11 %).

Nadalje, pri tlaku od 130 bara i temperaturi od 60 °C, koji su određeni kao optimalni parametri za terpene (Tablica 17), provedena je također sCO₂ ekstrakcija uz prethodni proces dekarboksilacije radi usporedbe dobivenih vrijednosti koristeći HPLC i GC/MS. U tom su ekstraktu identificirani CBD (29,4 %) i CBC (5,48 %), dok THC-a niti drugih kanabinoida nije bilo (Tablica 18).

Tablica 18. Udio kanabinoida (%) u sCO₂ ekstraktu dobivenom nakon procesa dekarboksilacije

Talk (bar)	Kanabinoidi (%)										
	CBCA	CBG	CBN	THC	CBDVA	CBD	CBDA	CBGA	THCVA	CBC	THCA-A
290	-	-	-	1,11	-	68,3	-	-	-	3,02	-
130	-	-	-	-	-	29,4	-	-	-	5,48	-

S obzirom da dekarboksilacija podrazumijeva sušenje uzorka na povišenoj temperature, za očekivati je da značajno utječe i na sastav isparljivih spojeva u samom ekstraktu. Dobiveni rezultati nakon procesa dekarboksilacije ukazuju na utjecaj predtretmana u sušioniku na 120 °C tijekom 30-45 minuta na kemijski sastav hlapljivih komponenti u odnosu na njihov sastav bez predtretmana. U odnosu na uzorak prije tretmana, u ekstraktima su bili manje zastupljeni

monoterpeni koji su isparljiviji, što se osobito uočava kod udjela α -pinena, β -pinena i β -mircena. S druge strane, došlo je do porasta udjela manje isparljivih seksviterpena, posebice gvajola, γ -eudezmola, β -eudezmola, α -eudezmola, bulnesola, α -bisabolola i juniper kamfora (Tablica 19).

U ovom istraživanju dokazano je da se mijenjanjem procesnih parametara tlaka i temperature tijekom sCO₂ ekstrakcije, kao i predtretmanom poput postupka dekarboksilacije cvatova industrijske konoplje može doći do ekstrakata odnosno izolata bogatih ciljanim komponentama, što omogućuje preciznije doziranja u kozmetički pripravak.

Tablica 19. Udjeli terpena u sCO₂ ekstraktu dobivenom nakon procesa dekarboksilacije pri tlakovima od 290 i 130 bara

Br.	Spoj	RI	% (290 bar)	% (130 bar)
1.	α -pinen	941	0,60	1,45
2.	β -pinen	983	0,03	0,75
3.	β -mircen	993	0,69	2,32
4.	limonen	1033	0,03	0,44
5.	α -terpinolen	1091	-	0,13
6.	fenhol	1115	-	0,27
7.	borneol	1169	-	0,13
8.	heksil-butanoat	1193	-	0,11
9.	α -jilangen	1373	-	0,16
10.	<i>trans</i> -kariofilen	1419	1,35	8,16
11.	α -humulen	1454	0,63	3,70
12.	<i>trans</i> - β -farnezen	1460	-	1,85
13.	α -amorfen	1466	-	0,52
14.	γ -muurolen	1476	-	0,24
15.	β -eudezmen	1483	-	0,63
16.	β -selinen	1485	-	1,99
17.	valencen	1492	-	1,02
18.	α -selinen	1493	-	1,87
19.	(<i>E,E</i>)- α -farnezen	1509	-	1,68
20.	γ -kadinen	1515	-	0,43
21.	biciklogermakren	1517	-	1,35
22.	β -kadinen	1518	-	1,16
23.	δ -kadinen	1524	-	1,13
24.	γ -selinen	1535	2,82	9,44
25.	selina-3,7(11)-dien	1541	4,12	12,44
26.	(<i>E</i>)- α -bisabolen	1549	-	1,32
27.	germakren B	1556	-	0,26
28.	nerolidol	1566	0,40	0,88
29.	kariofilen oksid	1581	1,12	1,42

30.	gvajol	1601	13,86	8,64
31.	ledol	1599	-	0,22
32.	γ -eudezmol	1623	18,09	9,27
33.	10-epi- γ -eudezmol	1630	3,37	1,65
34.	dihidro- <i>cis</i> - α -copaen-8-ol	1634	1,12	0,59
35.	hinesol	1637	-	0,23
36.	β -eudezmol	1649	9,16	0,46
37.	α -eudezmol	1652	11,47	3,93
38.	bulnesol	1666	15,79	7,23
39.	α -bisabolol	1683	5,56	2,86
40.	juniper kamfor	1692	2,48	0,93
41.	heksahidrofarnezil- aceton	1846	0,43	0,56
42.	fitol	2116	0,66	0,37

Tablica 20. Antioksidacijska i antibakterijska aktivnost sCO₂ ekstrakata dobivenih nakon postupka dekarboksilacije

Tlak (bar)	MIC (μ g/mL)				DPPH (%)
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
290	7,81	0,98	3,91	7,81	99,03
130	12,02	6,01	12,02	12,02	93,85

Superkritični ekstrakti dobiveni iz dekarboksiliranih uzoraka cvatova konoplje pokazali su vrlo sličnu antioksidacijsku aktivnost koju su imali sCO₂ ekstrakti bez prethodne dekarboksilacija. Pri tlaku od 290 bara na 60°C dobivena je antioksidacijska aktivnost od 99,03 %, dok ekstrakt dobiven pri nižem tlaku od 120 bara pokazao je nešto slabija antioksidacijska svojstva inhibirajući 93,85 % DPPH slobodnog radikala (Tablica 20). Vidljiva je značajna razlika u antibakterijskoj aktivnosti sCO₂ ekstrakata protiv bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* u odnosu na podatke dobivene sa uzorcima na kojima nije provedena dekarboksilacija. Ekstrakt dobiven pri tlaku od 290 bara najbolje je inhibirao rast i razvoj sve četiri ispitivane bakterije, s najnižom MIC vrijednosti (0,98 μ g/mL) pri djelovanju na vrstu *S. aureus*.

5. ZAKLJUČAK

Slijedom rezultata dobivenih u ovom specijalističkom radu može se zaključiti sljedeće:

- Ekstrakcija primjenom sCO₂ pokazala se kao selektivna tehnika za dobivanja ekstrakata željenog sastava terpena i kanabinoida iz cvatova industrijske konoplje.
- GC-MS analizom ustanovljen je β-mircenski kemotip ekstrakata dobivenih iz sorte Futura 75, s visokim udjelom drugih monoterpena poput α-pinena i β-pinena, dok je najzastupljeniji seskviterpen bio β-kariofilen.
- Glavni kanabinoidi identificirani u sCO₂ ekstraktima bili su CBDA i CBD, a slijede ih manje zastupljeni CBCA, CBC, THCA-A, THC, CBGA, CBG, CBDVA, dok CBN i THCVA nisu detektirani.
- Najbolju antioksidacijsku aktivnost pokazao je sCO₂ ekstrakt dobiven pri tlaku 320 bara i temperaturi 40 °C, a najvećim udjelom CBDA.
- Svi ispitani ekstrakti pokazali su dobro antibakterijsko djelovanje na vrste *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus.*, a najbolja antimikrobna svojstva imao je sCO₂ ekstrakt s najvećim udjelom CBD-a te monoterpena α-pinena, β-pinena, β-mircena i limonena.
- Uspostavljeni su optimalni uvjeti za sCO₂ ekstrakciju kanabinoida i terpena iz industrijske konoplje. Temperatura od 60 °C pokazala se optimalnom za sve ispitivane odzive, dok je tlak pokazao različit učinak ovisno o ciljanim spojevima. Za monoterpene je bio optimalan niži tlak, dok je viši tlak omogućavao bolju ekstrakciju seskviterpena. Primjena viših tlakova bila je pogodnija i za ekstrakciju CBD-a.
- Postupkom dekarboksilacije, kao predtretmanom biljnog materijala prije procesa sCO₂ ekstrakcije, moguće je dobiti ekstrakte s visokim prinosom CBD-a kao dominantnom komponentom.

U okviru ovog rada optimiran je proces sCO₂ ekstrakcije industrijske konoplje da se dobiju željeni ekstrakti bogati ciljanim komponentama antioksidacijskih i antibakterijskih svojstava. Dobiveni rezultati ukazuju na veliki potencijal implementacije ovog zelenog postupka ekstrakcije kanabinoida i terpena iz industrijske konoplje u sustav proizvodnje ekstrakata koji će biti prihvatljivi za izradu medicinskih i kozmetičkih pripravaka.

6. LITERATURA

1. Montero L, Meckelmann SW, Kim H, Ayala-Cabrera JF, Schmitz OJ. Differentiation of industrial hemp strains by their cannabinoid and phenolic compounds using LC LC-HRMS. *Anal Bioanal Chem* 2022;414(18):5445-5459.
2. Ahmed ATMF, Islam MZ, Mahmud MS, Sarker ME, Islam MR. Hemp as a potential raw material toward a sustainable world: A review. *Heliyon* 2022;8(1):e08753.
3. Gupta AK, Talukder M. Cannabinoids for skin diseases and hair regrowth. *J Cosmet Dermatol* 2021;20(9):2703-2711.
4. Jhavar N, Schoenberg E, Wang JV, Saedi N. The growing trend of cannabidiol in skincare products. *Clin Dermatol* 2019;37(3):279-281.
5. Baswan SM, Klosner AE, Glynn K, Rajgopal A, Malik K, Yim S, Stern N. Therapeutic potential of cannabidiol (CBD) for skin health and disorders. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2020;13:927-942.
6. Adams TK, Masondo NA, Malatsi P, Makunga NP. *Cannabis sativa*: From therapeutic uses to micropropagation and beyond. *Plants (Basel)* 2021;10(10):2078.
7. Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlorporabe droga („Narodne novine“, br. 39/19); Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_04_39_799.html; Pristupljeno: 27. 06. 2022.
8. Hrvatska agencija za hranu. Znanstveno mišljenje o utjecaju na zdravlje različitih vrsta hrane od sjemenki i koja sadrži sjemenke industrijske konoplje. Dostupno na: <https://www.hah.hr/>; Pristupljeno: 20. 07. 2022.
9. Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry* 2006;28(2):153-157.
10. Brenneisen R. Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents. U: ElSohly MA. ur. *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey; 2007, str. 17-37.
11. Hazekamp A, Fishedick JT. *Cannabis*-from cultivar to chemovar. *Drug Test Anal* 2011;4(7-8):660-667.
12. Al Ubeed HMS, Bhuyan DJ, Alsherbiny MA, Basu A, Vuong QV. A comprehensive review on the techniques for extraction of bioactive compounds from medicinal cannabis. *Molecules* 2022;27(3):604.
13. Cerino P, Buonerba C, Cannazza G, D'Auria J, Ottoni E, Fulgione A, Di Stasio A, Pierri B, Gallo A. A review of hemp as food and nutritional supplement. *Cannabis Cannabinoid Res* 2021;6(1):19–27.
14. Flores-Sanchez IJ, Verpoorte R. Secondary metabolism in Cannabis. *Phytochem Rev* 2008;7(3):615–639.
15. Ross SA, ElSohly MA, Sultana GN, Mehmedic Z, Hossain CF, Chandra S. Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochem Anal* 2005;16(1):45–48.

16. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005;81(1):268–276.
17. Andre CM, Larondelle Y, Evers D. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review. *Curr Nutr Food Sci* 2010;6(1):2–12.
18. McPartland JM, Russo EB *Cannabis* and cannabis extracts: greater than the sum of their parts? *J Cannabis Ther* 2001;1:103–132.
19. Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol* 2011;163:1344–1364.
20. Scheau C, Badarau I, Mihai L, Scheau A, Costache DO, Constantin C, Calina D, Caruntu C, Costache R, Caruntu A. Cannabinoids in the pathophysiology of skin inflammation. *Molecules* 2020;25(3):652-675.
21. Pacher P, Kogan NM, Mechoulam R. Beyond THC and endocannabinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2020;60:637-659.
22. Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Mavzo V, Mechoulam R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:515–527.
23. Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:438–455.
24. Eisohly M, Gul W. Constituents of *Cannabis sativa*. U: Pertwee RG. ur. *Handbook of Cannabis* Oxford University Press; 2014, str. 3-22.
25. Citti C, Braghiroli D, Vandell MA, Cannazza G. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *J Pharm Biomed Anal* 2018;147:565–579.
26. De Petrocellis L, Ligresti A, Moriello AS, Allarà M, Bisogno T, Petrosino S, Stott CG, Di Marzo V. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br J Pharmacol* 2011;163(7):1479-1494.
27. Englund AM, Stone J, Morrison PD. Cannabis in the arm: what can we learn from intravenous cannabinoid studies? *Curr Pharm Design* 2012;18(32):4906–4914.
28. Burstein S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorgan Med Chem* 2015;23(7):1377–1385.
29. Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol Therap* 2012;133(1):79–97.
30. Yousaf M, Chang D, Liu Y, Liu T, Zhou X. neuroprotection of cannabidiol, its synthetic derivatives and combination preparations against microglia-mediated neuroinflammation in neurological disorders. *Molecules* 2022;27(15):4961.
31. Hrvatska agencija za hranu. Znanstveno mišljenje o utjecaju na zdravlje proizvoda od konoplje koji se konzumiraju (ulje, sjemenke), 2011. Dostupno na: <https://1library.net/document/z3lj6k8z-znanstveno-misljenje-znanstveno-misljenje-utjecaju-zdravlje-proizvoda-konzumiraju.html>; Pristupljeno 20. 07. 2022.

32. Maioli C, Mattoteia D, Amin HIM, Minassi A, Caprioglio D. Cannabinol: History, syntheses, and biological profile of the greatest "minor" cannabinoid. *Plants (Basel)* 2022;11(21):2896.
33. Patil AS, Mahajan UB, Agrawal YO, Patil KR, Patil CR, Ojha S, Sharma C, Goyal SN. Plant-derived natural therapeutics targeting cannabinoid receptors in metabolic syndrome and its complications: A review. *Biomed Pharmacother* 2020;132:110889.
34. Zagožen M, Čerenak A, Kreft S. Cannabigerol and cannabichromene in *Cannabis sativa* L. *Acta Pharm* 2020;71(3):355-364.
35. Udoh M, Santiago M, Devenish S, McGregor IS, Connor M. Cannabichromene is a cannabinoid CB₂ receptor agonist. *Br J Pharmacol* 2019;176(23):4537-4547.
36. Serafimovska T, Darkovska-Serafimovska M, Stefkov G, Arsova-Sarafinovska Z, Balkanov T. Pharmacotherapeutic considerations for use of cannabinoids to relieve symptoms of nausea and vomiting induced by chemotherapy. *Folia Med (Plovdiv)* 2020;62(4):668-678
37. Semlali A, Beji S, Ajala I, Rouabhia M. Effects of tetrahydrocannabinols on human oral cancer cell proliferation, apoptosis, autophagy, oxidative stress, and DNA damage. *Arch Oral Biol* 2021;129:105200.
38. Thurman M. Analysis of terpenes in hemp (*Cannabis sativa*) by gas chromatography/mass spectrometry: Isomer identification analysis. *Compr Anal Chem* 2020;90:197-233.
39. Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deans SG, Franz CM. Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour Fragr J* 2001;16:259–226.
40. Hanuš LO, Hod Y. Terpenes/Terpenoids in Cannabis: Are they important? *Med Cannabis Cannabinoids* 2020;3:25–60.
41. Tholl D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2015;148:63-106.
42. Mahmood F, Lim MM, Kirchof MG. A Survey of topical cannabis use in Canada. *J Cutan Med Surg* 2022;26(2):156-161.
43. Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, Sugawara K, Szöllös, AG, Czifra G, Pál B, Ambrus L, Kloepper J, Camera E, Ludovici M, PicardoM, Voets T, Zouboulis CC, Paus R, Bíró T. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest* 2014;124(9):3713-3724.
44. European Industrial Hemp Association. CosIng Catalogue includes entry for pure CBD. Dostupno na: <https://eiha.org/wp-content/uploads/2021/02/PRCOSCosIng-update02022021.pdf>; Pristupljeno: 20. 07. 2022.
45. Eagleston LRM, Kalani NK, Patel RR, Flaten HK, Dunnick CA, Dellavalle RP. Cannabinoids in dermatology: A scoping review. *Dermatol Online J* 2018;24(6):13030/qt7pn8c0sb.
46. Cintosun A, Lara-Corrales I, Popr E. Mechanisms of cannabinoids and potential applicability to skin diseases. *Clin Drug Investig* 2020;40(4):293-304.

47. Ali A, Akhtar N. The safety and efficacy of 3% Cannabis seeds extract cream for reduction of human cheek skin sebum and erythema content. *Pak J Pharm Sci* 2015;28(4):1389-1395.
48. Oláh A, Markovics A, Szabó-Papp J, Szabó PT, Stott C, Zouboulis CPD, Bíró T. Differential effectiveness of selected non-psychotropic phytocannabinoids on human sebocyte functions implicates their introduction in dry/seborrheic skin and acne treatment. *Exp Dermatol* 2016;25(9):701-707.
49. Formukong EA, Evans AT, Evans FJ. Analgesic and antiinflammatory activity of constituents of *Cannabis sativa* L. *Inflammation* 1988;12:361–371.
50. Wollenberg A, Seba A, Antal AS. Immunological and molecular targets of atopic dermatitis treatment. *Br J Dermatol* 2014;170(1):7-11.
51. Palmieri B, Laurino C, Vadala` M. A therapeutic effect of cbd-enriched ointment in inflammatory skin diseases and cutaneous scars. *Clin Ter* 2019;170:e93e9.
52. Reich A, Ständer S, Szepletowski JC. Pruritus in the elderly. *Clin Dermatol* 2011;29(1):15-23.
53. Derakhshan N, Kazemi M. Cannabis for refractory psoriasis. High hopes for a novel treatment and a literature review. *Curr Clin Pharmacol* 2016;11(2):146-147.
54. Wilkinson JD, Williamson E. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *J Dermatol Sci* 2007;45:87–92.
55. Armstrong JL, Hill DS, McKee CS, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Lopez-Valero I, Anagnostou ME, Babatunde F, Corazzari M, CPF Redfern, Velasco G, Lovat PE. Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. *J Invest Dermatol* 2015;135(6):1629-1637.
56. Maor Y, Yu J, Kuzontkoski PM, Dezube BJ, Zhang X, Groopman JE. Cannabidiol inhibits growth and induces programmed cell death in Kaposi Sarcoma-associated Herpesvirus-infected endothelium. *Genes Cancer* 2012;3(7-8):512-520.
57. Garcia-Gonzalez E, Selvi E, Balistreri E, Lorenzini S, Maggio R, Natale MR, Capecci PL, Lazzarini PE, Bardelli M, Laghi-Pasini F, Galeazzi M. Cannabinoids inhibit fibrogenesis in diffuse systemic sclerosis fibroblasts. *Rheumatology* 2009;48(9):1050-1056.
58. Jokić S. Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkričnim CO₂. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek 2011.
59. Mujić I, Jokić S. Ekstrakcija i ekstraktori biljnih sirovina. Studio HS internet, Osijek, 2018.
60. Mellou F, Varvaresou A, Papageorgiou S. Renewable sources: applications in personal care formulations. *Int J Cosmet Sci* 2019;41:517-525.
61. Márquez-Sillero I, Aguilera-Herrador E, Cárdenas S, Valcárcel M. Determination of parabens in cosmetic products using multi-walled carbon nanotubes as solid phase extraction sorbent and corona-charged aerosol detection system. *J Chromatogr A* 2010;1217,1–6.
62. Georgiev V, Slavov A, Vasileva I, Pavlov A. Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Eng Life Sci* 2018;18:779–798.

63. Cabaleiro N, De la Calle I, Bendicho C, Lavilla I. Current trends in liquid–liquid and solid–liquid extraction for cosmetic analysis: a review. *Anal Methods* 2013;5:323-340.
64. McChesney J., Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction?. *Phytochemistry* 2007;68:2015–2022.
65. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food Bioprod Process* 2018;109:52-73.
66. Vasiljević D, Bojović L. Organski i prirodni kozmetički proizvodi – koliko su zaista bezbedni? *Arh Farm* 2018;68:990–1007.
67. Sovilj MN. Critical review of supercritical carbon dioxide extraction of selected oil seeds. *Apteff* 2010;41:105-120.
68. Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S. Green solvents for green technologies. *J Chem Technol Biotechnol* 2015;90:1631-1639.
69. Fonseca-Santos B, Corrêa MA, Chorilli M. Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations. *Braz J Pharm Sci* 2015;51:17–26.
70. Cosmos-Standard. Cosmetics organic and natural standard. Brussels: European Cosmetics Standards Working Group, 2011. Dostupno na: <https://www.cosmos-standard.org/>; Pristupljeno 01. 07. 2022.
71. SpecialChem - The Universal Selection Source: Cosmetics Ingredients. Dostupno na: <https://cosmetics.specialchem.com>; Pristupljeno 01. 08. 2022.
72. Amaral LF, Moriel P, Foglio MA, Mazzola PG. Caryocar brasiliense supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:73.
73. Nian-Yian L, Peng WL, Mohd-Setapar SH, Idham Z, Yunus MAC, Muhamad II. Application of Rubber (*Hevea Brasiliensis*) seeds oil extracted using supercritical carbon dioxide in cosmetics. *Jurnal Teknologi* 2014;69:55–59.
74. Ribeiro AS, Estanqueiro M, Oliveira MB, Sousa Lobo JM. Main benefits and applicability of plant extracts in skin care products. *Cosmetics* 2015;2:48-65.
75. Sikora E, Michorczyk P, Olszańska M, Ogonowski J. Supercritical CO₂ extract from strawberry seeds as a valuable component of mild cleansing compositions. *Int J Cosmet Sci* 2015;37:574-578.
76. Marto J, Gouveia LF, Chiari BG, Paiva A, Isaac V, Pinto P, Simões, Almeida AJ, Ribeiro HM. The green generation of sunscreens: Using coffee industrial sub-products. *Ind Crop Prod* 2016;80:93–100.
77. Avşar G, Yüksel D, Emen F, Demirdöğen R, Yeşilkaynak T, Kahrıman L. Supercritical carbondioxide extraction of *Lavandula officinalis* (Lavender) and *Hypericum perforatum* (centaury) plants grown in mersin region: Investigation of antioxidant and antibacterial activities of extracts and usage as cosmetic preservatives in creams. *JOTCSA* 2018;5:1215-1220.
78. Faccio M. Plant complexity and cosmetic innovation. *IScience* 2020;23(8):101358.

79. Vidović S. Ekstrakcija, sastav, delovanje i moguće primene odabranih vrsta pečuraka. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad 2011.
80. Aladić K. Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis sativa* L.) ulja superkritičnim CO₂ iz pogače nakon hladnog prešanja. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek 2015.
81. Myers RH, Montgomery DC. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. John Wiley & Sons, New York, NY, 1995.
82. Perrotin-Brunel H, Kroon MC, van Roosmalen MJE, van Spronsen J, Peters CJ, Witkamp GJ. Solubility of non-psychoactive cannabinoids in supercritical carbon dioxide and comparison with psychoactive cannabinoids. J Supercrit Fluids 2010a;55(2):603-608.
83. Rovetto LJ, Aieta NV. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. J Supercrit Fluids 2017;129:16–27.
84. Gallo-Molina AC, Castro-Vargas HI, Garzón-Méndez WF, Martínez Ramírez JA, Rivera Monroy ZJ, King JW, Parada-Alfonso F. 2019. Extraction, isolation and purification of tetrahydrocannabinol from the *Cannabis sativa* L. plant using supercritical fluid extraction and solid phase extraction. J Supercrit Fluids 2019;146:208216.
85. Vági E, Balázs M, Komoczi A, Mihalovits M, Székely E. 2020. Fractionation of phytocannabinoids from industrial hemp residues with high-pressure technologies. J Supercrit Fluids 2020;164:104898.
86. Qamar S, Manrique YJ, Parekh HS, Falconer JR. Development and optimization of supercritical fluid extraction setup leading to quantification of 11 cannabinoids derived from medicinal cannabis. Biology 2021;10(6):481.
87. Valizadehderakhshan M, Shahbazi A, Kazem-Rostami M, Todd MS, Bhowmik A, Wang L. Extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. (Hemp) – Review. Agriculture 2021;11(5):384.
88. Drinić Z. Ekstrakcija industrijske konoplje (*Cannabis sativa* L.). Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2020.
89. Kitryté V, Bagdonaitė D, Venskutonis PR. Biorefining of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) threshing residues into cannabinoid and antioxidant fractions by supercritical carbon dioxide, pressurized liquid and enzyme-assisted extractions. Food Chem 2018; 267: 420–429.
90. Attard TM, Bainier C, Reinaud M, Lanot A, McQueen-Mason SJ, Hunt AJ. Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and cannabidiol (CBD) from hemp wastes. Ind Crops Prod 2018;112:38-46.
91. Isidore E, Karim H, Ioannou, I. Extraction of phenolic compounds and terpenes from *Cannabis sativa* L. by-products: From conventional to intensified processes. Antioxidants 2021;10,942.
92. Kovalchuk I, Pellino M, Rigault PO, van Velzen R, Ebersbach J, Ashnest JR, Mau M, Schranz ME, Alcorn J, Laprairie RB, McKay JK, Burbridge C, Schneider D, Vergara D, Kane NC, Sharbe TF. The genomics of cannabis and its close relatives. Ann Rev Plant Biol 2020; 71:713–739.

93. Allen KD, McKernan K, Pauli C, Roe J, Torres A, Gaudino R. Genomic characterization of the complete terpene synthase gene family from *Cannabis sativa*. PLoS One 2019;14: e0222363.
94. Booth JK, Page JE, Bohlmann J. Terpene synthases from *Cannabis sativa*. PLoS One 2017;12:e0173911.
95. Micalizzi G, Vento F, Alibrando F, Donnarumma D, Dugo P, Mondello L. *Cannabis sativa* L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. J Chromatogr A 2021;1637:461864.
96. Gulluni N, Re T, Loiacono I, Lanzo G, Gori L, Macchi C, Epifani F, Bragazzi N, Firenzuoli F. Cannabis essential oil: a preliminary study for the evaluation of the brain effects. Evid Based Complement Alternat Med 2018;2018:1709182.
97. Jansen C, Shimoda LMN, Kawakami JK, Ang L, Bacani AJ, Baker JD, Badowski C, Speck M, Stokes AJ, Small-Howard AL, Turner H. Myrcene and terpene regulation of TRPV1. Channels 2019;13,344–366.
98. Koziół A, Stryjewska A, Librowski T, Sałat K, Gawel M, Moniczewski A, Lochyński S. An overview of the pharmacological properties and potential applications of natural monoterpenes. Mini Rev Med Chem 2014;14:1156–68.
99. Salehi B, Upadhyay S, Orhan I, Jugran AK, Jayaweera SLD, Dias DA, Sharopov F, Taheri, Y, Martins N, Baghalpour N, Cho WC, Sharifi-Rad J. Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature. Biomolecules 2019;9:738.
100. Erasto P, Viljoen AM. Limonene: a review: biosynthetic, ecological and pharmacological relevance. Nat Prod Commun 2008;3:1193–202.
101. Sun J. D-limonene: safety and clinical applications. Alt Med Rev 2007;12:259–264.
102. Sharma C, Al Kaabi JM, Nurulain SM, Goyal SN, Kamal MA, Ojha S. Polypharmacological properties and therapeutic potential of β -caryophyllene: a dietary phytocannabinoid of pharmaceutical promise. Curr Pharm Des 2016;22:3237–3264.
103. Francomano F, Caruso A, Barbarossa A, Fazio A, La Torre C, Ceramella J, Mallamaci R, Saturnino C, Iacopetta D, Sinicropi MS. β -Caryophyllene: a sesquiterpene with countless biological properties. Appl Sci 2019;9(24):5420.
104. Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Jian-Zhong C, Xiang-Qun X, Altmann KH, Karsak M, Zimmer A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:9099–104.
105. Astani A, Reichling J, Schnitzler P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. Evid Based Complement Alternat Med 2011;2011:253643.
106. Yang Q, Wu J, Luo Y, Huang N, Zhen N, Zhou Y, Sun F, Li Z, Pan Q, Li Y. (–)-Guaiol regulates RAD51 stability via autophagy to induce cell apoptosis in nonsmall cell lung cancer. Oncotarget 2016;7:62585–62597.
107. Yang X, Zhu J, Wu J, Huang N, Cui Z, Luo Y, Sun F, Pan Q, Li Y, Yanga Q. (–)-Guaiol regulates autophagic cell death depending on mTOR signaling in NSCLC. Cancer Biol Ther 2018;19:706–714.

108. Lu Y-C. Studies on the chemical constituents of the essential oil of *Rhododendron tsinghaiense* Ching. *Acta Chim Sinica* 1980;38:241–249.
109. Sexton M, Shelton K, Haley P, West M. Evaluation of cannabinoid and terpenoid content: Cannabis flower compared to supercritical CO₂ concentrate. *Planta Med* 2018;84:234–241.
110. Chandra S, Lata H, ElSohly MA. *Cannabis sativa* L. - Botany and Biotechnology. Springer, Switzerland; 2017, str. 191-194.
111. Zorić M, Banožić M, Aladić K, Vladimir-Knežević S, Jokić S. Supercritical CO₂ extracts in cosmetic industry: Current status and future perspectives. *Sust Chem Pharm* 2022;27: 100688.
112. Vági E, Balázs M, Komoczi A, Kiss I, Mihalovits M, Székely E. Cannabinoids enriched extracts from industrial hemp residues. *Period Polytech Chem Eng* 2019;63:357–363.
113. Omar J, Olivares M, Alzaga M, Etxebarria N. Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC–MS. *J Sep Sci* 2013;36:1397–1404.
114. Perrotin-Brunel H, van Roosmalen MJE, Kroon MC, van Spronsen J, Witkamp GJ, Peters CJ. Solubility of cannabinol in supercritical carbon dioxide. *J Chemical Eng Data* 2010b;55:3704–3707.
115. Dawidowicz AL, Olszowy-Tomczyk M, Typek R. CBG, CBD, Δ9-THC, CBN, CBGA, CBDA and Δ9-THCA as antioxidant agents and their intervention abilities in antioxidant action. *Fitoterapia* 2021;152:104915.
116. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2013;16:779–785.
117. Leghissa A, Hildenbr ZL, Schug KAA. review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. *J Sep Sci* 2018;41:398– 415.
118. Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M, Smith E, Rahman MM. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod* 2008;71:1427-1430.
119. Fiorini D, Molle A, Nabissi M, Santini G, Benelli G, Maggi GM. Valorizing industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products: Cannabidiol enrichment in the inflorescence essential oil optimizing sample pre-treatment prior to distillation. *Ind Crops Prod* 2019;128: 581-589.
120. Hazekamp A, Fishedick JT, Llano Díez M, Lubbe A, Ruhaak RL. Chemistry of *Cannabis*. U: Mander L, Liu HW. ur. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. Elsevier: Kidlington, UK; 2010, str. 1034–1077.
121. Ibrahim EA, Wang M, Radwan MM, Wanas AS, Majumdar CG, Avula B, Wang YH, Khan IA, Chandra S, Lata H, Hadad GM, Abdel Salam RA , Ibrahim AK , Ahmed SA , ElSohly MA. Analysis of terpenes in *Cannabis sativa* L. using GC/MS: Method development, validation and application. *Planta Med* 2019;85:431–438.
122. Nissen L, Zatta A, Stefanini I, Grandi S, Sgorbati S, Biavati B, Monti, A. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia* 2010;81:413–419.

123. Blaskovich MAT, Kavanagh AM, Elliott AG, Zhang B, Ramu S, Amado M, Lowe GJ, Hinton AO, Thu Pham DM, Zuegg J, Beare N, Quach D, Sharp MD, Pogliano J, Rogers AP, Lyras D, Tan L, West NP, Crawford DW, Peterson ML, Callahan M, Thurn M. The antimicrobial potential of cannabidiol. *Commun Biol* 2021;4:7.
124. Iseppi R, Brighenti V, Licata M, Lambertini A, Sabia C, Messi P, Pellati F, Benvenuti S. Chemical characterization and evaluation of the antibacterial activity of essential oils from fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Molecules* 2019;24(12):2302.
125. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 2008;76:965-977.
126. Bas D, Boyaci IH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng* 2007;78:836-845.
127. Marzorati S, Friscione D, Picchi E, Verotta L. Cannabidiol from inflorescences of *Cannabis sativa* L.: Green extraction and purification processes. *Ind Crops Prod* 2020;155:112816.
128. Vacek J, Vostalova J, Papouskova B, Skarupova D, Kos M, Kabelac M, Storch, J. Antioxidant function of phytocannabinoids: Molecular basis of their stability and cytoprotective properties under UV-irradiation. *Free Radic Biol Med* 2021;164:258–270.