

Određivanje aktivnih komponenti u ulju konoplje

Mijanović, Paulina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department of Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:227:265333>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivs 3.0 Unported](#) / [Imenovanje-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



konoplja

by Mijatović Paulina

Submission date: 20-May-2024 01:57PM (UTC+0200)

Submission ID: 2383982999

File name: Mijanovi_DR.docx (2.34M)

Word count: 10154

Character count: 59852

³
SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI
Forenzična kemija i molekularna biologija

DIPLOMSKI RAD
ODREĐIVANJE AKTIVNIH KOMPONENTI U ULJU
KONOPLJE

Paulina Mijanović

Split, lipanj 2024.

³
SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

Forenzična kemija i molekularna biologija

DIPLOMSKI RAD

ODREĐIVANJE AKTIVNIH KOMPONENTI **U** ULJU
KONOPLJE

Mentor: doc.dr.sc. Barbara Soldo

Studentica: Paulina Mijanović

JMBAG: 0284013349

Split, lipanj 2024.

³ Rad je izrađen u Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti te u laboratorijskim prostorijama odjela ³ za kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, pod nadzorom doc.dr.sc Barbare Soldo u razdoblju od 30.06.2023 – 02.02.2024.

¹⁴ **Datum predaje diplomskog rada:**

Datum prihvaćanja rada:

Datum usmenog polaganja:

Povjerenstvo: 1.

2.

3.

ZAHVALA

Na kraju ovog poučnog i nadasve lijepog razdoblja, želim zahvaliti mentorici doc.dr.sc Barbari Soldo. Veliko hvala želim uputiti izv.prof.dr.sc Ivici Ljubenkoviću čiji su savjeti uvijek bili dobrodošla pomoć. Također želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima koji su kao i uvijek nevjerovatna podrška.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Taksonomija i botanička svojstva vrste <i>C. sativa</i>	2
1.2. Morfološke karakteristike vrste <i>C. sativa</i>	4
1.3. Kemijski sastav vrste <i>C. sativa</i>	5
1.4. Kanabinoidi	5
1.5. Terpeni	8
1.6. Biosinteza fitokanabinoida i terpena	9
1.7. Mehanizam fiziološkog djelovanja kanabinoida: Endokanabinoidni receptori i signalni sustav	11
1.8. Kanabidiol (CBD)	13
1.9. Kanabidiolna kiselina (CBDA)	14
1.10. Kanabinol (CBN)	15
1.11. Delta-9-tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC)	16
1.12. Heksahidrokanabinol (HHC).....	18
1.13. Prethodna istraživanja proizvoda na bazi CBD-a	18
2. CILJ RADA I HIPOTEZE	20
3. IZVORI PODATAKA I METODE	21
3.1. Materijali	21
3.2. Kemikalije	21
3.3. Priprema uzorka	22
3.4. Uređaji, laboratorijska oprema, kromatografski uvjeti	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
5. ZAKLJUČAK	32
6. LITERATURA	33
7. SAŽETAK	40
8. SUMMARY	41
9. ŽIVOTOPIS	42
10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI	43

Popis kratica

CBD	kanabidiol
THC	Δ -9- tetrahidrokanabinol
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove
MCT	srednje lančani trigliceridi
CBN	kanabinol
CBDA	kanabidiolna kiselina
HPLC UV/VIS	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV/VIS detektorom
ITIS	integrirani taksonomski informacijski sustav
CBC	kanabikromen
CBG	kanabigerol
CBL	kanabiciklol
CBE	kanabielsoin
CBT	kanabitriol
THCA	tetrahidrokanabinolna kiselina
CBDA	kanabidiolna kiselina
CBCA	kanabikromenska kiselina
FAD	flavin adenin dinukleotid
CBV	kanabivarin
CBGVA	kanabigerovarinska kiselina
ECS	endokanabinoidni sustav
SŽS	središnji živčani sustav
AHEMK	amidna hidrolaza masnih kiselina
MAGL	monoacilglicerol lipaza

1. UVOD

Posljednjih godina, bilježi se znatan porast popularnosti kanabidiola (CBD). Globalno tržište kanabidiola procjenjuje se na zapanjujući iznos od 7,71 milijardi USD zaključno s 2023. godinom (1). Jedan od razloga ovako velikoj popularnosti su brojni pozitivni učinci kanabidiola na ljudsko zdravlje te odsustvo psihoaktivnog učinka. Za razliku od kanabidiola, Δ -9-tetrahidrokanabinol (Δ 9-THC) poznat je po svom psihoaktivnom učinku (2). Fiziološke aktivnosti CBD-a su širokog raspona i uključuju niz protuupalnih, antioksidativnih, antianksioznih te kardiovaskularnih učinaka. Također blagotvorni učinak je zabilježen kod napadaja i mišične spastičnosti (2). U 2018. godini ¹⁷ Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) **odobrila je prvi lijek** na bazi CBD-a, Epidiolex koji služi za liječenje pacijenata oboljelih od epilepsije i to kod Dravet sindroma i Lennox-Gastault sindroma (3). Kod bolesti kojima konvencionalna terapija ne daje dovoljan rezultat, oboljeli posežu za proizvodima od kanabisa kao drugom izvoru liječenja, prvenstveno zbog sve veće upotrebe kanabinoida u medicinske svrhe i sve veće prisutnosti u medijima (4). ² Industrijska konoplja definira se po Zakonu o suzbijanju zlouporabe droga kao konoplja s **ukupnim sadržajem THC od 0,2% i manje te čije se sorte nalaze na Zajedničkoj sortnoj listi Europske unije i nije uvrštena u Popis droga, psihotropnih tvari i biljaka iz kojih se može dobiti droga** (5). CBD proizvodi su visoko tražni i u Europi su pod regulacijom nove hrane odnosno hrane koja se nije konzumirala u EU-u „u znatnijoj mjeri” prije svibnja 1997. kad je prva uredba o tom pitanju stupila na snagu. Tom definicijom obuhvaćena je hrana s novim sastojcima ili hrana na koju se primjenjuju novi postupci proizvodnje. Ova regulacija omogućava sigurnu konzumaciju te se brine da ovakvi proizvodi sadrže propisane prehrambenu vrijednost (6). Odabir između mnoštva CBD proizvoda raznih proizvođača svakako može predstaviti izazov potrošačima pri odabiru ispravne doze te kvalitetnog i učinkovitog CBD proizvoda. Nadalje, postoji značajna razlika između ulja konoplje te CBD ulja. ²⁶ Ulje konoplje se dobiva iz sjemenki biljke te sadrži većinom **omega-6 i omega-3 esencijalne masne kiseline** ali ne i kanabinoide. Uglavnom se miješa sa srednje lančanim trigliceridima (MCT) te se prodaje kao ulje u kojem je iskazan postotni udio ulja konoplje, što se lako može pogrešno zamijeniti za CBD ulje. CBD ulje sadrži ekstrakte cvijeta i lista biljke koji sadrže kanabinoide i terpene. Dodavanjem ovih ekstrakata ulju sjemenke konoplje ili drugim uljima (suncokretovo ulje, MCT ulje) rezultira uljima s deklariranim CBD koncentracijama (4). Deklariranje CBD udjela u CBD ulju pokazalo se problematičnim. Provedena su razna istraživanja na temu točnosti deklaracije udjela CBD u

spomenutim uljima i rezultati su ukazali na ostupanja od deklarirane koncentracije. Manje od 50% ispitanih proizvoda u navedenim studijama bili su točno deklarirani, dok je većina od netočno deklariranih CBD ulja sadržavala udio CBD ispod deklarirane količine, a u ponekim uljima CBD se nije mogao detektirati (7).

Navedena istraživanja ukazala su na potrebu za kvalitetnijom kontrolom deklaracije proizvoda od CBD ulja kako bi se spriječila prevara potrošača.

Slijedom navedenog, ovaj rad je usmjeren na provjeru pridržavanja regulatornih normi i kontrole kvalitete proizvoda.

Pomoću metode tekućinske kromatografije s visokom djelotvornošću te UV/VIS detektorom (HPLC UV/VIS) provesti će se analiza aktivnih spojeva u proizvodima od konoplje s posebnim naglaskom na CBD proizvode u obliku ulja i paste. U sljedećim poglavljima opisati će se metodologija korištena za analizu spojeva, prezentirati će se rezultati i rasprava koja će doprinjeti boljem razumijevanju aktivnih spojeva u CBD proizvodima.

² **1.1. Taksonomija i botanička svojstva vrste *C. sativa***

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) je dvodomna, jednogodišnja, zeljasta kritosjemenjača koja obitava na područjima umjerene ili tropske klime (8). Konoplja pripada rodu *Cannabis* te se zajedno s hmeljem (*Humulus spp.*) uvrštava u porodicu *Cannabaceae* (9). Rasprava o postojanju jedne (*C. sativa*) ili dvije vrste (*C. sativa* i *C. indica*) započinje još od vremena Linnaeusa i Lamarcka te je još uvijek predmet rasprave među botaničarima. Postoje morfološke razlike između dva taksona, *C. sativa* je višeg rasta s vlaknastom stabljikom dok je *C. indica* nižeg rasta s drvenastom stabljikom, drugo postoje fitokemijske različitosti u omjeru THC/CBD koji je znatno veći kod vrste *C. indica*. Također europsko porijeklo sative i azijsko porijeklo indice podržavaju postojanje dva različita taksona unutar roda *Cannabis* kako primjećuje Rull (10), postavlja se pitanje o mogućnosti definiranja dvije različite vrste ili podvrste. Mcpartland je proveo istraživanje koristeći kvantitativne kriterije na temelju DNK barkoda te je prijavio da su genetske razlike u rangu podvrste i predložio je nomenklaturu: *C. sativa. ssp. sativa* te *C. indica. ssp. indica* (11). S jedne strane monotipnost roda *Cannabis* potvrđuje dio autora (12), dok drugi dio smatra rod *Cannabis* politipnim s infraspecifičnim oblicima (13). Svi su oblici *C. sativa* diploidni ($2n=20$) te spolno kompatibilni (14). Velike geografske, morfološke i kemijske varijacije biljke su posljedica dugogodišnje kultivacije i

prilagođivanja biljke raznim potrebama čovjeka (vlakno, ulje, lijek) (12). Neprekidno iskorištavanje konoplje kroz povijest kako navodi Tomašić Paić, pozivajući se na prethodna istraživanja Smalla i Cronquista rezultiralo je sa više taksonomskih varijanata iste botaničke vrste (8). Konoplja se sastoji od jedne visoko varijabilne vrste *Cannabis sativa* L., koju je prvo klasificirao Lineé 1753. godine u svom herbariju *Plantarum Species* koji služi kao preteča modernoj botaničkoj nomenklaturi, zatim nedugo poslije Lamarck je klasificirao indijsku konoplju (*Cannabis indica*) kao biološki različitu. Ruski botaničar D. E. Janischevsky imenovao je konoplju koja je uzgajana na području jugoistočnih dijelova središnje Rusije te ju naziva *Cannabis ruderalis* Janisch (8). Taksonomska klasifikacija vrste dugo vremena je bila izvor neslaganja između botaničara, a prikazana je Tablicom 1.

¹¹ **Tablica 1.** Klasifikacija *Cannabis sativa* L. (15).

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

Konoplja je autohtona području središnje Azije. U Kini se uzgajala prije 5.000 godina te se koristila za izradu tkanina. Razni nazivi za konoplju (kanabis, canapa, kanab, kinap) potječu od sanskrtke riječi *kana* u prijevodu prediva biljka, isto tako i *bhanga* što znači pijanstvo. Više od 3.000 godine uzgaja se u Indiji gdje se njene sjemenke koriste za pripravu lijekova dok se osušeni ženski cvjetovi konzumiraju u smjesi zajedno sa smolom kao opojna droga hašiš, sličnu primjenu našla je i u drevnoj Perziji. U Maloj Aziji se u 7. i 8. st. pr. Kr. spominju prve tkaonice konoplje, a najstariji arheološki zapisi povezuju konoplju sa seobom naroda (16). Marco Polo sa svojim slavim putovanjima je popularizirao konoplju u srednjem vijeku te je izvještavao i o Hasanu ibn-al Sabbahu te njegovim hašašinima (eng. assasin) i njihovoj upotrebi hašiša u Aziji. U Mainz, 1445. godine na konopljinom papiru tiskana je biblija Johannesa Gutenberga, a, 1776. godine na papiru napravljenom od konoplje skicirana je Američka deklaracija nezavisnosti (8).

1.2. Morfološke karakteristike vrste *C. sativa*

Korijen biljke je vretenast te se može reći da “produžuje” stabljiku za desetak centimetara ispod površine tla. Iz glavnog korijena izlazi postrano korijenje 1. i 2. reda koji se zatim prilikom rasta međusobno isprepleću. Ako usporedimo s nadzemnom masom korijenov sustav je slabo razvijen. Konopljina stabljika je uspravna, u početku zeljasta dok kasnije odrveni. Stabljika može narasti 0,5 do 5 metara, zelena je i ponekad razgranata, sa grubim dlačicama na epidermi (16). List je sastavljen od peteljke i plojke s 1-3-5-7-9-11 segmenata, prvi par listova je jednostavan i ima samo jedan segment, drugi ima tri segmenta dok treći njih 5, itd. Pri vrhu stabljike se broj segmenata smanjuje. Na biljci su listovi smješteni nasuprotno a pri vrhu su naizmjenično poredani. Segmenti su u prosjeku dugi od 5 do 18 cm te široki 0,5 do 2,5 cm, listovi ženskih biljaka su većih dimenzija nego muške biljke (16). Muške biljke ili bjelojke imaju manje listova od ženskih, svijetlije stabljike, žutih cvjetova s dugim stapkama te rahlijim cvatom dok su mu cvjetovi raspoređeni na vrhu prašnika i sastoje se od perigona te 5 prašnika. Za razliku od muških cvjetova, ženski cvjetovi ili crnojke posjeduju stabljiku intezivno zelene boje, cvjetovi su im sjedeći te se nalaze u pazušcima listova, zauzimaju gornju trećinu stabljike i tvore cvat, sastoje se od ovojnog listića, perigona i tučka s dvije njuške (16). Plod konoplje je ujedno i sjeme, odnosno orašac koji je omotan tvrdom ljuskom, boja mu je raznolika, nije jednolična i ima šare a može biti od svjetlozelene, sive, smeđe, crvene (16).



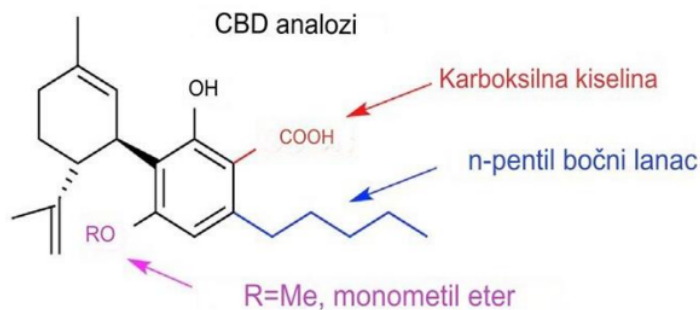
Slika 1. Konoplja (*Cannabis sativa* L.) (17)

1.3. Kemijski sastav vrste *C. sativa*

Prema istraživanju Upton *et al.*, a kako navodi Hartsel *et al.* (18) *C. sativa* sadrži više od 750 spojeva koji su zastupljeni u različitim kemijskim razredima od kojih su najpoznatiji kanabinoidi koji se grupiraju u jedan razred sastavljen od 86 terpenofenolskih sekundarnih metabolita. Terpeni su drugi razred kemijskih spojeva koje možemo pronaći u konoplji te ih je 140 (18). Ostali razredi spojeva uključuju približno 50 ugljikovodika, 34 šećera i sličnih spojeva, 27 dušičnih spojeva, 25 nekanabinoidnih fenola, 23 masne kiseline, 23 flavonoida, 20 jednostavnih kiselina, 13 jednostavnih ketona, 13 jednostavnih estera i laktona, 12 jednostavnih aldehida, 11 proteina te stereoida, 9 elementa, 3 vitamina te 2 pigmenta (18).

1.4. Kanabinoidi

Za većinu od 86 identificiranih kanabinoida u konoplji se može reći da su analozi Δ -9-tetrahidrokanabinola (THC), kanabidiola (CBD), kanabikromena (CBC), kanabigerola (CBG), kanabinola (CBN), kanabiciklola (CBL), kanabielsoina (CBE) i kanabitriola (CBT). Sedam je poznatih analoga kanabidiola u konoplji, najpoznatiji su s neutralni kanabinoidi: THC-a i CBD-a. Strukturna značajka kanabinoida je da sadrže karboksilnu kiselinu privezanu za aromatski prsten (Slika 2.). Dužina alkilnog bočnog lanca varira, na tom položaju najčešće nalazimo n-pentilni bočni lanac iako rijetko, mogu se pojaviti i n-butilni, n-propilni, etilni te metilni bočni lanac (19).

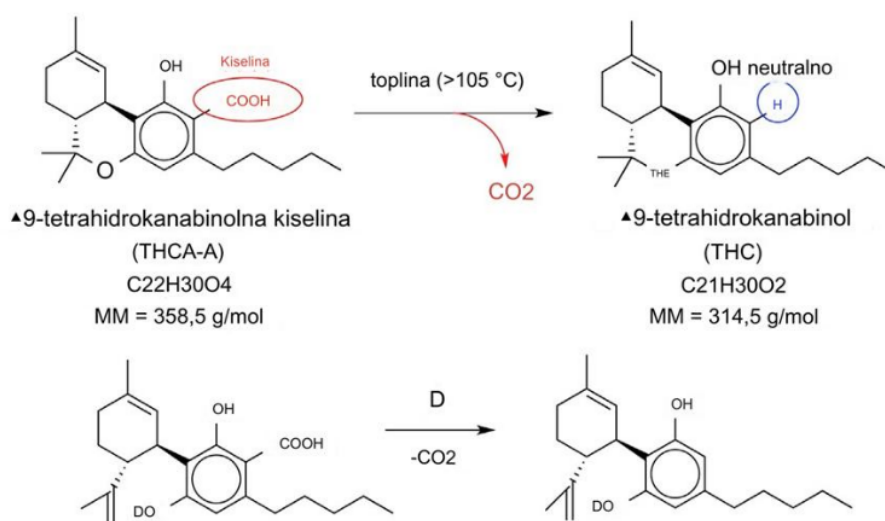


Slika 2. Kemijska struktura razreda kanabinoida (18)

Kanabinoidima koji nose n-propilni bočni lanac u nazivu se nadodaje sufiks varin, npr. tetrahidrokanabivarin (THCV), prirodni THC analog koji umjesto pentilne grupe sadrži propilni bočni lanac, često se pronalazi u podvrsti *C. sativa indica* (20).

Ne tako često, fenolne komponente u kanabinoidima zaštićuju monometil eteri, što je prisutno u analogima CBD-a, Slika 2. (18). Uz navedene, u konoplji je prisutno u niskim koncentracijama još 30-ak kanabinoida, pošto se ne zna točno posjeduju li terapeutska svojstva (18) u ovom radu se nisu razmatrali.

Važno je istaknuti da konoplja ne proizvodi THC, CBD ili CBC već karboksilne kiseline koje sadrže prekursore spomenutih kanabinoida i to su tetrahidrokanabinolska kiselina (THCA), kanabidiolska kiselina (CBDA) te kanabikromenska kiselina (CBCA) (18). Stoga su ekstrakti konoplje nepsihoaktivni sve dok se ne izlože određenoj temperaturi (>105 °C,) kojom započinje kemijska reakcija poznata kao dekarboksilacija (Slika 3.). Do dekarboksilacije kanabinoidnih kiselina dolazi i procesom pušenja ili pečenja (21).

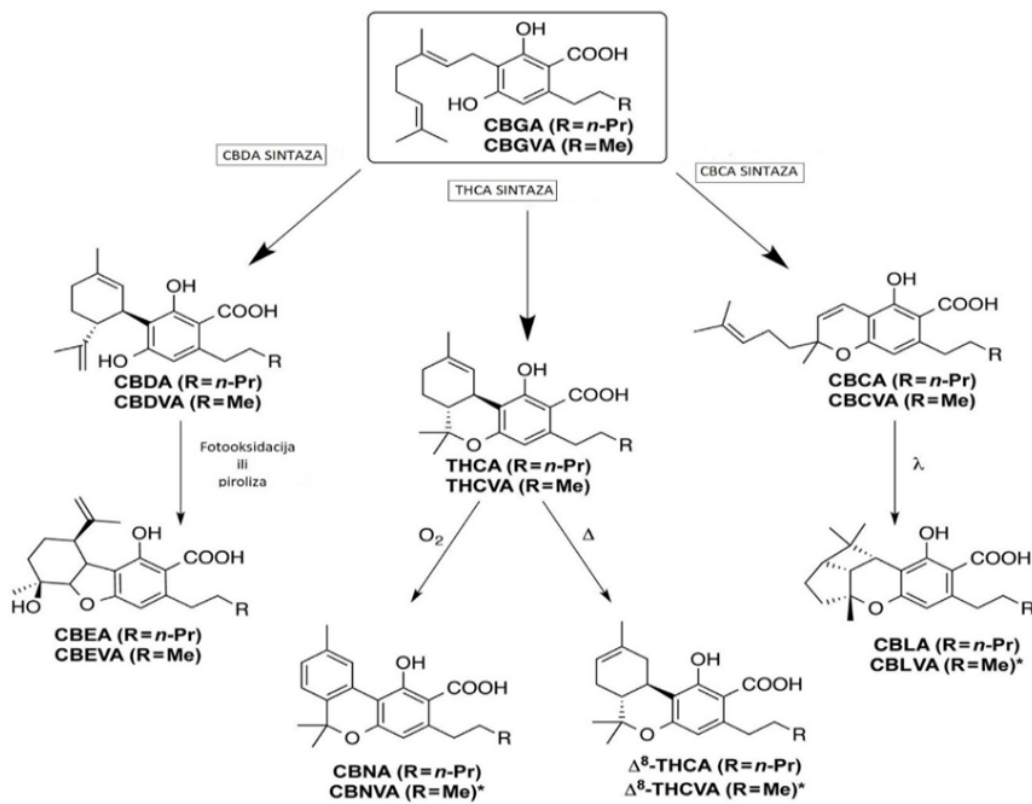


Slika 3. Uvjeti nužni za provedbu dekarboksilacije kanabinoidne kiseline u neutralan oblik (21)

Visoka razina dekarboksiliranih kanabinoida u cvjetovima konoplje ukazuje na mogućnost da je uzorak nepropisno skladišten ili na uznapredovali proces starenja (21).

Konoplja kroz specifične biosintetske puteve proizvodi kanabigerolnu (CBGA) kiselinu, CBDA, THCA te CBCA (18) (Slika 4.). Potvrđeno je da se CBGA ponaša kao supstrat za specifičnu oksidoreduktazu CBDA, THCA te CBCA sintazu i konvergentni je posrednik u

proizvodnji kanabinoida (18). Karboksilna grupa CBGA od važnosti je za prepoznavanje supstrata u sintezi kanabinoida. Istraživanje Taure *et al.* (22) pokazalo je da CBG bez karboksilne grupe ne prolazi kroz enzimatsku katalizu. Istraživanje Taure *et al.* (22) pokazuje da CBCA sintaza otpušta supstrat prije negoli je reakcija gotova što rezultira nižom enantiomernom čistoćom usporedno s THCA te CBDA. THCA sintaza je FAD (flavin adenin dinukleotid) zavisna i zavisna o kisiku te kao nusprodukt stvara vodikov peroksid, prema mišljenju Taure *et al.* (22) otpuštanje vodikovog peroksida moglo bi poslužiti biljkama kao obrambeni sustav protiv bolesti. Za razliku od THCA sintaze, CBDA sintazi kisik nije potreban za konverziju CBGA u CBDA (22). Kanabinoidi koji nisu primarni (THCA, CBDA, CBCA) se stvaraju kroz proces neenzimske degradacije (Slika 4). Primarni kanabinoidi mogu biti dekarboksilirani u neutralni oblik ili konverzirani u CBE, CBN, THC, CBL izlaganjem svjetlu, temperaturi i kisiku (19).

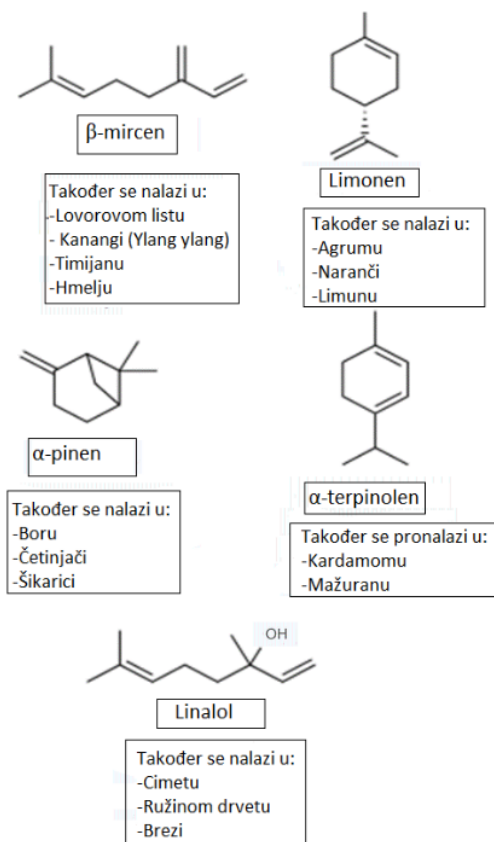


Slika 4. Biosinteza kanabinoida i njihova pregradnja (19)

CBD se može podvrgnuti fotooksidaciji ili pirolizi pri čemu nastaje CBE, također THC u prisustvu kisika se može degradirati u CBN, a izlaganjem povišenoj temperaturi u delta-8-THC. U prisustvu svjetlosti CBC se pretvara u CBL tip kanabinoida. CBV nastaje istim putem kao i CBGVA (23).

1.5. Terpeni

Terpeni su grupa hlapljivih monocikličnih te policikličnih ugljikovodika koji doprinose složenom i jedinstvenom aromatskom profilu konoplje, za sada ih je identificirano 140 (24).



Slika 5. Učestali monoterpeni u *C. sativa* (24)

Hlapljivost terpena bitno utječe na aromu konoplje. Jedno istraživanje utvrdilo je da otprilike pola terpena ishlapilo tokom tromjesečnog skladištenja u suhim uvjetima (25). Izolacija terpena destilacijom vodenom parom sobne vrste *C. sativa* pokazala je niski udio (0,29% terpena po osušenoj biomasi). Većina destilata sastojala se od monoterpena (92% od ukupnih terpena) te

se 7% seskviterpena i ostatak su činili jednostavni ketoni i esteri (25). Prema drugom istraživanju, od ukupnih monoterpena prisutnih u svježim cvjetovima najzastupljeniji je mircen s 67%, zatim slijedi D-limonen s 16% i linalol s 3% udjelom.

Sadržaj monoterpena u konoplji uzgajanoj vani iznosio je od 48% do 92% ukupnih prisutnih terpena, dok je sadržaj seskviterpena bio niži te se kretao oko 5% do 49%. Također je utvrđen visok sadržaj monoterpena, α -pinena, trans-ocimena, α -terpinolen su također bile pronađene (26).

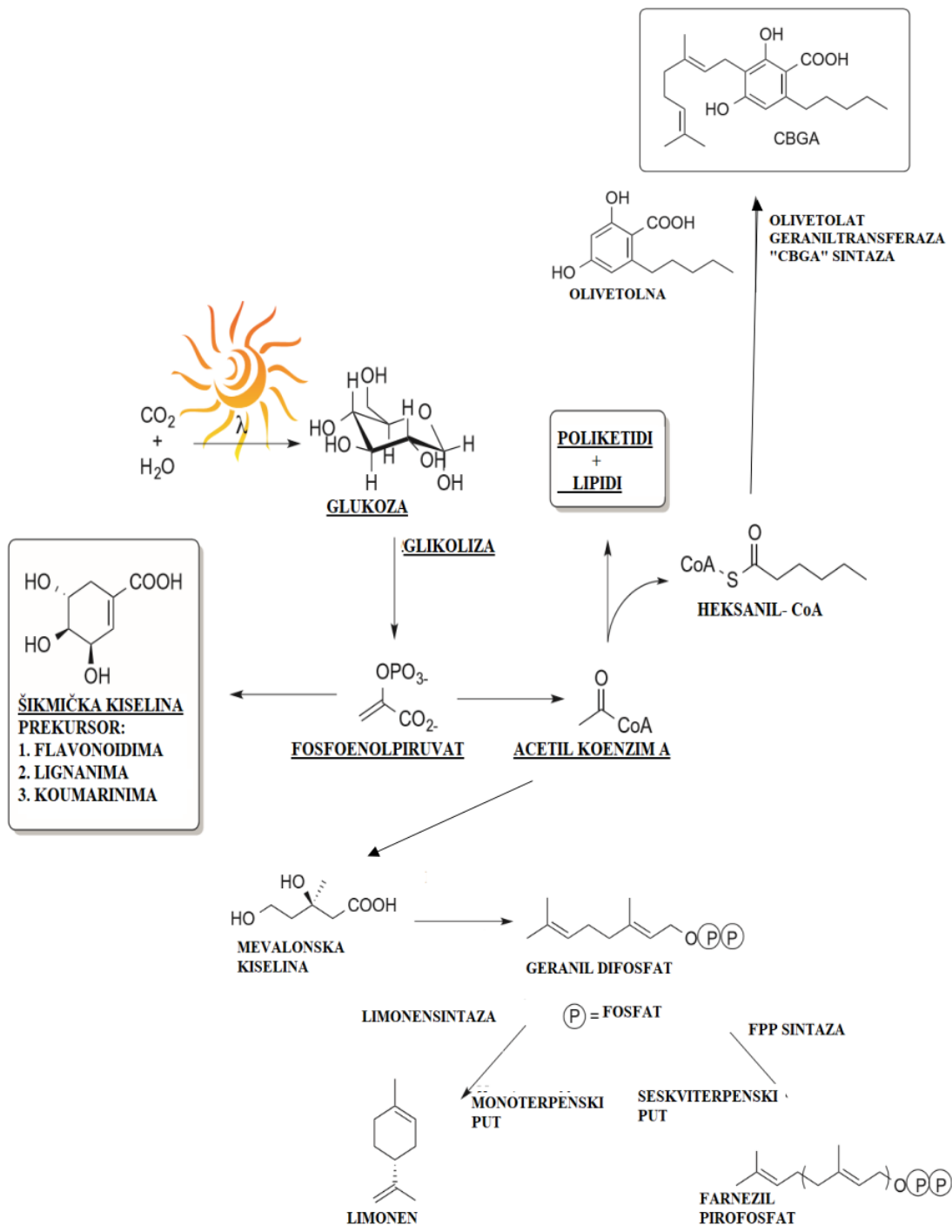
Novak *et al.* (2001) proveli su istraživanje europskih kultivara gdje su primijetili, u odnosu na američke kultivare značajne količine α -terpinolena i α -pinena te su ove biljke sadržavale znatno više količine α -humulena (6-9% ukupnih terpena) (27). U tragovima su potvrđene količine sabinena, α -terpinena, eukaliptola, pulegona, γ -terpinena, terpinen-4-ol, bornil acetata, α -kopaena, aloaromadendrena, viridiflorena, α -bisabolena, γ -kadinena, trans-nerolidola i β -bisabolola (25,26).

Istraživanje provedeno od strane Bertoli *et al.* (2010) o sastavu terpena u 10 različitih varijeteta konoplje tokom dvije sezone rasta utvrdilo je ukupnu količinu terpena u rasponu od 0,11% do 0,25% po ukupnoj osušenoj biomasi. Prisutni monoterpeni su mircen sa zastupljenošću 8-45 %, terpinolen (0,12-0,22%), α -pinen (3-20%), E-ocimen (1-10%) i β -pinen (1-8%), glavni prisutni seskviterpeni bili su β -kariofilen (7-28%), α -humulen (3-12%) i kariofilen oksid (0,12-0,22%) (28). Tehnike uzgoja, okolišni faktori te genetika doprinose specifičnoj aromi konoplje. U ispitivanju Mediavilla i Steinemanna ispitanicima kojima je dan uzorak konoplje s visokim udjelom seskviterpena i monoterpena preferirali su kultivare s visokim sadržajem monoterpena (26).

1.6. Biosinteza fitokanabinoida i terpena

Terpeni, zajedno s fitokanabinoidima, flavonoidima, liganima, kumarinima, poliketidima i lipidima dijeli biosintetičke puteve unutar konoplje kako je prikazano slikom 6.

Ključni posrednik u procesima biosinteze kod mogućih biljaka je fosfoenolpiruvat, nastao procesom glikolize. Fosfoenolpiruvat se prevodi u šikmičku kiselinu koja je prekursor flavonoidima, liganinima i kumarinima.



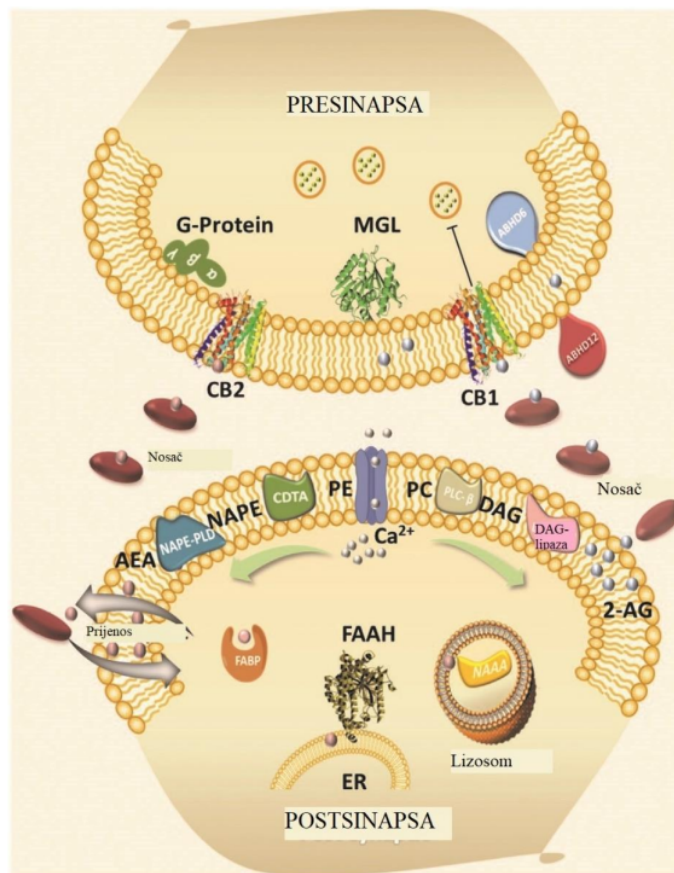
Slika 6. Biosinteza fitokanabinoida i terpena (18)

Fosfoenolpiruvat se može katabolizirati u acetil koenzim A koji izgrađuje botaničke lipide i poliketide. Konoplja koristi enzime vrste III poliketidne sintaze i olivetolinsko kiselinske ciklaze kako bi pretvorila acetil koenzim A u olivetolnu kiselinu (29). Acetil koenzim A također se pojavljuje u kompetecijskim biosintetskim putevima koji vode do stvaranja geranil difosfata. Geranil difosfat i olivetolna kiselina su produkt razgradnje acetil koenzima A, te se mogu olivetolnom geranil transferazom prevesti u CBGA (18). Nadalje, geranil difosfat može poslužiti kao supstrat za monoterpene (22) i seskviterpene (18). Konoplja terpene sintetizira u manjim količinama negoli kanabinoide (18).

1.7. Mehanizam fiziološkog djelovanja kanabinoida: **Endokanabinoidni receptori i signalni sustav**

Kanabinol je prvi izolirani fitokanabinoid, otkriven je u ekstraktu ulja konoplje, a njegova kemijska struktura objavljena je 1930. g. (30) iste je godine izoliran i kanabidiol dok se njegova struktura objavila tek 1963. g. Naredne godine objavljena je struktura trans-9-tetrahidrokanabinola ili dronabinola (sintetički THC) (31). Ova otkrića su potaknula interes znanstvenika te su se nastavila proučavati kemijska i farmakološka svojstva navedenih spojeva. Mehanizam djelovanja THC se počinje bolje razumijevati nakon Howlettovog otkrića kanabinoidnog CB1 receptora u mozgu te izolacije glavnih endogenih kanabinoida anandamida i 2-arahidonoil glicerola od strane Mechoulama (8). Navedeni endogeni kanabinoidi derivati su arahidonske kiseline (8). U tkivu sisavaca otkriveni su CB1 i CB2 G-protein kanabinoidni receptori na koje se veže THC. Dok CB1 receptor nalazimo unutar i izvan središnjeg živčanog sustava, CB2 receptor lokaliziran je isključivo u perifernom živčanom sustavu (32). Endokanabinoidi pomoću liganada ostvaruju interakcije s kanabinoidnim receptorima te sudjeluju u reguliranju stanične razine cikličkog adenzin monofosfata (cAMP), molekule sa funkcijom sekundarnog glasnika. Preko G-proteina ostvaruje se interakcije s adenilat-ciklazom, te se moduliraju funkcionalna svojstva naponski reguliranih ionskih kanala (Ca^{2+} , Na^+ , različiti tipovi K^+ kanala) i ligand-reguliranih ionskih kanala kao što su: serotoniniski 5-HT₃ receptor, nikotinski acetilkolin te glicin receptor (Slika 7.). Kanabinoidni receptori u mozgu prepoznaju specifična kanabinoid vezajuća mjesta (8), npr. aktivacija CB1 receptora za posljedicu ima inhibiranje naponski reguliranih Ca^{2+} kanala i aktivaciju K^+ kanala. Signalni putevi koji uključuju CB2 receptor povezuju se s aktivacijom mitogen aktivirane proteinske kinaze

(MAPK), regulacijom fosfatidilinozitol-3-kinaze te signaliziranje putem ceramida kao sekundarnih glasnika (33). Oba receptora pripadaju superporodici G-protein spregnutih visokoafinitetnih receptora koje izgrađuje sedam transmembranskih domena, a aktiviraju ih tri glavne skupine liganada i to endokanabinoidi (proizvodnja u tijelu sisavaca; N-arahidonoil-etanolamin (anandamid, AEA), 2-arahidonoil-glicerol (2-AG), 2-arahidonil-gliceril-eter (noladin eter), N-arahidonoil-dopamin (NADA), O-arahidonoil-etanolamine (virodamin)) svi redom su prirodni signalni lipidi koji se vežu za kanabinoide. Svi endogeni kanabinoidi su lipofilnog karaktera (8).



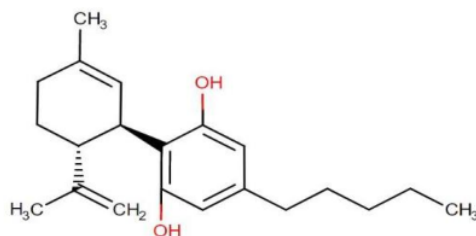
Slika 7. Shematski prikaz endokanabinoidnog signalnog puta (34)

CB1 receptor ciljana je terapijska meta za razne bolesti, poput pretilosti, ovisnosti o alkoholu, kod osjeta boli, Parkinsonove bolesti itd, također potencijalnu terapijsku primjenu imaju i selektivni CB2 receptori osobito u terapijama za supresiju tumora i upala (35). CB2 receptorni

agonisti mogu dovesti do analgezije neuropatskih bolova, obzirom na položaj CB2 receptora na periferiji interesantno je da agonisti koji selektivno aktiviraju CB2 receptor (periferni) mogu učiniti efektivnu analgeziju bez neželjenih psihoaktivnih učinaka na središnji živčani sustav (SŽS), a koji su povezani s CB1 receptorom (8). Ekspresija CB2 receptora većinom se odnosi na imunosa tkiva (slezena, krajnici) i hematopoetske matične stanice (8). Utvrđena je velika raspodjela CB1 receptora u mozgu, odnosno u bazalnim ganglijama, hipokampusu, cerebelumu i korteksu, plućima, jetri, slezeni i bubrežima (8). Endokanabinoidi u SŽS imaju ulogu neuromodulatora ili ulogu povratnih glasnika koji su sposobni inhibirati oslobađanje raznih neurotransmitera, uz to u perifernom i neuralnom tkivu mogu modulirati učinke proteina i jezgrinih faktora koji su uključeni u proliferaciju stanice, diferencijaciju i apoptozu, djeluju ujedno i kao parakrini i autokrini posrednici. Navedeni podaci pokazuju da endokanabinoidi imaju bitnu ulogu u staničnom životu (8). Također, CB1 receptori otkriveni su u dijelovima mozga koji zahvaćaju nekoliko vitalnih funkcija (učenje, pamćenje, motivacija i spoznaja, percepcija boli, neuroendokrina kontrola). Sintetiza endokanabinoida i njihovo oslobađanje slijedi potražnju receptor-ovisnoga signalnog puta i djeluju kao glasnici povratnog signaliziranja u GABA-nergičnim i glutamatergičnim sinapsama, te kao modulatori post-sinaptičkoga prijenosa, interagirajući s drugim neurotransmiterima (8). Transportiraju se u stanice pomoću enzimima kao što je amidna hidrolaza masnih kiselina (AHMK) i monoacilglicerol lipaze (MAGL). Endokanabinoidni sustav dio je mnogih patofizioloških procesa u centralnom i perifernom tkivu, uključujući hormonalnu regulaciju unosa hrane, kardiovaskularne, gastrointestinalne, imunološke, bihevioralno-kognitivne, antiproliferativne i reproduktivne funkcije (8).

1.8. Kanabidiol (CBD)

Kanabidiol je mala molekula, molekularne mase od 314,469 g/mol i molekularne formule $C_{21}H_{30}O_2$. Topljivost u vodi iznosi 0,0126 mg/ml (37), a strukturnu formulu prikazuje slika 8.



Slika 8. Strukturna formula CBD-a (37).

Kristalizira se i u prirodi pojavljuje kao (-) enantiomer. Točka tališta kanabidiola je oko 62-63 °C, a topljivost u etanolu oko 23,6 mg mL⁻¹ (38). CBD se primjenjuje oralno kao kapsula ili kao uljna otopina te sublingvalno i intranazalno (38). CBD doze koje pružaju efektivni učinak kreću se oko 100-800 mg/dan, dok komercijalne tinkture i ulja dolaze u dozama od 20 mg CBD po serviranju. CBD uljne kapsule uzimaju se oralnim putem, CBD se radi loše topljivosti u vodi slabo apsorbira u gastrointestinalnom traktu, a biološka raspoloživost nakon oralne primjene je svega oko 6 % (38). U zdravih muških dobrovoljaca srednja vrijednost CBD-a ± STD u krvi nakon oralne primjene 600 mg CBD-a iznosila je 0,36 ± 0,64 ng/mL nakon prvog sata, 1,62 ± 2,98 ng/mL nakon dva sata odnosno 3,4 ± 6,42 ng/mL nakon 3. CBD kada se uzima u obliku aerosola može doseći maksimalnu koncentracije u plazmi za 5 do 10 minuta i za razliku od oralne primjene postiže veću biološku raspoloživost (38). CBD se zbog visoke lipofilnosti nakuplja prvenstveno u masnom tkivu, a metabolizira se u jetri hidroksilacijom u 7-hidroksikanabidol (7-OH-CBD) koji se dalje metabolizira te se njegovi metaboliti izlučuju kroz feces i urin (38).

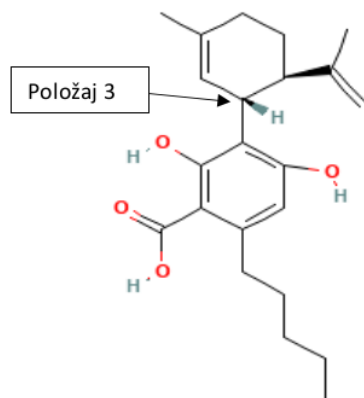


Slika 9. CBD proizvodi za kućne ljubimce (39)

CBD ima relativno nisku toksičnost, životinjske i in vitro studije otkrivaju utjecaj CBD-a na inhibiciju rasta tumorskih staničnih linija, bez učinka na većinu zdravih staničnih linija.

1.9. Kanabidiolna kiselina (CBDA)

Kanabidiolna kiselina ima kemijsku formulu C₂₂H₃₀O₄. CBDA jest dihidroksibenzenska kiselina u kojoj vodik na poziciji 3 se zamjenjuje s limonen grupom (Slika 9). CBDA i olivetolna kiselina su funkcionalno povezane biosintetičkim putem. Olivetolna kiselina služi kao prekursor u biosintezi CBDA (40). CBDA je visoko zastupljena u polenu konoplje kultivirane u industrijske svrhe (41).

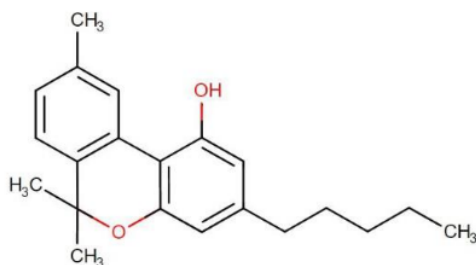


Slika 10. Strukturna formula CBDA (40).

Kanabidiolnoj kiselini se pripisuju i antiupalna, antikancerogena, antikonvulzivna i antiemetička svojstva (41). Omjer CBDA naspram CBD-a koristi se kao jedan od parametara za dobre uvjete skladištenja i proizvodnog procesa (41).

1.10. Kanabinol (CBN)

Kanabinol ima molekularnu masu 310,437 g/mol i molekularnu formulu $C_{21}H_{26}O_2$. Topljivost u vodi za CBN je niska i iznosi svega 0,000339 mg/ml. Kanabinol je fiziološki neaktivna komponenta *Cannabis sativa* L. (42). Strukturna formula kanabinola prikazana je na Slici 10.



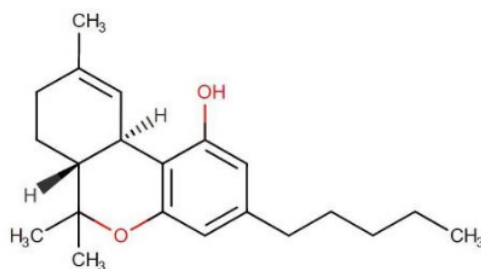
Slika 11. Strukturna formula CBN-a (42).

CBN je prvi izolirani fitokanabinoid u čistom obliku (18). Po prvi put je imenovan 1896.g a, struktura mu je objavljena 1940.g (24). Produkt je oksidacije Δ^9 -THC-a. Usporedno s Δ^9 -THC-om, CBN ima 10 puta manju moć aktivacije CB1 i CB2 receptora (18). Posjeduje sedativna, antibiotska, antikonvulzivna i antiupalna svojstva (24). Koncentracija CBN-a u proizvodima od

konoplje ovisi o dobi i uvjetima skladištenja (24). U proizvodima od konoplje (marihuana, hašiš i hašiš ulje) koncentracija CBN-a povećava se tokom skladištenja dok se koncentracija Δ^9 -THC-a smanjuje (19). CBN se učinkovito primjenjuje u liječenju bulozne epidermolize (lat. Epidermolysis bullosa), rijetke bolesti koju karakterizira stvaranje plikova na koži i sluznici (43). CBN je uspješan u liječenju glaukoma budući da sprječava upalu koju uzrokuje povišeni intraokularni tlak. Djeluje kao antioksidans i može utjecati na smanjenje oštećenja stanica kod Huntingtonove bolesti (43).

1.11. Delta-9-tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC)

THC je kanabinoidni alkaloid, on je viskozna smola koja se ne može kristalizirati. U čistome obliku pri niskim temperaturama je čvrst i staklast, a zagrijavanjem postaje ljepljiv i viskozan (8). Mala je molekula, molekularne mase 314,462 g/mol i molekulske formule $C_{21}H_{30}O_2$. U vodi, topljivost THC-a iznosi 0,0028 mg/ml (44). Može se dobro otopiti u većini organskih otapala kao što su etanol ili heksan (8). Jedna od glavnih funkcija THC-a u konoplji je zaštita biljke od štetočina poput mnogih farmakološki aktivnih specijaliziranih biljnih metabolita. THC posjeduje i svojstva visoke apsorpcije UV-B svjetla (280-315 nm) štiteći tako biljku od izloženosti ovom zračenju (8). Slika 11. prikazuje strukturu formulu THC-a.



Slika 12. Strukturna formula THC-a (44).

THC uz CBD je glavna komponenta konoplje, te je ujedno i glavna psihoaktivna tvar. Djelovanje THC-a ispoljava se putem kanabinoidnih receptora, a njegovo prisustvo može izazivati simptome kao što su promjene raspoloženja, povećanje apetita, promjene u kongnitivnim funkcijama itd. U medicini se primjenjuje sintetski oblik THC-a koji se naziva

"Dronabinol/Marinol" a koristi se kao terapija kod pacijenata oboljelih od sindroma stečene imunodeficijencije (AIDS) s ciljem povećanja apetita, također kod pacijenata oboljelih od raka primjenjuje se u svrhu liječenja mučnina koje su izazvane kemoterapijom (44). Neki pripravci od konoplje i udio THC u njima prikazani su u tablici 2. Mnoge eksperimentalne studije dokazale su učinak THC-a na psihomotorni i kognitivni sustav, THC dan ispitanicima u dozama od 40 i 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uzrokovao je smanjenje motornih funkcija, pamćenja, i pažnje prilikom izvođenja testova (8). Najizraženiji učinci THC-a mogli su se vidjeti prvi sat nakon pušenja ili između jedan i dva sata nakon oralnoga unosa, a u opadali su 3-4 sata nakon konzumacije (8). U dugoročnoj studiji koju su proveli Fried i sur. (8) ispitani su IQ rezultati laganih (< 5 jointova/tjedno) i teških (≥ 5 jointova/tjedno) korisnika marihuane, te bivših korisnika i nekorisnika. Ovom studijom Fried i sur. Zabilježili su manji ukupan IQ kod trenutačnih korisnika marihuane, ali kod težih korisnika marihuane koji nisu pušili najmanje tri mjeseca, testovi nisu pokazali pad u IQ rezultatima. Ovi rezultati navode na zaključak da je kod trenutačnih pušača utjecaj očigledan i ako nisu u intoksikirajućem stanju, ali takvo stanje nije trajno. Otkrile su se razlike u aktivnosti mozga kod teških ovisnika o kanabisu i teških ovisnika nakon apstinencije od 25 dana, primjenom magnetske rezonancije. Utvrđeno je da iskusni apstinencijski ovisnici koriste alternativne neuralne putove u mozgu kako bi kompenzirali za "oštećenje" uzrokovano djelovanjem THC-a (8).

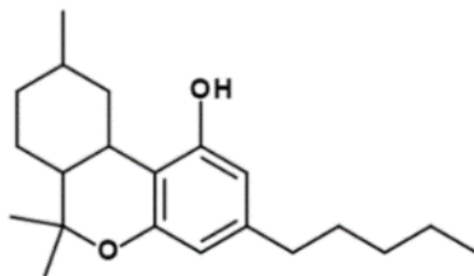
Tablica 2. Pripravci od konoplje i udio THC-a (8)

Ime	Dio biljke	THC sadržaj (%)
Marijuana (bhang, dagga, kif)	Listovi, male stabljike	1.0-3.0
Sinsemilla	Sterilne ženske glavice cvjetova	3.0-6.0
Ganja	Sabijene sterilne ženske glavice cvjetova	4.0-8.0
Hashish (charas)	Rezine kanabisa	10.0-15.0*
Cannabis ulje	Alkoholni ekstrakt rezine	20.0-60.0

*Ulični uzorci konoplje sadrže puno manju količinu THC-a jer su krivotvoreni s drugim tvarima.

1.12. Heksahidrokanabinol (HHC)

Heksahidrokanabinol (HHC) je molekula mase 316.5 g/mol i molekularne formule $C_{21}H_{32}O_2$. U znanstvenoj literaturi se prvi put opisuje 1940. g (45). HHC je kemijski sličan Δ^9 -THC, glavnoj psihoaktivnoj supstanci u kanabisu. Laboratorijske studije in vitro i in vivo pokazale su da HHC može izazvati slične učinke kao proizvodi kanabisa i THC-a (45). Polusintetski HHC je mješavina 9 α - i 9 β -metil stereoisomera (epimera) koji imaju različita farmakološka svojstva (45).



Slika 13. Strukturna formula HHC-a (45).

Konvencija UN-a o psihotropnim tvarima iz 1971.g kontrolira samo tetrahidrokanabinol i njegove izomere. HHC se od sredine 2021. g prodaje u SAD-u i Europi. Proizvodi uključuju cvijet kanabisa (konoplje) s niskim sadržajem THC-a i smola na koju je raspršen ili pomiješan HHC, HHC ulje, vape proizvodi i jestiva hrana (45). EU od 21. listopada označuje HHC kao NPS (nova psihoaktivna supstanca) (45). Za razliku od Δ^8 -THC, HHC za sada nije posebno kontroliran međunarodnim sustavom kontrole lijekova (45). U Europi postoje ograničeni podaci o HHC-u, prvi put je identificiran negdje u svibnju 2022. g u proizvodu koji se prodaje kao tinktura pod nazivom 'CBN night'. Identifikaciju HHC-a prijavilo je do 31. ožujka 2023.g prijavljen je u većini država članica EU (Austrija, Belgija, Bugarska, Hrvatska, Cipar, Češka, Danska, Estonija, Finska, Francuska, Njemačka, Grčka, Mađarska, Italija, Litva, Poljska, Slovačka, Slovenija, Španjolska, Švedska, Norveškoj i Švicarskoj) (45).

1.13. Prethodna istraživanja proizvoda na bazi CBD-a

Proizvodi na bazi kanabidiola u SAD-u su slabo regulirani te postoji malo dostupnih informacija o dugoročnoj stabilnosti proizvoda, varijabilnosti lota i postavlja se pitanje da li proizvod uistinu sadržava ono što je na deklaraciji označeno. Miller i suradnici (46) proveli su analizu uz pomoć HPLC-a te su ispitali koncentracije CBD-a, CBN-a, THC-a u raznim tekućim

i uljnim pripravcima od konoplje kako bi utvrdili ispravnost deklaracije. Ukupno su razmatrali 11 proizvoda od ulja te su rezultati pokazali da 18,2% (n=2) nisu ispoštovali navode otisnute na deklaraciji proizvoda, samo su četiri ulja (n=4), odnosno 36,4% bili točno deklarirani. Zatim, testiranje proizvoda za piće (n=21) rezultiralo je s 66,67% (n=14) proizvoda koji su bili u konzistenciji s navedenom CBD deklaracijom. Istraživanje Elsohly *et al.* ističe važnost analize neutralnih i kiselih kanabinoida koji prikazuju kompletan kemijski profil proizvoda. Glavnina ispitanih proizvoda od konoplje su bila ulja, jedan od proizvoda je bio maslac od konoplje, ostali proizvodi su bili kapsula s prahom konoplje i kapsula s ekstraktom konoplje. Većina proizvoda je sadržavala manje od 0,1% CBD-a i manje od 0,01% THC-a, nadalje 3 proizvoda su sadržavala 0,1-1% CBD-a, dva su proizvoda sadržavala 0,1-0,9% THC-a. Njihovo istraživanje je pokazalo da su svi uzorci bili dekarboksilirani pošto su CBDA i THCA iznosili manje od 0,001% (47).

2. CILJ RADA I HIPOTEZE

Cilj ovog rada je ispitati sastav komercijalno dostupnih CBD proizvoda u obliku ulja i pasti, te dva dostupna HHC ulja. Ovaj rad će pokušati utvrditi prisutnost i koncentraciju sljedećih kanabinoida: CBD, CBDA, CBN, THC te HHC. Nadalje, kvantifikacija navedenih spojeva provest će se primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV/VIS detektorom (HPLC UV/VIS). Također, cilj rada je usporediti dobivene koncentracije kanabinoida THC, HHC i CBD s onima označenim na deklaraciji proizvoda.

U ovom istraživanju ispitane su sljedeće hipoteze:

- 1) HPLC UV/VIS analiza uzoraka pokazati će određeni stupanj varijabilnosti koncentracije aktivnih komponenti naspram deklariranih.
- 2) Odstupanje od deklaracije može biti izazvano proizvodnim procesom, ekstrakcijskom metodom te izborom sorte konoplje.
- 3) CBD i HHC proizvodi su skloni nedosljednom deklariranju te su upitne kvalitete.

3. IZVORI PODATAKA I METODE

3.1. Materijali

Prilikom izrade ovog rada korišteni su sljedeći CBD proizvodi:

- Green lab Gold od 5%,15% (Garica d.o.o.)
- Green lab basic od 3%, 6%, 10%, 20% (Garica d.o.o.)
- Cbd ulje za ljubimce od 3%, 6%, 10% (Garica d.o.o.)
- Cbd ulje Ecofutura od 5%, 10% 20% (Ecomed d.o.o.)
- Hempika cbd kapi od 3%, 5% (Hempika d.o.o.)
- Hempika cbd paste od 20%, 30%, 50% (Hempika d.o.o.)
- Cbd puni spektar ulje za ljubimce od 2,5% (Hemp fiume d.o.o.)
- Cbd puni spektar ulje od 5%, 10%, 15%, 20% (Hemp fiume d.o.o.)
- Cbd pasta puni spektar od 50%, 70% (Hemp fiume d.o.o.)
- Cbd pasta Hempley od 30%, 40%, 50% (Kanabi d.o.o.)
- Cbd pasta Kanabi od 30%, 40%, 50% (Kanabi d.o.o.)
- HHC ulje Euphoria od 10%, 20% (Kanabi d.o.o.)
- domaće ulje od konoplje

3.2. Kemikalije

Prilikom izrade ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Acetonitril, za gradientni rad
- Deionizirana voda
- 2-propanol
- Octena kiselina
- CBDA (Sigma Aldrich, Round Rock, Texas)
- CBD (Sigma Aldrich, Round Rock, Texas)
- CBN (Sigma Aldrich, Round Rock, Texas)
- THC (Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KBC, Split)

3.3. Priprema uzorka

Odvagana masa uzorka otopila se u 2 mL 2-propanola. Za uzorke s deklariranim 2,5% sadržajem CBD-a uzimalo oko 0,15 g, za ulje od 5% od 0,08 - 0,10 g, za ulje s 10% CBD-a uzimalo se približno 0,05 g dok za CBD ulje s 20% oko 0,03 g uzorka. Zadnji korak pripreme uzorka pred analizu je razrjeđenje uzorka 30 puta, odnosno 50 µl propanolne otopine uzorka dodano je u 1450 µl 2-propanola. Za pripremu uzoraka CBD pasta uzimala se masa od 0,02 do 0,03 g te se razrijedila u plastičnoj eprueti s 5 ml 2-propanola. I ovdje je zadnji korak pripreme bio razrijedivanje otopljenе paste od 30 puta kao i kod CBD ulja. Iznimno za pastu od 70% CBD odvagano je oko 0,02 g te se u ovom slučaju ona otopila u 7 ml 2-propanola, ostatak pripreme pred analizu je bio isti kao u prethodno opisanim eksperimentima.

3.4. Uređaji, laboratorijska oprema, kromatografski uvjeti

- Analitička vaga
- HPLC sustav (PerkinElmer serija 200)
- HPLC pumpa (PerkinElmer serija 200)
- UV/VIS detektor (PerkinElmer serija 200)
- Autosampler (PerkinElmer serija 200)
- Poroshell kolumna ¹⁸120 EC-C18 (3.0 x 100 mm, 2.7 µm, Agilent, Milan, Italija).

Mješavina 0,2% octene kiseline u vodi (faza A) i acetonitrila (faza B) korišteni su kao mobilna faza s protokom od 0,5 mL min. Gradijent je započeo s 30% faze A i 70% faze B, zatim se udio mobilne faze A smanjio na 20% u narednih 10 minuta. U idućoj minuti uslijedio je strmi pad faza A na 5% te je postignuti odnos mobilnih fazi zadržan idućih 17 minuta. Poslije toga, kroz 1 minutu, udio faza A se povećala na 30% i narednih 11 minuta kroz kolonu je protjecalo 30% faze A i 70% faze B, kako bi se gradijent vratio na početne uvjete. Ukupno vrijeme analize bilo je 40 minuta. Kolona je termostatorana pri 25 °C, a volumen injektiranog uzorka iznosio je 50 µL. Za detekciju kanabinoida korišten je UV/VIS detektor pri valnoj dužini od 228 nm, a pojedini kanabinoidi su detektirani po retencijskom vremenu usporedbom s retencijskim vremenima čistih standarda.

Izračun udjela za pojedini kanabinoid dobio se računajući:

1. Masu kanabinoida u razrijeđenom uzorku.

Umnožak koncentracije kanabinoida izražene u $\mu\text{g/mL}$, a određene preko kalibracijske krivulje na HPLC instrumentu i volumena 2-propanola korištenog kao otapalo, izraženog u mL uveća se za faktor razrijeđenja (30).

Prikaz formule:

$$m_1 = (c_1 \times V) \times 30$$

gdje je,

m_1 - masa uzorka kanabinoida s razrijeđenjem

c_1 - koncentracija kanabinoida očitana s HPLC-a

V - volumen otapala

30 - faktor razrijeđenja

2. Udio kanabinoida u uzorku.

Prethodno dobivena masa dijeli se sa početnom masom uzorka. Rezultat se množio sa 100 kako bi se konačan rezultat iskazao kao postotak. Rezultat se zaokruživao se na dvije decimale.

$$W = \frac{m_1}{m_2} \times 100$$

gdje je,

m_1 - masa uzorka kanabinoida s razrijeđenjem

m_2 - početna masa uzorka kanabinoida

W- konačna koncentracija kanabinoida

Za HHC nismo imali standard, stoga je koncentracija HHC iskazana preko koncentracije THC.

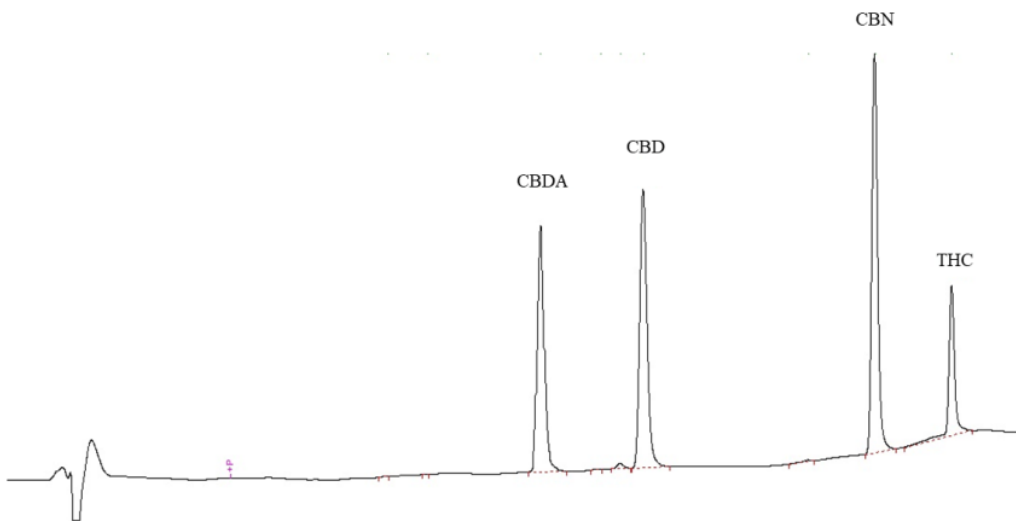
4. REZULTATI I RASPRAVA

Četiri kanabinoida su odvojena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti na Perkin Elmer Series 200 sustavu (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Pojedini kanabinoidi su detektirani po retencijskom vremenu (Tablica 3).

Tablica 3. Prikaz retencijskih vremena za četiri kanabinoidna standarda

Retencijsko vrijeme min	CBDA	CBD	CBN	THC
	10.84	12.67	16.77	18.09

Ispitana četiri kanabinoida su vrlo hidrofobna te posljedično izlaze kroz kromatografski sustav navedenim redosljedom (Slika 12).



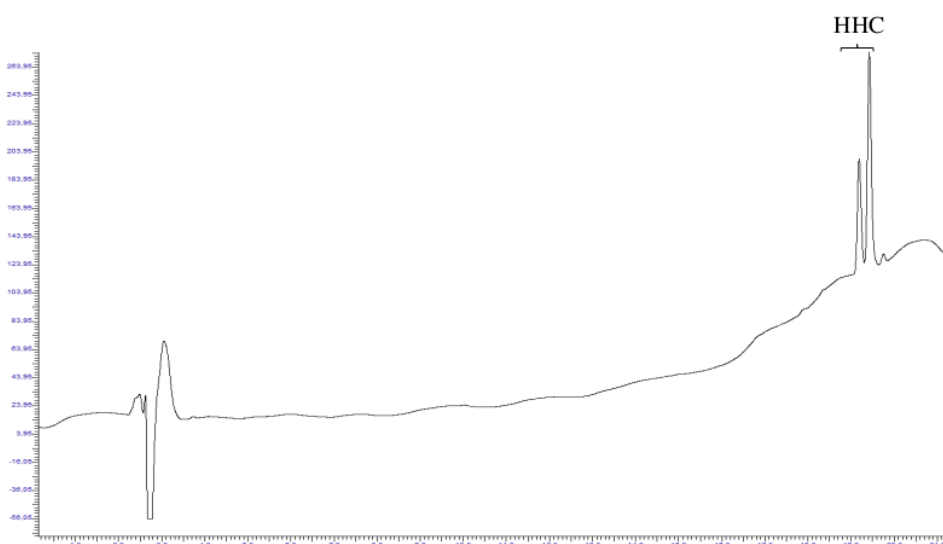
Slika 14. Primjer kromatograma s četiri standarda kanabinoida

CBD je glavna i najvažnija komponenta u proizvodima od CBD ulja i paste upravo zbog svojih bioaktivnih svojstava. S druge strane koncentracija THC-a u CBD proizvodima je zakonski regulirana te ne smije prelaziti propisana granicu od 0,2% (5). Ostali se kanabinoidi (CBDA i CBN) prirodno pojavljuju u proizvodima od konoplje te mogu utjecati na njihova terapijska svojstva. Za istovremenu identifikaciju i određivanje četiri kanabinoida u uljnoj matrici razvijena je i djelomično validirana analitička metoda. Glavni parametri za uspostavljanje metode su limit detekcije i kvantifikacije, te su oni određeni za ispitivane spojeve CBD, CBDA, CBN, THC i prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Prikaz limita detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za tražene kanabinoide te izraženi u $\mu\text{g/ml}$.

$\mu\text{g/mL}$	CBDA	CBD	CBN	THC
LOD	0,066	0,050	0,032	0,156
LOQ	0,198	0,150	0,098	0,470

Već je spomenuto da za HHC nismo imali standard, stoga smo njegovo retencijsko vrijeme odredili propuštajući uzorke koji su deklarirani kao HHC ulja (Slika 15).



Slika 15. Primjer kromatograma u kojem su detektirani HHC izomeri

Iz prikazanog kromatograma vidimo da se HHC očekivano pojavljuje u dva stereoisomera te da je retencijsko vrijeme prvog stereoisomer 19.31 min, a drugoga 19.57 min.

U ovo istraživanje uključeni su proizvodi deklarirani kao CBD ulja i paste s punim spektrom kanabinoida s iznimkom uzorka broj 22 koji nije deklariran i odnosi se na uzorak domaćeg ulja konoplje. Ukupno je ispitano 18 uzorka CBD ulja s različitim deklariranim koncentracijama CBD-a i 2 uzorka HHC ulja. Najmanja deklarirana koncentracija u CBD proizvodima sadržavala je 2,50% CDB-a, a najveća 20% CBD-a. Već je spomenuto da su HHC proizvodi noviji na tržištu i podvrgnuta su samo dva uzorka ovog ulja analizi sadržaja kanabinolida i to

10% i 20% ulja. Rezultati analize količine CBD-a u proizvodima od CBD i HHC uljima prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Udijeli CBD-a u CBD i HHC uljima

Uzorak (CBD ulje)	Deklarirana količina CBD (%)	Količina CBD(%) ± STD
1.	10%	4,96 ± 0,06
2.	5%	2,31 ± 0,01
3.	2,50%	1,06 ± 0,01
4.	20%	8,71 ± 0,07
5.	10%	4,23 ± 0,11
6.	20%	10,02±0,16
7.	10%	4,99 ± 0,04
8.	6%	2,69 ± 0,03
9.	10%	4,54 ± 0,08
10.	10% HHC	n.d.
11.	20% HHC	n.d.
12.	3%	0,50 ± 0,01
13.	5%	1,08 ± 0,01
14.	20%	8,53 ± 0,31
15.	15%	6,55 ± 0,01
16.	5%	2,53 ± 0,07
17.	15%	6,15 ± 0,02
18.	5%	2,05 ± 0,01
19.	6%	1,90 ± 0,01
20.	3%	1,02 ± 0,03
21.	3%	1,33 ± 0,08
22.	/	0,28 ± 0,01

Dobiveni rezultati ukazuju na nepravilnost deklaracije količine CBD-a u analiziranim proizvodima. U gotovo svim ispitanim uzorcima stvarna količina CBD-a u proizvodu ne prelazi polovicu označene količine na pakiranju (n=15). U oba uzorka deklariranim kao HHC ulje CBD nije detektiran (n=2). Manji dio uzoraka sadržavao je otprilike polovinu deklarirane količine CBD-a (n=4). Najniži sadržaj CBD-a (0,28%) zabilježen je u uzorku domaćeg ulja (nije posjedovao deklaraciju). Nijedan uzorak se nije približio postotku CBD-a označenom na deklaraciji proizvoda da bi se mogao izdvojiti kao najbolji postignuti rezultat.

Rezultate analize za spojeve CBDA i CBN prikazuje Tablica 6.

Tablica 6. Udijeli CBDA i CBN u CBD i HHC uljima

Uzorak (CBD ulje)	Deklarirana količina CBD (%)	Količina CBDA(%) ± STD	Količina CBN (%)
1.	10%	1,97 ± 0,04	n.d.
2.	5%	0,07 ± 0,00	n.d.
3.	2,50%	0,71 ± 0,02	T
4.	20%	0,13 ± 0,15	n.d.
5.	10%	T	n.d.
6.	20%	T	n.d.
7.	10%	1,51 ± 0,00	T
8.	6%	0,10 ± 0,00	n.d.
9.	10%	T	n.d.
10.	10% HCC	n.d.	n.d.
11.	20% HCC	n.d.	n.d.
12.	3%	3,69 ± 0,07	n.d.
13.	5%	5,31 ± 0,21	n.d.
14.	20%	1,71 ± 0,20	n.d.
15.	15%	1,47 ± 0,07	n.d.
16.	5%	n.d.	n.d.
17.	15%	n.d.	n.d.
18.	5%	1,63 ± 0,01	n.d.
19.	6%	2,03 ± 0,01	n.d.
20.	3%	0,94 ± 0,03	n.d.
21.	3%	T	n.d.
22.	/	1,03 ± 0,01	n.d.

n.d.- nedetektirano; T- u tragovima

Prisutnost CBDA zabilježena je u određenim količinama u više od pola testiranih uzoraka (n=14). U dva uzorka deklarirana kao HHC ulje nije postignuta detekcija spoja (n=2), dok je u četiri uzorka udio CBDA pronađen u tragovima (n=4). Najmanju količinu CBDA sadržavao je uzorak broj 2, a najveća vrijednost zabilježena je u uzorku broj 13. Oba uzorka su pripadala deklaraciji ulja od 5% CBD-a. U svim ispitanim uzorcima CBN nije detektiran. U uzorka 3. i 7. pronađen je u tragovima. Rezultati analize za spojeve THC i HHC u proizvodima na bazi CBD i HHC uljima prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Udio THC-a i HHC-a u CBD i HHC uljima

Uzorak (CBD ulje)	Deklarirana količina CBD (%)	Količina THC(%) ± STD	Količina HHC(%) ± STD
1.	8%	T	T
2.	5%	n.d.	n.d.
3.	2,50%	n.d.	n.d.
4.	20%	n.d.	n.d.
5.	10%	n.d.	n.d.
6.	20%	n.d.	T
7.	10%	n.d.	n.d.
8.	6%	n.d.	n.d.
9.	10%	n.d.	n.d.
10.	10% HCC	T	0,15 ± 0,01
11.	20% HCC	T	0,44 ± 0,00
12.	3%	T ²¹	T
13.	5%	T	T
14.	20%	T	T
15.	15%	T	T
16.	5%	T	T
17.	15%	n.d.	n.d.
18 ²⁸	5%	T	T
19.	6%	n.d. ⁶	n.d.
20.	3%	n.d.	n.d.
21.	3%	n.d.	n.d.
22.	/	n.d.	n.d.

n.d.- nedetektirano; T- u tragovima

Na svim deklaracijama analiziranih proizvoda THC je označen da ne prelazi dozvoljenu količinu od 0,2%. Njegova prisutnost u tragovima zabilježili smo u 7 uzoraka CBD ulja (n=7). U 13 uzoraka nije detektiran (n=13). U domaćem ulju koje se uzgajalo da bude obogaćeno kanabinoidima, a tako i spojem THC isti nije detektiran. Uz spomenuti uzorak niski udio THC-a imao je 15-ti uzorak koji je deklariran kao 15%-tni CBD proizvod. U oba HHC ulja zabilježena je prisutnost THC u tragovima. HHC nije detektiran u većini uzoraka, što nas ne iznenađuje jer se on rijetko nalazi u sklopu prirodno prisutnih kanabinoida (n=12), detektiran je u postotku od 0,15% u 10% i 0,44% u 20% HHC ulju (n=2). Provedena analiza udjela HHC

u ova dva ulja potvrdila je njihovu prisutnost u vrlo malim količinama, što nam daje za pravo da iznesemo kako dobiveni rezultati nisu u skladu s deklaracijom ovog proizvoda.

Proizvodi od CBD paste dolaze s općenito bogatijem CBD udjelom za razliku od ulja, a rangiraju se po sadržaju CBD-a od 20% do 70%. Ukupno se ispitalo 11 proizvoda, a rezultati analize za udio CBD u proizvodima od CBD paste prikazani su Tablicom 8.

Tablica 8. Udio CBD-a u CBD pastama.

Uzorak (CBD paste)	Deklarirana količina CBD (%)	Količina CBD (%) ± STD
1.	20%	20,68 ± 0,28
2.	30%	36,75 ± 0,05
3.	30%	32,85 ± 0,23
4.	30%	29,48 ± 0,13
5.	40%	18,47 ± 0,01
6.	50%	19,11 ± 0,04
7.	50%	21,39 ± 0,21
8.	40%	17,88 ± 0,08
9.	70%	23,53 ± 0,50
10.	50%	18,51 ± 3,92
11.	50%	21,93 ± 0,25

CBD je bio prisutan u svim ispitanim uzorcima (n=11). Jedan uzorak (br.2) premašuje deklariranu količinu (n=1) i u njemu je zabilježeno oko 7% veći udio CBD-a nego je navedeno u pratećoj deklaraciji. Naši rezultati ukazuju da je od ukupno 11 uzorka, tri su uzorka ispravno deklarirana i to su uzorci 1, 3 i 4 sa udjelom od 20% i 30% CBD-a (n=3). Sveukupno, 5 uzoraka sadrže manje od pola od navedene količine CBD-a (n=5). Pokazalo se da uzorak s očekivano najvišim postotkom CBD-a (70%) sadrži trećinu od označene količine (~23%). Uzorak broj 8 s deklaracijom CBD-a od 40% pokazao je niži udio te je CBD pasta s najnižim udjelom aktivne tvari među analiziranim uzorcima. Navedeni rezultati nas upućuju na zaključak da CBD paste s količinama CBD-a od 20% i 30% su uglavnom odgovarajuće deklaraciji dok deklarirane veće vrijednosti CBD-a u proizvodima od paste pokazuju znatno odstupanje u udjelu aktivne tvari.

Također su provedene analize udjela spojeva CBDA i CBN u CBD pastama i prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Udio CBDA i CBN u CBD pastama.

Uzorak (CBD paste)	Deklarirana količina CBD (%)	Količina CBDA(%) ± STD	Količina CBN(%) ± STD
1.	20%	14,92 ± 0,93	n.d.
2.	30%	n.d.	n.d.
3.	30%	1,22 ± 1,56	1,53 ± 0,01
4.	30%	12,93 ± 0,38	T
5.	40%	0,03 ± 0,00	0,34 ± 0,01
6.	50%	0,61 ± 0,69	n.d.
7.	50%	n.d.	n.d.
8.	40%	0,24 ± 0,01	1,53 ± 0,03
9.	70%	0,37 ± 0,02	n.d.
10.	50%	2,15 ± 0,89	n.d.
11.	50%	0,41 ± 0,22	1,86 ± 0,07

n.d.- nedetektirano; T- u tragovima

U 11 analiziranih uzoraka CBD pasta, CBDA nije detektiran u dva proizvoda (n=2), dok je u 9 uzoraka potvrđena prisutnost njegova prisutnost (n=9). Nešto niže rezultate udjela CBDA potvrdili smo u pastama br. 5, 8 i 11 (n=3). Najveću vrijednost pokazao je uzorak broj 1 deklariran kao 10% CBD ulje. CBN nije detektiran u 6 uzoraka (n=6), dok je u tragovima zabilježen u uzorku br. 4. Kvantifikacija CBN izvršena je u ukupno 5 uzoraka paste (n=5). Najnižu vrijednost udjela CBN-a zabilježili smo u uzorku paste br. 5 koji je deklariran kao 40% CBD pasta, sličnu vrijednost pokazali su uzorci 3 i 8, dok je uzorak 11 imao najveću vrijednost oko 1,86% CCBN-a.

Kao i kod analize CBD ulja i u CBD pastama smo proveli određivanje sadržaja THC-a i HHC-a. Rezultati analize CBD pastama na navedene spojeve prikazuje Tablica 10.

Tablica 10. Udio THC i HHC u CBD pastama

Uzorak (CBD paste)	Deklarirana količina CBD (%)	Količina THC (%) ± STD	Količina HHC (%) ± STD
1.	20%	T	n.d.
2.	30%	T	T
3.	30%	T	T
4.	30%	T	T
5.	40%	⁶ n.d.	n.d.
6.	50%	n.d.	T
7.	50%	T	T
8.	40%	n.d.	T
9.	70%	n.d.	n.d.
10.	50%	T	T
11.	50%	T	T

n.d- nedetektirano; T- u tragovima

THC i HHC nisu kvantificirani u nijednom uzorku (n=0). Prisutnost THC-a u tragovima potvrđena u 7 uzoraka (n=7), a nije detektirana u 4 uzoraka (n=4). HHC je u tragovima bio prisutan u 8 uzoraka (n=8). Svi uzorci u kojima je zabilježena prisutnost THC-a u tragovima, bili su pozitivni i na prisutnost HHC-a u tragovima.

5. ZAKLJUČAK

Velike potražnje za proizvodima od kanabidiola (CBD) dovodi do stalnog porasta proizvodnje. Odabir između mnoštva CBD proizvoda raznih proizvođača može predstaviti izazov potrošačima pri odabiru ispravne doze te kvalitetnog i učinkovitog CBD proizvoda. Stoga smo proveli istraživanje sa ciljem ispitivanja ispravnosti navedenog udjela glavnog kanabidiola (CBD), kao i njegovog analoga Δ -9-tetrahidrokanabinola (THC) te kanabidiolne kiseline (CBDA) i kanabinola (CBN) u nama dostupnim CBD uljima i pastama. U više od polovica analiziranih CBD ulja (64%) i 80% CBD pasti zabilježena je prisutnost CBDA, dok je prisutnost CBN zabilježena samo u tragovima u manje od 10% uzoraka ulja i 36% uzoraka pasti. Provedeno istraživanje pokazalo je da postoji veliko odstupanje od sadržaju CBD-a u CBD uljima od onoga koje je navedeno na popratnoj deklaraciji proizvoda. U gotovo svim ispitanim uzorcima CBD ulja, udio CBD-a bio je niži od polovice naznačenog udjela na deklaraciji. Kod CBD pasti provedena analiza je potvrdila da je u gotovo 30% uzoraka pravilno deklariran udio CBD-a, s tim da je sadržaj CBD-a u jednom uzorku bio veći za 7% od navedenog na deklaraciji. Ostali uzorci paste sadržavali su oko 50% niže udjele CBD-a. Na svim deklaracijama analiziranih proizvoda THC je označen da ne prelazi dozvoljenu količinu od 0,2%. Njegovu prisutnost u većem udjelu od dopuštenoga 0,2% nismo utvrdili u analiziranim CBD uljima i pastama. Na tržištu Europske uije su od nedavno prisutna i HHC ulja. Provedena analiza sadržaja dostupnih HHC ulja pokazala je da i kod ovih proizvoda udio aktivne tvari bio niži od navedene deklaracijom. Ovaj prirodni fitokanabinoid derivate je THC i to se indirektno potvrdilo jer u svim uzorcima koji su bili prisutni na THC zabilježili smo i prisutnost HHC-a. Izneseni podaci ukazuju da većina ulja i paste industrijske konoplje, koji su dostupni na tržištu su neispravno deklarirani i stoga predstavljaju potencijalni rizik za ljudsko zdravlje. Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na potrebu za učestalijim analizama ovih proizvoda od strane akreditiranih laboratorija kako bi se zaštitilo potrošače i omogućili ispravniji uvid na stanje tržišta ovih sve popularnijih dodataka prehrani.

6. LITERATURA

1. Cannabidiol Market Size Analysis | CBD Industry Growth Report, 2025 [Internet]. Grandviewresearch.com.2019. Available from: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/cannabidiol-cbd-market>
2. Rong C, Lee Y, Carmona NE, Cha DS, Ragguett RM, Rosenblat JD, et al. Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas and potential opportunities. Pharmacological Research [Internet]. 2017 Jul 1;121:213–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28501518>
3. Abu-Sawwa R, Stehling C. Epidiolex (Cannabidiol) Primer: Frequently Asked Questions for Patients and Caregivers. The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics. 2020 Jan;25(1):75–7.
4. Hazekamp A. The Trouble with CBD Oil. Medical Cannabis and Cannabinoids. 2018 Jun 12;1(1):65–72.
5. Ministarstvo poljoprivrede. Narodne novine. Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o suzbijanju zlouporabe droga. [Internet]. NN 39/19 [cited 2024 siječnja 30]. Available from: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2019_04_39_799.html
6. European Union. Regulation (EU) 2015/2283 of the European Parliament and of the Council of 25 November 2015 on novel foods, amending Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council and repealing Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council and Commission Regulation (EC) No 1852/2001 [Internet]. 2015. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2015/2283/oj>
7. Liebling JP, Clarkson NJ, Gibbs BW, Yates AS, O’Sullivan SE. An Analysis of Over-the-Counter Cannabidiol Products in the United Kingdom. Cannabis and Cannabinoid Research. 2020 Apr 1; 7(2):207-213.
8. Tomašić A, Institut P, Ruđer quot;, Za Molekularnu Biologiju Z, Za Elektronsku Mikroskopiju Autor Za L, Ana T, et al. Svojstva kanabinoidnih receptora ljekovite biljke Cannabis sativa. Med Vjesn [Internet]. 2012 [cited 2024 Feb 23];44(1-4):147–62. Available from: <https://hrcak.srce.hr/file/276869>
9. Russo EB. History of Cannabis and Its Preparations in Saga, Science, and Sobriquet. Chemistry & Biodiversity. 2007 Aug 21;4(8):1614–48.

10. Rull V. Origin, early expansion, domestication and anthropogenic diffusion of Cannabis, with emphasis on Europe and the Iberian Peninsula. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 2022 Jun;55:125670.
11. McPartland JM. Cannabis Systematics at the Levels of Family, Genus, and Species. *Cannabis and Cannabinoid Research*. 2018 Oct;3(1):203–12.
12. Government of Canada CFIA. The Biology of Cannabis sativa L. (Cannabis, hemp, marijuana) [Internet]. inspection.canada.ca. 2021. Available from: <https://inspection.canada.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/cannabis-sativa-l-eng/1612447522753/1612447718390>
13. Hillig KW. Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2005 Mar;52(2):161–80.
14. Small E, Cronquist A. A PRACTICAL AND NATURAL TAXONOMY FOR CANNABIS. *TAXON*. 1976 Aug;25(4):405–35.
15. TIS Standard Report Page: Cannabis sativa [Internet]. www.itis.gov. Available from: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19109#null
16. Butorac J. Predivo bilje [Internet]. repozitorij.agr.unizg.hr. Kugler; 2020. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:161145>
17. Thome, O. W. *Flora von Deutschland, Osterreich und Schweiz* Gera, Germany. 1885
18. Hartsel JA, Eades J, Hickory B, Makriyannis A. Cannabis sativa and Hemp. *Nutraceuticals*. 2016;735–54.
19. ElSohly MA, Slade D. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*. 2005 Dec;78(5):539–48.
20. Hillig KW, Mahlberg PG. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *American journal of botany* [Internet]. 2004;91(6):966–75. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653452>
21. Veress T, Szanto JI, Leisztner L. Determination of cannabinoid acids by high-performance liquid chromatography of their neutral derivatives formed by thermal decarboxylation. *Journal of Chromatography A* [Internet]. 1990 Nov [cited 2023 May 3];520:339–47. Available from:

https://diverdi.colostate.edu/C442/references/processing/decarboxylation/j_chromat_1990_v520_p339.pdf

22. Taura F, Sirikantaramas S, Shoyama Y, Shoyama Y, Morimoto S. Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: Recent Studies on Biosynthetic Enzymes. *Chemistry & Biodiversity*. 2007 Aug;4(8):1649–63.
23. Shoyama Y, Hirano H, Nishioka I. Biosynthesis of propyl cannabinoid acid and its biosynthetic relationship with pentyl and methyl cannabinoid acids. *Phytochemistry*. 1984 Aug;23(9):1909–12.
24. Brenneisen R. Chemistry and Analysis of Phytocannabinoids and Other Cannabis Constituents. *Forensic science and Medicine*. 2007 Nov; 17-49.
25. Rossi S, Elsohly M. The Volatile Oil Composition of Fresh and Air-Dried Buds of *Cannabis sativa*. *J Nut Prod [Internet]*. 1996 [cited 2024 Feb 27];59:49–51. Available from:https://www.alchimiaweb.com/blogfr/wpcontent/uploads/2015/12/Terpenes_In_Cannabis.pdf
26. Mediavilla V, Steinemann S. Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains *J. Int. Hemp Assoc.* 1997;4:80-82. Available from:<https://druglibrary.org/olsen/hemp/IHA/jiha4208.html>
27. Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deans SG, Franz C. Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. 2001 Jul 1;16(4):259–62.
28. Bertoli A, Tozzi S, Pistelli L, Angelini LG. Fibre hemp inflorescences: From crop-residues to essential oil production. *Industrial Crops and Products*. 2010 Nov;32(3):329–37.
29. Gagne SJ, Stout JM, Liu E, Boubakir Z, Clark SM, Page JE. Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 Jul 16;109(31):12811–6.
30. Pertwee RG. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology [Internet]*. 2009 Feb 2;147(S1):S163–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1760722/>

31. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*. 1964 Apr;86(8):1646–7.
32. Huffman JW, Duncan SG, Wiley JL, Martin BR. Synthesis and pharmacology of the 1',2'-dimethylheptyl- Δ 8-THC isomers: exceptionally potent cannabinoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 1997 Nov;7(21):2799–804.
33. Howlett AC. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2002 Jun 1;54(2):161–202.
34. Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, et al. The cannabinoid system and immune modulation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003 Jul 1;74(4):486–96.
35. Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 2002 Jan;135(1):181–7.
36. Cravatt BF, Lichtman AH. The endogenous cannabinoid system and its role in nociceptive behavior. *Journal of Neurobiology*. 2004;61(1):149–60.
37. DrugBank. Cannabidiol [Internet]. go.drugbank.com. 2022. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB09061>
38. World Health Organization. CANNABIDIOL (CBD) Critical Review Report [Internet]. 2018 Jun. Available from: https://docs.google.com/viewer?url=https%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fdocs%2Fdefault-source%2Fcontrolled-substances%2Fwhocbdreportmay2018-2.pdf%3Fsfvrsn%3Df78db177_2
39. CBD ulje za ljubimce 10% Garica Lu [Internet]. Garica Webshop. [cited 2024 May 8]. Available from: <https://garica.hr/product/cbd-ulje-za-ljubimce-garica-lu-10/>
40. PubChem. Cannabidiolic acid [Internet]. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. [cited 2024 Mar 3]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cannabidiolic-acid#section=2D-Structure>

41. Formato M, Crescente G, Scognamiglio M, Fiorentino A, Pecoraro MT, Piccolella S, et al. (-)-Cannabidiolic Acid, a Still Overlooked Bioactive Compound: An Introductory Review and Preliminary Research. *Molecules*. 2020 Jun 5;25(11):2638.
42. Cannabinol [Internet]. go.drugbank.com. [cited 2024 Mar 3]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB14737>
43. Maioli C, Mattoteia D, Amin HIM, Minassi A, Caprioglio D. Cannabinol: History, Syntheses, and Biological Profile of the Greatest “Minor” Cannabinoid. *Plants*. 2022 Oct 28;11(21):2896.
44. Dronabinol [Internet]. go.drugbank.com. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00470>
45. Ujváry I, Evans-Brown M, Gallegos A, Planchuelo G, de Morais J, Christie R, et al. Hexahydrocannabinol (HHC) and related substances [Internet]. Publications Office of the European Union: European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.; 2023 [cited 2024 May 11]. Available from: doi: 10.2810/852912
46. Miller OS, Elder EJ, Jones KJ, Gidal BE. Analysis of cannabidiol (CBD) and THC in non-prescription consumer products: Implications for patients and practitioners. *Epilepsy & Behavior*. 2022 Feb; 127:108514.
47. El Sohly MA, Murphy TP, Khan I, Walker LW, Gul W. Analysis of Cannabidiol, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, and Their Acids in CBD Oil/ Hemp oil Products. *Medical Cannabis and Cannabinoids*. 2020 Aug 13;1-13.

Popis tablica

Tablica 1. Klasifikacija <i>Cannabis sativa</i> L.....	3
Tablica 2. Pripravci od konoplje i udio THC-a.....	17
Tablica 3. Prikaz retencijskih vremena za četiri kanabinoidna standarda.....	24
Tablica 4. Prikaz limita detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za tražene kanabinoide te izraženi u µg/mL.....	25
Tablica 5. Udijeli CBD-a u CBD i HHC uljima.....	26
Tablica 6. Udijeli CBDA i CBN u CBD i HHC uljima.....	27
Tablica 7. Udio THC-a i HHC-a u CBD i HHC uljima.....	28
Tablica 8. Udio CBD-a u CBD pastama.....	29
Tablica 9. Udio CBDA i CBN u CBD pastama.....	30
Tablica 10. Udio THC i HHC u CBD pastama.....	31

Popis slika

Slika 1. Konoplja (<i>Cannabis sativa</i> L.).....	4
Slika 2. Kemijska struktura razreda kanabinoida.....	5
Slika 3. Uvjeti nužni za provedbu dekarboksilacije kanabinoidne kiseline natrag u neutralan oblik.....	6
Slika 4. Biosinteza kanabinoida i njihova pregradnja.....	7
Slika 5. Učestali monoterpeni u <i>C. sativa</i>	8
Slika 6. Biosinteza fitokanabinoida i terpena.....	10
Slika 7. Shematski prikaz endokanabinoidnog signalnog puta.....	12
Slika 8. Strukturna formula CBD-a.....	13
Slika 9. CBD proizvodi za kućne ljubimce.....	14
Slika 10. Strukturna formula CBDA.....	15
Slika 11. Strukturna formula CBN-a.....	15
Slika 12. Strukturna formula THC-a.....	16
Slika 13. Strukturna formula HHC-a.....	18
Slika 14. Primjer kromatograma s četiri standarda kanabinoida.....	24
Slika 15. Primjer kromatograma u kojem su detektirani HHC izomeri	25

7. SAŽETAK

Određivanje aktivnih komponenti u ulju konoplje

Cilj: Proizvodi koji sadrže kanabidiol (CBD) su trenutačno veoma toplami. Konzumiraju se u različite svrhe, a mogu imati blagotvorni učinak na neka zdravstvena stanja. Cilj ovog rada bio je ispitati sastav komercijalno dostupnih CBD proizvoda u obliku ulja i pasti, te dva dostupna HHC ulja. Ovaj rad imao je za cilj odrediti koncentraciju i udio sljedećih kanabinoida: CBD, CBDA, CBN, THC te HHC, a usporedbom dobivenog udjela kanabinoida s onima navedenim na deklaraciji proizvoda dobili smo uvid u ispravnost popratnih deklaracija.

Metode: Proizvodi od CBD-a (20 ulja i 11 pasti) i dva HHC ulja kupljeni su u lokalnim specijaliziranim CBD trgovinama ili putem online trgovine u Hrvatskoj i Sloveniji. Koncentracije CBD, CBDA, CBN, THC i HHC-a su kvantificirane u CBD uljima i pastama, te HHC uljima pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV/VIS detektorom (HPLC-UV/VIS). S napomenom da je koncentracija, HHC iskazana preko koncentracije THC, jer HHC standard nismo posjedovali.

Rezultati: U više od polovica analiziranih CBD ulja (64%) i 80% CBD pasti zabilježena je prisutnost CBDA, dok je prisutnost CBN zabilježena samo u tragovima u manje od 10% uzoraka ulja i 36% uzoraka pasti. Provedena analiza pokazala je veliko odstupanje u sadržaju CBD-a u CBD uljima od onoga koje je navedeno na popratnoj deklaraciji proizvoda. U gotovo svim ispitanim uzorcima CBD ulja, udio CBD-a bio je niži od polovice naznačenog udjela na deklaraciji. Kod CBD pasti provedena analiza je potvrdila da je u gotovo 30% uzoraka pravilno deklariran udio CBD-a, s tim da je sadržaj CBD-a u jednom uzorku bio veći za 7% od navedenog na deklaraciji. Ostali uzorci paste sadržavali su oko 50% niže udjele CBD-a. Prisutnost THC-a u većem udjelu od dopuštenoga 0,2% nismo utvrdili u analiziranim CBD uljima i pastama kao i HHC uljim. Analiza HHC ulja pokazala je da i kod ovih proizvoda udio aktivne tvari niži od navedene deklaracijom.

Zaključci: Izneseni podaci ukazuju da većina ulja i paste industrijske konoplje, koji su dostupni na tržištu su neispravno deklarirani i stoga predstavljaju potencijalni rizik za ljudsko zdravlje. Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na potrebu za učestalijim analizama ovih proizvoda od strane akreditiranih laboratorija kako bi se zaštitilo potrošače i omogućili ispravniji uvid na stanje tržišta ovih sve popularnijih dodataka prehrani.

Ključne riječi: CBD ulja i paste, HHC ulja, CBDA, CBN, THC, deklaracija proizvoda

8. SUMMARY

Determination of active components in hemp oil

Aim: Products containing cannabidiol (CBD) are currently very popular. They are consumed for various purposes and can have a positive effect on some health conditions. The aim of this work was to investigate the composition of commercially available CBD products in the form of oil and paste as well as two available HHC oils. The aim of this work was to determine the concentration and proportion of the following cannabinoids: CBD, CBDA, CBN, THC and HHC. By comparing the percentage of cannabinoids determined with the cannabinoids listed in the product declaration, we were able to gain an insight into the accuracy of the accompanying declarations.

Methods: CBD products (20 oils and 11 pastes) and two HHC oils were purchased in local specialized CBD stores or online stores in Croatia and Slovenia. The CBD, CBDA, CBN, THC and HHC concentrations were quantified in the CBD oils and pastes as well as in the HHC oils using high performance liquid chromatography with UV/VIS detector (HPLC-UV/VIS). Note that the HHC concentration is expressed above the THC concentration as we did not have an HHC standard available.

Results: CBDA was detected in more than half of the CBD oils (64 %) and 80% of the CBD pastes tested, while CBN was only present in traces in less than 10% of the oil samples and 36% of the paste samples. The analysis revealed a large deviation of the CBD content in CBD oils from the information on the accompanying product declaration. In almost all of the CBD oil samples tested, the CBD content was less than half of that stated on the declaration. In the case of CBD pastes, the analysis carried out confirmed that the CBD content was correctly declared in almost 30% of the samples, whereby the CBD content in one sample was 7% higher than stated on the declaration. Other paste samples contained a CBD content that was around 50% lower. In the CBD oils and pastes tested, as well as in the HHC oils, we were unable to detect THC in a higher proportion than the permitted 0.2%. The analysis of HHC oil showed that the proportion of the active ingredient in these products is also lower than stated in the declaration.

Conclusions: The data presented show that the majority of industrial hemp oils and pastes available on the market are mislabeled and therefore pose a potential risk to human health. The results of this investigation clearly show that these products need to be analyzed more frequently by accredited laboratories in order to protect consumers and gain a more accurate insight into the market situation of these increasingly popular dietary supplements.

Keywords: CBD oils and pastes, HHC oils, CBDA, CBN, THC, product declaration

9. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI

Ime i prezime: Paulina Mijanović

Datum i mjesto rođenja: 14.02.1998. u Splitu

Adresa stanovanja: Matoševa 157, Solin

Mobitel: 099/834 22 19

OBRAZOVANJE

2004.-2012. Osnovna škola Kraljice Jelene, Solin

2012.-2016. II gimnazija, Split

2016.-2020. Prediplomski stručni studij prehrambene tehnologije, Veleučilište “Marko Marulić” u Kninu

2021. – Diplomski sveučilišni studij forenzike, Forenzična kemija i molekularna biologija, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, Sveučilište u Splitu

OSTALO

2019. Stručni posjet i radionica “Proizvodnja dječje hrane u Hrvatskoj”, HiPP, Glina

2022. Prisutnost na gostujućem predavanju Kelly E. Blevins, Ph.D. na temu paleopatologije i drevnog DNK.

2022. ISABS conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic in Individualized Medicine

2022. Sudjelovanje u europskoj noći istraživača

2022. Obnašanje uloge tajnika i zamjenika predsjednika Studentskog zbora Sveučilišnog odjela za forenzične znanosti u Splitu

2024. Aktivno sudjelovanje u provedbi programa tematskih večeri forenzike od strane studenata forenzike

10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, Paulina Mijanović, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom Određivanje aktivnih komponenti u ulju konoplje rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovog rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ničija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovog rada nije iskorišten u nijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj, ili inoj ustavi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split,

Potpis studenta/studentice: *Paulina Mijanović*

konoplja

ORIGINALITY REPORT

12%

SIMILARITY INDEX

12%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	hrcak.srce.hr Internet Source	4%
2	repozitorij.unios.hr Internet Source	1%
3	repozitorij.forenzika.unist.hr Internet Source	1%
4	repozitorij.agr.unizg.hr Internet Source	1%
5	repozitorij.unizg.hr Internet Source	<1%
6	fedorabg.bg.ac.rs Internet Source	<1%
7	repozitorij.unin.hr Internet Source	<1%
8	pure.rug.nl Internet Source	<1%
9	repozitorij.svkst.unist.hr Internet Source	<1%

10	hrwiki.top Internet Source	<1 %
11	repozitorij.ptfos.hr Internet Source	<1 %
12	repozitorij.vef.unizg.hr Internet Source	<1 %
13	Radmila Pavlovic, Giorgio Nenna, Lorenzo Calvi, Sara Panseri et al. "Quality Traits of "Cannabidiol Oils": Cannabinoids Content, Terpene Fingerprint and Oxidation Stability of European Commercially Available Preparations", <i>Molecules</i> , 2018 Publication	<1 %
14	forenzika.unist.hr Internet Source	<1 %
15	repository.biotech.uniri.hr Internet Source	<1 %
16	www.research-collection.ethz.ch Internet Source	<1 %
17	bhzdravlje.ba Internet Source	<1 %
18	mafiadoc.com Internet Source	<1 %
19	www2.mdpi.com Internet Source	<1 %

20

Joshua A. Hartsel, Joshua Eades, Brian Hickory, Alexandros Makriyannis. "Cannabis sativa and Hemp", Elsevier BV, 2016

Publication

<1 %

21

epdf.pub

Internet Source

<1 %

22

hr.wikipedia.org

Internet Source

<1 %

23

www.unios.hr

Internet Source

<1 %

24

repozitorij.fsb.unizg.hr

Internet Source

<1 %

25

repozitorij.uni-lj.si

Internet Source

<1 %

26

salonemili.rs

Internet Source

<1 %

27

zir.nsk.hr

Internet Source

<1 %

28

Lyndsey L. Anderson, Maia G. Etchart, Dilara Bahceci, Taliesin A. Golembiewski, Jonathon C. Arnold. "Cannabis constituents interact at the drug efflux pump BCRP to markedly increase plasma cannabidiolic acid concentrations", Scientific Reports, 2021

Publication

<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On