



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET
FARMACEUTSKO INŽENJERSTVO

EKSTRAKCIJA INDUSTRIJSKE KONOPLJE (*CANNABIS SATIVA L.*)

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:
dr Senka Vidović, vanr. prof

Kandidat:
Zorica Drinić, mast. inž. tehnol.

Novi Sad, septembar 2020. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska publikacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Zorica Drinić
Mentor: MN	dr Senka Vidović, vanr. prof.
Naslov rada: NR	Ekstrakcija industrijske konoplje (<i>Cannabis sativa</i> L.)
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2020
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	6 poglavlja, 166 stranica, 20 tabela, 58 slika, 35 formula
Naučna oblast: NO	Tehničko - tehnološke nauke
Naučna disciplina: ND	Farmaceutska tehnologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Industrijska konoplja, <i>Cannabis sativa</i> L., kanabinoidi, polifenoli, savremene i klasične metode ekstrakcije, sušenje raspršivanjem
UDK	

<p>Čuva se: ČU</p>	<p>Biblioteka Tehnološkog fakulteta, Novi Sad</p>
<p>Važna napomena: VN</p>	<p>Nema</p>
<p>Izvod: IZ</p>	<p>U okviru ovog rada izvršeno je ispitivanje različitih procesa ekstrakcije herbe industrijske konoplje. Za ekstrakciju određenih bioaktivnih jedinjenja primenjene su klasične tehnike ekstrakcije, maceracija i <i>Soxhlet</i> ekstrakcija, dok su od savremenih metoda primenjene ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju i ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju. Praćenjem uticaja ulaznih promenljivih (procesnih parametara) na odabrane izlazne promenjive (sadržaj bioaktivnih jedinjenja ili antioksidativnu aktivnost) za svaku tehniku ekstrakcije pojedinačno utvrđeni su optimalni uslovi ekstrakcije. Nakon izvršenog poređenja odabrana je najadekvatnija tehnika ekstrakcije za pripremu tečnog ekstrakta koji će biti transformisan u suvi ekstrakt primenom metode sušenja raspršivanjem. Prilikom dobijanja suvog ekstrakta ispitan je uticaj različite koncentracije nosača na kvalitet ekstrakata i efikasnost sušenja. Dobijeni ekstrakti su okarakterisani u pogledu fizičkih i hemijskih osobina. Sadržaj kanabinoida u tečnim ekstraktima suve herbe industrijske konoplje ispitanih u ovoj doktorskoj disertaciji je bio u opsegu od 0,4314 mg/mL CBD-a i 0,0364 mg/mL THC-a (u optimalnom ekstraktu dobijenom maceracijom) do 1,0420 mg/mL CBD-a i 0,0430 mg/mL THC-a (u optimalnom ekstraktu dobijenom mikrotalasnom ekstrakcijom). U ekstraktima koji su nepolarnog karaktera i koji su dobijeni primenom <i>Soxhlet</i> ekstrakcije sadržaj CBD-a i THC-a je bio 64,40 i 2,90 mg/g, dok je primenom superkritične ekstrakcije dobijen sadržaj CBD-a i THC-a u opsegu od 76,1193 do 163,1111 mg/g i od 4,1746 do 6,5803 mg/g. Tečni ekstrakti dobijeni primenom vode i etanola kao ekstragensa bili su bogati flavonoidima i fenolima, a utvrđeno je i da imaju značajnu antioksidativnu aktivnost, dok su ekstrakti dobijeni <i>Soxhlet</i> ekstrakcijom i ekstrakcijom ugljendioksidom u superkritičnom stanju bili bogati lipofilnim jedinjenjima i terpenima. Ovako dobijeni ekstrakti predstavljaju visokovredne proizvode koji imaju</p>

	veliki potencijal za upotrebu u farmaceutskoj industriji.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	29.11.2018.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: KO	<p>Katarina Šavikin, dr, naučni savetnik, Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ Beograd, predsednik</p> <p>Senka Vidović, dr, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, član</p> <p>Anamarija Koren, dr, naučni saradnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, član</p> <p>Jadranka Fraj, dr, docent, Tehnološki fakultet Novi Sad, član</p> <p>Jelena Vladić, dr, naučni saradnik, Tehnološki fakultet Novi Sad, član</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Printed textual material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Zorica Drinić
Mentor: MN	Senka Vidović, PhD, Associate professor
Title: TI	Extraction of industrial hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)
Language of text: LT	Serbian (Latin script)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2020
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Boulevard cara Lazara 1
Physical description: PD	6 chapters, 166 pages, 20 tables, 58 figures, 35 formulas
Scientific field SF	Technical - technological sciences
Scientific discipline SD	Pharmaceutical technology
Subject, Key words SKW	Industrial hemp, <i>Cannabis sativa</i> L., cannabinoids, polyphenols, novel and classical extraction methods, spray drying
UC	

Holding data: HD	Library of Faculty of Technology of Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	<p> Various extraction processes of the aerial parts of industrial hemp were examined. From classic extractions, maceration and Soxhlet extraction were applied, while from novel methods, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, subcritical water extraction and supercritical carbon dioxide extraction were applied. By monitoring the influence of the input variables on the selected output variables for each extraction, the optimal extraction conditions were determined separately. After a comparison of all the extraction processes tested, microwave-assisted extraction was selected to prepare the liquid extract for spray drying. The effect of different carrier concentrations was examined during the preparation of the dry extract. The extracts obtained were characterized in terms of physical and chemical properties. The content of cannabinoids in liquid extracts of dry <i>Cannabis sativa</i> herba examined ranged from 0.4314 mg/mL for CBD and 0.0364 mg/mL for THC in the optimum extract obtained by maceration to 1.0420 mg/mL for CBD and 0.0430 mg/mL for THC in the optimum extract obtained by microwave-assisted extraction. The CBD and THC content in extract obtained by Soxhlet extraction was 64.4000 mg/mL and 2.9000 mg/mL, respectively, while the highest content of CBD and THC in the supercritical carbon dioxide extract was 163.11 and 6.5803 mg/g. In addition to cannabinoids, the liquid extracts obtained were rich in phenols and flavonoids, and have considerable antioxidant activity, while the extracts obtained by Soxhlet extraction and supercritical carbon dioxide were rich in lipophilic compounds and terpenes. The extracts mentioned above are high value products which have great potential for implementation in the pharmaceutical industry. </p>
Accepted on Senate on: AS	29.11.2018.
Defended: DE	

Thesis Defend Board: DB	<p>Katarina Šavikin, PhD, Principal Research Fellow, Institute for medicinal plant research „Dr Josif Pančić“ Belgrade, president</p> <p>Senka Vidović, PhD, Associate Professor, Faculty of technology Novi Sad, member</p> <p>Anamarija Koren, PhD, Research Associate, The Institute of Field and Vegetable Crops Novi Sad, member</p> <p>Jadranka Fraj, PhD, Assistant Professor, Faculty of technology Novi Sad, member</p> <p>Jelena Vladić, PhD, Research Associate, Faculty of technology Novi Sad, member</p>
----------------------------	--

Zahvalnica

Najpre, neizmernu zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Senki Vidović na pruženim stručnim savetima tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije, na prenesenom iskustvu, usmeravanju u naučnom radu i profesionalnom razvoju, a pre svega na nesebičnoj podršci i prijateljskom odnosu koji su mi pomogli da prevaziđem sve prepreke tokom izrade ove disertacije.

Dr Jeleni Vladić se posebno zahvaljujem na sveobuhvatnom angažovanju i izuzetnoj podršci, savetima i stručnoj pomoći u toku izrade ovog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i dr Anamariji Koren, koja me je uvela u svet gajenja industrijske konoplje, na stručnim savetima, konstruktivnim komentarima i pruženoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije.

Dr Katarini Šavikin dugujem veliku zahvalnost na stručnim savetima i korisnim sugestijama koji su doprineli konačnoj formi doktorske disertacije.

Dr Jadranki Fraj dugujem veliku zahvalnost na predanom čitanju disertacije i stručnim sugestijama.

Dr Tijani Zeremski dugujem zahvalnost na vođenju eksperimentalnog rada u okviru određivanja sadržaja kanabinoida gasno/masenom hromatografijom.

Dr Aleksandri Mišan dugujem zahvalnost na realizaciji eksperimentalnog rada određivanja fenolnog sastava ekstrakata herbe industrijske konoplje

Svim kolegama sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ i kolegama sa Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, koji su mi svako na sebi svojstven način pomogli u izradi ovog rada, dugujem veliku zahvalnost.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici, koja je bila moj najveći izvor snage. Svojim roditeljima, Nenadu i Božici, vereniku Milanu i sestri Bojani koji su u svakom momentu verovali u mene, podržavali me i bili oslonac na svakom mom životnom putu. Hvala vam na neizmernoj ljubavi, razumevanju, strpljenu i pomoći. Bez vas ništa ovo ne bi bilo moguće.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. Konoplja (<i>Cannabis</i>)	4
2.1.1. Istorija upotrebe konoplje.....	4
2.1.2. Botaničke karakteristike konoplje	5
2.1.3. Rasprostranjenost i agrokulturni status konoplje.....	8
2.1.4. Hemijski sastav.....	11
2.1.5. Biosinteza kanabionoida.....	18
2.1.6. Farmakodinamika i farmakokinetika kanabinoida	20
2.1.7. Toksičnost kanabinoida	21
2.1.8. Farmakološko delovanje.....	23
2.1.9. Potencijalna medicinska primena konoplje	25
2.1.10. Regulatorna upotreba konoplje.....	27
2.2. Izolovanje bioaktivnih jedinjenja	29
2.2.1. Klasične ekstrakcije.....	29
2.2.2. Savremene ekstrakcije	30
2.3. Sušenje raspršivanjem	45
2.3.1. Proces sušenja raspršivanjem	45
2.3.2. Prednosti i nedostaci sušenja raspršivanjem.....	48
2.4. Optimizacija tehnološkog procesa.....	48
2.4.1. Planiranje eksperimenta.....	48
2.4.2. Statistička obrada rezultata.....	50
3. MATERIJAL I METODE	53
3.1. Biljni materijal.....	53
3.1.1. Karakterizacija biljnog materijala	54
3.2. Hemikalije i reagensi	55
3.3. Primenjene metode ekstrakcije	55
3.3.1. Maceracija	55
3.3.2. Soxhlet ekstrakcija	56
3.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija	56
3.3.4. Mikrotalasna ekstrakcija.....	57
3.3.5. Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju	57
3.3.6. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju	58

3.4. Sušenje raspršivanjem	59
3.5. Karakterizacija ekstrakata.....	60
3.5.1. Prinos ekstrakcije.....	60
3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	61
3.5.3. Određivanje sadržaja flavonoida	61
3.5.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti	62
3.5.5. Određivanje reduktivnog kapaciteta.....	63
3.5.6. Određivanje sadržaja CBD-a i THC-a primenom GC-MS metode.....	63
3.5.7. Određivanje relativnog sadržaja jedinjenja primenom GC-MS metode	64
3.5.8. Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja primenom HPLC metode.....	64
3.5.9. Fizičke karakteristike suvih ekstrakata.....	65
3.5. Planiranje eksperimenta i statistička obrada rezultata	66
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	70
4.1. Karakterizacija herbe industrijske konoplje	70
4.2. Klasične metode ekstrakcije primenjene za ekstrakciju herbe industrijske konoplje	73
4.2.1. Maceracija herbe industrijske konoplje.....	73
4.2.2. <i>Soxhlet</i> ekstrakcija herbe industrijske konoplje	81
4.3. Savremene metode ekstrakcije primenjene za ekstrakciju herbe industrijske konoplje	82
4.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija herbe industrijske konoplje.....	82
4.3.2. Mikrotalasna ekstrakcija herbe industrijske konoplje	95
4.3.3. Ekstrakcija herbe industrijske konoplje vodom u subkritičnom stanju.....	110
4.3.4. Ekstrakcija herbe industrijske konoplje ugljendioksidom u superkritičnom stanju	112
4.4. Dobijanje suvog ekstrakta herbe industrijske konoplje.....	127
5. ZAKLJUČAK.....	133
6. LITERATURA	136

1. UVOD

Lekovite biljke su se koristile od davnina. Najstariji pisani izvori o upotrebi lekovitih biljaka od strane čoveka su sumerske glinene tablice, u kojima je pored opisa makroskopskih karakteristika lekovitih biljaka zapisana i njihova upotreba, kao i galenska forma u kojoj se određena biljka upotrebljava (Kelly, 2009). Neke od biljaka koje su koristili su mak, bunika i mandragora.

U knjizi o lekovitom bilju koje je napisana oko 2500 godina p.n.e., Pen-tsoo Ching, opisuje se 365 lekovitih biljaka među kojima su biljke koje se i danas koriste kao što su efedra, cimet, ginseng, tatula, žuta lincura, čaj i druge (Bottcher, 1965; Wiart, 2006).

U Indiji se lekovito bilje spominje u svetim knjigama, Vede. U njima postoje zapisi o biljkama koje se danas najčešće koriste kao začini: muskatni oraščići, biber, karanfilić (Tucakov, 1971).

Najvažniji dokument o staroegipatskoj medicini i farmaciji je Ebersov papirus napisan oko 1550 godine p.n.e. U njoj je dato oko 700 biljnih vrsta koje su se upotrebljavale u terapiji kao što su šipak, ricinus, aloja, sena, beli luk, smokva, vrba, korijander, kleka, kičica i druge (Glesinger, 1954; Tucakov, 1964).

Drevni Grci su dejstva lekovitih biljaka povezivali sa religijom, pa su tako smatrali da postoji bog za lekove i lekovite trave kojeg su zvali Asklepije. Hipokrat, najpoznatiji lekar drevne Grčke, je prvi sakupio, objedinio i sistematizovao medicinska i farmaceutska iskustva starih Grka. U ovom delu je opisano oko 230 lekovitih biljaka koje su svrstane prema farmakoterapijskim svojstvima (Tasić i sar., 2009).

Osnivač evropske farmakognozije koji se ujedno smatra i „ocem“ farmakognozije je starorimski lekar, grčkog porekla, Dioskorid. Dioskorid uvodi nove biljne droge kao što su valerijana, hrast, đumbir, kamilica, nana, mrazovac, lavanda i mnoge druge. U pisanim monografijama biljaka on opisuje način sakupljanja, čuvanja i upotrebe tih biljaka. Pored toga daje i crteže biljaka i droga, kao i njihovih falsifikata. Opisao je oko 500 biljnih, životinjskih i mineralnih droga zasnovano na grčkoj, egipatskoj, vavilonskoj i sumerskoj medicini. Sva ova saznanja o lekovitim biljkama su, požarom u Aleksandrijskoj biblioteci, izgubljena (Tasić i sar., 2009).

Plinije Stariji, nakon pokoravanja Grčke od strane Rima, preuzima sva medicinska i farmaceutska saznanja starih Grka koja sabira u svoj knjizi i tom prilikom opisuje oko 1000 lekovitih biljaka (Toplak Galle, 2005).

Čuveni Galen je najpoznatiji lekar i apotekar Starog Rima koji se smatra „ocem“ galenske farmacije, odnosno „ocem“ farmaceutskih preparata koji se spravlja u apotekama jednostavnim farmaceutskim postupcima od različitih droga. Ovi preparati se danas nazivaju

galenski preparati. Galen je opisao oko 400 galenskih preparata koji se dobijaju od droga biljnog, životinjskog i mineralnog porekla (Tasić i sar., 2009).

Slabljenjem i raspadom starog Rima dolazi do stagniranja u farmaciji i medicini i lečenje lekovitim biljkama prelazi u manastire (Petrovska, 2012).

Karlo Veliki, osnivač ugledne medicinske škole u Salermu, u Kapitularima daje popis oko 100 biljnih vrsta koje bi obavezno trebalo gajiti. Osnivanjem medicinske škole ponovo dolazi do procvata medicine i farmacije (Tucakov, 1990).

Arapi su ulagali u razvoj nauke, pa tako i u razvoj lečenja lekovitim biljkama. Najpoznatiji arapski lekar, Avicena, u svojoj knjizi Kanon medicinske nauke opisao je oko 900 lekovitih biljaka, kao i način njihove primene. Ova knjiga je prevedena na latinski i druge jezike i dugo godina je bila u upotrebi u Evropi (Tasić i sar., 2009).

Industrijska konoplja je biljna kultura duge tradicije gajenja. Gajenje industrijske konoplje je vršeno pre svega u cilju dobijanja vlakana koja su se, zbog svojih povoljnih fizičkih i hemijskih karakteristika, koristila u tekstilnoj, užarskoj i papirnoj industriji. Danas se industrijska konoplja gaji za različite namene pri čemu se teži iskorištenju sporednih proizvoda prilikom dobijanja vlakana. Zrno industrijske konoplje se koristi kao hrana ili za dobijanje konopljinog ulja koje se dalje koristi u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji zbog sadržaja esencijalnih masnih kiselina. Ostatak nakon dobijanja hladno ceđenog ulja industrijske konoplje je vredan izvor proteina koji se koristi za dobijanje različitih dijetetskih suplemenata i funkcionalne hrane. Pored upotrebe industrijske konoplje u tekstilnoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji, danas se sve više vrše istraživanja industrijske konoplje u cilju njene primene u farmaceutske industriji (Stojanović i sar., 2019).

Upotreba biljnih vrsta roda *Cannabis* kao lekovitih biljaka je poznata od davnina. Međutim, njihova upotreba u medicinske svrhe počinje da opada početkom 20. veka kako primena nestandardizovanih ekstakata nije davala uvek isti terapijski efekat. Jedinствена konvencija Ujedinjenih nacija o opojnim drogama klasifikovala je sve biljne vrste roda *Cannabis* kao drogu koja nema medicinsku primenu 1961. godine čime u potpunosti prestaje njihova primena u medicinske svrhe.

Otkriće strukture kanabinoida, kao i endokanabinoidnog sistema koji je odgovoran za važne biološke funkcije, početkom 1990. godine dovelo je do pojačanog interesovanja, kako naučnog, tako i interesovanja pacijenata za upotrebu biljaka roda *Cannabis* u medicinske svrhe. Sve više se objavljuju naučni radovi u čijem fokusu su hemijski sastav, biološka aktivnost i mogućnosti ekstrakcije kanabinoida. Međutim, prethodno spomenuta definicija biljnih vrsta roda *Cannabis* kao droge koja nema medicinsku primenu je ograničila klinička istraživanja (NASEM, 2017).

Upotreba biljaka roda *Cannabis* u medicinske svrhe je legalizovana sredinom 1990-tih godina u nekoliko američkih država. Početkom 2000-tih, Izrael (2001) i Holandija (2003), a

kasnije i druge države (Švajcarska (2011), Češka (2013), Australija (2016) i Nemačka (2017)), su odobrile upotrebu biljaka roda *Cannabis* u medicinske svrhe (EMA, 2018b). Biljke roda *Cannabis* se zakonski regulišu samo ukoliko je sadržaj Δ^9 -tetrahidrokanabinola dovoljan da izazove psihoaktivan efekat, ali u pojedinim državama se kontrolišu i one biljke u kojima je sadržaj ove psihoaktivne supstance zanemarljiv (EMA, 2018a).

U većini zemalja Evropske unije (EU), biljke roda *Cannabis* su legalizovane u medicinske svrhe. Pojedine zemlje dozvoljavaju njenu upotrebu samo u obliku gotovih preparata koji sadrže izolovane ili hemijski sintetizovane određene kanabinoide, dok pojedine dozvoljavaju i upotrebu ekstrakata (EMA, 2018b). U zemljama Balkana (Srbija, Crna Gora, Bosna i Hercegovina, Bugarska) nije dozvoljena upotreba biljaka roda *Cannabis* u medicinske svrhe. U Srbiji su one obuhvaćene Pravilnikom o utvrđivanju Spiska psihoaktivnih kontrolisanih supstanci (2019).

Prema Evropskoj agenciji za lekove (EMA, 2018a) biljke roda *Cannabis* i proizvodi na bazi ovih biljaka koji se koriste u medicinske svrhe, bilo da imaju visok sadržaj psihoaktivnog THC-a (Δ^9 -tetrahidrokanabinola) ili nepsihoaktivnog CBD-a (kanabidiola), se označavaju pojmom medicinska konoplja, dok biljke roda *Cannabis*, koje se koriste za dobijanje vlakana i semena, se označavaju kao industrijska konoplja.

U industrijskoj konoplji (*Cannabis sativa* L.) dozvoljen sadržaj THC-a, koji je nosilac psihoaktivnosti, razlikuje se u različitim državama. U zemljama EU maksimalan dozvoljen sadržaj THC-a u industrijskoj konoplji je 0,2% (EMA, 2018a), dok u Srbiji ova vrednost iznosi 0,3% (Pravilnik o uslovima za gajenje konoplje, 2013).

Kako je herba industrijske konoplje bogata farmakološki aktivnim jedinjenjima cilj ove doktorske disertacije je dobijanje novih, visokovrednih ekstrakata, željenih karakteristika, primenom različitih klasičnih i savremenih tehnika ekstrakcije. Za dobijanje tečnih ekstrakata primenjene su metoda klasične ekstrakcije, maceracija, i savremene metode ekstrakcije, mikrotalasna ekstrakcija, ultrazvučna ekstrakcija i ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju. Lipofilni ekstrakti su dobijenim primenom *Soxhlet* ekstrakcije i ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom. Primenjene ekstrakcione tehnike su optimizovane u pogledu najuticajnijih procesnih parametara, a kao izlazne promenjive su praćeni prinos ekstrakcije, sadržaj ciljnih jedinjenja, antioksidativna aktivnost i reduktivna sposobnost. Takođe, sve ekstrakcione tehnike za dobijanje tečnih ekstrakata su upoređene i odabrana je najadekvatnija tehnika za proizvodnju tečnih ekstrakta koji su se metodom sušenja raspršivanjem preveli u čvrstu formu. Prilikom dobijanja suvih ekstrakata metodom sušenja raspršivanjem ispitan je uticaj koncentracije nosača na hemijske i fizičke karakteristike dobijenih ekstrakata.

2. OPŠTI DEO

2.1. Konoplja (*Cannabis*)

2.1.1. Istorija upotrebe konoplje

Biljke roda konoplja (*Cannabis*) su jedne od najranije kultivisanih biljaka. Prvi dokazi o upotrebi i kultivaciji ovih biljnih vrsta za proizvodnju vlakana su pronađeni u Kini i datiraju od 4000. godine p.n.e. Pored vlakana, koje se koristilo za proizvodnju tekstila, žica, užadi i papira, zrno konoplje je korišćeno u ishrani ljudi i životinja. Upotreba konoplje u medicinske svrhe u Kini je zapisana u najstarijoj farmakopeji (*Pen-tsoo Ching*) iz usmenih predanja koja datiraju iz 2700. godine p.n.e. i indikovana je kod reumatskih bolova, zatvora, poremećaja reproduktivnog sistema žena, malarije i drugo (Zuardi, 2006).

Upotreba konoplje u Indiji bila je široko zastupljena jer je bila povezana sa velikim brojem religijskih običaja, a upotrebljavala se u tri oblika: napitak (*bhanga*) koji se sastoji od suvih listova sa kojih se pažljivo uklanja cvast, gandža (*ganja*) koja sadrži cvast i hašiš (*charas*) koji se pravi isključivo od smole koja prekriva cvast (Slika 1). Upotreba konoplje u Indiji datira od 1000. godine p.n.e. i upotrebljavala se kao analgetik kod neuralgija, glavobolja, zubobolja, kao antikonvulzivno sredstvo kod epilepsije, kao hipnotik, sedativ, anestetik, antiinflamatorno sredstvo kod reumatizma i drugih upalnih oboljenja, kao antibiotik kod kožnih infekcija, tuberkuloze, kao antiparazitno sredstvo kod glista, kao stimulans apetita, antitusik i ekspektorans kod bronhitisa i astme (Zuardi, 2006).



Slika 1. *Bhang, Ganja i Charas*

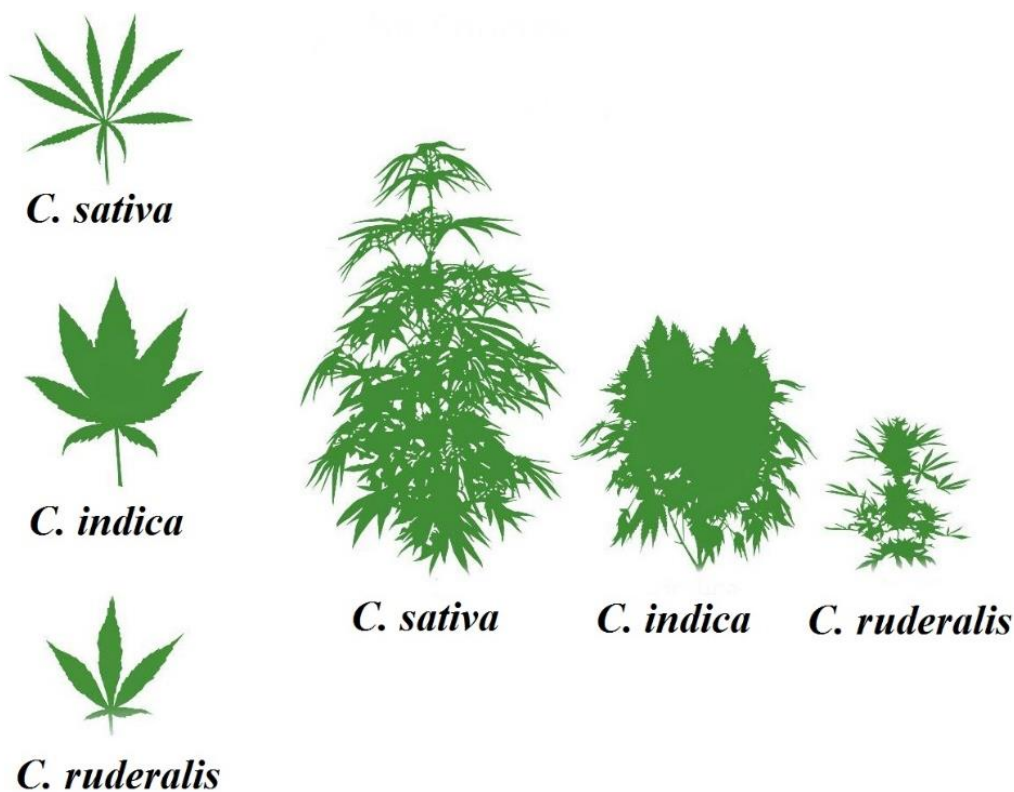
Do 18. veka upotreba konoplje u medicinske svrhe je ostala intenzivna u Indiji, odakle se proširila na Bliski Istok i Afriku. U Africi se upotrebljavala kod ujeda zmije, za olakšanje porođaja, kod malarije, groznice, sepse, antraksa, astme i dizenterije. U Americi je upotreba konoplje verovatno počela u Južnoj Americi, kada su je u 16. veku doneli afrički robovi. U Evropi se konoplja uzgajala isključivo za dobijanje vlakana (Zuardi, 2006).

Medicinska upotreba konoplje u Evropi je počela sredinom 19. veka, u Engleskoj i Francuskoj, odakle se proširila na celu Evropu i Severnu Ameriku. Američka farmakopeja uvodi monografiju konoplje 1850. godine, dok je Britanska farmakopeja uvodi nešto kasnije, 1888. godine. U drugoj polovini 19. veka je objavljeno preko 100 naučnih radova o terapijskoj vrednosti konoplje. Početkom 20. veka razvijeni su i prvi farmaceutski preparati

na bazi konoplje, ekstrakti i tinkture. *Sajous's Analytic Cyclopeda of Practical Medicine* (1924) propisuje upotrebu konoplje kao sedativa ili hipnotika kod nesanice, melanholiije, *delirium tremens*-a, besnila, kao analgetika kod migrene, kancera, neuralgija, čira na želucu, dismenoreje, akutnog reumatizma i druge upotrebe kao što su poboljšanje apetita i varenja, dispepsija, dijareja, dizenterija, kolera, nefritisa, vrtoglavice i drugo (Zuardi, 2006). Monografija konoplje je 1932. godine uklonjena iz Britanske farmakopeje, a 1941. i iz Američke.

2.1.2. Botaničke karakteristike konoplje

Familija Cannabaceae je porodica cvetnica koja obuhvata oko 170 vrsta grupisanih u 11 rodova, uključujući rod konoplji (*Cannabis*). Taksonomska klasifikacija roda konoplji je predmet naučne debate. Neki naučnici tvrde da sve biljke ovog roda pripadaju vrsti konoplja (*C. sativa*) sa podvrstama kao što su indijska (*C. sativa* subsp. *indica*), industrijska (*C. sativa* subsp. *sativa*) i ruderalna konoplja (*C. sativa* subsp. *ruderalis*) (Slika 2) (Quimby, 1974; Small i Cronquist, 1976). Drugi istraživači tvrde da morfološka diferencijacija i različit sadržaj kanabinoida u biljkama evropskog porekla, u poređenju sa biljkama u Indiji ukazuje na dve vrste, industrijska konoplja (*C. sativa*) i indijska konoplja (*C. indica*) (Schultes i Hofmann, 1992). Nedavno istraživanje varijacije alozima unutar 157 populacija roda konoplji, enzima koji se po jednoj aminokiselini razlikuje od drugih oblika istog enzima, ukazuje da se rod konoplji sastoji od dve vrste, industrijske (*C. sativa*) i indijske konoplje (*C. indica*), sa mogućnošću postojanja i treće vrste ruderalne konoplje (*C. ruderalis*) (Hilling, 2005).



Slika 2. Industrijska (*C. sativa*), indijska (*C. indica*) i ruderalna konoplja (*C. ruderalis*)

Sistematski položaj vrste industrijske konoplje (*C. sativa*) prikazan je u tabeli 1 (Chandra i sar., 2017).

Tabela 1. Sistematski položaj vrste industrijska konoplja (*C. sativa*)

Carstvo	Plantae
Razdeo	Magnoliophyta
Klasa	Magnoliopsida
Podklasa	Hamamelididae
Red	Urticales
Porodica	Cannabaceae
Rod	<i>Cannabis</i>
Vrsta	<i>Cannabis sativa</i> L.

2.1.2.1. Makroskopske karakteristike konoplje

Industrijska konoplja (*Cannabis sativa* L.) (Slika 3) je zeljasta, jednogodišnja, dvodoma biljka, uspravne stabljike. Stabljika je obično ugaona, brazdasta, razgranata, sa drvenastom unutrašnjošću, visine od 1 do 6 m. Grananje je naspramno ili naizmenično. Industrijska konoplja ima adventivni korenov sistem dužine između 30 i 60 cm. U rastresitom zemljištu adventivni koreni mogu dostići dužinu i do 2,5 m, a razvijaju se blizu površine zemlje. Listovi su karakteristični, prstasto složeno deljeni sa 7 listića, grubo testerasto nazubljeni. Veličina i oblik listića se značajno razlikuje u skladu sa genetskim poreklom. Raspored listova može biti naspraman i naizmeničan. Liska je dužine od 6 do 11 cm, širine od 2 do 15 cm. Adaksijalna i abaksijalna strana lista su zelene boje sa raspršenim smolastim trihomima. Cvast ženske biljke je grozdasta i sastoji se od brojnih cvetnih glavica koje se nalaze u pazuhu listova na vrhovima izdanaka. Muški cvet se sastoji od 5 bledezelenih čašičnih listića u obliku metlica, dužine od 2,5 do 4 mm i 5 visećih prašnika, raspoređeni u širim grupama duž stabljike. Plod je ahenija, orašica sa jednom semenkom, elipsoidna, glatka, duga oko 2 do 5 mm, sivo-smeđe boje (Tasić i sar., 2009; Farag i Kayser, 2017).

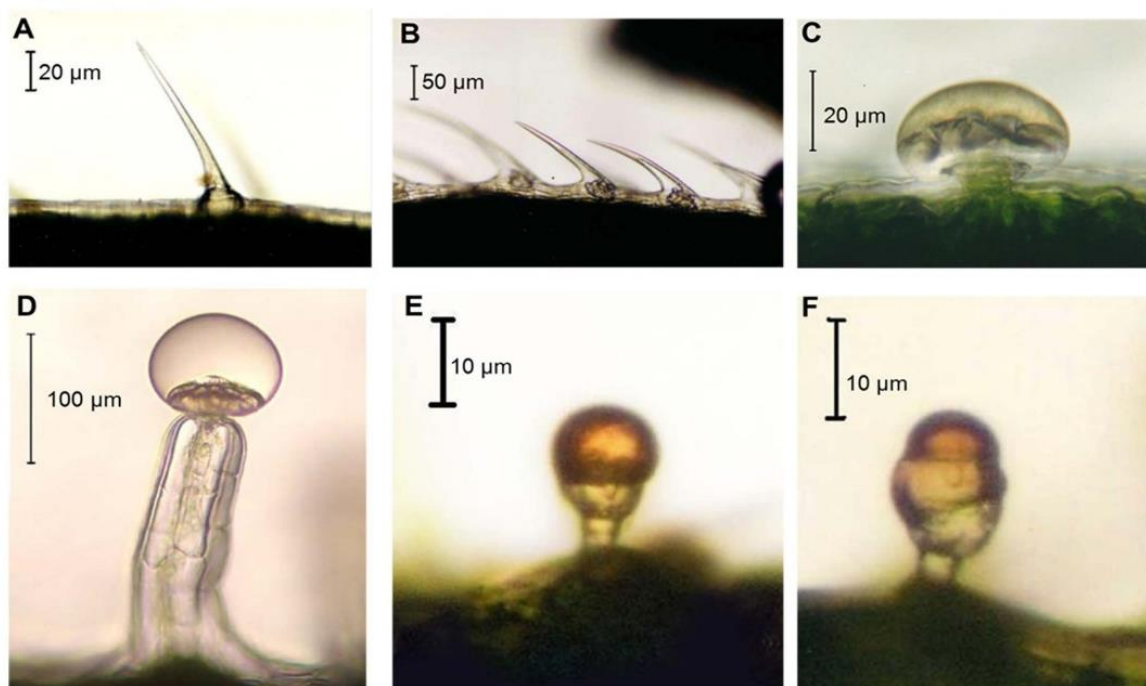


Slika 3. Makroskopske karakteristike industrijske konoplje (*C. sativa*)
(izvor: sr.wikipedia.org)

2.1.2.2. Mikroskopske karakteristike konoplje

Većina nadzemnog dela biljaka iz roda *Cannabis* je prekrivena različitim vrstama glandularnih i neglandularnih trihoma (Slika 4) (Schilmiller i sar., 2008). Neglandularni trihomi konoplje su jednostavni jednoćelijski trihomi, koji služe za zaštitu od ekstremnih temperatura uz smanjen gubitak vode, i cistolitni trihomi koji su slični jednoćelijskim ali formiraju cistolit od kalcijum karbonata, grubi su na dodir i pretpostavlja se da služe za zaštitu od grabljivica. Nalaze se na donjoj strani lista i na braktejama (Fairbairn, 1972). Glandularni trihomi koji se nalaze na ženskoj biljci su bulbus, kapitatni sedeći i kapitatni trihomi (Happyana i sar., 2013). Bulbus trihomi su najmanji, dužine od 10 do 30 μm , prvo se javljaju na stabljici i donjem lišću, a kasnije prekrivaju celu površinu biljke. Kapitatni sedeći trihomi se sastoje samo od žlezdaste glave, veličine oko 25 μm , koja je direktno spojena sa epidermom. Ovi trihomi prekrivaju veći deo stabljike i proizvode nekoliko kanabinoida i terpena. Najveći i najzastupljeniji trihomi konoplje su kapitatni trihomi koji se sastoje od izdužene stabljike i žlezdane glave, dužine od 50 do 500 μm , vidljivi golim

okom. Pojavljuju se tokom faze cvetanja biljke, prekrivaju brakteje i cvetne listove i imaju visok sadržaj kanabinoida (Farang i Kayser, 2017). Anterijalni trihomi su zastupljeni na muškim jedinkama, a veličine su od 70 do 80 μm (Fairbairn, 1972).



Slika 4. Vrste trihoma konoplje: A) jednostavni jednoćelijski trihomi, B) cistolitni trihomi, C) kapitatni sedeći trihomi, D) kapitatni trihomi, E) jednostavni bulbus, F) složeni bulbus (izvor: Andre i sar., 2016)

2.1.3. Rasprostranjenost i agrokulturni status konoplje

Rod *Cannabis* rasprostranjen je između 30° severne geografske širine i 60° južne geografske širine (Small i Cronquist, 1976). Poreklom je iz centralne Azije. Raste u predelima sa dosta sunca, na dobro ocednom zemljištu i ima veliku potrebu za hranivima. Raste pored puteva, ograda, na đubrištima i peskovitom zemljištu (Tasić i sar., 2009; Farang i Kayser, 2017).

Industrijska konoplja za proizvodnju vlakana se gaji širom sveta, a najveći proizvođač je Kina, dok je gajenje za medicinsku upotrebu zabranjeno u većini zemalja (Mediavilla i sar., 1999; Shahzad, 2011).

Konoplja se gaji:

- na otvorenom polju (*eng.* Outdoor cultivation) (Slika 5),
- u zatvorenom prostoru (*eng.* Indoor cultivation) (Slika 6),
- *In vitro* mikropropagacija (*eng.* In vitro micropropagation) (Slika 7).

Kultivacija na otvorenom podrazumeva razmnožavanje iz semena. Period vegetacije je od 4 do 6 meseci, zavisno od sorte i pedo-klimatskih uslova i može se podeliti u nekoliko faza. Faza klijanja traje sve dok prvi par pravih listova na klijavoj biljci ne dostignu veličinu

kotiledona i budu u mogućnosti da obavljaju fotosintezu. Faza sporog rasta traje od pojave prvog para pravih listova do rasta petog seta listova. Faza brzog rasta traje od kraja faze sporog rasta do formiranja cvetnih pupoljaka. Zatim sledi faza rasta od trenutka pojave cvetnih pupoljaka do otvaranja prvih cvetova, nakon čega rast postepeno usporava. Faza cvetanja počinje od trenutka kada se prašnici otvaraju i ispuštaju polen do trenutka kada se otvore cvetovi u gornjoj trećini cvasti i ispuste svoj polen. Poslednja faza jeste faza rasta ahenije (Bócsa i Karus, 1998). Noći u trajanju od 12 do 14 časova izazivaju cvetanje industrijske konoplje (Brenneisen, 1983). Ova tehnika kultivacije se uglavnom koristi za gajenje konoplje radi proizvodnje semena ili vlakana, a sadržaj THC je manji od 0,2% (Farag i Kayser, 2017).



Slika 5. Kultivacija na otvorenom: Genetska kolekcija konoplje, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Odeljenje za alternativne kulture i organsku proizvodnju, Bački Petrovac (2017)

Kultivacija u zatvorenom prostoru se koristi za gajenje konoplje radi proizvodnje smole. Ovom tehnikom kultivacije se izbegava kultivacija muških biljaka (Chandra i sar., 2010). Kompletan životni ciklus, koji traje od 6 do 8 nedelja, kvalitet i količina biomase se mogu kontrolisati uslovima životne sredine. Kultivacija u zatvorenom prostoru zahteva efikasan hidroponični sistem, sistem koji podrazumeva gajenje biljaka u vodenim supstratima sa hranljivim materijama i bez zemljišta (Argo i Fischer, 2002). Takođe, neophodno je obezbediti veštačko svetlo i komprimovan ugljendioksid za fotosintezu, kao i za kontrolu cvetanja i količine biomase (Jones, 1997). Klonovi odabranih vegetativnih ženskih biljaka se dalje gaje pod kontrolisanim, standardnim uslovima okoline (svetlosti, temperature, pH i koncentracije ugljendioksida) u prostoriji za vegetaciju (18 časova dnevni fotoperiod) i za cvetanje (12 časova dnevni fotoperiod) (Farag i Kayser, 2017).



Slika 6. Kultivacija u zatvorenom prostoru

Sistem *in vitro* mikropropagacija nudi brojne prednosti kao što su brzo razmnožavanje u relativno kratkom vremenu sa velikom stopom umnožavanja kontrolisanom od strane čoveka, nezavisno je od klimatskih i geografskih faktora (Zafar i sar., 1992). Sa druge strane, veliki broj heterozigota bi mogli dovesti do nagle i dramatične promene profila sekundarnih metabolita iz generacije u generaciju (Chandra i sar., 2010). Iako je postignut značajan napredak u oblasti *in vitro* biljne biotehnologije, do sada ima malo podataka o *in vitro* uzgoju konoplje (Farg i Kayser, 2017).



Slika 7. *In vitro* mikropropagacija
(izvor: Farag i Kayser, 2017)

2.1.4. Hemijski sastav

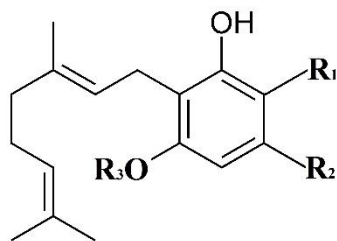
Konoplja je biljka koja ima veliki biosintetski kapacitet i sintetizira više od 480 hemijskih entiteta koji se mogu svrstati u skoro sve različite biogenetske klase (ElSohly i Slade, 2005). Pored kanabinoida, koji su najpoznatija i do sada najviše izučavana jedinjenja, konoplja sintetizira i druge sekundarne metabolite kao što su terpeni, ugljovodonici, azotna jedinjenja, ugljeni hidrati, flavonoidi, masne kiseline, nekanabinoidni fenoli, jednostavni alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline, esteri, laktoni i drugi (Brenneisen, 2007). Razlika u hemijskom sastavu industrijske i indijske konoplje jeste u sadržaju pojedinih kanabinoida (Hazekamp i Fischeidick, 2011).

2.1.4.1. Kanabinoidi

Konoplja sintetizira više od 100 jedinjenja kanabinoidne strukture. Kanabinoidi predstavljaju grupu C₂₁ terpenofenolnih jedinjenja, a nakon otkrića endokanabinoida i liganada endokanabinoidnog sistema, predloženo je da se kanabinoidi sintetisani od strane konoplje nazivaju fitokanabinoidi (Devane i sar., 1992; ElSohly i Gul, 2014).

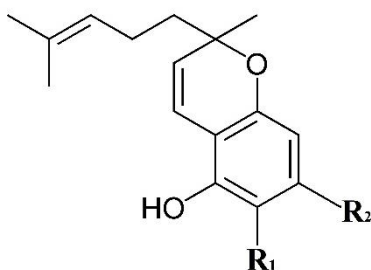
Kanabinoidi konoplje su podeljeni u 11 subklasa (Slika 8) (Turner i sar., 1980; Ross i ElSohly, 1995; ElSohly i Gul, 2014):

1. Kanabigerolna grupa: kanabigerolna kiselina (GBGA), kanabigerol (GBG) i njegovi derivati;
2. Kanabihromenska grupa: kanabihromenska kiselina (CBCA), kanabihromen (CBC) i njegovi derivati;
3. Kanabidiolan grupa: kanabidiolna kiselina (CBDA), kanabidiol (CBD) i njegovi derivati,
4. Δ^9 -tetrahidrokanabinolna grupa: Δ^9 -tetrahidrokanabinolna kiselina (Δ^9 -THCA, češće se obeležava 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: kanabinolna kiselina (CBNA), kanabinol (CBN) i njegovi derivati,
9. Kanabinodiolna grupa: kanabinodiol (CBND) i njegovi derivati,
10. Kanabitriolna grupa: kanabitriol (CBT) i njegovi derivati i
11. kanabinoidi različite strukture.



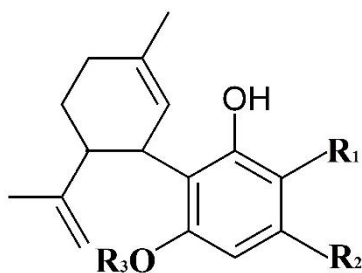
Kanabigerolna grupa

	R ₁	R ₂	R ₃
Kanabigerovarín (CBGV)	H	C ₃ H ₇	H
Kanabigerovarínska kiselina (CBGVA)	COOH	C ₃ H ₇	H
Kanabigerol (CBG)	H	C ₅ H ₁₁	H
Kanabigerolna kiselina (CBGA)	COOH	C ₅ H ₁₁	H
Kanabigerol monometil etar (CBGM)	H	C ₅ H ₁₁	CH ₃
Monometil etar kanabigerolne kiseline (CBGMA)	COOH	C ₅ H ₁₁	CH ₃



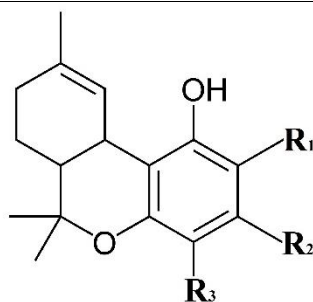
Kanabihromenska grupa

	R ₁	R ₂
Kanabihromevarín (CBCV)	H	C ₃ H ₇
Kanabihromevarínska kiselina (CBCVA)	COOH	C ₃ H ₇
Kanabihromen (CBC)	H	C ₅ H ₁₁
Kanabihromenska kiselina (CBCA)	COOH	C ₅ H ₁₁

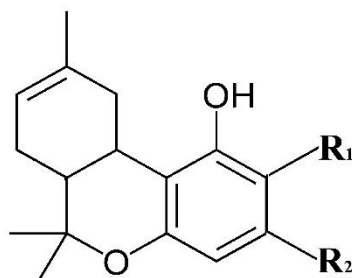


Kanabidiolna grupa

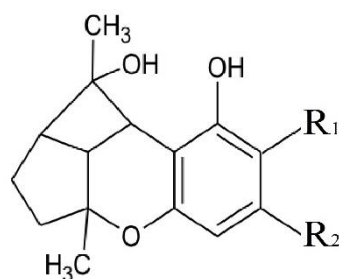
	R ₁	R ₂	R ₃
Kanabidivarín (CBDV)	H	C ₃ H ₇	H
Kanabidivarínska kiselina (CBDVA)	COOH	C ₃ H ₇	H
Kanabidiol (CBD)	H	C ₅ H ₁₁	H
Kanabidiolna kiselina (CBDA)	COOH	C ₅ H ₁₁	H
Kanabidiol monometil etar (CBDM)	H	C ₅ H ₁₁	CH ₃
Kanabidiol-C ₄ (CBD-C ₄)	H	C ₄ H ₉	H
Kanadidiorkol (CBD-C ₁)	H	CH ₃	H

 Δ^9 -tetrahidrokanabinolna grupa

	R ₁	R ₂	R ₃
Δ^9 -tetrahidorkanabivarin (THCV)	H	C ₃ H ₇	H
Δ^9 -tetrahidorkanabivarinska kiselina (THCVA)	COOH	C ₃ H ₇	H
Δ^9 -tetrahidorkanabinol (THC)	H	C ₅ H ₁₁	H
Δ^9 -tetrahidorkanabinolna kiselina A (THCA)	COOH	C ₅ H ₁₁	H
Δ^9 -tetrahidorkanabinolna kiselina B (THCB)	H	C ₅ H ₁₁	COOH
Δ^9 -tetrahidorkanabinol-C ₄ (THC-C ₄)	H	C ₄ H ₉	H
Δ^9 -tetrahidorkanabinolna kiselina-C ₄ (THCA-C ₄)	COOH/H	C ₄ H ₉	COOH/H
Δ^9 -tetrahidorkanabiorkol (THC-C ₁)	H	CH ₃	H
Δ^9 -tetrahidorkanabiorkolna kiselina (THCAC ₁)	COOH	CH ₃	H

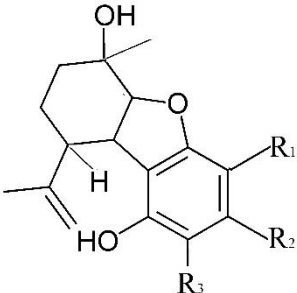
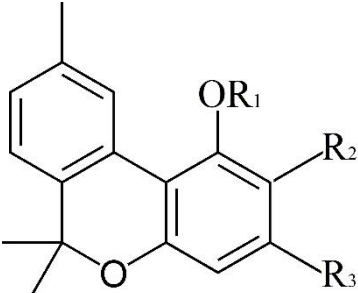
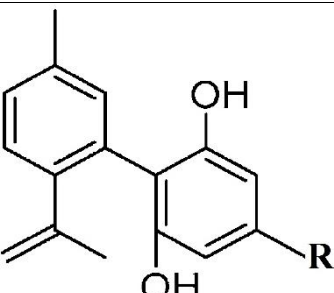
 Δ^8 -tetrahidrokanabinol grupa

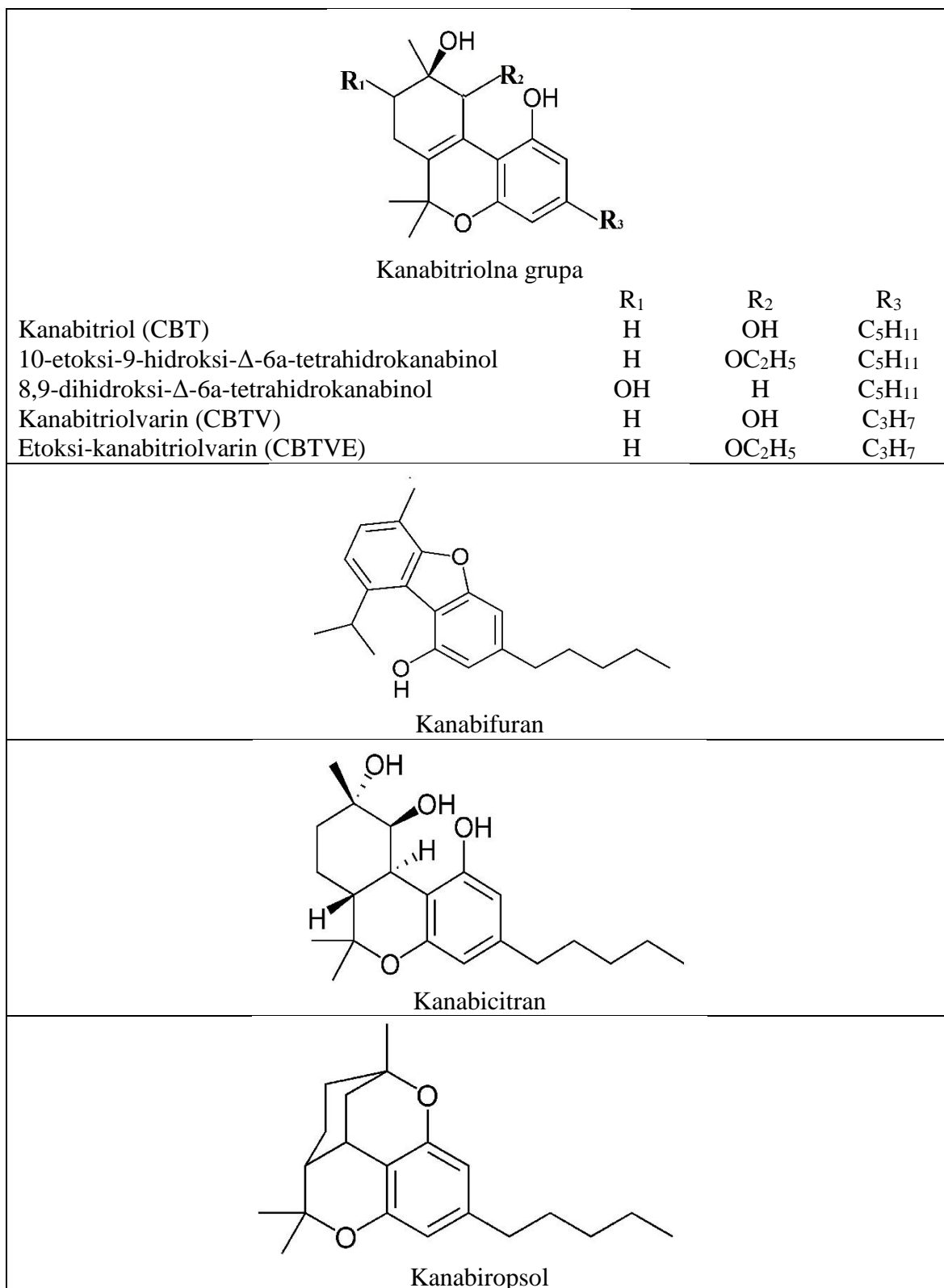
	R ₁	R ₂
Δ^8 -tetrahidrokanabinol (Δ^8 -THC)	H	C ₅ H ₁₁
Δ^8 -tetrahidorkanabivarinska kiselina (Δ^8 -THCA)	COOH	C ₅ H ₁₁



Kanabiciklolna grupa

	R ₁	R ₂	R ₃
Kanabiciklovarin (CBLV)	H	C ₃ H ₇	H
Kanabiciklol (CBL)	H	C ₅ H ₁₁	H
Kanabiciklolna kiselina (CBLA)	COOH	C ₅ H ₁₁	H

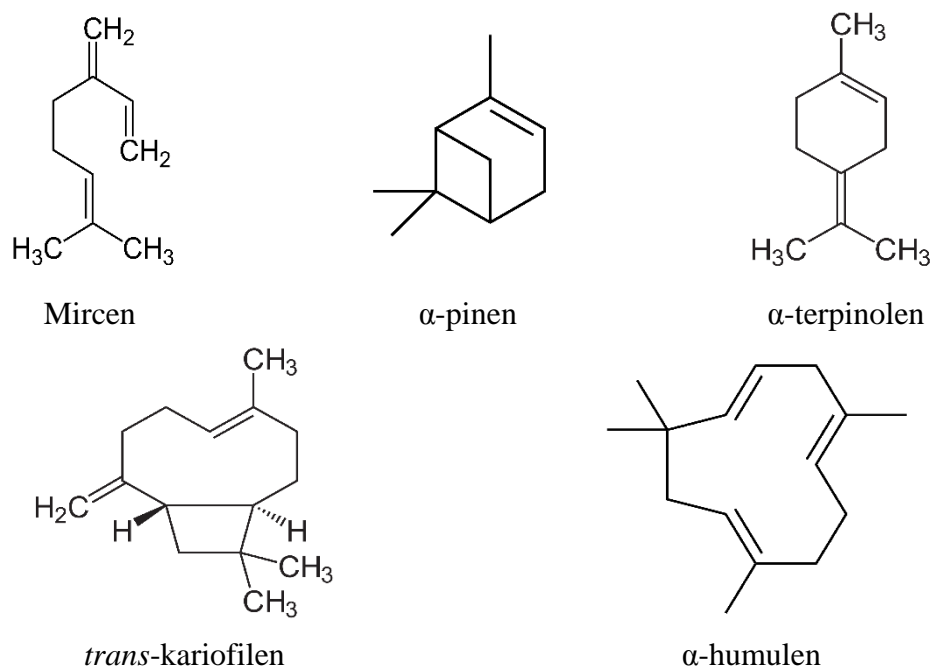
 <p>Kanabielzoinska grupa</p>			
	R_1	R_2	R_3
Kanabielzoin (CBE)	H	C_5H_{11}	H
Kanabielzoinska kiselina A (CBEA-A)	COOH	C_5H_{11}	H
Kanabielzoinska kiselina A (CBEA-B)	H	C_5H_{11}	COOH
 <p>Kanabinolna grupa</p>			
	R_1	R_2	R_3
Kanabivarin (CBV)	H	H	C_3H_7
Kanabinol (CBN)	H	H	C_5H_{11}
Kanabinolna kiselina (CBNA)	H	COOH	C_5H_{11}
Kanabnol metiletar (CBNM)	CH_3	H	C_5H_{11}
Kanabinol-C ₄ (CBN-C ₄)	H	H	C_4H_9
Kanabinol-C ₂ (CBN-C ₂)	H	H	C_2H_5
Kanabiorkol (CBN-C ₁)	H	H	CH_3
 <p>Kanabinodiolna grupa</p>			
		R_1	
Kanabinodivarin (CBNDV)		C_3H_7	
Kanabinodiol (CBND)		C_5H_{11}	



Slika 8. Strukturne formule kanabinoida (izvor: Brenneisen, 2007)

2.1.4.2. Terpeni

Pored kanabinoida konoplja sadrži oko 140 različitih terpena koji su primarno sastojci etarskog ulja. Prinos etarskog ulja zavisi od biljne vrste, pola, starosti, dela biljke uzetog za dobijanje etarskog ulja, načina kultivacije, uslova berbe, sušenja i skladištenja (Mediavilla i Steinemann, 1997; Meier i Mediavilla, 1998). Sveži pupoljci afganistanske sorte konoplje dali su prinos etarskog ulja od 0,29%, dok je prinos tokom sušenja i skladištenja nakon jedne nedelje i tri meseca bio 0,20% i 0,13% (Ross i ElSohly, 1996). U etarskom ulju konoplje dominantna jedinjenja su monoterpeni i njihov sadržaj varira između 47,9 i 92,1%, dok sadržaj seskviterpena varira od 5,2 do 48,6%. 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%) (Slika 9) (Novak i sar., 2001). Ostali terpeni prisutni u tragovima su sabinen, α -terpinen, 1,8-cineol, pulegon, γ -terpinen, terpin-4-ol, bornil acetat, aloaromadendren, α -kopaen, viridifloren, β -bisabolen, γ -kadinen, *trans*- β -farnesen, *trans*-nerolidol, i β -bisabolol (Ross i ElSohly, 1996; McPartland i Russo, 2001). Strukture najzastupljenijih terpena dati su na slici 9.

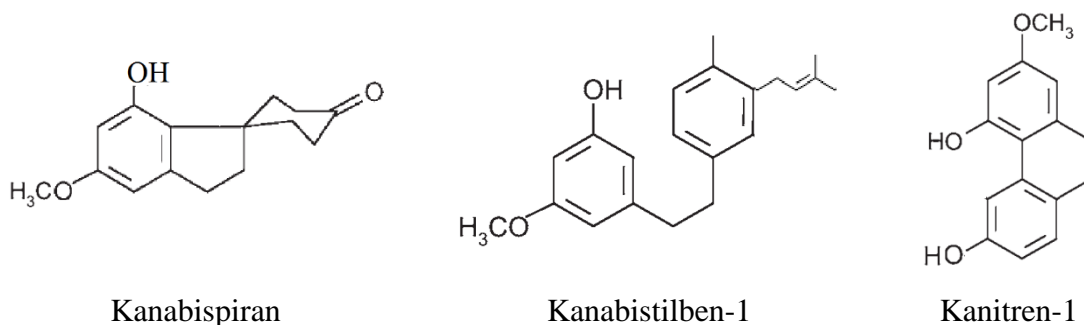


Slika 9. Najzastupljeniji terpeni (izvor: Brenneisen, 2007)

2.1.4.3. Nekanabionidni fenoli i flavonoidi konoplje

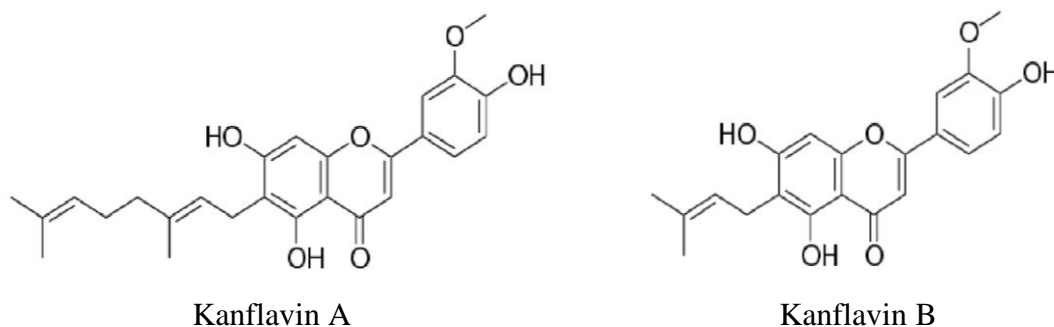
Konoplja sadrži 34 nekanabinoidna fenola podeljena u sledeće grupe (Slike 10):

1. Spiroindanska grupa: kanabispiran, izokanabispiran i drugi;
2. Dihidrostilbenska grupa: kanabistilben I i II;
3. Dihydrofenantrenska grupa: kanitren 1 i 2;
4. Fenolni metil estri i fenolni glikozidi: floriglucinol glikozid (Brenneisen, 2007).



Slika 10. Nekanabinoidni fenoli (izvor: Brenneisen, 2007)

U konoplji je identifikovano preko 20 flavonoida od kojih su najzastupljeniji apigenin, luteolin, kvercetin, kemferol, orijentin, viteksin, luteolin-7-*O*-glukozid, apigenin-7-*O*-glukozid i kanflavin A i B (Slika 11), koji su jedinstveni konoplji (Barrett i sar., 1985; Barrett i sar., 1986; Vanhoenacker i sar., 2002).

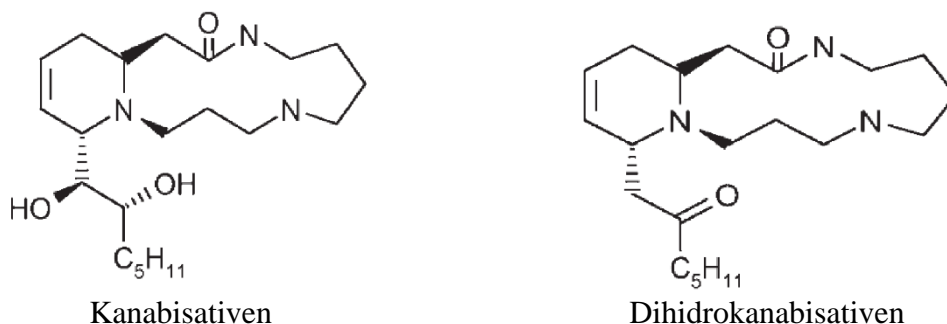


Slika 11. Kanflavin A i B (izvor: Brenneisen, 2007)

2.1.4.4. Ostale komponente konoplje

U masnom ulju semena konoplje identifikovano je 33 masne kiseline, od kojih su najzastupljenije nezasićene masne kiseline i to linolna (53-60%), α -linolenska (15-25%) i oleinska (8,5-16%) (Leson i sar., 1999). Pored njih prisutne su i γ -linolenska (1-4%), stearidonska (0,4-2%), eikozanska (<0,5%), *cis*-vaccenska i izolinolenska kiselina. Od zasićenih masnih kiselina prisutne su palmitinska (6-9%), stearinska (2-3,5%), arahidonska (1-3%), behenska (<0,3%), miristinska, lignocerinska, kapronska, heptanska, kaprilna, pelargonska, kaprinska, laurinska, margarinska i izoarahidonska (Brenneisen, 2007).

U konoplji je detektovano oko 70 azotnih jedinjenja od kojih dva alkaloida spermidinske grupe (kanabisativen i anhidrokanabisativen) (Slika 12), holin, muskarin, izoleucin, betain i neurin, amidi (*N-trans*-feruloiltiramin, *N-p*-kumaroiltiramin i *N-trans*-kafeoiltiliramin), lignanamide (grosamid, kanabisin A, B, C i D), jednostavni amidi (piperidin, hordenin, metilamin, etilamin i pirolidin), proteini (edestin, zeatin i zeatin nukleozid), enzimi (edestinaza, glukozidaza, polifenoloksidaza, peptidaza, peroksidaza i adenzin-5-fosfataza) i aminokiseline karakteristične za biljke (Brenneisen, 2007).



Slika 12. Alkaloidi spermidinske grupe (izvor: Brenneisen, 2007)

Konoplja sadrži i oko 50 ugljovodonika sa C₉ do C₃₉ dužinom ugljovodoničnog lanca (ElSohly, 2002). Glavni alkan prisutan u etarskom ulju dobijenom destilacijom pomoću vodene pare je nonakozan, zatim slede heptakozan, 2,6-dimetiltetradekan, pentakozan, heksakozan i hentriakontan (Brenneisen, 2007).

Od ugljenih hidrata u konoplji su prisutni monosaharidi (glukoza, fruktoza, manaza, galaktoza, arabinoza), disaharidi (saharoza i maltoza), polisaharidi (rafinoza, celuloza, hemiceluloza, pektin, ksilan), šećerni alkoholi (manitol, sorbitol, glicerol, inozitol) i aminošećeri (galaktozamin, glukozamin) (Brenneisen, 2007).

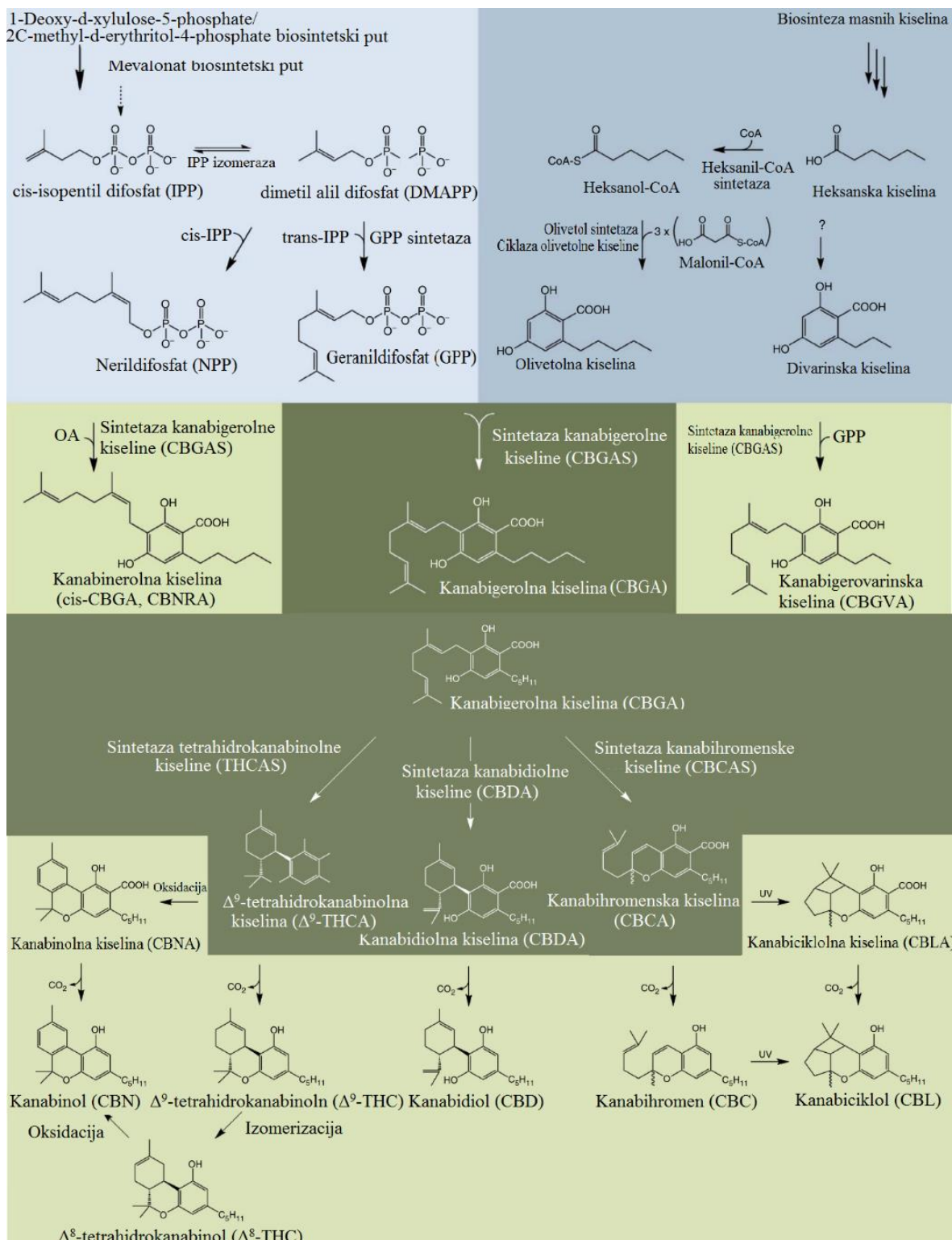
U konoplji su prisutni alkoholi (metanol, etanol, 1-okten-3-ol), aldehidi (acetaldehid, izobutiraldehid, pentanal), ketoni (aceton, 2-heptanon, 2-metil-2-hepten-6-on) i kiseline (arabinska, azealna, glukonska) (Brenneisen, 2007). Takođe su identifikovani fitosteroli kempsterol, ergosterol, β-sitosterol i stigmasterol. Vitamin K je jedini vitamin pronađen u konoplji. Od pigmenata prisutni su ksantofil i karoten. Od elemenata su prisutni Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, Zn, Hg (Brenneisen, 2007).

2.1.5. Biosinteza kanabionoida

Fitokanabinoidi se definišu kao jedinjenja prirodnog porekla sintetisana u biljkama, koji deluju na humane kanabinoidne receptore (CB1 i CB2). Kanabinoidi mogu da se nađu u svim delovima konoplje, osim u semenu, ali uglavnom se akumuliraju u žlezdastim trihomima ženskih cvetova (van Bakel i sar., 2011; Gagne i sar., 2012). Ključni intermedijer u biosintezi svih kanabionoida je kanabigerolna kiselina, koja nastaje kondezacijom olivetolne kiseline i geranildifosfata (Fellermeier i sar., 2011). Sintaza tetrahidrokanabinolne kiseline (THCAS), sintaza kanabidiolne kiseline (CBDAS) i sintaza kanabihromenske kiseline (CBCAS) katalizuju stereoselektivne, oksidativne ciklizacije monoterenske grupe CBGA do CBDA, CBCA ili THCA (Slika 13).

U svežoj biljci nalaze se kanabinoidi u obliku kiseline, a neutralni i farmakološki aktivni oblici nastaju skladištenjem, izlaganjem biljke toploti ili sunčevoj svetlosti (Fischedick i sar., 2010). Za sada se pretpostavlja da raznolikost kanabionoida potiče od neenzimskih

transformacija ili degradacija spomenutih kiselina i njihovih neutralnih oblika delovanjem svetlosti ili autooksidacijom (ElSohly i Slade, 2005).



Slika 13. Biosintetski put kanabinoida

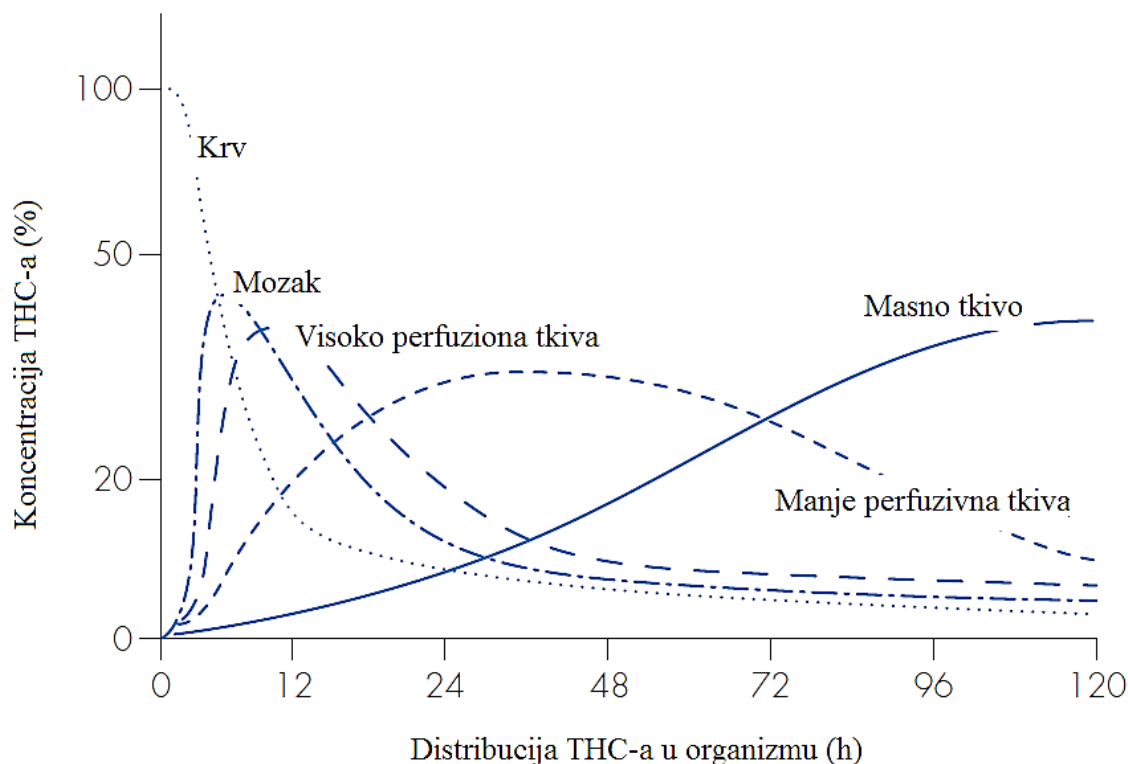
(izvor: Degenhardt i sar., 2017)

2.1.6. Farmakodinamika i farmakokinetika kanabinoida

Endokanabinoidni sistem je sistem receptora koji se sastoji iz dva tipa receptora, CB1 i CB2. CB1 receptori se uglavnom nalaze u centralnom nervnom sistemu, najviše u bazalnim ganglijama, limbičkom sistemu, ali su prisutni i u perifernom nervnom sistemu, jetri, materici, štitnoj žlezdi i kostima (Pagotto i sar., 2006; Pertwee, 2006; Russo i Guy, 2006). CB2 receptori se uglavnom nalaze u imunom sistemu, slezini, gastrointestinalnom sistemu i perifernom nervnom sistemu (Izzo, 2004; Pertwee, 2006). CB1 i CB2 receptori se nalaze i u placenti gde imaju ulogu regulisanja aktivnosti transporta serotonina (Kenney i sar., 1999). U mozgu se CB1 receptori nalaze na terminalima centralnih i perifernih neurona gde posreduju inhibicijsko delovanja na oslobađanje niza ekscitatornih i inhibicijskih neurotransmitera (γ -aminobuterne kiselina, acetiholin, dopamin, serotonin, noradrenalin, glutamat). Zbog toga CB1 receptori utiču na kongitivne funkcije, motoriku i percepciju bola (Howlett i sar., 2002). Endokanabinoidni sistem, koji je široko rasprostranjen u centralnom i perifernom nervnom sistemu, većini žlezda i organa, ima značajnu ulogu u neuronskom, vaskularnom, metaboličkom, imunološkom i reproduktivnom sistemu (Atakan, 2002). Kanabinoidi konoplje deluju na CB1 i CB2 receptore dajući različite odgovore. CBD nema direktan afinitet za CB1 i CB2 receptore, ali je nekoliko studija pokazalo da smanjuje psihotropnu aktivnost THC-a i da pojačava aktivnost endogenog kanabinoida, anandamida (Mechoulam i sar., 2002; Pertwee i sar., 2010; Borgelt i sar., 2013).

Farmakokinetika kanabinoida zavisi od načina upotrebe (Huestis, 2007). Najzastupljeniji načini upotrebe konoplje jesu inhalacioni i oralni put. Pored toga razvijeni su različiti proizvodi za sublingvalnu, rektalnu i transdermalnu primenu, a takođe su razvijene i kapi za oči i aerosoli (Madras, 2015). Zabeležena je i lokalna primena za dermatološka stanja (MacCalluma i Russo, 2018).

THC se vrlo brzo apsorbuje nakon primene biljnih vrsta konoplji koje se upotrebljavaju u medicinske svrhe inhalacionim putem i već nakon nekoliko sekundi se može detektovati u krvi. Inhalacionim putem primene bioraspoloživost THC-a je između 10 i 50%, dok se za ostale kanabinoide kreće u opsegu od 31% za CBD do 38% za CBN (Slika 14) (Corrigan, 2008).



Slika 14. Distribucija THC-a u organizmu (Izvor: Corrigan, 2008)

Primenom kanabinoida oralnim putem bioraspoloživost je mnogo manja nego inhalacionim. U poređenju na intravensku primenu, bioraspoloživost THC-a oralnom primenom je od 4 do 20% (Huestis, 2007). Brzina apsorpcije je značajno manja, maksimalna koncentracija u krvi se postiže nakon 60-120 minuta, a trajanje dejstva je između 6 i 8 h (Grotenhermen, 2003).

Kanabinoidi se veoma brzo distribuiraju u tkiva i zbog svog lipofilnog karaktera se akumuliraju u masnom tkivu. Poluživot eliminacije THC-a je oko sedam dana, a potpuna eliminacija može da traje i do 30 dana (Ashton, 2001). Kanabinoidi se metabolišu u preko 20 poznatih metabolita, a glavni metabolit, aktivniji od THC-a, jeste 11-hidroksi-THC. Metaboliti se jednim delom izlučuju preko urina, a većim delom se resorbuju u gastrointestinalnom traktu, produžavajući svoje dejstvo (Borgelt i sar., 2013; Golocorbin-Kon i sar., 2015).

2.1.7. Toksičnost kanabinoida

Madras (2015) je u Agendi za rod *Cannabis* koja je objavljena na sajtu Svetske zdravstvene organizacije navela da je toksičnost konoplje do sada istražena u okviru grupe ljudi koji konoplju koriste u rekreativne svrhe i da se na osnovu toga može zaključiti da konoplja izaziva akutne farmakološke efekte: kongitivne funkcije i kordinacija su smanjene i dozno su zavisni, dijagnostikovane su promene u mozgu kod ljudi koji su akutni korisnici konoplje u odnosu na ljude koji je ne koriste, prepoznata je veza između upotrebe konoplje i različitih psihoza i šizofrenije, upotreba konoplje je povezana sa povećanim rizikom od infarkta miokarda, moždanog udara i ishemijskih napada.

Studije na životinjama su do sada pokazale da kanabinoidi imaju veliku terapijsku širinu leka, odnosno povoljan profil sigurnosti leka sa faktorom sigurnosti većim od 10000 (House of Lords Report, 1998). Primenom maksimalne oralne doze kanabinoida od 3 g/kg kod pasa i 9 g/kg kod majmuna nije dovela do smrtnih slučajeva (Thompson i sar., 1973). Intravenskom primenom u dozi od 92 mg/kg kod majmuna nije zabeležen nijedan smrtni slučaj, dok su doze od 128 mg/kg bile letalne (Thompson i sar., 1974).

Histopatološke promene na mozgu nisu zabeležene kod pacova tretiranih sa 50 mg/kg THC-a oralnim putem u trajanju od 6 meseci (Rosenkrantz i sar., 1975), tretiranih sa 50-500 mg/kg u trajanju od 119 dana (Thompson i sar., 1973), kao i miševa i pacova tretiranih sa maksimalnim dozama od 500 mg/kg i 50 mg/kg, tim redom, u trajanju od dve godine (Chan i sar., 1996).

Wang i sar. (2008) su sistematizovali do sad objavljene radove vezane za neželjena dejstva primene medicinske konoplje kod ljudi. Većina (96,6%) prijavljenih neželjenih dejstava nisu ozbiljna pri čemu je vrtoglavica bila najčešće prijavljeno neželjeno dejstvo. Procenat prijavljenih neželjenih dejstava nije se značajno razlikovao od kontrolne grupe. Kako su sva ispitivanja neželjenih dejstava rađena u kratkom vremenskom intervalu, od 8 h do 12 meseci zaključili su da kratkotrajna upotreba kanabinoida u medicinske svrhe ima prihvatljiv profil sigurnosti.

U jednogodišnjoj studiji Ware i sar. (2015) su ispitivali uticaj upotrebe medicinske konoplje (sadržaj THC-a 12,5%) u terapiji bola. Kontrolna grupa su bili pacijenti koji su u terapiji bola koristili opioidne analgetike. Pre početka studije i nakon 1, 2, 3, 6, 9 i 12 meseci praćena su neželjena dejstva kao primarne promenjive i neurokognitivne funkcije, pulmološke funkcije, kao i biohemijski testovi krvi, jetre, bubrega i određenih hormona kao sekundarne promenjive. Ozbiljna neželjena dejstva su prijavljena kod 13% slučajeva iz grupe koji su u terapiji bola koristili medicinsku konoplju, dok je procenat prijavljenih ozbiljnih neželjenih dejstava kod grupe koji su koristili opioidne analgetike iznosio 19. Slabija neželjena dejstva su prijavljena kod 88,4 i 85,2% kod osoba koji su u terapiji bola koristili medicinsku konoplju i opioidne analgetike, tim redom. Kod obe grupe ispitanika nije bilo promene u ispitivanim parametrima sekundarnih promenjivih, sem za neurokognitivne funkcije koje su bile poboljšane.

Russo i sar. (2002) su ispitivali terapijski učinak, kao i štetne efekte, dugotrajne upotrebe indijske konoplje u medicinske svrhe. Ova studija je sprovedena u okviru programa Američke agencije za hranu i lekove (*FDA – Food and Drug Administration*) za istraživanje novih lekova–IND program (*Investigational New Drug program*). Praćenjem 7 pacijenata sa različitim indikacijama za upotrebu indijske konoplje zaključili su da njena upotreba pruža efikasno simptomatsko ublažavanje bolova, mišićnih grčeva i povišenja intraokularnog pritiska kod pacijenata kod kojih drugi lekovi ne deluju i da je samim tim omogućen bolji kvalitet života pacijenata. Dugotrajna upotreba nije dovela do malignih promena, nisu primećene neuropsihološke promene, kao ni endokrine, hematološke i imunološke, ali dolazi do blagih pulmoloških nuspojava.

Svetska zdravstvena organizacija je 2018. godine objavila Agendu o kanabidiolu (*CANNABIDIOL (CBD) Critical Review Report*). CBD je označen kao niskotoksično jedinjenje. Na osnovu *in vitro* ispitivanja na životinjama može se zaključiti da CBD utiče na rast malignih ćelija, ali nema uticaja na nemaligne ćelije pri čemu je primećen pro-apoptični efekat u limfocitima, nema uticaja na embrionalni razvoj, nema uticaja na širok spektar fizioloških i biohemijskih parametara, uticaj na imuni sistem je nejasan kako postoje dokazi o imunosupresiji u većim dozama, ali i imunostimulacija u nižim dozama, uticaj na hormone je takođe nejasan, jer u zavisnosti od hormona i primenjene metode neke studije su pokazale da ima uticaj, dok su druge pokazale da nema uticaj. U Agendi Svetske zdravstvene organizacije se takođe navodi da CBD ne stvara zavisnost kao THC, nema psihoaktivni efekat, niti štetne efekte na kardiovaskularni i druge sisteme.

2.1.8. Farmakološko delovanje

2.1.8.1. Farmakološko delovanje kanabinoida

THC u osnovi deluje kao depresor centralnog nervnog sistema. Utiče na kongitivne funkcije, u prvom redu na kratkotrajnu memoriju, opažanje i učenje, zatim na smanjenje psihomotrne sposobnosti koja se ogleda u poremećenoj motornoj koordinaciji tokom obavljanja voljnih pokreta. Male doze obično izazivaju blagu euforiju, opuštenost, povećanu društvenost i smanjenu anksioznost, dok veće doze izazivaju disforiju, anksioznost i panične reakcije. Takođe se povećava tolerancija na bol. THC ima i antiemetično dejstvo. Sva ova dejstva se ispoljavaju preko CB1 receptora (Kalant, 2001).

Klinička ispitivanja su pokazala da CBD smanjuje anksioznost i druga neželjena dejstva izazvana čistim THC-om modulirajući farmakokinetiku THC-a (Zuardi i sar., 1982). CBD ima antipsihotično dejstvo, povećava dopaminsku aktivnost, povećava iskoristivost raspoloživog serotonina i pojačava aktivnost noradrenalina (Banerjee i sar., 1975; Poddar i Dewey, 1980; Zuardi i sar., 1995). CBD ima antioksidativnu ulogu štiteći neurone od toksičnih glutamata (Hampson i sar., 1998). Nekoliko studija ukazuju i na to da CBD poseduje i antimikrobno i antifungalno dejstvo (Klingeren i Ham, 1976; ElSohly i sar., 1982; McPartland, 1984).

CBN, koji predstavlja produkt razgradnje THC-a (Turner i sar., 1980), agonista je CB1 receptora i ispoljava efekte slične THC-u (Musty i sar., 1976). CBN deluje na reproduktivne organe, povećavajući koncentraciju folikulostimulirajućeg hormona u plazmi i proizvodnju testosterona (Dalterio i sar., 1985). CBN ima i neka dejstva slična CBD-u, antikonvulzivno i antiinflamatorno dejstvo (Turner i sar., 1980; Evans, 1991). CBN ima veći afinitet ka CB2 receptorima pa se njegovo dejstvo ispoljava više u imunom sistemu (Klein i sar., 1998).

CBC pokazuje antiinflamatorno, analgetsko, antibakterijsko i blago antifungalno dejstvo (Wirth i sar., 1980; ElSohly i sar., 1982; Davis i Hatoum, 1993).

CBG je biosintetski prekursor CBC-a, CBD-a i THC-a. Ima blagi afinitet ka vezivanju za CB1 receptore i ispoljava približno isto dejstvo kao CBD (Devane i sar., 1988). Pored toga što povećava iskoristivost raspoloživog serotonina i noradrenalina, povećava i iskoristivost γ -aminobuterne kiseline (Banerjee i sar., 1975). CBG deluje analgetski, ima antibakterijsko dejstvo (ElSohly i sar., 1982) i inhibira rast ćelija humanog oralnog epiteloidnog karcinoma (Baek i sar., 1998).

Izomer THC, Δ^8 -THC, strukturno se razlikuju samo u položaju dvostruke veze u cikloheksanskom prstenu. Δ^8 -THC se pokazao korisno prilikom tretmana mučnine i povraćanja kao posledice hemoterapije kod dece obolelih od hematoloških malignih oboljenja, u koncentraciji od 18 mg/m². Terapija je primenjena 8 meseci bez ikakvih psihoaktivnih efekata (Abrahamov i Mechoulam, 1995). Hemijski je stabilniji i lakše se izvodi reakcija sinteze od THC-a pa su razvijena dva njegova sintetska derivata, jak psihoaktivni agonist CB1 receptora, nazvan HU-210 i nepsihoaktivni antiemetik i neuroprotektant, nazvan HU-211 (Biegon i Bar-Joseph, 1995; Gallily i sar., 1997; Mechoulam i Ben-Shabat, 1999; Achiron i sar., 2000).

Tetrahidrokanabivarin (THCV) je propilni analog THC-a, koji se uglavnom javlja u indijskoj konoplji. Psihoaktivno dejstvo THCV-a nastaje brže i traje značajno kraće od psihoaktivnog dejstva THC-a, a jačina dejstva je samo 20-25% jačine dejstva THC-a (Gill i sar., 1970; Hollister, 1974; Clarke, 1998).

2.1.8.2. Farmakološko delovanje terpena konoplje

Jedinstveni miris konoplje ne potiče od kanabinoida, već od terpena prisutnih u etarskom ulju (Turner i sar., 1980). Terpeni su lipofilnog karaktera i lako prolaze kroz hematoencefalnu barijeru gde ispoljavaju svoje dejstvo (Buchbauer i sar., 1993; Nasel i sar., 1994). Terpeni moduliraju aktivnost THC-a vezivanjem za CB1 receptore, menjanjem afiniteta THC-a ka CB1 receptorima, menjanjem farmakokinetike THC-a i menjanjem propustljivosti hematoencefalne barijere (Agrawal i sar., 1989; Meschler i Howlett, 1999). Neki terpeni deluju na povećanje aktivnosti dopamina, noradrenalina, γ -aminobuterne kiseline i povećanje iskoristivosti raspoloživog serotonina (McPartland i Russo, 2001). Monoterpeni, koji su prisutni u etarskom ulju konoplje imaju niz pozitivnih fizioloških delovanja: inhibišu sintezu holesterola, poboljšavaju aktivnosti hepatičnih enzima za detoksikaciju kancerogenih supstanci, stimulišu apoptozu u ćelijama sa oštećenom DNK i inhibišu izoprenilaciju proteina koji su povezani sa malignim oštećenima u organizmu (Jones, 1999).

2.1.8.3. Farmakološko delovanje flavonoida konoplje i nekanabinoidnih fenola

Flavonoidi konoplje uglavnom deluju antioksidativno, a pored toga moduliraju farmakokinetiku THC-a zajedno sa CBD-om. Jedan od dominantnih flavonoida konoplje je apigenin koji se, pored velikog broja lekovitog bilja, prvenstveno kamilice, nalazi i u konoplji i ima širok spektar bioloških dejstava. Deluje anksiolitično, bez štetnih efekata

izazvanih drugim anksioliticima kao što su benzodiazepini, inhibitorno na faktor nekroze tumora-alfa (TNF-alfa), koji predstavlja citokin koji učestvuje u sistemskoj inflamaciji, a takođe deluje i inhibitorno na proliferaciju ćelija karcinoma dojke vezujući se za estrogenske receptore i ispoljavajući nisku estrogensku aktivnost (Gerritsen i sar., 1995; Salgueiro i sar., 1997; Wang i Kurzer, 1998; Russo, 2000). Kanflavin A i B inhibišu ciklooksigenazu i lipooksigenazu i na taj način deluju antiinflamatorno (Baumann i sar., 1980; Evans i sar., 1987). Pored toga deluju antimikrobno i antihelmitično (Radwan i sar., 2008).

Denbinobin, jedan od tipičnih predstavnika nekanabionidne grupe fenola konoplje, pripada grupi stilbena i indukuje apoptozu u oštećenim ćelijama, deluje inhibitorno na transkripciju DNK HIV-a (*Human Immunodeficiency Virus*). Takođe nekoliko studija ukazuju da ovo jedinjenje deluje prooksidativno i proapoptično na ćelije leukemije (Sánchez-Duffhues i sar., 2008; Sánchez-Duffhues i sar., 2009).

2.1.9. Potencijalna medicinska primena konoplje

Farmakološki potencijal kanabinoida je veliki, ali zbog nedostatka odgovarajućeg modela za njihovo proučavanje, jer je glavno mesto njihovog delovanja mozak, sve eksperimentalne studije se svode na merenje fizioloških efekata i subjektivnih osećaja pacijenata koji koriste kanabinoide za različita stanja (Baker i sar., 2003). Takođe, prilikom razmatranja opravdanosti upotrebe konoplje neophodno je postići željeni terapijski efekat bez prisustva neželjenih psihoaktivnih efekata odabirom odgovarajuće doze i puteva administracije (Kalant, 2001).

Multipla skleroza (MS) je jedna od indikacija za upotrebu medicinske konoplje. Naime, istraživanje sprovedeno u Engleskoj je pokazalo da 14-18% pacijenata obolelih od multiple skleroze koristi biljke roda *Cannabis* za medicinsku upotrebu za ublažavanje simptoma bola, spazama i nesаницe (Chong i sar., 2006). U jednoj kontrolisanoj studiji je pokazano da inhalacionom upotrebom konoplje sa sadržajem THC-a od 4% smanjuje spazme i bolove kod pacijenata (Corey-Bloom i sar., 2012). Međutim, postoje i studije koje ukazuju drugačije. Greenberg i sar. (1994) su prijavili da inhalaciona primena konoplje sa sadržajem THC-a 1,54% dovodi do pogoršanja držanja i ravnoteže pacijenata, a Killestein i sar. (2002) da oralna primena THC-a i ekstrakta industrijske konoplje nisu umanjili spazme, a globalni utisak pacijenata je bio lošiji u odnosu na placebo.

Biljne vrste roda *Cannabis* koje se upotrebljavaju u medicinske svrhe su potencijalno indikovana i kod lečenja neuropatskih bolova kod kojih trenutno dostupni analgetici i drugi lekovi ne deluju. Iako su dokazi o uticaju biljnih vrsta roda *Cannabis* sa sadržajem THC-a od 1-10% primenjene inhalacionim putem na hronični neuropatski bol obećavajući, sva ispitivanja su praćena u toku dve nedelje i neophodno je izvršiti dugoročna ispitivanja (Madras, 2015). Nekoliko kontrolisanih studija kod neuropatskih bolova koji su posledica različitih oboljenja (dijabetes, HIV i drugo) su pokazala smanjenje bola za 30% pri čemu se kao neželjena dejstva javljaju anksioznost, sedacija, konfuzija, vrtoglavica, dezorijentacija i

slično (Abrams i sar., 2007; Wilsey i sar., 2008; Ellis i sar., 2009; Ware i sar., 2010; Wilsey i sar., 2013).

Iako biljne vrste roda *Cannabis* koje se koriste u medicinske svrhe utiču na kongitivne funkcije, postoje istraživanja za potencijalnu primenu u simptomatskoj terapiji Alchajmerove bolesti, u prvom redu kao sedativ. Kontrolisane studije postoje samo o upotrebi pojedinačnih kanabinoida, ne i čitave biljke, ali upotreba nije označena kao bezbedna jer ne postoje dugoročna istraživanja o posledicama primene (Madras, 2015). Biljne vrste roda *Cannabis* za medicinsku primenu su prijavljene i kao potencijalni lek za različita neurološka stanja kao što su epilepsija, cervikalna distonija i Parkinsonova bolest, ali ne postoje kliničke studije koje dokazuju delovanje za ova stanja (Madras, 2015).

Različite kliničke studije su ispitivale uticaj konoplje sa sadržajem THC-a od 1,8 do 3,9% i sintetskog THC-a na mršavljenje, kaheksiju i apetit kod osoba obolelih od HIV-a. U svim studijama je pokazan povoljan uticaj na poboljšanje apetita, povećanje telesne težine i poboljšanje kvaliteta života sa malim uticajem na kongitivne funkcije (Abrams i sar., 2003; Haney i sar., 2005; Haney i sar., 2007; Lutge i sar., 2013; Whiting i sar., 2015).

Upotreba biljnih vrsta roda *Cannabis* koji se koriste u medicinske svrhe i sintetskih kanabinoida, u prvom redu THC-a, je ispitivana kod osoba obolelih od kancera, za simptomatsko lečenje bola i neželjenih dejstava hemoterapije i za ublažavanje same bolesti. Sprovedene su tri kliničke studije koje su procenjivale antiemetičku aktivnost kanabinoida kod osoba obolelih od karcinoma lečenih hemoterapijom. Jednim istraživanjem je ustanovljen pozitivan antiemetički efekat u odnosu na placebo, drugim nije potvrđen antiemetički efekat, dok trećim istraživanjem antiemetički efekat nije mogao biti okarakterisan ni kao pozitivan ni kao neutralan (Abrams i Guzman, 2015). Podaci o upotrebi kanabinoida kao antitumornog agensa su do sad pokazali kontradiktornost. Naime, predklinička istraživanja na kulturama ćelija humanog tumora ili tumora glodara pokazuju obećavajući antitumorski efekat kanabinoida, mada THC pokazuje i inhibitornu aktivnost, ali i proliferativnu na ćelije tumora (Cathcart i sar., 2015; Whiting i sar., 2015).

THC utiče na smanjenje intraokularnog pritiska inhalacionom primenom biljnih vrsta roda *Cannabis* 6-8 puta dnevno (Hepler i Frank, 1971; Merritt i sar., 1980; Chien i sar., 2003; Tomida i sar., 2006).

Svi prethodni navodi potencijalne primene konoplje su bazirani na primeni čistog THC-a ili upotrebi cele biljke inhalacionim putem pri čemu je akcenat bio na sadržaju THC-a. Terapijska primena CBD-a je nedavno sumirana u Agendi Svetske zdravstvene organizacije za kanabidiol. Klinička upotreba CBD-a je do sada najviše istražena za potencijalnu primenu kod epilepsije. CBD je dokazan kao efikasan u terapiji pojedinih oblika epilepsije. Farmaceutski proizvod na bazi čistog CBD-a, čiji je zaštićen naziv Epidiolek, trenutno je u trećoj fazi kliničkih istraživanja (Madras, 2015). Većina studija je prijavila da upotreba CBD-a ima povoljan uticaj na tretman epilepsije sa redukovanim brojem napada u odnosu na placebo grupu. Kao neželjeni efekti prijavljeni su dijareja, gubitak apetita, umor i slično,

koji su verovatno posledica interakcije sa upotrebljenim antiepileptičkim lekovima (Mechoulam i Carlini, 1978; Cunha i sar., 1980; Geoffrey i sar., 2015; Devinsky i sar., 2016; Devinsky i sar., 2017).

Iako je epilepsija najviše istražena kao indikacija za primenu CBD-a, postoje dokazi da CBD može biti koristan u tretmanu brojnih drugih medicinskih stanja kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, multipla skleroza, Huntingtonova bolest, psihoze, depresija, anksioznost, kancer, mučnina, reumatoidni artritis, zapaljenje creva i Hronova bolest, kardiovaskularna oboljenja, komplikacije dijabetesa (Pisanti i sar., 2017). Pored ovoga, postoje predkliničke studije koje sugerišu da CBD može imati potencijalna terapijska svojstva za lečenje zavisnosti od opioida, kokaina i psihostimulanasa (Prud'homme i sar., 2015).

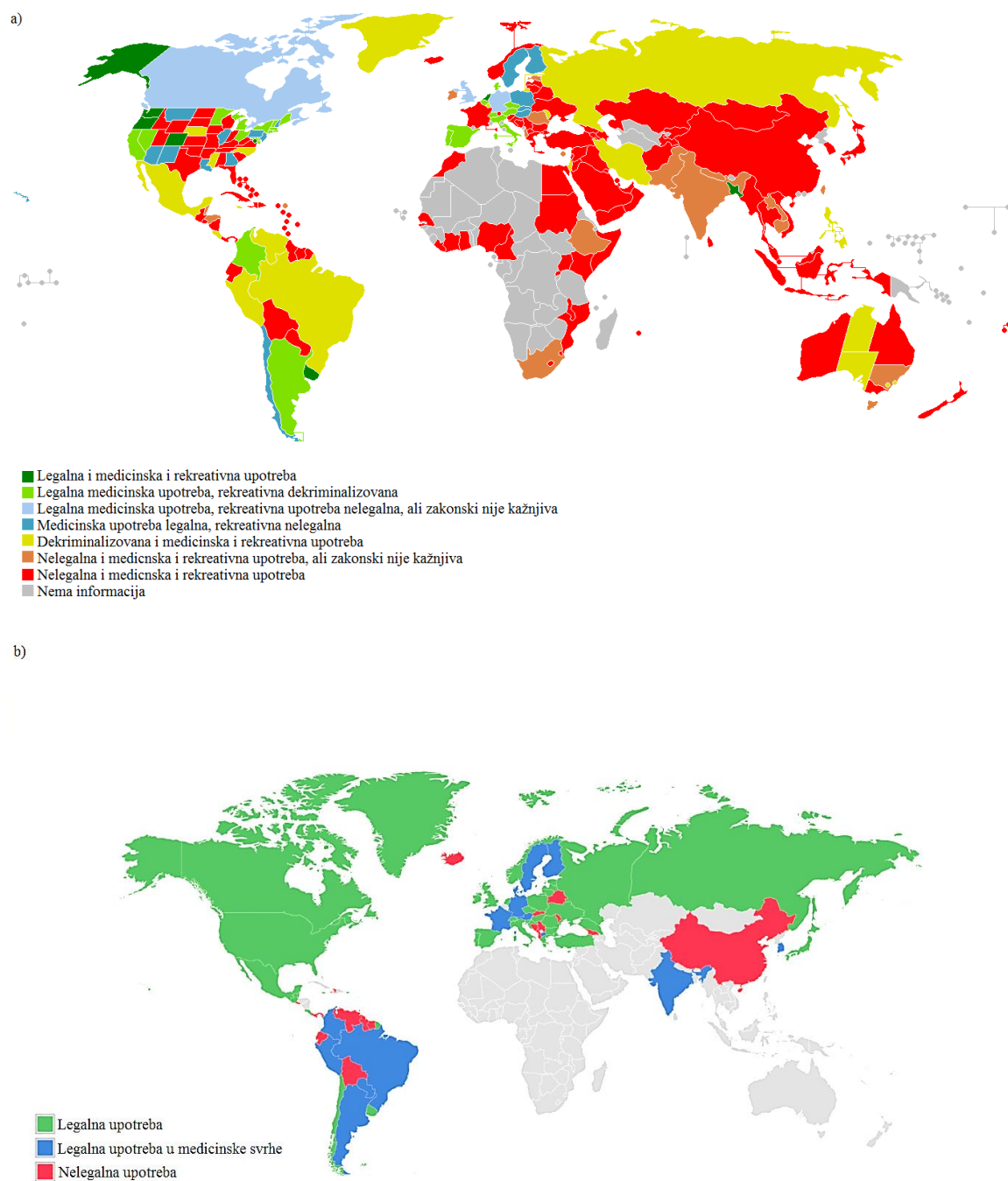
2.1.10. Regulatorna upotreba konoplje

Evropska agencija za lekove (EMA - *European Medicines Agency*) i Američka agencija za hranu i lekove (FDA - *Food and Drug Administration*) predstavljaju dve glavne agencije-tela zadužena za procenu, odobravanja i praćenje upotrebe lekova. U EU postoje dva načina za stavljanje leka u promet: preko EMA-e pri čemu odobrenje važi u svim zemljama EU ili preko nacionalnih nadležnih organa pri čemu je lek dozvoljen za upotrebu samo u državi u kojoj je odobren (Van Norman, 2016). EMA do sada nije odobrila lekove na bazi konoplje i kanabinoida i za sad su dozvoljena pedijatrijska istraživanja i istraživanja u okviru razvoja lekova za retke bolesti. Razvoj lekova na bazi konoplje za retke bolesti (*orphan drug*) omogućava razvijanje lekova uz finansijske olakšice. Pedijatrijska istraživanja (PIP-*Pediatric investigation plan*) imaju za cilj dobijanje potrebnih podataka za upotrebu lekova kod osoba mlađih od 18 godina (Kieffer, 2017). Međutim, mnoge evropske države su dozvolile upotrebu određenih lekova na bazi konoplje preko svojih nacionalnih nadležnih organa.

FDA, kao i EMA, nije odobrila lekove na bazi konoplje, ali su brojne države odobrile upotrebu konoplje u medicinske svrhe. FDA je odobrila upotrebu kanabidiola (Epidiolex®) (FDA, 2018) sintetskog kanabinoida nabinola (Cesamet®) (FDA, 2006) i dronabinola (Marinol® i Syndros®) (FDA, 2004; FDA, 2017).

Upotreba medicinske konoplje je za sada u potpunosti dozvoljena u Kanadi, Nemačkoj, Izraelu, Holandiji i više od 50% saveznih država u Sjedinjenim Američkim državama (Abuhasira, 2018). Magistralni preparati konoplje su, pored Nemačke i Holandije, dozvoljeni i u Hrvatskoj, Češkoj, Danskoj, Italiji, Malti, Norveškoj, Poljskoj, Sloveniji i Švajcarskoj. Većina država u Evropi je dozvolila upotrebu farmaceutskog proizvoda na bazi konoplje Nabiksimolsa (Sativex®), standardizovanog ekstrakta konoplje čije su glavne komponente THC i CBD u dozama 2,7 i 2,5 mg, tim redom (EMA, 2018b).

Na slici 15 je prikazana regulatorna upotreba konoplje (a) i regulatorna upotreba kanabidiola (b) u svetu.



Slika 15. Regulatorna upotrebe konoplje (a) i kanabidiola (b) u svetu

U Srbiji je dozvoljeno gajenje sorti konoplje koje pripadaju vrsti industrijske konoplje koje su upisane u Registar sorti poljoprivrednog bilja, a čiji je sadržaj THC-a manji 0,3%. Konoplja se u Srbiji može gajiti samo radi proizvodnje vlakana, proizvodnje semena za ishranu životinja, daljeg razmnožavanja, prerade, ispitivanja kvaliteta semena, kao i njegovog prometa (Pravilnik o uslovima za gajenje konoplje, 2013).

2.2. Izolovanje bioaktivnih jedinjenja

Izolovanje bioaktivnih jedinjenja se primenjivalo još u drevnim civilizacijama i danas se koristi u gotovo svim sferama prehrambene, farmaceutske i kozmetičke industrije. Ekstrakcija je prvi i veoma važan korak za dobijanje bioaktivnih jedinjenja. Ekstrakcija biljnih sirovina može da se izvodi klasičnim i savremenim metodama ekstrakcije. U klasične metode spadaju metode propisane od strane važeće Farmakopeje: maceracija, digestija, perkolacija i *Soxhlet* ekstrakcija. Ove metode se uglavnom koriste za dobijanje galenskih preparata u laboratorijskim uslovima. U industrijskim uslovima se primenjuju višestepena protivstrujna ekstrakcija, kao i kontinualna protivstrujna ekstrakcija (Lepojević, 2000).

Klasične ekstrakcije imaju niz mana kao što su:

- nizak prinos ciljanih jedinjenja,
- slaba selektivnost,
- dugo vreme ekstrakcije,
- velika potrošnja energije,
- upotreba velike količine rastvarača koji mogu biti štetni za okolinu.

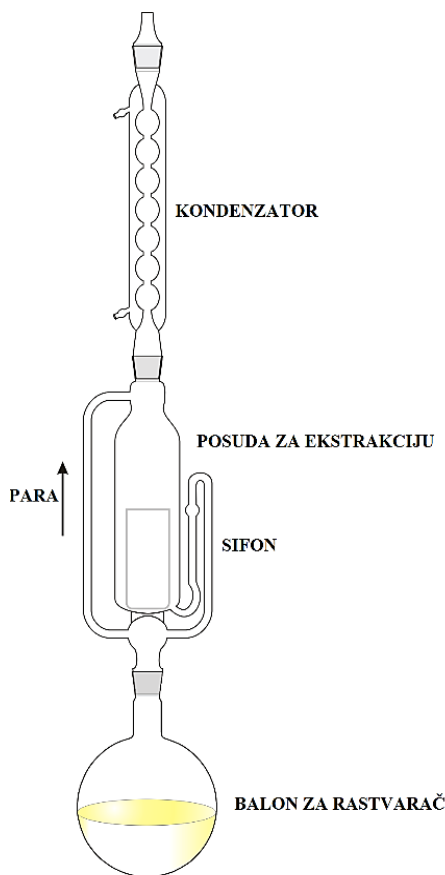
Savremene metode ekstrakcije su se razvile kao težnja očuvanju životne sredine i smanjenju troškova proizvodnje ekstrakata sa povećanjem kvaliteta i zdravstvene sigurnosti dobijenih proizvoda i označavaju se kao „zelene“ ekstrakcije (Chemat i sar., 2017). Savremene metode ekstrakcije obuhvataju mikrotalasnu ekstrakciju, ultrazvučnu ekstrakciju, ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju, ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju.

2.2.1. Klasične ekstrakcije

Danas se kao klasične metode ekstrakcije uglavnom primenjuju maceracije i *Soxhlet* ekstrakcija. Maceracija je klasična, tradicionalna, jednostavna, jednokratna ekstrakcija propisano usitnjene droge sa propisanim rastvaračem na sobnoj temperaturi u trajanju od nekoliko sati do nekoliko dana. Ekstrakcija se vrši po principu difuzije aktivnih jedinjenja u ekstrakcionim medijum. Prinos ekstrakcije zavisi od svojstva biljnog materijala, u prvom redu od stepena usitnjenosti, zatim upotrebljenog rastvarača, odnosa droga/rastvarač, vremena trajanja ekstrakcije, mešanja i slično. Prednost maceracije je jednostavnost izvođenja, mogućnost ekstrakcije termorezistentnih jedinjenja, mali troškovi ulaganja i mogućnost lake implementacije u industrijsku proizvodnju, dok su dugo vreme ekstrakcije, velika potrošnja rastvarača i nizak prinos nedostaci ove metode (Jovanović i sar., 2017).

Soxhlet ekstrakcija se uglavnom koristi za ekstrakciju lipofilnih jedinjenja. Aparatura za *Soxhlet* ekstrakciju je prikazana na slici 16. Prednosti *Soxhlet* ekstrakcije su potrošnja male količine rastvarača u poređenju sa maceracijom, uzorak se više puta ekstrahuje čistim rastvaračem, nije potrebno naknadno filtriranje (Handa i sar., 2008; Luque de Castro i Priego-Capote, 2010). Nedostatak *Soxhlet* ekstrakcije je što se ekstrakcija izvodi sa toksičnim, lako zapaljivim organskim rastvaračima kao što su heksan, petroletar, hloroform, metanol, etil acetat, aceton i drugi, u zavisnosti od polarnosti supstanci koje se ekstrahuju. Pored

ovoga, ekstrakcija je dugotrajna, a zbog povišene temperature ekstrakcije dolazi do razgradnje termolabilnih supstanci (Luque de Castro i Priego-Capote, 2010).



Slika 16. Aparatura po Soxhlet-u

2.2.2. Savremene ekstrakcije

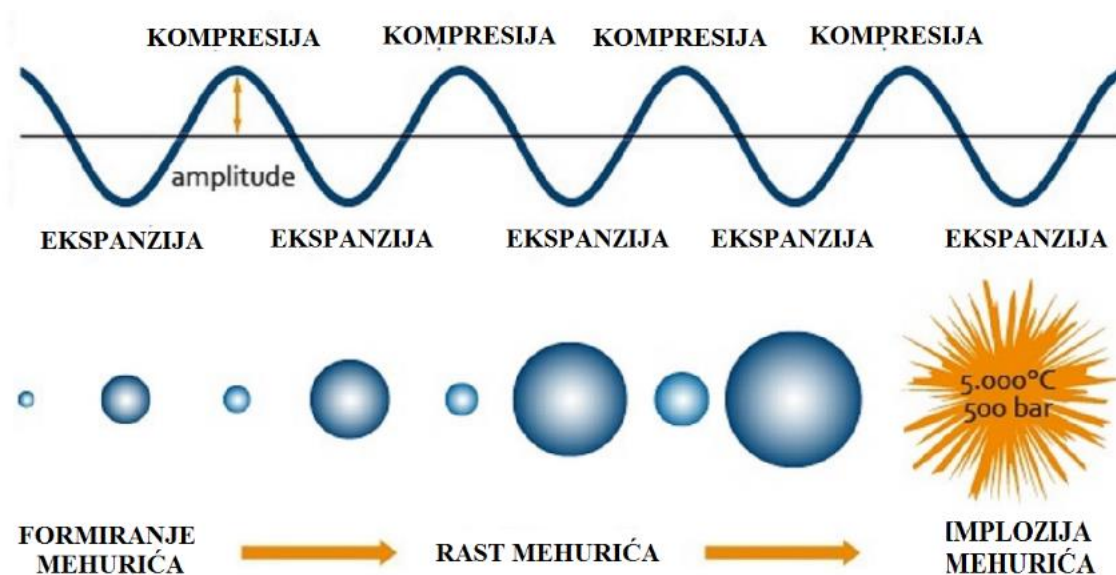
2.2.2.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučni talasi su talasi frekvencije opsega između 20 kHz i 10 MHz. Visokofrekventni ultrazvučni talasi niskog intenziteta (1 W/cm^2) se koriste za praćenje kvaliteta proizvoda ili procesa pri čemu se mere brzina ultrazvuka, prigušenje signala ili analiza spektra frekvencija. Niskofrekventni ultrazvučni talasi velikog intenziteta ($10\text{-}1000 \text{ W/cm}^2$) se primenjuju za poboljšanje procesa kao što su ekstrakcija, inaktivacija mikroba i enzima, fermentacija, pripreme emulzija i suspenzija i drugo (Tiwari, 2015).

- Princip ultrazvučne ekstrakcije

Ultrazvučni talasi prouzrokuju različite fizičke i hemijske fenomene poput kavitacije, agitacije, vibracije, pritiska, šok talasa, trenja, mikroturbulencija, kompresije, ekspanzije i formiranja slobodnih radikala. Fizički efekti se javljaju na frekvencijama od 20 do 100 kHz, hemijski efekti se javljaju na frekvencijama od 200 do 500 kHz, a na frekvencijama većim

od 1 MHz dolazi do akustične kavitacije (Slika 17) koja je odgovorna za veći prenos mase i povećanje efikasnosti ekstrakcije (Tiwari, 2015).



Slika 17. Princip ultrazvučne kavitacije

Prilikom prostiranja ultrazvuka kroz tečni medijum prosečna udaljenost unutar molekula se modifikuje njihovim oscilovanjem oko ravnotežnog položaja. Tokom niza ciklusa kompresije i ekspanzije intermolekularna udaljenost se menja i prilikom prevazilaženja kritične udaljenosti između molekula u fazi ekspanzije javljaju se šupljine u vidu mehurića. Tokom ciklusa kompresije i ekspanzije dolazi do menjanja veličine mehurića. U određenom trenutku mehurići dostižu kritičnu veličinu što dovodi do implozije mehurića i stvaranja pritiska od nekoliko stotina atmosfere i oslobađanja energije od oko 5000 K što izaziva oštećenja ćelijskih membrana omogućavajući veću prodornost rastvarača u biljne ćelije i efikasniju ekstrakciju (Leighton, 2007; Esclapez i sar., 2011).

- Faktori koji utiču na ultrazvučnu ekstrakciju

Ultrazvučna ekstrakcija zavisi od različitih faktora kao što su ultrazvučna snaga, frekvencija, temperatura, dizajn ultrazvučnog reaktora, upotrebljen rastvarač, odnos droga/rastvarač i veličina čestica droge (Capelo-Martínez i sar., 2004; Santos i Capelo, 2007).

Snaga ultrazvuka je direktno proporcionalna sa amplitudom oscilovanja ultrazvučnog talasa. Izbor amplitude zavisi od uzorka koji se ekstrahuje kao i rastvarača upotrebljenog za ekstrakciju i neophodno je izabrati takav nivo oscilovanja koji će dovesti do agitacije i kavitacije, ali ne i do razgradnje ciljanih jedinjenja (Tiwari, 2015). Ultrazvučna snaga može imati veliki uticaj na ekstrakciju, ne samo povećavajući prinos ekstrakcije, već i udeo krajnjih jedinjenja (Wei i sar., 2010; Chemat i sar., 2004). Ultrazvučni talasi nižih frekvencija velike snage postižu snažnije implozije mehurića i samim tim efikasniji proces ekstrakcije (Esclapez i sar., 2011).

Povećanje temperature bilo kog procesa ekstrakcije utiče na povećanje prenosa mase, a samim tim i na povećanje prinosa ekstrakcije. Međutim, povećanje temperature ultrazvučne ekstrakcije može dovesti do smanjenja efikasnosti ekstrakcije, jer se porastom temperature smanjuje međupovršinski napon i povećava napon pare što dovodi do smanjenja ultrazvučne kavitacije (Kuijpers i sar., 2002).

Izbor rastvarača prilikom ekstrakcije se zasniva na postizanju visokog molekularnog afiniteta između rastvarača i ciljanih jedinjenja. Međutim prilikom izbora rastvarača za ultrazvučnu ekstrakciju neophodno je uzeti u obzir faktore koji utiču na kavitaciju kao što su napon pare, koji utiče na intenzitet implोजije i međupovršinski napon, i viskozitet rastvarača koji utiču na prag početka kavitacije (Mason i Lorimer, 2002). Ukoliko je napon pare rastvarača visok, rastvarač će lakše prodirati u kavitacijski mehurić i sprečiti njihovu implोजiju (Price, 1990). Pored ovoga, hemijska reaktivnost rastvarača takođe utiče na ultrazvučnu ekstrakciju. Delovanjem ultrazvuka na rastvarač dolazi do nastanka radikala koji potpomažu oslobađanje aktivnih principa oštećenjem biljne ćelije (Henglein i Kormann, 1985). Međutim, radikali mogu izazvati i širok spektar hemijskih reakcija uključujući i razgradnju ciljanih jedinjenja (Tiwari, 2015).

- Uređaji za ultrazvučnu ekstrakciju

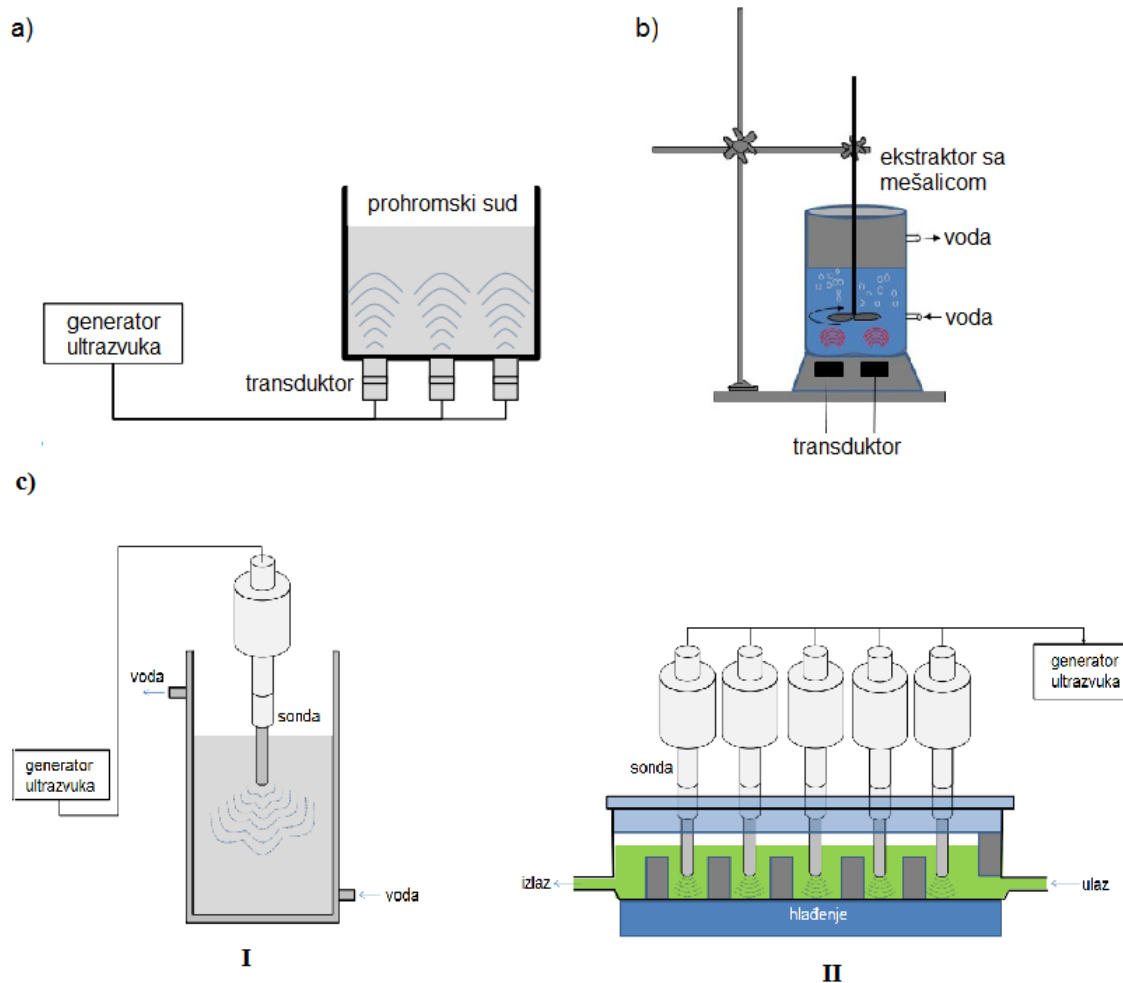
Ultrazvučna ekstrakcija može da se izvodi u ultrazvučnom kupatilu, ultrazvučnom ekstraktoru sa mešanjem i ekstraktorima sa ultrazvučnom sondom (Slika 18). Kao izvor ultrazvuka kod sva tri tipa uređaja se koristi piezoelektrični transduktor (Chemat i sar., 2017).

Ultrazvučno kupatilo se sastoji od rezervoara od nerđajućeg čelika sa jednim ili više ultrazvučnih izvora čija je radna frekvencija uglavnom 40 kHz. U ultrazvučnim kupatilima moguće je regulisati temperaturu ekstrakcije, vreme, kao i snagu ultrazvuka, odnosno gustinu ultrazvuka. Kako se ultrazvučni talasi prenose kroz vodu, do erlenmajera sa uzorkom i rastvaračem dolazi ultrazvučni talas slabijeg intenziteta. Ultrazvučno kupatilo se uglavnom koristi u laboratorijskim istraživanjima. Prednost im je relativno niska cena i mogućnost ekstrakcije više uzoraka istovremeno (Chemat i sar., 2017).

Ultrazvučni ekstraktor sa mešanjem se sastoji od reaktora od nerđajućeg čelika sa duplikatorom, koji omogućava regulisanje temperature ekstrakcije, i mešalice, koja dodatno povećava prenos mase. Radna frekvencija je 25 kHz. Uzorak za ekstrakciju i rastvarač se nalaze u ekstraktoru, a ultrazvučni talasi se prostiru direktno kroz rastvarač (Chemat i sar., 2017).

Ekstraktori sa ultrazvučnim sondama se sastoje od ekstraktora i sonde čija je radna frekvencija 20 kHz. Sonde su uronjene u reaktor sa uzorkom i rastvaračem za ekstrakciju i direktno, kroz ekstrakcioni medijum dolazi do prostiranja ultrazvuka kroz malu površinu što omogućava veće iskorišćenje intenziteta početnih talasa. Regulacija temperature se vrši preko duplikatora. Ekstraktori sa sondama mogu biti diskontinualni i kontinualni.

Kontinualni podrazumevaju rad u režimu stalnog protoka koji se obezbeđuje pomoću pumpi (Chemat i sar., 2017).



Slika 18. Uređaji za ultrazvučnu ekstrakciju: a) ultrazvučno kupatilo, b) ultrazvučni ekstraktor, c) ultrazvučni ekstraktor sa sondom: I-diskontinualni i II-kontinualni (izvor: Pavlić, 2017)

Danas se različite konvencionalne i savremene ekstrakcione tehnike kombinuju sa ultrazvučnom ekstrakcijom, pa su tako razvijene *Soxhlet* ekstrakcija podpomognuta ultrazvukom (Luque-Garcia i Luque de Castro, 2004), hidrodestilacija podpomognuta ultrazvukom (Pingret i sar., 2013), kombinacija mikrotalasne i ultrazvučne ekstrakcije (Cravotto i sar., 2008), kombinacija ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom i ultrazvučne ekstrakcije (Balachandran i sar., 2006) i druge.

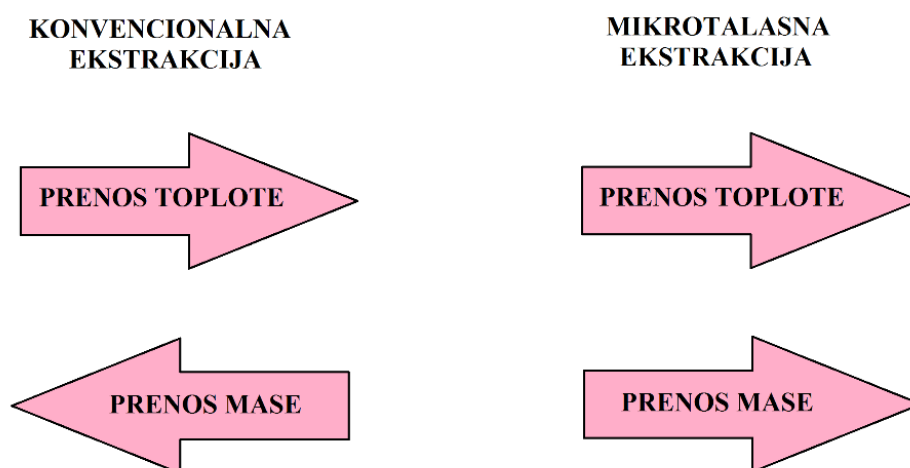
2.2.2.2. Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasno zagrevanje počinje da zauzima važno mesto u savremenim fizičko-hemijskim procesima jer se u mikrotalasnom polju ubrzavaju hemijskih procesi. Primenjuje se u industriji za sušenje materijala, polimerizaciju, procesiranje hrane, u analitičkoj hemiji za

digestiju uzoraka, spaljivanje, ekstrakciju, u biohemiji za hidrolizu proteina, sterilizaciju i u medicini (Stanisavljev, 2009).

- Princip mikrotalasne ekstrakcije

Proces mikrotalasne ekstrakcije se razlikuje od procesa konvencionalnih metoda ekstrakcije. Prema Chemat i sar. (2013), ekstrakcija aktivnih supstanci iz biljnog materijala u mikrotalasnoj ekstrakciji se javlja kao rezultat promene u strukturi ćelije uzrokovane elektromagnetnim talasima. Jedna od prednosti mikrotalasne ekstrakcije u odnosu na konvencionalne metode ekstrakcije jeste ubrzanje procesa ekstrakcije i visok prinos. Ovo je posledica sinergističkog delovanja dva transportna fenomena, odnosno u mikrotalasnoj ekstrakciji dolazi do delovanja gradijenta temperature i gradijenta mase u istom pravcu dok kod konvencionalnih metoda ekstrakcije ova dva gradijenta deluju u suprotnom pravcu (Slika 19). Pored toga, kod konvencionalnih metoda ekstrakcije toplota se prenosi od grejnog medijuma do unutrašnjosti uzorka, dok se kod mikrotalasne toplota rasipa volumetrijski, unutar ozračene sredine (Chemat i sar., 2009; Veggi i sar., 2013).



Slika 19. Transport toplote i mase u konvencionalnoj i mikrotalasnoj ekstrakciji

Zagrevanje mikrotalasima moguće je opisati efektima dipolarne polarizacije i kondukcije (Eskilsson i Björklund, 2000; Routray i Orsat, 2011). Efekat dipolarne polarizacije vezan je za kretanje dipola u električnom polju. Usled dejstva električnog polja na naelektrisanja dipola nastaje Kulonova sila koja dovodi do rotacije dipola (Milošević, 2014). Dipol u jakom električnom polju može da ima veliku energiju. Ukoliko među polarnim molekulima postoje međumolekulske sile, energija dipola usled rotacije može biti dovoljna za kidanje ovih veza. Uzimajući u obzir da dipol nastoji da prati spoljašnje polje koje osciluje, dipol će pri ovim naizmeničnim rotacijama sigurno doći u blizinu drugog molekula koji takođe ima raskinutu vezu. U tom trenutku formiraće se nova veza uz oslobađanje „energije formiranja veze“. Na taj način se energija mikrotalasa konstantno, na molekulskom nivou, prevodi u masu tečnosti što dovodi do njenog efikasnog zagrevanja (Eskilsson i Björklund, 2000; Milošević, 2014). Postojanje međumolekulskih veza je od suštinskog značaja za mikrotalasno zagrevanje dipolarnim efektom. Makroskopski gledano, može se reći da mikrotalasno zagrevanje

dipolarnim efektom potiče od molekularnog trenja izazvanog međumolekulskim silama (Milošević, 2014). Zagrevanje će zavisiti i od jačine međumolekulskih veza, pa će kod gasova, gde su međumolekulske sile slabe, i kod čvrstog stanja, gde su međumolekulske sile jake, biti vrlo malo (Stanisavljev, 2009). Ukoliko supstanca sadrži pokretne jone, u mikrotalasnom polju će doći do zagrevanja od translatornog kretanja jona (Nadagouda i sar., 2011). Solvatisani joni koji prate oscilacije polja na svom putu će takođe uzrokovati kidanje i reformiranje međumolekulskih veza u okolnom rastvaraču i na sličan način kao kod dipolarne polarizacije dovoditi do neprestanog prevođenja mikrotalasne energije u toplotu (Eskilsson i Björklund, 2000).

Prenos toplotne energije je glavna karakteristika mikrotalasne ekstrakcije. Kod konvencionalnih metoda ekstrakcije, energija se prenosi na materijal koji se ekstrahuje konvekcijom pri čemu je prisutan toplotni gradijent. Nasuprot tome, energija mikrotalasa je direktno prenetna na materijal koji se ekstrahuje kroz molekulske interakcije sa elektromagnetnim poljem preko konverzije elektromagnetne energije u toplotnu energiju (Thostenson i Chou, 1999).

- Faktori koji utiču na mikrotalasnu ekstrakciju

Efikasnost procesa mikrotalasne ekstrakcije zavisi od izbora rastvarača, odnosa rastvarač/droga, temperature ekstrakcije, vremena ekstrakcije, vrednosti snage mikrotalasa, kao i karakteristika materijala koji se ekstrahuje, naročito sadržaja vode (Veggi i sar., 2013).

Mikrotalasna energija, sama po sebi nije toplotna energija. Zagrevanje prilikom ekstrakcije je rezultat elektromagnetne energije koja je generisana zbog visokog faktora rasipanja i umerene dielektrične konstante materijala na koji se deluje mikrotalasima (Buffler, 1993). Upravo zbog toga je prilikom ekstrakcije mikrotalasima veoma važan faktor odabir rastvarača za ekstrakciju. Pored osobine da dobro ekstrahuje željene supstance, rastvarač mora da ima visok stepen apsorpcije mikrotalasa koji se, obično, povećava sa povećanjem dielektrične konstante. Pravilan izbor rastvarača, u prvom redu, zavisi od rastvorljivosti željenih jedinjenja, prodiranja rastvarača u materijal koji se ekstrahuje, interakcije sa materijalom koji se ekstrahuje, dielektrične konstante i kinetike prenosa mase (Chen i sar 2008; Spigno i De Faveri, 2009). Polarni molekuli i jonski rastvori (najčešće rastvori kiselina) imaju visok stepen apsorpcije mikrotalasa zbog permanentog (stalnog) dipolnog momenta. Napolarni rastvarači izloženi mikrotalasima se neće zagrejati (Eskilsson i Björklund, 2002). U mikrotalasnoj ekstrakciji se mogu koristiti i polarni i napolarni rastvarači. Rastvarači kao što su voda, etanol i metanol su dovoljno polarni da bi mogli biti zagrejani mikrotalasima. Kombinovanjem ovih rastvarača moguće je podesiti selektivnost rastvarača. Dodavanje soli u izabrani rastvarač utiče na povećanje dobijene toplotne energije pod dejstvom mikrotalasa jer dolazi do povećanja kondukcionog efekta (Spigno i De Faveri, 2009; Brachet i sar., 2002). Dosadašnje studije su pokazale da male količine vode u rastvaraču za ekstrakciju omogućava difuziju vode u ćelije materijala koji se ekstrahuje pa je omogućeno bolje zagrevanje i olakšana difuzija supstanci povećavajući prenos mase (Veggi i sar., 2013). Prilikom ekstrakcije lakoisparljivih jedinjenja, dodatkom rastvarača sa

relativno malom dielektričnom konstantom moguće je održavati temperaturu rastvarača na niskim vrednostima koji obezbeđuju hlađenje lakoisparljivih jedinjenja i sprečavaju njihovu degradaciju (Routray i Orsat, 2011).

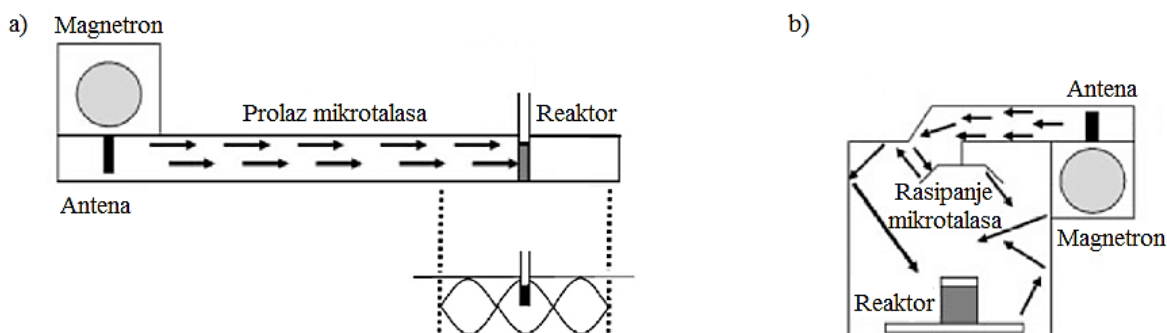
Pored odabira rastvarača veoma je bitno poznavati karakteristike materijala koji se ekstrahuje. Viskoznost čvrstog matriksa utiče na njegovu sposobnost da apsorbuje mikrotalasnu energiju jer povećan viskozitet utiče na molekulsku rotaciju pa toplota proizvedena od rotacije dipola opada (Kingston i Jassie, 1988).

Vreme ekstrakcije mikrotalasima je veoma kratko u poređenju sa konvencionalnim metodama ekstrakcije i obično je u opsegu od nekoliko minuta do pola sata pri čemu se izbegavaju moguće degradacije termolabilnih jedinjenja (Al-Harahshed i Kingman, 2004; Chan i sar., 2011). Porastom vremena ekstrakcije očekuje se veći prinos, međutim u mikrotalasnju ekstrakciji je prinos povećan zanemarljivo u odnosu na povećanje vremena ekstrakcije (Wang i sar., 2008).

Uticaj snage mikrotalasa i temperatura su povezani jer visoka vrednost snage mikrotalasa može dovesti do povećanja temperature sistema, a rezultat toga je povećani prinos ekstrakcije sve dok povećanje prinosa ne postane beznačajno ili ne počne da opada (Chemat i sar., 2005; Hu i sar., 2008; Xiao i sar., 2008;).

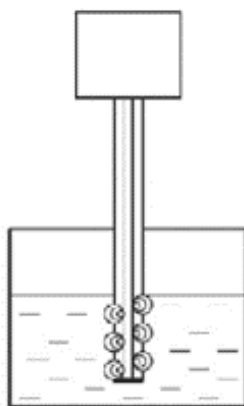
- Uređaji za mikrotalasnu ekstrakciju

Uređaji za mikrotalasnu ekstrakciju mogu biti jednorežimski i višerežimski (Slika 20) u zavisnosti od načina zračenja mikrotalasa. Kod jednorežimskih je mikrotalasno zračenje fokusirano na ograničenu zonu uzorka i tada je uzorak intenzivnije izložen mikrotalasima od višerežimskih gde je mikrotalasno zračenje raspršeno, a rezultat je ravnomerna distribucija mikrotalasa na uzorak. Uređaji za mikrotalasnu ekstrakciju se sastoje od izvora mikrotalasa, najčešće magnetrona, usmerivača talasa i reaktora. Komercijalni uređaji imaju i merno-kontrolnu jedinicu za praćenje parametara ekstrakcije. Prednost jednorežimskih uređaja je precizna i homogena raspodela mikrotalasa, a nedostatak je mogućnost pregrevanja i eksplozije zbog velike jačine elektromagnetnog polja. Prednost multirežimskih uređaja su mogućnost lakog konstruisanja uređaja sa mogućnošću homogenizacije elektromagnetnog polja, mogućnost višestrukog napajanja korišćenjem više mikrotalasnih generatora, relativno niska cena, dok su nedostaci nemogućnost primena zakona koje opisuju elektromagnetno polje zbog nedostatka znanja o raspodeli elektromagnetnog polja i potreba za toplotnom izolacijom velikih razmera (Vinatoru i sar., 2017).



Slika 20. Uređaji za mikrotalasnu ekstrakciju a) jednorežimski i b) višerežimski
(izvor: Vinatoru i sar., 2017)

Nedavno je razvijen novi tip uređaja za mikrotalasne ekstrakcije koji koristi interni usmerivač mikrotalasa (Slika 21). Na ovaj način se mikrotalasi uvode direktno u reaktor sa uzorkom za ekstrakciju i ekstragensom. Prednosti ovakvog uređaja su veća efikasnost pretvaranja elektromagnetne energije u toplotnu, ravnomerna distribucija mikrotalasne energije unutar reaktora, nema pogleda u ograničenju materijala od kojeg je konstruisan mikrotalasni reaktor (Vinatoru i sar., 2017). Ekstrakcioni uređaji mogu biti otvorenog tipa, koji se koristi pri atmosferskom pritisku, ili zatvorenog tipa, koji se koristi prilikom ekstrakcije na visokim temperaturama i pritiscima (Vinatoru i sar., 2017).



Slika 21. Uređaj za mikrotalasnu ekstrakciju sa internim usmerivačem talasa
(izvor: Vinatoru i sar., 2017)

Razvoj mikrotalasne ekstrakcije, kao i ultrazvučne, je išao u pravcu razvoja novih, kombinovanih tehnika, pa su tako razvijene mikrotalasna destilacija za izolaciju etarskih ulja iz aromatičnih biljaka (Chemat i Smadja, 2004), gravitaciona mikrotalasna hidrodifuzija, kombinacija mikrotalasnog zagrevanja i destilacije na atmosferskom pritisku koja se obavlja sa mnogo manje energije i bez rastvarača, a pod dejstvom mikrotalasa i gravitacije (Vian i sar., 2008), vakuum mikrotalasna hidrodifuzija, pomoću koje se vrši isparavanje azeotropne smeše voda-ulje iz biološkog uzorka na pritisku od 100 do 200 mbar (Mengal i Mompon, 1996), mikrotalasna-*Soxhlet* ekstrakcija podrazumeva kombinaciju *Soxhlet* ekstrakcije i mikrotalasnog zagrevanja (Virot i sar., 2007) i mikrotalasna ekstrakcija bez

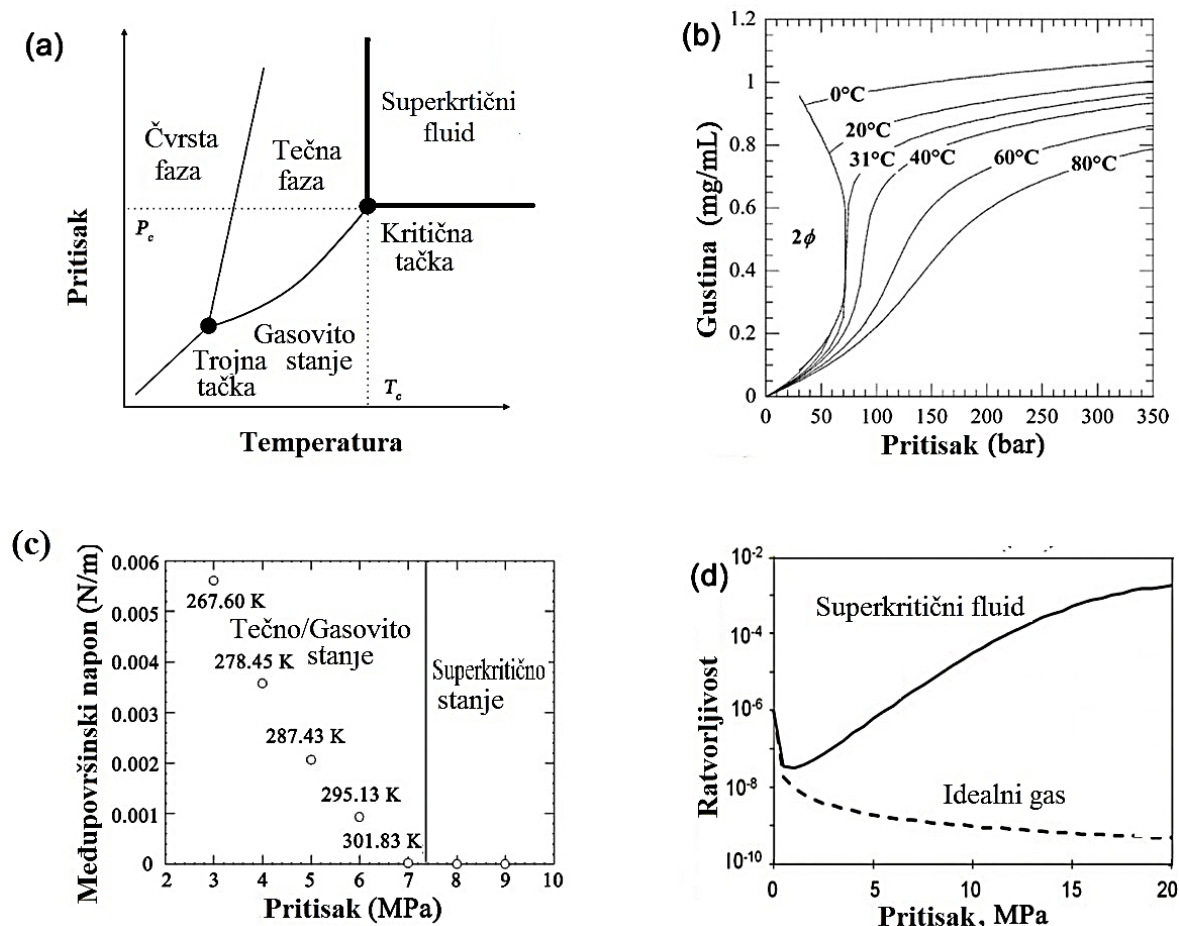
rastvarača, koja je zasnovana na destilaciji na atmosferskom pritisku, a mikrotalasi služe za zagrevanje (Chemat i sar., 2004).

2.2.2.3. Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju

Ekstrakcija superkritičnim fluidima podrazumeva ekstrakciju fluidima koji se nalaze u superkritičnom stanju, odnosno fluidima koji su izloženi pritisku i temperaturi koji su iznad kritične tačke fluida. Superkritično stanje se definiše kao stanje fluida koje ima osobine i tečnosti i gasova, odnosno u superkritičnom stanju fluid je stišljiv, ali sa gustinom i difuzivnošću koja odgovara tečnosti (Herrero i sar., 2006).

Različiti rastvarači se mogu koristiti kao ekstragensi za superkritičnu ekstrakciju, kao što su ugljendioksid, metanol, voda, eten, etan, *n*-pentan, *n*-butan, azotsuboksid i drugi (Herrero i sar., 2006). Jedan od najčešće korišćenih rastvarača jeste ugljendioksid. Ugljendioksid ima niz prednosti u odnosu na druge rastvarače, spada u zdravstveno bezbedne rastvarače jer nije toksičan za ljude i životnu sredinu, ima nisku kritičnu temperaturu (31,2 °C) što je dobra osobina za ekstrakciju termolabilnih jedinjenja, ekstrakt ne dolazi u kontakt sa vazduhom i na taj način se sprečavaju oksidacijske reakcije (Barbosa i sar., 2014). Nakon završetka ekstrakcije dobija se ekstrakt bez rastvarača jer dekompresijom ugljendioksid prelazi u gasovito stanje. Nedostatak ugljendioksida kao rastvarača je nemogućnost ekstrakcije polarnih jedinjenja. Da bi se povećala polarnost ugljendioksida dodaju se različiti ko-rastvarači (Zougagh i sar., 2004; Solana i sar., 2014).

Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju pruža nekoliko prednosti u odnosu na uobičajene metode ekstrakcije. Ugljendioksid u superkritičnom stanju ima nisku viskoznost, a veliku difuzivnost pa je samim tim poboljšana penetracija kroz uzorak i povećan je prinos ekstrahovanih jedinjenja (da Silva i sar., 2016). Jedna od glavnih karakteristika superkritičnog ugljendioksida je mogućnost promene viskoziteta i difuzivnosti promenom pritiska, temperature, ili i pritiska i temperature (Slika 22) (Herrero i sar., 2006).



Slika 22. a) Fazni dijagram supekritičnog ugljendioksida, b) Zavisnost gustine supekritičnog ugljendioksida od pritiska i temperature, c) Zavisnost međupovršinskog napona supekritičnog ugljendioksida od pritiska i temperature, d) Zavisnost rastvorljivosti supekritičnog ugljendioksida od pritiska
(izvor: Sun i sar., 2019)

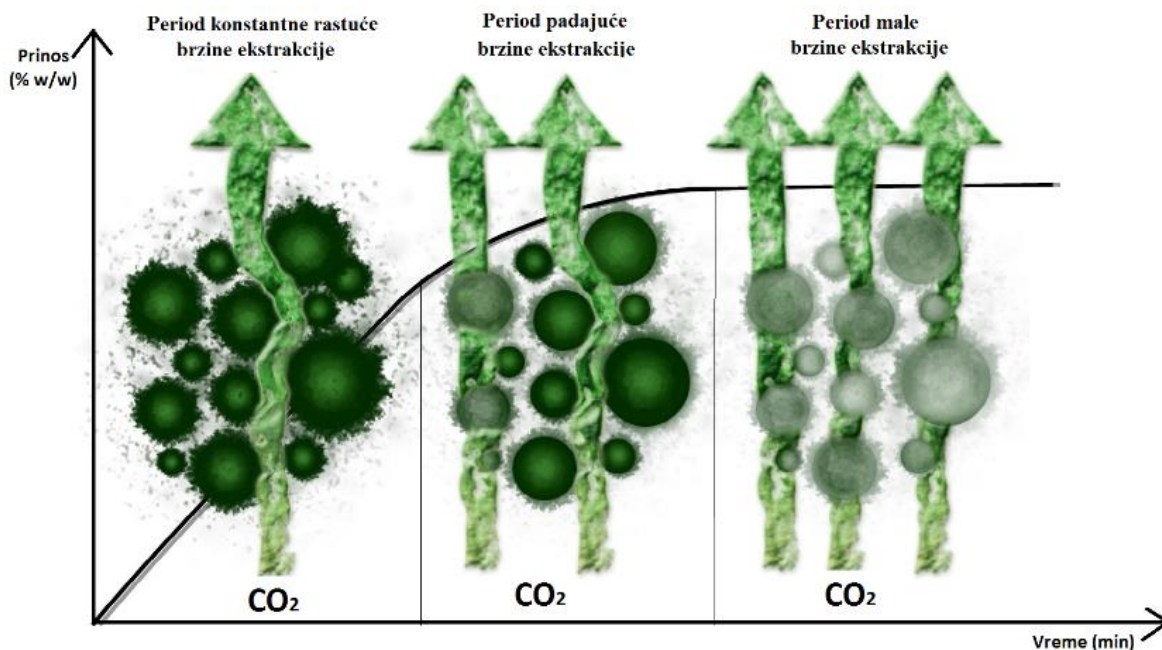
- Princip ekstrakcije ugljendioksidom u supekritičnom stanju

Suprekritična ekstrakcija se izvodi u dva koraka: soljubilizacija hemijskih jedinjenja koja su prisutna u uzorku i njeno odvajanje u supekritični ugljendioksid (da Silva i sar., 2016). Proces soljubilizacije biljnog uzorka odvija se u različitim fazama. Prvo biljni uzorak apsorbira supekritični ugljendioksid što uzrokuje bubrenje ćelije i širenje međućelijskih kanala pa je na taj način povećan prenos mase. Zatim dolazi do prenosa mase rastvorenih jedinjenja iz unutrašnjosti biljne ćelije na njenu površinu i dalje u ugljendioksid. Rastvorena jedinjenja i ugljendioksid se nakon smanjenja pritiska u separatoru odvajaju (Brunner, 1994).

Kod ekstrakcije supekritičnim ugljendioksidom od izuzetne je važnosti poznavati kinetiku ekstrakcije. Kriva kinetike ekstrakcije je podeljena u tri perioda (Slika 23):

- period konstantne rastuće brzine ekstrakcije gde je spoljna površina čestica prekrivena rastvorljivim supstancama a dominantan mehanizam prenosa mase je konvekcija,

- period padajuće brzine ekstrakcije gde je spoljna površina čestice delimično prekrivena rastvorljivim supstancama a mehanizmi prenosa mase su i difuzija i konvekcija i
- period male brzine ekstrakcije pri čemu spoljna površina čestice nije prekrivena rastvorljivim supstancama i prenos mase se odvija putem difuzije (Mezzomo i sar., 2009; Jesus i sar, 2013; Mesomo i sar., 2013).



Slika 23. Periodi ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom
(izvor: da Silva i sar., 2016)

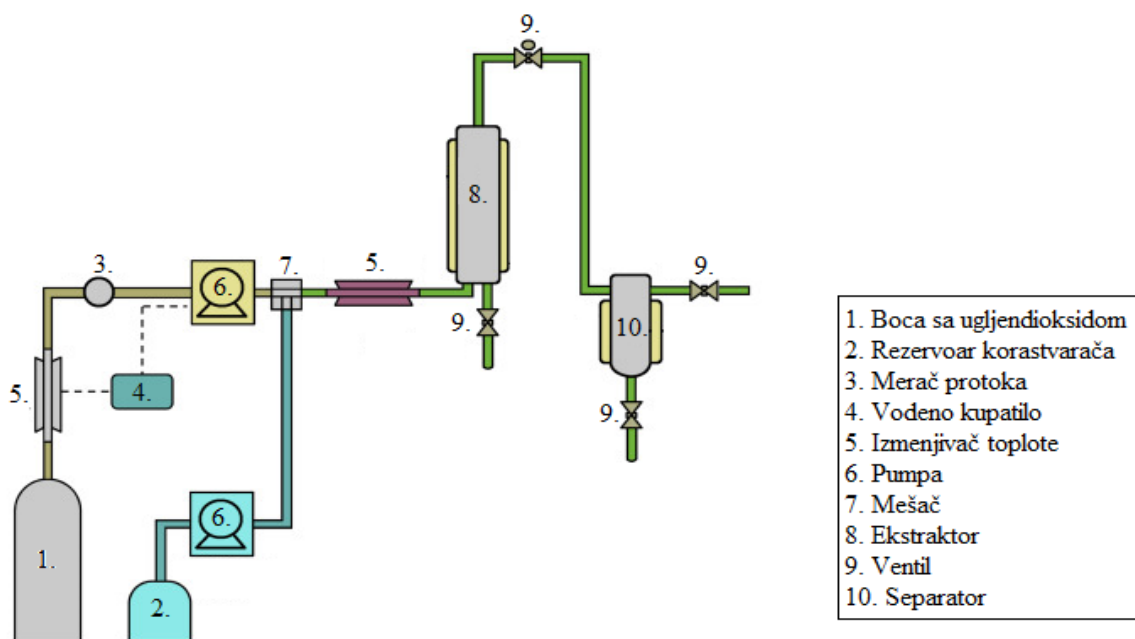
- Faktori koji utiču na ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju

Superkritična ekstrakcija ugljendioksidom zavisi od nekoliko faktora, a u prvom redu od pritiska, temperature, protoka i vremena ekstrakcije (Lang i Wai, 2001).

Rastvorljivost ciljnog jedinjenja u ugljendioksidu je glavni faktor koji određuje njegovu efikasnu ekstrakciju. Rastvorljivost zavisi od isparljivosti analita koja je funkcija temperature i solvatacije superkritičnog fluda koja je funkcija gustine tečnosti (Modey i sar., 1996). Generalno posmatrano, često je poželjno da se uzorci ekstrahuju tačno iznad temperature u kojoj željena jedinjenja postaju rastvorljiva, tako da ekstrakcija drugih jedinjenja može biti svedena na minimum (Lang i Wai, 2001). Da bi se postigla dobra selektivnost, neophodna je pažljiva kontrola gustine superkritičnog fluda koja se može modifikovati promenom pritiska. Kontrolom gustine superkritičnog fluda može se postići i frakcionisanje ekstrakata (Lang i Wai, 2001).

- Uređaji za ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju

Šematski prikaz aparatura za ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju data je na slici 24. Ugljendioksid se pumpom, pod određenim uslovima temperature, pritiska i protoka, uvodi u ekstraktor gde se nalazi uzorak. Nakon prolaska kroz ekstraktor superkritični ugljendioksid se sa ekstrahovanim supstancama uvodi u separator gde se pri uslovima sniženog pritiska i temperature ugljendioksid prevodi u gasovite stanje i odvaja od ekstrakta. Moguće je implementirati više separatora i izvršiti frakcionisanje dobijenog ekstrakta menjanjem moći rastvaranja ugljendioksida promenom procesnih parametara u svakom pojedinačnom separatoru. Ukoliko je prilikom ekstrakcije potrebno menjati selektivnost ugljendioksida dodatkom ko-rastvarača, pre ulaska u ekstraktor ko-rastvarač i ugljendioksid se mešaju u mešaču (Herrero i sar., 2006).



Slika 24. Šematski prikaz aparature za ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju

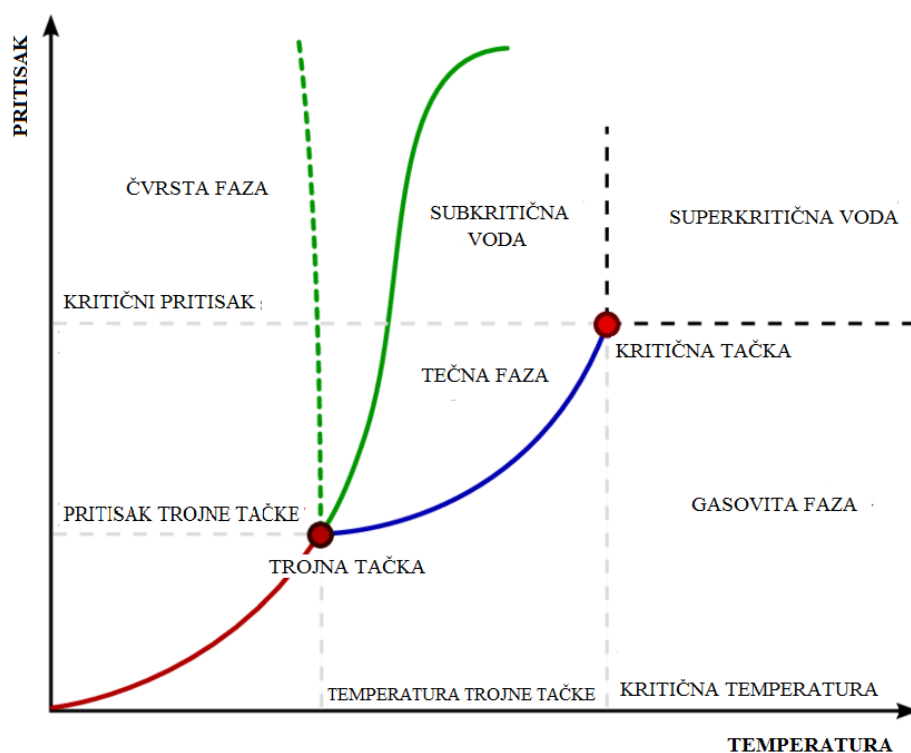
(izvor: Roohinejad i sar., 2017)

Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju se primenjuje u različitim oblastima kao što su prehrambena tehnologija, petrohemijska tehnologija, farmaceutska tehnologija i tehnologija zaštite životne sredine i drugo (Rozzi i Singh, 2002; Herrero i sar., 2006).

2.2.2.4. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

Voda, kao jeftin i ekološki prihvatljiv ekstragens, je idealan ekstragens za ekstrakciju lekovitih biljaka, ali zbog loše efikasnosti ekstrakcije većine nepolarnih jedinjenja njena upotreba je ograničena. Međutim, menjanjem pritiska i temperature moguće je menjati fizička i hemijska svojstva vode tako da voda ostane u tečnom stanju iako se njena temperatura značajno poveća iznad njene atmosferske tačke ključanja. Na ovaj način se

smanjuju polarnost, viskozitet, površinski napon i konstanta disocijacije vode. Voda sa niskom polarnošću pod pritiskom može lako rastvoriti organska polarna i nepolarna jedinjenja menjajući temperaturu od nižih ka višim (Ramos i sar., 2002). Voda pod ovakvim uslovima pritiska i temperature je poznata kao subkritična voda. Izraz „subkritična voda“ se koristi za označavanje vode u fazi između tačke ključanja (100 °C) i kritične temperature vode (374 °C) pri povišenom pritisku (najčešće između 10 i 60 bar) (Herrero i sar., 2006). Voda se u subkritičnom stanju može održavati sve do postizanja kritične tačke vode (temperatura 374 °C i pritisak 221 bar) nakon koje prelazi u superkritično stanje (Clifford, 2008; Chaplin, 2008.). Fazni dijagram vode (Slika 25) prikazuje različita stanja vode pod različitim uslovima temperature i pritiska.



Slika 25. Fazni dijagram vode
(izvor: Peterson, 2013)

- Princip ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju

Princip ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju zasnovan je na molekulskoj strukturi vode i njenim termodinamičkim svojstvima. Parcijalno negativno i parcijalno pozitivno naelektrisanje na suprotnim krajevima molekula vode su odgovorni za osobine vode kao što su polarnost, kohezija, međupovršinski napon, dipolni momenat i drugo (Moulton, 2004; Chaplin, 2008). Na sobnoj temperaturi ($T=25\text{ °C}$) i atmosferskom pritisku, voda ima veoma visoku dielektričnu konstantu ($\epsilon=80$) (Cabane i Vuilleumier, 2005). Povećanjem temperature i pritiska ($T=250\text{ °C}$ i $p=50\text{ bar}$) dielektrična konstanta vode značajno opada ($\epsilon=27$) što je oko raspona organskih rastvarača kao što su metanol, etanol, aceton (Teo i sar., 2010; Alupului i sar, 2012). Voda na ovakvim uslovima rastvara širok spektar jedinjenja sa niskom

i srednjom polarnošću (Kim i sar., 2009; Zaibunnisa i sar., 2009; Teo i sar., 2010). Na ovaj način, menjanjem temperature i pritiska, moguće je varirati dielektričnu konstantu vode, a samim tim i mogućnost vode kao rastvarača (Chemat i sar., 2012). U osnovi, ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju se odvija difuzijskim i konvekcijskim prenosom mase (Smith, 2002). Povećanjem temperature dolazi do povećanja toplotne energije koja može uticati na raskidanje adhezivnih sila između rastvorene supstance i matriksa za ekstrakciju, kao i kohezivnih sila između rastvorenih supstanci, smanjenjem aktivacijske energije potrebne za desorpciju omogućavajući brži prenos mase (Teo i sar., 2010). Povišen pritisak omogućava vodi da prožima pore matriksa i na taj način obezbeđuje bolju ekstrakciju (Richter i sar., 1996).

Mehanizam ekstrakcije subkritičnom vodom podrazumeva šestostepeni proces:

- brz prodor subkritične vode u pore matriksa,
- desorpcija rastvorljivih jedinjenja sa aktivnih centara u matriksu,
- rastvaranje rastvorljivih jedinjenja u subkritičnoj vodi,
- difuzija rastvorljivih jedinjenja kroz pore matriksa,
- difuzija rastvorljivih jedinjenja izvan čestica matriksa,
- iscrpljene sirovine prolaskom velike količine subkritične vode (Asl i Khajenoori, 2013).

Mehanizam ekstrakcije subkritičnom vodom zavisi od povećanja rastvorljivosti i prenosa mase usled promene svojstava vode (Ong i sar., 2006). Voda u subkritičnom stanju ima manju viskoznost i bolju difuzivnost, a samim tim bolju penetraciju kroz matriks. Takođe, smanjuje se površinski napon jer pri većim temperaturama i pritiscima dolazi do slabljenja vodoničnih veza i Van der Valsovih sila između jedinjenja i matriksa što olakšava desorpciju (Teo i sar., 2010).

- Faktori koji utiču na ekstrakciju vodom u subkritičnom stanju

Na efikasnost subkritične ekstrakcije utiču temperatura, pritisak, ko-rastvarači i protok subkritične vode (Gbashi i sar., 2016). Najvažniji faktor ekstrakcije subkritičnom vodom jeste temperatura (Teo i sar., 2010). Povećanje temperature dovodi do povećanja difuzivnosti i rastvorljivosti, a smanjenja viskoznosti i površinskog napona vode (Teo i sar., 2010; Asl i Khajenoori, 2013). Takođe usled povećanja temperature dolazi do olakšane desorpcije rastvorljivih jedinjenja (Teo i sar., 2010). Pritisak ima mali uticaj na ekstrakciju subkritičnom vodom jer je voda ispod svoje kritične temperature vrlo slabo kompresibilna, tako da pritisak nema uticaja na fizička svojstva vode sve dok se održava tečno stanje (Ramos i sar., 2002; Carr i sar., 2011). Tek iznad 300 °C fizička svojstva vode zavise od pritiska (Brovchenko i Oleinikova, 2008). Veći pritisci, iako ne utiču na svojstva vode, indirektno povećavaju prinos ekstrakcije forsirajući subkritičnu vodu da prodire u pore uzorka (Ong i sar., 2006).

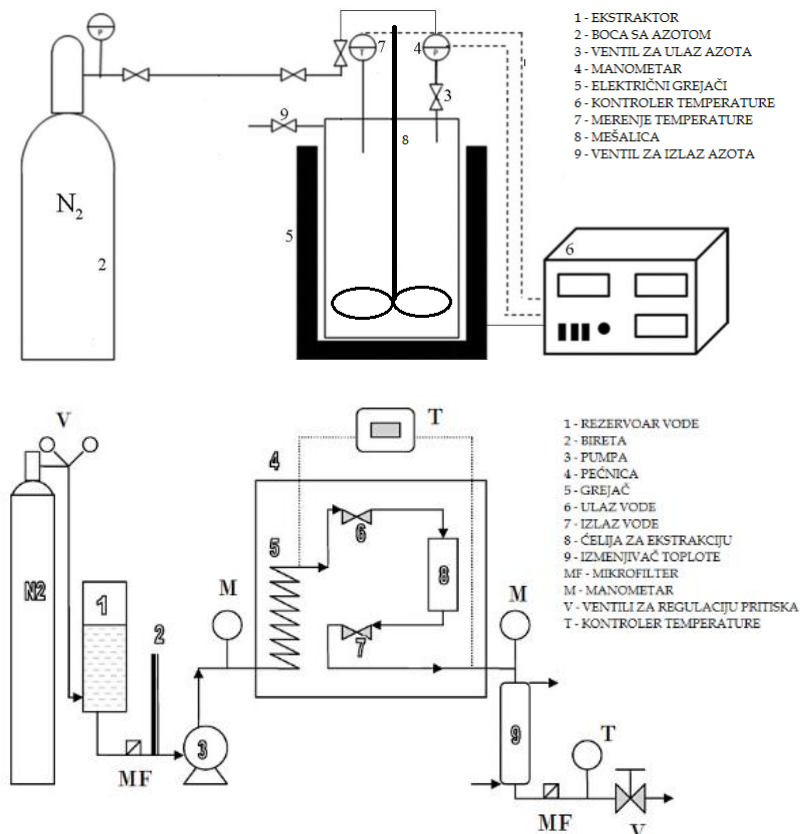
Ko-rastvarači i površinski aktivne materija mogu uticati na povećanje prinosa ekstrakcije menjanjem svojstava vode kao što su dielektrična konstanta, površinski napon, jačina

vodonične veze, difuzivnost ili menjanjem fizičko-hemijskih svojstava uzorka povećavajući desorpciju i difuzija jedinjenja koja se ekstrahuju (Curren i King, 2001; Wang i Weller, 2006; Teo i sar., 2010).

Brzina protoka utiče samo kod kontinualnih sistema za ekstrakciju subkritičnom vodom. Povećanjem brzine protoka subkritične vode kroz uzorak može se sprečiti razgradnja termolabilnih jedinjenja, jer je njihovo zadržavanje na visokoj temperaturi kratko. Međutim, brz protok može dovesti do dobijanja razblaženih ekstrakata, a samim tim smanjenja energetske efikasnosti jer je potrebno naknadno koncentrisati dobijene ekstrakte (Plaza i Turner, 2015).

- Uređaji za ekstrakciju vodom u subkritičnom stanju

Ekstrakciju subkritičnom vodom moguće je raditi na tri načina, diskontinualno, kontinualno i kombinacijom ova dva režima (Slika 26) (Richter i sar., 2003; Islam i sar., 2014). Diskontinualni režim podrazumeva mešanje uzorka i vode u ekstraktoru. Pritisak se postiže uvođenjem azota u ekstraktor, a temperatura zagrevanjem ekstraktora električnim grejačima. Tokom procesa ekstrakcije neophodno je mešanje kako bi se obezbedio prenos mase i toplote. Kontinualni režim podrazumeva kontinualni protok vode kroz ekstraktor u kome se nalazi uzorak što omogućava iscrpljenje sirovine jer se konstantno čist rastvor koristi za ekstrakciju. Međutim, na ovaj način se koriste veće zapremine rastvarača i veća je potrošnja energije (Gbashi i sar., 2016).



Slika 26. Šematski prikaz diskontinualnog i kontinualnog režima subkritične ekstrakcije (izvor: Zeković i sar., 2014; Khajenoori i sar., 2008)

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju je ekološki prihvatljiva tehnika ekstrakcije jer se kao rastvarač za ekstrakciju koristi voda koja je netoksična, nezapaljiva, ne stvara štetne proizvode (Liang i Fan, 2013). Kontrolisanjem radnih uslova moguće je izvršiti selektivnu ekstrakciju polarnih, umereno polarnih i nepolarnih jedinjenja (Curren i King, 2001; Liang i Fan, 2013). Nedostatak ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju je visoka temperatura, koja može dovesti do razgradnje termolabilnih jedinjenja (Mokgadi i sar., 2013; Khoza i sar., 2014).

2.3. Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem (eng. *Spray drying*) je široko rasprostranjena tehnika za sušenje vodenih ili organskih rastvora, suspenzija ili emulzija u prehrambenoj, hemijskoj i farmaceutskoj industriji. Sušenjem raspršivanjem se u prehrambenoj industriji proizvodi širok spektar proizvoda kao što su hrana za bebe, instant kafe, sušeni mlečni proizvodi i drugo. U hemijskoj industriji se na ovaj način dobijaju aluminijum-hlorohidrat, amonijum-nitrat, amonijum-fosfat, magnezijum-hidroksid, cink-oksidi, deterdženti, pigmenti i drugo. U farmaceutskoj industriji se koristi za dobijanje farmakološki aktivnih principa u vidu praha kao što su peptidi, proteini, jedinjenja slabo rastvorna u vodi, antibiotici i biljni ekstrakti. Prednosti upotrebe farmaceutskih preparata u vidu praha u odnosu na tečne su jednostavnije skladištenje, veća koncentracija aktivnih principa i produžena stabilnost proizvoda (Jain Manu i sar., 2011).

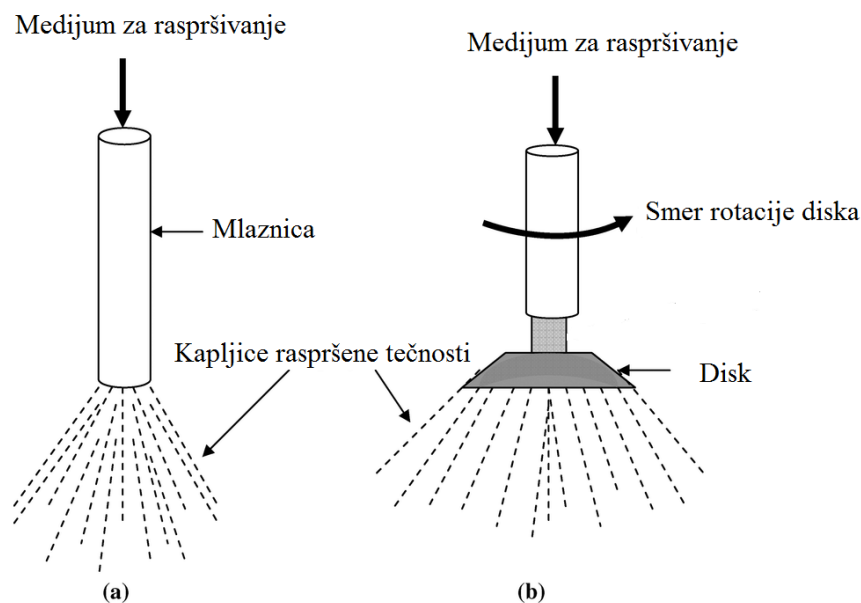
2.3.1. Proces sušenja raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem podrazumeva četiri osnovne faze procesa:

- priprema medijuma za raspršivanje,
- raspršivanje, odnosno atomizacija,
- sušenje, odnosno isparavanje rastvarača i
- odvajanje čestica praha od gasne faze (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).

Medijumi različitih reoloških osobina se mogu sušiti raspršivanjem. Dizajn medijuma vrši se u skladu sa određenim ciljnim karakteristikama proizvoda, stabilnošću, rastvorljivošću sastojaka formulacije, površinskim naponom i viskozitetom. Priprema treba da osigura da dobijeni medijum za raspršivanje bude odgovarajućih reoloških karakteristika zbog raspršivanja, kako bi bila formirana odgovarajuća veličina kapi i odgovarajuće osobine praha (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008; Miletić, 2013).

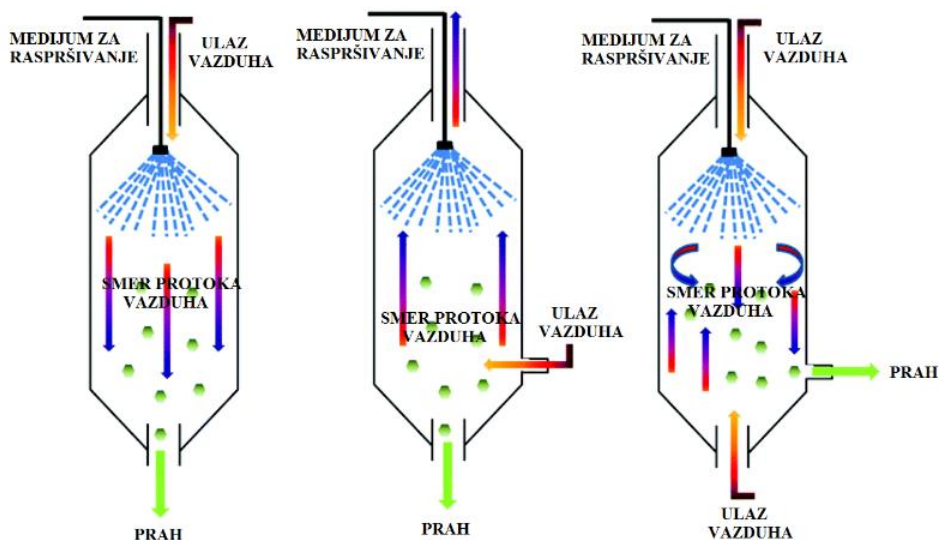
Za raspršivanje se koristi raspršivač, odnosno atomizer koji raspršuje tečnost u vidu pojedinačnih kapi određenih veličina i ta prva, inicijalna veličina raspršene kapi, utiče na veličinu osušenih čestica. Postoje dva osnovna tipa atomizera, rotacioni atomizer i mlazni atomizer (Slika 27).



Slika 27. Atomizer a) mlazni, b) rotacioni

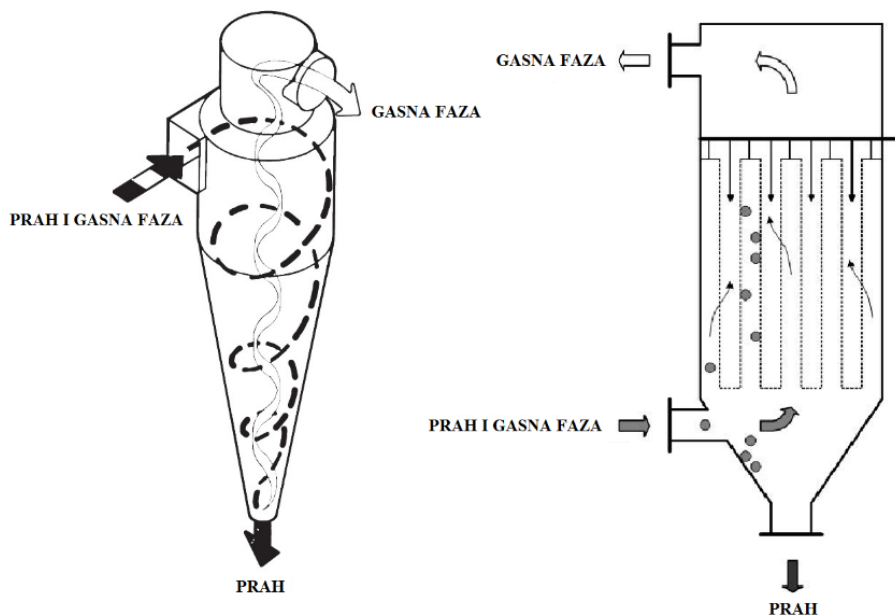
Rotacioni atomizer se sastoji od rotacionog diska koji za raspršivanje tečnosti koristi centrifugalnu silu. Veličina čestica koje nastaju prilikom raspršivanja pomoću rotacionog atomizera se kreću u rasponu od 10 do 200 μm . Rotacioni atomizeri su pouzdani, laki za rukovanje i dobro podnose fluktuacije brzine ulaska medijuma za raspršivanje (Jain Manu i sar., 2011). Mlazni atomizeri mogu biti pneumatski sa jednim i dva fluida, hidraulični i ultrazvučni. Pneumatski mlazni atomizeri proizvode velike brzine fluida za raspršivanje, najčešće vazduha. Prilikom kontakta sa medijumom za raspršivanje dolazi do stvaranja visokih sila trenja i do dezintegracije površinskog sloja tečnosti u kapljice. Veličina čestica se kontroliše odnosom protoka fluida i medijuma za raspršivanje i najčešće se kreće u opsegu od 5 do 100 μm . Hidraulični atomizeri, dovođenjem medijuma pod pritiskom u vidu tankog filma u atomizer i njegovo proterivanje pod pritiskom kroz dizne, omogućavaju raspršivanje nakon izlaska iz atomizera. Veličina čestica dobijenih u hidrauličnim mlaznim atomizerima je od 30 do 350 μm (Jain Manu i sar., 2011).

Sušenje se odvija u struji toplog gasa koji može biti vazduh u slučaju vodenih sistem ili neki inertni gas, kao što je azot, u slučaju rada sa organskim, lakozapaljivim tečnostima. Većina uređaja za sušenje raspršivanjem je konstruisana tako da gas za sušenje ulazi na vrhu ili na dnu komore za sušenje. Prah dobijen u ovakvim sušnicama često može biti loših osobina u pogledu neuniformnosti raspodele veličine čestica dobijenog praha, a često dolazi i do slepljivanja čestica. Da bi se ovo izbeglo konstruisani su uređaji kod kojih se sušenje odvija u dva koraka, jedno na vrhu komore za sušenje i jedno na dnu, u formiranom fluidizovanom sloju. Ovako dobijen prah je boljih karakteristika, a opseg raspodele veličina čestica je od 100 do 300 μm (Celik i Wendel, 2005). Komore za sušenje su prikazane na slici 28.



Slika 28. Komore za sušenje
(izvor: Wais i sar., 2016)

Separacija čestica prahe od gasne faze se obično odvija u ciklonu, mada je separaciju moguće obavljati i pomoću vrećastih filtera (Slika 29). Prednost separacije pomoću ciklona je visoka efikasnost, pogodnost čišćenja u mestu i mehanička jednostavnost. Nedostaci uključuju veličina opreme i moguće smanjenje efikasnosti prilikom *scale-up*-a. Efikasnost separacije ciklonom zavisi od dizajna ciklona, procesnih parametara i mehaničkih osobina čvrstih čestica (Snyder i Lechuga-Ballesteros, 2008).



Slika 29. Ciklon i vrećasti filter

2.3.2. Prednosti i nedostaci sušenja raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem, u odnosu na druge metode sušenja, ima brojne prednosti:

- brza metoda sušenja,
- kratkotrajno je zadržavanje tečnosti na povišenoj temperaturi, što je veoma važno za termolabile supstance,
- ne zahteva dalju obradu dobijenog praha jer se lako mogu kontrolisati brojne osobine praha kao što su oblik, veličina čestica, nasipna gustina, poroznost, sadržaj vlage, protočnost,
- u jednom koraku se tečnost prevodi u osušen prah (Celik i Wendel, 2005).

Nedostaci sušenja raspršivanjem se javljaju pri sušenju lepljivih proizvoda. Lepljivi proizvodi se teško suše zbog stvaranja aglomerata u toku samog procesa, uglavnom zbog velikog sadržaja niskomolekularnih šećera (saharoza, glukoza, fruktoza). Stvaranje aglomerata je direktna posledica niske temperature staklastog prelaza (T_g) (Truong i sar., 2005). Temperatura staklastog prelaza je temperatura pri kojoj čvrsta amorfna supstanca postaje meka nakon zagrevanja (Bhesh i sar., 1997). Da bi se sprečila aglomeracija prilikom sušenja dodaju se različiti nosači, u prvom redu maltodekstrin različitog glukoznog ekvivalenta, arapska guma, škrob, ciklodekstrini, proteini (Bhandari i Howes 1999; Truong i sar., 2005; Shrestha i sar., 2007). Nedostatak primene nosača je taj što je neophodna optimizacija za svako sušenje, odnosno određivanje količine nosača (na suvi ostatak) koja treba da se doda u tečnost koja se suši da bi se dobio prah najboljih karakteristika (Mani i sar., 2002).

2.4. Optimizacija tehnološkog procesa

U mnogim inženjerskim eksperimentima, nezavisno da li se obavljaju u strogo kontrolisanim laboratorijskim ili pogonskim uslovima, vrši se istraživanje proizvodnih uslova koji će dati optimum u kvalitetu proizvoda i njegovoj ekonomičnosti. Optimizacija je uglavnom rađena OFAT metodom (*one-factor-at-a-time*), odnosno praćenjem uticaja jednog parametra na dati proces. Danas se intenzivnije primenjuje eksperimentalni dizajn koji omogućava praćenje uticaja više faktora na dati proces, kako svakog faktora pojedinačno, tako i njihove interakcije (Bezerra i sar., 2008).

2.4.1. Planiranje eksperimenta

2.4.1.1. OFAT metoda

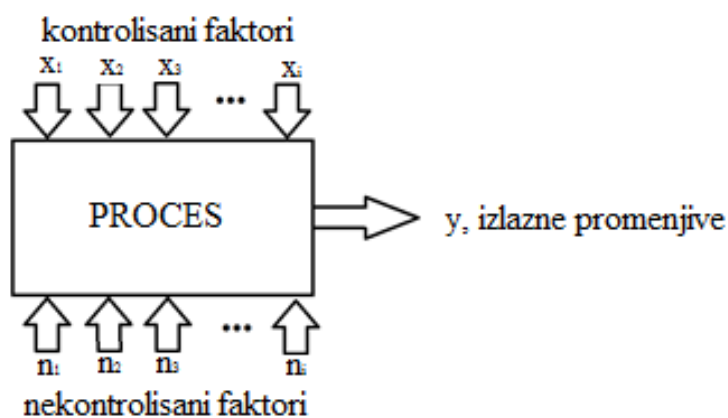
Ova metoda se sastoji od početne vrednosti (ili osnovnog seta nivoa), za svaki parametar, pri čemu se ispituju jedan po jedan parametar tako što se dati parametar menja u okviru svog domena, dok se svi ostali drže konstantni, na osnovnom nivou. Nakon što se izvedu svi testovi, nacrtaju se grafici koji pokazuju kako svaki parametar, čije se vrednosti menjaju, utiče na izlazne promenjive. Glavna mana ovakvog pristupa planiranja eksperimenta jeste što ona ne uspeva da ispita mogućnost interakcije između parametara, a samim tim ne daje

prikaz kompletnih uticaja parametara na izlazne promenjive. Druga mana OFAT metode je veliki broj eksperimenata potrebnih da bi se sprovedo istraživanje, a samim tim potrebno je mnogo više resursa što dovodi do velikih troškova (Lundstedt i sar, 1998).

2.4.1.2. Eksperimentalni dizajn

U cilju prevazilaženja problema OFAT metode, uveden je koncept eksperimentalnog dizajna. Koncept eksperimentalnog dizajna nije nov. Potiče iz 20-tih godina prošlog veka. Uveo ga statističar Ronald Fisher, naglašavajući potrebu razmatranja statističke analize tokom faze planiranja eksperimenta, a ne u završnim fazama. Ovaj koncept su proširili Walter A. Shewhart, William E. Deming, and Joseph M. Juran, a u farmaceutsku industriju su ga uvele FDA i EMA ističući da kvalitet farmaceutskih proizvoda mora da bude posledica dobrog dizajna (*Quality by Design*) (Politis i sar., 2017).

Eksperimentalni dizajn je strukturirana i organizovana metoda za određivanje odnosa između faktora koji utiču na proces i rezultate tog procesa, odnosno eksperimentalni dizajn podrazumeva postizanje saznanja o celokupnom procesu uspostavljanjem matematičkih odnosa između ulaznih i izlaznih promenjivih (Slika 30) (Politis i sar., 2017).



Slika 30. Šematski prikaz eksperimentalnog dizajna
(izvor: Politis i sar., 2017)

Proces zavisi od kontrolisanih faktora i nekontrolisanih faktora, koji se javljaju nasumično i imaju minimalan uticaj u poređenju sa kontrolisanim faktorima i izražavaju se eksperimentalnom greškom. Uticaj kontrolisanih faktora na izlazne promenjive varira u skladu sa Pareto principom, poznatim i kao 20:80 koji ukazuje da je mali procenat faktora odgovoran za veliki procenat odgovora. Najuticajniji faktori su definisani kao kritični parametri procesa i njihova promena utiče u značajnoj meri na izlazne promenjive. Eksperimentalni dizajn je pristup koji podrazumeva kontrolu ulaznih parametara procesa kako bi se ispitaio njihov uticaj na izlazne promenjive. Veza između kritičnih parametara procesa (x) i izlaznih promenjivih (y) se definiše funkcijom $y=f(x)$. Na ovaj način je moguće odrediti najuticajniji faktor procesa, optimizovati proces i odrediti interakcije između faktora procesa (Politis i sar., 2017).

U odnosu na OFAT metodu (*one-factor-at-a-time*) eksperimentalni dizajn ima nekoliko prednosti:

- povećava znanje o procesima uz minimalnu upotrebu resursa,
- obezbeđuje tačne informacije na najefikasniji način,
- identifikuje interakcije između faktora procesa,
- karakteriše uticaj svakog pojedinog faktora,
- omogućava predviđanje ponašanja procesa unutar eksperimentalnog dizajna,
- uspostavlja matematičku vezu između ulaznih i izlaznih promenljivih,
- omogućava optimizaciju izlaznih promenljivih u opsegu postavljenih procesnih parametara,
- omogućava optimizaciju za više izlaznih promenljivih istovremeno i drugo (Barker, 1985; Lewis i sar., 1999; Montgomery, 2013).

Eksperimentalni dizajn zahteva sedam različitih faza:

- postavljanje jasno definisanih ciljeva—tokom ovog koraka treba jasno da bude definisan kvalitet proizvoda;
- izbor ulaznih i izlaznih varijabli—zavisi od cilja eksperimentalnog dizajna što znači da faktori i njihovi nivoi, bilo kategorički ili numerički, budu izabrani u skladu sa ciljem;
- odabir eksperimentalnog dizajna—na osnovu ciljeva, provera, karakterizacije ili optimizacije procesa mogu se izabrati različiti dizajni;
- izvođenje eksperimenta—odabrani dizajn treba tačno izvršiti osiguravajući tako da se parametri koji nisu obuhvaćeni dizajnom identifikuju i održavaju konstantnim;
- provera da li su podaci u skladu sa eksperimentalnim pretpostavkama;
- analiza rezultata—analizom varijansi (ANOVA) i grafičkih alata i
- interpretacija rezultata (Montogemeri, 2013).

Krajnji cilj eksperimentalnog dizajna je karakterizacija i optimizacija procesa. Karakterizacija podrazumeva ispitivanje velikog broja ulaznih varijabli faktorskim dizajnom na dva nivoa. Na ovaj način se isključuju faktori koji nemaju uticaj na procese, a moguće je odabrati kritične parametre procesa, odnosno faktore koji značajno utiču na izlazne promenjive. Odabrani faktori se dalje ispituju sa ciljem optimizacije kroz dizajne koji sadrže najmanje tri nivoa faktora (Politis i sar., 2017).

2.4.2. Statistička obrada rezultata

Najznačajnija statistička metoda koja se danas koristi prilikom optimizacije procesa jeste metoda odzivne površine (RSM – *Responce surface Methodology*). Ova metoda predstavlja skup matematičkih i statističkih tehnika koje se baziraju na fitovanju eksperimentalnih vrednosti polinomnim jednačinama. Cilj je da se na osnovu pažljivo odabranog plana eksperimenata optimizuju odzivi sistema (y) koji zavise od više nezavisno promenljivih faktora ($x_1, x_2, x_3...$) (Montgomery, 2005).

Osnovna prednost korišćenja metode odzivne površine je u smanjivanju broja eksperimenata uz obezbeđivanje dovoljnog broja informacija za određivanje statistički validnih rezultata. Opšti oblik odzivne funkcije glasi:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon_n \quad (1)$$

gde je:

ε —ukupna greška eksperimenata koja sadrži slučajne greške merenja i efekte slučajnih spoljnih uticaja koji nisu obuhvaćeni funkcijom f .

Ova greška predstavlja razliku između stvarne (izmerene) i funkcionalnom zavisnošću (modelom) izračunate vrednosti za iste nivoe ulaznih faktora. Aproksimacija će biti utoliko bolja ukoliko je greška manja. Obe komponente greške eksperimenata su slučajne veličine sa normalnom raspodelom oko tačne (istinite) vrednosti $\mu_\varepsilon=0$ sa disperzijom σ_ε^2 . Tako je za svaki nivo ulaznih faktora potrebno obaviti više ponovljenih merenja kako bi se dobio podatak o grešci. Koliki će biti broj ponovljenih merenja za isti nivo faktora zavisi od uslova eksperimenata, njegove cene koštanja i tražene sigurnosti rezultata (Montgomery, 2005).

Oblik odzivne funkcije u RSM metodi prikazuje se u obliku polinoma obzirom da se stepen fitovanja eksperimentalnih podataka može poboljšati povećanjem stepena polinoma. Najčešće se primenjuju polinomi prvog reda koji u obzir uzimaju samo linearne uticaje pojedinačnih faktora. Međutim, ako je krajnji cilj postupka optimizacija procesa, neophodno je koristiti polinome drugog stepena opisan sledećom jednačinom (Ferreira i sar., 2007):

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_{ii}^2 + \sum b_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

gde su:

Y —odzivna funkcija,

b_0 —odsečak,

b_i —linearni koeficijent,

b_{ii} —kvadratni koeficijent,

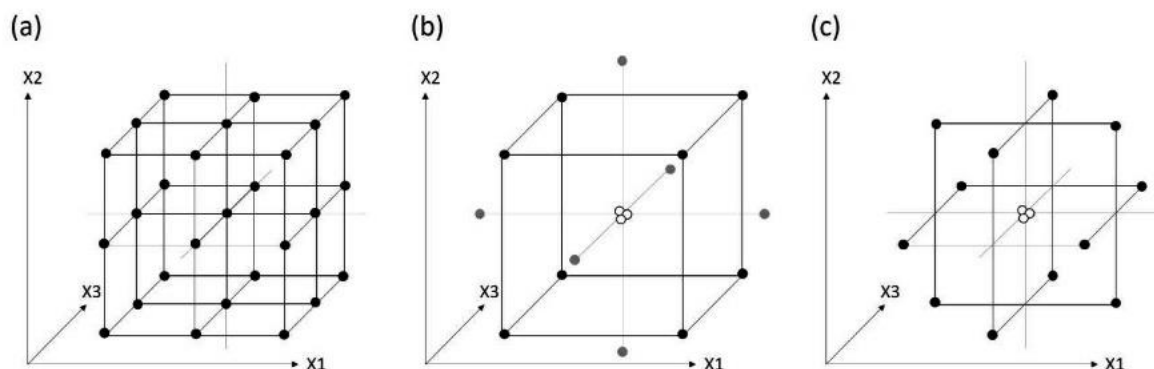
b_{ij} —koeficijent interakcije,

X_i, X_j —kodirane vrednosti nezavisno promenljivih.

Nakon određivanja koeficijenata, proračun odziva se izračunava pomoću jednačine modela. Pogodnost modela, odnosno provera da li model odgovara eksperimentalnim uslovima, obično se tumači na osnovu koeficijenata determinacije (R^2) i koeficijenta varijacije (CV), kao mere odstupanja odzivne funkcije od eksperimentalno dobijenih rezultata. Oblik odzivne funkcije u RSM metodi najčešće se ocenjuje analizom varijansi (ANOVA). ANOVA je najviše upotrebljavana statistička metoda korišćena za poređenje srednjih vrednosti među više posmatranih grupa podataka. Zasnovana je na testiranju hipoteza što je svrstava u grupu metoda koje donose odluku (*decision making methods*) sa izvesnim, unapred zadatim, rizikom. ANOVA omogućava poređenje srednjih vrednosti bilo koje dve grupe podataka,

uzimajući u obzir i srednje vrednosti u ostalim grupama, kao i procenu jednakosti srednjih vrednosti u čitavom modelu (Baş i Boyacı, 2007).

Najčešće korišćeni eksperimentalni dizajni su potpuni faktorski dizajn, centralni kompozitni dizajn i *Box-Behnken* dizajn (Slika 29).



Slika 31. Eksperimentalni dizajni: a) 3^k faktorski dizajn, b) centralni kompozitni dizajn, c) *Box-Behnken* dizajn
(izvor: Fukuda i sar., 2018)

Potpuni faktorski dizajn podrazumeva da su izvedeni i istraženi svi eksperimenti, sa svim kombinacijama faktora na svim njihovim nivoima i svim ponavljanjima. Najzastupljeniji je slučaj sa k faktora, gde svaki ima vrednosti na samo dva nivoa. Kompletan eksperiment dizajniran na ovaj način obuhvata 2^k eksperimenata. Ovaj specijalni slučaj uopštenog faktorijskog dizajna je od velike važnosti zbog svoje široke primene u istraživačkom radu, kao i zbog činjenice da je on osnova za mnoge druge dizajne koji imaju značajnu praktičnu primenu. Pored 2^k faktorijskog dizajna u mnogim eksperimentima se koristi i 3^k faktorijski dizajn. U 3^k faktorijskom dizajnu se posmatra k ulaznih faktora, tako da svaki od njih uzima vrednosti na tri nivoa (Montgomery i Runger, 2011). Centralni kompozitni dizajn je veoma efikasan dizajn u kojem se posebno posmatraju dva parametra, distanca α od osnovnih ponavljanja i broj centralnih tačaka n_c . Obično se prvo koristi 2^k dizajn i u slučaju da je dati model ocenjen kao neprihvatljiv, centralni kompozitni dizajn se dalje koristi kao osnova za obezbeđivanje uslova za primenu kvadratnog modela.

Box i *Behnken* (1960) su predložili nekoliko ideja za dizajne sa tri-nivoa za aproksimaciju odzivne površine. Ovi dizajni su formirani kombinacijom 2^k faktorijskog dizajna sa nekompletnim blok dizajnima. Tako konstruisani dizajni su obično veoma efikasni u uslovima traženog broja pokušaja, i obično su rotirajući (Politis i sar., 2017).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal upotrebljen u istraživanju je herba industrijske konoplje sorte Helena (*Cannabis sativa* L. cv. Helena) Instituta za ratarstvo i povrtarstvo iz Novog Sada, Srbija. Ova sorta je gajena kao komercijalni semenski usev na oglednom polju Odeljenja za alternativne kulture i organsku proizvodnju u Bačkom Petrovcu, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, tokom 2017. godine (Slika 32), prema tehnologiji gajenja koji preporučuju Bócsa i Karus (1998).



Slika 32. Ogledno polje Instituta za ratarstvo i povrtarstvo Novi Sad Bački Petrovac

Protokol uzorkovanja je bio u skladu sa Poglavljem 2, Dodatak I Uredbe EU 796/200, postupak A, koji podrazumeva uzorkovanje vršnih 30 cm stabljike biljke industrijske konoplje sa najmanje jednom cvasti. Uzorkovanje je vršeno dva puta, na samom početku cvetanja useva (herba industrijske konoplje na početku cvetanja useva) i 20 dana nakon početka cvetanja (herba industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva). Uzorkovani vršni delovi su osušeni na provetrenom mestu zaštićenom od sunca i padavina na sobnoj temperaturi. Stabljike i seme različite zrelosti su iz osušenog materijala odvojeni ručno i pomoću test sita. Uzorak za istraživanje se sastojao od lišća, cvetova, cvasti i brakteja (Slika 33).



Slika 33. Uzorak herbe industrijske konoplje

Ovako dobijen biljni materijal je usitnjen u mlinu za kafu (Alpina SF-2813, Švajcarska) (Slika 34) i kao takav primenjen u daljem toku istraživanja.



Slika 34. Usitnjavanje biljnog materijala

3.1.1. Karakterizacija biljnog materijala

3.1.1.1. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u biljnom materijalu je određen gravimetrijski, sušenjem određene količine uzorka do konstante mase na 105°C (*Ph. Eur.* 8.0., 2013). Merenje sadržaja vlage rađeno je u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

3.1.1.2. Određivanje stepena usitnjenosti

Stepen usitnjenosti biljnog materijala, odnosno veličina čestica, određuje se tako što se usitnjena droga (100 g) prenese na set sita (Erweka, Nemačka) i prosejava 20 minuta. Zatim se meri masa dela droge zaostale na svakom situ i izračunava maseni procenat svake frakcije i srednji prečnik veličine otvora dva susedna sita. Veličina srednjeg prečnika čestica (d) se izračunava prema jednačini:

$$\frac{100}{d} = \sum \left(\frac{m_i}{d_i} \right) \quad (3)$$

gde su:

m_i – maseni procenat i -te frakcije i

d_i – srednji prečnik i -te frakcije (Lepojević Ž., 2000).

Određivanje stepena usitnjenosti rađeno je u tri ponavljanja a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.1.1.3. Određivanje sadržaja etarskog ulja

Sadržaj etarskog ulja u biljnom materijalu je određen destilacijom vodenom parom primenom aparature po *Cleavenger*-u (*Ph. Eur.* 8.0., 2013). Izmerena masa biljne sirovine (20 g) se pomeša sa 400 mL vode u balonu za destilaciju, aparatura se zatim postavi u grejni medijum i zagreva do ključanja. Destilacija se odvija u trajanju od 2 h. Nakon 30 minuta od završetka destilacije se očitava zapremina etarskog ulja. Prinos se izražava u %. Merenje sadržaja etarskog ulja rađeno je u tri ponavljanja a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.2. Hemikalije i reagensi

Za istraživanja u okviru ove doktorske disertacije primenjeni su sledeći reagensi i hemikalije: Folin-Ciocalteu reagens, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•), ferihlorid, galna kiselina, katehin, maltodekstrin (Sigma Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka); etanol (Centrohem, Šabac, Srbija); metanol (J. T. Baker, Deventer, Holandija); komercijalni ugljendioksid ($\geq 99\%$) (Messer Tehnogas, Novi Sad, Srbija); komercijalni azot (Messer, Zaprešić, Hrvatska); destilovana voda, TKA water purification system tip: 05.30C 7-DEN (Sigma Aldrich GmbH, Sternheim, Nemačka). Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu su bili stepena analitičke čistoće.

3.3. Primenjene metode ekstrakcije

3.3.1. Maceracija

Maceracija biljnog materijala, odnosno bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala, je izvedena tako što je 10 g biljnog materijala ekstrahovano sa 100 i 200 mL rastvarača, tako da je odnos droga/rastvarač 1:10 i 1:20, na sobnoj temperaturi u laboratorijskoj inkubatorskoj tresilici tokom 24 h sa brojem obrtaja 150 rpm (KS 4000, IKA, Staufen, Nemačka). U ovoj metodi ekstrakcije kao rastvarač su primenjeni destilovana voda i smeša etanola i vode sa koncentracijama 30, 50, 70 i 90%. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakt je filtriran kroz filter papir sa porama veličine od 4 do 12 μm (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) pod vakuumom (V-700, Büchi, Switzerland). Dobijeni tečni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču do njihove karakterizacije.

3.3.2. Soxhlet ekstrakcija

U Soxhlet ekstrakciji 10 g droge ekstrahovano je primenom heksana kao rastvarača, u vremenskom trajanju ekstrakcije od 6 h. Nakon završene ekstrakcije izvršeno je uklanjanje rastvarača iz ekstrakta uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču (Devarot, Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija), nakon čega je određen prinos ekstrakcije (% (m/m)).

3.3.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Box-Behnken dizajn sa tri numerička faktora na tri nivoa je izabran radi ispitivanja i optimizacije procesa ultrazvučne ekstrakcije. Ovako postavljen dizajn zahteva 13 eksperimenata sa 4 ponavljanja u centralnoj tački što je ukupno 17 eksperimenata. Kao kritični faktori ultrazvučne ekstrakcije su odabrani vreme ekstrakcije (20, 40 i 60 minuta), temperature ekstrakcije (40, 60 i 80 °C) i snaga ultrazvuka izražene preko gustine (24, 42 i 60 W/L). Ekstrakcija je rađena u ultrazvučnom kupatilu (EUP540A, Euinstruments, Francuska) (Slika 35) prema blok šemi eksperimenata datoj u poglavlju Planiranje eksperimenata i statistička obrada rezultata ove doktorske disertacije (Tabela 2). U erlenmajeru od 250 mL je ekstrahovano 10 g biljne sirovine sa 100 mL 50% etanola (slika 36). Na erlenmajer je postavljen Libigov kondenzator radi sprečavanja isparavanja rastvarača. Erlenmajeri su uvek postavljeni na istom rastojanju od izvora ultrazvuka. Nakon završene ekstrakcije, ekstrakt je filtriran kroz filter papir sa porama veličine od 4 do 12 μm (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) pod vakuumom (V-700, Büchi, Switzerland). Dobijeni tečni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču do njihove karakterizacije.



Slika 35. Ultrazvučno kupatilo za ultrazvučnu ekstrakciju

3.3.4. Mikrotalasna ekstrakcija

Za mikrotalasnu ekstrakciju korišćen je sistem koji se sastoji od kuhinjske mikrotalasne pećnice (NN-E201W, Panasonic, Osaka, Japan) u koju je adekvatno postavljen stakleni balon sa Libigovim kondenzatorom (Slika 36). Položaj boce je uvek bio na istoj udaljenosti od magnetrona. Ispitivanja i optimizacije procesa mikrotalasne ekstrakcije je izvršena, kao i kod ultrazvučne ekstrakcije, pomoću *Box-Behnken*-ovog dizajna (Tabela 2) pri čemu su kao kritični parametri procesa ekstrakcije izabrani rastvarač (30, 50 i 70% etanol), odnos droga/rastvarač (1:5, 1:10 i 1:15) i vreme ekstrakcije (10, 20 i 30 minuta). Ekstrakcija je rađena na fiksnoj snazi mikrotalasa (580 W). Nakon završene ekstrakcije, ekstrakt je filtriran kroz filter papir sa porama veličine od 4-12 μm (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) pod vakuumom (V-700, Büchi, Switzerland). Dobijeni tečni ekstrakti su čuvani u zamrzivaču do njihove karakterizacije.



Slika 36. Sistem za mikrotalasnu ekstrakciju

3.3.5. Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju

Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju je rađena na laboratorijskom postrojenju za visoko-pritisnu ekstrakciju (*HPEP - High Pressure Extraction Plant - NOVA Swiss*, Effretikon, Švajcarska) (Slika 37). Izmerena masa biljnog materijala (40 g) je postavljena u ekstraktor i ekstrahovana na način opisan u poglavlju 2.2.2.3. pri različitim kombinacijama pritiska (100, 200 i 300 bar) i temperature (40, 50 i 60 °C). Za svaku kombinaciju parametara dobijeno je 5 ekstrakata: ekstrakt dobijen nakon ekstrakcije u

trajanju 4 sata, označen kao totalni ekstrakt (TE), i frakcije dobijene nakon svakih sat vremena ekstrakcije (F1, F2, F3, F4). Ekstrakti su čuvani na temperaturi od 4 °C do njihove karakterizacije.



Slika 37. Sistem za ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju

3.3.6. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju je rađena u diskontinualnom reaktoru (Slika 38). Biljna sirovina (15 g) je ekstrahovana sa destilovanom vodom (150 mL) u ekstraktoru na različitim temperaturama (120, 140, 160, 180, 200 i 220 °C) pri konstantnom pritisku od 30 bar i vremenu ekstrakcije od 10 minuta. Na osnovu naknadno određenih izlaznih parametara-kvalitativnih karakteristika dobijenih ekstrakata (CBD-a) odabrana je optimalna temperatura (140 °C) na kojoj je praćen uticaj vremena ekstrakcije (5, 10, 15, 30 i 40 minuta). Nakon ekstrakcije, ekstrakti su profiltrirani kroz filter papir sa porama veličine od 4-12 μm (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) pod vakuumom (V-700, Büchi, Switzerland) i čuvani u zamrzivaču do njihove karakterizacije.



Slika 38. Ekstraktor za ekstrakciju vodom u subkritičnom stanju

3.4. Sušenje raspršivanjem

Nakon poređenja kvalitativnih karakteristika dobijenih tečnih ekstrakata postupcima maceracije, ultrazvučne ekstrakcije, mikrotalasne ekstrakcije i ekstrakcije vodom u subkritičnom stanju, odabrana je najadekvatnija metoda ekstrakcije za pripremu tečnog ekstrakta herbe industrijske konoplje. Mikrotalasna ekstrakcija sa 57% etanolom, odnosno droga/rastvarač 1:5 i vremenom ekstrakcije 10 minuta na fiksnoj snazi od 580 W je odabrana za pripremu tečnog ekstrakta primenjenog dalje u pripremi napojne smeše za proces sušenja raspršivanjem. Ovako dobijen tečni ekstrakt je osušen u poluindustrijskoj *Spray dryer* sušnici (Anhydro, Danska) (Slika 39). Kao nosač prilikom sušenja je primenjen maltodekstrin sa dekstroznim ekvivalentom 16 u koncentracijama 20, 40 i 60% računato na suvi ostatak tečnog ekstrakta. Napojna smeša je pripremljena tako što je maltodekstrin rastvoren u destilovanoj vodi, a zatim je dodat tečnom ekstraktu neposredno pre svakog sušenja. Tako pripremljen medijum za sušenje je konstantno tokom procesa mešan pomoću magnetne mešalice i grejan na temperaturu od 30 °C. Medijum za sušenje je pomoću peristaltičke pumpe uveden u komoru za sušenje sa protokom od 15 mL/min. Za atomizaciju je primenjen mlazni hidraulični atomizer, a podešen radni pritisak atomizera je 3 bar. Ulazna temperatura vazduha koji je primenjen kao medijum za sušenje je bila u opsegu od 125-130 °C, dok je izlazna temperatura bila između 75 i 85 °C. Dobijeni suvi ekstrakti su nakon sakupljanja skladišteni u staklenoj ambalaži, koja je nakon toga sladištena u eksikator. Efikasnost procesa sušenja je izračunata iz odnosa mase dobijenog suvog ekstrakta i očekivane, teorijske mase, i izražena je u %.



Slika 39. *Spray dry sušnica*

3.5. Karakterizacija ekstrakata

3.5.1. Prinos ekstrakcije

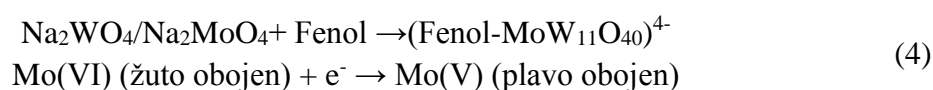
Prinos ekstrakcije (Y) u tečnim ekstraktima je određen primenom standardne metode po *Ph. Eur.* 8.0. (2013). Tečni ekstrakt (5 mL) je prenesen u prethodno izmeren balon. Balon je postavljen na rotacioni vakuum uparivač i sadržaj iz balona je uparen do suva. Balon je zatim sušen na temperaturi od 105 °C do konstantne mase. Prinos ekstrakcije je izražen u %, odnosno kao masa dobijenog suvog ostatka u g na 100 g biljnog materijala.

U slučaju ekstrakcije sa ugljendioksidom u superkričnom stanju prinos ekstrakcije je meren nakon 30, 60, 90, 180 i 240 minuta. Prinos ekstrakcije je izražen u %, odnosno kao masa izmerenog ekstrakta u g na 100 g biljnog materijala.

Prinos *Soxhlet* ekstrakcije je određen merenjem mase ekstrakta nakon uparavanja heksana na rotacionom vakuum uparivaču. Prinos je izražen u %, odnosno kao masa izmerenog ekstrakta u g na 100 g biljnog materijala.

3.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

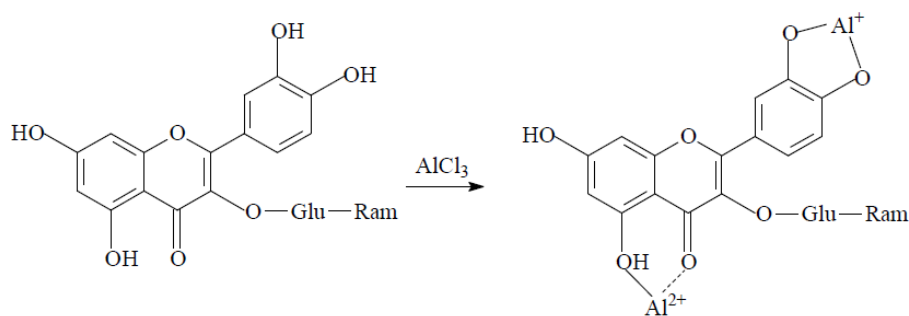
Sadržaj ukupnih fenola (TP) je određen u tečnim i suvim ekstraktima herbe industrijske konoplje primenom metode po *Folin-Ciocalteu*. Ova metoda zasniva se na spektrofotometrijskom određivanju sadržaja ukupnih fenola u reakcionoj smeši ekstrakta, *Folin-Ciocalteu* reagensa (smeša fosformolibdatske i fosforvolframske kiseline) i 20% rastvora natrijumkarbonata. Kod ovog određivanja stvara se kompleksan polimerni jon sa fosformolibdatskom ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) i fosforvolframskom ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) kiselinom. Ovaj reagens oksiduje polifenolne materije, a sam se redukuje u smešu volframoksida (W_8O_{23}) i molibdenoksida (Mo_8O_{23}) prema datoj reakciji. Rastvor postaje intenzivno plave boje, a intenzitet obojenosti je srazmeran koncentraciji polifenolnih jedinjenja (Singleton i Rossi, 1965; Kähkönen i sar., 1999).



U epruveti se pomešaju 0,1 mL uzorka, 7,9 mL destilovane vode, 0,5 mL *Folin-Ciocalteu* reagensa i 1,5 mL 20% natrijum-karbonata. Slepna proba je pripremljena na isti način, ali umesto uzorka se dodaje destilovana voda. Nakon inkubacije od 120 minuta na sobnoj temperaturi meri se apsorbancna na talasnoj dužini od 750 nm. Za određivanje sadržaja ukupnih fenola koristi se kalibraciona kriva standardnog rastvora galne kiseline. Sadržaj ukupnih fenola u tečnim ekstraktima izražen je u mg ekvivalenta galne kiseline po mL tečnog ekstrakta (mg EGK/mL), dok je sadržaj ukupnih fenola u suvim ekstraktima izražen u miligramima ekvivalenta galne kiseline na gram suvog ekstrakta (mg EGK/g). Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

3.5.3. Određivanje sadržaja flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida (TF) je određen u tečnim i suvim ekstraktima spektrofotometrijskom metodom aluminijum-hlorida. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida zasnovano je na njihovoj osobini da oni sa metalima daju odgovarajuće metalo-komplekse. Princip aluminijum-hlorid spektrofotometrijske metode je da aluminijum-hlorid sa C4 keto grupom i C3 ili C5 hidroksilnom grupom flavona i flavonola, formira stabilan kiseli kompleks prema datoj reakciji (Radojković, 2012).



Reakciona smeša se priprema mešanjem 1 mL uzorka, 4 mL vode i 0,3 mL 5% natrijum-nitrita. Kao slepa proba koristi se smeša u kojoj je umesto 1 mL uzorka dodato 1 mL destilovane vode. Za analizu ukupnih flavonoida suvi ekstrakti su rastvoreni u 47% etanolu. Smeša se inkubira na sobnoj temperaturi 6 minuta. Nakon inkubacije u reakcionu smešu se doda 0,3 ml 10% aluminijum-hlorida, a nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi doda se 2 mL 1 M natrijum-hidroksida. Dobijena smeša se dopuni destilovanom vodom do ukupne zapremine od 10 mL. Apsorbanca uzorka se meri na talasnoj dužini od 510 nm. Sadržaj flavonoida u tečnim ekstraktima je izražen u mg ekvivalenata katehina po mL tečnog ekstrakta (mg EK/mL), dok je sadržaj flavonoida u suvim ekstraktima izražen u miligramima ekvivalenata katehina na gram suvog ekstrakta (mg EK/g). Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti (Harborne 1989; Zhishen i sar., 1999).

3.5.4. Određivanje antioksidativne aktivnosti

Antioksidativna aktivnost dobijenih tečnih i suvih ekstrakata herbe industrijske konoplje je analizirana pomoću DPPH testa, koji su prethodno opisali Espin i sar (2002).

Određena zapremina uzorka se pomeša sa 1 mL 90 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ rastvora DPPH u kiveti i dopuni se sa 95% metanolom do 4 mL. Za analizu antioksidativnog delovanja suvi ekstrakti su pripremljeni rastvaranjem u 47% etanolu. Slepa proba umesto tečnog ekstrakta sadrži ekstragens koji je korišćen za pripremu ekstrakata. Apsorbance uzorka i slepe probe dobijene su spektrofotometrijski merenjem na talasnoj dužini od 515 nm, nakon 60 minuta, uz 95% metanol kao referentni rastvor. Antioksidativna aktivnost dobijena DPPH metodom prvo je izražena kao RSC vrednost (*Radical Scavenging Capacity*), a zatim kao IC_{50} vrednost. RSC vrednost predstavlja kapacitet hvatanja slobodnih radikala i računa se prema sledećoj jednačini:

$$RSC = 100 - \frac{A_{uz} \times 100}{A_{sp}} \quad (5)$$

gde su:

A_{uz} -apsorbanca uzorka i

A_{sp} -apsorbanca slepe probe.

IC_{50} se koristi kao mera antagonističke moći neke supstance u farmakološkim istraživanjima i njena vrednost se dobija iz jednačine zavisnosti RSC vrednosti od koncentracije zamenom vrednosti 50% za RSC. IC_{50} vrednost u tečnim ekstraktima je izražena kao mL tečnog ekstrakta po mL reakcione smeše (mL/mL), dok je u suvim ekstraktima izražena kao mg suvog ekstrakta po mL reakcione smeše (mg/mL). Određivanje antioksidativne vrednosti je rađeno u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti.

3.5.5. Određivanje reduktivnog kapaciteta

Reduktivni kapacitet dobijenih tečnih i suvih ekstrakata je određen metodom po Oyaizu (1986). Ova metoda se zasniva na praćenju redukcione sposobnosti ispitivanog ekstrakta za transformaciju $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$.

Prema eksperimentalnoj proceduri, 1 mL uzorka je pomešan sa 1 mL 0,2 M fosfatnog pufera i 1 mL 1% kalijum fericijanida u staklenim epruvetama. Za analizu reduktivnog kapaciteta suvi ekstrakti su rastvoreni u 47% etanolu. Pripremljena reakciona smeša se inkubira tokom 20 minuta na temperaturi 50 °C. Posle inkubacije, u reakcionu smešu je dodato 1 mL 10% rastvora trihlorsirćetna kiseline. Ova smeša je centrifugirana na 3000 rpm tokom 10 minuta. Iz kivete se izdvoji 2 mL supernatanta i doda 2 mL bidestilovane vode i 0,4 mL 0,1% ferihlorida. Apsorbancija je merena na talasnoj dužini od 700 nm. Reduktivni kapacitet ekstrakata izražen je preko EC_{50} vrednosti, koncentracije ispitnog rastvora koja omogućava redukciju 50% Fe^{3+} jona. EC_{50} vrednost je izražena kao mL tečnog ekstrakta po mL reakcione smeše (mL/mL). Određivanje reduktivnog kapaciteta je rađeno u tri ponavljanja, a rezultat je izražena kao srednja vrednost.

3.5.6. Određivanje sadržaja CBD-a i THC-a primenom GC-MS metode

Sadržaj CBD-a i THC-a je određen u svim dobijenim ekstraktima gasnom hromatografijom (Agilent 6890N, Papvorth Everard, Cambridgeshire, Engleska) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (Agilent 5975B, Papvorth Everard, Cambridgeshire, Engleska).

Uzorak za analizu tečnih ekstrakata je pripremljen tako što je izvršena tečno/tečna ekstrakcija dobijenih ekstrakata sa metanolom. Nakon snažnog mućkanja, smeša 0,5 mL tečnog ekstrakta i 2,5 mL metanola je centrifugirana na 10000 rpm tokom 5 minuta. Dobijeni supernatant je primenjen za određivanje sadržaja CBD-a i THC-a. Uzorak za analizu ekstrakata dobijenih ekstrakcijom ugljendioksidom u superkričnom stanju i Soxhlet ekstrakcijom, kao i suvih ekstrakata, su pripremljeni rastvaranjem u metanolu.

Prilikom injektovanja uzoraka ekstrakta na temperaturi injektora od 280 °C došlo je do dekarboksilacije kiselih oblika CBD-a i THC-a prisutnih u ispitivanom uzorku. Zapremina injektovanog uzorka je bila 1 μL u odnosu 1:20. Za razdvajanje je upotrebljena kolona od silicijum dioksida (HP-5MS, Agilent, Papvorth Everard, Cambridgeshire, Engleska, 30m \times 0,25 mm \times 0,25 mm). Helijum je primenjen kao gas nosač sa protokom od 1 mL/min. Inicijalna temperatura je bila 200 °C. Nakon zadržavanja na ovoj temperaturi od 20 minuta, porast temperature je bio sa korakom od 10 °C/min. Dostignuta temperatura od 240 °C je zadržana 10 minuta. Temperatura detektora je bila 230 °C. Za kalibraciju su korišćeni pojedinačni analitički standardi za CBD, CBG i CBN. Kvantifikacija THC-a izvedena je analitičkim standardom CBN metodom koju su opisali Poortnman-van der Meer i Huizer (1999).

3.5.7. Određivanje relativnog sadržaja jedinjenja primenom GC-MS metode

Relativni sadržaj jedinjenja je određen u etarskom ulju, totalnim ekstraktima dobijenim ekstrakcijom superkritičnim ugljendioksidom i ekstraktu herbe industrijske konoplje koji je dobijen *Soxhlet* ekstrakcijom. Pre injektovanja uzoraka, etarsko ulje je rastvoreno u etanolu, ekstrakti dobijeni *Soxhlet* ekstrakcijom u heksanu, dok su ekstrakti dobijeni ugljendioksidom u superkritičnom stanju rastvoreni u smeši hloroform etanol u odnosu 7:3.

Relativni sadržaj jedinjenja u ovako pripremljenim uzorcima je određen gasnom hromatografijom (GC2010, Simadzu, Kyoto, Japan) u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (MSQP2010, Simadzu, Kyoto, Japan). Za razdvajanje je primenjena kapilarna kolona InertCap5 (60,0 m × 0,25 mm × 0,25 μm). Kao gas nosač korišćen je helijum (He) sa konstantnim protokom od 35,2 cm/s. Temperaturni režim je bio sledeći: početna temperatura je bila 60 °C i zadržavana je tokom 4 min, zatim je porasla na 280 °C brzinom 4 °C/min, krajna temperatura je zadržana 10 min. Temperature injektora i detektora bile su 250 °C i 300 °C, tim redom. Temperatura izvora jona je bila 200 °C. Identifikacija jedinjenja prisutnih u ispitivanim uzorcima urađena je poređenjem njihovih masenih spektra i retencionog indeksa (RI) sa onima dobijenim iz autentičnih uzoraka i / ili navedenih u bibliotekama masenih spektra NIST/Wiley, koristeći različite vrste pretraživanja (PBM/NIST/AMDIS) i dostupne literaturne podatke (Hochmuth, 2006; Adams, 2007). Relativni sadržaj jedinjenja je izražen kao relativni maseni procenat (%).

3.5.8. Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja primenom HPLC metode

Fenolna jedinjenja u ekstraktima herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva i u fazi punog cvetanja useva dobijenih maceracijom su određeni metodom tečne hromatografije (*High-Performance Liquid Chromatography* – HPLC) koju se opisali Mišan i sar. (2011). Analiza je izvršena upotrebom tečnog hromatografa Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) opremljenog DAD detektorom, binarnom pumpom, vakuum degazerom, Chemstation softverom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), autosamplerom i kolonom (4,6 mm × 50 mm × 1,8 μm, Agilent Technologies, Eclipse XDB-C18), sa protokom od 1 mL/min. Gradijent rastvarača je bio sledeći: početni uslovi 10 % metanola i 90% 1% mravlje kiseline, 0-10 min 10-25% metanola i 90-75% 1% mravlje kiseline, 10-20 minuta 25-60% metanola i 75-40% 1% mravlje kiseline i 20-30 min 60-70% metanola i 40-30% 1% mravlje kiseline. Injektovanje je izvršeno pomoću autosemplera, a zapremina testiranih uzoraka je bila 5 μL. Snimanje spektara je izvršeno u opsegu od 210-440 nm i hromatogrami su prikazani na 280, 330 i 350 nm. Sadržaj fenolnih jedinjenja je izvršen pomoću kalibracionih kriva i izražen u μg/mL ekstrakta. Koeficijent korelacije kalibracionih dijagrama je bio veći od 0,9995.

3.5.9. Fizičke karakteristike suvih ekstrakata

3.5.9.1. Određivanje vlage

Sadržaj vlage u dobijenim suvim ekstraktima određen je sušenjem uzorka na temperaturi od 105 °C do konstantne mase (*Ph. Eur.* 8.0., 2013). Rezultat je izražen u procentima (%). Merenje sadržaja vlage rađeno je u tri ponavljanja a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.5.9.2. Higroskopnost

Higroskopnost suvih ekstrakata herbe industrijske konoplje je određena merenjem promene mase uzorka suvog ekstrakta nakon izlaganja povećanoj vlažnosti. Merenje je rađeno tako što se izmeri oko 1 g suvog ekstrakta na petrijevoj šolji i petrijeva šolja sa uzorkom se postavlja u eksikator u kome je prethodno postignuta vlažnost od 70% pomoću zasićenog rastvora natrijum-hlorida (Cai i Corke, 2000; Vidović i sar., 2014). Higroskopnost je izražena u % i merena je tokom 7 dana. Merenje higroskopnosti rađeno je u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.5.9.3. Indeks rastvorljivosti u vodi i indeks apsorpcije vode

Indeks rastvorljivosti u vodi (*Water solubility index* - WSI) i indeks apsorpcije vode (*Water absorption index* - WAI) su određeni tako što je 1,5 g svakog uzorka pomešano sa 15 mL vode u kivetu za centrifugiranje i ostavljeno da stoji inkubirano 30 minuta u vodenom kupatilu na 30°C. Nakon inkubacije smeša je centrifugirana 15 minuta na 3000 rpm. Supernatant je sakupljen u prethodno izmerene petri šolje sušen u sušnici na 105 °C preko noći i izmeren. Indeks rastvorljivosti u vodi predstavlja odnos mase osušenog supernatanta i ukupne suve materije u prvobitnom uzorku izražen u procentima. Indeks apsorpcije vode predstavlja odnos mase čvrstih peleta zaostalih nakon centrifugiranja i ukupne suve materije u prvobitnom uzorku izražen u procentima (Phoungchandang i Sertwasana, 2010; Vidović i sar., 2014). Merenje je rađeno u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.5.9.4. Nasipna zapremina

Nasipna zapremina suvog ekstrakta herbe industrijske konoplje je određena tako što je 10 g uzorka suvog ekstrakta uneto u stakleni cilindar zapremine 50 mL i potom izloženo petominutnoj vibraciji na 300 rpm. Nakon toga, očitana je zapremina praha u cilindru i zapreminska masa izražena je u mg/mL (Vidović i sar., 2014). Merenje je rađeno u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.5.9.5. Rehidracija

Određivanje vremena rehidracije suvih ekstrakata herbe industrijske konoplje podrazumeva merenje vremena pri kojem se suvi ekstrakt rastvara u vodi na temperaturi od

26 °C. Prilikom određivanja ovog vremena meri se vreme rastvaranja 1 g uzorka u 50 mL vode na magnetnoj mešalici. Vreme rehidracije se izražava u sekundama (Goula i Adamopoulos, 2008). Merenje je rađeno u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.5.9.6. *Caking*

Caking suvog ekstrakta herbe industrijske konoplje se određuje tako što se određena masa uzorka stavlja u hermetički zatvorenu posudu u koju je prethodno stavljen zasićen rastvor natrijum-hlorida, koji obezbeđuje povećanu relativnu vlažnost u prostoru u kome se uzorak nalazi. Uzorak u hermetički zatvorenoj posudi stoji 90 minuta. Nakon 90 minuta suši se u sušnici na 50°C tokom 2 časa. Uzorak se zatim seje kroz set sita 5 minuta i zaostali prah na svakom situ se izmeri. Zatim se izračunava udeo čestica za svaki promer sita ($d > 0,8\text{mm}$, $d = 0,315\text{--}0,8\text{mm}$, $d = 0,16\text{--}0,315\text{mm}$, $d = 0,10\text{--}0,16\text{mm}$, $d < 0,10\text{mm}$). Merenje je rađeno u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost.

3.5. Planiranje eksperimenta i statistička obrada rezultata

Optimizacija ispitivanih procesa je vršena upotrebom obe metode planiranja eksperimenta.

Planiranje eksperimenta OFAT metodom je izvršeno kod:

- klasične ekstrakcije, maceracije, pri čemu je praćen uticaj rastvarača i odnos droga/rastvarač na prinos ekstrakcije i kvalitativne karakteristike dobijenih ekstrakata (TP, TF, IC₅₀, EC₅₀),
- savremene metode ekstrakcije, ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom, pri čemu je praćen uticaj temperature i pritiska na prinos ekstrakcije i karakteristike dobijenih ekstrakata (CBD, THC),
- savremene metode ekstrakcije, ekstrakcije subkritičnom vodom, pri čemu je praćen uticaj temperature na prinos ekstrakcije i karakteristike dobijenih ekstrakata (TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD), a zatim uticaj vremena ekstrakcije na sadržaj CBD-a na optimalnoj temperaturi i
- procesa sušenja raspršivanjem, pri čemu je praćen uticaj koncentracije nosaša na efikasnost ekstrakcije i fizičkih (vlaga, higroskopsnost, WSI, WAI, nasipna zapremina, rehidracija, *caking*) i hemijskih (TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD, THC) karakteristika dobijenih suvih ekstrakata.

Dobijene vrednosti izlaznih promenljivih su prikazane kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Analiza varijansi praćena *Tukey*-ovim testom je korišćena za upoređivanje statističkih razlika među izlaznim promenjivima sa značajnošću od $p < 0,05$. Statistička obrada rezultata je izvršena uz korišćenje programa MS Office Excel 2013.

Planiranje eksperimenta eksperimentalnim dizajnom, pri čemu je kao eksperimentalni dizajn upotrebljen *Box-Behnken*-ov dizajn na tri nivoa sa tri promenjive, izvršeno je kod:

- savremene metode ekstrakcije, ekstrakcije pomoću ultrazvuka, pri čemu su za ulazne promenjive odabrani vreme ekstrakcije (20, 40 i 60 min), temperature ekstrakcije (40, 60 i 80 °C) i snaga ultrazvuka izražene preko gustine (24, 42 i 60 W/L), a kao izlazne promenjive praćeni su Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD, THC i
- savremene metode ekstrakcije, ekstrakcije pomoću mikrotalasa, pri čemu su za ulazne promenjive odabrani rastvarač (30, 50 i 70% etanol), odnos droga/rastvarač (1:5, 1:10, 1:15) i vreme ekstrakcije (10, 20 i 30 min), a kao izlazne promenjive praćeni su Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD, THC.

Statistička obrada rezultata dobijenih u savremenim metodama ekstrakcija pomoću ultrazvuka i mikrotalasa urađena je pomoću metode odzivne površine (*RSM*), a u tu svrhu je korišćen *Design-Expert v.7 Trial* (Stat-Ease, Minneapolis, Minnesota, USA) softver. Ovom metodom pomoću upotrebljenog eksperimentalnog dizajna integrišu se nezavisne promenjive značajne za proces ekstrakcije i na osnovu podataka dobijenih iz eksperimenta dolazi se do jednačine koja opisuje proces ekstrakcije. Na osnovu jednačine modela ekstrakcije može se proceniti uticaj svake nezavisne promenjive pojedinačno, njihove interakcije, kao i optimalni uslovi za dati proces.

Blok šema *Box-Behnken*-ovog dizajna za ekstrakcije pomoću ultrazvuka i mikrotalasa data je u tabeli 2. *Box-Behnken*-ov dizajn sa tri promenjive predviđa $N=2k(k-1)+C_p$ eksperimenata gde je C_p broj ponavljanja u centralnoj tački (ukupno 17 eksperimenata).

Kako bi se izvršilo modelovanje procesa realne vrednosti ispitivanih parametara se prevode u kodirane vrednosti koje se dalje koriste u modelovanju (Baş and Boyacı, 2007). Opšta jednačina koja se koristi za kodiranje realnih vrednosti parametara ima oblik:

$$X = \frac{x_i - x_0}{\Delta x} \quad (6)$$

gde su:

X –kodirana vrednost promenjive,

x_i –stvarna vrednost promenjive,

x_0 –vrednost promenjive na srednjem nivou (0),

Δx –razlika vrednosti promenjive na dva uzastopna nivoa (-1,0 ili 0,1).

Tabela 2. Blok šema *Box–Behnken*-ovog eksperimentalnog dizajna ekstrakcije pomoću ultrazvuka i mikrotalasa

	Ultrazvučna ekstrakcija				Mikrotalasa ekstrakcija				
	Kodirane vrednosti	Temperatura [°C]	Vreme [min]	Gustina ultrazvuka [W/L]	Koncentracija etanola [%]	Vreme [min]	Odnos droga/rastvarač		
1	0	0	0	60	40	42	50	20	1:10
2	0	0	0	60	20	60	50	20	1:10
3	-1	1	0	80	20	42	30	30	1:10
4	0	0	0	60	40	42	50	20	1:10
5	0	0	0	60	60	60	50	20	1:10
6	-1	-1	0	40	60	42	30	10	1:10
7	0	1	-1	80	40	60	50	30	1:5
8	1	-1	0	40	20	42	70	10	1:10
9	1	0	1	60	40	42	70	20	1:15
10	1	0	-1	40	40	60	70	20	1:5
11	0	-1	-1	60	40	42	50	10	1:5
12	0	1	1	60	20	24	50	30	1:15
13	-1	0	1	80	40	24	30	20	1:15
14	-1	0	-1	60	60	24	30	20	1:5
15	0	-1	1	40	40	24	50	10	1:15
16	0	0	0	80	60	42	50	20	1:10
17	1	1	0	60	40	42	70	30	1:10

Ispitivane izlazne promenjive, odnosno odzivi su fitovani kvadratnim polinomom prema jednačini (Ferreira i sar., 2007):

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_{ii}^2 + \sum b_{ij} X_i X_j \quad (7)$$

gde su:

Y —odzivna funkcija,

b_0 —odsečak,

b_i —linearni koeficijent,

b_{ii} —kvadratni koeficijent,

b_{ij} —koeficijent interakcije,

X_i, X_j —kodirane vrednosti nezavisno promenljivih (Wang i sar., 2008).

Jednačina modela ekstrakcije i njeni koeficijenti dobijeni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka. Najprihvatljiviji model određen je na temelju maksimalne vrednosti koeficijenta korelacije (R), odnosno determinacije (R^2), koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka i u idealnom slučaju iznosi 1, kao i koeficijenta varijacije, koji predstavlja stepen disperzije podataka i trebalo bi da je manj od 10%. Pored koeficijenta determinacije prilikom provere dobijenog modela značajni su i p -vrednost modela, koja treba da je manja od 0,05 i tada kažemo da je model značajan, kao i p -vrednost odstupanja od modela koja treba da je veća od 0,05, odnosno da odstupanje od modela nije značajno.

Model za svaku izlaznu promenjivu se sastoji od lineranog i kvadratnog člana svakog ispitivanog parametara, kao i članova koji predstavljaju njihovu interakciju, a koji imaju značajan uticaj na datu izlaznu promenjivu. Individualni efekti, značajnost odabranih faktora i njihovih interakcija se mogu objasniti na osnovu p -vrednosti. Kada je p -vrednost za određene članove odzivnog polinoma manja od 0,01 taj faktor veoma značajno utiče na analizirani proces, kada je p -vrednost između 0,01 i 0,05 tada taj faktor utiče značajno, kada je između 0,05 i 0,1 faktor utiče slabo, a kada je veće od 0,1 on ne utiče.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Karakterizacija herbe industrijske konoplje

Nedovoljno osušen ili nepropisno skladišten biljni materijal veoma lako se kvari. Pod uticajem vlage dolazi do razgradnje aktivnih principa i do razvoja mikroorganizama, što dodatno umanjuje njenu vrednost i narušava stabilnost i bezbednost. Farmakopeja za svaku biljnu sirovinu propisuje maksimalno dozvoljenu količinu vlage. Za najveći broj biljnih sirovina ta vrednost iznosi od 8 do 12%, sem za biljne sirovine sa veoma nestabilnim aktivnim principima, kao što su npr. biljne sirovine sa kardiotoničnim heterozidima, gde je maksimalno dozvoljen sadržaj vlage do 6% (*Ph. Eur.* 8.0., 2013). Sadržaj vlage upotrebljenog biljnog materijala u ovoj doktorskoj disertaciji je bio 7,36%, što ukazuje na to da je biljna sirovina odgovarajućeg kvaliteta u odnosu na ovaj parametar, kao i da je sušena i skladištena na odgovarajući način.

Prilikom ekstrakcije biljnog materijala veoma je bitno usitniti biljni materijal do određenog stepena usitnjenosti. Od veličine čestice biljnog materijala koji se ekstrahuje zavisi prinos ekstrakcije. Usitnjavanjem dolazi do narušavanja strukture biljnog materijala i povećanja površine kontakta pri čemu se intezifikuje prenos mase aktivnih principa iz biljne ćelije u ekstragens. Pri narušavanju strukture biljnog materijala dolazi do narušavanja dela ćelija i supstance koje one sadrže su lako dostupne rastvaraču. Međutim, previše usitnjene čestice teško propuštaju rastvarač jer ne poseduju odgovarajuću poroznost što znatno usporava proces ekstrakcije (Pekić B., 1983). Jovanović i sar. (2016) su ispitivali tri različita stepena usitnjenosti biljnog materijala majkine dušice (*Thymus serpyllum*) (0,3, 0,7 i 1,5 mm) na sadržaj ukupnih fenola pri čemu su kao ekstrakcione metode primenjene maceracija, ekstrakcija na povišenoj temperaturi i ultrazvučna ekstrakcija. Sadržaj fenola je bio najviši prilikom upotrebe biljnog materijala sa najmanjim stepenom usitnjenosti u sve tri ispitivane ekstrakcione tehnike. Ekstrakcijom vodom pod povišenim pritiskom sa česticama manjeg stepena usitnjenosti kore nara rezultirala je povećanjem sadržaja ukupnih fenola za 2 puta i povećanjem antioksidativne aktivnosti za 1,5 puta (Çam i Hıslı, 2010). Milošević i sar. (2011) su ispitivali uticaj stepena usitnjenosti ginka na prinos ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom. Od tri ispitivane veličine, 0,190, 0,467 i 1,009 mm, najveći prinos je dobijen sa česticama najmanjeg stepena usitnjenosti. Srednji prečnik čestica usitnjene herbe industrijske konoplje koja je primenjena u ovoj doktorskoj disertaciji je iznosio 0,4364 mm. Biljni materijal ove usitnjenosti primenjen je u svim eksperimentima.

Sadržaj etarskog ulja u biljkama može značajno da varira. Aromatične biljke sadrže od 0,5 do 20% etarskog ulja. *Ph. Eur.* 8.0. (2013) propisuje minimalni sadržaj etarskog ulja za aromatične biljke pa je tako minimalni sadržaj ploda anisa (*Anisi fructus*) 2,0% (v/m), ploda kima (*Carvi fructus*) 3,0 % (v/m), cveta kamilice (*Chamomillae romanae flos*) 0,7% (v/m), kore cimeta (*Cinnamomi cortex*) 1,2% (v/m), cveta karanfilića (*Caryophylli flos*) 15,0% (v/m), cveta lavande (*Lavandulae flos*) 1,3% (v/m), nadzemnog dela origana (*Origani herba*) 2,5% (v/m), lista nane (*Menthae piperitae folium*) od 0,9 do 1,2% (v/m), lista žalfije (*Salviae*

officinalis folium) od 1,0 do 1,5% (v/m), nadzemnog dela timijana (*Thymi herba*) 1,2% (v/m). Sadržaj etarskog ulja herbe industrijske konoplje, određen metodom hidrodestilacije, je iznosio 0,08% (v/m) što je svrstava u grupu biljaka koje su siromašne etarskim uljima, odnosno biljaka čija eksploatacija radi dobijanja etarskog ulja nije opravdana.

Hemijski sastav izolovanog etarskog ulja herbe industrijske konoplje sorte Helena je dat u Tabeli 3. U etarskom ulju herbe industrijske konoplje je identifikovano ukupno 44 jedinjenja od kojih su najdominantnija jedinjenja seskviterpeni sa relativnim masenim udelom od 92,70%, a od kojih su 65,57% neoksigovani seskviterpeni i 21,73% oksigenovani seskviterpeni. Prisutni su i kanabinoidi sa relativnim masenim udelom 7,6%. Relativni maseni udeo monoterpena je 3,69%, od čega su 3,29% neoksigovani monoterpeni i 0,40% oksigenovani. Najzastupljeniji terpeni su *trans*-kariofilen (38,30%), α -humulen (12,04%) i kariofilen-oksidi (6,73%). Prisutni kanabinoidi su CBD (7,28%) i CBC (0,32%).

Naz i sar. (2017) su ispitivali izolovanje etarskih ulja iz herbe industrijske i indijske konoplje različitim metodama ekstrakcije, hidrodestilacijom i destilacijom pomoću vodene pare na tri različite temperature (110, 120 i 130°C) i ekstrakcijom ugljendioksidom u superkritičnom stanju na različitoj temperaturi (40, 45 i 50°C) i pritisku (80, 85 i 90 bar). Sadržaj etarskog ulja u industrijskoj konoplji je bio veći nego u indijskoj konoplji i kretao se u opsegu od 0,024 do 0,035% (m/m), od 0,017 do 0,032% (m/m) i od 0,031 do 0,039% (m/m) primenom hidrodestilacije, destilacije pomoću vodene pare i ekstrakcije ugljendioksidom u superkritičnom stanju. Sadržaj etarskog ulja u indijskoj konoplji se kretao u opsegu od 0,021 do 0,029% (m/m), od 0,015 do 0,020% (m/m) i od 0,022 do 0,031% (m/m) primenom hidrodestilacije, destilacije pomoću vodene pare i ekstrakcije ugljendioksidom u superkritičnom stanju. Najveći sadržaj etarskog ulja je dobijen primenom hidrodestilacije na temperaturi od 110°C i iznosio je 0,035% (m/m). Hemijski sastav industrijske konoplje se nije mnogo razlikovao u zavisnosti od primenjene metode ekstrakcije. Najdominantnija jedinjenja etarskog ulja, nezavisno od vrste konoplje i primenjene metode, su seskviterpeni što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. U istoj studiji, poređenjem sastava etarskog ulja industrijske i indijske konoplje, utvrđeno je da industrijska konoplja ima veći sadržaj seskviterpena, dok indijska konoplja ima veći sadržaj monoterpena. Sadržaj kanabinoida nije analiziran u ovom radu.

Mediavilla i Steinemann (1997) su takođe ispitivali sastav etarskog ulja konoplje i to 19 različitih hemotipova konoplje od kojih su 15 bili hemotipovi za proizvodnju vlakana, dok su 4 bili hemotipovi koji su se koristila u rekreativne svrhe. Prinos etarskog ulja je bio oko 0,13% (v/m), nešto više nego što je dobijeno u ovoj doktorskoj disertaciji. Od 16 identifikovanih terpena, u svim ispitivanim hemotipovima dominantna jedinjenja su bila monoterpeni sa procentnim udelom od 47,90 do 92,10%, dok je procentni udeo seskviterpena bio od 5,20 do 48,60%. Najzastupljenija jedinjenja su mircen sa procentnim udelom od 29,40 do 62,00, a zatim slede *trans*-kariofilen sa udelom od 3,80 do 37,50, α -pinen sa udelom od 2,30 do 21,00, *trans*-ocimen sa udelom od 0,30 do 10,20 i α -terpinolen sa udelom od 0,40 do 23,80. Različit hemijski sastav etarskog ulja dobijen iz različitih hemotipova konoplje ukazuje da sastav etarskog ulja zavisi od uticaja spoljašnje sredine.

Sadržaj THC-a i CBD-a je bio mali i iznosio je 0,02 i 0,08% za THC i 0,25 i 0,04% za CBD za hemotip Fedora 19 poreklom iz Francuske koji se koristi za proizvodnju vlakana i hemotip Swismix poreklom iz Švajcarske koji se koristi u rekreativne svrhe. Sadržaj *trans*-kariofilena u etarskom ulju dobijenom u ovoj doktorskoj disertaciji je u korelaciji sa sadržajem u etarskom ulju ispitivanim od strane Mediavilla i Steinemann (1997) za hemotip Fedora 19, dok je sadržaj CBD-a skoro 30 puta veći.

Zengin i sar. (2018) su ispitivali sadržaj i hemijski sastav etarskog ulja industrijske konoplje brane u vremenskom razdoblju od mesec dana, od početka septembra do početka oktobra. Sadržaj etarskog ulja se kretao od 0,19 do 0,31% i najveći je bio u sirovini branom početkom septembra, dok je najmanji sadržaj bio u sirovini branom početkom oktobra. Najzastupljenija jedinjenja su bili seskviterpeni, *trans*-kariofilen (28%), kariofilen-oksid (15%), α -humulen (13%), α - i β -selinen (7%) i *trans*- α -bergamoten (4%). Od monoterpena najzastupljeniji su bili α - i β -pinen (11%), mircen (11%), α -terpinolen (6%) i D-limonen (2%). Veći sadržaj etarskog ulja u studiji koju su sprovedi Zengin i sar. (2018) u odnosu na sadržaj etarskog ulja dobijen u ovoj doktorskoj disertaciji je najverovatnije posledica varijacije sorte i različitih klimatskih uslova koji su uticali na razvoj biljke. Hemijski sastav etarskog ulja koji su dobili Zengin i sar. (2018) je uporediv sa hemijskim sastavom dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji.

Tabela 3. Hemijski sastav etarskog ulja herbe industrijske konoplje (*C. sativa* L.)

	Naziv jedinjenja	RI ^a	Relativni sadržaj [%]
1.	α -pinen	926,1	1,22
2.	sabinen	966,7	0,44
3.	β -pinen	975,1	0,70
4.	α -felandren	996,8	0,08
5.	limonen	1013,6	0,40
6.	1,4-cineol	1016,6	0,17
7.	<i>cis</i> - β -ocimen	1028,2	0,15
8.	terpinolen	1068,3	0,31
9.	linalol	1075,8	0,08
10.	endo-fenhol	1093,2	0,08
11.	α -terpineol	1162,8	0,07
12.	α -ylangen	1329,8	0,08
13.	ciklosativen	1363,8	0,58
14.	<i>cis</i> - α -bergamoten	1367,0	0,36
15.	α -santalen	1372,8	0,33
16.	<i>trans</i> -kariofilen	1379,1	38,30
17.	<i>trans</i> - α -bergamoten	1383,8	2,46
18.	geranil acetone	1391,5	0,16
19.	<i>trans</i> - β -farnesen	1396,0	3,23
20.	α -humulen	1407,9	12,04
21.	alo-aromadendren	1413,5	1,04
22.	<i>trans</i> - β -jonon	1427,4	0,48
23.	α -gvajen	1432,2	0,66
24.	β -selinen	1436,6	2,08
25.	α -selinen	1443,6	1,45
26.	β -bisabolen	1446,7	0,62

27.	β -seskvifelandren	1461,3	0,73
28.	γ -himakalen	1478,4	1,60
29.	<i>trans</i> -nerolidol	1492,0	1,45
30.	kariofilen oksid	1525,0	6,73
31.	humulene epoksid II	1547,6	2,60
32.	selin-6-en-4-ol	1554,3	1,50
33.	kariofil-4(12),8(13)-dien-5- α -ol	1570,3	2,20
34.	kariofil-4(12),8(13)-dien-5- β -ol	1586,6	2,13
35.	<i>trans</i> -14-hidroksi-9-epi-kariofilen	1598,0	2,52
36.	epi- α -bisabolol	1602,8	1,18
37.	eudesm-7(11)-en-4-ol	1623,3	0,69
38.	notkaton	1719,9	0,09
39.	heksahidrofarnesil aceton	1733,8	0,38
40.	5- <i>trans</i> -9- <i>trans</i> -farnesil aceton	1799,9	0,14
41.	fitol	1967,6	0,75
42.	<i>p</i> -heptilacetofenon	2070,4	0,14
43.	kanabihromen	2126,1	0,32
44.	kanabidiol	2247,0	7,28
Neoksigenovani monoterpeni			3,29
Oksigenovani monoterpeni			0,40
Neoksigenovani seskviterpeni			65,57
Oksigenovani seskviterpeni			21,73
Diterpeni			1,27
Kanabinoidi			7,60
Druga jedinjenja			0,14

^aRI-retencion indeks određen na HP-5 koloni koristeći homologni niz alkana od C₈ do C₃₀

4.2. Klasične metode ekstrakcije primenjene za ekstrakciju herbe industrijske konoplje

4.2.1. Maceracija herbe industrijske konoplje

Za ekstrakciju industrijske konoplje klasičnim metodama ekstrakcije do sada su se najčešće upotrebljavali različiti organski rastvarači kao što su metanol, etanol, butan, hloroform i heksan. Romano i Hazekamp (2013) su ispitivali uticaj različitih rastvarača, nafte, petroletra, etanola, maslinovog ulja i smeše maslinovog ulja i vode (20 mL+70 mL), na ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz industrijske konoplje zaštićenog naziva Bedrocan® sa 19% (m/m) THC-a. Prema istraživanju koje su sprovedli Romano i Hazekamp (2013) od testiranih rastvarača najoptimalniji izbor je etanol ili maslinovo ulje, jer nisu štetni, a pogodni su za ekstrakciju i kanabinoida i terpena. Prema ovoj studiji nedostatak etanola kao rastvarača je što nije selektivan i ekstrahuje veliki broj drugih, neželjenih jedinjenja, kao što je hlorofil koji daje loše organoleptičke osobine ekstrakta. Nedostatak maslinovog ulja kao rastvarača je što se maslinovo ulje ne može evaporizovati i na taj način koncentrovati ekstrakt, pa je za postizanje terapijskog efekta neophodno uneti veću količinu ekstrakta.

Industrijska konoplja (*C. sativa*), sa 8% CBD-a i 6,3% THC-a i zaštićenim nazivom Bediol®, je ekstrahovana sa etanolom i maslinovim uljem na povišenoj temperaturi uz refluks i bez refluksa. U dobijenim ekstraktima je ispitan sadržaj kanabinoida i terpena. Na

sadržaj kanabinoida uticaj su imali i rastvarač i način ekstrakcije, dok se sadržaj terpena nije menjao u zavisnosti od upotrebljenog ekstragensa i načina ekstrakcije. Sadržaj CBD-a i THC-a, prilikom ekstrakcije uz refluks, je bio u opsegu od 1,88 do 2,69 mg/mL i 1,53 do 2,12 mg/mL za ekstrakte ekstrahovane sa maslinovim uljem kao ekstragensom, dok je sadržaj CBD-a i THC-a u ekstraktima dobijenim sa etanolom kao ekstragensom bio od 3,11 do 4,36 mg/mL i od 2,49 do 2,65 mg/mL. Ekstrakti dobijeni ekstrakcijom bez refluksa su imali sadržaj CBD-a od 1,11 do 1,46 mg/mL i sadržaj THC-a od 0,72 do 1,01 mg/mL kada je kao ekstragens primenjeno maslinovo ulje, dok je sadržaj CBD-a i THC-a primenom etanola kao ekstragensa bio između 0,62 i 0,93 mg/mL i između 1,29 i 1,46 mg/mL. Poređenjem dve metode ekstrakcije, sa i bez refluksa, može se zaključiti da je sadržaj kanabinoida veći prilikom ekstrakcije uz refluks, dok je najpogodniji ekstragens bio etanol (Citti i sar., 2016).

Mkpenie i sar. (2014) su ispitivali uticaj različitih rastvarača (metanola, acetona i njihovih 50% vodenih rastvora) i vremena ekstrakcije (2, 8, 18 h), na sadržaj ukupnih fenola i reduktivnu sposobnost ekstrakata dobijenih klasičnom ekstrakcijom lista industrijske konoplje. Sadržaj ukupnih fenola se kretao od 0,0900 do 0,5560 mg EGK/g lista industrijske konoplje. Povećanjem vremena ekstrakcije rastao je i sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima. Ekstrakti dobijeni čistim rastvaračem su imali veći sadržaj ukupnih fenola u poređenju sa njihovim 50% vodenim rastvorima što ukazuje da su fenoli listova industrijske konoplje umereno polarna jedinjenja. Uticaj vremena ekstrakcije i rastvarača na reduktivnu sposobnost ekstrakata lista industrijske konoplje je bio u korelaciji sa fenolnim jedinjenjima. Reduktivna sposobnost ekstrakata dobijenih sa čistim rastvaračima je bila veća, sa opsegom od 0,2020 do 0,8660 mL/mL. Takođe, zapaženo je da raste sa porastom temperature. Najveći sadržaj ukupnih fenola i najveća reduktivna sposobnost je bila u ekstraktu dobijenim sa metanolom.

U studiji koju su sprovedeli Brighenti i sar. (2017) dokazano je da ne postoji značajna razlika u sadržaju kanabinoida u ekstraktima kada su kao ekstragensi upotrebljeni metanol, etanol, aceton, smeša metanola i etanola u odnosu 9:1 i heksan. Polarniji rastvarači su pogodniji za ekstrakciju kanabinoida, naročito kanabinoida u kiselom obliku. Najpogodniji rastvarač za ekstrakciju kanabinoida je bio etanol, dok je najmanje pogodan bio heksan.

Jedna od ekstrakcionih metoda koji pripada metodama klasične ekstrakcije biljnog materijala-maceracija, primenjena je i u slučaju ekstrakcije herbe industrijske konoplje upotrebljene u ovoj doktorskoj disertaciji. Ispitivanje klasične ekstrakcije tipa maceracije je veoma bitno iz više razloga. Prvo, maceracija je ekstrakcija koja je veoma zastupljena u farmaceutskoj industriji zbog jednostavnosti izvođenja, kako za dobijanje gotovih farmaceutskih preparata tipa tečnih ekstrakata, tako i za dobijanje poluproizvoda u toku proizvodnje gotovih farmaceutskih preparata različitih oblika. Maceracija najčešće predstavlja prvi korak u eksperimentalnim istraživanjima ekstrakcije biljnih sirovina, i najčešće se primenjuje kako za poređenje sa novim metodama ekstrakcije, tako i za određivanje optimalnog ekstragensa koji se može primeniti dalje za optimizaciju drugih parametara u nekonvencionalnim i efikasnijim ekstrakcijama.

Ispitivanje primene etanola različitih koncentracija i vode kao ekstragensa je veoma značajno u farmaceutskoj industriji jer etanol i voda predstavljaju ekstragense koji nisu toksični po zdravlje ljudi i, za razliku od drugih ekstragenasa kao što su aceton, metanol, heksan i drugi, ekstrakti dobijeni etanolom i vodom se mogu koristiti bez uklanjanja rastvarača i dodatnih prečišćavanja dobijenog ekstrakta. Pored ovoga, kako je već navedeno, u mnogim studijama etanol se pokazao kao najpogodniji rastvarač za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz konoplje.

Ekstrakcija herbe industrijske konoplje sorte Helena primenom maceracije kao metode klasične ekstrakcije u ovoj doktorskoj studiji je urađena prema opisanoj metodi u delu Materijal i Metode za dve sirovine industrijske konoplje, na početku cvetanja useva i u fazi punog cvetanja useva. U cilju analize uticaja procesnih parametara na maceraciju industrijske konoplje, na početku cvetanja useva i u fazi punog cvetanja useva, primenjeno je nekoliko različitih ekstragenasa i dva različita odnosa droga/rastvarač. Radi karakterizacije efikasnosti ovog procesa ekstrakcije analizirani su prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj flavonoida u dobijenim ekstraktima, kao i antioksidativna i reduktivna sposobnost ekstrakata. Ovi rezultati su dati u Tabelama 4 i 5.

Prinos ekstrakcije herbe industrijske konoplje, pri odnosu droga/rastvarač 1:10, kretao se u opsegu od 7,54 do 15,28%, dok je pri odnosu droga/rastvarač 1:20 bio nešto viši i iznosio je od 8,15 do 16,88%. Odnos droga/rastvarač nije statistički značajno uticao na prinos ekstrakcije jer ne postoji statistički značajna razlika između prinosa ekstrakcije sa različitim odnosom droga/rastvarač, a pri istom upotrebljenom ekstragensu. Povećanjem polarnosti ekstragensa prinos ekstrakcije je rastao i najveći je bio kada je kao ekstragens u procesu maceracije primenjena čista destilovana voda, a najniži kada je kao ekstragens primenjen 90% etanol. Povećanje polarnosti imalo je statistički značajan uticaj na prinos ekstrakcije smanjenjem koncentracije etanola do 30%.

U dobijenim tečnim ekstraktima sadržaj ukupnih fenola se kretao u opsegu od 0,4996 do 1,0476 i 0,2925 do 0,4626 mg EGK/mL za odnos droga/rastvarač 1:10 i 1:20, tim redom, dok je sadržaj ukupnih flavonoida bio u opsegu od 0,1674 do 0,3584 i od 0,0916 do 0,2067 mg EK/mL. Najveći sadržaj ukupnih fenola za oba ispitivana odnosa droga/rastvarač je bio u ekstraktima herbe industrijske konoplje kada je kao ekstragens primenjen 50% etanol, ali se on statistički nije značajno razlikovao od sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim sa 70 i 30% etanolom kao ekstragensom. Najveći sadržaj flavonoida nezavisno od ispitivanog odnosa droga/rastvarač je dobijen, takođe, primenom 50% etanola kao ekstragensa i sadržaj flavonoida u ovom ekstraktu se statistički značajno razlikovao od sadržaja flavonoida u ekstraktima dobijenim primenom drugih rastvarača. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je najpogodniji rastvarač za ekstrakciju fenola i flavonoida iz industrijske konoplje 50% etanol. Isti ekstragens se pokazao kao najadekvatniji ekstragens fenolnih jedinjenja i flavonoida iz velikog broja drugih biljnih sirovina (Turkmen i sar., 2005; Galvan d' Alessandro i sar., 2012; Čujić i sar., 2016; Gavarić i sar., 2018). Odnos droga/rastvarač statistički značajno utiče na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima i viši je ostvaren primenom odnosa droga/rastvarač 1:10, te se može zaključiti

da se u pripremi ekstrakta iz ove biljne sirovine primenom procesa ekstrakcije maceracijom odnos droga/rastvarač 1:10 može smatrati pogodnijim za ekstrakciju flavonoida i fenolnih jedinjenja.

Za dobijene ekstrakte IC_{50} vrednost se kretala od 0,0025 do 0,0179 mL/mL za ekstrakte koji su dobijeni primenom odnosa droga/rastvarač 1:10 i od 0,0021 do 0,0076 mL/mL za ekstrakte koji su dobijeni pri odnosa droga/rastvarač 1:20. Najniža IC_{50} vrednost, odnosno najviša antioksidativna vrednost, kod oba ispitivana odnosa droga/rastvarač određena je u ekstraktu dobijenom primenom 50% etanolom kao ekstragensa, međutim ne postoji statistički značajna razlika između antioksidativne aktivnosti određene u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom sa 70 i 30% etanolom. Odnos droga/rastvarač nije imao statistički značajan uticaj na antioksidativno delovanje kada je kao rastvarač primenjen etanol. Međutim, prilikom ekstrakcije vodom, antioksidativna aktivnost ekstrakta ukoliko je primenjen odnos droga/rastvarač 1:20 se statistički značajno razlikuje i veća je 2,5 puta u odnosu na aktivnost ekstrakta koji je dobijen primenom odnosa droga/rastvarač 1:10. Većina studija je pokazala da je sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu u direktnoj korelaciji sa njegovom antioksidativnom aktivnosti (Katalinic et al., 2006; Djeridane et al., 2006; Paixao et al., 2007; Liu et al., 2009; Šeruga et al., 2011). Kako ekstrakti herbe industrijske konoplje dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji sa najvećim sadržajem fenolnih jedinjenja nemaju i najveću antioksidativnu aktivnost moguće je da fenoli nisu jedine komponente konoplje koje doprinose ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti ovog herbalnog preparata. Za pojedine kanabinoide, kao što su THC i CBD, dokazano je da imaju antioksidativnu aktivnost (Hampson i sar., 1998; Oláh i sar., 2014), pa je moguće da oni doprinose ovakvom delovanju ispitivanih ekstrakata. Reduktivna sposobnost izražena preko EC_{50} vrednosti se kretala u opsegu od 0,0072 do 0,0158 mL/mL za odnos droga/rastvarač 1:10 i bila je najviša u ekstraktu dobijenom sa 70% etanolom kao ekstragensom. Primenom odnosa droga/rastvarač 1:20, dobijena je EC_{50} vrednost ekstrakta u opsegu 0,0073 do 0,0120 mL/mL, a najveća reduktivna sposobnost izmerena je u ekstraktu koji je dobijenom primenom 50% etanola kao ekstragensa. Ne postoji statistički značajna razlika između reduktivne sposobnosti ekstrakta dobijenog odnosom droga/rastvarač 1:10 i 70% etanolom kao ekstragensa i reduktivne sposobnosti ekstrakta dobijenog odnosom droga/rastvarač 1:20 i 50% etanolom kao ekstragensa.

Iz tabele 4 se vidi, uzimajući u obzir sve ispitivane karakteristike dobijenih ekstrakata herbe industrijske konoplje, da se 50% etanol može smatrati najpogodnijim ekstragensom za primenu u ovom tipu ekstrakcije. U ovom ekstraktu je određen i sadržaj CBD-a koji je iznosio 0,4314 mg/mL i sadržaj THC-a koji iznosio 0,0364 mg/mL.

Table 4. Vrednosti ispitivanih karakteristika ekstrakata herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva dobijenih maceracijom primenom vode i etanola različite koncentracije kao ekstragensa

Rastvarač	Y [%]	TP [mg EGK/mL]	TF [mg EK/mL]	IC ₅₀ [mL/mL]	EC ₅₀ [mL/mL]
Odnos droga/rastvarač 1:10					
90% Etanol	7,54±0,38 e	0,5535±0,0277 b	0,3169±0,0158 b	0,0069±0,0003 b	0,0092±0,0005 cd
70% Etanol	11,66±0,58 c	1,0386±0,0510 a	0,3323±0,0166 ab	0,0032±0,0002 c	0,0072±0,0004 f
50% Etanol	14,24±0,71 b	1,0476±0,0520 a	0,3584±0,0179 a	0,0025±0,0001 cd	0,0090±0,0005 cd
30% Etanol	15,22±0,76 ab	1,0206±0,0510 a	0,2174±0,0109 d	0,0031±0,0002 cd	0,0110±0,0006 b
Destilovana voda	15,28±0,76 ab	0,4996±0,0250 b	0,1674±0,0084 e	0,0179±0,0009 a	0,0158±0,0008 a
Odnos droga/rastvarač 1:20					
90% Etanol	8,16±0,41 de	0,2925±0,0146 e	0,2607±0,0130 c	0,0076±0,0004 b	0,0086±0,0004 def
70% Etanol	9,96±0,50 cd	0,3918±0,0196 cd	0,1348±0,0067 e	0,0026±0,0001 cd	0,0105±0,0005 bc
50% Etanol	14,52±0,70 b	0,4626±0,0231 bc	0,2607±0,0130 c	0,0021±0,0001 d	0,0073±0,0004 ef
30% Etanol	15,60±0,70 ab	0,3840±0,0192 cde	0,1688±0,0084 e	0,0023±0,0001 cd	0,0088±0,0004 de
Destilovana voda	16,88±0,80 a	0,3104±0,0155 de	0,0916±0,0046 f	0,0073±0,0004 b	0,0120±0,0006 b

a, b, c, d, e, f, d – predstavljaju statistički značajnu razliku među ispitanim kvalitativnim parametrima ekstrakata, zasnovanu na *Tukey*-ovom testu $p < 0.05$

Prinos u slučaju ekstrakcije herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva, pri odnosu droga/rastvarač 1:10, kretao se u opsegu od 8,18 do 17,94%, dok je pri odnosu droga/rastvarač 1:20 bio nešto viši i iznosio je od 8,28 do 19,56%. Odnos droga/rastvarač nije imao statistički značajan uticaj na prinos ekstrakcije industrijske konoplje na početku cvetanja useva, dok se uticaj ekstragensa pokazao kao statistički značajan. Porast prinosa ekstrakcije herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva je zabeležen porastom polarnosti rastvarača. Kod odnosa droga/rastvarač 1:10 najviši prinos ekstrakcije ostvaren je upotrebom vode kao ekstragensa, mada se nije statistički značajno razlikovao od prinosa kada su kao ekstragensi upotrebljeni 30 i 50% etanol. Najviši prinos ekstrakcije kod odnosa droga/rastvarač 1:20 je, takođe, ostvaren upotrebom vode kao ekstragensa, ali se nije statistički značajno razlikovao od prinosa kada je kao ekstragens upotrebljen 30% etanol. Najniži prinos ekstrakcije u oba ispitivana slučaja odnosa droga/rastvarač je ostvaren prilikom ekstrakcije sa 90% etanolom kao ekstragensom.

U dobijenim tečnim ekstraktima herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva za odnos droga/rastvarač 1:10 ukupni fenoli su se kretali u opsegu od 0,5759 do 1,7045 mg EGK/mL, dok je sadržaj flavonoida bio u opsegu od 0,2370 do 0,4217 mg EK/mL. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida u ekstraktima dobijenim iz herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva pri odnosu droga/rastvarač 1:20 je bio u opsegu od 0,3216 do 0,8525

mg EGK/mL i od 0,1178 do 0,5602 mg EK/mL. U ovom slučaju odnos droga/rastvarač ima statistički značajan uticaj na sadržaj ukupnih fenola i flavonoida kod svih ispitivanih slučajeva, sem kod uticaja na sadržaj flavonoida kada je kao ekstragens primenjen 90% etanol. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida je viši u slučaju ekstrakcije sa odnosom droga/rastvarač 1:10. Ekstragens koji je najpogodniji za dobijanje ekstrakta iz sirovine industrijske konoplje na početku cvetanja useva sa najvećim sadržajem ukupnih fenola, pri odnosu droga/rastvarač 1:10, je 70% etanol, dok je, pri odnosu droga/rastvarač 1:20 to 50% etanol. Najpogodniji rastvarač za ekstrakciju flavonoida, za oba ispitivana odnosa droga/rastvarač, jeste 50% etanol. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je, kao i kod herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva, najpogodniji rastvarač za ekstrakciju ukupnih fenola i flavonoida 50% etanol.

U ekstraktima dobijenim iz herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva izmerena IC_{50} vrednost se kretala od 0,0016 do 0,0067 mL/mL za ispitivan odnos droga/rastvarač 1:10 i od 0,0013 do 0,0044 mL/mL za ispitivan odnos droga/rastvarač 1:20. Uticaj odnosa droga/rastvarač je statistički značajan prilikom primene 70 i 90% etanola i vode kao ekstragensa, dok prilikom primene 30 i 50% etanola nema statistički značajan uticaj. Najveću antioksidativnu vrednost imaju ekstrakti dobijeni ekstrakcijom primenom odnosa droga/rastvarač 1:10 i 30 i 50% etanola kao ekstragensa, kao i ekstrakti dobijeni primenom odnosa droga/rastvarač 1:20 i 30, 50 i 70% etanola kao ekstragensa. Razlika u antioksidativnoj aktivnosti ovih ekstrakata nema statističku značajnost. Za ispitivane ekstrakte dobijene iz herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva efektivna koncentracija prilikom ispitivanja reduktivne sposobnosti se kretala u intevalu od 0,0058 do 0,0097 mL/mL za odnos droga/rastvarač 1:10 i od 0,0044 do 0,0088 mL/mL za odnos droga/rastvarač 1:20. Odnos droga/rastvarač nema statistički značajan uticaj na reduktivnu sposobnost ekstrakata herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva, sem kada se kao ekstragens koristi 30% etanol. Reduktivna sposobnost je najviša i statistički se ne razlikuje u ekstraktima dobijenim primenom 30, 50 i 70% etanola kao ekstragensa, dok se reduktivna sposobnost ekstrakata dobijenih ekstrakcijom vodom i 90% etanola statistički značajno razlikuju od pomenutih ekstrakata.

Table 5. Vrednosti ispitivanih karakteristika ekstrakata herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva dobijenih maceracijom primenom vode i etanola različite koncentracije kao ekstragensa

Rastvarač	Y [%]	TP [mg EGK/mL]	TF [mg EK/mL]	IC ₅₀ [mL/mL]	EC ₅₀ [mL/mL]
Odnos droga/rastvarač 1:10					
90% Etanol	8,18±0.41 e	0,5962 ± 0.0298 e	0,2370 ± 0.0119 ef	0,0061 ± 0.0003 b	0,0097 ± 0.0005 a
70% Etanol	12,84±0.64 d	1,7045 ± 0.0853 a	0,4451 ± 0.0223 bc	0,0023 ± 0.0001 e	0,0060 ± 0.0003 c
50% Etanol	16,96±0.85 bc	1,2565 ± 0.0629 b	0,4817 ± 0.0241 b	0,0018 ± 0.0001 ef	0,0058 ± 0.0003 c
30% Etanol	17,34±0.87 bc	1,0981 ± 0.0549 c	0,3022 ± 0.0151 d	0,0016 ± 0.0001 f	0,0058 ± 0.0003 c
Destilovana voda	17,94 0.90 ab	0,5759 ± 0.0288 e	0,3950 ± 0.0198 c	0,0067 ± 0.0003 a	0,0078 ± 0.0004 b
Odnos droga/rastvarač 1:20					
90% Etanol	8,28±0.41 e	0,3216 ± 0.0161 g	0,1948 ± 0.0097 f	0,0044 ± 0.0003 c	0,0088 ± 0.0005 a
70% Etanol	12,36±0.62 d	0,5418 ± 0.0271 ef	0,2478 ± 0.0124 e	0,0017 ± 0.0001 f	0,0058 ± 0.0003 c
50% Etanol	15,68±0.78 c	0,8525 ± 0.0426 d	0,5602 ± 0.0281 a	0,0013 ± 0.0001 f	0,0053 ± 0.0003 cd
30% Etanol	18,36±0.92 ab	0,5316 ± 0.0266 ef	0,2505 ± 0.0125 e	0,0013 ± 0.0001 f	0,0044 ± 0.0003 d
Destilovana voda	19,56±0.98 a	0,4222 ± 0.0212 fg	0,1178 ± 0.0059 g	0,0036 ± 0.0002 d	0,0070 ± 0.0004 b

a, b, c, d, e, f, d – predstavljaju statistički značajnu razliku među ispitanim kvalitativnim parametrima ekstrakata, zasnovanu na Tukey-ovom testu $p < 0.05$

Kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih kiselina ekstrakata dobijenih, primenom odnosa droga/rastvarač 1:10, iz herbe industrijske konoplje na početku cvetanja i u fazi punog cvetanja useva su prikazani u tabeli 6. Najzastupljenije jedinjenje u ekstraktima dobijenim iz herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva bila je sinapinska kiselina koja je bila prisutna u koncentraciji od 1,13 do 30,02 $\mu\text{g/mL}$. Najveći sadržaj sinapinske kiseline je određen u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom sa 50% etanolom. Pored sinapinske kiseline, u ekstraktima dobijenim iz herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva, od fenolnih jedinjenja prisutni su i protokatehinska kiselina (0,36-1,97 $\mu\text{g/mL}$), vanilinska kiselina (0,63-15,55 $\mu\text{g/mL}$), siringinska kiselina (0,42-1,72 $\mu\text{g/mL}$), ferulna kiselina (1,33-3,61 $\mu\text{g/mL}$), izovitekisin (0,92-3,28 $\mu\text{g/mL}$), rutin (0,19-6,77 $\mu\text{g/mL}$), cimetna kiselina (0,81-1,71 $\mu\text{g/mL}$), narginin (1,21-33,14 $\mu\text{g/mL}$) i apigenin (0,31-8,81 $\mu\text{g/mL}$). Najveći sadržaj rutina je dobijen ekstrakcijom sa 90% etanolom, dok je najveći sadržaj narginina dobijen ekstrakcijom sa 30% etanolom. Epikatehin je detektovan samo u ekstraktu dobijenom kada je kao ekstragens primenjen 70% etanol, dok narginin nije detektovan u ovom ekstraktu. Siringinska kiselina je detektovana samo u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom sa 70% etanolom i vodom.

Nargini i apigenin su detektovani u svim ispitivanim ekstraktima dobijenim ekstrakcijom herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva, pri čemu je sadržaj ovih fenola iznosio od 1,33 do 1,70 i 0,31 do 1,10 $\mu\text{g/mL}$, tim redom. Ferulna kiselina nije detektovana u ekstraktima dobijenim iz herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva. Siringinska kiselina i epikatehinska kiselina su detektovane samo u ekstraktima dobijenim primenom 70% etanola kao ekstragensa i njihov sadržaj je iznosio 4,77 i 3,59 $\mu\text{g/mL}$. Cimetna kiselina je bila dominantna fenolna komponenta u ekstraktima koji su dobijeni ekstrakcijom sa 70 i 90% etanolom (8,84 i 7,32 $\mu\text{g/mL}$, tim redom), dok njeno prisustvo u

ekstraktu dobijenom ekstrakcijom sa 30% etanolom nije zabeleženo. Druge fenolne kiseline prisutne u ekstraktima dobijenim iz herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva su protokatehinska kiselina (1,24-2,50 $\mu\text{g/mL}$) prisutna u ekstraktima dobijenim 70 i 90% etanolom, vanilinska kiselina (0,58-1,53 $\mu\text{g/mL}$) koja nije detektovana samo u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom sa vodom, sinapinska kiselina (1,03-4,02 $\mu\text{g/mL}$) koja nije detektovana samo u ekstraktu dobijenom sa 30% etanolom, izoviteksin (0,64-6,21 $\mu\text{g/mL}$) koji je prisutan u ekstraktima dobijenim sa 50 i 90% etanolom i vodom i rutin (2,28-2,74 $\mu\text{g/mL}$) koji je detektovan u ekstraktima dobijenim sa 50, 70 i 90% etanolom.

Table 6. Sadržaj identifikovanih fenola ($\mu\text{g/mL}$) u ekstraktima herbe industrijske konoplje na početku cvetanja i u fazi punog cvetanja useva dobijenih maceracijom odnosom droga/rastvarač 1:10

Rastvarač	Protokatehinska kiselina	Vanilinska kiselina	Siringinska kiselina	Epikatehinska kiselina	Ferulinska kiselina	Sinapinska kiselina	Izoviteksin	Rutin	Čimetna kiselina	Naringenin	Apigenin
Herba industrijske konoplje na početku cvetanja useva											
90% Etanol	1,09	0,45	nd	nd	2,57	1,13	1,14	4,13	0,81	1,21	0,31
70% Etanol	1,97	1,55	1,72	7,38	1,33	16,36	3,28	6,77	1,37	nd	7,73
50% Etanol	1,50	1,44	nd	nd	3,61	30,02	1,84	0,19	1,44	nd	8,81
30% Etanol	1,66	0,63	nd	nd	2,49	3,21	0,92	0,19	1,38	33,16	4,16
Destilovana voda	0,36	nd	0,42	nd	1,36	2,81	nd	nd	1,71	2,14	2,01
Herba industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva											
90% Etanol	2,50	1,07	nd	nd	4,02	0,64	2,28	7,32	1,60	0,31	0,31
70% Etanol	1,24	1,53	3,59	nd	1,19	nd	2,63	8,84	1,51	0,96	1,47
50% Etanol	nd	1,26	nd	nd	1,03	6,21	2,74	3,28	1,33	1,10	5,36
30% Etanol	nd	0,58	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,70	0,98	2,59
Destilovana voda	nd	nd	nd	nd	1,46	0,98	nd	nd	1,46	0,96	1,16

nd - nije detektovano

I sadržaj fenola i sadržaj flavonoida bio je veći uglavnom u ekstraktima koji su dobijeni iz herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva. Veći sadržaj fenola u herbi industrijske konoplje na početku cvetanja useva može biti posledica biosintetskog puta kanabinoida. Naime, prema Mahlberg i Kimu (2004) kanabinoidi nastaju kondenzacijom terpena i fenolnog prekursora. Takođe, ekstrakti dobijeni ekstrakcijom herbe industrijske konoplje na početku cvetanja useva pokazuju veću antioksidativnu aktivnosti i reduktivnu sposobnost što je u korelaciji sa većim sadržajem fenola. Kako ekstrakti herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva sa najvećim sadržajem fenola nisu i ekstrakti sa najvećom antioksidativnom aktivnošću i reduktivnom sposobnošću moglo bi se zaključiti da antioksidativna aktivnost i reduktivna sposobnost potiču od jedinjenja koja nisu prisutna u herbi industrijske konoplje na početku cvetanja useva, kanabinoida. Na osnovu sagledavanja rezultata i ukupnih fenola i flavonoida i pojedinačnih fenolnih jedinjenja može se smatrati

da je najpogodniji rastvarač za ekstrakciju fenola i flavonoida iz obe upotrebene sirovine 50% etanol.

Žugić i sar. (2014) su u biljkama koje se koriste u narodnoj medicini u Srbiji kao što su matičnjak (*Melissa officinalis*), macina trava (*Nepeta nuda*), crni dud (*Morus nigra*), hmelj (*Humulus lupulus*), bršljen (*Hedera helix*), glog (*Crataegus sp.*), odoljen (*Valeriana officinalis*), nana (*Mentha pulegium*), šumska jagoda (*Fragaria vesca*) i kantaron (*Hypericum perforatum*), ispitivali sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativnu aktivnost. Sadržaj ukupnih fenola u ovim biljnim sirovinama se kretao u opsegu od 9,6050 do 64,0800 mg EGK/g biljne sirovine i ove biljke su na osnovu toga označene kao biljke bogate fenolima. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima analiziranim u ovoj doktorskoj disertaciji i dobijenim iz herbe industrijske konoplje primenom maceracije, preračunato na gram biljne sirovine je iznosio od 4,9964 do 17,0453 mg EGK, što, imajući u vidu rezultate dobijene u studiji Žugić i sar. (2014), može ukazivati na to da se i herba industrijske konoplje sorte Helena može svrstati u biljne sirovine bogate fenolnim jedinjenjima.

4.2.2. Soxhlet ekstrakcija herbe industrijske konoplje

Lewis-Bakker i sar. (2019) su ispitivali različite tehnike ekstrakcije smole iz cvetova 3 različita varijeteta *C. sativa*. U istraživanju su primenili i Soxhlet ekstrakciju sa etanolom kao ekstragensom. Prinos Soxhlet ekstrakcije je bio od 21 do 31% (m/m), dok se sadržaj ispitivanih kanabinoida kretao u opsegu od 2,0 do 9,2% (m/m) za THCA, od 2,5 do 72,5% (m/m) za CBDA, od 7,5 do 18,3% (m/m) za THC i od 7,8 do 15,4% (m/m) za CBD. Zaključak ove studije bio je da je u poređenju sa ostalim ispitivanim ekstrakcijama (SFE, UAE, MAE) Soxhlet ekstrakcija dobar izbor za ekstrakciju kanabinoida u njihovoj neutralnoj formi (slično MAE).

Attard i sar. (2018) su ispitivali ekstrakciju po Soxhlet-u i superkričnu ekstrakciju 8 različitih uzoraka sporednog proizvoda dobijenog prilikom prerade industrijske konoplje za proizvodnju vlakana. Autori su naveli da su ekstrakti dobijeni primenom ovih metoda bogati visoko vrednim lipofilnim jedinjenjima uključujući masne kiseline, triterpene, polikosan, aldehide, ugljovodonike, sterole i kanabinoide sa sadržajem CBD-a 5832 µg/g upotrebene sirovine.

Kao i maceracija, Soxhlet ekstrakcija je veoma bitna metoda klasične ekstrakcija jer predstavlja prvi korak u eksperimentalnim istraživanjima metoda ekstrakcije čiji je cilj ekstrakcija lipofilnih jedinjenja iz biljnih sirovina. Pored toga, Soxhlet ekstrakcija se primenjuje kao tehnika ekstrakcije u okviru zvanične metode za određivanje ukupnih masnih jedinjenja u sirovinama biljnog porekla.

U slučaju ekstrakcije herbe industrijske konoplje sorte Helena u fazi punog cvetanja useva prinos ekstrakcije po Soxhlet-u iznosio je 9,85%. Maseni udeo CBD-a i THC-a u dobijenom Soxhlet ekstraktu herbe industrijske konoplje je iznosio 64,40 i 2,90 mg/g, tim redom.

U ekstraktu herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva koji je dobijen primenom *Soxhlet* ekstrakcije je identifikovano ukupno 5 jedinjenja koja pripadaju grupi terpena, ugljovodonika, kanabinoida i masnih kiselina, a njihov relativni udeo je dat u tabeli 7. Prisutno kanabinoidno jedinjenje u ekstraktu je CBD, koje je ujedno i najdominantnije jedinjenje sa relativnim masenim udelom od 84,42%. Relativni sadržaj ugljovodonika je bio 9,17%, od čega hentriakontan sa udelom od 7,41% i nonakosan sa udelom od 1,76%. Od terpenskih jedinjenja prisutan je kariofilen oksid sa udelom od 4,08%. Iz grupe masnih kiselina prisutna je palmitinska kiselina u koncentraciji 2,32%.

Tabela 7. Hemijski sastav ekstrakta herbe industrijske konoplje dobijen *Soxhlet* ekstrakcijom

	Naziv jedinjenja	RI	Relativni sadržaj [%]
1.	Kariofilen oksid	1523,6	4,08
2.	Palmitinska kiselina	1832,2	2,32
3.	Kanabidiol	2248,5	84,42
4.	Hentriakontan	2647,7	7,41
5.	Nonakosan	2891,9	1,76

^aRI – retencion indeks određen na HP-5 koloni koristeći homologni niz alkana od C₈ do C₃₀

4.3. Savremene metode ekstrakcije primenjene za ekstrakciju herbe industrijske konoplje

4.3.1. Ultrazvučna ekstrakcija herbe industrijske konoplje

Ultrazvučna ekstrakcija kao savremena metoda ekstrakcije je do sada primenjena kod velikog broja lekovitih biljaka za intezifikaciju procesa izolovanja bioaktivnih jedinjenja. Primenom ultrazvučne ekstrakcije ekstrahovani su majkina dušica (Jovanović i sar., 2016), ruzmarin (Hosseini i sar., 2018), kora nara (Živković i sar., 2018), sremuš (Tomšik i sar., 2016), valerijana (Hromádková i sar., 2002), aronija (Galvan d’Alessandro i sar., 2012) i mnoge druge. Primena ultrazvučnih talasa u ekstrakciji bioaktivnih komponenti iz industrijske konoplje je primenjena kao predtretman biljne sirovine za ekstrakciju klasičnim metodama ekstrakcije, uglavnom prilikom ekstrakcije ulja iz semena konoplje (Da Porto i sar., 2015), ili kao metoda izbora za direktnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja. Tako su Agarwal i sar. (2018) ispitivali ultrazvučnu ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja, ukupnih fenola i flavonoida, iz ženskih cvetova industrijske konoplje. U ovom istraživanju ispitan je uticaj vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta), jačine ultrazvuka (90, 120 i 150%) i koncentracije metanola (20, 50 i 80%) na prinos ekstrakcije, ukupne fenole, flavonoide i antioksidativnu aktivnost. Proces je optimizovan upotrebom RSM-a. Ultrazvučna ekstrakcija upoređena je sa klasičnom ekstrakcijom sa 50% metanolom kao ekstragensom. U ovako dobijenim ekstraktima ženskih cvetova industrijske konoplje prinos ekstrakcije je bio u opsegu od 3,51 i 6,39 mg/mL, sadržaj ukupnih fenola je iznosio od 9,47 do 15,70 mg EGK/mL, sadržaj flavonoida od 0,84 to 2,55 mg EKV/mL, i antioksidativna aktivnost je iznosila od 0,31 do 0,98 mM AAE/mL. Utvrđeno je da su vreme ekstrakcije i koncentracija metanola procesni parametri koji utiču na ispitivane kvalitativne karakteristike dobijenih

ekstrakata, dok jačina ultrazvučnih talasa nije imala uticaj. Zaključak ove studije bio je da su ultrazvučni ekstrakti u poređenju sa ekstraktom dobijenim klasičnom ekstrakcionom metodom imali veće izlazne promenjive ispitivane u okviru optimizacije procesa, ali su takođe imali i veći sadržaj kanabinoida koji nije praćen kao izlazna promenljiva prilikom optimizacije.

U ovoj doktorskoj disertaciji ultrazvučna ekstrakcija je primenjena u opsegu procesnih parametara datih u opisu metode u okviru poglavlja Materijal i Metode. Kao procesni parametri koji utiču na ultrazvučnu ekstrakciju izabrani su gustina ultrazvuka, temperatura i vreme ekstrakcije, dok su ekstragens i odnos droga/rastvarač bili konstantni i izabrani su u skladu sa podacima dobijenim u delu istraživanja klasične ekstrakcije. Kao ekstragens je upotrebljen 50% etanol i odnos droga/rastvarač 1:10 jer su ova dva značajna parametra ekstrakcija odabrana kao optimalna u procesu klasične ekstrakcije herbe industrijske konoplje. Ispitivani opseg procesnih parametara je izabran na osnovu podataka iz literature (Tomšik i sar., 2016, Zeković i sar., 2017, Naffati i sar., 2017, Živković i sar., 2018). Prilikom izbora temperature ekstrakcije, pored literaturnih podataka, u obzir je uzeta i tačka ključanja rastvarača koja za 50% etanol iznosi između 80 i 85 °C. Tačka ključanja rastvarača je ograničavajući faktor prilikom izbora temperature ultrazvučne ekstrakcije jer povećanje temperature, kako je navedeno u poglavlju Uvod, vodi smanjenju ultrazvučne kavitacije što dalje može dovesti do smanjenja efikasnosti ekstrakcije. Eksperimentalni podaci izlaznih promjenjivih (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC), koji su dobijeni u eksperimentima na različitim procesnim parametrima prikazani su u tabeli 8.

Prinos ekstrakcije se kretao u opsegu od 10,00 do 17,54%. Najviši prinos ekstrakcije je određen u ekstraktu koji je dobijen ekstrakcijom industrijske konoplje na temperaturi od 60 °C, pri primenjenoj gustini ultrazvuka od 42 W/L i vremenu ekstrakcije od 40 minuta.

Sadržaj ukupnih fenola u dobijenim ekstraktima industrijske konoplje se kretao u opsegu od 1,0552 do 1,7795 mg EGK/mL, dok je sadržaj flavonoida bio u opsegu od 0,3793 i 0,6749 mg EK/mL. Ekstrakt dobijen ekstrakcijom na temperaturi od 80 °C, pri primenjenoj gustini ultrazvuka od 42 W/L i vremenu ekstrakcije od 60 minuta je imao najveći sadržaj ukupnih fenola, dok je ekstrakt sa najvećim sadržajem flavonoida dobijen na temperaturi ekstrakcije od 60 °C, pri gustini ultrazvuka 60 W/L u trajanju ekstrakcije od 60 minuta.

IC₅₀ vrednost dobijenih ekstrakta je bila u intervalu od 0,0012 do 0,0021 mL/mL. Ekstrakt sa najvećom antioksidativnom aktivnošću (najnižom IC₅₀ vrednošću) je dobijen na sledećim uslovima ekstrakcije: temperatura 60 °C, gustina ultrazvuka 24 W/L i vreme ekstrakcije 60 minuta. EC₅₀ vrednost ekstrakata industrijske konoplje je bila u opsegu od 0,0036 do 0,0057 mL/mL. Najmanju EC₅₀ vrednost, odnosno najveći reduktivni kapacitet, je pokazao ekstrakt dobijen na temperaturi ekstrakcije od 80 °C, gustini ultrazvuka 60 W/L i vremenu ekstrakcije 40 minuta.

Sadržaj ispitivanih kanabinoida u dobijenim ekstraktima industrijske konoplje kretao se u intervalu od 0,6158 do 0,8752 mg/mL za CBD i od 0,0412 do 0,0458 mg/mL za THC.

Sadržaj kanabinoida je bio najveći u ekstraktu dobijenim na sledećim uslovima ekstrakcije: temperaturi 80 °C, gustini ultrazvuka 60 W/L i vremenu ekstrakcije 40 minuta.

Uticao ispitivanih parametara je nezavisan za svaku izlaznu promenjivu, odnosno najviše vrednosti za svaku izlaznu promenjivu su dobijene na različitim vrednostima ispitivanih parametara ekstrakcije, sem za reduktivnu sposobnost i sadržaj kanabinoida. Ovo je u korelaciji sa rezultatima koje su dobili Agarwal i sar. (2018) kod kojih su, takođe, najviše vrednosti ispitivanih izlaznih promenjivih ultrazvučne ekstrakcije cveta industrijske konoplje dobijene na različitim vrednostima ispitivanih parametara ekstrakcije. Ispitivanim izlaznim promenjivama pogoduje primena više temperature, pa optimalna temperatura za prinos ekstrakcije, sadržaj flavonoida i antioksidativnu aktivnost iznosi 60 °C, dok za sadržaj ukupnih fenola, reduktivnu aktivnost i sadržaj kanabinoida iznosi 80 °C. Optimalno vreme za prinos ekstrakcije, reduktivnu sposobnost i sadržaj kanabinoida je 40 minuta, dok za sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antioksidativnu aktivnost iznosi 60 minuta. Ekstrakt sa najvećom antioksidativnom aktivnošću dobijen je ekstrakcijom sa najmanjom ispitivanom gustinom ultrazvuka, najveći prinos ekstrakcije i najveći sadržaj ukupnih fenola dobijen je u ekstraktima kada je primenjena srednja ispitivana gustina ultrazvuka, dok je najveća vrednost većine izlaznih parametara (sadržaja flavonoida, reduktivna sposobnost i sadržaja kanabinoida) dobijena u ekstraktima pripremljeni primenom najviše gustine ultrazvuka. Kako ekstrakt sa najvećom reduktivnom sposobnošću ima i najveći sadržaj kanabinoida pretpostavka je da reduktivna sposobnost ovog ekstrakta najvećim delom potiče upravo od kanabinoida.

Table 8. Box–Behnken eksperimentalni dizajn sa procesnim parametrima ultrazvučne ekstrakcije (temperatura, vreme i gustina ultrazvuka) i ispitivanim karakteristikama dobijenih ekstrakata (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC)

	Temperatura [°C]	Vreme [min]	Gustina ultrazvuka [W/L]	Y [%]	TP [mg EGK/mL]	TF [mg EK/mL]	IC ₅₀ [mL/mL]	EC ₅₀ [mL/mL]	CBD [mg/mL]	THC [mg/mL]
1	60	40	42	13,34	1,3050	0,6391	0,0016	0,0038	0,7604	0,0439
2	60	20	60	14,78	1,3612	0,5405	0,0013	0,0046	0,7860	0,0442
3	80	20	42	15,88	1,4145	0,6722	0,0014	0,0041	0,8259	0,0455
4	60	40	42	14,74	1,2966	0,6426	0,0013	0,0037	0,7672	0,0444
5	60	60	60	17,02	1,4258	0,6749	0,0013	0,0042	0,7912	0,0447
6	40	60	42	12,66	1,1590	0,5137	0,0014	0,0055	0,6924	0,0425
7	80	40	60	17,04	1,4314	0,5808	0,0015	0,0036	0,8752	0,0458
8	40	20	42	10,20	1,0552	0,3793	0,0021	0,0057	0,6158	0,0412
9	60	40	42	13,66	1,3752	0,5620	0,0013	0,0037	0,7154	0,0431
10	40	40	60	11,72	1,2208	0,4680	0,0018	0,0053	0,6712	0,0421
11	60	40	42	17,54	1,4763	0,5925	0,0014	0,0045	0,7289	0,0437
12	60	20	24	14,10	1,3949	0,5378	0,0016	0,0041	0,6966	0,0428
13	80	40	24	14,94	1,4987	0,6543	0,0013	0,0044	0,8602	0,0453
14	60	60	24	12,16	1,3780	0,5656	0,0012	0,0042	0,7329	0,0440
15	40	40	24	10,00	1,1534	0,4563	0,0017	0,0050	0,6698	0,0420
16	80	60	42	16,56	1,7795	0,5459	0,0017	0,0050	0,7612	0,0440
17	60	40	42	14,68	1,2882	0,5262	0,0013	0,0047	0,7946	0,0441

4.3.1.1. Matematičko modelovanje i provera modela za ultrazvučnu ekstrakciju herbe industrijske konoplje

Za sve izlazne promenjive (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC), a na osnovu eksperimentalnih podataka prikazanih u tabeli 8, izvršeno je matematičko modelovanje prema metodi opisanoj u okviru poglavlja Materijal i Metode. Koeficijenti determinacije (R²), koeficijenti varijacije (CV) i *p*-vrednosti za modele izlaznih promenjivih i odstupanja od modela dati su u Tabeli 9. Koeficijent determinacije je za sve ispitivane izlazne promenjive iznad 0,8. Iako koeficijent determinacije nije visok (blizu 1), matematički modeli su statistički prihvatljivi zbog visoke značajnosti za modele (*p*<0,05) i neznačajnog odstupanja od modela (*p*>0,05). Pored toga, na prihvatljivost modela ukazuje i nizak koeficijent varijacije (CV<10%), koji predstavlja procenat eksperimentalnih podataka koji nisu mogli biti objašnjeni ovim modelom.

Tabela 9. Rezultati analize varijansi (ANOVA) za proveru modela izlaznih promenjivih (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC)

	Zbir kvadrata	DF	Srednji kvadrat	F-vrednost	<i>p</i> -vrednost
Y					
Model	71,94	9	7,99	4,51	0,0297
Ostatak	12,39	7	1,77		
Odstupanje od modela	1,44	3	0,48	0,17	0,9083
Greška	10,96	4	2,74		
Ukupno	84,33	16			
R ² =0,8530					
CV=9,38%					
TP					
Model	35,99	9	4,00	4,00	0,0405
Ostatak	6,99	7	1,00		
Odstupanje od modela	4,47	3	1,49	2,36	0,2129
Greška	2,53	4	0,63		
Ukupno	42,98	16			
R ² =0,8373					
CV=7,38%					
TF					
Model	8,87	9	0,99	4,11	0,0378
Ostatak	1,68	7	0,24		
Odstupanje od modela	0,68	3	0,23	0,90	0,5144
Greška	1,00	4	0,25		
Ukupno	10,54	16			
R ² =0,8409					
CV=8,71%					
IC₅₀					
Model	$7,84 \times 10^{-3}$	9	$8,71 \times 10^{-4}$	4,08	0,0385
Ostatak	$1,49 \times 10^{-3}$	7	$2,13 \times 10^{-4}$		
Odstupanje od modela	$7,06 \times 10^{-4}$	3	$2,35 \times 10^{-4}$	1,19	0,4185
Greška	$7,88 \times 10^{-4}$	4	$1,97 \times 10^{-4}$		
Ukupno	$9,34 \times 10^{-3}$	16			
R ² =0,8400					

CV=10,10%

EC₅₀

Model	0,06	9	$6,19 \times 10^{-3}$	4,12	0,0376
Ostatak	0,01	7	$1,50 \times 10^{-3}$		
Odstupanje od modela	$2,29 \times 10^{-3}$	3	$7,63 \times 10^{-4}$	0,37	0,7795
Greška	$8,23 \times 10^{-3}$	4	$2,06 \times 10^{-3}$		
Ukupno	0,07	16			
R ² =0,8412					
CV=8,67%					

CBD

Model	0,07	9	$7,77 \times 10^{-3}$	6,88	0,0094
Ostatak	$7,91 \times 10^{-3}$	7	$1,13 \times 10^{-3}$		
Odstupanje od modela	$3,93 \times 10^{-3}$	3	$1,31 \times 10^{-3}$	1,32	0,3849
Greška	$3,98 \times 10^{-3}$	4	$9,94 \times 10^{-4}$		
Ukupno	0,08	16			
R ² =0,8984					
CV=4,48%					

THC

Model	$2,50 \times 10^{-5}$	9	$2,78 \times 10^{-6}$	10,45	0,0027
Ostatak	$1,86 \times 10^{-6}$	7	$2,66 \times 10^{-7}$		
Odstupanje od modela	$9,28 \times 10^{-7}$	3	$3,09 \times 10^{-7}$	1,33	0,3825
Greška	$9,32 \times 10^{-7}$	4	$2,33 \times 10^{-7}$		
Ukupno	$2,68 \times 10^{-5}$	16			
R ² =0,9307					
CV=1,18%					

^abroj stepeni slobode

U tabeli 10 su prikazane *p*-vrednosti linearnih, interakcijskih i kvadratnih članova na osnovu kojih se izdvajaju značajni faktori prema značajnosti opisanoj u poglavlju 3.5. Linearni, interakcijski i kvadratni članova koji značajno utiču na proces ulaze u krajnju formu matematičkog modela datog odziva.

Tabela 10. Odgovarajuće *p*-vrednosti linearnih, interakcijskih i kvadratnih članova (X₁–temperature, X₂–vreme ekstrakcije, X₃–gustina ultrazvuka)

Član	Y	TP	TF	IC ₅₀	EC ₅₀	CBD	THC
Linearni							
X ₁	0,0012	0,0010	0,0025	0,0040	0,0053	0,0002	<0,0001
X ₂	0,3911	0,1104	0,2587	0,0153	0,6798	0,5929	0,3254
X ₃	0,0418	0,9618	0,7278	0,9758	0,9076	0,1281	0,1117
Interakcije							
X ₁ X ₂	0,5250	0,2328	0,0324	0,3196	0,1911	0,0737	0,0335
X ₁ X ₃	0,8905	0,5218	0,4136	0,7275	0,2070	0,8443	0,7645
X ₂ X ₃	0,1602	0,6959	0,3123	0,3619	0,5832	0,6589	0,5359
Kvadratni							
X ₁ ²	0,1567	0,5569	0,0645	0,0446	0,0119	0,7239	0,2219
X ₂ ²	0,9271	0,5097	0,6185	0,3996	0,0808	0,1954	0,4558
X ₃ ²	0,6178	0,8763	0,9892	0,7725	0,4054	0,2246	0,3079

Na osnovu dobijenih podataka statističke analize, prikazanih u prethodne dve tabele (9 i 10), matematički model za prinos ekstrakcije je opisan sledećom jednačinom:

$$Y = 14,79 + 2,48X_1 + 0,43X_2 + 1,17X_3 - 0,44X_1X_2 + 0,10X_1X_3 + 1,04X_2X_3 - 1,03X_1^2 + 0,06X_2^2 - 0,34X_3^2 \quad (8)$$

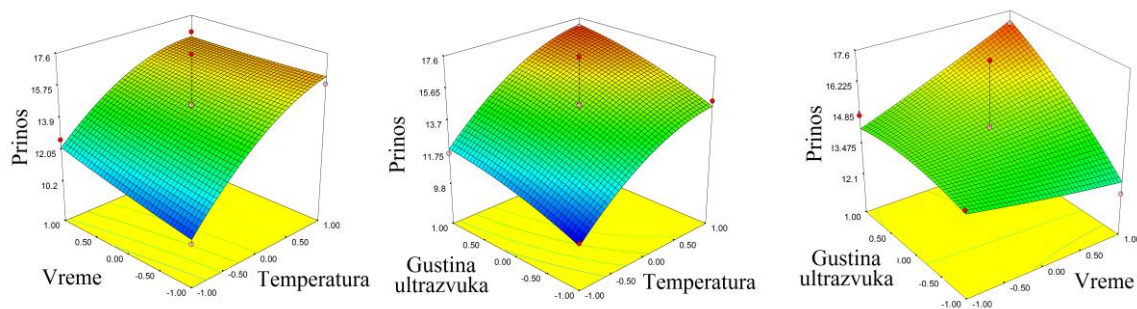
Na osnovu podataka navedenih u tabeli 10, može se zaključiti da na prinos ultrazvučne ekstrakcije značajno utiču samo linearni član temperature i gustine ultrazvuka, dok ostali članovi nemaju značaj u ovom procesu. Temperatura ekstrakcije veoma značajno utiče na proces ekstrakcije jer je p -vrednost za ovaj parametar manja od 0,01 (0,0012), dok linearni član gustine ultrazvuka utiče značajno jer je njegova p -vrednost između 0,01 i 0,05 (0,0418). Uzimajući u obzir samo značajne faktore, matematička jednačina koja opisuje model prinosa ekstrakcije ima sledeći oblik:

$$Y = 14,79 + 2,48X_1 + 1,17X_3 \quad (9)$$

Iz jednačine se vidi da oba člana imaju pozitivan uticaj na prinos ultrazvučne ekstrakcije, odnosno da povećanje temperature i gustine ultrazvuka u opsegu ispitivanih vrednosti dovode do povećanja prinosa ekstrakcije. Opšte je poznato da povećanje temperature ekstrakcionih procesa utiče na povećanje prenosa mase što dalje vodi povećanju prinosa ekstrakcije. Povećanje prenosa mase sa povećanjem temperature se javlja kao posledica povećanja difuzivnosti rastvarača, desorpcije i rastvorljivost supstanci koje se ekstrahuju (Miron i sar., 2011; Vergara-Salinas i sar., 2012). Nekoliko studija ukazuju na pozitivan uticaj temperature u ekstrakciji bioaktivnih jedinjenja. Temperatura je imala značajan uticaj na prinos ultrazvučne ekstrakcije korena biljke *Morinda citrifolia* (Hemwimol i sar., 2006). Naime, vrednost prinosa ekstrakcije dobijena na višim temperaturama (45 i 60 °C) nije mogla da se postigne ekstrakcijom na nižoj temperaturi (25 °C) ni povećanjem vremena ekstrakcije. Zeković i sar. (2014) su ispitivali uticaj različitih parametara ultrazvučne ekstrakcije na prinos ekstrakcije biljne sirovine koja se javlja kao sporedni proizvod prilikom proizvodnje čaja od aronije (*Aronia melanocarpa*). U ovoj studiji temperatura je imala najveći uticaj na prinos ekstrakcije i povećanje temperature od 30 do 70 °C je uticalo na povećanje prinosa ekstrakcije i najveći prinos ekstrakcije je zabeležen na najvišoj ispitivanoj temperaturi. Prinos ultrazvučne ekstrakcije se obično povećava povećanjem gustine ultrazvuka. Takođe, nekoliko studija ukazuju na pozitivan uticaj povećanja gustine ultrazvuka na prinos ekstrakcije. Povećanje gustine ultrazvuka je uticalo na povećanje prinosa ultrazvučne ekstrakcije iz ploda gardenije (*Gardenia jasminoides*) što je objašnjeno povećanjem koeficijenta prenosa mase u tečnost oko čestica ploda, kao i povećanjem koeficijenta difuzije unutar čestice (Ji i sar., 2006). Povećanje gustine ultrazvuka uticalo je i na povećanje prinosa ekstrakcije iz biljke *Auricularia auricula* (Zou i sar., 2010).

Sa slike 40, koja predstavlja odzivne površine koje opisuju zavisnost prinosa ekstrakcije herbe industrijske konoplje od uticaj ispitivanih parametara ekstrakcije, se takođe može zaključiti da nezavisne promenljive koje imaju uticaj na prinos ekstrakcije jesu temperatura ekstrakcije i gustina ultrazvuka. Sa dijagrama zavisnosti prinosa ekstrakcije od vremena i temperature se može videti da prinos eksponencijalno raste samo sa porastom temperature, dok vreme ekstrakcije ima neznatan uticaj. Sa dijagrama zavisnosti prinosa ekstrakcije od gustine ultrazvuka i temperature se vidi da se sa porastom obe promenljive prinos povećava

sa različitim uticajem. Kao i na prethodnom dijagramu i na dijagramu zavisnosti prinosa ekstrakcije od gustine i temperature vidi se da prinos ekstrakcije eksponencijalno raste sa porastom temperature, dok gustina ultrazvuka ima neznatan uticaj na prinos ekstrakcije. Sa dijagrama zavisnosti prinosa ekstrakcije od gustine ultrazvuka i vremena se može videti da gustina ultrazvuka ima neznatan uticaj na prinos, dok vreme nema uticaj pri nižim vrednostima ovih promenljivih, dok pri višim vrednostima dolazi do povećanja uticaja i sa porastom obe promenjive do maksimalne ispitivane vrednosti prinos naglo raste. Ovo znači da duže vreme izlaganja većim gustinama ultrazvuka utiče na povećanje prinosa ekstrakcije.



Slika 40. Odzivne površine koje opisuju prinos ultrazvučne ekstrakcije iz herbe industrijske konoplje

Matematički model koji opisuje ekstrakciju ukupnih fenola iz herbe industrijske konoplje primenom ultrazvuka ima oblik sledeće funkcije:

$$TP = 1,35 + 0,19X_1 + 0,06X_2 + 1,75 * 10^{-3}X_3 + 0,07X_1X_2 - 0,03X_1X_3 + 0,02X_2X_3 - 0,03X_1^2 + 0,03X_2^2 + 7,86 * 10^{-3}X_3^2 \quad (10)$$

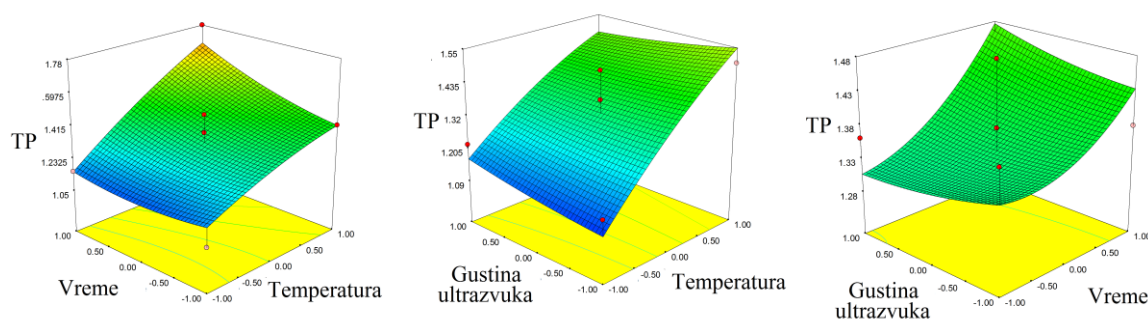
Iz tabele 10 se vidi da jedini parametar ultrazvučne ekstrakcije koji utiče na ekstrakciju ukupnih fenola iz herbe industrijske konoplje jeste temperatura. Temperatura ekstrakcije ima veoma značajan uticaj jer je p -vrednost manja od 0,01 i iznosi 0,0010. Jednačina koja opisuje ultrazvučnu ekstrakciju ukupnih fenola jeste:

$$TP = 1,35 + 0,19X_1 \quad (11)$$

Temperatura ima pozitivni uticaj na ekstrakciju ukupnih fenola. To znači da povećanjem temperature u opsegu ispitivanih vrednosti dolazi do povećanje ekstrakcije ukupnih fenola konoplje ultrazvučnom ekstrakcijom. Pozitivan uticaj temperature na izolovanje fenola je zabeležen u nekoliko studija. Hossain i sar. (2011) su ukazali da je temperatura dominantan faktor ekstrakcije fenola iz ruzmarina, majorana i origana. Povećanje temperature je uticalo na povećanje sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima majkine dušice i najveći je bio prilikom ekstrakcije na temperaturi od 80 °C (Jovanović i sar., 2017). Porast sadržaja ukupnih fenola ultrazvučnom ekstrakcijom iz pšeničnih mekinja je zabeležen porastom temperature od 25 do 75 °C (Wang i sar., 2008). Ispitivanje uticaja temperature ultrazvučne ekstrakcije na izolovanje fenola iz biljne sirovine koja predstavlja sporedni proizvod prilikom proizvodnje filter čaja od žalfije je pokazao da povećanje temperature do 70-75 °C utiče na povećanje

sadržaja fenola u dobijenim ekstraktima (Zeković i sar., 2017). Prilikom ultrazvučne ekstrakcije cvetova industrijske konoplje, od ispitivanih parametara, uticaj na sadržaj fenola su imali vreme ekstrakcije i koncentracija rastvarača, ali je kao rastvarač primenjen metanol, dok jačina ultrazvuka nije imala uticaj na ekstrakciju fenola što je u korelaciji sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji (Agarwal i sar., 2018).

Odzivne površine koje i vizuelno opisuju zavisnost sadržaja ukupnih fenola (Slika 41) od primenjenih parametara ultrazvučne ekstrakcije u skladu su sa jednačinom koja opisuje ekstrakciju ukupnih fenola i pokazuju da na prinos ekstrakcije ukupnih fenola iz herbe industrijske konoplje u ovako postavljenom setu eksperimenata uticaj ima samo temperatura. Dijagram zavisnosti ukupnih fenola od temperature i gustine najbolje opisuje jednačinu dobijenu za proces ekstrakcije ukupnih fenola i vidi se da sadržaj ukupnih fenola eksponencijalno raste sa porastom temperature. Blagi porast sadržaja ukupnih fenola sa porastom vremena se može zapaziti sa dijagrama zavisnosti sadržaja fenola od vremena i temperature, a pri višim temperaturama. Ovo znači da duže trajanje ekstrakcije pri višim temperaturama utiče na povećanje ekstrakcije fenola. Sa dijagrama zavisnosti sadržaja ukupnih fenola od gustine ultrazvuka i vremena se vidi da porastom oba faktora dolazi do povećanja sadržaja ukupnih fenola, ali je to povećanje malo, odnosno nema značaja i nije obuhvaćeno jednačinom.



Slika 41. Odzivne površine koje opisuju ultrazvučnu ekstrakciju ukupnih fenola iz herbe industrijske konoplje

Matematički model za proces ekstrakcije flavonoida iz herbe industrijske konoplje primenom ultrazvuka ima sledeći oblik:

$$TF = 0,59 + 0,08X_1 + 0,02X_2 + 6,27 * 10^{-3}X_3 - 0,06X_1X_2 - 0,02X_1X_3 + 0,02X_2X_3 - 0,05X_1^2 - 0,01X_2^2 - 3,36 * 10^{-4}X_3^2 \quad (12)$$

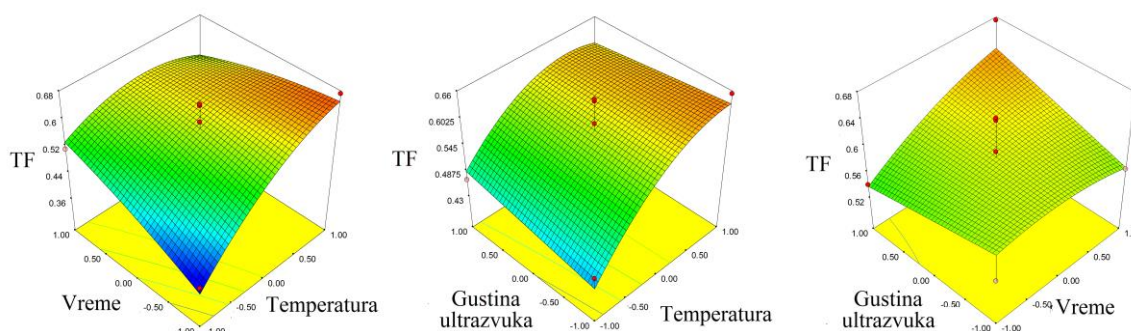
Na osnovu p -vrednosti sumiranih u tabeli 10, može se zaključiti da linearni i kvadratni član temperature ekstrakcije i interakcija temperature i vremena ekstrakcije imaju uticaj na proces ekstrakcije flavonoida iz herbe industrijske konoplje. Linearni član temperature ima veoma značajan uticaj na proces ekstrakcije jer je p -vrednost manja od 0,01 (0,0025), dok kvadratni član temperature ima neznatan uticaj jer je p -vrednost za ovaj član između 0,05 i 0,1 (0,0645). Interakcija temperature i vremena ima značajan uticaj jer je p -vrednost za interakcijski član ova dva parametra između 0,01 i 0,05 (0,0324). Kada se uzmu u obzir

značajni članovi, matematički model procesa ekstrakcije flavonoida iz herbe industrijske konoplje dobija sledeći oblik:

$$TF = 0,59 + 0,08X_1 - 0,06X_1X_2 - 0,05X_1^2 \quad (13)$$

Linearni član temperature ima pozitivni uticaj na sadržaj flavonoida, dok kvadratni član ima negativni uticaj. Ovo znači da se sadržaj flavonoida povećava sa povećanjem temperature do određene tačke koja se označava kao prevojna tačka. Interakcija temperature i vremena ekstrakcije ima negativan uticaj na ekstrakciju flavonoida, odnosno povećanje oba ova parametra dovodi do pada sadržaja flavonoida. Sa dijagrama prikazanih na slici 44 se može uočiti da se prevojna tačka nalazi na temperaturi oko 70 °C ali da degradacija flavonoida počinje tek nakon vremena ekstrakcije od oko 50 minuta. Dakle, interakcijski uticaj temperature i vremena ekstrakcije može biti posledica degradacije flavonoida izlaganjem na povišenoj temperaturi duži vremenski period što je u skladu sa istraživanjem Galvan d'Alessandro i sar. (2012). Ovakav uticaj temperature na sadržaj flavonoida je zabeležen i u slučaju ultrazvučne ekstrakcije biljne sirovine koja predstavlja sporedni proizvod prilikom proizvodnje filter čaja žalfije (*Salvia officinalis*) (Zeković i sar., 2017), dok je vreme imalo negativan uticaj prilikom ultrazvučne ekstrakcije flavonoida iz tulsia (*Ocimum tenuiflorum*) (Upadhya i sar., 2015).

Odzivne površine koje opisuju proces ekstrakcije flavonoida pokazuju isti uticaj procesnih parametara kao i matematički model (Slika 44). Sa dijagrama zavisnosti flavonoida od vremena i temperature, kao i od gustine i temperature, se može videti da sa porastom temperature sadržaj flavonoida u dobijenim ekstraktima raste eksponencijalno pri nižim vrednostima vremena, dok interakcija sa gustinom ultrazvuka nema značajan uticaj. Pad sadržaja flavonoida može se zapaziti pri višim vrednostima vremena ekstrakcije, a nakon porasta temperature od preko 70 °C što je u korelaciji sa jednačinom koja pokazuje da nakon određene vrednosti temperature interakcija vremena i temperature ima negativan uticaj. Sa druge strane, vreme ima uticaj na povećanje sadržaja flavonoida u ekstraktima prilikom ekstrakcije na nižim temperaturama, od oko 40 do oko 50 °C, gde se vidi blago povećanje sadržaja flavonoida kao funkcija vremena ekstrakcije. Sa dijagrama zavisnosti sadržaja ukupnih fenola od gustine ultrazvuk i vremena se vidi da povećanje oba faktora dovodi do blagog povećanja sadržaja ukupnih fenola.



Slika 42. Odzivne površine koje opisuju ultrazvučnu ekstrakciju flavonoida iz herbe industrijske konoplje

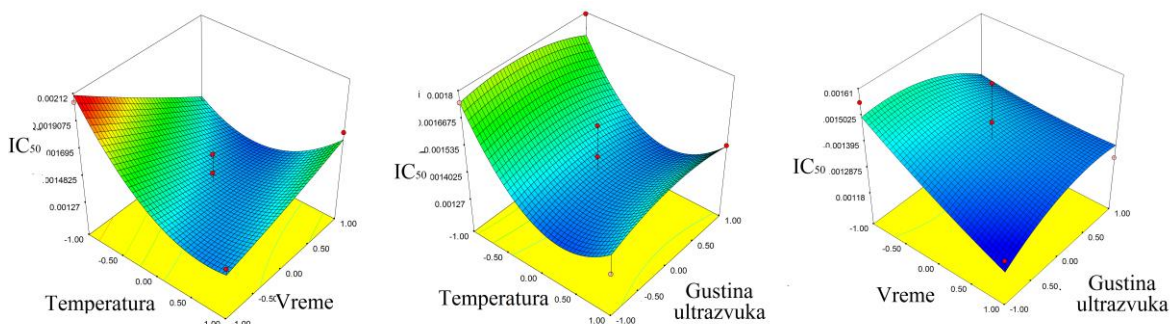
Matematičko modelovanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata herbe industrijske konoplje je izvršeno preko IC_{50} vrednosti čija je jednačina ima oblik:

$$IC_{50} = 1,38 * 10^{-3} - 1,38 * 10^{-4}X_1 - 8,65 * 10^{-5}X_2 - 1,44 * 10^{-6}X_3 + 2,34 * 10^{-4}X_1X_2 + 2,63 * 10^{-5}X_1X_3 + 7,11 * 10^{-5}X_2X_3 + 2,51 * 10^{-4}X_1^2 + 1,43 * 10^{-5}X_2^2 - 5,65 * 10^{-5}X_3^2 \quad (14)$$

Parametri koji utiču na antioksidativnu aktivnost jesu linearni i kvadratni član temperature ekstrakcije i linearni član vremena ekstrakcije. Linearni član temperature ekstrakcije ima veoma značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost jer je prema dobijenim podacima njegova p -vrednost manja od 0,01 (0,0040). Kvadratni član temperature ekstrakcije i linearni član vremena ekstrakcije utiču značajno na antioksidativnu aktivnost jer imaju p -vrednost između 0,01 i 0,05 (0,0446 i 0,0153, tim redom). Kada se uzmu u obzir značajni faktori, jednačina za IC_{50} vrednost dobija sledeći oblik:

$$IC_{50} = 1,38 * 10^{-3} - 1,38 * 10^{-3}X_1 - 8,65 * 10^{-5}X_2 + 2,51 * 10^{-4}X_1^2 \quad (15)$$

U dobijenoj jednačini sa značajnim faktorima linearni članovi imaju negativan uticaj, dok kvadratni član ima pozitivan uticaj na IC_{50} vrednost. To znači da sa porastom temperature i vremena ekstrakcije dolazi do smanjenja IC_{50} vrednosti, odnosno povećanja antioksidativne vrednosti. Povećanje temperature utiče negativno na IC_{50} vrednost, odnosno pozitivno na antioksidativnu vrednost do određene tačke koja se naziva prevojna tačka na šta nam ukazuje pozitivan uticaj kvadratnog člana temperature na IC_{50} vrednost. Uticaj procesnih parametara na antioksidativnu aktivnost ekstrakata je u skladu sa uticajem procesnih parametara na sadržaj flavonoida, pa se može zaključiti da su upravo ova jedinjenja dominantni nosioca antioksidativne aktivnosti ekstrakata herbe industrijske konoplje. Ovakvu zavisnost su dale i odzivne površine IC_{50} vrednosti, što se može videti sa slike 43. Sa dijagrama zavisnosti IC_{50} od temperature i vremena i od temperature i gustine ultrazvuka se vidi da porast temperature do vrednosti od oko 70 °C utiče na naglo smanjenje IC_{50} vrednosti, odnosno na značajno povećanje antioksidativne aktivnosti. Daljim povećanjem temperature do najviše ispitivane vrednosti (80 °C) uočava se blago povećanje IC_{50} vrednosti, odnosno blago smanjenje antioksidativne aktivnosti. Sa grafika zavisnosti IC_{50} vrednosti od temperature i vremena se vidi da vreme ima veći uticaj pri nižim temperatura ekstrakcije. Naime, na nižim ispitivanim temperaturama ekstrakcije (40-50 °C) se vidi značajan pad IC_{50} vrednosti, odnosno povećanje antioksidativne vrednosti, sa porastom vremena ekstrakcije što je u korelaciji sa uticajem vremena ekstrakcije pri nižim temperaturama na sadržaj flavonoida.



Slika 43. Odzivne površine koje opisuju antioksidativnu aktivnost ekstrakata herbe industrijske konoplje koji su dobijeni primenom ultrazvučne ekstrakcije

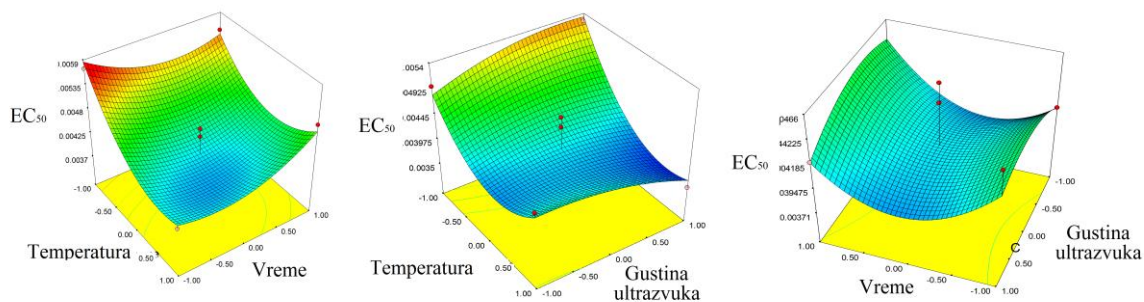
Matematički model koji opisuje uticaj procesnih parametara na reduktivni kapacitet ekstrakata dobijenih iz herbe industrijske konoplje, izražen preko EC_{50} vrednosti, prikazan je sledećom jednačinom:

$$\begin{aligned}
 EC_{50} = & 4,07 * 10^{-3} - 5,46 * 10^{-4}X_1 + 5,88 * 10^{-5}X_2 - 1,66 * 10^{-5}X_3 + 2,80 \\
 & * 10^{-4}X_1X_2 - 2,69 * 10^{-4}X_1X_3 - 1,11 * 10^{-4}X_2X_3 + 6,37 \\
 & * 10^{-4}X_1^2 + 3,85 * 10^{-4}X_2^2 - 1,67 * 10^{-4}X_3^2 \quad (16)
 \end{aligned}$$

Faktori koji pokazuju značajno delovanje na reduktivni kapacitet ovako dobijenih ekstrakata jesu linearni i kvadratni član temperature ekstrakcije i kvadratni član gustine ekstrakcije (Tabela 10). Linearni član temperature ekstrakcije ima veoma značajan uticaj jer je njegova p -vrednost manja od 0,01 (0,0053), kvadratni član temperature ima značajan uticaj jer je njegova p -vrednost između 0,01 i 0,05 (0,0119), dok kvadratni član gustine ultrazvuka ima neznatan uticaj jer je njegova p -vrednost između 0,05 i 0,1 (0,0808). Zbog različite značajnosti procesnih parametara, matematički model koji opisuje uticaj procesnih parametara na EC_{50} vrednosti ekstrakta herbe industrijske konoplje može se prikazati sledećim oblikom:

$$EC_{50} = 4,07 * 10^{-3} - 5,46 * 10^{-4}X_1 + 6,37 * 10^{-4}X_1^2 + 3,85 * 10^{-4}X_2^2 \quad (17)$$

Uticaj linearnog i kvadratnog člana temperature, kao i uticaj kvadratnog člana vremena, je isti kao uticaj ovih parametara na IC_{50} vrednost. Slika 44 prikazuje odzivne površine sa kojih se može videti da se matematički objašnjeni uticaji slažu sa grafičkim. Sa grafika zavisnosti EC_{50} vrednosti od temperature i vremena, kao i temperature i gustine, uočavaju se prevojne tačke uticaja temperature na vrednosti od oko 70 °C, odnosno uočava se da porastom temperature do ove vrednosti dolazi do naglog pada EC_{50} vrednosti, odnosno do porasta reduktivne sposobnosti, a daljim povećanjem temperature zapaža se blagi porast EC_{50} vrednosti, odnosno blagi pad reduktivne sposobnosti. Porast vremena ekstrakcije do centralne tačke ima uticaj na blagi pad EC_{50} vrednosti, odnosno povećanje reduktivne sposobnosti, dok daljim porastom vremena ekstrakcije se beleži povećanje EC_{50} vrednosti, odnosno smanjenje reduktivne sposobnosti.



Slika 44. Odzivne površine koje opisuju reduktivnu sposobnost ekstrakata dobijenih iz herbe industrijske konoplje koji su dobijeni primenom ultrazvučne ekstrakcije

Matematički modeli koji opisuju proces ultrazvučne ekstrakciju CBD-a i THC-a iz herbe industrijske konoplje primenom ultrazvuka imaju sledeći oblik:

$$\begin{aligned}
 CBD = & 0,75 + 0,08X_1 + 6,66 * 10^{-3}X_2 + 0,02X_3 - 0,04X_1X_2 + 3,42 \\
 & * 10^{-3}X_1X_3 - 7,75 * 10^{-3}X_2X_3 - 6,02 * 10^{-3}X_1^2 - 0,02X_2^2 \\
 & + 0,02X_3^2 \quad (18)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 THC = & 0,04 + 1,62 * 10^{-3}X_1 + 1,93 * 10^{-4}X_2 + 3,31 * 10^{-4}X_3 - 6,80 \\
 & * 10^{-4}X_1X_2 + 8,03 * 10^{-5}X_1X_3 - 1,68 * 10^{-4}X_2X_3 - 3,37 \\
 & * 10^{-4}X_1^2 - 1,98 * 10^{-4}X_2^2 + 2,76 * 10^{-4}X_3^2 \quad (19)
 \end{aligned}$$

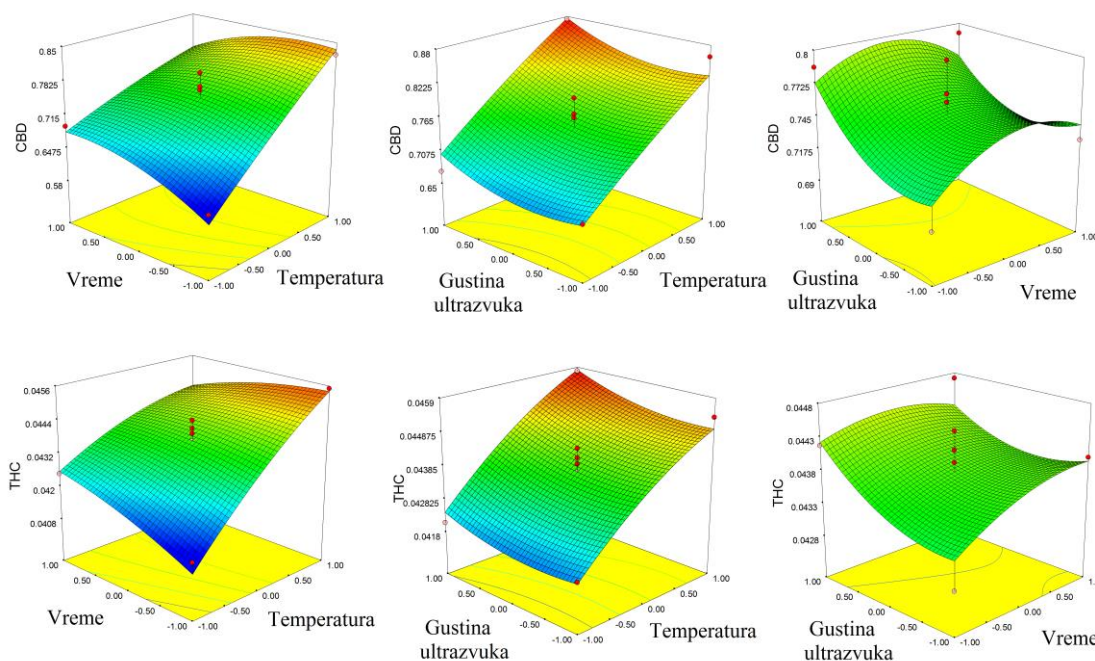
Linearni član temperature ekstrakcije, kao i interakcija temperature i vremena ekstrakcije, imaju uticaj na proces ekstrakcije CBD-a i THC-a. Linerani temperaturni član ima veoma značajan uticaj, u oba slučaja, jer je njegova p -vrednost manja od 0,01 (za CBD iznosi 0,0002, dok je za THC manja od 0,0001). Interakcija temperature i vremena ekstrakcije ima značajan uticaj na ekstrakciju THC-a, jer je p -vrednost ovog člana za THC 0,0335, dok na ekstrakciju CBD ima mali uticaj jer njegova p -vrednost iznosi 0,0737. Na osnovu dobijenih podataka, matematički modeli za CBD i THC sa značajnim faktorima prikazuju se na sledeći način:

$$CBD = 0,75 + 0,08X_1 - 0,04X_1X_2 \quad (20)$$

$$THC = 0,04 + 1,62 * 10^{-3}X_1 - 6,80 * 10^{-4}X_1X_2 \quad (21)$$

Iz jednačina se vidi da linearni član temperature ima pozitivni uticaj na proces ekstrakcije CBD-a i THC-a ultrazvukom, dok interakcija temperature i vremena ima negativan uticaj u oba slučaja. To znači da povećanjem temperature ekstrakcija sadržaj CBD-a i THC-a se povećava, ali produženjem vremena ekstrakcije dolazi do pada njihovog sadržaja. Ovo se takođe može videti sa slike 45. Sa dijagrama zavisnosti sadržaja kanabinoida od temperature i vremena se može videti da povećanje temperature utiče na naglo povećanje sadržaja kanabinoida, dok vreme ima blagi uticaj na povišenje kanabinoida pri nižim vrednostima ispitivanih temperatura. Interakcija temperature i vremena ekstrakcije utiče negativno na

sadržaj kanabinoida. Sa grafika se vidi da povećanje temperature preko vrednosti od oko 70 °C i vremena ekstrakcije preko 40 minuta dolazi do pada sadržaja ispitivanih kanabinoida. Pozitivan uticaj temperature se može videti i sa dijagrama zavisnosti sadržaja kanabinoida od temperature i gustine ultrazvuka, ali se takođe može zapaziti da postoji blagi porast sadržaja kanabinoida interakcijom temperature i gustine ultrazvuka.



Slika 45. Odzivne površine koje opisuju ultrazvučnu ekstrakciju kanabinoida (CBD i THC) iz herbe industrijske konoplje

Analiza varijansi je pokazala da je faktor sa najvećim uticajem na proces ultrazvučne ekstrakcije herbe industrijske konoplje sorte Helena u domenu postavljenog eksperimenta temperatura, uzimajući u obzir sve izlazne promenjive. Prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj CBD-a i sadržaj THC-a su rasli sa povećanjem temperature ekstrakcije. Sadržaj flavonoida, antioksidativna aktivnost i reduktivna sposobnost su se povećanjem temperature povećavali do određene vrednosti temperature nakon koje se vrednost ovih izlaznih promenjivih smanjuje. Interakcija temperature i vremena ekstrakcije imali su negativan uticaj samo na sadržaj fenola, CBD-a i THC-a. Povećanje temperature u kombinaciji sa povećanjem vremena, u okviru određenih vrednosti ovih parametara, dovodi do smanjenja sadržaja fenola, CBD-a i THC-a.

Poređenjem vrednosti ispitivanih karakteristika ekstrakata dobijenih ultrazvučnom ekstrakcijom i maceracijom, može se zaključiti da je ultrazvučna ekstrakcija superiornija metoda za izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz herbe industrijske konoplje. Naime, ekstrakcija primenom ultrazvuka je dovela do povećanja sadržaja fenola i flavonoida (oko 1,5 do 2 puta), povećanja antioksidativne aktivnosti i reduktivne sposobnosti (oko 3 puta), kao i povećanja sadržaja CBD-a (oko 2 puta), dok je povećanje sadržaja THC-a bilo zanemarljivo.

4.3.1.2. Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije herbe industrijske konoplje

Određivanje optimalnih uslova ultrazvučne ekstrakcije je, u zavisnosti od željenih karakteristika dobijenog ekstrakta, urađeno sa različitim zahtevima za izlazne promenjive. Optimalni uslovi za dobijanje ekstrakta sa visokim prinosom, visokim sadržajem ukupnih fenola i flavonoida i sa visokom antioksidativnom aktivnošću i reduktivnom sposobnošću su temperatura 68,8 °C, vreme 54,8 minuta i gustina ultrazvuka 60 W/L. Pri ovim uslovima bi se dobio ekstrakt sa prinosom ekstrakcije 17,54%, sadržajem ukupnih fenola 1,5245 mg EGK/mL, sadržajem flavonoida 0,6214 mg EK/mL, dok bi IC₅₀ vrednost i EC₅₀ vrednost bile 0,0014 mL/mL i 0,0039 mL/mL, tim redom.

Optimalni uslovi za dobijanje ekstrakta sa visokim sadržaj CBD-a su temperatura 79,4 °C, vreme 31,6 min i gustina ultrazvuka 60 W/L. Pri ovim uslovima predviđeno je da bi sadržaj CBD-a iznosio 0,8827 mg/mL, dok bi sadržaj THC-a bio 0,0460 mg/mL. Za pripremu ekstrakta sa visokim sadržajem CBD-a i niskim sadržajem THC-a potrebni su temperatura 55,4 °C, vreme 38,2 minuta i gustina ultrazvuka 24 W/L. Sadržaj CBD-a bi pri ovakvim uslovima ekstrakcije iznosio 0,7339 mg/mL, dok bi sadržaj THC-a bio neznatno smanjen u odnosu na prethodni slučaj i iznosio bi 0,0434 mg/mL.

Radi provere predviđenih eksperimentalnih uslova postavljena je ekstrakcija na optimalnim uslovima za prinos, sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, IC₅₀ vrednosti i EC₅₀ vrednosti. Eksperimentalno dobijeni podaci za prinos, sadržaj ukupnih fenola i flavonoida odgovaraju predviđenim vrednostima sa pouzdanošću od 95% i njihova vrednost je iznosila 18,46%, 1,5128 mg EGK/mL i 0,7895 mg EK/mL, tim redom. Vrednost IC₅₀ u dobijenim optimalnim ekstraktima je iznosila 0,0007 mL/mL, dok je EC₅₀ vrednost bila 0,0026 mL/mL i ove vrednosti su malo odstupale od intervala od 95%. Na ovim uslovima je izmeren i sadržaj kanabinoida i iznosio je 0,8565 mg/mL za CBD i 0,0429 mg/mL za THC.

4.3.2. Mikrotalasna ekstrakcija herbe industrijske konoplje

Mikrotalasna ekstrakcija, kao jedna od savremenih metoda ekstrakcije, je upotrebljena kao metoda ekstrakcije za izolovanja bioaktivnih supstanci iz različitih biljnih sirovina: čaja (*Camellia sinensis*) (Pan i sar., 2003), sikavice (*Silybum marianum*) (Dhobi i sar., 2009), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), origana (*Origanum dictamnus*), majorana (*Origanum majorana*), divizme (*Styrax officinalis*), pepeljuše (*Teucrium polium*) i konopljike (*Vitex agnus-cactus*) (Proestosi i Komaitis, 2008).

Chang i sar. (2017) su optimizovali proces mikrotalasne ekstrakcije kanabinoida (THC, CBD, CBN) iz semena industrijske konoplje RSM metodom. U ovoj studiji utvrđeno je da je od ispitivanih procesnih parametara, temperature (80, 120 i 160 °C), mikrotalasne snage (300, 800 i 1300 W) i vremena ekstrakcije (10, 20 i 30 minuta), temperatura imala najveći uticaj na ekstrakciju kanabinoida. Naime, sadržaj THC-a je rastao sa porastom temperature do 100 °C, a daljim povećanjem temperature sadržaj THC-a je opadao. Uticaj temperature na CBD i CBN je bio isti. Sadržaj ova dva kanabinoida je rastao sa porastom temperature do 120 °C, dok je dalje povećanje temperature rezultiralo u smanjenju njihovog sadržaja.

Optimalan ekstrakt semena industrijske konoplje je pripremljen na optimalnim uslovima (109 °C, 375 W, 30 minuta), a dobijen sadržaj kanabinoida je upoređen sa sadržajem kanabinoida u ekstraktima dobijenim primenom drugih metoda ekstrakcija uključujući *Soxhlet*, ekstrakciju ugljendioksidom u superkritičnom stanju i ultrazvučnu ekstrakciju. Utvrđeno je da je ekstrakt dobijen mikrotalasnom ekstrakcijom imao najveći sadržaj kanabinoida 6,09 µg/g. Brighenti i sar. (2017) su prilikom razvoja HPLC metode za detekciju nepsihooaktivnih kanabinoida ispitivali uticaj pripreme ekstrakata industrijske konoplje na sadržaj kanabinoidnih kiselina i njihovih dekarboksilovanih oblika. Sadržaj CBDA je bio manji u ekstraktu dobijenom mikrotalasnom ekstrakcijom u poređenju sa ostalim ekstrakcijama, dok je sadržaj CBD-a bio veći. Konstatovano je da je ovo verovatno posledica dekarboksilacije CBDA na visokoj temperaturi koja se razvija prilikom mikrotalasnog zagrevanja. Dekarboksilacija kanabinoidnih kiselina prilikom ekstrakcije je bitna zbog poboljšanja kvaliteta dobijenih ekstrakata u pogledu sadržaja aktivnih, dekarboksilovanih kanabinoida. Lewis-Bakker i sar. (2019) su takođe ispitivali uticaj različitih metoda ekstrakcija (*Soxhlet* ekstrakcije, ekstrakcije ugljendioksidom u superkritičnom stanju, mikrotalasne i ultrazvučne ekstrakcija) na prinos i dekarboksilaciju kanabinoida. Na osnovu dobijenih rezultata zaključili su da je mikrotalasna ekstrakcija superiornija metoda u pogledu izolovanja i dekarboksilacije kanabinoida u poređenju sa ostalim ispitivanim metodama.

U ovoj doktorskoj disertaciji mikrotalasna ekstrakcija je primenjena u opsegu procesnih parametara datih u opisu metode u okviru poglavlja Materijal i Metode. Eksperimentalni podaci ulaznih i izlaznih promenljivih procesa mikrotalasnog ekstrakcije su dati u tabeli 11. Ispitivane ulazne promenjive su koncentracija etanola, vreme ekstrakcije i odnos droga/rastvarač. Iako se 50% etanol pokazao kao najoptimalniji ekstragens prilikom klasične ekstrakcije ove biljne sirovine, kao jedan od procesnih parametara je izabrana i koncentracija etanola jer mikrotalasna ekstrakcija zavisi od primenjenog rastvarača, odnosno od polarnosti rastvarača. U zavisnosti od polarnosti rastvarača i njegove dielektrične konstante, zavisice i uticaj mikrotalasa na proces ekstrakcije, odnosno zavisice sposobnost rastvarača da apsorbuje mikrotalase. U literaturi je navedeno da povećanjem odnosa droga/rastvarač u mikrotalasnog ekstrakcije dolazi do povećanja ekstrakcije ciljanih jedinjenja kao posledica povećanja hidratacije biljnog materijala koji se ekstrahuje (Milutinović i sar., 2015) i povećanja zapremine rastvarača (Wang i Weller, 2006; Chupin i sar., 2015). Prema podacima iz literature, mikrotalasi velike snage tokom kratkog vremena ekstrakcije izazivaju degradaciju ćelijske membrane i bolju difuziju jedinjenja u ekstrakcioni medijum. Povećanjem vremena ekstrakcije, odnosno dužim delovanjem mikrotalasa, dolazi do povećanja prinosa koji uglavnom potiče od balastnih materija, dok se prinos bioaktivnih jedinjenja smanjuje usled degradacije (Simić i sar., 2016). Opseg ispitivanih vrednosti za koncentraciju etanola i odnos droga/rastvarač je izabran na osnovu podataka dobijenih u klasičnoj ekstrakciji, gde je kao srednja vrednost odabrana ona koja je prilikom klasične ekstrakcije izabrana za najoptimalniju, dok je opseg ispitivanih vrednosti za vreme odabran na osnovu literaturnih podataka da porast vremena do oko 30 minuta utiče na porast sadržaja bioaktivnih jedinjenja u dobijenim ekstraktima, nakon čega dolazi do pada (Chemat i sar., 2005, Xiao i sar., 2008, Zhao i sar., 2018). Mikrotalasna ekstrakcija je izvedena na fiksnoj

snazi mikrotalasa od 580 W koja je navedena u velikom broju istraživanja kao optimalna prilikom mikrotalase ekstrakcije fenola (Bhuyan i sar., 2015, Belwal i sar., 2016, Dahmoune i sar., 2015). Dobijeni ekstrakti su okarakterisani izlaznim promenljivim istim kao u slučaju ultrazvučne ekstrakcije (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC).

Dobijeni podaci pokazuju da je prinos ekstrakcije, pri postavljenim uslovima ekstrakcije, bio u opsegu od 10,96 do 38,08%. Najveći prinos je dobijen sa 30% etanolom, pri primeni odnosa droga/rastvarač 1:5 i vremenu ekstrakcije od 20 min.

Najniži sadržaj ukupnih fenola iznosio je 0,8499 mg EGK/mL, dok je najveći sadržaj bio 2,7060 mg EGK/mL. Ekstrakt sa najvišim sadržajem ukupnih fenola dobijen je pri sledećim uslovima ekstrakcije: 50% etanol, 1:5 odnos droga/rastvarač i 10 minuta vreme ekstrakcije. Sadržaj flavonoida u dobijenim ekstraktima herbe industrijske konoplje u eksperimentu u kojoj je primenjen proces mikrotalase ekstrakcije bio je u opsegu od 0,4707 do 1,4246 mg EK/mL. Uslovi ekstrakcije 70% etanol, 1:5 odnos droga/rastvarač i 20 minuta vreme ekstrakcije su uslovi pri kojima je dobijen ekstrakt sa najvišim sadržajem flavonoida.

IC₅₀ vrednost ekstrakata industrijske konoplje koji su pripremljeni primenom mikrotalase ekstrakcije je bila u opsegu između 0,0009 i 0,0021 mL/mL. Najveću antioksidativnu aktivnost pokazao je ekstrakt sa najnižom IC₅₀ vrednošću koji je dobijen primenom 50% etanola, odnosa droga/rastvarač 1:5 i primenom vremenu ekstrakcije od 10 minuta. Ovo su ujedno isti procesni uslovi pod kojima je pripremljen ekstrakt herbe industrijske konoplje sa najvišim sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja. EC₅₀ vrednost ekstrakta industrijske konoplje je iznosila od 0,0021 do 0,0066 mL/mL. Ekstrakt sa najvećom reduktivnom sposobnošću je dobijen na sledećim uslovima ekstrakcije: koncentracija etanola 30%, vreme ekstrakcije 20 minuta i odnos droga/rastvarač 1:5.

Sadržaj CBD-a u dobijenim ekstraktima je bio u opsegu od 0,2243 do 1,8415 mg/mL, dok je sadržaj THC-a iznosio od 0,0339 do 0,0637 mg/mL. Ekstrakt sa najvećim sadržajem CBD-a i THC-a je dobijen primenom etanola koncentracije 70%, primenom odnosa droga/rastvarač 1:5 i u vremenu ekstrakcije od 20 minuta.

Od ispitivanih parametara mikrotalase ekstrakcije, koncentracija etanola i vreme imaju različit uticaj na izlazne promenjive, dok optimalan odnos droga/rastvarač za sve izlazne promenjive iznosi 1:5. Optimalno vreme ekstrakcije za prinos, sadržaj flavonoida, reduktivnu sposobnost i sadržaj CBD i THC je 20 minuta, dok optimalno vreme ekstrakcije za sadržaj fenola i antioksidativne aktivnosti iznosi 10 minuta. Koncentracija etanola je imala različit uticaj na ispitivane parametre.

Tabela 11. *Box–Behnken* eksperimentalni dizajn sa parametrima mikrotalasne ekstrakcije (koncentracija etanola, vreme i odnos droga/rastvarač) i ispitivanim karakteristikama dobijenih ekstrakata herbe industrijske konoplje (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC)

	Koncentracija etanola [%]	Vreme [min]	Odnos droga/rastvarač	Y [%]	TP [mg EGK/mL]	TF [mg EK/mL]	IC ₅₀ [mL/mL]	EC ₅₀ [mL/mL]	CBD [mg/mL]	THC [mg/mL]
1	50	20	10	20,68	1,4173	0,6426	0,0016	0,0042	0,8634	0,0458
2	50	20	10	20,96	1,4398	0,6722	0,0016	0,0035	0,8438	0,0444
3	30	30	10	20,86	1,2517	0,6803	0,0016	0,0048	0,2766	0,0344
4	50	20	10	21,02	1,3921	0,6552	0,0015	0,0029	0,8541	0,0382
5	50	20	10	20,04	1,4173	0,6964	0,0014	0,0044	0,8432	0,0446
6	30	10	10	21,18	1,2938	0,6767	0,0015	0,0039	0,2816	0,0344
7	50	30	5	37,60	2,2259	0,9937	0,0011	0,0032	1,4589	0,0516
8	70	10	10	15,90	1,2320	0,8388	0,0016	0,0049	0,9819	0,0480
9	70	20	15	10,96	0,8499	0,6453	0,0021	0,0066	0,6324	0,0428
10	70	20	5	27,56	2,0687	1,4246	0,0011	0,0029	1,8415	0,0637
11	50	10	5	36,72	2,7060	1,3592	0,0009	0,0025	1,5856	0,0553
12	50	30	15	14,98	1,0524	0,4913	0,0021	0,0036	0,6238	0,0418
13	30	20	15	14,64	0,9342	0,4707	0,0019	0,0055	0,2243	0,0345
14	30	20	5	38,08	2,1220	1,2105	0,0011	0,0021	0,2542	0,0339
15	50	10	15	13,44	1,0187	0,5029	0,0020	0,0055	0,4836	0,0393
16	50	20	10	19,66	1,3443	0,6588	0,0015	0,0035	0,8124	0,0446
17	70	30	10	16,42	1,1478	0,8549	0,0018	0,0049	0,9152	0,0472

4.3.2.1. Matematičko modelovanje i provera modela za mikrotalasnu ekstrakciju herbe industrijske konoplje

Matematičko modelovanje mikrotalasne ekstrakcije herbe industrijske konoplje je urađeno fitovanjem dobijenih eksperimentalnih podataka sa polinomom drugog reda. Koeficijent determinacije, koeficijent varijacije, kao i *p*-vrednosti modela i odstupanja od modela služe za proveru dobijenog matematičkog modela upravo onako kako je opisano u poglavlju 3.5.

U tabeli 12 su dati statistički podaci analize varijansi za proces mikrotalasne ekstrakcije. Na osnovu koeficijenta determinacije većeg od 0,9 se može zaključiti da matematički modeli ispitivanih izlaznih promenljivih pokazuju dobru aproksimaciju eksperimentalnih podataka. Koeficijent varijacije je bio niži od 10% za prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj flavonoida, IC₅₀ vrednost i sadržaj THC-a što ukazuje na mali procenat eksperimentalnih podataka koji nisu mogli biti objašnjeni ovim matematičkim modelom. Koeficijent varijacije je za EC₅₀ i sadržaj CBD-a bio nešto veći od 10% što ukazuje na veći procenat eksperimentalnih podataka koji nisu mogli biti opisani modelom. Kako su *p*-vrednosti modela svih izlaznih parametara manje od 0,01 znači da dobijeni modeli dobro opisuju proces mikrotalasne ekstrakcije. Odstupanje od modela nije značajno za sve izlazne promenjive, sem za prinos ekstrakcije i sadržaj THC-a gde su *p*-vrednosti iznosile 0,0461 i 0,0003 i pokazivale su značajno odstupanja modela. Iako odstupanje od modela pokazuje značajnost, zbog visokog koeficijenta determinacije i niskog koeficijenta varijacije za ove dve promenjive rasipanje eksperimentalnih podataka je model-nezavisna mera čiste greške (Mayers i sar., 2009).

Tabela 12. *Box–Behnken* eksperimentalni dizajn sa parametrima mikrotalasne ekstrakcije i ispitivanim karakteristikama dobijenih ekstrakata herbe industrijske konoplje (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC)

	Zbir kvadrata	DF ^a	Srednji kvadrat	F-vrednost	p-vrednost
Y					
Model	1122,06	9	124,67	98,67	< 0,0001
Ostaci	8,84	7	1,26		
Odstupanje od modela	7,42	3	2,47	6,93	0,0461
Greška	1,43	4	0,36		
Ukupno	1130,9	16			
R ² =0,9922					
CV=5,15%					
TP					
Model	38,54	9	4,28	47,67	< 0,0001
Ostaci	0,63	7	0,09		
Odstupanje od modela	0,097	3	0,032	0,24	0,8633
Greška	0,53	4	0,13		
Ukupno	39,17	16			
R ² =0,9839					
CV=2,29%					
TF					
Model	16,98	9	1,89	16,38	0,0007
Ostaci	0,81	7	0,12		
Odstupanje od modela	0,64	3	0,21	5,1	0,0748
Greška	0,17	4	0,042		
Ukupno	17,79	16			
R ² =0,9547					
CV=4,79%					
IC₅₀					
Model	0,018	9	2,01 × 10 ⁻³	50,67	< 0,0001
Ostaci	2,78 × 10 ⁻⁴	7	3,97 × 10 ⁻⁵		
Odstupanje od modela	1,02 × 10 ⁻⁴	3	3,40 × 10 ⁻⁵	0,78	0,5656
Greška	1,76 × 10 ⁻⁴	4	4,39 × 10 ⁻⁵		
Ukupno	0,018	16			
R ² =0,9849					
CV=4,06%					
EC₅₀					
Model	0,26	9	0,028	12,13	0,0017
Ostaci	0,016	7	2,34 × 10 ⁻³		
Odstupanje od modela	2,85 × 10 ⁻³	3	9,49 × 10 ⁻⁴	0,28	0,8378
Greška	0,014	4	3,38 × 10 ⁻³		
Ukupno	0,27	16			
R ² =0,9397					
CV=11,52					
CBD					
Model	3,41	9	0,38	22,61	0,0002
Ostaci	0,12	7	0,017		
Odstupanje od modela	0,12	3	0,0369	104,28	0,0003
Greška	1,479 × 10 ⁻³	4	3,697 × 10 ⁻⁴		
Ukupno	3,52	16			

R²=0,9667

CV=15,96%

THC					
Model	$9,858 \times 10^{-4}$	9	$1,095 \times 10^{-4}$	13,41	0,0012
Ostaci	$5,717 \times 10^{-5}$	7	$8,167 \times 10^{-6}$		
Odstupanje od modela	$2,058 \times 10^{-5}$	3	$6,861 \times 10^{-6}$	0,75	0,5765
Greška	$3,658 \times 10^{-5}$	4	$9,146 \times 10^{-6}$		
Ukupno	$1,043 \times 10^{-3}$	16			

R²=0,9452

CV=6,53%

^abroj stepeni slobode

Za svaki član matematičkog modela u tabeli 13 su date *p*-vrednosti na osnovu kojih se izdvajaju značajni faktori prema značajnosti opisanoj u poglavlju 3.5. Ulazne promenjive koje značajno utiču na proces ulaze u krajnju formu matematičkog modela datog odziva.

Tabela 13. Odgovarajuće *p*-vrednosti linearnih, interakcijskih i kvadratnih članova (X₁–koncentracija etanola, X₂–vreme ekstrakcije, X₃–odnos droga/rastvarač)

Član	Y	TP	TF	IC ₅₀	EC ₅₀	CBD	THC
Linearni							
X ₁	0,0001	0,0071	0,0002	0,0179	0,0638	<0,0001	<0,0001
X ₂	0,4371	0,0074	0,1021	0,0140	0,1324	0,8781	0,8197
X ₃	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0007
Interakcija							
X ₁ X ₂	0,7919	0,5050	0,8587	0,9329	0,3642	0,8183	0,8897
X ₁ X ₃	0,0188	0,1403	0,0564	0,1984	0,7498	0,0026	0,0069
X ₂ X ₃	0,7776	0,0019	0,0451	0,2876	0,9404	0,3364	0,3124
Kvadratni							
X ₁ ²	0,0034	<0,0001	0,0010	0,1493	0,1141	0,0040	0,0757
X ₂ ²	0,3949	0,3475	0,6295	0,3965	0,0730	0,5946	0,7920
X ₃ ²	<0,0001	0,1478	0,7087	0,3877	0,5423	0,0393	0,0605

Jednačina matematičkog modela prinosa mikrotalasne ekstrakcije herbe industrijske konoplje ima sledeći oblik:

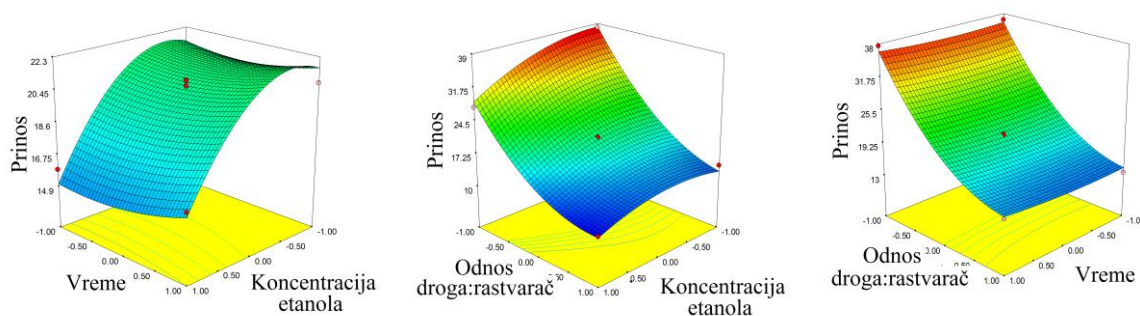
$$Y = 20,47 - 2,99X_1 + 0,33X_2 - 10,74X_3 + 0,21X_1X_2 + 1,71X_1X_3 + 0,16X_2X_3 - 2,38X_1^2 + 0,50X_2^2 + 4,72X_3^2 \quad (22)$$

U tabeli 13 su date *p*-vrednosti linearnih, kvadratnih i interakcijskih članova. Prema dobijenim podacima iz tabele se vidi da linearni i kvadratni član koncentracije etanola, linearni i kvadratni član odnosa droga/rastvarač, kao i interakcija ove dve ulazne promenjive utiču na prinos ekstrakcije herbe industrijske konoplje. Najveći uticaj na prinos ekstrakcije ima odnos droga/rastvarač jer su *p*-vrednosti za oba člana bila manja od 0,0001, što znači da je taj uticaj bio veoma značajan. Linearni i kvadratni član koncentracije etanola su takođe pokazali veoma značajan uticaj na prinos ekstrakcije jer su njihove *p*-vrednosti bile 0,0001 i 0,0034. Interakcija koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač značajno je uticala na prinos ekstrakcije, jer je *p*-vrednost ovog člana bila između 0,01 i 0,05 (0,0188). Stoga se

može zaključiti da su za prinos mikrotalasne ekstrakcije, koncentracija etanola i odnos droga/rastvarač u domenu ispitivanog opsega procesnih parametara dominantni procesni parametri, pa jednačina koja opisuje prinos ove mikrotalasne ekstrakcije ima oblik:

$$Y = 20,47 - 2,99X_1 - 10,74X_3 + 1,71X_1X_3 - 2,38X_1^2 + 4,72X_3^2 \quad (23)$$

Iz jednačine se vidi da oba člana koncentracije etanola, kao i linearni član odnosa droga/rastvarač imaju negativan uticaj na prinos ekstrakcije, dok kvadratni član odnosa droga/rastvarač ima pozitivan uticaj. To ukazuje da se sa povećanjem polarnosti rastvarača prinos ekstrakcije povećava. Sa jedne strane ovo je u skladu sa uticajem rastvarača u klasičnoj ekstrakciji iste sirovine, gde je povećanje polarnosti uticalo na povećane prinosa ekstrakcije. Sa druge strane, povećanje polarnosti rastvarača utiče na povećanje absorpcije mikrotalasa što dalje takođe utiče na povećanje prinosa ekstrakcije (Escribano-Bailon i Santos-Buelga, 2003). Negativan efekat linearnog člana i pozitivan efekat kvadratnog člana odnosa droga/rastvarač ukazuju da će se prinos ekstrakcije smanjivati povećanjem odnosa droga/rastvarač do određene tačke, prevojne tačke, nakon koje će se prinos povećavati. Interakcija ova dva parametra je imala pozitivan uticaj na prinos ekstrakcije, pa se njihovim povećanjem očekuje i povećanje prinosa ekstrakcije. Ovakva zavisnost se može uočiti i sa odzivnih površina za prinos mikrotalasne ekstrakcije datih na slici 46. Sa grafika zavisnosti prinosa u kojima figuriše vreme kao izlazna promenljiva se vidi da vreme nema uticaj na prinos. Sa grafika se ne uočava jasna prevojna tačka uticaja odnosa droga/rastvarač, ali se zapaža nagli pad prinosa sa povećanjem odnosa droga/rastvarač do oko 12,5 mL/g, nakon čega se uticaj ne uočava. Sa grafika zavisnosti prinosa od ispitivanih parametara ekstrakcije se jasno vidi uticaj povećanja prinosa ekstrakcije sa smanjenjem koncentracije etanola, kao i pozitivan uticaj interakcije koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač.



Slika 46. Odzivne površine koje opisuju prinos mikrotalasne ekstrakcije iz herbe industrijske konoplje

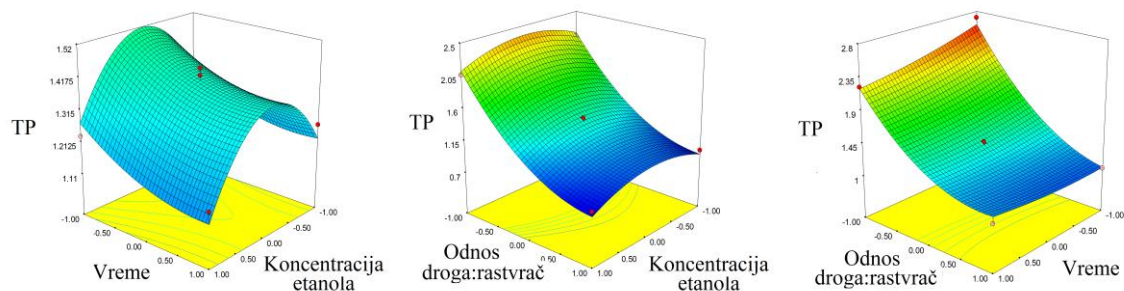
Matematički model koji opisuje ekstrakciju ukupnih fenola primenom mikrotalasa iz herbe industrijske konoplje je dat jednačinom:

$$TP = 1,40 - 0,04X_1 - 0,07X_2 - 0,66X_3 - 0,01X_1X_2 - 7,72 * 10^{-3}X_1X_3 + 0,13X_2X_3 - 0,21X_1^2 + 0,04X_2^2 + 0,31X_3^2 \quad (24)$$

Iz tabele 13, u kojoj su date p -vrednosti članova matematičkog modela, se može videti da na ekstrakciju ukupnih fenola utiču linearni i kvadratni član koncentracije etanola, linearni član vremena ekstrakcije, linearni član odnosa droga/rastvarač i interakcije vremena i odnosa droga/rastvarač. Svi navedeni članovi imaju veoma značajan uticaj na ekstrakciju fenola iz herbe industrijske konoplje jer su p -vrednosti za svaki navedeni član bile manje od 0,01. Uzimajući u obzir značajne članove, jednačina koja opisuje ekstrakcije fenola iz herbe industrijske konoplje prikazuje se sledećom jednačinom:

$$TP = 1,40 - 0,04X_1 - 0,07X_2 - 0,66X_3 + 0,13X_2X_3 - 0,21X_1^2 \quad (25)$$

Linearni i kvadratni član koncentracije etanola negativno utiču na sadržaj fenola, kao i linearni član vremena ekstrakcije i odnosa droga/rastvarač. Negativan uticaj koncentracije etanola ukazuje da povećanjem polarnosti rastvarača dolazi i do povećanja ekstrakcije fenola. Pozitivan uticaj na sadržaj fenola u dobijenim ekstraktima ima interakcija vremena ekstrakcije i odnosa droga/rastvarač, što znači da se povećanjem ova dva faktora i sadržaj fenola povećava. Iako se iz jednačine ne može zapaziti da postoji prevojna tačka uticaja koncentracije etanola, sa grafika zavisnosti sadržaja ukupnih fenola u kojima figuriše koncentracija etanola se jasno vidi da etanol ima pozitivan uticaj do koncentracije etanola od oko 50%, odnosno da povećanjem koncentracije etanola do 50% dolazi do naglog porasta sadržaja ukupnih fenola, dok dalje povećanje koncentracije etanola ima blag uticaj na pad sadržaja ukupnih fenola. Ovo je u skladu sa rezultatima dobijenim u klasičnoj ekstrakciji ove sirovine gde je zapažen isti uticaj promene polarnosti ekstragensa kao i prilikom mikrotalasne ekstrakcije. Etanol koncentracije 50% je naveden i kao najbolji ekstragens za izolovanje fenola iz aronije (*Aronia melanocarpa*) primenom mikrotalasne ekstrakcije (Simić i sar., 2016). Kako voda ima visoku dielektričnu tačku, očekuje se da će povećanje sadržaja vode u ekstragensima prilikom mikrotalasne ekstrakcije uticati pozitivno na izolaciju ciljanih jedinjenja. Međutim, voda ima mali faktor rasipanja pa se kod ekstragensa sa velikim udelom vode javlja pregrevanje ekstrakcione smeše jer dolazi do apsorpcije velike mikrotalasne energije bez mogućnosti rasipanja te toplotne energije. Smanjenje koncentracije fenolnih jedinjenja je moguće kao posledica degradacije ovih jedinjenja usled pregrevanja ekstrakcione smeše (Proestos i Komaitis, 2008). Sa odzivnih površina koji opisuju mikrotalasnu ekstrakciju ukupnih fenola u kojima figuriše odnos droga/rastvarač se jasno može videti da povećanjem odnosa droga/rastvarača sadržaj ukupnih fenola opada. Povećanje sadržaja ukupnih fenola smanjenjem odnosa droga/rastvarač je zapaženo prilikom mikrotalasne ekstrakcije eukaliptusa (*Eucalyptus robusta*) (Bhuyan i sar., 2015).



Slika 47. Odzivne površine koje opisuju mikrotalasnu ekstrakciju ukupnih fenola iz herbe industrijske konoplje

Proces mikrotalasne ekstrakcije flavonoida iz herbe industrijske konoplje je opisan sledećom jednačinom:

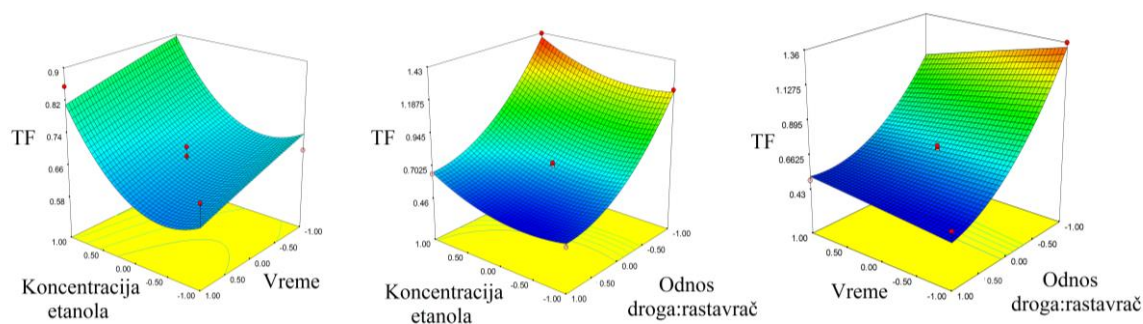
$$TF = 0,66 + 0,09X_1 - 0,04X_2 - 0,36X_3 + 3,13 * 10^{-3}X_1X_2 - 9,85 * 10^{-3}X_1X_3 + 0,09X_2X_3 + 0,10X_1^2 - 1,68 * 10^{-3}X_2^2 + 0,17X_3^2 \quad (26)$$

Linearni i kvadratni član koncentracije etanola, linearni član odnosa droga/rastvarač, interakcija ove dve ulazne promenjive i interakcija odnosa droga/rastvarač i vremena ekstrakcije imaju značajan uticaj na proces ekstrakcije flavonoida (Tabela 13). Uticaj linearnog i kvadratnog člana koncentracije etanola i linearnog člana odnosa droga/rastvarač je veoma značajan jer su njihove p -vrednosti bile manje od 0,01 (0,0002 za linearni član koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač, za koncentraciju etanola 0,0010). Interakcija koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač ima neznatan uticaj jer je njegova p -vrednost 0,0564, odnosno manje je od 0,01, dok interakcija vremena ekstrakcije i odnosa droga/rastvarač ima značajan uticaj na proces ekstrakcije flavonoida jer je p -vrednost bila između 0,01 i 0,05 (0,0451). Korigovana jednačina koja opisuje model procesa ekstrakcije flavonoida, primenjujući uticaj samo značajnih parametara, ima sledeći oblik:

$$TF = 0,66 + 0,09X_1 - 0,36X_3 - 9,85 * 10^{-3}X_1X_3 + 0,09X_2X_3 + 0,10X_1^2 \quad (27)$$

Linearni i kvadratni član koncentracije etanola i interakcije vremena ekstrakcije i odnosa droga/rastvarač imaju pozitivan uticaj na TF, što znači da će njihovo povećanje dovesti do porasta ekstrakcije flavonoida iz herbe industrijske konoplje ukoliko se kao metoda ekstrakcije primeni mikrotalasna ekstrakcije u ispitivanom opsegu parametara. Linearni član odnosa droga/rastvarač i interakcija koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač negativno utiču na ekstrakciju flavonoida iz industrijske konoplje, a njihovim povećanjem sadržaj flavonoida u dobijenim ekstraktima se smanjuje. Sa odzivnih površina koje opisuju mikrotalasnu ekstrakciju ukupnih flavonoida može se zapaziti da je uticaj koncentracije etanola u skladu sa jednačinom do vrednosti koncentracije etanola od oko 50%, odnosno da smanjenje koncentracije etanola utiče na smanjenje sadržaja ukupnih fenola do koncentracije 50%, nakon čega koncentracija etanola nema veći uticaj. Kako dobijeni rezultati nisu u skladu sa rezultatima dobijenim prilikom ispitivanja uticaja polarnosti rastvarača primenom klasične ekstrakcije, moglo bi se zaključiti da je uticaj smanjenja sadržaja flavonoida u

ekstraktima direktna posledica degradacije flavonoida usled povećanja temperature ekstrakcione smeše povećanjem sadržaja vode. Različiti uticaj koncentracije etanola na sadržaj fenola i sadržaj flavonoida prilikom mikrotalasne ekstrakcije ukazuje da su flavonoidi konoplje termolabilnija jedinjenja. Uticaj odnosa droga/rastvarač na sadržaj flavonoida i fenola je isti, odnosno smanjenjem ovog faktora ekstrakcije dolazi do povećanja njihovih sadržaja u mikrotalasnim ekstraktima industrijske konoplje, što se može videti sa slike 48.



Slika 48. Odzivne površine koje opisuju mikrotalasnu ekstrakciju flavonoida iz herbe industrijske konoplje

Uticaj procesnih parametara na antioksidativnu aktivnost, izraženu preko IC_{50} vrednosti, ekstrakata herbe industrijske konoplje koji su dobijeni primenom mikrotalasne ekstrakcije može se opisati matematičkim modelom u formi sledeće jednačine:

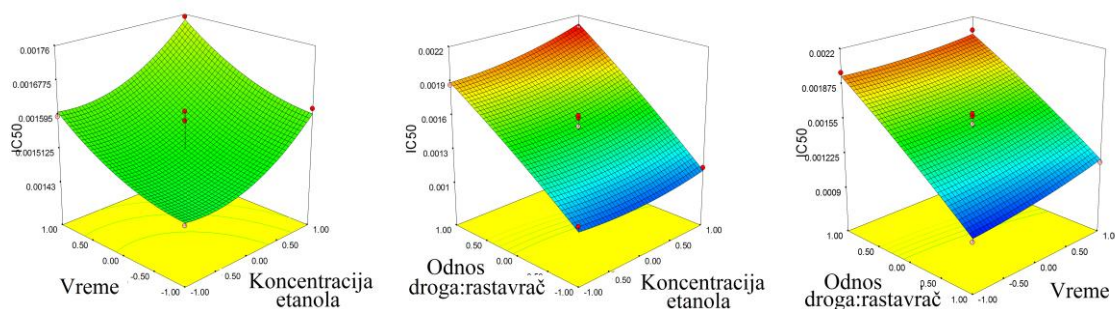
$$\begin{aligned}
 IC_{50} = & 1,53 * 10^{-3} + 6,84 * 10^{-5}X_1 + 7,07 * 10^{-5}X_2 + 4,59 * 10^{-4}X_3 + 2,86 \\
 & * 10^{-6}X_1X_2 + 4,49 * 10^{-5}X_1X_3 - 3,26 * 10^{-5}X_2X_3 + 4,79 \\
 & * 10^{-5}X_1^2 + 2,95 * 10^{-5}X_2^2 - 2,65 * 10^{-5}X_3^2
 \end{aligned} \quad (28)$$

Iz table 13 se vidi da veoma značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakata industrijske konoplje pokazuje samo linearni član odnosa droga/rastvarač čija je p -vrednost $<0,0001$, dok su značajan uticaj imali linearni član koncentracije etanola i vremena ekstrakcije sa p -vrednostima između 0,01 i 0,05 (0,0179 i 0,0140, tim redom). Korigovana jednačina koja opisuje uticaj značajnih procesnih parametara na IC_{50} ekstrakata herbe industrijske konoplje prikazuje se sledećom formom:

$$IC_{50} = 1,53 + 6.84 * 10^{-5}X_1 + 7,07 * 10^{-5}X_2 + 4,59 * 10^{-4}X_3 \quad (29)$$

Sve značajne ulazne promenjive su pozitivno uticale na vrednost IC_{50} , što znači da će njihovo povećanje dovesti do povećanja IC_{50} vrednosti, odnosno do smanjenja antioksidativne aktivnosti ekstrakta, što se može videti i sa slike 49. Sa odzivnih površina koje opisuju antioksidativnu aktivnost ekstrakata dobijenih mikrotalasnom ekstrakcijom herbe industrijske konoplje se može videti da najveći uticaj ima odnos droga/rastvarač, dok vreme ekstrakcije i koncentracija etanola imaju neznatan uticaj. Uticaj vremena ekstrakcije i koncentracije etanola je uočljiv samo na dijagramu zavisnosti antioksidativne aktivnosti od

ova dva parametra na kojem se može videti da antioksidativna aktivnost raste smanjenjem ova dva faktora ekstrakcije. Ovaj uticaj je zanemarljiv u poređenju sa uticajem odnosa droga/rastvarač na kome se vidi da smanjenjem odnosa droga/rastvarač IC_{50} vrednost naglo opada, odnosno da dolazi do povećanja antioksidativne aktivnosti. Ovakav uticaj odnosa droga/rastvarač na antioksidativnu aktivnost ekstrakata je bio očekivan s obzirom na isti uticaj odnosa droga/rastvarač i na sadržaja ukupnih fenola i sadržaj flavonoida koji su jedni od nosioca antioksidativne aktivnosti ekstrakta herbe industrijske konoplje.



Slika 49. Odzivne površine koje opisuju antioksidativnu aktivnost ekstrakata herbe industrijske konoplje koji su dobijeni primenom mikrotalasne ekstrakcije

Uticaj procesnih parametara u mikrotalasnoj ekstrakciji herbe industrijske konoplje na EC_{50} vrednost dobijenih ekstrakata opisana je sledećim matematičkim modelom, odnosno jednačinom:

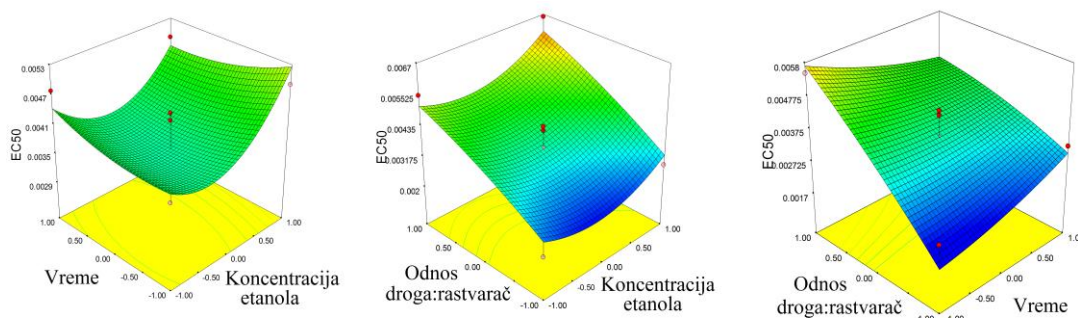
$$\begin{aligned}
 EC_{50} = & 3,69 * 10^{-3} + 3,76 * 10^{-4}X_1 - 3,38 * 10^{-5}X_2 + 1,31 * 10^{-3}X_3 - 2,35 \\
 & * 10^{-4}X_1X_2 + 8,08 * 10^{-5}X_1X_3 - 6,69 * 10^{-4}X_2X_3 + 7,51 \\
 & * 10^{-4}X_1^2 + 1,72 * 10^{-4}X_2^2 - 1,74 * 10^{-4}X_3^2
 \end{aligned} \quad (30)$$

Na EC_{50} vrednost su uticali linearni član koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač, kao i kvadratni član vremena ekstrakcije. Linearni član odnosa droga/rastvarač je pokazao veoma značajan uticaj sa p -vrednošću $<0,0001$, dok su linearni član koncentracije etanola i kvadratni član vremena ekstrakcije pokazali umerenu značajnost sa p -vrednostima između 0,05 i 0,1 (0,0638 i 0,0730, tim redom) (Tabela 13). Uzimanjem u obzir samo značajnih faktora, korigovana jednačina, odnosno matematički model koji opisuje uticaj procesnih parametara u mikrotalasnoj ekstrakciji herbe industrijske konoplje na EC_{50} vrednost ima sledeći oblik:

$$EC_{50} = 3,69 * 10^{-3} + 3,76 * 10^{-4}X_1 + 1,31 * 10^{-3}X_3 + 1,72 * 10^{-4}X_2^2 \quad (31)$$

Sve značajne ulazne varijable imaju pozitivan uticaj na EC_{50} vrednost, što znači da imaju negativan uticaj na reduktivni kapacitet. Stoga, povećanjem ovih ulaznih varijabli, smanjuje se reduktivni kapacitet. Sa slike odzivnih površina (Slika 50) se može zapaziti da najveći uticaj na reduktivnu sposobnost ima odnos droga/rastvarač i da EC_{50} vrednost naglo opada sa smanjenjem odnosa droga/rastvarač, odnosno da dolazi do povećanja reduktivne

spособnost. Ovakav uticaj odnosa droga/rastvarač je zabeležen i kod fenola i flavonida i antioksidativne aktivnosti ekstrakat. Vreme nema uticaj na mikrotalasnu ekstrakciju herbe industrijske konoplje, dok se blag uticaj koncentracije etanola zapaža na dijagramima odzivnih površina za EC₅₀ vrednost u kojima figuriše koncentracija etanola. Sa ovih grafika se može uočiti da postoji prevojna tačka uticaja koncentracije etanola, odnosno da smanjenje koncentracije etanola do 50% utiče na smanjenje EC₅₀ vrednosti, odnosno povećanje reduktivne sposobnosti, dok dalje smanjenje koncentracije etanola utiče na povećanje EC₅₀ vrednosti, odnosno smanjenje reduktivne sposobnosti ekstrakata.



Slika 50. Odzivne površine koje opisuju reduktivnu sposobnost ekstrakata herbe industrijske konoplje koji su dobijeni primenom mikrotalasne ekstrakcije

Ekstrakcija CBD-a i THC-a primenom mikrotalasne ekstrakcije je opisana sledećim jednačinama:

$$CBD = 0,84 + 0,42X_1 - 7,28 * 10^{-3} X_2 - 0,40X_3 - 0,02X_1X_2 - 0,29X_1X_3 + 0,07X_2X_3 - 0,26X_1^2 + 0,04X_2^2 + 0,16X_3^2 \quad (32)$$

$$THC = 0,04 + 8,07 * 10^{-3} X_1 - 2,39 * 10^{-4} X_2 - 5,75 * 10^{-3} X_3 - 2,06 * 10^{-4} X_1X_2 - 5,40 * 10^{-3} X_1X_3 + 1,56 * 10^{-3} X_2X_3 - 2,9 * 10^{-3} X_1^2 + 3,82 * 10^{-4} X_2^2 + 3,11 * 10^{-3} X_3^2 \quad (33)$$

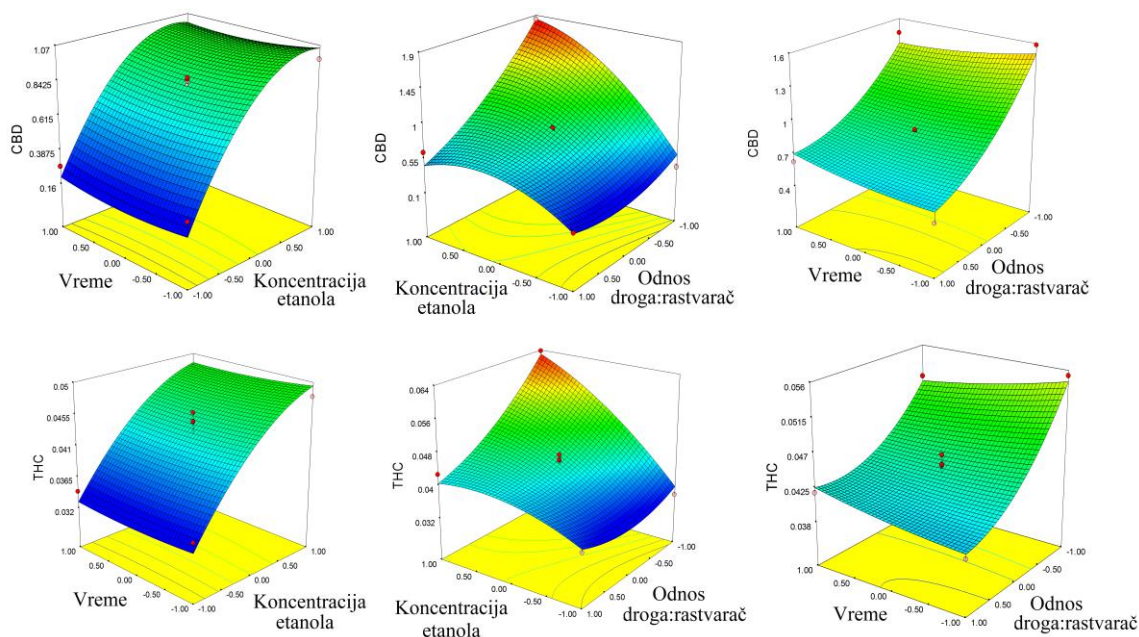
Ulazne promenjive koje imaju uticaj na proces ekstrakcije i CBD-a i THC-a iz herbe industrijske konoplje su linearni i kvadratni član koncentracije etanola, linearni i kvadratni član odnosa droga/rastvarač i član koji opisuje interakciju ove dve promenjive. Uticaj linearnih članova koncentracije temperature i odnosa droga/rastvarač, kao i član interakcije ova dve promenjive su imale veoma značajan uticaj na ekstrakciju oba ispitivana kanabinoida. Za linearni član koncentracije etanola za CBD i THC i linearni član odnosa droga/rastvarač za CBD p -vrednosti je $<0,0001$, dok je za linearni član odnosa droga/rastvarač za THC $0,0007$, a za interakcijski član za THC $0,0069$. Kvadratni član koncentracije etanola za CBD takođe ima veoma značajan uticaj i njegova p -vrednost je $0,0040$, dok kvadratni član odnosa droga/rastvarač za CBD ima značajan uticaj sa p -vrednošću između $0,01$ i $0,05$. Kvadratni članovi koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač, prema podacima iz tabele 13, imaju neznatan mali uticaj na ekstrakciju THC-a. Na osnovu podataka o značajnim procesnim parametrima koji utiču na proces

mikrotalasne ekstrakcije CBD-a i THC-a iz herbe industrijske konoplje, korigovana jednačina koja opisuje ovaj proces može se prikazati na sledeći način:

$$CBD = 0,84 + 0,42X_1 - 0,40X_3 - 0,29X_1X_3 - 0,26X_1^2 + 0,16X_3^2 \quad (34)$$

$$THC = 0,04 + 8,07 * 10^{-3}X_1 - 5,75 * 10^{-3}X_3 - 5,40 * 10^{-3}X_1X_3 - 2,9 * 10^{-3}X_1^2 + 3,11 * 10^{-3}X_3^2 \quad (35)$$

Linearni član koncentracije etanola i kvadratni član odnosa droga/rastvarač pokazuju pozitivan uticaj na proces ekstrakcije CBD-a i THC-a. Linearni član odnosa droga/rastvarač, interakcija koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač i kvadratni član koncentracije etanola pokazuju negativan uticaj na ekstrakciju CBD-a i THC-a. Iz ovoga se može zaključiti da će povećanje koncentracije etanola imati pozitivan uticaj na sadržaj CBD-a i THC-a do određene tačke koja je približna maksimalnoj ispitivanoj vrednosti koncentracije etanola, nakon čega će početi da opada, dok će povećanje odnosa droge/rastvarača imati negativan uticaj na sadržaj CBD-a i THC-a do određene tačke koja je blizu maksimalne ispitivane vrednosti odnosa droga/rastvarač, nakon čega počinje da raste. Povećanjem oba faktora dolazi do smanjenja sadržaja kanabinoida u dobijenim ekstraktima. Na osnovu dobijenih matematičkih modela može se zaključiti da na proces ekstrakcije CBD-a i THC-a ulazne promenljive utiču isto što se može videti i sa slike 51. Sa slike koje predstavljaju odzivne površine za sadržaj ispitivanih kanabinoida se vidi da vreme ekstrakcije nema značajan uticaj. Uticaj etanola, kao što je opisano kroz jednačinu procesa ekstrakcije CBD-a i THC-a, je pozitivan do koncentracije etanola od oko 65%, to znači da će sa povećanjem koncentracije etanola do skoro maksimalne ispitivani sadržaj CBD-a i THC-a rasti naglo, dok će se daljim povećanjem beleži blagi pad. Povećanje sadržaja kanabinoida sa smanjenjem polarnosti rastvarača je očekivano, jer je njihova rastvorljivost veoma mala u polarnim rastvaračima (Ramirez i sar., 2018). Uticaj odnosa droga/rastvarač se jasno vidi sa dijagrama zavisnosti kanabinoida od vremena i odnosa droga/rastvarač. Povećanje odnosa droga/rastvarač do vrednosti od 1:12,5 utiče na naglo smanjenje sadržaja kanabinoida. Daljim povećanjem odnosa droga/rastvarač zapaža se blag porast sadržaja kanabinoida. Najveći uticaj na sadržaj kanabinoida mikrotalasnim ekstraktima herbe industrijske konoplje ima interakcija koncentracije etanola i odnosa droga/rastvarač. Povećanjem koncentracije etanola u kombinaciji sa smanjenjem odnosa droga/rastvarač izaziva naglo povećanje sadržaja kanabinoida.



Slika 51. Odzivne površine koje opisuju mikrotalasnu ekstrakciju kanabinoida (CBD i THC) iz herbe industrijske konoplje

Analiza varijansi je pokazala da su koncentracija etanola, kao i odnos droga/rastvarač veoma značajni parametri mikrotalasne ekstrakcije herbe industrijske konoplje sorte Helena za sve ispitivane karakteristike ekstrakata. Koncentracija etanola pokazala je negativan uticaj na prinos ekstrakcije, dok je na sadržaj ukupnih fenola, antioksidativnu aktivnost i reduktivnu sposobnost koncentracija etanola imala pozitivan uticaj do srednje ispitivane koncentracije etanola (50%), a daljim povećanjem koncentracije se javlja negativan uticaj. Sadržaj flavonoida i sadržaj ispitivanih kanabinoida je rastao sa povećanjem koncentracije etanola. Odnos droga/rastvarač ima negativan uticaj na sve izlazne promenjive što znači da najmanja vrednost odnosa droga/rastvarač pogoduje mikrotalasnoj ekstrakciji u pogledu svih ispitivanih karakteristika dobijenih ekstrakata.

Poređenjem vrednosti izlaznih promenjivih ekstrakata herbe industrijske konoplje dobijenih ekstrakcijom metodom maceracije, ultrazvučne ekstrakcije i mikrotalasne ekstrakcije može se zaključiti da je mikrotalasna ekstrakcija pogodnija metoda izolovanje bioaktivnih jedinjenja iz herbe industrijske konoplje sorte Helena. Najveći dobijen prinos mikrotalasne ekstrakcije je bio oko 3 puta veći od najviše vrednosti prinosa maceracije i oko 2 puta veći od najviše vrednosti prinosa ultrazvučne ekstrakcije. Sadržaj ukupnih fenola u mikrotalasnim ekstraktima je bio oko 2,5 puta viši u poređenju sa sadržajem ukupnih fenola u ekstraktima dobijenim maceracijom, dok je u odnosu na ekstrakte dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom bio oko 1,5 puta veći. Sadržaj flavonoida u ekstraktima dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom u poređenju sa sadržajem flavonoida u ekstraktima dobijenim maceracijom i ultrazvučnom ekstrakcijom bio 4 i 2 puta veći, tim redom. Nešto niže IC_{50} i EC_{50} vrednosti su dobijeni u mikrotalasnim ekstraktima u poređenju sa ultrazvučnim, dok su u odnosu na ekstrakte dobijene maceracijom bile niže 2,5-3 puta. Sadržaj CBD-a u ekstraktima dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom je u odnosu na optimalan ekstrakt

maceracije bio oko 4 puta viši, dok je u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju bio oko 2 puta viši. Sadržaj THC-a se nije značajno povećao.

4.3.2.2. Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije herbe industrijske konoplje

Optimizacija mikrotalasne ekstrakcije je urađena kao i u slučaju ultrazvučne ekstrakcije, u zavisnosti od željenih karakteristika dobijenog ekstrakta. Prema ovoj analizi optimalni uslovi ekstrakcije za dobijanje ekstrakta sa maksimalnim prinosom, maksimalnim sadržajem ukupnih fenola i flavonoida, minimalnom IC_{50} i EC_{50} vrednošću u domenu ispitivanih parametara su koncentracija etanola 47,60%, vreme ekstrakcije 10 minuta i odnos droga/rastvarač 1:5. Predviđene vrednosti ispitivanih izlaznih promenljivih u ekstraktu pripremljenom na ovim uslovima su: 33,66% za prinos ekstrakcije, 2,6093 mg EGK/mL za ukupne fenole, 1,3221 mg EK/mL za flavonoide, 0,0009 mL/mL i 0,0017 mL/mL za IC_{50} i EC_{50} .

Kada se želi dobiti ekstrakt herbe industrijske konoplje sa maksimalnim sadržajem CBD-a neophodno je primeniti sledeće uslove mikrotalasne ekstrakcije: koncentracija etanola 67%, vreme ekstrakcije 10 minuta i odnos droga/rastvarač 1:5,1. Predviđene vrednosti CBD-a i THC-a u ekstraktu pripremljenom na ovim uslovima su 1,8895 mg/mL i 0,0634 mg/mL, tim redom. Sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktu dobijenim na ovim uslovima bi bio 2,1192 mg EGK/mL i 1,0753 mg EK/mL. IC_{50} vrednost je bila 0,0004 mL/mL, dok je EC_{50} vrednost iznosila 0,0020 mL/mL.

Optimalni uslovi za pripremu ekstrakata, primenom mikrotalasa, sa maksimalnim sadržajem CBD-a i minimalnim sadržajem THC-a su koncentracija etanola od 47%, vreme ekstrakcije od 10 min i odnos droga/rastvarač 1:5. Pod ovim uslovima, predviđene vrednosti CBD-a i THC-a su: 1,1504 mg/mL i 0,0474 mg/mL. Vrednosti ostalih izlaznih promenljivih bi bile 32,02% za prinos ekstrakcije, 2,1557 mg EGK/mL za sadržaj ukupnih fenola, 0,9866 mg EK/mL, 0,0010 mL/mL za IC_{50} i 0,0025 mL/mL za EC_{50} .

Optimalni uslovi ekstrakcije za sve izlazne promenjive, prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, antioksidativna aktivnost i reduktivna sposobnost, kao i sadržaj kanabinoida su koncentracija etanol 47%, vreme ekstrakcije 10 minuta i odnos droga/rastvarač 1:5.

Validacija matematičkog modelovanje mikrotalasne ekstrakcije je izvršena pripremom ekstrakta na definisanim optimalnim uslovima za maksimalan prinos, maksimalan sadržaj ukupnih fenola i flavonoida i minimalne vrednosti IC_{50} i EC_{50} . U dobijenom ekstraktu su određene su izlazne promenjive i dobijene su sledeće vrednosti: 30,94% prinos, sadržaj ukupnih fenola 2,1192 mg EGK/mL, sadržaj flavonoida 1,0753 mg EK/mL, IC_{50} vrednost 0,0004 mL/mL i EC_{50} vrednost 0,0020 mL/mL. Sve eksperimentalno dobijene vrednosti izlaznih promenljivih odgovaraju vrednostima predviđanja sa intervalom pouzdanosti od 95% za predviđeni model, sa zanemarljivim odstupanjima. Za iste optimalne uslove određeni su i sadržaj CBD-a i THC-a i njihov sadržaj je bio 1,0420 mg/mL, odnosno 0,0430 mg/mL.

4.3.3. Ekstrakcija herbe industrijske konoplje vodom u subkritičnom stanju

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju se do sada koristila za ekstrakciju različitih jedinjenja iz biljnog materijala poput: ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) (Ibanez i sar., 2003), rtanjskog čaj (*Satureja hortensis*) (Vladić i sar., 2017), očajnice (*Marrubium vulgare*) (Gavarić i sar., 2019), nane (Kuvatova i sar., 2001), karanfilića (*Syzygium aromaticum*) (Clifford i sar., 1999), origana (*Origanum vulgare*) (Soto Ayala i Luque de Castro, 2001), komorača (*Foeniculum vulgare*) (Gamiz-Garcia i Luque de Castro, 2000). U ovoj doktorskoj disertaciji ekstrakcija herbe industrijske konoplje vodom u subkritičnom stanju rađena je uz variranje dominantnog parametra procesa—temperature, u opsegu od 120 do 220 °C, pri konstantnom pritisku od 30 bar i vremenu od 10 minuta. U dobijenim ekstraktima ispitan je, baš kao i u slučaju prethodne dve ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola i flavonoida, antioksidativna aktivnost i reduktivni kapacitet, kao i sadržaj CBD-a i THC-a.

Eksperimentalni podaci za ulazne i izlazne promenjive su dati u tabeli 14. Podaci iz tabele pokazuju da je prinos ekstrakcije herbe industrijske konoplje subkritičnom vodom bio u opsegu od 21,59 do 32,41%. Najniži prinos je dobijen u ekstraktu dobijenom na temperaturi ekstrakcije od 120 °C i rastao je povišenjem temperature do 200 °C nakon čega je, daljim povišenjem temperature do 220 °C, zapažen pad prinosa. Opadanje prinosa na temperaturi od 220 °C je moguće kao posledica degradacije nekih ekstrahovanih komponenti na toj temperaturi. U velikom broju studija se navodi da se degradacija komponenti prilikom ekstrakcije subkritičnom vodom dešava upravo na temperaturi od 220 °C i višoj (Holliday i sar., 1997; Sasaki i sar., 2000; Khuwijitjaru i sar., 2004; Lamoolphak i sar., 2006; Sereewatthanawut i sar., 2007), što je u skladu sa rezultatima uočenim i u ovom istraživanju.

Sadržaj ukupnih fenola, u ekstraktima konoplje dobijenim primenom vode u subkritičnom stanju je bio u opsegu od 1,0025 do 2,2602 mg EGK/mL, dok se sadržaj flavonoida kretao u opsegu od 0,4776 do 0,8115 mg EGK/mL. Sadržaj ukupnih fenolna i flavonoida je rastao sa povišenjem temperature i svoju najveću vrednost dostigao je na najvišoj primenjenoj temperaturi ekstrakcije 220 °C. Na svim ispitivanim temperaturama do 200 °C sadržaj ukupnih fenola se statistički razlikovao, dok na temperaturi od 200 i 220 °C statistički značajna razlika u pogledu sadržaja flavonoida u ekstraktima ne postoji. Povećanje sadržaja fenola porastom temperature u ekstrakciji subkritičnom vodom je uočeno i u slučaju još nekih biljnih sirovina. Zeković i sar. (2014) ispitali su uticaj različitih procesnih parametara subkritične ekstrakcije korijandera (*Coriandrum sativum*) i uočili da u okviru ispitivane temperature od 100 do 200 °C sadržaj ukupnih fenola i flavonoida raste sa povećanjem temperature, pri čemu je najviši sadržaj dobijen u ekstraktu na najvišoj ispitivanoj temperaturi. He i sar. (2012) su ispitivali uticaj temperature u opsegu od 80 do 280 °C na subkritičnu ekstrakciju fenola iz nara (*Punica granatum*). Sadržaj ukupnih fenola u subkritičnim ekstraktima nara je rastao od 80 do 220 °C nakon čega je počeo da opada. Povišenjem temperature subkritične ekstrakcije dolazi do pada dielektrične konstante vode i na temperaturi od 220 °C vrednost dielektrične konstante vode iznosi 31, što je vrednost koja je približna vrednosti dielektrične konstante etanola (25) i metanola (33) (Åkerlöf, 1932; Fernández i sar., 1997).

IC₅₀ i EC₅₀ vrednosti su se smanjivale sa porastom temperature i iznosile su od 0,0006 do 0,0017 mL/mL i od 0,0014 do 0,0058 mL/mL, tim redom. Ovo znači da sa porastom temperature subkritične ekstrakcije dolazi do povećanja antioksidativne aktivnosti i reduktivne sposobnosti ekstrakata, što je u korelaciji sa povećanjem sadržaja fenola i flavonoida u ekstraktima. Koeficijenti korelacije za antioksidativnu aktivnost sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida iznose 0,9215 i 0,9602, tim redom, dok koeficijenti korelacije za reduktivnu sposobnost sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida iznose 0,8810 i 0,9603, tim redom.

Sadržaj fenola i flavonoida u ekstraktima herbe industrijske konoplje sorte Helena dobijenih subkritičnom ekstrakcijom je veći od sadržaja u ekstraktima dobijenim maceracijom oko 2 puta, dok je u ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom veći 1,2 puta. U poređenju sa rezultatima mikrotalasne ekstrakcije iste sirovine zaključuje se da je sadržaj fenola u ekstraktima dobijenim subkritičnom ekstrakcijom i mikrotalasnom ekstrakcijom približan, dok je sadržaj flavonoida u ekstraktima dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom veći za oko 1,5 puta.

Povećan sadržaj fenola i flavonoida u odnosu na maceraciju i ultrazvučnu ekstrakciju, kao i veća antioksidativna aktivnost i reduktivna sposobnost u subkritičnim ekstraktima je moguća posledica nastanka novih fenola. Naime, na osnovu do sada objavljenih studija utvrđeno je da fenolna jedinjenja poput fenolnih kiselina mogu nastati degradacijom lignina, celuloze i hemiceluloze (Wiboonsiriku i sar., 2007; Wiboonsirikul i sar., 2008). Usled primene visokih temperatura u subkritičnoj ekstrakciji dolazi do raskidanja veza između fenola i polisaharida i proteina u ovim molekulima i na taj način dolazi do oslobađanja fenola (Kim and Mazza, 2006). Lignin, celuloza i hemiceluloza su prisutni u vlaknima i semenu konoplje. Povećanje sadržaja fenola kao posledica razgradnje lignina uočena je i u istraživanju grupe autora koji su ispitivali uticaj temperature na subkritičnu ekstrakciju pirinčanih mekinja (Pourali i sar., 2010). Prema studiji Pourali i sar. (2010) sadržaj fenola u subkritičnim ekstraktima pirinčanih mekinja je rastao na temperaturi od 150 do 220 °C nakon čega je daljim povećanjem temperature ostao konstantan. Neke od fenolnih kiselina koje su nastale kao posledica razgradnje lignina pirinčanih mekinja su kafena, ferulna, galna, sinapinska, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzoeva, siringiska, vanilinska i druge.

Sadržaj CBD-a u dobijenim ekstraktima je bio u opsegu od 0,0039 do 0,0183 mg/mL, dok THC nije bio u granicama detekcije. Najviši sadržaj CBD-a dobijen je prilikom ekstrakcije na temperaturi od 140 °C i nije se statistički značajno razlikovao od sadržaja dobijenog u ekstraktu na temperaturi od 160 °C. Sadržaj CBD-a u ekstraktima dobijenim subkritičnom ekstrakcijom je manji u odnosu na sve ispitivane ekstrakcije i to oko 20 puta od sadržaja optimalnog ekstrakta klasične ekstrakcije, oko 50 puta od sadržaja u ultrazvučnim ekstraktima i oko 100 puta od sadržaja u ekstraktima dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom. Wianowska i sar. (2015) su ispitivali uticaj temperature i vremena Soxhlet ekstrakcije i ekstrakcije rastvaračima pod povišenim pritiskom na ekstrakciju THCA i njegovu dekarboksilaciju do THC-a i dalju oksidaciju do CBN-a. Iako su koristili visoku temperaturu (150 °C) u PLE dekarboksilacija THCA je bila veoma niska, a samim tim i dalja

transformacija do CBN-a. Nizak sadržaja CBD-a, kao i THC-a, koji nije bio u granicama detekcije, u dobijenim subkritičnim ekstraktima herbe industrijske konoplje u odnosu na druge upotrebene ekstrakcije najverovatnije je posledica niske dekarboksilacije kanabinoidnih kiselina u njihove odgovarajuće dekarboksilovane oblike pri uslovima povišenog pritiska i temperature, kako je to navedeno i u studiji kod Wianowska i sar. (2015) koji su primenili PLE.

Tabela 14. Uticaj temperature ekstrakcije herbe industrijske konoplje subkritičnom vodom na izlazne promenjive (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀, CBD i THC)

T [°C]	Y [%]	TP [mg EGK/mL]	TF [mg EK/mL]	IC ₅₀ [mL/mL]	EC ₅₀ [mL/mL]	CBD [mg/mL]
120	21,59±0,11 e	1,0025±0,0303 f	0,4776±0,0050 e	0,0017±0,0001 a	0,0058±0,0000 a	0,0145±0,0014 ab
140	24,44±0,28 d	1,2787±0,0326 e	0,5843±0,0065 d	0,0012±0,0001 b	0,0038±0,0001 b	0,0183±0,0025 a
160	27,02±0,62 c	1,5786±0,0068 d	0,6703±0,0136 c	0,0011±0,0001 b	0,0025±0,0000 c	0,0156±0,0074 a
180	29,71±0,29 b	1,7335±0,0584 c	0,7183±0,0079 b	0,0009±0,0000 c	0,0021±0,0000 d	0,0138±0,0017 ab
200	32,41±1,23 a	2,0963±0,1022 b	0,7878±0,0144 a	0,0008±0,0001 cd	0,0016±0,0001 e	0,0063±0,0015 bc
220	29,49±0,19 b	2,2602±0,0416 a	0,8115±0,0129 a	0,0006±0,0001 d	0,0014±0,0000 f	0,0039±0,0002 c

Rezultati eksperimenata koji su postavljeni radi ispitivanja uticaja vremena ekstrakcije subkritičnom vodom na sadržaj CBD-a u ekstraktima herbe industrijske konoplje, na optimalnoj temperaturi za ekstrakciju CBD-a, dati su u tabeli 15.

Tabela 15. Uticaj vremena subkritične ekstrakcije na sadržaj CBD

Vreme [min]	5	10	15	30	40
CBD [mg/g]	0,0210±0,0092 a	0,0183±0,0025 a	0,0184±0,0037 a	0,0142±0,0053 a	0,0138±0,0003 a

Vreme nije imalo statistički značajan uticaj na sadržaj CBD-a u ekstraktima herbe industrijske konoplje dobijeni subkritičnom ekstrakcijom (Tabela 15).

4.3.4. Ekstrakcija herbe industrijske konoplje ugljendioksidom u superkritičnom stanju

Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju se, kao i *Soxhlet* ekstrakcija, upotrebljava za ekstrakciju nepolarnih jedinjenja i do sada je superkritična ekstrakcija upotrebena za ekstrakciju velikog broja različitih nepolarnih klasa jedinjenja kao što su karotenoidi, lipidi, aromatična jedinjenja, steroli, triterpeni, alkaloidi, mikotoksini i drugi (Modey i sar., 1996). Još uvek samo mali broj visokokvalitetnih ekstrakata danas se proizvodi superkritičnim ugljendioksidom na industrijskom nivou (Eggers, 2012). Razlog ovoga su pre svega visoki ekonomski troškovi procesne opreme, kao i zakoni koji još uvek dozvoljavaju rezidue rastvarača u farmaceutskim proizvodima (Ramirez i sar., 2018).

Ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju kao savremena metoda ekstrakcije je do sada upotrebena za izolovanje ulja iz semena konoplje (Da Porto i sar., 2012; Aladić i sar., 2015; Devi i Khanam, 2019), za izolovanje kanabinoida iz različitih delova konoplje

(Rovetto i Aieta, 2017; Brighenti i sar., 2017; Ribeiro Grijó i sar., 2019;), kao i za izolovanje aromatičnih jedinjenja iz industrijske konoplje (Da Porto i sar., 2014; Naz i sar., 2017). Perrotin-Brunell i sar. (2010) su ispitivali rastvorljivost kanabinoida (THC, CBD, CBN i CBG) u superkritičnom ugljendioksidu na različitim vremenima i temperaturama. Utvrdili su da rastvorljivost ispitivanih kanabinoida opada u sledećem nizu THC<CBG<CBD<CBN. U ovoj studiji je takođe utvrđeno da se rastvorljivost CBD-a i THC-a u ugljendioksidu u superkritičnom stanju povećava sa povećanjem upotrebljenog pritiska. Sa druge strane, terpeni prisutni u konoplji imaju najveću rastvorljivost na pritiscima nižim od pritiska najviše rastvorljivosti kanabinoida pa je na osnovu pritiska moguće izvršiti njihovo frakcionisanje (Da Porto i sar., 2014). Whittle i sar. (2008) su patentirali postupak dobijanja farmaceutski aktivnih oblika kanabinoida ekstrakcijom ugljendioksidom u superkritičnom stanju. Postupak patenta se sastoji od nekoliko koraka. U prvom koraku se vrši zagrevanje na temperaturi od 100 do 150 °C radi dekarboksilacije kanabinoidnih kiselina. Drugi korak patenta podrazumeva ekstrakciju ugljendioksidom u superkrtičnom stanju na pritisku od 600 bar i temperaturi od 35 °C u toku 4 h, iako druge kombinacije pritiska u opsegu od 60-600 bar i temperature u opsegu 10-35°C mogu biti upotrebljene. Treći i završni koraka patenta podrazumeva precipitaciju balastnih materija, voskova, na temperaturi od -20 u trajanju od 24 h. Uticaj različitih procesnih parametara superkrtične ekstrakcije kao što su pritisak, inicijalni sastav upotrebljenog biljnog materijala, vreme i upotreba etanola kao ko-rastvarača je ispitan prilikom ekstrakcije lišća i pupoljaka industrijske konoplje (Rovetto i Aieta, 2017). Ispitivani pritisak je bio u opsegu od 170 do 340 bar na temperaturi od 55 °C sa protokom ugljendioksida od 200 g/min. Prinos ekstrakcije je rastao sa porastom pritiska i najveći prinos je dobijen na pritisku od 340 bar bez upotrebe ko-rastvarača. Brighenti i sar. (2017) su ispitivali četiri različite metode za ekstrakciju nepsihaktivnih kanabinoida, dinamičnu maceraciju, ultrazvučnu ekstrakciju, mikrotalasnu ekstrakciju i ekstrakciju ugljendioksidom u superkrtičnom stanju, kako je već prethodno navedeno. Kao najadekvatnija ekstrakcija za dobijanje visokog sadržaja dekarboksilovanih kanabinoida je navedena mikrotalasna ekstrakcija, dok su ekstrakti dobijeni ultrazvučnom ekstrakcijom, kao i ekstrakcijom ugljendioksidom u superkrtičnom stanju imali najmanji sadržaj CBDA, CBD i CBGA. Kitryte i sar. (2017) su ispitivali uticaj temperature i pritiska na proces ekstrakcije ugljendioksidom u superkrtičnom stanju iz biljnog materijala konoplje koji je sadržao listove, delove cveta i nezrelo seme. Temperatura i pritisak ekstrakcije ugljendioksidom u superkrtičnom stanju su bili u opsegu od 35 do 75 °C i od 100 do 500 bar. Najveći prinos ekstrakcije (8,3%) je dobijen prilikom ekstrakcije na najvišim ispitivanim vrednostima i temperature i pritiska. Sadržaj CBD i CBDA u dobijenom ekstraktu je iznosio 28% što predstavlja 93% dostupnog CBD i CBDA u sirovini.

Prinos ekstrakcije herbe industrijske konoplje sorte Helena ugljendioksidom u superkrtičnom stanju dat je u tabeli 16. Prinos ekstrakcije se kretao u opsegu od 0,33 do 7,13%. Prinos ekstrakcije je povećanjem pritiska pri konstantnoj temperaturi rastao, pa je tako za temperaturu ekstrakcije od 40 °C bio u opsegu od 1,57 do 5,20%, za temperaturu ekstrakcije od 50°C u opsegu od 0,78 do 5,71% i za temperaturu ekstrakcije od 60 °C u opsegu od 0,33 do 7,13%. Povećanje prinosa ekstrakcija sa povećanjem pritiska je uočeno u nekoliko studija u kojima je ispitan uticaj pritiska na prinos superkrtične ekstrakcije, kako

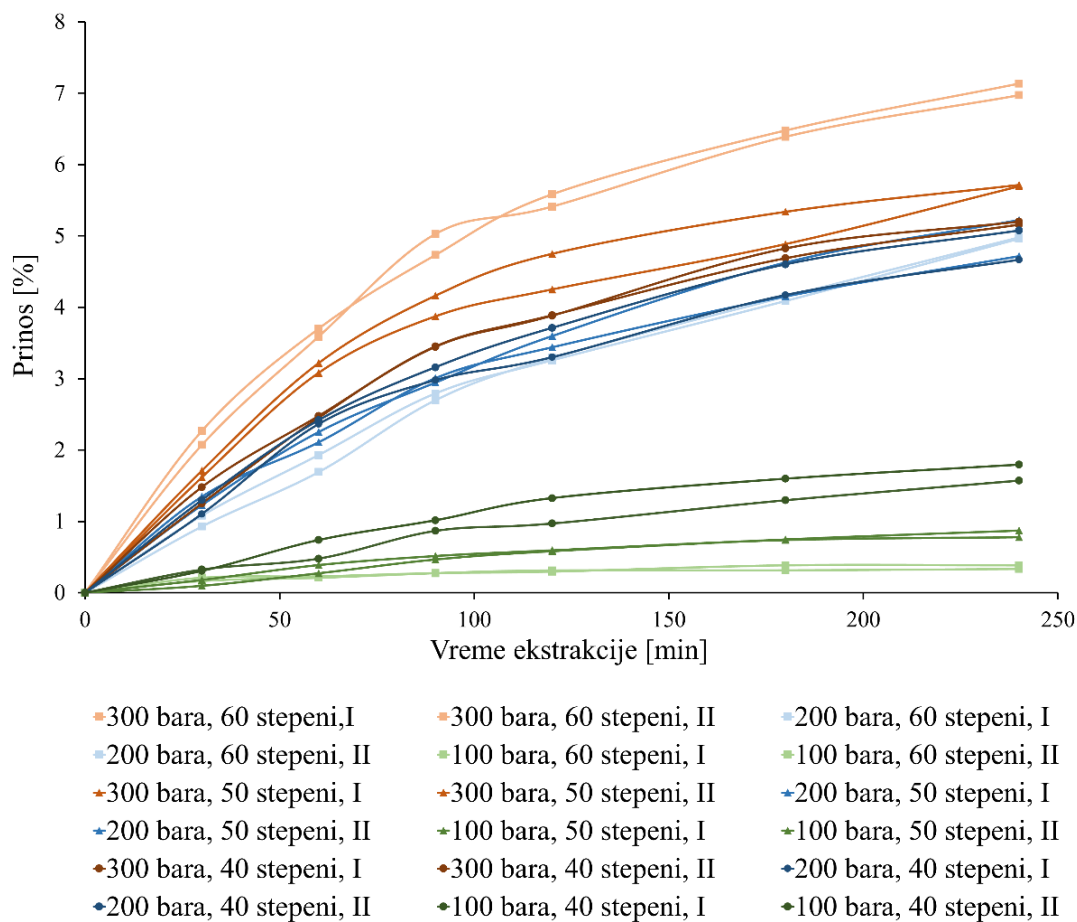
prilikom ekstrakcije ulja iz semena industrijske konoplje (Aladić i sar., 2015), tako i prilikom ekstrakcije kanabinoida iz biljne sirovine koja se sastojala iz lista, cvetnih fragmenata i nezrelog semena industrijske konoplje (Kitryte i sar., 2015) i kanabinoida iz cvetova različitih sorti industrijske konoplje (Rovetto i Aieta, 2017). Gustina i dielektrična konstanta, a samim tim i solvaciona moć supekritičnog ugljendioksida zavisi od primenjenog pritiska i temperature kako je prikazano na Slici 22 u delu Uvod ove doktorske disertacije. Sa slike 22 se može videti da povećanjem pritiska pri konstantnoj temperaturi naglo raste gustina i moć rastvorljivosti superkritičnog ugljendioksida pa je ovakva promena osobina supekritičnog ugljendioksida najverovatniji uzrok povećanja prinosa pri višim vrednostima pritiska. Prinos superkritične ekstrakcije sporednog proizvoda dobijenog prilikom proizvodnje vlakana različitih uzoraka industrijske konoplje je bio u opsegu od 0,12 do 1,57% a najveći je ostvaren prilikom ekstrakcije na najvišem upotrebljenom pritisku (400 bar) i temperaturi (65 °C) (Attard i sar., 2018). Prinos superkritične ekstrakcije iz listova i pupoljaka industrijske konoplje je bio od 7,40 do 18,50% (Rovetto i Aieta, 2017). Prinos superkritične ekstrakcije iz cvasti industrijske konoplje na pritisaku u opsegu od 150 do 330 bar, temperaturi od 40 do 80 °C, uz dodatak etanola kao ko-rastvarača (0-5%) je bio u opsegu od 4,83 do 26,36%, a najviši je ostvaren ekstrakcijom sledećih procesnih parametara: 330 bar, 40 °C, 5% etanol (Gallo-Molina i sar., 2019). Prinos ekstrakcije dobijen u ovoj doktorskoj disertaciji je u skladu sa literaturom. Naime, u poređenju sa prinosom ekstrakcije sporednog proizvoda prilikom proizvodnje vlakana, prinos ekstrakcije herbe industrijske konoplje je veći oko 4 puta, dok je prinos u odnosu na prinos ekstrakcije iz biljnog materijala koji se sastojao iz listova i pupoljke, kao i iz cvasti konoplje, niži oko 2,5 i 3,5 puta, tim redom. Prinos ekstrakcije zavisi od dela biljke koji se ekstrahuje, a može da varira i u zavisnosti od same biljke, tj. varijeteta biljke, lokaliteta i uslova gajenja (Rovetto i Aieta, 2017).

Uticaj temperature pri konstantnom pritisku je različit za različite pritiske. Pri pritisku od 100 bar porast temperature ima negativan uticaj na prinos ekstrakcije, pa je najveći prinos ostvaren na temperaturi od 40 °C 1,57%, na temperaturi od 50 °C 0,78%, dok je na najvišoj temperaturi u okviru datog eksperimenta iznosio 0,33%. Pri pritisku od 200 bar promena temperature nije imala veći uticaj na prinos ekstrakcije i dobijene vrednosti prinosa ekstrakcije su se kretale od 4,66 do 5,22%. Pri konstantnom pritisku od 300 bar povećanjem temperature dolazi do povećanja prinosa ekstrakcije. Najveći prinos ekstrakcije je dobijen pri ekstrakciji na pritisku od 300 bar i 60 °C i iznosio je 7,13%. Povećanje prinosa ekstrakcije različitih delova biljke industrijske konoplje povećanjem temperature je navedeno u nekoliko studija (Kitryte i sar., 2017; Attard i sar., 2018), ali je takođe uočeno i da je najveći prinos ekstrakcije dobijen na najnižoj upotrebljenoj temperaturi (40 °C) (Gallo-Molina i sar., 2019).

Tabela 16. Uticaj ulaznih parametara, temperature i pritiska ekstrakcije, na prinos superkritične ekstrakcije herbe industrijske konoplje sorte Helena

Pritisak ekstrakcije [bar]	Vreme ekstrakcije [min]	Temperatura [°C]					
		40	50	60	70	80	90
100	30	0,32	0,31	0,18	0,10	0,21	0,16
	60	0,48	0,74	0,39	0,27	0,23	0,21
	90	0,87	1,01	0,51	0,47	0,27	0,27
	120	0,97	1,32	0,59	0,58	0,29	0,31
	180	1,30	1,60	0,74	0,75	0,38	0,31
	240	1,57	1,79	0,78	0,87	0,38	0,33
200	30	1,10	1,30	1,35	1,23	0,93	1,08
	60	2,36	2,42	2,11	2,25	1,69	1,93
	90	2,98	3,16	3,01	2,94	2,70	2,79
	120	3,30	3,71	3,44	3,60	3,29	3,26
	180	4,17	4,60	4,15	4,63	4,15	4,09
	240	4,66	5,07	4,72	5,22	4,98	4,96
300	30	1,48	1,25	1,62	1,71	2,07	2,27
	60	2,48	2,45	3,08	3,22	3,59	3,70
	90	3,45	3,44	3,87	4,16	5,02	4,73
	120	3,89	3,88	4,25	4,75	5,41	5,58
	180	4,69	4,82	4,88	5,34	6,39	6,48
	240	5,16	5,20	5,69	5,71	6,97	7,13

U poređenju sa *Soxhlet* ekstrakcijom, kao klasičnom metodom koja se primenjuje za ekstrakciju lipofilnih jedinjenja, ekstrakcija superkritičnim ugljendioksidom herbe industrijske konoplje se smatra efikasnom na najvišoj vrednosti upotrebljenog pritiska i najvišoj vrednosti upotrebljene temperature jer je prinos na ovim vrednostima pritiska i temperature nešto niži u poređenju sa prinosom *Soxhlet* ekstrakcije (7,13% za ekstrakciju superkritičnim ugljendioksidom u poređenju sa 9,85% za *Soxhlet* ekstrakciju). Na osnovu eksperimentalnih podataka datih u tabeli 16 utvrđena je kinetika ekstrakcije. Prinos ekstrakcije na svim uslovima ekstrakcije se povećava 180 minuta, nakon čega počinje da se formira „plato“ krive kinetike ekstrakcije, odnosno dolazi do daljeg neznatnog povećanja prinosa do 240 minuta. Zbog neznatnog povećanja prinosa ekstrakcije nakon 180 minuta ekstrakcije, povećanje vremena ekstrakcije preko 240 minuta se ne smatra isplativim. Sa slike 52 koja predstavlja kinetiku ekstrakcije herbe industrijske konoplje ugljendioksidom u superkritičnom stanju se takođe može videti prethodno navedeno tj. da povećanjem pritiska dolazi do povećanja prinosa ekstrakcije, dok povećanje temperature pri pritisku od 100 bar ima negativan uticaj, pri pritisku od 200 bar nema značajniji uticaj, a pri pritisku od 300 bar ima pozitivan uticaj.



Slika 52. Kinetika ekstrakcije herbe industrijske konoplje ugljendioksidom u superkritičnom stanju

Dobijeni totalni ekstrakti (TE), koji predstavljaju ekstrakt dobijen nakon neprekidne ekstrakcije u trajanju 4 sata, kako je naznačeno u delu Materijal i Metode, kao i ekstrakti izolovani nakon svakih 60 minuta (F1, F2, F3, F4) ekstrakcije su prikazani na slici 53, 54 i 55.



Slika 53. Totalni ekstrakt označen kao TE i ekstrakti izolovani nakon svakih 60 minuta označeni kao F1, F2, F3 i F4 vršnih delova industrijske konoplje dobijeni ekstrakcijom ugljendioksidom u superkričnom stanju pri konstantnom pritisku od 100 bar i temperaturi: a) 40 °C, b) 50 °C i c) 60 °C



Slika 54. Totalni ekstrakt označen kao TE i ekstrakti izolovani nakon svakih 60 minuta označeni kao F1, F2, F3 i F4 industrijske konoplje dobijeni ekstrakcijom ugljendioksidom u superkritičnom stanju pri konstantnom pritisku od 200 bar i temperaturi: a) 40 °C, b) 50 °C i c) 60 °C



Slika 55. Totalni ekstrakt označen kao TE i ekstrakti izolovani nakon svakih 60 minuta označeni kao F1, F2, F3 i F4 industrijske konoplje dobijeni ekstrakcijom ugljendioksidom u superkritisnom stanju pri konstantnom pritisku od 300 bar i temperaturi: a) 40 °C, b) 50 °C i c) 60 °C

U svim ekstraktima, totalnim i frakcijama, je određen apsolutni sadržaj CBD-a i THC-a koji je dat u tabeli 18. Sadržaj CBD-a se u totalnim ekstraktima kretao od 76,1193 do 163,1111 mg/g, dok je sadržaj THC-a bio u opsegu od 4,1746 do 6,5803 mg/g. Najveći sadržaj kanabinoida je dobijen ekstrakcijom na pritisku od 100 bar i temperaturi od 40 °C, dok je najmanji dobijen pri istom pritisku, ali na temperaturi od 60 °C. Generalno je povišenje temperature na svim pritiscima imalo negativan uticaj na sadržaj kanabinoida, odnosno u okviru svake pojedinačne vrednosti ispitivanog pritiska sadržaj kanabinoida je opadao sa porastom temperature od 40 do 60 °C. Optimalna temperatura za ekstrakciju kanabinoida, odnosno dobijanje kvalitetnog ekstrakta u pogledu sastava kanabinoida jeste 40 °C. Povećanje pritiska dovodi do pada sadržaja kanabinoida u ekstraktu, pa iako je najveći prinos ekstrakcije dobijen ekstrakcijom na najvišoj vrednosti ispitivanog pritiska, sadržaj kanabinoida u dobijenom ekstraktu je niži. Ovo je moguća posledica povećanja solvacione moći superkritisnog ugljendioksida povećanjem pritiska. Povećanjem solvacione moći superkritisnog ugljendioksida smanjuje se njegova selektivnost što dovodi do ekstrakcije velikog broja različitih jedinjenja (Reverchon i De Marco, 2006). Ovakav uticaj pritiska na prinos ekstrakcije i sadržaj kanabinoida prilikom superkritisne ekstrakcije listova i cvasti industrijske konoplje je uočen i u studiji koju su sproveli Roveto i sar. (2017). Povećanjem pritiska prinos je rastao od 0,074 do 0,185 g dobijenog ekstrakta/g napojne smeše, dok je ukupan THC opadao od 76,23 do 64,17%. U studiji Kitryte i sar. (2017) najveći sadržaj

kanabinoida dobijen je u ekstraktu na najnižem ispitivanom pritisku (u ispitivanom opsegu pritiska od 100 do 500 bar) i temperaturi (u ispitivanom opsegu temperature od 35 do 75 °C). Sadržaj CBD-a u ekstraktu u koji je dobijen u istoj studiji bio je u opsegu od 18,30 do 64,20 mg/g ekstrakta, pri čemu je najviši prinos ostvaren pri uslovima od 100 bar i 35 °C. Omar i sar. (2013) su ispitivali supekritičnu ekstrakciju kanabinoida iz 13 različitih uzoraka indijske konoplje, uz analizu uticaja procesnih parametara (pritiska od 100 do 250 bar, temperature od 35 do 55 °C, koncentracija etanola kao ko-rastvarača od 0 do 40%) na efikasnost ekstrakcije i kvalitet ekstrakata. U ovako dobijenim ekstraktima sadržaj CBD-a je bio od u opsegu od 1 do 13 mg/g, a sadržaj THC-a u opsegu od 4,5 do 324 mg/g. Analizom podataka iz literature i poređenjem sa rezultatima dobijenim u okviru ove doktorske disertacije ustanovljeno je da je sadržaj CBD-a u ekstraktima dobijenim iz herbe industrijske konoplje veći oko 2,5 puta u odnosu na sadržaj dobijen u ekstraktim studije Kitryte i sar. (2017) pri sličnim uslovima ekstrakcije, dok je u odnosu na indijsku konoplju ispitivanu od strane Omar i sar. (2013) koncentracija CBD-a veća oko 100 puta. Iz navedenog se može zaključiti da je biljna sirovina upotrebljena u ovoj doktorskoj disertaciji dobar izvor CBD-a.

Iako je najveći sadržaj kanabinoida u ekstraktu dobijen ekstrakcijom na pritisku od 100 bar i temperaturi od 40 °C, najviše izolovanih kanabinoida po g upotrebljene sirovine dobijeno je ekstrakcijom na pritisku od 300 bar i temperaturi od 40 °C (Tabela 17). Uticaj temperature na prinos ekstrahovanih kanabinoida iz biljne sirovina na pritisku od 100 bar je isti kao i uticaja temperature na njihov sadržaj u dobijenim ekstraktima i on opada sa povećanjem temperature, dok u slučaju ekstrakcije na pritisku od 200 i 300 bar, prinos ekstrahovanih kanabinoida opada povećanjem temperature do 50 °C dok sa daljim povećanjem do 60 °C raste. Povećanjem pritiska se povećava prinos ekstrahovanih kanabinoida. Masa ekstrahovanih kanabinoida po g upotrebljene sirovine, za definisani opseg temperature ekstrakcije, se prilikom ekstrakcije na pritisku od 100 bar kretala od 0,1782 do 2,2411 mg, na pritisku od 200 bar od 3,3525 do 6,4678 mg i na pritisku od 300 bar od 4,4917 do 7,7582 mg.

Pored analize sadržaja CBD-a i THC-a, radi analize uticaja vremena ekstrakcije na izolovanje bioaktivnih jedinjenja, urađeno je i frakcionisanje superkritičnog ekstrakta herbe industrijske konoplje tokom vremena, odnosno izdvojeni su ekstrakti nakon 60, 120, 180 i 240 minuta ekstrakcije na određenom pritisku i temperaturi (analogno prethodno postavljenom eksperimentu). U ovako dobijenim frakcijama-ekstraktima određen je sadržaja CBD-a i THC-a, a dobijeni rezultati ukazuju na to da se preko 70% kanabinoida ekstrahuje u prva dva sata ekstrakcije (Tabela 17). Pri konstantnom pritisku od 100 bar na temperaturi od 40 °C u prva dva sata ekstrakcije se iz herbe industrijske konoplje izoluje 75,04% CBD-a i 71,50% THC-a, od čega u prvih 60 minuta 42,10 i 38,82%, tim redom. Na istom pritisku na temperaturi od 50 °C u prvih 120 minuta superkritične ekstrakcije herbe industrijske konoplje izoluje se 81,20% CBD-a i 74,29% THC-a, od kojih 35,23% i 34,74% u prvih 60 minuta, tim redom. Procenat CBD-a i THC-a izolovanih u prvih 120 minuta na pritisku od 100 bar i temperaturi od 60 °C je 96,57 i 96,14%, od kojih u prvih 60 minuta 60,29% CBD-a i 60,91% THC-a. Sličan trend je uočeno u slučaju superkritične ekstrakcije herbe industrijske konoplje na pritisku od 200 bar. Pri konstantnom pritisku od 200 bar procenat

izolovanog CBD-a i THC-a na temperaturi od 40 °C u prvih 120 minuta iznosi 80,38 i 82,39%, od kojih se u prvih 60 minuta izoluje 56,74 i 59,49%, tim redom. Na temperaturi od 50 °C, na istom pritisku, sadržaj ekstrahovanih CBD-a i THC-a u prvih 120 minuta iznosi 77,03 i 80,25%, tim redom, od čega je 51,37 i 54,76% u prvih 60 minuta. Na temperaturi od 60 °C i pritisku od 200 bar ekstrahuje se u prvih 120 minuta superkritične ekstrakcije 76,27% CBD-a i 81,59% THC-a, od kojih 48,88 i 56,33% u prvih 60 minuta. Pri pritisku od 300 bar, u prvih 120 minuta ekstrakcije izolovano je preko 80% kanabinoida i na temperaturama superkritične ekstrakcije od 40 °C, 50 °C i 60 °C. Podaci pokazuju da se pri ovim uslovima ekstrakcije u prvih 120 minuta ekstrahuje 83,16%, 89,03% i 88,17% CBD-a i 85,94%, 90,75% i 90,63% THC-a.

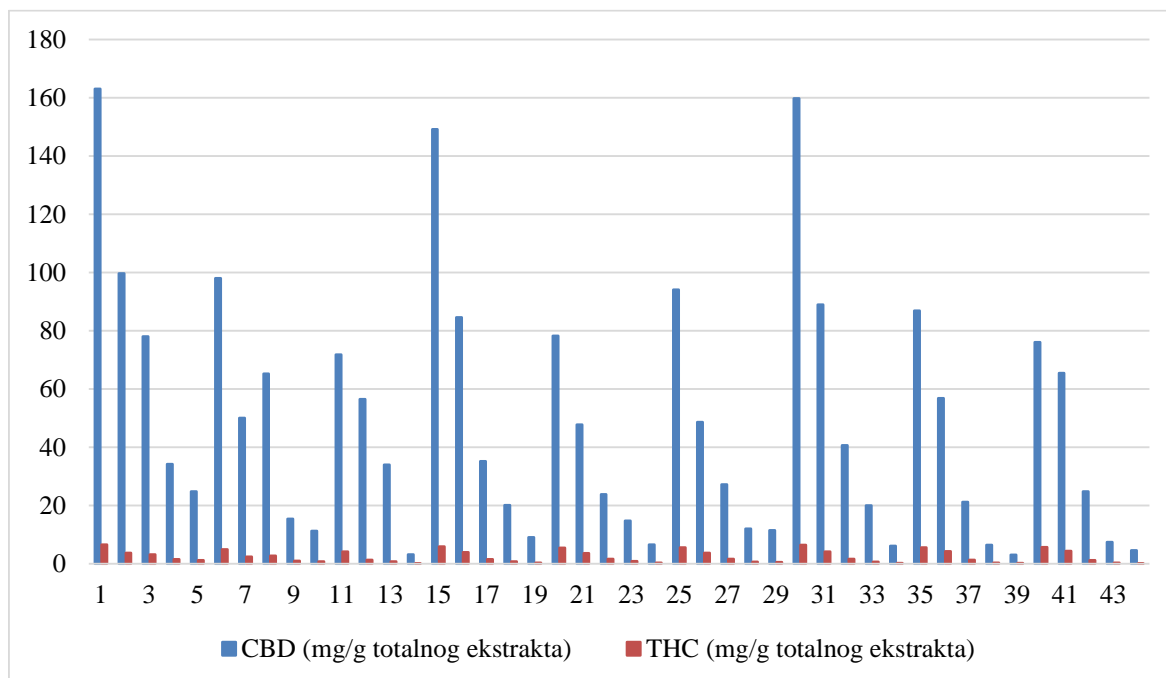
Tabela 17. Sadržaj CBD-a i THC-a u ekstraktima herbe industrijske konoplje dobijenim ugljendioksidom u superkritičnom stanju pri različitim pritiscima i temperaturama

	Uslovi ekstrakcije	CBD (mg/g totalnog ekstrakta)	CBD (% ekstrakcije/h)	CBD (mg/g droge)	THC (mg/g totalnog ekstrakta)	THC (% ekstrakcije/h)	THC (mg/g droge)
1.	100 bar, 40 °C, total	163,1111		2,2411	6,5803		0,0904
2.	100 bar, 40 °C, 1h	99,7378	42,10	1,3357	3,7679	38,82	0,0505
3.	100 bar, 40 °C, 2h	78,0263	32,94	1,0450	3,1718	32,68	0,0425
4.	100 bar, 40 °C, 3h	34,2349	14,45	0,4585	1,5557	16,03	0,0208
5.	100 bar, 40 °C, 4h	24,8853	10,51	0,3333	1,2114	12,48	0,0162
6.	100 bar, 50 °C, total	98,0934		0,5469	4,9718		0,0277
7.	100 bar, 50 °C, 1h	50,2387	35,23	0,1829	2,4266	34,74	0,0088
8.	100 bar, 50 °C, 2h	65,5543	45,97	0,2386	2,7628	39,55	0,0101
9.	100 bar, 50 °C, 3h	14,9643	10,85	0,0545	0,9542	14,12	0,0035
10.	100 bar, 50 °C, 4h	11,3464	7,96	0,0413	0,8098	11,59	0,0029
11.	100 bar, 60 °C, total	71,8416		0,1782	4,1746		0,0104
12.	100 bar, 60 °C, 1h	56,5566	60,29	0,0942	1,3375	60,91	0,0022
13.	100 bar, 60 °C, 2h	34,0327	36,28	0,0567	0,7736	35,23	0,0013
14.	100 bar, 60 °C, 4h	3,2137	3,43	0,0054	0,0848	3,86	0,0001

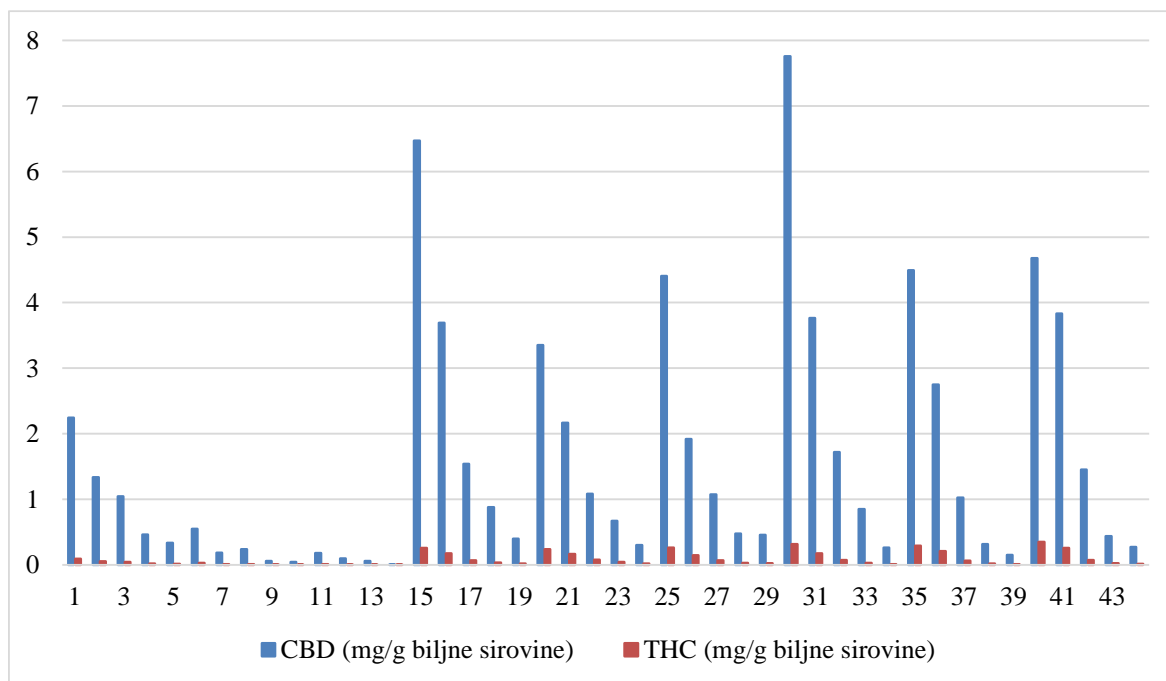
15.	200 bar, 40 °C, total	149,2247		6,4678	5,9646		0,2585
16.	200 bar, 40 °C, 1h	84,6037	56,74	3,6921	3,9610	59,49	0,1729
17.	200 bar, 40 °C, 2h	35,2490	23,64	1,5383	1,5249	22,90	0,0665
18.	200 bar, 40 °C, 3h	20,1706	13,53	0,8802	0,7664	11,51	0,0334
19.	200 bar, 40 °C, 4h	9,0947	6,10	0,3969	0,4059	6,10	0,0177
20.	200 bar, 50 °C, total	78,3329		3,3525	5,4934		0,2351
21.	200 bar, 50 °C, 1h	47,8346	51,37	2,1654	3,6582	54,76	0,1656
22.	200 bar, 50 °C, 2h	23,8928	25,66	1,0816	1,7029	25,49	0,0771
23.	200 bar, 50 °C, 3h	14,7918	15,89	0,6696	0,9460	14,16	0,0428
24.	200 bar, 50 °C, 4h	6,5919	7,08	0,2984	0,3728	5,58	0,0169
25.	200 bar, 60 °C, total	94,1945		4,4074	5,6027		0,2622
26.	200 bar, 60 °C, 1h	48,7223	48,88	1,9161	3,7487	56,33	0,1474
27.	200 bar, 60 °C, 2h	27,3031	27,39	1,0738	1,6828	25,29	0,0662
28.	200 bar, 60 °C, 3h	12,1111	12,15	0,4763	0,6776	10,18	0,0266
29.	200 bar, 60 °C, 4h	11,5503	11,59	0,4542	0,5461	8,21	0,0215
30.	300 bar, 40 °C, total	159,8808		7,7582	6,5330		0,3170
31.	300 bar, 40 °C, 1h	61,1061	57,08	3,7622	2,9335	60,87	0,0107
32.	300 bar, 40 °C, 2h	71,3316	26,08	1,7190	3,0835	25,04	0,0112
33.	300 bar, 40 °C, 3h	12,5490	12,89	0,8494	0,4563	10,41	0,0017
34.	300 bar, 40 °C, 4h	7,2492	3,96	0,2609	0,3025	3,67	0,0011
35.	300 bar, 50 °C, total	86,9815		4,4917	5,6549		0,2920
36.	300 bar, 50 °C, 1h	56,8279	64,84	2,7505	4,3244	69,57	0,2093
37.	300 bar, 50 °C, 2h	21,2046	24,19	1,0263	1,3168	21,18	0,0637
38.	300 bar, 50 °C, 3h	6,4967	7,41	0,3144	0,3658	5,88	0,0177
39.	300 bar, 50 °C, 4h	3,1208	3,56	0,1510	0,2093	3,37	0,0101

40.	300 bar, 60 °C, total	76,1193		4,6756	5,6859		0,3493
41.	300 bar, 60 °C, 1h	65,5374	63,96	3,8341	4,4111	71,25	0,2581
42.	300 bar, 60 °C, 2 h	24,8055	24,21	1,4512	1,2001	19,38	0,0702
43.	300 bar, 60 °C, 3h	7,4463	7,27	0,4356	0,3739	6,04	0,0219
44.	300 bar, 60 °C, 4h	4,6799	4,57	0,2738	0,2060	3,33	0,0121

Na osnovu dobijenih rezultata konstruisani su dijagrami iz koga se jasno vidi da je najveća izolacija kanabinoida postignuta nakon 240 minuta ekstrakcije na pritisku od 300 bar i temperaturi od 40 °C, a da se najviše ovog jedinjenja ekstrahuje upravo u prvih 60 minuta, a zatim drugih 60 minuta ekstrakcije pri zadatim uslovima (Slika 56). Sa slike 56 se takođe može videti da ne postoji velika razlika u sadržaju CBD-a u ekstraktu dobijenom na pritisku od 100 bar i temperaturi 40 °C i sadržaja CBD-a u ekstraktu dobijenom na pritisku od 300 bar i temperaturi 40 °C. Na osnovu sadržaja CBD-a u ekstraktu, kao i na osnovu najveće izolacije CBD-a iz biljne sirovine (slika 57), može se zaključiti da su optimalni uslovi za superkritičnu ekstrakciju kanabinoida u okviru ispitivanih pritisak 300 bar i temperatura 40 °C. Slika takođe pokazuje da je u ekstraktima industrijske konoplje sadržaj CBD-a dominantan u odnosu na sadržaj THC-a, te se u tom smislu ovako dobijeni ekstrakti mogu primeniti u farmaceutskoj industriji.



Slika 56. Sadržaj CBD-a i THC-a u dobijenim totalnim ekstraktima i frakcijama dobijenim nakon 1, 2, 3 i 4 sata ekstrakcije izraženi na g ekstraktra



Slika 57. Sadržaj CBD-a i THC-a u dobijenim totalnim ekstraktima i frakcijama dobijenim nakon 1, 2, 3 i 4 sata ekstrakcije izraženi na g biljne sirovine

Sadržaj kanabinoida u tečnim ekstraktima, koji su dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji primenom maceracije, ultrazvučne ekstrakcije i mikrotalasne ekstrakcije herbe industrijske konoplje je bio od 0,4314 mg/mL CBD-a i 0,0364 mg/mL THC-a (koliko je izmereno u optimalnom ekstraktu dobijenom maceracijom) do 1,0420 mg/mL CBD-a i 0,0430 mg/mL THC-a u optimalnom ekstraktu dobijenom mikrotalasnom ekstrakcijom. Ekstrakcijom po *Soxhlet*-u dobijen je ekstrakt sa sadržajem CBD-a i THC-a 64,4000 mg/mL i 2,9000 mg/mL, tim redom, dok je najveći sadržaj CBD-a i THC-a u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom ugljendioksidom u superkritisnom stanju iznosio 163,1100 i 6,5803 mg/g. Dakle, ekstrakcija herbe industrijske konoplje sorte Helena ugljendioksidom u superkritisnom stanju je adekvatnija metoda ekstrakcije u odnosu na ostale ispitivane u ovom istraživanju. Daleko veći sadržaja kanabinoida u ekstraktu dobijenom ekstrakcijom superkritisnim ugljendioksidom omogućio bi upotrebu ovakvog ekstrakta u značajno manjim količinama za postizanje istog terapijskog efekta, u odnosu na ostale analizirane ekstrakte. Nedostatak ove ekstrakcione tehnike, u odnosu na ostale prethodno analizirane je dugo vreme ekstrakcije i ekonomski aspekt implementacije opreme na industrijskom nivou nedostatak.

U preparatima na bazi CBD-a koji se mogu naći na tržištu CBD je prisutan u različitim koncentracijama, zavisno od indikacijske primene i oblika leka. Ulje koje se preporučuje za upotrebu kod različitih malignih oboljenja, multiple skleroze, HIV-a i epileptičnih napada sadrži od 5 do 7% CBD-a. Supozitorije na bazi CBD-a sadrže 25 i 50 mg ovog jedinjenja i preporučuju za upotrebu kod osoba kod kojih oralni put administracije nije moguć, a za iste indikacije. Sadržaj CBD-a u leku odobrenom od strane FDA, Epidiolex®, je 100 mg/mL. Imajući u vidu koncentracije CBD-a u preparatima na tržištu i sadržaj CBD-a u ekstraktima dobijenim superkritisnom ekstrakcijom, može se pretpostaviti da se ekstrakti herbe

industrijske konoplje sorte Helena dobijeni na ovaj način mogu upotrebiti za inkorporaciju u nove farmaceutske preparate koji bi bili deklarirani kao preparati na bazi CBD-a.

Pored određivanja sadržaja CBD-a i THC-a u dobijenim totalnim ekstrakti je određen relativni sadržaj jedinjenja prema metodi opisanoj u delu Materijal i metode (tabeli 18). U dobijenim totalnim ekstraktima u granicama detekcije prisutni su monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni, triterpeni, kanabinoidi, masne kiseline, ugljovodonici i vitamini. Monoterpeni su prisutni samo u ekstraktu koji je dobijen na temperaturi od 60 °C i pritisku od 300 bar, vitamini su prisutni samo u ekstraktima dobijenim na pritisku od 100 bar, dok diterpeni nisu prisutni samo u ekstraktu dobijenom na pritisku od 200 bar i temperaturi od 40 °C.

Najzastupljenija jedinjenja u totalnim ekstraktima jesu kanabinoidi sa relativnim masenim udelom od 65,48 do 81,95%. Od kanabinoida prisutni su *p*-heptilacetofenon, CBD, THC, CBG u svim totalnim ekstraktima. U svim totalnim ekstraktima CBD je bio najzastupljenije jedinjenje i kretao se u opsegu od 62,44 do 78,26%. Relativni maseni udeo THC-a je bio između 1,40 i 1,95%, CBG-a između 0,40 i 0,60%, a *p*-heptilacetofenon 0,92 i 1,41%. CBC je bio prisutan samo u ekstraktima dobijenim pri pritisku od 100 bar i temperaturama ekstrakcije od 40 i 50 °C sa relativnim masenim udelom od 0,33 i 0,32%, tim redom.

Od monoterpena u ekstraktima herbe industrijske konoplje dobijenim superkričnom ekstrakcijom prisutni su samo α -tujen i β -pinen, pri čemu je njihov relativni maseni udeo bio 0,55%. Relativni maseni udeo seskviterpena u dobijenim ekstraktima je bio od 7,91 do 23,92%, pri čemu je najveći sadržaj bio u ekstraktima pri pritisku od 100 bar. Najdominantniji seskviterpen je *trans*-kariofilen. Od diterpena prisutan je fitol, dok je od triterpena prisutan skvalen i njihov najveći sadržaj određen je u ekstraktima koji su dobijeni na pritisku od 100 bar i temperaturi od 50 i 40 °C, tim redom. Od masnih kiselina u dobijenim ekstraktima prisutna je samo palmitinska kiselina, a ekstrakt sa najvećim sadržajem palmitinske kiseline je dobijen ekstrakcijom na pritisku 300 bar i temperaturi 60 °C. Od vitamina prisutan je α -tokoferol, u ekstraktima dobijenim ekstrakcijom na 100 bar i to u procentima manjim od 1%. Pentakozan je najzastupljeniji ugljovodonik sa relativnim masenim udelom od 3,37 do 6,91%.

Tabela 18. Relativni maseni udeo isparljivih jedinjenja u totalnim ekstraktima herbe industrijske konoplje koji su dobijeni primenom superkritičnog ugljendioksida

Naziv jedinjenja	KI	100 bar			200 bar			300 bar		
		40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C	40°C	50°C	60°C
1. α -tujen	925,8	/	/	/	/	/	/	/	/	0,26
2. β -pinen	975,0	/	/	/	/	/	/	/	/	0,29
3. <i>trans</i> -kariofilen	1375,9	8,78	11,51	6,87	4,62	4,90	5,69	6,87	5,74	5,32
4. <i>trans</i> - α -bergamoten	1383,2	0,83	1,35	0,97	0,56	0,58	0,69	0,80	0,68	0,60
5. <i>cis</i> - β -farnezen	1395,2	0,98	1,69	1,15	0,58	0,68	0,79	0,88	0,83	0,72
6. α -humulen	1406,0	2,47	3,29	1,98	1,33	1,42	1,63	2,21	1,75	1,58
7. alo-aromadendren	1413,0	/	0,31	/	/	/	/	/	/	/
8. β -selinen	1436,0	0,61	0,99	0,67	/	0,40	0,39	0,55	0,50	0,39
9. α -selinen	1443,1	0,38	0,61	0,43	/	/	/	0,36	0,22	0,26
10. kariofilen oksid	1523,6	1,14	4,18	4,23	0,81	1,00	0,87	1,14	1,28	0,67
11. palmitinska kiselina	1832,2	1,39	1,49	2,78	1,44	1,59	1,92	1,30	1,94	4,40
12. fitol	1967,6	0,60	0,72	0,68	/	0,42	0,64	0,44	0,43	0,36
13. <i>p</i> -heptilacetofenon	2070,4	1,13	0,92	1,14	1,20	1,16	1,41	1,16	1,10	1,25
14. kanabihromen	2126,2	0,33	0,32	/	/	/	/	/	/	/
15. kanabidiol	2248,5	67,81	62,44	70,47	78,26	76,64	73,71	74,40	75,01	73,09
16. tetrahidrokanabinol	2326,3	1,44	1,40	1,88	1,89	1,89	1,86	1,81	1,83	1,95
17. kanabigerol	2368,3	0,47	0,40	0,56	0,60	0,62	0,58	0,58	0,58	0,59
18. tetrakozan	2457,9	0,62	0,50	/	0,52	0,49	0,54	0,45	0,46	0,44
19. skvalen	2587,2	1,54	1,20	0,88	1,08	1,11	1,44	1,06	1,10	1,29
20. hentriakontan	2647,7	/	/	/	/	/	/	/	/	/
21. pentakozan	2648,8	6,91	4,86	3,37	5,51	5,44	6,05	4,63	5,05	4,96
22. nonakozan	2891,9	1,96	1,23	1,16	1,58	1,67	1,79	1,36	1,49	1,58
23. α -tokoferol	2965,6	0,61	0,60	0,79	/	/	/	/	/	/
Monoterpeni		/	/	/	/	/	/	/	/	0,55
Seskviterpeni		15,19	23,92	16,29	7,91	8,97	10,07	12,81	11,01	9,53
Diterpeni		0,60	0,72	0,68	/	0,42	0,64	0,44	0,43	0,36
Triterpeni		1,54	1,20	0,88	1,08	1,11	1,44	1,06	1,10	1,29
Kanabinoidi		71,17	65,48	74,05	81,95	80,32	77,56	77,96	78,51	76,88
Masne kiseline		1,39	1,49	2,78	1,44	1,59	1,92	1,30	1,94	4,40
Ugljovodonici		9,49	6,59	4,52	7,61	7,59	8,38	6,44	7,00	6,99
Vitamini		0,61	0,60	0,79	/	/	/	/	/	/

^aRI–retencioni indeks određen na HP-5 koloni koristeći homologe niz alkana od C₈ do C₃₀

Ekstrakcijom ugljendioksidom u superkritičnom stanju se izoluju lipofilna jedinjenja iz sirovine, dok hidrofilna jedinjenja zaostaju. Zbog toga je nakon superkritične ekstrakcije materijal iscrpljen ovom metodom primenjen za ekstrakciju hidrofilnih polarnih jedinjenja i to primenom klasične ekstrakcije-maceracije. Na ovaj način postiže se maksimalno iskorišćenje sirovine i minimalno generisanje finalnog sporednog proizvoda odnosno otpada biljne sirovine koja je primenjena za ekstrakciju. Pored ovoga, omogućava se dobijanje dva tipa ekstrakta, odnosno proizvodnja dva biljna preparata, čime se ceo proces prerade biljne sirovine može smatrati efikasnijim. Maceracija je urađena prema načinu opisanom u poglavlju 3.3.1. sa 50% etanolom kao ekstragensom i odnosom droga/rastvarač 1:10 koji su se pokazali kao optimalni. Dobijeni ekstrakt okarakterisan je u pogledu parametara koji su

analizirani i u prethodnim ekstrakcijama, dakle analizirani su prinos ekstrakcije, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj flavonoida, IC₅₀ vrednost i EC₅₀ i vrednosti su date u tabeli 19.

Iz rezultata datih u tabeli se vidi da je prinos ekstrakcije bio od 14,88 do 17,83%, sadržaj ukupnih fenola od 1,2700 do 1,6100 mg EGK/mL, sadržaj flavonoida od 0,3400 do 0,4700 mg EK/mL, IC₅₀ vrednost od 0,0024 i 0,0040 mL/mL i EC₅₀ vrednost od 0,0062 do 0,0093 mL/mL. Vrednosti dobijenih izlaznih promenljivih su veće od vrednosti izlaznih promenljivih dobijenih prilikom maceracije polazne sirovine pa se može zaključiti da je sirovina nakon ekstrakcije ugljendioksidom u superkritisnom stanju vredna sirovina za ekstrakciju hidrofilnih jedinjenja, kao i da tretman superkritisnim ugljendioksidom povoljno utiče na ekstrakciju hidrofilnih jedinjenja iz industrijske konoplje.

Table 19. Izlazne promenjive (Y, TP, TF, IC₅₀, EC₅₀) ekstrakata dobijenih maceracijom sirovine nakon ekstrakcije ugljendioksidom u superkritisnom stanju

Pritisak i Temperatura	Y [%]	TP [mg EGK/mL]	TF [mg EK/mL]	IC ₅₀ [mL/mL]	EC ₅₀ [mL/mL]	
40	17,44±0,87a	1,6100±0,0805a	0,3900±0,0195cd	0,0024±0,0001d	0,0062±0,0003d	
100	50	15,52±0,46bc	1,2200±0,0610e	0,4000±0,0200bc	0,0040±0,0002a	0,0072±0,0004cd
60	14,63±0,43c	1,5400±0,0770ab	0,4700±0,0235a	0,0027±0,0001cd	0,0073±0,0004cd	
40	16,54±0,48ab	1,3900±0,0695b-e	0,3600±0,0180cd	0,0033±0,0002b	0,0076±0,0004bc	
200	50	17,53±0,51a	1,3200±0,0660cde	0,3900±0,0195cd	0,0035±0,0002b	0,0085±0,0004ab
60	16,75±0,49ab	1,3500±0,0675b-e	0,3800±0,0190cd	0,0028±0,0001cd	0,0077±0,0004bc	
40	16,07±0,18abc	1,5100±0,0255abc	0,4500±0,0225ab	0,0034±0,0002b	0,0089±0,0004a	
300	50	16,79±0,49ab	1,2700±0,0635de	0,3400±0,0170d	0,0031±0,0002bc	0,0093±0,0005a
60	15,82±0,46bc	1,4500±0,0725ad	0,3400±0,0170d	0,0030±0,0002bc	0,0087±0,0004ab	

4.4. Dobijanje suvog ekstrakta herbe industrijske konoplje

Kanabinoidi poseduju značajno farmakološko dejstvo, ali je njihova upotreba u farmaciji otežana kako zbog slabe rastvorljivosti u vodi, tako i zbog njihove nestabilnosti tokom skladištenja (Elsohly i Repka, 2016). Jedan od farmaceutskih proizvoda koji omogućava oralnu primenu kanabinoida su meke kapsule sa uljem u kojima je rastvoren dronabinol, sintetički oblik THC-a (Marinol®). Nedostatak ove formulacije je nestabilnost THC-a, pa je neophodno ovaj lek čuvati na niskoj temperaturi (4 °C). Niska stabilnost farmakološki aktivne supstance i neophodnost čuvanja leka pod određenim uslovima je ozbiljan nedostatak u farmaciji. Prevođenjem tečnih ekstrakata u suve primenom različitih metoda, kao što je na primer metoda sušenja raspršivanjem, omogućava se produžavanje stabilnosti bioaktivnih jedinjenja. Suvi ekstrakt se dalje može upotrebiti kao takav, ili se može koristiti za pripremu različitih novih farmaceutskih proizvoda. Sušenje raspršivanjem primenjeno je kao jedna od metoda za dobijanja stabilne formulacije prirodnih kanabinoida uz primenu inulina kao nosača u patentu Eissens i sar. (2003). Inulin je upotrebljen kao nosač u koncentraciji od 50%, a zatim je metodom sušenja raspršivanjem, metodom liofilizacije,

vakuum sušenjem i superkritičnim sušenjem dobijen suvi ekstrakt kanabinoida u kojima je praćena stabilnost. Dodatak inulina kao nosača je produžilo stabilnost THC-a.

Suvi ekstrakti herbe industrijske konoplje u ovoj doktorskoj disertaciji su dobijeni sušenjem tečnog ekstrakta dobijenog mikrotalasnom ekstrakcijom na optimalnim uslovima. Mikrotalasna ekstrakcija se pokazala kao najoptimalnija metoda ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz herbe industrijske konoplje primenom vode ili etanola kao rastvarača. Ekstrakti dobijeni mikrotalasnom ekstrakcijom su imali 2,5 puta veći sadržaj ukupnih fenola u poređenju sa ekstraktima dobijenim maceracijom i 1,5 puta veći sadržaj u poređenju sa ekstraktima dobijenim ultrazvučnom ekstrakcijom, dok je sadržaj u subkritičnim ekstraktima bio približan. Sadržaj flavonoida u mikrotalasnim ekstraktima je bio 1,5, 2 i 4 puta veći u poređenju sa ekstraktima dobijenim subkritičnom ekstrakcijom, ultrazvučnom ekstrakcijom i maceracijom, tim redom. Sadržaj CBD-a u ekstraktima dobijenim mikrotalasnom ekstrakcijom je bio 2 puta veći od sadržaja u ultrazvučnim ekstraktima, 4 puta veći od sadržaja u ekstraktima dobijenim maceracijom i čak 100 puta veći od sadržaja CBD-a u subkritičnim ekstraktima. Sušenje ovakvog ekstrakta herbe industrijske konoplje sorte Helena je rađeno primenom maltodekstrina kao nosača u koncentraciji od 20, 40 i 60% u odnosu na sadržaj suvog ostatka u tečnom ekstraktu. Efikasnost procesa sušenja, kao i hemijske i fizičke karakteristike dobijenih suvih ekstrakata herbe industrijske konoplje su dati u tabeli 20.

Tabela 20. Efikasnost procesa sušenja, fizičke i hemijske karakteristike dobijenih suvih ekstrakata herbe industrijske konoplje sorte Helena

Koncentracija MD	20%	40%	60%
Efikasnost (%)	71,29±1,09 b	71,71±0,94 b	80,84±0,92 a
Fizičke karakteristike			
Sadržaj vlage (%)	4,66±0,12 a	3,95±0,11 b	3,63±0,04 c
Higroskopnost (%)			
1 dan	5,09±0,01 a	5,28±0,16 a	4,75±0,04 b
2 dan	7,62±0,02 a	7,79±0,14 a	7,18±0,01 b
3 dan	9,67±0,09 a	9,60±0,14 a	8,84±0,07 b
4 dan	11,06±0,13 a	10,76±0,13 b	9,96±0,01 c
5 dan	12,43±0,18 a	12,05±0,16 a	11,18±0,15 b
6 dan	13,32±0,10 a	12,91±0,08 b	12,03±0,12 c
7 dan	13,87±0,09 a	13,49±0,30 a	12,53±0,09 b
Indeks apsorpcije vode (%)	35,56±3,71 a	28,35±2,19 b	33,27±0,36 ab
Indeks rastvorljivosti u vode (%)	61,97±0,27 b	64,20±0,12 a	59,17±1,05 c
Nasipna zapremina (mg/mL)	204,18±4,49 b	200,04±2,13 b	226,93±7,30 a
Rehidratacija (s)	22,67±0,58 a	20,67±0,58 b	19,00±1,00 b

Caking

d > 0.800 (mm)	0,95	4,93	1,71
0.800 (mm) < d < 0.315 (mm)	7,62	59,86	64,10
0.315 (mm) < d < 0.100 (mm)	32,38	27,46	24,79
d < 0.100 (mm)	59,05	7,75	9,40

Hemijske karakteristike

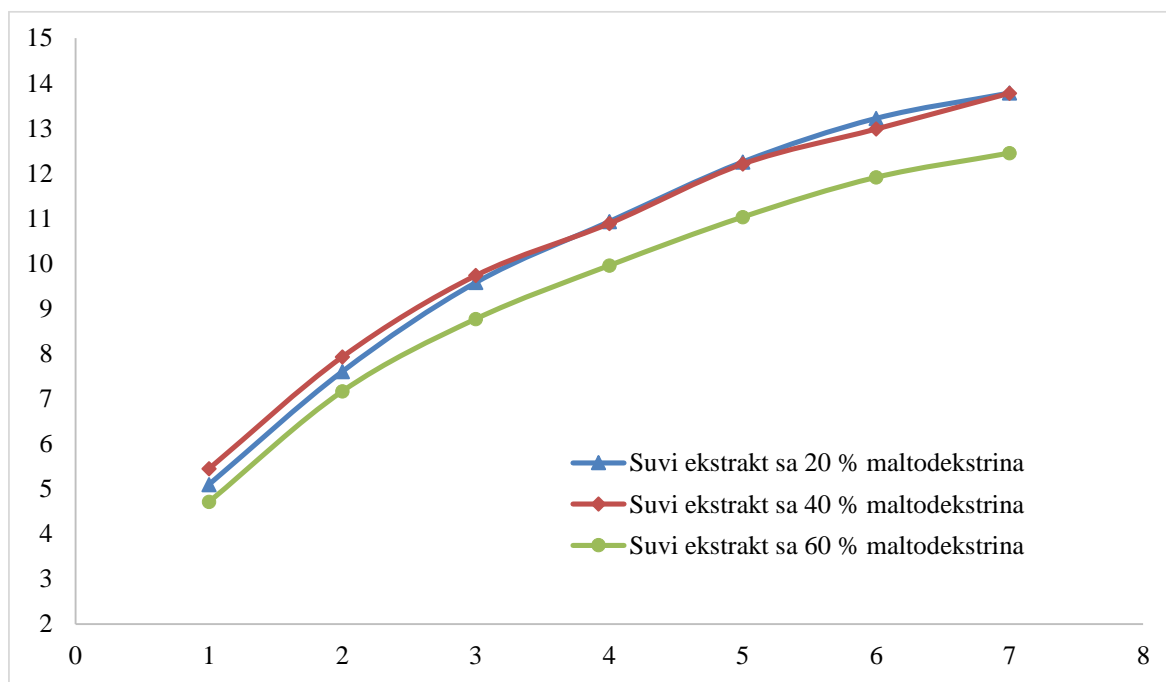
Ukupni fenoli (mg EGK/g)	31,0458±1.5523 a	27,0617±1,3531 b	23,3801±1,1690 c
Flavonoidi (mg EK/g)	22,0441±1.1022 a	16,9835±0,8492 b	17,0445±0,8522 b
IC ₅₀ (mg/g)	0,0376±0.0019 b	0,0484±0,0024 a	0,0463±0,0023 a
EC ₅₀ (mg/g)	0,0977±0.0049 b	0,1160±0,0058 a	0,1247±0,0063 a
CBD (mg/g)	16,2000±0.8100 a	13,4000±0,6700 b	10,6000±0,5300 c
THC (mg/g)	1,9000±0.0950 a	1,8000±0,0900 a	1,8000±0,0900 a

U laboratorijskim uslovima, proces sušenja se smatra efikasnim ukoliko je efikasnost veća od 50% (Bhandari i sar., 1997). Efikasnost procesa sušenja tečnih ekstrakata herbe industrijske konoplje je u sva tri slučaja bila veća od 70%. Pri upotrebi maltodekstrina u koncentraciji od 20 i 40% efikasnost sušenja se nije statistički značajno razlikovala i iznosila je 71,29 i 71,71%, tim redom. Statistički značajnu i najveću efikasnost sušenja (80,80%) je imao proces sušenja uz primenu maltodekstrina u koncentraciji od 60%. Povećanje efikasnosti procesa sušenja sa povećanjem koncentracije dodatog MD je uočeno i u slučaju proizvodnje tečnih ekstrakata sledećih biljnih sirovina: aronije (*Aronia melanocarpa*) (Vidović i sar., 2019), bosiljka (*Ocimum basilicum*) (Gavarić i sar., 2019), rtanjskog čaja (*Satureja montana*) (Vidović i sar., 2014).

Sadržaj vlage je veoma značajna karakteristika suvih ekstrakata jer utiče na stabilnost, veličinu čestica, morfologiju i reološka svojstva praha (Bhandari i Hartel, 2005). Ukoliko je sadržaj vlage u opsegu od 3,9 do 5,9%, dobijeni suvi ekstrakt je zadovoljavajućih karakteristika u pogledu lepljivosti (Saydi i Hatampour, 2012). Sadržaj vlage u dobijenim i analiziranim suvim ekstraktima je bio u opsegu koji su predložili Saydi i Hatampour, statistički se značajno razlikovao među ispitivanim suvim ekstraktima i iznosio je 4,66% za proces sušenja sa 20% maltodekstrina, 3,95% za proces sušenja sa 40% maltodekstrina i 3,63% za proces sušenja sa 60% maltodekstrina. Povećanjem koncentracije maltodekstrina sadržaj vlage se smanjivao. Manji sadržaj vlage osigurava stabilnost ekstrakta u dužem vremenskom periodu sa smanjenom mogućnošću mikrobiološke kontaminacije, kao i smanjenjem različitih degradacionih reakcija oksidacije (Marques i sar., 2007; Tan i sar., 2011). Suvi ekstrakt herbe industrijske konoplje može biti primenjen i u formi instant biljnog čaja. Prema Pravilniku o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda (Službeni glasnik RS, 2012), koji propisuje maksimalan dozvoljen sadržaj vlage za instant biljni čaj u čvrstoj formi do 8%, suvi ekstrakt herbe industrijske konoplje je zadovoljavajućeg kvaliteta.

Higroskopnost suvih ekstrakata je povezana sa prisustvom hidrofilnih molekula u ekstraktu koji mogu da vezuju vodu iz atmosfere/okruženja. Higroskopnost zavisi i od temperature

staklastog prelaza suvog ekstrakta. Što je temperatura staklastog prelaza veća higroskopnost je manja (Vidović i sar., 2014). Kako na povećanje temperature staklastog prelaza utiče maltodekstrin, očekuje se da suvi ekstrakti sa dodatkom veće količine maltodekstrina ima manju higroskopnost. Higroskopnost suvih ekstrakta herbe industrijske konoplje je praćena tokom 7 dana (Slika 58). Iz tabele 20 se vidi da je u ovom vremenskom intervalu ispitivanja ona bila u opsegu od 5, 10 do 13,78% za ekstrakt sa maltodekstrinom u koncentraciji od 20%, od 5,44 do 13,78% za ekstrakt sa maltodekstrinom u koncentraciji od 40% i od 4,71 do 12,45% za ekstrakt sa maltodekstrinom u koncentraciji od 60%. Higroskopnost u suvim ekstraktima dobijenim sa 20 i 40% maltodekstrina je tokom svih dana ispitivanja bila približne vrednosti i statistički se nije razlikovala, sem za peti i šesti dan, kada je postojala statistička razlika. U ekstraktu dobijenim sa 60% maltodekstrina higroskopnost je bila statistički značajno manja tokom svih dana praćenja ove karakteristike. Kako je i očekivano, najmanja higroskopnost tokom perioda od 7 dana je detektovana u ekstraktu sa maltodekstrinom u koncentraciji od 60%. Sa slike 58 i iz tabele 20 se vidi da je higroskopnost rasla tokom perioda ispitivanja i to tako da je nakon drugog dana izloženosti povišenoj vlažnosti vazduha higroskopnost bila za oko 50% veća od prvog dana u svim uzorcima. Nakon trećeg dana higroskopnost se povećava za oko 20%, nakon četvrtog i petog dana se povećala između 10 i 15%, dok je šestog i sedmog dana povećanje higroskopnosti bilo manje od 10%.



Slika 58. Higroskopnost dobijenih suvih ekstrakata konoplje

Indeks rastvorljivosti u vodi i indeks apsorpcije vode su važne karakteristike suvih ekstrakata. Indeks rastvorljivosti u vodi predstavlja meru rastvorljivosti suvih ekstrakata u vodi, dok indeks apsorpcije vode predstavlja sposobnost ekstrakata da apsorbuje vodu. Za vrednost indeksa rastvorljivosti u vodi zahteva se da je visok, dok se za indeks apsorpcije vode zahteva niska vrednost (Vidović i sar., 2014). Dobijeni suvi ekstrakti konoplje imaju relativno visoku vrednost indeksa rastvorljivosti u vodi, oko 60% i najveći je (64,20%) u

suvom ekstraktu koji je dobijenim sa 40% maltodekstrina. Indeks apsorpcije vode je iznosio oko 30% i najmanji je bio u ekstraktu dobijenim sa 40% maltodekstrina i iznosi 28,35%, ali se statistički ne razlikuje od indeksa apsorpcije vode suvog ekstrakta dobijenog sa 60% maltodekstrina. Viši indeks rastvorljivosti je poželjnija karakteristika suvih ekstrakta iz razloga što on ukazuje i na to da će ovakav biljni preparat, ukoliko bude primenjen u instant proizvodima, biti brže rastvorljiv u vodi što je jedan od zahteva ovakvih proizvoda.

Rehidracija, slično indeksu rastvorljivosti u vodi, je još jedna u nizu karakteristika suvih ekstrakata kojom se ocenjuje njihov kvalitet. Rehidracija je veoma važna prilikom upotrebe suvog ekstrakta. Vreme rehidracija mora biti što manje, odnosno suvi ekstrakt mora što pre da se rastvori u vodi u potpunosti da bi bio poželjan prilikom dalje primene u proizvodnji farmaceutskih oblika, naročito instant formi koje se primenjuju rastvaranjem u vodi. Podaci iz prethodne tabele ukazuju na to da svi dobijeni ekstrakti herbe industrijske konoplje imaju malu vrednost vremena rehidracije koje iznosi 23, 21 i 19 s za ekstrakt dobijen sa 20, 40 i 60% maltodekstrina, tim redom. Vrednost rehidracije suvog ekstrakta sa 20% maltodekstrina se statistički razlikovala od suvog ekstrakta sa 40 i 60%.

Nasipna zapremina suvih ekstrakata je važna karakteristika prvenstveno zbog upotrebe suvih ekstrakata u formulaciji gotovih farmaceutskih proizvoda koji su ograničeni po zapremini, kao što su kapsule i tablete (Vidović S. i sar. 2014). Nasipna zapremina bi trebalo da ima što veću vrednost, da bi se, u ograničenoj zapremini gotovih farmaceutskih proizvoda, mogla postići što viša i željena koncentracija određenih bioaktivih jedinjenja prisutnih u suvom ekstraktu. Nasipna zapremina u sva tri dobijena suva ekstrakta je bila preko 200 mg/mL. Nasipna zapremina u ekstraktima dobijenim sa 20% i 40% maltodekstrina se statistički nije razlikovala i iznosila je 204,18 i 200,04 mg/mL, tim redom. Ekstrakt dobijen sa 60% maltodekstrina ima najveću nasipnu zapreminu koja iznos 226,93 mg/mL.

Caking je karakteristika suvih ekstrakata koja utiče na jednostavnost njihove primene, normalnu i kontinualnu protočnost i doziranje u industriji, kao i na vizuelnu dopadljivost. Naime, prilikom skladištenja suvih ekstrakata može doći do apsorpcije vlage. Povećanje sadržaja vlage u suvim ekstraktima uslovljava nastanak agregata, krupnijih čestica u suvim ekstraktima, čiji veći udeo može negativno uticati na primenu, doziranje i pakovanje. Analizom ove karakteristike dobijenih ekstrakata utvrđeno je da je udeo aglomerata većih od 0,800 mm u sva tri uzorka bio mali i iznosio je 0,95 % za ekstrakt dobijen sa 20% maltodekstrina, 4,93% za ekstrakt dobijen sa 40% maltodekstrina i 1,71% za ekstrakt dobijen sa 60% maltodekstrina. Najveći udeo čestica za ekstrakt dobijen sa 20% maltodekstrina je bio manji od 0,100 mm, dok je najveći udeo za ekstrakte dobijenih sa 40 i 60% maltodekstrina bio veličine čestica između 0,315 i 0,800 mm. Najbolje karakteristike u pogledu homogenosti veličine čestica, nakon izloženosti vlage prilikom skladištenja, pokazuje ekstrakt sa 20% maltodekstrina, jer je veoma mali udeo čestica formirao veće aglomerate.

Sadržaj ukupnih fenola se u dobijenim suvim ekstraktima kretao u opsegu od 23,3801 do 31,0458 mg EGK/g i najveći je bio u ekstraktu dobijenom sa 20% maltodekstrina.

Povećanjem količine maltodekstrina u suvim ekstraktima sadržaj ukupnih fenola se smanjivao. Smanjenje sadržaja ukupnih fenola povećanjem količine dodatog maltodekstrina je verovatno posledica povećanja udela maltodekstrina u suvom ekstraktu, praktično efekat razblaživanja prouzrokovan povećanjem sadržaja maltodekstrina u ekstraktu. Sadržaj flavonoida je bio u opsegu od 17,0445 do 22,0441 mg EK/g. Najveći sadržaj flavonoida je detektovan u ekstraktu koji je dobijen primenom 20% maltodekstrina. I ovde je zabeležen, kao i kod fenola, pad sadržaja flavonoida sa povećanjem količine dodatog maltodekstrina.

Antioksidativna aktivnost je izražena preko IC_{50} vrednosti, kao i u prethodnim eksperimentima. IC_{50} vrednost je za ekstrakt dobijen sa 20% maltodekstrina iznosila 0,0376 mg/g, za ekstrakt dobijen sa 40% maltodekstrina 0,0484 mg/g, dok je za ekstrakt dobijen sa 60% maltodekstrina iznosila 0,0463 mg/g. Najmanja IC_{50} vrednost, odnosno najveća antioksidativna vrednost, je bila u ekstraktu dobijenom sa 20% maltodekstrina što je u skladu sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida. Reduktivna sposobnost suvih ekstrakata je izražena preko EC_{50} i za ekstrakt pripremljen sa 20% maltodekstrina je iznosila 0,0977 mg/g, za ekstrakt pripremljen sa 40% maltodekstrina je 0,1160 mg/g i za ekstrakt pripremljen sa 60% maltodekstrina iznosila je 0,1247 mg/g. Kao i kod antioksidativne aktivnosti, dodatkom veće količine maltodekstrina EC_{50} vrednost je rasla, odnosno reduktivna sposobnost je opadala. Najveća reduktivna sposobnost određena je u ekstraktu koji je dobijeno uz primenu 20% maltodekstrina.

Sadržaj CBD-a i THC-a se u dobijenim ekstraktima kretao u opsegu od 10,6000 do 16,2000 mg/g i u opsegu od 1,8000 do 1,9000 mg/g, tim redom. Sadržaj THC se nije statistički značajno razlikovao između dobijenih suvih ekstrakata. Sadržaj CBD-a je najviši u ekstraktu dobijenom sa 20% maltodekstrina, dok je najmanji u ekstraktu koji je dobijen primenom 60% maltodekstrina. Smanjenje sadržaja CBD-a je, kao i kod sadržaja ukupnih fenola i flavonoida, posledica razblaženja sa povećanjem koncentracije maltodekstrina.

Na osnovu svih ispitivanih karakteristika može se zaključiti da su suvi ekstrakti herbe industrijske konoplje sorte Helena dobijeni na opisan način visokovredni proizvodi, koji se mogu upotrebi kao takvi u formi instant proizvoda ili se mogu koristiti za proizvodnju kapsula, tableta i drugih farmaceutskih proizvoda koji omogućavaju tačno doziranje. Prednost ovako pripremljenih farmaceutskih proizvoda je lakše prihvatanje od strane korisnika, kao i mogućnost menjanja farmakokinetike leka. Dakle, savremena metoda ekstrakcije-mikrotalasna ekstrakcija, u kombinaciji sa metodom sušenja raspršivanjem omogućava da se za kratko vreme, bez velikih troškova, dobije visoko vredan proizvod herbe industrijske konoplje.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije ispitane su različite tehnike ekstrakcije herbe industrijske konoplje. Od klasičnih metoda ekstrakcija primenjene su maceracija i *Soxhlet* ekstrakcija, dok su od savremenih metoda ekstrakcije primenjene ultrazvučna ekstrakcija, mikrotalasna ekstrakcija, ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju i ekstrakcija ugljendioksidom u superkritičnom stanju. Praćenjem uticaja ulaznih promenljivih-procesnih parametara na odabrane izlazne promenjive za svaki tip ekstrakcije posebno su utvrđeni optimalni uslovi ekstrakcije u domenu postavljenog eksperimenta za dobijanje ekstrakata optimalnih karakteristika. Zatim, od pomenutih ekstrakcionih tehnika su upoređene one kojima se dobijaju tečni ekstrakti i najadekvatnija je odabrana za pripremu ekstrakta koji je preveden u suvo stanje metodom sušenja raspršivanjem. Prilikom pripreme suvog ekstrakta ispitan je uticaj različite koncentracije nosača, a dobijeni ekstrakti su okarakterisani u pogledu fizičkih i hemijskih osobina.

Prilikom maceracije ispitan je uticaj rastvarača, odnosno koncentracija etanola, kao i odnos droga/rastvarač na prinos, sadržaj ukupnih fenola, sadržaj flavonoida, kao i na antioksidativnu i reduktivnu sposobnost. Uzimajući u obzir sve ispitivane karakteristike ekstrakata 50% etanol se pokazao kao najbolji ekstragens, dok je odnos droga/rastvarač značajnije uticao samo na ukupne fenole. Prilikom maceracije industrijske konoplje 50% etanolom kao ekstragensom i primenom odnosa droga/rastvarač 1:10 dobijen je ekstrakt sa prinosom 14,24%, sadržajem ukupnih fenola 1,0476 mg EGK/mL, sadržajem flavonoida 0,3584 mg EK/mL, antioksidativnom aktivnošću izraženom preko IC_{50} od 0,0025 mL/mL i reduktivnom aktivnošću izraženom preko EC_{50} od 0,0090 mL/mL. Sadržaj CBD-a u ovom ekstraktu je iznosio 0,4314 mg/mL, dok je sadržaj THC-a iznosio 0,0364 mg/mL.

U ekstraktima herbe industrijske konoplje dobijenim maceracijom ispitan je i kvalitativni i kvantitativni sastav fenolnih kiselina. Sinapinska kiselina je bila najzastupljenije jedinjenje u ekstraktima dobijenim iz herba industrijske konoplje na početku cvetanja useva i njen sadržaj je bio između 1,13 i 30,02 $\mu\text{g/mL}$. Pored sinapinske kiseline u ovim ekstraktima su detektovane protokatehinska kiselina, vanilinska kiselina, siringinska kiselina, ferulna kiselina, izovitekisn, rutin, cimetna kiselina, narginin i apigenin. Narginin, apigenin i cimetna kiselina su bili prisutni u svim ekstraktima herbe industrijske konoplje u fazi punog cvetanja useva, dok su se ferulna, siringinska, epkateihinska, cimetna, protokatehinska, vanilinska i sinapinska kiselinu, kao i izoviteksin i rutin nalazili u pojedinim ekstraktima.

Soxhlet ekstrakcijom dobijen je prinos ekstrakcije od 9,85%. Najdominantnije jedinjenje u ovom ekstraktu bio je CBD sa relativnim sadržajem od 84,42%, dok je apsolutni sadržaj ovog jedinjenja iznosio 64,4000 mg/g. Sadržaj THC-a je bio 2,9000 mg/g.

Ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija su optimizovane korišćenjem *Box-Behnken* eksperimentalnog dizajna i metode odzivne površine. Na osnovu koeficijenta determinacije, koeficijenta varijacije i *p*-vrednosti za modele izlaznih promenljivih i odstupanja od modela

može se zaključiti da primenjeni kvadratni polinomi u svim slučajevima predstavljaju dobru aproksimaciju eksperimentalnih rezultata.

Optimalni uslovi ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije su utvrđeni sa različitim zahtevima za izlazne promenjive u zavisnosti od željenih karakteristika ekstrakta

Optimalni uslovi za dobijanje ekstrakta sa visokim prinosom, visokim sadržajem ukupnih fenola i flavonoida i sa visokom antioksidativnom aktivnošću i reduktivnom sposobnošću su temperatura 68,8 °C, vreme 54,8 minuta i gustina ultrazvuka 60 W/L za ultrazvučnu ekstrakciju i koncentracija etanola 47,60%, vreme ekstrakcije 10 minuta i odnos droga/rastvarač 1:5 za mikrotalasnu ekstrakciju. Na predhodno definisanim uslovima, predviđene izlazne promenjive ultrazvučnog ekstrakta herbe industrijske konoplje su 17,54% za prinos, 1,5245 mg EGK/mL za sadržaj ukupnih fenola, 0,6214 mg EK/mL za sadržaj flavonoida, 0,0014 mL/mL za IC₅₀ vrednost i 0,0039 mL/mL za EC₅₀ vrednost, dok za ekstrakt pripremljen mikrotalasnom ekstrakcijom predviđene vrednosti su prinos ekstrakcije 33,66%, sadržaj ukupnih fenola 2,6093 mg EGK/mL, sadržaj flavonoida 1,3221 mg EK/mL, IC₅₀ vrednost 0,0009 mL/mL i EC₅₀ vrednost 0,0017 mL/mL.

Kada se želi dobiti ekstrakt sa visokim sadržajem CBD-a optimalni uslovi ultrazvučne ekstrakcije su temperatura 79,4 °C, vreme 31,6 min i gustina ultrazvuka 60 W/L, dok su optimalni uslovi mikrotalasne ekstrakcije koncentracija etanola 67%, vreme ekstrakcije 10 minuta i odnos droga/rastvarač 1:5,1. U ekstraktima pripremljenom na optimalnim uslovima ekstrakcije sa zahtevom za visok sadržaj CBD-a predviđen je njegov sadržaj od 0,7339 mg/mL u ultrazvučnom ekstraktu i 1,8895 mg/mL u mikrotalasnom ekstraktu.

Kada se pored zahteva za visok sadržaj CBD-a postavi i zahtev za minimalni sadržaj THC-a optimalni uslovi ekstrakcije su temperatura 55,4 °C, vreme 38,2 i gustina ultrazvuka 24 W/L za ultrazvučnu ekstrakciju i koncentracija etanola od 47%, vreme ekstrakcije od 10 min i odnos droga/rastvarač 1:5 za mikrotalasnu ekstrakciju. Predviđen sadržaj CBD-a i THC-a na predhodno definisanim uslovima su 0,7339 i 0,0434 mg/mL za ultrazvučni ekstrakt i 1,1504 mg/mL i 0,0474 mg/mL za mikrotalasni ekstrakt.

Provera optimizacije ultrazvučne i mikrotalasne ekstrakcije je izvršena pripremom ekstrakta na optimalnim uslovima za visok prinos, visok sadržaj ukupnih fenola i flavonoida i visokom antioksidativnom aktivnošću i reduktivnom sposobnošću. Vrednosti izlaznih promenjivih su odgovarale predviđenim vrednostima sa 95% pouzdanošću.

Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju ispitana je variranjem temperature pri konstantom pritisku i vremenu. Ekstrakcija vodom u subkritičnom stanju se pokazala kao efikasna za ekstrakciju fenola iz herbe industrijske konoplje, dok je sadržaj CBD-a bio nizak. Porastom temperature sadržaj fenola je rastao, verovatno kao posledica razgradnje lignina, celuloze i hemiceluloze i oslobađanja fenola. Na osnovu sadržaja CBD-a, odabrana je optimalna temperatura (140 °C), na kojoj je dalje praćen uticaj vremena. Vreme nije imalo statistički značajan uticaj na sadržaj CBD-a.

Prilikom ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom praćen je uticaj temperature i pritiska na prinos i sadržaj ispitivanih kanabinoida. Pored ovoga, urađeno je i frakcionisanje ekstrakta po vremenu. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da su optimalni uslovi ekstrakcije ugljendioksidom u superkritičnom stanju za ekstrakciju kanabinoida iz herbe industrijske konoplje pritisak od 300 bar i temperatura od 40 °C. Iako je praćenjem kinetike ekstrakcije utvrđeno da formiranje „platoa“ nastaje nakon 4 sata, optimalno vreme superkritične ekstrakcije herbe industrijske konoplje je 120 minuta jer se najveći procenat kanabinoida ekstrahuje upravo u ovom vremenskom periodu. Pored kanabinoida u ekstraktima herbe industrijske konoplje dobijenim superkritičnom ekstrakcijom prisutni su i monoterpeni, seskviterpeni, diterpeni, triterpeni, masne kiseline, ugljovodoni i vitamini.

Poređenjem primenjenih ekstrakcionih tehnika može se zaključiti da su savremene metode ekstrakcije superiornije u pogledu kvalitativnih i kvantitativnih karakteristika dobijenih ekstrakata herbe industrijske konoplje. Od primenjenih ekstrakcionih tehnika koje se koriste za dobijanje tečnih ekstrakata mikrotalasna ekstrakcija se pokazala kao najpogodnija metoda za izolovanje bioaktivnih jedinjenja herbe industrijske konoplje. Najveći sadržaj kanabinoida u ekstraktima je postignut primenom ekstrakcije superkritičnim ugljendioksidom.

Sirovina nakon ekstrakcije lipofilnih jedinjenja ugljendioksidom u superkritičnom stanju se pokazala kao vredna sirovina za ekstrakciju hidrofilnih jedinjenja sa povoljnim uticajem superkritičnog ugljendioksida jer su ekstrakti, dobijeni klasičnom ekstrakcijom sirovine nakon superkritične ekstrakcije, imali više vrednosti izlaznih promenljivih od ekstrakata dobijenih istim postupkom ekstrakcije bez prethodne primene superkritičnog ugljendioksida.

Tečni ekstrakt za sušenje raspršivanjem je pripremljen mikrotalasnom ekstrakcijom na optimalnim uslovima. Sušenje je izvršeno sa 20, 40 i 60% maltodekstrina kao nosača. Dobijeni suvi ekstrakti su imali zadovoljavajuće tehnološke karakteristike, kao i visok procenat očuvanja bioaktivnih jedinjenja konoplje, pa se proces sušenja raspršivanjem na ovaj način može smatrati efikasnim, a dobijeni ekstrakti mogu biti okarakterisani kao visokovredni proizvodi za primenu u farmaceutskoj industriji.

6. LITERATURA

- [1] Abrahamov A i Mechoulam R (1995). An efficient new cannabinoid antiemetic in pediatric oncology. *Life Sciences*, 56 (23-24): 2097-2102.
- [2] Abrams DI i Guzman M (2015). Cannabis in cancer care. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97(6): 575-86.
- [3] Abrams DI, Hilton JF, Leiser RJ, Shade SB, Elbeik TA, Aweeka FT, Benowitz NL, Bredt BM, Kosel B, Aberg JA, Deeks SG, Mitchell TF, Mulligan K, Bacchetti P, McCune JM, Schambelan M (2003). Short-term effects of cannabinoids in patients with HIV-1 infection: randomised, placebo controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, 139: 258-66.
- [4] Abrams DI, Jay CA, Shade SB, Vizoso H, Reda H, Press S, Kelly ME, Rowbotham MC, Petersen KL (2007). Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology*, 68(7): 515-21.
- [5] Abuhasira R, Shbiroa L i Landschaft Y (2018). Medical use of cannabis and cannabinoids containing products—Regulations in Europe and North America. *European Journal of Internal Medicine*, 49: 2-6.
- [6] Achiron A, Miron S, Lavie V, Margalit R i Biegon A (2000). Dexamabinol (HU-211) effect on experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 102(1): 26-31.
- [7] Adams RP (2007). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectrometry, Allured Publishing Corporation. Google-Books-ID: 9ut3PQAACAAJ.
- [8] Agarwal C, Mathe K, Hofmann T, Csoka L (2018). Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. Optimized by Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 83(3): 700–711.
- [9] Agrawal AK, Kumar P, Gulati A i Seth PK (1989). Cannabis-induced neurotoxicity in mice: effects on cholinergic (muscarinic) receptors and blood brain barrier permeability. *Research communications in substance abuse*, 10: 155-168.
- [10] Åkerlöf G (1932). Dielectric constants of some organic solvent–water mixtures at various temperatures. *Journal of the American Chemical Society*, 54: 4125–4139.
- [11] Aladić K, Jarni K, Barbir T, Vidović S, Vladić J, Bilić M, Jokić S (2015). Cold Pressing and Supercritical CO₂ Extraction of Hemp (*Cannabis sativa*) Seed Oil. *Industrial Crops and Products*, 76: 472–478.
- [12] Al-Harahshed M i Kingman SW (2004). Microwave-assisted leaching: a review. *Hydrometallurgy*, 73: 189–203.
- [13] Alupului A, Calinescu I, i Lavric V (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Scientific Bulletin, Series A: Applied Mathematics and Physics*, 74(2): 129–142.

- [14] Andre CM, Hausman J-F i Guerriero G (2016). *Cannabis sativa*: The plant of the thousand and one molecules, *Frontiers in Plant Science*, 7: 19
- [15] Argo WR i Fischer PR (2002). Understanding pH management for container-grown crops. Meister, Willoughby, Ohio.
- [16] Ashton CH (1999). Biomedical benefits of cannabinoids? *Addiction Biology*, 4: 111-126.
- [17] Ashton H (2001). Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *British Journal of Psychiatry*, 178: 101–106.
- [18] Asl AH i Khajenoori M (2013). Subcritical Water Extraction. In *Mass Transfer-Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling*. InTech: Boca Raton, Florida.
- [19] Atakan Z (2002). Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 2(6): 241–254.
- [20] Attard TM, Bainier C, Reinaud M, Lanot A, McQueen-Mason SJ and Hunt AJ (2018). Utilisation of supercritical fluids for the effective extraction of waxes and cannabidiol (CBD) from hemp wastes. *Industrial Crops and Products*, 112: 38-46.
- [21] Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117: 426–436.
- [22] Baek SH, Kim YO, Kwag JS, Choi KE, Jung WY i Han DS (1998). Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, 21: 353-356.
- [23] Bagshaw SM i Hagen NA (2002). Medical efficacy of cannabinoids and marijuana: A comprehensive review of the literature. *Journal of Palliative Care*, 18(2): 111–122.
- [24] Baker D, Pryce G, Giovannoni G i Thompson AJ (2003). The therapeutic potential of cannabis. *Neurology*, 2: 291-298.
- [25] Balachandran S, Kentish SE, Mawson R, Ashokkumar M (2006). Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13: 471–479.
- [26] Banerjee SP, Snyder SH i Mechoulam R (1975). Cannabinoids: influence on neurotransmitter uptake in rat brain synaptosomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 194: 74-81.
- [27] Barbosa HMA, de Melo MMR, Coimbra MA, Passos CP, Silva CM (2014). Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 85: 165–172.

- [28] Barker TB (1985). Quality by experimental design. New York: Marcel Dekker, Inc.
- [29] Barrett ML, Gordon D i Evans FJ (1985). Isolation from *Cannabis sativa* L. of cannflavin—a novel inhibitor of prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 34: 2019–2024.
- [30] Barrett ML, Scutt AM i Evans FJ (1986). Cannflavin A and B, prenylated flavones from *Cannabis sativa* L. *Experientia*, 42:452–453.
- [31] Baş D i Boyacı İH (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3): 836-845.
- [32] Baumann J, von Bruchhausen F i Wurm G (1980). Flavonoids and related compounds as inhibition of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins*, 20(4): 627-39.
- [33] Belwal T, Bhatt ID, Rawal RS, Pande V (2016). Microwave-assisted extraction (MAE) conditions using polynomial design for improving antioxidant phytochemicals in *Berberis asiatica* Roxb. ex DC. leaves. *Industrial Crops and Products*
- [34] Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76: 965–977.
- [35] Bhandari B, Datta N i Howes T (1997). Problems associated with spray drying of sugar rich foods, *Drying Technology*, 15: 671–684.
- [36] Bhandari BR i Hartel RW (2005): Phase transitions during food powder production and powder stability. In: *Encapsulated and powdered foods*. CRC Press.
- [37] Bhandari BR i Howes H (1999). Implication of glass transition for the drying and stability of dried foods. *Journal of Food Engineering*, 40:71–79
- [38] Bhandari BR, Datta N i Howes T (1997). Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. *Drying Technology*, 15:2, 671-684.
- [39] Bhuyan DJ, Vuong QV, Chalmers AC, van Altena IA, Bowyer MC, Scarlett CJ (2015). Microwave-assisted extraction of *Eucalyptus robusta* leaf for the optimal yield of total phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 69: 1–10.
- [40] Biegon A i Bar-Joseph A (1995). Development of HU-211 as a neuroprotectant for ischemic brain damage. *Neurological Research*, 17(4): 275-80.
- [41] Bifulco M i Di Marzo V (2002). Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nature Medicine*, 8: 547–550.
- [42] Bifulco M, Laezza C, Pisanti S i Gazerro P (2006). Cannabinoids and cancer: pros and cons of an antitumour strategy. *British Journal of Pharmacology*, 148: 123–35.
- [43] Bifulco M, Malfitano AM, Pisanti S i Laezza C (2008). Endocannabinoids in endocrine and related tumours. *Endocrine-Related Cancer*, 15: 391–408.
- [44] Blázquez C, Carracedo A, Barrado L, Real PJ, Fernández-Luna JL, Velasco G, Malumbres M i Guzmán M (2006). Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB Journal*, 20: 2633–2635.

- [45] Bócsa I and Karus M (1998). The cultivation of hemp: botany, varieties, cultivation and harvesting. Hemptech, Sebastopol, CA.
- [46] Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM i Wang GS (2013). The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. *Pharmacotherapy*, 33(2): 195–209
- [47] Bottcher H (1965). *Miracle drugs*. Zagreb: Zora.
- [48] Bowles DW, O'Bryant CL, Camidge DR i Jimeno A (2012). The intersection between cannabis and cancer in the United States. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 83: 1–10.
- [49] Brachet A, Christen P i Veuthey JL (2002). Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochemical Analysis*, 13: 162–169.
- [50] Brenneisen R (1983). Psychotropic drugs. I. *Cannabis sativa* L. (Cannabinaceae). *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 58(11): 314–320.
- [51] Brenneisen R (2007). Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other *Cannabis* constituents, in: *Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids*, edited by ElSohly MA, Humana Press Inc, Totowa, New Jersey
- [52] Bridgeman MB i Abazia DT (2017). Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *Pharmacology & Therapeutics*, 42(3): 180–188.
- [53] Brighenti V, Pellati F, Steinbach M, Maran D, Benvenuti S (2017). Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibretype *Cannabis sativa* L.(hemp). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- [54] Brovchenko I i Oleinikova A (2008). Multiple phases of liquid water. *ChemPhysChem*, 9: 2660–2675
- [55] Brunner G (1994). *Supercritical Gases as Solvents: Phase Equilibria*. In: *Gas Extraction*. Topics in Physical Chemistry, vol 4. Steinkopff, Heidelberg
- [56] Buchbauer G, Jirovetz L, Jager W, Plank C i Dietrich H (1993). Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82(6): 660-664.
- [57] Buffler CR (1993). *Microwave cooking and processing: engineering fundamentals for the food scientist*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- [58] Cabane B i Vuilleumier R (2005). The physics of liquid water. *Comptes Rendus Geoscience*, 337: 1–23.
- [59] Cai YZ i Corke H (2000). Production and properties of spray dried Amaranthus Betacyanin pigments, *Journal of Food Science*, 65: 1248-1252.
- [60] Çam M i Hisil Y (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123: 878–885.

- [61] Capelo-Martínez JL, Ximénez-Embún P, Madrid Y, Cámara C (2004). Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (4): 331–340.
- [62] Carr AG, Mammucari R i Foster N (2011). A review of subcritical water as a solvent and its utilization for the processing of hydrophobic organic compounds. *Chemical Engineering Journal*, 172(1): 1–17.
- [63] Carracedo A, Gironella M, Lorente M, Garcia S, Guzmán M, Velasco G i Iovanna JL (2006). Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Research*, 66: 6748–6755.
- [64] Casanova ML, Blázquez C, Martínez-Palacio J, Villanueva C, Fernández-Aceñero MJ, Huffman JW, Jorcano JL i Guzmán M (2003). Inhibition of skin tumour growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *Journal of Clinical Investigation*, 111: 43–50.
- [65] Cathcart P, de Giorgio A i Stebbing J (2015). Cannabis and cancer: reality or pipe dream? *The Lancet Oncology*, 16(13): 1291-2.
- [66] Celik M i Wendel S (2005). Spray drying and pharmaceutical applications, in: *Handbook of granulation technology*, edited by Parikh DM, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA.
- [67] Chan CH, Yusoff R, Nghoh GC i Kung FWL (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218: 6213–6225.
- [68] Chan PC, Sills RC, Braun AG, Haseman JK i Bucher JR (1996). Toxicity and carcinogenicity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in Fischer rats and B6C3F1 mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 30: 109–117.
- [69] Chandra S, Lata H, ElSohly Mahmoud A (2017). *Cannabis sativa L.* - Botany and Biotechnology, Springer International Publishing
- [70] Chandra SH, Lata I, Khan A i ElSohly MA (2010). Propagation of elite *Cannabis sativa* for the production of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) using biotechnological tools. In A. Rajesh (Ed.), *Medicinal Plant Biotechnology*. UK: CABI.
- [71] Chang C, Yen C, Wu M, Hsu M (2017). Microwave-assisted extraction of cannabinoids in hemp nut using response surface methodology: optimization and comparative study. *Molecules*, 22 (11): 1894.
- [72] Chaplin M (2008). Explanation of the physical anomalies of water. London South Bank University.
- [73] Chaplin M (2008). Water's hydrogen bond strength. London South Bank University, Borough Road, London SE1 0AA, UK.
- [74] Chemat F i Smadja (2004). Brevet Européen. EP 1 439 218 A1.
- [75] Chemat F, Rombaut N, Sicaire AG, Meullemiestre A, Fabiano-Tixier AS, Abert-Vian M (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms,

- techniques, combinations, protocols and applications A Review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 36: 540-560.
- [76] Chemat F, Smadja J i Lucchesi ME (2004). Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. US Patent 0,187,340, A1.
- [77] Chemat F, Vian M i Cravotto G (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 8615–8627.
- [78] Chemat S, Ait-Amar H, Lagha A i Esveld DC (2005), Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. *Chemical Engineering and Processing*, 44: 1320–1326.
- [79] Chemat S, Ait-Amar H, Lagha A, Esveld DC (2005). Microwave-assisted extraction kinetics of terpenes from caraway seeds. *Chemical Engineering and Processing*, 44: 1320–1326.
- [80] Chemat S, Lagha A, Ait Amar H, Bartels PV, Chemat F (2004). Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal*, 19: 188-195.
- [81] Chen L, Song D, Tian Y, Ding L, Yu A i Zhang H (2008). Application of on-line microwave sample-preparation techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, 27: 151–159.
- [82] Chesher GB i Jackson DM (1985). The quasi-morphine withdrawal syndrome: effect of cannabiniol, cannabidiol and tetrahydrocannabinol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 23: 13-15.
- [83] Chien FY, Wang R, Mittag Tw, Podos SM (2003). Effect of WIN55212-2, a cannabinoid receptor agonist, on aqueous humor dynamics in monkeys. *Archives of Ophthalmology*, 121(1): 87-90.
- [84] Chong MS, Wolff K, Wise K, Tanton C, Winstock A, Silber E (2006). Cannabis use in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 12 (5): 646-651.
- [85] Chopra M, Kour N i Kaur M (2014). Antimicrobial analysis of leaves of *Cannabis sativa*. *Journal of Science*, 4: 123–127.
- [86] Cianchi F, Papucci L, Schiavone N, Lulli M, Magnelli L, Vinci MC, Messerini L, Manera C, Ronconi E, Romagnani P, Donnini M, Perigli G, Trallori G, Tanganelli E, Capaccioli S i Masini E (2008). Cannabinoid receptor activation induces apoptosis through tumor necrosis factor alpha-mediated ceramide de novo synthesis in colon cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 14: 7691–7700.
- [87] Citti C, Ciccarella G, Braghiroli D, Parentic C, Vandelli MA, Cannazzab G (2016). Medicinal cannabis: Principal cannabinoids concentration and their stability evaluated by a high performance liquid chromatography coupled to diode array and quadrupole time of flight mass spectrometry method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128: 201–209.
- [88] Clarke RC (1998). Hashish! Los Angeles, CA: Red Eye Press.

- [89] Clarke RC i Watson DP (2002). Botany of natural Cannabis medicines. In F. Grotenhermen, & E. Russo (Eds.), Cannabis and cannabinoids: pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. New York: The Haworth Press.
- [90] Clifford AA (2008). Changes of water properties with temperature.
- [91] Clifford AA, Basile A, Al-Saidi SH (1999). A comparison of the extraction of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 364: 635–637.
- [92] Consroe P, Laguna J, Allender J, Snider S, Stern L, Sandyk R, Kennedy K i Schram K (1991). Controlled clinical trial of cannabidiol in Huntington's disease. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 40: 701–708.
- [93] Corey-Bloom J, Wolfson T, Gamst A, Jin S, Marcotte TD, Bentley H, Gouaux B (2012). Smoked cannabis for spasticity in multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled trial. Canadian Medical Association Journal, 184(10): 1143-50.
- [94] Corrigan D (2008). The pharmacology of cannabis issues for understanding its use. A cannabis reader: global issues and local experiences, Monograph series 8, Volume 1, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon.
- [95] Cravotto G, Boffa L, Mantegna S, Perego P, Avogadro M, Cintas P (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. Ultrasonics Sonochemistry, 15: 898–902.
- [96] Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R (1980). Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. Pharmacology, 21(3): 175-185.
- [97] Curren MSS i King JW (2001). Solubility of triazine pesticides in pure and modified subcritical water. Analytical Chemistry, 73: 740–745.
- [98] Čujić N, Šavikin K, Janković T, Pljevljakušić D, Zdunić G i Ibrić S (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique, Food Chemistry, 194: 135–142.
- [99] Da Porto C, Decorti D, Natolino A (2014). Separation of aroma compounds from industrial hemp inflorescences (*Cannabis sativa* L.) by supercritical CO₂ extraction and on-line fractionation. Industrial Crops and Products, 58: 99-103.
- [100] Da Porto C, Natolino A, Decorti D (2015). Effect of ultrasound pre-treatment of hemp (*Cannabis Sativa* L.) seed on supercritical CO₂ extraction of oil. Journal of Food Science and Technology, 52(3): 1748–1753.
- [101] Da Porto C, Voinovich D, Decorti D, Natolino A (2012). Response surface optimization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) oil yield and oxidation stability by supercritical carbon dioxide extraction. The Journal of Supercritical Fluids, 68: 45-51.
- [102] da Silva RPF, Rocha-Santos TAP, Duarte AC (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. Trends in Analytical Chemistry, 76: 40–51.

- [103] Dahmoune F, Nayak B, Moussi K, Remini H, Madani K (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166: 585- 595.
- [104] Dalterio S, Mayfield D, Bartke A i Morgan W (1985). Effects of psychoactive and non-psychoactive cannabinoids on neuroendocrine and testicular responsiveness in mice. *Life Sciences*, 36: 1299-1306.
- [105] Davis WM i Hatoum NS (1993). Neurobehavioral actions of cannabichromene and interactions with Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *General Pharmacology*, 14(2): 247-252.
- [106] Degenhardt F, Stehle F i Kayser O (2017). The biosynthesis of cannabinoids, in: *Handbook of Cannabis and related pathologies: Biology, pharmacology, diagnosis, and treatment*, edited by Preedy VR, Academic Press, Elsevier
- [107] Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS i Howlett AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular Pharmacology*, 34(5): 605-13.
- [108] Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R, (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946–1949.
- [109] Devi V i Khanam S (2019). Study of ω -6 linoleic and ω -3 α -linolenic acids of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil extracted by supercritical CO₂ extraction: CCD optimization. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7: 102818.
- [110] Devinsky O, Cross JH, Laux L, Marsh E, Miller I, Nabbout R, Scheffer IE, Thiele EA i Wright S (2017). Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the Dravet syndrome. *New England Journal of Medicine*, 376(21): 2011-2020.
- [111] Devinsky O, Marsh E, Friedman D, Thiele E, Laux L, Sullivan J, Miller I, Flamini R, Wilfong A, Filloux F, Wong M, Tilton N, Bruno P, Bluvstein J, Hedlund J, Kamens J, Maclean J, Nangia S, Singhal NS, Wilson CA, Patel A, Cilio MR (2016). Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *The Lancet Neurology*, 15(3): 270-278.
- [112] Dhobi M, Mandal V, Hemalatha S (2009). Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavolignan–silybinin. *Journal of Chemical Metrology* 3 (1): 13–23.
- [113] Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P i Vidal N (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, *Food Chemistry*, 97(4): 654–660.
- [114] Ellis RJ, Toperoff W, Vaida F, van den Brande G, Gonzales J, Gouaux B, Bentley H, Atkinson JH (2009). Smoked medicinal cannabis for neuropathic pain in HIV: a randomized, crossover clinical trial. *Neuropsychopharmacology*, 34(3): 672-80.

- [115] ElSohly HN, Turner CE, Clark AM i ElSohly MA (1982). Synthesis and antimicrobial activities of certain cannabichromene and cannabigerol related compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71: 1319-1323.
- [116] ElSohly M (2002). Chemical constituents of *Cannabis*, in *Cannabis and cannabinoids- Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential* (Grotenhermen, F. and Russo, E., eds.), Haworth Press, New York.
- [117] Elsohly M i Repka MA (2006). Transmucosal Delivery of Cannabinoids. U.S. patent 0257463A1
- [118] ElSohly MA i Slade D (2005). Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, *Life Science Journal*, 78: 539-548.
- [119] Elsohly M i Gul W (2014). Constituents of *Cannabis sativa*, in *Handbook of Cannabis* (Pertwee RG, ed.). Oxford University Press
- [120] EMA, 2018a, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Cannabis legislation in Europe: an overview, Publications Office of the European Union, Luxembourg
- [121] EMA, 2018b, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Medical use of cannabis and cannabinoids: questions and answers for policymaking, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- [122] Esclapez MD, Garcia-Perez JV, Mulet A, Carcel JA (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3: 108–120.
- [123] Escribano-Bailon MT i Santos-Buelga C (2003). Polyphenol extraction from foods. In C. Santos-Buelga, & G. Williamson (Eds.), *Methods in polyphenol analysis*. UK: The Royal Society of Chemistry.
- [124] Eskilsson CS i Björklund E (2002). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902: 227–250.
- [125] Eskilsson CS, Björklund E (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902: 227–250.
- [126] Espín JC, Soler-Rivas C i Wichers HJ (2002). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 648–656.
- [127] European Pharmacopoeia editio 8th, Ph. Eur. 8.0., 2013.
- [128] Evans AT, Formukong EA, Evans FJ (1987). Actions of cannabis constituents on enzymes of arachidonate metabolism: anti-inflammatory potential. *Biochemical Pharmacology*, 36, 2035-2037.
- [129] Evans FJ (1991). Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Medica*, 57(Suppl 1): 60-67.

- [130] Fabre LF i Mciendon D (1981). The efficacy and safety of nabilone (a synthetic cannabinoid) in the treatment of anxiety. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 21: 377-382.
- [131] Fairbairn JW (1972). Trichomes and glands of *Cannabis sativa* L. *Bulletin on Narcotics*, 24(4): 29–33.
- [132] Farag S and Kayser O (2017). The *Cannabis* plant: Botanical aspects, in: *Handbook of Cannabis and related pathologies: Biology, pharmacology, diagnosis, and treatment*, edited by Preedy VR, Academic Press, Elsevier
- [133] FDA. CESAMET® FDA Approval
(https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/018677s011lbl.pdf).
- [134] FDA. EPIDIOLEX® FDA Approval
(https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/210365lbl.pdf).
- [135] FDA. MARINOL® FDA Approval
(https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/018651s021lbl.pdf).
- [136] FDA. SYNDROS FDA Approval
(https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/205525s003lbl.pdf).
- [137] Fellermeier M, Eisenreich W, Bacher A i Zenk MH (2001). Biosynthesis of cannabinoids. Incorporation experiments with ¹³C labeled glucoses. *European Journal of Biochemistry*, 268: 1596–1604.
- [138] Fernández DP, Goodwin ARH, Lemmon EW, Levelt Sengers JMH, Williams RC (1997). A formulation for the static permittivity of water and steam at temperatures from 238 K to 873 K at pressures up to 1200 MPa, including derivatives and Debye-Hückel coefficients. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 26: 1125–1166.
- [139] Ferreira SC, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandao GC, da Silva EGP, Portugal LA, dos Reis PS, Souza AC, Dos Santos WNL (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2): 179-186.
- [140] Fishedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH i Verpoorte R (2010). Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*, 71: 2058–2073.
- [141] Fukuda IM, Pinto CFF, dos Santos Moreira C, Saviano AM i Lourenço FR (2018). Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54.
- [142] Gagne SJ, Stout JM, Liu E, Boubakir Z, Clark SM i Page JE (2012). Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 12811–12816.

- [143] Gallily R, Yamin A, Waksman Y, Ovadia H, Weidenfeld J, Bar-Joseph A, Biegon A, Mechoulam R i Shohami E (1997). Protection against septic shock and suppression of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production by dexanabinol (HU-211), a nonpsychotropic cannabinoid. *J Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(2): 918-24.
- [144] Gallo-Molina AC, Castro-Vargasa HI, Garzón-Méndez WF, Martínez Ramírez JA, Rivera Monroy JZ, 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. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- [145] Galvan d'Alessandro L, Kriaa K, Nikov I i Dimitrov K (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93: 42–47.
- [146] Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M i Guzmán M (2000). Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Medicine*, 6: 313–319.
- [147] Gamiz-García L i Luque de Castro MD (2000). Continuous subcritical water extraction of medicinal plant essential oil: comparison with conventional techniques. *Talanta*, 51: 1179–1185.
- [148] Gavaric A, Ramic M, Vladic J, Pavlic B, Radosavljevic R i Vidovic S (2018). Recovery of antioxidant compounds from aronia filter tea factory by-product: novel versus conventional extraction approaches. *Acta Chimica Slovenica*, 438–447.
- [149] Gavarić A, Vidović S, Zeković Z, Vladić J (2019). Influence of storage time on quality of spray-dried extracts of basil (*Ocimum Basilicum* L.). *Food in Health and Disease, scientific-professional journal of nutrition and dietetics*, 8 (1): 6-12.
- [150] Gavarić A, Vladić J, Ambrus R, Jokić S, Szabó-Révész P, Tomić M, Blažić M, Vidović S (2019). Spray drying of a subcritical extract using *Marrubium vulgare* as a method of choice for obtaining high quality powder. *Pharmaceutics*, 11(10): 523.
- [151] Gbashi S, Adebo OA, Piater L, Madala NE i Njobeh PB (2016). Subcritical water extraction of biological materials. *Separation & Purification Reviews*, 46: 21-34.
- [152] Geffrey AL, Pollack SF, Bruno PL, Thiele EA (2015). Drug–drug interaction between clobazam and cannabidiol in children with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 56(8): 1246-1251.
- [153] Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF i Perry CA (1995). Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *The American Journal of Pathology*, 147: 278-292.
- [154] Gill EW, Paton WDM i Pertwee RG (1970). Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of *Cannabis*. *Nature*, 228: 134-6.

- [155] Glesinger L (1954). *Medicine through centuries*. Zagreb: Zora.
- [156] Golocorbin-Kon S, Pavlović N, Raskovic A, Lalic-Popovic M, Milic N, Milošević N i Mikov M (2015). Primena kanabisa u medicini i farmaciji, *Medicinski Casopis*, 49: 130-138.
- [157] Goula AM i Adamopoulos KG (2008). Effect of maltodextrin addition during spray drying of tomato pulp in dehumidified air: II. Powder properties. *Drying Technology*, 26(6): 726-737.
- [158] Graham JDP (1986). The bronchodilator action of cannabinoids, in: *Cannabinoids as therapeutic agents*, edited by Mechoulam R, Boca Raton: CRC Press.
- [159] Green K (1998). Marijuana smoking vs cannabinoids for glaucoma therapy. *Archives of Ophthalmology*, 116: 1433-1437.
- [160] Greenberg HS, Werness SA, Pugh JE, Andrus RO, Anderson DJ, Domino EF (1994). Short-term effects of smoking cannabis on balance in patients with multiple sclerosis and normal volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 55(3): 324-8.
- [161] Grotenhermen F (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4): 327-60.
- [162] Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J i Wink D (1998). Cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 8268-8273.
- [163] Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J i Wink D (1998). Cannabidiol and (-)-Delta-9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14): 8268-8273.
- [164] Handa SS, Khanuja SPS, Longo G, Rakesh DD (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants, (Istedn), no. 66. Italy: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology.
- [165] Haney M, Gunderson EW, Rabkin J, Hart CL, Vosburg SK, Comer SD, Foltin RW (2007). Dronabinol and marijuana in HIV-positive marijuana smokers: caloric intake, mood and sleep. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 45: 545-554.
- [166] Haney M, Rabkin J, Gunderson E, Foltin RW (2005). Dronabinol and marijuana in HIV+ marijuana smokers: acute effects on caloric intake and mood. *Psychopharmacology*, 181: 170-8.
- [167] Happyana N, Agnolet S, Muntendam R, Van Dam A, Schneider B i Kayser O (2013). Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*, 87: 51-59.
- [168] Harborne JB i Dey PM (1989). *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London.

- [169] Hazekamp A i Fishedick JT (2011). *Cannabis*-from cultivar to chemovar. *Drug Test. Analysis*, 4 (7-8): 660-667.
- [170] He L, Zhang X, Xu H, Xu C, Yuan F, Knez Ž, Novak Z, Gao Y (2012). Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS•+ assay. *Food and Bioproducts processing*, 90: 215-223.
- [171] Hemwimol S, Pavasant P, Shotipruk A (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13:543-548.
- [172] Henglein A, Kormann C (1985). Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 48 (2): 251-258.
- [173] Hepler RS i Frank IR (1971). Marijuana smoking and intraocular pressure. *The Journal of the American Medical Association*, 217(10): 1392.
- [174] Herrero M, Cifuentes A, Ibañez E (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry*, 98: 136-148.
- [175] Hillig K (2005). Genetic evidence for speciation in *Cannabis* (Cannabaceae), *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 161-180
- [176] Hochmuth D (2006). Massfinder 3: Software for GC/MSinterpretation and presentation, mass spectral library administration. Hamburg, Germany.
- [177] Holliday RL, King JW, List GR (1997). Hydrolysis of vegetable oils in sub- and supercritical water. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 36 (3): 932-935.
- [178] Hollister LE (1974). Structure-activity relationships in man of cannabis constituents, and homologs and metabolites of delta-9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacology*, 11(1): 3-11.
- [179] Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP (2011). Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology, *Food Chemistry*, 126: 339-346.
- [180] Hosseini H, Bolourian S, Hamgini EY, Mahababadi EG (2018). Optimization of heat- and ultrasound- assisted extraction of polyphenols from dried rosemary leaves using response surface methodology. *Journal of Food Processing and Preservation* 42.
- [181] House of Lords Select Committee on Science and Technology. *Cannabis: The scientific and medical evidence*. London: The Stationary Office. 1998.
- [182] Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R i Pertwee RG (2002), International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*, 54: 161-202.

- [183] Hromádková Z, Ebringerová A, Valachovič P (2002). Ultrasound-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian (*Valeriana officinalis* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 9: 37-44.
- [184] Hu Z, Cai M i Liang HH (2008). Desirability function approach for the optimization of microwave-assisted extraction of saikosaponins from radix bupleuri. *Separation and Purification Technology*, 61(3): 266–275.
- [185] Huestis MA (2007). Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*, 4: 1770–804.
- [186] Ibanez E, Kuvatova A, Senorans FJ, Cavero S, Reglero G, Hawthorne SB (2003). Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 375–382.
- [187] Ilaria RL, Thornby JI i Fann WE (1981). Nabilone, a cannabinol derivative, in the treatment of anxiety neurosis. *Current Therapeutic Research*, 29: 943-949.
- [188] Islam MN, Jo YT i Park JH (2014). Remediation of soil contaminated with lubricating oil by extraction using subcritical water. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20: 1511–1516.
- [189] Izzo A (2004). Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors. *British Journal of Pharmacology*, 142: 1201–1202.
- [190] Jain Manu S, Lohare Ganesh B, Bari Manoj M, Chavan Randhir B, Barhate Shashikant D, Shah Chirag B (2011). Spray drying in pharmaceutical industry: a review. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, 4(2): 74-79.
- [191] Jesus SP, Calheiros MN, Hense H, Meireles MAA (2013). A simplified model to describe the kinetic behavior of supercritical fluid extraction from a rice bran oil byproduct. *Food Public Health*, 3: 215–222.
- [192] Ji J, Lu X, Cai M, Xu C (2006). Improvement of leaching process of geniposide with ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13: 455–462.
- [193] Jones CLA (1999). Monoterpenes: Essence of a cancer cure. *Nutrition Research News*, 4(4): 190.
- [194] Jones JB (1997). *Hydroponics: a practical guide for the soilless grower*. Boca Raton: CRC Press.
- [195] Jovanović A, Petrović P, Đorđević V, Zdunić G, Šavikin K i Bugarski B (2017). Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite Sirovine*, 37: 45-49.
- [196] Jovanović AA, Đorđević V, Zdunić GM, Šavikin KP, Pljevljakušić D, Bugarski BM (2016). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from *Thymus serpyllum* and its antioxidant activity. *Hemijska Industrija*, 70 (4): 391–398.
- [197] Jovanović AA, Đorđević VB, Zdunić GM, Pljevljakušić DS, Šavikin KP, Gođevac DM, Bugarski BM (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from

Thymus serpyllum L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. Separation and Purification Technology.

- [198] Joy J, Watson S i Benson J (1999). Marijuana and medicine: assessing the science base. Washington, D.C.: National Academy Press
- [199] Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha JP, Pihlaja K, Kujala TS i Henonen M (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3954–3962.
- [200] Kaiser CS, Römpp H, Schmidt PC (2001). Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide. Pharmazie, 56: 907–926.
- [201] Kalant H (2001). Medicinal use of cannabis. Pain Research and Management, 6(2): 80-91.
- [202] Katalinic V, Milos M, Kulisic T i Jukic M (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chemistry, 94(4): 550–557.
- [203] Kelly K (2009). History of medicine. New York: Facts on file.
- [204] Kenney S, Kekuda R, Prasad P, Leibach F, Devoe L i Ganapathy V (1999). Cannabinoid receptors and their role in the regulation of the serotonin transporter in human placenta. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 181: 491–497.
- [205] Khajenoori M, Asl A, Hormozi F, Eikani M, Nouri-Bidgoli H (2008). Subcritical water extraction of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss. Journal of Food Process Engineering, 32: 804-816.
- [206] Khoza BS, Chimuka L, Mukwevho E, Steenkamp PA, and Madala NE (2014). The effect of temperature on pressurized hot water extraction of pharmacologically-important metabolites as analyzed by UPLC-qTOF-MS and PCA. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, (Article ID 914759): 1–9.
- [207] Khuwijitjaru P, Fujii T, Adachi S, Kimura Y, Matsuno R (2004). Kinetics on the hydrolysis of fatty acid esters in subcritical water. Chemical Engineering Journal 99 (1): 1–4.
- [208] Kieffer J (2017). European medicines agency representative (personal communication). n.d.
- [209] Killestein J, Hoogervorst EL, Reif M, Kalkers NF, Van Loenen AC, Staats PG, Gorter RW, Uitdehaag BM, Polman CH (2002). Safety, tolerability, and efficacy of orally administered cannabinoids in MS. Neurology, 58(9): 1404-7.
- [210] Kim JW, Mazza G (2006). Optimization of extraction of phenolic compounds from flax shives by pressurized low-polarity water. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 7575–7584.
- [211] Kim W, Kim J, Veriansyah B, Kim J, Lee Y, Oh S, i Tjandrawinata R (2009). Extraction of bioactive components from *Centella asiatica* using subcritical water. The Journal of Supercritical Fluids, 48(3): 211–216.

- [212] Kingston HM i Jassie (1988). Introduction to microwave sample preparation. American Chemical Society, Washington, DC.
- [213] Klein TW, Friedman H i Specter S (1998). Marijuana, immunity and infection. Journal of Neuroimmunology, 83:,102-105.
- [214] Klinger BV i Ham MT (1976). Antibacterial activity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol. Antonie van Leeuwenhoek, 42: 9-12.
- [215] Kuijpers MWA, Kemmere MF, Keurentjes JTF (2002). Calorimetric study of the energy efficiency for ultrasound-induced radical formation. Ultrasonics, 40:675–678
- [216] Kuvatova A, Lagadec AJM, Miller DJ, Hawthorne SB (2001). Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water. Flavour and Fragrance Journal, 16: 64–73.
- [217] Lamoolphak W, Goto M, Sasaki M, Suphantharika M, Muangnapoh C, Prommuag C, Shotipruk A (2006). Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids. Journal of Hazardous Materials, 137 (3): 1643–1648.
- [218] Lang Q, Wai CM (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. Talanta, 53: 771–782.
- [219] Leighton TG (2007). What is ultrasound? Progress in Biophysics & Molecular Biology, 93: 3–83
- [220] Lepojević Ž (2000). Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda, Novi Sad.
- [221] Leson G, Pless P i Roulac J (1999). Hemp Foods and Oils for Health, Hemptech, Sebastopol, CA.
- [222] Leung L (2011). Cannabis and its derivatives: review of medical use. Journal of the American Board of Family Medicine, 24: 452–462.
- [223] Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R (1999). Pharmaceutical experimental design. New York: Marcel Dekker, Inc.
- [224] Lewis-Bakker MM, Yang Y, Vyawahare R i Kotra LP (2019). Extractions of medical cannabis cultivars and the role of decarboxylation in optimal receptor responses. Cannabis and Cannabinoid Research.
- [225] Liang X i Fan Q (2013). Application of subcritical water extraction in pharmaceutical industry. Journal of Chemical Engineering and Materials Science, 2013: 1–6.
- [226] Liu S, Lin J, Wang C, Chen H i Yang D (2009). Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) flowers. Food Chemistry, 114(2): 577– 581.
- [227] Lundstedt T, Seifert E, Abramo L, Thelin B, Nystrom A, Pertensen J, Bergman R (1998). Experimental design and optimization. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 42: 3-40.

- [228] Luque de Castro MD i Priego-Capote F (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2383-2389.
- [229] Luque-Garcia JL, Luque de Castro MD (2004). Ultrasound-assisted soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment: application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, 1034: 237–242.
- [230] Lutge EE, Gray A, Siegfried N (2013). The medical use of cannabis for reducing morbidity and mortality in patients with HIV/AIDS. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 4: CD005175.
- [231] MacCallum CA i Russo EB (2018). Practical considerations in medical cannabis administration and dosing. *European Journal of Internal Medicine*, 49: 12-19.
- [232] Madras BK (2015). Update of Cannabis and its medical use, 37th ECDD. Agenda item 6.2.
- [233] Mahlberg P G i Kim E S (2004). Accumulation of cannabinoids in glandular trichomes of *Cannabis* (Cannabaceae). *Journal of Industrial Hemp*, 9 (1): 15-36.
- [234] Mani S, Jaya S, Das H (2002). Sticky issue on spray drying of fruit juices, ASAE Meeting, Saskatoon, Canada.
- [235] Marques LG, Ferreira MC, Freire JT (2007): Freeze-drying of acerola (*Malpighia glabra* L.). *Chem Eng Process: Process Intensification*, 46 (5): 451-457.
- [236] Martin-Sanchez E, Furukawa TA, Taylor J i Martin JL (2009). Systematic review and meta-analysis of cannabis treatment for chronic pain. *Pain Medicine*, 10: 1353–1368.
- [237] Mason TJ, Lorimer JP (2002). General principles, in: Mason TJ, Lorimer JP. (Eds.). *Applied Sonochemistry: uses of power ultrasound in chemistry and processing*, Wiley-VCH Verlag, Germany, pp 25–74.
- [238] Massi P, Solinas M, Cinquina V i Parolaro D (2012). Cannabidiol as potential anticancer drug. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75: 303-312.
- [239] Mayers RH, Montgomery DC and Anderson-Cook CM (2009). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments* (3rd edn). Wiley, Chichester.
- [240] McPartland JM (1984). Pathogenicity of *Phomopsis ganjae* on *Cannabis sativa* and the fungistatic effect of cannabinoids produced by the host. *Mycopathologia*, 87: 149-153.
- [241] McPartland JM i Russo EB (2001). *Cannabis* and cannabis extracts: greater than the sum of their parts? *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1: 103–132.
- [242] Mechoulam R i Ben-Shabat S (1999). From gan-zi-gun-nu to anandamide and 2-arachidonoylglycerol: The ongoing story of cannabis. *Natural Product Reports* 16(2): 131-43.
- [243] Mechoulam R i Carlini E (1978). Toward drugs derived from *Cannabis*. *Naturwissenschaften*, 65(4): 174-179.

- [244] Mechoulam R, Parker LA, Gallily R (2002). Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42: 11–19.
- [245] Mediavilla V i Steinemann S (1997). Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains. *Journal of the International Hemp Association*, 4(2): 80 - 82.
- [246] Mediavilla V i Steinemann S (1997). Essential oil of *Cannabis sativa* L. strains. *Journal of the international hemp association*, 4: 80–82.
- [247] Mediavilla V, Bassetti P i Leupin M (1999). Agronomic characteristics of some hemp genotypes. *Journal of the International Hemp Association*, 6: 45–53.
- [248] Meier C i Mediavilla V (1998). Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil. *Journal of the international hemp association*, 5: 16–20.
- [249] Mengal P i Mompon B (1996). Method and apparatus for solvent free microwave extraction of natural products. Eur Patent P EP 698,076 B1.
- [250] Merritt JC, Crawford wJ, Alexander PC, Anduze AL, Gelbart SS (1980). Effect of marihuana on intraocular and blood pressure in glaucoma. *Ophthalmology*, 87(3): 222-8.
- [251] Merritt JC, Perry DD, Russell DN i Jones BF (1981). Topical delta-9-tetrahydrocannabinol and aqueous dynamics in glaucoma. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 21: 467–71.
- [252] Meschler JP i Howlett AC (1999). Thujone exhibits low affinity for cannabinoid receptors but fails to evoke cannabimimetic responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 62: 473-480.
- [253] Mesomo MC, Corazza ML, Ndiaye PM, Dalla Santa OR, Cardozo L, Scheer ADP (2013). Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): chemical composition and antibacterial activity. *Journal of Supercritical Fluids*, 80: 44–49.
- [254] Mezzomo N, Martínez J., Ferreira SRS (2009). Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: kinetics, mathematical modeling and scale-up. *Journal of Supercritical Fluids*, 51: 10–16.
- [255] Michel T, Destandau E i Elfakir C (2011). Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries: pressurised solvent-free microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 126: 1380–1386.
- [256] Miletić T, 2013. Karakterizacija i modelovanje procesa sušenja raspršivanjem u razvoju čvrstih farmaceutskih oblika primenom koncepta dizajniranja kvaliteta, doktorska disertacija.
- [257] Milošević SZ, Lepojević ŽD, Zeković ZP, Vidović SS (2011). Determination of extraction conditions of *Ginkgo biloba* L. leaves by supercritical CO₂ using response surface methodology. *Hemijaska Industrija*, 65 (2): 147–157.

- [258] Milošević I, 2014. Razvoj metodologije praćenja višegodišnjeg zagađenja životne sredine preko akumulativnosti elemenata u prstenovima prirasta i kori drveta ariša. (*Larix europaea* Lam.) i duglazije (*Pseudotsuga menziesii* Mirb.), doktorska disertacija.
- [259] Milutinović M, Radovanović N, Corović M, Šiler Marinković S, Rajlić-Stojanović M, Dimitrijević-Branković S (2015). Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust. *Industrial Crops and Products*, 77: 333–341.
- [260] Miron T, Plaza M, Bahrim G, Ibanez E, Herrero M (2011). Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(30): 4918–4927.
- [261] Mišan AC, Mimica-Dukić NM, Mandić AI, Sakač MB, Milovanović IJ, Sedej IJ (2011). Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. *Central European Journal of Chemistry*, 9: 133–142.
- [262] Mkpennie VN, Essien EE, Udoh II (2012). Effect of extraction conditions on total polyphenol contents, antioxidant and antimicrobial activities of *Cannabis sativa* L. *EJEAFChe*.
- [263] Modey WK, Mulholland DA, Raynor MW (1996). Analytical supercritical fluid extraction of natural products. *Phytochemical Analysis*, 7: 1-15.
- [264] Mokgadi J, Turner C i Torto N (2013). Pressurized hot water extraction of alkaloids in Goldenseal. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4: 398–403.
- [265] Montgomery DC (2005). *Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ.
- [266] Montgomery DC (2013). *Design and analysis of experiments*. 8th edn. New York: John Wiley Sons, Inc.
- [267] Montgomery DC i Runger GC (2011). *Applied statistics and probability for engineers*, 5th ed., John Wiley & Sons Inc., New York.
- [268] Moulton G (Eds) (2004). *The complete idiot's guide to biology*, 6–8. Penguin Group Inc: New York, USA
- [269] Musty RE, Karniol IG, Shirakawa I, Takahshi N i Knobel E (1976). Interactions of Δ^9 -THC and cannabinal in man, in: *Pharmacology of marihuana*, edited by Braude MC i Szara S, Raven Press, NY, 2: 559-563.
- [270] Nadagouda MN, Speth TF i Varma RS (2011). Microwaveassisted green synthesis of silver nanostructures. *Accounts of Chemical Research*, 44: 469e478.
- [271] Naffati A, Vladić J, Pavlić B, Vidović S (2017). Biorefining of filter tea factory by-products: Classical and ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild apple fruit dust. *Journal of Food Process Engineering*, e12572

- [272] Nasel C, Nasel B, Samec P, Schindler E i Buchbauer G (1994). Functional imaging of effects of fragrances on the human brain after prolonged inhalation. *Chemical Senses*, 19: 359-364.
- [273] NASEM (2017), The health effects of cannabis and cannabinoids: the current state of evidence and recommendations for research, National Academies Press for the National Academies of Sciences Engineering and Medicine, Washington, DC.
- [274] Naz S, Hanif MA, Bhatti HN i Ansari TM (2017). Impact of supercritical fluid extraction and traditional distillation on the isolation of aromatic compounds from *Cannabis indica* and *Cannabis sativa*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 20 (1): 175-184.
- [275] Nikolovski B (1995). Essays on the history of health culture in Macedonia. Skopje: Macedonian pharmaceutical association.
- [276] Novak J, Zitterl-Eglseer K, Deans SG i Franz CM (2001). Essential oils of different cultivars of *Cannabis sativa* L. and their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 259–262.
- [277] Novotna A, Mares J, Ratcliffe S, Novakova I, Vachova M, Zapletalova O, Gasperini C, Pozzilli C, Cefaro L, Comi G, Rossi P, Ambler Z, Stelmasiak Z, Erdmann A, Montalban X, Klimek A, Davies P (2011). A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, enriched-design study of nabiximols* (Sativex®), as add-on therapy, in subjects with refractory spasticity caused by multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 18: 1122–1131.
- [278] Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, Sugawara K, Szöllösi AG, Czifra G, Pál B, Ambrus L, Klopper J, Camera E, Ludovici M, Picardo M, Voets T, Zouboulis CC, Paus R i Bíró T (2014). Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 124: 3713.
- [279] Omar J, Olivares M, Alzaga M, Etxebarria N (2013). Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *Journal of Separation Science*, 36: 1397-1401.
- [280] Ong E, Cheong JS i Goh D (2006). Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2): 92–102.
- [281] Oyaizu M (1986). Studies on products of browning reaction – antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44:307–315.
- [282] Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B i Pasquali R (2006). The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocrine Reviews*, 27: 73–100.
- [283] Paixao N, Perestrelo R, Marques J i Camara J (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1): 204–214.

- [284] Pan X, Niu G, Liu H (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing* 42 (2): 129–133.
- [285] Pavlić B (2017). Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- [286] Pelagic V (1970). Pelagic folk teacher. Beograd: Freedom.
- [287] Perrotin-Brunel H, Perez PC, van Roosmalen MJE, van Spronsen J, Witkamp G-J, Peters CJ (2010). Solubility of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in supercritical carbon dioxide: Experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 52: 6-10.
- [288] Pertwee R (2006). The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International Journal of Obesity*, 30: 13–18.
- [289] Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA (2010). International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB and CB. *Pharmacological Reviews*, 62: 588–631.
- [290] Peterson J (2013). Accurate curve fits of IAPWS data for high-pressure, high-temperature single-phase liquid water based on the stiffened gas equation of state.
- [291] Petrovska BB (2012). Historical review of medicinal plants' usage, *Pharmacognosy Reviews*.
- [292] Phillips TJ, Cherry CL, Cox S, Marshall SJ i Rice AS (2010). Pharmacological treatment of painful HIV-associated sensory neuropathy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLOS One*, 5:e14433.
- [293] Phoungchandang S i Sertwasana A (2010). Spray drying of ginger juice and physicochemical properties of ginger powders. *Science Asia*, 36: 40–45.
- [294] Piluzza G, Delogu G, Cabras A, Marceddu S, Bullitta S (2013). Differentiation between fiber and drug types of hemp (*Cannabis sativa* L.) from a collection of wild and domesticated accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60.
- [295] Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F (2013). An improved ultrasound cleverger for extraction of essential oils. *Food Analytical Methods*, 7: 9–12.
- [296] Pisanti S, Malfitano AM, Ciaglia E, Lamberti A, Ranieri R, Cuomo G, Abate M, Faggiana G, Proto MC, Fiore D, Laezza C, Bifulco M (2017). Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. *Pharmacology & Therapeutics*, 175: 133-150.
- [297] Plaza M i Turner C (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. *Trends in industrial analytical chemistry*, 71: 39-54.

- [298] Poddar MK i Dewey WL (1980). Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in hypothalamic and striatal synaptosomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 214: 63-67.
- [299] Politis SN, Colombo P, Colombo G, Rekkas DM (2017). Design of experiments (DoE) in pharmaceutical development. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 43(6): 889-901.
- [300] Poortman-van der Meer AJ i Huizer H (1999). A contribution to the improvement of accuracy in the quantitation of THC, *Forensic Science International*, 101: 1-8.
- [301] Pourali O, Asghari FS, Yoshida H (2010). Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. *Chemical Engineering Journal*, 160: 259–266.
- [302] Pravilnik o kvalitetu čaja, biljnog čaja i njihovih proizvoda. Službeni glasnik RS, 4/12
- [303] Pravilnik o uslovima za gajenje konoplje, Službeni glasnik RS, broj 64/13, 2013.
- [304] Pravilnik o utvrđivanju Spiska psihoaktivnih kontrolisanih supstanci, Službeni glasnik RS, broj 38, 2019.
- [305] Price GJ (1990). The use of ultrasound for the controlled degradation of polymer solutions. In: Mason TJ (Eds) *Advances in sonochemistry*, vol 1. Jai Press, Cambridge, pp 231–287
- [306] Proestosi C i Komaitis M (2008). Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT- Food Science and Technology*.
- [307] Prud'homme M, Cata R i Jutras-Aswad D (2015). Cannabidiol as an intervention for addictive behaviors: a systematic review of the evidence. *Substance abuse: research and treatment*, 9: 33.
- [308] Quimby MW (1974). Botany of *Cannabis sativa*, *Archivos De Investigacion Medica*, 5 suppl 1: 127–134.
- [309] Radojković M (2012). Ekstrakti duda (*Morus spp.*, Moraceae), sastav, delovanje i primena, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- [310] Radwan MM, Elsohly MA, Slade D, Ahmed SA, Khan IA i Ross SA (2009). Biologically active cannabinoids from high-potency *Cannabis sativa*. *Journal of Nature Production*, 72(5): 906-911.
- [311] Radwan MM, Ross SA, Slade D, Ahmed SA, Zulfiqar F i Elsohly MA (2008). Isolation and characterization of new *Cannabis* constituents from a high potency variety. *Planta Medica*, 74(3): 267-272.
- [312] Ramirez CL, Fanovich MA i Churio MS (2018). Cannabinoids: extraction methods, analysis, and physicochemical characterization. *Studies in Natural Products Chemistry*, 61.

- [313] Ramos L, Kristenson EM i Brinkman UAT (2002). Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975: 3–29.
- [314] Ramos L, Kristenson EM i Brinkman UAT (2002). Current use of pressurised liquid extraction and sub-critical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 975: 3-29.
- [315] Regelson W, Butler JR, Schulz J (1976). Delta-9-THC as an effective antidepressant and appetite-stimulating agent in advanced cancer patients. in: *The pharmacology of marihuana*, edited by Braude MC Szara S. New York: Raven Press
- [316] Reverchon E i De Marco I (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *Journal of Supercritical Fluids*, 38: 146–166.
- [317] Ribeiro Grijo D, Vieitez Osorio IA, Cardozo-Filho L (2019). Supercritical extraction strategies using CO₂ and ethanol to obtain cannabinoid compounds from cannabis hybrid flowers. *Journal of CO₂ Utilization*, 30: 241-248.
- [318] Richter B, Jones B, Ezzell J, Porter N, Avdalovic N i Pohl C (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68: 1033–1039.
- [319] Richter P, Sepulveda B, Oliva R, Calderon K i Seguel R (2003). Screening and determination of pesticides in soil using continuous subcritical water extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 994: 169–177.
- [320] Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M i Nagarkatti P (2010). Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology*, 215: 598–605.
- [321] Romano LL i Hazekamp A (2014). Cannabis Oil: chemical evaluation of an upcoming cannabis-based medicine. *Cannabinoids*, 1(1): 1-11.
- [322] Roohinejad S, Nikmaram N, Brahim M, Koubaa M, Khelifa A, Greiner R (2017). Potential of novel technologies for aqueous extraction of plant bioactives, in *Water extraction of bioactive compounds: from plants to drug development* edited by Dominguez González H i Jesús González Muñoz M, Elsevier.
- [323] Rosenkrantz H, Sprague RA, Fleischman RW i Braude MC (1975). Oral delta-9-THC toxicity in rats treated for period up to six months. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 32: 399–417.
- [324] Ross SA i ElSohly MA (1995). Constituents of *Cannabis sativa* L. XXVIII—A review of the natural constituents: 1980–1994. *Zagazig Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4: 1–10.
- [325] Ross SA i ElSohly MA (1996). The volatile oil composition of fresh and air-dried buds of *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products*, 59: 49–51.

- [326] Routray W i Orsat V (2001). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2): 1–16.
- [327] Routray W, Orsat V (2011). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2): 1–16.
- [328] Rovetto LJ i Aieta NV (2017). Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *The Journal of Supercritical Fluids*, 129: 16-27.
- [329] Rozzi NL i Singh RK (2002). Supercritical fluids and the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 33–44.
- [330] Russo E i Guy G (2006). A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Medical Hypotheses*, 66: 234–246.
- [331] Russo E, Mathre ML, Byrne A, Velin R, Bach PJ, Sanchez-Ramos J, Kirlin KA (2002). Chronic cannabis use in the compassionate investigational new drug program: an examination of benefits and adverse effects of legal clinical cannabis, *Journal of Cannabis Therapeutics*, 2(1).
- [332] Russo EB (2000). *Handbook of psychotropic herbs: A scientific analysis of herbal remedies for psychiatric conditions*. Binghamton, NY: The Haworth Press, Inc.
- [333] Salgueiro JB, Ardenghi P, Dias M, Ferreira MBC, Izquierdo I i Medina JH (1997). Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58: 887-891.
- [334] Sánchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramón y Cajal S i Guzmán M (2001). Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Research*, 61: 5784–5789.
- [335] Sánchez-Duffhues G, Calzado MA, de Vinuesa AG, Appendino G, Fiebich, BL, Looch U, Lefarth-Risse A, Krohn K i Muñoz E (2009). Denbinobin inhibits nuclear factor- κ B and induces apoptosis via reactive oxygen species generation in human leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*, 77: 1401-1409.
- [336] Sánchez-Duffhues G, Calzado MA, de Vinuesa AG, Caballero FJ, Ech-Chahad A, Appendino G, Krohn K, Fiebich BL i Muñoz E (2008). Denbinobin, a naturally occurring 1,4-phenanthrenequinone, inhibits HIV-1 replication through an NF- κ B-dependent pathway. *Biochemical Pharmacology*, 76: 1240-1250.
- [337] Santos HM, Capelo JL (2007). Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. *Talanta* 73 (5): 795–802.
- [338] Sasaki M, Fang Z, Fukushima Y, Adschiri T, K. Arai K (2000). Dissolution and hydrolysis of cellulose in subcritical and supercritical water. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 39 (8): 2883–2890.

- [339] Sauer MA, Rifka SM, Hawks RL, Cutler GB i Loriaux DL (1983). Marijuana: interaction with the estrogen receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 224: 404-407.
- [340] Saydi D i Hatamipour MS (2012). Analysis of the effective parameters on potato powder quality produced by spray dryer. *Iranian Journal of Chemical Engineering*, 9: 55–62.
- [341] Schillmiller AL, Last RL, Pichersky E (2008). Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *The Plant Journal*, 54: 702–711.
- [342] Schultes RE and Hofmann A (1992). The botany and chemistry of hallucinogens, in: *The bannerstone division of American lectures in living chemistry*, edited by Newton Kugelmass, Charles C Thomas
- [343] Sereewatthanawut I, Prapintip S, Watchiraruji K, Goto M, Sasaki M, Shotipruk A (2007). Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. *Bioresource Technology*, 99 (3): 555–561.
- [344] Shahzad A (2011). Hemp fibre and its composites – a review. *Journal of Composite Materials*
- [345] Shirsath SR, Sonawane SH, Gogate PR (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations - A review of current status. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 53: 10–23.
- [346] Shrestha AK, Howes T, Adhikari BP, Bhandari BR (2007). Water sorption and glass transition properties of spray dried lactose hydrolyzed skim milk powder. *LWT - Food Science and Technology*, 40: 1593–1600.
- [347] Simić VM, Rajković KM, Stojicević SS, Veličković DT, Nikolić N, Lazić ML, Karabegović, IT (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Separation and Purification Technology*, 160: 89–97.
- [348] Singleton VL i Rossi JA (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144–158.
- [349] Small E and Cronquist A (1976). A practical and natural taxonomy for *Cannabis*, *Taxon*, 25(4): 405.
- [350] Smith R (2002). Extractions with superheated water. *Journal of Chromatography A*, 975(1): 31–46.
- [351] Snyder HE i Lechuga-Ballesteros D (2008). Spray drying: Theory and pharmaceutical applications. In *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Vol. 1: Unit Operations and Mechanical Properties*, edited by Augsburg LL, Hoag SW, Informa Healthcare USA: New York.

- [352] Solana M, Boschiero I, Dall'Acqua S, Bertucco A (2014). Extraction of bioactive enriched fractions from *Eruca sativa* leaves by supercritical CO₂ technology using different co-solvents. *Journal of Supercritical Fluids* 94: 245–251.
- [353] Soto Ayala R i Luque de Castro MD (2001). Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chemistry*, 75: 109–113.
- [354] Spigno Gi De Faveri DM (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: a phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93: 210–217.
- [355] Stanisavljev DR (2009). Fizičko-hemijski procesi u mikrotalasnom polju, *Hemijska industrija* 63 (5a): 489–498.
- [356] Stojanović A, Aćimović M, Kiproovski B, Zeremski T, Vidović S, Drinić Z, Božin B (2019), Ekstrakt od otpada pri preradi konoplje, tehničko rešenje
- [357] Sun Z, Fan Q, Zhang M, Liu S, Tao H, Texter J (2019). Supercritical Fluid- Facilitated Exfoliation and Processing of 2D Materials, *Advanced Science*, 6, 1-34.
- [358] Šeruga M, Novak I i Jakobek L (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3): 1208–1216.
- [359] Tan LW, Ibrahim MN., Kamil R, Taip FS (2011). Empirical modeling for spray drying process of sticky and non-sticky products. *Procedia Food Science*, 1: 690-697.
- [360] Tasić S, Šavikin K, Menković N (2009). Vodič kroz svet Lekovitog, Alexandria
- [361] Teh S-S, Bekhit AE and Birch J (2014). Antioxidative polyphenols from defatted oilseed cakes: effect of solvents. *Antioxidants*, 3: 67-80.
- [362] Teo CC, Tan SN, Yong J, Hew CS i Ong ES (2010). Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A*, 1217: 2484–2494.
- [363] Thompson GR, Fleischman RW, Rosenkrantz H, Braude MC (1974). Oral and intravenous toxicity of delta-9-tetrahydrocannabinol in rhesus monkeys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 27: 648-65.
- [364] Thompson GR, Mason MM, Rosenkrantz H i Braude MC (1973). Chronic oral toxicity of cannabinoids in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 25: 373–390.
- [365] Thostenson i Chou (1999). Microwave processing: fundamentals and applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 30(9): 1055–1071.
- [366] Tiwari BK (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *Trends in Analytical Chemistry*, 71: 100–109.
- [367] Tomida I, Azuara-Blanco A, House H, Flint M, Pertwee RG, Robson PJ (2006). Effect of sublingual application of cannabinoids on intraocular pressure: a pilot study. *Journal of Glaucoma*, 15(5): 349-53.
- [368] Tomšika A, Pavlič B, Vladić J, Ramić M, Brindza J, Vidović S (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29: 502-511.

- [369] Toplak Galle K (2005). Domestic medicinal plants. Zagreb: Mozaic book.
- [370] Truong V, Bhandari BR i Howes T (2005). Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part I—Moisture and glass transition temperature profile during drying. *Journal of Food Engineering*, 71: 55–65.
- [371] Tucakov J (1964). Pharmacognosy. Beograd: Institute for text book issuing in SR. Srbije.
- [372] Tucakov J (1971). Healing with plants – phytotherapy. Beograd: Culture.
- [373] Turcotte D, Le Dorze JA, Esfahani F, Frost E, Gomori A i Namaka M (2010). Examining the roles of cannabinoids in pain and other therapeutic indications: a review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11: 17–31.
- [374] Turkmen N, Sari F, Velioglu YS (2005). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99: 835–841.
- [375] Turner CE, Elsohly MA i Boeren EG (1980). Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of Natural Products*, 43: 169–234.
- [376] Turner CE, Elsohly MA i Boeren EG (1980). Constituents of *Cannabis sativa* L. XVII. A review of the natural constituents. *Journal of Natural Products*, 43: 169–304.
- [377] Upadhyay R, Nachiappan G i Mishra HN (2015). Ultrasound-assisted extraction of flavonoids and phenolic compounds from *Ocimum tenuiflorum* leaves. *Food Science and Biotechnology*, 24: 1951–1958.
- [378] van Bakel H, Stout J, Cote A, Tallon C, Sharpe A, Hughes T i Page J (2011). The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biology*, 12: 102.
- [379] Van Norman GA (2016). Drugs and devices: comparison of European and U.S. approval processes. *JACC: Basic to Translational Science*, 1: 399–412.
- [380] Vanhoenacker G, Van Rompaey P, De Keukeleire D i Sandra P (2002). Chemotaxonomic features associated with flavonoids of cannabinoid-free cannabis (*Cannabis sativa* subsp. *sativa* L.) in relation to hops (*Humulus lupulus* L.). *Natural Product Letters*, 16: 57–63.
- [381] Veggi PC, Martinez J, Meireles MA (2013). Fundamentals of microwave extraction, School of Food Eng./University of Campinas, Campinas.
- [382] Vergara-Salinas JR, Perez-Jimenez J, Torres JL, Agosin E, Perez-Correa JR (2012). Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hotwater extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44): 10920–10929.
- [383] Vian M, Fernandez X, Visinoni F i Chemat F (2008). Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: a multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Chromatography A*, 1190: 14–17.

- [384] Vidović S, Ramić M, Ambrus R, Vladić J, Szabó-Révész P i Gavarić A (2019). Aronia berry processing by spray drying: from byproduct to high quality functional powder. *Food technology and Biotechnology*.
- [385] Vidović S, Vladić J, Vaštag Ž, Zeković Z, Popović Lj (2014). Maltodextrin as a carrier of health benefit compounds in *Satureja montana* dry powder extract obtained by spray drying technique, *Powder Technology*, 258: 209-215.
- [386] Vinatoru M, Mason TJ, Calinescu I (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry*, 97: 159-178.
- [387] Virot M, Tomao V, Colnagui G, Visinoni F i Chemat F (2007), New microwave-integrated Soxhlet extraction. An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of Chromatography A*, 1174: 138–144.
- [388] Vladić J, Canli O, Pavlić B, Zeković Z, Vidović S, Kaplan M (2017). Optimization of *Satureja montana* subcritical water extraction process and chemical characterization of volatile fraction of extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120 (1): 86-94.
- [389] Wade DT, Collin C, Stott C i Duncombe P (2010). Meta-analysis of the efficacy and safety of Sativex (nabiximols), on spasticity in people with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 16: 707–714.
- [390] Wais U, Jackson AW, T He T i Zhang H (2016). Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. *Nanoscale*, 8: 1746-1769.
- [391] Wallace MS, Marcotte TD, Umlauf A, Gouaux B, Atkinson JH (2015). Efficacy of inhaled cannabis on painful diabetic neuropathy. *The Journal of Pain*, 16(7): 616-27.
- [392] Wang C i Kurzer MS (1998). Effects of phytoestrogens on DNA synthesis in MCF-7 cells in the presence of estradiol or growth factors. *Nutrition and Cancer*, 31: 90-100.
- [393] Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y, Li X (2008). Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106: 804–810.
- [394] Wang L i Weller CL (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 300–312.
- [395] Wang LJ (2010). Advances in extraction of plant products in nutraceutical processing. In: Pathak Y (ed) *Handbook of nutraceuticals, vol II: Scale up, processing and automation*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton.
- [396] Wang T, Collet JP, Shapiro S, Ware MA (2008). Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *Canadian Medical Association Journal*, 178: 1669-78
- [397] Wang Y, You J, Yu Y, Qu C, Zhang H, Ding L, Zhang H i Li X (2008). Analysis of ginsenosides in *Panax ginseng* in high pressure microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 110(1): 161–167.

- [398] Ware MA, Wang T, Shapiro S, Collet JP, COMPASS study team (2015). Cannabis for the management of pain: assessment of safety study (COMPASS), *Journal of Pain*.
- [399] Ware MA, Wang T, Shapiro S, Robinson A, Ducruet T, Huynh T, Gamsa A, Bennett GJ, Collet JP (2010). Smoked cannabis for chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *Canadian Medical Association Journal*, 182(14): E694-701.
- [400] Wasim K, Ikram H i Ashrafa M (1995). Antimicrobial studies of the leaf of *Cannabis sativa* L. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1): 29-38.
- [401] Wei X, Chen M, Xiao J, Liu Y, Yu L, Zhang H, Wang Y (2010). Composition and bioactivity of tea flower polysaccharides obtained by different methods. *Carbohydrate Polymers*, 79: 418-422.
- [402] Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, Keurentjes JC, Lang S, Misso K, Ryder S, Schmidtkofer S, Westwood M, Kleijnen J (2015). Cannabinoids for medical use: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*, 313(24): 2456-73.
- [403] Whittaker K, Roth MD, Salehi K, Tashkin DP i Baldwin GC (2004). Mechanisms for impaired effector function in alveolar macrophages from marijuana and cocaine smokers. *Journal of Neuroimmunology*, 147(1-2): 82- 86.
- [404] Whittle B, Hill CA, Flockhart IR, Downs DV, Gibson P, Wheatley GW (2008). Extraction of pharmaceutically active cannabinoids from plant materials. US 7344736B2 Patent.
- [405] WHO, https://www.who.int/substance_abuse/facts/cannabis/en/
- [406] Wianowska D, Dawidowicz AL, Kowalczyk M (2015). Transformations of tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinolic acid and cannabinol during their extraction from *Cannabis sativa* L. *American Journal of Analytical Chemistry*, 70(8): 920–925.
- [407] Wiart C (2006). *Etnopharmacology of medicinal plants*. New Jersey: Humana Press.
- [408] Wiboonsirikul J, Kimura Y, Kadota M, Morita H, Tsuno T, Adachi S (2007). Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 8759–8765.
- [409] Wiboonsirikul J, Kimura Y, Kanaya Y, Tsuno T, Adachi S (2008). Production and characterization of functional substances from a by-product of rice bran oil and protein production by a compressed hot water treatment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72: 384–392.
- [410] Wilsey B, Marcotte T, Deutsch R, Gouaux B, Sakai S, Donaghe H. Low-dose vaporized cannabis significantly improves neuropathic pain. *The Journal of Pain*, 14(2): 136-48.
- [411] Wilsey B, Marcotte T, Tsodikov A, Millman J, Bentley H, Gouaux B, Fishman S (2008). A randomized, placebo-controlled, crossover trial of cannabis cigarettes in neuropathic pain. *The Journal of Pain*, 9(6): 506-21.

- [412] Wirth PW, Watson ES, ElSohly M, Turner CE i Murphy JC (1980). Anti-inflammatory properties of cannabichromene. *Life Sciences*, 26: 1991-1995.
- [413] World Health Organization, CANNABIDIOL (CBD) Critical review report, expert committee on drug dependence, Fortieth Meeting, Geneva, 4-7 June 2018
- [414] Xiao W, Han L i Shi B (2008). Microwave-assisted extraction of flavonoids from *radix astragali*. *Separation and Purification Technology*, 62(3): 614–618.
- [415] Yuan L, Li H, Ma R, Xu X, Zhao C, Wang Z, Chen F i Hu X (2012). Effect of energy density and citric acid concentration on anthocyanins yield and solution temperature of grape peel in microwave-assisted extraction process. *Journal of Food Engineering*, 109: 274–280.
- [416] Zafar R, Aeri V i Datta A (1992). Application of plant tissue and cell culture for production of secondary metabolites. *Fitoterapia*, 63: 33–43.
- [417] Zaibunnisa A, Norashikin S, Mamot S, i Osman H (2009). An experimental design approach for the extraction of volatile compounds from turmeric leaves (*Curcuma domestica*) using pressurized liquid extraction (PLE). *LWT - Food Science and Technology*, 42(1): 233–238.
- [418] Zeković Z, Pavlić B, Ramić M, Vladić J, Cvejcin A, Vidović S (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* byproduct from filter-tea factory. *International Journal Of Engineering*.
- [419] Zeković Z, Pintać D, Majkić T, Vidović S, Mimica-Dukić N, Teslić N, Versari A, Pavlić B (2017). Utilization of sage by-products as raw material for antioxidants recovery—Ultrasound versus microwave-assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 99: 49–59.
- [420] Zeković Z, Vidović S, Vladić J, Radosavljević R, Cvejcin A, Elgndi MA, Pavlić B (2014). Optimization of subcritical water extraction of antioxidants from *Coriandrum sativum* seeds by response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95: 560-566.
- [421] Zengin G, Menghini L, Di Sotto A, Mancinelli R, Sisto F, Carradori S, Cesa S, Fraschetti C, Filippi A, Angiolella L1, Locatelli M, Mannina L, Ingallina C, Puca V, D'Antonio M, Grande R (2018). Chromatographic analyses, in vitro biological activities, and cytotoxicity of *Cannabis sativa* L. Essential Oil: A Multidisciplinary Study. *Molecules*, 10: 23 (12).
- [422] Zhao C-N, Zhang J-J, Li Y, Meng Y, Li H-B (2018). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Melastoma sanguineum* fruit: optimization and identification. *Molecules*, 23(10): 2498.
- [423] Zhao X, Zhu H, Chen J i Ao Q (2015). FTIR, XRD and SEM analysis of ginger powders with different size. *Journal of Food Processing and Preservation*, ISSN 1745-4549.

- [424] Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64, 555-559.
- [425] Zou Y, Xie C, Fan G, Gu Z, Han Y (2010). Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from *Auricularia auricula* fruit bodies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 611–615.
- [426] Zougagh M, Valcárcel M, Ríos A (2004) Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness, *Trends in Analytical Chemistry*, 23: 399–405.
- [427] Zuardi A, Morais S, Guimarães F i Mechoulam R (1995). Antipsychotic effect of cannabidiol. *The Journal of clinical psychiatry*, 56: 485-486
- [428] Zuardi AW (2006). History of cannabis as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*, 28(2):153-157.
- [429] Zuardi AW, Shirakawa I, Finkelfarb E i Karniol IG (1982). Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by Δ^9 -THC in normal subjects. *Psychopharmacology*, 76: 245-50.
- [430] Živković J, Šavikin K, Janković T, Čujić N, Menković N (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from pomegranate peel using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 194: 40-47.

Овај Образац чини саставни део докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта који се брани на Универзитету у Новом Саду. Попуњен Образац укоричити иза текста докторске дисертације, односно докторског уметничког пројекта.

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Екстракција индустријске конопље (<i>Cannabis sativa</i> L.)
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Технолошки факултет Нови Сад б) Институт за ратарство и повртарство Нови Сад в) Нучни институт за прехранбене технологије у Новом Саду г) Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Пројекат финансиран од стране Покрајинског секретаријата за високо образовање и научноистраживачку делатност: „Ренесанса индустријске конопље у светлу актуелних агрономско-медицинских изазова“ Бр. 114-451-2178/2016-03 Трајање: 2016-2019.
1. Опис података
1.1. Врста студије <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u> <hr/> <hr/> <hr/>

1.2. Врсте података

а) квантитативни

б) квалитативни

1.3. Начин прикупљања података

а) анкете, упитници, тестови: _____

б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи: _____

в) генотипови: _____

г) административни подаци: _____

д) узорци ткива: херба индустријске конопље сорте Хелена (*Cannabis sativa* L.)

њ) снимци, фотографије: фотографије генетске колекције конопље Института за ратарство и повртарство Нови Сад, фотографије током експерименталног рада

е) текст: литература

ж) мапа: _____

з) остало: експериментални подаци

1.4. Формат података, употребљене скале, количина података

1.4.1. Употребљени софтвер и формат датотеке:

а) Excel фајл, датотека .xlsx, .csv

б) SPSS фајл, датотека _____

в) PDF фајл, датотека .pdf

г) Текст фајл, датотека .docx

д) JPG фајл, датотека .jpg, .jpeg, .png, .tif

е) Остало: Design-Expert v.7 Trial, датотека .dx7

1.4.2. Број записа (код квантитативних података)

- а) број варијабли 23 (7 улазних и 16 излазних варијабли)
- б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.4.3. Поновљена мерења

- а) да
- б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) временски размак измедју поновљених мера је 1 h
- б) варијабле које се више пута мере односе се на испитиване карактеристике добијених екстраката (излазне варијабле)
- в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене:

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

- а) Да
- б) Не
- Ако је одговор не, образложити* _____
- _____

2. Прикупљање података

2.1. Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент: анализа физичких и хемијских карактеристика биљног материјала и добијених екстраката

б) корелационо истраживање: регресиона анализа прикупљених експерименталних података

ц) анализа текста: прикупљање података из литературе

д) остало: фотографисање генетске колекције индустријске конопље Института за ратарство и повртарство Нови Сад, фотографисање током експерименталног рада

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Спектрофотометар, гасни хроматограф са масеним спектрометром, стандардне методе прописане од стране Европске Фармакопеје (Ph. Eur. 8)

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) Колики је број недостајућих података? _____

б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не

в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан применом статистичких тестова и одбацивањем екстрема и валидацијом експериментално добијеним подацима

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса података у матрицу је изведена поређењем добијених података са литературним подацима

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Репозиторијум докторских дисертација на Универзитету у Новом Саду

3.1.2. URL адреса: <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI: _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.2. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3. Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? _____

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да Не

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да Не

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?
Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.1. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? Да Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да Не

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.2. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Зорица Дринић, drinic_zorica@yahoo.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Зорица Дринић, drinic_zorica@yahoo.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Зорица Дринић, drinic_zorica@yahoo.com