

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Fyziologické účinky kanabinoidů a jejich analytické stanovení  
Bakalářská práce

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Physiological effects of cannabinoids and their analytical determination

Bachelor thesis

2021

Veronika Šubrtová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika Šubrtová**  
Osobní číslo: **C18076**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Téma práce: **Fyziologické účinky kanabinoidů a jejich analytické stanovení**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na fyziologické účinky kanabinoidů obsažených v konopí. Dále se zabývejte využitím moderních separačních technik pro jejich stanovení. Věnujte se rovněž úpravě vzorku před samotnou analýzou.
2. Výsledky prezentované v literatuře porovnejte a kriticky zhodnoťte.
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Veškerá dostupná odborná literatura.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **26. února 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Fyziologické účinky kanabinoidů a jejich analytické stanovení jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 15. 7. 2021

Veronika Šubrtová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Děkuji doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za pomoc a věcné připomínky, které mi během práce poskytovala, a také své rodině a přátelům za podporu a trpělivost během studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je zaměřena na charakteristiku, fyziologické účinky a analytické stanovení kanabinoidů, důležitých látek získávaných z konopí. V první části práce je prezentována stručná charakteristika konopí a jednotlivých kanabinoidů. Dále je pak práce věnována metodám vhodným pro jejich stanovení a na konci práce jsou diskutovány účinky konopí na organismus a jejich farmakologické využití.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kanabinoidy, konopí, *Cannabis sativa*

## **TITLE**

Physiological effects of cannabinoids and their analytical determination

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis is focused on the characteristics, physiological effects and analytical determination of cannabinoids, important substances obtained from cannabis. A brief description of cannabis and individual cannabinoids is presented in the first part of the work. Furthermore, the thesis is devoted to the methods suitable for their determination and at the end of the work the effects of cannabis on the organism and their pharmacological applications are discussed.

## **KEYWORDS**

cannabinoids, cannabis, *Cannabis sativa*

## OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	12
ÚVOD.....	15
1. ZÁKLADNÍ INFORMACE .....	16
1.1 Konopí .....	16
1.1.1 Historie využívání konopí.....	18
1.2 Kanabinoidy.....	20
1.3 Endokanabinoidní systém .....	21
2. ZÁSTUPCI KANABINOIDŮ .....	22
2.1 $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol .....	22
2.2 Kanabidiol.....	23
2.3 Kyselina kanabidiolová.....	25
2.4 Kanabinol.....	25
2.5 Kanabigerol.....	26
2.6 Kanabichromen.....	27
3. ANALYTICKÉ STANOVENÍ KANABINOIDŮ .....	27
3.1 Úprava vzorku před analýzou .....	31
3.1.1 Extrakce na pevné fázi .....	32
3.1.2 Extrakce kapalinou .....	32
3.1.3 Extrakce nadkritickou tekutinou.....	33
3.1.3.1 Extrakce zkapalněným oxidem uhličitým.....	33
3.1.3.2 Extrakce stlačenou horkou vodou.....	34
3.1.4 Mikrovlnná extrakce .....	35
3.1.5 Extrakce pomocí ultrazvuku .....	36
3.1.6 Zajímavé extrakční metody .....	37
3.2 Moderní analytické techniky pro stanovení kanabinoidů.....	38



3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie .....	38
3.2.2 Plynová chromatografie .....	39
3.2.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	41
3.2.4 Nukleární magnetická resonance .....	44
4. VYUŽITÍ KANABINOIDŮ VE FARMACII .....	45
4.1 Moderní historie využívání konopí v medicíně .....	45
4.2 Současnost .....	48
4.3 Nežádoucí účinky konopí .....	49
4.4 Farmakologické aplikace .....	49
4.4.1 Bolest .....	50
4.4.2 Epilepsie.....	51
4.4.3 Roztroušená skleróza .....	52
4.4.4 Zvýšení chuti k jídlu .....	53
4.4.5 Prevence zvracení a nevolnosti.....	53
4.4.6 Parkinsonova choroba.....	54
4.4.7 Schizofrenie .....	55
4.4.8 Glaukom.....	55
4.4.9 Touretteův syndrom.....	56
4.4.10 Zánětlivé onemocnění střev .....	56
4.4.11 COVID-19 .....	57
ZÁVĚR .....	58
SEZNAM LITERATURY .....	59

## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1:</b> Cannabis sativa L. - samčí (A) a samičí (B) květ <sup>1</sup> .....	16
<b>Obrázek 2:</b> Druhy konopí <sup>6</sup> .....	17
<b>Obrázek 3:</b> Období začátku užívání konopí jako léku v závislosti na místě <sup>10</sup> .....	19
<b>Obrázek 4:</b> Chemické struktury hlavních zástupců endo-, fyto- a syntetických kanabinoidů <sup>14</sup> .....	20
<b>Obrázek 5:</b> Struktura $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu <sup>18</sup> .....	22
<b>Obrázek 6:</b> Struktura kyseliny $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolové – typu A (A), typu B (B) <sup>18</sup> .....	23
<b>Obrázek 7:</b> Struktura kanabidiolu <sup>16</sup> .....	24
<b>Obrázek 8:</b> Struktura kyseliny kanabigerolové <sup>19</sup> .....	24
<b>Obrázek 9:</b> Struktura kyseliny kanabidiolové <sup>18</sup> .....	25
<b>Obrázek 10:</b> Struktura kanabinolu <sup>16</sup> .....	26
<b>Obrázek 11:</b> Struktura kanabigerolu <sup>16</sup> .....	26
<b>Obrázek 12:</b> Struktura kanabichromenu <sup>16</sup> .....	27
<b>Obrázek 13:</b> Schématický náčrt zařízení pro extrakci nadkritickou kapalinou (P = produkt, VP = vedlejší produkt) <sup>51</sup> .....	34
<b>Obrázek 14:</b> Porovnání výtěžků extrakce (mg/g) konopných složek ve vzorku pomocí různých extrakčních technik. Zobrazené hodnoty jsou průměrem výsledků z více vzorků. Průměrné hodnoty označené stejnými písmeny se navzájem významně neliší. DM = dynamická macerace (macerace za míchání) <sup>69</sup> .....	37
<b>Obrázek 15:</b> Chromatogram RP HPTLC na Merck Si 60 RP-18 F stacionární fázi, mobilní fáze je methanol-voda-kyselina octová (70:15:15) a činidlo pro derivatizaci je kyselina sírová a vanilin. Standardy kanabinoidů (1 – 8), vzorky květenství konopí (9 – 12). RP = reverzní fáze <sup>80</sup> .....	39
<b>Obrázek 16:</b> Chromatogram rychlé GC-MS analýzy kanabinoidů pro TMS derivatizaci <sup>82</sup> ...	41
<b>Obrázek 17:</b> HPLC-UV chromatogram zaznamenaný při vlnové délce 220 nm. ....	43
<b>Obrázek 18:</b> <sup>1</sup> H NMR spektrum (60 MHz) s interním kalibrantem a zvýrazněnými oblastmi zájmu pro kvantitativní analýzu NMR. K označení zbytkového píku rozpouštědla CDCl <sub>3</sub> se použila hvězdička <sup>91</sup> .....	45
<b>Obrázek 19:</b> Farmakologické aplikace extraktů nebo léků z konopí či syntetických kanabinoidů při léčbě nemocí <sup>95</sup> .....	50
<b>Tabulka 1:</b> Analytické metody pro analýzu kanabinoidů v konopí <sup>35</sup> .....	28

**Tabulka 2:** Dělení antiepileptik podle mechanismu účinku. (GABA = gama-aminomáselná kyselina, AMPA =  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina, NDMA = N-methyl-D-asparágová kyselina)<sup>109</sup> .....51

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

$\Delta^8$ -THC	delta-8-tetrahydrokanabinol
$\Delta^9$ -THC	delta-9-tetrahydrokanabinol
$\Delta^9$ -THCA	Kyselina delta-9-tetrahydrokanabinolová
$\Delta^9$ -THCA-A	Kyselina delta-9-tetrahydrokanabinolová typu A
$\Delta^9$ -THCA-B	Kyselina delta-9-tetrahydrokanabinolová typu B
2-AG	2-Arachidonoylglycerol
AIDS	Syndrom získaného imunodeficitu
AMPA	Kyselina alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CB <sub>1</sub>	Kanabinoidní receptor 1
CB <sub>2</sub>	Kanabinoidní receptor 2
CBC	Kanabichromen
CBCA	Kyselina kanabichromenová
CBCV	Kanabichromevarin
CBD	Kanabidiol
CBDA	Kyselina kanabidiolová
CBDV	Kanabidivarin
CBDVA	Kyselina kanabidivarinová
CBE	Kanabielsoin
CBG	Kanabigerol
CBGA	Kyselina kanabigerolová
CBGAM	Monomethylether kyseliny kanabigerolové
CBGM	Kanabigerol monomethylether
CBGV	Kanabigerovarin
CBL	Kanabicyklol
CBLA	Kyselina kanabicyklolová
CBLV	Kanabicyklovarin
CBN	Kanabinol

CBNA	Kyselina kannabinolová
CBT	Kanabicitran
CBV	Kanabivarin
CDCl <sub>3</sub>	Chloroform-d
CFL-A	Kanaflavin A
CFL-B	Kanaflavin B
CI	Chemická ionizace
CNS	Centrální nervová soustava
CPE	Extrakce s využitím teploty zákalu micelárních roztoků
DAD	Detektor diodového pole
DEA	Správa pro vymáhání drog v USA
DM	Dynamická macerace
EI	Elektronová ionizace
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA
FID	Plamenový ionizační detektor
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GC	Plynová chromatografie
GPR-55	Receptor spojený s G proteinem 55
GPR-19	Receptor spojený s G proteinem 19
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
HRGC	Plynová chromatografie s vysokým rozlišením
IBD	Zánětlivé onemocnění střev
IT	Iontová past
LC	Kapalinová chromatografie
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez kvantifikace
LSD	Diethylamid kyseliny d-lysergové
MRM	Monitorování více reakcí

MAE	Mikrovlňná extrakce
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní detekce
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoracetamid
NDMA	Kyselina <i>N</i> -methyl-D-asparágová
NMR	Nukleární magnetická resonance
OSN	Organizace spojených národů
Q	Kvadrupól
QqQ	Trojité kvadrupól
PDMS	Polydimethylsiloxan
PHWE	Tlaková extrakce horkou vodou
PI	Fotoionizace
PLE	Extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku
QuEChERS	Disperzní extrakce tuhou fází (z angl. <b>Q</b> uick, <b>E</b> asy, <b>C</b> heap, <b>E</b> ffective, <b>R</b> ugged, <b>S</b> afe – rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní, bezpečný)
RP-HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi
SBSE	Mikroextrakce na magnetickém míchadle
SFE	Extrakce nadkritickou tekutinou
SLE	Extrakce pevná látka-kapalina
SPE	Extrakce na pevné fázi
SWE	Extrakce nadkritickou vodou
THC	Tetrahydrokanabinol
THCA	Kyselina tetrahydrokanabinolová
THCA-C4	Tetrahydrokanabutol nebo tetrahydrokanabinol-C4
THCV	Tetrahydrokanabivarin
THCVA	Kyselina tetrahydrokanabivarinová
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl
TOF	Analyzátor doby letu

TS	Touretteův syndrom
UAE	Extrakce pomocí ultrazvuku
UHPLC	Ultra vysoko účinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialová oblast
Vis	Viditelná oblast

## ÚVOD

V této bakalářské práci je rozebrána problematika kanabinoidů, což jsou látky získávané z konopí s mnoha zajímavými fyziologickými účinky.

Konopí (*Cannabis sativa*) je rostlina, která je již tisíce let využívána k terapii, protože obsahuje právě kanabinoidy. Tyto látky mají kromě léčebných účinků i účinky psychoaktivní a z toho důvodu jsou v dnešní době často zneužívány. V posledních 40 letech byly postupně tyto účinné látky konopí, jako je např. kanabidiol a  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol charakterizovány a hlavní psychoaktivní účinek byl přiřazen právě  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu, zatímco účinek terapeutický vykazuje hlavně kanabidiol.

Terapeutické využití kanabinoidů zahrnuje široké možnosti dnes už ověřených či stále zkoumaných aplikací jako jsou například epilepsie, nevolnost vyvolaná chemoterapií, psychické poruchy zahrnující např. schizofrenii, Parkinsonova choroba, či například zvýšení chuti k jídlu.



# 1. ZÁKLADNÍ INFORMACE

## 1.1 Konopí

Konopí je jednoletá dvoudomá (zřídka jednodomá) rostlina pocházející ze Střední Asie obsahující více než 400 chemických sloučenin, z nichž více než 100 jsou kanabinoidy<sup>1-3</sup>. Jako jedna z prvních rostlin byla používána člověkem jako zdroj textilních vláken, jídla, či pro společenské a náboženské rituály. Postupem času byly různé její části použity pro terapeutické a rekreační účely, např. pro extrakci léčivých olejů ze semen nebo použití květenství pro jeho psychoaktivní účinky<sup>1,3,4</sup>.

Konopí neboli *Cannabis sativa* patří do čeledi konopovité (*Cannabinaceae*). Rostlina má vztyčené stonky, které mohou v závislosti na podmínkách prostředí a genetické rozmanitosti dosáhnout až 5 m, listy jsou dlanitě složené z pěti až sedmi lístků, které jsou lineárně kopinaté, zužují se na obou koncích a okraje jsou ostře pilovaté. Samčí květy (**obr. 1A**) jsou uspořádány do lat, mají 5 nažloutlých okvětních lístků a pět prašníků. Samičí květy (**obr. 1B**) klíčí v paždí terminálně s jedním jednoválcovým, těsně přiléhajícím okvětím. Na květu se vyprodukuje jediný, malý, hladký, světle hnědošedý plod, díky kterému se společně s dravým způsobem života ptáků rostlina dále množí. Tato rostlina je navíc bohatá na trichomy, epidermální žlázovité výčnělky pokrývající listy, listeny a stonky rostliny. Tyto žláznaté trichomy obklopují sekundární metabolity rostliny jako jsou fytoKANABINOIDY, které interagují s organismem býložravců a škůdců, a dále pak terpenoidy, které generují typický zápach konopí<sup>1,5</sup>. Roste hlavně na písčitéch a suchých, ruderálních stanovištích, v blízkosti silnic a zemědělských polí<sup>4</sup>.



**Obrázek 1:** *Cannabis sativa* L. - samčí (A) a samičí (B) květ<sup>1</sup>

Klasifikace druhů konopí není příliš jasná ani jistá a je stále diskutována. Existují dva koncepty vysvětlující situaci: prvním je monotypický koncept, který uvádí, že existuje pouze jeden druh, *Cannabis sativa* a další jména jsou jen synonyma<sup>4</sup>. Druhým je polytypický koncept, který naznačuje existenci nejméně dvou (někdy tří) druhů, a to *Cannabis sativa* Linnaeus, *Cannabis indica* Lamarck a *Cannabis ruderalis* Janisch zobrazených na **obr. 2**. Polytypický koncept byl posílen vyšetřováním izoenzymu (izozymu), což tuto speciaci v rámci rodu prokázalo<sup>1,4</sup>. Tyto tři druhy se původně rozdělovaly na základě místa výskytu na „evropský“ (*C. sativa*), „jihoasijsko-africký“ (*C. indica*) a „středně asijský“ (*C. ruderalis*). Nyní je rozlišujeme např. podle obsahu psychoaktivních molekul nebo fyzických vlastností. U kmene *indica* se vyskytují krátké rostliny s širokými, tmavě zelenými listy a s vyšším obsahem kanabidiolu (CBD) než u kmene *sativa*, u kterého je pozorován vyšší obsah tetrahydrokanabinolu (THC). Rostliny kmene *sativa* jsou také obvykle vyšší a mají tenké listy se světle zelenou barvou. Vzhledem k vyššímu obsahu THC je tento druh také nejčastěji zneužíván<sup>1,2</sup>.



**Obrázek 2:** Druhy konopí<sup>6</sup>

Konopí je jednou z nejrozšířenějších nelegálních drog na světě, zejména u mladých lidí. Na každého jedince působí jeho užívání jinou měrou, nicméně při dlouhodobém užívání dochází k rozvoji problémů s duševním zdravím<sup>2</sup>.

Zájem o tuto rostlinu však v poslední době vzrostl také v návaznosti na aktuální mezinárodní trendy v terapii založené na účincích kanabinoidů a jiných fytochemikáliích v konopí obsažených. Dalším důvodem může být i legalizace užívání marihuany v některých státech nebo její výhodné zemědělské vlastnosti, mezi které patří rychlý růst, dobrá odolnost vůči škůdcům, dobře vyvinutý kořenový systém zabraňující erozi půdy a nižší spotřeba vody

ve srovnání s jinými rostlinami (např. bavlna). V důsledku všestranného využití této rostliny se očekávají slibné studie s různým zaměřením<sup>4,7,8</sup>.

### 1.1.1 Historie využívání konopí

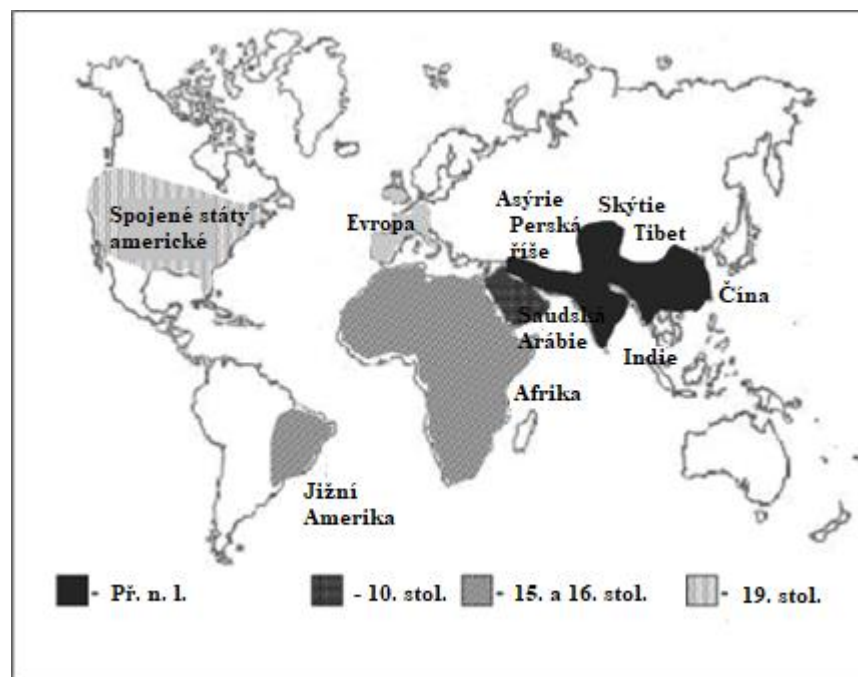
*Cannabis sativa* pochází pravděpodobně ze střední a jihovýchodní Asie a tato oblast její primární domestikace hrála zásadní roli ve vývoji této rostliny<sup>1</sup>. Podle legendy, měl starověký císař Shen Nung, patron zemědělského božstva (asi 2700 př. n. l.), průhledné břicho, které mu umožňovalo vidět účinky léků procházejících jeho tělem. Poté, co experimentoval s více než 100 bylinami, se mu připisuje objev chvojníku, ženšenu, a právě konopí jako terapeutických látek<sup>3,9</sup>. V Indii bylo doopravdy konopí široce využíváno ve formě léčiv či jako rekreační drogy. Atharva Veda (sbírka posvátných textů neznámého autora) zmiňuje konopí jako jednu z pěti posvátných rostlin a označuje ji jako zdroj štěstí, dárce radosti a nositele svobody. Z těchto důvodů se začalo konopí hojně využívat v náboženských rituálech<sup>9</sup>. Tato rostlina dále doprovázela pokrok prvních lidských společností po době ledové a pravděpodobně nejstarší archeologický důkaz o jejím využití byl nalezen v českých paleolitických lokalitách, kde byla používána celá řada technik na výrobu pletených košíků z jejích vláken<sup>1</sup>.

Identifikace konopí jako narkotické látky je pak spojena s britskou a francouzskou koloniální expanzí devatenáctého století, jejíž pronikání do Indie a severní Afriky vedlo k objevu opojných kmenů rostliny<sup>10</sup>. Na asijský trh byla tato rostlina uváděna pod různými názvy jako jsou Bhang, Ganja nebo Charas. Typ s nejslabšími účinky se nazývá Bhang a skládá se ze suchých listů, z nichž jsou pečlivě odstraněny květy<sup>9</sup>. Jeho psychoaktivní účinek je srovnatelný s účinkem některých západních alkoholických nápojů<sup>1</sup>. Silnější typ, Ganja, obsahuje i květy samičí rostliny a nejsilnější typ Charas, je připraven výhradně z pryskyřice, která se ze samičích květů získává<sup>9</sup>. Dříve ještě nebyl rozdíl mezi léčebným a rekreačním využitím zcela jasný, a proto i přes psychoaktivní účinky rostliny byl zájem o konopí na počátku studií skutečně léčebný a ne forenzní, čemuž napomáhalo i dobré zdokumentování terapeutického využití této rostliny indickými odborníky<sup>10,11</sup>.

V návaznosti na izolaci čistého morfinu Sertüernerem v roce 1817 byla však první polovina 19. století svědkem pokusů nahradit užívání celých rostlin pouze jejich účinnými látkami, jak dokládá objev chininu, nikotinu, emetinu a papaverinu. Stejně tak byla tedy i snaha popsat a izolovat jednotlivé kanabinoidy obsažené v konopí. Po několika nezdařilých studiích a pokusech však bylo konopí a THC v něm obsažené zařazeno mezi narkotika-opiáty a vědecký zájem o kanabinoidy tak ustal v západních zemích téměř úplně<sup>9-11</sup>.

Na druhé straně světa, ale vedly studie o konopí k pozoruhodným novým poznatkům. Nejvýznamnější studie o kanabinoidech v letech 1940 – 1960 byly provedeny na Univerzitě Palackého v Olomouci (tehdejší Československo) Zdeňkem Krejčím a Františkem Šantavým. V socialistických zemích bylo totiž za účelem obcházení patentů souvisejících s antibiotiky prováděno systematické hledání rostlinných zdrojů antibakteriálních látek. V průběhu těchto studií bylo vyšetřováno antibakteriální působení u více než 3 000 původních druhů rostlin a jako nejslibnější kandidáti pro klinické použití byly identifikovány extrakty z konopného vlákna s pozoruhodnou účinností proti tuberkulózním lézím. Tyto poznatky byly bohužel zveřejněny v časopise s omezenou distribucí, a proto o nich nevěděla široká vědecká veřejnost<sup>10</sup>.

Století trvající období nejistot ohledně nepříznivých účinků konopí ukončila až práce Raphaela Mechoulama<sup>12</sup>, když v roce 1964 v Jeruzalémě poprvé charakterizoval a identifikoval THC v hašiši a popsal jeho psychoaktivní účinky. S následnou identifikací dalších kanabinoidů a jejich prvními syntézami se zájem o terapeutický výzkum konopí opět zvýšil<sup>9,10</sup>. Na **obr. 3** je zobrazena mapa se znázorněním začátku využívání konopí v terapii v závislosti na lokalitě.



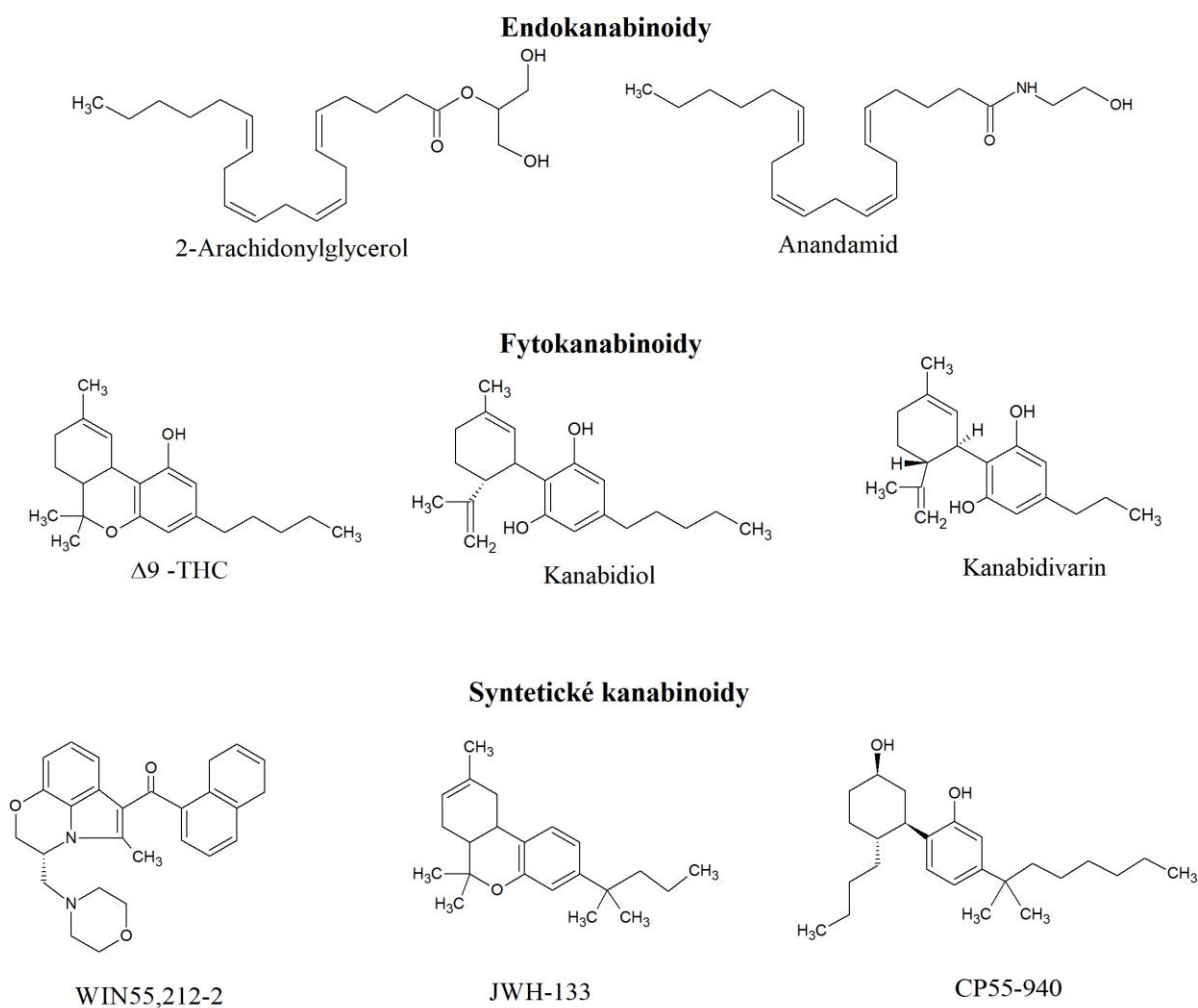
**Obrázek 3:** Období začátku užívání konopí jako léku v závislosti na místě<sup>10</sup>

## 1.2 Kanabinoidy

Kanabinoidy jsou nejvíce studovanou skupinou sloučenin obsažených v konopí, hlavně díky jejich široké škále fyziologických účinků na člověka, včetně těch psychotropních. Tyto účinky jsou většinou vyvolány interakcí kanabinoidů s endokanabinoidním systémem v organismu člověka. Tyto látky patří do třídy terpenofenolových sloučenin akumulovaných hlavně v samičím květenství a doposud jich bylo identifikováno více než 110. Mezi hlavní zástupce této skupiny patří THC a CBD<sup>1,7,13,14</sup>.

V rostlině jsou kanabinoidy syntetizovány a akumulovány jako kanabinoidní kyseliny. Pokud je rostlinný produkt vysušen, skladován nebo zahříván, kyseliny pak postupně dekarboxylují do svých neutrálních forem, jako je právě již zmíněné CBD či THC<sup>2</sup>.

Dnes termín kanabinoidy nezahrnuje jen rostlinné kanabinoidy, též známé jako fytokanabinoidy, ale také endokanabinoidy a syntetické analogy obou skupin (**obr. 4**)<sup>14</sup>.



**Obrázek 4:** Chemické struktury hlavních zástupců endo-, fyto- a syntetických kanabinoidů<sup>14</sup>

### 1.3 Endokanabinoidní systém

Endokanabinoidní systém zahrnuje dva základní kanabinoidní receptory spojené s G proteinem, CB<sub>1</sub> a CB<sub>2</sub>, a stejně tak dva endogenní ligandy, anandamid (**obr. 4**) a 2-arachidonylglycerol (**obr. 4**), které si organismus v případě potřeby syntetizuje<sup>7,8,14,15</sup>. Předpokládá se, že endokanabinoidy po navázání na kanabinoidní receptory moduluji nebo hrají regulační roli v různých fyziologických procesech, včetně chuti k jídlu, vnímání bolesti, zlepšení či zhoršení nálady, zhoršení paměti, potlačení tvorby zánětu, tvorby inzulínu, citlivosti nebo metabolismu tuků a energie. Stejně tak se navazují i fytoKANABINOIDY. Například THC je částečným agonistou receptoru CB<sub>1</sub> i CB<sub>2</sub>, ale vyšší afinitu má k receptoru CB<sub>1</sub>, který jak se zdá, zprostředkovává jeho psychoaktivní vlastnosti<sup>7,15</sup>. U CB<sub>2</sub> receptorů se předpokládá, že mají imunomodulační účinky a regulují aktivitu cytokinů. Ve skutečnosti má, ale THC více molekulárních cílů, než jen CB<sub>1</sub> a CB<sub>2</sub> receptory, a vykazuje dále i silné protizánětlivé, protirakovinné, analgetické, svalově relaxační, antioxidační a antispasmodické účinky<sup>7</sup>.

CB<sub>1</sub> receptory se vyskytují v centrální nervové soustavě a v celém mozku. Dále pak také v imunitních, gastrointestinálních, reprodukčních, nadledvinových, srdečních, plicních buňkách, anebo v buňkách močového měchýře. Díky tomu mají kanabinoidy velice široké pole působnosti. CB<sub>2</sub> receptory jsou také přítomny v CNS (ale pouze v gliových buňkách, nikoliv v nervových buňkách) a to zejména za určitých okolností, například při zánětu<sup>7,14</sup>.

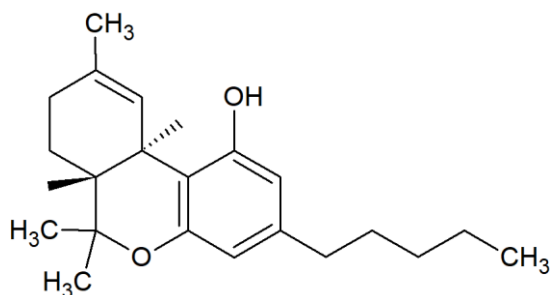
Přes to, že se nazývají kanabinoidní receptory, bylo brzy jasné, že kromě kanabinolu (CBN), THC a jeho izomeru  $\Delta^8$ -tetrahydrokanabinolu ( $\Delta^8$ -THC) není většina doposud identifikovaných rostlinných kanabinoidů schopna účinně aktivovat tyto receptory<sup>16</sup>. Jak už bylo tedy naznačeno, účinky kanabinoidů, včetně endokanabinoidů, musí být zprostředkovány i nekanabinoidními receptory, jako jsou např. další receptory spřažené s G-proteinem mezi které patří GPR55 a GPR19, přechodné vaniloidní kanály potencionálního receptoru nebo receptory aktivované proliferátorem peroxisomu<sup>8,14</sup>. Dalšími receptory se zdají být také proteiny, na které jsou zaměřeny jiné endogenní a exogenní látky. Anandamid a 2-AG (2-arachidonylglycerol), stejně jako většina ostatních lipidových mediátorů, mají více než jednu sadu biosyntetických a degradačních cest. Také mají své enzymy, které často sdílejí s „endokanabinoidům podobnými“ mediátory. To jsou mediátoři patřící do stejné chemické třídy jako endokanabinoidy, (např. amidy nebo estery mastných kyselin s dlouhými řetězci), kteří nemusí být nutně metabolicky vázány na anandamid či 2-AG a mají jako preferenční receptory proteiny odlišné od CB<sub>1</sub> a CB<sub>2</sub> receptorů. To znamená, že s nimi mohou nebo nemusí interagovat

proteiny, na které se kanabinoidy (kromě THC) váží. V některých případech, tyto degradující dráhy a enzymy vedou k molekulám, jako jsou prostamidy a estery prostaglandin-glycerolu, které interagují s ostatními receptory, což znamená, že tyto enzymy jsou „degradujícími“ pro endokanabinoidy a „biosyntetickými“ pro jiné mediátory<sup>15</sup>. Endokanabinoidní systém, tak jako potenciální terapeutický cíl pro různé patologické stavy, přitahuje značný zájem, zejména při léčbě rakoviny a neurologických poruch<sup>8</sup>.

## 2. ZÁSTUPCI KANABINOIDŮ

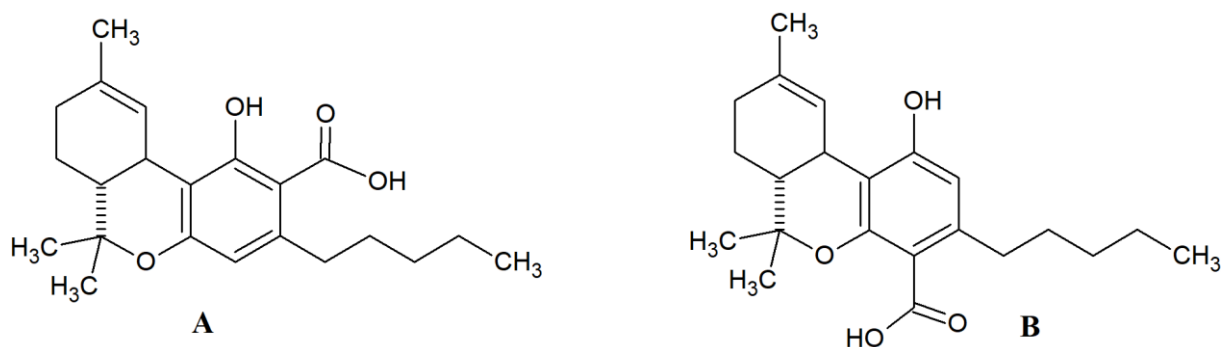
### 2.1 $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol

$\Delta^9$ -tetrahydrokanabinol ( $\Delta^9$ -THC či jen THC, **obr. 5**), jakožto hlavní psychoaktivní kanabinoid, byl izolován v čisté formě a strukturně popsán v Izraeli Mechoulamem a Gaonim<sup>11,12,17</sup>. Bylo prokázáno, že jej lze snadno získat z psychotropně neaktivní, krystalické hlavní složky konopí, kanabidiolu<sup>11</sup>.



**Obrázek 5:** Struktura  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolu<sup>18</sup>

Přirozenou formu THC představuje směs dvou pre-kanabinoidů, a to kyseliny  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolové typu A ( $\Delta^9$ -THCA-A) a typu B ( $\Delta^9$ -THCA-B). Jedná se o polohové isomery (**obr. 6**), které se však liší ve fyzikálních vlastnostech, stabilitě vůči dekarboxylaci a koncentraci v rostlinných tkáních.  $\Delta^9$ -THCA-A se vyskytuje v amorfní formě a je dekarboxylována při 90 °C zatímco  $\Delta^9$ -THCA-B se vyskytuje v krystalické formě a při této teplotě je stabilní<sup>19</sup>.  $\Delta^9$ -THCA-A byla nejprve extrahovaná Kortem a kol.<sup>20</sup> v roce 1965 a izolována jako čistá sloučenina v roce 1967 Nishiokovou skupinou<sup>21</sup>. Má antiproliferativní, antispasmodické, neuroprotektivní, antioxidační a protizánětlivé účinky<sup>18,22</sup>.  $\Delta^9$ -THCA-B pak byla izolována v roce 1969 Mechoulamem a kol<sup>23</sup>.



**Obrázek 6:** Struktura kyseliny  $\Delta^9$ -tetrahydrokanabinolové – typu A (A), typu B (B)<sup>18</sup>

THC je jako čistá sloučenina ve formě amorfni gummy, která snadno zhnědne a podléhá degradaci na CBN. Stabilnější je v surové formě a lze jej skladovat v chlazeném roztoku methanolu. Při pokojové teplotě byla rychlost degradace takto uchovávaného THC odhadnuta na cca 5 % za měsíc, zatímco u čistého produktu to bylo 10 %. Předpokládá se však, že v rostlinných tkáních fungují i jiné cesty degradace, protože bylo zjištěno, že úbytek THC je mnohem výraznější a rychlejší než nárůst CBN<sup>19</sup>.

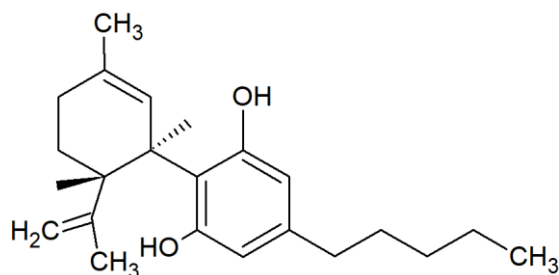
Díky dobře známým psychotropním vlastnostem THC, jako je euforie, relaxace, stimulace chuti k jídlu, kognitivní deficity, úzkost, psychóza a závislost, je v Evropské unii povoleno pěstování pouze takových odrůd, které vykazují jeho nízký obsah<sup>24</sup>.

## 2.2 Kanabidiol

Kanabidiol (CBD, **obr. 7**) je hlavní nepsychotropní kanabinoid, který byl jako první izolován z marihuany v roce 1940 Adamsem a kol.<sup>25</sup>, ale správné objasnění jeho struktury muselo počkat na příchod NMR spektroskopie, a tak byl strukturně popsán až v roce 1963 Mechoulamem a Shvem<sup>17-19,26</sup>.

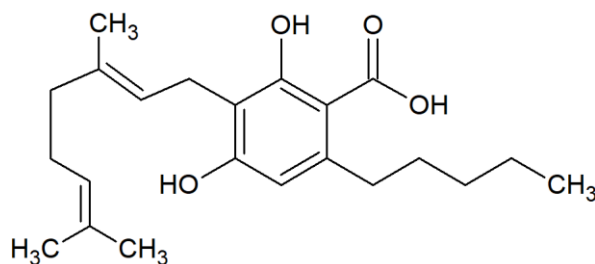
Vzhledem k tomu, že CBD je hlavním fyto-kanabinoidem ve vláknitém konopí, je jeho karboxylovaná forma také prvním izolovaným pre-kanabinoidem a její vztah s CBD stanovil český chemik Šantavý, který je spolu s Cahnem, Adamsem a Toddem jedním ze zakladatelů chemie kanabinoidů<sup>19</sup>.





**Obrázek 7:** Struktura kanabidiolu<sup>16</sup>

CBD společně s THC, jakožto nejvíce zastoupené fytokanabinoidy v rostlině *Cannabis sativa*, vykazují navzdory jejich strukturní podobnosti odlišný biologický profil, a přestože lze CBD elektrofilně cyklizovat na THC působením kyselin, v rostlině k této reakci nedochází. Obě sloučeniny nezávisle vznikají oxidační cyklizací jejich společného předchůdce kyseliny kanabigerolové (**obr. 8**)<sup>19,27</sup>.



**Obrázek 8:** Struktura kyseliny kanabigerolové<sup>19</sup>

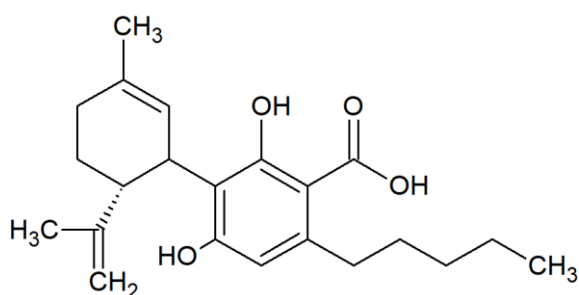
CBD je alosterickým inhibítozem CB<sub>1</sub> receptoru, působí ale i mnoha jinými mechanismy. Už první studie biologické aktivity CBD byly spuštěny jeho modulační aktivitou na cytochromy a potenciálem lékových interakcí, přičemž synergická aktivita CBD na hypnotické účinky barbiturátů byla hlášena již v roce 1942 Adamsem<sup>18,19,28</sup>.

V USA došlo za poslední 2 roky k rekordnímu nárůstu prodeje CBD díky jeho širokému spektru účinků podporujících právě zdraví, které mu byly připsány s několika dostupnými recenzemi o účinnosti a bezpečnosti<sup>13,24</sup>. Klinicky byl hodnocen u úzkostí, psychóz, pohybových poruch, pro zmírnění neuropatické bolesti, u pacientů s roztroušenou sklerózou, poruch kardiovaskulárního systému a u léčby dětské epilepsie<sup>13,18,19</sup>. Úřady v EU i USA nedávno schválily lék obsahující CBD Epidolex<sup>®</sup> právě pro léčbu dětí ve věku od 2 let s těžkými epileptickými záchvaty. Na trh je však nadále CBD uváděn jako lék na předpis s několika potenciálními nepříznivými účinky, jako jsou poruchy vědomí, snížená chuť k jídlu, průjem, horečka, únava a zvracení<sup>13</sup>.

Obecně platí, že nejběžněji používanými formami CBD přípravků jsou oleje, tinktury, gely nebo kapaliny, které se dále hojně využívají i jako složka potravin, v kosmetických přípravcích nebo v kapalinách do elektronických cigaret a nazývají se CBD extrakty<sup>24</sup>. Tyto extrakty můžeme najít v drogeriích nebo v online obchodech. Ne všechny členské státy v EU však umožňují jejich distribuci. I přes to, že samotný CBD není psychoaktivní a komise OSN pro omamné látky ho neřadí mezi látky kontrolované, nabízí se tu argument týkající se hlavně kouření či používání e-cigaret. Při kouření se totiž sloučeniny vystavují teplotám dostatečným k podpoře chemických reakcí a již v 70. letech bylo uváděno, že se při kouření CBD částečně přeměňuje na THC. Dále pak navzdory bezpečnostním tvrzením o elektronických cigaretách byl v některých případech hlášen výskyt poranění plic „vapováním“ kapalin z e-cigaret obsahujících CBD jako přísadu. Současný vzestup konopí však souvisí pouze s léčebným využitím CBD a většina takovýchto produktů se prodává pouze ve formě doplňků stravy<sup>13,24</sup>.

### 2.3 Kyselina kanabidiolová

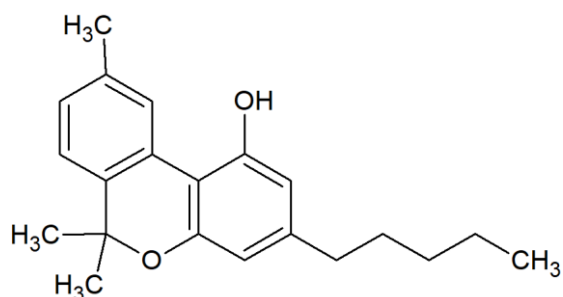
Kyselina kanabidiolová (CBDA, **obr. 9**), je první objevenou kanabinoidní kyselinou izolovanou v roce 1955 Krejčím a Šantavým. Spolu s CBD je CBDA hlavní složkou žlázových chloupků (trichomů) konopí (až 15 %) s prokazatelnými antiproliferativními účinky. V čerstvém rostlinném materiálu se až 95 % CBD vyskytuje ve formě právě této kyseliny<sup>18</sup>.



**Obrázek 9:** Struktura kyseliny kanabidiolové<sup>18</sup>

### 2.4 Kanabinol

Kanabinol (CBN, **obr. 10**) je prvním fytokanabinoidem izolovaným v čisté formě z konopí. V roce 1896 se Woodovi a jeho kolegům<sup>29</sup> ze společnosti Easterfield v Cambridge ve Velké Británii podařilo získat kanabinol z vysokovroucí frakce éterického extraktu z indického vzorku konopí. Jeho strukturu uvedl v roce 1940 Adams<sup>30</sup> a kanabinol zůstal po dvě desetiletí jedinou sloučeninou této třídy, u které byla objasněna struktura<sup>18,19</sup>.

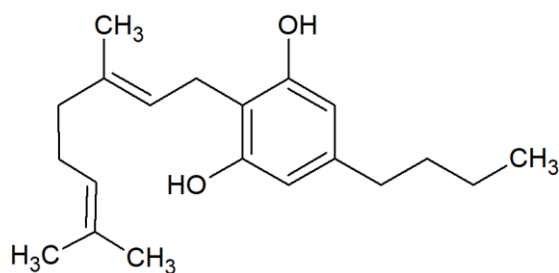


**Obrázek 10:** Struktura kanabinolu<sup>16</sup>

Původně se považoval za aktivní psychotropní složku konopí, což se následně ukázalo jako chybné tvrzení. V čerstvém konopí je ho velmi málo, jelikož vzniká oxidací THC. Jeho obsah se pak dále zvyšuje s degradací THC při skladování<sup>18</sup>. CBN samotný je však vysoce stabilní vůči oxidativní degradaci a byl používán jako marker pro identifikaci narkotického konopí v archeologických nálezích. Má jen slabou afinitu k CB<sub>1</sub> a CB<sub>2</sub> receptorům, pouze cca 10 % z afinity jednoho THC a jeho potenciální terapeutické využití je u nemocí, u nichž jsou kanabinoidní receptory up-regulovány<sup>18,19</sup>.

## 2.5 Kanabigerol

Kanabigerol (CBG, **obr. 11**) je nepsychootropní kanabinoid, který byl strukturně objasněn v roce 1964 Gaonim a Mechoulamem<sup>16</sup> a je zároveň prvním syntetizovaným kanabinoidem<sup>18,19</sup>. I když CBG nebyl během prvních studií na konopí identifikován jako jeho hlavní složka, byly nedávno hybridizací vytvořeny nové odrůdy obohacené o tento kanabinoid<sup>19</sup>.



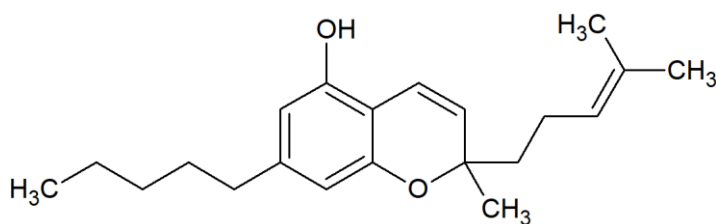
**Obrázek 11:** Struktura kanabigerolu<sup>16</sup>

Kanabigerol má pouze okrajovou afinitu ke kanabinoidním receptorům a působí tak hlavně prostřednictvím mechanismů nezávislých na těchto receptorech. Je např. silným antagonistou mentolového receptoru TRPM8, což je cíl výhodný při léčbě rakoviny prostaty. Mezi jeho další účinky pak patří inhibice kontraktility močového měchýře a antiproliferativní či antibakteriální účinky<sup>18,19,31</sup>.

## 2.6 Kanabichromen

Kanabichromen (CBC, **obr. 12**), další neppsychotropní kanabinoid, byl nezávisle izolován v roce 1966 Mechoulamem s Gaonim<sup>32</sup> a Claussenem a kol.<sup>33</sup>, kteří této sloučenině přiřadili stejný triviální název, aby nedošlo ke zmatkům v literatuře<sup>18,19</sup>. Předpokládalo se, že CBC je druhým nejvíce zastoupeným fytoKANABINOIDEM v konopí. Tato skutečnost však byla silně nadhodnocena z důvodu obtížné separace CBC a CBD a jeho koncentrace v konopí je ve skutečnosti mnohem nižší než u ostatních „hlavních“ fytoKANABINOIDŮ. Zřídka přesahuje 0,2 – 0,3 % v suché rostlině, zatímco fytoKANABINOIDY jako je CBD nebo THC se vyskytují v desítkách procent<sup>18,19,34</sup>.

Je téměř 2,5krát toxičtější než THC a stejně jako THC může u myši způsobit podchlazení, sedaci a hypoaktivitu. Také jako jediný hlavní fytoKANABINOID vykazuje modrou fluorescenci pod UV zářením<sup>18,19</sup>.



**Obrázek 12:** Struktura kanabichromenu<sup>16</sup>

Při důkladném čištění je přírodní CBC racemický a nevykazuje žádnou aktivitu vůči kanabinoidnímu receptoru CB<sub>1</sub>. Je to nejjednodušší přírodní fytoKANABINOID, který lze syntetizovat a vzhledem k jeho tepelné a fytochemické nestabilitě je překvapivé, že byl detekován v historických vzorcích konopí<sup>19,34</sup>. Vyskytuje se ve formě gumy nebo oleje a má protizánětlivou, antimikrobiální a mírnou analgetickou aktivitu<sup>18,34</sup>.

## 3. ANALYTICKÉ STANOVENÍ KANABINOIDŮ

Při analýze konopí se využívá různých částí rostliny. Některé studie jsou zaměřené na stanovení vlákniny v konopném semínku z důvodu její prospěšnosti pro naše trávení. Většina studií je však zaměřena na analýzu jednotlivých látek, zpravidla kanabinoidních, v různých částech konopí. Analýzy se provádí především z forenzních či právních důvodů, avšak v dnešní době i za účelem kontroly kvality materiálu používaného k léčebným účelům<sup>35,36</sup>.

K analýze lze použít mnoho různých analytických metod. V popředí jsou separační techniky, jako jsou plynová (GC) a kapalinová chromatografie (LC)<sup>36,37</sup>. Souhrn analytických metod používaných pro stanovení kanabinoidů v rostlinném materiálu je uveden v **tabulce 1**.

**Tabulka 1:** Analytické metody pro analýzu kanabinoidů v konopí<sup>35</sup>

<b>Analytická metoda</b>	<b>Matrice</b>	<b>Identifikované analyty</b>	<b>Metoda extrakce</b>	<b>Citlivost</b>	<b>Citace</b>
HPLC-DAD	Zabavené rostliny konopí a vlákniny	$\Delta^9$ -THCA, CBDA, CBGA, $\Delta^9$ -THC, CBD, CBG, CBN (kvantitativně), $\Delta^8$ -THC (kvalitativně)	MeOH/CHCl <sub>3</sub> 9:1 (v/v)	LOQ 0,125 $\mu$ g/ml (THCA, CBGA, CBDA, THC, CBN), 0,188 $\mu$ g/ml (CBD), 0,375 $\mu$ g/ml (CBG)	38
GC-FID GC-MS	Léčivé konopí (Bedrocan <sup>®</sup> , Bedropuur <sup>®</sup> a Bediol <sup>®</sup> )	$\Delta^9$ -THC, $\Delta^8$ -THC, CBD, CBG, CBC, THCV, CBDV, CBGM	EtOH	0,6 mg/g	39
HPTLC	Léčivé konopí (Bedrocan <sup>®</sup> , Bediol <sup>®</sup> )	$\Delta^9$ -THC, CBN (kvantitativně), CBD, $\Delta^8$ -THC, THCV, CBG, CBC (kvalitativně)	Dehydroxylace (H <sub>2</sub> O, 100 °C, 2 h) a extrakce EtOH	LOD 10 ng, LOQ 50 ng	40
HPLC-DAD GC-FID	Květy	CBDVA, CBDV, THCV, CBGA, THCVA (předběžná identifikace), CBDA, CBG, CBD, CBN, $\Delta^9$ -THC, $\Delta^8$ -THC, CBC, THCA	EtOH	LOQ 5 – 8 $\mu$ g/ml	41
2D-LC-UV- CI-HPLC-ESI- TOF	Průmyslové konopí	CBDV, CBCV, CBV, CBLV, CBGV, CBN, CBC, CBD, CBL, CBG, CBT, CBE, CBNA, CBCA, CBDA, CBLA, CBGA (předběžné identifikace)	EtOAc 78 °C, 1,5 h Soxhlet	–	42
LC-APCI-IT	Rostlina	THC, THCA, CBD, CBDA, CBN	MeOH/CHCl <sub>3</sub> 9:1 (v/v)	0,1 g/kg (CBD), 0,04 g/kg (CBDA), 0,03 g/kg (CBN), 0,28 g/kg (THC), 9,9 g/kg (THCA)	43

<b>Analytická metoda</b>	<b>Matrice</b>	<b>Identifikované analyty</b>	<b>Metoda extrakce</b>	<b>Citlivost</b>	<b>Citace</b>
GC-FID	Zadržené rostliny	THC, THCA, CBN	Soxhlet nebo PLE s MeOH nebo hexanem	–	44
GC-MS	Květenství (zabavené vzorky)	CBG, CBN, CBD, CBC, THC	SLE s hexanem, ultrazvuk	–	45
GC-MS	Konopné produkty (pastilky, semena, voňavá tráva, pivo, likér, olej)	THC, CBD, CBN	Hexan/iPrOH 9:1 (v/v) a derivatizace pomocí MSTFA a TMCS	1 ng/ml (THC, CBN), 2 ng/ml (CBD)	46
<sup>1</sup> H NMR HPLC-DAD	Rostliny bohaté na THC, CBD, CBG, vlákna rostliny bohaté na CBD	THC, CBD, CBN, THCA	Frakční extrakce EtOAc, EtOH, heptan, MeOH	LOQ 0,5 mg/g (extraktu), 10 mg/ml pro nejvyšší separaci	47
<sup>1</sup> H NMR	Bedrocan <sup>®</sup> , nezákonný materiál, rostliny bohaté na CBD a nekanabinoidní typy rostlin	THC, THCA (semikvantitativně)	Horké a studené vodné extrakty a tinktury (EtOH/H <sub>2</sub> O)	–	48
HPLC-DAD	Pryskyřice	THC	Extrakce s využitím teploty zákalu s Dowfax 20B102, deionizovaná H <sub>2</sub> O a Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	LOD 0,04 µg/ml	49
HPLC-QTOF HPLC-QqQ	Rostliny	CBD, THCA, THCV, CBN, THC, CBG (kvantitativně), Kyselina kanabikumarová, CBCA, 10-EtO-9-OH-Δ <sup>6</sup> a-THC, 4-acetoxycBC, CBGA, CBGAM, THCA-C4 (předběžná identifikace)	SFE (CO <sub>2</sub> /10% EtOH)	LOD 0,2 ng/ml (CBD, THCA), 0,05 ng/ml (THCV, CBN, THC), 0,02 ng/ml (CBG)	50

<b>Analytická metoda</b>	<b>Matrice</b>	<b>Identifikované analyty</b>	<b>Metoda extrakce</b>	<b>Citlivost</b>	<b>Citace</b>
GC-MS	Rostliny	THC, CBN, CBD	Pojistka s iPrOH: CO <sub>2</sub> /20% EtOH (pro kanabinoidy)	LOQ 1 µg/ml	51
UHPLC-QqQ	Léčivé konopné květenství	THCA, CBDA, THC, CBD, CBC, CBG, CBN	Čajové a olejové výtažky	LOD 0,3 µg/ml, LOQ 0,1 µg/ml	52
HPLC-DAD HPLC-Q-TOF	Léčivé konopné květenství (Bediol®)	THCA, CBDA, THC, CBD, CBN	Olejové a ethylalkoholové extrakty	LOD 0,05 µg/ml, LOQ 0,1 µg/ml	53
GC-MS	Rostliny	THC, CBD, CBN	Hexan, 10 dní, pak ultrazvuk	–	54
UPLC-DAD-ESI-MS GC-EI-MS	Bylinné produkty	Syntetické kanabinoidy	MeOH a ultrazvuk 10 min	LOQ 10 µg/ml	55
HPLC-DAD GC-FID	Sušená a čerstvá rostlina, sušené konopné květy a hašiš	THCA, THC	EtOAc a ultrazvuk, 15 min	–	56
HRGC-FID HPLC-UV	Hašiš	THC, CBD, CBN	MeOH	HRCG-FID: 0,034 mg/ml (THC), 0,041 mg/ml (CBD), 0,026 mg/ml (CBN) HPLC-UV: 0,044 mg/ml (THC), 0,014 mg/ml (CBD), 0,018 mg/ml (CBN)	57
HPLC-QqQ Kryogenní <sup>1</sup> H NMR	Laserem mikrodisekované trichomy léčivého konopí (Bediol®)	THCA, CBDA, THC, CBD, CBG, CBN, CBC	MeOH, ultrazvuk, 10 min a inkubace přes noc při pokojové teplotě. (pro LC-MS), CDCl <sub>3</sub> (pro NMR)	LC-MS: LOQ 3 ng/ml (CBD, CBG, CBN), 30 ng/ml (CBC)	58
<sup>1</sup> H NMR GC-MS	Květenství léčivého konopí	THCA, CBDA, THC, CBD, CBN	MeOH/CHCl <sub>3</sub> 9:1 (v/v) a ultrazvuk, 2 min, 4 °C	NMR: LOQ 0,2 mg/ml (THCA, CBDA, CBD), 0,1 mg/ml (THC, CBN)	59
<sup>1</sup> H NMR	Květenství léčivého konopí	THCA, THC, CBD	50% MeOH/CHCl <sub>3</sub> 1:1 (v/v)	–	60

Analytická metoda	Matrice	Identifikované analyty	Metoda extrakce	Citlivost	Citace
<sup>1</sup> H NMR	Květenství léčivého konopí	THCA, CBDA, THC, CBD, CBN, CBG, CFL-A, CFL-B	Frakční extrakce směsí MeOH/CHCl <sub>3</sub> 1:1 (v/v), 90% MeOH, hexan, poté postupný gradient EtOH v acetonu	–	61
HPLC-UV <sup>1</sup> H NMR	Květenství léčivého konopí (Bediol <sup>®</sup> , Bedrobinol <sup>®</sup> )	Δ <sup>9</sup> -THCA, CBDA, CBNA, CBGA, Δ <sup>9</sup> -THC, Δ <sup>8</sup> -THC, CBD, CBG, CBN, CBC	MeOH a ultrazvuk, 10 min	–	62

### 3.1 Úprava vzorku před analýzou

Než mohou být kanabinoidy analyzovány je třeba je extrahovat z matrice. Volba metody extrakce závisí jak na cílových sloučeninách, tak na povaze zdrojového materiálu, např. jestli se jedná o sušený rostlinný prášek, biologické materiály, půdu nebo vodu<sup>63</sup>. Dále je třeba vzít v úvahu také následující: účel extrakce; objem extrakce; kroky čištění, které mají být provedeny; úroveň čistoty kanabinoidů; stabilita a fyzikálně-chemické vlastnosti cílových kanabinoidů a samozřejmě náklady a dopady na životní prostředí<sup>63,64</sup>.

Mezi konkrétní typy extrakce patří extrakce kapalinou (macerace, extrakce rozpouštědlem, vaření, destilace, Soxhlet a extrakce za použití ultrazvuku) nebo extrakce na pevné fázi (SPE). Tyto metody jsou však časově náročné a používají velké množství organických rozpouštědel, která mohou být toxická pro životní prostředí a lidské zdraví<sup>63,65</sup>. V dnešní době se proto k extrakci přirozeně se vyskytujících kanabinoidů používají i další modernější metody zahrnující zrychlenou extrakci rozpouštědlem, extrakce kapalinou za zvýšeného tlaku (PLE), mikrovlnnou extrakci (MAE), extrakci pomocí ultrazvuku (UAE), extrakci nadkritickou tekutinou (SFE) a mikro-extrakci na pevné fázi<sup>63</sup>.

Jak už bylo zmíněno, velice často se k extrakci využívají rozpouštědla, která hrají velkou roli ve výsledné velikosti výtěžku. Snažíme se proto vybrat taková, která nám zajistí výtěžek co nejvyšší. Pro extrakci přirozeně se vyskytujících kanabinoidů, které jsou většinou lipofilní, jsou nejčastěji používanými rozpouštědly; organická rozpouštědla jako je např. hexan<sup>63,64</sup>.



### 3.1.1 Extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi je široce používaná metoda pro zpracování vzorků, při které se k izolaci cílové sloučeniny ze vzorku používá pevný sorbent, který je umístěn v kolonce, do které se následně přivádí vzorek ve vhodném rozpouštědle. Nevýhoda této extrakce spočívá v omezené rychlosti průtoku vzorku kolonkou a malým poměrem průtočné plochy a výšky sloupce sorbentu což snižuje sorpční kapacitu a reprodukovatelnost<sup>66</sup>.

Alternativním přístupem ke konvenční SPE je disperzní extrakce na pevné fázi, ve které je sorbent rozptýlen do matrice vzorku (nebo jejího extraktu). Úzký kontakt, kterého je dosaženo mezi částicemi sorbentu a analytem, podporuje kinetiku sorpce, což zvyšuje účinnost celého procesu. Tento přístup je obecně známý jako QuEChERS, což je zkratka jeho hlavních funkcí: rychlý; snadný; levný; efektivní; robustní a bezpečný (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)<sup>66</sup>.

Dalším druhem SPE je mikro-extrakce na pevné fázi, která využívá křemičitého vlákna potaženého tenkou vrstvou vhodného polymerního sorbentu nebo imobilizované kapaliny. Toto vlákno je umístěno uvnitř jehly v zařízení podobnému stříkačce, což umožňuje dobrý kontakt se vzorky bez nutnosti vakua pro plnění nebo eluci. Čas potřebný pro extrakci, objem rozpouštědla a vzorku se s použitím této metody výrazně snižují<sup>67-68</sup>.

### 3.1.2 Extrakce kapalinou

Extrakce kapalinou (macerace) mletých vzorků rostliny za použití vody není obvykle preferovanou volbou díky nízké rozpustnosti fytoKANABINOIDŮ právě v tomto rozpouštědle. Stále se však používají macerace např. alkoholem. Jedná se o zvláště užitečný způsob na přípravu konopné tinktury obsahující KANABINOIDY. Jednou z nevýhod této metody je však relativně nízký výtěžek, který můžeme zvětšit zvýšením extrakční teploty a použitím Soxhletova přístroje. Kromě alkoholu se dá k extrakci KANABINOIDŮ použít také ether, chloroform či uhlovodíky a celý proces můžeme ještě urychlit mícháním. Právě způsob extrakce a teplota, při které probíhá, jsou rozhodující faktory pro přeměny KANABINOIDŮ, což je další z důvodů, proč jsou pro extrakci preferovány modernější techniky<sup>63,69</sup>.

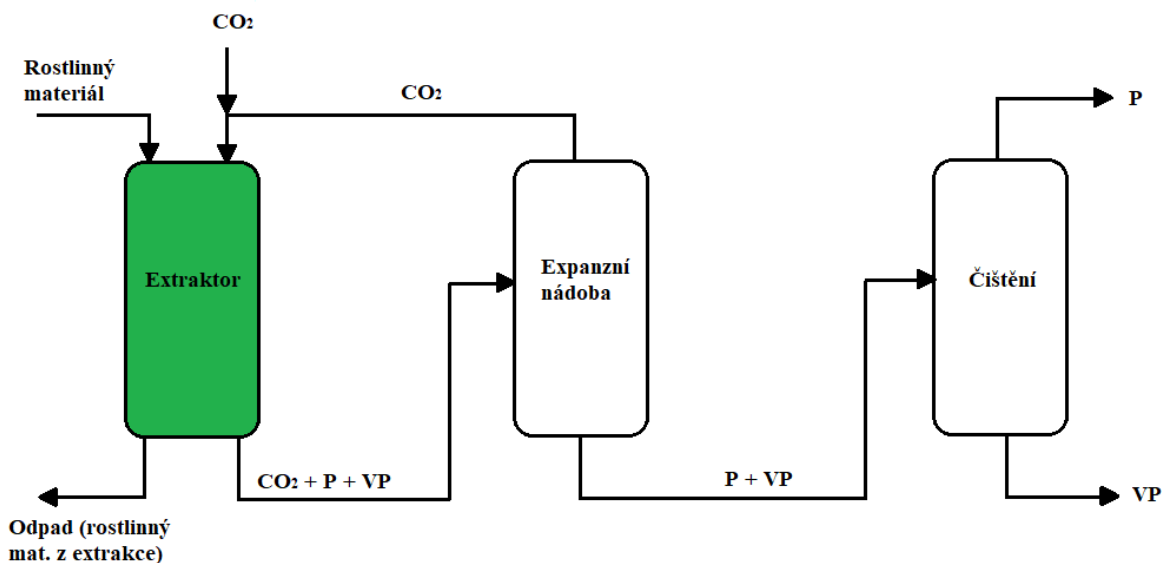
### 3.1.3 Extrakce nadkritickou tekutinou

Extrakce nadkritickou tekutinou je metoda používaná ve velkém měřítku k extrakci éterických olejů a široké škály bioaktivních složek z rostlinných matic<sup>64</sup>. Jako rozpouštědlo se zpravidla používá CO<sub>2</sub> nebo voda v nadkritickém stavu<sup>63</sup>.

#### 3.1.3.1 Extrakce zkapalněným oxidem uhličitým

Nejčastěji používaným rozpouštědlem u SFE je zkapalněný oxid uhličitý, což je levné, nehořlavé, bezpečné rozpouštědlo s velmi dobře známými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. CO<sub>2</sub> dosahuje nadkritického stavu při 304,25 K (31,1 °C) a 7,39 MPa a vrací se do plynného stavu za okolních podmínek (atmosférický tlak a pokojová teplota), což umožňuje jednoduchou regeneraci rozpuštěné látky za vzniku produktu bez rozpouštědel. To je hlavní důvod proč se SFE často používá pro potraviny a farmaceutické výrobky, u kterých nesmí zůstat zbytky toxických rozpouštědel. Nízká kritická teplota CO<sub>2</sub> umožňuje zpracování materiálů citlivých na teplo bez jejich degradace. Pro optimalizaci účinnosti extrakce je vhodná mírná korekce hodnoty tlaku a teploty pro převedení do nadkritických podmínek<sup>64,70</sup>.

Použití oxidu uhličitého jako zeleného rozpouštědla má také svá omezení. Pro udržení oxidu uhličitého v nadkritickém stavu je nutná práce za zvýšeného tlaku, což často vede k lehce vyšším investičním nákladům. To je však většinou kompenzováno skutečností, že u SFE nemusíme provádět složitou desorpci nebo čištění produktu a skutečností, že CO<sub>2</sub> je ve srovnání s ostatními rozpouštědly levný a snadno dostupný<sup>70</sup>. Další nevýhodou je jeho polarita, protože není dobrým rozpouštědlem pro polární látky. Z toho důvodu se při extrakci využívají různé polární modifikátory (alkohol, voda, kyseliny, atd.), čímž se rozšíří rozsah polarity extrakčního rozpouštědla i pro extrakci polárních látek<sup>51,64</sup>. Na **obr. 13** je zobrazen schématický náčrt zařízení pro SFE.



**Obrázek 13:** Schématický náčrt zařízení pro extrakci nadkritickou kapalinou (P = produkt, VP = vedlejší produkt)<sup>51</sup>

SFE byla dříve použita pro extrakci kanabinoidů z konopného oleje a podle dostupných informací existuje i několik studií o SFE aplikovaných na drogový typ *Cannabis sativa* L.<sup>64</sup>. První je disertační práce Perrotina<sup>70</sup>, který zkoumal některé podmínky extrakce a izolace kanabinoidů včetně THC, CBD, CBN a CBG a dospěl k závěru, že z ekonomického a ekologického hlediska je upřednostňována SFE před tradiční extrakcí rozpouštědlem (hexanem). Druhá a novější je práce Omara a kol.<sup>51</sup>, kteří srovnávali účinnost dvou různých technik, extrakce s fokusovaným ultrazvukem a SFE, pro zpracování kanabinoidů. Jednou z nevýhod SFE je, že účinnost není vždy dostatečně vysoká a že extrakční podmínky jsou vysoce závislé na matici vzorku. Tato práce však ukázala, že pro extrakci kanabinoidů z listů nebo semen konopí je SFE vhodnou technikou nejen pro selektivní oddělení od dalších matričních sloučenin, ale také účinně odstraňuje zápach těchto rostlin. Aromatickou frakci lze po extrakci využít v kosmetických přípravcích s nízkým obsahem psychoaktivních látek a na druhé straně, extrakce kanabinoidů bez aromatické frakce otevírá cestu k přípravě přírodních léčivých látek se slibným a rostoucím využitím v různých terapiích.

### 3.1.3.2 Extrakce stlačenou horkou vodou

Extrakce stlačenou horkou vodou (PHWE) je další formou SFE, kde místo CO<sub>2</sub> použijeme jako rozpouštědlo vodu v nadkritickém stavu, což je při teplotě nad atmosférickým bodem varu vody (100 °C, 0,1 MPa), ale pod kritickým bodem varu vody (374 °C, 22,1 MPa), kdy má voda podobné vlastnosti jako methanol a ethanol<sup>65,71</sup>. Někdy bývá označena jako extrakce

nadkritickou vodou (SWE), extrakce přehřátou vodou, PLE nebo zrychlená extrakce rozpouštědlem kdy se jako rozpouštědlo použije právě voda<sup>71</sup>.

Technika PHWE přilákala pozornost hlavně kvůli svým výhodám (stejným jako při použití SFE s CO<sub>2</sub>) ve srovnání s jinými konvenčními i nekonvenčními technikami. Důležitým parametrem je teplota, která přímo ovlivňuje účinnost extrakce i přenos hmoty během procesu. Optimální podmínky pro získání extraktu bohatého na CBD, CBC, CBG s nízkým obsahem THC a CBN jsou teplota v extraktoru 150 °C, ve sběrné nádobě 160 °C a doba extrakce 45 minut<sup>65,71</sup>.

### 3.1.4 Mikrovlnná extrakce

Mikrovlnná extrakce (MAE) patří k nově vznikajícím technologiím zelené extrakce a je zvláště vhodná pro extrakci polárních sloučenin jako jsou polyfenoly. Obecnou výhodou MAE oproti konvenčním extrakčním technikám je vysoká výtěžnost, zkrácení doby extrakce, nízká spotřeba rozpouštědla i energie a také minimalizace dopadu na životní prostředí díky aplikaci netoxických rozpouštědel<sup>72</sup>.

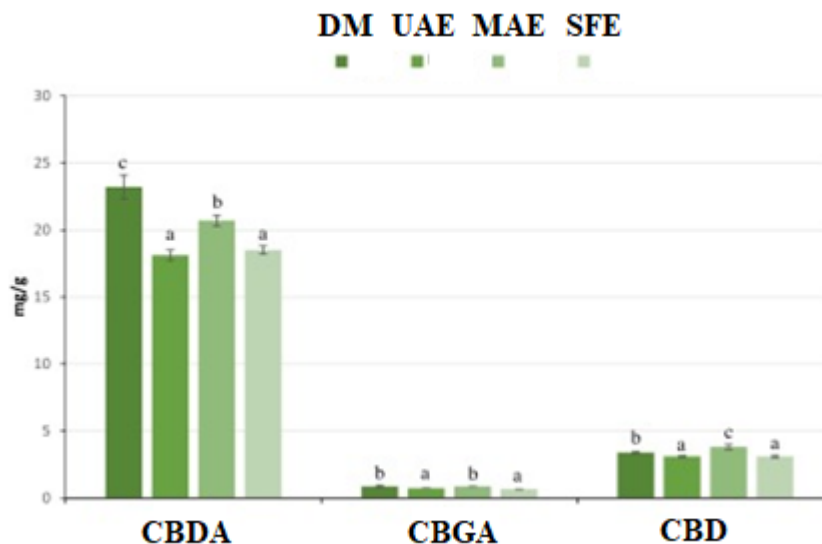
Tato metoda je přijímána jako účinná alternativa pro extrakci organických sloučenin z rostlinného materiálu ve srovnání s jinými extrakčními technikami jako je Soxhletova extrakce, extrakce pomocí ultrazvuku a extrakce nadkritickou tekutinou a má velký potenciál pro použití v průmyslovém měřítku. Nejdůležitějšími parametry této metody jsou polarita rozpouštědla, doba extrakce, síla ozáření, teplota a kontaktní plocha<sup>71</sup>. Při MAE mohou mikrovlny proniknout do rostlinné matrice a generovat tak teplo v buňce, čímž se usnadní prasknutí buňky a v krátké době se zlepší rozpouštění cílových sloučenin v rozpouštědle<sup>73</sup>. K realizaci této extrakce se dá použít jednoduchý extrakční systém skládající se z mikrovlnné trouby připojené k příslušnému skleněnému zařízení obsahujícímu baňku s kulatým dnem a kondenzátor.<sup>72</sup> Mikrovlnná trouba je bezkontaktní zdroj tepla, který minimalizuje teplotní gradient a zmenšuje tak velikost záření. Zatímco se přenos energie zrychluje, topení se stává efektivnějším.<sup>73</sup>

V jedné studii<sup>71</sup> byl získán extrakt s maximálním obsahem CBD a minimálním obsahem THC při použití 47% ethanolu za 10 minut při poměru rychlosti a délky, (S/L=5). Další práce<sup>74</sup> uvádí, že rychlost extrakce celkového THC a CBD byla vyšší při použití olivového oleje místo ethanolu jako rozpouštědla. V této práci autoři také uvádí, že uspokojujivější metodou ve srovnání s MAE, vzhledem k velikosti výtěžku, je extrakce pomocí ultrazvuku. Podle studie<sup>73</sup> uvedené v roce 2017 jsou optimální podmínky pro MAE následující, mikrovlnný výkon 375 W, teplota 109 °C, doba extrakce 30 minut a jako extrakční rozpouštědlo methanol.

### 3.1.5 Extrakce pomocí ultrazvuku

Extrakce pomocí ultrazvuku (UAE) je další populární metoda pro extrakci fytochemikálií s využitím různých rozpouštědel (ethanol, olivový olej). Při tomto typu extrakce je rozemletý materiál vložen do skleněné nádoby, která je umístěna do ultrazvukové lázně (vysokofrekvenční pulsy, 20 kHz), buď při pokojové teplotě či při teplotě zvýšené<sup>63,74</sup>. Tato technika se opírá o fenomén tvorby bublin a jejich prudkého zhroucení, který se nazývá kavitace, což má za následek místní hotspoty s teplotou řádově 104 K a tlakem až 103 barů. To umožňuje cílovým sloučeninám rozpustit se v rozpouštědle narušením buněčné stěny, čímž se zvýší výtěžek za mnohem kratší dobu. Poté jsou vzorky vyjmuté z ultrazvukové lázně filtrovány přes filtrační papír a následně je rozpouštědlo, obsahující cílové analyty odpařeno pro získání koncentrovaného produktu. Při použití ethanolu jako rozpouštědla je výtěžek třikrát až čtyřikrát vyšší ve srovnání s olivovým olejem a nejlepšími podmínkami jsou teplota 60 °C a doba 50 minut<sup>74,75</sup>. V nedávné studii<sup>75</sup> se také prokázalo, že při použití ultrazvuku u extrakce kanabinoidů, např. THC a CBD z květenství konopí, se výrazně zvýšil výtěžek extrakce. Jedná se o velice jednoduchou metodu, která probíhá při mírnějších teplotách, je levnější, bezpečná a energeticky efektivní<sup>74</sup>.

Studie<sup>69</sup> z roku 2017 porovnávala několik extrakčních metod včetně macerace s mícháním, UAE, MAE a SFE za účelem získání vysokého výtěžku nepsychoaktivních kanabinoidů. Pro spolehlivé srovnání byla pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) provedena kvantitativní analýza hlavních kanabinoidů v květenství. Jak je znázorněno na **obr. 14** mezi UAE a SFE nebyl žádný významný rozdíl, obě metody poskytovaly nejnížší množství CBDA, CBD a CBGA. Macerace poskytla výrazně vysoké množství CBDA a nejvyšší obsah CBD byl nalezen s využitím MAE. Obsah CBGA byl konstantně nejnížší v případě všech použitých metod. Jako nejlepší extrakční technika pro nepsychoaktivní kanabinoidy byla tedy zvolena macerace s EtOH jako extrakčním rozpouštědlem při pokojové teplotě po dobu 45 minut a za míchání.



**Obrázek 14:** Porovnání výtěžků extrakce (mg/g) konopných složek ve vzorku pomocí různých extrakčních technik. Zobrazené hodnoty jsou průměrem výsledků z více vzorků. Průměrné hodnoty označené stejnými písmeny se navzájem významně neliší. DM = dynamická macerace (macerace za míchání)<sup>69</sup>

### 3.1.6 Zajímavé extrakční metody

Kromě rutinních metod extrakce, které byly výše popsány pro extrakci kanabinoidů z rostlin konopí a spotřebních materiálů (konopný olej), existují nové miniaturizované metody extrakce. Jednou z těchto metod je metoda mikro-extrakce na magnetickém míchadle (SBSE), která byla nedávno použita pro extrakci kanabinoidů z květenství rostliny konopí pro zakoncentrování vzorku pro další stanovení<sup>63</sup>. Zařízení pro extrakci se skládá ze tří základních částí: magnetické míchací tyčinky, která je nezbytná pro přenos rotačního pohybu míchací desky na kapalný vzorek; tenkého skleněného pláště, který zakrývá magnetickou míchací tyčinku a jako třetí je vrstva sorbentu polydimethylsiloxanu (PDMS), do kterého se extrahují analyty. Skleněný obal chrání vrstvu PDMS před rozpadem, který by byl způsobený katalýzou kovy v magnetické míchací tyčince. Tato tyčinka je pak vložena do vodných roztoků konopných květů a za kontrolovaných podmínek probíhá míchání. Po extrakci se provede desorpce a vzorek se může dále chromatograficky analyzovat<sup>76,77</sup>. Výtěžek extrakce stoupá s rostoucí dobou a teplotou (60 min a 50 °C)<sup>77</sup>.

Další metodou je extrakce s využitím teploty zákalu micelárních roztoků (CPE), což je alternativní přístup ke konvenčním typům extrakcí jako je extrakce na pevné fázi a klasická extrakce kapalina-kapalina. V literatuře ji můžeme nalézt i pod názvy micelární extrakce, extrakce zprostředkovaná micelami nebo kapalná-koncentrační technika. Tato metoda

umožňuje extrakci a zakoncentrování vzorku v jednom kroku a provádí se za použití neškodných extrakčních rozpouštědel. Těmito rozpouštědly jsou neiontové povrchově aktivní látky, které mají tendenci se oddělovat od vznikajícího kalu, když se zahřejí na kritickou nebo vyšší teplotu a obvykle se absorbují na rozhraní mezi fázemi<sup>49,78</sup>. Výťažnost této extrakce je obvykle ovlivněna teplotou bodu zákalu, koncentrací povrchově aktivních látek a fyzikálně-chemickými vlastnostmi extrahovaných látek. CPE byla využita pro extrakci THC z konopné pryskyřice a představuje potencionálně účinný nástroj pro rozpouštění, čištění a zakoncentrování aktivních látek z pevného extraktu. Mezi výhody CPE patří jednoduchost a nízká finanční nákladnost, protože není nutné používat drahá a potenciálně toxická organická rozpouštědla<sup>49,78</sup>.

Další nově vyvinutou metodou je extrakce pomocí kávovaru na kapsle. Je to jednoduchý, rychlý (v řádech sekund) a nízkonákladový způsob extrakce THC, CBD a CBN z pevných vzorků marihuany založený na použití kávovaru na kapsle a 2-propanolu jako extrahovadla za mírných podmínek (19 bar, 72 °C). K provedení této studie byla prázdná kapsle naplněná vzorkem kanabinoidů a dispergačním činidlem obohaceným o vnitřní standard. Kvantitativní extrakce THC, CBD a CBN z pupenů, listů a stonků byla dosažena v jediném a rychlém kroku za 40 sekund při použití 100 ml 2-propanolu a vyhodnocena byla pomocí GC-MS<sup>79</sup>.

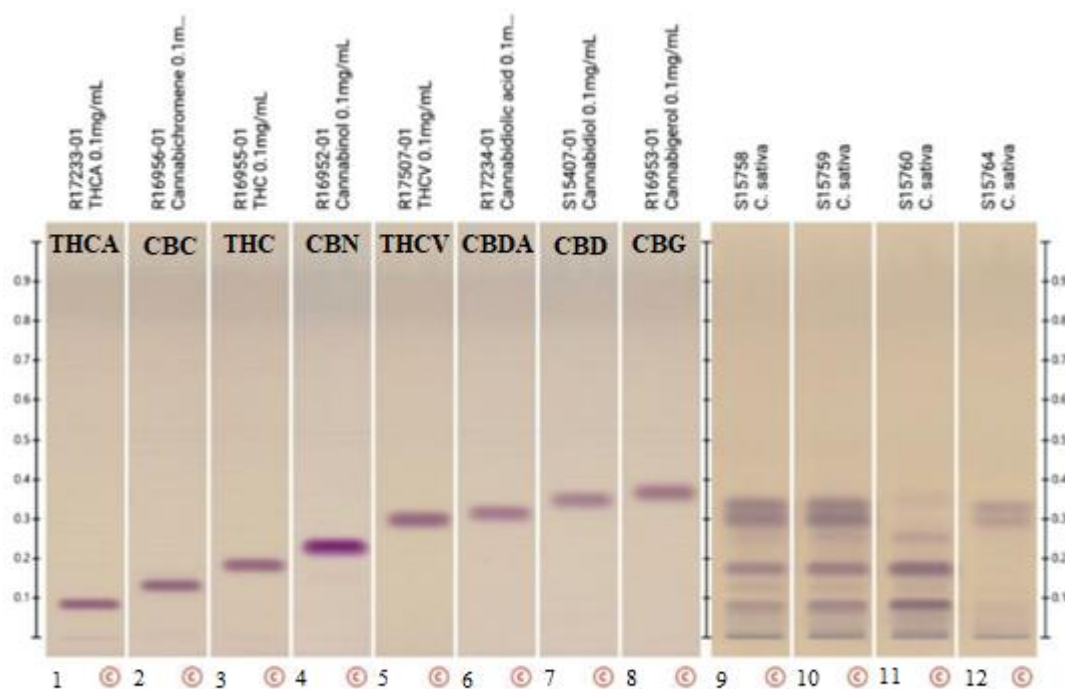
## **3.2 Moderní analytické techniky pro stanovení kanabinoidů**

### **3.2.1 Tenkovrstvá chromatografie**

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) je dobře známá technika, která se využívá i pro analýzu kanabinoidů. Z větší části pouze pro jejich předběžnou semikvantitativní analýzu v rostlinných extraktech. Oproti kolonovým separačním technikám, jako jsou kapalinová či plynová chromatografie, je TLC jednodušší a poskytuje výsledky pro řadu vzorků najednou, takže dochází k velké úspoře času<sup>35,80</sup>.

Hazekamp a kolegi<sup>40</sup> vyvinuli a ověřili jednoduchou, rychlou a vysokoúčinnou metodu TLC (HPTLC), která umožňuje analyzovat surové vzorky obsahující více složek s použitím jedné TLC desky, což vede k vysoké produktivitě práce. Další výhodou je snadná separace a detekce barevných sloučenin, minimální množství toxických či organických odpadů, které je nutné likvidovat a které by mohly znečišťovat životní prostředí. Samotná identifikace kanabinoidů je založena na srovnání hodnoty retardačního faktoru s hodnotami standardů. Vizualní vyhodnocení se provádí ponořením TLC destičky do vodného roztoku obsahujícího

„Fast Blue B Salt“, což je selektivní barvivo pro kanabinoidy. Tato metoda se využívá především pro kvantifikaci THC, ale umožňuje kvalitativní analýzu i dalších neutrálních kanabinoidů jako např. CBG či CBC. Její omezení spočívají ve specifitě a citlivosti, které jsou ve srovnání s jinými analytickými metodami poměrně nízké, a proto je třeba brát výsledky s jistou dávkou opatrnosti<sup>35,50,80</sup>. Na **obr. 15** je zobrazeno vyhodnocení analýzy kanabinoidů touto metodou.



**Obrázek 15:** Chromatogram RP HPTLC na Merck Si 60 RP-18 F stacionární fázi, mobilní fáze je methanol-voda-kyselina octová (70:15:15) a činidlo pro derivatizaci je kyselina sírová a vanilin. Standardy kanabinoidů (1 – 8), vzorky květenství konopí (9 – 12). RP = reverzní fáze<sup>80</sup>

### 3.2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je jedním z nejčastěji používaných přístupů ve forenzní, farmakokinetické a fytochemické analýze kanabinoidů<sup>35,46,54,81</sup>. Neumožňuje však přímou analýzu extrahovaného vzorku, protože zahrnuje zahřátí vzorku na vysokou teplotu v nástřikové komoře (přibližně 280 °C) před chromatografickou separací za účelem převedení kapalného vzorku na jeho plynnou fázi, a to nevyhnutelně vede k dekarboxylaci kanabinoidních kyselin za vzniku jejich neutrálních kanabinoidů<sup>35,36</sup>. Aby se tomuto jevu zabránilo je pro GC analýzu nutná derivatizace (silylace), při které často dochází ke snížení výtěžku<sup>35-37,82</sup>. Dále bylo dokázáno, že tepelná přeměna kanabinoidních kyselin na jejich neutrální deriváty



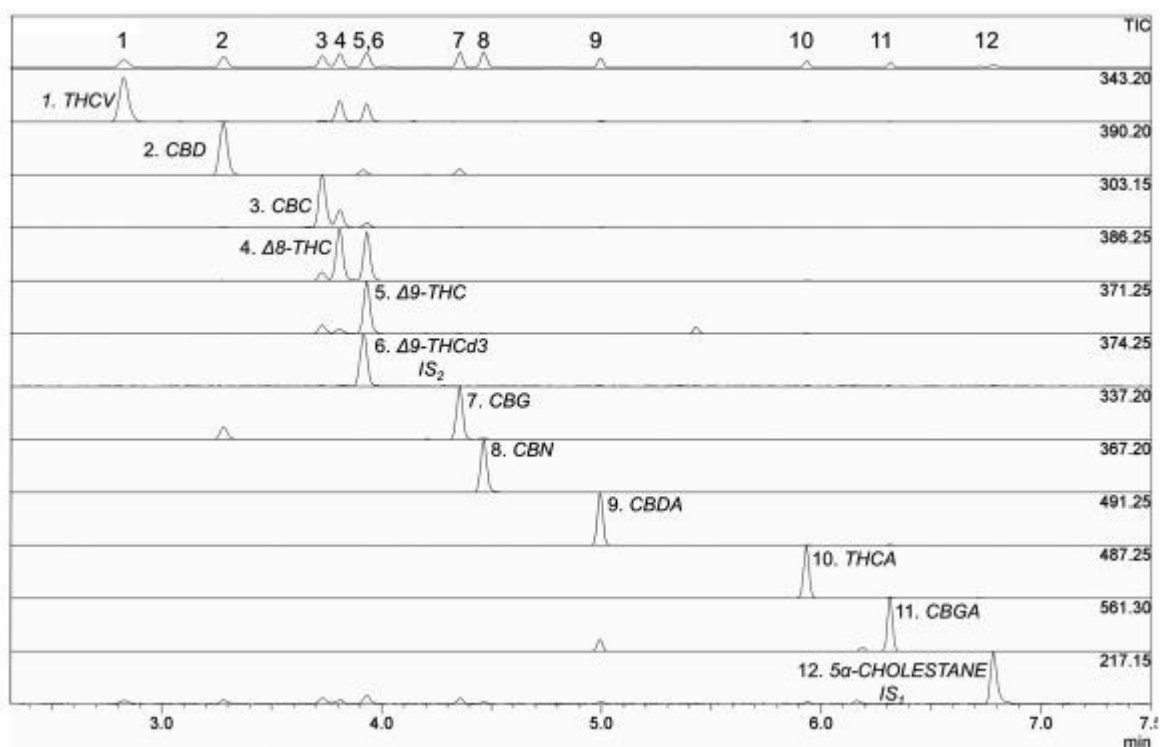
v dávkovacím portu GC je pouze částečná, což už samo vede k podhodnocení výsledku. Autoři proto navrhují, aby se přesné celkové množství kanabinoidů měřilo zvlášť pro kyselé a zvlášť pro neutrální formy<sup>35,56</sup>. Nicméně GC je stále metodou obvykle jednodušší a rychlejší než HPLC a je stále frekventovanou metodou využívanou úřady pro stanovení kanabinoidů<sup>35,81</sup>.

GC je obecně spojena s plamenovým ionizačním detektorem (FID) nebo s hmotnostním spektrometrem (MS)<sup>35,36,82</sup>. Ve většině rutinních analýz se používá GC-FID kvůli své jednoduchosti a spolehlivosti při identifikaci a klasifikaci kanabinoidů v rostlinných i jiných matricích. Při kvantifikaci těchto látek se vychází z použití autentických standardů, zatímco GC-MS vyžaduje použití odpovídajících deuterovaných standardů, které jsou drahé a nejsou komerčně dostupné pro všechny kanabinoidy. Pro správnou identifikaci jednotlivých kanabinoidů je však GC-MS vhodnější, jelikož její citlivost je ve srovnání s GC-FID vyšší<sup>35,81</sup>.

Při použití GC-MS pro analýzu kanabinoidů je zpravidla využívána elektronová ionizace. Ta generuje hmotnostní spektra, která obsahují charakteristické píky iontových fragmentů a lze je pro jejich identifikaci porovnat se spektry přítomnými v knihovných sloučenin. Dále se využívají měkké ionizační techniky, jako je například chemická ionizace, která poskytuje informace o molekulárních iontech nebo se dá použít i fotoionizace<sup>81,82</sup>.

Jak již bylo zmíněno, důležitým krokem pro GC analýzu kanabinoidů je derivatizace různými silylačními činidly, jako jsou *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTF)<sup>83</sup> či kombinace *N,O*-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (BSTFA) nebo MSTFA s trimethylchlorsilanem (TMCS) nebo s ethylacetátem<sup>84</sup>. Novějším způsobem je pak esterifikace kanabinoidních karboxylových kyselin diazomethanem při použití rychlé GC-MS, což je metoda, která dokáže analyzovat vzorek se stejnou citlivostí, rozlišením a dalšími analytickými parametry (jako je opakovatelnost a reprodukovatelnost), ale za mnohem kratší čas. Má dokonce i vyšší citlivost než HPLC. Tuto metodu lze proto použít pro rutinní kvantitativní stanovení hlavních kanabinoidů v krátkém čase s dobrým rozlišením a možností použití levnějšího vnitřního standardu (**obr. 16**)<sup>82</sup>.

Některé práce poukázaly na to, že jednorozměrná GC nenabízí dostatečné rozlišení pro analýzu složitých směsí, kde se vyskytují velmi podobné chemické struktury. V tomto smyslu již bylo pro stanovení chemických profilů různých vzorků konopí a heroinu úspěšně použito dvourozměrné plynové chromatografie (GC×GC), která dokáže vedle sebe stanovit 7 hlavních kanabinoidů a to THC, CBD, THCA, CBN, CBG, CBDA a CBC<sup>35,50,81,82</sup>.



**Obrázek 16:** Chromatogram rychlé GC-MS analýzy kanabinoidů pro TMS derivatizaci<sup>82</sup>

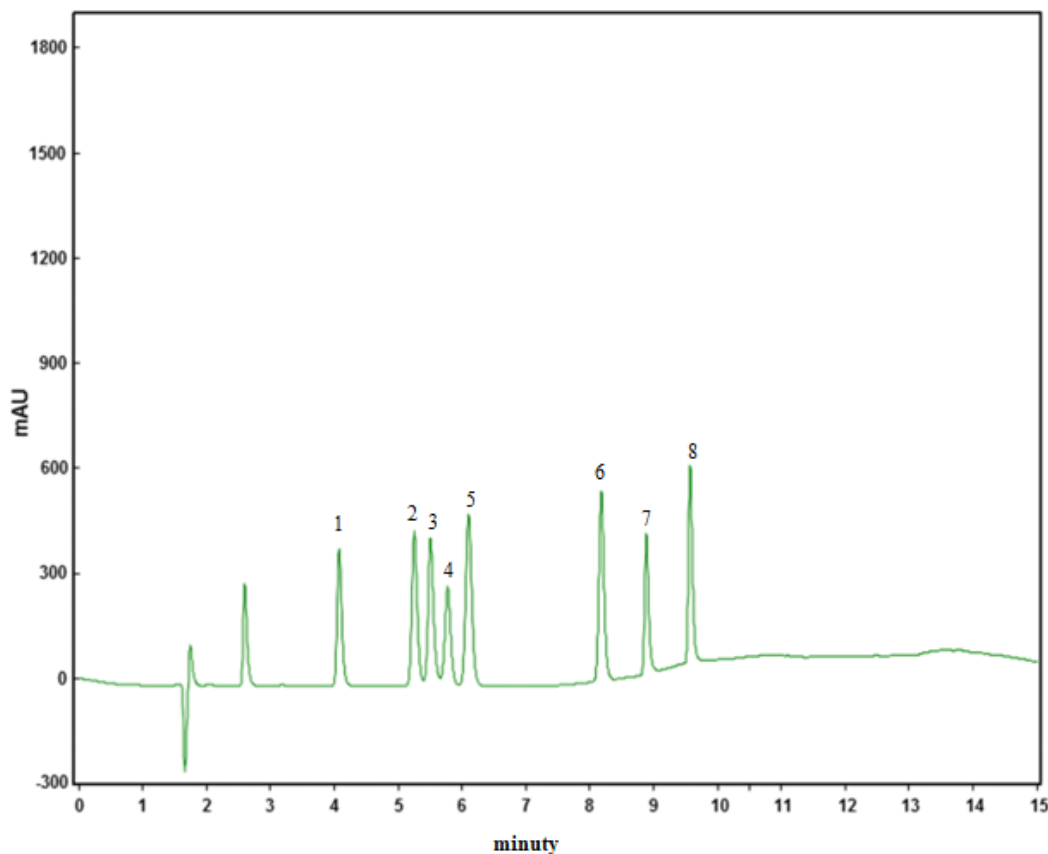
### 3.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie se využívá pro stanovení kanabinoidů ve složitých matricích. Pracuje při pokojové teplotě, a tak umožňuje přímou analýzu neutrálních a kyselých kanabinoidů bez ochrany karboxylové skupiny, a také umožňuje získat úplný chemický profil vzorků konopí<sup>35-37,50</sup>. Téměř všechny metody HPLC dnes používané pro analýzu kanabinoidů byly vyvinuty v systému s obrácenými fázemi pomocí gradientové eluce<sup>36,85</sup>.

Ve spojení s HPLC a ultra vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC) se nejčastěji využívají spektrofotometrické detektory pracující v ultrafialové a viditelné oblasti (UV/Vis) a hmotnostní spektrometry<sup>36,53</sup>. Spektrofotometrický detektor je nejpoužívanějším, cenově dostupným detektorem pro analýzu kanabinoidů v rostlinných materiálech, kde je jejich obsah poměrně vysoký (**obr. 17**)<sup>36,37</sup>. Přináší však určité nevýhody související s jeho omezenou citlivostí a specifitou. Při použití tohoto detektoru je někdy obtížné stanovit všechny složky vzorku v jedné chromatografické analýze, protože absorpční maximum kanabinoidních kyselin (270 a 310 nm) je odlišné oproti maximu neutrálních kanabinoidů (220 nm)<sup>35,53</sup>. Některé látky ani nelze detekovat, jelikož neabsorbují záření v oblasti UV/Vis<sup>59</sup>. Nízkou specifitu lze překonat použitím detektoru s diodovým polem (DAD), kdy se zaznamenává celé spektrum v každém okamžiku eluce a tudíž lze po analýze rekonstruovat chromatogramy při zvolené

vlnové délce. V posledních letech se stále více, pro kvantitativní a kvalitativní analýzu složitých matric, využívá citlivější a selektivnější hmotnostní spektrometr. Využití hmotnostního spektrometru je vhodné pro rozlišení CBG a CBD, které mají rozdílnou molární hmotnost, a tedy rozdílný poměr hmotnosti k náboji ( $m/z$ ), což je klíčový parametr pro hmotnostně spektrometrickou detekci<sup>35,53</sup>. U izomerů jako jsou  $\Delta^8$ -THC a  $\Delta^9$ -THC, je to však komplikovanější, protože mají stejná MS spektra a nelze je rozlišit ani tímto detektorem<sup>35</sup>. Z analyzátorů se nejčastěji využívá trojitý kvadrupól (QqQ) nebo spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu (QTOF), který poskytuje spektra s vysokým rozlišením<sup>35,50</sup>. Důležitým nástrojem pro analýzu kanabinoidů, které eluují velmi blízko nebo se je nedaří chromatograficky rozdělit je tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS), která v kombinaci s analyzátozem s vysokým rozlišením, představuje rychlý a ekonomický nástroj pro kvantitativní analýzu kanabinoidů v různých přírodních i biologických materiálech<sup>50,86</sup>.

V současné době je nejpoužívanějším analyzátozem pro kvantitativní stanovení kanabinoidů a jejich příslušných metabolitů v biologických tekutinách již zmíněný QqQ, který má vynikající citlivost a selektivitu, zvláště v režimu monitorování více přechodů (MRM)<sup>35</sup>. Protože však poskytuje pouze měření nominální hmotnosti, a nikoliv strukturní identifikaci necílových sloučenin, je pro odstranění matricových vlivů nutné použití deuterovaných analytických standardů. Bez těchto analytických standardů se získají pouze nespolehlivé hodnoty, zejména v případě kanabinoidních kyselin, které se při ionizaci elektrosprejem (ESI) za teploty 300 °C rozkládají na neutrální analogy<sup>35,87</sup>. K analýze těchto kyselých kanabinoidů se s úspěchem využívá kapalinová chromatografie s nadkritickou tekutinou, která je ve spojení se spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem sice mnohem méně citlivá než GC-MS či HPLC-MS, ale za to doba analýzy je mnohem kratší<sup>50</sup>.



**Obrázek 17:** HPLC-UV chromatogram zaznamenaný při vlnové délce 220 nm.

**1** – kanabidivarin, **2** – kyselina kanabidiolová, **3** – kyselina kanabigerolová, **4** – kanabigerol, **5** – kanabidiol, **6** – kanabinol, **7** – tetrahydrokanabinol, **8** – kyselina tetrahydrokanabinolová<sup>85</sup>

Doposud ještě nebyly objeveny a popsány všechny kanabinoidy, které se nacházejí v konopí. Je proto zřejmé, že je zapotřebí více studií, aby bylo možné posoudit jeho potenciál pro farmakologické použití, nebo pro agronomické účely (šlechtění různých druhů). S ohledem na tyto předpoklady byly navrženy dvě metody pro necílenou metabolickou analýzu polárních a nepolárních extraktů z konopí, aby byla pokryta detekce co největšího počtu kanabinoidních sloučenin. Těmito metodami jsou GC-TOF/MS pro nepolární konopné extrakty a LC-QTOF-MS/MS pro polární konopné extrakty<sup>88</sup>. Pro získání strukturních informací o dané sloučenině je často využívána iontová past (IT), která umožňuje opakovaně vybírat a fragmentovat sledovaný iont ve spektru, teoreticky až do  $n$  stupně ( $MS^n$ )<sup>35</sup>. Použití LC-IT- $MS^n$  tak umožňuje kombinovat kvantifikaci a strukturní analýzu pro potvrzení kanabinoidů v konopných produktech<sup>43</sup>.

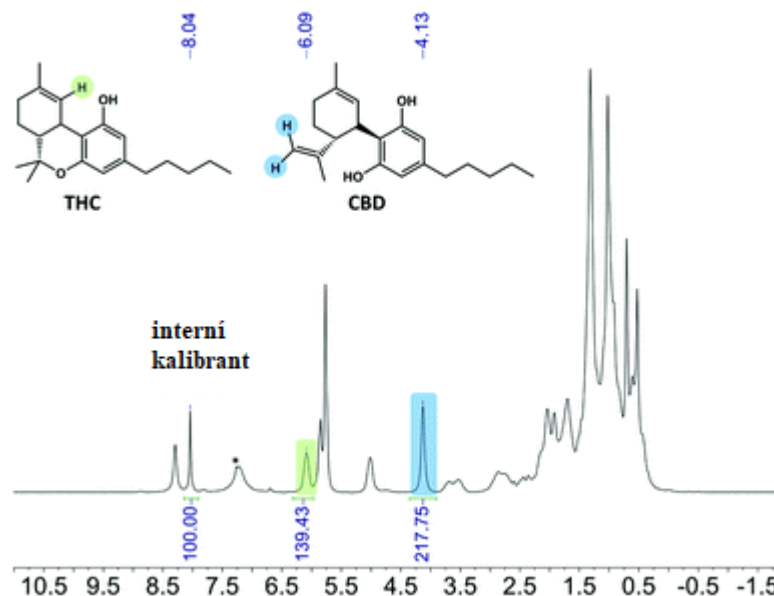
U HPLC-MS se pro ionizaci molekul kromě elektrospreje využívá chemická ionizace za atmosférického tlaku, která patří mezi měkké ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku. Zpravidla se však pro analýzu kanabinoidů využívá ESI<sup>89</sup>.

V posledních několika desetiletích je snahou analytických chemiků miniaturizace a zmenšení nákladů na separaci a s tím související zkrácení doby analýzy. Proto dochází ke zmenšování průměru separační kolony, zmenšení průměru částic a délky kolony čímž dochází ke zrychlení analýzy. Patří sem kapilární či nano-kapalinová chromatografie, které oproti konvenční HPLC přinášejí mnohé výhody, jako je snížení spotřeby mobilní fáze, včetně toxických činidel, dále pak zmenšení objemu dávkovaného vzorku, vysoká účinnost separace, snadné spojení s MS a jednou z nejdůležitějších je omezení produkce odpadu v souladu s principy zelené chemie<sup>36,89,90</sup>. I navzdory uvedeným výhodám a dobré výkonnosti nano-LC v několika aplikačních oblastech se tato metoda nevyužívá v analýze kanabinoidů<sup>36</sup>.

### 3.2.4 Nukleární magnetická resonance

Spektroskopie nukleární magnetické resonance (NMR) je alternativní metodou ke konvenční analýze HPLC a GC pro stanovení kanabinoidů. Jak již bylo dříve zmíněno, pro kvantitativní analýzu kanabinoidů se hojně využívá právě GC s FID nebo jinou detekcí a HPLC se spektrofotometrickou detekcí. Obě tyto metody jsou citlivé na nečistoty ve vzorku (např. chlorofyl, lipidy, ...) a obvykle tak vyžadují přečištění vzorku ještě před samotnou analýzou. Nevýhodou je že, referenční sloučeniny potřebné pro přípravu kalibračních roztoků u těchto metod nejsou k dispozici pro všechny kanabinoidy. Zde pak přichází v úvahu <sup>1</sup>H-NMR, která je vhodná pro analýzu kanabinoidů bez jakéhokoliv chromatografického přečištění. Navíc se ukázalo, že NMR je vhodná pro přesnou a reprodukovatelnou kvantitativní analýzu ve velmi krátkém čase. Nevýhodou této metody jsou vysoké přístrojové náklady a nutnost vysoce specializované obsluhy přístroje<sup>35,58,59,88</sup>. Tyto spektrometry také vyžadují k ochlazení supravodivého magnetu velké množství kryogenních kapalin (jak helia, tak dusíku) a obvykle vyžadují izolovanou místnost kvůli velikosti přístroje<sup>91</sup>.

Z toho důvodu byl velice významný vznik stolních NMR spektrometrů s vysokým rozlišením, které nabízejí rychlou, snadně použitelnou a nenáročnou alternativu ke kvantifikaci klíčových složek vzorku konopí. Na rozdíl od chromatografického přístupu je NMR neodmyslitelně kvantitativní, protože plocha pod křivkou pro specifickou rezonanci je přímo úměrná počtu jader v molekule, která nás zajímá. Jedním z nejsilnějších aspektů NMR je schopnost získat spektrum všeho co je v roztoku, aniž by bylo potřeba oddělit jednotlivé složky. Příklad <sup>1</sup>H NMR spektra u vzorku připraveného smícháním dvou komerčně dostupných koncentrátů z konopí, aby byl dosažen poměr THC : CBD přibližně 1:1 je uveden na **obr. 18**<sup>91</sup>.



**Obrázek 18:** <sup>1</sup>H NMR spektrum (60 MHz) s interním kalibrantem a zvýrazněnými oblastmi zájmu pro kvantitativní analýzu NMR. K označení zbytkového píku rozpouštědla CDCl<sub>3</sub> se použila hvězdička<sup>91</sup>

## 4. VYUŽITÍ KANABINOIDŮ VE FARMACII

### 4.1 Moderní historie využívání konopí v medicíně

Díky studiím farmakologických a toxikologických vlastností konopí se v Evropě v 19. století opět začalo využívat k různým terapiím. Prvním, kdo v této době dle dostupné literatury, aplikoval experimentální metody ke studiu konopí, byl irský lékař William Brooke O'Shaughnessy, který pracoval v Indii, kde také prováděl své experimenty. Jakmile se vrátil do Evropy, rozšířil znalosti o nespočetné farmakologické výhody konopí v lékařské komunitě. V esejích, které napsal je spousta historických detailů o použití konopí, které uvádějí sanskrtské, peršské a arabské autoři a tyto eseje jsou dokonalými modely moderního farmaceutického výzkumu rozděleného na předklinické studie bezpečnosti a účinnosti následované klinickými experimenty. Uvědomil si, že odrůda pěstovaná v Indii s názvem *Cannabis indica* se liší od odrůdy pěstované v Evropě s názvem *Cannabis sativa* a to ne, jen vzhledem, ale také ve farmakologických vlastnostech. Proto důsledně přistoupil k vyšetřování rostlinných extraktů pomocí testů na zvířatech jako byli myši, králíci, kočky a psi. Jakmile zjistil jeho bezpečnost na zvířatech, použil místní recepty na přípravu alkoholových konopných tinktur a podával je svým pacientům postiženým revmatismem, cholerou nebo tetanem, a dokonce i dítěti trpícímu křečemi. Pacienti na terapii reagovali dobře, takže usoudil, že

rostlinný extrakt má silné analgetické účinky a myorelaxační vlastnosti a navrhl ho jako lék na záchvaty. Navíc při studiích účinků konopí na tetanus uvedl, že i když není schopen vyléčit infekci, je účinný jako paliativní léčba a zmírňuje tak některé závažné příznaky<sup>9,14,92-96</sup>.

Dalším, kdo se v té době o konopí zajímal, byl francouzský psychiatr Jacques-Joseph Moreau. Byl asistentem lékaře v Charenton Asylum poblíž Paříže a běžnou terapeutickou praxí v té době, bylo doprovázet psychiatrické pacienty na dlouhých cestách do exotických a vzdálených zemí. Během těchto cest zjistil, že mezi Araby je běžně užíván hašiš (konopná pryskyřice) a překvapily ho jeho účinky. V Paříži se pak kolem roku 1840 rozhodl experimentovat s různými přípravky z konopí, nejprve na sobě a poté i na svých studentech. Výsledkem jeho práce bylo, že vydal knihu, která obsahovala jeden z nejucelenějších popisů akutních účinků konopí<sup>9,92</sup>.

Díky studiím a znalostem O'Shaughnessyho v Británii, Moreaua ve Francii a prací Barona Sylvestra de Sacyho (1758 – 1838.) také ve Francii, který překládal do francouzštiny dříve neznámé arabské rukopisy uvádějící mimo jiné i léčivé a psychotropní účinky konopí, zájem o konopí a hlavně jeho pryskyřici rychle rostl a rozšířil se jak po celé Evropě tak i ve Spojených státech. Mnoho významných chemiků se poté pokoušelo izolovat a identifikovat účinné látky z konopné alkoholové tinktury, ale marně, tedy až do roku 1964<sup>92</sup>.

Ve druhé polovině 19. století bylo v Evropě a ve Spojených státech publikováno více než 100 vědeckých článků o terapeutické hodnotě konopí a tomuto období se také proto dá říkat Zlatý věk konopí. Zároveň několik laboratoří po celém světě, např. Bristol-Meyers a Squibb ve Spojených státech či Merck v Německu, začalo uvádět na trh komerční formy konopí (tinktura, extrakty a pilulky), které byly hlavně předepisovány pro své analgetické, protizánětlivé a antispastické účinky<sup>9,92,93,95</sup>. Lékařské indikace konopí na počátku 20. století pak byly shrnuty v Sajousově Analytické cyklopedii praktické medicíny (1924) ve třech oblastech<sup>9</sup>:

1. Sedativa a hypnotika: při nespavosti, melancholii, mánii, delirium tremens („šílenství s třesením“, abstinenční příznak u alkoholiků), při choleře, tetanu, vzteklině, senné rýmě, bronchitidě, tuberkulóze, kašli, paralýze, křeči močového měchýře a kapavce
2. Analgetika: při bolestech hlavy, migrénách, namáhání očí, menopauze, mozkových nádorech, tic douloureux (neuralgie trigeminu; bolest, která vznikne poruchou v systému signalizace bolesti), žaludečních vředech a křečích, onemocnění míchy, mnohočetném zánětu nervu, bolesti, která není způsobena lézemi, poruchách dělohy, menstruačních

bolestech, chronickému zánětu, abnormálně silném menstruačním krvácení, hrozícím potratu, poporodním krvácení, akutnímu revmatismu, ekzému, senilnímu svědění, brnění, mravenčení, k znečitlivění dny a pro úlevy od bolesti zubů

3. Další použití: ke zlepšení chuti k jídlu a trávení, na „výraznou anorexii po vyčerpávajících onemocněních“, žaludeční neurózy, pocity plnosti, tlaku, plynatosti, průjem, úplavice, cholera, zánět ledvin, hematurie (krev v moči), diabetes mellitus, bušení srdce, vertigo (pocit porušené rovnováhy, závrať), ztrátu napětí děložního svalstva u žen a impotenci u mužů

V prvních desetiletích 20. století se užívání konopí v medicíně významně snížilo. To nastalo mimo jiné díky tomu, že do té doby ještě nikdo nedokázal identifikovat účinné látky v konopí, které se zatím používalo jen ve formě konopných tinktur či extraktů. Účinnost těchto přípravků velmi kolísala v závislosti na několika faktorech (původ a věk rostliny nebo způsob přípravy) a nebylo jednoduché určit optimální dávku. Kromě toho se na konci 19. století začali objevovat různé léky se známými účinnostmi při léčbě nemocí a problémů na které se dalo do té doby používat právě konopí<sup>9</sup>. Také je tu nadále problém se zneužíváním konopí jako omamné drogy. Na počátku 20. století bylo konopí takto zneužíváno jen v malých skupinkách lidí, což popisují ve svých románech autoři jako je Charles Boudelaire, Victor Hugo nebo např. Honoré de Balzac<sup>9,92</sup>. V Severní a Jižní Americe byla tato praxe relativně běžná na venkovské oblasti severovýchodní Brazílie mezi černochoy už od 16. století. Ti se o víkendech scházeli, aby drogu společně užívali. Dále se to později rozšířilo mezi rybáře v San Franciscu a po moři do pobřežních měst. Rekreační užívání konopí např. v Brazílii v těchto malých, ve společnosti nízce postavených, skupinkách bylo naprosto běžné a konopí se proto začalo přezdívát „opium chudých“ a tak to zůstalo až do 50. let. Od šedesátých let se konopí, jakožto omamná látka, rychle rozšířila mezi mladší generace obyvatelstva po celém západním světě. Ve Spojených státech se procento mladých dospělých, kteří užili konopí aspoň jednou zvýšilo, z 5 % v roce 1967 na 44 %, 49 %, 68 % a 64 % v letech 1971, 1975, 1980 a 1982 a toto využití zůstává dodnes<sup>9,97</sup>. Ve 30. letech 20. století byla marihuana identifikována jako opojná „nová“ droga. V roce 1937 následovalo přijetí zákona o daních z marihuany, který zakázal sociální užívání drogy a v roce 1970 byl přijat zákon o kontrolovaných látkách, který měl za následek zákaz léčebného užívání konopí úplně. Tato legislativa zmocnila DEA (Správa pro vymáhání drog v USA) regulovat užívání psychoaktivních drog jejich zařazením do harmonogramu podle jejich potenciálu zneužívání. Marihuana je zařazena do skupiny drog, kam patří např. i LSD, heroin, meskalin a psilocybin. Hned na to se několik organizací



pokoušelo tento zákon napadnout formou žalob, aby bylo možné konopí i nadále terapeuticky využívat, to ovšem nedopadlo úspěšně, a tak zůstalo konopí i nadále zařazeno mezi drogy<sup>9,92,93,95,96</sup>.

Jak už bylo dříve zmíněno v roce 1964 byla identifikována chemická struktura THC<sup>12</sup>, počátkem 90. let byl objeven a popsán endokanabinoidní systém se specifickými receptory pro kanabinoidy a následně byl izolován anandamid<sup>98</sup>, endogenní kanabinoid. Tyto objevy způsobily velký boom, co se týče výzkumu ohledně konopí a jeho aktivních složek. Začala nová éra, která vedla k publikaci tisíce článků a klíčových zjištěních na podporu terapeutické hodnoty této rostliny<sup>9,92</sup>.

V tomto období např. provedlo 6 států studie povolené FDA, aby stanovily účinnost kouřené marihuany jako antiemetika během chemoterapie rakoviny a jako stimulantu chuti k jídlu. V květnu 1985 schválila FDA na nevolnost a zvracení spojené s chemoterapií lék Dronabinol, který je syntetickou verzí THC a v roce 1992 se pak jako stimulant chuti k jídlu začal využívat i k boji s AIDS. A jelikož byl Dronabinol klasifikován jako droga, byl v roce 1999 překlasifikován jako kontrolovaná látka, což umožnilo jeho indikace na tyto nemoci<sup>93</sup>.

## 4.2 Současnost

V současné době, je o konopí využíváné v terapii, opět široký zájem, jak co se týče již známých a nebo i potenciálně možných účinků na člověka. Jasným příkladem využití, které by konopí mohlo mít v budoucnu je např. léčba závislosti na opiátech, která již dosáhla alarmujících čísel. Kanabinoidy totiž mají již zmíněné účinky na bolest a jsou celkově bezpečnější než opiáty, proto by se takovými pacientům mohly podávat pro zmírnění závislosti<sup>92,99</sup>.

V posledních dvou dekadách se také několik farmaceutických firem snažilo vyrobit látky schopné cílit na kanabinoidní receptory a posilovat nebo naopak blokovat jejich funkci<sup>92</sup>. To vedlo např. k vzniku antagonisty CB<sub>1</sub> Rimonabantu v roce 2006 pro léčbu obezity. Očekávaného úspěchu to však nedosáhlo a v roce 2008 byl pozastaven jeho prodej kvůli vznikajícím depresím a sebevražedným úmyslům u pacientů co ho používali. Následně byl, v roce 2009, Evropskou komisí stažen z trhu úplně<sup>100</sup>.

Z toho vyplývá, že kanabinoidy mají dobrý terapeutický potenciál, ale na druhou stranu i spoustu nežádoucích účinků.

### 4.3 Nežádoucí účinky konopí

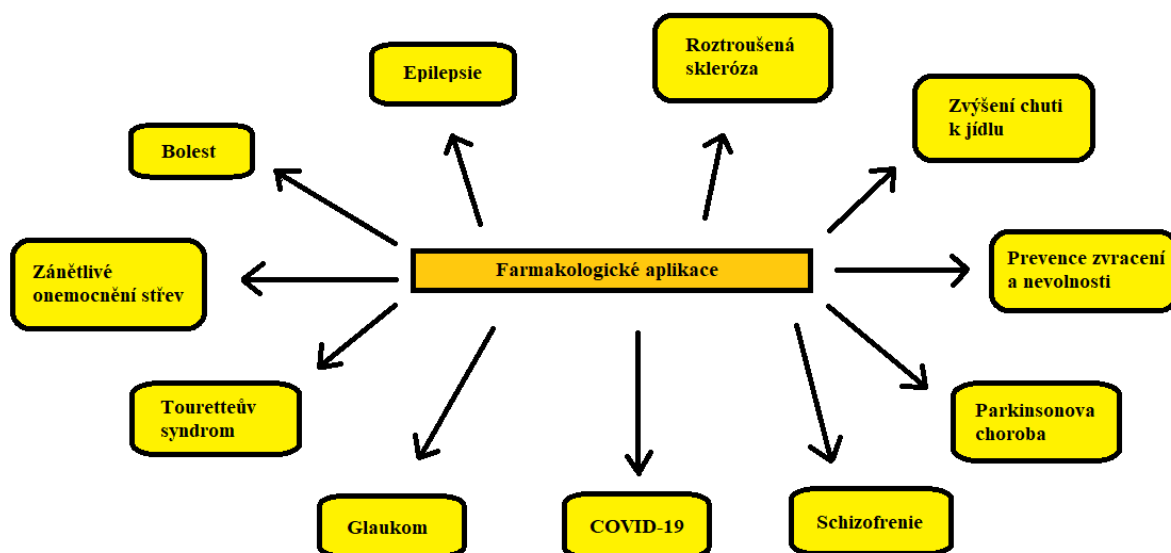
Užívání konopí není bezrizikové a existuje celá řada proměnných, které mohou ovlivnit přítomnost nebo závažnost těchto rizik/nežádoucích účinků při užívání konopí. Mezi potenciální proměnné pak hlavně patří věk, pohlaví, váha, způsob podání drogy, souběžné podávání léků, současný výskyt více nemocí u pacienta, dávkování, typ konopí, poměr fytoKANABINOIDŮ v konopí, zejména pak poměr THC : CBD a mnoho dalších<sup>93,96</sup>.

Při užívání konopí je stejně jako u jiných psychoaktivních látek hlavním možným vedlejším účinkem zhoršená psychomotorická výkonost, dále pak sucho v ústech, mírné sedace a zvýšená chuť k jídlu. U akutní intoxikace pak může dojít ke zrychlení srdeční frekvence a může se objevit i pokles nálady, ten je ale běžnější u pacientů užívajících syntetické THC, než u pacientů užívajících přírodní rostliny. V případě chronického užívání konopí formou kouření se pak zvyšuje pravděpodobnost plicních infekcí či rakoviny<sup>93</sup>. Studie zkoumající vliv konopí na vývoj naznačují, že u jedinců, kteří užívají konopí během dospívání přetrvává neblahý vliv na poznávání, inteligenci a neuropsychologický výkon<sup>101</sup>. Pravidelné a časté užívání konopí u vysokého procenta pacientů způsobuje také chronické zánětlivé změny v dýchacích cestách, které se projevují chronickým kašlem, sípáním a hlenem. Akutní účinky v případě jednorázových expozic konopí zahrnují řadu účinků na kognitivní funkce, jako je narušení krátkodobé paměti, snížení rozpětí pozornosti, snížení verbální schopnosti a pomalejší řešení problémů. Tyto projevy však úplně vymizí, když účinek vyprchá<sup>102</sup>.

Pokud jde o fyzickou závislost na konopí, problém může být méně významný ve srovnání s jinými látkami jako jsou například již zmíněné opiáty. Abstinenční příznaky po dlouhodobém užívání konopí zahrnují hněv, depresivní nálady, podrážděnost, neklid, nespavost, podivné sny, úbytek hmotnosti a snížená chuť k jídlu. Často a správně bylo také konstatováno, že konopí má velmi nízkou toxicitu v tom smyslu, že neexistují důkazy o úmrtích způsobených výlučně předávkováním touto drogou<sup>93,96,102</sup>.

### 4.4 Farmakologické aplikace

Jak již bylo několikrát konstatováno konopí má také širokou škálu žádoucích účinků, které se využívají ve farmacii. Na **obr. 19** jsou pak znázorněny hlavní farmakologické aplikace, týkající se vnitřního podání extraktů nebo léků z konopí a syntetických kanabinoidů. Tyto údaje zobrazují klinickou účinnost těchto přípravků ve velmi širokém spektru chorob<sup>95,96</sup>.



**Obrázek 19:** Farmakologické aplikace extraktů nebo léků z konopí či syntetických kanabinoidů při léčbě nemocí<sup>95</sup>

Přípravky z konopí, zejména extrakty CBD a THC, mají velice významný terapeutický potenciál, ale z důvodů nedokončených klinických studií by se měly tyto přípravky používat až jako jedna z posledních možností<sup>95,96</sup>.

#### 4.4.1 Bolest

Endokanabinoidní systém je hlavním systémem kontroly endogenní bolesti a hraje tak klíčovou roli ve vývoji a řešení této bolesti. Zaměření kanabinoidů z konopí na tento systém proto může poskytnout terapeutickou výhodu při její léčbě<sup>103,104</sup>. Tento systém je přítomen v mnoha dráhách bolesti, přičemž bylo dokázáno na zvířecích modelech, že agonisté kanabinoidních receptorů působí proti vedení bolestivých podnětů v případě akutní, zánětlivé a neuropatické bolesti. Předpokládá se, že přesný mechanismus účinku je inhibice uvolňování presynaptického neurotransmiteru a modulace postsynaptické dráždivosti<sup>96,103,105</sup>.

U člověka však není léčebné konopí stejně účinné proti všem druhům bolesti. Bylo prokázáno, že kanabinoidy nemohou bojovat s akutní bolestí, ale dokáží lehce zmírnit chronickou bolest (kam patří např. i migrény), podobně jako všechna ostatní, dnes dostupná analgetika. Farmakoterapie chronické bolesti je však sama o sobě velice obtížná<sup>95,99,103,106</sup>. Neuropatická bolest je typ chronické bolesti, která vzniká přímo v nervech. Objevuje se v důsledku úrazu, nemoci, rakoviny, poruchy imunity nebo účinků některých léčiv<sup>95,107</sup>. Bylo zjištěno, že na snížení této bolesti je účinné podávání konopí formou kouření nebo inhalace. Tento účinek

závisí na dávce a lze ho dosáhnout s obsahem THC menším než 10 %. Ve srovnání s perorálním podáním je v tomto případě mnohem rychlejší a předvídatelnější<sup>106</sup>.

#### 4.4.2 Epilepsie

Epilepsie je považována za nejčastější neinfekční neurologické onemocnění. Zhruba třetina epileptických pacientů trpí záchvaty, které jsou rezistentní i na léčbu standartními antiepileptiky. Antiepileptika potlačují abnormální mozkovou aktivitu a tím zabraňují vzniku záchvatů. Nevýhodou je řada nežádoucích účinků, jako je demineralizace kostí v důsledku nedostatku vitamínu D a anémie. Podle mechanismu účinku můžeme tyto léčiva rozlišit do 4 hlavních tříd (**tabulka. 2**)<sup>95,108,109</sup>.

**Tabulka 2:** Dělení antiepileptik podle mechanismu účinku. (GABA = kyselina gama-aminomáselná, AMPA = kyselina  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová, NDMA = kyselina *N*-methyl-D-asparágová)<sup>109</sup>

Třída	Mechanismus účinku
1.	Snížení presynaptické excitability a uvolnění neurotransmiterů
2.	Posílení GABA-ergní transmise – prodloužené nebo častější otevření chloridového kanálu v GABA-A receptoru, inhibice degradace nebo transportu GABA ze synapse
3.	Snížení postsynaptické excitability – ovlivnění AMPA nebo NDMA receptoru
4.	Vícečetné a jiné cíle

Antiepileptika schválená před rokem 1989 jsou označována jako „první generace“ (např. karbamazepin, valproát a fenytoin) a přípravky zavedené později jako „druhá generace“. Nověji schválené léky (např. brivaracetam, lokosamid, perampanel a stiripentol), které vykazují zlepšení oproti klasickým antiepileptikům nebo působí novým mechanismem účinku se řadí do „třetí generace“<sup>110</sup>.

Antiepileptické užívání konopí sahá až do starověku, nicméně zájem o užívání konopí, konkrétně CBD, pro léčbu dětské epilepsie za poslední desetiletí vzrostl, zvláště poté co se objevily mediální zprávy o dětech jejichž epilepsie, rezistentní na léčbu antiepileptiky, reagovala právě na použití konopí. Epilepsie rezistentní na léky má potenciální katastrofální následky, může dojít ke zpomalení kognitivních funkcí, autismu, problémům s chováním a tím ke špatné kvalitě života, a dokonce až k předčasné smrti.<sup>111</sup> Endokanabinoidy působením, jak na CB<sub>1</sub>, tak i na CB<sub>2</sub> snižují uvolňování excitačního neurotransmiteru v CNS, čímž zabraňují záchvatům. Konkrétní popis toho, jak CBD ovlivňuje fyziologické funkce však není do dnešní

doby zcela objasněn. Jeden z možných mechanismů může být působení CBD na potencionální kationtové kanály přechodného receptoru, což má za následek snížení presynaptického uvolnění glutamátu. V roce 2016 a 2017 byla provedena velká studie, která prokázala účinky CBD v případě terapie pediatrické epilepsie, jen s několika vedlejšími účinky. Většina z nich byla mírná až středně těžká a zahrnovala ospalost, sníženou chuť k jídlu, únavu, průjem, a zvýšené křeče. U některých pacientů se ukázaly abnormality v testech jaterní funkce, které ale postupně zmizely při nepřetržitém podávání konopí. Nicméně CBD se používalo pouze v kombinaci s tradiční epileptickou léčbou a nebylo proto zcela jasné, zda má samotný CBD antiepileptické účinky, nebo zda pouze zesiluje účinky tradičních antiepileptik<sup>108</sup>.

V roce 2018 FDA schválila lék Epidolex<sup>®</sup> (99% čistý, orální CBD extrakt) k léčbě záchvatů, což vytvořilo tolik potřebnou příležitost pro pokračující studium vysoce koncentrovaného CBD extraktu pro léčbu refrakterní epilepsie, kdy dochází k opakovaným záchvatům, které přetrvávají i po aplikaci dvou antiepileptik a je nutné tak pacienta uvést do celkové anestézie. I když bylo prokázáno významné zlepšení frekvence a závažnosti záchvatů s relativně dobře tolerovanými vedlejšími účinky tohoto léku, je nutné nadále pokračovat v jeho monitoringu, aby se dále posoudila dlouhodobá bezpečnost a účinnost zejména s ohledem na imunitní, kognitivní, hormonální a reprodukční funkce<sup>112</sup>. Jsou také pozorovány velké rozdíly mezi vírou zdravotnických pracovníků a široké veřejnosti, pokud jde o jeho účinnost a bezpečnost<sup>111</sup>. S tímto konkrétním faktem se však setkáváme u všech aplikací konopí, co se terapie týče.

#### **4.4.3 Roztroušená skleróza**

Roztroušená skleróza je nejčastějším autoimunitním onemocněním CNS vedoucím ke ztrátě myelinu a tedy, ke ztrátě funkce axonů. Ty pak nejsou schopné přenášet nervové vzruchy. Mezi klasické příznaky této nemoci patří problémy se zrakem, bolest, svalová ochablost, problémy s rovnováhou a paralýza<sup>95,113</sup>. Tyto projevy jsou způsobeny progresivním abnormálním neuronovým přenosem a nemoc má zpočátku dlouhé bezpříznakové období, které je náhle přerušeno relapsy, trvajících několik dnů až týdnů<sup>95</sup>.

Současná terapie se zaměřuje zejména na zastavení imunitních záchvatů v rané fázi léky, které přímo inhibují aktivaci buněk a uvolňování zánětlivých mediátorů, nebo které zabraňují náboru bílých krvinek do CNS<sup>113</sup>. Dosud však nejsou k dispozici téměř žádné léky, které zabraňují nebo zpomalují výskyt neurodegenerace a progresu nemoci, s výjimkou nedávno schválené protilátky Ocrelizumab (Ocrevuz<sup>®</sup>)<sup>113,114</sup>. Preklinické studie prokázali potenciální využití neuroprotektivních vlastností endokanabinoidů v částečné inhibici progresu nemoci.

Nabiximol, orální sprej (Sativex<sup>®</sup>, směs THC a CBD, 1:1) je v současné době farmaceutickým přípravkem schváleným pro tuto indikaci, nepatří však ale do léčby první linie<sup>95,113,115</sup>. Podává se k úlevě od středně těžkých až těžkých příznaků svalové ztuhlosti u dospělých pacientů s roztroušenou sklerózou, kteří nereagují na jiné léky a kteří vykazují klinicky významné zlepšení příznaků v začátcích léčby. Může být také účinný při špatné funkci močového měchýře, která je u této nemoci běžná. Prokázalo se však, že lékařská marihuana negativně ovlivňuje rovnováhu a držení těla<sup>95,113</sup>.

Nedávné studie týkající se užívání lékařské marihuany při roztroušené skleróze sice vykazují jisté účinky, ale bez statistické významnosti. Celkově se kanabinoidy zdají být dobře tolerovanou doplňkovou léčbou spolu s významnějším průměrným zlepšením nemoci u pacientů, ale další výzkum je určitě nutný<sup>103</sup>.

#### **4.4.4 Zvýšení chuti k jídlu**

Zvýšení chuti k jídlu se využívá v případě anorexie, která je často spojována s řadou chronických onemocnění jako je mentální anorexie, infekce HIV a rakovina<sup>88</sup>. V terapii se využívají progestiny (megestrol) ke zvýšení chuti k jídlu a z krátkodobého hlediska se dají použít i kortikosteroidy (anamorelin). Každopádně jejich použití je velmi omezené v důsledku několika vedlejších účinků<sup>95,103,116</sup>.

Zde se proto naskytla možnost aplikace Dronabinolu (obsahuje THC), který se podává pacientům trpícím rakovinou jak pro zlepšení chuti k jídlu, tak i jako prevence proti nevolnosti a zvracení. Rozsáhlá studie, kde se podával Dronabinol pacientům s rakovinou a byl porovnáván s účinky Megesterolu, ukázala, že perorální užití Dronabinolu může pomoci stimulovat chuť k jídlu u pacientů s pokročilým nádorovým onemocněním a zpomalit úbytek hmotnosti, nicméně oproti Megesterolu není tak účinný. Marinol<sup>®</sup> (Dronabinol), byl ale nakonec, jako lék zvyšující chuť k jídlu u pacientů s AIDS a rakovinou, schválen<sup>95,103,116</sup>.

#### **4.4.5 Prevence zvracení a nevolnosti**

Chemoterapie, běžný způsob léčby rakoviny, často způsobuje nevolnost a zvracení, které významně ovlivňují kvalitu života a patří tak k jedněm z jejich nejobávanějších vedlejších účinků. Přibližně 45 – 61 % pacientů s rakovinou trpí zvracením a nevolností vyvolanými chemoterapií. U dětí a dospívajících je uváděno, že k těmto nežádoucím účinkům dochází mnohem častěji než u dospělých pacientů<sup>117</sup>. V antiemetické profylaxi během chemoterapie je spousta léčiv, která se dají použít např. kortikosteroid (methylprednisolon), derivát fenothiazinu

(chlorpromazin) nebo antihistaminikum (haloperidol)<sup>95,117,118</sup>. Pokyny navrhují užívání antiemetik v monoterapii nebo v režimu dva léky ku třem, v závislosti na stupni rizika nevolnosti, zvracení a individuální citlivosti<sup>117</sup>.

Výskyt nevolnosti a zvracení lze také snížit aktivací CB<sub>1</sub> receptoru pomocí THC kde se v důsledku této stimulace zruší proemetické účinky dopaminu a serotoninu<sup>119</sup>. V důsledku toho se od roku 1985 u pacientů, u nichž selhala adekvátní odpověď na konvenční antiemetickou léčbu, využívají perorální kanabinoidy (tj. Dronabinol, Nabilon). Studie ukázaly, že podání těchto léčiv pacientům během chemoterapie, umožňuje 70% kontrolu nevolnosti a 66% kontrolu zvracení. Bylo také prokázáno, že kanabinoidy mají stejnou nebo dokonce i zlepšenou antiemetickou účinnost oproti konvenční terapii, mají ale ovšem více nežádoucích účinků a to např. závratě, hypotenzi, stavy úzkosti či deprese<sup>95,118,119</sup>. V dnešní době už ale máme k dispozici účinnější léky, které když byly porovnány s kanabinoidy tak vykazovaly 90% účinnost, zatímco kanabinoidy pouze 30%. Z toho důvodu se kanabinoidy používají pouze k léčbě v druhé linii nebo jako doplněk terapie<sup>95,120</sup>.

#### **4.4.6 Parkinsonova choroba**

Parkinsonova choroba je neurologický stav zahrnující degeneraci nigrostriálních dopaminových neuronů. Nigrostriální dráha je jednou z dopaminových drah v mozku, která reguluje pohyb. Tato nemoc se projevuje především ztuhlostí svalstva, třesem v klidu, nápadného, celkového zpomalení pohybu a nedostatkem schopnosti udržovat vzpřímené postavení těla. Navíc i depresemi, úzkostí, hypotenzí, zácpou, problémy se spánkem a únavou. Moderní farmakoterapie spočívá v doplnění nedostatku dopaminu a symptomatické léčbě. U pacientů trpících touto chorobou je léčba zaměřená na zlepšení motorických a nemotorických příznaků. Zatím neexistují léky, které by přímo léčily tuto nemoc, existují pouze takové, které umožňují pacientům důstojně dožít svůj život. Jedním takovým lékem je např. Levodopa, která nahrazuje dopamin. Má však řadu nežádoucích účinků jako je např. porucha souhry normálních pohybů<sup>95,103,121</sup>.

Složky endokanabinoidního systému se podílejí na regulaci a aktivitě dopaminu, konopí se proto jeví jako atraktivní léčebný prostředek při léčbě pohybových a neurodegenerativních poruch<sup>95</sup>. Bylo prokázáno, že lékařská marihuana zlepšuje motorické příznaky včetně třesu, ztuhlosti, zpomalenosti pohybu, a i nemotorických příznaků jako je bolest a poruchy spánku<sup>106</sup>. To znamená, že konopí hraje při léčbě Parkinsonovy choroby významnou roli, nicméně k objasnění přesných mechanismů účinku kanabinoidů jsou zapotřebí další studie<sup>103,121</sup>.

#### 4.4.7 Schizofrenie

Schizofrenie je duševní choroba, která postihuje téměř 1 % populace, často se značnými sociálními a ekonomickými důsledky, jelikož pacienti často trpí nezaměstnaností a nemají kde bydlet<sup>122</sup>. Objevuje se nejčastěji v rané dospělosti a zahrnuje tzv. pozitivní či negativní příznaky a kognitivní dysfunkci. Mezi pozitivní příznaky patří halucinace, paranoia a bludy, zatímco mezi negativní patří emoční stažení, nedostatek motivace a snížený afekt<sup>95</sup>. Kvůli špatnému pochopení příčin schizofrenie se léčba zaměřuje hlavně na zmírnění příznaků. Mezi hlavní léky užívané při terapii pak patří neuroleptika 1. generace (haloperidol, chlorpromazin), 2. generace (risperidon) a 3. generace (kariprazin). Používají se také doplňková, neuroleptická léčiva a to antidepressiva, sedativa, hypnotika a stabilizátory nálady<sup>122,123</sup>.

U schizofrenie existují rané důkazy o tom, že CBD může být vhodný pro terapii, zatímco u THC se zdá, že psychózu naopak zhoršuje. Některé studie pak také ukázali, že použití konopí má výhody v případě schizofrenie, některé však ukázali že ne. Což akorát dokazuje, že ne všichni lidé reagují na konopí stejně a jsou proto potřeba další studie<sup>103</sup>.

#### 4.4.8 Glaukom

Glaukom popisuje mnohočetné oční poruchy, které mají společnou charakteristickou optickou neuropatii s výslednými deficitem zorného pole. Nejčastěji je spojován se zvýšeným nitroočním tlakem a způsobuje nevratnou ztrátu zraku. Lze ho léčit léky v podobě očních kapek, laserem nebo operací<sup>124</sup>.

Studie používající orální, intravenózní a inhalovanou lékařskou marihuanu ukázaly, že THC má účinky na snížení nitroočního tlaku, a to působením na kanabinoidní receptory řasnatého tělíska oka. Tím se snižuje produkce komorové vody a následně i nitrooční tlak. Navíc jak už bylo zmíněno THC má i neuroprotektivní účinky. Samotný terapeutický účinek je však krátkodobý a je nutné časté podávání léku. Podle studií 60 – 65 % pacientů zaznamenalo snížení nitroočního tlaku o 25 % po užívání lékařské marihuany. Projevily se však i nežádoucí účinky jako je snížení krevního tlaku, které vede ke špatnému prokrvení očního nervu a tím naopak může dojít opět ke zhoršení zraku<sup>95,124,125</sup>.

Byly také provedeny studie na použití THC ve formě kapek do očí, což by bylo velice výhodné, jelikož tento způsob podání by se vyhnul nežádoucím systémovým účinkům. Tato aplikace se



ale ukázala jako méně účinná. Bohužel doposud nejsou ani žádné studie, které by porovnávaly účinnost a bezpečnost využití kanabinoidů oproti dosavadní léčbě glaukomu<sup>95,103</sup>.

#### **4.4.9 Touretteův syndrom**

Hlavní příznaky Touretteova syndromu (TS) jsou četné motorické a vokální tiky. Toto onemocnění postihuje přibližně 1 % populace, a muži jsou zasaženi 3 krát až 4 krát častěji než ženy. Tyto tiky jsou považovány za neúmyslné, ale mohou být dočasně potlačeny vůlí. Existuje však „rebound“ fenomén, kdy po potlačení, propuknou nahromaděné tiky ve větší intenzitě, než je pro pacienta běžné<sup>122</sup>. Léčba, která je dnes k dispozici, nepřináší požadované výsledky nebo má velice závažné vedlejší účinky a mnoho pacientů tak vyhledává různé doplňky k jejich terapii. Sáhnu proto po doplňcích stravy nebo stimulantech jako je alkohol nebo právě marihuana<sup>95,103</sup>. Byly pouze dva případy kdy se zkoumal léčivý přípravek Sativex<sup>®</sup> v léčbě TS a oba prokázaly významné snížení motorických a hlasových tiků u pacientů. Aby ovšem lékaři mohly rozhodnout, zda předepíší Sativex<sup>®</sup> v případě léčby TS, je opět zapotřebí mnohem více klinických studií prokazujících účinnost na zmírnění symptomů tohoto onemocnění<sup>103,126,127</sup>.

#### **4.4.10 Zánětlivé onemocnění střev**

Zánětlivé onemocnění střev (IBD) zahrnuje Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu, způsobující zánět střev. Jsou to chronické, idiopatické, zánětlivé poruchy gastrointestinálního traktu, jejichž původ není zcela znám, ale předpokládá se, že jsou výsledkem kombinace genetické predispozice, faktorů prostředí a nesprávné imunitní reakce na vlastní střevní mikroflóru. Jako cíl léčby Crohnovy choroby byla navržena kombinace kontroly symptomů a hojení sliznice. Konvenční léčba tohoto typu zahrnuje aminosalyciláty, kortikosteroidy, thiopuriny, methotrexát a dále pak faktory protinádorové nekrózy (adalimumab, certolizumab) a protilátky (vedolizumab, ustekinumab)<sup>128</sup>. U pacientů, jejichž příznaky jsou nekontrolovatelné touto konvenční terapií, se vyskytuje významná morbidita<sup>103</sup>.

Endokannabinoidní systém hraje významnou roli při udržování střevní homeostázy, jelikož rychle a okamžitě reaguje na vznik poruchy syntézou svých efektorových molekul, takže může být součástí tvoření střevního zánětu a je proto obzvláště zajímavý při léčbě IBD. Studie na zvířatech objevily, že v případě zanícené tkáně tlustého střeva byla kanabinoidní signalizace vyšší než v tkáni zdravé. Dále pak také ukázaly, že u pacientů užívajících konopí k vlastní léčbě došlo ke zmírnění příznaků IBD, jako je bolest břicha, ztráta chuti k jídlu a průjem. Většina

provedených studií, ale není dostatečně statisticky významná a je problém s výběrem vhodného placebo k porovnání vlastních účinků konopí, a ačkoliv lze konopí použít při léčbě IBD, klinická data ani neprokázala silnou souvislost mezi konopím a úlevou u pacientů, a proto je zde opět nutný další výzkum<sup>103,129,130</sup>.

#### 4.4.11 COVID-19

SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2), COVID-19 nebo koronavirus 2 jsou označení pro virus, který je velmi nakažlivý, velice rychle se rozšířil, způsobuje katastrofické škody a ovlivňuje zdraví, život a smrt po celém světě. Způsobuje zánět v důsledku imunitní odpovědi v rozsahu mírných nebo žádných příznaků až po závažnou a kritickou komorbiditu a mortalitu. Příznaky této nemoci zahrnují horečky, suchý kašel nebo malátnost a progresse tohoto onemocnění může záviset na genetických rozdílech pacientů, imunitním systému a expozici jednotlivce. O COVID-19 je stále mnoho neznámých, ale existuje zde spojení s onemocněním AIDS, kterého lze využít. Obě to jsou totiž onemocnění přenesená ze zvířete s odlišným způsobem šíření dosud bez možnosti léčby<sup>95,131,132</sup>. V případě AIDS bylo už dříve navrženo konopí a kanabinoidy pro snížení symptomů onemocnění a také jako doplňková léčba při výrazném hubnutí doprovázejícím toto onemocnění. Ukázalo se, že v patogenezi AIDS, a i u COVID-19 jsou důležité zánětlivé procesy a že kanabinoidy jsou účinné při jejich potlačení. Z toho důvodu byly navrženy i na léčbu COVID-19<sup>132</sup>.

Angiotenzin-konvertující enzym 2 a transmembránová serinproteáza jsou hlavní virové brány v orálním, plicním a střevním epitelu, které tvoří důležité cesty invaze viru COVID-19 a extrakty s vysokým obsahem CBD mají schopnost snižovat regulaci těchto enzymů<sup>133</sup>. Problémem u této nemoci mohou být hyperzánětlivé imunitní odpovědi, které mají těžké následky jako jsou zvýšená závažnost onemocnění a úmrtnost. Proto zde může pomoci další z účinků kanabinoidů a to imunomodulační účinek, který snižuje závažnost těchto následků. Může ale naopak hrát i nepříznivou roli v pozdějších stádiích onemocnění. V tomto případě ještě nejsou k dispozici ani informace o účinné velikosti dávky a mělo by být, proto opět pamatováno, že lékařské konopí není konvenční typ léčby<sup>133-135</sup>.

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na látky obsažené v konopí, jejich analytické stanovení a fyziologické účinky na člověka.

Tyto látky se nazývají kanabinoidy a je jich celá řada, konkrétně něco přes 120 sloučenin, přičemž mezi ty nejznámější a nejvyužívanější patří CBD a THC. THC je významné zejména díky svému psychoaktivnímu účinku, který má za následek, že je konopí zneužíváno jako omamná látka a CBD je naopak významné díky svým terapeutickým účinkům. Obě tyto látky interagují s endokanabinoidním systémem v lidském organismu a vyvolávají tak tyto konkrétní účinky.

Konopí a kanabinoidy nyní zažívají nový „zlatý věk“, díky velikému množství informací tykajících se jejich vlastností a velikému zájmu o jejich blahodárné účinky. Nadále zde přetrvává problém s jejich nežádoucími a nepříznivými účinky, nicméně množství studií podporujících terapeutické využívání neustále roste a podporuje tak již zmíněný zájem. Tomu napomáhá i velké množství použitelných a velice přesných analytických metod díky kterým je čím dál tím menším problémem stanovit a kontrolovat obsah a kvalitu konopných přípravků. Mezi nepoužívanější extrakční metody pro stanovení kanabinoidů z rostlinného materiálu patří extrakce nadkritickou tekutinou, využívající CO<sub>2</sub> jako rozpouštědlo. K následné separaci jsou pak nejvíce využívány chromatografické metody, a to zejména plynová chromatografie ve spojení s plamenovým ionizačním detektorem a vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení se spektrofotometrickým detektorem.

## SEZNAM LITERATURY

1. BONINI, Sara, Anna, PREMOLI, Marika, Tambaro, Simone, KUMAR, Amit, MACCARINELLI, Guiseppina, MEMO, Maurizio, MASTINU, Andrea. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*. **2018**, 227, 300 – 315.
2. ATAKAN, Zerrin. Cannabis, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*. **2012**, 2 (6), 241 – 254.
3. MATHRE, Lynn, Marry, R. N. *Cannabis in Medical Practice: A Legal, Historical and Pharmacological Overview of the Therapeutic Use of Marijuana*. [online]. Jefferson, North Carolina, and London: McFarland and company, Inc., Publishers, 1997. [cit. 15. 3. 2021]. ISBN 0-7864-0361-6. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=1AWGDhIOvk0C&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
4. NAGY, U. David, CIANFAGLIONE, Kevin, MAGGI, Filippo, SUT, Stefania, DALL'ACQUA, Stefano. Chemical Characterization of Leaves, Male and Female Flowers from Spontaneous Cannabis (*Cannabis sativa* L.) Growing in Hungary. *Chemistry a Biodiversity*. **2019**, 16(3).
5. HUCHELMANN, Alexandre, BOUTRY, Marc, HACHEZ, Charles. Plant Glandular Trichomes: Natural Cell Factories of High Biotechnological Interest. *Plant Physiology*. **2017**, 175(1), 6 – 22.
6. PETRELLI, Paolo. Cannabis. In: *Medium.com* [online]. Dec 28, 2018. [cit. 3. 5. 2021]. Dostupné z: <https://medium.com/@Cannabis5star/the-difference-between-cannabis-species-plants-the-inappropriate-and-twisted-use-of-term-cannabis-e31fcbc871ac>
7. ANDRE, M. Christelle, HAUSMAN, Jean-Francois, GUERRIERO, Gea. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecule. *Frontiers in Plant Science*. **2016**, 7, 1 – 17.
8. ALSHERBINY, A. Muhammad, LI, Guang, Chun. Medicinal Cannabis - Potential Drug Interactions. *Medicines*. **2019**, 6 (1), 1 – 12.
9. ZUARDI, Waldo, Antonio. History of *cannabis* as a medicine: a review. *Brazilian Journal of Psychiatry*. **2006**, 28(2), 153 – 157.

10. APPENDINO, Giovanni. The early history of cannabinoid research. *Rendiconti lincei-scienze fisiche e naturali*. **2020**, 31 (4), 919 – 929.
11. MECHOULAM, R., CARLINI, E.A. Toward Drugs Derived from Cannabis. *Naturwissenschaften*. **1978**, 65 (4), 174 – 179.
12. GAONI, Y., MECHOULAM, R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society*. **1964**, 86, 1646 – 1647.
13. CZÉGÉNY, Zsuzsanna, NAGY, Gréta, BABINSZKI, Bence, BAJTEL, Ákos, SEBESTYÉN, Zoltán, KISS, Tivadar, CSUPOR-LÖFFLER, TÓTH, Barbara, CSUPOR, Dezső. CBD, a precursor of THC in e-cigarettes. *Scientific Reports*. **2021**, 11(8951).
14. SÁNCHEZ-FRAGUAS, Isabel, Ana, SUARÉZ-TORRES, Isabel, Ana. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs*. **2018**, 78(16), 1665 – 1703.
15. DI MARZO, Vincenzo, PISCITELLI, Fabiana. The Endocannabinoid System and its Modulation by Phytocannabinoids. *Neurotherapeutics*. **2015**, 12(4), 692 – 698.
16. PISCITELLI, Fabiana, DI MARZO, Vincenzo. Cannabinoids: a class of unique natural products with unique pharmacology. *Rendiconti lincei-scienze fisiche e naturali*. **2021**, 32, 5 – 15.
17. CROCQ, Marc-Antoine. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in clinical neuroscience*. **2020**, 22(3), 223 – 228.
18. IZZO, A. Angelo, BORRELLI, Francesca, CAPASSO, Raffaele, DI MARZO, Vincenzo, MECHOULAM, Raphael. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in Pharmacological Sciences*. **2009**, 30(10), 515 – 527. ISSN 0165-6147.
19. HANUŠ, Ondřej, Lumír, MEYER, Martin, Stefan, MUNOZ, Eduardo, TAGLIALATELA-SCAFATI, Orazio, APPENDINO, Giovanni. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. *Natural Product Reports*. **2016**, 33(12), 1347 – 1448. ISSN 0265-0568.
20. KORTE, F., HAAG, M., CLAUSSEN, U. Tetrahydrocannabinol-carbonsäure, ein neuer Haschisch-Inhaltsstoff. *Angewandte Chemie*. **1965**, 77(19), 862 – 862. ISSN 1521-3757.

21. YOSHISUKE, Tsuda, HATTORI, Masao. Tetrahydrocannabinolic Acid, a Genuine Substance of Tetrahydrocannabinol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **1967**, *15*(7), 1075 – 1076. ISSN 1347-5223.
22. BALA, Asis, RADEMAN, Sunelle, KEVIN, Ndivhuwo, Khorommbi, MAHARAJ, Vinesh, MATSABISA, G. Motlalepula. UPLC-MS Analysis of *Cannabis sativa* Using Tetrahydrocannabinol (THC), Cannabidiol (CBD), and Tetrahydrocannabinolic Acid (THCA) as Marker Compounds: Inhibition of Breast Cancer Cell Survival and Progression. *Natural Product Communications*. **2019**, 1 – 5.
23. MECHOULAM, R., YAGEN, B. Stereoselectivity cyclization of cannabinoid 1,5 dienes. *Tetrahedron Letters*. **1969**, *10*(60), 5349 – 5352.
24. GOLOMBEK, Patricia, MÜLLER, Marco, BARTHLOTT, Ines, SPROLL, Constanze, LACHENMEIER, W. Dirk. Conversion of Cannabidiol (CBD) into Psychotropic Cannabinoids Including Tetrahydrocannabinol (THC): A Controversy in the Scientific Literature. *Toxics*. **2020**, *8*(2), 41.
25. ADAMS, Roger, HUNT, Madison, CLARK, J. H. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. *Journal of the American Chemical Society*. **1940**, *62*(1), 196 – 200.
26. MECHOULAM, R., SHVO, Y. Hashish-I: The structure of Cannabidiol. *Tetrahedron*. **1963**, *19*(12), 2073 – 2078. ISSN 0040-4020.
27. BONACCORSO, Stefania, RICCIARDI, Angelo, ZANGANI, Caroline, CHIAPPINI, Stefania, SCHIFANO, Fabrizio. Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review. *Neurotoxicology*. **2019**, *74*, 282 – 298. ISSN 0161-813X.
28. ADAMS, Roger. Marihuana. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. **1942**, *18*(11), 705 – 730.
29. WOOD, T. Barlow, SPIVEY, W. T. Newton, EASTERFIELD, Hill, Thomas. XL.-Charas. The resin of Indian hemp. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. **1896**, *69*, 539 – 546.
30. ADAMS, Roger, BAKER, B. R., WEARN, R. B. Structure of Cannabinol. III. Synthesis of Cannabinol, 1-Hydroxy-3-*n*-amyl-6,6,9-trimethyl-6-dibenzopyran. *Journal of the American Chemical Society*. **1940**, *62*(8), 2204 – 2207.

31. PAGANO, Ester, MONTANARO, Vittorino, DI GIROLAMO, Antonio, PISTONE, Antonio, ALTIERI, Vincenzo, ZJAWIONY, K. Jordan, IZZO, A. Angelo, CAPASSO, Raffaele. Effect of Non-psychotropic Plant-derived Cannabinoids on Bladder Contractility: Focus on Cannabigerol. *Natural Product Communications*. **2015**, *10*(6), 1009 – 1012.
32. GAONI, Y., MECHOULAM, Raphael. Cannabichromene, a New Active Principle in Hashish. *Chemical Communications*. **1966**, *1*, 20 – 21.
33. CLAUSSEN, U., SPULAK, F. v., KORTE, F. Zur chemischen klassifizierung von pflanzen-XXXI, haschisch-X: Cannabichromen, ein neuer haschisch-inhalts-stoff. *Tetrahedron*. **1966**, *22*(4), 1477 – 1479. ISSN 0040-4020.
34. POLLASTRO, Federica, CAPRIOGLIO, Diego, DEL PRETE, Danilo, ROGATI, Federica, MINASSI, Alberto, TAGLIALATELA-SCAFATI, Orazio, MUNOZ, Eduardo, APPENDINO, Giovanni. Cannabichromene. *Natural Product Communications*. **2018**, *13*(9), 1189 – 1194.
35. CITTI, Cinzia, BRAGHIROLI, Daniela, VANDELLI, Angela, Maria, CANNAZZA, Giuseppe. Pharmaceutical and biomedical analysis of cannabinoids: A critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2018**, *147*, 565 – 579. ISSN 0731-7085.
36. ŽAMPACHOVÁ, Lucie, ATURKI, Zeineb, MARIANI, Francesca, BEDNÁŘ, Petr. A Rapid Nano-Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. Extracts. *Molecules*. **2021**, *26*(7), 1825. ISSN 1420-3049.
37. LEGHISSA, Allegra, HILDENBRAND, L. Zacariah, SCHUG, A. Kevin. The imperatives and challenges of analyzing *Cannabis* edibles. *Curent Opinion in Food Science*. **2019**, *28*, 18 – 24. ISSN 2214-7993.
38. De BACKER, Benjamin, DEBRUS, Benjamin, LEBRUN, Pierre, THEUNIS, Laetitia, DUBOIS, Nathalie, DECOCK, Lies, VERSTRAETE, Alain, HUBERT, Philippe, CHARLIER, Corinne. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material. *Journal of Chromatography B*. **2009**, *877*(32), 4115 – 4124.

39. FISCHEDICK, Thomas, Justin, HAZEKAMP, Arno, ERKELENS, Tjalling, CHOI, Hae, Young, VERPOORTE, Rob. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry*. **2010**, *71*(17–18), 2058 – 2073.
40. FISCHEDICK, T. Justin, GLAS, Ronald, HAZEKAMP, Arno, VERPOORTE, Rob. A Qualitative and Quantitative HPTLC Densitometry Method for the Analysis of Cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *Phytochemical Analysis*. **2009**, *20*(5), 421 – 426.
41. GIESE, Matthew, W., LEWIS, Mark, A., GIESE, Laura, SMITH, Kevin M. Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. **2015**, *98*(6), 1503 – 1522.
42. PANDOHEE, Jessica, HOLLAND, Brendan, J., LI, Bingshan, TSUZUKI, Takuya, STEVENSON, Paul, G., BARNETT, Neil, W., PEARSON, James, R., JONES, Oliver, A. H., CONLAN, Xavier, A. Screening of cannabinoids in industrial-grade hemp using two-dimensional liquid chromatography coupled with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Journal of Separation Science*. **2015**, *38*(12), 2024 – 2032.
43. STOLKER, A. A. M., van SCHOONHOVEN, J., de VRIES, A. J., BOBELDIJK-PASTOROVA, I., VAES, W. H. J., van den BERG, R. Determination of cannabinoids in cannabis products using liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2004**, *1058*(1–2), 143 – 151.
44. WIANOWSKA, D., DAWIDOWICZ, A. L., KOWALCZYK, M. Transformations of Tetrahydrocannabinol, tetrahydrocannabinolic acid and cannabinol during their extractions from *Cannabis sativa* L. *Journal of Analytical Chemistry*. **2015**, *70*, 920 – 925.
45. MARIOTTI, de CÁSSIA, Kristiane, MARCELO, Alexandre, Caetano, Marcelo, ORTIZ, S., Rafael, BORILLE, Tassi, Bruna, DOS REIS, Monique, FETT, Sander, Mauro, FERRÃO, Flôres, Marco, LIMBERGER, Pereira, Renata. Seized cannabis seeds cultivated in greenhouse: A chemical study by gas chromatography-mass spectrometry and chemometric analysis. *Science & Justice*. **2016**, *56*(1), 35 – 41.
46. PELLEGRINI, Manuela, MARCHEI, Emilia, PACIFICI, Roberta, PICCHINI, Simona. A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food



- products by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2005**, *36*(5), 939 – 946.
47. PESCHEL, Wieland, POLITI, Matteo. <sup>1</sup>H NMR and HPLC/DAD for *Cannabis sativa* L. chemotype distinction, extract profiling and specification. *Talanta*. **2015**, *140*, 150 – 165.
  48. POLITI, M., PESCHEL, W., WILSON, N., ZLOH, M., PRIETO, J. M., HEINRICH, M. Direct NMR analysis of cannabis water extracts and tinctures and semi-quantitative data on  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^9$ -THC-acid. *Phytochemistry*. **2008**, *69*(2), 562 – 570.
  49. AMEUR, S., HADDOU, B., DERRICHE, Z., CANSELIER, J. P., GOURDON, C. Cloud point extraction of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol from cannabis resin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2013**, *405*(10), 3117 – 3123.
  50. AIZPURUA-OLAIZOLA, Oier, OMAR, Jone, NAVARRO, Patricia, OLIVARES, Maitane, ETXEBARRIA, Nestor, USOBIAGA, Aresatz. Identification and quantification of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. plants by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2014**, *406*(29), 7549 – 7560.
  51. OMAR, Jone, OLIVARES, Maitane, ALZAGA, Mikel, ETXEBARRIA, Nestor. Optimisation and characterization of marijuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS. *Journal of Separation Science*. **2013**, *36*(8), 1397 – 1404.
  52. PACIFICI, R., MARCHEI, E., SALVATORE, F., GUANDALINI, L., BUSARDÒ, F. P., PICHINI, S. Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **2017**, *0*, 1 – 9.
  53. CITTI, Cinzia, CICCARELLA, Giuseppe, BRAGHIROLI, Daniela, PARENTI, Carlo, VANDELLI, Angela, Maria, CANNAZZA, Giuseppe. 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*. **2016**, *128*, 201 – 209.

54. TAYYAB, Muhammad, SHAHWAR, Durre. GCMS analysis of *Cannabis sativa* L. from four different areas of Pakistan. *Egyptian Journal of Forensic Science*. **2015**, 5(3), 114 – 125.
55. UCHIYAMA, Nahoko, KIKURA-HANAJIRI, Ruri, OGATA, Jun, GODA, Yukihiro. Chemical analysis of synthetic cannabinoids as designer drugs in herbal products. *Forensic Science International*. **2010**, 198(1–3), 31 – 38.
56. DUSSY, E. Franz, HAMBERG, Cornelia, LUGINBÜHL, Marco, SCHWERZMANN, Thomas, BRIELLMANN, A. Thomas. Isolation of  $\Delta^9$ -THCA-A from hemp and analytical aspects concerning the determination of  $\Delta^9$ -THC in cannabis products. *Forensic Science International*. **2005**, 149(1), 3 – 10.
57. GAMBARO, Veniero, DELL'ACQUA, Lucia, FARÈ, Fiorenza, FROLDI, Rino, SALIGARI, Elisa, TASSONI, Giovanna. Determination of primary active constituents in *Cannabis* preparations by high-resolution gas chromatography/flame ionization detection and high-performance liquid chromatography/UV detection. *Analytica Chimica Acta*. **2002**, 468(2), 245 – 254.
58. HAPPYANA, Nizar, AGNOLET, Sara, MUNTENDAM, Remco, VAN DAM, Annie, SCHNEIDER, Bernd, KAYSER, Oliver. Analysis of cannabinoids in laser-microdissected trichomes of medicinal *Cannabis sativa* using LCMS and cryogenic NMR. *Phytochemistry*. **2013**, 87, 51 – 59.
59. HAZEKAMP, Arno, CHOI, Hae, Young, VERPOORTE, Robert. Quantitative Analysis of Cannabinoids from *Cannabis sativa* Using  $^1\text{H}$ -NMR. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. **2004**, 52(6), 718 – 721.
60. CHOI, Hae, Young, KIM, Kyong, Hye, HAZEKAMP, Arno, ERKELENS, Cornelis, LEFEBER, Alfons, W. M., VERPOOTE, Robert. Metabolomic Differentiation of *Cannabis sativa* Cultivars Using  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy and Principal Component Analysis. *Journal of Natural Products*. **2004**, 67(6), 953 – 957.
61. CHOI, Hae, Young, HAZEKAMP, Arno, PELTENBURG-LOOMAN, Anja, M. G., FRÉDÉRICH, Michel, ERKELENS, Cornelis, LEFEBER, Alfons, W. M., VERPOORTE, Robert. NMR assignments of the major cannabinoids and cannabiflavonoids isolated from flowers of *Cannabis sativa*. *Phytochemical Analysis*. **2004**, 15(6), 345 – 354.

62. MUNTENDAM, Remco, HAPPYANA, Nizar, ERKELENS, Tjalling, BRUINING, Freerk, KAYSER, Oliver. Time Dependent Metabolomics and Transcriptional Analysis of Cannabinoid Biosynthesis in *Cannabis sativa* var. Bedrobinol and Bediol Grown under Standardized Condition and with Genetic Homogeneity. *Online International Journal of Medicinal Plants Research*. **2012**, 1(2), 31 – 40.
63. NAHAR, Lutfun, UDDIN, Jamal, Shaikh, ALAM, Md. Ashraful, SARKER, D. Satyajit. Extraction of naturally occurring cannabinoids: and update. *Phytochemical Analysis*. **2021**, 32(3), 228 – 241.
64. ROVETTO, J. Laura, AIETA, V. Niccolo. Supercritical carbon dioxide extraction of cannabinoids from *Cannabis sativa* L. *The Journal of Supercritical Fluids*. **2017**, 129, 16 – 27.
65. NUAPIA, Yannick, TUTU, Hlanganani, CHIMUKA, Luke, CUKROWSKA, Ewa. Selective Extraction of Cannabinoid Compounds from Cannabis Seed Using Pressurized Hot Water Extraction. *Molecules*. **2020**, 25(6).
66. CHISVERT, Alberto, CÁRDENAS, Soledad, LUCENA, Rafael. Dispersive micro-solid phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2019**, 112, 226 – 233.
67. MONTESANO, Camilla, SERGI, Manuel, ODOARDI, Sara, SIMEONI, Chiara, Maria, COMPAGNONE, Dario, CURINI, Roberta. A  $\mu$ -SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2014**, 91, 169 – 175.
68. SPIETELUM, Agata, PILARCZYK, Michał, KLOSKOWSKI, Adam, NAMIEŚNIK, Jacek. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*. **2010**, 39(11), 4524 – 4537.
69. BRIGHENTI, Virginia, PELLATI, Federica, STEINBACH, Marleen, MARAN, Davide, BENVENUTI, Stefania. Development of a new extraction technique and HPLC method for the analysis of non-psychoactive cannabinoids in fibre-type *Cannabis sativa* L. (hemp). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2017**, 143, 228 – 236.
70. PERROTIN-BRUNEL, Hélène. *Sustainable Production of Cannabinoids with Supercritical Carbon Dioxide Technologies*. Delft, 2011. Disertační práce. Technische Universiteit Delft. Prof. ir. K.C.A.M Luyben.

71. PLAZA, Merichel, TURNER, Charlotta. Pressurized hot water extraction of bioactives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2015**, *71*, 39 – 54.
72. DRINIĆ, Zorica, VLADIĆ, Jelena, KOREN, Anamarija, ZEREMSKI, Tijana, STOJANOV, Nadežda, KIPROVSKI, Biljana, VIDOVIČ, Senka. Microwave-assisted extraction of cannabinoids and antioxidants from *Cannabis sativa* aerial parts and proces modeling. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. **2020**, *95*(3), 831 – 839.
73. CHANG, Chih-Wei, YEN, Ching-Chi, WU, Ching-Chi, WU, Ming-Tsang, HSU, Mei-Chich, WU, Yu-Tse. Microwave-Assisted Extraction of Cannabinoids in Hemp Nut Using Response Surface Methodology: Optimization and Comparative Study. *Molecules*. **2017**, *22*(11).
74. De VITA, Daniela, MADIA, Noemi, Valentina, TUDINO, Valeria, SACCOLITI, Francesco, De LEO, ALESSANDRO, MESSORE, Antonella, ROSCILLI, Patrizia, BOTTO, Alfonso, PINDINELLO, Ivano, SANTILLI, Gianluigi, SCIPIONE, Luigi, COSTI, Roberta, Di SANTO, Roberto. Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis. *Natural Product Research*. **2020**, *34*(20), 2952 – 2958.
75. AGARWAL, Charu, MÁTHÉ, Katalin, HOFMANN, Tamás, CSÓKA, LEVENTE. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from *Cannabis Sativa* L. Optimized by Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*. **2018**, *83*(3), 700 – 710.
76. BADER, N. Stir bar sorptive extraction as a sample preparation technique for chromatographic analysis: An overview. *Asian Journal of Nanosciences and Materials*. **2018**, *1*(2), 56 – 62.
77. FRANCHINA, A. Flavio, DUBOIS, M. Lena, FOCANT, Jean-François. In-Depth Cannabis Multiclass Metabolite Profiling Using Sorptive Extraction and Multidimensional Gas Chromatography with Low- and High-Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. **2020**, *92*(15), 10512 – 10520.
78. ARYA, S. S., KAIMAL, M. Admajith, CHIB, Moksha, SONAWANE, K. Sachin, SHOW, Loke, Pau. Novel, energy efficient and green cloud point extraction: technology and applications in food processing. *Journal of Food Science and Technology*. **2019**, *56*(2), 524 – 534.

79. LEIMAN, Kristiina, COLOMO, Lorenzo, ARMENTA, Sergio, De la GUARDIA, Miguel, ESTEVE-TURRILLAS, A. Francesc. Fast extraction of cannabinoids in marijuana samples by using hard-cap espresso machines. *Talanta*. **2018**, *190*, 321 – 326.
80. SHERMA, Joseph, RABEL, Fred. Thin layer chromatography in the analysis of cannabis and its components and synthetic cannabinoids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2019**, *42*(19-20), 613 – 628.
81. NAHAR, Lutfun, GUO, Mingquan, SARKER, D. Satyajit. Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published the past decade. *Phytochemical Analysis*. **2020**, *31*(2), 135 – 146.
82. GARDENIA, Vladimiro, TOSCHI, Gallina, Tullia, SCAPPINI, Simona, RUBINO, Cristina, Rosamaria, RODRIGUEZ-ESTRADA, Teresa, Maria. Development and validation of a Fast gas chromatography/mass spectrometry method for the determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. *Journal of Food and Drug Analysis*. **2018**, *26*(4), 1283 – 1292.
83. PURSCHKE, Kirsten, HEINL, Sonja, LERCH, Oliver, ERDMANN, Freidoon, VEIT, Florian. Development and validation of an automated liquid-liquid extraction GC/MS method for the determination of THC, 11-OH-THC, and free THC-carboxylic acid (THC-COOH) from blood serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2016**, *408*(16), 4379 – 4388.
84. ESCRIVÁ, Úrsula, ANDRÉS-COSTA, Jesús, María, ANDREU, Vincente, PICÓ, Yolanda. Analysis of cannabinoids by liquid chromatography-mass spectrometry in milk, liver and hemp seed to ensure food safety. *Food Chemistry*. **2017**, *228*, 177 – 185.
85. ZIVOVINOVIC, Sanja, ALDER, Ruth, ALLENSPACH, D. Martina, STEUER, Christian. Determination of cannabinoids in *Cannabis sativa* L. samples for recreational, medical, and forensic purpose by reversed-phase liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Analytical Science and Technology*. **2018**, *27*, 1 – 10.
86. JAMWAL, Rohitash, TOPLETZ, R. Ariel, RAMRATNAM, Bharat, AKHLAGHI, Fatemeh. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass-spectrometry for simple and simultaneous quantification of cannabinoids. *Journal of Chromatography B*. **2017**, *1048*, 10 – 18.

87. STOKVIS, Ellen, ROSING, Hilde, BEIJNEN, H. Jos. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **2005**, *19*(3), 401 – 407.
88. DELGADO-POVEDANO, M. M., CALLADO, Sánchez-Carnerero, C., PRIEGO-CAPOTE, F., FERREIRO-VERA, C. Untargeted characterization of extracts from *Cannabis sativa* L. cultivars by gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry in high resolution mode. *Talanta*. **2020**, *208*, 120384.
89. MACIEL, Soares, Vasconcelos, Edvaldo, de TOFFOLI, Lúcia, Anna, SOBIESKI, Eduardo, NAZÁRIO, Domingues, Eduardo, Carlos, LANÇAS, Mauro, Fernando. Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*. **2020**, *1103*(22), 11 – 13.
90. WELCH, J. Christopher, WU, Naijun, BIBA, Mirlinda, HARTMAN, Robert, BRKOVIC, Tanja, GONG, Xiaoyi, HELMY, Roy, SCHAFER, Wes, CUFF, James, PIRZADA, Zainab, ZHOU, Lili. Greening analytical chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **2010**, *29*(7), 667 – 680
91. ARANEDA, F. Juan, CHU, Terry, LECLERC, C. Matthew, RIEGEL, D. Susanne, SPINGARN, Neil. Quantitative analysis of cannabinoids using benchtop NMR instruments. *Analytical Methods*. **2020**, *12*(40), 4853-4857.
92. PISANTI, S., BIFULCO, M. Medical Cannabis - A plurimillennial history of an evergreen. *Journal of Cellular Physiology*. **2019**, *234*(6), 8342 – 8351.
93. MATHRE, Mary, Lynn. Therapeutic Cannabis: A patient advocacy issue. *American Journal of Nursing*. **2011**, *101*(4), 61 – 69.
94. MacGILLIVRAY, Neil. Sir William Brooke O'Shaughnessy (1808-1889), MD, FRS, LRCS Ed: Chemical pathologist, pharmacologist and pioneer in electric telegraphy. *Journal of Medical Biography*. **2017**, *25*(3), 186 – 196.
95. STASIŁOWICZ, Anna, TOMALA, Anna, PODOLAK, Irma, CIELECKA-PIONTEK, Judyta. *Cannabis sativa* L. as a Natural Drug Meeting the Criteria of a Multitarget Approach to Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**, *22*(2), 778.

96. BARON, P. Eric. Comprehensive Review of Medicinal Marijuana, Cannabinoids, and Therapeutic Implications in Medicine and Headache: What a Long Strange Trip It's Been... *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. **2015**, 55(6), 885 – 916.
97. KANDEL, B. Denise. Marijuana Users in Young Adulthood. *Archives of General Psychiatry*. **1984**, 41(2), 200 – 209.
98. MARTIN, B. R., MECHOULAM, R., RAZDAN, R. K. Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sciences*. **1999**, 65(6-7), 573 – 595.
99. BARON, P. Eric. Medicinal Properties of Cannabinoids, Terpenes, and Flavonoids in Cannabis, and Benefits in Migraine, Headache, and Pain: An update on Current Evidence and Cannabis Science. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. **2018**, 58(7), 1139 – 1186.
100. BIFULCO, Maurizio, PISANTI, Simona. End of the line for cannabinoid receptor 1 as an anti-obesity target? An opinion. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2009**, 8(7), 594 – 594.
101. CAMCHONG, Jazmin, O LIM, Kelvin, KUMRA, Sanjiv. Adverse Effects of Cannabis on Adolescent Brain Development: A Longitudinal Study. *Cerebral Cortex*. **2017**, 27(3), 1922 – 1930.
102. KALANT, Harold. Adverse effects of cannabis on health: an update of the literature since 1996. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. **2004**, 28(5), 849 – 863.
103. MOUHAMED, Yara, VISHNYAKOV, Andrey, QORRI, Bessi, SAMBI, Manpreet, FRANK, SM, Signy, NOWIERSKI, Catherine, LAMBA, Anmol, BHATTI, Umrao, SZEWCZUK, R. Myron. Therapeutic potential of medicinal marijuana: an educational primer for health care professionals. *Drug, Healthcare and Patient Safety*. **2018**, 10, 15 – 66.
104. WOODHAMS, G. Stephen, CHAPMAN, Victoria, FINN, P. David, HOHMANN, G. Andrea, NEUGEBAUER, Volker. The cannabinoid system and pain. *Neuropharmacology*. **2017**, 124, 105 – 120.
105. STAROWICZ, Katarzyna, FINN, P. David. Chapter Thirteen - Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Advances in Pharmacology*. **2017**, 80, 437 – 475.

106. VUČKOVIĆ, Sonja, SREBRO, Dragana, VUJOVIĆ, Savić, Katarina, VUČETIĆ, Čedomir, PROSTRAN, Milica. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Frontiers in Pharmacology*. **2018**, *9*, 1259.
107. CAVALLI, Eugenio, MAMMANA, Santa, NICOLETTI, Ferdinando, BRAMANTI, Placido, MAZZON, Emanuela. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. **2019**, *33*.
108. ZAHEER, Sidra, KUMAR, Deepak, KHAN, T. Muhammad, GIYANWANI, Raj, Pirthvi, KIRAN, F. N. U. Epilepsy and Cannabis: A Literature Review. *Cureus*. **2018**, *10(9)*, 3278.
109. SILLS, J. Graeme, ROGAWSKI, A. Michael. Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. *Neuropharmacology*. **2020**, *168*, 107966.
110. CHEN, Zhibin, BRODIE, J. Martin, KWAN, Patrick. What has been the impact of new drug treatments on epilepsy? *Current Opinion in Neurology*. **2020**, *33(2)*, 185 – 190.
111. ELLIOTT, Jesse, DeJEAN, Deirdre, CLIFFORD, Tammy, COYLE, COYLE, Doug, POTTER, Beth, SKIDMORE, Becky, ALEXANDER, Christine, REPETSKI, E. Alexander, McCOY, Bláthnaid, WELLS, A. George. Cannabis for pediatric epilepsy: protocol for a living systematic review. *Systematic Reviews*. **2018**, *7*, 95.
112. SEKAR, Krithiga, PACK, Alison. Epidolex as adjunct therapy for treatment of refractory epilepsy: a comprehensive review with focus on adverse effects. *F1000 Research*. **2019**, *8*, F1000 Faculty Rev-234.
113. CHIURCHIÙ, Valerio, Van der STELT, Mario, CENTONZE, Diego, MACCARRONE, Mauro. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation in multiple sclerosis: Clues for other neuroinflammatory diseases. *Progress in Neurobiology*. **2018**, *160*, 82 – 100.
114. MONTALBAN, Xavier, HAUSER, L. Stephen, KAPPOS, Ludwig, ARNOLD, L. Douglas, BAR-OR, Amit, COMI, Giancarlo, De SEZE, Jérôme, GIOVANNONI, Gavin, HARTUNG, Hans-Peter, HEMMER, Bernhard, LUBLIN, Fred, RAMMOHAN, W. Kottil. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*. **2017**, *376(3)*, 209 – 220.



115. ZETTL, K. Uwe, ROMMER, Paulus, HIPPE, Petra, PATEJDL, Robert. Evidence for the efficacy and effectiveness of THC-CBD oromucosal spray in symptom management of patients with spasticity due to multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*. **2015**, 9(1), 9 – 30.
116. CHILDS, S. Daniel, JATOI, Aminah. A hunger for hunger: A review of palliative therapies for cancer-associated anorexia. *Annals of Palliative Medicine*. **2019**, 8(1), 50 – 58.
117. BAUCHEMIM, Melissa, SUNG, Lillian, HERSHMAN, L. Dawn, WENG, Chunhua, DUPUIS, L. Lee, SCHNALL, Rebecca. Guideline concordant care for prevention of acute chemotherapy-induced nausea and vomiting in children, adolescent, and young adults. *Supportive Care in Cancer*. **2020**, 25, 4761 – 4769.
118. MAY, Megan, Brafford, GLODE, E. Ashley. Dronabinol for chemotherapy-induced nausea and vomiting unresponsive to antiemetics. *Cancer Management and Research*. **2016**, 8, 49 – 55.
119. BADOWSKI, E. Melissa. A review of oral cannabinoids and medical marijuana for the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: a focus on pharmacokinetic variability and pharmacodynamics. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **2017**, 80(3), 441 – 449.
120. HALL, Wayne. U.S. Policy Responses to Calls for the Medical Use of Cannabis. *Yale Journal of Biology and Medicine*. **2015**, 88(3), 257 – 264.
121. BABAYEVA, Mariana, ASSEFA, Haregewein, BASU, Paramita, CHUMKI, Sanjeda, LOEWY, Zvi. Marijuana Compounds: A Nonconventional Approach to Parkinson's Disease Therapy. *Parkinson's Disease*. **2016**, 2016, 1279042.
122. NOVOTNY, Michal, VALIS, Martin, KLIMOVA, Blanka. Tourette Syndrome: A Mini-Review. *Frontiers in Neurology*. **2018**, 9, 139.
123. STEPNIICKI, Piotr, KONDEJ, Magda, KACZOR, A. Agnieszka. Current Concepts and Treatments of Schizophrenia. *Molecules*. **2018**, 23(8), 2087.
124. SUN, Xiaoshen, XU, S. Chaoying, CHADHA, Nisha, CHEN, Allshine, LIU, Ji. Marijuana for Glaucoma: A Recipe for Disaster or Treatment? *Yale Journal of Biology and Medicine*. **2018**, 88(3), 265 – 269.

125. BHARTIYA, Schibal, ICHHPUJANI, Parul. Complementary and Alternative Management of Glaucoma: The Verdict so Far. *Journal of Current Glaucoma Practice*. **2014**, 8(2), 54 – 57.
126. TRAINOR, David, EVANS, Lois, BIRD, Rupert. Severe motor and vocal tics controlled with Sativex®. *Australasian Psychiatry*. **2016**, 24(6), 541 – 544.
127. KANAAN, Seif, Ahmad, JAKUBOVSKI, Ewgeni, MÜLLER-VAHL, Kirsten. Significant Tic Reduction in An Otherwise Treatment-Resistant Patient with Gilles de la Tourette Syndrome Following Treatment with Nabiximols. *Brain Science*. **2017**, 7(5), 47.
128. SHI, Hai, Yun, NG, Siew, Chien. The state of the art on treatment of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology*. **2018**, 53(9), 989 – 998.
129. HASENOEHRL, Carina, STORR, Martin, SCHICHO, Rudolf. Cannabinoids for treating inflammatory bowel diseases: where are we and where do we go? *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. **2017**, 11(4), 329 – 337.
130. NAFTALI, Timma, SCHLEIDER, Bar-Lev, Lihi, DOTAN, Iris, LANSKY, Philip, Ephraim, BENJAMINOV, Sklerovsky, Fabiana, KONIKOFF, Meir, Fred. Cannabis Induces a Clinical Response in Patients With Crohn's Disease: A Prospective Placebo-Controlled Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. **2013**, 11(10), 1276 – 1280.
131. WANG, Chen, HORBY, W. Peter, HAYDEN, G. Frederick, GAO, F. George. A novel coronavirus outbreak of global health concern. *The Lancet*. **2020**, 395(10223), 470 – 473.
132. ONAIVI, Emmanuel, Shan, SHARMA, Venkatanarayanan. Cannabis for COVID-19: can cannabinoids quell the cytokine storm? *Future Science*. **2020**, 6(8).
133. ESPOSITO, Giuseppe, PESCE, Marcella, SEGUELLA, Luisa, SANSEVERINO, Walter, LU, Jie, CORPETTI, Chiara, SARNELLI, Giovanni. The potential of cannabidiol in the COVID-19 pandemic. *British Journal of Pharmacology*. **2020**, 177(21), 4967 – 4970.
134. MAMBER, W. Stephen, KRAKOWKA, Steven, OSBORN, Jeffrey, SABERSKI, Lloyd, RHODES, G. Ryan, DAHLBERG, E. Albert, POND-TOR, Sunthorn,

- FITZGERALD, Kara, WRIGHT, Neal, BESEME, Sarah, McMICHAEL, John. Can Unconventional Immunomodulatory Agents Help Alleviate COVID-19 Symptoms and Severity? *mSphere*. **2020**, 5(3).
135. SEXTON, Michelle. Cannabis in the Time of Coronavirus Disease 2019: The Yin and Yang of the Endocannabinoid System in Immunocompetence. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. **2020**, 26(6), 444 – 448.