

KONOPÍ - TAXONOMIE, LEGISLATIVA A SEKUNDÁRNÍ METABOLITY /ČÁST DRUHÁ/

CANNABIS - TAXONOMY, LEGISLATION AND SECONDARY METABOLITES /SECOND PART/

MATĚJ MALÍK^a, JIŘÍ VELECHOVSKÝ^b, ANEŽKA JANATOVÁ^c, PAVEL TLUSTOŠ^{d*}

^{a,b,d} Czech University of Life Science Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Agroenviromental Chemistry and Plant Nutrition, Kamýcká 129, 165 00, Prague 6 - Suchdol

^c Czech University of Life Science Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Food Science, Kamýcká 129, 165 00, Prague 6 - Suchdol

Abstrakt: Užívání konopí pro léčebné účely se datuje daleko před éru moderní medicíny. V posledních letech výzkum využití léčebného konopí v lékařských a farmaceutických vědách zažívá obrovský rozmach. Tento přehledový článek diskutuje botanickou klasifikaci konopí a dále nastiňuje tematickou legislativu v ČR a ve světě. Ve značné části textu se též zabývá sekundárními metabolity konopí, konkrétně fytoKANABINOIDY a terpenickými sloučeninami, jejich biosyntézou a metodami izolace, identifikace a kvantifikace.

Klíčová slova: *Cannabis sativa L.*; biosyntéza fytoKANABINOIDŮ; Δ^9 -tetrahydroKANABINOL; terpenoidy; KANABIDIOL

Pokračování příspěvku – první část publikována v *Drugs & Forensics Bulletin* č.4/2021.

4. SEKUNDÁRNÍ METABOLITY KONOPÍ

V tomto odvětví již dávno uplynula doba, kdy se při experimentech využívaly neznámé kmeny konopí s nedefinovaným obsahem alespoň dvou hlavních KANABINOIDŮ, THC a CBD. Nyní jsou nastaveny přísné a sterilní pěstitelské postupy s cílem optimalizovat a standardizovat šlechtění konopných kmenů se specifickým složením majoritních i minoritních KANABINOIDŮ a dalších důležitých fytoCHEMICKÁLIÍ, zejména terpenů a flavonoidů. Ačkoliv se

většina stávající vědecké literatury o konopí zaměřuje především na dva již zmíněné hlavní KANABINOIDY, minoritní KANABINOIDY, terpeny a flavonoidy jsou obecně ignorovány. Důkazy však naznačují, že tyto složky, zejména KANABINOIDY a terpeny, hrají významnou roli při vzájemném ovlivňování a synergickém působení. Tento jev bývá souhrnně označován jako „doprovodný efekt konopí.“²⁵⁻²⁷

4.1. FYTOKANABINOIDY

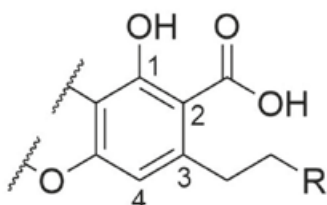
Současný výzkum KANABINOIDŮ navazuje na řadu významných objevů profesora Raphaela Mechoulama a profesora Yechiela Gaoniho. Ti v 60. le-

tech identifikovali psychoaktivní složku *Cannabis sativa*, Δ^9 -tetrahydrokanabinol, popsali její chemickou strukturu^{28,29} a syntetizovali ji.³⁰ V 90. letech byly v tkáních savců identifikovány ligandy endogenních kanabinoidních receptorů, nazývané endokanabinoidy. Nejznámějšími zástupci jsou anandamid³¹ a 2-arachidonoylglycerol³². Endokanabinoidy jsou odvozeny od arachidonové kyseliny, jako potenciální zdroj této mastné kyseliny slouží membránové lipidy.³³ Z tohoto důvodu jsou kanabinoidní látky z konopí často označovány jako fyto-kanabinoidy, aby se odlišily od výše zmíněných endokanabinoidů.¹

4.1.1. Biosyntéza

Fyto-kanabinoidy lze rozdělit do dvou skupin, a to na neutrální kanabinoidy a kanabinoidní kyseliny. Diverzifikace je založena na tom, kolik karboxylových skupin má daná molekula. Během skladování a při zvýšených teplotách může ale dojít k neenzymatické dekarboxylaci^{34,35}, což je chemická reakce, při níž dochází k odštěpení karboxylové skupiny v podobě oxidu uhličitého (CO_2).

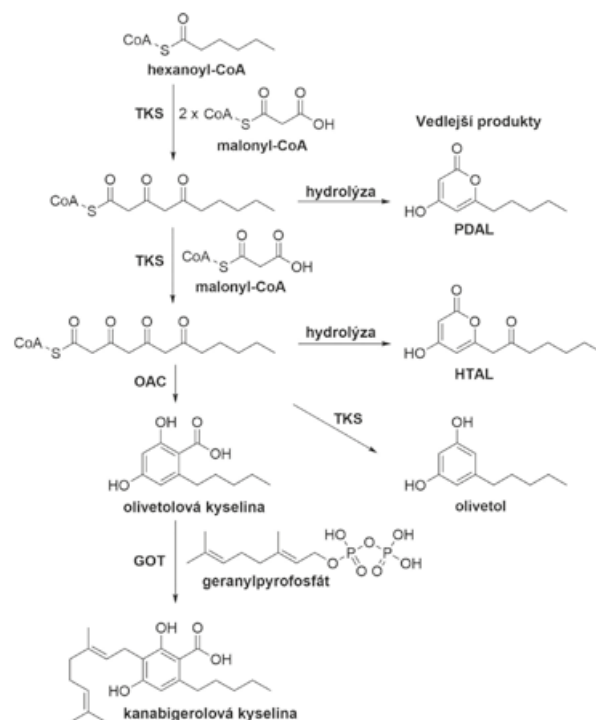
Fyto-kanabinoidy, prenylované polyketidy smíšeného biosyntetického původu, jsou syntetizovány z prekurzorů mastných kyselin a izoprenoidů. Všechny fyto-kanabinoidní struktury obsahují monoterpenovou jednotku připojenou k fenolickému kruhu se substituentem v podobě alkyly na C3 (cit.³⁶). Alkylový postranní řetězec může mít různou délku od jednoho do pěti atomů uhlíku (obrázek 3), ale n-pentyl je nejhojnější.³⁷ Fyto-kanabinoidy obsahující postranní řetězec v podobě n-propylu se označují jako kanabivariny. Tetrahydrokanabi-



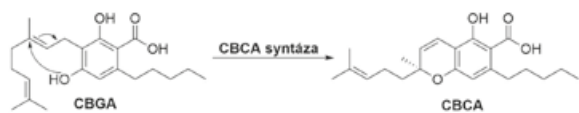
Obr. 3 - Chemická struktura fyto-kanabinoidů (zdroj: zpracováno autory).

varin (THCV), analog THC s postranním řetězcem n-propylu, se často vyskytuje u *C. indica*.¹⁶

Výchozími sloučeninami pro syntézu aromatických kruhů, včetně alkyly na třetím uhlíku³⁸, jsou tři molekuly malonyl-CoA a jedna molekula hexanoyl-CoA odvozená od kyseliny hexanové (kapronové).³⁶ Hexanoyl-CoA působí jako primer pro enzymy, polyketidové syntázy typu III, známé také jako tetraketid syntázy (TKS). V dalším kroku jsou vyžadovány enzymy, cyklázy olivetolové kyseliny (OAC), katalyzující C2-C7 intramolekulární aldolovou kondenzaci s retencí karboxylové skupiny za vzniku olivetolové kyseliny.^{39,40} V průběhu těchto biosyntetických kroků vznikají též vedlejší produkty jako 4-hydroxy-6-pentylpyran-2-on (PDAL), 4-hydroxy-6-(2-oxoheptyl)pyran-2-on (HTAL) a olivetol. Olivetolová kyselina je alkylována monoterpenovou jednotkou, geranylpyrofosfátem, za účasti geranylpyrofosfát: olivetolát geranyltransferázy (GOT), a tím vzniká kanabigerolová kyselina (CBGA) (ob-



Obr. 4 - Biosyntéza fyto-kanabinoidů 1/2. TKS - tetraketid syntáza; PDAL - 4-hydroxy-6-pentylpyran-2-on; OAC - cykláza olivetolové kyseliny; HTAL - 4-hydroxy-6-(2-oxoheptyl)pyran-2-on; GOT - geranylpyrofosfát: olivetolát geranyltransferáza (zdroj: zpracováno autory).



Obr. 5 - Syntéza Δ^9 -THCA. CBGA - kanabigerolová kyselina; Δ^9 -THCA - tetrahydrokanabinolová kyselina (zdroj: zpracováno autory).

rázek 4).⁴¹ V menší míře je syntetizován také (*Z*)-izomer kanabigerolové kyseliny, kanabinerolová kyselina (CBNRA) (na obr. 4 z důvodu přehlednosti nezmíněna), a to v případě, kdy je nerylpyrofosfát využit enzymem GOT namísto geranylpyrofosfátu.⁴² Existují tři kyseliny, které lze vytvořit z CBGA a CBNRA.

První z nich, tetrahydrokanabinolová kyselina (THCA) je syntetizována z CBGA nebo CBNRA za formování heterocyklického kruhu pomocí enzymu THCA syntázy.⁴³ Nízká substrátová specifita THCA syntázy pro CBNRA ve srovnání s CBGA však naznačuje, že THCA je převážně syntetizována z CBGA. Průběh této reakce je obdobný jako u jiných reakcí katalyzovaných monoterpenními cyklázami (obrázek 5). Většina cykláz vyžaduje pro svou aktivitu dvojmocné ionty, jako jsou Mg^{2+} nebo Mn^{2+} , ale u THCA syntázy tomu tak není.⁴⁴ Přítomnost karboxylové skupiny u substrátu je pro danou reakci zásadní, protože THCA syntáza nerozpozná jako substráty neutrální kanabinoidy, jako je kanabigerol (CBG).⁴⁵

Struktura druhé, kanabidiolové kyseliny (CBDA) je výsledkem pericyklické reakce zahrnující ztrátu protonu (obrázek 6).³⁶ Modifikace je katalyzována intramolekulární oxidoreduktázou, CBDA syntázou, která selektivně upřednostňuje tvorbu CBDA z CBGA před jeho (*Z*)-izomerem, CBNRA.⁴⁶ Byly zkoumány účinky různých kovových iontů (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} a Cu^{2+}) na aktivitu daného enzymu, ale tyto nezměnily rychlost katalýzy. Naproti tomu iont Hg^{2+} při koncentraci 2 mM zcela inhiboval aktivitu enzymu a chelatační činidlo, ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), v koncentracích do 5 mM vykazovalo **nízký pozitivní účinek na aktivitu enzymu**. Nezdá se tedy, že



Obr. 6 - Syntéza CBDA. CBGA - kanabigerolová kyselina; CBDA - kanabidiolová kyselina (zdroj: zpracováno autory).

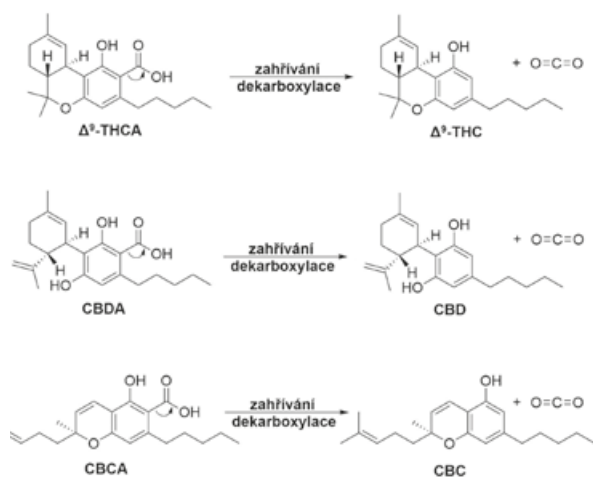
by CBDA syntéza vyžadovala kovové ionty pro oxidativní cyklizaci CBGA.⁴⁶ CBDA syntéza a THCA syntéza katalyzují tvorbu jednotlivých optických izomerů o enantiomerní **čistotě vyšší než 95 %**.⁴⁷

Třetí, kanabichromenová kyselina (CBCA) je syntetizována z CBGA pomocí oxidace a cyklizace CBCA syntázou (obrázek 7). CBCA je syntetizována jako enantiomerní směs v poměru 5:1, pravděpodobně kvůli částečnému uvolňování meziproduktů z aktivního místa CBCA syntázy **před dokončením reakce**.⁴⁸ Testy kovových iontů Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} a Cu^{2+} ukázaly, že žádný ze zmíněných nestimuluje aktivitu enzymu. Podobně jako v předcházejícím případě iont Hg^{2+} úplně inhiboval danou reakci již v koncentraci 1 mM a EDTA mírně zvyšovala aktivitu enzymu. Vše tedy naznačuje, že reakce CBCA syntázy nevyžaduje kovové ionty.⁴⁹



Obr. 7 - Syntéza CBCA. CBGA - kanabigerolová kyselina; CBCA - kanabichromenová kyselina (zdroj: zpracováno autory).

Croteau (1987)⁵⁰ zjistil, že terpenické cyklázy vyžadují pro svoji funkci bivalentní kationty. Tyto kovové ionty jsou schopné neutralizovat negativní náboj na difosfátových skupinách terpenických molekul, a dále ionizují allyldifosfátový substrát. Protože ale CBGA difosfátovou skupinu neobsahuje, lze očekávat, že CBCA syntáza, CBDA syntáza a THCA syntáza tento požadavek na bivalentní kationty nemají. Z kanabinoidů **přítomných v *C. sativa*** lze většinu klasifikovat jako Δ^9 -THC, CBD, kanabichromen (CBC), CBG, kanabinol (CBN), ka-

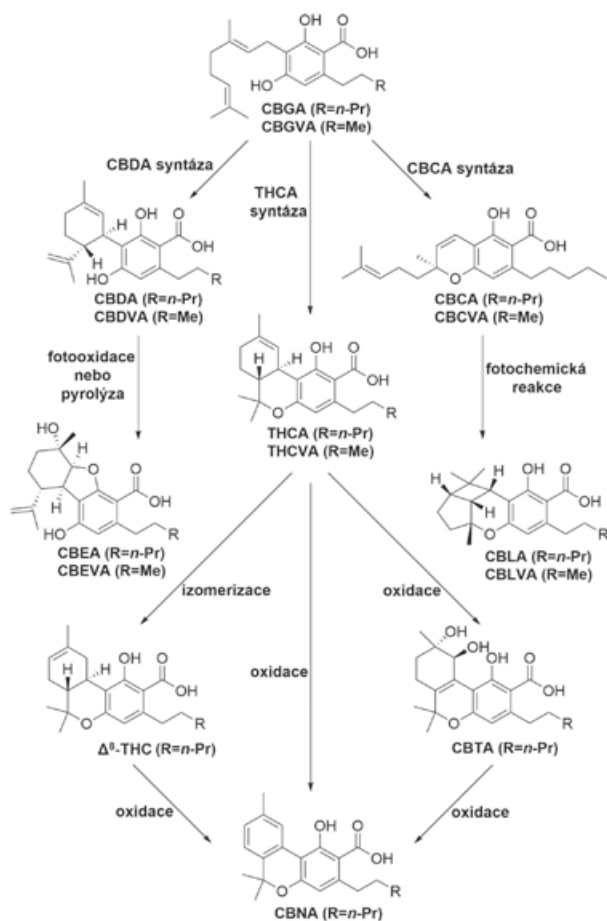


Obr. 8 - Dekarboxylace primárních fytoKANABINOIDŮ. Δ^9 -THCA - tetrahydroKANABINOLOVÁ kyselina; Δ^9 -THC - tetrahydroKANABINOL; CBDA - KANABIDIOLOVÁ kyselina; CBD - KANABIDIOL; CBCA - KANABICHROMENOVÁ kyselina; CBC - KANABICHROMEN (zdroj: zpracováno autory).

nabicyklo (CBL), kanabielsoin (CBE) a kanabitriol (CBT).⁵¹⁻⁵³ THCA, CBDA a CBCA bývají také někdy nazývány jako primární fytoKANABINOIDY, protože další fytoKANABINOIDY jsou generovány z těchto tří prekurzorů převážně neenzymatickými degračními cestami.

Primární fytoKANABINOIDY lze buď dekarboxylovat na neutrální formu (obrázek 8), nebo konvertovat na CBE, CBN, CBT, Δ^8 -tetrahydroKANABINOL (Δ^8 -THC) či CBL vystavením světlu, teple a kyslíku (obrázek 9). CBD může podstoupit fotooxidaci nebo pyrolýzu za vzniku CBE. Δ^9 -THC se při vystavení teple převede na termodynamicky stabilnější Δ^8 -THC, nebo může v přítomnosti kyslíku oxidovat na CBT nebo CBN.³⁷ **Přítomnost CBT a CBN spolu s vysokými hladinami dekarboxylovaných fytoKANABINOIDŮ** jsou chemickými indikátory dlouhého skladování za špatných podmínek.³⁵ Rychlost degradace primárních fytoKANABINOIDŮ se zvyšuje spolu s teplotou, vyššími počátečními koncentracemi primárních fytoKANABINOIDŮ a při zvětšení povrchu květů (**nadrcením**), a tím tedy i větší povrchovou expozicí vzduchu.⁵⁴ CBC v přítomnosti světla degraduje na KANABINOIDY typu CBL.³⁷

KANABIVARINY jsou generovány stejnými biosyntetickými cestami z kyseliny KANABIGEROVARINOVÉ (CBGVA), homologního prekurzoru CBGA (ob-



Obr. 9 - Biosyntéza fytoKANABINOIDŮ 2/2. CBGA - KANABIGEROLOVÁ kyselina; CBGVA - KANABIGEROVARINOVÁ kyselina; CBDA - KANABIDIOLOVÁ kyselina; CBDVA - KANABIDIVARINOVÁ kyselina; CBCA - KANABICHROMENOVÁ kyselina; CBCVA - KANABICHROMEVARINOVÁ kyselina; THCA - tetrahydroKANABINOLOVÁ kyselina; THCVA - tetrahydroKANABIVARINOVÁ kyselina; CBEA - KANABIELSOINOVÁ kyselina; CBEVA - KANABIELSOVARINOVÁ kyselina; CBLA - KANABICYKLOLOVÁ kyselina; CBLVA - KANABICYKLOLVARINOVÁ kyselina; CBT - KANABITRILOVÁ kyselina; CBN - KANABINOLOVÁ kyselina (zdroj: zpracováno autory).

rázek 9).⁵⁵ KANABINOIDNÍ profil v konopí prochází rychlými změnami v raných fázích růstu.⁵⁶ CBDA a THCA syntáza mají velmi podobné katalytické rychlosti ($k_{\text{cat}} = 0,19 \text{ s}^{-1}$ a $0,20 \text{ s}^{-1}$) a afinitu ($K_M = 134 \mu\text{M}$ a $137 \mu\text{M}$) pro CBGA.^{43,46} Ale CBCA syntáza vykazuje nižší Michaelisovu konstantu ($K_M = 23 \mu\text{M}$) a vyšší katalytickou rychlost ($k_{\text{cat}} = 0,04 \text{ s}^{-1}$). V raných fázích kultivace, kde je CBGA stále přítomna v nízkých koncentracích, převládá tedy syntéza CBCA.⁴⁹ Jak se však v průběhu času zvyšuje koncentrace CBGA, zvyšuje se účinnost biosyntézy THCA a CBDA, a tyto sloučeniny brzy převládají

nad koncentrací CBCA. V pozdějších fázích růstu se syntéza CBGA zpomaluje a její relativní podíl v **kanabinoidním** profilu rostliny se postupně snižuje.^{1,57}

4.2. Terpenické sloučeniny

Terpeny a terpenoidy jsou hlavními složkami rostlinných pryskyřic a éterických olejů mnoha léčivých bylin, včetně konopí. Z chemického hlediska se tyto dvě skupiny od sebe částečně liší. Terpeny se skládají pouze z uhlovodíků, kdežto u terpenoidů je na daném uhlovodíkovém skeletu navázána ještě funkční skupina či jiný chemický prvek. Tyto termíny se však v literatuře často zaměňují. Terpenické sloučeniny představují jednu z nejpohodlnějších a strukturně nejrozmanitějších skupin přírodních látek. Lze je rozdělit podle počtu stavebních jednotek izoprenu v molekule na monoterpeny, seskviterpeny, diterpeny, sesterterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny. Spolu se steroly tvoří rozsáhlou skupinu izoprenoidů.⁵⁸

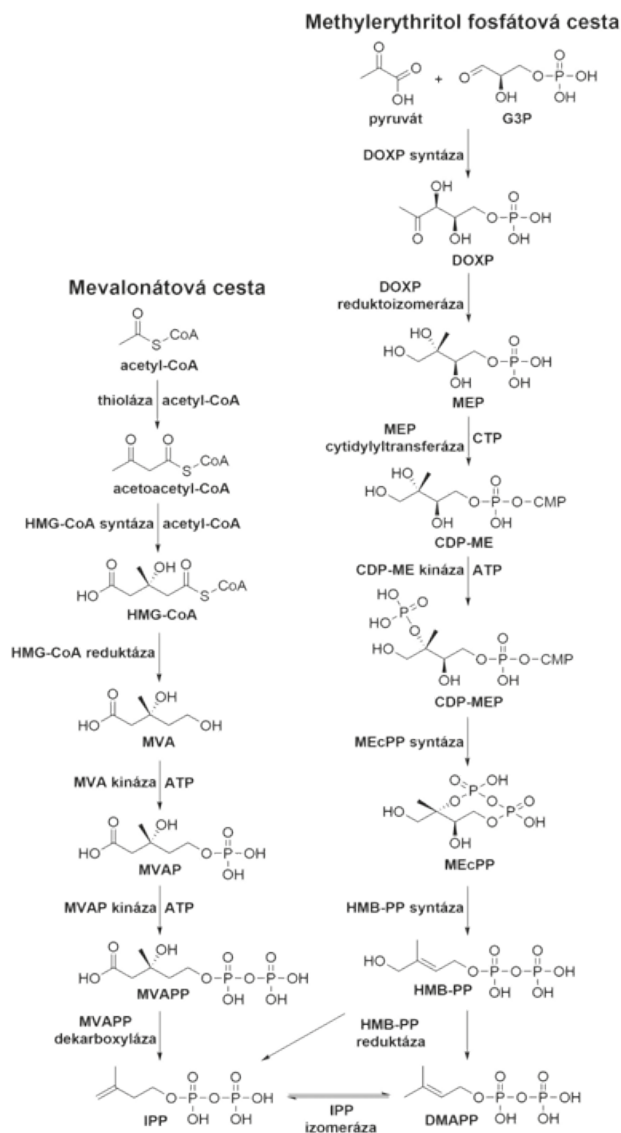
V minulosti byly terpenické sloučeniny v knihách popisovány jako produkty detoxikace, avšak začátkem sedmdesátých let bylo několik terpenů demonstrováno jako toxiny, repelenty či atraktanty. Toto vedlo k závěru, že mají zásadní funkci v antagonistických a mutualistických vztazích mezi organismy. V přírodě hrají důležitou roli při řízení růstu, obraně, komunikaci či vábení opylovačů mnohých druhů rostlin.⁵⁹ Terpenické sloučeniny jsou taktéž zodpovědné za rozdílnou vůni u různých genotypů konopí. Pravděpodobně tedy následně přispěly k záměrné selekci narkotických genotypů při domestikaci.⁸ Obsah a distribuce terpenických sloučenin v rostlině se liší dle procesu získávání, podmínek prostředí nebo zralosti rostliny.⁶⁰ Mono a seskviterpeny byly detekovány v květech, kořenech a listech konopí, přičemž hlavním místem produkce jsou sekreční žlázy chloupky (trichomy). Monoterpeny obecně dominují těkavému terpenickému profilu (3,1-28,3 mg/g sušiny květu) s hlavními konkrétními zástupci jako jsou *D*-limonen, β -myrcen, α -pinen, β -pinen, terpeno-

len a linalool. Seskviterpeny, zejména β -karyofylen a α -humulen, se ale v konopí také vyskytují ve velké míře (0,5-10,1 mg/g sušiny květu). Při pěstování konopí za standardizovaných podmínek byla zjištěna významná pozitivní korelace mezi úrovní terpenů a kanabinoidů.¹⁴ To lze vysvětlit skutečností, že monoterpeny a seskviterpeny jsou syntetizovány ve stejných žlázových trichomech jako kanabinoidy.⁶⁰

4.2.1. Biosyntéza

K syntéze rostlinných terpenů přispívají ve svých raných krocích dvě biosyntetické dráhy. První, dráha cytosolické mevalonové kyseliny (MVA), která je zapojena do biosyntézy seskviterpenů a triterpenů. Druhá, plastidově lokalizovaná methylethylerythritol fosfátová (MEP) dráha, účastní se syntézy monoterpenů, diterpenů a tetraterpenů. Tyto dráhy regulují různé substráty.⁶¹ Základními stavebními kameny všech terpenických struktur jsou izopentenylidifosfát (IPP) a dimethylallyldifosfát (DMAPP). Obratlovci a bezobratlí živočichové syntetizují tyto prekurzory izoprenoidů z acetyl koenzymu A (acetyl-CoA) cestou mevalonové kyseliny, což je též kritická dráha pro syntézu cholesterolu a prekurzorů farnesyly a geranylgeranylu pro prenylaci proteinů. Tato cesta je rovněž důležitým zdrojem IPP a DMAPP v cytoplazmě rostlinných buněk.⁶² Zde jsou v prvním kroku konjugovány 3 jednotky acetyl-CoA za vzniku 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzymu A (HMG-CoA), a ten je dále přeměněn na mevalonovou kyselinu pomocí HMG-CoA reductázy (obrázek 10). Statiny, včetně mevinolinu, mevistatinu, pravastatinu a simvastatinu, mohou blokovat tento krok limitující rychlost biosyntézy.⁶³ Přestože statiny blokují produkci fytosterolů v rostlinách, nezabraňují produkci terpenů v plastidech.⁶⁴

Počátečním krokem plastidické methylethylerythritol fosfátové cesty je konverze pyrohroznové kyseliny (pyruvátu) a *D*-glyceraldehyd-3-fosfátu (G3P) na 1-deoxy-*D*-xylóza-5-fosfát (DOXP) pomocí DOXP syntázy. DOXP je poté pomocí DOXP reduktoizomerázy přeměněn na 2-C-methyl-*D*-erythri-



Obr. 10 - Biosyntéza terpenů 1/2. CDP-MEP - 4-di-fosfocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-fosfát; ATP - adenosintrifosfát; CTP - cytidintrifosfát; HMB-PP - (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrofosfát; MEcPP - 2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyklo difosfát; MVAPP - mevalonát-5-pyrofosfát; HMG-CoA - 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A; IPP - izopentenyl difosfát; DMAPP - dimethylallyldifosfát; G3P - D-glyceraldehyd-3-fosfát; DOXP - 1-deoxy-D-xylóza-5-fosfát (zdroj: zpracováno autory).

tol-4-fosfát (MEP). Tento krok je možné inhibovat antibiotikem fosmidomycin.⁶⁵⁻⁶⁷ Koncovým bodem obou zmíněných biosyntetických drah (MVA a MEP cesta) je IPP, který se poté izomerizuje na DMAPP pomocí izomerázy IPP v cytosolu (obrázek 10). V cytosolu jsou poté dvě molekuly IPP a jedna molekula DMAPP kondenzovány za vzniku farne-

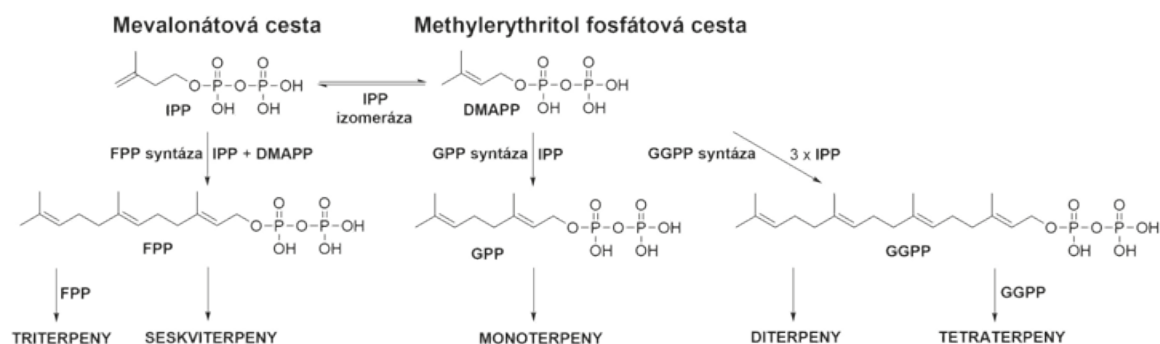
syldifosfátu (FPP), farnesyldifosfát syntázou. FPP slouží jako prekurzor seskviterpenů. Dvě molekuly FPP mohou být dále kondenzovány skvalen syntázou (SQS) na endoplazmatickém retikulu za vzniku skvalenu, prekurzoru triterpenů a sterolů. V plastidu je jedna molekula IPP a jedna molekula DMAPP kondenzována za vzniku geranylpyrofosfátu (GPP), GPP syntázou (obrázek 11).⁶⁸ GPP je bezprostředním prekurzorem monoterpenů a také stavebním kamenem biosyntézy kanabinoidů.⁶⁹ Tyto lineární izoprenoiddifosforečnany jsou substráty pro monoterpensyntázy a seskviterpensyntázy, které následně diverzifikují tyto prekurzory enzymatickými modifikacemi, jako jsou hydroxylace, dehydrogenace, acylace a glykosylace.^{70,71}

4.3. ISOLACE FYTOKANABINOIDŮ A TERPENICKÝCH SLOUČENIN

4.3.1. Extrakce fytokanabinoidů

Na základě studia literatury lze rozlišit dvě kategorie procesu extrakce konopných květů. Za prvé, konvenční metody, zahrnující maceraci rostlinného materiálu v organickém rozpouštědle. Extrakt se při nich koncentruje odstraňováním rozpouštědla. Fytokanabinoidy bývají při tomto procesu vystaveny kombinovaným účinkům tepla, světla, vzduchu a kyselého prostředí, a tím pádem mohou podléhat chemickým modifikacím a degradaci. Jedna z nevýhod těchto konvenčních technik souvisí hlavně s termolabilitou extrahovaných složek. Efektivitu tohoto typu extrakce lze kupříkladu zlepšit procesním zapojením ultrazvuku nebo mikrovlnného ošetření.⁷²⁻⁷⁴

Za druhé, inovativní metody, jako je superkritická fluidní extrakce, což je proces separace jedné složky od ostatních použitím superkritické látky jako extrakčního rozpouštědla. Extrahuje se obvykle z pevné matrice, ale může to být i z kapaliny. Nejpoužívanější superkritickou kapalinou je oxid uhličitý, a to navzdory své neúčinnosti při rozpouštění polárních sloučenin. Pro zlepšení rozpustnosti polárních látek je někdy modifikován přísadkou



Obr. 11 - Biosyntéza terpenů 2/2. IPP - izopentenylidifosfát; DMAPP - dimethylallyldifosfát; GPP - geranylpyrofosfát; GGPP - geranylgeranylpyrofosfát; FPP – farnesylidifosfát (zdroj: zpracováno autory).

malého množství jiného rozpouštědla (ethanolu či methanolu), které by mělo být zcela mísitelné se superkritickým CO_2 . Extrakční podmínky pro CO_2 jsou vyšší než kritická teplota u $31,1\text{ }^\circ\text{C}$ a nad kritický tlak $73,8\text{ barů}$ ($7,38\text{ MPa}$). Přidáním modifikátoru se mohou tyto hodnoty měnit. Tekutina v superkritickém stavu je velmi mobilní. Rozpustností se přibližuje kapalným rozpouštědlům, zatímco penetrace do pevné matrice je usnadněna transportními vlastnostmi blízcími se plynu. Vysoce stlačený plyn pak v superkritickém stavu vykazuje mimořádné vlastnosti, s rostoucí hustotou vzrůstá totiž schopnost rozpouštět dané látky. Zatímco zvyšování tlaku zvyšuje hustotu, zvyšování teploty hustotu obvykle snižuje. Tyto parametry lze tedy pro dosažení optimálních výsledků různě kombinovat.^{72,75,76}

Nejdůležitějšími parametry, které je třeba při extrakci vzít v úvahu, jsou teplota, tlak, předběžná úprava bylin a povaha rozpouštědla. Extrakci lze považovat za úspěšnou, když je dosaženo optimální rozpustnosti aktivních sloučenin ve vhodném rozpouštědle. Za tímto cílem je nutné rozbít buněčnou strukturu rostlin natolik, aby účinné látky byly dobře přístupné a mohly tak interagovat s rozpouštědlem.⁷² Následuje několik příkladů extrakčních metod.

4.3.1.1. Dynamická macerace

Před samotnou dynamickou macerací je naváženo přesné množství konopných květů a poté je ke vzorku přidáno extrakční rozpouštědlo. Následuje mag-

netické míchání po určitou dobu při laboratorní teplotě. Roztok je potom přefiltrován přes filtrační papír. Zbytek je extrahován stejným postupem ještě dvakrát, vždy se shodným extrakčním poměrem (hmotnost sušiny/objem rozpouštědla). Filtráty ze všech tří extrakcí jsou slity dohromady. Před nástřikem na kolonu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) jsou ještě extrakty zfiltrány pomocí PTFE filtru do HPLC vialek.⁷⁷⁻⁷⁹

4.3.1.2. Ultrazvukem asistovaná extrakce

Na začátek je znovu naváženo určité množství konopných květů a přilito dané množství extrakčního rozpouštědla. Vzorek se dále po určitý čas nechá v laboratorní ultrazvukové lázni při $40\text{ }^\circ\text{C}$. Roztok je poté přefiltrován přes filtrační papír do odměrné baňky. Postup se opakuje ještě dvakrát. Filtráty ze všech tří extrakcí se poté spojí. Před nástřikem do systému HPLC jsou extrakty ještě filtrovány pomocí PTFE filtru do HPLC vialek.^{77,80,81}

4.3.1.3. Extrakce mikrovlnným zářením

Odvážené množství vzorku je v prvním kroku extrahováno rozpouštědlem do skleněné nádoby při $60\text{ }^\circ\text{C}$ za nepřetržitého magnetického míchání. Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem s fokusovaným polem probíhá v uzavřeném systému nádob. Po skončení extrakce je vzorek přefiltrován do odměrné baňky. Druhý a třetí krok extrakce probíhá obdobně. Filtráty ze tří extrakčních kroků jsou následně spojeny. Před samotnou analytickou

koncovkou ve formě HPLC jsou extrakty ještě zfiltróvány pomocí PTFE filtru do HPLC vialek.^{77,82}

4.3.1.4. Extrakce fytoKANABINOIDŮ SUPERKRITICKÝM CO₂

Extrakce se provádí superkritickým CO₂ s 20% přídavkem ethanolu jako spolurozpouštědla. Extrakční nádoba je naplněna konopnými květy rozemletými na prach a smíchanými se stejným množstvím pevné matrice. Po stlačení vzorku je na horní část umístěna zátka z vlny a prázdný prostor je vyplněn matricí. Průtok CO₂ se zpravidla udržuje na průměrné úrovni 2,5 l/min a celý proces se provádí při 100 barech a 35 °C po dobu 5 minut statické extrakce. Při statické extrakci je extrakční cela naplněna nadkritickou tekutinou a systém je ponechán v klidu. Nastane přestup analytu z matrice do extrakčního média a po určité době dojde k ustavení rovnováhy. Následuje 15 minut dynamické extrakce. Při dynamické extrakci je nadkritická tekutina čerpána přes extrakční celu se vzorkem, tudíž vzorek je neustále v kontaktu s čerstvou nadkritickou tekutinou. Ke sběru extraktu je použit ethanol. Extrakt se poté vysuší a rozpustí v ethanolu. Před nástřikem do systému HPLC je extrakt zředěn a zfiltróván pomocí PTFE filtru do HPLC vialek.^{77,83}

4.3.2. Izolace terpenických sloučenin

V průběhu času bylo vyvinuto několik technik izolace terpenů a terpenoidů. Silice (esenciální či éterické oleje) bývají tradičně z trichomů konopí izolovány pomocí hydrodestilace. Obdobně se ale již také využívá konvenční extrakce rozpouštědlem či metod inovativních.⁸⁴ Je potvrzeno, že úprava biomasy má významný vliv na výtěžek a složení esenciálních olejů. Sušení a skladování rostlin vede k vyšší ztrátě nejvíce těkavých složek, monoterpenů. K dalšímu snížení výtěžku silic dochází při zvýšení teploty sušení.⁸⁵⁻⁸⁷

4.3.2.1. Destilace vodní parou a hydrodestilace

Parní destilace a hydrodestilace patří mezi nejpou-

žívanější metody izolace silic z rostlinných zdrojů. Tyto metody jsou užívány k oddělení látek, které těkají s vodní párou při nižší teplotě, než je jejich bod varu. Vodní pára proniká biomasou a rozpouští těkavé sloučeniny. Rozpouštědlo a rozpuštěné látky poté kondenzují, což způsobuje jejich oddělení, přičemž horní fázi kapaliny jsou éterické oleje. Rozdíl v těchto dvou metodách spočívá v tom, že při destilaci vodní parou je pára přímo přiváděna do rostlinného materiálu, zatímco při hydrodestilaci je rostlinný materiál zpočátku nasáknut vodou a následně zahříván na teplotu varu.⁸⁸ Ukazuje se, že typ destilace ovlivňuje selektivitu vůči určité skupině terpenů. Fiorini et al. (2019)⁸⁹ porovnávali chemické složení silice získané pomocí destilace vodní parou a hydrodestilace a všimli si, že při parní destilaci se získá větší obsah monoterpenů (54 %) ve srovnání se seskviterpeny (44,2 %). Naopak hydrodestilace vedla k většímu zastoupení seskviterpenů (48,5 %) oproti monoterpenům (43,9 %). Karyofylen však zůstal nejvíce zastoupeným seskviterpenem v silicích bez ohledu na destilační typ. Hydrodestilace byla díky vyššímu procentu extrahovaných bioaktivních sloučenin vyhodnocena jako účinnější. Je to pravděpodobně proto, že u parní destilace je vyvinut nižší tlak a pára neproniká rovnoměrně rostlinným materiálem. Proto je též zapotřebí více času na extrakci složek s vyšším bodem varu. Byly rovněž testovány různé teploty u obou typů destilací květů konopí. Optimální teploty jsou 110 °C pro hydrodestilaci a 130 °C pro destilaci vodní parou. Rozemletí rostlinného materiálu vedlo k dalšímu zvýšení obsahu monoterpenů, ale snižovalo seskviterpenovou frakci.^{90,91}

4.3.2.2. Konvenční extrakce rozpouštědlem

Konopí se extrahuje dobře jak polárním⁹², tak nepolárním rozpouštědlem.⁹³ Nicméně Namdar et al. (2018)⁹⁴ zjistili, že směs polárních a nepolárních rozpouštědel, konkrétně hexan/ethanol (7:3), vede k neúčinnější extrakci terpenů a současně kanabinoidů z květenství ve srovnání s čistým hexanem a ethanolem. Případné využití polárních rozpouště-

del vede ke zvýšení výtěžku kanabinoidů.

Z kořenů a stonkové kůry konopí byly extrahovány triterpeny. Friedelin a epifriedelin byly izolovány z kořenů konopí po ethanolové extrakci⁹⁵, ale malé množství různých triterpenů bylo též identifikováno při extrakci stonkové kůry acetonem na Soxhletově ekstraktoru.⁹⁶

4.3.2.3. Superkritická fluidní extrakce

Superkritický CO₂ je dobrým rozpouštědlem pro extrakci těkavých sloučenin, jako jsou terpeny, z *C. sativa*⁹⁷. Extrakce superkritickým CO₂ byla porovnána s hydrodestilací a prokázalo se, že superkritická fluidní extrakce dosahuje lepších extrakčních výtěžků silic než hydrodestilace. Dalšími výhodami jsou možná frakcionace, přímé získávání silic a nižší spotřeba energie ve srovnání s hydrodestilací.⁹⁰ Da Porto et al. (2014)⁹⁸ studovali vliv extrakčního tlaku na výtěžek a složení konopného esenciálního oleje. Při 40 °C vedlo zvýšení extrakčního tlaku ze 100 barů na 140 barů ke snížení výtěžku z 0,67 % hmotnosti sušiny na 0,34 %. Dále bylo též zjištěno, že terpenové spektrum v extraktech získaných při tlaku 100 barů je blíže původní terpenické skladbě v konopných květech.

4.3.2.4. Ultrazvuková extrakce

Bylo prokázáno, že ultrazvuková amplituda a složení rozpouštědla (poměr cyklohexanu a izopropanolu) má významný vliv na obsah terpenů, zatímco zvyšování doby působení nemá ve studovaném rozsahu signifikantní vliv. Dále byly navrženy optimální provozní podmínky extrakce květů konopí pro tuto metodu, rozpouštědlo izopropanol/cyklohexan (1:1), čas působení 5 min s 80% amplitudou a v cyklech 3 s⁻¹. Ultrazvukem asistovaná extrakce je časově mnohem méně náročná (minuty) ve srovnání s hodinami práce v případě destilace.^{83,99}

4.3.2.5. Mikrovlnná extrakce

Při extrakci mikrovlnným zářením je pozorován obdobný výtěžek silic jako při hydrodestilaci, ale za

kratší čas. Tyto dvě metody se však liší svým terpenickým profilem, podíl seskviterpenů je v případě mikrovlnné extrakce upřednostňován před monoterpeny. Vysoká energie dodávaná mikrovlnami pravděpodobně způsobuje ztrátu těkavějších sloučenin.^{100,101}

4.4. IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE FYTOKANABINOIDŮ A TERPENICKÝCH SLOUČENIN

4.4.1. IDENTIFIKACE A KVANTIFIKACE FYTOKANABINOIDŮ

Kanabinoidní sloučeniny se běžně stanovují různými chromatografickými technikami s odlišnými detekčními metodami.

4.4.1.1. Tenkovrstvá chromatografie

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) je vhodná metoda pro rychlý screening různých druhů vzorků. Lze ji snadno provést při rutinních testech a na trhu je již k dispozici několik komerčních sad přímo pro testování kanabinoidů⁷⁶. Fishedick et al. (2009)¹⁰⁷ vyvinuli jednoduchou a rychlou metodu vysokoúčinné TLC (HPTLC) pro kvantifikaci Δ9-THC a kvalitativní screening hlavních neutrálních kanabinoidů nalezených v kultivarech konopí. HPTLC destičky se silikagelem 60 potažené hliníkovou fólií byly předem promyty v methanolu. Po aplikaci vzorků byly vyvíjeny ve skleněné komoře chloroformem a následně skenovány při 206 nm za použití UV skeneru.

4.4.1.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je jednou z nejpoužívanějších technik pro analýzu biologických matric a rostlinných extraktů. Tato metoda pracuje na principu, kdy se daný vzorek dávkuje do proudu nosného plynu (mobilní fáze) a je dále unášen kolonou. Aby mohl být vzorek transportován, musí se ihned taktéž přeměnit na plyn. V koloně se pak látky separují na základě odlišné schopnosti interagovat se stacionární fází.¹⁰³ Použití vysokých teplot ale

vede ke ztrátě karboxylové skupiny z kyselých forem kanabinoidů. Při této metodě tudíž není možné rozlišovat kyselinu od neutrálních forem, pokud není provedena předchozí derivatizace, neboli chemická modifikace analytu vedoucí k nové látce mající vhodnější vlastnosti pro následnou separaci a detekci. Je však třeba vzít též v úvahu, že výtěžky derivatizace nemusí být kvantitativní.¹⁰⁴

4.4.1.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V rostlinných extraktech konopí, které nebyly podrobeny tepelnému ošetření, bývá většinový podíl kanabinoidů ve formě kyselin. Výhodou technik založených na kapalinové chromatografii (LC) je schopnost analyzovat při laboratorní teplotě a tím pádem zabránit případné tepelné degradaci a dekarboxylaci kanabinoidních sloučenin ve vzorku.¹⁰⁴ V dnešní době je pro tyto analýzy běžně využívaná kapalinová chromatografie s obrácenými (reverzními) fázemi, tedy s nepolární (C18) stacionární fází a polární mobilní fází.⁷²

De Backer et al. (2009)¹⁰⁵ aplikovali HPLC s detektorem s diodovým polem (DAD) za účelem identifikace a kvantifikace neutrálních a kyselých forem kanabinoidů z *C. sativa*. Byla použita nepolární kolona C18 v kombinaci s gradientovou elucí methanol/voda od poměru 68:32 do 95:5 s přídatkem 50 mM mravenčanu amonného a při pH 5,19. Určili mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) pro THCA, Δ^9 -THC, CBDA, CBD, CBGA, CBG a CBN. Metoda byla plně validována dle Mezinárodní organizace pro normalizaci, ISO 17025 (cit.¹⁰⁶).

Aizpurua-Olaizola et al. (2014)¹⁰⁷ použili HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) pro analýzu konopných extraktů. Kvantifikovali 6 kanabinoidů (THCA, Δ^9 -THC, CBD, THCV, CBG a CBN) a dalších 7 identifikovali pomocí kvadrupólového detektoru doby letu (Q-TOF) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) při pozitivní ionizaci.

Relativně nedávno byly též testovány kolony

naplněné částicemi silikagelu o průměru pod 2 μm . Tato metoda byla nazvána jako ultra vysoce účinná (UHPLC) či ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC). Heo et al. (2016)¹⁰⁸ ji při simultánní analýze kanabinoidů v doplňcích stravy kombinovali s detektorem ultrafialového (UV) záření a detektory MS/MS. Metoda se ukázala jako citlivá a reprodukovatelná. Umožnila identifikaci a kvantifikaci rostlinných a syntetických kanabinoidů přítomných v tabletách, kapslích, prášcích a cukrovinkách s validací dle mezinárodních pokynů.

4.4.2. Identifikace a kvantifikace terpenických sloučenin

Kanabinoidní sloučeniny a jejich metabolity lze analyzovat jak pomocí kapalinové, tak i plynové chromatografie. Terpeny se ale kvůli vysoké volatilitě analyzují hlavně prostřednictvím plynové chromatografie (GC).¹⁰⁹

4.4.2.1. Plynová chromatografie

Terpeny jsou snadno ionizovány, ale nejběžnější analytické metody neberou v úvahu izomerní povahu a různé aromatické vlastnosti těchto sloučenin, což vede k méně než komplexní charakterizaci.¹⁰⁹ K překonání tohoto nedostatku by mohly být použity chirální GC kolony (se stacionární fází na bázi cyklodextrinu). Dalším problémem v analýze terpenů jsou strukturální podobnosti těchto složek, které vedou k podobným až identickým fragmentům.⁷⁰

Primární volbou kombinace této separační techniky s detektorem, založenou na nízkých pořizovacích nákladech a jednoduchosti, je plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID). Využívá se k semikvantitativní analýze, čímž se zjistí relativní zastoupení daných složek v aromaprofilu.¹⁰⁹ Hazekamp a Fishedick (2012)¹¹⁰ použili ke kvantifikaci 20 terpenických složek vzorku pouze jeden terpenový standard, γ -terpinen, kvůli velmi malým rozdílům mezi FID faktory odezvy monoterpenů a seskviterpenů.

Kvalitativní povaha terpenů je obvykle zkou-

mána pomocí jednoduchých kvadrupolových MS detektorů porovnáním vypočtených retenčních indexů složek a hmotnostních spekter daných látek s databázemi. Snadná ionizace umožňuje detekovat sloučeniny s vysokou spolehlivostí. Strukturální podobnosti monoterpenů a seskviterpenů však vedou k podobným a nerozeznatelným MS spektrům, což způsobuje problémy při jejich identifikaci. K překonání těchto nevýhod se pro jednoznačné přiřazení velmi doporučuje kombinovat FID a MS spektra.¹¹¹

5. ZÁVĚR

Celosvětově významně stoupá počet civilizačních a autoimunitních chorob. Ve státech, kde se konopí pro léčebné účely dekriminlizovalo, je na tyto diagnózy předepisováno nejčastěji. Lze tedy označit za velmi důležité v budoucnu detailněji popsat co nejvíce genotypů konopí. Je třeba dalších studií o jejich pěstování, výživě, potenciálních výnosech, chemickém profilu a v neposlední řadě je nutné, alespoň prozatím *in vitro*, popsat jejich biologickou aktivitu. Jen tak bude možné je doporučit konkrétnímu pacientovi na určité stadium daného onemocnění. Je však dobré mít vždy na paměti, že konopí není *panaceum*. Obecně mezi odborníky platí čtyři „NE“. Konopí NEmusí pomoci každému, NE vždy, NE na každou diagnózu a NE na každé stádium.

Používání konopí s vyšším obsahem Δ^9 -tetrahydrokanabinolu než je 0,3 %, bylo ve většině států světa dlouhodobě kriminalizováno. V posledních letech se ale tato situace začala rapidně měnit a v mnoha státech bylo legalizováno konopí pro léčebné použití. V některých dokonce i konopí pro užívání rekreační. Česká zemědělská univerzita v Praze byla první institucí v České republice, které bylo Ministerstvem zdravotnictví České republiky povoleno v rámci výzkumu pěstování konopí s vyšším obsahem Δ^9 -tetrahydrokanabinolu, než je 0,3 %, nazývané taktéž tzv. léčebné konopí.

V budoucnosti lze s rozumnou mírou očekávat další rozvolňování restrikcí tykajících se pěstování

a nakládání s léčebným konopím, ať už pro výzkumné, léčebné, tak i rekreační účely. Budoucí technický výzkum v této oblasti by se měl zaměřit na možné nové metody izolace, identifikace a kvantifikace sekundárních metabolitů konopí pro usnadnění a urychlení laboratorních analýz.

Konflikt zájmů/Conflict of Interest: *Autoři prohlašují, že v souvislosti s tímto článkem jsou bez konfliktu zájmů.*

Corresponding Author: *prof. Ing. Pavel Tlustoš, CSc., dr. h. c. Katedra agroenvironmentální chemie a výživy rostlin, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00, Praha 6 – Suchbátka, e-mail: tlostos@af.czu.cz*
Spoluautoři: e-mail: malikmatej@af.czu.cz, e-mail: velechovsky@af.czu.cz, e-mail: janatovaa@af.czu.cz, e-mail: tlostos@af.czu.cz

Abstract: *The use of cannabis for medicinal purposes dates before the era of modern medicine. However, in recent years the research of medical cannabis in the medical and pharmaceutical sciences is developing rapidly. This review article discusses the botanical classification of cannabis and further outlines the thematic legislation in the Czech Republic and in the world. Much of the text also deals with cannabis secondary metabolites, specifically phytocannabinoids and terpene compounds, their biosynthesis and isolation, identification and quantification methods.*

Keywords: *Cannabis sativa L.; phytocannabinoids biosynthesis; Δ^9 -tetrahydrocannabinol; terpenoids; cannabidiol*

LITERATURA

- 1) Malík, M.; Velechovský, J.; Tlustoš, P. The Overview of Existing Knowledge on Medical Cannabis Plants Growing. *Plant, Soil Environ.* **2021**, *67* (8), 425–442.
- 8) Small, E. Evolution and Classification of Cannabis Sativa (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *Bot. Rev.* **2015**, *81* (3), 189–294.
- 14) Fishedick, J. T.; Hazekamp, A.; Erkelens, T.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Metabolic Fingerprinting of Cannabis Sativa L., Cannabinoids and Terpenoids for Chemotaxonomic and Drug Standardization Purposes. *Phytochemistry* **2010**, *71* (17–18), 2058–2073.
- 16) Hillig, K. W.; Mahlberg, P. G. A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in Cannabis (Cannabaceae). *Am. J. Bot.* **2004**, *91*, 966–975.
- 25) Russo, E. B. Taming THC: Potential Cannabis Synergy and Phytocannabinoid-Terpenoid Entourage Effects. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163* (7), 1344–1364.
- 26) Russo, E. B. The Case for the Entourage Effect and Conventional Breeding of Clinical Cannabis: No “Strain,” No Gain. *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1969.
- 27) Koltai, H.; Namdar, D. Cannabis Phytomolecule “Entourage”: From Domestication to Medical Use. *Trends Plant Sci.* **2020**, *25* (10), 976–984.
- 28) Gaoni, Y.; Mechoulam, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (8), 1646–1647.
- 29) Mechoulam, R.; Gaoni, Y. The Absolute Configuration of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol, the Major Active Constituent of Hashish. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8* (12), 1109–1111.
- 30) Mechoulam, R.; Braun, P.; Gaoni, Y. Stereospecific Synthesis of (-)- Δ^1 - and (-)- Δ^1 -Tetrahydrocannabinols. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89* (17), 4552–4554.
- 31) Devane, W. A.; Hanuš, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. Isolation and Structure of a Brain Constituent That Binds to the Cannabinoid Receptor. *Science.* **1992**, *258* (5090), 1946–1949.
- 32) Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N. E.; Schatz, A. R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B. R.; Compton, D. R.; Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, Z. Identification of an Endogenous 2-Monoglyceride, Present in Canine Gut, That Binds to Cannabinoid Receptors. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50* (1), 83–90.
- 33) Giuffrida, A.; Beltramo, M.; Piomelli, D. Mechanisms of Endocannabinoid Inactivation: Biochemistry and Pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *298* (1), 7–14.
- 34) Kimura, M.; Okamoto, K. Distribution of Tetrahydrocannabinolic Acid in Fresh Wild Cannabis. *Experientia* **1970**, *26* (8), 819–820.
- 35) Shoyama, Y.; Yamauchi, T.; Nishioka, I. Cannabis. V. Cannabigerolic Acid Methyl Ether and Cannabinolic Acid. *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18* (7), 1327–1332.
- 36) Dewick, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2002.
- 37) Elsohly, M. A.; Slade, D. Chemical Constituents of Marijuana: The Complex Mixture of Natural Cannabinoids. *Life Sci.* **2005**, *78* (5), 539–548.
- 38) Hanuš, L. O.; Meyer, S. M.; Muñoz, E.; Tagliavola-Scafati, O.; Appendino, G. Phytocannabinoids: A Unified Critical Inventory. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33* (12), 1357–1392.
- 39) Gagne, S. J.; Stout, J. M.; Liu, E.; Boubakir, Z.; Clark, S. M.; Page, J. E. Identification of Olivetolic Acid Cyclase from Cannabis Sativa Reveals a Unique Catalytic Route to Plant Polyketides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (31), 12811–12816.
- 40) Taura, F.; Tanaka, S.; Taguchi, C.; Fukamizu, T.; Tanaka, H.; Shoyama, Y.; Morimoto, S. Characterization of Olivetol Synthase, a Polyketide Synthase Putatively Involved in Cannabinoid Biosynthetic Pathway. *FEBS Lett.* **2009**, *583* (12), 2061–2066.
- 41) Fellermeier, M.; Zenk, M. H. Prenylation of Olivetolate by a Hemp Transferase Yields Cannabigerolic Acid, the Precursor of Tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* **1998**, *427* (2), 283–285.
- 42) Taura, F. Cannabinerolic Acid, a Cannabinoid from Cannabis Sativa. *Phytochemistry* **1995**, *39* (2), 457–458.
- 43) Taura, F.; Morimoto, S.; Shoyama, Y.; Mechoulam, R. First Direct Evidence for the Mechanism of Δ^1 -Tetrahydrocannabinolic Acid Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (38), 9766–9767.
- 44) Taura, F. Studies on tetrahydrocannabinolic acid synthase that produces the acidic precursor of tetrahydrocannabinol, the pharmacologically active

- ve cannabinoid in marijuana. *Drug Discov. Ther.* **2009**, 3 (3), 83–87.
- 45) Taura, F.; Sirikantaramas, S.; Shoyama, Y.; Shoyama, Y.; Morimoto, S. Phytocannabinoids In Cannabis Sativa: Recent Studies on Biosynthetic Enzymes. *Chem. Biodivers.* **2007**, 4 (8), 1649–1663.
- 46) Taura, F.; Morimoto, S.; Shoyama, Y. Purification and Characterization of Cannabidiolic-Acid Synthase from Cannabis Sativa L. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271 (29), 17411–17416.
- 47) Taura, F.; Sirikantaramas, S.; Shoyama, Y.; Yoshikai, K.; Shoyama, Y.; Morimoto, S. Cannabidiolic-Acid Synthase, the Chemotype-Determining Enzyme in the Fiber-Type Cannabis Sativa. *FEBS Lett.* **2007**, 581 (16), 2929–2934.
- 48) Morimoto, S.; Komatsu, K.; Taura, F.; Shoyama, Y. Enzymological Evidence for Cannabichromenic Acid Biosynthesis. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60 (8), 854–857.
- 49) Morimoto, S.; Komatsu, K.; Taura, F.; Shoyama, Y. Purification and Characterization of Cannabichromenic Acid Synthase from Cannabis Sativa. *Phytochemistry* **1998**, 49 (6), 1525–1529.
- 50) Croteau, R. Biosynthesis and Catabolism of Monoterpenoids. *Chem. Rev.* **1987**, 87 (5), 929–954.
- 51) Razdan, R. K. Structure-Activity Relationships in Cannabinoids. *Pharmacol. Rev.* **1986**, 38 (2), 75–149.
- 52) Ross, S.; Elsohly, M. Constituents of Cannabis Sativa L. XXVIII. A Review of the Natural Constituents: 1980-1994. *Zagazig J. Pharm. Sci.* **1995**, 4 (1), 1–10.
- 53) Turner, C. E.; Elsohly, M. A.; Boeren, E. G. Constituents of Cannabis Sativa L. XVII. A Review of the Natural Constituents. *J. Nat. Prod.* **1980**, 43 (2), 169–234.
- 54) Milay, L.; Berman, P.; Shapira, A.; Guberman, O.; Meiri, D. Metabolic Profiling of Cannabis Secondary Metabolites for Evaluation of Optimal Postharvest Storage Conditions. *Front. Plant Sci.* **2020**, 11, 583605.
- 55) Shoyama, Y.; Hirano, H.; Nishioka, I. Biosynthesis of Propyl Cannabinoid Acid and Its Biosynthetic Relationship with Pentyl and Methyl Cannabinoid Acids. *Phytochemistry* **1984**, 23 (9), 1909–1912.
- 56) Potter, D. J. A Review of the Cultivation and Processing of Cannabis (Cannabis Sativa L.) for Production of Prescription Medicines in the UK. *Drug Test. Anal.* **2014**, 6 (1–2), 31–38.
- 58) Ludiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*, 1st ed.; Badal, S., Delgoda, R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2017.
- 59) Langenheim, J. H. Higher Plant Terpenoids: A Phytocentric Overview of Their Ecological Roles. *J. Chem. Ecol.* **1994**, 20 (6), 1223–1280.
- 60) Meier, C.; Mediavilla, V. Factors influencing the yield and the quality of hemp (Cannabis sativa L.) essential oil. *J. Int. Hemp Assoc.* **1998**, 5 (1), 16–20.
- 61) Bouvier, F.; Rahier, A.; Camara, B. Biogenesis, Molecular Regulation and Function of Plant Isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* **2005**, 44 (6), 357–429.
- 62) McGarvey, D. J.; Croteau, R. Terpenoid Metabolism. *Plant Cell* **1995**, 7 (7), 1015–1026.
- 63) Luthra, R.; Luthra, P. M.; Kumar, S. Redefined Role of Mevalonate–Isoprenoid Pathway in Terpenoid Biosynthesis in Higher Plants. *Curr. Sci.* **1999**, 76 (2), 133–135.
- 64) Chang, W.; Song, H.; Liu, H.; Liu, P. Current Development in Isoprenoid Precursor Biosynthesis and Regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17 (4), 571–579.
- 65) Wanke, M.; Skorupinska-Tudek, K.; Swiezewska, E. Isoprenoid Biosynthesis via 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Phosphate/2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate (DOXP/MEP) Pathway. *Acta Biochim. Pol.* **2001**, 48 (3), 663–672.
- 66) Dubey, V. S.; Bhalla, R.; Luthra, R. An Overview of the Non-Mevalonate Pathway for Terpenoid Biosynthesis in Plants. *J. Biosci.* **2003**, 28 (5), 637–646.
- 67) Rohmer, M. The Discovery of a Mevalonate-Independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria, Algae and Higher Plants†. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16 (5), 565–574.
- 68) Kempinski, C.; Jiang, Z.; Bell, S.; Chappell, J. *Biotechnology of Isoprenoids*, 1st ed.; Schrader, J., Bohlmann, J., Eds.; Springer: Cham, 2015.
- 69) Fellermeier, M.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H. Biosynthesis of Cannabinoids Incorporation Experiments with ¹³C-Labeled Glucoses. *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268 (6), 1596–1604.
- 70) Booth, J. K.; Page, J. E.; Bohlmann, J. Terpene Synthases from Cannabis Sativa. *PLoS One* **2017**, 12 (3), e0173911.
- 71) Nagegowda, D. A.; Gupta, P. Advances in Biosynthesis, Regulation, and Metabolic Engineering of Plant Specialized Terpenoids. *Plant Sci.* **2020**, 294, 110457.

- 72) Ramirez, C. L.; Fanovich, M. A.; Churio, M. S. *Studies in natural products chemistry*, vol 61; 1st ed.; Atta-ur-Rahman, Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2019.
- 73) Fairbairn, J. W.; Liebmann, J. A. The Extraction and Estimation of the Cannabinoids in Cannabis Sativa L. and Its Products. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, 25 (2), 150–155.
- 74) Nahar, L.; Uddin, S. J.; Alam, M. A.; Sarker, S. D. Extraction of Naturally Occurring Cannabinoids: An Update. *Phytochem. Anal.* **2021**, 32 (3), 228–241.
- 75) Lancaster, M. *Green chemistry: an introductory text*, 3rd ed.; Royal society of chemistry: Cambridge, 2020.
- 76) Sihvonen, M.; Järvenpää, E.; Hietaniemi, V.; Huopalahti, R. Advances in Supercritical Carbon Dioxide Technologies. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, 10 (6–7), 217–222.
- 77) Brighenti, V.; Pellati, F.; Steinbach, M.; Maran, D.; Benvenuti, S. Development of a New Extraction Technique and HPLC Method for the Analysis of Non-Psychoactive Cannabinoids in Fibre-Type Cannabis Sativa L. (Hemp). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 143, 228–236.
- 78) Pellati, F.; Brighenti, V.; Sperlea, J.; Marchetti, L.; Bertelli, D.; Benvenuti, S. New Methods for the Comprehensive Analysis of Bioactive Compounds in Cannabis Sativa L. (Hemp). *Molecules* **2018**, 23 (10), 2639.
- 79) Žampachová, L.; Aturki, Z.; Mariani, F.; Bednář, P. A Rapid Nano-Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Cannabinoids in Cannabis Sativa L. Extracts. *Molecules* **2021**, 26 (7), 1825.
- 80) Da Porto, C.; Decorti, D.; Natolino, A. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from industrial Cannabis sativa L. inflorescences. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.* **2014**, 7 (1), 8–14.
- 81) Agarwal, C.; Máthé, K.; Hofmann, T.; Csóka, L. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. Optimized by Response Surface Methodology. *J. Food Sci.* **2018**, 83 (3), 700–710.
- 82) De Vita, D.; Madia, V. N.; Tudino, V.; Saccoliti, F.; De Leo, A.; Messore, A.; Roscilli, P.; Botto, A.; Pindinello, I.; Santilli, G.; Scipione, L.; Costi, R.; Di Santo, R. Comparison of Different Methods for the Extraction of Cannabinoids from Cannabis. *Nat. Prod. Res.* **2020**, 34 (20), 2952–2958.
- 83) Omar, J.; Olivares, M.; Alzaga, M.; Etxebarria, N. Optimisation and Characterisation of Marihuana Extracts Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Focused Ultrasound Extraction and Retention Time Locking GC-MS. *J. Sep. Sci.* **2013**, 36 (8), 1397–1404.
- 84) Isidore, E.; Karim, H.; Ioannou, I. Extraction of Phenolic Compounds and Terpenes from Cannabis Sativa L. By-Products: From Conventional to Intensified Processes. *Antioxidants* **2021**, 10 (6), 942.
- 85) Wanas, A. S.; Radwan, M. M.; Chandra, S.; Lata, H.; Mehmedic, Z.; Ali, A.; Baser, K.; Demirci, B.; ElSohly, M. A. Chemical Composition of Volatile Oils of Fresh and Air-Dried Buds of Cannabis c Hemovars, Their Insecticidal and Repellent Activities. *Nat. Prod. Commun.* **2020**, 15 (5), 1934578X2092672.
- 86) Kwaśnica, A.; Pachura, N.; Masztalerz, K.; Figiel, A.; Zimmer, A.; Kupczyński, R.; Wujcikowska, K.; Carbonell-Barrachina, A. A.; Szumny, A.; Róžański, H. Volatile Composition and Sensory Properties as Quality Attributes of Fresh and Dried Hemp Flowers (Cannabis Sativa L.). *Foods* **2020**, 9 (8), 1118.
- 87) McGraw, G. W.; Hemingway, R. W.; Ingram, L. L.; Canady, C. S.; McGraw, W. B. Thermal degradation of terpenes: camphene, Δ -carene, limonene, and α -terpinene. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 4029–4033.
- 88) Chemat, F.; Boutekedjiret, C. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, 1st ed.; Reedijk, J., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2015.
- 89) Fiorini, D.; Molle, A.; Nabissi, M.; Santini, G.; Benelli, G.; Maggi, F. Valorizing Industrial Hemp (Cannabis Sativa L.) by-Products: Cannabidiol Enrichment in the Inflorescence Essential Oil Optimizing Sample Pre-Treatment Prior to Distillation. *Ind. Crops Prod.* **2019**, 128, 581–589.
- 90) Naz, S.; Hanif, M. A.; Bhatti, H. N.; Ansari, T. M. Impact of Supercritical Fluid Extraction and Traditional Distillation on the Isolation of Aromatic Compounds from Cannabis Indica and Cannabis Sativa. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2017**, 20 (1), 175–184.
- 91) Zheljzkov, V. D.; Sikora, V.; Semerdjieva, I. B.; Kačániová, M.; Astatkie, T.; Dincheva, I. Grinding and Fractionation during Distillation Alter Hemp Essential Oil Profile and Its Antimicrobial Activity. *Molecules* **2020**, 25 (17), 3943.
- 92) Bakro, F.; Jedryczka, M.; Wielgusz, K.; Sgorbi-

- ni, B.; Inchingolo, R.; Cardenia, V. Simultaneous Determination of Terpenes and Cannabidiol in Hemp (*Cannabis Sativa* L.) by Fast Gas Chromatography with Flame Ionization Detection. *J. Sep. Sci.* **2020**, *43* (14), 2817–2826.
- 93) Krill, C.; Rochfort, S.; Spangenberg, G. A High-Throughput Method for the Comprehensive Analysis of Terpenes and Terpenoids in Medicinal Cannabis Biomass. *Metabolites* **2020**, *10* (7), 276.
- 94) Namdar, D.; Mazuz, M.; Ion, A.; Koltai, H. Variation in the Compositions of Cannabinoid and Terpenoids in Cannabis Sativa Derived from Inflorescence Position along the Stem and Extraction Methods. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *113*, 376–382.
- 95) Slatkin, D. J.; Doorenbos, N. J.; Harris, L. S.; Masoud, A. N.; Quimby, M. W.; Schiff, P. L. Chemical Constituents of Cannabis Sativa L. Root. *J. Pharm. Sci.* **1971**, *60* (12), 1891–1892.
- 96) Gutiérrez, A.; Rodríguez, I. M.; del Río, J. C. Chemical Characterization of Lignin and Lipid Fractions in Industrial Hemp Bast Fibers Used for Manufacturing High-Quality Paper Pulps. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (6), 2138–2144.
- 97) Darani, K. K.; Mozafari, M. R. Supercritical fluids technology in bioprocess industries: A review. *J. Biochem. Tech.* **2009**, *2* (1), 144–152.
- 98) Da Porto, C.; Decorti, D.; Natolino, A. Separation of Aroma Compounds from Industrial Hemp Inflorescences (*Cannabis Sativa* L.) by Supercritical CO₂ Extraction and on-Line Fractionation. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *58*, 99–103.
- 99) Palmieri, S.; Pellegrini, M.; Ricci, A.; Compagnone, D.; Lo Sterzo, C. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Thyme, Hemp and Coriander Extracts: A Comparison Study of Maceration, Soxhlet, UAE and RSLDE Techniques. *Foods* **2020**, *9* (9), 1221.
- 100) Fiorini, D.; Scortichini, S.; Bonacucina, G.; Greco, N. G.; Mazzara, E.; Petrelli, R.; Torresi, J.; Maggi, F.; Cespi, M. Cannabidiol-Enriched Hemp Essential Oil Obtained by an Optimized Microwave-Assisted Extraction Using a Central Composite Design. *Ind. Crops Prod.* **2020**, *154*, 112688.
- 101) Gunjević, V.; Grillo, G.; Carnaroglio, D.; Binello, A.; Barge, A.; Cravotto, G. Selective Recovery of Terpenes, Polyphenols and Cannabinoids from Cannabis Sativa L. Inflorescences under Microwaves. *Ind. Crops Prod.* **2021**, *162*, 113247.
- 102) Fishedick, J. T.; Glas, R.; Hazekamp, A.; Verpoorte, R. A Qualitative and Quantitative HPTLC Densitometry Method for the Analysis of Cannabinoids in Cannabis Sativa L. *Phytochem. Anal.* **2009**, *20* (5), 421–426.
- 103) Jennings, W.; Mittlefehldt, E.; Stremple, P. *Analytical gas chromatography*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, 1997.
- 104) Hazekamp, A.; Peltenburg, A.; Verpoorte, R.; Giroud, C. Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from Cannabis Sativa L. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2005**, *28* (15), 2361–2382.
- 105) De Backer, B.; Debrus, B.; Lebrun, P.; Theunis, L.; Dubois, N.; Decock, L.; Verstraete, A.; Hubert, P.; Charlier, C. Innovative Development and Validation of an HPLC/DAD Method for the Qualitative and Quantitative Determination of Major Cannabinoids in Cannabis Plant Material. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877* (32), 4115–4124.
- 106) Rodima, A.; Vilbaste, M.; Saks, O.; Jakobson, E.; Koort, E.; Pihl, V.; Sooväli, L.; Jalukse, L.; Traks, J.; Virro, K.; Annuk, H.; Aruoja, K.; Floren, A.; Indermitte, E.; Jürgenson, M.; Kaleva, P.; Kepler, K.; Leito, I. ISO 17025 Quality System in a University Environment. *Accredit. Qual. Assur.* **2005**, *10* (7), 369–372.
- 107) Aizpurua-Olaizola, O.; Omar, J.; Navarro, P.; Olivares, M.; Etxebarria, N.; Usobiaga, A. Identification and Quantification of Cannabinoids in Cannabis Sativa L. Plants by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (29), 7549–7560.
- 108) Heo, S.; Yoo, G. J.; Choi, J. Y.; Park, H. J.; Do, J.-A.; Cho, S.; Baek, S. Y.; Park, S.-K. Simultaneous Analysis of Cannabinoid and Synthetic Cannabinoids in Dietary Supplements Using UPLC with UV and UPLC-MS-MS. *J. Anal. Toxicol.* **2016**, *40* (5), 350–359.
- 109) Leghissa, A.; Hildenbrand, Z. L.; Schug, K. A. A Review of Methods for the Chemical Characterization of Cannabis Natural Products. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41* (1), 398–415.
- 110) Hazekamp, A.; Fishedick, J. T. Cannabis - from Cultivar to Chemovar. *Drug Test. Anal.* **2012**, *4* (7–8), 660–667.
- 111) Micalizzi, G.; Vento, F.; Alibrando, F.; Donnarumma, D.; Dugo, P.; Mondello, L. Cannabis Sativa L.: A Comprehensive Review on the Analytical Methodologies for Cannabinoids and Terpenes Characterization. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1637*, 461864.