

EKSTRAKCIJE KONOPLJE: Z OPTIMALNO METODO DO KAKOVOSTNIH EKSTRAKTOV

CANNABIS EXTRACTIONS: OPTIMAL METHODS FOR OBTAINING HIGH-QUALITY EXTRACTS

AVTORICA / AUTHOR:

doc. dr. Eva Tavčar, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Katedra za farmacevtsko biologijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: eva.tavcar@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Konoplja (*Cannabis sativa* L.) je rastlina z močnimi farmakološkimi učinki. Vsebuje kanabinoide, ki v človeškem or-

POVZETEK

Članek obravnava različne metode ekstrakcije konoplje in njihovo vlogo pri izkoriščanju terapevtskega potenciala kanabinoidov, predvsem kanabidiola (CBD) in (-)-trans- Δ^9 -tetrahidrokanabinola (Δ^9 -THC) za uporabo v medicini. Konoplja v zadnjih desetletjih vzbuja vedno več znanstvenega zanimanja, saj zaradi svojih zdravilnih učinkovin postaja vedno bolj pomembna za zdravljenje simptomov številnih bolezni, kar se odraža tudi v monografijah za cvet konoplje in kanabidiol, ki se bosta v letu 2024 uvrstili v Evropsko farmakopejo. Za optimizacijo proizvodnje izdelkov iz konoplje je bistveno razumevanje postopkov ekstrakcije, njihovega donosa učinkovin ter vsebnosti in terapevtske učinkovitosti ekstraktov. Ta osnovni pregled področja zato obravnava rastlinsko drogo in njeno pripravo za ekstrakcijo, različne tehnike, kot so ekstrakcijske metode z organskimi topili, olji, plini, vodo ter vročim zrakom ter pristope, ki so posebnost pri predelavi konoplje, kot je npr. dekarboksilacija. Dotaknemo se tudi varnostnih vidikov tako postopkov kot končnih izdelkov.

KLJUČNE BESEDE:

CBD, ekstrakcija, kanabinoidi, konoplja, Δ^9 -THC

ABSTRACT

The review paper discusses different methods of cannabis extraction and their role in harnessing the therapeutic potential of cannabinoids, especially cannabidiol (CBD) and (-)-trans- Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) for use in medicine. Cannabis has attracted increasing scientific interest in recent decades, as its active ingredients make it increasingly important for treating the symptoms of many diseases. This is also reflected in the monographs on cannabis flower and cannabidiol, which will be included in the European Pharmacopoeia in 2024. To optimize the production of cannabis products, it is essential to understand the extraction processes, the yield of active ingredients, and the content and therapeutic effectiveness of the extracts. This basic overview covers the herbal drug and its preparation for extraction, and various techniques such as extraction methods with organic solvents, oils, gases, water and hot air, along with the approaches specific to the processing of cannabis, such as decar-



boxylation. We also touch on the safety aspects of both the processes and final products.

KEY WORDS:

cannabis, cannabinoids, CBD, extraction, Δ^9 -THC

ganizmu aktivirajo endokanabinoidne receptorje. Prisotni so po vseh tkivih, največ pa sodelujejo pri komunikaciji med sinapsami v živčevju in imunskem sistemu. Kanabinoidi zato vplivajo na številne pomembne funkcije, kot so hranjenje, spanje, uravnavanje temperature in bolečine, vnetni in imunski odzivi, učenje, pomnjenje ter čustva (1). Kanabinoidi so zdravilne učinkovine in slovenski zdravniki nam lahko napišejo recept za magistralno zdravilo z (–)-trans- Δ^9 -tetrahidrokanabinolom (Δ^9 -THC), kanabidiolom (CBD) ali pa s cvetom konoplje. Monografiji iz Formulariuma Slovenicuma Javne agencije RS za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) »Cvet konoplje« in »Ekstrakt konoplje« predstavljata standard kakovosti, ki mu morata ustrezati cvet konoplje in standardiziran ekstrakt cveta konoplje, kadar se uporabljata za pripravo magistralnih zdravil v RS (2, 3). V letu 2024 bo objavljena nova monografija z naslovom »Cvet konoplje« tudi v novi izdaji Evropske farmakopeje 11.5 (4).

Najbolj raziskan kanabinoid je Δ^9 -THC, ki je s svojim agonizmom na receptorje CB1 zaslužen za znan opojni učinek konoplje. Najdemo ga predvsem v varietetah, ki jih po politično-regulativni kategorizaciji na vrste imenujemo indijska konoplja (*Cannabis sativa* L. ssp. *indica* LAM, angl. *cannabis*, pa tudi *marihuana*). V Sloveniji konoplje z vsebnostjo Δ^9 -THC nad 0,3 % uvrščamo v II. skupino prepovedanih drog, kar pomeni, da so dovoljene le za raziskovalne in medicinske namene.

CBD je v zadnjih letih najbolj priljubljena snov iz konoplje, saj je antioksidant s protivnetnim delovanjem ter ni opojen. Evropska komisija ga je uvrstila med dovoljene kozmetične sestavine, Evropska agencija za varno hrano (EFSA) pa presoja o njegovi varnosti kot prehranskem dopolnilu. V letu 2024 bo dobil tudi monografijo v Evropski farmakopeji (5). CBD je prevladujoči kanabinoid v večini sort, ki jih v Evropski uniji kategoriziramo med industrijske konoplje (*C. sativa* L. subsp. *sativa*, angl. *hemp*) in jih smemo gojiti za pridobivanje vlaken in semen (6).

Nekoliko šibkeje kot Δ^9 -THC, a tudi opojno, učinkuje kanabinol (CBN), ki nastane z oksidativnim razpadom drugih kanabinoidov. Vsebnost CBN je po monografijah FS v cvetu konoplje omejena na 1 % in v ekstraktih konoplje na 2,5 %.

V dovolj veliki meri, da lahko raziskujemo njune farmakološke učinke, iz konoplje pridobivamo tudi CBG in CBC (7). Drugi kanabinoidi so zaradi bistveno manjših vsebnosti v konoplji manj zanimivi (7, 8).

Za konopljo so značilne tudi večje količine terpenov in terpenoidov, ki so hlapne snovi, prisotne tudi v številnih drugih rastlinah, npr. α -pinen, limonen, β -kariofilen, linalool in mircen (7). Pripisujemo jim sinergistične učinke s kanabinoidi, po drugi strani pa so lahko vzrok draženja in alergijskih reakcij, zato med uporabniki in stroko ni enotnega soglasja, ali so v zdravilih s konopljo zaželeni. V literaturi najdemo tudi navajanje konopljinih flavonoidov, klorofilov, alkaloidov, voskov, vlaknin, maščobnih kislin in številnih drugih snovi, ki so za glavno terapevtsko delovanje konoplje manj pomembni in jih navadno iz ekstrakta odstranjujemo (7).

Članek se osredotoča na kanabinoide in predstavlja pregled ekstrakcijskih metod za pridobivanje s kanabinoidi bogatih ekstraktov iz konoplje.

2 PREDPRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA

2.1 RASTLINSKA DROGA

Najbolj kakovostna rastlinska droga za pridobivanje kanabinoidov so cvetni vršički neoplojenih ženskih rastlin, saj je na njihovi površini največ žleznihih laskov ali trihomov, ki vsebujejo kanabinoide in terpenske spojine. Kanabinoidi v semenih ali v koreninah niso prisotni. Ovojnico trihomov sestavljajo voski in skupaj s kanabinoidi jih imenujemo konopljinna smola. V količinah, ki so za ekonomičnost ekstrakcije premajhne, trihome najdemo tudi na površini listov in stebel. Čim večje količine kanabinoidov in standardizirane vsebnosti spojin zagotavljamo s hibridnimi varietetami rastlin in razmnoževanjem s potaknjenci ter z ekonomičnimi načini gojenja v enakomernih ter higienskih rastnih pogojih. Rastline morajo biti prostorsko in časovno ustrezno izpostavljene svetlobi, vodi, zraku, hranilom ter stresu in požetu, ko dosežejo zrelost (7).

Zelo pomembno je gojenje v skladu z dobro kmetijsko in nabiralno prakso zdravilnih rastlin ter doseganje kakovosti, ki jo določa monografija »Cvet konoplje« Formulariuma Slovenicuma (4). Ta predpisuje, da posušena droga vsebuje najmanj 90,0 % in največ 110,0 % na deklaraciji navedenih kanabinoidov, kot sta Δ^9 -THC in CBD, ter kanabinoidnih karboksilnih kislin, kot sta Δ^9 -tetrahidrokanabinolna kislina,

izražena kot $\Delta 9$ -THC ($C_{21}H_{30}O_2$; Mr 314,5), in kanabidiolna kislina, izražena kot CBD ($C_{21}H_{30}O_2$; Mr 314,5). Poleg ustrezne vsebnosti učinkovin je tudi pri konoplji treba posebno pozornost nameniti prisotnosti mikroorganizmov, pesticidov, kovin, aflatoksinov ter oceniti in s standardnimi operativnimi postopki preprečevati vsa tveganja, ki bi lahko vodila do neakovostnega končnega izdelka.

Optimalna vlaga za shranjevanje posušenih cvetnih vršičkov, ki so namenjeni inhalaciji, povzeta po ASTM International, je 55–65 %. Dosežemo jo s počasnim sušenjem v temnem, čistem prostoru ob nadziranih zračni vlagi in temperaturi; obrezane cvetove razprostremo na perforirane inertne pladnje, cele rastline pa obesimo s cvetovi navzdol. Z večanjem vlage se povečuje tveganje za razrast plesni in gliv, pri nižji vlagi pa izgublamo kanabinoide z oksidativnim razpadom in terpenske spojine z izhlapevanjem. Ko drogo uporabimo za ekstrakcijo, je zaželena nižja vlaga, 0–15 %, čeprav je kanabinoide možno ekstrahirati tudi iz svežih rastlin (7). V literaturi za pospeševanje sušenja navajajo uporabo mikrovalov, pečice, vročega zraka, električnih pulzov v kombinaciji z iztiskanjem, razvlažilnikov ter liofilizacije (10). Kadar sušimo pri višjih temperaturah, obenem poteka dekarboksilacija, ki je opisana v naslednjem poglavju.

Mletje rastline za ekstrakcijo kanabinoidov ni nujno, saj so trihomi na površini rastlinskih delov. Pripomore pa k homogenizaciji materiala in z manjšanjem velikosti delcev omogoči hitrejšo difuzijo topila, kar zmanjša potreben čas ekstrakcije in ključno vpliva na ponovljivost serij. Po drugi strani se kanabinoide in terpenske spojine zaradi nizkih tališč radi zlepljajo med sabo in na površine pribora, ki ga uporabljamo za mletje. Z mletjem v material lahko vnesemo neželeno vlago in kovine iz pribora. Težavo lahko v določeni meri rešujemo z mletjem ob zamrzovanju (11).

Možno je tudi sejanje delcev, saj so ugotovili, da delci premera 0,063–0,125 mm vsebujejo največ rastlinskih struktur, bogatih s kanabinoidi, a je treba vzeti v zakup morebitne izgube kanabinoidov z delci drugih velikosti. Rastlinsko drogo vedno pripravimo glede na ekstrakcijsko metodo, saj so za različne metode zaželeno različne lastnosti rastlinskega materiala (7).

2.2 DEKARBOKSILACIJA

V konoplji najdemo kanabinoidne molekule, ki imajo na terpenofenolnem skeletu karboksilno skupino: CBGA, $\Delta 9$ -THCA, CBDA in CBCA. Te spojine niso enako farmakološko učinkovite kot neeksidirane oblike, zato jih moramo pred uporabo kemijsko pretvoriti, kar dosežemo s segrevanjem. Proces imenujemo dekarboksilacija. Če učinkovine konoplje

apliciramo v pljuča z inhalacijo preko uparjalnika ali cigarete, segrevamo kanabinoide nad njihova vrelišča na temperaturi okrog 180 °C in dekarboksilacija poteče ob sami aplikaciji. Če pa želimo kanabinoide uporabiti v drugi farmacevtski obliki, npr. za oralno, peroralno, rektalno ali dermalno uporabo, je dekarboksilacijo treba izvesti kot del proizvodnje pred ekstrakcijo ali po njej (9).

Predhodna dekarboksilacija rastlinske droge je koristna predvsem pri nadaljnji ekstrakciji z nepolarnimi topili, saj so neeksidirane oblike kanabinoidov v njih bolj topne. Zmanjša se tudi možnost oksidacije in izgube spojin v primerjavi z dekarboksilacijo, ki jo izvedemo na končnih ekstraktih. Slabost dekarboksilacije rastlinske droge pa je rokovanje z večjimi volumni materiala; potrebujemo večje naprave za segrevanje in porabimo več energije. Za optimalno dekarboksilacijo rastlinskega materiala v pečici se bolj kot dolgotrajno segrevanje na temperaturi 100 °C priporoča krajše, 30-minutno segrevanje pri 140 °C, homogenizacija rastlinske droge na delce velikosti 1–2 mm, plast droge pa ne sme biti debelejša od 5 mm (8, 13).

2.3 STABILNOST KANABINOIDOV

Za shranjevanje rastlinske droge in ekstraktov ter določanje oz. načrtovanje roka uporabe je pomembno upoštevanje stabilnosti spojin.

2.3.1 Stabilnost kanabinoidov v rastlinski drogi

Pri štiri leta trajajoči raziskavi zaseženih konopljinih cvetov in hašiša so ugotovili, da je pri sobni temperaturi vsebnost $\Delta 9$ -THC v vzorcih padala za 3–5 % na mesec. $\Delta 9$ -THC se je pri tem deloma in stehiometrično pretvarjal v CBN. V vzorcih konopljinih cvetov, ki so bili v neposrednem stiku z atmosferskim zrakom, so izmerili 65- do 100-odstotno nižje vsebnosti $\Delta 9$ -THC kot ob shranjevanju v zamrzovalniku na –20 °C, kjer so bile izgube kanabinoidov zanemarljive. Opazno manjši je bil tudi razpad kanabinoidov pri 4 °C, pri nekaterih vzorcih le nekaj odstoten, pri nobenem pa ni presegel 50 % (13). V prihajajoči monografiji Evropske farmakopeje je navedeno, da je cvetove treba hraniti v zrakotesnem vsebniku (14).

2.3.2 Stabilnost kanabinoidov v ekstraktih in raztopinah

V raziskavi zaseženih vzorcev konopljne smole so največje zmanjšanje vsebnosti $\Delta 9$ -THC ugotovili pri vzorcih, ki so bili v stiku z zrakom, ne glede na to, ali so jih shranjevali na svetlobi ali v temi. Po štirih letih je vsebnost $\Delta 9$ -THC upadla za 64–74 % glede na začetno vsebnost. Pri shranjevanju v

zrakotesnih plastičnih vrečkah so bile izgube manjše, in sicer 25–42 % glede na začetno vsebnost. Pri vseh omejenih vzorcih so opazili linearno povečanje vsebnosti CBN. Razmere shranjevanja so imele bistveno manjši vpliv na vsebnost CBD. Avtorji so zaključili, da je manj oksidativno občutljiv. Ko so bili vzorci shranjeni pri -20°C , pa statistično pomembnega razpada $\Delta 9\text{-THC}$, CBN ali CBD niso zaznali (15). $\Delta 9\text{-THC}$ se je ohranil tudi v konopljinih ekstraktih v olivnem olju, ki so bili shranjeni tri tedne v hladilniku (16).

V več raziskavah so ugotovili, da je na svetlobo bolj občutljiv CBD, sploh če je raztopljen. Deloma je razpadel v CBN, v komaj zaznavnih količinah pa celo v $\Delta 9\text{-THC}$ (17, 18). CBD, raztopljen v olju, shranjen na svetlobi in v stiku z zrakom je popolnoma razpadel v 270 dneh (18).

Analize smole, ki je vsebovala CBD, CBDA, $\Delta 9\text{-THC}$, $\Delta 9\text{-THCA}$, CBN, CBNA, CBG in CBGA in je bila raztopljena v različnih organskih topilih (metanolu, kloroformu in njuni zmesi ter petroletru), so pokazale, da se je vsebnost nekislinskih kanabinoidov pri sobni temperaturi in v temi popolnoma ohranila do 15 dni, pri -18°C in 4°C pa do 30 dni. Kislinke so pri 4°C v kloroformu in petroletru razpadle tako na svetlobi kot tudi v temi tudi za 20 odstotkov, v metanolu pa ne. Največji je bil razpad $\Delta 9\text{-THCA}$ in $\Delta 9\text{-THC}$, še posebej v kloroformu pri 20°C , kjer sta bila v 30 dneh oba kanabinoida prisotna zgolj še v okrog 10 %

začetnih vsebnosti. Razpad $\Delta 9\text{-THC}$, CBD in njunih kislin-
skih oblik je bil pri 20°C na svetlobi za okrog 50 % večji kot v temi, kjer so avtorji raziskave nižje vsebnosti kislin-
skih oblik pripisali zgolj dekarboksilaciji (19).

Monografija »Standardiziran ekstrakt cveta konoplje« iz DAB navaja, da ekstrakte shranjujemo tesno zaprte, zaščitene pred svetlobo, pri temperaturi manj kot 25°C , najbolje pri $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$ (3). Ker gre za magistralna zdravila, je njihov rok uporabe 30 dni. Pri zdravilih z dovoljenjem za promet pa je v navodilih za paciente pri zdravlilu, ki vsebuje $\Delta 9\text{-THC}$ in CBD navedeno, da je neodprt vsebnik treba shranjevati v hladilniku pri $2\text{--}8^{\circ}\text{C}$, odprtega pa pri manj kot 25°C in ga porabiti v 42 dneh (20). Pri zdravlilu, ki kot zdravilno učinkovino vsebuje CBD, pa je navedeno, da ne zahteva posebnih pogojev shranjevanja, porabiti pa ga je treba v 12 tednih od odprtja (21).

3 METODE EKSTRAKCIJE

Na najoptimalnejše lastnosti ekstrakta ciljamo z ustrezno predpripravo rastlinskega materiala in skrbno razviti de-



Slika 1: Glavne faze ekstrakcije kanabinoidov iz konoplje; ustvarjeno z BioRender.com.

Figure 1: The main stages of the extraction of cannabinoids from cannabis; created with BioRender.com.

javniki ekstrakcije, saj nobena ekstrakcijska metoda ne vodi do popolnih izkoristkov želenih snovi in popolne odsotnosti neželenih. Potek osnovnega ekstrakcijskega postopka kanabinoidov iz konoplje prikazujemo na sliki 1. Vrednotimo izkoristek ekstrakcije (masa pridobljenega ekstrakta glede na maso rastlinske droge), učinkovitost ekstrakcije (ekstrahirano maso želenih spojin glede na njihovo maso, ki ostane v rastlinskem materialu po ekstrakciji) in kakovost ekstrakta (vsebnost) (22). Dejavniki, ki vplivajo na učinkovitost ekstrakcije kanabinoidov iz konoplje, so prikazani na sliki 2.

V monografiji »Standardiziran ekstrakt cveta konoplje« iz DAB je ekstrakt opisan kot zelenkasta ali rumena do rjava tekočina. Monografija navaja zahtevo po vsebnosti CBD in Δ^9 -THC, ki je med 90 in 110 % deklarirane vsebnosti, vsebnost CBN ne presega 2,5 % in vode 0,5 %. Monografija navaja, da je ekstrakt najbolje pridobiti z ekstrakcijo s superkritičnim ogljikovim dioksidom (CO_2) in da ga po potrebi rafiniramo in prilagodimo določeni vsebnosti z uporabo inertnih pomožnih snovi, najbolje s srednjeveržnimi trigliceridi. Standardiziran ekstrakt cveta konoplje mora ustrezati tudi zahtevam splošne monografije Evropske farmakopeje »Ekstrakti iz rastlinskih drog«. Seveda pa monografija proizvajalcev ne omejuje pri razvoju drugačnih izdelkov, če pri razvoju in proizvodnji upoštevajo zakonodajo in po farmacevtskem sistemu zagotavljanja kakovosti sledijo smernicam dobre proizvodne prakse.

3.2 EKSTRAKCIJE TRDNO-TEKOČE

Ekstrakcija s topili je sestavljena iz maceracije rastlinskega materiala, ki ga potopimo in mešamo v topilu pri različnih pogojih. Po ekstrakciji topilo običajno odstranimo s centrifugiranjem, filtriranjem ali izparevanjem. Dobro topilo je selektivno in hlapno, njegova izbira pa je močno odvisna od želenih lastnosti ekstrakta. Pomembno je razmerje med rastlinsko drogo in topilom. Za popolno ekstrakcijo lahko izvedemo več stopenj ekstrakcije, s čimer se povečata poraba topila in energije. Pri pridobivanju ekstraktov z namenom farmacevtske, prehranske ali kozmetične uporabe je zelo pomemben vidik toksičnost topila zaradi zaostankov. Področje je regulirano s smernicami Mednarodnega sveta za harmonizacijo (ICH), ki topila kategorizira v razrede ter jim pripisuje največje dopustne preostanke v končnem produktu. V razred I uvrščamo topila, ki so za uporabo preveč toksična, zato kanabinoide ekstrahiramo s topili razreda II, III ali neuvrščeni (22). Od topil s polarnimi lastnostmi je najbolj znan etanol, sledi mu izopropanol, od nepolarnih pa petroleter, propan, butan, heksan in CO_2 , ki jih obravnavamo v nadaljevanju.

3.1.1 Voda

Kanabinoidi v vodi niso topni, saj so zelo lipofilni. Italijansko Ministrstvo za zdravje kljub temu predpisuje postopek priprave magistralnega zdravila v obliki dekokta z zavretjem rastlinske droge in vode v razmerju 1 : 1, ki mu sledi 15-minutno vrenje, ohlajanje in filtriranje. Ugotovili pa so, da je v takšni raztopini več kislinjskih kot aktivnih oblik, da so prisotne v zelo majhni koncentraciji in da bi za terapevtske količine kanabinoidov morali zaužiti velike količine dekokta, ki pa vsebuje tudi številne druge vodotopne spojine (12). Vsebnosti kanabinoidov v teh ekstraktih so bile zelo raznolike. Sklepamo, da se ob vodni ekstrakciji oz. pripravi čaja raztopijo v frakciji eteričnega olja, ki plava na vodi, zaradi lipofilne narave pa se tudi lepijo in obarjajo na površine vsebnika.

3.1.2 Organska topila

Etanol

Glede na stopnjo toksičnosti po ICH je etanol uvrščen v razred III z dovoljenim preostankom v polizdelku ali končnem izdelku 5000 ppm. Je polarno topilo, ki poleg kanabinoidov raztaplja tudi terpene, terpenoide, glikozide, sladkorje, soli alkaloidov, klorofile, lipide in voske. Ekstrakcija z etanolom ne zahteva visokih tlakov, odstranljiv je pri temperaturi nad 70 °C, a tudi vnetljiv in eksploziven. Ekstrakcija kanabinoidov najučinkoviteje poteče pri višjih odstotkih etanola, optimalno nad 70 %. Večja vsebnost vode poveča ekstrakcijo klorofilov. Ker rastlinski material vpije veliko topila, je pomembno temeljito ožemanje trdnih preostankov ali pa ekstrakcija predhodno presejane rastlinske droge z manj rastlinskimi vlakni. Tudi ekstrakcija v mrzlem (–80 do 5 °C) daje ekstrakte z manj klorofili, trigliceridi in voski, ohrani pa terpene in terpenoide. Etanolni ekstrakciji lahko sledi tudi filtracija skozi aktivno oglje, siliko ali bentonit. S temi metodami odstranjujemo neželene snovi, a lahko izgubljamo tudi kanabinoide (22, 23).

Izopropanol

Kot etanol je uvrščen v razred toksičnosti III, a z njim pridobivamo ekstrakte z manjšimi vsebnostmi klorofila in drugih snovi. Wongwailikhit in sod. so pri primerjanju ekstrakcij z etanolom in izopropanolom ugotovili, da je etanol nekoliko bolj ekstrahiralo CBD, izopropanol pa Δ^9 -THC (24).

Heksan

Za razliko od etanola ne raztaplja klorofilov. Po ICH ga uvrščamo v razred II in v končnem materialu lahko zaostane v količini 290 ppm. Vrelišče pri atmosferskem tlaku je 68 °C, zato ga je podobno kot etanol za odstranjevanje treba se-

grevati, vnetljivost in eksplozivnost pa v proces vnašata tveganja. Značilna ekstrakcija mlete konoplje s heksanom traja okrog 10 minut ob mešanju pri temperaturi 10–25 °C pri razmerju med rastlinsko drogo in topilom 1 : 3–5 (22).

Druška organska topila

V patentni literaturi najdemo ekstrakcijo z zmesjo acetona in CO₂ pri temperaturah –25 do –100 °C, s katero naj bi dosegli nad 90-odstotno vsebnost kanabinoidov. Navajajo tudi vnetljivi topili, ki pa sta lahko odstranljivi zaradi hlapnosti: pentan, ki spada v razred III, in petroleter, ki pa ni uvrščen v nobeno od skupin. Sestavljajo ga različne naftne frakcije in lahko vsebuje zdravju škodljive nečistote, zato je treba biti posebej previden pri njegovi kakovosti. Manj primerna z varnostnega in toksikološkega vidika, ampak v patentni literaturi navedena topila so heptan, terc-butilmetileter, dimetileter in diklorometan (22).

3.1.3 Olja

Med priljubljenimi so oljčno, kokosovo (srednjeveržni trigliceridi), sončnično in konoplino olje. Rastlinska olja so netoksična in okolju prijazna. Ekstrakcija z njimi ne zahteva povišanih temperatur in tlakov, navadno poteka pri temperaturah 30–80 °C od nekaj minut do nekaj ur. Njihova slabost je, da jih zaradi visokih vrelišč iz ekstraktov ne moremo zlahka odstraniti in ostanejo njihova neločljiva sestavina, zato so oljni ekstrakti bistveno manj koncentrirani. Kanabinoide lahko od olja oddestiliramo pri temperaturi nad 180 °C, saj imajo nižje vrelišče kot trigliceridi. Olja ekstrahirajo tudi terpene, terpenoide in voske, ne pa klorofilov in flavonoidov (22). V italijanskih lekarnah farmacevti po zdravniškem receptu pripravljajo galenska zdravila v obliki standardiziranih oljnih kapljic (25). Primer učinkovite ekstrakcije v olje zajema dekarboksilacijo konoplje v pečici na 140 °C 30 min, ki ji sledi 60-minutna maceracija na vodni kopeli v razmerju mase droge (mg) na volumen topila (mL) 200 : 1 (26).

3.1.4 Ekstrakcija s superkritičnim ali subkritičnim CO₂

Najmanj toksično topilo za ekstrakcijo kanabinoidov je CO₂, ki v končnem produktu tudi ne pušča preostankov. Ni vnetljiv, je poceni in se izredno lahko odstrani iz ekstrakta ter reciklira. Plin se segreva pod nadzorovanim tlakom, dokler ne doseže superkritičnega stanja. Nato se črpa skozi rastlinsko drogo v ekstrakcijski posodi, od tam pa v separacijsko enoto, kjer se ekstrahirane spojine z različno topnostjo selektivno kondenzirajo pri znižanem tlaku. Ko je CO₂ odstranjen iz ekstrakta, se črpa in reciklira v tlačno napravo.

Uporabimo lahko različne programe tlaka in temperature, s katerimi spreminjamo dielektrično konstanto topila, torej njegovo polarnost in s tem ekstrakcijsko moč za posamezne spojine (27). Superkritično stanje CO₂ pri 31 °C dosežemo že pri tlaku okrog 73,8 bar. Slabosti metode so nevarnost ob delu z visokimi tlaki, zahteva po dragi, specializirani opremi, ekstraktabilnost voskov in dolg čas trajanja (15). Kanabinoide lahko s CO₂ ekstrahiramo tudi v subkritičnih pogojih, pri katerih se ohrani več terpenov in ekstrahira manj voskov (28).

Pri razvoju ekstrakcij kanabinoidov iz različnih nedekarboksiliranih rastlinskih drog so v različnih raziskavah uporabljali razpon temperatur od 40 do 70 °C, tlakov od 100 do 340 barov in dodatkov etanola (29). Z dodatkom sotopil, kot je etanol, povečamo polarnost CO₂. Možna je tudi predhodna ekstrakcija voskov in terpenov iz rastlinske droge, ki ji sledi etanolna ekstrakcija kanabinoidov (22).

3.1.5 n-butan in n-propan

Sta vnetljiva in eksplozivna plina, ki se utekočinita pri povišanem tlaku (2–10 barov) in na ta način postaneta podobno učinkoviti ekstrakcijski topili za kanabinoide, kot sta etanol ali heksan. Rastlinsko drogo navadno namestimo v perforirano posodo oz. je ob izhodu ekstrakta nameščen filter, ki zadrži netopne dele. Plina zelo selektivno raztapljata kanabinoide, terpene in terpenoide, zato na ta način pridobimo koncentrirane ekstrakte, ki jih v angleškem jeziku poznamo pod izrazom *shatter*. Ekstrahirata tudi voske, ki jih zlahka odstranimo s postopkom vinterizacije. Kljub temu, da sta pri atmosferskih pogojih hlapna, pa zaradi nevarnosti preostankov iz toksikoloških razlogov njuno uporabo odsvetujemo (29, 30).

3.1.6 1,1,1,2-tetrafluoroetan (HFC 134a)

Je nevnetljiv plin, ki ga največ uporabljamo kot hladilno sredstvo v gospodinskih aparatih in avtomobilskih klimatskih napravah. Uporabljamo ga tudi v medicinskih inhalatorjih. Ni strupen ali rakotvoren in mejna vrednost preostalega topila ni navedena v smernicah ICH za zdravila. Kar zadeva vpliv na okolje, HFC-134a velja za močan toplogredni plin s potencialom vpliva na globalno segrevanje. Ekstrakcijska moč HFC-134a se izboljša z uporabo toksičnih sotopil, kot sta butan in dimetileter, ter kombinira z etanolno ekstrakcijo (22).

3.2 EKSTRAKCIJA Z VROČIM ZRAKOM

Temelji na uporabi segrelih plinov, ki jih vodimo skozi rastlinsko drogo pri temperaturah, pri katerih se hlapne spojine

najprej uparijo, nato pa jih zberemo s kondenzacijo. V začetnih frakcijah izoliramo hlapnejše terpene in terpenoide, pri višjih temperaturah nad 175 °C pa kanabinoide, medtem ko imajo voski, klorofili, alkaloidi in flavonoidi za tovrstno izolacijo previsoka vrelišča. Metoda zahteva uporabo specializiranih in dragih aparatov, po drugi strani pa ni težave odstranjevanja topila iz končnega ekstrakta. Dekarboksilacija zaradi segrevanja poteka sočasno z ekstrakcijo. V literaturi zasledimo uporabo segretega zraka ali pare, ki spadata pod oksidirajoče pline in lahko negativno vplivata na stabilnost produkta, pa tudi uporabo žveplovega dioksida, CO₂, dušika, helija ali argona, ki spadajo med redu-

cirajoče pline in preprečujejo oksidacije spojin, zato so za uporabo bolj priporočljivi (22).

3.3 POMOŽNE METODE EKSTRAKCIJE

Pri ekstrakcijah s tekočinami v ekstrakcijsko zmes pogosto vnesemo dodatno energijo za pomoč pri razbitju celičnih struktur, ki zadržujejo učinkovine v rastlinski drogi, ter za večjo difuzijo in raztapljanje v topilu. V ta namen uporabljamo ekstrakcijo z mikrovalovi, ultrazvokom, hidrodinamsko kavitacijo in ekstrakcijo v pulzirajočem električnem polju. Pri mikrovalovih se voda v celicah hitro segreje in raztrga



Slika 2: Dejavniki, ki vplivajo na učinkovitost ekstrakcije kanabinoidov iz konoplje; ustvarjeno z BioRender.com.

Figure 2: Factors affecting the efficiency of extraction of cannabinoids from cannabis; created with BioRender.com.



celične stene. Podoben pojav se dogaja, ko ekstrakcijsko zmes izpostavimo ultrazvoku ali hidrodinamski kavitaciji, kjer nastanejo kavitacijski mehurčki, lokalizirana mesta višjih temperatur, ali s pulzirajočimi električnimi polji. Ker pa so kanabinoidi na površini rastlinskih delov, ki zlahka pridejo v stik s topilom, s pretirano obdelavo ne smemo pretiravati, ker tako povečamo neželeno ekstrakcijo snovi iz notranjosti tkiv, npr. klorofila (22). Casiraghi in sod. so podrobno proučili sestavo ekstraktov in med sonificiranimi in klasično ekstrahiranimi niso ugotovili razlik v kakovosti z vidika vsebnosti Δ^9 -THC in CBD, tokoferolov in oksidiranih tokoferolov, lipofilnih hlapnih karbonilnih spojin in oksidacijskega stanja sestavin, ki so značilne za starana olja (31).

4 ČIŠČENJE EKSTRAKTOV IN IZOLACIJA KANABINOIDOV

Vinterizacija je postopek hlajenja ekstrakta v organskem topilu z namenom obarjanja olj in voskov, ki jih nato odstranimo s filtracijo (32). V patentni literaturi omenjajo tudi uporabo zeolitnih molekulskih sit ali diatomejske prsti za odstranitev klorofilov, flavonoidov in alkaloidov. Za izolacijo kanabinoidov s čistostjo > 95 % uporabljamo postopke kristalizacije, destilacije, tekočinske kromatografije oz. kolonske ekstrakcije na trdnih nosilcih (SFE) (22). Topila, uporabljana v teh postopkih, je lažje odstraniti iz izolatov kot iz ekstraktov, zato so za izolacijo primerna tudi tista, ki se jim pri ekstrakciji zaradi toksičnosti izogibamo.

5 SKLEP

Metodo ekstrakcije kanabinoidov iz konoplje moramo izbrati glede na želene lastnosti izdelka, ki pa so raznolike in odvisne od farmacevtske oblike ter načina aplikacije zdravila. Pomemben dejavnik izbire proizvodnih metod je tudi ekonomičnost postopkov, ki je zelo odvisna od velikosti serij in opreme. Te pristope industrija neprestano razvija, pa tudi varuje, zato smo v tem članku lahko obravnavali le javno znane podatke. Poudariti želimo tudi, da smo bili v članku osredotočeni na kanabinoide naravnega izvora, ki jih pridobivamo iz konoplje in se jih v javnosti drži sloves superiornosti nad sintezno pridobljenimi. Zaključujemo pa,

da se pri uporabi toksičnih ekstrakcijskih topil »romantičnost« naravnega izvora kanabinoidov izgubi.

6 LITERATURA

1. IZUM-Institut informacijskih znanosti. Uporaba kanabinoidov : strokovno izpopolnjevanje s področja farmacije, [Ljubljana, 11., 12. in 18. junij 2019] :: COBISS+. V [citirano 4. februar 2023]. Dostopno na: <https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/sikmb/300264192>
2. Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke. Cvet konoplje. *Formularium Slovenicum* 5.0; 2020.
3. Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke. Standardiziran ekstrakt cveta konoplje. *Formularium Slovenicum* 5.0; 2020.
4. European Pharmacopoeia. Cannabis flower. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM); 2023.
5. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare [Internet]. [citirano 9. oktober 2023]. Outcome of the 176th session of the European Pharmacopoeia Commission, June 2023 - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - EDQM. Dostopno na: <https://www.edqm.eu/en/-/outcome-of-the-176th-session-of-the-european-pharmacopoeia-commission-june-2023-2>
6. Tavčar E. Kanabidiol (CBD) in koža. *farm vestn.* 2023;1(74):56–66.
7. Sainz Martinez A. Extraction techniques for bioactive compounds of cannabis. *Natural Product Reports.* 1. januar 2023;40(3):676–717.
8. Glivar T, Eržen J, Kreft S, Zagožen M, Čerenak A, Čeh B, idr. Cannabinoid content in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) varieties grown in Slovenia. *Industrial Crops and Products.* 1. marec 2020;145:112082.
9. Fučak T, Kreft S, Svedružić ŽM, Tavčar E. Mechanism and kinetics of CBDA decarboxylation into CBD in hemp. *J Plant Biochem Biotechnol.* 1. september 2023;32(3):608–21.
10. Shuja A. Rapid drying extraction targeting oil resin plant extracts [Internet]. US9981203B2, 2018 [citirano 12. september 2023]. Dostopno na: <https://patents.google.com/patent/US9981203B2/en>
11. Atkins PL. Sample Processing and Preparation Considerations for Solid Cannabis Products. *J AOAC Int.* 1. marec 2019;102(2):427–33.
12. Baratta F, Simiele M, Pignata I, Ravetto Enri L, Torta R, De Luca A, idr. Development of Standard Operating Protocols for the Optimization of Cannabis-Based Formulations for Medical Purposes. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2019 [citirano 11. september 2023];10. Dostopno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00701>
13. Zamengo L, Bettin C, Badocco D, Di Marco V, Miolo G, Frison G. The role of time and storage conditions on the composition of hashish and marijuana samples: A four-year study. *Forensic Science International.* 1. maj 2019;298:131–7.
14. Council of Europe S. European Pharmacopoeia 11.5 monograph: Cannabis flower. EDQM; 2024.
15. Grafström K, Andersson K, Pettersson N, Dalgaard J, Dunne SJ. Effects of long term storage on secondary metabolite

- profiles of cannabis resin. *Forensic Science International*. 1. avgust 2019;301:331–40.
16. Casiraghi A, Roda G, Casagni E, Cristina C, Musazzi UM, Franzè S, idr. Extraction Method and Analysis of Cannabinoids in Cannabis Olive Oil Preparations. *Planta Med.* marec 2018;84(4):242–9.
 17. Franco C, Protti S, Porta A, Pollastro F, Profumo A, Mannucci B, idr. Stability of cannabidiol (CBD) in solvents and formulations: A GC–MS approach. *Results in Chemistry*. 1. januar 2022;4:100465.
 18. Kosović E, Sýkora D, Kuchař M. Stability Study of Cannabidiol in the Form of Solid Powder and Sunflower Oil Solution. *Pharmaceutics*. 19. marec 2021;13(3):412.
 19. Smith RN, Vaughan CG. The decomposition of acidic and neutral cannabinoids in organic solvents. *J Pharm Pharmacol*. maj 1977;29(5):286–90.
 20. GW Pharma Ltd. Package leaflet: Information for the patient Sativex® Oromucosal Spray. GW Pharma Limited; 2022.
 21. GW Pharma (International) B.V. SMPC: Epidyolex 100 mg/ml oral solution. Jazz Pharmaceuticals Ireland Ltd; 2022.
 22. López-Olmos C, García-Valverde MT, Hidalgo J, Ferrerio-Vera C, Sánchez de Medina V. Comprehensive comparison of industrial cannabinoid extraction techniques: Evaluation of the most relevant patents and studies at pilot scale. *Frontiers in Natural Products [Internet]*. 2022 [citirano 12. september 2023];1. Dostopno na: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fntr.2022.1043147>
 23. Armstrong JL, Hill DS, McKee CS, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Lopez-Valero I, idr. Exploiting Cannabinoid-Induced Cytotoxic Autophagy to Drive Melanoma Cell Death. *Journal of Investigative Dermatology*. 1. junij 2015;135(6):1629–37.
 24. Wongwailikhit K, Jiratchaya J. Comparison of the Two Common Solvents for THC and CBD Extractions. V 2021.
 25. Ternelli M, Brighenti V, Anceschi L, Poto M, Bertelli D, Licata M, idr. Innovative methods for the preparation of medical Cannabis oils with a high content of both cannabinoids and terpenes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 15. julij 2020;186:113296.
 26. Baratta F, Simiele M, Pignata I, Enri LR, D'Avolio A, Torta R, idr. Cannabis-Based Oral Formulations for Medical Purposes: Preparation, Quality and Stability. *Pharmaceutics*. 2021;
 27. Schoss K, Kočevár Glavač N, Dolenc Koce J, Anžlovar S. Supercritical CO2 Plant Extracts Show Antifungal Activities against Crop-Borne Fungi. *Molecules*. januar 2022;27(3):1132.
 28. Schoss K, Kočevár Glavač N. Ekstrakcija s subkrično vodo za pridobivanje rastlinskih ekstraktov. 2021;72(3):167–72.
 29. Moreno T, Montanes F, Tallon SJ, Fenton T, King JW. Extraction of cannabinoids from hemp (*Cannabis sativa* L.) using high pressure solvents: An overview of different processing options. *The Journal of Supercritical Fluids*. 1. julij 2020;161:104850.
 30. Radoiu M, Kaur H, Bakowska-Barczak A, Splinter S. Microwave-Assisted Industrial Scale Cannabis Extraction. *Technologies*. september 2020;8(3):45.
 31. Casiraghi A, Gentile A, Selmin F, Gennari CGM, Casagni E, Roda G, idr. Ultrasound-Assisted Extraction of Cannabinoids from Cannabis Sativa for Medicinal Purpose. *Pharmaceutics*. 5. december 2022;14(12):2718.
 32. Grijó DR, Vieitez Osorio IA, Cardozo-Filho L. Supercritical extraction strategies using CO2 and ethanol to obtain cannabinoid compounds from Cannabis hybrid flowers. *Journal of CO2 Utilization*. december 2018;28:174–80.

