

METODA ZA BRZU EKSTRAKCIJU KANABINOIDA IZ KANABISA MIKROTALASNIM ZAGREVANJEM

Biljana Koturević *

Ana Branković **

Kriminalističko-policijska akademija, Beograd

Sažetak

Forenzička identifikacija aktivnih supstanci iz kanabisa i njenih produkata (marihuana, hašiš, hašiš ulje) sastoji se u određivanju sadržaja glavnog psihoaktivnog kanabinoida Δ^9 -tetrahidrokanabinola, produkta degradacije kanabinola i nepsihoaktivnog kanabidiola. Tehnika ekstrakcije predstavlja jedan od prvih koraka laboratorijskog izolovanja biljnog materijala, te je stoga, razvoj novih, efikasnijih metoda ekstrakcije izuzetno važan za sprovođenje forenzičkih analiza. Potencijalna alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije jeste ekstrakcija pod uticajem mikrotalasa, odnosno mikrotalasnim zagrevanjem. U ovom radu opisan je mehanizam mikrotalasnog zagrevanja i kroz primere njegove primene u ekstrakciji organskih jedinjenja iz biljnog materijala, istaknute su prednosti ove relativno nove ekstrakcione tehnike u poređenju sa konvencionalnom ekstrakcijom. Opisom jednostavne i brze metode ekstrakcije, mikrotalasnim zagrevanjem, prikazana je mogućnost njene primene u forenzičkoj identifikaciji kanabisa.

Ključne reči: Kanabis, kanabinoidi, Δ^9 -tetrahidrokanabinol, mikrotalasna ekstrakcija.

Uvod

Kanabis, konoplja (lat. *cannabis sativa*) i njeni produkti (marihuana, hašiš, hašiš ulje) dugi niz godina predstavljaju najviše zloupotrebljavanu drogu u svetu.³ Prisustvo psihoaktivnog kanabinoida tetrahidrokanabinola (Δ^9 -THC), svrstao je ovu biljku u psihoaktivne supstance. Prema Zakonu o psihoaktivnim kontrolisanim supstancama

* Spec., biljana.koturevic@kpa.edu.rs

** Docent, ana.brankovic@kpa.edu.rs

3 World Drug Report 2014, United Nations office on Drugs and crime, Vienna, str. 3.

Republike Srbije⁴, zabranjeno je posedovanje, uzgajanje i promet varijeteta konoplje koje mogu sadržati više od 0,3 % supstanci iz grupe tetrahidrokanabinola. Međutim, kako je konoplja korisna industrijska sirovina, važno je laboratorijskim analizama odrediti koncentraciju i odnos glavnih kanabinoida Δ^9 -THC-a i kanabidiola (CBD) i na osnovu toga napraviti razliku između konoplje industrijskog tipa i droge.

Forenzička analiza kanabisa i njenih produkata sastoji se iz pripreme uzorka, ekstrakcije kanabinoida i njihove identifikacije. Ekstrakcija biljnog materijala, odnosno izolacija i prečišćavanje organskih jedinjenja iz ispitivanog uzorka je jedan od prvih koraka u analizi biljnog materijala. Neadekvatna ekstrakcija može uticati na krajnji rezultat analize uprkos primeni najpreciznijih fizičko-hemijskih metoda za identifikaciju ekstrakta. U analizi biljnog materijala, uglavnom se primenjuju konvencionalne metode ekstrakcije, primenom rastvarača. Ovakve metode su često neefikasne u pogledu energetskog utroška, vremena, količine rastvarača i prinosa, stoga je razumljiva važnost stalnog razvoja novih, efikasnijih metoda ekstrakcije. Jedna od potencijalnih alternativa konvencionalnoj ekstrakciji, koja se sve više koristi u laboratorijskim uslovima je mikrotalasna ekstrakcija. Mikrotalasi se dugo primenjuju u prehrambenoj industriji, a zahvaljujući činjenici da pripadaju nejonizovanom zračenju koje ne uzrokuje promene u strukturi materije, našli su primenu i u ekstrakciji⁵

Cilj ovog rada je da kroz kratak teorijski opis mikrotalasnog zagrevanja i njegove primene u ekstrakciji organskih jedinjenja iz biljnog materijala, prikaže mogućnosti ove metode, kao i njene prednosti nad konvencionalnim metodama ekstrakcije u forenzičkoj identifikaciji aktivnih supstanci iz kanabisa.

1. Kanabis

Kanabis ili konoplja (lat. *Cannabis sativa*) je jedna od najstarijih biljnih kultura čija je namena višestruka. Koristi se kao industrijska sirovina, terapijsko sredstvo za ublažavanje bolova i mučnine, povećanje apetita itd., ali i kao droga.⁶ Ova jednogodišnja zeljasta biljka se veoma brzo razvija u sunčanim predelima i može dostići visinu do 5 m. Vegetacija mladih biljaka se intenzivno razvija tokom letnjih meseci, dok skraćanjem dana, po završetku leta, biljka cveta. Kanabis je dvodomna biljka. Muške jedinke su obično manjeg rasta, dok su ženske jedinke veće i sa karakterističnim cvetovima u vidu klasa.⁷

Potentnost kanabisa je određena koncentracijom osnovne psihoaktivne supstance Δ^9 -tetrahidrokanabinola (Δ^9 -THC)⁸, dok se na osnovu odnosa Δ^9 -THC-a i kanabidiola (CBD), može odrediti vrsta kanabisa tj. konoplje. Industrijski kanabis se odlikuje niskom koncentracijom Δ^9 -THC-a i visokom koncentracijom CBD-a. Kanabis uzgajan za zloupotrebu sadrži visoku koncentraciju Δ^9 -THC-a i nisku koncentraciju CBD-a.⁹ Biljke u čijem sastavu se nalazi manje od 0,3% THC-a su Zakonom o psihoaktivnim

4 *Sl. glasnik RS*, br. 99/2010, član 58.

5 M. Blekić; *et al*, Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian J. Food Sci. Technol.*, 3/2011, str. 33.

6 P. Wexler, *Encyclopedia of Toxicology*, USA, 2005, str. 405.

7 F. Grotenhermen; E. Russo, *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic*

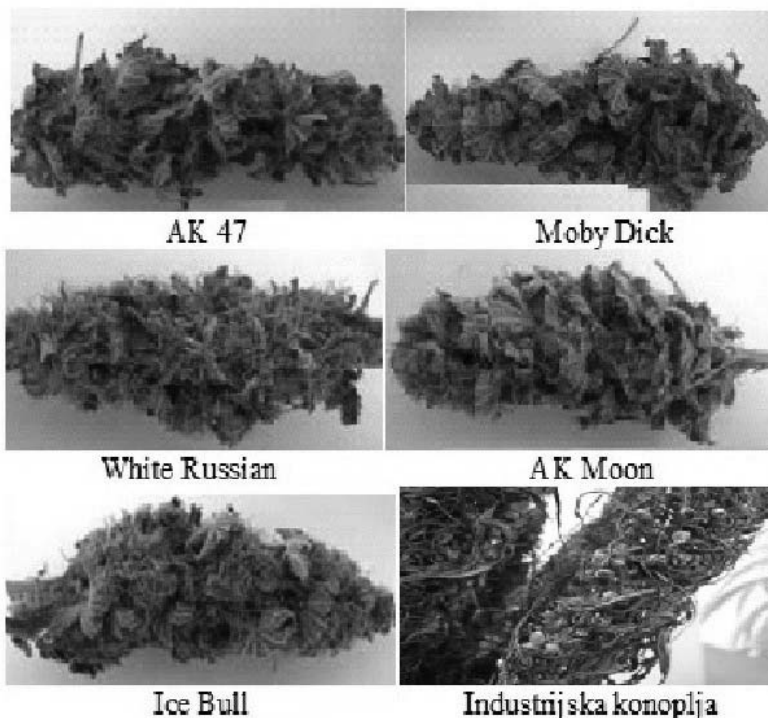
Potential, Psychology Press, Binghamton, US, 2002, str. 3–15.

8 I. G. Trofin, *et al*, Identification and characterization of special types of herbal cannabis, *U. P. B. Sci. Bull., Series B*, Vol. 74/2012, str. 119.

9 *Ibidem*, str. 120.

kontrolisanim supstancama Republike Srbije klasifikovane kao industrijske. Zakonom je dozvoljeno uzgajanje samo industrijskog kanabisa i to osobama sa posebnom dozvolom koju izdaje Ministarstvo poljoprivrede.¹⁰ Sadržaj Δ^9 -THC-a je najveći u osušenim cvetovima, listovima i stablu kanabisa i kreće se od 1–20%. Ovakav preparat biljke, poznatiji kao marihuana se zloupotrebljava pušenjem u vidu ručno pravljenih cigareta (džoint) ili udisanjem preko vodenih lula. U koncentrovanoj uljanoj smoli, hašišu, Δ^9 -THC prisutan je u koncentraciji od 5–20%.¹¹

Danas postoji veliki broj ilegalno proizvedenih hibridnih vrsta biljke *Cannabis sativa* u kojima je sadržaj Δ^9 -THC-a veći od 20%. Najpoznatiji hibridi su: AK 47, Moby Dick, White Russian, Ak Moon, Ice Bull, White Widow, itd.¹²



Slika 1. Hibridi biljke kanabis¹³

2. Hemijski sastav kanabisa

Hemijski sastav kanabisa je veoma kompleksan. U ovoj vrsti identifikovano je 489 hemijskih jedinjenja kao što su proteini, aminokiseline, ugljeni hidrati, masne kiseline, vitamini, flavonoidi, zbog čega je konoplja važna sirovina za proizvodnju hrane, tekstila, goriva, lepkova, itd. (tabela 1).¹⁴ Od ukupnog broja identifikovanih jedinjenja, 70

10 Sl. glasnik RS, br. 99/2010, član 60.

11 F. Grotenhermen; E. Russo, *op. cit.*, str. 11.

12 I. G. Trofin, et al, *op. cit.*, str. 124–125.

13 *Ibidem*.

14 E. Russo; M. A. ElSohly, *Chemical constituents of Cannabis*, Psychology Press, Binghamton, 2002, str. 27–30.

čine kanabinoidi¹⁵, od kojih je najpoznatiji psihoaktivni Δ^9 -tetrahidrokanabinol, zbog čega se kanabis veoma dugo zloupotrebljava kao droga.

Tabela 1. Hemijski sastav biljke kanabis¹⁶

Kanabinoidi	70
Nitro jedinjenja	27
Aminokiseline	18
Proteini, enzimi i glikoproteini	11
Ugljeni hidrati	34
Prosti alkoholi	7
Aldehidi	12
Ketoni	13
Kiseline	20
Masne kiseline	23
Estri i laktoni	13
Steroidi	11
Terpeni	120
Fenoli	25
Flavonoidi	23
Vitamini	1
Pigmenti	2
Elementi	9
Ugljovodonici	50
Ukupno	489

Kanabinoidi, kao i njihovi analozi i produkti su terpenoidna jedinjenja, a mogu se klasifikovati u 10 osnovnih strukturnih tipova (slika 2).¹⁷ Poznato je da se kanabinoidi sintetišu u kanabisu u formi 2-karboksi kiseline. Glavni prekursor iz koga nastaju svi ostali kanabinoidi je kanabigerol (CBG), odnosno kanabigerolna kiselina (CBGA). Iz CBGA u reakcijama katalizovanim odgovarajućim sintazama, nastaju: tetrahidrokanabinolna kiselina (Δ^9 -THCA), kanabidiolna kiselina (CBDA) i kanabihromenska kiselina (CBCA). Daljom oksidacijom THCA, nastaje kanabinolna kiselina (CBNA) (slika 3).¹⁸

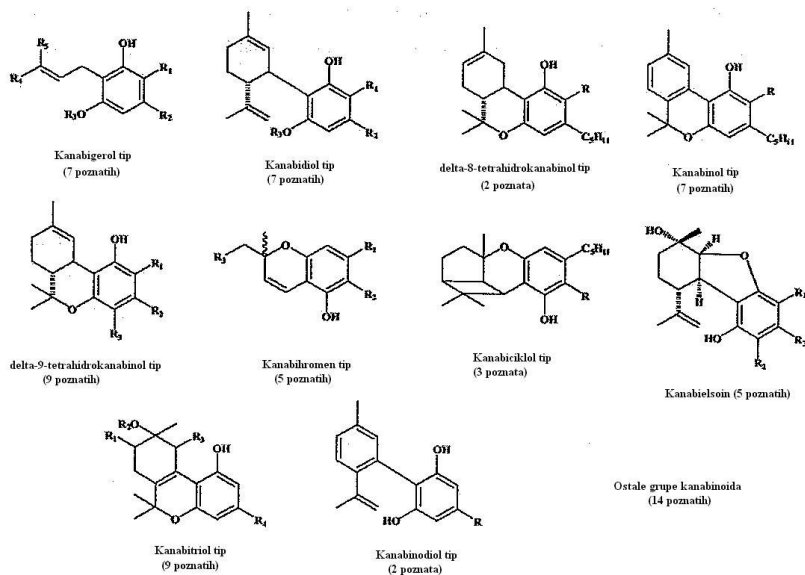
U kanabisu koji se zloupotrebljava kao droga, uglavnom se identifikuju sledeći kanabinoidi: Δ^9 -tetrahidrokanabinol (Δ^9 -THC), kanabinol (CBN), kanabidiol (CBD),

15 M. A. ElSohly; D. Slade, Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, *Life Science*, 78/2005, str. 540.

16 Prilagođeno prema: M. A. ElSohly; D. Slade, Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, *Life Science*, 78/2005, str. 544.

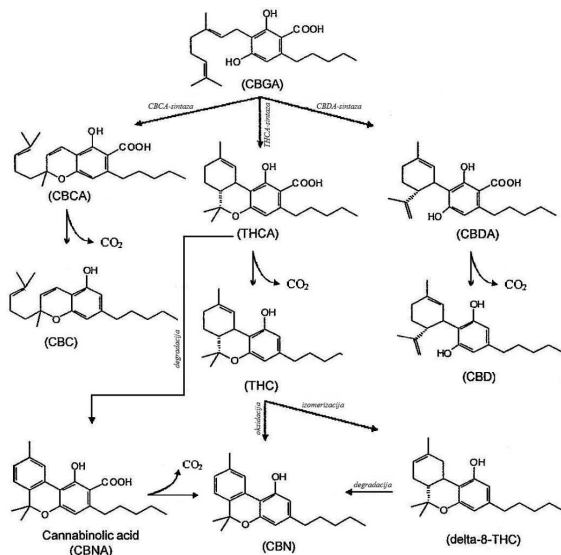
17 A. Hazekamp, *Cannabis review*, Leiden University, The Netherlands, 2009, str. 14.

18 *Ibidem*, str. 18–23.



Slika 2. Strukturni tipovi kanabinoida iz kanabisa¹⁹

kanabihromen (CBC), odnosno njihove 2-karboksilne kiseline. Δ^9 -THC je najviše izučavan kanabinoid koji poseduje psihoaktivna svojstva. Kao i ostali prirodni kanabinoidi, Δ^9 -THC nastaje dekarboksilacijom njegove 2-karboksilne kiseline (Δ^9 -THCA). Dalji proces transformacije podrazumeva oksidaciju Δ^9 -THC-a do CBN-a i izomerizaciju do Δ^8 -tetrahidrokanabinol-a (Δ^8 -THC), dok se Δ^9 -THCA dalje degradira do CBNA (slika 3).



Slika 3. Putevi biosinteze i degradacije osnovnih grupa kanabinoida²⁰

19 Prilagođeno prema: A. Hazekamp, *op. cit.*, str.14–19.

20 Prilagođeno prema: A. Hazekamp, *op. cit.*, str. 19.

Kanabinol (CBN) je slab psihoaktivni derivat Δ^9 -THC-a koji se u svežoj biljci retko nalazi, dok dužim stajanjem biljke na atmosferskom vazduhu nastaje oksidacijom Δ^9 -THC-a, čime se smanjuje potentnost kanabisa.²¹

Kanabidiol (CBD) je drugi najčešći kanabinoid prisutan u kanabisu koji takođe nastaje iz prekursora CBGA u reakciji koju katalizuje CBDA-sintaza i daljom dekarboksilacijom 2- karboksilne kiseline (CBDA). Pri ispitivanju dejstva marihuane na dobrovoljcima, zapaženo je da nepsihoaktivan CBD može redukovati dejstvo Δ^9 -THC-a.²² Kao što je već napomenuto, odnos CBD-a i Δ^9 -THC-a u konoplji je važan za razlikovanje industrijske vrste od vrste kanabisa proizvedenog za zloupotrebu. Pri analizi ilegalno uzgajanih hibrida kanabisa, odnos Δ^9 -THC/CBD je u opsegu od 54 do 66%.²³

3. Forenzička analiza kanabisa

Prema priručniku Ujedinjenih nacija²⁴, u većini evropskih zemalja za forenzičku identifikaciju kanabisa nije neophodna analiza kompletnog hemijskog sastava, odnosno za identifikaciju je dovoljno odrediti sadržaj glavnog psihoaktivnog kanabinoida Δ^9 -THC-a, zatim produkta njegove degradacije CBN-a i CBD-a. Na osnovu sadržaja ovih kanabinoida, može se odrediti tip kanabisa (industrijski tip ili droga).

Forenzičkoj analizi kanabisa prethodi složena priprema uzorka. Kanabinoide u svežoj biljci je potrebno sačuvati od dalje degradacije sušenjem biljnog materijala 2–3 dana.²⁵ Ekstrakcija kanabinoida iz osušenog biljnog materijala se uglavnom vrši konvencionalnom metodom, odnosno ekstrakcijom pomoću rastvarača. Kako su kanabinoide nerastvorni u vodi, ali rastvorni u organskim rastvaračima, za njihovu ekstrakciju se uglavnom koriste: metanol, etanol, petrol-etar, n-heksan, toluen, hloroform ili kombinacija rastvarača, npr. metanol/hloroform. Ovako ekstrahovane kanabinoide u forenzičkim laboratorijama je moguće analizirati brojnim metodama, od kojih se uglavnom koriste gasna hromatografija (GC) ili tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) povezane sa odgovarajućim detektorima (maseni spektrometar (MS) ili plameno jonizacioni detektor (FID)). Međutim, za određivanje ukupnog Δ^9 -THC-a, koji se sastoji iz slobodnog Δ^9 -THC-a i Δ^9 -THC-a nastalog dekarboksilacijom Δ^9 -THCA, pre hromatografije potrebno je izvršiti dekarboksilaciju, zagrevanjem ekstrakta na 150°C²⁶

Ovakav vid pripreme uzorka kanabisa može trajati nekoliko dana, dok sama ekstrakcija može trajati i do nekoliko časova. Iz tog razloga, danas se teži primeni novih tehnika koje će skratiti vreme ekstrakcije, smanjiti upotrebu rastvarača i povećati prinos ekstrakcije. Jedna od takvih metoda je mikrotalasna ekstrakcija (ME) koja se za potrebe sinteze i izolovanja biološki aktivnih jedinjenja iz biljnog materijala primenjuje od 1986. godine.²⁷

21 I. G. Trofin, et al, op. cit., str. 120.

22 A. W. Zuardi, et al., Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 39/2006, str. 422.

23 I. G. Trofin, et al, op. cit., str. 128.

24 Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products, Laboratory and Scientific Section United Nations office on drugs and crime Vienna, United Nations, New York, 2009.

25 *Ibidem*.

26 I. G. Trofin, et al, op. cit., str. 121.

27 M. Blekić; R. A. Jambak; F. Chemat, op. cit., str. 33.

Prema podacima iz literature, ekstrakcija kanabinoida iz kanabisa se uglavnom izvodi konvencionalnom ekstrakcijom, upotrebom rastvarača.²⁸ U novije vreme za ekstrakciju kanabinoida se primenjuje i mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. *Solid-phase microextraction* – SPME)²⁹, ekstrakcija pomoću micela (eng. *Cloud point extraction* – CPE)³⁰, fokusirana ultrazvučna ekstrakcija (eng. *Focused ultrasound extraction* – FUSE) i ekstrakcija superkritičnim fluidima (eng. *Supercritical fluid extraction* – SFE).³¹

3.1. Teorija o mikrotalasnom zagrevanju

Mikrotalasno zračenje je nejonizujuće zračenje frekvencije između 300 MHz i 300 GHz, koje se sastoji iz dva oscilujuća, međusobno upravna polja, električnog i magnetnog.³² Mikrotalasno zagrevanje predstavlja dielektrično zagrevanje koje se zasniva na sposobnosti nekih supstanci da prevode elektromagnatno zračenje u toplotu. Sam proces zagrevanja mikrotalasima se može objasniti pomoću dva fenomena: jonska kondukcija i rotacija dipola. Pod uticajem električnog polja dolazi do elektroforetske migracije jona, odnosno do fenomena jonske kondukcije. Otpor rastvora koji se javlja pri migraciji jona generiše trenje koje dovodi do zagrevanja rastvora.³³ Drugi važan mehanizam zagrevanja je rotacija dipola. Pod uticajem mikrotalasa molekuli se orijentišu kako bi uskladili svoje kretanje sa pravcem električnog polja, dolazi do vibracije molekula i generisanja toplote uzrokovane trenjem.³⁴ Mikrotalasno zagrevanje se kao nekonvencionalni vid zagrevanja primenjuje u raznim oblastima: industriji, hemiji, biohemiji, medicini, itd. Brojni literaturni podaci pokazuju da se primenom mikrotalasa skraćuje vreme reakcije, povećava prinos i čistoća dobijenih produkata. Međutim i pored brojnih radova na temu primene mikrotalasa u hemiji, još uvek nije potpuno razjašnjeno kako mikrotalasi utiču na kinetiku hemijskih reakcija.³⁵ Danas je opšte prihvaćeno da uticaj mikrotalasnog zagrevanja na kinetiku hemijskih reakcija i fizičko-hemijskih procesa predstavlja kombinaciju termalnih (pregrevanje, vrele tačke, selektivno grejanje) i netermalnih, odnosno specifičnih mikrotalasnih efekata.³⁶ Termalni efekti koji se javljaju pri mikrotalasnom zagrevanju rezultat su inverzije transfera toplote, nehomogenosti magnetnog polja u uzorku i selektivne apsorpcije zračenja od strane polarnih jedinjenja.³⁷

28 S. Ameer, *et al*, Cloud point extraction of Δ^9 -tetrahydrocannabinol from cannabis resin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405/2013, str. 3117–3123.

29 D. W. Lachenmeier, *et al*, Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17/2003, str. 472–478; R. Yang; W. Xie, Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography–mass spectrometry, *Forensic Science International*, 162/2006, str. 135–139.

30 S. Ameer, *et al*, op. cit.

31 J. Omar, Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS, *J. Sep. Sci.*, 36/2013, str. 1397–1404.

32 M. A. M. Khraisheh; *et al*, Microwave and Air Drying I. Fundamental Considerations and Assumptions for the Simplified Thermal Calculations of Volumetric power Absorption, *J. Food Eng.*, 33/1997, str. 209.

33 S. Dawn Armstrong; *Microwave-Assisted Extraction for the Isolation of Trace Systemic Fungicides from Woody Plant Material*, doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1999.

34 V. Mandal; Y. Mohan; S. Hemalatha, Microwave Assisted Extraction-An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacology Reviews*, 1/2007, str. 8.

35 C. Kappe; A. Stadler; D. Dallinger, *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry-second edition*, Hoboken, USA, 2012, str. 18.

36 J. Jovanović; B. Adnađević, Kinetics of Isothermal Ethanol Adsorption onto a Carbon Molecular Sieve under Conventional and Microwave Heating, *Chem. Eng. Technol.*, 4/2012, str. 762.

37 B. Adnađević; J. Jovanović, *Hidrogelovi – sinteza, struktura i svojstva*, Beograd, 2014, str.47–48.

Jedan od termalnih efekata koji je karakterističan za mikrotalasno zagrevanje je tzv. pregrevanje (*eng. overheating*). Pojavu pregrevanja rastvarača, odnosno zagrevanja na temperaturu iznad tačke ključanja, bez pojave ključanja opisao je D. Baghurst.³⁸ X. Zhang³⁹ pretpostavio je postojanje drugog termalnog efekta koji se javlja pri mikrotalasnom zagrevanju, a koji je poznat kao vrele tačke (*eng. hot-spots*). Smatra se da ovaj efekat nastaje kao posledica nehomogenosti mikrotalasnog polja, usled čega se pojavljuju određene zone povišene temperature u uzorku. Mikrotalasno zagrevanje poseduje i termalni efekat poznat kao selektivno zagrevanje pojedinih faza u sistemu. Ovaj efekat je uočio K. D. Raner⁴⁰ na primeru korišćenja sistema dva rastvarača, od kojih jedan bolje apsorbuje mikrotalasnu energiju.

Za razliku od termalnih, pitanje postojanja specifičnih mikrotalasnih efekata je još uvek diskutabilno, a smatra se da ovi efekti nastaju kao posledica direktne interakcije električnog polja sa specifičnim molekulima u uzorku.⁴¹

3.2. Mikrotalasna ekstrakcija

Pod mikrotalasnom ekstrakcijom se podrazumeva metoda za izolovanje organskih jedinjenja iz analiziranog materijala, primenom mikrotalasnog zagrevanja.⁴² Za ekstrakciju primenom mikrotalasa razvijeni su specijalni mikrotalasni ekstraktori. Danas postoje dva komercijalno dostupna sistema za ME, a to su otvoren i zatvoren sistem (*eng. open-vessel, closed-vessel system*). U otvorenom sistemu ekstrakcija se vrši pri atmosferskom pritisku, dok se u zatvorenom sistemu ekstrakcija odigrava pri kontrolisanom pritisku i temperaturi. U otvorenom sistemu koji za uglavnom koristi za ekstrakciju, ekstrakcioni sud sa uzorkom i rastvaračem se izlaže direktnom dejstvu mikrotalasa (generisani magnetronom), pri kontrolisanim uslovima temperature i na atmosferskom pritisku. Temperatura u sistemu je kontrolisana mikrotalasnom snagom koja određuje količinu energije koja se prenosi na uzorak i koja se dalje konvertuje u toplotu. Snaga koja se u ovom sistemu postiže, kreće se od 0 do 300 W, a brzina zagrevanja je 2–6 °C/s. Praćenje postignute temperature se vrši preko temperaturnog senzora (infracrveni senzor ili sonda na bazi optičkih vlakana) (slika 4).⁴³

Mikrotalasnom ekstrakcijom se mogu izolovati jedinjenja iz svežeg uzorka, bez korišćenja rastvarača. Ovakav vid mikrotalasne ekstrakcije bez rastvarača (*Solvent-free microwave extraction – SFME*) predstavlja kombinaciju mikrotalasnog zagrevanja i suve destilacije. Kao ekstrakciona tehnika, SFME se može koristiti i za ekstrakciju jedinjenja osetljivih na visoke temperature (termoosetljivih jedinjenja), poput eteričnih ulja.⁴⁴ Ovakvi rezultati su prezentovani u i u radu M. Lucchesi i saradnika.⁴⁵

38 D. R. Baghurst; D. M. P. Mingos, Superheating effects associated with microwave dielectric heating, *J. Che. Soc. Chem. Commun.*, 9/1992, str. 674–677.

39 X. Zhang; D. O. Hayward; D. M. P. Mingos, Apperent equilibrium shifts hot-spot formation for catalytic reactions induced by microwave dielectric heating, *Chem. Commun.*, 9/1999, str. 975–976.

40 K. D. Raner, *et al*, A New Microwave Reactor for Batchwise Organic Synthesis, *J. Org. Chem.*, 60/1995, str. 2456–2460.

41 C. Kappe, *et al*, *op. cit.*, str. 18; A. Hoz; A. Diaz-Ortiz; A. Moreno, Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects, *Chem. Soc. Rev.*, 34/2005, str. 164–178.

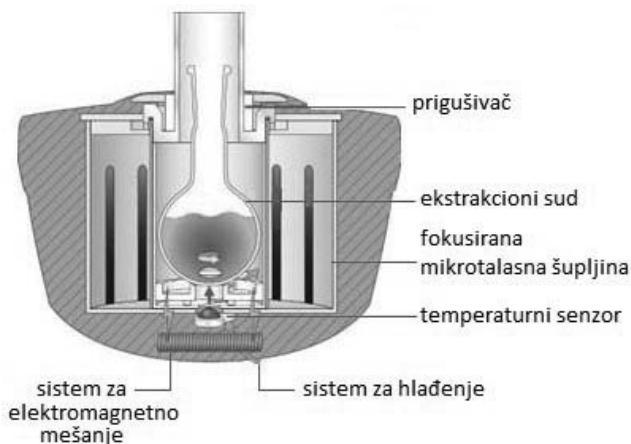
42 V. Mandal, *et al*, *op. cit.*, str. 9.

43 The latest in Microwave synthesis technology, Discover, CEM Corporation, 2010; V. Mandal; Y. Mohan; S. Hemalatha, *op. cit.*

44 M. Blekić, *et al*, *op. cit.*, str. 38.

45 M. E. Lucchesi; F. Chemat; J. Smadja, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chrom. A*, 2/2004, str. 323–327.

Naime, poređenjem konvencionalne metode i SFME pri ekstrakciji eteričnih ulja iz bosiljka, majčine dušice i pitome nane, SFME se pokazala kao efikasnija u pogledu kraćeg vremena ekstrakcije (4,5 h pri KE i 30 min pri SFME), manje utrošenog biljnog materijala i većeg prinosa ekstrakcije.



Slika 4. Šema uređaja za mikrotalasnu ekstrakciju (otvoren sistem)⁴⁶

Kako bi ME bila što efikasnija, potrebno je pravilno razmotriti faktore koji utiču na proces ekstrakcije i na osnovu toga optimizovati uslove. Najznačajniji faktori koji utiču na proces ekstrakcije, odnosno na kinetiku i efikasnost mikrotalasne ekstrakcije su: priroda uzorka, izbor rastvarača, količinski odnos rastvarača i uzorka, temperatura, vreme ekstrakcije i mikrotalasna snaga.⁴⁷

Pri izboru rastvarača, odlučujuću ulogu ima sposobnost zagrevanja rastvarača pod uticajem mikrotalasa. Ova osobina rastvarača se može izraziti preko tangensa gubitaka ($\tan \delta$), koji predstavlja odnos između faktora gubitaka (ϵ'' -efikasnost konverzije apsorbovane energije u toplotu) i dielektrične konstante (ϵ' -sposobnost rastvarača da apsorbuje mikrotalasnu energiju):

Na taj način, veće vrednosti tangensa gubitaka kod nekih rastvarača su razlog njihovog boljeg zagrevanja pod uticajem mikrotalasa.⁴⁸ Drugi važan faktor koji može uticati na kinetiku i efikasnost ekstrakcije je temperatura. Zapaženo je da se povećanjem temperature efikasnost ME povećava. Međutim, pri ekstrakciji termoosetljivih supstanci, visoka temperatura može dovesti do degradacije ekstrahovanih jedinjenja.⁴⁹ Veličina čestica biljnog materijala takođe utiče na ME. Da veći stepen usitnjenosti biljnog materijala dovodi do efikasnije ekstrakcije, poredovano je i u radu M. Sony i saradnika⁵⁰, pri ekstrakciji fenolnih jedinjenja iz lišća gorke dinje. Ovakvi rezultati su

⁴⁶ The latest in Microwave synthesis technology, Discover, CEM Corporation, 2010.

⁴⁷ P. C. Veggi; J. Martinez; M. A. A. Meireles, Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds, Theory Practice, Food Engineering Series 4, Springer Science+Business Media New York, 2013, str. 25–29.

⁴⁸ V. Mandal; Y. Mohan; S. Hemalatha, op. cit, str. 8.

⁴⁹ P. C. Veggi; J. Martinez; M. A. A. Meireles, op. cit., str. 28.

⁵⁰ M. Sony; S. Jain; C. P. S. Yadav, Optimization of microwave assisted extraction of phenolic compounds from *Momordica charantia* leaves, *Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science*, 1/2012, str. 512.

objašnjeni činjenicom da se smanjenjem veličine čestica, dodirna površina između čvrstog materijala i rastvarača povećava, pa je prodor mikrotalasa bolji.

Kod velikog broja jedinjenja, ME se pokazala znatno efikasnijom od KE u pogledu vremena ekstrakcije, prinosa i utroška rastvarača. D. P. Fulzele i R. K. Satdive⁵¹ poredili su ME sa KE i ultrazvučnom pri ekstrakciji kamptotecina iz biljke (lat. *Nothapodytes foetida*). Rezultati su pokazali da je ME efikasnija u pogledu većeg prinosa i kraćeg vremena ekstrakcije (3 min), u odnosu na konvencionalnu (120 min) i ultrazvučnu ekstrakciju (30 min). C. Deng i saradnici⁵² su ME-om za znatno kraće vreme (20 min) i sa manjom količinom početnog uzorka (1 g) ekstrahovali kurkumul, kurdion i germakron iz biljke kurkuma, u odnosu na KE (6 h, 40 g). Do sličnih rezultata su došli i H. Y. Zhou i C. Z. Liu⁵³ pri ekstrakciji solanesola iz lišća duvana. ME je završena nakon 40 min, dok je KE trajala 180 min. Efikasnost SFME pri ekstrakciji esencijalnih ulja iz kumina prikazana je u radu Z. Wang i saradnika.⁵⁴ Njihovi rezultati su pokazali da se primenom mikrotalasnog zagrevanja može skratiti vreme ekstrakcije sa 180 min koliko je trajala KE, na 90 min, dok je kvalitet esencijalnih ulja ostao nepromenjen.

Prema saznanjima autora, u literaturi nema podataka o primeni mikrotalasa u ekstrakciji kanabinoida iz kanabisa. Takođe, jako malo istraživanja je izvedeno u pogledu razumevanja kinetike ekstrakcije kanabinoida, pa tako u literaturi nema dostupnih podataka o poređenju kinetike konvencionalne i mikrotalasnog zagrevanja ekstrakcije kanabinoida iz kanabisa.

Međutim, primena mikrotalasnog zagrevanja je opisana u procesu derivatizacije Δ^9 -THCA u biološkim uzorcima. Naime, De Brabanter i saradnici⁵⁵ poredili su konvencionalno i mikrotalasnog zagrevanje u procesu prevođenja Δ^9 -THCA u isparljiva etarska jedinjenja koja su zatim analizirana GC/MS-om. Rezultati su pokazali da je derivatizacija pri mikrotalasnog zagrevanju izvršena za 90 s, dok je pri konvencionalnom zagrevanju za isti korak bilo potrebno 30 min.

Primeri primene mikrotalasnog zagrevanja u ekstrakciji aktivnih supstanci iz biljnog materijala prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Primeri mikrotalasnog zagrevanja

Biljni materijal	Analit	Rastvarač	Vreme ekstrakcije	Reference
Koren biljke (lat. <i>Salvia miltiorrhiza</i>)	diterpeni	etanol	2 min	[54]
Kora biljke (lat. <i>Eucommia ulmoides</i>)	genipozidinska i hlorogena kiselina	metanol:voda	40 s	[55]

51 D. P. Fulzele; R. K. Satdive, Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*, *J. Chromatography A*, 1063/2005, str. 9–13.

52 C. Deng, et al., Fast determination of curcuminol, curdione and germacrone in three species of *Curcuma* rhizomes by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatography A*, 1117/2006, str. 115–120.

53 H. Y. Zhou; C. Z. Liu, Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves, *Journal of Chromatography A*, 1129/2006, str. 135–139.

54 Z. Wang Z, et al., Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim, *Journal of Chromatography A*, 1102/2006, str. 11–17

55 N. De Brabanter, et al, Fast quantification of 11-nor-D9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) using microwave-accelerated derivatisation and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Forensic Science International* 224/2013, str. 90–95.

Cela biljka (lat. <i>Nothapodytes foetida</i>)	kamptotecin	etanol	3 min	[49]
Rizom biljke Kurkuma (lat. <i>Curcuma longa</i>)	kurkumol, kurdion i germakron	voda	4 min	[50]
Lišće duvana (lat. <i>Nicotiana tabacum</i>)	solanesol	heksan:etanol	40 min	[51]
Kumin (lat. <i>Cuminum cyminum</i>) i (lat. <i>Zanthoxylum bungeanum</i>)	esencijalno ulje	bez rastvarača	30 min	[52]
Osušena i usitnjena masa jabuke	pektin	hlorovodonična kiselina	20,8 min	[56]
Osušena kora biljke (lat. <i>Embellia ribes</i>)	empelin	aceton	80 s	[57]
Listovi zelenog čaja (lat. <i>Camellia sinensis</i>)	polifenoli i kofein	voda	3 min	[58]
Lavanda (lat. <i>Lavandula angustifolia</i>)	esencijalno ulje	bez rastvarača	35 min	[59]

Zaključak

Brojnim naučnim istraživanjima dokazano je da se mikrotalasna ekstrakcija može koristiti za ekstrakciju aktivnih supstanci iz organskih jedinjenja sa upotrebom polarnih/nepolarnih rastvarača ili bez nje. Ovakvi podaci ukazuju na mogućnost razvoja ME kao metode za brzo izolovanje glavnih kanabinoida iz kanabisa koja bi skratila složenu pripremu uzorka i samu forenzičku analizu znatno ubrzala. Takođe, metoda mikrotalasne ekstrakcije bez rastvarača može biti potencijalna alternativa konvencionalnim metodama u pripremi, odnosno sušenju, dekarboksilaciji i ekstrakciji kanabinoida iz svežeg biljnog materijala, koja bi se odigrala u jednom koraku. Ovako ekstrahovani kanabinoidi bi se potom mogli analizirati fizičko-hemijskim metodama bez potrebe za dodatnim prečišćavanjem ekstrakta ili uparavanjem rastvarača. Za pravilnu optimizaciju uslova mikrotalasne ekstrakcije kanabinoida iz kanabisa potrebna su dodatna istraživanja, ali kako se hemijska tehnologija ubrzano razvija, mikrotalasna ekstrakcija uskoro može postati ekstrakciona tehnika izbora u forenzičkoj identifikaciji aktivnih jedinjenja iz kanabisa.

Literatura

1. Abroomand Azar, P., Torabbeigib, M., Sharifana, A., Tehrania, M. S.; Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Lavandula angustifolia* Isolated by Solvent Free Microwave Assisted Extraction and Hydrodistillation, *Journal of Food Biosciences and Technology*, 1/2011.
2. Adnađević, B; Jovanović, J; *Hidrogelovi-sinteza, struktura i svojstva*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2014.
3. Ameer, S; et al. Cloud point extraction of Δ^9 -tetrahydrocannabinol from cannabis resin, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405.
4. Baghurst, D. R; Mingos, D. M. P; Superheating effects associated with microwave dielectric heating, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 9/1992.
5. Blekić, M; Jambak, R. A; Chemat, F; Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, vol. 3, br. 1/2011.
6. Dawn A. S; *Microwave-Assisted Extraction for the Isolation of Trace Systemic Fungicides from Woody Plant Material*, doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1999.
7. De Brabanter, N., Van Gansbeke, W., Hooghe, F., Van Eenoo, P; Fast quantification of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid (THCA) using microwave-accelerated derivatisation and gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry, *Forensic Science International*, vol. 224, br. 1–3/2013, str. 90–95.
8. Deng, C; et al; Fast determination of curcumin, curdione and germacrone in three species of *Curcuma* rhizomes by microwave-assisted extraction followed by head-space solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatography A*, vol. 1117 br. 2/2006.
9. ElSohly, M. A; Slade, D; Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids, *Life Science*, vol 78, br. 5/2005.
10. Fulzele, D. P; Satdive, R. K; Comparison of techniques for the extraction of the anti cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*, *J. Chromatography A*, vol. 1063 br. 1/2005.
11. Grotenhermen, F; Russo, E; *Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Potential*, Psychology Press, Binghamton, US, 2002.
12. Hazekamp, A.; *Cannabis review*, Leiden University, The Netherlands, 2009.
13. Hoz, A; Diaz-Ortiz, A; Moreno, A; Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects, *Chem. Soc. Rev.*, 34/2005.
14. Jovanović, J; Adnađević, B; Kinetics of Isothermal Ethanol Adsorption on to a Carbon Molecular Sieve under Conventional and Microwave Heating, *Chem. Eng. Technol.*, 4/2012.
15. Kappe, C; Stadler, A; Dallinger, D; *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry second edition*, Hoboken, USA, 2012.
16. Khraisheh, M. A. M; Cooper, R. J. T; Magee, A. R. T; Microwave and Air Drying I. Fundamental Considerations and Assumptions for the Simplified Thermal Calculations of Volumetric power Absorption, *Journal of Food Engineering* 33/1997.

17. Lachenmeier, D. W; Kroener, L; Musshoff, F; Madea, B; Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples, *Rapid communications in mass spectrometry*, vol. 17, br. 5/2003.
18. Latha, C; Microwave-assisted extraction of embelin from *Embelia ribes*, *Biotechnology letters*, , vol. 29, br.2/2007, Bangalore, India.
19. Li, D. C., Jiang, J. G.; Optimization of the microwave-assisted extraction conditions of tea polyphenols from green tea, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 61, br. 8/2010.
20. Li, H; Chen, B; Zhang, Z; Yao, S; Focused microwave-assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*), *Talanta*, vol. 63, br. 3/2004.
21. Lucchesi, E; Chemat, F; Smadja, J; Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation, *J. Chromatography A*, vol. 1043, br 2/2004.
22. Mandal, V; Mohan, Y; Hemalatha, S; Microwave Assisted Extraction-An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research, *Pharmacology Reviews*, vol. 1, br. 1/2007.
23. Manual for use by national drug analysis laboratories., *Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products*, Laboratory and Scientific Section United Nations office on drugs and crime Vienna, United Nations, New York, 2009.
24. Omar, J.; Optimisation and characterisation of marihuana extracts obtained by supercritical fluid extraction and focused ultrasound extraction and retention time locking GC-MS, *ournal of separation science*, vol. 36, br. 8/2013, str. 1397–1404.
25. Pan, X; Niu, G; Liu, H; Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chemical Engineering and Processing*, vol. 42, br. 2/2002.
26. Raner, K. D; Strauss, C. R; Trainor, R. W; Thorn, J. S; A New Microwave Reactor for Batchwise Organic Synthesis, *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 60, br. 8/1995.
27. Russo, E; ElSohly, M. A; *Chemical constituents of Cannabis*, Psychology Press, Binghamton, US, 2002.
28. Sony, M; Jain, S; Yadav, C. P. S; Optimization of microwave assisted extraction of phenolic compounds from *Momordica charantia* leaves, *Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 1, br. 8/2012.
29. The latest in Microwave synthesis technology, Discover, CEM Corporation, US, 2010, dostupno na http://www.igz.ch/f/puebersicht_f.asp?action=download&fileid=10160.
30. Trofin, I. G; Vlad, C. C; Noja, V. V; Dabija, G; Identification and characterization of special types of herbal cannabis, *U. P. B. Sci. Bull., Series B*, vol. 74, br. 1/2012.
31. *Unated Nations Office on drugs and Crime, Vienna, World Drug Report 2014*, New York, 2014.

32. Veggi, C. P; Martinez, J; Meireles, M. A; *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds, Theory and Practice*, Food Engineering Series 4, Springer Science+Business Media, New York, 2013.
33. Wang, S; et al; Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, vol. 78, br. 2/2007.
34. Wang, Z; et al; Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim, *Journal of Chromatography A*, vol. 1102, br. 1–2/2006.
35. Wexler, P; *Encyclopedia of Toxicology*, vol. 1, Academic Press, USA, 2005.
36. Yang, R; Xie, W; Determination of cannabinoids in biological samples using a new solid phase micro-extraction membrane and liquid chromatography–mass spectrometry, *Forensic Science International*, vol. 162, br. 1/2006.
37. *Zakon o psihoaktivnim kontrolisanim supstancama*, Službeni glasnik RS, br. 99/2010.
38. Zhang, X; Hayward, D. O; Mingos, D. M. P; Apparent equilibrium shifts hot-spot formation for catalytic reactions induced by microwave dielectric heating, *Chemical Communications*, 11/1999.
39. Zhou, H; Liu, C; Microwave-assisted extraction of solanesol from tobacco leaves, *Journal of Chromatography A*, vol. 1129, br. 1/2006.
40. Zuardi A. W; et al; Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39/2006.

A RAPID METHOD FOR THE EXTRACTION
OF CANNABINONIDS FROM CANNABIS SATIVA
USING MICROWAVE HEATING TECHNIQUE

Biljana Koturevic

Ana Brankovic

Academy of Criminalistic and Police Studies, Belgrade

Summary

Cannabis sativa and its products (marihuana, hashish and hashish oil) is one of the most used illicit drugs in the world. It is also an agricultural crop so it is important to distinguish between industrial-type and drug-type cannabis by forensic examination of suspected material. Extraction technique is one of the first steps in the laboratory plant material isolation, and therefore the development of new, more efficient method of extraction is desirable. The traditional techniques of extraction of biological active compounds from plant material, such as cannabinoids from cannabis, are based on solvent extraction. These methods are often inefficient in terms of extraction time, amount of solvent, energy consumption and extraction yield. Therefore the importance of continuous development of new, more efficient extraction methods is understandable. In this paper, the short description of cannabis

plant and chemical constituents of forensic significance were shown for better understanding. Paper also describes the mechanism of microwave heating and its use in the extraction method through short theoretical background of microwave heating. In addition, examples of application of microwaves for the isolation of some organic compounds from plant material were presented. It is also shown that the microwave extraction can be used in absence of solvent in solvent free microwave technique. The possibility of microwave extraction application in forensic examination of *Cannabis sativa* is presented by highlighting its simplicity and efficiency.