

CannaFamily

Souhrnná technická zpráva

Název projektu: Vývoj inovativní extrakčně-rafinační jednotky pro zpracování rostlinných materiálů pro lékařské účely.

Registrační číslo projektu (MS2014+): CZ.011.02/0.0/0.0/21_374/0027349

Číslo a název prioritní osy OP PIK: PO-1 „Rozvoj výzkumu a vývoje pro inovace“

Místa realizace projektu:

Žadatel - W.P.E., a.s.: objekt TESLA - Středulinského 26, 703 00 Ostrava - Vítkovice, Šámalova 14, 250 82 Horoušany

Partner - CannaFamily, a.s.: Nad Safinou II/365, 252 50 Vestec

Datum vydání: 27.8.2023

Autoři:

Ing. Petr Dřevíkovský
Jan Martin Paďouk, MSc, MBA
Ing. Petr Yilma, PhD.



Obsah:

1. Předmluva
2. Úvod
3. Podrobný průběh řešení projektu
 - 3.1 Metody
 - 3.2 Etapa I
 - 3.3 Etapa II
4. Zhodnocení dosažených výsledků
 - 4.1 Prototyp I
 - 4.2 Prototyp IV
 - 4.3 Prototypy II-IV - Možnosti zapojení dílčích jednotek
 - 4.4 Kvalita výstupů koncového využití vyvíjené technologie
 - 4.4.1 Chemická analýza
 - 4.4.1.1 Obsah fytoKANABINOIDŮ
 - 4.4.1.2 Metabolomický profil
 - 4.4.1.3 Obsah terpenů a terpenoidů
 - 4.4.1.4 Obsah reziduálních pesticidů
 - 4.4.1.5 Obsah těžkých kovů
 - 4.4.1.6 Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků
 - 4.4.1.7 Mikrobiologická analýza
 - 4.4.1.8 Obsah reziduálních rozpouštědel
 - 4.4.2 Farmakokinetika
 - 4.4.3 Toxicita
5. Závěrečné shrnutí
6. Seznam příloh, literárních zdrojů, obrázků a tabulek

1. Předmluva

Cílem této zprávy je poskytnou čtenáři ucelený obraz o postupu technického řešení projektu a logicky provázat jednotlivé aktivity a dílčí technické zprávy a protokoly. Tato technická zpráva vznikla v rámci projektu - "Vývoj inovativní extrakčně-rafinační jednotky pro zpracování rostlinných materiálů pro lékařské účely", registrační číslo CZ.01.1.02/0.0/0.0/21_374/0027349 za finanční podpory Ministerstva průmyslu a obchodu České republiky v rámci dotačního programu OPPIK.

2. Úvod

Cílem projektu byl vývoj technologie extrakce a rafinace biologicky aktivních výtažků z rostlin Cannabis Sativa L. a hlavními výstupy jsou dva funkční prototypy umožňující realizaci tohoto procesu v požadované kvalitě jak v laboratorním tak průmyslovém měřítku. Vedlejšími výstupy pak jsou dva dílčí prototypy sloužící k ověření technologie a vývoji koncového řídicího software v rámci průmyslového scale-upu. V souladu s principy efektivity a hospodárnosti byly dílčí prototypy

konstruovány tak aby bylo umožněno jejich napojení do koncové průmyslové jednotky a tím zároveň rozšířena míra její využitelnosti.

Problematika výroby konopných výtažků a jejich následného využití v lékařství a naturopatii spočívá především v komplikovaných možnostech standardizace výroby léčivých přípravků vzhledem k vysokému počtu farmakologicky aktivních látek v nich obsažených a současně jejich rozdílným terapeutickým účinkům ve vztahu k vzájemným poměrům (*Russo 2011*). Rostliny *Cannabis Sativa L.* mají navíc neobvykle silné bioakumulativní vlastnosti (*Rheay 2020*), což představuje silnou míru kontaminace rostlinného materiálu především toho který slouží jako surovina pro výrobu doplňků stravy. Tento problém se bohužel však často týká i květů konopí pro léčebné použití. Vývoj efektivních metod extrakce a rafinace farmakologicky aktivních látek z těchto rostlin je tak v době kdy je toto odvětví celosvětově na významném vzestupu nejen otázkou tržní příležitosti, ale především společenské nutnosti v rámci dalšího výzkumu terapeutického potenciálu těchto látek při souběžném zajištění ochrany veřejného zdraví. Vývoj technologie se tak primárně zaměřuje na tyto klíčové aspekty:

- efektivita a hospodárnost výrobního procesu
- zachování obsahu cílových aktivních látek v koncových produktech
- eliminace nežádoucích kontaminantů



Obrázek 1 - Průmyslová extrakčně-rafinační jednotka v kompletním zapojení v místě realizace žadatele v Horoušanech.

3. Podrobný průběh řešení projektu

3.1 Metody:

V rámci dosažení maximální efektivity a hospodárnosti činností výzkumu a vývoje při současné eliminaci rizik s nimi spojených vlivem řady neznámých byl v rámci řešení projektu jako nejkritičtější bod identifikována chemická analýza. Především pro svou vysokou nákladovost a možnou chybovost způsobenou obtížnou přípravou často nehomogenních vzorků rostlinných materiálů a tzv. rozšířenou nejistotou stanovenou dle analytu na 5-30 %. Tato potenciální překážka byla v rámci metodických postupů minimalizována především následujícími opatřeními:

- Všechny experimenty realizované v rámci laboratorního výzkumu a následného provozního testování všech prototypů byly provedeny triplicitně za účelem

vyloučení vzniku chyby jak v rámci aplikovaných postupů tak i výše popsaných limitací metod chemické analýzy.

- Po celou dobu řešení projektu bylo využíváno analytické instrumentace která je majetkem partnera projektu - společnosti CannaFamily, a.s. v podobě vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Díky tomuto opatření bylo možné realizovat řádově víc chemických analýz než kolik by umožňoval rozpočet projektu při pouhém využití služeb smluvního výzkumu. Služby akreditované analytické laboratoře pak byly využity pouze k ověření výsledků u vybraných vzorků což nejen výrazně snížilo náklady projektu při zachování vysoké validity výsledků, ale rovněž poskytlo konsorciu značnou flexibilitu v rámci plánování a realizace dílčích experimentů.

3.2 Etapa I:

Předmětem první etapy řešení projektu byl především laboratorní výzkum na základě jehož výsledků byly postupně definovány požadované parametry technologie potřebné pro dosažení její účinnosti dle zadání. Byly vyhodnoceny možnosti použití různých materiálů a způsobu provedení technologického transferu laboratorních metod do stavby prvních dílčích prototypů. Za účelem ověření procesů a reakčních podmínek byly nejprve navrženy a zkonstruovány modely dílčích částí technologie a ty byly podrobeny základnímu provoznímu testování za účelem zhodnocení jejich účinnosti a identifikace překážek v rámci jejich dalšího scale-upu. Na základě těchto činností pak byla vytvořena projekčně-technologická dokumentace sloužící k následné konstrukci prototypů.

Příprava podkladů a design experimentálních zkoušek:

Září - Říjen 2021

- Byla provedena literární a patentová rešerše za účelem identifikace vhodných laboratorních metod pro další zkoumání s důrazem na vyhodnocení úrovně stávající právní ochrany již existujících technologických celků tak aby nedošlo v rámci vývoje k jejímu porušení.
- Na základě literární rešerše byl stanoven normativ pro každý sledovaný faktor v rámci zkoumaných metod (kontrola).
- Byly stanoveny limitní obsahy pro sledované látky, a byly identifikovány primární kontaminanty.
- Veškeré výtažky získané při zkoumání jednotlivých faktorů byly srovnávány s kvalitativními parametry a výtěžností dosažené za použití stanovených normativů. Tato srovnání byla provedena na základě laboratorních protokolů a chemické analýzy.

- Byl zahájen design jednotlivých experimentů tak aby jejich výsledky umožňovaly přípravu podkladů pro tvorbu projekčně-technologické dokumentace dílčích komponent jednotlivých prototypů.
- Byl vybrán rostlinný materiál (*Cannabis Sativa L.*) určený k laboratornímu testování, ten byl formou chemické analýzy vyhodnocen z hlediska kvantifikace obsahu cílových látek a kontaminantů (Exp. č.: 1-15).

Vývoj a optimalizace extrakční a rafinační metody herbálních materiálů:

Listopad - Prosinec 2021:

- Na základě literární rešerše byly vybrány tři extrakční činidla s různou polaritou (hexane, ethanol, isopropylalkohol). Následně byly triplicitně provedeny pokusné extrakce za normativních podmínek teploty a tlaku (Exp. č.: 16-60 - celkem 45 zkoušek).
- Takto získané extrakty byly podrobeny chemické analýze a byly kvantifikovány hlavní cílové látky a kontaminanty.
- Byla provedena metabolomická analýza a byly identifikovány hlavní přednosti a nedostatky použití jednotlivých extrakčních činidel, tyto závěry byly podloženy literární rešerší zaměřenou na biologickou aktivitu jednotlivých metabolitů.
- Po stránce zachování původního metabolického profilu se jako nejúčinnější jevílo použití EtOH. Koncentrace hlavních sledovaných látek, však nedosahovaly ani v jednom z opakování stanovených minimálních hodnot.

Leden - Únor 2022:

- V rámci určení dalšího směru výzkumu bylo rovněž třeba stanovit reakční podmínky umožňující recyklaci použitého rozpouštědla a to bez indukce zásadních změn v rámci obsahových látek v získaném biologicky aktivním výtažku. Tyto zkoušky proběhly triplicitně pro každé použité činidlo zvláště za použití 4 různých reakčních podmínek (Exp. č.: 61-132 - celkem 72 zkoušek). Vyhodnocení těchto experimentů ukázalo, že výsledky dosažené za použití ethanolu a hexanu by bylo možné považovat po stránce zachování původního metabolického profilu za srovnatelné. U obou rozpouštědel bylo nejlepších výsledků v tomto ohledu dosaženo při aplikaci vysokého podtlaku (tzv. Vakuovou destilací při stálém míchání). U isopropylalkoholu pak ovšem byla i při aplikaci této metody pozorována nežádoucí izomerizace sledovaných látek pravděpodobně vlivem aplikace vyšší teploty potřebné pro kompletní remediaci tohoto extrakčního činidla, o jehož využití z tohoto důvodu nebylo dále uvažováno.
- Získané výtažky byly v tomto momentě rovněž podrobeny chemické analýze za účelem kvantifikace reziduí použitých rozpouštědel. Jak se ukázalo metody vykazující nejlepší výsledky po stránce zachování metabolického profilu měly za následek měřitelné reziduální hladiny těchto látek v koncovém

produktu. Tato skutečnost se stala zásadní překážkou pro další využití hexanu především pro jeho neurotoxické vlastnosti. Jediným činidlem vykazujícím odpovídající výsledky zachování poměru a formy obsahových látek při současném udržení nízké toxicity koncového produktu se tak stal ethanol.

Březen - Duben 2022:

- Zvolené činidlo (ethanol) však v předchozích experimentálních zkouškách nedosahovalo požadovaných výsledků po stránce koncentrace hlavních cílových látek v získaném extraktu. Za účelem dosažení požadovaných výsledků v tomto ohledu tak byly navrženy navazující experimenty za použití 4 rozdílných reakčních teplot. Pokusy byly realizovány triplicitně na 3 vzorcích rostlinného materiálu (Exp. č.: 133-168 - celkem 36 zkoušek).
- Výsledky jasně ukázaly, že vyšší teplota rozpouštědla má za následek vyšší výtěžnost extrakce ovšem na úkor snížené koncentrace hlavních sledovaných látek. Tento jev byl vyhodnocen jako nežádoucí a další pokusy tak směřovaly ke stanovení ideální extrakční teploty na spodní hranici testované škály. Pokusy byly opět realizovány triplicitně na 3 vzorcích rostlinného materiálu (Exp. č.: 169-204 - celkem 36 zkoušek).
- Optimální reakční teplota extrakce byla stanovena na - 33 °C.

Květen - Červen 2022:

- Pro stanovenou reakční teplotu bylo dále třeba stanovit tlak v extrakční nádobě / rychlost průtoku použitého rozpouštědla. Nízký tlak a s tím spojená prodloužená expozice rostlinného materiálu extrakčnímu činidlu způsobila pravděpodobně i z důvodu zvýšení reakční teploty podobně jako v předchozím případě vyšší výtěžnost celého procesu na úkor snížené koncentrace hlavních sledovaných látek a zvýšení obsahu nežádoucích lipidů (Exp. č.: 205-231 - celkem 27 zkoušek). Závěrem tedy bylo nejen doporučení na aplikaci vysokého podtlaku a minimalizace času expozice materiálu v extrakční nádobě ale rovněž její aktivní chlazení pro dosažení optimálních výsledků.
- Na základě literární rešerše byl naplánován pokus aplikace ultrazvukového homogenizátoru v procesu extrakce. Výsledkem byl výtažek snížené denzity s odlišným metabolickým profilem oproti kontrole (Exp. č.: 232-249 - celkem 18 zkoušek). Tento jev byl vyhodnocen jako negativní a od implementace do koncové technologie bylo dočasně upuštěno. Provedená literární rešerše však dala základ předpokladu, že aplikace této technologie by mohla zvyšovat biologickou dostupnost koncového preparátu. Časový a finanční plán realizace projektu však pro bližší studování tohoto jevu neposkytoval dostatek projektu. Závěrem této části výzkumu tak pro konsorcium byla identifikace nových výzkumných cílů pro navazující práci v rámci rozvoje a optimalizace vyvíjené technologie.

Červenec - Září 2022:

- V rámci přípravy rostlinných materiálů určených k extrakci byl zkoumán především vliv obsahu H₂O. Pokusy jasně ukázaly, že materiál s vyšším obsahem vody vykazoval v procesu extrakce celkově nižší výtěžnost (Exp. č.: 250-276 - celkem 27 zkoušek). Aplikace vysoké teploty za účelem sušení však způsobila ztrátu některých klíčových látek (přesněji terpenů a terpenoidů). Výsledkem pokusů tedy byla doporučení v rámci metodiky přípravy materiálů určených k extrakci na kompletní eliminaci zbytkové vody aplikací teploty nepřesahujících 30 °C.
- Dále byl v rámci přípravy rostlinných materiálů určených k extrakci zkoumán vliv velikosti jeho extrahovaných částí (hrubosti materiálu na vstupu). Byly aplikovány tři různé hrubosti za použití průmyslové techniky určené k mletí rostlinných materiálů a realizovány triplicitní pokusy na třech různých typech vstupního materiálu (Exp.: 277-303 - celkem 27 zkoušek). Pokusy ukázaly že nejlepšími výsledky bylo dosaženo s nejjemněji zpracovaným vstupním materiálem. Tento způsob zpracování ovšem mírně prodlužoval extrakční čas a tím i délku expozice extrakčnímu činidlu, tento potenciální problém byl zcela odstraněn zvýšením negativního tlaku v extrakční nádobě. Díky těmto pokusům byl rovněž zvolen optimální materiál sloužící jako mechanický filtr částic na výstupu z extrakční nádoby.

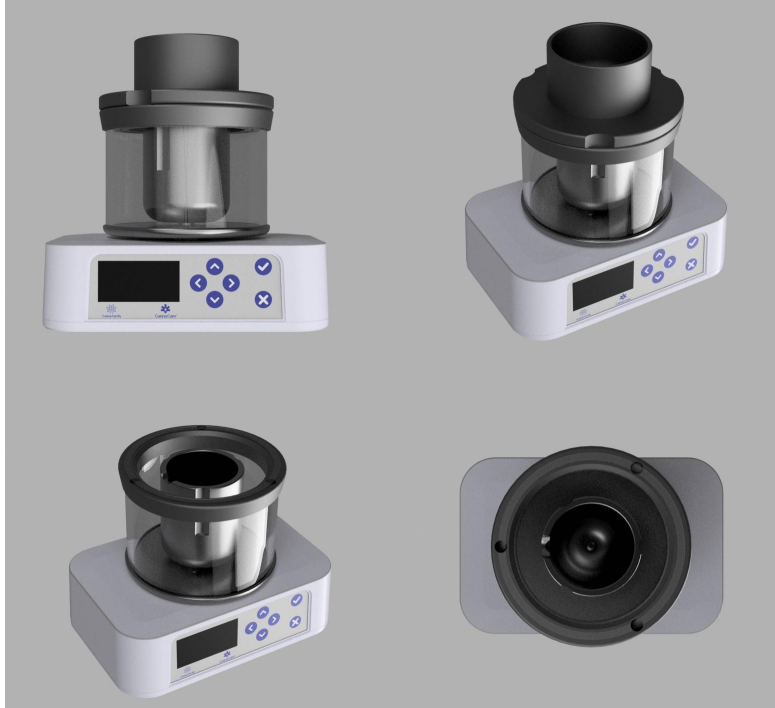
Říjen - Prosinec 2022:

- Jedním z největších úkolů v rámci laboratorního výzkumu, kterému doposud nebyla ani v zahraničí věnována patřičná pozornost byly metody rafinace získaných výtažků za účelem úplné eliminace přirozených kontaminantů. Pozornost byla zaměřena především na ty které představují zásadní riziko pro lidské zdraví a zároveň je jejich přítomnost ve vysokých hladinách v rostlinách Cannabis Sativa L. zcela běžná až nevyhnutelná především díky jejich silným bioakumulativním vlastnostem. Limitní obsahy těchto látek jsou ve výrobcích určených k lidské spotřebě stanoveny zákonem, minimálním cílem pokládaným za úspěch tak bylo naplnění těchto zákonných limitů. Jako největší překážkou v rámci naplnění tohoto cíle se ukázala eliminace některých polycyklických aromatických uhlovodíků, ze všech nejvíce se pak jednalo o Chrysene, který se nepodařilo odstranit žádnou z původně zamýšlených metod. Celkem bylo triplicitně testováno 5 vzorků, 4 sorbenty za aplikace 2 reakčních podmínek jejichž kombinace vedla k úspěšnému naplnění cílů (Exp. č.: 304-423 - celkem 120 zkoušek).
- Pro potřeby finalizace podkladů pro projekčně-technologickou dokumentaci sloužící ke stavbě finálních prototypů byly ještě reakční podmínky (tlak a teplota) blíže specifikovány navazujícím experimentem (Exp. č.: 424-441 - celkem 18 zkoušek).

- Zvolená metoda však vyžadovala přidání rafinačního reaktoru a celý proces výrazně zkomplikovala, a prakticky znemožnila jeho automatizaci v rámci vývoje Prototypu I (extrakčně-rafinační jednotky laboratorních rozměrů) aniž by došlo k zásadnímu navýšení výrobní ceny prototypu jakož i náročnosti na jeho dlouhodobou údržbu. Tento problém byl elegantně vyřešen úpravou návrhu prototypu tak aby extrakční nádoba sloužila rovněž jako filtrační jednotka použitých sorbentů a sběrná nádoba rovněž jako rafinační reaktor. Tato úprava sice znamená nutnost zásahu operátora v průběhu procesu výroby výtažku, nicméně zajistila plnou funkčnost prototypu při udržení předpokládaných výrobních nákladů a současně nízké náročnosti na údržbu zařízení. V tomto duchu byl později navržen i software a uživatelské rozhraní, které operátora bezpečně provede celým procesem. Vzhledem k tomu, že konsorcium považuje za hlavní cílovou skupinu zákazníků pro toto zařízení lékárnské a laboratorní provozy zaměstnávající vysokoškolsky vzdělané operátory, nebylo toto odchýlení od původního záměru identifikováno jako problematické.
- V rámci vývoje a stavby Prototypu IV (extrakčně-rafinační jednotky průmyslových rozměrů) pak bylo navrženo lineární zapojení rafinačního reaktoru, dávkovače sorbentů a filtrační jednotky do soustavy tak aby byl umožněn zcela automatizovaný provoz dle původního záměru řešitelského týmu.

Prosinec 2022 - Leden 2023:

- Byl ukončen základní laboratorní výzkum a získané poznatky byly vyhodnoceny a převedeny do souboru reakčních podmínek a metodických výrobních postupů kterým musí technologie a použité materiály vyhovovat.
- Tyto postupy nemohly být nadále ověřeny před stavbou finálního prototypu dostupnou laboratorní technikou, proto byly dílčí části finální technologie navrženy samostatně a partnerem projektu postupně testovány na modelových dílech postavených společností W.P.E.
- Byly provedeny simulace a 3D modeling dílčích částí. Speciální pozornost byla věnována extrakční komoře pracující ve značném podtlaku u které bylo výběr materiálu i přes úspěšné simulace nutno upravit po zničení prvních dvou modelů už při jejich prvním testování (viz obrázek 3).
- Na základě vyhodnocení a optimalizace partnerem testovaných modelů dílčích částí extrakční a rafinační jednotky byly vytvořeny podklady pro tvorbu finální projekčně-technologické dokumentace.



Obrázek 2 - Původní návrh Prototypu I vytvořený na základě provozních simulací zahrnujících vlastnosti použitých materiálů před testováním modelového dílu extrakčního tubusu.



Obrázek 3 - Modelový díl extrakčního tubusu Prototypu I po testování provozních

podmínek.

3.3 Etapa II:

Druhá etapa projektu byla věnována především přípravě projekčně-technologické dokumentace a stavbě všech finálních prototypů včetně scale-upu technologie, jejímu provoznímu testování a optimalizaci vyvíjených komponent, jak po hardwarové tak softwarové stránce. Byly vyhodnoceny výsledky a stanoveny další cíle za účelem navazujícího vývoje, certifikace a uvedení zařízení na trh.

Únor - Březen 2023

- Byla navržena finální podoba Prototypu I, pro jehož konstrukci byl provedený laboratorní výzkum dostačující. Především z důvodu upuštění od plné automatizace procesu eliminace nežádoucích kontaminantů byl další vývoj směřován především na návrh řešení ovládacího software a s tím spojeného uživatelského rozhraní (viz výše).
- V rámci naplnění původního záměru konsorcia byl v poslední fázi vývoje do Prototypu I zakomponován návrh technologického řešení zpracování vyrobeného extraktu do koncové lékové podoby s jasně stanoveným dávkováním (koncentrací) individuálně pro každou výrobní šarži na základě zvážení s přesností na jednotky mg a následného smíchání s požadovaným nosičem (např. Triglyceridy, Polyethylene / polypropylene glycol, kakaové máslo a další farmaceutické suroviny).
- Prototypy II a III pak byly z důvodu komplikovanosti automatizace procesu rafinace navrženy tak aby jejich konstrukce umožnila ověření účinnosti technologie před scale-upem do průmyslového rozměru. Z technologického hlediska tak byly použity všechny základní rysy návrhu konstrukce Prototypu IV a tyto tři jednotky jsou zcela kompatibilní.

Duben - Květen 2023:

- Byla provedena stavba a první provozní testování Prototypu I. za použití 3 různých vzorků rostlinného materiálu (Exp. č.: 442-468 - celkem 27 zkoušek) Výsledky byly velice uspokojivé a na technologii byly provedeny jen minoritní úpravy a optimalizace software.
- V rámci provozního testování Prototypu I byla detailně vyvinuta a popsána metoda dekarboxylace kanabinoidních kyselin (viz níže Obrázek 25).
- Na základě srovnání s v zahraničí komerčně dostupným fenolovým extraktem na úrovni aktivní farmaceutické ingredience bylo provedeno ověření možností dalších rafinačních metod pro odstranění nežádoucích složek v podobě rostlinných barviv. Úspěšného odstranění všech vizuálně nežádoucích složek se

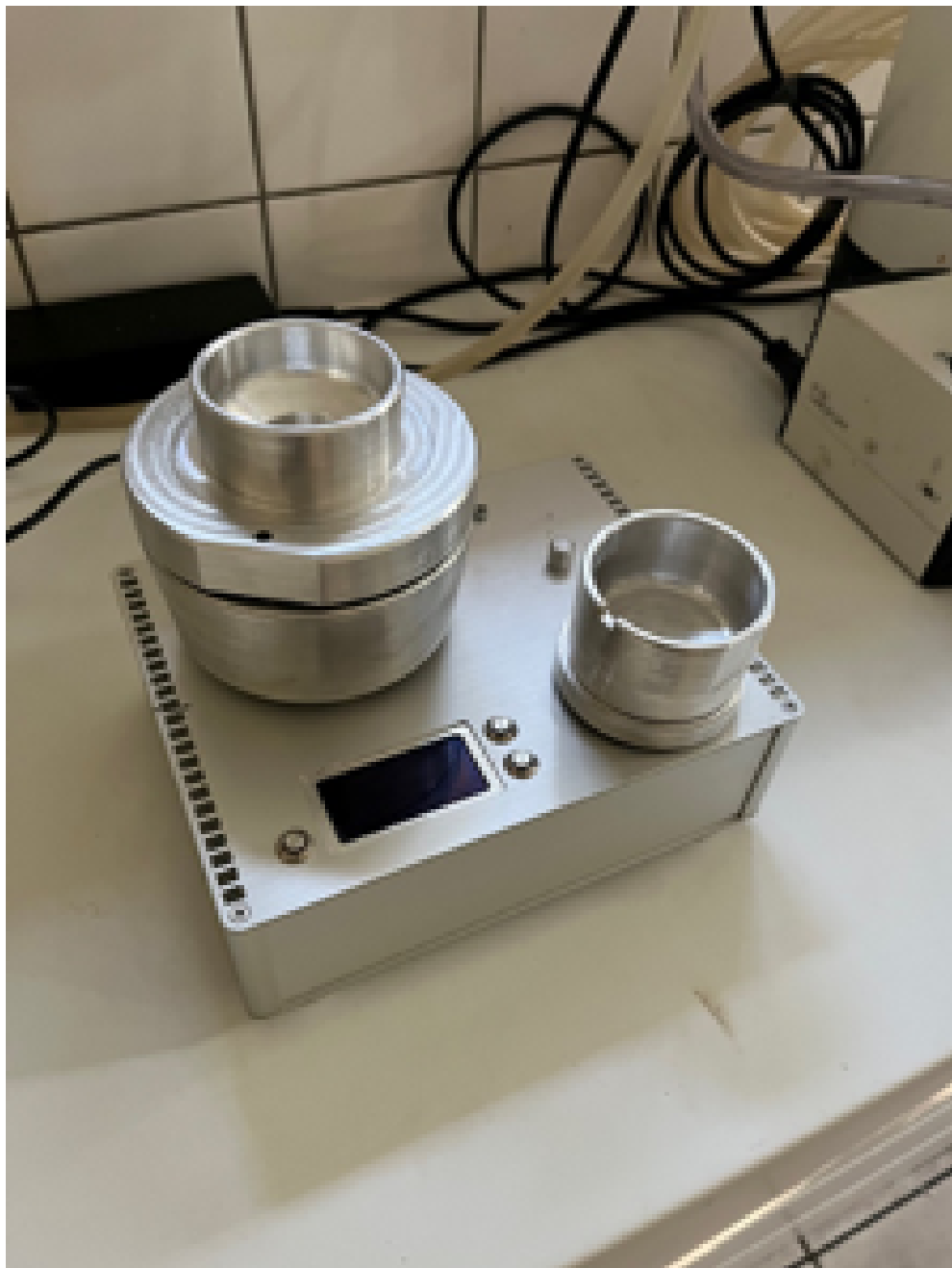
však nepodařilo dosáhnout při zachování složení použité mobilní fáze pro rafinaci, která byla jinak po všech stránkách zcela vyhovující. Na základě tohoto zjištění tak byly identifikovány další výzkumné cíle do budoucna, které by nebylo možné naplnit v rámci časového a finančního plánu činností výzkumu a vývoje realizovaných v souvislosti s řešením projektu.

- Byla provedena stavba a první provozní testování Prototypů II a III (Exp. č.: 469-513 - celkem 45 zkoušek). Z pokusů vyplynulo, že kritickým bodem je vzdálenost obou prototypů od sebe, především z důvodu velkých ztrát v rámci transportu mezi extrakční nádobou a rafinačním reaktorem ke kterému dochází stále ještě hluboko pod bodem mrazu. Z toho důvodu byly jednotky pro další testování naistalovány na společnou rámovou konstrukci minimalizující tuto vzdálenost (viz níže obrázek 5).
- První rostlinné výtažky získané v rámci tohoto provozního testování byly použity pro zahájení zrychlené stabilitní studie, testů toxicity a popisu farmakokinetických vlastností.
- V rámci navazujícího provozního testování dílčích Prototypů II a III byla provedena optimalizace extrakčních a rafinačních metod (Exp. č.: 514-521 - celkem 8 zkoušek).
- V rámci scale-upu byla zavrhnuta původní myšlenka zdroje hnací síly pro transport rozpouštědla v podobě čerpadla, především z důvodu limitace provozní teploty čerpané kapaliny, což při testování v požadovaném objemu způsobilo překročení maximální reakční teploty extrakce. Tento problém byl odstraněn implementací nádoby na tlakový vzduch který se stal hnací silou pro celý proces průmyslové jednotky (viz obrázek 12).
- Testování dále ukázalo, že použití sorbentů zvolených na základě laboratorního výzkumu vykazuje zásadní provozní nedostatek po stránce údržby neboť sorbenty představují špatně odstranitelnou mechanickou nečistotu v rafinačním reaktoru jakož i transportním potrubí. Za účelem odstranění tohoto potenciálního problému byly navrženy rafinační zásobníky na bázi mobilní fáze umožňující přesné dávkování a následnou separaci použitých sorbentů aniž by došlo ke snížení jejich účinnosti prokázané laboratorním výzkumem (viz níže obrázek 17).
- Tato skutečnost ovšem představovala výrazné zvětšení vzdálenosti mezi extrakční nádobou a destilační kolonou umožňující recyklaci použitého rozpouštědla, to mělo za následek navýšení tzv. mrtvého objemu vedení a stím spojené ztráty ve výrobě. Situace byla vyřešena snížením průměru transportního potrubí a úpravou složení mobilní fáze.

Květen - Červen 2023:

- Dekarboxylační jednotka byla implementována do reaktoru sloužícího k recyklaci extrakčního činidla (obrázek 16) a je samostatně ovladatelná pomocí centrální řídicí jednotky a souvisejícího software.

- V rámci realizace scale-upu bylo zjištěno že stávající chladicí výkon zásobníku na rozpouštědlo není dostatečný pro udržení reakční teploty extrakce při stávajícím objemu průmyslové extrakční nádoby. Za tím účelem byly navrženy a zkonstruovány zásobníky s vyšším chladicím výkonem zároveň umožňující sběr recyklovaného rozpouštědla do separátní nádoby (viz obrázek 17). Tento přístup je v souladu se správnou výrobní praxí a umožňuje recyklaci rozpouštědla v rámci jedné výrobní šarže.
- Bylo realizována tlaková zkouška a následné provozní testování Prototypu IV (Exp. č.: 522-584 - celkem 63 zkoušek), v rámci kterého byly optimalizovány reakční podmínky a s tím související řídicí software který je součástí řídicí jednotky.
- Byla zpracována studie proveditelnosti separace těkavých biologicky aktivních látek (terpenů a terpenoidů) při recyklaci použitého rozpouštědla a jejich následné introdukce zpět do získaného extraktu za účelem zvýšení jeho kvality. Tento cíl se ukázal jako realizovatelný nicméně za předpokladu dalších technologických úprav stávající destilační kolony a s tím související optimalizace řídicího softwaru. Konsorcium se této problematice hodlá nadále věnovat ještě před uvedením zařízení na trh.
- Byly naplánovány další kroky vedoucí k certifikaci zařízení a jeho uvedení na trh.
- Byly vyhodnoceny výsledky výzkumu s ohledem na jejich další využitelnost v rámci marketingu k podpoře prodeje zařízení po jeho uvedení na trh.



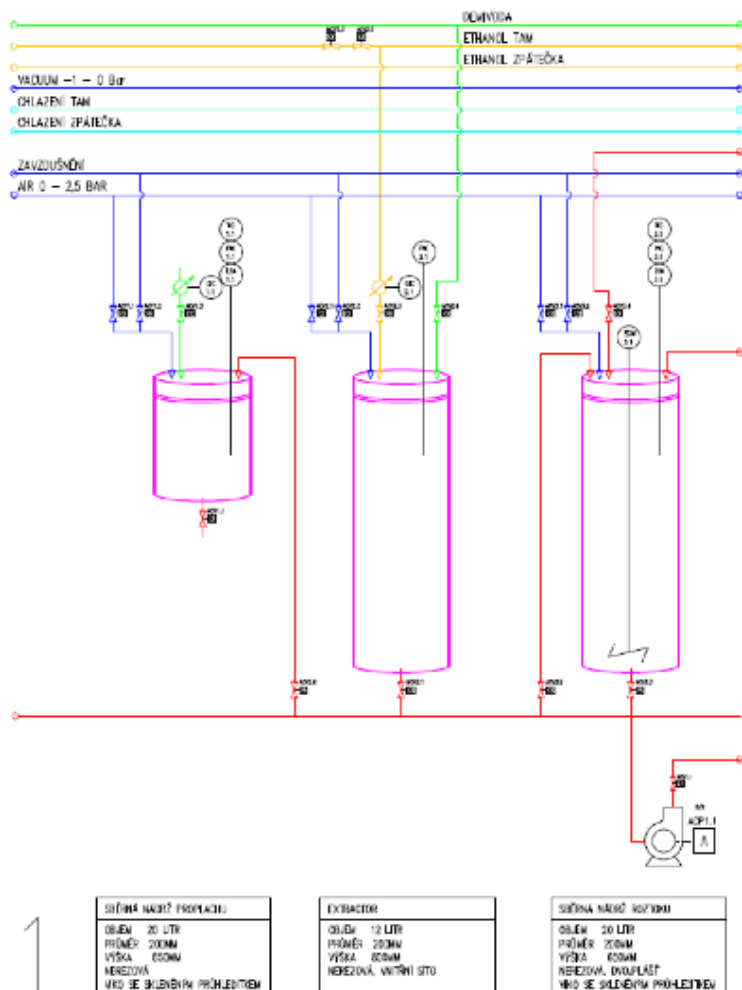
Obrázek 4 - Finální verze Prototypu I (extrakčně-rafinační jednotka laboratorních rozměrů) v laboratoři Partnera projektu.



Obrázek 5 - Dílčí Prototypy II a III instalované na společné rámové konstrukci. Zleva: zásobník na proplach, extrakční nádoba malá a rafinační reaktor.

Popis uspořádání:

Extraktor je tvořen vlastní extrakční nádobou s konickým dnem. Nádoba je dvouplášťová s chlazeným pláštěm. Do nádoby se vkládá 5um filtrační sáček naplněný rostlinným materiálem, který chceme extrahovat. Do extrakční nádoby je zaveden chlazený ethanol ze zásobníku chlazeného ethanolu. Po naplnění celého objemu extraktoru chlazeným ethanolem, je z extraktoru podtlakem odsáván nasycený ethanol do sběrné nádrže roztoku. Po ukončení této fáze a získání požadovaného roztoku je možno do extraktoru pomocí podtlaku nasávat vodu, za účelem propláchnutí vyextrahovaného rostlinného materiálu do sběrné nádrže proplachu. Tento proplach zajistí maximální vytěžení ethanolu z rostlinného materiálu a zároveň snižuje riziko manipulace z rostlinným materiálem nasyceným ethanolem.

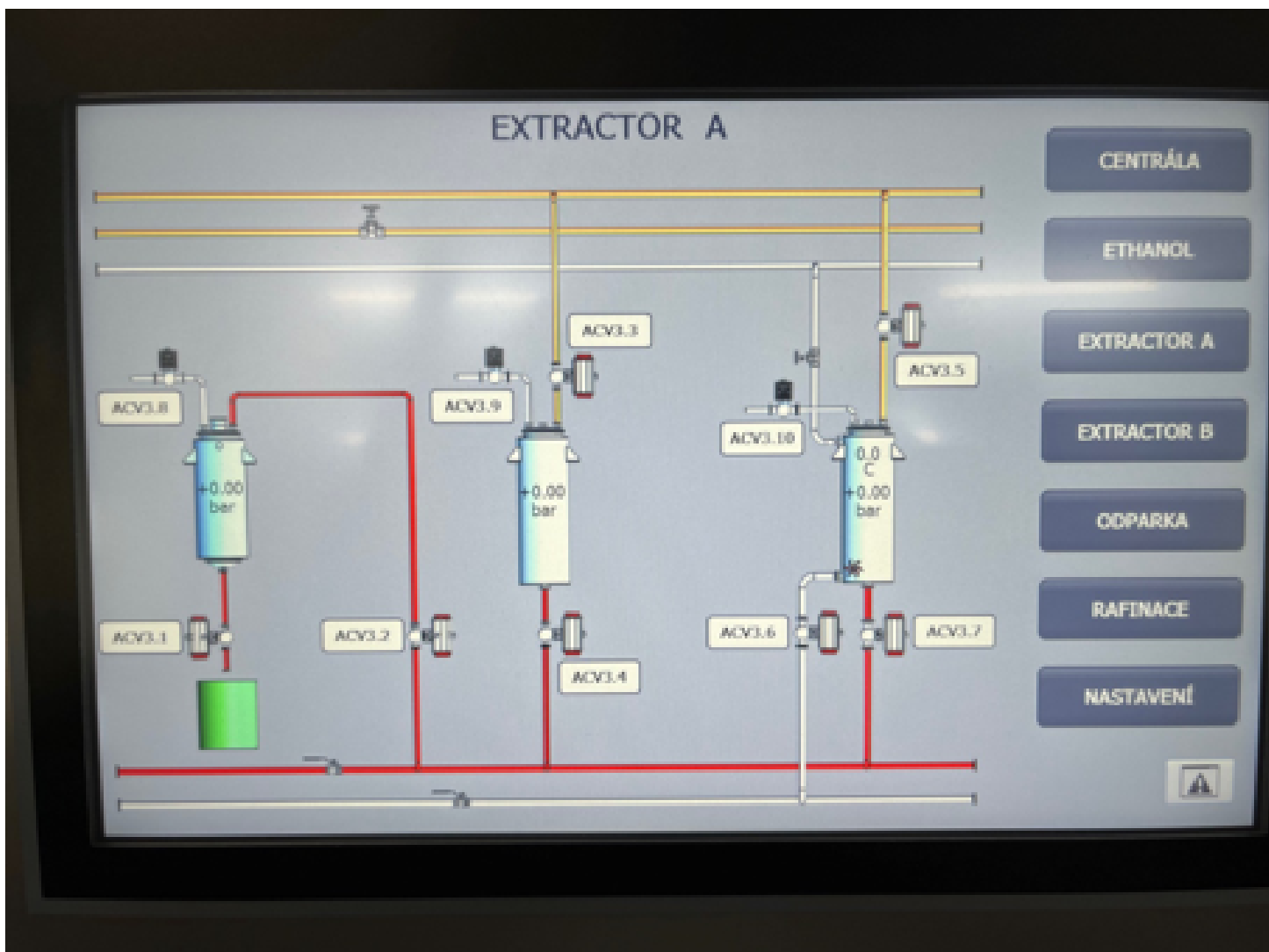


Obrázek 6 - Technologické schéma zapojení dílčích Prototypů II a III.

Popis ovládání:

Extraktor je vybaven vlastním řídicím systémem Simatic S7/1200 . Celý řídicí systém je uspořádán do síťové architektury, kdy jsou všechny jednotky, které si uživatel nakombinuje, zapojeny na sběrnice systém médií a na centrálním ovládacím panelu je možno potom obsluhovat celou vlastní sestavu zařízení.

Ovládání je buďto plně autonomní, ruční nebo je možno vytvořit sekvence jednotlivých kroků celého postupu W-E-R-D-DC (winterizace - extrakce – rafinace – destilace - dekarboxylace).



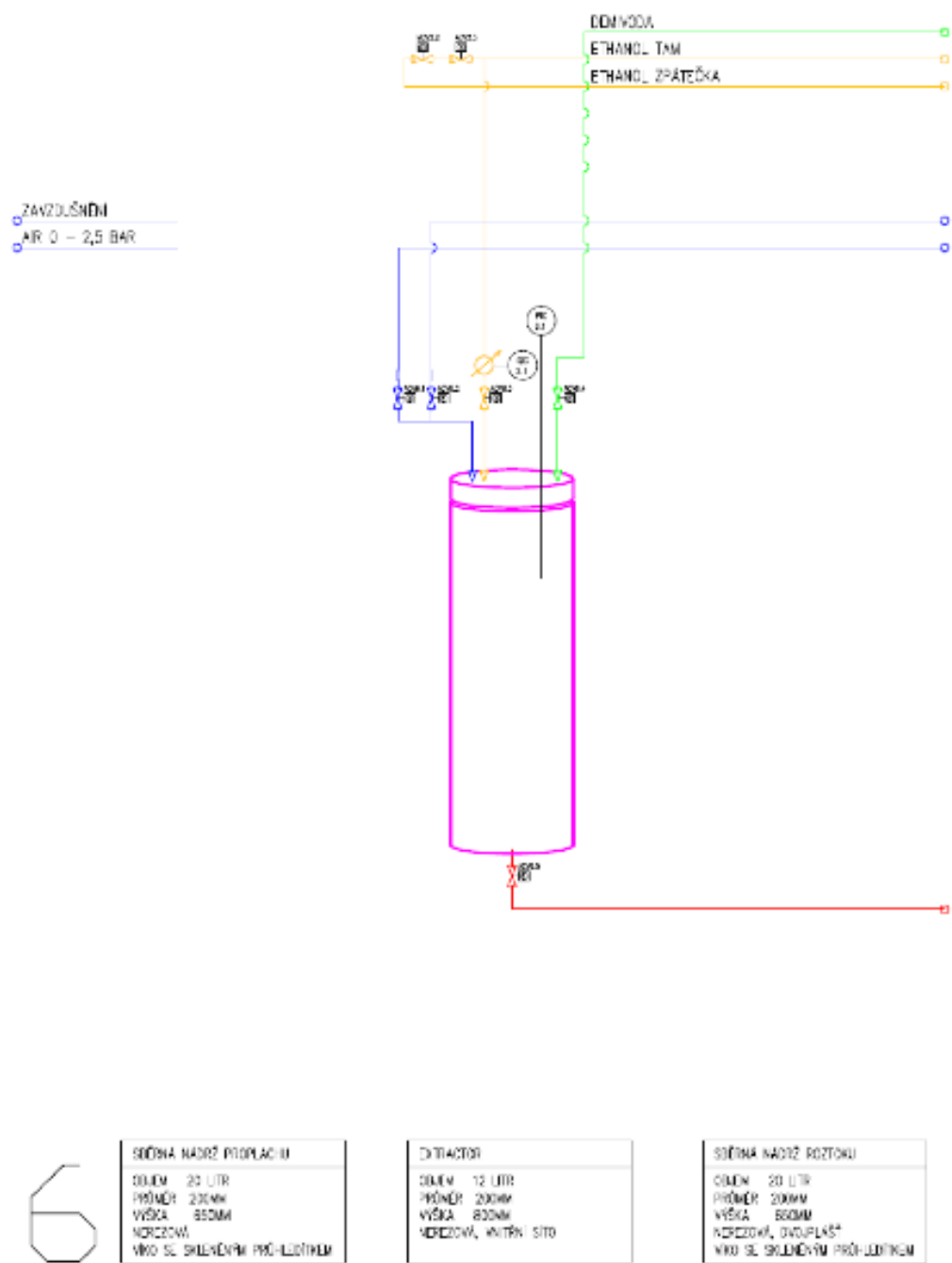
Obrázek 7 - Ovládací obrazovka se software umožňujícím regulaci zapojení dílčích Prototypů II a III.



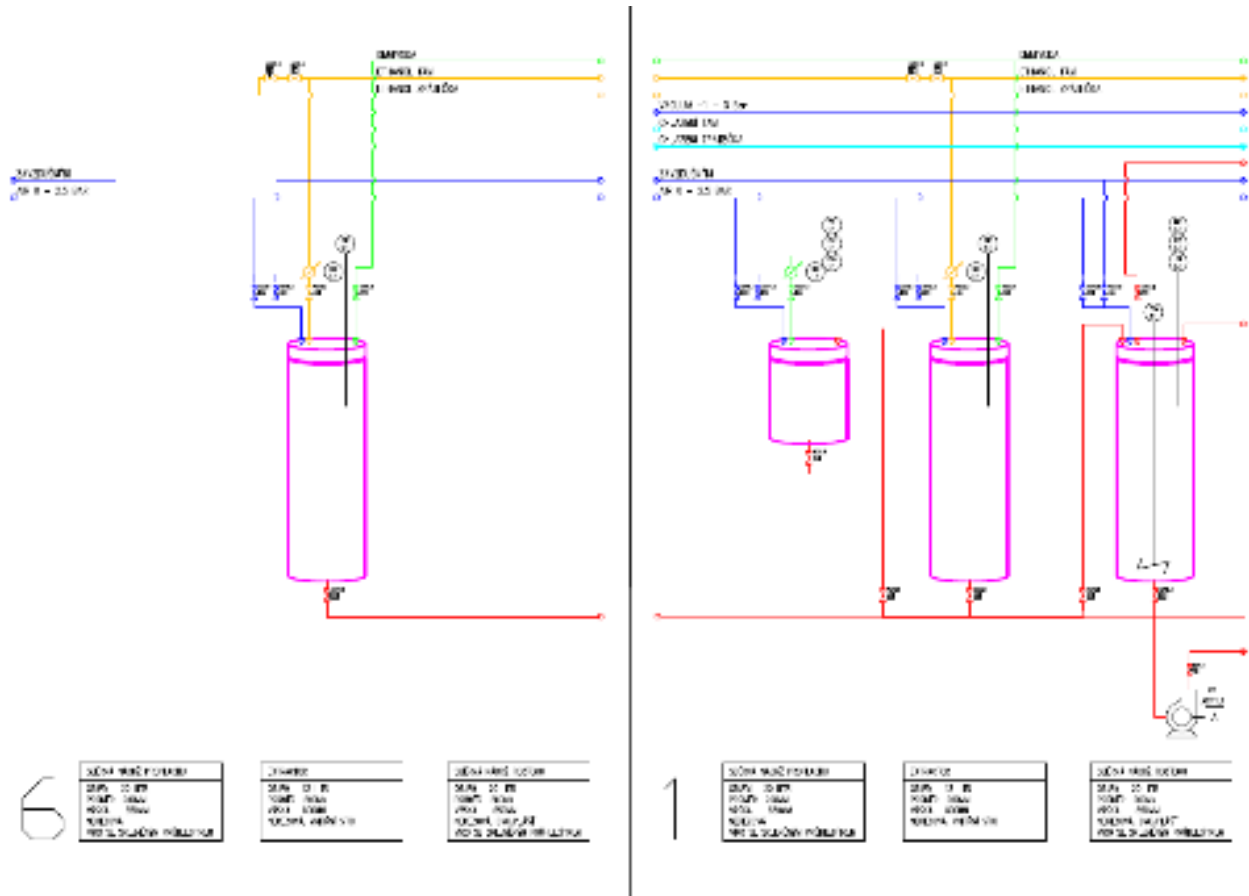
Obrázek 8 - Na levé straně Extraktor B - velikostně opovídající průmyslovému využití.

Popis uspořádání:

Extraktor je tvořen vlastní extrakční nádobou s konickým dnem. Extrakční nádoba má větší objem a je určena pro až 56 litrů rostlinného materiálu. Je připojená k modulu malého extraktoru a využívá zásobník proplachu. Do nádoby se vkládá 5um filtrační sáček naplněný rostlinným materiálem, který chceme extrahovat. Do extrakční nádoby je zaveden chlazený ethanol ze zásobníku chlazeného ethanolu. Po naplnění celého objemu extraktoru chlazeným ethanolem, je z extraktoru podtlakem odsáván nasycený ethanol do sběrné nádrže roztoku.



Obrázek 9 - Technologické schéma průmyslového Extraktoru B.

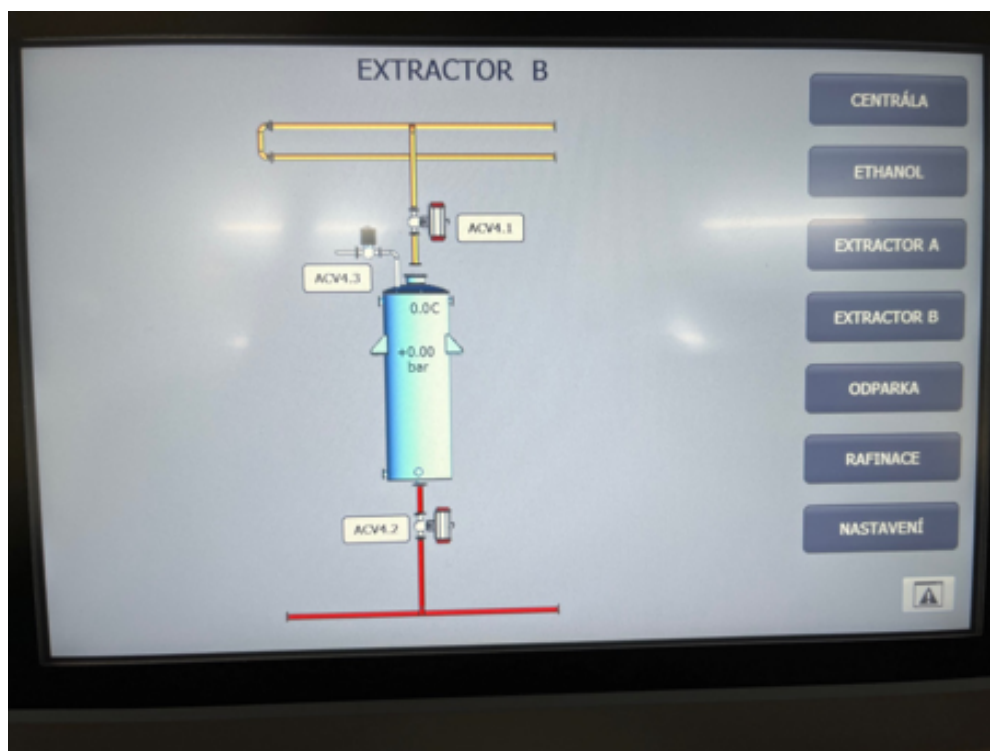


Obrázek 10 - Technologické schéma zapojení průmyslového Extraktoru B do sběrnicevého systému.

Popis ovládání:

Extraktor je vybaven vlastním řídicím systémem Simatic S7/1200 . Celý řídicí systém je uspořádán do síťové architektury, kdy jsou všechny jednotky, které si uživatel nakombinuje, zapojeny na sběrnicevý systém médií a na centrálním ovládacím panelu je možno potom obsluhovat celou vlastní sestavu zařízení.

Ovládání je buďto plně autonomní, ruční nebo je možno vytvořit sekvence jednotlivých kroků celého postupu W-E-R-D-DC (winterizace - extrakce - rafinace - destilace - dekarboxylace).



Obrázek 11 - Ovládací obrazovka se software umožňujícím regulaci reakčních podmínek průmyslového Extraktoru B.



Obrázek 12 - Uprostřed nádoba na tlakový vzduch sloužící jako hnací síla pro

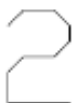
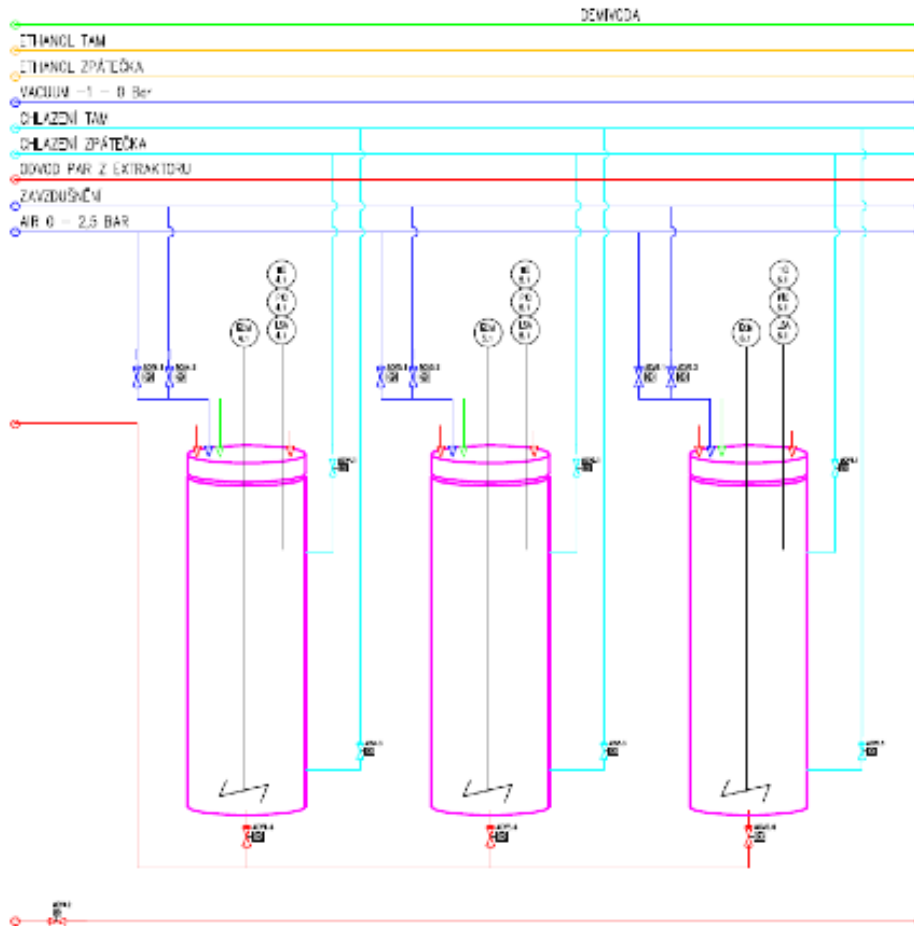
transport rozpouštědla v teplotách hluboko pod bodem mrazu.



Obrázek 13 - Rafinační jednotka na bázi mobilní fáze.

Popis uspořádání:

Rafinační zařízení je tvořeno zásobníky vlastních rafinačních činidel. Ta jsou připravována a skladována samostatně. Zásobníky jsou dvouplášťové s chlazeným pláštěm. Do každého zásobníku je zaveden ethanol ze zásobníku ethanolu. Po extrakci je možno z jednotlivých zásobníků pomocí podtlaku nebo přetlaku načerpat postupně jednotlivá rafinační činidla do reaktoru. Po proběhnutí procesu čištění je možno suspenzi odčerpat na externí komorový filtr a odtud do odparky pro odstranění ethanolu.



ZÁSOBNÍK RAFINAČNÍ ČÍSLU 1
OBJEM 20 LITR
PRŮMĚR 200MM / 200MM
VÝŠKA 800MM
NICEROZOVÝ DVOUTĚM PLÁŠŤM
MICHAELO

ZÁSOBNÍK RAFINAČNÍ ČÍSLU 2
OBJEM 20 LITR
PRŮMĚR 200MM / 200MM
VÝŠKA 800MM
NICEROZOVÝ DVOUTĚM PLÁŠŤM
NIC-ALUB

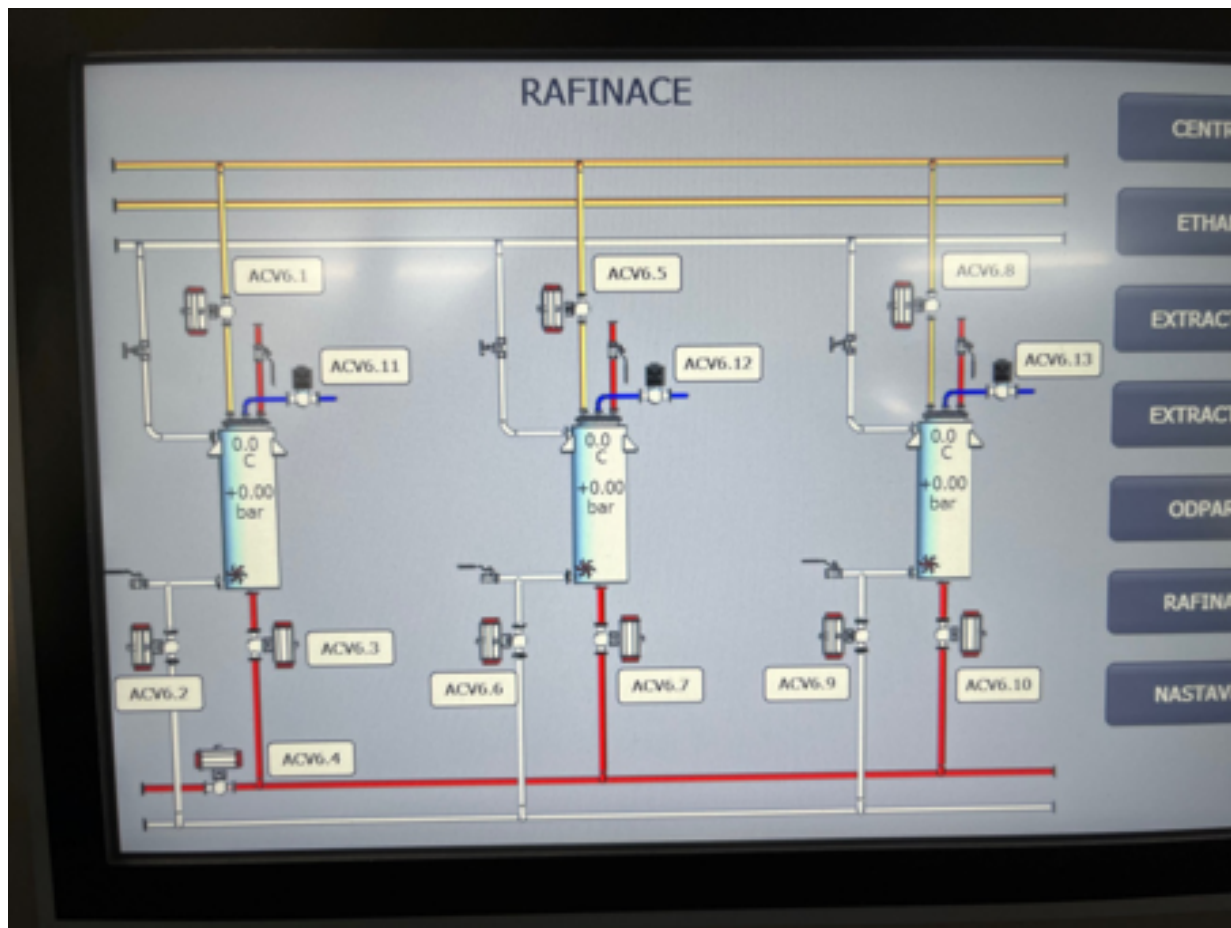
ZÁSOBNÍK RAFINAČNÍ ČÍSLU 3
OBJEM 20 LITR
PRŮMĚR 200MM / 200MM
VÝŠKA 800MM
NICEROZOVÝ DVOUTĚM PLÁŠŤM
MICHAELO

Obrázek 14 - Technologické schéma zapojení rafinační jednotky na bázi mobilní fáze.

Popis ovládání:

Rafinační jednotka je vybavena vlastním řídicím systémem Simatic S7/1200. Celý řídicí systém je uspořádán do síťové architektury, kdy jsou všechny jednotky, které si uživatel nakombinuje, zapojeny na sběrníkový systém médií a na centrálním ovládacím panelu je možno potom obsluhovat celou vlastní sestavu zařízení.

Ovládání je buďto plně autonomní, ruční nebo je možno vytvořit sekvence jednotlivých kroků celého postupu W-E-R-D-DC (winterizace - extrakce – rafinace – destilace - dekarboxylace).



Obrázek 15 - Ovládací panel se software umožňujícím regulaci procesu rafinace za pomoci mobilní fáze.



Obrázek 16 - Vakuová odparka se speciálním reaktorem umožňujícím dekarboxylaci

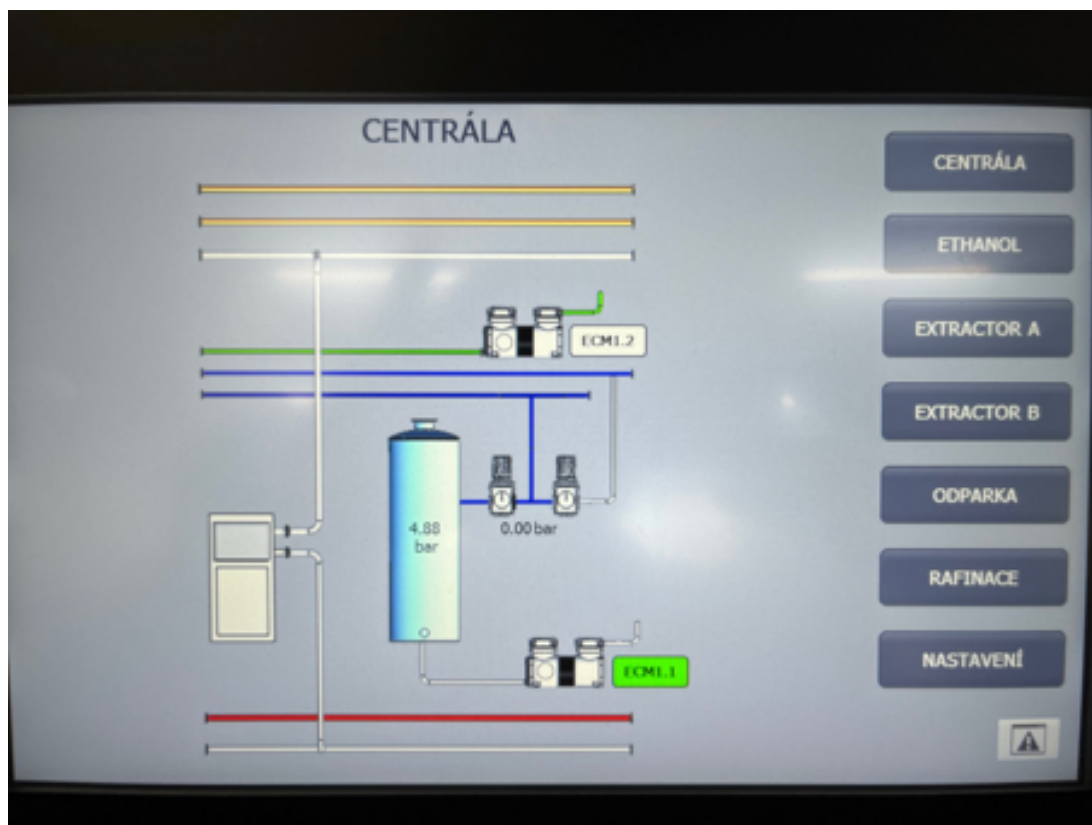
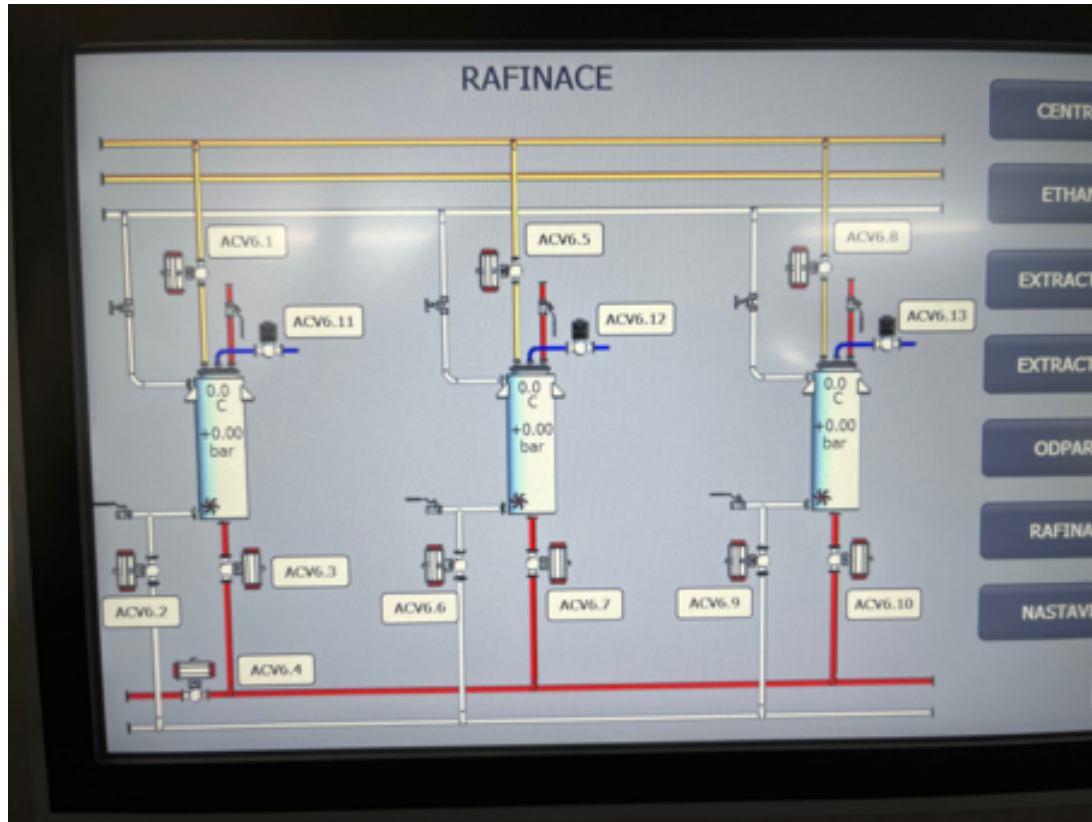
kanabinoidních kyselin.

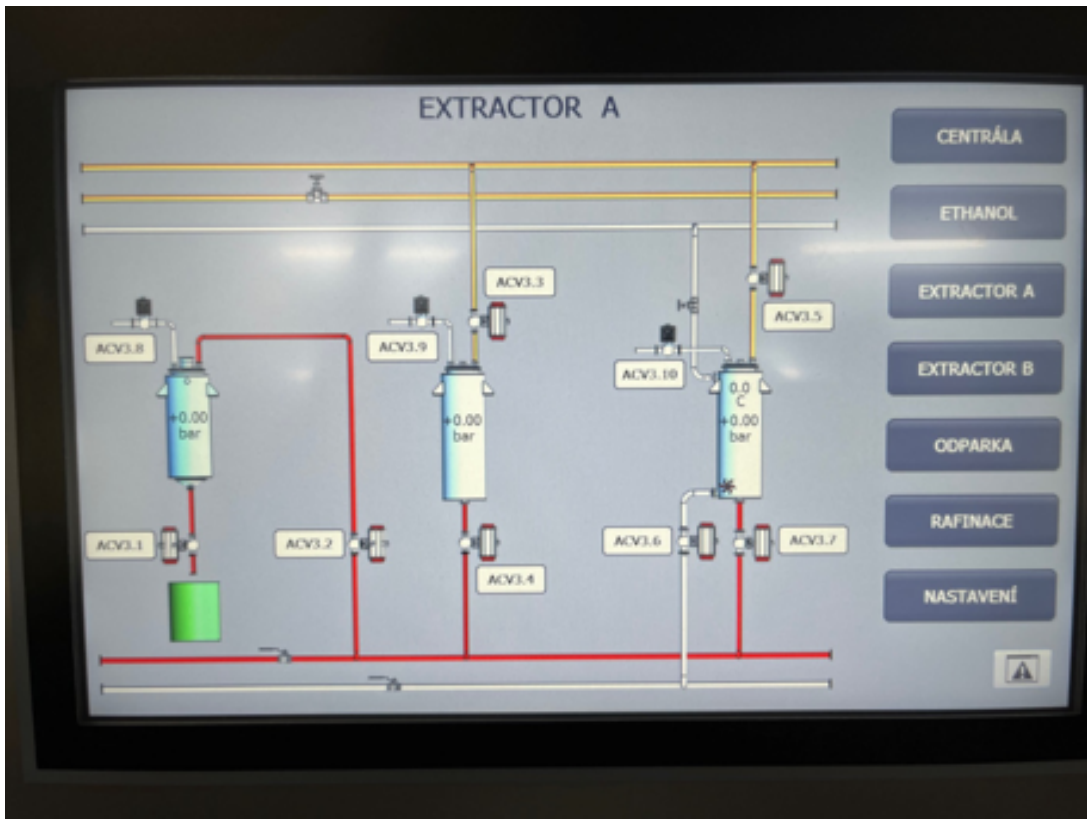
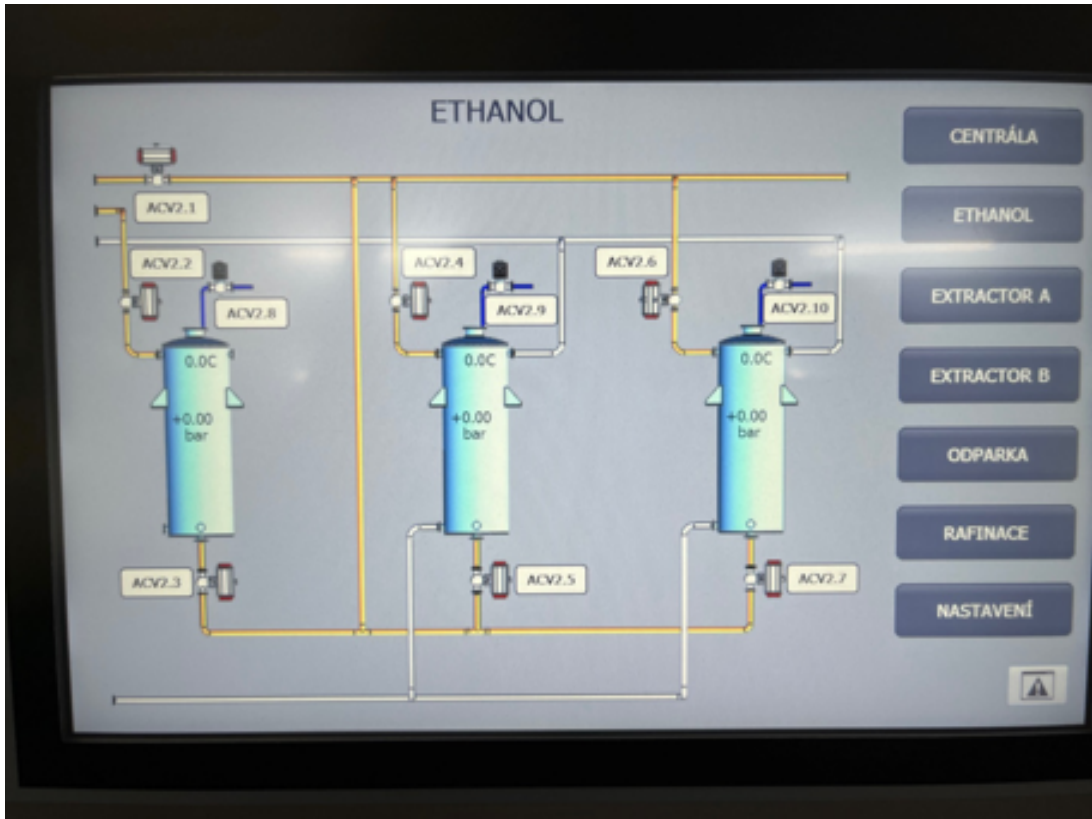


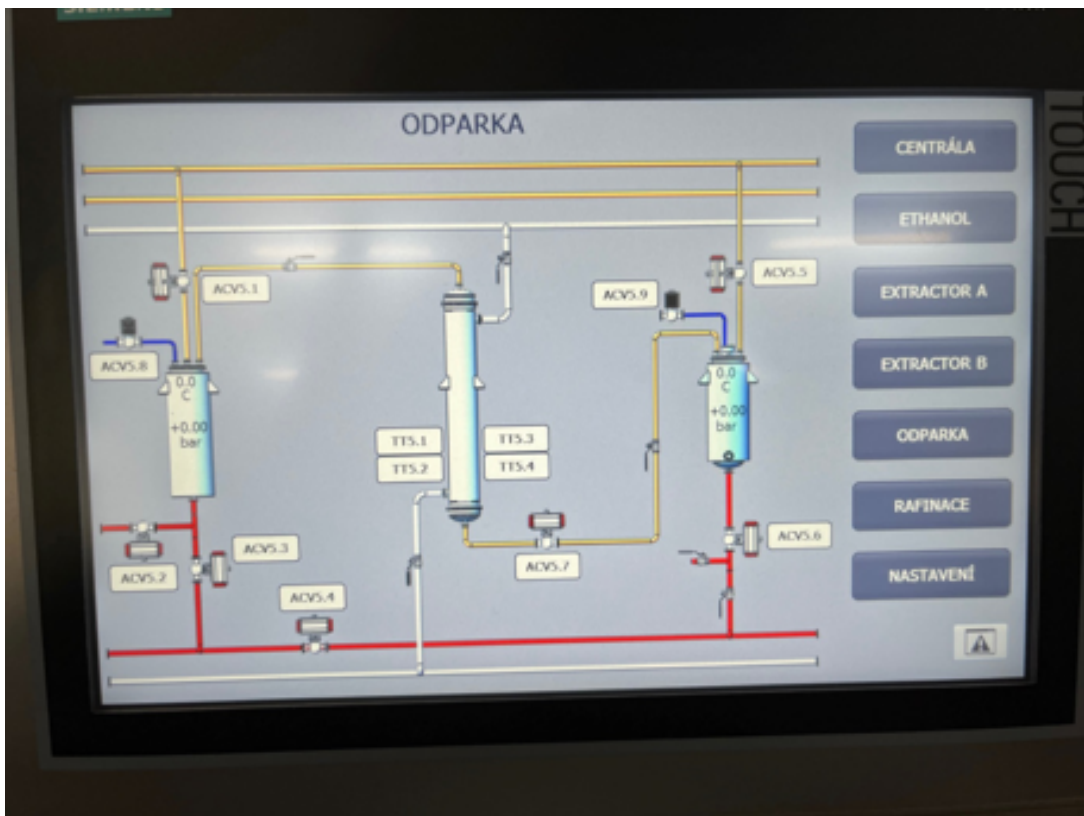
Obrázek 17 - zásobníky na chlazení ethanolu umožňující recyklaci dle správné výrobní praxe.



Obrázek 18 - Centrální řídicí jednotka s dotykovým displejem, chlazení, zdroj vakua a zdroj tlakového vzduchu.







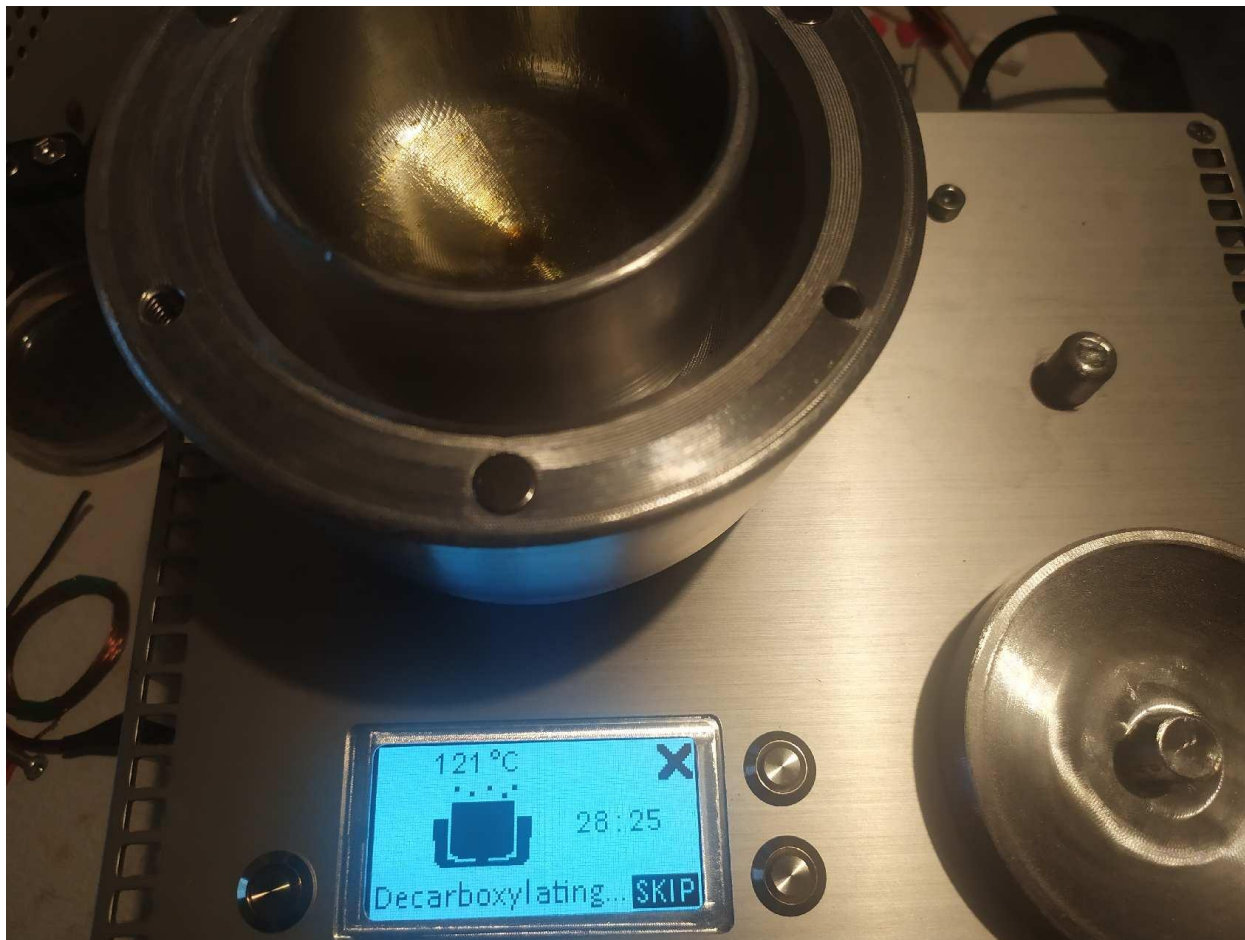
Obrázky 19 - 24: Ovládací prvky celé sestavy které jsou součástí software centrální řídicí jednotky.

4. Zhodnocení výsledků projektu

Hlavními výstupy projektu jsou především **2 koncové prototypy** určené k opakované výrobě. **Prototyp I** určený pro laboratorní a lékárenské provozy a **Prototyp IV** určený pro výrobu v průmyslovém měřítku. Mezi indikátory naplnění projektového záměru však patří i **2 dílčí Prototypy II a III** jejichž primárním účelem bylo ověření účinnosti technologie před jejím finálním přenesením do průmyslových rozměrů. Oba dílčí prototypy jsou tak zcela kompatibilní s architekturou koncové průmyslové jednotky. Dílčí **Prototyp II** extrakční jednotky lze provozně využít samostatně pro menší výrobní šarže, ale i zapojit do koncové jednotky k navýšení její celkové výrobní kapacity. Dílčí **Prototyp III** rafinačního reaktoru se pak po rozšíření o rafinační jednotku na bázi mobilní fáze (vyvinutou v rámci stavby prototypu IV) ukázal svou kapacitou jako dostačující a stal se nedílnou součástí koncového průmyslového zařízení.

4.1 Prototyp I:

Prototyp I, byl zkonstruován a na základě provozního testování vyhodnocen jako plně funkční a **dosahující výtěžnosti extrakce překračující 90 %** původního obsahu cílových látek v rostlinném materiálu. Jednotka umožňuje jednorázové zpracování přibližně **30 g rostlinného materiálu**. Byly v něm implementovány principy rafinace poskytující konsorciu možnost po uvedení na trh dále dodávat uživatelům speciálně vyvinutá rafinační činidla a další spotřební materiál jako například mechanické filtry a čisticí roztok. Přesto že zařízení nebylo možné patentovat na základě v minulosti uznaných generických patentů obdobných přesto výrazně odlišných technologií, jedná se o **zcela unikátní jednotku**, která překročila současný stav poznání u nás i ve světě a díky své schopnosti nejen efektivní výroby ale i kompletní eliminace nežádoucích kontaminantů a následného převedení rostlinného výtažku do koncové lékové formy pomocí navázání na odpovídající nosič s přesně stanoveným dávkováním pro každou výrobní šarži toto zařízení **nemá na světovém trhu žádnou přímou konkurenci**.



Obrázek 25 - Prototyp I (extrakčně-rafinační jednotka pro lékárenské a laboratorní využití) při vývoji metody dekarboxylace v rámci provozního testování.

4.2 Prototyp IV:

Prototyp IV dosáhl v provozním testování **výtěžnosti extrakce 97 %** původního obsahu cílových látek v rostlinném materiálu. Navíc umožňuje **recyklaci použitého rozpouštědla** v souladu s principy správné výrobní praxe a to při **účinnosti** dosahující **až 70 %**. Jednotka v maximálním zapojení je kapacitně schopná jednorázového zpracování až **33 kg rostlinného materiálu**. Prototyp se navíc skládá z dílčích jednotek v sériovém zapojení, které umožňují i samostatné využití případně různé varianty sestav pro různá použití, maximalizující možnosti koncového využití vyvinuté technologie.

4.3 Prototypy II - IV. - Možné varianty sestav dílčích jednotek:

Všechny dílčí jednotky které společně v sériovém zapojení tvoří maximální

sestavu průmyslové extrakčně-rafinační jednotky (obrázek 1 a 31) jsou osazeny autonomními řídicími jednotkami umožňující jejich základní použití i samostatně (obrázek 30). Jsou však zároveň koncipovány tak aby při napojení na centrální řídicí jednotku s pokročilým řídicím softwarem umožňovaly maximální možnou šíři využití a to i nad rámec primárního záměru. Takovým využitím rozumíme například výrobu alternativních produktů, nebo zpracování meziproductů získaných odlišnými výrobními postupy (obrázky 26-29).



Obrázek 26 - Malý extraktor (A) + rafinační reaktor a zásobník proplachu samostatně umožňující výrobu herbálních tinktur (přibližný objem výroby 12 l/h).



Obrázek 27 - Velký i malý extraktor (A,B) + rafinační reaktor a zásobník proplachu samostatně umožňující velkokapacitní výrobu herbálních tinktur (přibližný objem výroby 70 l/h).



Obrázek 28 - Samotná rafinace na bázi mobilní fáze.



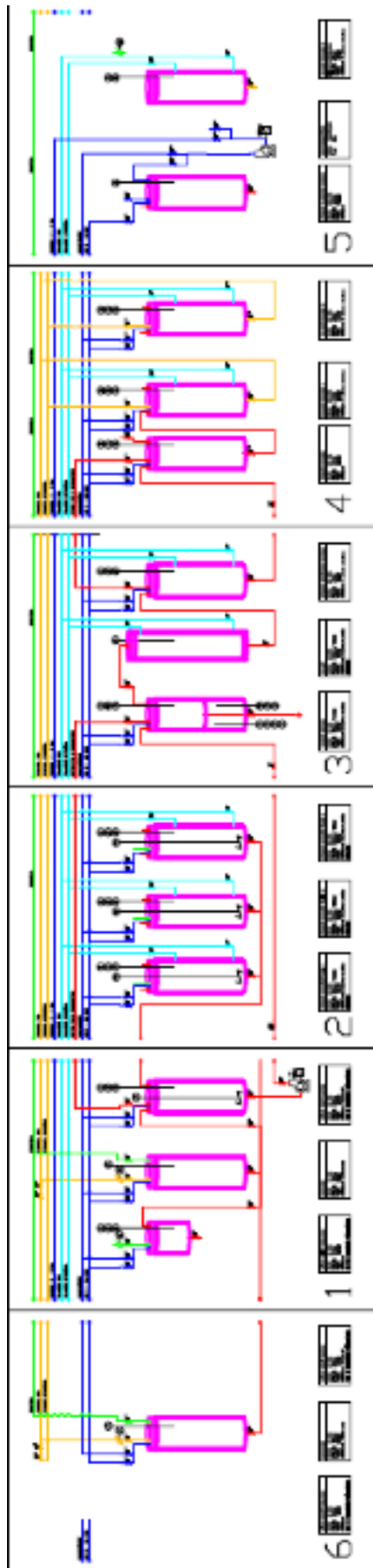
Obrázek 29 - Samotná vakuová odparka se speciálním dekarboxylačním reaktorem umožňující zpracování herbálních macerátů a řízený rozklad karboxylových kyselin.



Obrázek 30 - Zadní strana sestavy s autonomními řídicími jednotkami.



Obrázek 31 - Maximální průmyslová sestava obsahující zleva: obě extrakční nádoby (A, B), rafinační reaktor, rafinační jednotky na bázi mobilní fáze, vakuovou destilační kolonu, dekarboxylační reaktor, řídicí jednotku se zdrojem chladu vakua a tlakového vzduchu, chlazení ethanolu a zásobník použitého rozpouštědla.



Obrázek 32 - Technologické schéma celé sestavy.

4.4 Kvalita výstupů koncového využití vyvíjené technologie

Technologie která byla předmětem řešení projektu zdaleka není první svého druhu na světě. Přesto jsou členové řešitelského týmu přesvědčeni, že se v tomto konkrétním případě jedná o technologii zcela ojedinělou a do jisté míry naprosto bezkonkurenční a to i ve světovém měřítku. Toto tvrzení vychází ze skutečnosti, že extrakci rostlinných materiálů již bylo u nás i v zahraničí věnováno dostatek pozornosti zato problematikou jejich rafinace takovým způsobem aby byly eliminovány přirozené kontaminanty a výsledný materiál byl tak použitelný pro další zpracování v rámci farmaceutického průmyslu se odborníci teprve začínají zabývat. U rostlin *Cannabis Sativa L.* je tento problém velice aktuální nejen pro neustále vzrůstající poptávku po nutraceutických a farmaceutických produktech z nich vyrobených, ale především pro jejich silné bioakumulativní vlastnosti. Díky této schopnosti v sobě rostliny ukládají obrovské množství toxických látek získaných z okolního prostředí a tyto látky se pak v rostlinných výtažcích dále koncentrují a představují významné riziko pro veřejné zdraví, které si bohužel veřejnost na straně uživatelů těchto výrobků ještě zdaleka neuvědomuje. Pravděpodobně z těchto důvodů, tj. nedostatku poptávky se ani komerční výzkum touto problematikou doposud nezabýval a ani technologicky nejvyspělejší zařízení na světovém trhu určená k extrakci rostlin konopí, rafinaci v podobě eliminace takových kontaminantů neumožňují, jak bylo ostatně dostatečně demonstrováno v podnikatelském záměru tohoto projektu. Nedílnou součástí zhodnocení výsledků projektů tak musí být i vyhodnocení kvality rostlinných výtažků k jejich výrobě je technologie určena. Tu budeme posuzovat v několika následujících rovinách.

4.4.1 Chemická analýza

Níže prezentované tabulky a grafy představují pro tuto zprávu vybranou ukázkou naměřených hodnot ve vstupním rostlinném materiálu a ve výtažku / výtažcích získaných v rámci provozního testování vyvíjené technologie. Jedná se tedy o kvantifikaci dosažených výsledků výzkumu na tom nejdůležitějším ukazateli, kterým je schopnost technologie vyrábět nejen farmakologicky aktivní, ale především zdravotně nezávadné výtažky z rostlin *Cannabis Sativa L.* za účelem jejich dalšího zpracování nebo přímého využití pro terapeutické účely.

4.4.1.1 Obsah fytkanabinoidů:

Kvantitativní analýza fytkanabinoidů je v rámci vývoje zkoumané technologie jedním z primárních kvalitativních ukazatelů její účinnosti, především proto že měřené látky patří mezi ty kterým je dle současného stavu poznání přisuzován hlavní terapeutický účinek v rámci sledovaných obsahových látek ve farmakologicky

aktivních výtažcích rostlin Cannabis Sativa L.

V tabulce níže je možné pozorovat rozdíly mezi těmito obsahovými látkami ve vstupním herbálním materiálu po dekarboxylaci (Výsledek A) a výtažku z něj vyrobeného (Výsledek B). Koncentrace sledovaných látek ve výtažku převýšila očekávání autorů projektu. Konverzní poměr (míra jejich koncentrace způsobená aplikací extrakční metody) u jednotlivých látek však není identický. Rozdíly v tomto sledovaném ukazateli, pohybující se v rozmezí 3.9-4.2 násobku koncentrace látek ve výtažku oproti vstupnímu materiálu však lze vysvětlit tzv. rozšířenou nejistotou aplikované analytické metody (UHPLC-MS/MS) jež u některých analytů dosahovala až 14% možné odchylky měření. Vzhledem k tomuto racionálnímu vysvětlení a zároveň závěrům učiněným na základě srovnání metabolomických profilů těchto vzorků (viz následující bod 4.4.1.2) nebyly tyto drobné odchylky vyhodnoceny jako problematické z hlediska účinnosti vyvíjené technologie.

Kvantitativní analýza fytoKANabinoidů			
Analyt	Výsledek A	Výsledek B	Jednotky
CBD (cannabidiol)	170841	723364	mg/kg
CBDA (cannabidiolic acid)	33	115	mg/kg
Δ -THC (delta-9-tetrahydrocannabinol)	9060	39150	mg/kg
Δ -THC (delta-8-tetrahydrocannabinol)	< 2.5*	< 2.5*	mg/kg
Δ -THCA-A (delta-9-tetrahydrocannabinolic acid-A)	8.5	33	mg/kg
CBN (cannabinol)	1783	7534	mg/kg
CBNA (cannabinolic acid)	< 2.5*	< 2.5*	mg/kg
CBG (cannabigerol)	4310	18042	mg/kg
CBGA (cannabigerolic acid)	48	194	mg/kg
CBDV (cannabidivarine)	1477	5713	mg/kg
CBDVA (cannabidivarinic acid)	< 2.5*	3.3	mg/kg
CBC (cannabichromene)	6315	24860	mg/kg
CBCA (cannabichromenic acid)	< 2.5*	< 2.5*	mg/kg
THCV (tetrahydrocannabivarine)	226	986	mg/kg
THCVA (tetrahydrocannabivarinic acid)	< 2.5*	< 2.5*	mg/kg
CBL (cannabicyclol)	112	450	mg/kg
CBLA (cannabicyclolic acid)	< 2.5*	< 2.5*	mg/kg

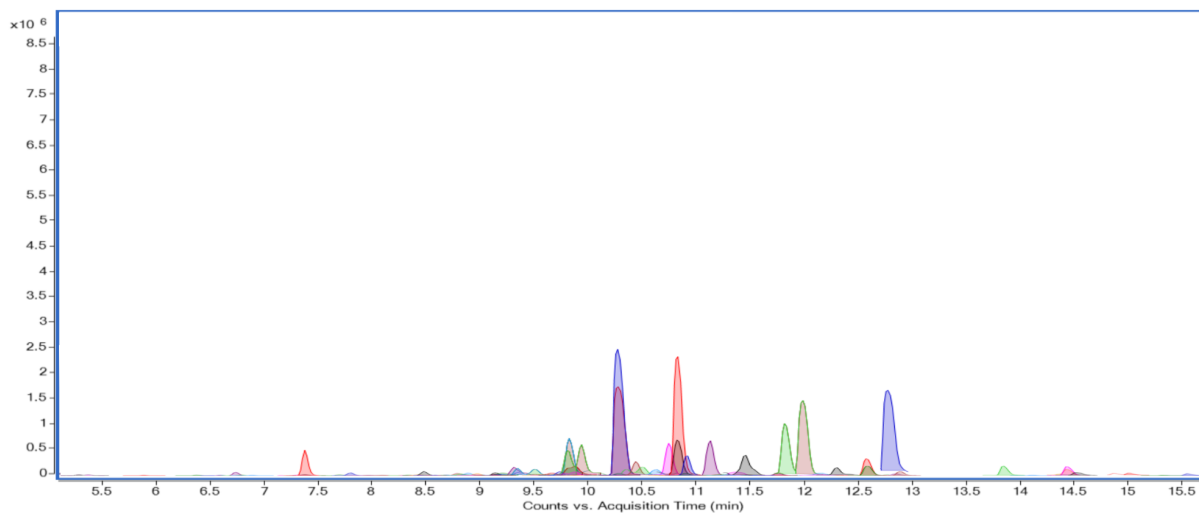
Tabulka 1 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a výtažku z něj získaného (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu fytoKANabinoidů.

* - Limit kvantifikace analytu v rámci použité analytické metody.

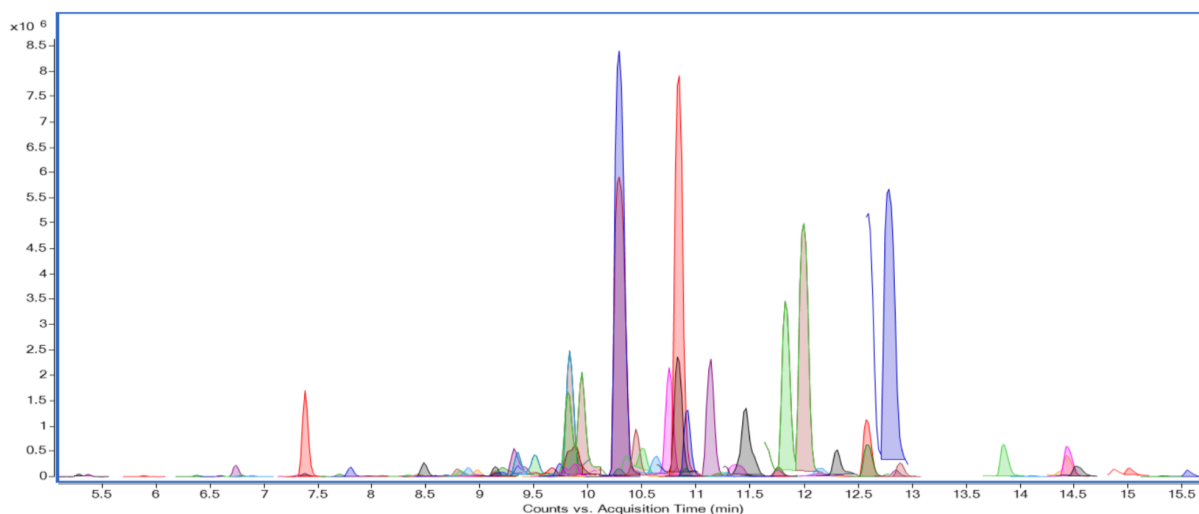
4.4.1.2 Metabolomický profil:

Metabolomická profilace zpracovávaných materiálů je dalším zcela zásadním ukazatelem dosažení cílů vytečených autory na začátku řešení projektu. Vzhledem ke skutečnosti, že technologie je primárně určena pro zpracování konopí pro léčebné použití, jehož výroba by měla podléhat přísné standardizaci za účelem dosažení žádaných obsahů cílových biologicky aktivních látek jejichž počet v tomto materiálu běžně dosahuje desítek, někdy i stovek jasně rozlišitelných složek. Cílem zkoumané extrakční metody a tedy i vyvíjené technologie tak bylo dosáhnout co největšího zachování původních obsahových biologicky aktivních látek v koncovém výtažku, pouze zvýšit jejich koncentraci při současné eliminaci nežádoucích kontaminantů.

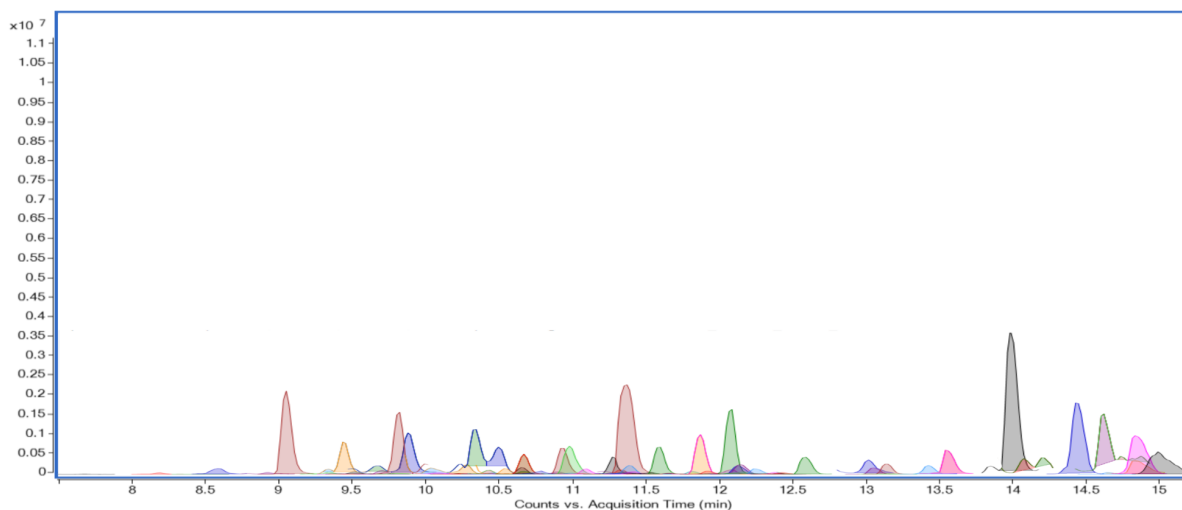
V níže zobrazených chromatogramech můžeme opět vidět srovnání vstupního rostlinného materiálu a následně výtažku z něj vyrobeného se zaměřením na konkrétní cílové biologicky aktivní látky. Chromatogramy byly záměrně ponechány v jednotném formátu po stránce hodnot osy x (retenční čas) i y (odezva) za účelem jasné vizuální demonstrace výsledků. Jak je patrné výsledky vykazují zcela minimální až nulové odchylky po stránce zjištěných obsahových látek. Jediným parametrem který se mění je jejich celková koncentrace, která u většiny sledovaných látek vykazuje velice podobný až identický konverzní poměr. Tuto skutečnost považují autoři projektu za naplnění jednoho z nejzásadnějších ukazatelů maximální možné efektivity vyvíjené technologie.



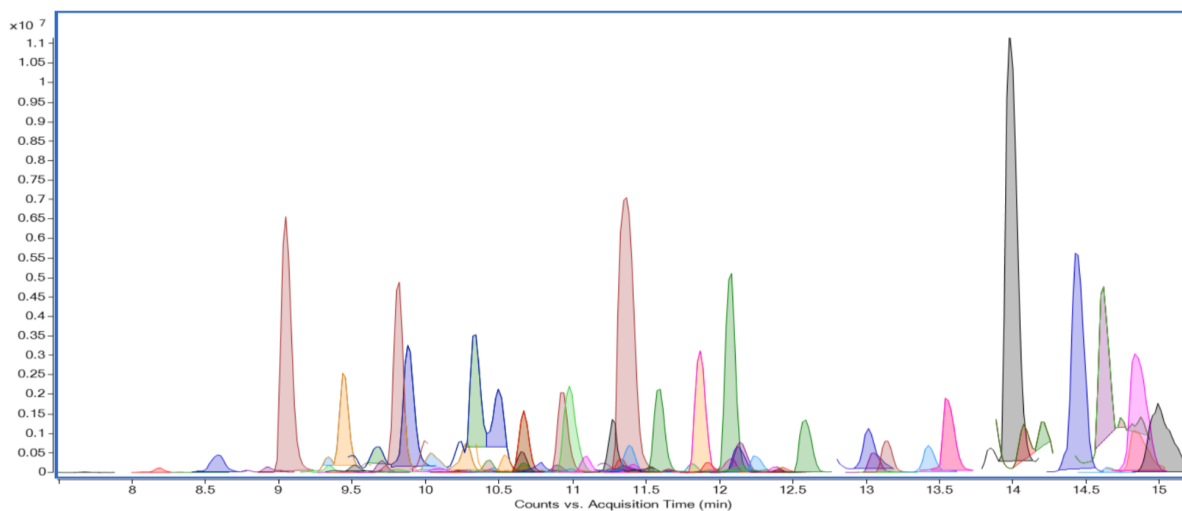
Obrázek 33a - Cílový metabolomický screening fytkanabinoidů ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram zobrazující 92 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI+.



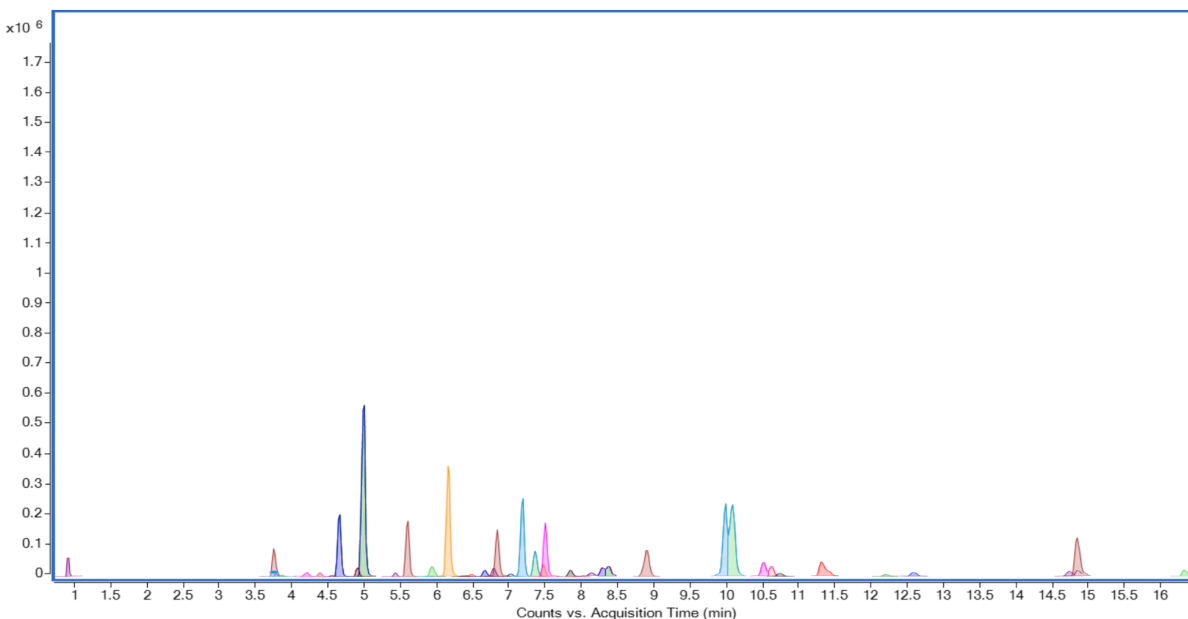
Obrázek 33b - Cílový metabolomický screening fytkanabinoidů ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram zobrazující 94 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI+.



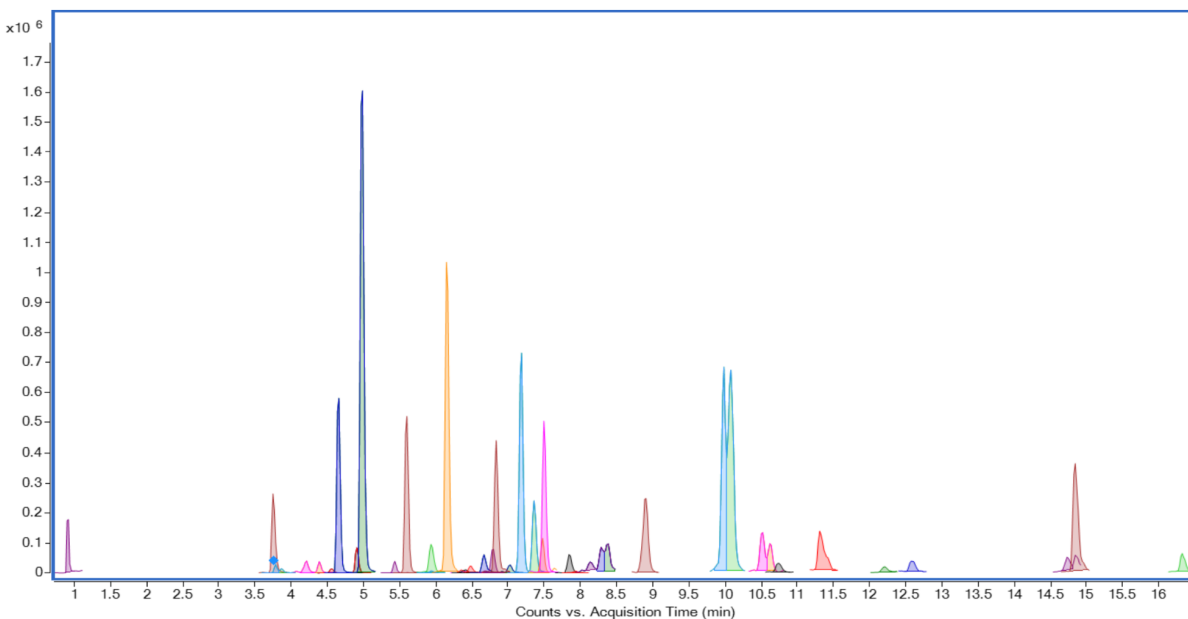
Obrázek 34a - Cílový metabolický screening fytkanabinoidů ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram zobrazující 90 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI-.



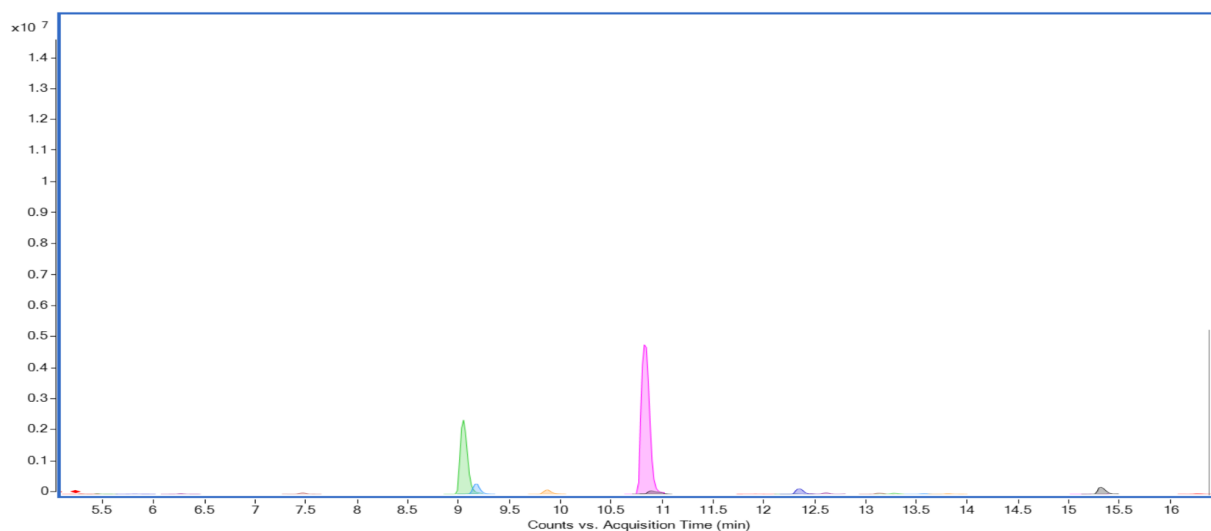
Obrázek 34b - Cílový metabolický screening fytkanabinoidů ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram zobrazující 90 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI-.



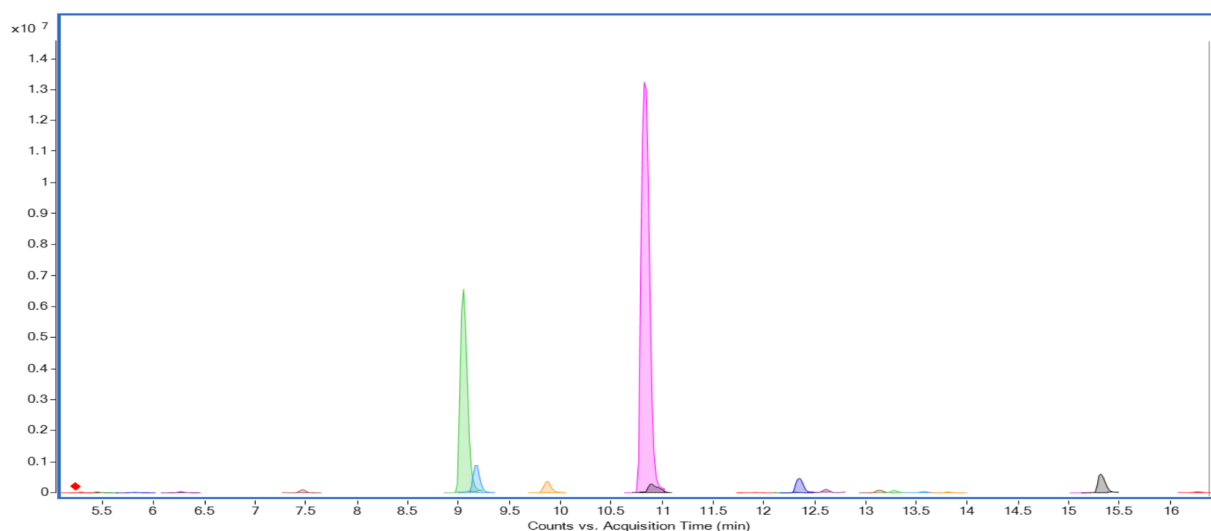
Obrázek 35a - Cílový metabolický screening nekanabinoidních biologicky aktivních látek ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram zobrazující 43 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI+.



Obrázek 35b - Cílový metabolický screening nekanabinoidních biologicky aktivních látek ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram zobrazující 43 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI+.



Obrázek 36a - Cílový metabolomický screening nekanabinoidních biologicky aktivních látek ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram po přiblížení zobrazující 21 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI-.



Obrázek 36b - Cílový metabolomický screening nekanabinoidních biologicky aktivních látek ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie, UHPLC-HRMS/MS extrahovaný iontový chromatogram zobrazující 21 látek s jedinečnou kombinací specifické hmotnosti a retenčního času detekovaných v módu ESI-.

4.4.1.3 Obsah terpenů a terpenoidů

Látky ze skupiny terpenů a terpenoidů patří v rámci analyzovaných výtažků mezi farmakologicky aktivní složky jejichž přímý účinek často není klasifikován jako terapeutický sám o sobě, ovšem dle současného stavu poznání jejich přítomnost v koncovém preparátu může hrát zcela klíčovou roli v mechanismu účinku a to na základě synergických vlastností pozorovaných v mnoha vědeckých experimentech (Russo, 2011) při jejich současném podání společně s některými fytoKANABINOIDY, tedy primárními terapeuticky aktivními složkami rostlinných výtažků jejichž technologie výroby byla předmětem řešení projektu.

Dosažené výsledky z hlediska účinnosti extrakční technologie dosahující konverzního poměru 3-3.9 násobku obsahu těchto látek v získaném výtažku oproti původní matici považují autoři projektu za více než uspokojivé především proto, že se jedná o těkavé látky tradičně vykazující vysokou ztrátovost a často naprostou absenci v rámci stávajících extrakčních metod zaměřených primárně na fytoKANABINOIDY.

Terpeny			
Analyt	Výsledek A	Výsledek B	Jednotky
α-pinene	112	428	mg/kg
camphene	3	11	mg/kg
sabinene	1	3	mg/kg
β-pinene	63	234	mg/kg
myrcene	1477	5508	mg/kg
α-phellandrene	<5*	<5*	mg/kg
3-carene	<0.8*	<0.8*	mg/kg
α-terpinene	3.5	12	mg/kg
4-isopropyltoluene	<5*	<5*	mg/kg
limonene	245	965	mg/kg
cineole	6	21	mg/kg
β-ocimene	14	46	mg/kg
γ-terpinene	2.5	9	mg/kg
sabinene hydrate	<7*	<7*	mg/kg
α-terpinolene	2.9	11	mg/kg
fenchone	24	86	mg/kg
linalool	346	1284	mg/kg
fenchol	9.7	33	mg/kg

isopulegol	34	126	mg/kg
camphor	415	1460	mg/kg
isoborneol	<0.4*	<0.4*	mg/kg
borneol	6	22	mg/kg
menthol	<7*	<7*	mg/kg
terpineol-1	16	54	mg/kg
pulegone	<5*	<5*	mg/kg
geraniol	72	258	mg/kg
geranyl acetate	15	55	mg/kg
α -cedrene	<5*	<5*	mg/kg
trans-caryophyllene	570	2180	mg/kg
α -humulene	528	2012	mg/kg
trans-nerolidol	<5*	<5*	mg/kg
caryophyllene oxide	66	246	mg/kg
guaiol	<5*	<5*	mg/kg
α -bisabolol	3.5	12	mg/kg
phytol	157	608	mg/kg
eucalyptol	27	99	mg/kg

Tabulka 2 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a výtažku z něj získaného (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu terpenů a terpenoidů.

* - Limit kvantifikace analytu v rámci použité analytické metody.

4.4.1.4 Obsah reziduálních pesticidů

Separace pesticidů nebyla primárním předmětem výzkumu v rámci stavby technologie určené ke zpracování konopí pro léčebné použití jehož pěstební postupy tento druh kontaminace prakticky vylučují. Nicméně vzhledem k záměru konsorcia zasáhnout po uvedení na trh co nejširší cílovou skupinu zákazníků s potenciálním zájmem o vyvíjenou technologii (především pak Prototypu IV - průmyslové extrakčně-rafinační jednotky u kterého je předpoklad že budoucí zákazníci s jeho pomocí budou chtít pro potřeby nutraceutické či kosmetické výroby zpracovávat i rostlinný materiál pěstovaný volně na polích), byla i tomuto kvalitativnímu parametru věnována pozornost v rámci laboratorního výzkumu.

Pro testování byl pořízen rostlinný materiál ve kterém byly v rámci analýzy identifikovány 3 reziduální kontaminanty z této kategorie, přesněji 1 pesticid a 2 insekticidy (v tabulce vyznačeny šedou barvou). Purifikační (rafinační) metody s

úspěchem aplikované u dalších nežádoucích kontaminantů se však ukázaly jako neúčinné a bylo třeba přistoupit k aplikaci individuální purifikační metody koncového výtažku získaného vyvíjenou technologií. Tato metoda se v tomto konkrétním případě ukázala jako 100% efektivní (viz tabulka 3 níže) a bude pro tento případ zapracována do metodických pokynů pro budoucí uživatele technologie. Nicméně řada kontaminantů tohoto typu nebyla v žádném konsorciu dostupném materiálu po čas výzkumu identifikována a přestože na základě literární rešerše existuje předpoklad, že zvolená metoda bude úspěšně aplikovatelná i v případě kontaminace dalšími látkami z této kategorie, v rámci realizovaného výzkumu to nebylo možné prokázat.

Reziduální pesticidy			
Analyt	Výsledek A	Výsledek B	Jednotky
Alachlor	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Aldrin and Dieldrin (sum of)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Azinphos-methyl	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Chlordane (sum of cis-, trans - and Oxythlordane)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Chlorfenvinphos	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Chlorpyrifos	0.038	< 0.02*	mg/kg
Chlorpyrifos-methyl	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Cypermethrin (and isomers)	1.13	< 0.02*	mg/kg
Bromopropylate	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Deltamethrin	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Diazinon	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Dichlorvos	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Dithiocarbamates (as CS ₂)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
DDT (sum of p,p'-DDT, o,p'-DDT, p,p'-DDE and p,p'-TDE)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Endosulfan (sum of isomers and Endosulfan sulphate)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Endrin	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Fenitrothion	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Fenvalerate	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Fonofos	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Ethion	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg

Heptachlor (sum of Heptachlor and Heptachlorepoxyde)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Hexachlorobenzene	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Hexachlorocyclohexane isomers (other than γ)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Lindane (γ -Hexachlorocyclohexane)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Malathion Methidathion	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Parathion	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Parathion-methyl	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Permethrin	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Phosalone	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Piperonyl butoxide	0.624	< 0.02*	mg/kg
Pirimiphos-methyl	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Pyrethrins (sum of)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg
Quintozene (sum of quintozene, pentachloroaniline and methyl pentachlorophenyl sulphide)	< 0.02*	< 0.02*	mg/kg

Tabulka 3 - Srovnání rostlinného výtažku před purifikací (Výsledek A) a po purifikaci (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu reziduálních pesticidů.

* - Limit kvantifikace analytu v rámci použité analytické metody.

4.4.1.5 Obsah těžkých kovů

Podobně jako u reziduálních pesticidů se zvýšeným výskytem tohoto typu kontaminantů v případě konopí pro léčebné použití není počítáno, neboť samotná aplikace tzv. správné pěstitelské praxe v řízených podmínkách výroby by měla možnost této kontaminace zcela vyloučit. Nicméně především z hlediska vývoje průmyslové extrakčně-rafinační jednotky (Prototyp IV) kde je třeba počítat s koncovým využitím i v oblasti nutraceutické a kosmetické výroby tradičně používající vstupní rostlinný materiál pěstovaný volně na polích a v dalších běžných agronomických provozech hraje schopnost technologie eliminovat tento typ kontaminantů zásadní roli. Především pro jejich častý výskyt způsobený silnými bioakumulativními vlastnostmi rostlin *Cannabis Sativa L.* (Rheay, 2021). Proto byl pro potřeby laboratorního výzkumu rafinačních metod a následného provozního testování vyvíjené technologie pořízen rostlinný materiál s relativně vysokou mírou kontaminace těmito látkami. Výsledky prezentované v tabulce níže jsou ukázkou účinnosti purifikačních schopností Prototypu IV právě v rámci jeho provozního testování.

Těžké kovy			
Analyt	Výsledek A	Výsledek B	Jednotky
arsen (As)	86	< 50*	(µg/kg)
olovo (Pb)	303	< 50*	(µg/kg)
kadmium (Cd)	153	< 5*	(µg/kg)
rtuť (Hg)	12	< 1*	(µg/kg)

Tabulka 4 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a z něj získaného výtažku po následné purifikaci (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu těžkých kovů.

* - Limit kvantifikace analytu v rámci použité analytické metody.

4.4.1.6 Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků

Této kategorii kontaminantů byla v rámci výzkumu věnována největší pozornost, především proto že jejich eliminace se z hlediska úrovně automatizace navrhované technologie ukázala jako velice komplikovaná. V neposlední řadě však také pro jejich doslova extrémní výskyt napříč všemi typy běžně pěstovaného konopí včetně toho určeného pro léčebné použití! Tato skutečnost je nanejvýše alarmující především proto, že některé z těchto látek patří mezi karcinogeny třídy I. Obsahy některých z nich (v tabulce vyznačeny šedou barvou) ve výrobcích určených k lidské spotřebě jsou pak ve všech zemích EU přísně limitovány platnou evropskou legislativou. Přesto purifikaci těchto látek v rostlinných výtažcích z konopí nebyla ani v ČR ani v zahraničí doposud věnována prakticky žádná pozornost. Dosažené výsledky (viz tabulka 5 níže) tak autoři projektu považují za zcela **průlomové ve světovém měřítku** a posouvají vlastnosti vyvíjené technologie do kategorie ve které nemá na stávajícím trhu naprosto žádnou srovnatelnou konkurenci!

Polycyklické aromatické uhlovodíky			
Analyt	Výsledek A	Výsledek B	Jednotky
dibenzo[a,h]anthracene	21	< 3*	(µg/kg)
benzo[g,h,i]perylene	88	< 1*	(µg/kg)
indeno[1,2,3-cd]pyrene	86	< 5*	(µg/kg)
phenanthrene	465	< 1*	(µg/kg)
benzo[k]fluoranthene	76	< 1*	(µg/kg)
benzo[a]pyrene	100	< 1*	(µg/kg)
chrysene	156	< 1*	(µg/kg)
benz[a]anthracene	162	< 5*	(µg/kg)

benzo[b]fluoranthene	125	< 1*	(µg/kg)
anthracene	79	< 1*	(µg/kg)
fluoranthene	793	< 2*	(µg/kg)
pyrene	241	< 3*	(µg/kg)

Tabulka 5 - Srovnání rostlinného výtažku před purifikací (Výsledek A) a po purifikaci (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků.

* - Limit kvantifikace analytu v rámci použité analytické metody.

4.4.1.7 Mikrobiologická analýza

Na základě osobních zkušeností autorů projektu s farmaceutickým provozem výroby konopí pro léčebné použití byly jako druhý nejčastěji se vyskytující kontaminant identifikovány plísně. K jejich vzniku dochází často i ve velice přísně regulovaných provozech vlivem vysoké denzity konopných květů v kombinaci s vysokou relativní vlhkostí vzduchu v porostu ve kterém dochází k jejich dozrávání. Tento aspekt výroby je často téměř nevyhnutelně podceňován i na výstupní kontrole především pro svou extrémní náročnost na odhalení v případech kdy není kontaminace viditelná prostou vizuální kontrolou. V případech kdy kontaminace dosáhne rozsahu jednoduše odhalitelného tímto způsobem pak již většinou představuje pro výrobce ekonomickou ztrátu často dosahující více než 40 % celkové produkce. Aplikace purifikační metody při výrobě výtažku z konopných květů se tak jeví jako jediná cesta zaručující standardizaci kvality výroby po této stránce a tedy i klíčový bod v rámci ochrany veřejného zdraví. Vyvinutá metoda byla sjednocena s postupem zvoleným pro eliminaci polycyklických aromatických uhlovodíků a byla tak zahrnuta do automatizovaného výrobního režimu ve kterém operuje Prototyp IV průmyslové extrakčně-rafinační jednotky. Cíle 100% eliminace těchto látek bylo v rámci provozního testování technologie úspěšně dosaženo (viz tabulka 6 níže).

Mikrobiologické parametry			
Analyt	Výsledek A	Výsledek B	Jednotky
celkový počet mikroorganismů	<10	<10	CFU/g
celkový počet plísní	180 000	<10	CFU/g
celkový počet kvasinek	<10	<10	CFU/g

Tabulka 6 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a z něj získaného výtažku po následné purifikaci (Výsledek B) po stránce stanovení obsahu mikrobiálních kontaminantů.

4.4.1.8 Obsah reziduálních rozpouštědel

Přestože zvolené rozpouštědlo (ethanol) je běžnou nejen farmaceutickou, ale rovněž potravinářskou surovinou jeho reziduální obsah ve většině přípravků určených ke koncové spotřebě není žádoucí. V rámci vývoje technologie bylo navíc jedním z cílů zajistit maximální možnou návratnost rozpouštědla umožňující jeho další použití (recyklaci). Níže uvedená tabulka je tak pouze ukázkou kvantitativní analýzy tohoto parametru v jednom z výtažků získaných při provozním testování Prototypu IV.

Analyt	Výsledek	Jednotka
reziduální extrakční činidla	<0.02*	%

Tabulka 7 - Kvantitativní analýza obsahu reziduálních rozpouštědel ve vzorku rostlinného výtažku získaného v rámci provozního testování Prototypu IV.

* - Limit kvantifikace analytu v rámci použité analytické metody.

4.4.2 Farmakokinetika

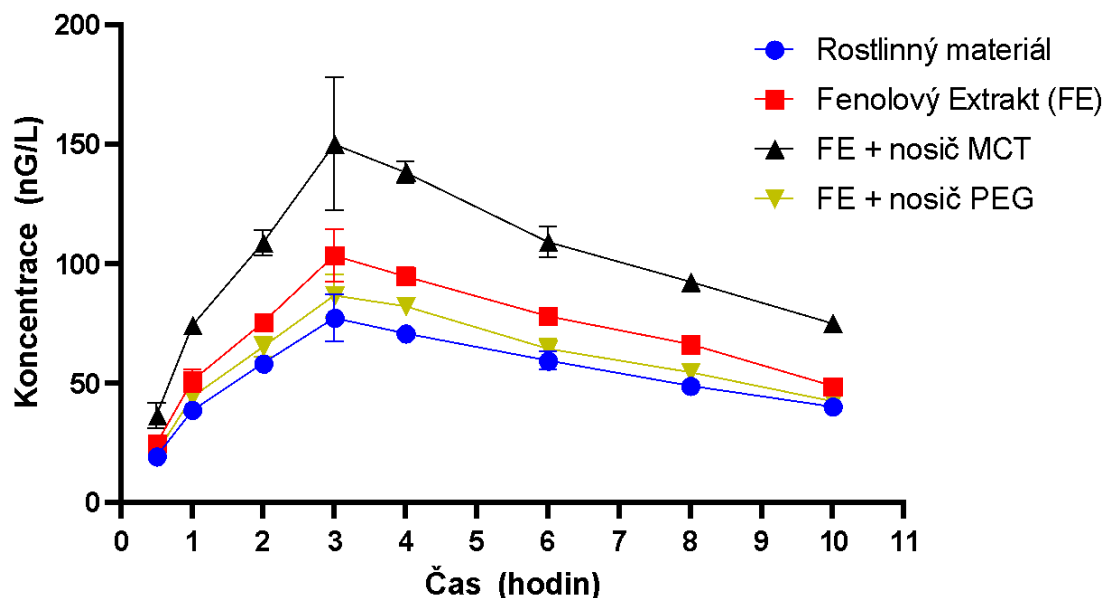
Dalším sledovaným kvalitativním parametrem byly farmakokinetické vlastnosti získaných výtažků, především pak biologická dostupnost. Kontrolou pro tyto experimenty bylo podání samotného mletého rostlinného materiálu po jeho dekarboxylaci, což je v současné chvíli stále ještě zcela běžná zavedená praxe v českých lékárnách při podání konopí pro léčebné použití. Výsledky dle očekávání ukázaly že podání výtažku navázeného na odpovídající nosič biologickou dostupnost účinných látek výrazně zvyšuje, což je dalším argumentem pro použití vyvinuté technologie, v případě lékařských provozů pak především **Prototypu I**.

Cílem této studie bylo porovnat biologickou dostupnost čistého rostlinného materiálu *cannabis sativa* L a tří různých forem fenolového extraktu po orálním podání. Tyto formy zahrnovaly čistý fenolový extrakt (FE), fenolový extrakt s nosičem MCT (Medium Chain Triglycerides), fenolový extrakt s nosičem PEG (polyethylene glycol), a samotný rostlinný materiál. Biologická dostupnost byla sledována u osmi myší v každé skupině, aby se získaly spolehlivé výsledky. Každá formulace fenolového extraktu byla pečlivě připravena v souladu s danými specifikacemi. Čistý rostlinný materiál byl pečlivě rozemlet. Každá formulace byla připravena k podání myším pomocí orální gaváže, která je bezbolestivá, pokusná zvířata ji velmi dobře snášejí a je tímto způsobem zajištěno přesné a kontrolované dávkování.

Po orálním podání byly odebrány vzorky krve z myší v intervalech po dobu až 10 hodin. Tímto způsobem byly stanoveny koncentrace fenolového extraktu v plazmě v průběhu času, kde byly stanoveny koncentrace cannabidiolu. Výsledky této studie ukázaly, že fenolový extrakt s nosičem MCT (FE + MCT) vykazuje nejvyšší biologickou dostupnost mezi všemi sledovanými formami. Konkrétně byla biologická dostupnost FE + MCT cca o 1,5krát vyšší než u čistého fenolového extraktu (FE) v čase vrcholu koncentrace po 3 hodinách. Dále byla biologická dostupnost FE + MCT zhruba dvakrát

vyšší než u FE + PEG a stále vyšší než u čistého rostlinného materiálu v kapslích. Zvýšená biologická dostupnost FE + MCT může být vysvětlena schopností MCT zlepšit rozpustnost fenolového extraktu v trávicím traktu nebo jeho schopností zvýšit transportní kapacitu pro fenolový extrakt do krve. Tato studie také potvrzuje, že čistý rostlinný materiál má nižší biologickou dostupnost ve srovnání s formulacemi FE + MCT a FE + PEG. Další studie by mohly zkoumat mechanismy, které stojí za těmito rozdíly v biologické dostupnosti a optimalizaci podávání fenolových extraktů pro zlepšení jejich účinnosti.

Koncentrace cannabidiolu v séru po orálním podání



Obrázek 37 - Srovnání biologické dostupnosti za pomoci měření koncentrace kanabidiolu v séru po orálním podání.

4.4.3 Toxicita

Součástí hodnocení kvality získaných výtažků byla i studie toxicity. Výsledky byly nadmíru uspokojivé, neboť z celkem 4 testovaných vzorků rostlinných výtažků získaných v rámci provozního testování prototypů nevykazoval ani jeden zvýšenou toxicitu oproti kontrole.

Orgánová toxicita fenolového extraktu s nosičem MCT z *Cannabis Sativa L.* byla stanovena měřením oxidativního stavu jednotlivých tkání orgánů čtyři hodiny po orálním podání (hodinu od vrcholu koncentrace cannabidiolu v séru). Cílem bylo stanovit rozdíly v oxidativním poškození těchto myší oproti myším kontrolním, jelikož se jedná o jeden z ukazatelů orgánového poškození. Oxidativní stres je stav, kdy v těle dochází k nerovnováze mezi tvorbou volných radikálů a schopností těla tyto volné radikály neutralizovat pomocí antioxidantů. Volné radikály jsou molekuly obsahující

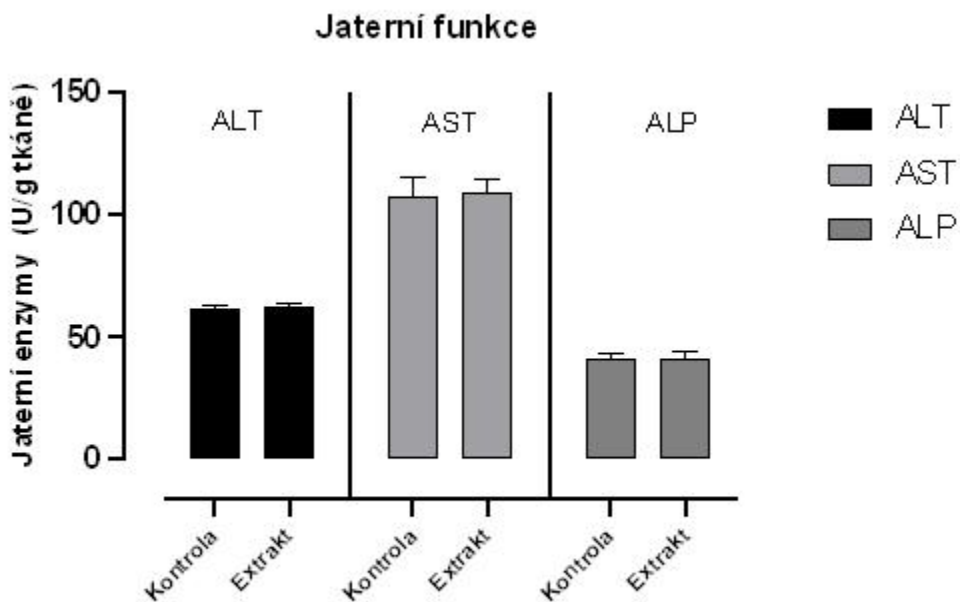
nevyvážený elektron, což znamená, že mohou poškozovat buňky a tkáně v těle. Oxidativní stres může být spojen s různými onemocněními a poškozením orgánů. Když tkáň trpí oxidativním stresem, mohou se v ní hromadit poškozené buňky a molekuly, což může vést k různým patologickým stavům. To zahrnuje například poškození jater, srdce, ledvin, mozku a dalších orgánů.

Existují různé způsoby, jak hodnotit oxidativní stres v tkáních a tím pádem i potenciální orgánové poškození. Jedním z přístupů je měření hladiny biomarkerů oxidativního stresu, jako jsou například peroxidační produkty lipidů, proteiny poškozené volnými radikály nebo enzymy spojené s ochranou před oxidativním stresem. Pokud jsou tyto biomarkery zvýšené, může to signalizovat existenci oxidativního stresu a potenciální riziko orgánového poškození. V této studii jsme ve vybraných tkáních, a to mozku, srdci, plicích, ledvinách a játrech zkoumali změny v hladinách malondialdehydu (MDA), jakožto markeru peroxidačního poškození polynenasycených lipidů biologických membrán, redukovaného glutathionu (GSH – tripeptid γ -L-glutamyl-L-cysteinylglycin), je nejběžnějším thiolovým antioxidantem v buňkách savců a hraje zásadní roli při udržování redoxního potenciálu thiolu v buňkách a hladiny oxidu dusnatého (NO), signální molekuly, která mimo jiné hraje roli v oxidačním stresu buňky - má dvě protichůdné role v oxidativním stresu a oxidativním poškození. Na jednu stranu může fungovat jako antioxidant, chránit buňky před škodlivými účinky reaktivních kyslíkových druhů (ROS) a přeměňovat je na méně škodlivé sloučeniny. Na druhou stranu může NO hrát prooxidantní roli, když je přítomen v nadměrném množství nebo když interaguje s ROS, což může vést k tvorbě peroxynitritů, velmi reaktivních a škodlivých molekul, které poškozují biomolekuly v buňkách a přispívají k různým zdravotním problémům.

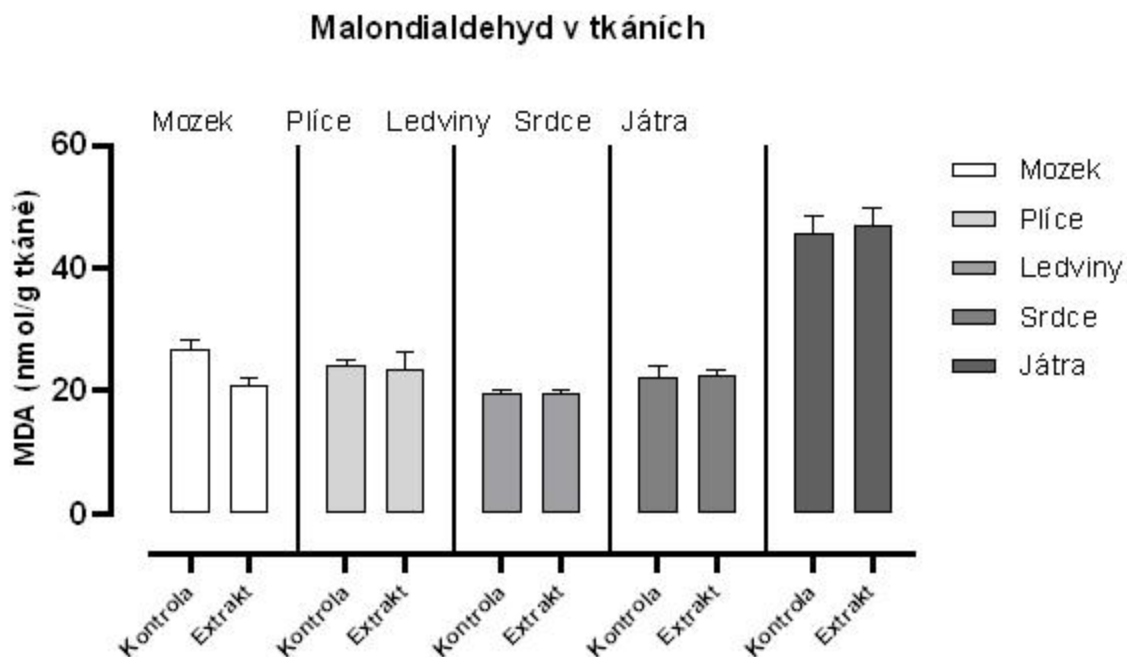
Kromě toho byly stanoveny hladiny jaterních enzymů, které se používají jako ukazatele funkce jater a jsou ovlivněny jejich poškozením. Jsou mezi nimi enzym aspartát aminotransferáza (AST), který se nachází nejen v játrech, ale i v svalové tkáni, srdci, ledvinách a dalších orgánech. Zvýšená hladina AST v krvi může naznačovat poškození jater, ale také může být způsobena jinými problémy, jako je infarkt myokardu (srdeční infarkt) nebo svalové poškození, enzym alanin aminotransferáza (ALT), který je specifický pro játra a nachází se v nich v nejvyšší koncentraci. Zvýšené hladiny ALT v krvi obvykle naznačují poškození jaterních buněk a enzym alkalická fosfatáza (ALP), který se nachází v játrech a také v kostech, střevní sliznici a placentě během těhotenství. Zvýšené hladiny ALP mohou být spojeny s řadou onemocnění, včetně onemocnění jater, žlučových cest a kostních onemocnění.

Závěry studie naznačují, že podání extraktu z *Cannabis sativa* L nevedlo k prokazatelným známkám orgánového poškození u zkoumaných tkání. Není pozorováno žádné lipidové poškození ani přítomnost oxidativního stresu v tkáních mozku, plic, ledvin, srdce ani jater, s výjimkou snížené hladiny malondialdehydu v mozku. Tato snížená hladina malondialdehydu naznačuje, že podání extraktu z *Cannabis sativa* L mohlo snížit peroxidové poškození lipidů v mozku ve srovnání s kontrolními skupinami. Důležité je také poznamenat, že tři jaterní enzymy ALT, AST a ALP nevykazovaly žádné změny po podání extraktu, což naznačuje, že extrakt nepřinesl

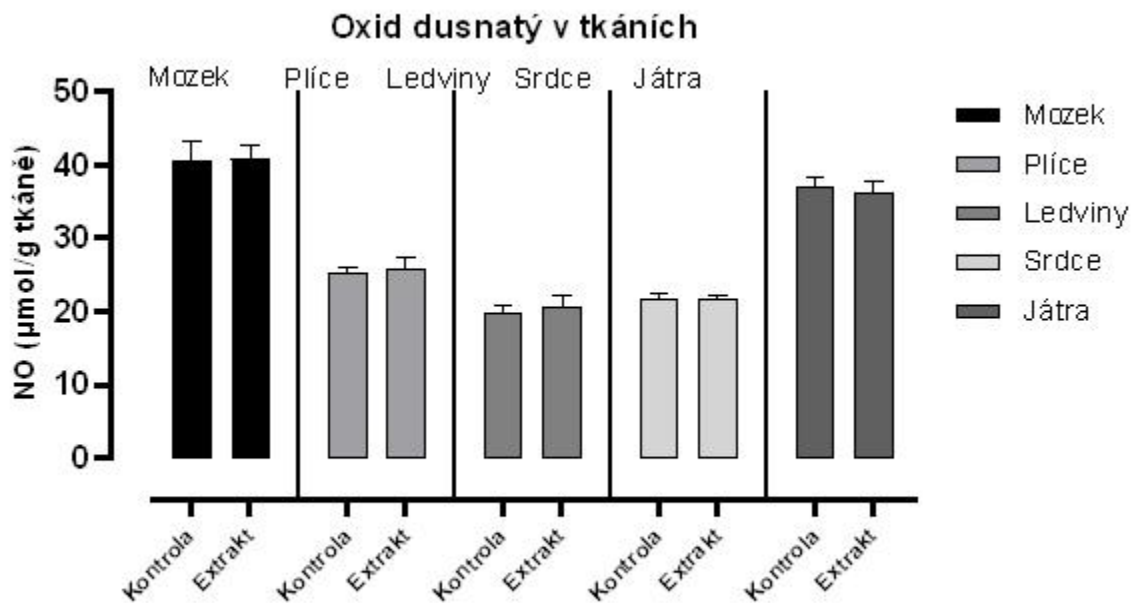
žádné negativní účinky na játra a nezpůsobil žádnou jaterní toxicitu u zkoumaných myší. Celkově lze tedy konstatovat, že na základě této studie neexistují přesvědčivé důkazy o orgánovém poškození, lipidovém poškození nebo oxidativním stresu v tkáních mozku, plic, ledvin, srdce ani jater po podání extraktu z Cannabis sativa L. Tato zjištění naznačují, že extrakt může být relativně bezpečným látkou, pokud jde o zkoumané orgány a tkáně, a může dokonce poskytovat určité ochranné účinky na mozkou tím, že snižuje peroxidové poškození lipidů.



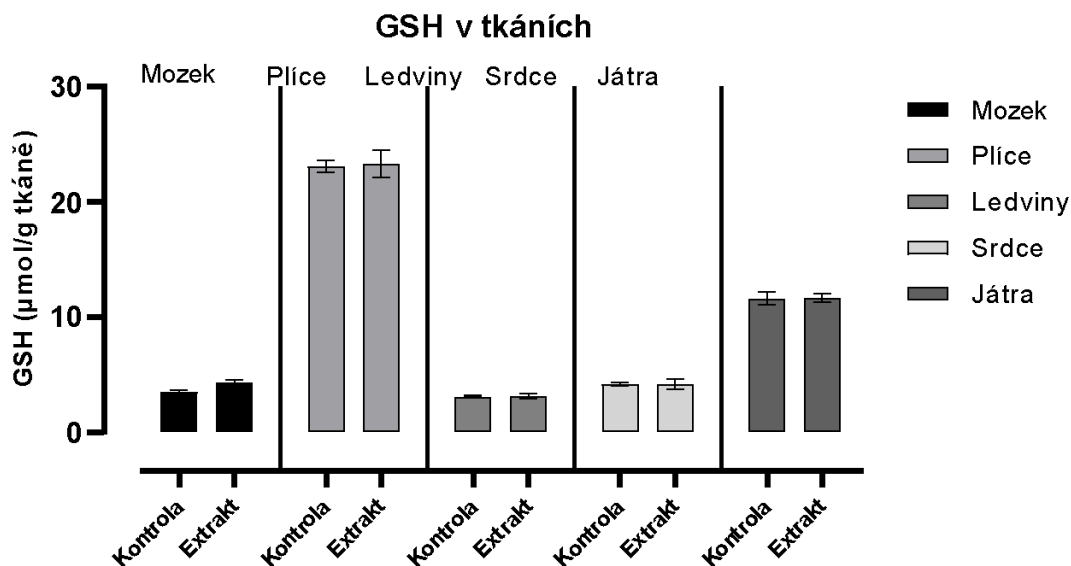
Obrázek 38 - Jaterní funkce vyjádřené pomocí hladin jaterních enzymů.



Obrázek 39 - Orgánová toxicita vyjádřená pomocí hladin malondialdehydu v tkáních.



Obrázek 40 - Orgánová toxicita vyjádřená pomocí hladin oxidu dusnatého v tkáních.



Obrázek 41 - Orgánová toxicita vyjádřená pomocí hladin GSH v tkáních.

5. Závěrečné shrnutí

V rámci realizace projektu došlo k naplnění všech indikátorů (stavbě 4 funkčních prototypů). Prototypy byly podrobeny provoznímu testování ze kterého byly získány vzorky zpracovaného materiálu a ty následně detailně popsány nástroji chemické analýzy a testovány po stránce toxicity a biologické dostupnosti. Výsledky těchto parametrů, které jsou hlavními ukazateli kvality dosažených výstupů v rámci vývoje technologie zpracování rostlinných materiálů pro léčebné účely předčily očekávání konsorcia a potvrdily unikátní vlastnosti zařízení. Tyto výsledky budou zpracovány do marketingových podkladů za účelem další komercializace obou finálních prototypů (I a IV). Celkově tak došlo k úspěšné realizaci všech aktivit výzkumu a vývoje prezentovaných v podnikatelském záměru. Nad rámec toho byly identifikovány výzkumné cíle a výzvy pro další optimalizaci a rozšíření technologie za účelem jejího dlouhodobého udržení na špičce světového trhu. Výsledky projektu považují autoři za průlomové ve světovém měřítku.

6. Seznam příloh, literárních zdrojů, obrázků a tabulek

Přílohy:

Příloha č. 1 - Revizní zpráva

Příloha č. 2 - Protokol o tlakové zkoušce

Příloha č. 3 - Protokol o funkční zkoušce

Literární zdroje:

Citace č. 1 - Ethan B Russo - Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects, [Br J Pharmacol](#). 2011 Aug; 163(7): 1344–1364.

Citace č. 2 - Hanah T. Rheay - Potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) for paired phytoremediation and bioenergy production, GCB - Bioenergy, [Volume13, Issue4](#), April 2021, Pages 525-536.

Obrázky:

Obrázek 1 - Průmyslová extrakčně-rafinační jednotka v kompletním zapojení v místě realizace žadatele v Horoušanech.

Obrázek 2 - Původní návrh Prototypu I vytvořený na základě provozních simulací zahrnujících vlastnosti použitých materiálů před testováním modelového dílu extrakčního tubusu.

Obrázek 3 - Modelový díl extrakčního tubusu Prototypu I po testování provozních podmínek.

Obrázek 4 - Prototyp I (extrakčně-rafinační jednotka laboratorních rozměrů) v laboratoři Partnera projektu.

Obrázek 5 - Dílčí Prototypy II a III instalované na společné rámové konstrukci. Zleva: zásobník na proplach, extrakční nádoba malá a rafinační reaktor.

Obrázek 6 - Technologické schéma zapojení dílčích Prototypů II a III.

Obrázek 7 - Ovládací obrazovka se software umožňujícím regulaci zapojení dílčích Prototypů II a III.

Obrázek 8 - Na levé straně Extraktor B - velikostně opovídající průmyslovému využití.

Obrázek 9 - Technologické schéma průmyslového Extraktoru B.

Obrázek 10 - Technologické schéma zapojení průmyslového Extraktoru B do sběrníkového systému.

Obrázek 11 - Ovládací obrazovka se software umožňujícím regulaci reakčních podmínek průmyslového Extraktoru B.

Obrázek 12 - Uprostřed nádoba na tlakový vzduch sloužící jako hnací síla pro transport rozpouštědla v teplotách hluboko pod bodem mrazu.

Obrázek 13 - Rafinační jednotka na bázi mobilní fáze.

Obrázek 14 - Technologické schéma zapojení rafinační jednotky na bázi mobilní fáze.

Obrázek 15 - Ovládací panel se software umožňujícím regulaci procesu rafinace za pomoci mobilní fáze.

Obrázek 16 - Vakuová odparka se speciálním reaktorem umožňujícím dekarboxylaci kanabinoidních kyselin.

Obrázek 17 - zásobníky na chlazení ethanolu umožňující recyklaci dle správné výrobní praxe.

Obrázek 18 - Centrální řídicí jednotka s dotykovým displejem, chlazení, zdroj vakua a zdroj tlakového vzduchu.

Obrázky 19 - 24: Ovládací prvky celé sestavy které jsou součástí software centrální řídicí jednotky.

Obrázek 25 - Prototyp I (extrakčně-rafinační jednotka laboratorních rozměrů) při vývoji metody dekarboxylace v rámci provozního testování.

Obrázek 26 - Malý extraktor (A) + rafinační reaktor a zásobník proplachu samostatně umožňující výrobu herbálních tinktur (přibližný objem výroby 12 l/h).

Obrázek 27 - Velký i malý extraktor (A,B) + rafinační reaktor a zásobník proplachu samostatně umožňující velkokapacitní výrobu herbálních tinktur (přibližný objem výroby 70 l/h).

Obrázek 28 - Samotná rafinace na bázi mobilní fáze.

Obrázek 29 - Samotná vakuová odparka se speciálním dekarboxylačním reaktorem umožňující zpracování herbálních macerátů a řízený rozklad karboxylových kyselin.

Obrázek 30 - Zadní strana sestavy s autonomními řídicími jednotkami.

Obrázek 31 - Maximální průmyslová sestava obsahující zleva: obě extrakční nádoby (A, B), rafinační reaktor, rafinační jednotky na bázi mobilní fáze, vakuovou destilační kolonu, dekarboxylační reaktor, řídicí jednotku se zdrojem chladu vakua a tlakového vzduchu, chlazení ethanolu a zásobník použitého rozpouštědla.

Obrázek 32 - Technologické schéma celé sestavy.

Obrázek 33a - Cílový metabolomický screening fytoKANABINOIDŮ ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie.

Obrázek 33b - Cílový metabolomický screening fytoKANABINOIDŮ ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie.

Obrázek 34a - Cílový metabolomický screening fytoKANABINOIDŮ ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie.

Obrázek 34b - Cílový metabolomický screening fytoKANABINOIDŮ ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie.

Obrázek 35a - Cílový metabolomický screening NEKANABINOIDNÍCH biologicky aktivních látek ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie.

Obrázek 35b - Cílový metabolomický screening NEKANABINOIDNÍCH biologicky aktivních látek ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie.

Obrázek 36a - Cílový metabolomický screening NEKANABINOIDNÍCH biologicky aktivních látek ve vzorku rostlinného materiálu před zpracováním pomocí vyvíjené technologie.

Obrázek 36b - Cílový metabolomický screening NEKANABINOIDNÍCH biologicky aktivních

látek ve vzorku rostlinného výtažku získaného použitím vyvíjené technologie

Obrázek 37 - Srovnání biologické dostupnosti za pomoci měření koncentrace kanabidiolu v séru po orálním podání.

Obrázek 38 - Jaterní funkce vyjádřené pomocí hladin jaterních enzymů.

Obrázek 39 - Orgánová toxicita vyjádřená pomocí hladin malondialdehydu v tkáních.

Obrázek 40 - Orgánová toxicita vyjádřená pomocí hladin oxidu dusnatého v tkáních.

Obrázek 41 - Orgánová toxicita vyjádřená pomocí hladin GSH v tkáních.

Tabulky:

Tabulka 1 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a výtažku z něj získaného (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu fytokanabinoidů.

Tabulka 2 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a výtažku z něj získaného (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu terpenů a terpenoidů.

Tabulka 3 - Srovnání rostlinného výtažku před purifikací (Výsledek A) a po purifikaci (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu reziduálních pesticidů.

Tabulka 4 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a z něj získaného výtažku po následné purifikaci (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu těžkých kovů.

Tabulka 5 - Srovnání rostlinného výtažku před purifikací (Výsledek A) a po purifikaci (Výsledek B) po stránce kvantitativní analýzy obsahu polycyklických aromatických uhlovodíků.

Tabulka 6 - Srovnání vstupního rostlinného materiálu před extrakcí (Výsledek A) a z něj získaného výtažku po následné purifikaci (Výsledek B) po stránce stanovení obsahu mikrobiálních kontaminantů.

Tabulka 7 - Kvantitativní analýza obsahu reziduálních rozpouštědel ve vzorku rostlinného výtažku získaného v rámci provozního testování Prototypu IV.