

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ-ΑΓΡΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΜΣ: «ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ:
Καλλιέργεια, Μεταποίηση και Παραγωγή Προϊόντων Υψηλής Προστιθέμενης Αξίας»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

"Εκχύλιση και ανάλυση σπόρων βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) και
κανναβελαίου από ποικιλίες της ελληνικής επικράτειας."

ΕΚΠΟΝΗΣΗ: ΠΙΑΧΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

(υπογραφή)

(υπογραφή)

(υπογραφή)

Μ. Χαλαμπαλάκη
Αναπ. Καθηγήτρια
(επιβλέπουσα)

Ε. Καμβούκου-Βογιατζή
Καθηγήτρια

Δρ. Α. Αγγελής

Στον Πατέρα μου...

Περικλή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), στο Τμήμα Φαρμακευτικής, στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων και στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων κατά τη διάρκεια του του ακαδημαϊκού έτους 2021-2022.

Μέσα στις επόμενες λίγες γραμμές θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν και με στήριξαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας και συγκεκριμένα την επιβλέπουσα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α. Μαρία Χαλαμπαλάκη, την Καθηγήτρια Ελένη Καμβούκου-Βογιατζή και Διευθύντρια του Π.Μ.Σ. του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον Διδάκτορα Αποστόλη Αγγελή που δέχτηκαν να αξιολογήσουν και να κρίνουν την εργασία μου.

Ιδιαίτερως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Χαλαμπαλάκη Μαρία, για την ανάθεση του θέματος και για την ευκαιρία και τη δυνατότητα που μου έδωσε ώστε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα και να διεξαχθεί το πειραματικό μέρος της εργασίας μου στο ΕΚΠΑ. Αισθάνομαι απέραντη ευγνωμοσύνη για τις συμβουλές-παρατηρήσεις της καθώς και για τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε όπου χρειαζόταν καθ' όλη της εργασίας μου καθώς και τις συμβουλές της στη διόρθωση της εργασίας μου.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στον Διδάκτορα της Φαρμακευτικής Σχολής κ. Τζίμα Πέτρο για την αμέριστη βοήθεια μαζί με τις συμβουλές του που μου παρείχε τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας όσο και στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια που μου παρείχαν στο χώρο του εργαστηρίου, για το φιλικό κλίμα και τις γνώσεις που κατάφερα να αποκτήσω από όλους.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς και στα αδέρφια μου που ήταν αρωγοί και με στήριζαν σταθερά όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιομηχανική κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) ανήκει στα ελαιούχα – κλωστικά φυτά. Η κάνναβη καλλιεργείται από αρχαιοτάτων χρόνων στην Ασία, υπάρχουν ισχυρές αρχαιολογικές ενδείξεις για την ευρεία χρήση της κάνναβης στην Κίνα ως οικονομική καλλιέργεια γύρω στο 4500 π.Χ, ενώ από το 1.400 π.Χ. την χρησιμοποιούσαν στην Περσία ως φάρμακο. Από την αρχαιότητα μέχρι το τέλος του 18ου αιώνα η κάνναβη καλλιεργούνταν σε μεγάλη σχετική έκταση στην Ευρώπη, γιατί αποτελούσε τη μοναδική ύλη για την κατασκευή σχοινιών και υφασμάτων. Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν την κάνναβη για την παραγωγή σχοινιού και χονδροειδούς υφάσματος (μάλλον δεν τη χρησιμοποίησαν ως φάρμακο). Στα μέσα του 20ού αιώνα, η κάνναβη αποτελούσε βασική γεωργική καλλιέργεια και εξαγωγίμο προϊόν και λειτουργούσαν στην Ελλάδα κανναβουργεία που επεξεργάζονταν την ίνα για τη δημιουργία σκοινιών. Η καλλιέργεια της κάνναβης απαγορεύτηκε εντελώς με νόμο το 1993. Το πρόβλημα πάντα ήταν η δυνατότητα καλλιέργειας της κάνναβης για παραγωγή ινών χωρίς να υπάρχει ο κίνδυνος παραλαβής και ρητινών με ψυχοτρόπο δράση. Σήμερα, χάρις στην γενετική βελτίωση έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες κάνναβης με φυτά μόνοικα-δίοικα, με ιδιαιτέρως χαμηλή περιεκτικότητα σε τετραϋδροκανναβινόλη - THC (μικρότερη του 0,2%) όπως ορίζουν και οι σχετικοί Κοινοτικοί Κανονισμοί. Έτσι, μπορεί να καλλιεργηθεί η κάνναβη για την παραγωγή ινών ή/και σκευασμάτων με μη-ψυχοτρόπα κανναβινοειδή όπως η κανναβιδιόλη (CBD), χωρίς τους κινδύνους της ψυχοτρόπου δράσης.

Σκοπός της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της ποσοτικής διακύμανσης των κύριων κανναβινοειδών (CBD, CBDA, THC και THCA) σε διαφορετικά δείγματα σπόρων και ελαίων βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.). Η εκχύλιση και η ανάλυση σπόρων βιομηχανικής κάνναβης καθώς και κανναβέλαιου πραγματοποιήθηκε σε διάφορες ποικιλίες της ελληνικής επικράτειας. Χρησιμοποιήθηκαν 10 ποικιλίες σπόρων κάνναβης και 9 ποικιλίες ελαίων που ελήφθησαν από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Κατόπιν βελτιστοποίησης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα (MAE) οδηγώντας σε αποτελεσματική παραλαβή κανναβινοειδών. Παράλληλα, αξιοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (UPLC-PDA) παρέχοντας γρήγορα και ακριβή ποσοτικά δεδομένα. Τα πειραματικά αποτελέσματα της έρευνας μας έδειξαν ότι οι διαφορές που παρατηρούνται ενδέχεται να σχετίζονται με την καλλιεργούμενη ποικιλία, περιβαλλοντικές (π.χ. εδαφοκλιματικές) συνθήκες, καλλιεργητικές τεχνικές (λίπανσης, άρδευσης κ.α.) και φυτικό τμήμα, μεταξύ άλλων. Φαίνεται επίσης η συγκέντρωση κανναβινοειδών να επηρεάζεται από το μέσο και τη διαδικασία εκχύλισης.

Λέξεις – Κλειδιά: Κάνναβη, Έλαιο κάνναβης, κανναβινοειδή, Μέθοδος εκχύλισης, MAE, UPLC

ABSTRACT

Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) has been cultivated since ancient times in Asia as there is strong archaeological evidence for the widespread use of hemp in China as an economic crop around 4500 BC, while from 1400 BC it was used in Persia as a medicine. For many centuries, hemp was cultivated in a relatively large area in Europe, as it was the only material for the manufacture of ropes and fabrics. The Greeks and the Romans used hemp to make rope and coarse cloth (they probably didn't use it as medicine). In the mid-20th century, hemp was a staple agricultural crop and export product and hemp mills operated in Greece that processed the fiber to create ropes. The cultivation of hemp was completely banned by law in 1993. The problem has always been the ability to grow hemp for fiber production without the risk of receiving the resins with potential psychotropic effects. Today, thanks to genetic improvement, hemp varieties have been created with monoecious-dioecious plants with a tetrahydrocannabinol (THC) content of less than 0.2%, as required by the relevant EU Regulations. Thus, hemp can be cultivated to produce fibers, without the risks associated with psychotropic action.

The purpose of this thesis was to investigate the quantitative variation of the main cannabinoids (CBD, CBDA, THC and THCA) in different samples of seeds and oils of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). The extraction and analysis of industrial hemp seeds as well as hemp oil was done from varieties of the Greek territory. 10 varieties of hemp seeds and 9 varieties of oils obtained from the Agricultural University of Athens were used. For the needs of the research, the microwave extraction method (MAE) was used, which according to the literature is a modern, efficient process of high extractive efficiency in cannabinoids, giving accurate results. The experimental results of our research showed that the differences observed may correlate with cultivated varieties, environmental (e.g. pedoclimatic) conditions, cultivation practices (fertilization, irrigation, etc.) and plant part, among others. It also appears that the concentration of cannabinoids is affected by the extraction process.

Keywords: Cannabis, Hemp Oil, cannabinoids, Extraction Method, MAE, UPLC

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
1.1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιολογία του φυτού <i>C. sativa</i>	1
1.1.1	Ιστορική Αναδρομή	1
1.1.2	Βοτανική κατάταξη	4
1.1.3	Μορφολογία – Ανατομία	5
1.1.4	Είδη του φυτού Cannabis	8
1.1.5	Χρήσεις φυτού <i>C. sativa</i>	9
1.1.6	Νομοθετικό Πλαίσιο.....	14
1.2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Χημικοί τύποι κανναβινοειδών – κατηγορίες συστατικών κάνναβης 17	
1.2.1	Κανναβινοειδή.....	17
1.2.1.1	Τύπος κανναβιγερόλης (CBG)	20
1.2.1.2	Τύπος κανναβιχρωμενίου (CBC).....	21
1.2.1.3	Τύπος κανναβιδιόλης (CBD)	21
1.2.1.4	Τύπος τετραϋδροκανναβινόλης.....	22
1.2.1.5	Cannabicyclol (CBL), Cannabielsoin (CBE) and Cannabitriol (CBT)	23
1.2.1.6	Τύποι κανναβινόλης (CBN).....	23
1.2.2	Μη κανναβινοειδείς ενώσεις	24
1.2.2.1	Τερπένια και Τερπενοειδή	24
1.2.2.2	Φαινολικές ενώσεις.....	25
1.2.2.3	Φλαβονοειδή.....	26
1.2.2.4	Λιπαρά Οξέα.....	26
1.2.2.5	Λιγναναμίδια	27
1.2.2.6	Αμινοξέα.....	27
1.2.2.7	Στυλβένια και Στυλβενοειδή	27
1.3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μέθοδοι εκχύλισης και ανάλυσης της βιομηχανικής κάνναβης	28
1.3.1	Υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης - Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)	28
1.3.2	Εκχύλιση με μικροκύματα - Microwave Assisted Extraction (MAE)	31
1.3.3	Εκχύλιση με υπερήχους - Ultrasound Assisted Extraction (UAE).....	35
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	40
2.1	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πειραματική Διαδικασία.....	40
2.1.1	Σκοπός διπλωματικής εργασίας.....	40
2.1.2	Προέλευση και ομαδοποίηση δειγμάτων	41
2.1.3	Εκχύλιση φυτικού υλικού (σπόρων)	42

2.1.3.1	1 ^η ΔΟΚΙΜΗ.....	43
2.1.3.2	2 ^η ΔΟΚΙΜΗ.....	43
2.1.3.3	3 ^η ΔΟΚΙΜΗ.....	44
2.1.3.4	4 ^η ΔΟΚΙΜΗ.....	45
2.1.3.5	Τελικό Πείραμα	49
2.1.4	Εκχύλιση κανναβέλαιου	53
2.1.5	Ανάλυση του εκχυλίσματος με τεχνική υγρής χρωματογραφίας – Προσδιορισμός κανναβινοειδών με UPLC	58
2.2	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συζήτηση – Αποτελέσματα	60
2.2.1	Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης σπόρων και ελαίου - σύγκριση τεχνικών.....	60
2.2.2	Σύγκριση της συγκέντρωσης των CBD, CBDA, THC, THCA και απόδοσης εκχυλίσματος μεταξύ των ποικιλιών στους σπόρους της <i>C. sativa</i>	68
2.2.3	Σύγκριση της συγκέντρωσης των CBD, CBDA, THC, THCA και απόδοσης εκχυλίσματος σε έλαια από διάφορες ποικιλίες της <i>C. sativa</i>	80
2.2.4	Συσχέτιση στοιχείων καλλιεργητικής τεχνικής (άρδευση και λίπανση) ανά ποικιλία με την περιεκτικότητα κανναβινοειδών στους σπόρους	82
3	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	97
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	99
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	102

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 - Cannabis Sativa.....	1
Εικόνα 2 - Χώρες που εντοπίζεται η κάνναβη.....	2
Εικόνα 3 - Χώρες που έχει εισαχθεί η κάνναβη.....	2
Εικόνα 4 - Αρσενικό και Θηλυκό Φυτό Κάνναβης σε Πρώιμο Στάδιο	6
Εικόνα 5 - Αρσενικό και Θηλυκό Φυτό Κάνναβης σε Προχωρημένο Στάδιο	6
Εικόνα 6 - Μορφολογικές Διαφορές των Ειδών Κάνναβης	9
Εικόνα 7 - Μηχανισμός Δράσης Κανναβοειδών ενάντια στα Καρκινικά Κύτταρα (Abrams DI et al., 2015).....	12
Εικόνα 8 - Ανατομικές λεπτομέρειες του στελέχους κάνναβης.....	13
Εικόνα 9 - Διαγραμματική Απεικόνιση Χρήσης Κανναβης στις ΗΠΑ	14
Εικόνα 10 - Δομή Nabilone.....	15
Εικόνα 11 - Δομή Dronabinol	15
Εικόνα 12 - Δομή Nabiximols	15
Εικόνα 13 - Διαγραμματική Απεικόνιση Χρήσης Κάνναβης στην Ευρώπη	16
Εικόνα 14 - Βιοσύνθεση Φυτοκανναβοειδών.....	18
Εικόνα 15 - Βιοσύνθεση Κανναβιγερόλης.....	20
Εικόνα 16 - Βιοσύνθεση Κανναβιχρωμίνης.....	21
Εικόνα 17 - Βιοσύνθεση Κανναβιδιόλης.....	22
Εικόνα 18 - Βιοσύνθεση THC.....	23
Εικόνα 19 - Βιοσύνθεση μη Κανναβινοειδών	25
Εικόνα 20 - Κύριες μορφές υγρής χρωματογραφίας	28
Εικόνα 21 - Ανιχνευτής Κυψέλη ροής ACQUITY Tunable UV/Visible	29
Εικόνα 22 - Σύγκριση των τεχνικών HPLC και UPLC	30
Εικόνα 24 - Σχήμα λειτουργίας μονάδας για την εκχύλιση διαλυτών από φυτικές πηγές (Vinatoru et al., 2017)	36
Εικόνα 25 - Δημιουργία φυσαλίδων σπηλαίωσης και κατάρρευσή τους (Vinatoru et al., 2017).....	36
Εικόνα 26 - Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων φυσικών/χημικών διεργασιών που μπορεί να συμβούν κατά την εκχύλιση με διαλύτη από φυτικό υλικό (Vinatoru et al., 2017)	37
Εικόνα 27 - Αναπαράσταση ενός διογκωμένου φυτικού σωματιδίου που περιβάλλεται από στρώμα διαλύτη και του και τα προκύπτοντα είδη διάχυσης που συμβαίνουν.....	38
Εικόνα 28 - Σπόροι Κάνναβης.....	42
Εικόνα 29 - Κονιοποιημένοι σπόροι Κάνναβης.....	42
Εικόνα 30 - Διήθηση εκχυλίσματος με διηθητικό χαρτί	50
Εικόνα 31 - Εκχύλισμα κάνναβης σε ογκομετρική φιάλη	51
Εικόνα 32 - Εκχύλισμα κάνναβης σε φιαλίδια Falcon.....	51
Εικόνα 33 - Φιαλίδια HPLC για ανάλυση	52
Εικόνα 34 - Έλαια Κάνναβης.....	53
Εικόνα 35 - Ανάδευση με συσκευή Vortex	56
Εικόνα 36 - Έλαιο κάνναβης σε Falcon μετά την ανάδευση	57
Εικόνα 37 - Εκχυλίσματα ελαίων κάνναβης μετά την κατάψυξη	57

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 – Βοτανική ταξινόμηση Κάνναβης	5
Πίνακας 2 - Κατηγορίες Κανναβινοειδών	18
Πίνακας 3 - Ποικιλίες σπόρων κάνναβης	41
Πίνακας 4 - Δείγματα σπόρων βιομηχανικής κάνναβης	41
Πίνακας 5 - Βάρη δειγμάτων 2ης δοκιμής εκχύλισης με UAE	43
Πίνακας 6 - Βάρη δειγμάτων 2ης δοκιμής με εκχύλιση MAE	44
Πίνακας 7 - Βάρη δειγμάτων 3ης δοκιμής με εκχύλιση MAE	44
Πίνακας 8 - Βάρη δειγμάτων 4ης δοκιμής εκχύλισης MAE	45
Πίνακας 9 - Συγκεντρωτικός Πίνακας Δοκιμών	47
Πίνακας 10 - Τελικά βάρη ανά ποικιλία	49
Πίνακας 11 - Πρόγραμμα εκχύλισης με μικροκύματα (MAE)	50
Πίνακας 12 - Πρώτο πρόγραμμα ξήρανσης	51
Πίνακας 13 - Δεύτερο πρόγραμμα ξήρανσης	52
Πίνακας 14 - Ποικιλίες ελαίων Κάνναβης	53
Πίνακας 15 - Συνοπτικός Πίνακας Πειραματικής Διαδικασίας Ελαίων	55
Πίνακας 16 - Βάρη ελαίων Κάνναβης ανά ποικιλία	56
Πίνακας 17 – Περιεκτικότητα κανναβινοειδών (% w/w) σε δείγματα σπόρων κάνναβης από διαφορετικές ποικιλίες, καθώς και παράγοντες άρδευσης και λίπανσης (N: λίπανση, ND: not detected – μη ανιχνεύσιμο, M: απουσία λίπανσης/μάρτυρας).	74
Πίνακας 18 - Περιεκτικότητα κανναβινοειδών (μg/g) σε δείγματα σπόρων κάνναβης από διαφορετικές ποικιλίες, καθώς και παράγοντες άρδευσης και λίπανσης (ND: not detected – μη ανιχνεύσιμο).	76
Πίνακας 19 - Βάρος ξηράς ουσίας ανά ποικιλία	78
Πίνακας 20 - Ποσότητα κανναβινοειδών στις ποικιλίες ελαίων κάνναβης (μέσος όρος ± τυπική απόκλιση)	82
Πίνακας 21 - Εξοπλισμός πειραματικής διαδικασίας	99

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1 - Συγκέντρωση CBD 1ης δοκιμής.....	61
Διάγραμμα 2 - Συγκέντρωση CBDA 1ης δοκιμής	61
Διάγραμμα 3 - Συνολική συγκέντρωση CBD 1ης δοκιμής.....	62
Διάγραμμα 4 - Συγκέντρωση CBD 2ης δοκιμής.....	63
Διάγραμμα 5 - Συγκέντρωση CBDA 2ης δοκιμής	63
Διάγραμμα 6 - Συνολική συγκέντρωση 2ης δοκιμής	64
Διάγραμμα 7 - Συγκέντρωση CBD 3ης δοκιμής.....	65
Διάγραμμα 8 - Συγκέντρωση CBDA 3ης δοκιμής	65
Διάγραμμα 9 - Συνολική συγκέντρωση CBD 3ης δοκιμής.....	66
Διάγραμμα 10 - Συγκέντρωση CBD 4ης δοκιμής.....	67
Διάγραμμα 11 - Συγκέντρωση CBDA 4ης δοκιμής	67
Διάγραμμα 12 - Συνολική συγκέντρωση CBD 4ης δοκιμής.....	68
Διάγραμμα 13 - Συγκέντρωση CBD ανά ποικιλία και άρδευση	69
Διάγραμμα 14 - Συγκέντρωση CBDA ανά ποικιλία και άρδευση.....	70
Διάγραμμα 15 - Συνολική συγκέντρωση CBD ανά ποικιλία και άρδευση	70
Διάγραμμα 16 - Συγκέντρωση THC ανά ποικιλία και άρδευση	71
Διάγραμμα 17 - Συγκέντρωση THCA ανά ποικιλία και άρδευση.....	72
Διάγραμμα 18 - Συνολική συγκέντρωση THC ανά ποικιλία και άρδευση	72
Διάγραμμα 19 - Ποσοτικός προσδιορισμός ξηράς ουσίας ανά ποικιλία και άρδευση	80
Διάγραμμα 20 - Ποσότητα κανναβινοειδών στις ποικιλίες ελαίων κάνναβης.....	81
Διάγραμμα 21 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας USO ανά άρδευση.....	82
Διάγραμμα 22 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας USO ανά λίπανση.....	83
Διάγραμμα 23 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA ανά άρδευση	84
Διάγραμμα 24 – Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA 27 ανά λίπανση.....	84
Διάγραμμα 25 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FUTURA 75 ανά άρδευση	85
Διάγραμμα 26 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FUTURA 75 ανά λίπανση.....	85
Διάγραμμα 27 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FINOLA ανά άρδευση.....	86
Διάγραμμα 28 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FINOLA ανά λίπανση.....	86
Διάγραμμα 29 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA 70 ανά άρδευση	87
Διάγραμμα 30 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA 70 ανά λίπανση	87
Διάγραμμα 31 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας CARMAGNOLA ανά άρδευση.....	88
Διάγραμμα 32 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας CARMAGNOLA ανά λίπανση.....	88
Διάγραμμα 33 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FERIMON ανά άρδευση	89
Διάγραμμα 34 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FERIMON ανά λίπανση	89
Διάγραμμα 35 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας ZUZANA ανά άρδευση	90
Διάγραμμα 36 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας ZUZANA ανά λίπανση	90
Διάγραμμα 37 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FEDORA ανά άρδευση	91
Διάγραμμα 38 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FEDORA ανά λίπανση.....	91
Διάγραμμα 39 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας KC DORA ανά άρδευση.....	92
Διάγραμμα 40 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας KC DORA ανά λίπανση	92

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Βιολογία του φυτού *C. sativa*

Η κάνναβη (*Cannabis sativa* L.) (Εικόνα 1) είναι ένα ετήσιο ποώδες ανθοφόρο φυτό, ιθαγενές της Ανατολικής Ασίας, αλλά λόγω της ευρείας καλλιέργειας εντοπίζεται πλέον παγκοσμίως. Αξίζει να αναφερθεί πως καλλιεργείται από την αρχαιότητα στην περιοχή της Κεντρικής Ασίας και συγκεκριμένα στην Κίνα και την Ινδία (Russo et al., 2008). Αναφορές καλλιέργειας του φυτού απαντώνται σε όλη την καταγεγραμμένη ιστορία ενώ το ενδιαφέρον για το φυτό αυτό αναζωπυρώθηκε αφού αποτελεί πηγή βιομηχανικών ινών, σπορέλαιου, τροφής σε θρησκευτικές/πνευματικές τελετές καθώς και στην ιατρική (Piluzza et al., 2013). Εξίσου μεγάλο ενδιαφέρον για αυτό το φυτό αυτό δείχνει ο φαρμακευτικός και ο κατασκευαστικός τομέας, καθώς οι μεταβολίτες του παρουσιάζουν ισχυρές βιοδραστηριότητες στην ανθρώπινη υγεία ενώ οι εξωτερικοί και εσωτερικοί ιστοί του στελέχους του μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή βιοπλαστικών και υλικού παρόμοιου με σκυρόδεμα, αντίστοιχα. Κάθε μέρος του φυτού συλλέγεται διαφορετικά, ανάλογα με τον σκοπό χρήσης του.



Εικόνα 1 - *Cannabis Sativa*

1.1.1 Ιστορική Αναδρομή

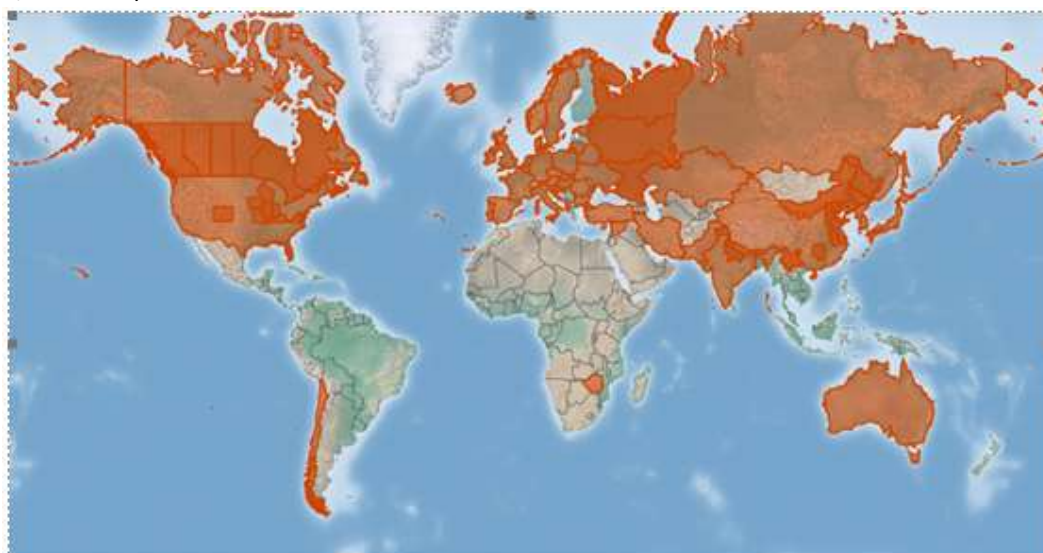
Η ακριβής προέλευση της κάνναβης και η καλλιέργειά της δεν είναι πολύ σαφής. Ωστόσο, τόσο οι ιστορικοί όσο και οι αρχαιολόγοι συμφωνούν ότι η κάνναβη ήταν μια από τις πρώτες μη εδωδιμες καλλιέργειες που καλλιεργήθηκαν. Θεωρείται ότι το φυτό προέρχεται πιθανώς από την Κεντρική και Νοτιοανατολική Ασία και λέγεται πως αυτές οι περιοχές διαδραμάτισαν ζωτικής σημασίας ρόλο όσο αναφορά την εξέλιξη του φυτού της κάνναβης (Stevens et al., 2016, Jiang et al., 2006). Είναι γεγονός ότι οι αλλαγές που συνέβησαν κατά την περίοδο της παγετώδους εποχής του Πλειστόκαινου και μετά επηρέασαν την πρόοδο των κοινωνιών η οποία συνοδεύτηκε από τη *C. Sativa*. Από ιστορικές μελέτες προκύπτει ότι στις τσέχικες παλαιολιθικές τοποθεσίες χρησιμοποιήθηκε ποικιλία τεχνικών που είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή πλεκτών καλαθιών με κύριο συστατικό την

C. Sativa. Το παραπάνω αποτελεί την αρχαιότερη αρχαιολογική μαρτυρία παγκοσμίως για τη χρήση του φυτού (Adonasio et al., 1996). Επίσης, στη περιοχή της Ταϊβάν νεολιθικά στοιχεία δείχνουν πως το φυτό της Κάνναβης χρησιμοποιήθηκε πριν από 12.000 χρόνια και συνέβαλε στην κατασκευή υφασμάτων (Li, 1974).

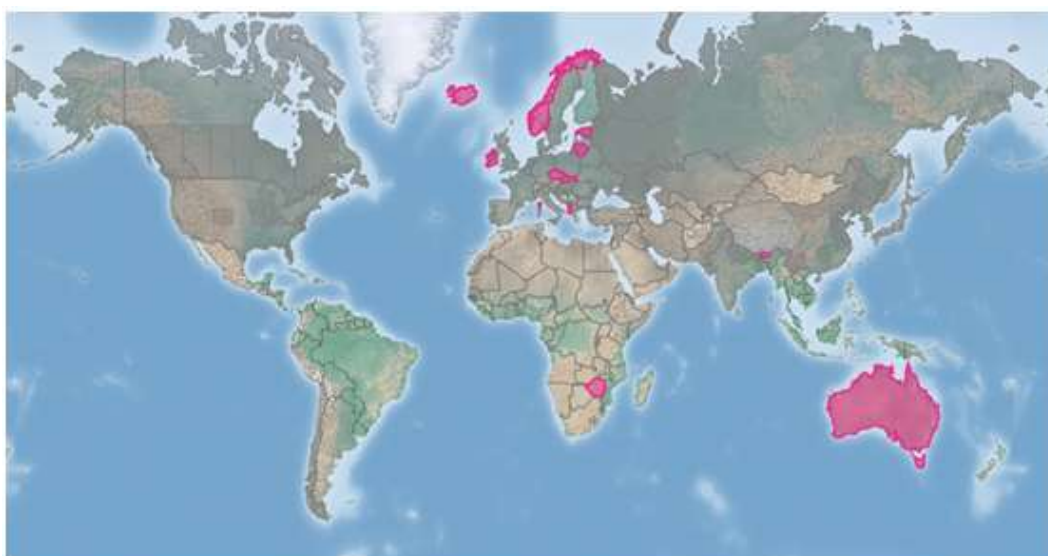
Με την πάροδο των αιώνων η *C. sativa* έχει θεωρηθεί από διάφορες θρησκείες ως ένα ιερό φυτό (Τουων, 1981). Αξίζει να αναφερθεί, ότι τόσο στην Ινδία όσο και στο Θιβέτ μέρη του φυτού όπως είναι τα άνθη και οι ρητίνες χρησιμοποιούνταν για διαλογισμό και επικοινωνία με τα πνεύματα (Schultes et al., 1992).

Όσο αναφορά τη *C. sativa* στην Ιατρική χρησιμοποιήθηκε από τους κινέζους πριν από 5000 χρόνια (Abel, 1980). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε πριν από 3000 χρόνια στην Ασσυρία και την Αίγυπτο όπως προκύπτει από διάφορες μαρτυρίες (Erstein, 2010).

Άλλες περιοχές προέλευσης του φυτού θεωρούνται μια περιοχή μεταξύ της Κασπίας Θάλασσας και της λίμνης Βαϊκάλης ή μια περιοχή γύρω από τα βουνά Altai ενώ οι McPartland et al. (2000) προτείνει τα νότια όρη Tien Shan. Στους ακόλουθους χάρτες φαίνονται οι χώρες που απαντάται το φυτό καθώς και αυτές στις οποίες έχει εισαχθεί (Εικόνα 2, Εικόνα 3).



Εικόνα 2 - Χώρες που εντοπίζεται η κάνναβη



Εικόνα 3 - Χώρες που έχει εισαχθεί η κάνναβη

Υπάρχουν ισχυρές αρχαιολογικές ενδείξεις για την ευρεία χρήση της κάνναβης στην Κίνα ως οικονομική καλλιέργεια γύρω στο 4500 π.Χ. Η συντριπτική πλειονότητα των υπολειμμάτων ινών κάνναβης έχει ανακτηθεί από αρχαιολογικούς χώρους στην Κίνα. Η παλαιότερη γραπτή αναφορά για τη χρήση της κάνναβης είναι ένα κινέζικο έγγραφο της τρίτης χιλιετίας π.Χ., στο οποίο περιεγράφηκε η φαρμακευτική χρήση της κάνναβης. Σε έναν τάφο στην επαρχία Shaanxi της Κίνας το 1957, οι αρχαιολόγοι ανακάλυψαν ένα κομμάτι χαρτί που περιείχε ίνες κάνναβης, που χρονολογείται από το 140–87 π.Χ. Αυτό θεωρείται το παλαιότερο κομμάτι χαρτιού που έχει ανακτηθεί ποτέ (Carod-Artal, 2013). Σύμφωνα με τον Vanilov, η εξημέρωση της κάνναβης πιθανότατα συνέβη ανεξάρτητα σε πολλά κέντρα στη βορειοανατολική Ασία πριν από περίπου έξι χιλιετίες. Γύρω στο 1000 π.Χ., η κάνναβη πιθανότατα είχε μεταναστεύσει δυτικά και νότια με νομάδες και εμπόρους και εξαπλώθηκε στην Ινδία, τη Μέση Ανατολή, τη Μικρά Ασία, την Αφρική και την Ευρώπη. Στην Αίγυπτο, χρησιμοποιούσαν το *C. sativa* για να μειώσουν τον πόνο και να βελτιώσουν τη διάθεσή τους ενώ η παρουσία χασίς βρέθηκε στους ιστούς του σώματος των μουμιών, που χρονολογούνται περίπου στο 1000 π.Χ. (Carod-Artal, 2013). Την εποχή αυτή, ο Ιατρός Πεντάνιος Διοσκουρίδης ανέφερε τα σημαντικά οφέλη της χρήσης του φυτού (Riddle, 2011). Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν την κάνναβη για την παραγωγή σχοινιού και χονδροειδούς υφάσματος. Μάλλον δεν το χρησιμοποίησαν ως φάρμακο.

Οι διάφορες μορφές του *C. sativa* ήταν γνωστές στη μεσαιωνική Ευρώπη. Την περίοδο του Μεσαίωνα οι Ιταλοί ξεκίνησαν σε μεγάλη έκταση την καλλιέργεια και το εμπόριο του φυτού στη Μεσόγειο. Την ίδια περίοδο Ισπανοί και Άγγλοι άποικοι εισήγαγαν στην Αμερική την καλλιέργεια του φυτού – που μέχρι τότε ήταν άγνωστη – για ποικιλίες που αφορούσαν την Παρασκευή υφασμάτων (Anon, 1972).

Το 1830, ο Γάλλος γιατρός Jacques Joseph Moreau μελέτησε τις επιδράσεις του *C. sativa* στις ψυχικές ασθένειες (Moreau, 1973). Το 19^ο αιώνα το *C. sativa* χρησιμοποιήθηκε ως αναλγητικό, αντιεμετικό, αντισπασμωδικό και αντιφλεγμονώδες στην αγγλική Ιατρική (Aldrich, 1997). Το 1932, σε νόμο που ψήφισε το Βρετανικό Κοινοβούλιο απαγορεύτηκε η θεραπευτική χρήση και έτσι αφαιρέθηκε από τη φαρμακοβιομηχανία της Βρετανίας (Hall, 2008).

Το 1937, ο νόμος που ψηφίστηκε περί φορολογίας της μαριχουάνας είχα σαν αποτέλεσμα να απαγορευτεί τόσο η παραγωγή όσο και η κατοχή ή μεταφορά του *C. sativa* στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (Bonnie and Whitebread, 1974).

Από φαρμακολογική άποψη, το 1964, οι Gaoni και Mechoulam άνοιξαν το δρόμο για τη μελέτη των κανναβινοειδών απομονώνοντας και συνθέτοντας το κύριο φυτοκανναβινοειδές, το Δ9-THC (Mechoulam και Gaoni, 1965).

Στη δεκαετία του 1980, η Pfizer εργάστηκε για την ανάπτυξη συνθετικών συνδέσμων των υποδοχέων κανναβινοειδών (Pertwee, 2006). Στη συνέχεια, ο υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου 1 (CB1) ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά το 1990, στη συνέχεια ο υποδοχέας κανναβινοειδών τύπου-2 (CB2) το 1993 (Pertwee, 2006). Επιπλέον, στη δεκαετία του 1990 οι δύο ενδογενείς συνδέτες του υποδοχέα CB, η αραχιδονουλαϊθανιολαμίνη, και η 2-αραχιδονυλογλυκερόλη, ανακαλύφθηκαν επίσης (Pertwee, 2006).

Ακόμα και σήμερα, υπάρχει μια συνεχής συζήτηση σχετικά με το νομικό καθεστώς του *C. sativa* σε πολλές δυτικές κυβερνήσεις (McGinty et al., 2017). Συγκεκριμένα, η κυβέρνηση της χώρας μας δεν είναι σε θέση να υποστηρίξει την πολιτική της, η ελευθερία χρήσης της *C. sativa* για ιατρικούς ή ψυχαγωγικούς σκοπούς θεωρείται από πολλούς ανθρώπους ως κατάκτηση των πολιτικών δικαιωμάτων και από άλλους ως μείζον κοινωνικοπολιτισμικό πρόβλημα.

Στην Περσία και την Αραβία σίγουρα χρησιμοποιούσαν την κάνναβη ως ναρκωτικό επειδή ο όρος «χασίς» είναι αραβικός και προέρχεται από το «hashish al kief», που σημαίνει «αποξηραμένο βότανο της απόλαυσης». Η πρώτη καταγραφή χρήσης ναρκωτικών κάνναβης ήταν οι προϊστορικοί Σκύθες. Η καλλιέργεια ναρκωτικών εξαπλώθηκε από την Ινδία στην Αραβία, την Ανατολική Αφρική, τη Νότια Αφρική και τη Νοτιοανατολική Ασία. Κατά τη διάρκεια του 1800, υπηρέτες από την Ινδία μετέφεραν σπόρους στην Τζαμάικα και από εδώ η καλλιέργεια ναρκωτικών εξαπλώθηκε στον Κόλπο του Μεξικού.

Υπάρχουν αρκετά στοιχεία για τη διάχυση της κάνναβης στην Ευρώπη και τη Μέση Ανατολή. Η ευρωπαϊκή καλλιέργεια κάνναβης με ίνες επεκτάθηκε το 1500 και το 1600, για να καλύψει τη ζήτηση για σχοινιά και πανιά στη ναυτιλιακή βιομηχανία και οι Ευρωπαίοι εξερευνητές διέδωσαν την καλλιέργεια κάνναβης σε ολόκληρη την Αμερική, την Αυστραλία και τη δυτική Αφρική. Από τον 16ο έως τον 18ο αιώνα, η κάνναβη ήταν μια σημαντική καλλιέργεια φυτικών ινών στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Η παραγωγή κάνναβης μειώθηκε τον 19ο και τον 20ο αιώνα λόγω της μεγάλης καλλιέργειας βαμβακιού, της εμφάνισης συνθετικών ινών και επειδή η καλλιέργεια κάνναβης έχει καταστεί παράνομη σε πολλές χώρες.

Σήμερα η κατανομή της καλλιέργειών είναι ελάχιστα τεκμηριωμένη. Ο FAO αναφέρει μόνο 16 χώρες που καλλιεργούν κάνναβη. Τα στατιστικά στοιχεία της ΕΕ είναι πιο ακριβή αν και δεν είναι πρόσφατα (Mignoni, 1997). Το Ινστιτούτο Nona συμπληρώνει τις στατιστικές της ΕΕ με αποτελέσματα παρακολούθησης 31 χωρών (Karus et al., 2000). Ένας κατάλογος των κύριων κέντρων καλλιέργειας για μια μικρή καλλιέργεια, όπως η κάνναβη, ενδέχεται να αλλάξει και να είναι ξεπερασμένος. Η ναρκωτική κάνναβη, για παράδειγμα, καλλιεργείται σχεδόν παγκοσμίως (το ODCCP αναφέρει 120 χώρες), αλλά λίγες χώρες είναι συνεπείς και έχουν σημαντικές εξαγωγές.

1.1.2 Βοτανική κατάταξη

Η αρχική ταξινόμηση του φυτού έγινε το 1753, οπότε και ο Carl Linnaeus αναγνώρισε μόνο ένα είδος, την *Cannabis sativa*. Το 1785, ο Lamarck προσδιόρισε ότι τα στελέχη κάνναβης από την Ινδία ήταν διαφορετικά από την κοινή κάνναβη της Ευρώπης, με βάση τη μορφολογία του στελέχους και των φύλλων, και ονόμασε το νέο είδος *C. indica* Lam. Οι Schutler και Anderson, για την ταξινόμηση του φυτού, περιέγραψαν τρία είδη: το *Cannabis sativa* Linnaeus, το *Cannabis indica* Lamarck και το *Cannabis ruderalis* Janisch (Schultes et al., 1974- Anderson, 1980). Τα είδη αυτά διαφέρουν τόσο ως προς το ύψος όσο και ως προς την περιεκτικότητα της ψυχοδραστικής ουσίας. Τόσο οι γενετικές όσο και οι ταξινομικές αναλύσεις οδήγησαν στη διαπίστωση ότι υπήρχε γεωγραφικός διαχωρισμός μεταξύ της *C. sativa* ("ευρωπαϊκής"), της *C. indica* ("Νότια Ασία-Αφρική") και *C. ruderalis* ("Κεντρική Ασία" (Gilmore et al., 2003). Οι γενετικές αυτές αλλαγές αφορούσαν την παραγωγή D9-THC και οι διαφορές αυτές έχουν αυξηθεί σημαντικά εξαιτίας της παρέμβασης του ανθρώπου (Russo, 2007). Αξίζει να σημειωθεί πως μελέτες που αφορούν την ταξινόμηση του *C. sativa* πραγματοποιούνται ακόμα και σήμερα. Σε μια λεπτομερή ανασκόπηση του προβλήματος ταξινόμησης της κάνναβης, οι Small και Cronquist (1976) όρισαν ένα ενιαίο εξαιρετικά μεταβλητό είδος, την *C. sativa*, με έναν αριθμό υποειδών και ποικιλιών.

Η ταξινόμηση αυτή στηρίχθηκε, εν μέρει, στη συγκέντρωση φυτικής τετραϋδροκανναβινόλης (THC), η οποία είναι ψυχοδραστική ένωση μοναδική στην κάνναβη. Από τη δεκαετία του 1940, οι καλλιεργητές ινών κάνναβης έχουν μειώσει την περιεκτικότητα σε THC, ενώ καλλιεργητές φαρμακευτικού σκοπού έχουν αυξήσει την περιεκτικότητα.

Επιπλέον, τα είδη κάνναβης μπορούν να διασταυρωθούν και να υβριδοποιηθούν,. Επιπλέον, το *C. sativa* και το *C. indica* μπορούν να αναπτυχθούν ελεύθερα στη φύση, εκτός οργανωμένης καλλιέργειας. Αυτά έχουν ονομαστεί *C. ruderalis* (Small and Cronquist, 1976). Στον Πίνακα 1 δίνεται αναλυτικά η βοτανική ταξινόμηση της κάνναβης.

Πίνακας 1 – Βοτανική ταξινόμηση Κάνναβης

Βοτανική ταξινόμηση	
Βασίλειο	Plantae
Φύλο	Spermatophyta
Συνομοταξία	Angiospermae
Ομοταξία	Dicotyledonae
Τάξη	Urticales
Οικογένεια	Cannabaceae
Γένος	<i>Cannabis</i>
Είδος	<i>Cannabis sativa</i> , <i>Cannabis indica</i> , <i>Cannabis ruderalis</i>

1.1.3 Μορφολογία – Ανατομία

Όπως αναφέρθηκε, η κάνναβη είναι ετήσιο φυτό ύψους 1-5 μέτρα ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και τη γενετική ποικιλία. Οι σπόροι (αχαίνια) έχουν στρογγυλοί βάση σε πράσινο-καφέ ή γκρι χρώμα.

Τα νεαρά σπορόφυτα παράγουν ένα ζευγάρι κοτυληδόνων, σαρκώδη και ωοειδή. Οι κοτυληδόνες ακολουθούνται από ένα έως πέντε ζεύγη φύλλων με πράσινο και λευκοπράσινο χρώμα στην επάνω και κάτω επιφάνεια αντίστοιχα. Κατά το πρώιμο βλαστικό στάδιο σχηματίζονται τα αληθινά ζεύγη φύλλων, αντίθετα διατεταγμένα με κοντά μεσογονάτια. Αργότερα στο βλαστικό στάδιο η επιμήκυνση του στελέχους επιτυγχάνεται και η απόσταση μεσογονάτιου αυξάνεται. Το ριζικό σύστημα είναι σφριγηλό και κεντραρισμένο από μια ρίζα.

Η ανθοφορία ξεκινάει με αλλαγή στη φυλλοταξία από αντίθετη σε εναλλακτική. Τα περισσότερα φυτά είναι δίοικα με αρκετές μονόοικες ποικιλίες στην Ευρώπη. Σε μια δίοικη καλλιέργεια, τα αρσενικά και θηλυκά φυτά είναι περίπου ίδιου αριθμού. Τα πρώιμα άνθη primordia εμφανίζονται στη βάση των μίσχων και πρώτα εμφανίζονται τα αρσενικά. Είναι σχήματος καμπυλωτού με πέντε τέπαλα. Οι αρσενικές ταξιανθίες είναι διακλαδισμένοι κυμόζοι. Οι κόκκοι της γύρης είναι σφαιρικοί, λείοι, κίτρινου χρώματος. Τα θηλυκά (υπεροειδή) άνθη είναι μασχαλιαία και τερματικά. Τα φύλλα και τα βράκτια καλύπτονται από ρητινώδεις τρίχες και ο καρπός είναι γκρι-καφέ αχαίνιο.

Η κάνναβη περιέχει πολλές βιοδραστικές ενώσεις που είναι τα κανναβινοειδή, φλαβονοειδή, τερπενοειδή καθώς και αλκαλοειδή (Andre et al., 2016), με πιο δραστικές τα κανναβονοειδή τα οποία ανήκουν στις τερπενοφαινολικές ενώσεις (Taura et al., 2007, Brenneisen, 2007). Χαρακτηριστικά, το *C. sativa* είναι πλούσιο σε αδενώδεις τρίχες, επιδερμικές αδενικές προεξοχές που καλύπτουν τα φύλλα, τα βράκτια και τους μίσχους του φυτού. Οι αδενώδεις τρίχες περικλείουν δευτερογενείς μεταβολίτες όπως τα φυτοκανναβινοειδή, που είναι

υπεύθυνα για την άμυνα και την αλληλεπίδραση με φυτοφάγα ζώα και παράσιτα, και τα τερπενοειδή, τα οποία δημιουργούν τη χαρακτηριστική οσμή του *C. sativa* (Andre et al., 2016).



Εικόνα 4 - Αρσενικό και Θηλυκό Φυτό Κάνναβης σε Πρώιμο Στάδιο



Εικόνα 5 - Αρσενικό και Θηλυκό Φυτό Κάνναβης σε Προχωρημένο Στάδιο

Οι ίνες κάνναβης είναι, πλάτους μόνο 10 μm , αλλά μήκους έως 7,5 cm. Οι ίνες επικαλύπτονται σε δέσμες που περιέχουν από 10-40 κύτταρα ανά δέσμη. Οι δέσμες ινών συχνά διατρέχουν όλο το μήκος των φυτών. Περίπου 25 δέσμες βρίσκονται γύρω από τους μίσχους, ενσωματωμένες σε ένα δακτύλιο παρεγχυματικού φλοιώματος.

Όσο αναφορά τη μορφολογία του φυτού της κάνναβης αυτή ποικίλει ανάλογα με το κλίμα και την ποικιλία. Ως επί το πλείστον αναπτύσσεται στις περισσότερες των περιπτώσεις ως ένα επίμονο ζιζάνιο στις άκρες των καλλιεργούμενων αγρών κυρίως σε εδάφη που έχουν υψηλά ποσοστά σε άζωτο (Reman, 1998). Η *C. sativa* είναι ένα ετήσιο βότανο και ο σπόρος βλασταίνει 3-7 ημέρες μετά την απορρόφηση του νερού. Η πρώιμη βλαστική ανάπτυξη είναι συχνά αργή, αλλά αργότερα η ανάπτυξη μπορεί να είναι αρκετά γρήγορη. Το φυτό της κάνναβης για να μπορέσει να αναπτυχθεί απαιτείται να έχει ένα μέτριο επίπεδο εδαφικής και περιβαλλοντικής υγρασίας καθώς επίσης και καλό φωτισμό. Το *C. sativa* είναι ένα φυτό

όπου η ανάπτυξη του είναι κάθετη και στο στάδιο πριν από την άνθηση παράγει συνέχεια νέα φύλλα. Αυτά τα στάδια απαιτούν χαμηλό φωτισμό και η διάρκειά τους κυμαίνεται περίπου από 6 έως 22 εβδομάδες (Reman, 1998). Γενικά, το κλείσιμο του θόλου (όταν τα φύλλα των παρακείμενων φυτών αναμειγνύονται μεταξύ τους και σκιάζουν το έδαφος) συμβαίνει όταν οι καλλιέργειες ινών έχουν ύψος περίπου 50 cm. Η περιεκτικότητα των φυτοκανναβινοειδών του *C. sativa* φαίνεται ότι επηρεάζεται από τις συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας, ακτινοβολίας, θρεπτικών στοιχείων του εδάφους και παρασίτων, αφού για παράδειγμα οι αραιές βροχοπτώσεις, η χαμηλή υγρασία και το ηλιόλουστο κλίμα δημιουργούν ένα φυτό πλούσιο σε ψυχοδραστικά συστατικά. Στα φύλλα και στα άνθη του *C. sativa* υπάρχουν πολλά κανναβινοειδή καθώς και διάφορα τερπένια τα οποία λειτουργούν σαν φραγμός στην απώλεια νερού από το φυτό όπως συμβαίνει και στους κάκτους όπου αυτή τη δουλειά την αναλαμβάνουν οι κηρώδεις επικαλύψεις του φυτού καθώς και σε άλλα παχύφυτα φυτά (Pate, 1994). Αξίζει να σημειωθεί, πως η περιεκτικότητα των φυτοκανναβινοειδών στη γύρη επηρεάζεται από την υγρασία, δηλαδή, όταν μειώνεται η υγρασία η περιεκτικότητα αυξάνεται. Επιπλέον, σημαντικός είναι και ο ρόλος της θερμοκρασίας όσον αφορά την ποσότητα των κανναβινοειδών, πάντα βεβαίως σε σχέση με την υγρασία του περιβάλλοντος. Όταν το φυτό είναι εκτεθειμένο σε υψηλές υπεριώδεις ακτινοβολίες (UV-B 280-315 nm), τότε παράγεται σημαντικές ποσότητες D9-THC. Μελέτες έδειξαν ότι η D9-THC είναι σταθερότερη στην ακτινοβολία UV-B συγκρίνοντας την με άλλα κανναβινοειδή που αποικοδομούνται γρηγορότερα όταν είναι εκτεθειμένα στην UV-B (Pate, 1994). Η ανάπτυξη του φυτού εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό και από την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών από το έδαφος. Όμως, αυτά τα συστατικά επηρεάζουν και τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών στο φυτό. Από τη μια πλευρά η συγκέντρωση του καλίου (K) στο έδαφος επηρεάζει αρνητικά τη συγκέντρωση του D9-THC στο *C. sativa* ενώ από την άλλη η αλληλεπίδραση των στοιχείων καλίου – φωσφόρου (K-P), αζώτου (N) και ασβεστίου (Ca) συσχετίζονται θετικά με αυτό. Είναι γεγονός, πως το μαγνήσιο (Mg) και ο σίδηρος (Fe) επιδρούν σημαντικά στην παραγωγή των φυτοκανναβινοειδών λόγω ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπαραγόντες για τις ενζυμικές αντιδράσεις (Pate, 1994- Latta and Eaton, 1975). Ακόμα, προκύπτει ότι, τα τερπένια και τα φυτοκανναβινοειδή είναι ικανά να εμποδίζουν επιθέσεις από βακτήρια, μύκητες και έντομα. Αξίζει να σημειωθεί πως, ιδιαίτερα τα θηλυκά φυτά του *C. sativa* ξεχωρίζουν για την ποιότητα του αρώματος τους και πολλές φορές δρουν ως εντομοαπωθητικά και βοηθούν στην καταστολή της γύρω βλάστησης (McPartland, 1997). Ο Duke (1985) προσδιόρισε ότι η βέλτιστη ανάπτυξη του *C. sativa* εμφανίζεται στους 14,3°C. Έχει μια περίοδο ανάπτυξης 2-10 μηνών, η οποία εξαρτάται από το γεωγραφικό πλάτος. Το *C. sativa* έχει εκτεταμένο ριζικό σύστημα και είναι σε θέση να ανεχθεί ξηρές συνθήκες, αν και δεν ευδοκimeί. Το *C. sativa* αναπτύσσεται επίσης ελάχιστα σε υγροτόπους ή σε κορεσμένα εδάφη. Ο Duke (1985) βρήκε ότι η *C. sativa* έχει βέλτιστη ανάπτυξη σε περιοχές με ετήσια βροχόπτωση 970 mm.

Η *C. sativa* αναπτύσσεται καλά σε έντονο ηλιακό φως. Οι McPartland et al. (2000) περιγράφει την καλή ανάπτυξη των φυτών στα 14.000-18.000 lx, ή 215 W/m. Ανθίζει το φθινόπωρο, όταν η φωτοπερίοδος πέφτει κάτω από 12-13 ώρες την ημέρα, ανάλογα με την ποικιλία και την τοποθεσία. Το *C. sativa* ανέχεται την υπεριώδη ακτινοβολία, και υπό συνθήκες υψηλού UV-B η παραγωγή THC ενισχύεται (Lydon et al., 1987). Επιπλέον, αναπτύσσεται σε υψόμετρο μέχρι και 3700 m από το επίπεδο της θάλασσας και από τον ισημερινό έως περίπου τις 63° γεωγραφικό πλάτος (όπως στη Φινλανδία). Οι ποικιλίες κάνναβης με ίνες αναπτύσσονται καλά σε γεωγραφικό πλάτος 40-55° και έχουν κακή απόδοση σε ημιτροπικά και τροπικά γεωγραφικά πλάτη. Ωστόσο, οι ποικιλίες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή φαρμάκων

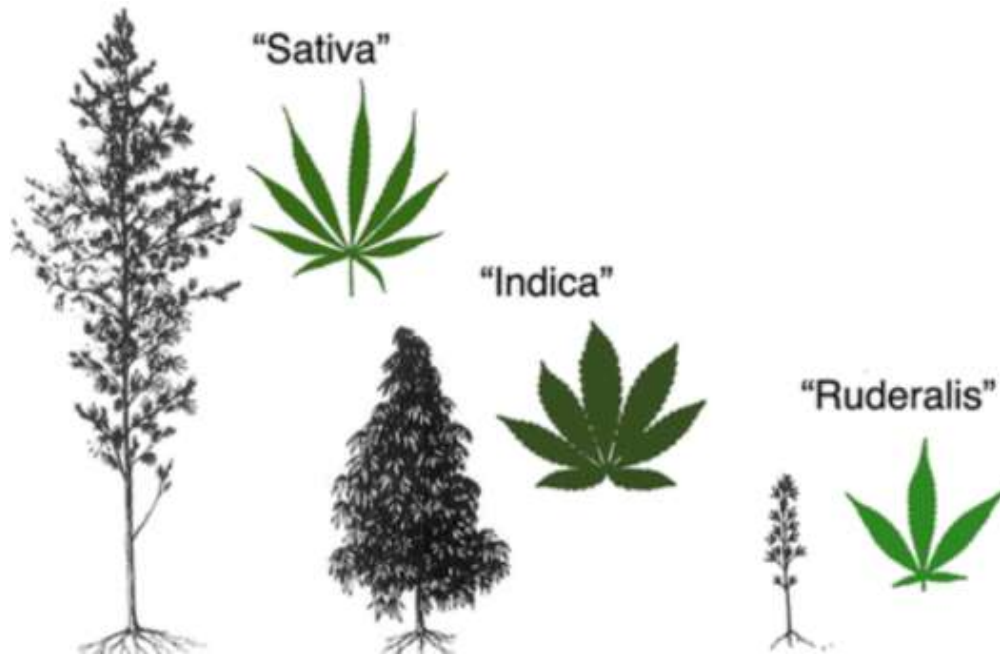
εκτράφηκαν σε ημιτροπικές και τροπικές τοποθεσίες και έχουν κακή ανάπτυξη σε μεγάλα γεωγραφικά πλάτη (πάνω από 45°), επειδή ο παγετός συχνά καταστρέφει τα φυτά πριν από την ανθοφορία. Τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους επηρεάζουν επίσης την παραγωγή κανναβινοειδών. Έτσι, απαιτείται πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, καλά στραγγιζόμενο, καλά δομημένο, ιλυώδες αργιλώδες έδαφος με υψηλή οργανική ουσία. Οι καλλιέργειες φυτών που προορίζονται για φυτικές ίνες απαιτούν υψηλά επίπεδα αζώτου και καλίου, και κατά φθίνουσα σειρά σπουδαιότητας ασβέστιο, φώσφορο και μαγνήσιο. Ωστόσο, οι καλλιέργειες σπόρων εξάγουν λιγότερο κάλιο και περισσότερο φώσφορο από το έδαφος, και οι καλλιέργειες φαρμακευτικής κάνναβης έχουν υψηλή ζήτηση για φώσφορο. Ο Duke (1985) προτείνει ότι ένα pH εδάφους 6,5 είναι το βέλτιστο.

1.1.4 Είδη του φυτού Cannabis

Παρακάτω παρουσιάζονται οι μορφολογικές περιγραφές των διαφόρων ειδών, όπως περιεγράφηκαν από τους Schultes et al. (1974), Small and Cronquist (1976) και McPartland et al. (2000) (Εικόνα 6).

- *Cannabis sativa*: Φυτά ψηλά (μέχρι 6 μέτρα), στελέχη λεία και κούφια, χαλαρά διακλαδισμένα με μακριά μεσογονάτια. Μίσχοι μικροί, συνήθως 5-9 φυλλαράκια ανά φύλλο, φυλλαράκια λογχοειδή, μεγαλύτερα φυλλαράκια μήκους, κατά μέσο όρο 136 mm (αναλογία μήκους/πλάτους = 7,5). Οι ράχες έχουν μακρά μεσογονάτια και τα αχαινία είναι μερικώς εκτεθειμένα. Οι αχαινοί (σπόροι) είναι συνήθως μήκους 3,7 mm, κάπως σε σχήμα φακού με αμβλεία βάση, επιφάνεια θαμπή ανοιχτό προς σκούρο πράσινο και συνήθως χωρίς ανάγλυφο, σπόροι που συνήθως προσκολλώνται στα φυτά στην ωριμότητα. Καλλιεργείται για φυτικές ίνες, λάδι και μερικές φορές για φάρμακα.
- *Cannabis indica*: Φυτά πιο κοντά (κάτω από 3 m), στελέχη λεία και σχεδόν συμπαγή, πυκνά διακλαδισμένα με μικρότερα μεσογονάτια. Μίσχοι μικρότεροι, συνήθως 7-11 φυλλαράκια ανά φύλλο. φυλλαράκια στενά λογχοειδή, τα μεγαλύτερα φυλλαράκια μήκους κατά μέσο όρο 92 mm (αναλογία μήκους/πλάτους = 10). Αχαινοί μήκους κατά μέσο όρο 3,7 mm, λιγότερο σε σχήμα φακού, με πιο στρογγυλεμένη βάση, επιφάνεια πράσινο-καφέ και ανάγλυφο ή μη, με ή χωρίς στρώμα αποκοπής. Καλλιεργείται κυρίως για φάρμακα, αλλά χρησιμοποιείται επίσης για φυτικές ίνες και λάδι.
- *Cannabis ruderalis*: Φυτά μικρά (συνήθως κάτω από 0,5 m), στελέχη λεία και κούφια, περιστασιακά χωρίς διακλαδώσεις. Μίσχοι μικροί, συνήθως 5-7 φυλλαράκια ανά φύλλο, φυλλαράκια ελλειπτικά, μεγαλύτερα φυλλαράκια μήκους κατά μέσο όρο 60 mm (αναλογία μήκους/πλάτους = 6). Αχαινοί μικροί με έντονη δομή αποκοπής στη βάση, επιφάνεια θαμπό πράσινο και ανάγλυφο, στρώμα αποκοπής σαρκώδες με ελαιοπαραγωγικά κύτταρα, σπόροι που απομακρύνονται εύκολα από το φυτό. Άγριο, δεν καλλιεργείται.
- *Cannabis 'afghanica'*: Φυτά κοντά (κάτω από 1,5 m), μίσχοι με ραβδώσεις και σχεδόν συμπαγείς, πυκνά διακλαδισμένοι με κοντά μεσογονάτια. Μίσχοι μακροί, συνήθως 7-11 φυλλαράκια ανά φύλλο, φυλλαράκια σκούρα πράσινα και σε γενικές γραμμές λοξά, τα μεγαλύτερα φυλλαράκια κατά μέσο όρο 130 mm (αναλογία μήκους/πλάτους = 5). Οι ράχες έχουν κοντά μεσογονάτια και οι αχαινοί δεν είναι εκτεθειμένοι - ένθετα, σύνθετα βράκτια παράγονται μερικές φορές. Οι αχαινοί συνήθως έχουν <3,0 mm μήκος, σχεδόν

στρογγυλοί με αμβλεία βάση, επιφάνεια γυαλιστερή γκρι και ανάγλυφη. Καλλιεργείται για ναρκωτικά, κυρίως χασίς.



Εικόνα 6 - Μορφολογικές Διαφορές των Ειδών Κάνναβης

1.1.5 Χρήσεις φυτού *C. sativa*

Η κάνναβη χρησιμοποιείται ως φάρμακο εδώ και 3.000 χρόνια περίπου. Χρησιμοποιήθηκε ευρέως στην ινδική υποήπειρο και εισήχθη στη δυτική ιατρική τη δεκαετία του 1840. Έγινε γνωστή για τις αναλγητικές, ηρεμιστικές, αντιφλεγμονώδεις και αντισπασμωδικές ιδιότητες. Στις αρχές της δεκαετίας του 1900, τα νέα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση παρόμοιων ασθενειών περιόρισαν τη χρήση της. Το 1942, η κάνναβη αφαιρέθηκε από τη φαρμακοποιία των ΗΠΑ. Το 1970, με την έναρξη της Νόμου περί ελεγχόμενων ουσιών, η μαριχουάνα κατατάχθηκε στο Πρόγραμμα Ι. Η Delta-9-THC είναι ένα από τα 100 κανναβινοειδή που βρίσκονται στην φυτό της κάνναβης και θεωρείται ότι είναι το κύριο ψυχοδραστικό συστατικό. Συνολικά, το φυτό περιέχει περίπου 400 ενώσεις που προέρχονται από τον δευτερογενή μεταβολισμό του, πολλές από τις οποίες μπορεί να συμβάλλουν στην στη φαρμακευτική του δράση. Συνθετικό δέλτα-9-THC σε σιγαμέλαιο (δρωναβινόλη, Marinol) έλαβε για πρώτη φορά άδεια και εγκρίθηκε το 1986 για τη θεραπεία της ναυτίας και του εμέτου που σχετίζονται με τη χημειοθεραπεία. Οι κλινικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν εκείνη την εποχή καθόρισαν ότι η δρωναβινόλη ήταν εξίσου αποτελεσματική, αν όχι περισσότερο, από τους διαθέσιμους αντιεμετικούς παράγοντες. Η δρωναβινόλη διερευνήθηκε για την ικανότητά της να διεγείρει το βάρος σε ασθενείς με το σύνδρομο εξάντλησης του AIDS στα τέλη της δεκαετίας του 1980s. Τα αποτελέσματα από διάφορες δοκιμές έδειξαν ότι αν και η ασθενείς ανέφεραν βελτίωση της όρεξης, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση του σωματικού βάρους. Η ναμπιλόνη (Cesamet) είναι ένα άλλο συνθετικό δέλτα-9-THC που διατίθεται επίσης με ιατρική συνταγή. Πιο πρόσφατα, η ναμπιξιμόλη (Sativex), ένα τυποποιημένο εκχύλισμα που χορηγείται ως εκφένωμα έχει αναπτυχθεί και εγκριθεί για ιατρική χρήση στην Ευρώπη και τον Καναδά.

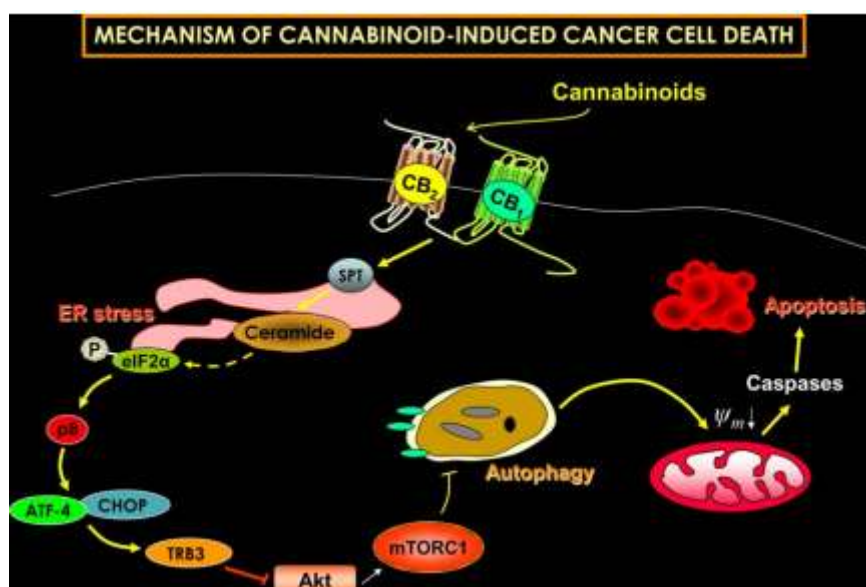
Ένας τομέας στον οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η κάνναβη λόγω των ιδιοτήτων της είναι η αντιμετώπιση των συμπτωμάτων του καρκίνου και αυτό γιατί τα κανναβινοειδή, τα ενεργά συστατικά της, μιμούνται τις επιδράσεις των ενδογενών κανναβινοειδών, ειδικά όσον αφορά την επίδραση με τον υποδοχέα CB1 που βρίσκεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Έτσι, η δέλτα-9-τετραϋδροκανναβινόλη διατίθεται ως συνταγογραφούμενο φάρμακο εγκεκριμένο για τη θεραπεία του καρκίνου, της ναυτίας και του εμέτου που προκαλούνται από χημειοθεραπεία καθώς και της ανορεξίας που σχετίζεται με το σύνδρομο εξάντλησης του AIDS. Πιο συγκεκριμένα:

1. **Αντιεμετική δράση:** Η ναυτία και ο έμετος που σχετίζονται με τη χημειοθεραπεία του καρκίνου εξακολουθούν να αποτελούν σημαντικά κλινικά προβλήματα. Η δροναβινόλη (συνθετικό THC) και η ναμπιλόνη (συνθετικό ανάλογο της THC) δοκιμάστηκαν και δύο ως νέες ουσίες σε ελεγχόμενες κλινικές δοκιμές και έπειτα από πολυάριθμες αναλύσεις επιβεβαιώθηκε η χρησιμότητα τους στη θεραπεία της ναυτίας που προκαλείται από χημειοθεραπεία και του εμέτου. Σε δοκιμή με 1.366 ασθενείς δοκιμάστηκε η χορήγηση από το στόμα της ναμπιλόνης, της δροναβινόλης και λεβοναντραδόλης, όπου βρέθηκε ότι τα κανναβινοειδή ήταν σημαντικά πιο αποτελεσματικά αντιεμετικά από την προχλωπεραζίνη, τη μετοκλοπραμίδη, τη χλωροπρομαζίνη, θειθυλπεραζίνη, αλοπεριδόλη, δομπεριδόνη ή αλισαπρίδη. Επίσης, τα κανναβινοειδή δεν ήταν πιο αποτελεσματικά σε ασθενείς που λάμβαναν πολύ χαμηλή ή πολύ υψηλή εμετογόνο χημειοθεραπεία ενώ οι ασθενείς προτιμούσαν τα κανναβινοειδή για μελλοντικούς κύκλους χημειοθεραπείας. Παρόμοιες μελέτες δείχνουν ότι η ναμπιλόνη βρέθηκε να είναι ανώτερη από την προχλωπεραζίνη, τη δομπεριδόνη και την αλισαπρίδη, με τους ασθενείς να προτιμούν σαφώς τη ναμπιλόνη για συνεχή χρήση. Εντοπίστηκαν ωστόσο παρενέργειες που εμφανίζονταν συχνότερα με τα κανναβινοειδή όπως ζάλη, δυσφορία ή κατάθλιψη, ψευδαισθήσεις, παράνοια και υπόταση αν και το «φτιάξιμο», η καταστολή, η υπνηλία ή η ευφορία ήταν επιθυμητές. Απόρροια των παραπάνω, η THC έχει χρησιμοποιηθεί μεταξύ άλλων θεραπειών για ως μια πρωτοποριακή θεραπεία για την επαγόμενη από χημειοθεραπεία ναυτία και εμετό.
2. **Διέγερση της όρεξης:** Η ανορεξία, ο πρώιμος κορεσμός, η απώλεια βάρους και η καχεξία είναι μερικές από τις προκλήσεις κατά τη διάρκεια θεραπείας του καρκίνου. Δύο ελεγχόμενες μελέτες έδειξαν ότι η THC από το στόμα διεγείρει την όρεξη και μπορεί να επιβραδύνει την απώλεια βάρους σε ασθενείς με προχωρημένες κακοήθειες. Σε μια μεγαλύτερη μελέτη 469 ενηλίκων με προχωρημένο καρκίνο και απώλεια βάρους, οι ασθενείς έλαβαν είτε 2,5 mg THC από το στόμα δύο φορές την ημέρα, είτε 800 mg μεγεστρόλης από το στόμα ημερησίως ή και τα δύο. Στην ομάδα μονοθεραπείας με μεγεστρόλη, η όρεξη αυξήθηκε στο 75% και το βάρος στο 11% σε σύγκριση με το 49% και 3%, αντίστοιχα, στην ομάδα THC από το στόμα ενώ η συνδυασμένη θεραπεία δεν προσέδωσε πρόσθετα οφέλη. Πολλές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η THC και άλλα κανναβινοειδή έχουν διεγερτική επίδραση στην όρεξη και αυξάνουν την πρόσληψη τροφής καθώς το ενδογενές κανναβινοειδές σύστημα μπορεί να χρησιμεύσει ως ρυθμιστής της συμπεριφοράς σίτισης. Σε καρκινοπαθείς με ανορεξία καθώς και σε ναυτία που προκαλείται από χημειοθεραπεία, αξίζει να σημειωθεί ότι η κάνναβη είναι το μοναδικό αντιεμετικό που έχει επίσης ορεξιογόνο δράση. Αν και η κάνναβη παρέχει έτσι δύο πιθανά οφέλη στον ασθενή με καρκίνο, η διέγερση της όρεξης δεν αντιστρέφει πάντα την καρκινική καχεξία.

3. Αναλγησία: Η κατανόησή μας για τους πιθανούς μηχανισμούς της επαγόμενης από κανναβινοειδή αναλγησίας έχει αυξηθεί σημαντικά μέσω της μελέτης των υποδοχέων κανναβινοειδών, ενδοκανναβινοειδών και συνθετικών συναγωνιστών και ανταγωνιστών. Ο υποδοχέας CB1 βρίσκεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα καθώς και στις περιφερικές νευρικές απολήξεις. Από τα ενδογενή κανναβινοειδή που έχουν ταυτοποιηθεί, η ανανδαμίδα έχει υψηλή συγγένεια με τους υποδοχείς CB1, ενώ η 2-AG έχει υψηλή συγγένεια τόσο με τους υποδοχείς CB1 όσο και με τους υποδοχείς CB2. Με την ανάπτυξη των εκλεκτικών ανταγωνιστών υποδοχέων, έχουν προκύψει πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με τους ρόλους των υποδοχέων και των ενδογενών κανναβινοειδών στη διαμόρφωση του πόνου. Τα κανναβινοειδή μπορεί επίσης να συμβάλλουν στη διαμόρφωση του πόνου μέσω ενός αντιφλεγμονώδους μηχανισμού ενώ είναι αποτελεσματικά σε ζωικά μοντέλα τόσο οξέος όσο και επίμονου πόνου. Ο κεντρικός αναλγητικός μηχανισμός διαφέρει από τον οπιοειδή στο ότι δεν μπορεί να παρεμποδιστεί από ανταγωνιστές των οπιοειδών. Η δυνατότητα για πρόσθετες αναλγητικές επιδράσεις με τα οπιοειδή καθώς και η δυνατότητα των κανναβινοειδών να μειώνουν τη ναυτία και να αυξάνουν την όρεξη αποτελούν ισχυρό επιχειρήμα για την αξιολόγηση της μαριχουάνας ως συμπληρωματικής θεραπείας για ασθενείς που λαμβάνουν μορφίνη. Ενθαρρυντικά κλινικά δεδομένα σχετικά με τις επιδράσεις των κανναβινοειδών σε χρόνιο πόνο έχουν αναφερθεί. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι οι δόσεις των 15 και 20 mg παρήγαγαν σημαντική αναλγησία, καθώς και αντιεμετική δράση και διέγερση της όρεξης αν και ορισμένα άτομα ανέφεραν ανεπιθύμητες παρενέργειες.
4. Νευροπάθεια: Τα κανναβινοειδή έχει επίσης αποδειχθεί ότι μπορούν να ωφελήσουν σε έναν νευροπαθητικό πόνο, ένα σύνηθες σύμπτωμα σε ασθενείς με καρκίνο, ιδίως σε εκείνους που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνη ή τις ταξάνες. Σε μελέτη που έγινε η κάνναβη μείωσε τον καθημερινό πόνο κατά 34% έναντι 17% με το εικονικό φάρμακο. Μια μεγαλύτερη από 30% μείωση του πόνου αναφέρθηκε από το 52% στην ομάδα της κάνναβης και από το 24% στην ομάδα του ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Το πρώτο τσιγάρο κάνναβης μείωσε τον χρόνιο πόνο κατά μέσο όρο 72% σε σύγκριση με 15% με το εικονικό φάρμακο.

Το τελευταίο διάστημα έχουν συγκεντρωθεί ολόένα και περισσότερα στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα κανναβινοειδή μπορεί να έχουν ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου (Guzman M., 2003). Στοιχεία από συστήματα κυτταροκαλλιέργειας καθώς και από ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η THC και άλλα κανναβινοειδή μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη ορισμένων όγκων μέσω της αναστολής της αγγειογένεσης και της μετάστασης. Οι αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις αναφέρθηκαν αρχικά το 1975 από τους Munson et al, οι οποίοι απέδειξαν ότι η δέλτα-9-THC, η δέλτα-8-THC και η κανναβινόλη ανέστειλαν την ανάπτυξη των κυττάρων αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα Lewis in vitro καθώς και σε ποντίκια. Από τα τέλη του 1990, αρκετά φυτικά (THC και CBD), συνθετικά (WIN- 55,212-2 και HU-210) και ενδογενή κανναβινοειδή (ανανδαμίδιο και 2-αραχιδοנוυλογλυκερόλη) έχουν αποδειχθεί ότι ασκούν αντιπολλαπλασιαστικές επιδράσεις σε μεγάλη ποικιλία καρκινικών κυττάρων. Εκτός από την αρχική μελέτη για το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, άλλα καρκινικά κύτταρα που έχουν αποδειχθεί ευαίσθητα στην επαγόμενη από κανναβινοειδή αναστολή της ανάπτυξης περιλαμβάνουν γλοίωμα, θυρεοειδικό επιθηλίωμα, λευχαιμία/λεμφώματα, νευροβλάστωμα και καρκινώματα του δέρματος, της μήτρας, του μαστού, του στομάχου, του παχέος εντέρου, του παγκρέατος και του προστάτη. Τα κανναβινοειδή μπορεί να ασκούν τις αντικαρκινικές τους επιδράσεις με έναν αριθμό διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της άμεσης επαγωγής θανάτου

μετασχηματισμένων κυττάρων, άμεση αναστολή της ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων και την αναστολή της αγγειογένεσης και της μετάστασης του όγκου (Εικόνα 7) (Abrams DI et al., 2015).

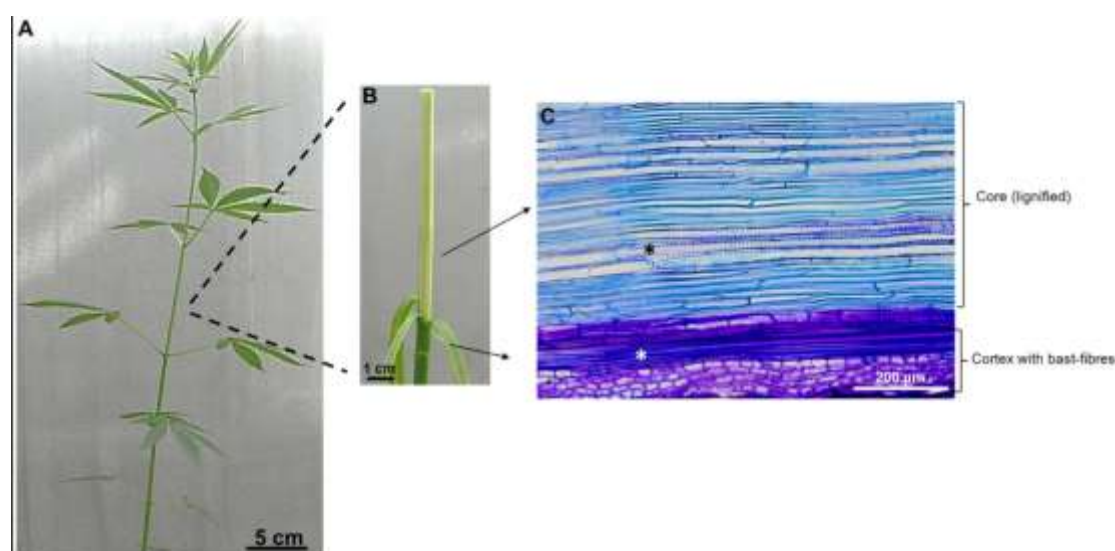


Εικόνα 7 - Μηχανισμός Δράσης Κανναβοειδών ενάντια στα Καρκινικά Κύτταρα (Abrams DI et al., 2015)

Τα κανναβινοειδή φαίνεται να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα αλλά δεν επηρεάζουν τα μη μετασχηματισμένα αντίστοιχα κύτταρα, και μπορεί ακόμη και να τα προστατεύουν από τον κυτταρικό θάνατο (Abrams DI et al., 2015). Έτσι, έχει αποδειχθεί ότι τα κανναβινοειδή επάγουν απόπτωση των κυττάρων γλοιώματος σε καλλιέργεια και παλινδρόμηση των κυττάρων γλοιώματος σε ποντίκια και αρουραίους με την ενεργοποίηση των υποδοχέων CB1 και CB2. Αντίθετα, τα κανναβινοειδή προστατεύουν τα φυσιολογικά κύτταρα των αστρογλοιακών και ολιγοδενδρογλοιακών σειρών από την απόπτωση. Ανοσοϊστοχημικές και λειτουργικές αναλύσεις σε μοντέλα γλοιωμάτων, καρκινωμάτων του δέρματος και άλλων όγκων έχουν καταδείξει ότι η χορήγηση κανναβινοειδών μεταβάλλει την αγγειακή υπερπλασία που χαρακτηρίζει τους ενεργά αναπτυσσόμενους όγκους σε ένα πρότυπο που χαρακτηρίζεται από μικρά, διαφοροποιημένα, αδιαπέραστα τριχοειδή αγγεία, εμποδίζοντας έτσι την αγγειογένεση. Επίσης, η ενεργοποίηση των υποδοχέων κανναβινοειδών στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλει τη μετανάστευση και την επιβίωση των κυττάρων, συμβάλλοντας επίσης στην εξασθένηση της αγγείωσης του όγκου. Η χρήση συνδυασμένων αντικαρκινικών θεραπειών έχει ορισμένα θεωρητικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις στρατηγικές που βασίζονται σε μεμονωμένους παράγοντες, καθώς επιτρέπουν την ταυτόχρονη στόχευση της ανάπτυξης, της εξέλιξης και/ή της εξάπλωσης του όγκου σε διαφορετικά επίπεδα. Σύμφωνα με αυτή την ιδέα, πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι η συνδυασμένη χορήγηση κανναβινοειδών με άλλα αντικαρκινικά φάρμακα δρα συνεργιστικά για τη μείωση της ανάπτυξης του όγκου σε ποντίκια. Για παράδειγμα, η χορήγηση THC και τεμοζολομίδης ασκεί ισχυρή αντικαρκινική δράση σε ξενομοσχεύματα γλοιώματος. Ακόμα, η συνδυασμένη χορήγηση THC και CBD ενισχύει την αντικαρκινική δράση της THC και μειώνει τις δόσεις THC που απαιτούνται για να προκληθεί η ανασταλτική δράση της στην ανάπτυξη των όγκων. Επιπλέον, ο συνδυασμός THC και CBD μαζί με τεμοζολομίδα προκαλεί εντυπωσιακή μείωση της ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων γλοιώματος ακόμη και όταν χρησιμοποιούνται χαμηλές δόσεις THC. Αν και τα κανναβινοειδή έχουν ψυχοδραστικές παρενέργειες, αυτές θα μπορούσαν να θεωρηθούν εντός των ορίων

ανοχής για τα προφίλ τοξικότητας των κυτταροτοξικών, χημειοθεραπευτικών και στοχευμένων θεραπειών μικρών μορίων που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ογκολογία (Abrams DI et al., 2015). Παρά αυτά τα εντυπωσιακά ευρήματα *in vitro* και σε ζωικά μοντέλα σχετικά με τις πιθανές αντικαρκινικές επιδράσεις των κανναβινοειδών, δεν υπάρχει ακόμη ισχυρή βάση για τους συνεχείς ισχυρισμούς των υποστηρικτών των εξαιρετικά συμπυκνωμένων εκχυλισμάτων ή ελαίων κάνναβης ότι τα παρασκευάσματα αυτά μπορούν να "θεραπεύσουν τον καρκίνο". Όλο και περισσότεροι ασθενείς στη Βόρεια Αμερική αναζητούν έλαια με υψηλή περιεκτικότητα σε THC ή/και CBD λόγω μαρτυριών ότι οι ασθενείς έχουν χρησιμοποιήσει αυτά τα παρασκευάσματα είτε τοπικά για να εξαλείψουν καρκίνους του δέρματος είτε συστηματικά για να εξαλείψουν μη δερματικούς καρκίνους. Αυτό έχει οδηγήσει σε έναν αριθμό ασθενών που επιδιώκουν να εγκαταλείψουν ή να αναβάλουν δυνητικά θεραπευτικές συμβατικές θεραπείες για τον καρκίνο υπέρ της αυτοθεραπείας με έλαια κάνναβης υψηλής ισχύος. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμη διεξαχθεί ισχυρές μελέτες σε ανθρώπους που να διερευνούν την κάνναβη ως αντικαρκινικό παράγοντα, οι οποίες να δικαιολογούν τη συμβουλή προς τους ασθενείς να εγκαταλείψουν τη συμβατική θεραπεία υπέρ της χρήσης ενός εκχυλίσματος κάνναβης υψηλής ισχύος. Οι ασθενείς που επιλέγουν να καθυστερήσουν τις συμβατικές θεραπείες με την ελπίδα να επωφεληθούν από μια δοκιμή ελαίου κάνναβης κατά του καρκίνου τους, διακινδυνεύουν το ενδεχόμενο ένας δυνητικά θεραπεύσιμος καρκίνος να γίνει ανίατος. Καθώς τα προκλινικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα κανναβινοειδή θα μπορούσαν να ενισχύσουν την αντικαρκινική δράση των συμβατικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων καθώς και να βελτιώσουν τις σχετικές παρενέργειες, η προσθήκη σκευασμάτων με βάση τα κανναβινοειδή στη συνήθη θεραπεία του καρκίνου δεν θα πρέπει να αποθαρρύνεται από τον θεράποντα ογκολόγο.

Εκτός από τη φαρμακευτική βιομηχανία, η κάνναβη είναι ένας πόρος, ο οποίος μπορεί να παρέχει βιοπολυμερή, ίνες, διάφορες χημικές ουσίες και ενέργεια (Guerriero et al., 2014). Το στέλεχος αυτής της καλλιέργειας παρέχει τόσο ίνες κυτταρίνης όσο και ξυλώδεις ίνες (Εικόνα 8).



Εικόνα 8 - Ανατομικές λεπτομέρειες του στελέχους κάνναβης

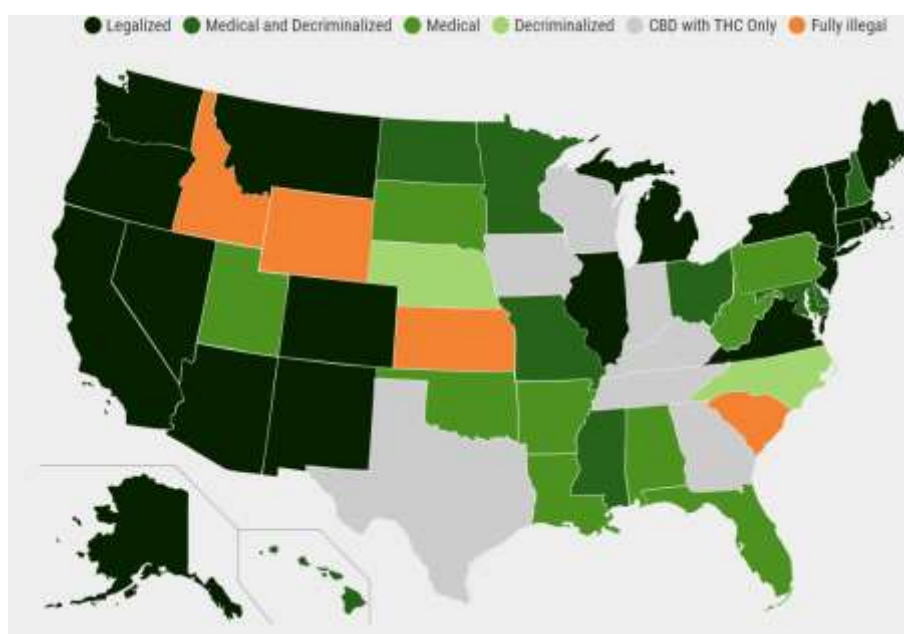
Αυτή η ετερογενής σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος καθιστά το στέλεχος κάνναβης ενδιαφέρον για τη μελέτη της δευτερογενούς βιοσύνθεσης κυτταρικού τοιχώματος. Οι ξυλώδεις ίνες κάνναβης χρησιμοποιούνται για ζωικά κλινοσκεπάσματα λόγω της υψηλής

ικανότητας απορρόφησης και για τη δημιουργία ενός υλικού που μοιάζει με σκυρόδεμα. Οι ίνες φλοιού κάνναβης χρησιμοποιούνται στον τομέα των βιοσυνθετικών ως υποκατάστατο του υαλοβάμβακα ενώ η αυτοκινητοβιομηχανία είναι ιδιαίτερα πρόθυμη να χρησιμοποιήσει ίνες κάνναβης για την παραγωγή βιοπλαστικών: αυτό το υλικό είναι ισχυρότερο από το πλαστικό πολυπροπυλενίου και ελαφρύτερο σε βάρος.

Πέρα από τις εφαρμογές στις κατασκευές και την αυτοκινητοβιομηχανία, οι ίνες κάνναβης είναι ελκυστικές και υπό το πρίσμα της φυσικής αντιβακτηριακής τους ιδιότητας. Οι ίνες της κάνναβης έχουν πράγματι περιγράψει ως αντιβακτηριακές και έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή χειρουργικών συσκευών ή λειτουργικών υφασμάτων (Hao et al., 2014). Η ιδιότητα αυτή συνδέεται με τη χημική σύνθεση των ινών φλοιού κάνναβης: έχουν εντοπιστεί τόσο ελεύθερες όσο και εστεροποιημένες στερόλες και τριτερπένια, μεταξύ των οποίων β-σιτοστερόλη και β αμυρίνης, ενώσεις γνωστές για τις αντιβακτηριακές ιδιότητες (Kirono et al., 2000).

1.1.6 Νομοθετικό Πλαίσιο

Η χρήση κάνναβης για ιατρικούς λόγους ήταν παράνομη τις ΗΠΑ μέχρι το 1996 ενώ η χρήση της για ψυχαγωγικούς σκοπούς μέχρι το 2012. Από τον Αύγουστο του 2021, 18 πολιτείες των ΗΠΑ, η Περιφέρεια της Κολούμπια, το Γκουάμ και οι Βόρειες Μαριάνες πέρασαν νόμους που επιτρέπουν την ψυχαγωγική και ιατρική κάνναβη και 17 πολιτείες επέτρεπαν μόνο την ιατρική κάνναβη (Weiser, 2021). Στην ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 9) φαίνονται διαγραμματικά τα παραπάνω.



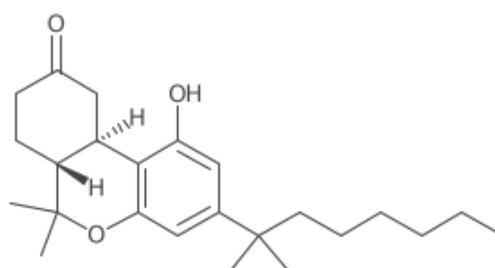
Εικόνα 9 - Διαγραμματική Απεικόνιση Χρήσης Κανναβης στις ΗΠΑ

Ωστόσο, η ύπαρξη μη ενοποιημένης νομοθεσίας σε όλες τις πολιτείες δημιουργεί προβλήματα στην καθοδήγηση των ασθενών, των προμηθευτών και των ιδρυμάτων υγειονομικής που επιτρέπουν τη χρήση ιατρικής κάνναβης. Έτσι, με τον όρο «Ιατρική Κάνναβη» ορίζεται η κάνναβη που χορηγείται σε ασθενή επιλεγμένο από το κράτος αποκλειστικά για διασχείριση συμπτωμάτων που σχετίζονται με ασθένειες.

Το 1970, η κάνναβη ταξινομείται ως ουσία στον πίνακα I σύμφωνα με τον ομοσπονδιακό νόμο περί ελεγχόμενων ουσιών και παραμένει παράνομη παρά την αυξανόμενη νομιμοποίηση σε κρατικό επίπεδο, καθώς η Διοίκηση Καταπολέμησης Ναρκωτικών των ΗΠΑ (Drug Enforcement Administration - DEA), αρμόδια για την επιβολή νόμων που σχετίζονται με τη ρύθμιση, διανομή και κατασκευή παράνομων ουσιών, υποστηρίζει ότι υπάρχει μεγάλος κίνδυνος κατάχρησης, ακόμα με ιατρική παρακολούθηση.

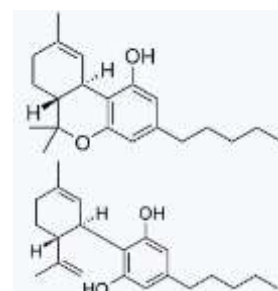
Μέχρι σήμερα, η Αμερικάνικη Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) έχει εγκρίνει την ιατρική κάνναβη για θεραπευτική ή/και ιατρική χρήση στις παρακάτω μορφές:

- Nabilone (Εμπορική Ονομασία: Cesamet ή Canemes) (Εικόνα 10): Έλαβε για πρώτη φορά άδεια και εγκρίθηκε για θεραπεία το 1985. Περιέχει συνθετικό κανναβινοειδές ανάλογο της THC και συνταγογραφείται για την αντιμετώπιση συμπτωμάτων ναυτίας και εμέτου σε ασθενείς με καρκίνο. Χορηγείται από το στόμα με τη μορφή χαπιών.



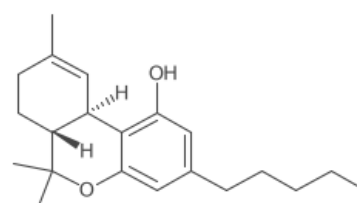
Εικόνα 10 - Δομή Nabilone

- Dronabinol (Εμπορική Ονομασία: Marinol/ Syndros/ Reduno/ Adversa) (Εικόνα 11): Έλαβε για πρώτη φορά άδεια και εγκρίθηκε για θεραπεία το 1986. Περιέχει συνθετικό κανναβινοειδές ανάλογο της THC και συνταγογραφείται για την αντιμετώπιση συμπτωμάτων ναυτίας και εμέτου σε ασθενείς με καρκίνο καθώς και για την αντιμετώπιση της ανορεξίας σε ασθενείς με HIV/AIDS. Χορηγείται από το στόμα με τη μορφή χαπιών ή διαλύματος.



Εικόνα 11 - Δομή Dronabinol

- Nabiximols (Εμπορική Ονομασία: Sativex) (Εικόνα 12): Περιέχει THC και CBD με αναλογία δόσης 2,7mg THC - 2,5mg CBD και συνταγογραφείται για την ανακούφιση συμπτωμάτων πόνου, σπαστικότητας και άλλων σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Χορηγείται από το στόμα με τη μορφή εκφενώματος.



Εικόνα 12 - Δομή Nabiximols

Αντίστοιχα με τις ΗΠΑ, δεν υπάρχει εναρμονισμένη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης στη χρήση κάνναβης, αφού σύμφωνα με το άρθρο 168 της Συνθήκης για τη Λειτουργία της Ευρωπαϊκής Ένωσης «Η Ένωση συμπληρώνει τη δράση των κρατών μελών για τη μείωση θεμάτων υγείας που σχετίζονται με τα ναρκωτικά». Τα τελευταία χρόνια οι περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες έχουν νομιμοποιήσει την κάνναβη για ιατρική χρήση ενώ ένας αυξανόμενος αριθμός χωρών έχουν αποποινοικοποιήσει την κατοχή μικρών ποσοτήτων κάνναβης (Εικόνα 13). Ωστόσο, οι ευρωπαϊκοί νόμοι για την κάνναβη μπορεί να προκαλούν σύγχυση, καθώς ορισμένες χώρες έχουν νομιμοποιήσει μόνο παράγωγα του φυτού και όχι λουλούδια ή άλλες φυσικές μορφές αυτού. Όσο αναφορά τα εγκεκριμένα φάρμακα είναι τα αντίστοιχα με αυτά που κυκλοφορούν στις ΗΠΑ ενώ είναι διαθέσιμο και το «Bedrocan» το οποίο είναι φυτικής προέλευσης καθώς παρασκευάζεται από αποξηραμένα μέρη του φυτού.



Εικόνα 13 - Διαγραμματική Απεικόνιση Χρήσης Κάνναβης στην Ευρώπη

Στην Ευρώπη ωστόσο, δόθηκε μεγαλύτερη προσοχή στα φυτικά σκευάσματα κάνναβης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αφέψημα, έλαια και σπρέι ή απλά να εισπνευστούν με ατμοποιητή. Παρόλο που οι μέσω καθιερωμένων συσκευών είναι διαθέσιμες, τα σπιτικά αφεψήματα και τα φαρμακευτικά έλαια είναι επί του παρόντος τα πιο διαδεδομένα σκευάσματα κάνναβης στην Ευρώπη, γεγονός που καθιστά δύσκολη την τυποποίηση της παρασκευής.

Με τον όρο «φυτικά σκευάσματα» αναφερόμαστε σε αποξηραμένες θηλυκές ταξιανθίες, οι οποίες περιέχουν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις κανναβινοειδών, κυρίως THC, CBD, κανναβιγερόλη (CBG), κανναβιχρωμένιο (CBC), κανναβιδιβαρίνη (CBDV) και τετραϋδροκανναδιβαρίνη (THCV). Επειδή ο τρόπος καλλιέργειας και η αποθήκευση μπορεί να προκαλέσουν διαφοροποιήσεις στη σύνθεση της φυτικής κάνναβης, μεταβάλλοντας την αποτελεσματικότητά τους, οι παραγωγοί πρέπει να είναι προσεκτικοί και να ακολουθούν τις ορθές γεωργικές πρακτικές και πρακτικές συλλογής (GACP) του ΠΟΥ για τα φαρμακευτικά φυτά ενώ συνιστάται αυστηρά οι ανθισμένες κορυφές της κάνναβης να αποθηκεύονται σε βέλτιστες, προκαθορισμένες συνθήκες.

Εκτός Ευρώπης, οι κύριοι παραγωγοί ιατρικής κάνναβης, η Aurora Cannabis Inc. (ACB) και η Spectrum Therapeutics™, βρίσκονται στον Καναδά και προσφέρουν μεγάλη ποικιλία ιατρικής κάνναβης με διαφορετικές αναλογίες THC/CBD. Η φυτική κάνναβη μπορεί να χορηγηθεί απλά μέσω εμπορικά διαθέσιμων ατμιστήρων (π.χ. Micro Vape®, G Pen Herbal

Vaporizer® και Volcano®), στοματικών ψεκασμών (π.χ. Sativex®) ή από του στόματος λαμβανόμενων καψουλών (π.χ. Cannador®), αφεψημάτων ή ελαίων.

Η Ελλάδα νομιμοποίησε την ιατρική κάνναβη τον Ιούλιο του 2017, με κοινή υπουργική απόφαση των Υπουργών Υγείας και Δικαιοσύνης και άλλαξε η ταξινόμησή της από ουσία του Πίνακα Α σε ουσία του Πίνακα Β. Το επόμενο έτος, το ελληνικό Κοινοβούλιο ενέκρινε νόμο που επιτρέπει την καλλιέργεια και επεξεργασία ιατρικής κάνναβης με έως και 0,2% THC, τον οποίο ακολούθησε το 2021 η έγκριση νομοσχεδίου για τη νομιμοποίηση της καλλιέργειας και πώλησης ιατρικής κάνναβης με ποσοστό THC >0,2%.

Ωστόσο, από τον Απρίλιο του 2019, οι εταιρείες που θέλανε να προχωρήσουν σε καλλιέργεια κάνναβης είχαν να αντιμετωπίσουν μια σειρά από γραφειοκρατικές διαδικασίες αφού απαιτούνταν τρεις διαφορετικές άδειες. Οι προϋποθέσεις που πρέπει να πληρούνται είναι εξής:

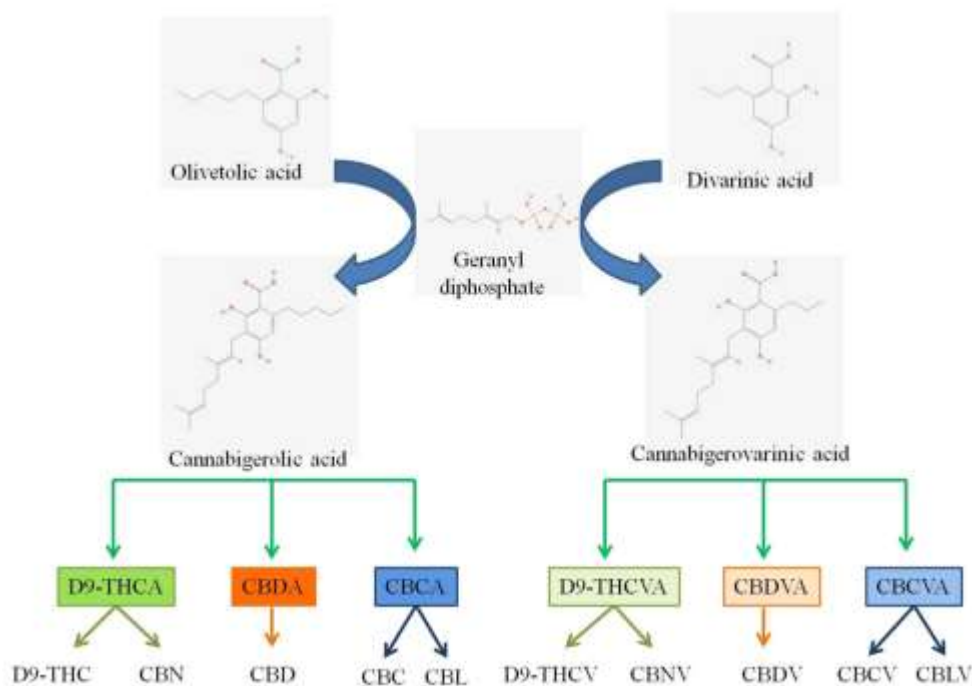
- Έκταση τουλάχιστον τεσσάρων στρεμμάτων
- Περιφραγμένη περιοχή καλλιέργειας
- Ειδικές απαιτήσεις ασφαλείας
- Ελέγχους τήρησης των μέτρων από τα αρμόδια τμήματα της ΕΛ.ΑΣ.
- Ανάκληση άδειας σε περίπτωση παραβίασης των όρων
- Καθαρό ποινικό μητρώο των εργαζομένων

1.2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Χημικοί τύποι κανναβινοειδών – κατηγορίες συστατικών κάνναβης

1.2.1 Κανναβινοειδή

Το φυτό *C. Sativa* περιέχει περισσότερες από 538, με περισσότερες από 100 να κατατάσσονται στην κατηγορία των φυτοκανναβινοειδών. Τα φυτοκανναβινοειδή είναι μια δομικά ποικίλη κατηγορία φυσικών χημικών συστατικών, τα μόρια της οποίας διαθέτουν λιπιδική δομή που περιέχει τμήματα αλκυλρεζορκινόλης και μονοτερπενίου. Απαντώνται κυρίως στη ρητίνη που εκκρίνεται από τα τρίχωμα των θηλυκών φυτών, ενώ τα αρσενικά φυτά διαθέτουν λίγες αδενώδεις τρίχες επομένως παράγουν μικρότερες ποσότητες ψυχοδραστικών μορίων. Διακρίνονται σε ουδέτερα κανναβινοειδή (χωρίς καρβοξυλική ομάδα) και κανναβινοειδή οξέα (με καρβοξυλική ομάδα). Κατά τη διαδικασία της βιοσυνθέσής τους, τα κανναβινοειδή βιοσυντίθενται και συσσωρεύονται ως κανναβινοειδή οξέα και στη συνέχεια αποκαρβοξυλιώνονται στις ουδέτερες μορφές τους. Πιο συγκεκριμένα, το διφωσφορικό γερανύλιο και το ολιβετολικό οξύ μετατρέπονται με τη βοήθεια ενός εξειδικευμένου ενζύμου (πρενυλτρανσφεράσης) στο CBGA, τον κύριο πρόδρομο των D9-THCA, CBDA και CBCA, που περιέχουν μια πλευρική αλυσίδα ν-πεντυλίου (C5-φυτοκανναβινοειδή). Από την αποκαρβοξυλίωση αυτών των προδρόμων σχηματίζονται η Δ-9-τετραϋδροκανναβινόλη (D9-THC) και οι μεταβολίτες της κανναβινόλης (CBN), κανναβιδιόλη (CBD), κανναβιχρωμένιο (CBC) και κανναβικυκλόλη (CBL). Απο την άλλη, από το διφωσφορικό γερανύλιο και το διβαρινικό οξύ σχηματίζεται το κανναβιγεροβαρινικό οξύ

(CBGVA), μια πλευρική αλυσίδα n-προπυλίου, (C3-φυτοκανναβινοειδή). Από το CBGVA συντίθενται το Δ-9-τετραϋδροκανναβιδιβαρινικό οξύ (D9-THCVA), το κανναβιδιβαρινικό οξύ (CBDVA) και το κανναβιχρωμεβαρινικό οξύ (CBCVA) ενώ η αποκαρβοξυλίωση τους σχηματίζει τα αντίστοιχα κανναβινοειδή D9-THCV, CBNV, CBDV και CBCV. Τα παραπάνω παρουσιάζονται διαγραμματικά στην Εικόνα 14.

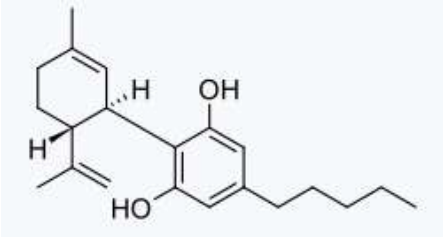
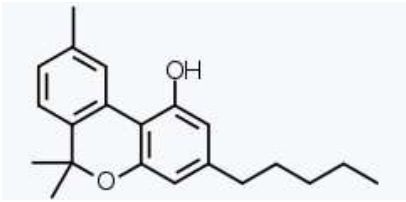
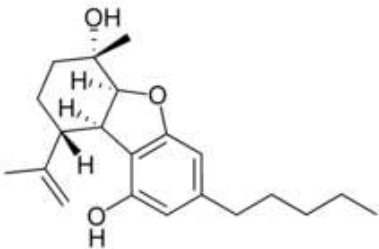
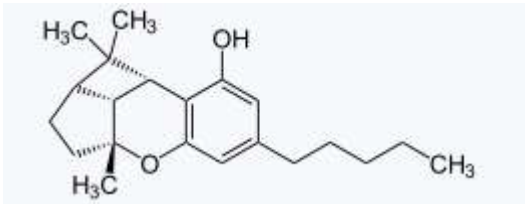
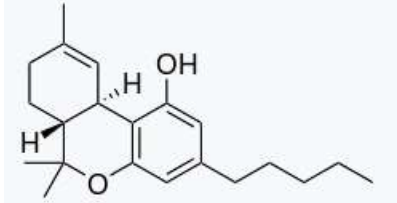
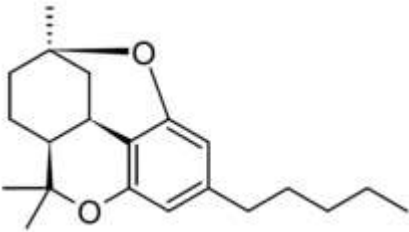


Εικόνα 14 - Βιοσύνθεση Φυτοκανναβοειδών

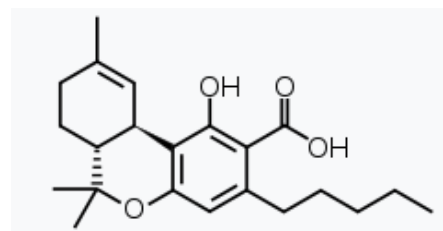
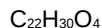
Πιο αναλυτικά, τα φυτοκανναβοειδή χωρίζονται σε 10 κατηγορίες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα ενώ ακολούθως αναλύονται τα κυριότερα κανναβινοειδή.

Πίνακας 2 - Κατηγορίες Κανναβινοειδών

Φυτοκανναβινοειδή			
Όνομα	Όνομα IUPAC	Χημικός Τύπος	Δομή
Cannabigerol (CBG)	2-[(2E)-3,7-Dimethylocta-2,6-dienyl]-5-pentylbenzene-1,3-diol	$C_{21}H_{32}O_2$	
Cannabichromene (CBC)	2-Methyl-2-(4-methylpent-3-enyl)-7-pentyl-5-chromenol	$C_{21}H_{30}O_2$	

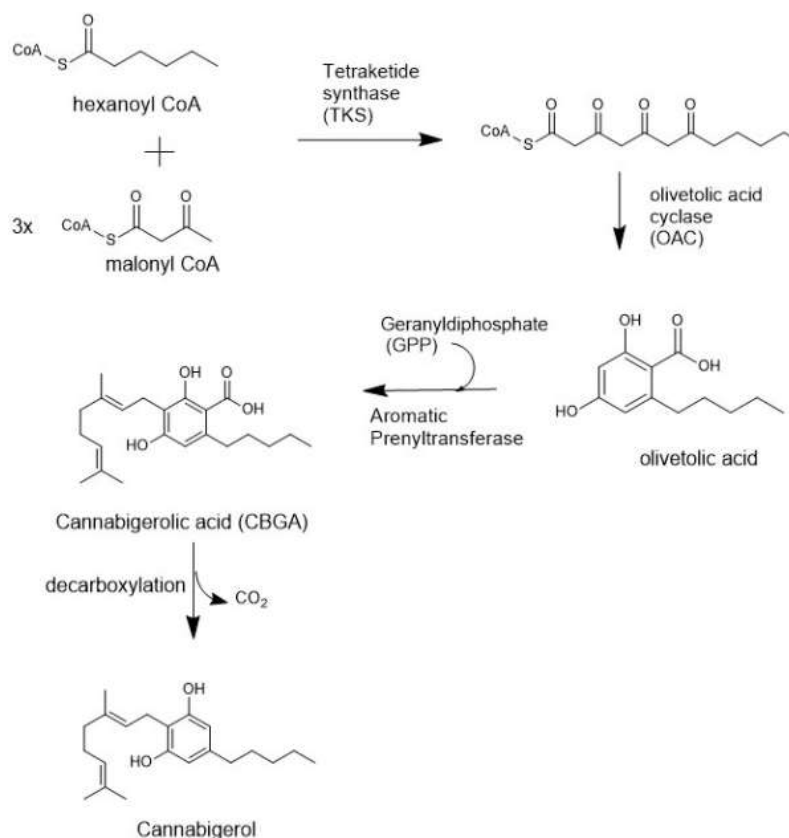
Cannabidiol (CBD)	2-[(1R,6R)-6-Isopropenyl-3-methylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1,3-diol	$C_{21}H_{30}O_2$	
Cannabinol (CBN)	6,6,9-Trimethyl-3-pentylbenzo[c]chromen-1-ol	$C_{21}H_{26}O_2$	
Cannabielsoin (CBE)	(5aS,6S,9R,9aR)-6-methyl-3-pentyl-9-prop-1-en-2-yl-7,8,9,9a-tetrahydro-5aH-dibenzofuran-1,6-diol	$C_{21}H_{30}O_3$	
Cannabicyclol (CBL)	(1aR-(1a alpha,3a alpha,8b alpha,8c alpha))-1a,2,3,3a,8b,8c-hexahydro-1,1,3a-trimethyl-6-pentyl-1H-4-oxabenzof(cyclobut)inden-8-ol	$C_{21}H_{30}O_2$	
Tetrahydrocannabinol (THC)	(6aR,10aR)-6,6,9-Trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromen-1-ol	$C_{21}H_{30}O_2$	
Cannabicitran (CBT)	1,5,5-trimethyl-9-pentyl-6,15-dioxatetracyclo[9.3.1.04,13.07,12]pentadeca-7(12),8,10-triene	$C_{21}H_{30}O_2$	

Tetrahydrocannabinolic acid (THCA) (6aR,10aR)-1-Hydroxy-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6H-benzo[c]chromene-2-carboxylic acid



1.2.1.1 Τύπος κανναβιγερόλης (CBG)

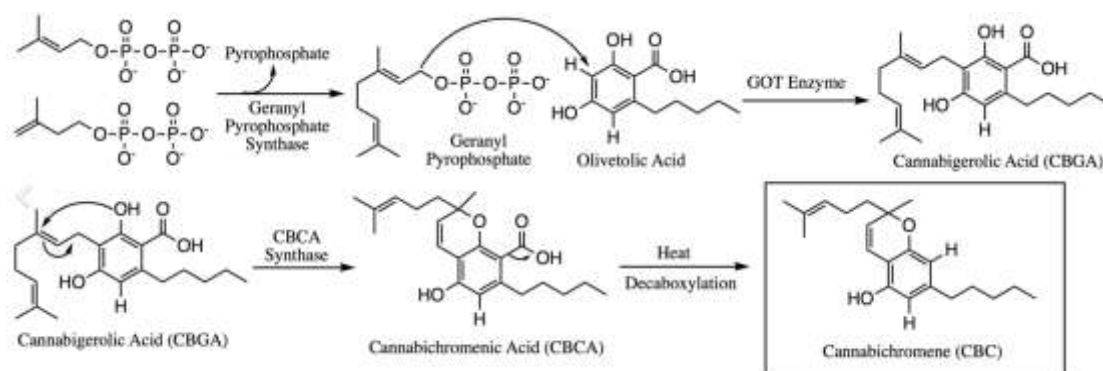
Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1964 από τους Mechoulam και Gaoni από τη ρητίνη του φυτού (Εικόνα 15). Η βιοσύνθεση της κανναβιγερόλης ξεκινά με το εξανοΐλ-CoA σε μια που συμπυκνώνεται με τρία μόρια μαλονυλ-CoA. Αυτό το πολυκετίδιο κυκλοποιείται σε ολιβετολικό οξύ μέσω της αντίστοιχης κυκλάσης. Στη συνέχεια πρενυλιώνεται, μέσω ενός ενζύμου αρωματικής πρενυλτρανσφεράσης, για τη βιοσύνθεση του κανναβιγερολικού οξέος και κατόπιν την αποκαρβοξυλίωση του σε κανναβιγερόλη. Αυτά τα φυτοκανναβινοειδή έχουν ετερογενή χημική δομή και δεν έχουν ψυχοδραστική δράση. Αντίθετα, διαθέτει αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Επιπλέον, το CBG είναι ένας αγωνιστής των α-2 αδρενεργικών υποδοχέων ικανός να αναστέλλει την απελευθέρωση κατεχολαμίνης με καταστολή, μυϊκή χαλάρωση και αναλγητικά αποτελέσματα ενώ παρατηρήθηκε ότι τα εκχυλίσματα *C. sativa*, με CBD/CBDA ή CBG/CBGA, αναστέλλουν τη δραστηριότητα της αναγωγής αλδόξης και θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα για την πρόληψη και τη θεραπεία των διαβητικών επιπλοκών.



Εικόνα 15 - Βιοσύνθεση Κανναβιγερόλης

1.2.1.2 Τύπος κανναβιχρωμενίου (CBC)

Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1966, και θεωρείται μαζί με το THC, το CBD και το CBG ένα από τα κύρια φυτοκανναβινοειδή και είναι, από δομική άποψη, ένα από τα πιο σταθερά φυτοκανναβινοειδή (Εικόνα 16). Η ποσότητα CBC συνδέεται αυστηρά με το D9-THC, υποδηλώνοντας μια χημική σχέση μεταξύ της οξειδάσης που εμπλέκεται στη δημιουργία του CBC και της D9-THC από το CBG (Izzo et al., 2009). Υψηλότερες περιεκτικότητες CBC έχουν βρεθεί στο βλαστικό στάδιο του φυτού σε σύγκριση με το αναπαραγωγικό του στάδιο. Επιπλέον, οι ενώσεις τύπου CBC δεν εμφανίζουν καμία ψυχοδραστικότητα που προκαλείται από το CB1. Η δράση του CBC μπορεί να περιορίσει τις επιδράσεις του NO και να έχει θεραπευτική επίδραση στη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου. Τέλος, οι Shinjyo et al (2013) προτείνουν μια πιθανή επίδραση του CBC σε νευρικά βλαστοκύτταρα στον ενήλικο εγκέφαλο ενώ υπάρχουν λίγες μελέτες που σχετίζονται με τον πιθανό ρόλο του CBC στη διαχείριση νευροεκφυλιστικών νόσων (ΝΔ), δεδομένων των αναγνωρισμένων αντιφλεγμονωδών και νευροπροστατευτικών ιδιοτήτων του από προκλινικές μελέτες.

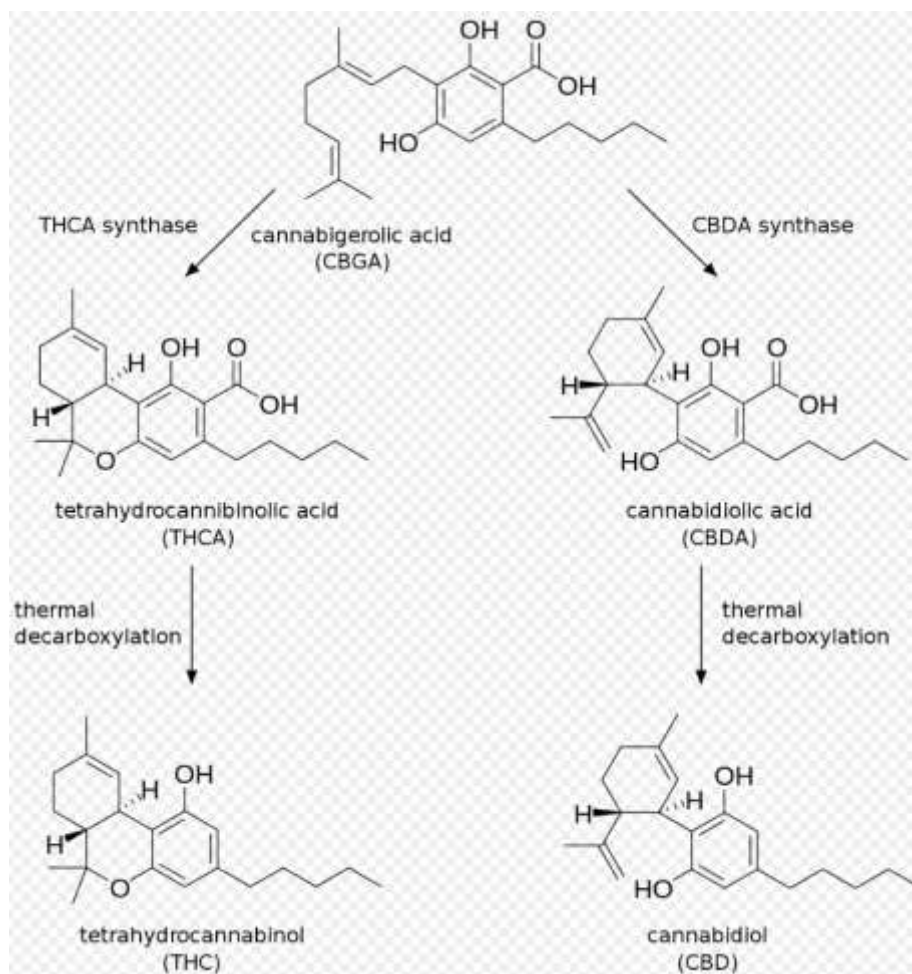


Εικόνα 16 - Βιοσύνθεση Κανναβιχρωμίνης

1.2.1.3 Τύπος κανναβιδιόλης (CBD)

Απομονώθηκε το 1940 από τον Adams και τους συνεργάτες του, αλλά μόνο το 1963 η χημική του δομή αποσαφηνίστηκε πλήρως από τους Gaoni και Mechoulam (Εικόνα 17). Το κανναβιδιολικό οξύ (CBDA) και το CBD είναι τα πιο άφθονα φυτοκανναβινοειδή στο είδος της κάνναβης για κλωστοϋφαντουργικές χρήσεις. Παρά τη δομική ομοιότητα μεταξύ της CBD και της D9-THC, η CBD έχει χαμηλό αγωνισμό για τους υποδοχείς κανναβινοειδών. Ωστόσο, μπορεί να κυκλοποιηθεί ηλεκτρονιόφιλα σε D9-THC σε όξινο περιβάλλον. Αυτό θα μπορούσε επίσης να εξηγήσει την παραγωγή D9-THC στα τσιγάρα καπνού (υδατικά εναιωρήματα όξινα) όταν προστίθενται CBD. Παρουσιάζει αντισπασμωδικές, αγχολυτικές, αντιεμετικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες. Επίσης καθώς η ένωση αυτή δεν είναι ψυχοτρόπος και έχοντας ένα αποδεκτό προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας μπορεί να προταθεί για τη θεραπεία αρκετών ασθενειών που σχετίζονται με το ΚΝΣ. Ως η CBD έχει αποδεδειγμένη ικανότητα να εμποδίζει τις ψυχοτρόπες επιδράσεις και να μειώνει τις επιδράσεις που προκαλούνται από υψηλές δόσεις THC. Στην πραγματικότητα, αυτές οι ιδιότητες είναι

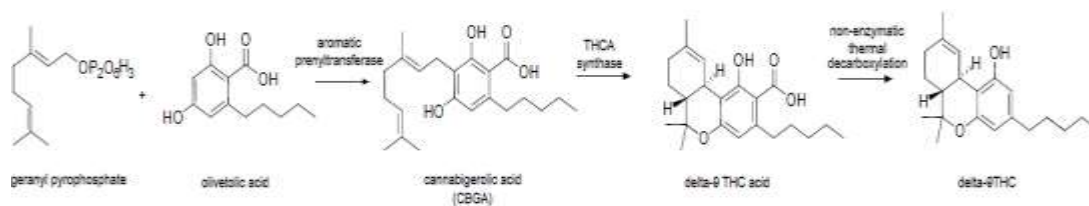
σύμφωνες με τις γνωστές ιδιότητες των αλλοστερικών ρυθμιστών που έχουν τη δυνατότητα να αποφύγουν δυσμενείς επιδράσεις στο κεντρικό και περιφερικό νευρικό σύστημα που προκαλούνται από τους συμβατικούς ορθοστερικούς προσδέτες.



Εικόνα 17 - Βιοσύνθεση Κανναβιδιόλης

1.2.1.4 Τύπος τετραϋδροκανναβινόλης

Η *trans*-Δ-9-τετραϋδροκανναβινόλη (D9-THC) είναι η βασική ένωση του *C. sativa* με σημαντικές ψυχοδραστικές επιδράσεις (Pertwee, 2008) και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1942, αλλά η δομή της αποσαφηνίστηκε πλήρως μόνο από τον Mechoulam και τους συνεργάτες του το 1964 (Εικόνα 18). Αυτή η ένωση είναι θερμοδυναμικά ασταθής, υφίσταται ισομερισμό παρουσία οξέων για να σχηματίσει την Δ8-THC. Η THC απορροφάται και κατανέμεται αμέσως στον οργανισμό ενώ μεταβολίζεται από το κυτόχρωμα P450. Λόγω της λιποφιλικότητας του, θεωρήθηκε ότι οι φαρμακολογικές του ιδιότητες οφείλονταν στις αλληλεπιδράσεις με τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες μέχρι την ανακάλυψη των υποδοχέων κανναβινοειδών.



Εικόνα 18 - Βιοσύνθεση THC

Μεταξύ των πιο σταθερών μεταβολιτών, αξίζει να αναφερθεί η Δ8-τετραϋδροκανναβινόλη, που προέρχεται από έναν όξινο ισομερισμό της D9-THC με μια μετατόπιση του ενδοκυκλικού διπλού δεσμού. Επιπλέον, από τη διυδροκανναβινόλη, το ενδιάμεσο D9-THC, θα μπορούσε να προκύψει τρι-υδροκανναβινόλη, που προσδιορίζεται στη γύρη της κάνναβης. Άλλα ισομερή της D9-THC έχουν επίσης ταυτοποιηθεί, όπως η *cis*-Δ9-τετραϋδροκανναβινόλη, η Δ6a- και Δ10a-τετραϋδροκανναβινόλη, άγνωστα ως φυσικά προϊόντα αλλά συντίθενται με οξειδωτική αρωματοποίηση της D9-THC. Οι ψυχοδραστικές επιδράσεις του D9-THC περιλαμβάνουν άγχος, παράνοια, αντιληπτικές αλλοιώσεις και γνωστικά ελλείμματα. Όλες αυτές οι επιδράσεις προκαλούνται από τη διαταραχή της GABA/γλουταμινεργικής νευροδιαβίβασης και της απελευθέρωσης ντοπαμίνης. Επιπλέον, έχει επίσης παρατηρηθεί χαμηλή οξεία τοξικότητα D9-THC σε μοντέλα ποντικού ενώ μετά τη χορήγηση D9-THC, έχουν αναφερθεί υποκίνηση, υποθερμία, καταληψία, αναλγησία και αυξημένη πρόσληψη τροφής. Τέλος, εκτός από την CBD, η THC, παρά τις ψυχοτρόπες επιδράσεις της, έχει αξιολογηθεί για τη μείωση του οξειδωτικού στρες, της νευροφλεγμονής και της νευροπροστασίας σε ασθένειες που σχετίζονται στενά με την υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών.

1.2.1.5 Cannabicyclol (CBL), Cannabielsoin (CBE) and Cannabitriol (CBT)

Το κανναβικυκλόλη (CBL) απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Korte και Shaper το 1964 και είναι το φυτοκανναβινοειδές που βρίσκεται στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις στο φυτό και παράγεται με θέρμανση από το CBC. Η κανναβιελσοΐνη (CBE), που απομονώθηκε από τους Shani και Mechoulam ως το όξινο παράγωγό του το 1974, παράγεται φυσικά με φωτοοξείδωση του CBD και του CBDA. Το 1965, οι Obata και Ishikawa ανακάλυψαν την CBT, αλλά η χημική της δομή αποσαφηνίστηκε μόλις δέκα χρόνια αργότερα. Υπάρχουν εννέα ισομερή CBT, τα οποία διακρίνονται από την υποκατάσταση των υδροξυλομάδων. Είναι ενδιαφέρον, ότι παρά τη χημική τους δομή και την ομοιότητά τους με άλλα βιοενεργά συστατικά που προέρχονται από την κάνναβη, κανένα από αυτά τα φυτοκανναβινοειδή δεν έχει μελετηθεί για τις δυνατότητές του σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες.

1.2.1.6 Τύποι κανναβινόλης (CBN)

Αποτελεί το πρώτο κανναβινοειδές που απομονώθηκε στα τέλη του 1800 και προέρχεται από την οξείδωση της Delta-9-THC. Η συγκέντρωση CBN στα προϊόντα της *C. sativa* εξαρτάται από την ηλικία και τις συνθήκες αποθήκευσης. Το CBN είναι εξαιρετικά σταθερό στην οξειδωτική αποικοδόμηση. Επιπλέον, πολλά παράγωγα αποικοδόμησης CBN είναι τα ίδια με αυτά που λαμβάνονται από την αυθόρμητη οξειδωτική αρωματοποίηση της D9-THC.

1.2.2 Μη κανναβινοειδείς ενώσεις

Εκτός από τα κανναβινοειδή που αναφέρθηκαν παραπάνω, το φυτό κάνναβης παράγει επίσης μη κανναβινοειδείς δευτερογενείς μεταβολίτες συμπεριλαμβανομένων περίπου 120 τερπενοειδών (μονοτερπένια, σесκιτερπένια και τριτερπένια, αιθήρια έλαια, πάνω από 26 φλαβονοειδείς λιγνάνες, παράγωγα στυλβενοειδών, αλκαλοειδή, αμινοξέα, πολυφαινόλες, στεροειδή), διυδροφαινανθρένια, γλυκοπρωτεΐνες (όπως γαλακτόζη, γλυκόζη, μαννόζη και ξυλόζη) και διβενζύλια. Τα φλαβονοειδή και τα τερπενοειδή ειδικότερα έχουν ένα ευρύ θεραπευτικό φάσμα, που περιλαμβάνει καρκίνο, φλεγμονές, ενίσχυση της νευροπροστασίας και άλλα.

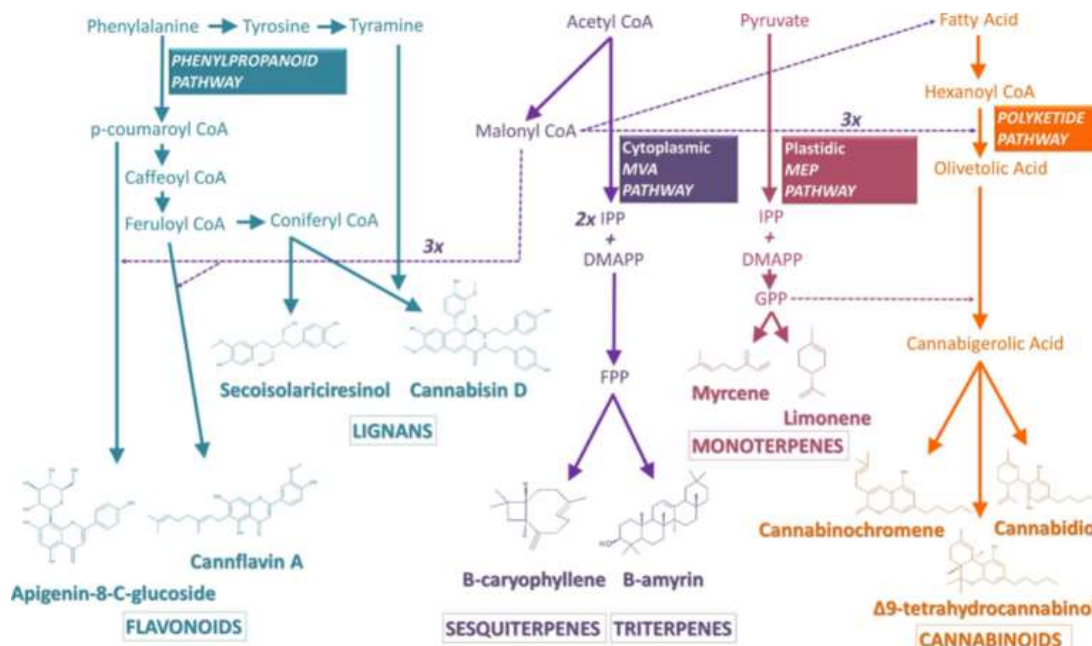
1.2.2.1 Τερπένια και Τερπενοειδή

Τα τερπένια είναι υδρογονάνθρακες και αποτελούνται από μονάδες ισοπρενίου (5 δομικά στοιχεία άνθρακα), (Al-Taweel A et al. 2018). Είναι υπεύθυνα για τις γεύσεις και αρώματα πολλών βοτάνων και φυτών καθώς και τις φαινοτυπικές παραλλαγές μεταξύ των φυτικών ειδών. Πάνω από 20.000 τερπένια υπάρχουν σε όλα τα είδη φυτών και πάνω από 150 μόνο στο φυτό της κάνναβης. Ταξινομούνται με βάση τον αριθμό των μονάδων ισοπρενίου στο μόριο τους ενώ η απόδοση και η κατανομή τους στο φυτό εξαρτάται από τις διαδικασίες για την απόκτηση αιθέριου ελαίου, τις περιβαλλοντικές συνθήκες ή την ωριμότητα του φυτού (Meier και Mediana, 1998, Brenneisen, 2007). Στα πιο κοινά τερπένια στην κάνναβη ανήκει το λιμονένιο, το α-πινένιο, το β-πινένιο, το χουμουλένιο, το β-καρυοφυλλένιο, τη λιναλοόλη και το μυρκένιο (Jin et al., 2020).

Δύο διαφορετικές βιοσυνθετικές οδοί συμβάλλουν στη σύνθεση τερπενίων φυτικής προέλευσης (Εικόνα 19). Ενώ η οδός του κυτοσολικού μεβαλονικού οξέος (MVA) εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του σέσκι- και των τρι-τερπενίων, η οδός της MEP συμβάλλει στη σύνθεση των μονο-, δι- και τετρατερπενίων. MVA και MEP παράγονται μέσω διαφόρων και διακριτών βημάτων, από δύο μόρια ακετυλο-συνένζυμο Α και από πυρουβικό και D-γλυκεραλδεΐδη-3-φωσφορικό άλας, αντίστοιχα. Μετατρέπονται σε IPP και DMAPP, το τελικό σημείο των οδών MVA και MEP. Στη δεύτερη διαδρομή, ένα μόριο IPP και ένα μόριο DMAPP συμπυκνώνονται για να σχηματίσουν GPP (C10), που είναι ο άμεσος πρόδρομος των μονοτερπενίων (Kempinski et al., 2015).

Επιπλέον, τα τερπένια είναι λιπόφιλες ενώσεις που διασχίζουν εύκολα τις μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Fukumoto et al., 2006) και παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών ιδιοτήτων.

- D-λιμονένιο: ισχυρές αντικαρκινικές, αγχολυτικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες
- β-μυρκένιο: ισχυρό αντιφλεγμονώδες, αναλγητικό και αγχολυτικό συστατικό
- α-Pinene: πρόκειται για ακετυλοχολινοστερικός αναστολέας και μπορεί να βοηθήσει τις ικανότητες μνήμης.
- β-καρυοφυλλένιο: ισχυρές αντιφλεγμονώδεις και γαστρικές δραστηριότητες.
- Πεντακυκλικά τριτερπένια: πολυάριθμες βιολογικές ιδιότητες, όπως αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές, αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές (Vázquez et al., 2012).



Εικόνα 19 - Βιοσύνθεση μη Κανναβινοειδών

1.2.2.2 Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μία από τις πιο ευρέως διαδεδομένες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών στο φυτικό βασίλειο. Παρουσιάζουν περισσότερες από 10.000 διαφορετικές δομές, συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών οξέων (βενζοϊκά και υδροξυκιναμικά οξέα), флаβονοειδών (φλαβονόλες και флаβόνες), στυλβενίων και λιγνάνων (Andre et al., 2010). Στην κάνναβη, έχουν εντοπιστεί περίπου 20 флаβονοειδή, που ανήκουν κυρίως στις υποκατηγορίες флаβόνης και флаβονόλης. Αυτές περιλαμβάνουν τον Ο-γλυκοσίδης της λουτεολίνης, καεμπφερόλης και κουερσετίνης, καθώς την κανφλαβίνης Α και κανφλαβινίνης Β, τα οποία είναι μεθυλιωμένα ισοπρενοειδή флаβονοειδή που είναι μοναδικά για την κάνναβη (Εικόνα 19) (Ross et al., 2005).

Οι φαινολικές ενώσεις παράγονται μέσω της φαινυλπροπανοειδούς οδού στο κυτταρόπλασμα και στη συνέχεια μεταφέρονται στο κενοτόπιο ή εναποτίθενται στο κυτταρικό τοίχωμα (Εικόνα 19). Οι διαδρομές προς τις μεγάλες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων περιλαμβάνουν την κύρια φαινυλοπροπανοειδή οδό από τη φαινυλαλανίνη σε παραγωγό ενεργού (υδροξυ) κουμαρικού οξέος (p-coumaroyl CoA) καθώς και ειδικών οδών για το σχηματισμό απλών εστέρων, λιγνάνων, флаβονοειδών, κουμαρινών και στυλβενίων (Andre et al., 2009) (Εικόνα 19). Αν και το флаβονοειδή έχουν μελετηθεί εκτενώς σε διάφορα φυτά, δεν υπάρχουν συγκεκριμένα δεδομένα σχετικά με τη βιοσύνθεση των флаβονοειδών στην κάνναβη.

Στα φυτά, οι φαινολικές ενώσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά υπό ορισμένες φυσιολογικές συνθήκες και, ως εκ τούτου, να προστατεύσουν τα φυτά από το οξειδωτικό στρες. Στον άνθρωπο, αποδείχθηκε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της διαίτητικής πρόσληψης φαινολικών ενώσεων και της μειωμένης συχνότητας εμφάνισης χρόνιων ασθενειών όπως καρκίνοι, καρδιαγγειακές και νευροεκφυλιστικές ασθένειες, αλλά αυτές οι θετικές επιπτώσεις στην υγεία μπορεί να μην εξηγούνται πλήρως από τις φαινολικές

αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς δεν είναι επαρκώς διαθέσιμες. Οι και οι флаβονόλες που βρίσκονται στην κάνναβη ασκούν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών επιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων των ιδιοτήτων που μοιράζονται τα τερπένια και τα κανναβινοειδή, αφού παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές και νευροπροστατευτικές ιδιότητες (Andre et al., 2010).

1.2.2.3 Φλαβονοειδή

Τα флаβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία πολυφαινολικών φυτικών ενώσεων. Υπάρχουν έξι κατηγορίες флаβονοειδών, συμπεριλαμβανομένων των ανθοκυανιδινών, των флаβανό-3-όλων, των флаβονολών, των флаβανονών, των флаβονών και των ισοφлаβονών. Τα флаβονοειδή βρίσκονται σε ένα ευρύ φάσμα φυτών και μπορεί να λειτουργήσουν ως φυσιολογικοί ρυθμιστές, αναστολείς του κυτταρικού κύκλου ή/και χημικοί αγγελιοφόροι. Είναι επίσης υπεύθυνα για τη χρώση των φυτών, το φιλτράρισμα/προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία και τη συμβιωτική δέσμευση αζώτου. Προσφέρουν, επίσης, χρώμα, γεύση και άρωμα. Αυτές οι ενώσεις έχουν επίσης αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές, αντιδιαβητικές και νευροπροστατευτικές δράσεις.

Πάνω από 20 διαφορετικά флаβονοειδή έχουν εντοπιστεί στην κάνναβη, τα περισσότερα από τα οποία ανήκουν στην ομάδα των флаβονολών και των флаβονών (Jin D et al., 2020). Ένα τέτοιο флаβονοειδές είναι η κανφλαβίνη A, η οποία θεωρείται ότι είναι 30 φορές πιο αποτελεσματική από την Ασπιρίνη στην αναστολή της προσταγλανδίνης E2, ενός σημαντικού ρυθμιστή της φλεγμονής (Barrett M.L et al., 1985). Ένα άλλο σημαντικό флаβονοειδές που προέρχεται από την κάνναβη είναι η. Σε πρόσφατες μελέτες, η έδειξε δράση έναντι του ανθρώπινου κορονοϊού (SARS-CoV-2). Η καφλανόνη αποδείχθηκε ότι έχει ισχυρή συγγένεια δέσμευσης σε δύο από τις πρωτεΐνες (PLpro και 3CLpro) αναστέλλοντας έτσι την είσοδο του ιού και/ή την αναπαραγωγή εντός του ανθρώπινου κυττάρου (Ngwa W et al, 2020).

1.2.2.4 Λιπαρά Οξέα

Πρόκειται για μια κατηγορία μορίων που αποτελείται από μια αλυσίδα ατόμων άνθρακα συνδεδεμένα με άτομα υδρογόνου, με μια λειτουργική καρβοξυλική ομάδα (-COOH) συνδεδεμένη σε ένα τερματικό άκρο. Αυτή η λειτουργική ομάδα είναι που συμμετέχει σε χημικές αντιδράσεις που επιτρέπουν στα λιπαρά οξέα να εκτελούν τους φυσιολογικούς τους ρόλους, όπως η αποθήκευση και παροχή ενέργειας στα κύτταρα απουσία γλυκόζης, η παροχή χοληστερόλης για την παραγωγή ορμονών και ενδοκυτταρικών μεμβρανών - δομικά στοιχεία των γλυκολιπιδίων και των φωσfolιπιδίων -, η μεταφορά λιποδιαλυτών βιταμινών και η τροποποίηση πρωτεϊνών. Στα πιο κοινά λιπαρά οξέα που συναντώνται στην κάνναβη, και κυρίως στους σπόρους του φυτού, ανήκει το καπροϊκό οξύ, το καρυλικό οξύ, το παλμιτολεϊκό οξύ, το ολεϊκό οξύ, το εικοσενοϊκό οξύ και άλλα.

Οι σπόροι της κάνναβης αποτελούνται από περίπου 25% πρωτεΐνη υψηλής ποιότητας και 35% λίπος (Hazekamp A et al., 2010) Εκτός από σημαντικές συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων, το έλαιο κάνναβης που εξάγεται από σπόρους *C. sativa* L. περιέχει και άλλα θρεπτικά

συστατικά όπως βιταμίνη C, θειαμίνη, βιταμίνη E, ασβέστιο, μαγνήσιο, κάλιο, φώσφορο, σίδηρος, ψευδάργυρος, νάτριο, χαλκός, λίπος, υδατάνθρακες, φυτικές ίνες και πρωτεΐνες.

1.2.2.5 Λιγναναμίδια

Τα λιγναναμίδια είναι ένα άλλο παράδειγμα φυσικών, μη κανναβινοειδών δευτερογενών μεταβολιτών με βιοδραστικότητα. Αυτή η κατηγορία φυτοχημικών που παράγονται στην κάνναβη περιλαμβάνει την κανναβισίνη A–G και το γκροσαμίδιο (Flores-Sánchez I.J. et al., 2008).

Αυτά τα φυτοχημικά είναι ισχυροί αντικαρκινικοί, αντιικοί, αντιοξειδωτικοί, αντιδιαβητικοί, καρδιαγγειακοί, αντινεοπλασματικοί, αντιφλεγμονώδεις, αναλγητικοί παράγοντες ενώ αναστέλλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης. Σε μελέτη του 2015 από τους Yan και συνεργάτες, απομονώθηκαν επίσης τέσσερα νέα λιγναναμίδια από τον σπόρο κάνναβης, η Κανναβισίνη M, η Κανναβισίνη N, η Κανναβισίνη O και το 3,3'-δεμεθυλ-ηλιοτροπαμίδιο (Yan X. et al., 2015).

1.2.2.6 Αμινοξέα

Τα αμινοξέα είναι τα δομικά στοιχεία των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες στο σώμα. Οι σπόροι της *C. sativa* περιέχουν εννέα βασικά αμινοξέα, δηλαδή αμινοξέα που δεν μπορούν να συντεθούν στο σώμα μας, αλλά πρέπει να ληφθούν μέσω της τροφής: ιστιδίνη, ισολευκίνη, λευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη και βαλίνη (Audu B.S. et al., 2014). Τα αμινοξέα βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα φύλλα καθώς εκεί συγκεντρώνονται τα περισσότερα τριχώματα του φυτού. Εξίσου σημαντικά το ασπαρτικό οξύ, το γλουταμικό οξύ και η αργινίνη συγκεντρώνονται στον σπόρο κάνναβης (Jang H. et al., 2018). Τέλος, η πρωτεΐνη κάνναβης περιέχει την υψηλότερη σύνθεση (65%) της σφαιρίνης εδιστίνης που συνθέτει πολλά ένζυμα, αντισώματα και ορμόνες στο σώμα (Osburn L., 1992).

1.2.2.7 Στιλβένια και Στιλβενοειδή

Τα στιλβένια είναι φυσικές πολυφαινολικές ενώσεις που έχουν ευρύ φάσμα βιολογικής δραστηριότητας και φαρμακευτικής αξίας για τον άνθρωπο. Τα στιλβενοειδή είναι παράγωγα στιλβενίου που έχουν υδροξυλιωθεί. Δεκαεννέα στιλβενοειδή μοναδικά στο φυτό της κάνναβης εντοπίστηκαν σε μια μελέτη του 1995. Αυτά μπορούν να χωριστούν σε τρεις κύριες δομικές κατηγορίες: έντεκα σπειροϊνδάνια, οκτώ διυδροστιλβένια/διβενζύλια, πέντε φαινανθρένια και πρενυλιωμένα, γερανυλιωμένα και γλυκοζυλιωμένα παράγωγα (Pollastro F. et al., 2018). Η ντεμπινομπίνη (Denbinobin), αναφέρεται ότι έχει ευεργετικές βιοδραστικές ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία ως αντι-HIV, αντιοξειδωτικό, αντικαρκινικό και αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Sánchez-Duffhues G. et al., 2008).

1.3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μέθοδοι εκχύλισης και ανάλυσης της βιομηχανικής κάνναβης

1.3.1 Υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης - Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

Η υγρή χρωματογραφία, ως τεχνική, χρησιμοποιείται ευρέως ώστε να ανιχνεύσει με ακρίβεια και ευαισθησία τις δραστικές φαρμακευτικές ουσίες σε διάφορα δείγματα. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High-performance liquid chromatography, HPLC) και η υγρή χρωματογραφία υπερύψηλης απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC) είναι δύο μορφές υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιούν τις ίδιες βασικές αρχές με κύρια διαφορά την οργανολογία. Και οι δύο σε συνδυασμό με συστήματα φασματομετρίας μάζας μπορούν να εφαρμοστούν και δίνουν καλύτερα αποτελέσματα.

Οι HPLC και UPLC διέπονται από την ίδια βασική η οποία εξαρτάται από τον τρόπο με τον οποίο διαχωρίζονται οι ουσίες όπως παρουσιάζονται την Εικόνα 20. Με βάση το χρωματογραφικό υλικό γίνεται προσρόφηση, κατανομή, αποκλεισμός και ιοντοανταλλαγή.

Types of compounds	Mode	Stationary phase	Mobile Phase
Neutral (weak acids and bases)	Reverse phase	C ₁₈ , C ₈ , C ₄ , Cyano, Amino	Aqueous or organic modifiers
Ionics, Bases, Acids	Ion pair	C ₁₈ , C ₈	Aqueous or organic ion-pair reagent
Compounds insoluble in water	Normal phase	Silica, Amino, Cyano, Diol	Organics
Ionics or inorganic ions	Ion exchange	Anion or Cation exchange resin	Aqueous buffer with counter ion
High Molecular Weight Compounds, Polymers	Size exclusion	Polystyrene Silica	Gel Filtration Or Permeation

Εικόνα 20 - Κύριες μορφές υγρής χρωματογραφίας

Η χρήση μικρών σωματιδίων είναι απαραίτητη στην HPLC γιατί δίνει τη δυνατότητα καλύτερης ανάλυσης, υψηλής απόδοσης και το κυριότερο γρήγορης ανάλυσης (Jerkovich Ad et al., 2003). Αντίθετα, η UPLC έγινε στηριζόμενη στην αρχή της χρήσης της στήλης, η οποία αποτελείται από σωματίδια με μέγεθος μικρότερο των 2 μm. Χρωματογραφικές στήλες με σωματίδια < 2 μm εφαρμόζονται σε εξοπλισμό που είναι ικανός να λειτουργεί σε υψηλή πίεση. Με τα μικρότερα σωματίδια η πίεση στη στήλη αυξάνεται πολύ με αποτέλεσμα να δημιουργούνται υψηλές πιέσεις σε στήλες μεγαλύτερου μήκους. Έτσι στήλες που έχουν διάμετρο σωματιδίων 1,9 μm δεν χρησιμοποιούνται για τα συνηθισμένα συστήματα LC. Για το λόγο αυτό οι στήλες UPLC έχουν χαμηλότερες ή παρόμοιες με τις αποδόσεις HPLC. Όσο μειώνεται το μέγεθος της στήλης τόσο βελτιώνεται η απόδοση διαχωρισμού και αυξάνεται ο ρυθμός της ροής, άρα και η ανάλυση.

Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των διαφόρων συστατικών που περιέχονται σε δείγματα προς ανάλυση, απαιτείται να υπάρχει μια συνδεδεμένη φάση που να προσφέρει αφενός κατακράτηση και αφετέρου εκλεκτικότητα. Αρχικά, ήταν διαθέσιμες μόνο στήλες C₁₈. Στη σημερινή εποχή και μετά από τροποποιήσεις που έγιναν υπάρχουν διάφορες στήλες όπως C₈, φαινυλικές, HILIC, πυριτίας, αμιδίου, φθοροφαινυλικές και φαινυλ-εξυλικές. Σε αυτή την περίπτωση, η χρήση μικρότερων στηλών με γρήγορη εξισορρόπηση του συστήματος και δυνατότητα ταυτόχρονης μέτρησης πολλών ποιοτικών παραμέτρων αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της UPLC.

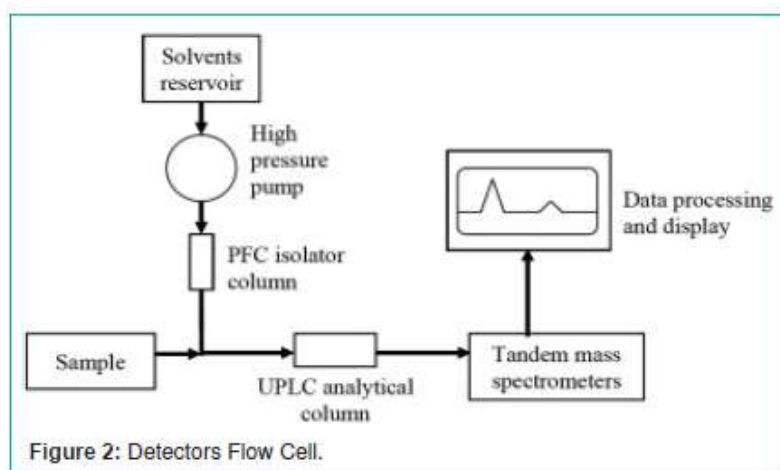
Στη συνέχεια, θα αναφερθούν οι συνδεδεμένες φάσεις που είναι διαθέσιμες για το διαχωρισμό UPLC και είναι οι εξής:

1. ACQUITY UPLC BEH C8 (αλκυλομάδα ευθείας αλυσίδας στήλης C8)
2. ACQUITY UPLC BEH C18 (αλκυλικές στήλες ευθύγραμμης αλυσίδας)
3. ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (ενσωματωμένες πολικές ομάδες)
4. ACQUITY UPLC BEH Phenyl (φαινυλομάδα προσδεσμένη σε με τη λειτουργικότητα σιλυλίου με αλκύλιο C6)
5. ACQUITY UPLC BEH Phenyl (ομάδα φαινυλίου προσδεσμένη στη σιλυλική με C6 αλκύλιο)

Κάθε χημική στήλη δίνει διαφορετικό συνδυασμό υδροφοβικότητας, δραστηριότητας σιλαλκοόλης, υδρολυτικής σταθερότητας και χημικής αλληλεπίδρασης με τους διαλύτες.

Επειδή τα μικρά σωματίδια προκαλούν ακραίες πιέσεις για αυτό το λόγο χρειάζεται ένα σύστημα που να αντέχει σε υψηλές πιέσεις. Αποδείχθηκε ότι για να υπάρξει τριπλάσια απόδοση, πρέπει να αυξηθεί εννιά φορές η πίεση. Το μικρότερο μήκος της στήλης, του υλικού συσκευασίας καθώς και το βελτιωμένο σύστημα αντλίας αναφέρονται στα πλεονεκτήματα της UPLC.

Οι ανιχνευτές, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην UPLC είναι UV/ορατοί. Η ανίχνευση βασίζεται στην απορρόφηση που είναι ανιχνευτές ευαίσθητοι στη συγκέντρωση. Στην UPLC ο όγκος της κυψελίδας ροής θα πρέπει να μειωθεί για να διατηρηθεί η συγκέντρωση και το σήμα (van Demeter JJ et al., 1965). Οι κυψέλες ροής που έχουν μικρότερο όγκο μειώνουν το μήκος της διαδρομής, από το οποίο εξαρτάται και η ισχύς του σήματος. Η μείωση της διατομής οδηγεί στη μείωση της διαδρομής του φωτός καθώς επίσης και στη μείωση της μετάδοσης με την αύξηση του θορύβου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ότι εάν χρησιμοποιούνταν μια συμβατική κυψελίδα ροής HPLC, η ευαισθησία της UPLC θα διακυβευόταν. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21, το σύστημα διαθέτει μια κυψελίδα ροής που καθοδηγείται από φως και είναι ισοδύναμη με μια οπτική ίνα. Το φως μεταφέρεται αποτελεσματικά κατά μήκος της κυψελίδας ροής σε μια λειτουργία εσωτερικής ανάκλασης που εξακολουθεί να διατηρεί μήκος διαδρομής κυψελίδας ροής 10 mm.



Εικόνα 21 - Ανιχνευτής Κυψέλη ροής ACQUITY Tunable UV/Visible

Οι βαλβίδες έγχυσης που υπάρχουν στην HPLC δεν αντέχουν τις υψηλές πιέσεις και επομένως είναι απαραίτητα να χρησιμοποιηθεί μια αντλία, η οποία να προωθεί το διαλύτη σιγά-σιγά. Οι όγκοι του δείγματος στη UPLC είναι 2-5 μL ενώ στη HPLC είναι 10-50 μL . Απαιτείται ένας γρήγορος κύκλος έγχυσης με μεγάλη χωρητικότητα δείγματος, με έγχυση χαμηλού όγκου που οδηγεί σε ελάχιστα προβλήματα μεταφοράς με αυξημένη ευαισθησία. Για να είναι η

ανάλυση περισσότερο αποδοτική πρέπει η κυψέλη του ανιχνευτή να έχει τον μικρότερο όγκο διασποράς ενώ είναι απαραίτητος ο μεγάλος ρυθμός δειγματοληψίας. Η ευαισθησία της UPLC επηρεάζεται από τον τύπο του ανιχνευτή και μάλιστα, αυτή αυξάνεται 2-3 φορές πιο πολύ από την αντίστοιχη της HPLC.

Στη UPLC βελτιώνεται η ταχύτητα, η ανάλυση και η ευαισθησία. Το σημαντικότερο όμως είναι ότι μειώνεται ο χρόνος ανάλυσης γεγονός που οδηγεί στη μείωση κατανάλωσης των διαλυτών. Επιπλέον, η UPLC είναι πιο φθηνή από την HPLC και αυτό γιατί μπορεί να γίνει μεγάλος αριθμός αναλύσεων στη μονάδα του χρόνου. Στην Εικόνα 22 παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ των δύο μεθόδων ανάλυσης.

Characteristics	HPLC	UPLC
Particle size	3–5 μm	Sub-2 μm
Max back pressure	35–40 MPa	103.5 MPa
Analytical column (Dimensions)	Agilent Eclipse xbd C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm)	Acquity UPLC BEH Shield RP18 (2.1 x 50 mm, 1.7 μm)
Column temperature	25 °C	65 °C
Injection volume	10–20 μL	1–5 μL
Disadvantages	Lack of efficiency, Low diffusion coefficients	Expensive instrument, Reduced column life due to high back pressure

Εικόνα 22 - Σύγκριση των τεχνικών HPLC και UPLC

Μελέτες έδειξαν ότι η UPLC είναι γρηγορότερη, ευαίσθητη και κυρίως πιο φιλική προς το περιβάλλον σε σχέση με την HPLC. Η τεχνολογία UPLC είναι ένας τομέας που αναπτύσσεται πολύ γρήγορα και ο οποίος βρίσκει αρκετές εφαρμογές που αφορούν την ανάλυση φαρμακευτικών και βιολογικών ενώσεων (Tolley L et al., 2001).

Τέτοιες εφαρμογές είναι οι εξής:

1. Προσδιορισμός, διαχωρισμός και ποσοτική εκτίμηση θεραπευτικά δραστικών συστατικών από φυσικά εκχυλίσματα και φάρμακα φυτικής προέλευσης.
2. Δοκιμές διάλυσης: Για σκοπούς ποιοτικού ελέγχου και για την απόδειξη της ομοιομορφίας από παρτίδα σε παρτίδα του(των) δραστικού(-ών) συστατικού(-ών) στη σύνθεση και στις διαδικασίες παραγωγής.
3. Προφίλ προσμίξεων: Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός των προσμίξεων που σχετίζονται με το φάρμακο τόσο στις πρώτες ύλες όσο και στο τελικό προϊόν.
4. Μελέτες πρωτεομικής: Ανάλυση πεπτιδικών και πρωτεϊνικών φαρμάκων.
5. Μελέτες μεταβολομικής: Ανάλυση των φαρμάκων και των μεταβολικών προϊόντων τους σε βιολογικά υγρά, π.χ. ανθρώπινο πλάσμα, ούρα κ.λπ. για τη αποσαφήνιση των μονοπατιών βιομετασχηματισμού.
6. Φαρμακομεταβολικές και συναφείς μελέτες: Μέτρηση της μεταβολικής απόκρισης των ζωντανών συστημάτων σε γενετική τροποποίηση ή σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα.

Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα της μεθόδου UPLC μπορούν να αναφερθούν τα εξής (Swartz ME, 2005):

1. Απαιτεί λιγότερο χρόνο εκτέλεσης και ενισχύει την ευαισθησία.
2. Παρέχει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα, ευαισθησία και δυναμικό εύρος
3. Στο χρωματογράφημα λαμβάνονται διαχωρισμένες κορυφές.
4. Η κατανάλωση διαλυτών είναι μικρότερη.
5. Αναλύονται περισσότερα προϊόντα με τους υπάρχοντες πόρους.

6. Αυξάνει την απόδοση των δειγμάτων και επιτρέπει στους κατασκευαστές να παράγουν περισσότερο υλικό που ανταποκρίνεται σταθερά ή υπερβαίνει τις προδιαγραφές του προϊόντος, εξαλείφοντας ενδεχομένως τη μεταβλητότητα, τις αποτυχημένες παρτίδες ή την ανάγκη επανεπεξεργασίας του υλικού.
7. Παρέχει ανάλυση σε πραγματικό χρόνο, συμβαδίζοντας με τις διαδικασίες παραγωγής.
8. Διασφαλίζει την ποιότητα του τελικού προϊόντος, συμπεριλαμβανομένων των δοκιμών τελικής απελευθέρωσης.

Στον αντίποδα, στην ανάλυση UPLC το κύριο μειονέκτημα που εμφανίζεται είναι η διάρκεια ζωής των στηλών, κατά τη διάρκεια της ανάλυσης αναπτύσσεται υψηλή πίεση λόγω του μεγέθους των σωματιδίων. Η αύξηση της πίεσης μειώνει τη διάρκεια ζωής των στηλών. Λόγω της αυξημένης πίεσης απαιτείται περισσότερη συντήρηση και μειώνεται η διάρκεια ζωής των στηλών αυτών των τύπων. Η χρήση στατικής φάσης μεγέθους σωματιδίων 2μm παρέχει καλύτερη ανάλυση χωρίς τις δυσμενείς επιπτώσεις της υψηλής πίεσης. Ακόμη ένα μειονέκτημα της UPLC είναι το κόστος του οργάνου που χρησιμοποιείται. Η UPLC αυξάνει την παραγωγικότητα δίνοντας πολλές πληροφορίες σε μικρότερο χρονικό διάστημα, με αυξημένη ανάλυση και ταχύτητα αναλύσεων LC.

Εκτός από τη μέθοδο ανάλυσης της UPLC χρησιμοποιείται όπως ήδη έχει αναφερθεί και η HPLC με πολλά πλεονεκτήματα όπως ευκολία στη χρήση, εκλεκτικότητα και ευαισθησία η οποία μπορεί να ρυθμιστεί. Εκείνο όμως, που περιορίζει τη χρήση της είναι η έλλειψη αποτελεσματικότητας συγκρινόμενη με την αέρια χρωματογραφία (GC).

Η ανάλυση UPLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τις εξής περιπτώσεις:

1. Ανάλυση αμινοξέων
2. Ανάλυση βιοδραστικών ουσιών όπως από φυτικά εκχυλίσματα, όπως τα κανναβινοειδή
3. Ανάλυση φαρμάκων στο ανθρώπινο πλάσμα και μεταβολίτες
4. Μελέτη των μεταβολιτών

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω προκύπτει ότι η τεχνική UPLC είναι μία τεχνική η οποία είναι καθιερωμένη και πολύ γρήγορα αναπτυσσόμενη σε πάρα πολλούς τομείς. Η χρήση της UPLC στην ανάλυση πολλών φυσικών προϊόντων δείχνει τη μεγάλη σημασία αυτής της τεχνικής ενώ συγχρόνως καταδεικνύει και τα προβλήματα που προκύπτουν κατά την προσαρμογή των συνθηκών της μεθόδου από το σύστημα HPLC στο UPLC. Το πρόβλημα αυτό γίνεται πιο σημαντικό, όταν γίνονται οι αναλύσεις ουσιών σε σύνθετα δείγματα όπως βιολογικό υλικό και φυτικά εκχυλίσματα. Τέλος, η μετάβαση των παλαιών συνθηκών της μεθόδου UPLC σε UPLC μπορεί να αποβεί μια διαδικασία με σημαντικά οφέλη. Αυτό μπορεί να αποτελέσει ένα εργαλείο στα χέρια του αναλυτή ώστε να βελτιωθεί η ποιότητα της ανάλυσης.

1.3.2 Εκχύλιση με μικροκύματα - Microwave Assisted Extraction (MAE)

Στην μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα (MAE), η ακτινοβολία των μικροκυμάτων αλληλεπιδρά με τα δίπολα των πολικών υλικών, τα μόρια των οποίων προσανατολίζονται στο πεδίο, όταν οι δυνάμεις των ηλεκτρικών και μαγνητικών συνιστωσών αλλάζουν κατεύθυνση

με αποτέλεσμα να θερμαίνονται. Αντίθετα, η θέρμανση είναι ελάχιστη όταν οι διαλύτες είναι μη πολικοί. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα μεγάλα σωματίδια, δε θερμαίνονται ομοιόμορφα πράγμα που είναι ένα σημαντικό μειονέκτημα της θέρμανσης με μικροκύματα. Στη θέρμανση με μικροκύματα η μεταφορά ενέργειας γίνεται είτε με περιστροφή διπόλου είτε με ιοντική αγωγιμότητα και αποτελεί και αποτελεί το κύριο χαρακτηριστικό της θέρμανσης αυτής.

Η παραπάνω μέθοδος παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα τα οποία είναι τα εξής:

- ✓ Πλεονεκτήματα
 - Μειωμένη θερμική υποβάθμιση
 - Μειωμένο κόστος επεξεργασίας
 - Σημαντικά ταχύτερη εκχύλιση
 - Πολύ χαμηλότερη χρήση ενέργειας
 - Πολύ χαμηλότερη (τάξη μεγέθους) χρήση διαλυτών
- ✓ Μειονεκτήματα
 - Ο διαλύτης εκχύλισης πρέπει να μπορεί να απορροφήσει τα μικροκύματα
 - Απαιτείται στάδιο καθαρισμού
 - Χρόνος αναμονής για την ψύξη των δοχείων

Τέλος, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και κάποιοι παράγοντες που είναι οι εξής:

- ✓ Επιλογή διαλύτη και αναλογία δείγματος προς διαλύτη
- ✓ Επίδραση του χρόνου και του κύκλου εκχύλισης
- ✓ Επίδραση της ισχύος των μικροκυμάτων και της θερμοκρασίας εκχύλισης
- ✓ Επίδραση της επιφάνειας επαφής και της περιεκτικότητας σε νερό
- ✓ Επίδραση της ανάδευσης

Για την εισαγωγή βιοδραστικών φυτικών εκχυλισμάτων σε φαρμακευτικά και άλλα σκευάσματα, οι βιομηχανίες αναζητούν πράσινες (οικολογικές) και αποτελεσματικές διαδικασίες εκχύλισης που χρησιμοποιούν μη τοξικούς διαλύτες όπως είναι το νερό, η αιθανόλη και άλλους. Οι νέες τεχνικές εκχύλισης έχουν τραβήξει την προσοχή των ειδικών εξαιτίας του μειωμένου χρόνου εκχύλισης, της μειωμένης κατανάλωσης διαλυτών, της αυξημένης πρόληψης ρύπανσης καθώς επίσης και της μέριμνας για τα θερμοευαίσθητα συστατικά. Μια τέτοια μέθοδος για την εκχύλιση των οργανικών ενώσεων από τα διάφορα φυτικά υλικά όπως σπόροι είναι η εκχύλιση με μικροκύματα. Θεωρείται πιο αποτελεσματική συγκρινόμενη με τις συμβατικές τεχνικές όπως είναι η Soxhlet, η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους (UAE), η εκχύλιση με υγρά υπό πίεση (PLE) και εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστά (SFE).

Παρακάτω συγκρίνεται η μέθοδος MAE έναντι άλλων μεθόδων εκχύλισης.

- *MAE έναντι εκχύλισης Soxhlet:* Η μέθοδος Soxhlet αποτελεί τη σημαντικότερη και πιο χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης στερεών-υγρών. Εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του φυτού και το μέγεθος των σωματιδίων. Ακόμα, σε σχέση με άλλες συμβατικές μεθόδους εκχύλισης έχει τη μεγαλύτερη απόδοση, εκτός της εκχύλισης θερμοευαίσθητων ενώσεων. Επιπλέον, η φτωχή εκχύλιση, ο μεγάλος χρόνος λειτουργίας, η υψηλή κατανάλωση διαλυτών συμπεριλαμβάνονται στα

μειονεκτήματα της Soxhlet. Αντίθετα, η MAE επιτρέπει τη μείωση του χρόνου και της κατανάλωσης διαλύτη καθώς και τη βελτίωση της απόδοσης συνολικά.

- *MAE έναντι εκχύλισης με υπερκρίσιμο ρευστά (SFE):* Για έναν οικολογικό τρόπο εκχύλισης η χρησιμοποίηση υπερκρίσιμων ρευστών (SFE) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο αφενός γιατί οι ουσίες που διαλύονται παραλαμβάνονται εύκολα και αφετέρου ο διαλύτης επαναχρησιμοποιείται. Αυτό συμβαίνει γιατί με τη βοήθεια της θερμοκρασίας ή της πίεσης ανακυκλώνεται. Στην εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό, ο διαλύτης που χρησιμοποιείται, ως επί των πλείστων, είναι το CO₂, και αυτό διότι είναι ασφαλές, διαθέσιμο στην αγορά, μη τοξικό και σε λογικό κόστος, αλλά από την άλλη θα πρέπει να δοθεί μεγάλη προσοχή ως προς τη χρήση του γιατί σε μεγάλες πυκνότητες περιορίζει την ικανότητα διάλυσης πολικών ενώσεων. Αξίζει βέβαια, να αναφερθεί ότι η προσθήκη τροποποιητών στο CO₂ βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης αυξάνοντας τη διαλυτότητα της διαλυμένης ουσίας στο διαλύτη. Το γεγονός ότι η μέθοδος SFE δίνει τη δυνατότητα να ρυθμίζονται οι συνθήκες λειτουργίας για την αύξηση της διαλυτικής ισχύος την καθιστά μια καλή επιλογή για τη συλλογή συγκεκριμένων τύπων ουσιών και έτσι βρίσκει πλείστες εφαρμογές. Η ανάπτυξη της μεθόδου στη SFE είναι πολύπλοκη και η απόδοση όχι τόσο υψηλή όσο στη MAE, η αποτελεσματικότητα της οποίας είναι χαμηλή. Επιπλέον, η MAE είναι φθηνότερη στην εγκατάσταση του εξοπλισμού σε σχέση με τη SFE. Τέλος, η MAE είναι πιο ασφαλής μέθοδος αφού οι πιο πολλές εκχυλίσσεις γίνονται σε ατμοσφαιρικές συνθήκες.
- *MAE έναντι UAE:* Τόσο η χημική βιομηχανία όσο και η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούν τον υπερήχους ως μία εναλλακτική λύση διότι κάνει χρήση μικρότερων ποσοτήτων ορυκτής ενέργειας που οδηγεί στη μειωμένη κατανάλωση διαλυτών, οπότε και σε πιο καθαρό προϊόν και υψηλές αποδόσεις. Η UAE ως μέθοδος εκχύλισης ή η MAE ή τέλος ο συνδυασμός αυτών των δύο μεθόδων μπορούν να δώσουν εξαιρετικά αποτελέσματα όσον αφορά την απόδοση και τη μείωση του χρόνου. Ως προς την απόδοση η MAE είχε σχεδόν διπλάσια σε σύγκριση με την UAE.
- *MAE έναντι PLE:* Η μέθοδος εκχύλισης με υγρό υπό πίεση (PLE) θεωρείται ως εναλλακτική λύση στη μέθοδο Soxhlet. Χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των αντιοξειδωτικών στα φυτά. Είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιεί διαλύτες ή μείγματα διαλυτών σε μεγάλες πιέσεις. Η διαδικασία της εκχύλισης γίνεται γρηγορότερα όταν χρησιμοποιείται υψηλή θερμοκρασία. Συγκρινόμενες οι δύο μέθοδοι παρατηρήθηκε ότι αμφότερες έδωσαν πολύ καλά ποσοστά απόδοσης, όμως η MAE υπερέχει ως προς τον χειρισμό του δείγματος, το κόστος, τη χρονική διάρκεια της εκχύλισης καθώς και την κατανάλωση των διαλυτών.

Συμπερασματικά, η MAE ως τεχνική εκχύλισης, έχει περισσότερα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Εκτός του μειωμένου χρόνου, της αυξημένης απόδοσης είναι και μια οικολογική τεχνική, περισσότερο αποδοτική και φιλική προς το περιβάλλον. Όλα τα πλεονεκτήματα της MAE οδήγησαν στο να είναι η MAE η πιο κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης πάντα σε σχέση με τα χαρακτηριστικά του φυτού. Ειδικότερα, για την εκχύλιση της κάνναβης θα πρέπει να συνυπολογιστούν και οι παρακάτω παράγοντες:

- Η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, το ποσοστό των βιοδραστικών ενώσεων που προκύπτουν κατά την εκχύλιση
- Η ποιότητα του εκχυλίσματος, λαμβάνοντας πάντα υπόψη την καθαρότητά του, την παρουσία των κανναβινοειδών και άλλων ενώσεων όπως τα τερπένια

- Την ικανότητα της απόδοσης, αξιολόγηση της μεθόδου και πόσο αποτελεσματική είναι η εφαρμογή της ανάλογα με τη ζήτηση της αγοράς
- Ο περιβαλλοντικός έλεγχος, ώστε να μειωθούν οι κίνδυνοι για τους καταναλωτές και να μεγαλώσει η ασφάλεια για τους εργαζομένους.

Ακολούθως φαίνεται η επίδραση διάφορων παραγόντων στις αποδόσεις των κανναβινοειδών:

1. Επίδραση διαλύτη: Η εκχύλιση με μικροκύματα επηρεάζεται από ένα σημαντικό παράγοντα που είναι η επιλογή του σωστού διαλύτη. Ο διαλύτης αυτός θα πρέπει να έχει μεγάλη ικανότητα απορρόφησης μικροκυμάτων, υψηλή απόδοση όταν τα μικροκύματα μετατρέπονται σε θερμότητα, μεγάλη ικανότητα διάλυσης των αναλυτών, υψηλή αλληλεπίδραση με τη μήτρα.
2. Επίδραση ισχύος: Η ισχύς των μικροκυμάτων είναι δυνατόν να επηρεάσει το χρονικό διάστημα που χρειάζεται ώστε να υπάρξει η καθορισμένη θερμοκρασία εκχύλισης.
3. Επίδραση θερμοκρασίας: Ο παράγοντας θερμοκρασία διερευνάται περισσότερο από όλους στη ΜΑΕ. Και αυτό γιατί όταν η θερμοκρασία ξεπερνούσε το Σημείο Βρασμού της μεθανόλης είχε ως αποτέλεσμα τη μεγάλη απόδοση της εκχύλισης. Όταν όμως αυξήθηκε η θερμοκρασία, αυξήθηκε και μη εκρόφιση των αναλυτών από το δείγμα στη μήτρα. Τέλος, η ρύθμιση πιο ψηλής θερμοκρασίας υποβάθμισε τα κανναβινοειδή.
4. Επίδραση του χρόνου: Σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης, στη ΜΑΕ οι χρόνοι εκχύλισης είναι μικροί γιατί αλλιώς η εκχύλιση οδηγείται σε υποβάθμιση των θερμοευαίσθητων συστατικών

Τα μικροκύματα χρησιμοποιούνται για τη για την εξαγωγή βιοδραστικών ενώσεων από τα φυτά (Brujan E.A. et al., 2006). Η ΜΑΕ διαφέρει από τις άλλες μεθόδους εκχύλισης, διότι η εκχύλιση γίνεται σαν αποτέλεσμα της θέρμανσης αντίθετα με τη μεταφορά θερμότητας. Αυτή οδηγεί στον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας (Mason, 1999). Τα τελευταία χρόνια, όσο αναφορά τη ΜΑΕ έγιναν πολλές έρευνες εξαιτίας της αυξημένης ζήτησης για πιο ευεργετικές τεχνικές εκχύλισης, που αφορούσαν τους μειωμένους χρόνους εκχύλισης, μειωμένη κατανάλωση οργανικών διαλυτών καθώς εξοικονόμηση ενέργειας και κόστος. Όλα αυτά οδήγησαν σε καινοτόμες τεχνικές με βάση τα μικροκύματα (Vinatoru M. et al., 1997). Για αυτή τη διαδικασία χρησιμοποιείται μια βιώσιμη και ασφαλής πηγή ενέργειας, που είναι η ηλεκτρική ενέργεια σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα. Η εκχύλιση με μικροκύματα είναι γρήγορη, αποτελεσματική, και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος και αποτελεί ένα “όπλο” στη φαρέτρα των κυβερνήσεων στους νόμους που θέσπισαν όσον αναφορά τον περιορισμό της περιεκτικότητας των κανναβινοειδών σε προϊόντα κάνναβης ευρείας εμπορικής κυκλοφορίας. Αξίζει να αναφερθεί πως η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και στον ιατρικό τομέα αφού μέσω αυτής μπορεί να επεξεργάζονται σύνθετες βιομάζες για την παραλαβή πολύτιμων ενώσεων. Με βάση τα πλεονεκτήματα της ΜΑΕ και την ανάπτυξη εξοπλισμού για εμπορική λειτουργία ευρείας κλίμακας η ΜΑΕ έχει λαμπρό μέλλον.

1.3.3 Εκχύλιση με υπερήχους - Ultrasound Assisted Extraction (UAE)

Η εκχύλιση με διαλύτη καθώς επίσης και η εκχύλιση με διαβροχή και μόνο αυτές επωφελούνται από τη χρήση υπερήχων. Πολλές βιοδραστικές ενώσεις ευθύνονται για τις διαφορετικές ιδιότητες που αποδίδονται στα φυτά. Οι ενώσεις αυτές βοηθούν στην επιβίωση των φυτών επιτρέποντας την αλληλεπίδρασή τους με το περιβάλλον. Οι βιοδραστικές ενώσεις είναι δύσκολο να απομονωθούν εξαιτίας της ευαισθησίας τους στη θερμοκρασία και τη σχέση τους με άλλα συστατικά (Bimark et. al. 2011). Για την εκχύλιση χρήσιμων συστατικών του φυτού καθοριστικό ρόλο έχει η επιλογή των διαλυτών, η οποία σε μεγάλο βαθμό εξαρτάται από το πως τελικά χρησιμοποιούνται τα εκχυλίσματα. Επομένως, για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση χρησιμοποιούνται διαφορετικοί διαλύτες.

Στις συμβατικές τεχνολογίες εκχύλισης με διαλύτες, το αποξηραμένο υλικό εμβαπτίζεται στο διαλύτη ώστε να απόκτηση υγρασία.

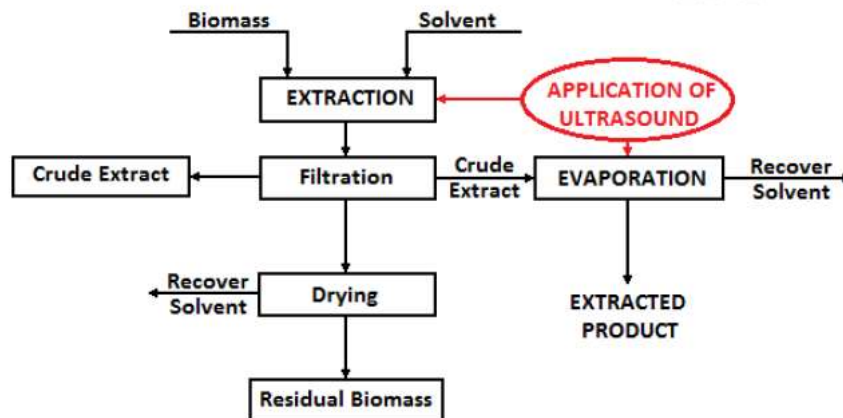
Ο βαθμός συγκέντρωσης των συστατικών είναι το στοιχείο που θα δώσει το έναυσμα ώστε να ξεκινήσει η εκχύλιση με υπερήχους. Η συγκέντρωση αυτή είναι μεγαλύτερη στο εσωτερικό του υλικού που έχει διογκωθεί. Επιπλέον, προκύπτει ότι όταν η συγκέντρωση μειώνεται, μειώνεται και η κινητήρια δύναμη, μέχρι τη στιγμή που θα γίνει ισορροπία (Azmir J. et al., 2013).

Για την ισορροπία αυτή ο χρόνος που χρειάζεται μπορεί να επιτευχθεί με του εξής τρόπους:

1. άμεση θέρμανση για να ενισχυθεί η κινητικότητα των μορίων και, επομένως, να αυξηθεί η απόδοση της εκχύλισης,
2. η θέρμανση με μικροκύματα, η οποία διαφέρει από την άμεση θέρμανση επειδή ξεκινά από το εσωτερικό του φυτικού υλικού,
3. ανάμιξη υψηλής ταχύτητας που παρέχει πολύ αποτελεσματική διαταραχή του στάσιμου στρώματος διαλύτη γύρω από το φυτικό υλικό, το οποίο διαφορετικά θα εμπόδιζε την εκχύλιση,
4. χρήση ηλεκτρικής εκκένωσης, η οποία μπορεί επίσης να διαταράξει το στάσιμο στρώμα (ωστόσο πρόκειται για μια σπάνια χρησιμοποιούμενη τεχνική),
5. χρήση ενέργειας υπερήχων η οποία προάγει την εκχύλιση με διαφορετικούς τρόπους από όλους τους προαναφερθέντες.

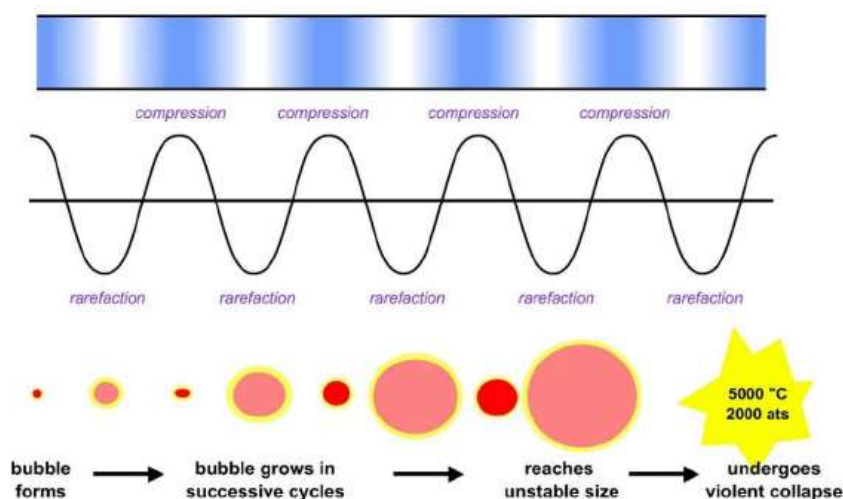
Επίσης η εκχύλιση με διαλύτη στηρίζεται σε ένα σύστημα λειτουργίας μονάδας που οι υπέρηχοι εισάγονται σε κάποιο σημείο όπως φαίνεται στην Εικόνα 23. Πιο συγκεκριμένα, οι υπέρηχοι εισάγονται σε δύο σημεία που είναι τα εξής (Khan M. et al., 2010):

1. Στην ίδια τη διαδικασία εκχύλισης, όπου εισάγονται η βιομάζα και ο διαλύτης
2. Στη διαδικασία εξάτμισης, για την υποβοήθηση της απομάκρυνσης του διαλύτη σε χαμηλότερη θερμοκρασία.



Εικόνα 23 - Σχήμα λειτουργίας μονάδας για την εκχύλιση διαλυτών από φυτικές πηγές (Vinatoru et al., 2017)

Η σπηλαιώση που εντοπίστηκε το 1895, είναι η κινητήρια δύναμη για την εκχύλιση με υπερήχους. Ο υπέρηχος διαδίδεται μέσω μιας σειράς κυμάτων συμπίεσης και αραιώσης, τα οποία προκαλούνται στα μόρια του μέσου από το οποίο διέρχεται. Σε υψηλή ισχύ, ο κύκλος αραιώσης ενδέχεται να ξεπεράσει τις ελκτικές δυνάμεις που δημιουργούνται από τα μόρια του υγρού και σχηματίζονται φυσαλίδες σπηλαιώσης όπως φαίνονται στην Εικόνα 24.

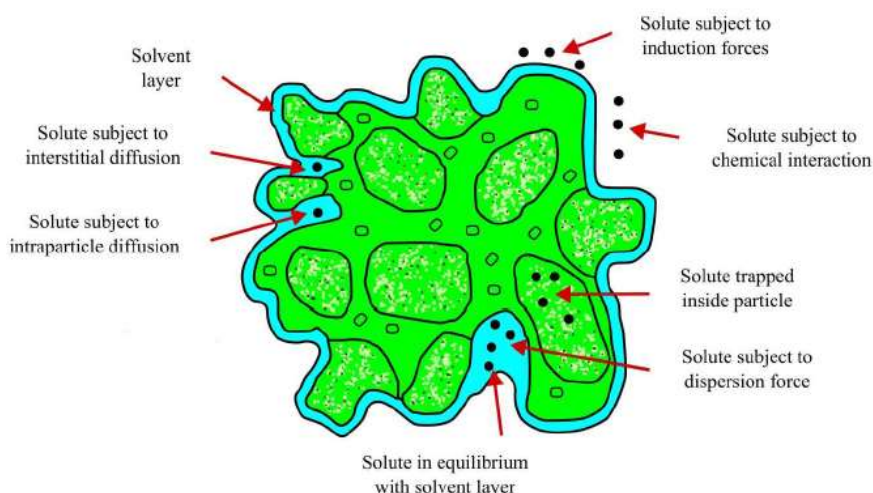


Εικόνα 24 - Δημιουργία φυσαλίδων σπηλαιώσης και κατάρρευσή τους (Vinatoru et al., 2017)

Έτσι, μικρές ποσότητες αερίου από το μέσο εισέρχονται στη φυσαλίδα κατά τη διαστολή και δεν αποβάλλεται κατά τη συμπίεση. Ερευνητές- μελετητές δημοσίευσαν μελέτες που αφορούσαν τόσο τις φυσικές όσο και τις βιολογικές επιδράσεις των ηχητικών κυμάτων μεγάλης έντασης και συχνότητας. Γίνονται αναφορές, στις οποίες επισημαίνεται ότι οι φυσαλίδες είναι συμμετρικές μόνο στην περίπτωση που δημιουργούνται σε ομογενή υγρά. Επιπλέον, η κατάρρευσή τους στον όγκο του υγρού είναι συμμετρική και εντοπίζεται σε σημεία με συνθήκες θερμοκρασίας περίπου 5000 K και πίεσης περίπου 2000 atm (Newman et al., 1997). Όταν οι φυσαλίδες πέσει σε μια επιφάνεια αυτή παραμορφώνεται δηλαδή είναι ασύμμετρη η κατάρρευση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να δημιουργείται πίδακας μεγάλης ταχύτητας, οποίος αν συγκρουσθεί στο τοίχωμα έχει τη δυνατότητα να παρασύρει σωματίδια (Newman et al., 1997). Αυτός είναι ένας από τους λόγους που οι υπερήχοι είναι αποτελεσματικοί στον καθαρισμό επιφανειών. Ο βασικός λόγος της εκχύλισης με υπερήχους

είναι η ασύμμετρη κατάρρευση των φυσαλίδων και η ακουστική ισχύς που εφαρμόζεται είναι τόσο μεγάλη ώστε να περάσει τη σπηλαίωση. Οι υδρατμοί στη φυσαλίδα έχει σαν αποτελέσματα η κατάρρευση της να προκαλεί διάσπαση του νερού και τη δημιουργία αντιδραστικών μορίων $\text{HO}^\cdot$ και H^+ (Schmitt et al., 1929). Οι ρίζες αυτές δημιουργούν οξειδωτικούς παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν ενδεχομένως αποικοδόμηση του εκχυλίσματος. Όταν το αέριο είναι αδρανές όπως άζωτο ή αργό, τότε οι επιδράσεις των οξειδωτικών ελαχιστοποιούνται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης με υπερήχους. Όταν χρησιμοποιούνται σαν διαλύτης μίγματα νερού/αιθανόλη τότε μειώνεται η δημιουργία οξειδωτικών από τη διάσπαση του νερού (Vinatoru, 2000). Αυτό οφείλεται στο εξής: όταν στο διαλύτη νερού/αιθανόλης αναπτύσσονται φυσαλίδες τότε ένα μέρος του νερού εισέρχεται σε αυτές αλλά και ένα μέρος του μείγματος αιθανόλη/νερού και η αιθανόλη είναι πιο ισχυρή από το νερό κατά τη διάσπαση. Τέλος, σε ένα ετερογενές μίγμα εκχύλισης, η κατάρρευση των φυσαλίδων είναι ασύμμετρη με αποτέλεσμα ο διαλύτης να δημιουργεί πίδακες μεγάλης ταχύτητας οι οποίοι έχουν στόχο το φυτικό υλικό γεγονός που κάνουν την UAE πιο αποτελεσματική.

Όταν σε ένα διαλύτη αιωρούνται διάφορα φυτικά σωματίδια, τότε αυτά θα πρέπει να εξετασθούν και ως προς το σχήμα και ως προς την σύστασή τους. Και τούτο, γιατί είναι αυτά που επηρεάζονται από την κατάρρευση των κοντινών φυσαλίδων όπως φαίνεται στην Εικόνα 25.

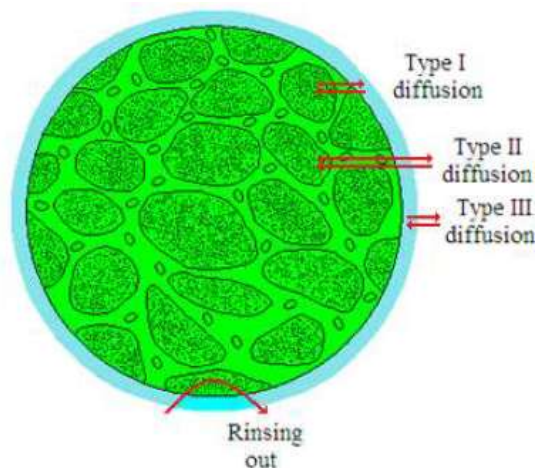


Εικόνα 25 - Σχηματική αναπαράσταση των κυριότερων φυσικών/χημικών διεργασιών που μπορεί να συμβούν κατά την εκχύλιση με διαλύτη από φυτικό υλικό (Vinatoru et al., 2017)

Αφενός ο διαλύτης εισέρχεται στο φυτικό υλικό προκειμένου να αναπληρώσει την απώλεια του νερού. Με την πάροδο του χρόνου τα σωματίδια υφίστανται διόγκωση και από τη διαδικασία προσδιορίζεται ποσοτικά ο δείκτης διόγκωσης (SI) ο οποίος είναι σημαντικός για την φυτοφαρμακευτική τεχνολογία.

Επιπλέον, ο δείκτης διόγκωσης δείχνει τη συγγένεια του φυτού με το διαλύτη. Έτσι, οι ενώσεις που είναι μέσα στο φυτό και διαλύονται στο διαλύτη, πηγαίνουν προς το διάλυμα. Η συγκέντρωση των ενώσεων μέσα και έξω από το φυτό, είναι η κινητήρια δύναμη βάση της οποίας οι ενώσεις πηγαίνουν προς το διάλυμα.

Η εκχύλιση ολοκληρώνεται ύστερα από μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα σωματίδια, ακανόνιστα στην αρχή, γίνονται στη συνέχεια στρογγυλεμένα και ακανόνιστα και τελικά γίνονται σφαιρικά όπως φαίνονται στην Εικόνα 26.



Εικόνα 26 - Αναπαράσταση ενός διογκωμένου φυτικού σωματιδίου που περιβάλλεται από στρώμα διαλύτη και του και τα προκύπτοντα είδη διάχυσης που συμβαίνουν

Οι διεργασίες που γίνονται είναι οι εξής:

1. Διάχυση τύπου I των φυτικών συστατικών προς το εξωτερικό στάσιμο στρώμα,
2. Διάχυση φυτικών συστατικών τύπου II κατευθείαν προς τον διαλύτη,
3. Διάχυση τύπου III από το στάσιμο στρώμα προς τον κύριο διαλύτη και
4. Έκπλυση ή ξέπλυμα του περιεχομένου των σπασμένων κυττάρων.

Αυτές οι διεργασίες ελέγχουν την εκχύλιση και επηρεάζονται από τους υπερήχους ενέργειας. Τα φυτικά σωματίδια είναι στερεά οπότε οδηγούν τη φυσαλίδα σε κατάρρευση, δημιουργούνται πίδακες υψηλής ταχύτητας, διαταράσσουν τα γύρω στρώματα και έτσι ενισχύεται η διάχυση τύπου I. Στη συνέχεια, ο διαλύτης μπαίνει γύρω από τα σωματίδια και επιτυγχάνεται η ισορροπία εκχύλισης και αυτό οδηγεί στη διάχυση τύπου II. Κατά τη διάρκεια της διάχυσης II απομακρύνεται συνέχεια άχρηστο φυτικό υλικό, μέχρι να φτάσουν στον όγκο του διαλύτη. Έτσι, εξαλείφεται η διάχυση τύπου III. Τέλος, η ασύμμετρη κατάρρευση φυσαλίδων, που προκαλεί τους πίδακες καθώς και ο κατακερματισμός των σωματιδίων του φυτικού υλικού οδηγεί στην έκπλυση. Οι φυσαλίδες που καταρρέουν παράγονται σε μεγάλο αριθμό με αποτέλεσμα η συνεχής αντικατάσταση στάσιμων στρωμάτων να είναι γρήγορη.

Όλα τα παραπάνω έχουν σαν αποτέλεσμα τη βελτίωση της μεταφοράς μάζας από το φυτικό υλικό στο διαλύτη και έτσι αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης.

Αξίζει να σημειωθεί, πως η UAE, εκτός από την ενισχυμένη διάχυση και την αυξημένη έκπλυση των κυττάρων, παρέχει και άλλα οφέλη όπως:

1. Παραπέρα κατακερματισμό ώστε να παράγονται μικρότερα σωματίδια που έχουν συνολικά μεγαλύτερη επιφάνεια
2. Κατά την ασύμμετρη κατάρρευση των φυσαλίδων οι κρούσεις του πίδακα, προκαλούν μεγαλύτερη και γρηγορότερη διείσδυση
3. Αν και οι πίδακες μπορούν να βοηθήσουν στην διεύρυνση των πόρων των φυτικών κυττάρων, εν τούτοις κατά την UAE υπάρχει μειονέκτημα στη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων, οπότε είναι δύσκολο να απομακρυνθούν με διήθηση.

Κατά τη χρήση της UAE, ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα είναι η αύξηση που παρατηρείται στην απόδοση των εκχυλισμένων ενώσεων. Έχει αποδειχθεί, όταν χρησιμοποιούνται υπέρηχοι σε θερμοκρασία δωματίου υπάρχει μεγάλη αύξηση της

απόδοσης συγκρινόμενη με την εκχύλιση σε τέτοια θερμοκρασία. Επιπλέον, η UAE παρέχει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στις εκχυλίσσεις. Ακόμα, η επεξεργασία με υπερήχους προκαλεί την γρήγορη απελευθέρωση των αιθέριων ελαίων σε μικρό χρονικό διάστημα. Η UAE δίνει καλύτερη απόδοση ακόμα και όταν το φυτικό υλικό έχει αλεσθεί. Τέλος, υπενθυμίζεται ότι η UAE παρέχει και άλλα πλεονεκτήματα όπως η βελτιωμένη μεταφορά μάζας, η διάσπαση των κυττάρων, η άλεση και η βελτιωμένη διείσδυση.

Οι βιομηχανίες φαρμάκων και διατροφολογικών προϊόντων, παρακολουθώντας τα πολλά πλεονεκτήματα της μεθόδου άρχισαν να ενδιαφέρονται για την υιοθέτησή της. Η συνεχιζόμενη ανάπτυξη αποδοτικότερων επεξεργαστών υπερήχων αλλά και η ιδιαίτερη γνώση που απέκτησαν για τη UAE οδηγούν τους επιστήμονες, να αναπτύξουν καλύτερο εξοπλισμό.

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Πειραματική Διαδικασία

2.1.1 Σκοπός διπλωματικής εργασίας

Η *Cannabis sativa* L. με κοινόχρηστη ονομασία κάνναβη είναι ένας φυτικός οργανισμός που παρουσιάζει πολλά ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά. Ακόμα στις μέρες μας είναι σχεδόν συνυφασμένο με τις ψυχοδραστικές ενώσεις που περιέχει και παραβλέπεται σε μεγάλο βαθμό ότι αποτελεί επίσης μια εξαιρετική πηγή φυτικών ινών και ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και χρήσιμο φαρμακευτικό φυτό, που περιέχει επίσης μη-ψυχοτρόπα κανναβινοειδή. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί πάνω από 480 δευτερογενείς μεταβολίτες γνωστές όχι μόνο για τις ψυχοδραστικές αλλά και για ένα εύρος άλλων φαρμακευτικών ιδιοτήτων. Ανάλογα με τη χρήση, η κάνναβη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μορφές αφού, για παράδειγμα, το στέλεχος κάνναβης χρησιμοποιείται ως πηγή ινών για τις βιομηχανίες κατασκευών και αυτοκινήτων, οι σπόροι κάνναβης χρησιμοποιούνται ως πηγή διατροφικού ελαίου και τα φύλλα ή οι ταξιανθίες της κάνναβης ως πηγή βιοδραστικών συστατικών με φαρμακευτική χρήση.

Αν και οι αυξανόμενες γνώσεις μας σχετικά με τα βασικά μοριακά συστατικά που ενεργοποιούν τις ποικίλες φυτοχημικές οδούς του φυτού, μπορούν να αυξήσουν περαιτέρω την παραγωγή συγκεκριμένων κανναβινοειδών, τερπενίων ή φαινολικών ενώσεων, εντούτοις απαιτείται περαιτέρω γνώση των μηχανισμών που εμπλέκονται στις βιοσυνθετικές οδούς.

Στην Ελλάδα, το νομοθετικό πλαίσιο για τη χρήση της κάνναβης ψηφίστηκε το 2017, οπότε και αποτελεί πλέον εγκεκριμένη φαρμακευτική ουσία η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή κάθε μορφής φαρμάκων που περιέχουν ποσότητα THC μικρότερη του 0,2%. Το 2018 εγκρίθηκε ενιαία η παραγωγή, κατοχή, μεταφορά, αποθήκευση και προμήθεια των πρώτων υλών και των ουσιών των ποικιλιών κάνναβης του είδους *Cannabis sativa* (THC<0,2%), ανοίγοντας έτσι ο δρόμος για την αξιοποίηση του φυτού αυτού.

Σκοπό της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της ποσοτικής διακύμανσης των κύριων κανναβινοειδών (CBD, CBDA, THC και THCA) σε διαφορετικά δείγματα σπόρων και ελαίων βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.) από διαφορετικές ποικιλίες.

Η εκχύλιση και η ανάλυση σπόρων βιομηχανικής κάνναβης καθώς και κανναβέλαιου έγινε από ποικιλίες της ελληνικής επικράτειας. Χρησιμοποιήθηκαν 10 ποικιλίες σπόρων κάνναβης και 9 ποικιλίες ελαίων. Στο κομμάτι της ανάλυσης δίνεται μεγαλύτερη έμφαση στα κανναβινοειδή και συγκεκριμένα στα κύρια κανναβινοειδή: CBD, CBDA, THC και THCA. Εξετάστηκαν δυο διαφορετικοί τρόποι εκχύλισης αυτή των υπερήχων (UAE) και εκείνη των μικροκυμάτων (MAE) ώστε να επιλεγθεί η καταλληλότερη, ενώ η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της UPLC.

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εντάσσεται στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο « ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ: ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ, ΜΕΤΑΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΥΨΗΛΗΣ ΠΡΟΣΤΙΘΕΜΕΝΗΣ ΑΞΙΑΣ» και πραγματοποιείται στο Εργαστήριο Αξιοποίησης Βιοδραστικών Φυτικών

Προϊόντων, του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων της Φαρμακευτικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ).

2.1.2 Προέλευση και ομαδοποίηση δειγμάτων

Τα δείγματα των σπόρων και των ελαίων ελήφθησαν από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αξίζει να σημειωθεί πως η συγκομιδή των σπόρων από τα φυτά για όλες τις ποικιλίες και για όλες τις συνθήκες λίπανσης και άρδευσης πραγματοποιήθηκε την ίδια χρονική περίοδο και πιο συγκεκριμένα το 2019. Έτσι, στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι ποικιλίες σπόρων κάνναβης που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Πίνακας 3 - Ποικιλίες σπόρων κάνναβης

USO	CARMAGNOLA
SANTHICA 27	FERIMON
FUTURA 75	ZUZANA
FINOLA	FEDORA
SANTHICA 70	KC DORA

Πιο συγκεκριμένα, για κάθε από τις παραπάνω ποικιλίες εφαρμόστηκαν τρεις τρόποι άρδευσης (Irrigation) που είναι οι εξής: I100, I50 και I75. Το I100 σημαίνει πως εφαρμόστηκε η μεγαλύτερη ποσότητα νερού, στο I50 εφαρμόστηκε η μικρότερη ποσότητα νερού ενώ στο I75 εφαρμόστηκε η ενδιάμεση ποσότητα νερού. Αξίζει να σημειωθεί πως από κάθε συνθήκη άρδευσης προέκυψαν τρία δείγματα δηλαδή I100 (I,II,III), I75 (I,II,III) και I50 (I,II,III). Επιπλέον, στα φυτά από κάθε ποικιλία εφαρμόστηκε λίπανση με διαφορετικό ποσοστό αζώτου δηλαδή επτά μονάδες αζώτου (7N), δεκατέσσερις μονάδες αζώτου (14N), ενώ υπήρχαν φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε λίπανση και αυτά τα φυτά αποτέλεσαν τους μάρτυρες (M). Και σε αυτή την περίπτωση υπήρχαν τρεις επαναλήψεις για κάθε ποικιλία μια από κάθε κατηγορία λίπανσης. Τα δείγματα 7N και 14N ομαδοποιήθηκαν και αναλύθηκαν μαζί για τις ανάγκες του πειραματισμού. Αναλυτικά, στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα δείγματα σπόρων βιομηχανικής κάνναβης και οι αντίστοιχες πληροφορίες άρδευσης και λίπανσης.

Πίνακας 4 - Δείγματα σπόρων βιομηχανικής κάνναβης

USO	SANTHICA 27	FUTURA 75	FINOLA	SANTHICA 70	CARMAGNOLA	FERIMON	ZUZANA	FEDORA	KC DORA
I100 M	I100 M	I100 M	I100 M	I100 M	I100 M	I100 M	I100 M	I100 M	I100 M
I100 N	I100 N	I100 N	I100 N	I100 N	I100 N	I100 N	I100 N	I100 N	I100 N
I75 M	I75 M	I75 M	-	I75 M	I75 M	I75 M	I75 M	I75 M	I75 M
I75 N	I75 N	I75 N	-	I75 N	I75 N	I75 N	I75 N	I75 N	I75 N
I50 M	I50 M	I50 M	-	I50 M	I50 M	I50 M	I50 M	I50 M	I50 M
I50 N	I50 N	I50 N	I50 N	I50 N	I50 N	I50 N	I50 N	I50 N	I50 N

Πρώτο βήμα της ανάλυσης αποτέλεσε ο θρυμματισμός και η ομογενοποίηση των σπόρων κάθε δείγματος σε ιγδίο έως ότου γίνουν σκόνη (Εικόνα 28,29). Όταν ολοκληρωθεί ο θρυμματισμός, το δείγμα ζυγίζεται με ακρίβεια και αποθηκεύεται ενώ το γουδί ξεπλένεται με μεθανόλη για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται για όλα τα δείγματα.



Εικόνα 27 - Σπόροι Κάνναβης



Εικόνα 28 - Κονιοποιημένοι σπόροι Κάνναβης

2.1.3 Εκχύλιση φυτικού υλικού (σπόρων)

Για να αποφασιστεί το πρωτόκολλο εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές. Αρχικά εξετάστηκαν δύο τρόποι εκχύλισης, αυτή με τη χρήση υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction, UAE) και εκείνη με τη χρήση μικροκυμάτων (Microwave Assisted Extraction, MAE). Βάσει βιβλιογραφίας, προτείνεται η χρήση 1 g αρχικού υλικού και για τις δύο τεχνικές και διαλύτης μεθανόλη (MeOH). Εναλλακτικά δοκιμάστηκε και η αιθανόλη (EtOH). Για την εκτέλεση των δοκιμών επιλέχθηκαν ένα δείγμα της ποικιλίας FUTURA 75 που ήταν διαθέσιμο σε μεγάλη ποσότητα στο εργαστήριο.

2.1.3.1 1^η ΔΟΚΙΜΗ

Αρχικά, ζυγίστηκαν με ακρίβεια 1,00 g σκόνης σπόρων σε φιαλίδιο Falcon και προστέθηκαν 20 mL μεθανόλη με σιφώνιο. Το δείγμα τοποθετήθηκε στη συσκευή υπερήχων για 30 min και θερμοκρασία 30 °C. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, ακολούθησε διήθηση με τη χρήση διηθητικού χαρτιού και συμπλήρωση διαλύτη ως τα 25 ml. Εν συνεχεία, 1ml από το εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο HPLC προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση με τη χρήση UPLC-DAD. Παράλληλα, από το αρχικό εκχύλισμα (μετά τη ρύθμιση του όγκου) παρασκευάστηκαν 2 επιπλέον δείγματα προς ανάλυση στα οποία χρησιμοποιήθηκε αραιώση με ακετονιτρίλιο (ACN). Συγκεκριμένα, εφαρμόστηκε df₅ όπου χρησιμοποιήθηκαν 200 μL εκχυλίσματος και 800 μL ACN και df_{2,5} όπου χρησιμοποιήθηκαν 400 μL εκχυλίσματος και 800 μL ACN.

Όσον αναφορά τη διαδικασία εκχύλισης με MAE ζυγίστηκε ακριβώς η ίδια ποσότητα αρχικού υλικού (1,00 g) και μαζί με 20 mL MeOH προστέθηκαν σε κλειστά δοχεία εκχύλισης (vessels) και έπειτα στα μικροκύματα. Ο χρόνος εκχύλισης ήταν 30 min, η θερμοκρασία 60 °C, η πίεση 10 bar και η ισχύς 1000 Watt. Μετά το πέρας της εκχύλισης ακολούθησε διήθηση. Όπως και στην περίπτωση της εκχύλισης UAE, παρασκευάστηκαν 3 δείγματα σε φιαλίδια HPLC για να αναλυθούν στη συνέχεια με τη χρήση UPLC-DAD.

2.1.3.2 2^η ΔΟΚΙΜΗ

Στη δεύτερη δοκιμή, εξετάστηκαν δύο διαφορετικές ποσότητες 1 g και 2 g κονιοποιημένων σπόρων χρησιμοποιώντας το ίδιο αρχικό υλικό (FUTURA 75) όπως και προηγούμενα, ώστε τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Η όλη διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με την δοκιμή 1. Όσον αναφορά τους διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε εκτός από τη μεθανόλη (MeOH) και η αιθανόλη (EtOH), ενώ πραγματοποιήθηκαν 2 επαναλήψεις ανά διαλύτη. Για την διαδικασία εκχύλισης με UAE οι ποσότητες από τη σκόνη κάνναβης ζυγίζονται με ακρίβεια με τη χρήση ζυγού και με διαλύτη τη μεθανόλη προκύπτουν οι εξής μετρήσεις όπως φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5 - Βάρη δειγμάτων 2ης δοκιμής εκχύλισης με UAE

ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗ	ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΣΠΟΡΟΥ (g)
F75-MeOH-1g	UAE	A	1.0076
	UAE	B	1.0074
F75-MeOH-2g	UAE	A	2.0066
	UAE	B	2.0068
F75-EtOH-1g	UAE	A	1.0019
	UAE	B	1.0072
F75-EtOH-2g	UAE	A	2.0021
	UAE	B	2.0079

Η κάθε ποσότητα προστίθεται σε ξεχωριστά Falcon. Όλα τα Falcon τοποθετούνται στη συσκευή UAE ώστε να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση. Ο χρόνος εκχύλισης είναι 30min ενώ η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 40 °C. Μετά το πέρας των 30 min τα Falcon αφαιρούνται από τους υπερήχους και γίνεται το φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων σε ογκομετρικές των 25 mL με τον τρόπο που αναφέρθηκε και στην πρώτη δοκιμή. Σε φιαλίδια HPLC μεταφέρεται ποσότητα εκχυλισμάτων για ανάλυση. Στο Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα βάρη των δειγμάτων που θα εκχυλιστούν με τη μέθοδο MAE.

Πίνακας 6 - Βάρη δειγμάτων 2ης δοκιμής με εκχύλιση MAE

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΣΠΟΡΟΥ (g)
F75-MeOH-1g	MAE	A	1.0003
	MAE	B	1.0008
F75-MeOH-2g	MAE	A	2.0066
	MAE	B	2.0050
F75-EtOH-1g	MAE	A	1.0030
	MAE	B	1.0040
F75-EtOH-2g	MAE	A	2.0051
	MAE	B	2.0023

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση της τεχνικής MAE, η εκχύλιση γίνεται ξεχωριστά για τους δύο διαλύτες μια φορά για τα δείγματα που έχουν ως διαλύτη τη MeOH και μια φορά για τα δείγματα που έχουν ως διαλύτη την EtOH. Και στις δύο περιπτώσεις οι συνθήκες της εκχύλισης είναι οι ίδιες (30 min, θερμοκρασία 30 °C, ισχύς 1000 Watt και πίεση 10 bar). Έτσι, όλα τα δείγματα θα έχουν αραιώση $df_{1,25}$ (800 μ L εκχυλίσματος και 200 μ L ACN). Μετά αναλύονται με UPLC για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών. Για τον προσδιορισμό της ξηράς ουσίας τα erpendorf τοποθετούνται στη συσκευή ξήρανσης ώστε να απομακρυνθεί μόνο ο διαλύτης και το νερό και να μείνει μόνο η ξηρά ουσία.

2.1.3.3 3^η ΔΟΚΙΜΗ

Στη τρίτη δοκιμή εξετάστηκαν διαφορετικές ποσότητες αρχικού υλικού και συγκεκριμένα 0,2 g, 0,5 g, 1 g και 1,5 g. Η ποικιλία που χρησιμοποιήθηκε ήταν πάλι η ίδια (FUTURA 75). Σε αυτή τη δοκιμή χρησιμοποιήθηκε μόνο η MeOH ως διαλύτης ενώ η μέθοδος εκχύλισης ήταν MAE (Πίνακας 7).

Πίνακας 7 - Βάρη δειγμάτων 3ης δοκιμής με εκχύλιση MAE

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΣΠΟΡΟΥ (g)
F75-MeOH-0.2g-	MAE	A	0.2006
	MAE	B	0.2014
F75-MeOH -0.5g	MAE	A	0.5003
	MAE	B	0.5042
F75-MeOH-1g	MAE	A	1.0051

F75-MeOH-1.5g	MAE	B	1.0073
	MAE	A	1.5033
	MAE	B	1.5076

Όλα τα δείγματα προστίθενται σε κατάλληλο περιέκτη (closed vessel) μαζί με 20 mL MeOH. Αυτά τοποθετούνται στα μικροκύματα για εκχύλιση. Οι συνθήκες είναι οι ίδιες που είναι και στις προηγούμενες δοκιμές και μετά γίνεται φιλτράρισμα των εκχυλισμάτων με τον τρόπο που αναφέρεται και στις προηγούμενες δοκιμές. Και σε αυτή την περίπτωση υπολογίζεται η ξηρά ουσία του κάθε δείγματος. Σε erppendorf προστίθεται 1,3 mL εκχυλίσματος. Οι συνθήκες ξήρανσης είναι οι εξής: αρχικά ο χρόνος είναι 2 h, θερμοκρασία 30 °C και Mode Vent V-AL. Μετά οι συνθήκες είναι οι εξής: χρόνος 2 h, θερμοκρασία 30 °C και Mode Vent V-AQ. Όλα τα φιαλίδια HPLC που ετοιμάζονται για την ανάλυση υφίστανται αραίωση df1,25. Αυτό σημαίνει ότι κάθε φιαλίδιο περιέχει 800 µL εκχυλίσματος και 200 µL ACN και μετά τοποθετούνται στη συσκευή UPLC.

2.1.3.4 4^η ΔΟΚΙΜΗ

Στην τελευταία δοκιμή εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές ποικιλίες που ήταν οι εξής: KC DORA 175 III 14N, FERIMON 175 II 7N και ZUZANANI75 III 14N. Οι ποσότητες σκόνης από σπόρους κάνναβης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,5 g και 1 g. Για κάθε ποικιλία υπάρχουν δύο επαναλήψεις. Όπως και στις προηγούμενες δοκιμές έτσι και εδώ δείγματα ζυγίζονται με ακρίβεια. Στο Πίνακα 8 φαίνονται οι μετρήσεις για κάθε ποικιλία και για κάθε επανάληψη.

Πίνακας 8 - Βάρη δειγμάτων 4ης δοκιμής εκχύλισης MAE

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΤΡΟΠΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	ΔΙΑΛΥΤΗΣ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΚΟΝΙΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΣΠΟΡΟΥ (g)
FERIMON (0.5g)	MAE	MeOH	A	0.5021
			B	0.5064
FERIMON (1g)	MAE	MeOH	A	1.0050
			B	1.0055
ZUZANA (0.5g)	MAE	MeOH	A	0.5014
			B	0.5044
ZUZANA (1g)	MAE	MeOH	A	1.0029
			B	1.0027
KC DORA (0.5 g)	MAE	MeOH	A	0.5028
			B	0.5023
KC DORA (1g)	MAE	MeOH	A	1.0023
			B	1.0045

Όλα τα δείγματα προστίθεται σε κατάλληλο περιέκτη (closed vessel). Όσον αναφορά τον τρόπο εκχύλισης στη δοκιμή αυτός γίνεται με τη χρήση των μικροκυμάτων (MAE). Έτσι, οι συνθήκες εκχύλισης είναι οι εξής: ο χρόνος κυμαίνεται στα 30 min, η θερμοκρασία είναι 60 °C, η ισχύς είναι 1000 Watt ενώ η πίεση είναι 10 bar. Μετά την ολοκλήρωση τα εκχυλίσματα φιλτράρονται με τον τόπο που αναφέρθηκαν και στις προηγούμενες δοκιμές. Σε φιαλίδια erppendorf προστίθεται 1,3 mL εκχύλισμα για ξήρανση ώστε να υπολογιστεί η ξηρά ουσία

από κάθε ποικιλία, επομένως η απόδοση σε εκχύλισμα. Οι συνθήκες εκχύλισης είναι οι εξής: αρχικά ο χρόνος είναι 2h, η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 30 °C ενώ το mode vent είναι το V-AL. Μετά το πέρας των 2h οι συνθήκες αλλάζουν και είναι οι εξής: ο χρόνος είναι 2h και 30min, θερμοκρασία παραμένει στους 30 °C ενώ το mode vent αλλάζει σε V-AQ. Στη συνέχεια σε φιαλίδια HPLC προστίθενται 1,3 mL εκχυλίσματος προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση τους με τη συσκευή UPLC.

Συγκεντρωτικά οι συνθήκες και τα αποτελέσματα κάθε δοκιμής φαίνονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9 - Συγκεντρωτικός Πίνακας Δοκιμών

Συνθήκες	ΔΟΚΙΜΕΣ					Τελικό Πείραμα
	Δοκιμή 1	Δοκιμή 2	Δοκιμή 3	Δοκιμή 4		
Μέθοδος Εκχύλισης	MAE / UAE	MAE / UAE	MAE	MAE		MAE
Ποσότητα Σκόνης Κάνναβης (gr)	1,0071	1 / 2	0,2 / 0,5 / 1 / 1,5	0,5 / 1		0,5
Διαλύτης (Μεθανόλη / Αιθανόλη)	MeOH	MeOH / EtOH	MeOH	MeOH		MeOH
Βαθμός Αραίωσης (df)	1 / 2,5 / 5	1,25	1	1		1
Ανάλυση	UPLC	UPLC	UPLC	UPLC		UPLC
Επαναλήψεις	1	2	2	2		2
Ποικιλία Κάνναβης	FUTURA75	FUTURA75	FUTURA75	FERMAN, ZUZANA, KC DORA		
	↓	↓	↓	↓		
Συνδιασμός Συνθηκών	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – CBD Total(%)					
	Δοκιμή 1	Δοκιμή 2	Δοκιμή 3	Δοκιμή 4		
MAE – df:5	0,0131					
MAE – df:2,5	0,0123					
MAE – df:1	0,0114					
UAE – df:5	0,0123					
UAE – df:2,5	0,0123					
UAE – df:1	0,0111					
UAE – MeOH – 1g		0,0155				
UAE – MeOH – 2g		0,0133				
UAE – EtOH – 1g		0,0130				

UAE – EtOH – 2g		0,0118				
MAE – MeOH – 1g		0,0164				
MAE – MeOH – 2g		0,0150				
MAE – EtOH – 1g		0,0131				
MAE – EtOH – 2g		0,0101				
MAE – MeOH – 0,2g			0,0149			
MAE – MeOH – 0,5g			0,0152			
MAE – MeOH – 1g			0,0143			
MAE – MeOH – 1,5g			0,0145			
FERMAN – 0,5g				0,0744		
FERMAN – 1g				0,0754		
ZUZANA – 0,5g				0,1017		
ZUZANA – 1g				0,0963		
KC DORA– 0,5g				0,0983		
KC DORA – 1g				0,0493		

2.1.3.5 Τελικό Πείραμα

Έτσι, με βάση τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν προκύπτει ότι το πρωτόκολλο που θα ακολουθηθεί για την διεξαγωγή του πειράματός μας βασίζεται στις συνθήκες της τελευταίας δοκιμής.

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του θρυμματισμού των σπόρων όλων των δειγμάτων στη συνέχεια πραγματοποιείται η ανάλυσή τους. Αρχικά θα πρέπει να ζυγιστεί η ποσότητα της σκόνης που θα χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση. Μετά από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν η ποσότητα που ορίστηκε είναι αυτή των 0,5 g (500 mg). Έτσι σε ένα ζυγό ακριβείας με 4 δεκαδικά ψηφία (Παράρτημα Α) τοποθετείται ένα αλουμινόχαρτο και ζυγίζονται 0,5 g (500 mg). Σημειώνεται η ακριβής ποσότητα του δείγματος.

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται όλα τα δείγματα με τα ακριβή βάρη τους.

Πίνακας 10 - Τελικά βάρη ανά ποικιλία

Ποικιλία δείγματος	Βάρος δείγματος (g)	Ποικιλία δείγματος	Βάρος δείγματος (g)
USO I75 N	0.5020 g	ZUZANA I50 M	0.5040 g
SAN 27 I75 M	0.5014 g	ZUZANA I50 N	0.5035 g
SAN 27 I75 N	0.5055 g	KC DORA I50 M	0.5020 g
FUT 75 I75 M	0.5012 g	KC DORA I50 N	0.5031 g
FUT 75 I75 N	0.5040 g	FUT 75 I50 M	0.5030 g
SAN 70 I75 M	0.5030 g	FUT 75 I50 N	0.5044 g
SAN 70 I75 N	0.5019 g	FEDORA I50 M	0.5039 g
CARMAG I75 M	0,5049 g	FEDORA I50 N	0.5044 g
CARAG I75 N	0.5022 g	USO I100 M	0.5040 g
FERIMON I75 M	0.5013 g	USO I100 N	0.5036 g
ZUZANA I75 M	0.5038 g	SAN 27 I100 M	0.5041 g
ZUZANA I75 N	0.5040 g	SAN 27 I100 N	0.5034 g
FEDORA I75 M	0.5038 g	FINOLA I100 M	0.5031 g
FEDORA I75 N	0,5024 g	FINOLA I100 N	0.5015 g
KC DORA I75 M	0.5033 g	ZUZANA I100 M	0.5043 g
KC DORA I75 N	0.5026 g	ZUZANA I100 N	0.5040 g
FERIMON I75 N	0.5041 g	KC DORA I100 M	0.5037 g
FINOLA I50 N	0.5043 g	KC DORA I100 N	0.5055 g
USO I50 M	0,5025 g	SAN 70 I100 M	0.5040 g
USO I50 N	0.5038 g	FEDORA I100 M	0.5039 g
SAN 27 I50 M	0.5025 g	FUT 75 I100 M	0.5039 g
SAN 27 I50 N	0.5040 g	FUT 75 I100 N	0.5034 g
CARMAG I50 M	0.5029 g	CARMAG I100 M	0.5029 g
CARMAG I50 N	0.5041 g	CARMAG I100 N	0.5037 g
SAN 70 I50 M	0.5042 g	FERIMON I100 M	0.5035 g
SAN 70 I50 N	0.5033 g	FERIMON I100 N	0.5036 g
FERIMON I50 M	0.5044 g	SAN 70 I100 N	0.5038 g

FERIMON I50 N	0.5023 g	FEDORA I100 N	0.5044 g
---------------	----------	---------------	----------

Αφού ζυγίστηκαν τα δείγματα στη συνέχεια προστίθενται σε δοχεία εκχύλισης μικροκυμάτων (closed vessel) (Παράρτημα Α).

Όσον αναφορά το διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί μέσα από δοκιμές που πραγματοποιηθήκαν αυτός είναι η μεθανόλη (MeOH). Έτσι, ογκομετρούνται 20 mL μεθανόλη και στη συνέχεια προστίθεται στο closed vessel. Χρησιμοποιείται ακόμη ένα closed vessel που περιέχει μόνο διαλύτη που είναι ο μάρτυρας. Ο τρόπος με τον οποίο θα γίνει η εκχύλιση των δειγμάτων είναι ο εξής: Microwave – Assisted Extraction (MAE). Τα closed vessel τοποθετούνται στη συσκευή των μικροκυμάτων (Παράρτημα Α).

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζεται το πρόγραμμα εκχύλισης με μικροκύματα.

Πίνακας 11 - Πρόγραμμα εκχύλισης με μικροκύματα (MAE)

Συνθήκες	Τιμές
Time (min)	40
Temperature (°C)	60
P (bar)	10
Ισχύς (Watt)	1000

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκχύλισης στην συνέχεια πραγματοποιείται η διήθηση των εκχυλισμάτων όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 30.



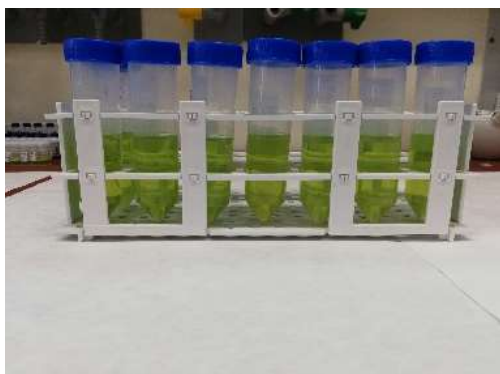
Εικόνα 29 - Διήθηση εκχυλίσματος με διηθητικό χαρτί

Έτσι, σε ογκομετρική φιάλη των 25 mL τοποθετείται ένα χωνί με διηθητικό χαρτί για να γίνει η εκχύλιση. Μετά γίνεται πλήρωση, με διαλύτη (MeOH) μέχρι τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης (Εικόνα 31).

Η φιάλη ανακινείται για 30 sec και μετά μεταφέρεται το περιεχόμενο της φιάλης σε φιαλίδια τύπου Falcon (Εικόνα 32) ώστε να πραγματοποιηθεί πιο εύκολα η λήψη του εκχυλίσματος και η μεταφορά του σε φιαλίδια erpendorf τον προσδιορισμό της απόδοσης του εκχυλίσματος και σε φιαλίδια HPLC για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών με τη μέθοδο UPLC – PDA.



Εικόνα 30 - Εκχύλισμα κάνναβης σε ογκομετρική φιάλη



Εικόνα 31 - Εκχύλισμα κάνναβης σε φιαλίδια Falcon

Εν συνεχεία, για τον προσδιορισμό της απόδοσης εκχυλίσματος σε φιαλίδια errendorf (Παράρτημα Α) σημειώνεται ο κωδικός του κάθε δείγματος και με τη βοήθεια ενός ζυγού ακριβείας με 5 δεκαδικά ψηφία ζυγίζεται το βάρος τους. Αξίζει να σημειωθεί, ότι πραγματοποιούνται δύο μετρήσεις και μετά λαμβάνεται ο μέσος όρος τους.

Στη συνέχεια, με μια πιπέτα ακριβείας των 1000 μL (Παράρτημα Α) από κάθε δείγμα λαμβάνεται 1,3 mL (1300 μL) και προστίθεται στο αντίστοιχο errendorf. Όταν ετοιμαστούν όλα τα errendorf αυτά τοποθετούνται σε συσκευή ξήρανσης (Παράρτημα Α) προκειμένου να εξατμιστεί ο διαλύτης και το νερό και να μένει μόνο η ξηρά ουσία.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζεται το πρώτο πρόγραμμα ξήρανσης ενώ στον Πίνακα 13 παρουσιάζεται το δεύτερο πρόγραμμα έτσι ώστε να επιτευχθεί η ξήρανση των δειγμάτων με σκοπό τον υπολογισμό της ξηράς ουσίας.

Πίνακας 12 - Πρώτο πρόγραμμα ξήρανσης

Συνθήκες	Τιμές
TIME	2 h
TEMPERATURE	30 °C
MODE VENT	V-AL

Πίνακας 13 - Δεύτερο πρόγραμμα ξήρανσης

Συνθήκες	Τιμές
TIME	2 h και 30 min
TEMPERATURE	30 °C
MODE VENT	V-AQ

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία τα erpendorf αφαιρούνται από τη συσκευή και στη συνέχεια ζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας προκειμένου να υπολογιστεί η ποσότητα της ξηράς ουσίας. Και σε αυτή την περίπτωση ζυγίζονται δύο φορές και καταγράφεται ο μέσος όρος.

Μετά θα πρέπει να γίνει ποσοτικός προσδιορισμός της ξηράς ουσίας για τον υπολογισμό της % ξηράς ουσίας για κάθε δείγμα.

Ο τύπος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της % ξηράς ουσίας είναι ο εξής:

$$W_{\text{ξηράς ουσίας ογκομετρική φιάλη}} = (V_{\text{ογκομετρική φιάλη}} * W_{\text{ξηράς ουσίας erpendorf}}) / V_{\text{erpendorf}}$$

$$\% \text{ ξηρά ουσία} = (W_{\text{ξηράς ουσίας ογκομετρική φιάλη}} * 100) / W_{\text{δείγματος}}$$

Εν συνεχεία, πραγματοποιείται η ανάλυση του εκχυλίσματος των δειγμάτων με τη μέθοδο της Υγρής χρωματογραφίας υπερύψηλης απόδοσης - UltraPerformance Liquid Chromatography ανάλυση (UPLC). Έτσι, με τη χρήση μιας πιπέτας Pasteur λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα εκχυλίσματος και προστίθεται σε vials (Εικόνα 34). Αξίζει να σημειωθεί, πως για κάθε δείγμα λαμβάνονται δύο vials.



Εικόνα 32 - Φιαλίδια HPLC για ανάλυση

Όλα τα vials τοποθετούνται στη συσκευή UPLC (Παράρτημα Α) έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάλυσή τους για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών και συγκεντρωμένα των CBD, CBDA, D9-THC και TCHA.

2.1.4 Εκχύλιση κανναβέλαιου

Όσον αναφορά το πειραματικό κομμάτι που αφορά τα έλαια κάνναβης τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν προέρχονται, όπως και οι σπόροι κάνναβης, από το Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι ποικιλίες που θα χρησιμοποιηθούν στο πείραμά μας ενώ στην Εικόνα 34 φαίνονται τα έλαια από τις διάφορες ποικιλίες Κάνναβης.

Πίνακας 14 - Ποικιλίες ελαίων Κάνναβης

FUTURA 75	SANTHICA 27	KC ZUZANA
USO 31	CARMAGNOLA	FERIMON
FINOLA	SANTHICA 70	FEDORA 17



Εικόνα 33 - Έλαια Κάνναβης

Για να αποφασιστεί το πρωτόκολλο που θα ακολουθηθεί για την διεξαγωγή του πειράματος πραγματοποιήθηκαν κάποιες δοκιμές που βασίστηκαν σε κάποιες βιβλιογραφικές πηγές.

Η πρώτη δοκιμή βασίστηκε στο στην εργασία των Madej et al (2020) «*A Simple, Fast, and Green Oil Sample Preparation Method for Determination of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol by HPLC-DAD*» (doi:10.3390/separations7040060).

Σε αυτή τη δοκιμή η ποικιλία ελαίου που θα χρησιμοποιηθεί είναι η FUTURA 75. Έτσι, ζυγίζεται με ακρίβεια η ποσότητα του ελαίου κάνναβης με τη χρήση ζυγού και προστίθεται σε φιαλίδιο errendorf. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η ποσότητα του ελαίου είναι 0,9121 g. Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί είναι το ακετονιτρίλιο. Έτσι, με τη βοήθεια μιας πιπέτας ακριβείας ογκομετρούνται 500 μ L ACN και προστίθεται στο errendorf. Στη συνέχεια, ανακινείται για 1 min με τη συσκευή Vortex. Όσο αναφορά τον τρόπο εκχύλισης σύμφωνα με το άρθρο πραγματοποιείται με τη μέθοδο των υπερήχων (UAE). Το errendorf τοποθετείται στη συσκευή UAE προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση του ελαίου. Η εκχύλιση πραγματοποιείται στους 30 °C ενώ ο χρόνος είναι 30min. Μετά αφαιρείται από τους υπερήχους και τοποθετείται στην κατάψυξη για 40min στους -20 °C. Εν συνεχεία, αφαιρείται και με τη βοήθεια μιας πιπέτας παραλαμβάνεται πάνω στρώση του εκχυλίσματος χωρίς την παραλαβή του ελαίου και προστίθεται σε ογκομετρική φιάλη των 5mL και μετά γίνεται πλήρωση με νερό μέχρι τη χαραγή της φιάλης και γίνεται ανακίνηση της φιάλης. Για την ανάλυση του ελαίου σε φιαλίδια HPLC προστίθεται 500 μ L από το διάλυμα και 500 μ L ACN

και το ανακινούμε είτε στη συσκευή vortex για 30 sec. Το φιαλίδιο τοποθετείται στη συσκευή UPLC για ανάλυση για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών.

Στη δεύτερη δοκιμή που βασίστηκε στο άρθρο Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils (<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.039>) η ποικιλία ελαίου που θα χρησιμοποιηθεί είναι και σε αυτή την περίπτωση η FUTURA 75. Η ποσότητα του ελαίου κάνναβης που θα χρησιμοποιηθεί είναι 1 mL.

Μέσα από βιβλιογραφικές πηγές προκύπτει ότι η πυκνότητα του ελαίου κάνναβης είναι $\rho_{\text{HSO}} = 0.9180 - 0.9270 \text{ g/mL}$. Οπότε προκύπτει ότι $1 \text{ mL hemp seed oil} = 0.9180 - 0.9270 \text{ g}$. Έτσι, σε ένα φιαλίδιο Falcon ζυγίζεται με ακρίβεια η ποσότητα του ελαίου που είναι 0,9121 g.

Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί είναι το ακετονιτρίλιο. Με τη βοήθεια ενός σιφωνίου ογκομετρούνται 10 mL ακετονιτρίλιο και προστίθεται στο φιαλίδιο και ανακινείται για 10sec είτε με το χέρι είτε με τη συσκευή vortex. Έπειτα, τοποθετείται στους υπερήχους για την εκχύλιση του ελαίου όπου ο χρόνος είναι 15 min και η θερμοκρασία είναι 30-35 °C. Όταν ολοκληρωθεί η εκχύλιση τοποθετείται στο καταψύκτη για 2h στους -20 °C.

Έπειτα, παραλαμβάνεται η επάνω στοιβάδα του εκχυλίσματος χωρίς την παραλαβή του ελαίου. Έτσι, σε ένα φιαλίδιο HPLC προστίθεται 1,5 mL από το εκχύλισμα χωρίς να έχει φιλτραριστεί και σε ένα άλλο προστίθεται 1,5 mL εκχυλίσματος το οποίο έχει φιλτραριστεί. Τα δύο φιαλίδια τοποθετούνται στη συσκευή UPLC για την ανάλυση του ελαίου και τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών.

Στην τελευταία δοκιμή που πραγματοποιήθηκε εξετάστηκαν τρεις ποικιλίες ελαίων κάνναβης που είναι οι εξής: FUTURA 75, USO 31 και FINOLA. Από κάθε έλαιό χρησιμοποιήθηκαν δύο δόσεις που είναι το 1 g και το 1,5 g. Και σε αυτή την περίπτωση η ποσότητα του ελαίου μετρήθηκε με ακρίβεια με ζυγό. Έτσι, για την ποικιλία FUTURA 75 η ποσότητα είναι: 1,0032 g και 1,5057 g, για την ποικιλία USO 31 η ποσότητα είναι: 0,994 g και 1,5040 g ενώ για την ποικιλία FINOLA η ποσότητα είναι 1,0073 g και 1,5056 g. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακετονιτρίλιο και με τη βοήθεια ενός σιφωνίου ογκομετρούνται 10mL και προστίθενται μέσα στο Falcon και ανακινείται για 10sec με τη συσκευή Vortex. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο UAE σε θερμοκρασία 35 °C και χρόνο 15 min. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στη κατάψυξη για 2 h στους -20 °C. Μετά με τη βοήθεια μια σύριγγα παραλαμβάνεται η πάνω στοιβάδα χωρίς την παραλαβή ελαίου και συγκεκριμένα 2,5 mL και μετά μέσω φίλτρου η ποσότητα μοιράζεται σε δύο φιαλίδια HPLC και στη συνέχεια τοποθετούνται στη συσκευή UPLC για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών.

Τελικά, μέσα από δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν βγαίνει το συμπέρασμα πως η κατάλληλη ποσότητα ελαίου που θα χρησιμοποιηθεί είναι το 1 g.

Στον πίνακα 15 φαίνονται συνοπτικά οι παραπάνω δοκιμές.

Πίνακας 15 - Συνοπτικός Πίνακας Πειραματικής Διαδικασίας Ελαίων

Συνθήκες	ΔΟΚΙΜΕΣ			→	Τελικό Πείραμα
	Δοκιμή 1	Δοκιμή 2	Δοκιμή 3		UAE
Μέθοδος Εκχύλισης	UAE	UAE	UAE		35 °C
Θερμοκρασία Εκχύλισης	30 °C	30-35 °C	35 °C		15min
Χρόνος Εκχύλισης	30min	15min	15min		1
Ποσότητα Ελαίου Κάνναβης (gr)	1	1	1 / 1,5		Acetonitrile (ACN)
Διαλύτης	Acetonitrile (ACN)	Acetonitrile (ACN)	Acetonitrile (ACN)		-20 °C
Θερμοκρασία Κατάψυξης	-20 °C	-20 °C	-20 °C		2h
Χρόνος Κατάψυξης	40min	2h	2h		UPLC
Ανάλυση	UPLC	UPLC	UPLC		NAI
Φιλτράρισμα	OXI	1 φιαλίδιο -> NAI 1 φιαλίδιο -> OXI	NAI		
Ποικιλία Κάνναβης	FUTURA75	FUTURA75	FUTURA75 USO 31 FINOLA		

Αξίζει να σημειωθεί πως για κάθε ποικιλία υπάρχουν δύο επαναλήψεις (Α και Β). Έτσι σε ζυγό ακριβείας τοποθετούνται τα φιαλίδια Falcon ζυγίζεται με ακρίβεια η ποσότητα του ελαίου για κάθε ποικιλία και επανάληψη όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 16 - Βάρη ελαίων Κάνναβης ανά ποικιλία

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΛΑΙΟΥ	ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ	ΒΑΡΟΣ ΕΛΑΙΟΥ (g)
FUTURA 75	A	1.0047
	B	1.0020
USO 31	A	1.0069
	B	1.0052
FINOLA	A	1.0024
	B	1.0070
FERIMON	A	1.0060
	B	1.0049
KC ZUZANA	A	1.0005
	B	1.0063
SANTHICA	A	1.0065
	B	1.0015
FEDORA 17	A	1.0073
	B	1.0005
CARMAGNOLA	A	1.0061
	B	0.9994
SANTHICA 70	A	1.0038
	B	1.0058

Όσον αναφορά το διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί αυτός είναι το ακετονιτρίλιο (Acetonitrile, ACN). Έτσι, με σιφωνίο ογκομετρούνται 10 mL ACN και προστίθεται σε κάθε φιαλίδιο Falcon. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια καλύπτονται με ταινία parafilm και πραγματοποιείται η ανακίνησή τους με τη συσκευή Vortex για 10 sec όπως φαίνεται στην Εικόνα 35 ενώ στην Εικόνα 36 φαίνονται τα δείγματα των ελαίων μετά την ανάδευση.



Εικόνα 34 - Ανάδευση με συσκευή Vortex



Εικόνα 35 - Έλαιο κάνναβης σε Falcon μετά την ανάδευση

Όσον αναφορά των τρόπου εκχύλισης, σε αντίθεση με τους σπόρους που χρησιμοποιήθηκαν τα μικροκύματα, σε αυτή την περίπτωση πραγματοποιείται με τη μέθοδο των υπερήχων (Ultrasound Assisted Extraction, UAE).

Όταν ολοκληρωθεί η ανακίνηση των φιαλιδίων τοποθετούνται στους υπερήχους για να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση των ελαίων. Ο χρόνος της εκχύλισης είναι 15 min ενώ η θερμοκρασία κυμαίνεται στους 35 °C. Όταν ολοκληρωθεί η εκχύλιση τα φιαλίδια τοποθετούνται στον καταψύκτη για 2 h στους -20 °C. Μετά τις 2h τα φιαλίδια αφαιρούνται λίγα-λίγα από τον καταψύκτη προκειμένου να γίνει παραλαβή του εκχυλίσματος με σκοπό την ανάλυσή του. Στην Εικόνα 37 φαίνονται τα δείγματα που προκύπτουν μετά την αφαίρεση από την κατάψυξη.



Εικόνα 36 - Εκχυλίσματα ελαίων κάνναβης μετά την κατάψυξη

Έτσι, με τη χρήση μιας σύριγγας (Παράρτημα Α) παραλαμβάνεται μια ποσότητα το εκχυλίσματος χωρίς όμως να γίνει συλλογή του ελαίου. Μετά προστίθεται στη σύριγγα ένα μικρό φίλτρο διαμέτρου 0,45 mm ώστε να γίνει φιλτράρισμά του (Παράρτημα Α).

Το φιλτραρισμένο εκχύλισμα μοιράζεται σε μικρά φιαλίδια vials. Αξίζει να σημειωθεί, πως για κάθε ποικιλία ελαίου και για κάθε επανάληψη χρησιμοποιούνται δύο Vials. Όλα τα Vials τοποθετούνται στη συσκευή UPLC για την ανάλυση των εκχυλισμάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των CBD και CBDA.

2.1.5 Ανάλυση του εκχυλίσματος με τεχνική υγρής χρωματογραφίας – Προσδιορισμός κανναβινοειδών με UPLC

Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός συστήματος Waters Acquity UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, USA), το οποίο περιλαμβάνει έναν απαερωτή κενού, μια αντλία διαλυτών, έναν θερμοστατούμενο αυτόματο δειγματολήπτη, καθώς και έναν ανιχνευτή φωτοδιόδων (PDA) (Παράρτημα Α). Το λογισμικό Waters Empower 3 χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του οργάνου μαζί με την απόκτηση και την επεξεργασία δεδομένων. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε σε στήλη Fortis Speed- Core C18-PFP (100 mm 2,1 mm i.d., 2,6 mm- Fortis Technologies, UK), ενώ η κινητή φάση αποτελούνταν από νερό (διαλύτης Α) και ACN (διαλύτης Β) που περιείχαν αμφότερα 0,1% (v/v) μυρμηκικό οξύ.

Η βαθμιδωτή έκλουση προγραμματίστηκε ως εξής: αρχικά το 60% Β διατηρήθηκε για 0,5 min, στη συνέχεια αυξήθηκε σε 68% σε 2,4 min, όπου διατηρήθηκε για 2,6 min. Στη συνέχεια, αυξήθηκε περαιτέρω σε 90% σε 2,3 min, διατηρήθηκε στο 90% για 1,2 min και τέλος επανήλθε σε 60% σε 0,1 min. Η σύνθεση της κινητής φάσης διατηρήθηκε στις αρχικές συνθήκες μέχρι τα 11 min για την εκ νέου εξισορρόπηση της στήλης. Η στήλη διατηρήθηκε στους 25 °C και ο αυτόματος δειγματολήπτης στους 10 °C. Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στα 0,4 mL/min και ο όγκος έγχυσης ήταν 3 μL. Ο ανιχνευτής PDA κατέγραφε στο εύρος 200-500 nm με ανάλυση 4,8 nm. Εκλεκτικά χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 210 και 225 nm για την CBD και το CBDA, αντίστοιχα.

Για σκοπούς ποσοτικοποίησης, πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση εξωτερικών προτύπων. Τα λαμβανόμενα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ποσοστό βάρους (% w/w) του αναλύτη που περιέχεται στο αρχικό δείγμα (*C. sativa*, dw). Η καθαρότητα των κορυφών των αναλυτών επιβεβαιώθηκε με σύγκριση του χρόνου κατακράτησης και του φάσματος UV με εκείνα των καθαρών προτύπων. Υπό αυτές τις συνθήκες, οι χρόνοι κατακράτησης των CBDA, CBD, Δ9-THC και THCA ήταν 2,27 , 2,69 , 4,05 και 4,71 λεπτά, αντίστοιχα.

Αφού συλλεχθούν τα αποτελέσματα από τα χρωματογραφήματα στην συνέχεια πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός των κανναβινοειδών. Οι τύποι που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της περιεκτικότητας στα δείγματα είναι οι εξής:

- Για CBD, CBDA, Δ9-THC και THCA

$$C_{matrix} (\% w/w) = \frac{C_{analyte} * V * df}{W * 10}$$

Όπου,

C_{analyte} = η συγκέντρωση του αναλύτη (μg mL⁻¹), όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς,

V = όγκος διαλύτη εκχύλισης μετά από τυχόν ρύθμιση του όγκου σε ογκ. Φιάλη (mL)

df (dilution factor) = βαθμός αραίωσης

W = Βάρος δείγματος σε mg

- Για CBD TOTAL και THC TOTAL

$$\%CBD\ TOTAL = \%CBD + (0.877 * \%CBDA)$$

$$\%THC\ TOTAL = \%THC + (0.877 * \%THCA)$$

Η έκφραση της περιεκτικότητας σε κανναβινοειδή μπορεί να γίνει και ως μg/g, με βάση τον παρακάτω τύπο.

Έκφραση περιεκτικότητας ως μg/g

- Προσδιορισμός CBD, CBDA (μg/g)

$$\frac{\mu g}{g} = (\%w/w * 10^4)$$

Όπου,

$\%w/w$ = η εκατοστιαία κατά βάρος περιεκτικότητα

Για τον προσδιορισμό της απόδοσης εκχυλίσματος (% w/w) διαιρέθηκε το βάρος του ξηρού εκχυλίσματος που παραλήφθηκε προς το βάρος του ξηρού αρχικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε.

2.2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Συζήτηση – Αποτελέσματα

2.2.1 Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης σπόρων και ελαίου - σύγκριση τεχνικών

Όσο αναφορά τους σπόρους κάνναβης για να επιλεγθεί η καταλληλότερη μέθοδος εκχύλισης, αρχικά έγινε σύγκριση δύο τεχνικών εκχύλισης που είναι αυτή των μικροκυμάτων (MAE) και εκείνη των υπερήχων (UAE) καθώς επίσης και οι διάφοροι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε μέθοδο.

Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν βασίστηκαν στο παρακάτω άρθρο “Effective determination of the principal non-psychoactive cannabinoids in fiber-type Cannabis sativa L. by UPLC-PDA following a comprehensive design and optimization of extraction methodology” (Tzimas et.al. 2021). Στο συγκεκριμένο άρθρο χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης μεταξύ των οποίων είναι αυτή των υπερήχων (UAE) και αυτή των μικροκυμάτων (MAE) και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε η αιθανόλη (EtOH) και υπήρχε μια αναλογία δείγματος διαλύτη 1:50 (w/v). Το συγκεκριμένο πείραμα πραγματοποιήθηκε με βάση την εμπειρία αλλά και τις συνθήκες του εργαστηρίου.

Με βάση την εμπειρία του εργαστηρίου για την εκχύλιση με UAE χρησιμοποιήθηκαν 400mg φυτικό υλικό (ταξιανθίες) και 20 mL EtOH που προστέθηκαν σε φιαλίδια Falcon. Το φιαλίδιο ανακινήθηκε με Vortex για 10sec και εν συνεχεία τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 30min στους 40 °C και μετά ακολούθησε φυγοκέντρηση. Μετά παραλήφθηκε το υπερκείμενο εκχύλισμα για την ανάλυση και τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών.

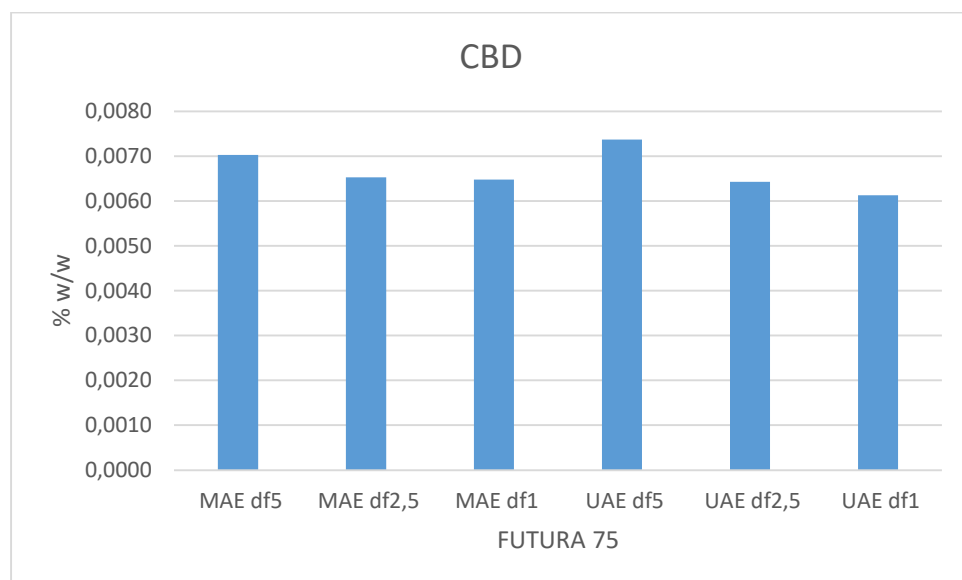
Για τη μέθοδο MAE χρησιμοποιήθηκαν 400mg φυτικού υλικού και 20mL EtOH και προστέθηκαν σε closed vessel. Οι συνθήκες εκχύλισης ήταν 30min, 40 °C και η ισχύς ήταν 80 Watt. Τα δείγματα εξισορροπήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η διήθηση σε ογκομετρικές φιάλες των 25mL και το διάλυμα που προέκυψε χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυσή του.

Βασιζόμενοι στο συγκεκριμένο άρθρο και στις μεθόδους εκχύλισης πραγματοποιήθηκαν κάποιες δοκιμές αλλάζοντας τις παραμέτρους και για τις δύο μεθόδους εκχύλισης για να διαπιστωθεί εάν αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν ή όχι τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών και σε τι βαθμό. Αξίζει να αναφερθεί πως στο άρθρο οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε ταξιανθίες του φυτού κάνναβης οι οποίες αποξηράθηκαν ώστε στη συνέχεια να γίνει ανάλυση στο φυτικό υλικό. Αντίθετα, στο πείραμά μας ως φυτικό υλικό δε θα χρησιμοποιηθούν οι ταξιανθίες του φυτού αλλά οι σπόροι οπότε είναι ένας ακόμα παράγοντας που διαφοροποιείται από το άρθρο και εξετάζεται το κατά πόσο τα διαφορετικά μέρη του φυτού έχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις κανναβινοειδών και πώς μπορεί η φύση του δείγματος να επηρεάζει την αποδοτικότητα των μεθόδων εκχύλισης.

Αρχικά, οι τεχνικές εκχύλισης που θα χρησιμοποιηθούν είναι η UAE και η MAE. Η ποσότητα κονιοποιημένου σπόρου που θα χρησιμοποιηθεί είναι το 1 g ενώ ο διαλύτης είναι η MeOH με όγκο 20 mL. Για τη μέθοδο εκχύλισης οι συνθήκες ήταν διαφορετικές από εκείνες του άρθρου με τη θερμοκρασία να κυμαίνεται στους 30 °C ενώ ο χρόνος ήταν 30 min. Για τη μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα οι συνθήκες ήταν τελείως διαφορετικές αφού η θερμοκρασία ήταν 60 °C, η ισχύς ήταν 1000 Watt, η πίεση 10 bar και ο χρόνος 40 min.

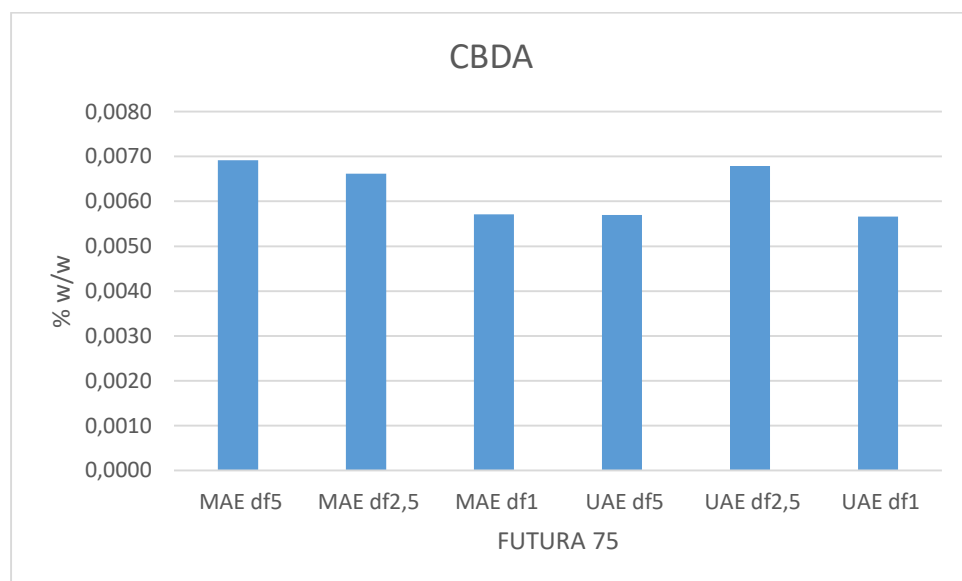
Σε αντίθεση με το άρθρο στη πρώτη δοκιμή υπήρχαν κάποια δείγματα τα οποία είχαν υποστεί αραίωση και κάποια άλλα όχι.

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 1 που απεικονίζει τη συγκέντρωση του CBD φαίνεται πως η συγκέντρωση του CBD είναι υψηλότερη στα δείγματα τα οποία έχουν υποστεί τη μεγαλύτερη αραίωση (df5) τόσο σε αυτά στα οποία η εκχύλιση έγινε με τη μέθοδο MAE όσο και σε αυτά που η εκχύλιση έγινε με τη μέθοδο UAE. Επιπλέον φαίνεται πως η συγκέντρωση CBD και για τις δύο μεθόδους εκχύλισης αρχίζει να μειώνεται όσο η αραίωση πηγαίνει προς το df1.



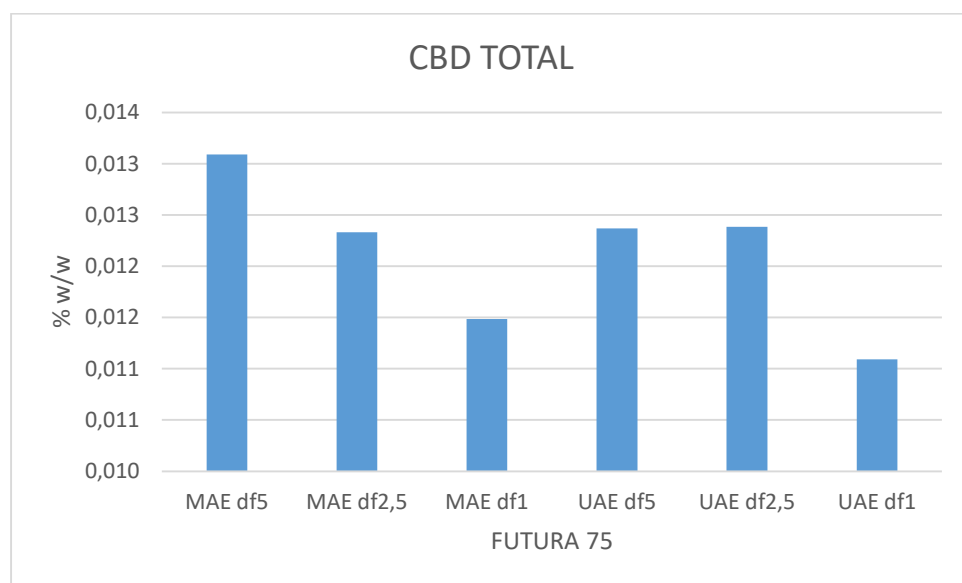
Διάγραμμα 1 - Συγκέντρωση CBD 1ης δοκιμής

Στο Διάγραμμα 2 απεικονίζεται η συγκέντρωση του CBDA. Παρατηρείται πως δεν διαφέρουν σημαντικά τα ποσοστά ανάμεσα στις δύο μεθόδους εκχύλισης. Λαμβάνοντας υπόψη τις τρεις διαφορετικές αραιώσεις όπως αναφέρεται στο πειραματικό μέρος παρατηρείται πως δεν υπάρχουν διαφορές στα ποσοστά CBDA στα δείγματά μας.



Διάγραμμα 2 - Συγκέντρωση CBDA 1ης δοκιμής

Στο Διάγραμμα 3 απεικονίζεται η ολική συγκέντρωση της CBD. Η απεικόνιση του διαγράμματος για την ολική CBD μοιάζει με εκείνη του διαγράμματος για τη CBD, όπως είναι αναμενόμενο. Φαίνεται, δηλαδή, πως η συγκέντρωση του CBD είναι υψηλότερη στα δείγματα τα οποία δεν έχουν υποστεί αραίωση τόσο σε αυτό το οποίο η εκχύλιση έγινε με τη μέθοδο MAE όσο και σε αυτό που η εκχύλιση έγινε με τη μέθοδο UAE. Επιπλέον φαίνεται πως η συγκέντρωση CBD και για τις δύο μεθόδους εκχύλισης αρχίζει να μειώνεται στα δείγματα που έχουν υποστεί αραίωση με τη μικρότερη συγκέντρωση να παρατηρείται στα δείγματα με αραίωση df_5 . Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η συγκέντρωση του CBDA επηρεάζει σε μικρό βαθμό τη συνολική συγκέντρωση ενώ ποιο πολύ επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του CBD.

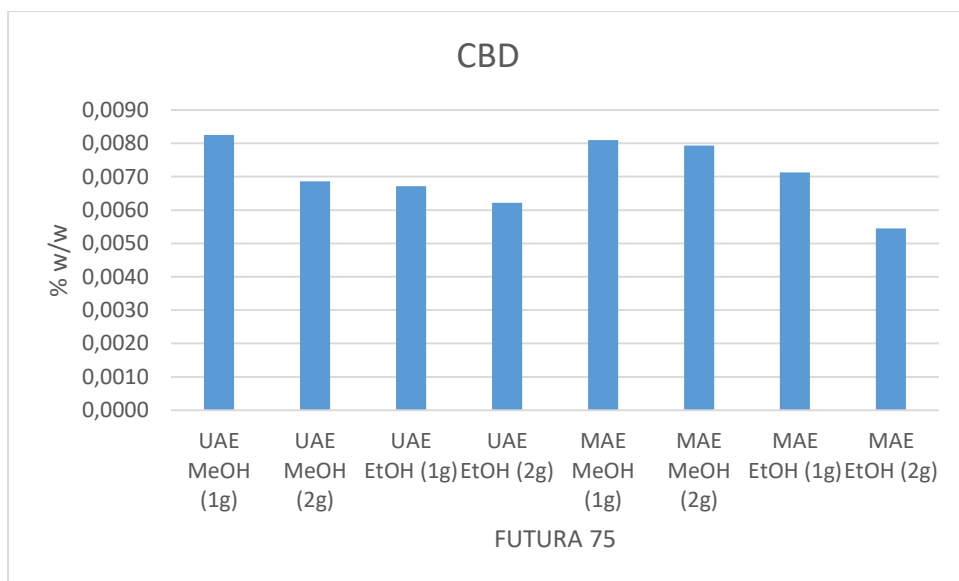


Διάγραμμα 3 - Συνολική συγκέντρωση CBD 1ης δοκιμής

Στην επόμενη δοκιμή (2) δηλαδή στη δεύτερη θα χρησιμοποιηθούν και οι δύο μέθοδοι εκχύλισης αλλά τα δείγματα που θα προκύψουν δεν θα υποστούν αραίωση.

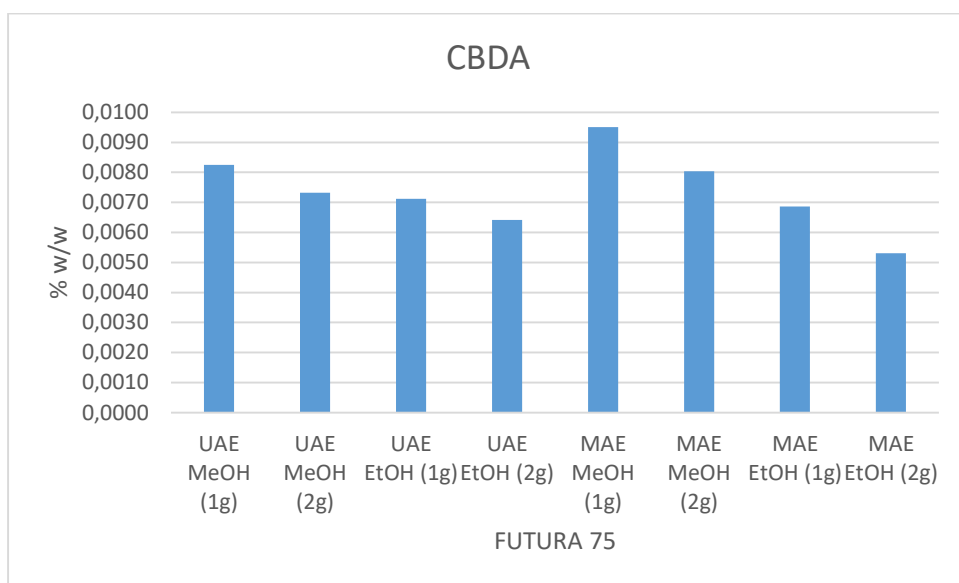
Επιπλέον, σε αυτή τη δοκιμή (2) εξετάστηκε εάν η χρήση διαφορετικού διαλύτη που είναι η MeOH και η EtOH καθώς και η διαφορετική δόση κονιοποιημένων σπόρων κάνναβης της ίδια ποικιλίας μπορεί να επηρεάζει τη συγκέντρωση τόσο του CBD όσο και του CBDA. Στο παρακάτω διάγραμμα απεικονίζεται η συγκέντρωση του CBD.

Από το διάγραμμα περιεκτικότητας της CBD (Διάγραμμα 4) φαίνεται, πως για δόση 1 g και χρησιμοποιώντας ως διαλύτη MeOH δε παρατηρείται διαφορά στη συγκέντρωση για τις δύο μεθόδους εκχύλισης ενώ για δόση 2 g και για τον ίδιο διαλύτη η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη στη μέθοδο εκχύλισης με μικροκύματα (MAE). Ακόμα, λίγο μεγαλύτερη είναι και η συγκέντρωση για το δείγμα στο οποίο η δόση ήταν 1 g, ο διαλύτης ήταν η EtOH και η εκχύλιση έγινε με μικροκύματα από το αντίστοιχο δείγμα που εκχυλίστηκε με υπερήχους. Το αντίθετο βέβαια σημαίνει στην περίπτωση που η δόση είναι 2 g, ο διαλύτης είναι η EtOH όπου το ποσοστό του CBD είναι λίγο υψηλότερο στη μέθοδο UAE από το αντίστοιχο ποσοστό στη μέθοδο MAE.



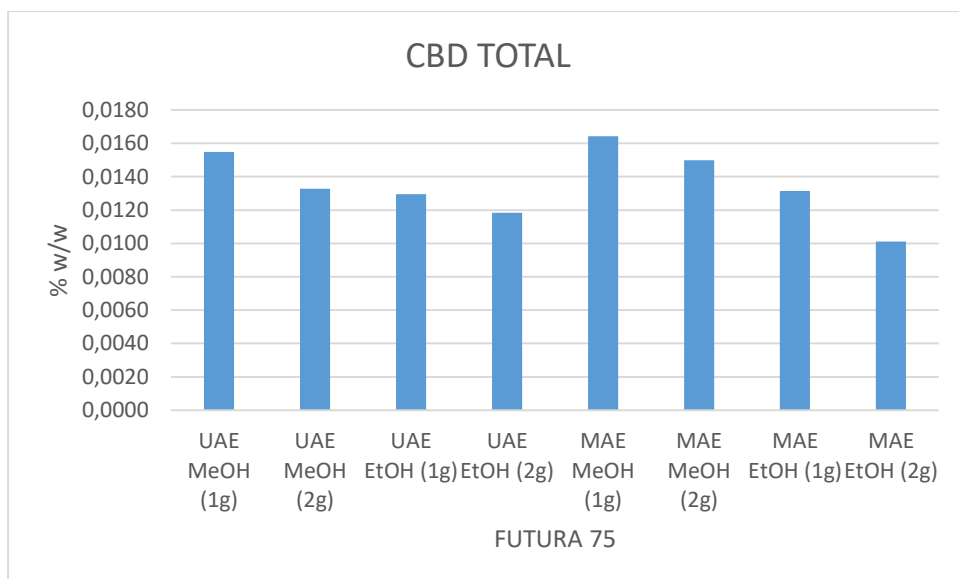
Διάγραμμα 4 - Συγκέντρωση CBD 2ης δοκιμής

Παρόμοια εικόνα παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 5 που απεικονίζεται η συγκέντρωση του CBDA. Παρατηρείται ότι στα δείγματα που εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο MAE και για τις δύο δόσεις σπόρων κάνναβης (1 g και 2 g) και έχοντας ως διαλύτη τη MeOH τα ποσοστά του CBDA είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα ποσοστά των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με τη χρήση υπερήχων. Αντίθετα, ελάχιστα μεγαλύτερα είναι τα ποσοστά στα δείγματα που εκχυλίστηκαν με υπερήχους έχοντας ως διαλύτη την EtOH και για τις δύο δόσεις (1 g και 2 g) από τα αντίστοιχα δείγματα που η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο MAE.



Διάγραμμα 5 - Συγκέντρωση CBDA 2ης δοκιμής

Η ίδια εικόνα παρουσιάζεται και στο διάγραμμα της συνολικής συγκέντρωσης του CBD (Διάγραμμα 6). Από το διάγραμμα φαίνεται πως δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στη συνολική συγκέντρωση ανάμεσα στις δύο μεθόδους εκχύλισης, στις δόσεις και στους διαλύτες.



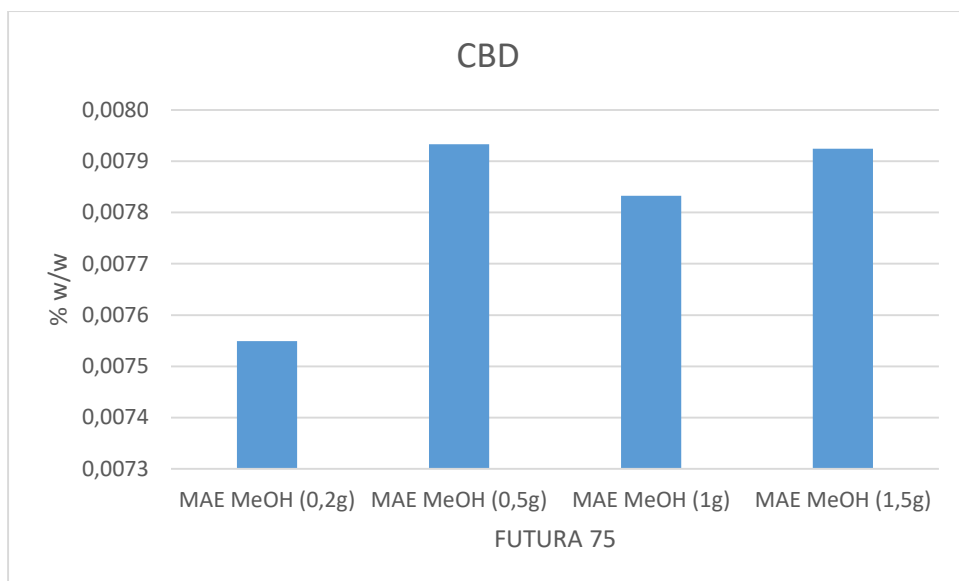
Διάγραμμα 6 - Συνολική συγκέντρωση 2ης δοκιμής

Οπότε από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι τα δείγματα που είχαν ως διαλύτη τη MeOH είχαν υψηλότερη συγκέντρωση CBD, CBDA και CBD TOTAL σε σύγκριση με τα δείγματα που είχαν ως διαλύτη την EtOH καθώς επίσης και στη μέθοδο εκχύλισης MAE σε σύγκριση με την αντίστοιχη μέθοδο UAE.

Επομένως, στην επόμενη δοκιμή (3) θα χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης μόνο η MeOH και ως μέθοδος εκχύλισης η MAE. Ακόμα, σε αυτή τη δοκιμή εξετάστηκαν τέσσερις διαφορετικές δόσεις κονιοποιημένων σπόρων κάνναβης 0,2 g, 0,5 g, 1 g και 1,5 g χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά ως διαλύτημόνη μεθανόλη (MeOH) και σαν μέθοδο εκχύλισης τα μικροκύματα (MAE). Αυτό γίνεται με σκοπό να εξεταστεί εάν η δόση επηρεάζει τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών και ποια από τις τέσσερις είναι η καλύτερη.

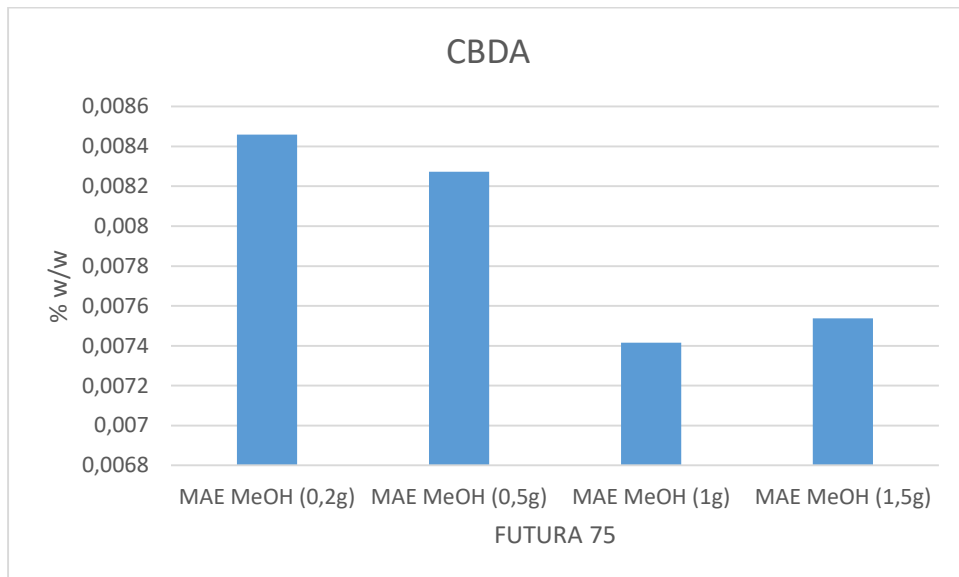
Από το Διάγραμμα 7 φαίνεται πως η δόση των 0,5 g παρουσίασε την μεγαλύτερη συγκέντρωση όσο αναφορά το CBD με ασήμαντη διαφορά από εκείνη των 1,5 g.

Υψηλά ποσοστά CBD είχαν και τα δείγματα στα οποία η ποσότητα κονιοποιημένων σπόρων κάνναβης ήταν το 1 g. Αντιθέτως, παρατηρείται πως η δόση των 0,2 g παρουσίασε την μικρότερη συγκέντρωση CBD.



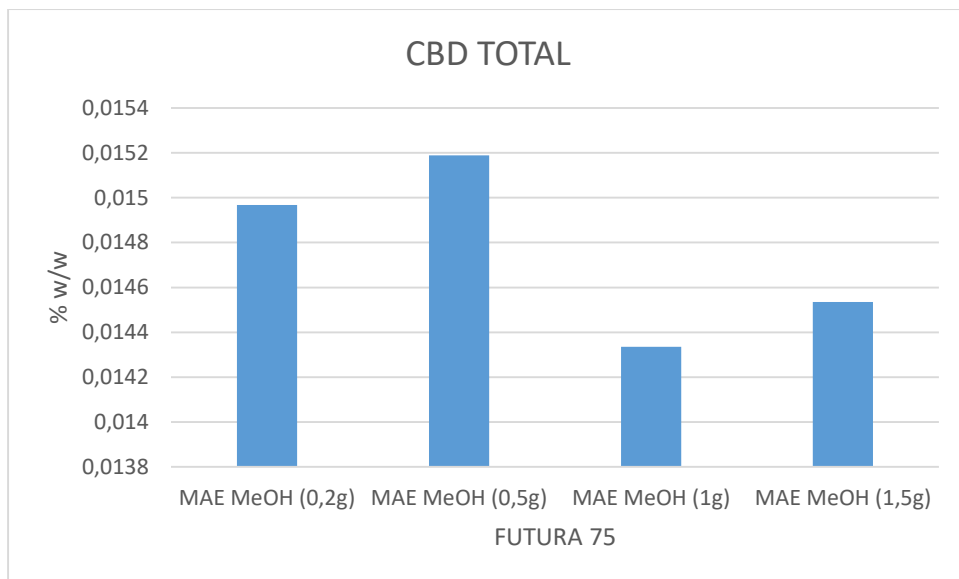
Διάγραμμα 7 - Συγκέντρωση CBD 3ης δοκιμής

Όσον αναφορά τη συγκέντρωση του CBDA η εικόνα είναι διαφορετική από εκείνη του CBD. Από το Διάγραμμα 8 παρατηρείται πως υψηλή συγκέντρωση παρουσιάζονται στα δείγματα στα οποία η ποσότητα της σκόνης κάνναβης ήταν 0,2 g και 0,5 g με λίγο μεγαλύτερο ποσοστό σε αυτή των 0,2 g σε σύγκριση με αυτή των 0,5 g. Αντίθετα, στη δόση του 1 g προκύπτει ότι τα δείγματα έχουν τη μικρότερη συγκέντρωση CBDA.



Διάγραμμα 8 - Συγκέντρωση CBDA 3ης δοκιμής

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 9) απεικονίζει τη συνολική συγκέντρωση του CBD (CBD TOTAL) που είναι αποτέλεσμα τη επίδρασης τόσο του CBD όσο και του CBDA. Έτσι, προκύπτει ότι τα δείγματα με δόση 0,5 g παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με τις υπόλοιπες δόσεις σκόνης από σπόρους κάνναβης. Η μικρότερη συγκέντρωση παρατηρείται στην περίπτωση του 1 g.

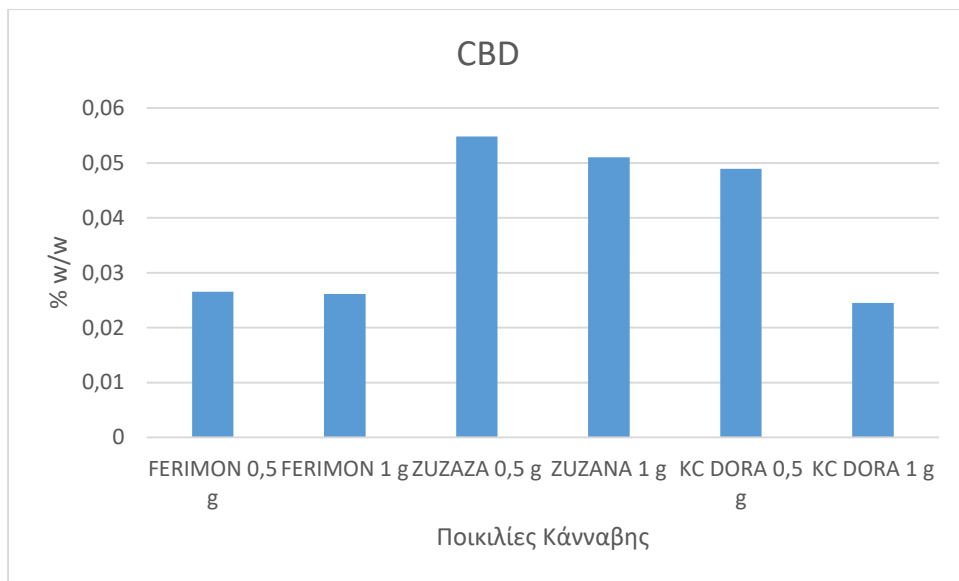


Διάγραμμα 9 - Συνολική συγκέντρωση CBD 3ης δοκιμής

Με βάση τα αποτελέσματα της τρίτης δοκιμής βγαίνει το συμπέρασμα πως η δόση σκόνη κάνναβης που θα χρησιμοποιηθεί για τη διεξαγωγή της τέταρτης δοκιμής είναι αυτή των 0,5 g και 1 g. Η μέθοδος εκχύλισης για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών είναι αυτή των μικροκυμάτων (MAE) ενώ ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί είναι η μεθανόλη (MeOH).

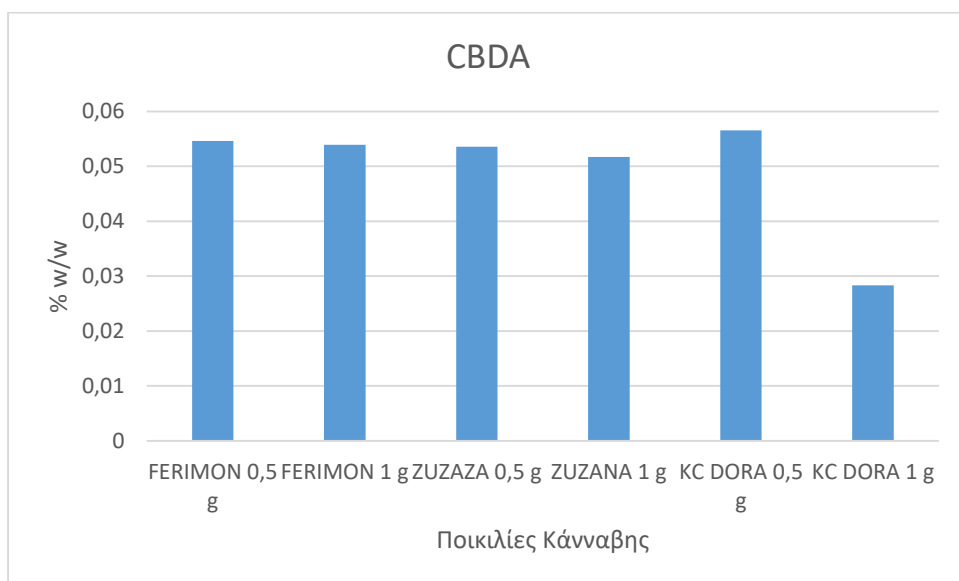
Επιπλέον, στην επόμενη δοκιμή (4) εξετάστηκαν και τρεις διαφορετικές ποικιλίες που είναι η FERIMON, ZUZANA και KC DORA. Αυτό γίνεται με σκοπό να διαπιστωθεί το πως μπορεί να μεταβληθεί η συγκέντρωση των κανναβινοειδών ανάμεσα στις ποικιλίες διατηρώντας σταθερές τις υπόλοιπες συνθήκες που είναι η ποσότητα των κονιοποιημένων σπόρων, το είδος και ο όγκος του διαλύτη καθώς επίσης και οι παράμετροι της εκχύλισης με MAE.

Σε αυτή την τέταρτη δοκιμή εξετάστηκαν τρεις διαφορετικές ποικιλίες που είναι οι εξής: FERIMON, ZUZANA και KC DORA. Παρατηρώντας το διάγραμμα της συγκέντρωσης του CBD (Διάγραμμα 10) βγαίνει το συμπέρασμα πως και στις τρεις ποικιλίες σπόρων κάνναβης καλύτερα ποσοστά ως προς τη συγκέντρωση του CBD παρουσιάζουν τα δείγματα στα οποία η δόση από τους σπόρους της κάνναβης ήταν 0,5 g σε σύγκριση με αυτή του 1 g. Μικρή είναι η διαφορά για τις ποικιλίες FERIMON και ZUZANA ενώ η διαφορά είναι εμφανώς μεγαλύτερη για την ποικιλία KC DORA.



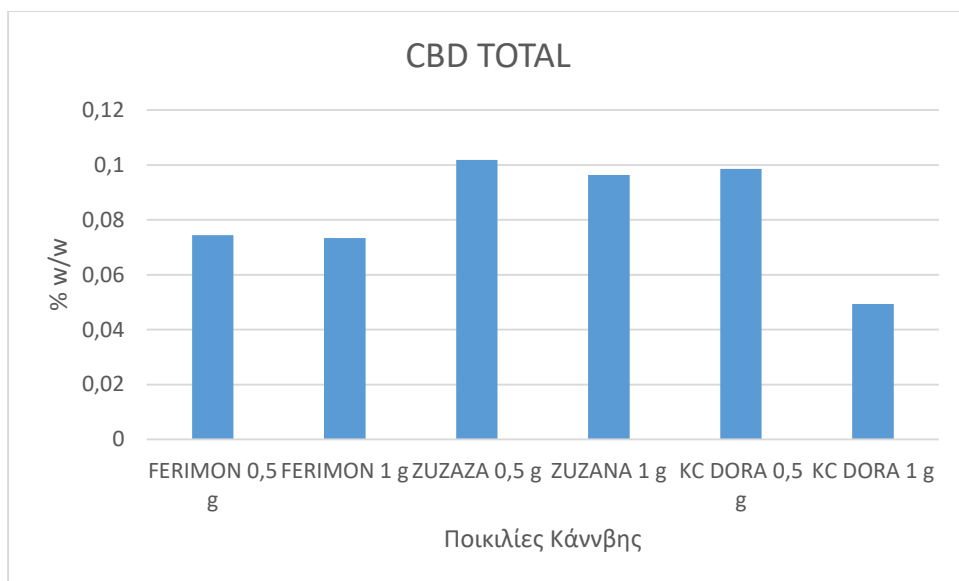
Διάγραμμα 10 - Συγκέντρωση CBD 4ης δοκιμής

Όσο αναφορά τη συγκέντρωση του CBDA από το Διάγραμμα 11, φαίνεται να μην προκύπτουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο δόσεις (0,5 g και 1 g) για τις ποικιλίες FERIMON και ZUZANA ενώ για την ποικιλία KC DORA παρατηρείται μεγαλύτερη συγκέντρωση στη δόση του 0,5 g σε σύγκριση με εκείνη του 1 g που είναι εμφανώς πολύ μικρότερη.



Διάγραμμα 11 - Συγκέντρωση CBDA 4ης δοκιμής

Όσο αναφορά την ολική CBD (Διάγραμμα 12), φαίνεται πως η ολική CBD συγκέντρωση και για τις τρεις ποικιλίες είναι μεγαλύτερη έστω και με ασήμαντη διαφορά στη δόση του 0,5 g σε σύγκριση του 1 g με εξαίρεση την ποικιλία KC DORA όπου η διαφορά είναι εμφανώς σημαντική.



Διάγραμμα 12 - Συνολική συγκέντρωση CBD 4ης δοκιμής

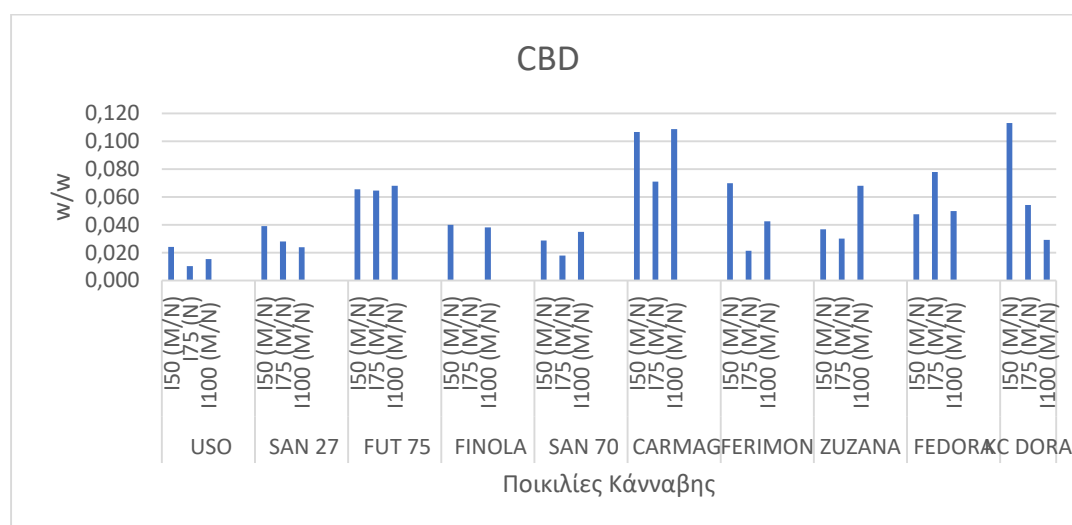
Από όλες τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν για τις διαφορετικές δόσεις σπόρων κάνναβης και για τους δύο διαλύτες (MeOH και EtOH) που χρησιμοποιήθηκαν αλλά και για τις δύο τεχνικές εκχύλισης (UAE και MAE) βγήκε το συμπέρασμα πως καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν για τη δόση 0,5 g με διαλύτη τη MeOH και με εκχύλισης τα μικροκύματα (MAE). Οπότε αυτές οι παράμετροι επιλέχθηκαν για το τελικό πείραμά.

2.2.2 Σύγκριση της συγκέντρωσης των CBD, CBDA, THC, THCA και απόδοσης εκχυλίσματος μεταξύ των ποικιλιών στους σπόρους της *C. sativa*

Σε όλα τα διαγράμματα για όλα τα κανναβινοειδή ο κάθετος άξονα απεικονίζει τη συγκέντρωση του κανναβινοειδούς για κάθε ποικιλία σε (% w/w) ενώ ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τις ποικιλίες όπου για κάθε ποικιλία παρουσιάζεται η άρδευση (irrigation). Οπότε εξετάστηκε εάν και το κατά πόσο η άρδευση ανεξαρτήτως εάν εφαρμόστηκε λίπανση ή δεν εφαρμόστηκε λίπανση στις ποικιλίες που μελετήθηκαν επηρεάζει τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών.

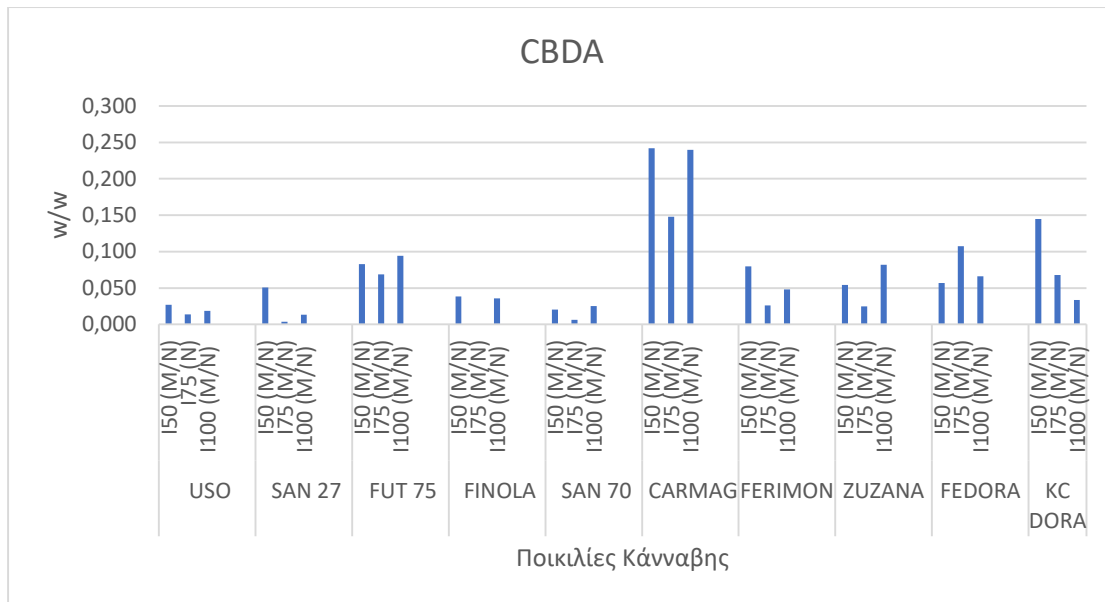
Έτσι, στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 13) που απεικονίζει τη συγκέντρωση της CBD παρατηρείται πως όσον αφορά τη συγκέντρωση της CBD σε σχέση με τη ελλειμματική άρδευση στο 50% (I50), η ποικιλία KC DORA παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση με ασήμαντη διαφορά από εκείνη της ποικιλίας CARMAGNOLA ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση παρουσιάζει η ποικιλία USO. Στη συνέχεια, όσο αναφορά για τη συγκέντρωση με τον τρόπο άρδευσης I75 (ελλειμματική άρδευση στο 75% των υδατικών αναγκών της καλλιέργειας) παρατηρείται ότι υψηλότερη συγκέντρωση παρουσιάζει η ποικιλία FEDORA ενώ τη μικρότερη συγκέντρωση πάλι η ποικιλία USO. Τέλος, για την πλήρη άρδευση (I100) παρατηρείται πως η ποικιλία CARMAGNOLA παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση CBD ενώ και σε αυτή την περίπτωση η ποικιλία USO παρουσιάζει τη μικρότερη συγκέντρωση. Εάν, κοιτάξει κανείς ξεχωριστά τη κάθε ποικιλία θα συμπεράνει πως ο τρόπος άρδευσης (I50, I75 και I100) δεν επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση του CBD με ελάχιστες περιπτώσεις όπως

είναι οι ποικιλίες CARAMAGNOLA, FERIMON, ZUZANA, FEDORA και KC DORA. Οπότε, βγαίνει το πως για ορισμένες ποικιλίες είναι ευεργετική η μικρότερη άρδευση (I50) για να υπάρξει μεγαλύτερη συγκέντρωση CBD, σε άλλες ποικιλίες χρειάζεται να υπάρχει μεσαία άρδευση (I75) ενώ σε κάποιες άλλες για να επιτευχθεί η υψηλή συγκέντρωση του CBD απαιτείται η λήψη μεγαλύτερης ποσότητας νερού στα φυτά (πλήρης άρδευση). Βέβαια, η συγκέντρωση σε σχέση με τον τρόπο άρδευσης μπορεί να επηρεαστεί και από τη δυνατότητα που έχει το φυτό στο να απορροφήσει το νερό που μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως στο να μην έχει καλό αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, το έδαφος να είναι αμμώδες οπότε να μην μπορεί να συγκρατεί το νερό κ.ά. Μπορεί να γίνει παραδείγματος χάριν μεγάλη λήψη νερού (I100) αλλά το φυτό να μην μπορεί να απορροφήσει όλη την ποσότητα και αυτό να έχει ως αποτέλεσμα να επηρεάζει τη συγκέντρωση της CBD αναλόγως με την ποικιλία.



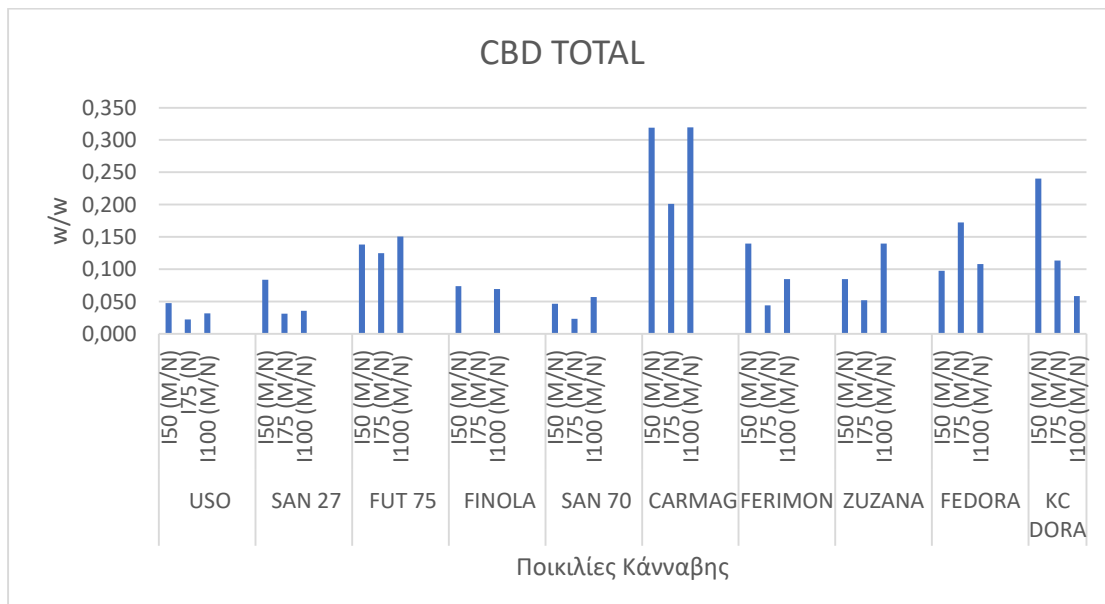
Διάγραμμα 13 - Συγκέντρωση CBD ανά ποικιλία και άρδευση

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 14) παρουσιάζεται η συγκέντρωση του CBDA. Από το διάγραμμα φαίνεται πως η συγκέντρωση του CBDA είναι υψηλότερη από εκείνη του CBD. Παρατηρώντας τα δύο διαγράμματα αυτό της CBD και του CBDA φαίνεται πως για κάθε ποικιλία οι συγκεντρώσεις παρουσιάζουν την ίδια τάση ανάλογα με τον τρόπο άρδευσης. Και σε αυτή την περίπτωση η ποικιλία CARMAGNOLA παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και για τους τρεις τρόπους άρδευσης σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες ενώ η ποικιλία USO παρουσιάζει τη χαμηλότερη συγκέντρωση CBDA και για τους τρεις τρόπους άρδευσης. Όποτε συμπεραίνει κανείς πως και εδώ η άρδευση μπορεί να επηρεάζει - σε άλλες ποικιλίες σημαντικά και σε άλλες όχι τόσο σημαντικά - τη συγκέντρωση του CBDA.



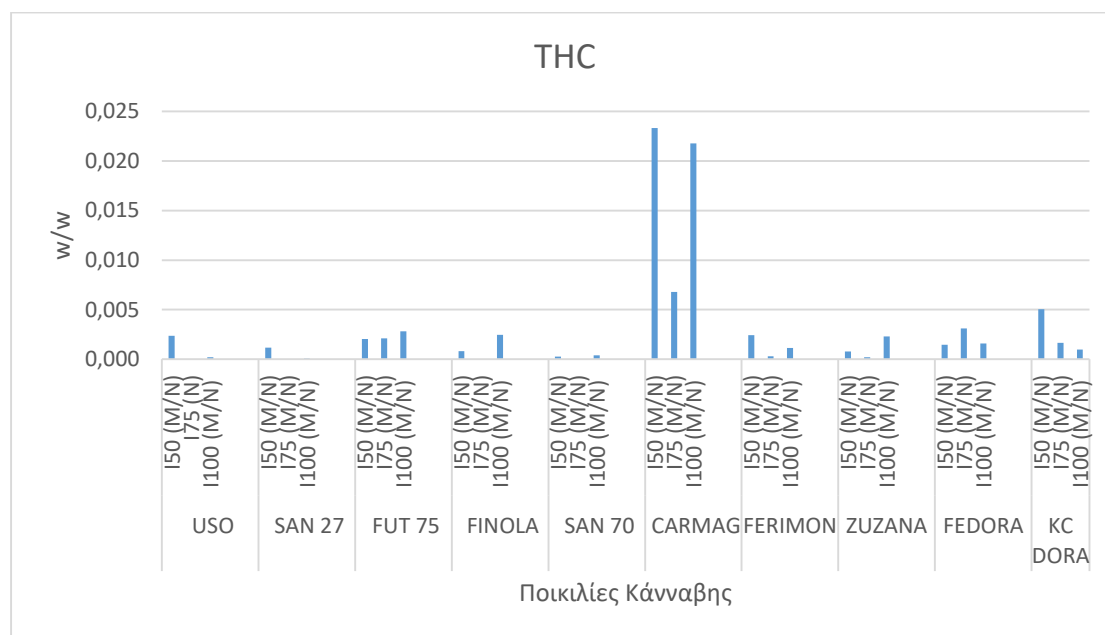
Διάγραμμα 14 - Συγκέντρωση CBDA ανά ποικιλία και άρδευση

Στο Διάγραμμα 15 φαίνεται η συνολική συγκέντρωση του CBD που είναι επίδραση και του CBD και του CBDA. Όπως και στα άλλα δύο έτσι και σε αυτό το διάγραμμα φαίνεται πως επικρατεί η ίδια τάση ανάλογα με τον τρόπο άρδευσης. Και εδώ φαίνεται πως η ποικιλία CARMAGNOLA έχει την υψηλότερη συνολική συγκέντρωση CBD και στους τρεις τρόπους άρδευσης (150,175,1100) ενώ τη χαμηλότερη συνολική συγκέντρωση παρουσιάζει η ποικιλία USO.



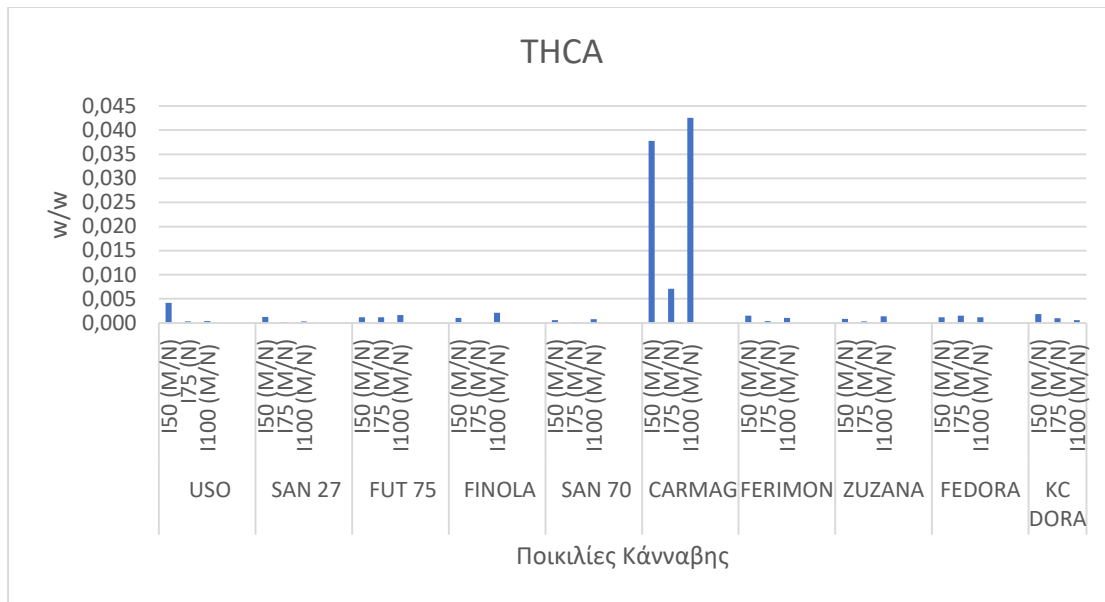
Διάγραμμα 15 - Συνολική συγκέντρωση CBD ανά ποικιλία και άρδευση

Όσο αναφορά την περιεκτικότητα σε THC η εικόνα είναι τελείως διαφορετική από εκείνη για τη CBD. Από το παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 16) φαίνεται ότι μόνο η ποικιλία CARMAGNOLA παρουσίασε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις THC και στους τρεις τρόπους άρδευσης ενώ στις υπόλοιπες ποικιλίες οι συγκεντρώσεις της THC ήταν ελάχιστες έως μηδαμινές και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν ανιχνεύτηκε καθόλου ποσότητα THC. Άρα βγαίνει γενικά το συμπέρασμα πως η άρδευση δεν επηρεάζει ιδιαίτερα τη συγκέντρωση THC.



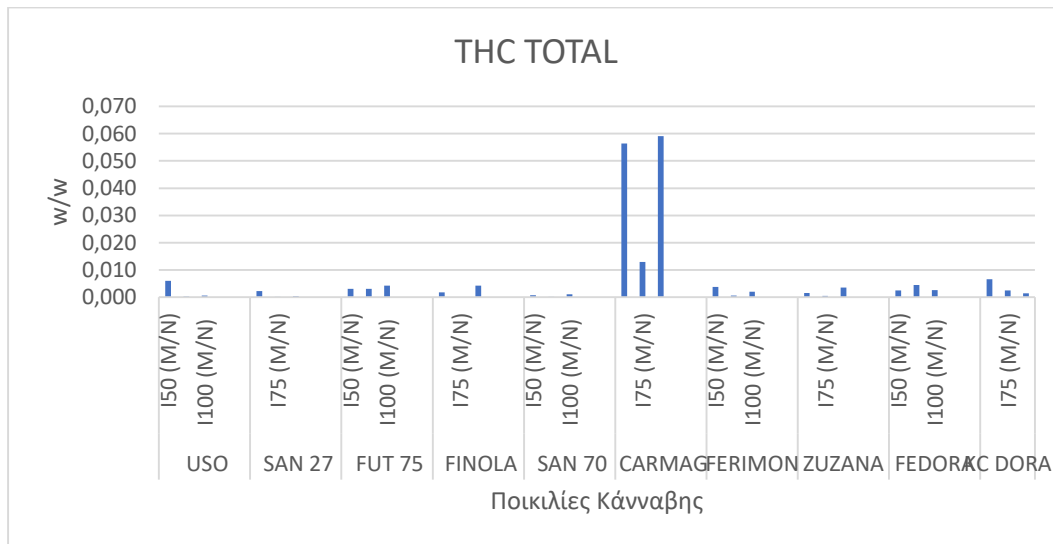
Διάγραμμα 16 - Συγκέντρωση THC ανά ποικιλία και άρδευση

Η εικόνα για την συγκέντρωση του THCA (Διάγραμμα 17) είναι παρόμοια με εκείνη της THC. Και σε αυτή την περίπτωση μόνο η ποικιλία CARMAGNOLA παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση THCA σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες. Για την ποικιλία CARMAGNOLA παρατηρείται πως υψηλότερη συγκέντρωση είχαν τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε άρδευση 1100, ακολουθούν τα δείγματα με άρδευση 150 ενώ χαμηλότερη είχαν τα δείγματα στα οποία εφαρμόστηκε άρδευση 175. Όσο αναφορά τις άλλες ποικιλίες από το διάγραμμα φαίνεται πως η συγκέντρωση της THCA είναι ελάχιστη έως μηδαμινή στους διαφορετικούς τρόπους άρδευσης.



Διάγραμμα 17 - Συγκέντρωση THCA ανά ποικιλία και άρδευση

Παρακάτω απεικονίζεται το διάγραμμα για την περιεκτικότητα σε ολική THC (Διάγραμμα 18) όπου και σε αυτή την περίπτωση η ποικιλία CARMAGNOLA παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση THC TOTAL σε σχέση με τις υπόλοιπες ποικιλίες και πιο συγκεκριμένα στο I100 μετά ακολουθεί το I50 ενώ χαμηλότερη παρουσιάζεται στα δείγματα με άρδευση I75.



Διάγραμμα 18 - Συνολική συγκέντρωση THC ανά ποικιλία και άρδευση

Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνει κανείς ότι η ποικιλία που είχε υψηλότερη συγκέντρωση κανναβινοειδών είναι αυτή της CARMAGNOLA σε σύγκριση με τις υπόλοιπες. Αξίζει να σημειωθεί, πως ο τρόπος άρδευσης επηρέασε τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών αφού η ποσότητα ήταν υψηλή στους σπόρους κάνναβης που συλλέχθηκαν από φυτά στα οποία εφαρμόστηκε άρδευση I50 και I100 με ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους ενώ ήταν

χαμηλότερη στους σπόρους από φυτά στα οποία εφαρμόστηκε άρδευση 175. Για τις άλλες ποικιλίες από τα διαγράμματα φαίνεται ότι η άρδευση δεν επηρεάζει τις συγκεντρώσεις των κανναβινοειδών αφού δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές.

Στον Πίνακα 17 παρουσιάζεται το ποσοστό για κάθε κανναβινοειδή και για κάθε ποικιλία ενώ στον Πίνακα 18 φαίνεται η ποσότητα του κανναβινοειδούς στις ποικιλίες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμά μας.

Πίνακας 17 – Περιεκτικότητα κανναβινοειδών (% w/w) σε δείγματα σπόρων κάνναβης από διαφορετικές ποικιλίες, καθώς και παράγοντες άρδευσης και λίπανσης (N: λίπανση, ND: not detected – μη ανιχνεύσιμο, M: απουσία λίπανσης/μάρτυρας).

Variety	Irrigation	Fertilization	CBD (% w/w)	CBDA (% w/w)	CBD TOTAL (% w/w)	THC (% w/w)	THCA (% w/w)	THC TOTAL (% w/w)
USO	I100	M	0,009 ± 0,0001	0,0082 ± 0,0002	0,0161 ± 0,0002	ND	ND	ND
USO	I100	N	0,0216 ± 0,0002	0,0287 ± 0	0,0468 ± 0,0002	0,0004 ± 0,0001	0,0008 ± 0	0,0012 ± 0,0002
USO	I50	M	0,027 ± 0,0002	0,0302 ± 0,0002	0,0534 ± 0,0003	0,0044 ± 0,0001	0,0076 ± 0,001	0,0111 ± 0,0008
USO	I50	N	0,0213 ± 0,0001	0,0235 ± 0	0,0419 ± 0,0001	0,0004 ± 0,0002	0,0006 ± 0,0001	0,0009 ± 0,0001
USO	I75	N	0,0102 ± 0,0001	0,0139 ± 0	0,0224 ± 0,0001	ND	0,0003 ± 0,0004	0,0003 ± 0,0004
SANTHICA 27	I100	M	0,0198 ± 0,0003	0,0059 ± 0,0002	0,025 ± 0,0002	ND	ND	ND
SANTHICA 27	I100	N	0,0282 ± 0,0004	0,0203 ± 0	0,046 ± 0,0004	0,0002 ± 0,0002	0,0007 ± 0	0,0008 ± 0,0003
SANTHICA 27	I50	M	0,0476 ± 0,0004	0,0875 ± 0,0083	0,1244 ± 0,0069	0,0018 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0001	0,0031 ± 0,0001
SANTHICA 27	I50	N	0,0306 ± 0,0003	0,0136 ± 0	0,0425 ± 0,0003	0,0005 ± 0,0001	0,001 ± 0,0001	0,0014 ± 0,0002
SANTHICA 27	I75	M	0,0093 ± 0	0,0018 ± 0,0001	0,0108 ± 0,0001	ND	ND	ND
SANTHICA 27	I75	N	0,0469 ± 0	0,0057 ± 0,0003	0,0518 ± 0,0003	ND	0,0003 ± 0,0004	0,0003 ± 0,0004
FUTURA 75	I100	M	0,07 ± 0,0004	0,0923 ± 0,0005	0,151 ± 0,0008	0,0029 ± 0,0002	0,0016 ± 0	0,0043 ± 0,0043
FUTURA 75	I100	N	0,066 ± 0,0013	0,0958 ± 0,0015	0,15 ± 0,0027	0,0027 ± 0,0001	0,0017 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0042
FUTURA 75	I50	M	0,0436 ± 0,0009	0,0461 ± 0,0006	0,0841 ± 0,0014	0,0008 ± 0,0002	0,0006 ± 0	0,0014 ± 0,0002
FUTURA 75	I50	N	0,0873 ± 0,0001	0,1194 ± 0,0002	0,192 ± 0,0003	0,0033 ± 0,0001	0,0017 ± 0	0,0048 ± 0,0001
FUTURA 75	I75	M	0,0729 ± 0,0003	0,0749 ± 0,0007	0,1386 ± 0,0009	0,0022 ± 0,0001	0,0012 ± 0,0001	0,0033 ± 0,0002
FUTURA 75	I75	N	0,0563 ± 0,0001	0,0625 ± 0,0001	0,1111 ± 0	0,002 ± 0,0001	0,0011 ± 0	0,0029 ± 0,0001
FINOLA	I100	M	0,0382 ± 0,0004	0,0357 ± 0,0001	0,0695 ± 0,0005	0,0025 ± 0	0,0022 ± 0,0001	0,0044 ± 0,0001
FINOLA	I100	N	0,038 ± 0	0,0359 ± 0	0,0694 ± 0	0,0024 ± 0,0002	0,0021 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0001
FINOLA	I50	N	0,0399 ± 0,0007	0,0384 ± 0,0006	0,0736 ± 0,0012	0,0008 ± 0	0,001 ± 0	0,0017 ± 0
SANTHICA 70	I100	M	0,0239 ± 0,0002	0,0316 ± 0,0002	0,0516 ± 0,0005	0,0003 ± 0	0,0006 ± 0,0001	0,0008 ± 0,0001
SANTHICA 70	I100	N	0,0461 ± 0,0002	0,019 ± 0,0001	0,0628 ± 0,0003	0,0005 ± 0,0001	0,0009 ± 0	0,0013 ± 0,0013
SANTHICA 70	I50	M	0,0347 ± 0,0004	0,0293 ± 0,0002	0,0604 ± 0,0005	0,0005 ± 0,0001	0,0008 ± 0	0,0012 ± 0,0001
SANTHICA 70	I50	N	0,0226 ± 0,0003	0,0116 ± 0,0001	0,0328 ± 0,0004	ND,0001	0,0003 ± 0,0005	0,0003 ± 0,0005
SANTHICA 70	I75	M	0,0173 ± 0,0002	0,0031 ± 0	0,0201 ± 0,0002	ND	0,0003 ± 0,0004	0,0003 ± 0,0004

SANTHICA 70	I75	N	0,0183 ± 0,0004	0,0091 ± 0,0001	0,0263 ± 0,0005	ND	ND	ND
CARMAGNIOLA	I100	M	0,1447 ± 0,0022	0,3791 ± 0,0067	0,4772 ± 0,008	0,0093 ± 0,0004	0,0086 ± 0,0001	0,0169 ± 0,0167
CARMAGNIOLA	I100	N	0,0729 ± 0,002	0,1009 ± 0,0027	0,1614 ± 0,0044	0,0343 ± 0,0006	0,0765 ± 0,0019	0,1014 ± 0,1006
CARMAGNIOLA	I50	M	0,1342 ± 0,0005	0,3087 ± 0,0111	0,4049 ± 0,0092	0,0235 ± 0	0,0288 ± 0,0028	0,0487 ± 0,0024
CARMAGNIOLA	I50	N	0,0795 ± 0	0,1753 ± 0,0001	0,2333 ± 0,0001	0,0231 ± 0,0004	0,0467 ± 0,0002	0,0641 ± 0,0006
CARMAGNIOLA	I75	M	0,0495 ± 0,0003	0,0752 ± 0,0005	0,1154 ± 0,0007	0,002 ± 0,0001	0,0014 ± 0,0002	0,0033 ± 0
CARMAGNIOLA	I75	N	0,0926 ± 0	0,2209 ± 0,0006	0,2864 ± 0,0005	0,0116 ± 0,0005	0,0127 ± 0,0006	0,0227 ± 0,0011
FERIMON	I100	M	0,0281 ± 0	0,0263 ± 0,0001	0,0511 ± 0,0001	0,0004 ± 0,0001	0,0008 ± 0	0,001 ± 0,0011
FERIMON	I100	N	0,057 ± 0,0004	0,0702 ± 0,0007	0,1186 ± 0,0011	0,0019 ± 0,0002	0,0013 ± 0,0001	0,0031 ± 0,0002
FERIMON	I50	M	0,0287 ± 0,0001	0,036 ± 0,0002	0,0603 ± 0,0003	0,0006 ± 0	0,0012 ± 0	0,0016 ± 0
FERIMON	I50	N	0,1112 ± 0,0003	0,1233 ± 0,0002	0,2194 ± 0,0005	0,0043 ± 0,0003	0,0018 ± 0,0001	0,006 ± 0,0002
FERIMON	I75	M	0,0095 ± 0,0001	0,0138 ± 0,0002	0,0216 ± 0,0002	ND	ND	ND
FERIMON	I75	N	0,033 ± 0,0001	0,0385 ± 0,0002	0,0668 ± 0,0003	0,0006 ± 0	0,0008 ± 0,0001	0,0013 ± 0
ZUZANA	I100	M	0,0414 ± 0,0006	0,0484 ± 0,0002	0,0839 ± 0,0007	0,0011 ± 0	0,001 ± 0,0001	0,0019 ± 0,0001
ZUZANA	I100	N	0,0946 ± 0,0007	0,1152 ± 0,001	0,1956 ± 0,0015	0,0035 ± 0,0001	0,0018 ± 0	0,0051 ± 0,0001
ZUZANA	I50	M	0,0348 ± 0,0001	0,0603 ± 0,0004	0,0877 ± 0,0002	0,0007 ± 0,0001	0,0009 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0001
ZUZANA	I50	N	0,0389 ± 0,0002	0,0483 ± 0,0005	0,0813 ± 0,0006	0,0009 ± 0,0001	0,0007 ± 0,0002	0,0015 ± 0,0001
ZUZANA	I75	M	0,0159 ± 0,0002	0,007 ± 0,0002	0,0221 ± 0,0004	ND	0,0003 ± 0,0004	0,0003 ± 0,0004
ZUZANA	I75	N	0,0443 ± 0,0001	0,0423 ± 0,0001	0,0814 ± 0	0,0004 ± 0,0006	0,0003 ± 0,0005	0,0007 ± 0,0002
FEDORA	I100	M	0,0708 ± 0,0001	0,1025 ± 0,0001	0,1606 ± 0	0,0026 ± 0,0002	0,0015 ± 0	0,0039 ± 0,0002
FEDORA	I100	N	0,0293 ± 0,0006	0,0297 ± 0,0005	0,0553 ± 0,001	0,0006 ± 0	0,0008 ± 0	0,0014 ± 0,0014
FEDORA	I50	M	0,0097 ± 0,0001	0,0139 ± 0,0001	0,0219 ± 0,0001	ND,0001	0,0009 ± 0,0012	0,0008 ± 0,0011
FEDORA	I50	N	0,0856 ± 0,0002	0,0998 ± 0	0,1732 ± 0,0002	0,0029 ± 0,0001	0,0015 ± 0,0001	0,0042 ± 0,0002
FEDORA	I75	M	0,1089 ± 0,0011	0,1408 ± 0,0009	0,2324 ± 0,0018	0,0044 ± 0,0001	0,0018 ± 0,0003	0,006 ± 0,0001
FEDORA	I75	N	0,0471 ± 0,0004	0,0741 ± 0,0005	0,112 ± 0,0009	0,0019 ± 0	0,0012 ± 0,0001	0,003 ± 0
KC DORA	I100	M	0,0072 ± 0,0001	0,002 ± 0,0001	0,0089 ± 0	ND	ND	ND
KC DORA	I100	N	0,0511 ± 0,0003	0,0653 ± 0,0004	0,1083 ± 0,0006	0,0019 ± 0,0001	0,0011 ± 0,0001	0,0029 ± 0,0001
KC DORA	I50	M	0,0335 ± 0,0001	0,0325 ± 0,0004	0,062 ± 0,0004	0,0008 ± 0,0003	0,0003 ± 0,0005	0,0011 ± 0,0008
KC DORA	I50	N	0,1932 ± 0,0001	0,2572 ± 0,0009	0,4187 ± 0,0009	0,0093 ± 0,0001	0,0034 ± 0	0,0123 ± 0,0001
KC DORA	I75	M	0,0388 ± 0,0001	0,0575 ± 0,0006	0,0892 ± 0,0006	0,001 ± 0,0001	0,0009 ± 0,0001	0,0018 ± 0
KC DORA	I75	N	0,0696 ± 0,0009	0,0779 ± 0,0013	0,138 ± 0,002	0,0023 ± 0,0001	0,001 ± 0	0,0032 ± 0,0001

Πίνακας 18 - Περιεκτικότητα κανναβινοειδών (μg/g) σε δείγματα σπόρων κάνναβης από διαφορετικές ποικιλίες, καθώς και παράγοντες άρδευσης και λίπανσης (ND: not detected – μη ανιχνεύσιμο).

Variety	Irrigation/ Replicate (bag)	Fertilization	CBD (μg/g)	CBDA (μg/g)	CBD TOTAL (μg/g)	THC (μg/g)	THCA (μg/g)	TCH TOTAL (μg/g)
USO	I100	M	89,58 ± 0,77	81,85 ± 1,89	161,36 ± 2,43	ND	ND	ND
USO	I100	N	215,95 ± 1,9	287,18 ± 0,42	467,8 ± 2,26	4,37 ± 1,47	8,19 ± 0,35	11,55 ± 1,78
USO	I50	M	269,58 ± 1,86	302,06 ± 1,86	534,49 ± 3,5	43,66 ± 0,81	76,32 ± 9,57	110,59 ± 7,58
USO	I50	N	213,13 ± 0,91	234,59 ± 0,11	418,87 ± 0,82	3,7 ± 2,28	6,45 ± 1,4	9,35 ± 1,05
USO	I75	N	101,97 ± 1,16	138,62 ± 0,32	223,54 ± 1,44	ND	3,01 ± 4,26	2,64 ± 3,74
SANTHICA 27	I100	M	197,58 ± 2,95	59,44 ± 1,51	249,71 ± 1,62	ND	ND	ND
SANTHICA 27	I100	N	281,63 ± 3,58	202,9 ± 0,39	459,57 ± 3,92	1,76 ± 2,49	6,88 ± 0,11	7,8 ± 2,59
SANTHICA 27	I50	M	476,14 ± 4,12	875,07 ± 83,23	1243,58 ± 68,88	18,36 ± 0,63	14,88 ± 0,91	31,4 ± 1,44
SANTHICA 27	I50	N	305,83 ± 3,4	136,21 ± 0,21	425,28 ± 3,22	5,23 ± 0,74	10,17 ± 1,05	14,15 ± 1,66
SANTHICA 27	I75	M	92,77 ± 0,32	17,87 ± 0,88	108,44 ± 1,09	ND	ND	ND
SANTHICA 27	I75	N	468,84 ± 0,14	56,6 ± 3,32	518,48 ± 3,05	ND	3,04 ± 4,3	2,67 ± 3,77
FUTURA 75	I100	M	700,24 ± 3,93	923,12 ± 4,53	1509,82 ± 7,9	29,35 ± 2,14	15,9 ± 0,04	43,29 ± 42,52
FUTURA 75	I100	N	660,19 ± 13,03	957,84 ± 15,38	1500,21 ± 26,52	27,31 ± 0,7	16,56 ± 0,53	41,84 ± 41,92
FUTURA 75	I50	M	436,01 ± 8,68	461,23 ± 6,12	840,51 ± 14,04	8,47 ± 1,79	6,44 ± 0,32	14,12 ± 1,51
FUTURA 75	I50	N	872,82 ± 0,98	1193,87 ± 2	1919,84 ± 2,73	32,61 ± 1,47	17,37 ± 0,18	47,85 ± 1,32
FUTURA 75	I75	M	729,27 ± 3	748,63 ± 6,74	1385,82 ± 8,91	21,9 ± 1,34	12,35 ± 1,31	32,72 ± 2,48
FUTURA 75	I75	N	562,8 ± 0,84	624,73 ± 0,81	1110,68 ± 0,13	20,16 ± 0,6	10,64 ± 0,39	29,49 ± 0,93
FINOLA	I100	M	381,68 ± 3,87	357,24 ± 0,98	694,98 ± 4,73	25,44 ± 0,21	21,57 ± 0,91	44,36 ± 0,59
FINOLA	I100	N	379,56 ± 0,49	358,72 ± 0,35	694,16 ± 0,18	23,8 ± 1,94	20,56 ± 1,45	41,84 ± 0,67
FINOLA	I50	N	399,37 ± 7,43	384,02 ± 5,57	736,15 ± 12,32	8,25 ± 0,39	10,48 ± 0,46	17,45 ± 0,01
SANTHICA 70	I100	M	239,09 ± 2,46	315,85 ± 2,49	516,09 ± 4,64	2,68 ± 0,14	6,42 ± 0,74	8,31 ± 0,51
SANTHICA 70	I100	N	460,6 ± 2,11	190,33 ± 1,44	627,52 ± 3,37	5,41 ± 0,98	8,88 ± 0	13,2 ± 12,85
SANTHICA 70	I50	M	347,01 ± 3,54	292,79 ± 2,17	603,79 ± 5,45	4,83 ± 1,02	8,13 ± 0,28	11,97 ± 1,26
SANTHICA 70	I50	N	225,78 ± 3,27	116,38 ± 1,26	327,85 ± 4,38	0,4 ± 0,56	3,3 ± 4,67	3,29 ± 4,66
SANTHICA 70	I75	M	173,09 ± 2	31,31 ± 0,28	200,55 ± 2,25	ND	3,06 ± 4,32	2,68 ± 3,79

SANTHICA 70	I75	N	183,3 ± 4,09	90,76 ± 0,92	262,9 ± 4,89	ND	ND	ND
CARMAGNIOLA	I100	M	1447,26 ± 21,61	3790,86 ± 66,76	4771,84 ± 80,16	92,97 ± 4,49	86,45 ± 1,23	168,79 ± 166,82
CARMAGNIOLA	I100	N	729,43 ± 20,11	1008,96 ± 27,41	1614,28 ± 44,15	342,54 ± 5,65	765,14 ± 18,53	1013,57 ± 1005,82
CARMAGNIOLA	I50	M	1341,92 ± 5,13	3086,6 ± 111,01	4048,86 ± 92,22	234,81 ± 0,11	288,05 ± 28,02	487,44 ± 24,46
CARMAGNIOLA	I50	N	795,03 ± 0,07	1753,12 ± 0,98	2332,52 ± 0,79	231,45 ± 4,35	466,67 ± 2,38	640,72 ± 6,44
CARMAGNIOLA	I75	M	494,78 ± 3,33	752,13 ± 4,62	1154,39 ± 7,38	20,08 ± 1,3	14,29 ± 2	32,61 ± 0,45
CARMAGNIOLA	I75	N	926,35 ± 0,18	2209,13 ± 5,56	2863,76 ± 5,05	115,82 ± 5,32	126,87 ± 6,09	227,08 ± 10,66
FERIMON	I100	M	280,88 ± 0,28	262,86 ± 0,7	511,41 ± 0,9	3,62 ± 0,98	7,77 ± 0,32	10,44 ± 10,88
FERIMON	I100	N	570,47 ± 4,46	702,34 ± 7,23	1186,42 ± 10,8	18,96 ± 2,18	13,2 ± 0,7	30,54 ± 1,56
FERIMON	I50	M	287,35 ± 1,05	360,2 ± 2,21	603,25 ± 2,99	5,56 ± 0	11,6 ± 0,46	15,74 ± 0,4
FERIMON	I50	N	1112,33 ± 3,38	1233,3 ± 2,22	2193,94 ± 5,32	43,43 ± 2,78	18,42 ± 1,41	59,58 ± 1,55
FERIMON	I75	M	94,65 ± 0,85	138,12 ± 1,59	215,78 ± 2,24	ND	ND	ND
FERIMON	I75	N	329,99 ± 0,7	385,32 ± 2,21	667,92 ± 2,64	5,8 ± 0,28	7,81 ± 0,6	12,65 ± 0,24
ZUZANA	I100	M	414,39 ± 5,75	483,76 ± 1,86	838,65 ± 7,38	10,58 ± 0,18	9,84 ± 1,3	19,21 ± 0,96
ZUZANA	I100	N	946,3 ± 6,7	1151,51 ± 9,72	1956,18 ± 15,22	35,34 ± 1,09	17,96 ± 0,49	51,09 ± 0,66
ZUZANA	I50	M	348,41 ± 0,77	602,58 ± 3,58	876,87 ± 2,37	6,92 ± 0,6	9,15 ± 0,81	14,95 ± 1,3
ZUZANA	I50	N	389,25 ± 1,79	483,32 ± 4,63	813,12 ± 5,86	8,66 ± 0,74	7,47 ± 1,58	15,22 ± 0,65
ZUZANA	I75	M	158,99 ± 1,54	70,22 ± 2,25	220,57 ± 3,51	ND	2,98 ± 4,21	2,61 ± 3,69
ZUZANA	I75	N	443,11 ± 1,26	423,31 ± 0,91	814,35 ± 0,46	4,34 ± 6,14	3,5 ± 4,95	7,41 ± 1,8
FEDORA	I100	M	707,51 ± 0,6	1024,61 ± 0,63	1606,09 ± 0,04	25,58 ± 1,93	14,83 ± 0,07	38,59 ± 1,99
FEDORA	I100	N	292,58 ± 6,24	297,23 ± 4,77	553,25 ± 10,42	6,47 ± 0,04	8,33 ± 0,21	13,77 ± 13,69
FEDORA	I50	M	96,67 ± 0,6	139,39 ± 0,53	218,91 ± 1,06	0,42 ± 0,6	8,63 ± 12,21	7,99 ± 11,3
FEDORA	I50	N	856,12 ± 2,03	998,41 ± 0	1731,73 ± 2,03	29,12 ± 0,74	15,24 ± 1,23	42,49 ± 1,81
FEDORA	I75	M	1089,37 ± 10,88	1407,53 ± 8,6	2323,77 ± 18,42	43,69 ± 1,44	18,16 ± 3,09	59,62 ± 1,27
FEDORA	I75	N	470,57 ± 4,05	741,07 ± 5,17	1120,48 ± 8,58	18,83 ± 0,46	12,39 ± 0,7	29,7 ± 0,16
KC DORA	I100	M	71,55 ± 0,6	20,4 ± 0,98	89,44 ± 0,27	ND	ND	ND
KC DORA	I100	N	510,58 ± 2,87	652,84 ± 3,53	1083,13 ± 5,97	19,49 ± 0,84	10,91 ± 0,73	29,05 ± 1,48
KC DORA	I50	M	334,54 ± 0,6	325,17 ± 3,63	619,71 ± 3,78	7,79 ± 3,49	3,29 ± 4,65	10,68 ± 7,56
KC DORA	I50	N	1931,67 ± 1,26	2571,53 ± 8,89	4186,91 ± 9,06	93,07 ± 0,98	33,57 ± 0,18	122,51 ± 0,83
KC DORA	I75	M	388,34 ± 0,98	574,68 ± 6,08	892,33 ± 6,31	9,98 ± 0,77	8,89 ± 0,56	17,78 ± 0,28
KC DORA	I75	N	696,4 ± 8,62	779,35 ± 13,01	1379,89 ± 20,03	23,25 ± 1,02	10,47 ± 0,25	32,44 ± 0,8

Αξίζει να αναφερθεί πως εκτός από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών στις διάφορες ποικιλίες κάνναβης μετρήθηκε επίσης και η απόδοση σε εκχύλισμα (extraction yield) για την κάθε ποικιλία, με βάση το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο εκχύλισης με μικροκύματα (MAE).

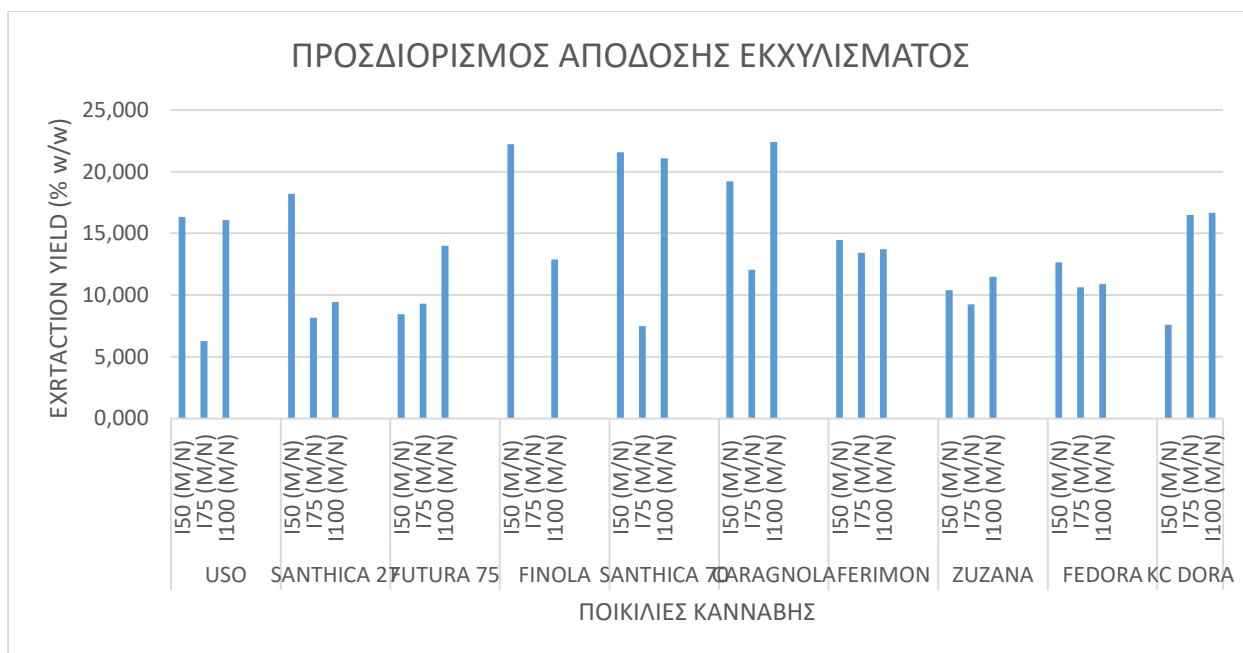
Όλα τα erpendorf πρώτα ζυγίστηκαν προστέθηκαν σε αυτά 1.3mL από το διηθημένο εκχύλισμα και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στη φυγοκεντρική συσκευή εξάτμισης ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης και να παραμείνει μόνο το ξηρό εκχύλισμα. Στον Πίνακα 19 φαίνονται τα βάρη από τα erpendorf, για κάθε ποικιλία, τρόπο άρδευσης και λίπανση δηλαδή εάν έχει εφαρμοστεί λίπανση (N) ή είναι οι μάρτυρες (M) τόσο πριν τη ξήρανση δηλαδή χωρίς να έχουν εκχύλισμα όσο και μετά τη ξήρανση, καθώς και το βάρος του ξηρού εκχυλίσματος (ουσίας).

Πίνακας 19 - Βάρος ξηράς ουσίας ανά ποικιλία

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΒΑΡΟΣ ERPENDORF ΜΕΤΑ ΤΗ ΞΗΡΑΝΣΗ	ΒΑΡΟΣ ERPENDORF ΠΡΙΝ ΤΗ ΞΗΡΑΝΣΗ	ΒΑΡΟΣ ΞΗΡΑΣ ΟΥΣΙΑΣ (g)
USO I75 N	1.08598	1.08434	0.00164
SAN 27 I75 M	1.08677	1.08465	0.00212
SAN 27 I75 N	1.08842	1.08627	0.00215
FUT 75 I75 M	1,09139	1.08932	0.00207
FUT 75 I75 N	1.08774	1.08595	0.00179
SAN 70 I75 M	1.08686	1.08508	0.00178
SAN 70 I75 N	1.08571	1.08358	0.00213
CARMAG I75 M	1.08509	1.08210	0.00299
CARMAG I75 N	1.08907	1.08576	0.00331
FERIMON I75 M	1.09117	1.08835	0.00282
ZUZANA I75 M	1.08749	1.08524	0.00225
ZUZANA I75 N	1.08787	1.08526	0.00261
FEDORA I75 M	1.08849	1.08511	0.00338
FEDORA I75 N	1.08582	1.08363	0.00219
KC DORA I75 M	1.09072	1.08818	0.00254
KC DORA I75 N	1.08925	1.08640	0.00285
FERIMON I75 N	1.09153	1.08733	0.00420
FINOLA I50 N	1.09402	1.08819	0.00583
USO I50 M	1.09093	1.08759	0.00334
USO I50 N	1.09454	1.08933	0.00521
SAN 27 I50 M	1.09601	1.09097	0.00504
SAN 27 I50 N	1.08681	1.08232	0.00449
CARMAG I50 M	1.09178	1.08920	0.00258
CARMAG I50 N	1.09217	1.08620	0.00597
SAN 70 I50 M	1.08913	1.08405	0.00508
SAN 70 I50 N	1.09160	1,08538	0.00622
FERIMON I50 M	1.08814	1.08419	0.00395
FERIMON I50 N	1.08984	1.08623	0.00361

ZUZANA I50 M	1.08867	1.08487	0.00380
ZUZANA I50 N	1.08851	1.08736	0.00115
KC DORA I50 M	1.09242	1.09058	0.00184
KC DORA I50 N	1.08683	1.08471	0.00212
FUT 75 I50 M	1.08663	1.08448	0.00215
FUT 75 I50 N	1.08760	1.08532	0.00228
FEDORA I50 M	1.08706	1.08512	0.00194
FEDORA I50 N	1.09014	1.08544	0.00470
USO I100 M	1.08903	1.08552	0.00351
USO I100 N	1.09444	1.08952	0.00492
SAN 27 I100 M	1.09023	1.08850	0.00173
SAN 27 I100 N	1.08896	1.08575	0.00321
FINOLA I100 M	1.09425	1.08979	0.00446
FINOLA I100 N	1.08732	1.08514	0.00218
ZUZANA I100 M	1.08803	1.08638	0.00165
ZUZANA I100 N	1.09008	1.08671	0.00337
KC DORA I100 M	1.08862	1.08379	0.00483
KC DORA I100 N	1.08998	1.08606	0.00392
SAN 70 I100 M	1.09183	1.08740	0.00443
FEDORA I100 M	1.08772	1.08593	0.00179
FUT 75 I100 M	1.08703	1.08346	0.00357
FUT 75 I100 N	1.08870	1.08394	0.00476
CARMAG I100 M	1.09102	1.08536	0.00566
CARMAG I100 N	1.08823	1.08215	0.00608
FERIMON I100 M	1.08944	1.08609	0.00335
FERIMON I100 N	1.09263	1.08879	0.00384
SAN 70 I100 N	1.09221	1.08648	0.00573
SAN 70 I100 N	1.09080	1.08688	0.00392

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 19) φαίνεται η απόδοση εκχυλίσματος για κάθε ποικιλία (extraction yield).



Διάγραμμα 19 - Ποσοτικός προσδιορισμός ξηράς ουσίας ανά ποικιλία και άρδευση

2.2.3 Σύγκριση της συγκέντρωσης των CBD, CBDA, THC, THCA και απόδοσης εκχυλίσματος σε έλαια από διάφορες ποικιλίες της *C. sativa*

Δείγματα κανναβελαίου από διαφορετικές ποικιλίες ελήφθησαν κατόπιν ψυχρής έκθλιψης των αντίστοιχων σπόρων. Όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος για να αποφασιστεί ποιο πρωτόκολλο θα ακολουθηθεί για τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών σε δείγματα ελαίων, πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές. Η μια δοκιμή βασίστηκε στο παρακάτω άρθρο: A Simple, Fast, and Green Oil Sample Preparation Method for Determination of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol by HPLC-DAD (Madej et. Al. 2020). Στο συγκεκριμένο άρθρο οι καλύτερες συνθήκες απομόνωσης της CBD που αποτελεί το κύριο συστατικό των περισσότερων συμπληρωμάτων ελαίου διατροφής μελετήθηκαν στα δείγματα συμπληρωμάτων ελαίου. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η τελική ποσότητα ελαίου ήταν 100 gr, η μέθοδος εκχύλισης ήταν η UAE ενώ σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το ACN. Προκειμένου να αποφασιστούν οι τελικές συνθήκες του πειράματος, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές δοκιμές τροποποιώντας κάθε φορά την αντίστοιχη συνθήκη (ποσότητα ελαίου, διαλύτης, θερμοκρασία, κτλ).

Αντίστοιχα με την προαναφερθείσα μελέτη, διαξήχθη και η πειραματική διαδικασία της παρούσας εργασίας.. Έτσι, προέκυψαν αλλαγές ως προς την ποσότητα του ελαίου που χρησιμοποιήθηκε (0.9121 g ελαίου κάνναβης έναντι 100 g) ενώ ως διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ACN σε ίση ποσότητα με την μελέτη-οδηγό (500 mL).

Η δεύτερη δοκιμή που πραγματοποιήθηκε βασίστηκε στο άρθρο Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils. Όσο αναφορά την περιεκτικότητα των κανναβινοειδών αυτή προσδιορίστηκε με τη χρήση εκχύλισης υγρού-υγρού και με τη χρήση των υπερήχων. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα χιλιοστόλιτρο (mL) ελαίου κάνναβης και προστέθηκε σε φιαλίδιο Falcon των 50 mL. Ως διαλύτης

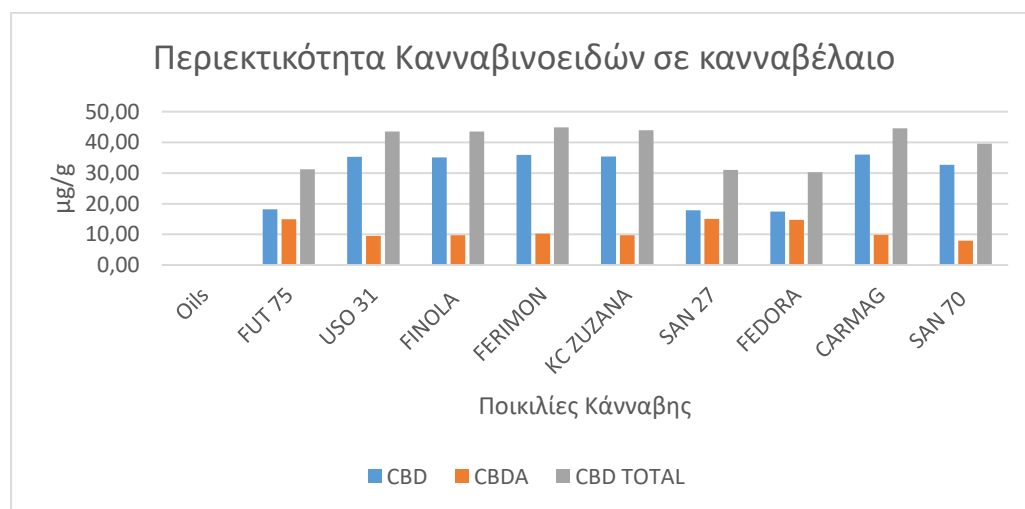
χρησιμοποιήθηκε το ACN και συγκεκριμένα 10 mL το οποίο προστέθηκε στο φιαλίδιο Falcon. Το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στους υπερήχους για 15 min και μετά στην κατάψυξη στους -15 °C για 2 h.

Στη δοκιμή μας χρησιμοποιήθηκε 0.9121 g ελαίου κάνναβης και ο διαλύτης είναι το ACN και η ποσότητα 10 mL. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με υπερήχους για 15min στους 30-35 °C. Έπειτα, τοποθετήθηκε στην κατάψυξη για 2 h αλλά στους -20 °C.

Αυτές οι δύο δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με βάση τα παραπάνω άρθρα. Κάποια δείγματα φιλτραρίστηκαν και κάποια άλλα δε φιλτραρίστηκαν και αυτό έγινε με σκοπό να διαπιστωθεί εάν το φιλτράρισμα επηρεάζει ή όχι τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών. Όμως πραγματοποιήθηκε ακόμα μια δοκιμή στην οποία αυξήθηκε η ποσότητα του ελαίου που ήταν το 1 g και 1.5 g αλλά κρατώντας τις άλλες παραμέτρους σταθερές που είναι ο διαλύτης, ο όγκος του διαλύτη, ο χρόνος και η θερμοκρασία εκχύλισης καθώς επίσης και ο χρόνος διατήρησης του εκχυλίσματος στον καταψύκτη. Αυτό έγινε με σκοπό να διαπιστωθεί εάν η ποσότητα του ελαίου κάνναβης επηρεάζει ή όχι τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών.

Από όλες τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα ως προς τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών είχαν τα δείγματα με ποσότητα ελαίου το 1g και αυτή η ποσότητα χρησιμοποιήθηκε και στο πείραμά μας καθώς όλα τα δείγματα φιλτραρίστηκαν.

Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 20) απεικονίζεται η συγκέντρωση των κανναβινοειδών στα έλαια από τις διάφορες ποικιλίες κάνναβης. Από το διάγραμμα φαίνεται πως οι ποικιλίες USO 31, FINOLA, FERIMON, KC ZUZANA, CARMAGONLA και SANTHICA 70 παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση CBD χωρίς να υπάρχει μεταξύ αυτών των ποικιλιών σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση ενώ οι ποικιλίες FUTURA 75, SANTHIC 27 και FEDORA παρουσιάζουν τη χαμηλότερη συγκέντρωση CBD. Στη συνέχεια, όσον αφορά τη συγκέντρωση του CBDA η εικόνα είναι αντίστροφη δηλαδή οι ποικιλίες που έχουν χαμηλή συγκέντρωση CBD έχουν υψηλή συγκέντρωση CBDA ενώ οι ποικιλίες που έχουν υψηλή συγκέντρωση CBD έχουν χαμηλή συγκέντρωση CBDA. Ως προς τη συγκέντρωση ολικής CBD που είναι αποτέλεσμα της επίδρασης και του CBD και το CBDA φαίνεται αυτές που παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση είναι οι ποικιλίες USO 31, FINOLA, FERIMON, KC ZUZANA και CARAGNOLA.



Διάγραμμα 20 - Ποσότητα κανναβινοειδών στις ποικιλίες ελαίων κάνναβης

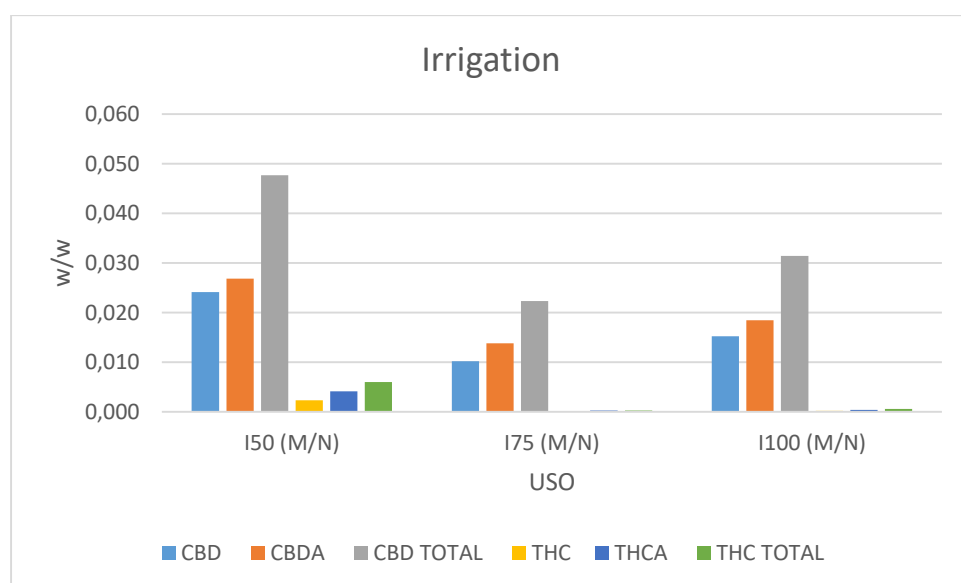
Πίνακας 20 - Ποσότητα κανναβινοειδών στις ποικιλίες ελαίων κάνναβης (μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση)

Variety	CBD ($\mu\text{g/g}$)	CBDA ($\mu\text{g/g}$)	CBD TOTAL ($\mu\text{g/g}$)
FUT 75	18,14 $\pm$ 0,079	14,97 $\pm$ 0,119	31,27 $\pm$ 0,306
USO 31	35,29 $\pm$ 0,254	9,46 $\pm$ 0,074	43,59 $\pm$ 0,18
FINOLA	35,06 $\pm$ 0,11	9,71 $\pm$ 0,049	43,58 $\pm$ 0,067
FERIMON	35,95 $\pm$ 0,01	10,23 $\pm$ 0,01	44,93 $\pm$ 0,025
KC ZUZANA	35,45 $\pm$ 0,144	9,67 $\pm$ 0,055	43,94 $\pm$ 0
SAN 27	17,82 $\pm$ 0,076	15,05 $\pm$ 0,069	31,02 $\pm$ 0,125
FEDORA	17,41 $\pm$ 0,471	14,72 $\pm$ 0,025	30,32 $\pm$ 0,388
CARMAG	35,99 $\pm$ 0,064	9,8 $\pm$ 0,04	44,59 $\pm$ 0,029
SAN 70	32,65 $\pm$ 0,212	7,92 $\pm$ 0,129	39,59 $\pm$ 0,325

2.2.4 Συσχέτιση στοιχείων καλλιεργητικής τεχνικής (άρδευση και λίπανση) ανά ποικιλία με την περιεκτικότητα κανναβινοειδών στους σπόρους

Όπως αναφέρθηκε και στο πειραματικό μέρος εξετάστηκαν σπόροι από δέκα (10) διαφορετικές ποικιλίες βιομηχανικής κάνναβης με μέθοδο εκχύλισης βασισμένη στα μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction, MAE) και χρησιμοποιώντας σαν διαλύτη τη μεθανόλη (MeOH). Η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε κανναβινοειδή πρωταρχικής σημασίας (CBDA, CBD, THCA, THC) προσδιορίστηκε με UPLC-PDA. Επίσης, υπολογίστηκε η περιεκτικότητα σε ολική CBD και ολική THC. Τα δείγματα ομαδοποιήθηκαν ανά ποικιλία (Variety), συνθήκες άρδευσης (Irrigation) και εάν υπάρχει λίπανση ή όχι (Fertilization).

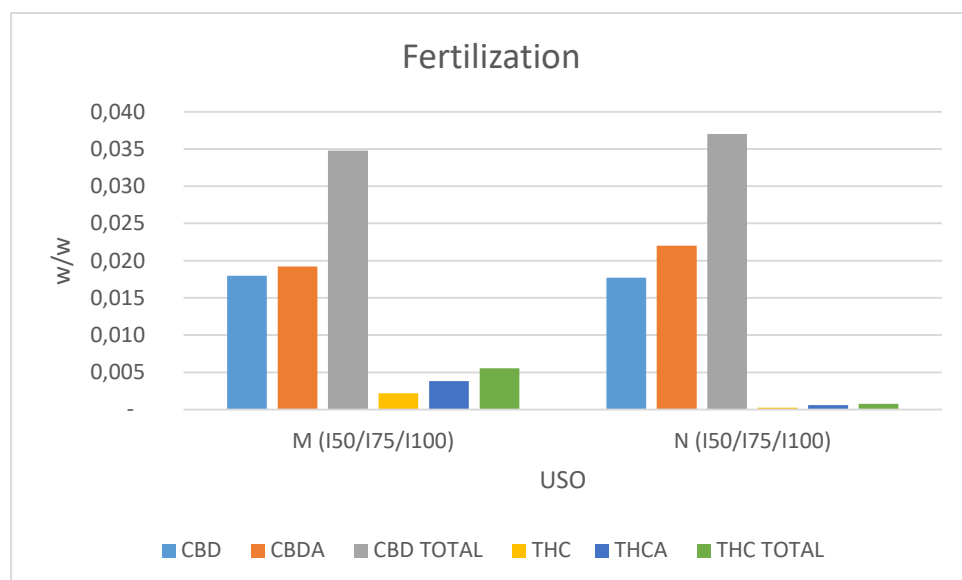
Στα διαγράμματα που ακολουθούν θα εξεταστεί το πόσο επηρεάζει η άρδευση (Irrigation) καθώς επίσης και η λίπανση στη συγκέντρωση των κανναβινοειδών σε κάθε ποικιλία. Από τα συμπεράσματα που θα βγουν θα διαπιστωθεί ποιος από τους δύο παράγοντες επηρεάζει περισσότερο ώστε να επιλεγεί αυτός που θα βασιστεί η τελική ανάλυση των ποικιλιών.



Διάγραμμα 21 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας USO ανά άρδευση

Στο παραπάνω διάγραμμα (Διάγραμμα 21) απεικονίζεται η συγκέντρωση των κανναβινοειδών στους διαφορετικούς τρόπους άρδευσης (I50,I75,I100) στη ποικιλία USO. Από το διάγραμμα φαίνεται ότι πως ο τρόπος άρδευσης I50 έχει τη υψηλότερη συγκέντρωση των κανναβινοειδών σε σχέση με του άλλους τρόπους άρδευσης I75 και I100. Οπότε συμπεραίνεται ότι η λήψη μικρότερης ποσότητας νερού στα φυτά επηρεάζει θετικά στη συγκέντρωση των κανναβινοειδών. Επιπλέον, φαίνεται πως και στις τρεις περιπτώσεις άρδευσης υπάρχει υψηλότερη συγκέντρωση των CBD και CBDA από τα αντίστοιχα THC και THCA, που είναι αναμενόμενο καθώς πρόκειται για ποικιλίες βιομηχανικής κάνναβης.

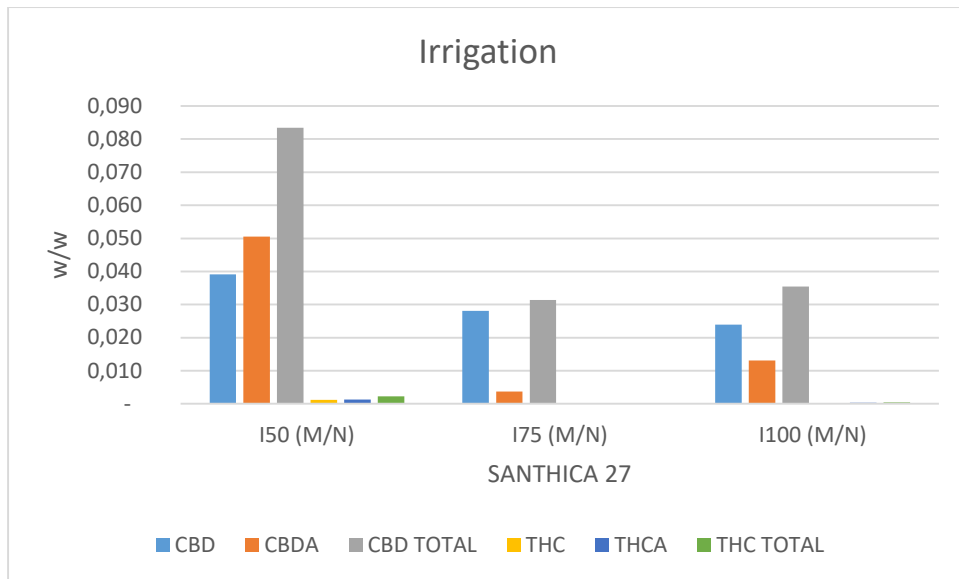
Στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 22) απεικονίζεται η συγκέντρωση των κανναβινοειδών και το πως επηρεάζεται από την εφαρμογή λίπανσης ή όχι στη ποικιλία USO. Παρατηρείται ότι στα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε λίπανση η συγκέντρωση των CBD, CBDA και κατά επέκταση η συγκέντρωση του CBD TOTAL είναι παρόμοια με την αντίστοιχη των CBD, CBDA και CBD TOTAL στα φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε λίπανση.



Διάγραμμα 22 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας USO ανά λίπανση

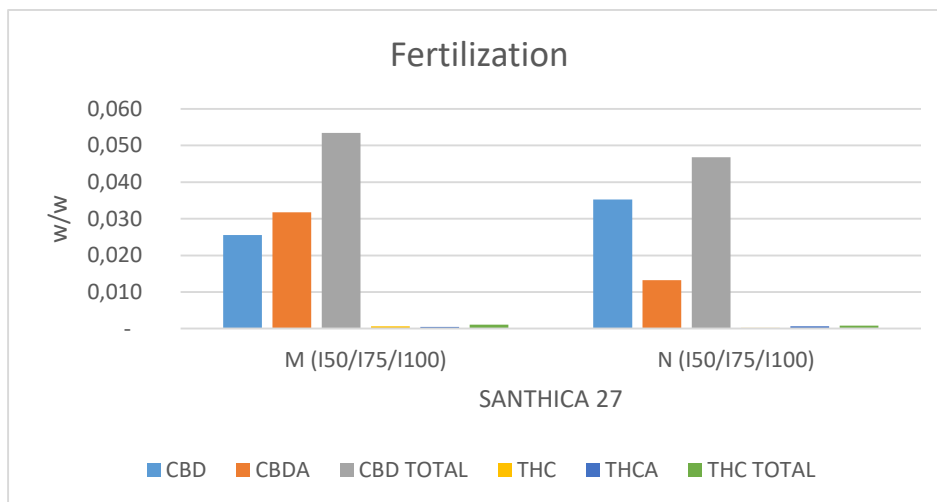
Συγκρίνοντας τα δύο διαγράμματα και εξετάζοντας τους δύο παράγοντες που είναι η άρδευση και η λίπανση παρατηρεί κανείς πως ο παράγοντας της άρδευσης επηρεάζει πιο πολύ τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών σε σχέση με τον παράγοντα της λίπανσης και αυτό διότι παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση των κανναβινοειδών.

Στη ποικιλία SANTHICA 27 η άρδευση επηρεάζει σημαντικά τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 23. Στη μικρότερη ποσότητα νερού (I50) τα φυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ποσότητα CBD, CBDA άρα και CBD TOTAL. Όσο αυξάνεται η ποσότητα του νερού στα φυτά παρατηρείται πως η συγκέντρωση του CBD μειώνεται ενώ η συγκέντρωση του CBDA στη μεγαλύτερη δόση νερού (I100) είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την ενδιάμεση δόση νερού (I75) ενώ και στους τρεις τρόπους άρδευσης υπάρχει ελάχιστη ποσότητα THC και THCA.



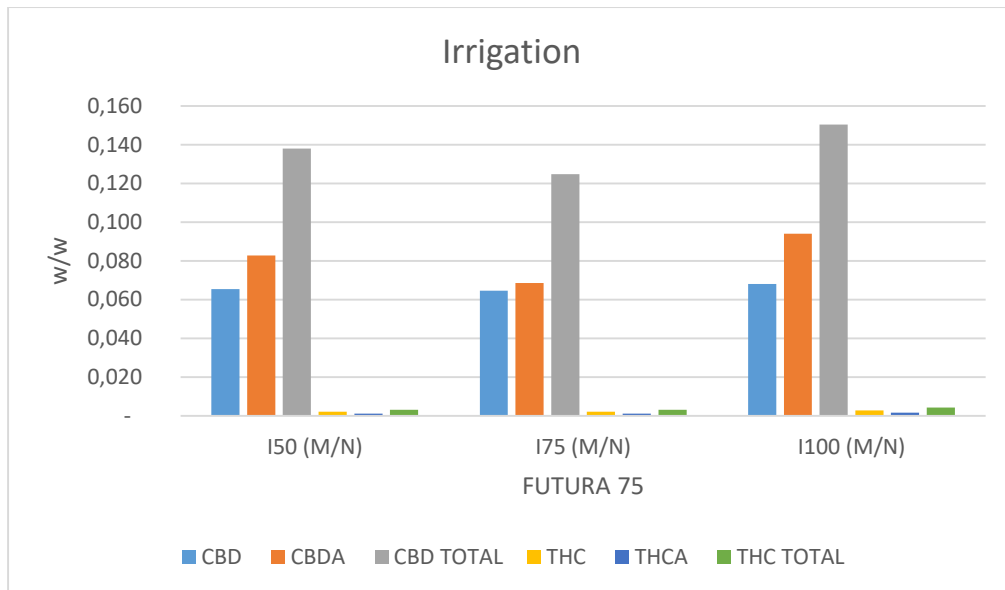
Διάγραμμα 23 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA ανά άρδευση

Στην ποικιλία SANTHICA 27 τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε λίπανση παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε CBD σε σχέση με τα φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε λίπανση. Αξίζει να σημειωθεί, πως η συγκέντρωση του CBDA και του CBD TOTAL είναι μεγαλύτερη στα φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε λίπανση. Επιπλέον φαίνεται πως η λίπανση δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των υπόλοιπων κανναβινοειδών (THC, THCA) αφού και στις δύο περιπτώσεις είτε εφαρμόστηκε λίπανση είτε όχι η συγκέντρωση είναι σχεδόν μηδαμινή όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 24.



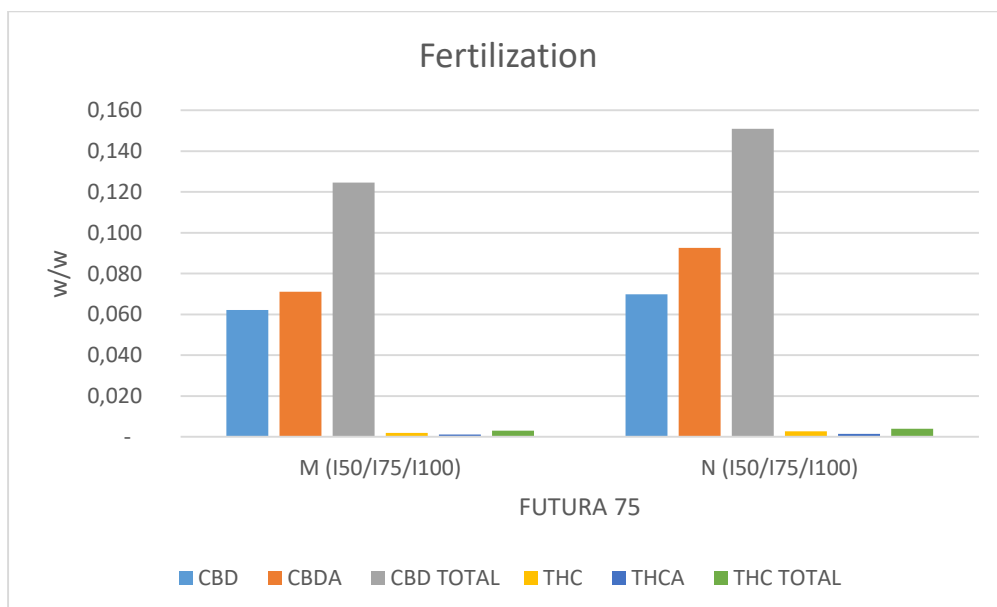
Διάγραμμα 24 – Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA 27 ανά λίπανση

Στη ποικιλία FUTURA 75 η εικόνα είναι διαφορετική από τις προηγούμενες ποικιλίες. Εδώ η συγκέντρωση των CBD και CBDA φαίνεται να μην επηρεάζεται ιδιαίτερα από την τεχνική άρδευσης. Και εδώ η άρδευση δεν επηρέασε τη συγκέντρωση των THC και THCA αφού οι συγκεντρώσεις είναι ελάχιστες (Διάγραμμα 25).



Διάγραμμα 25 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FUTURA 75 ανά άρδευση

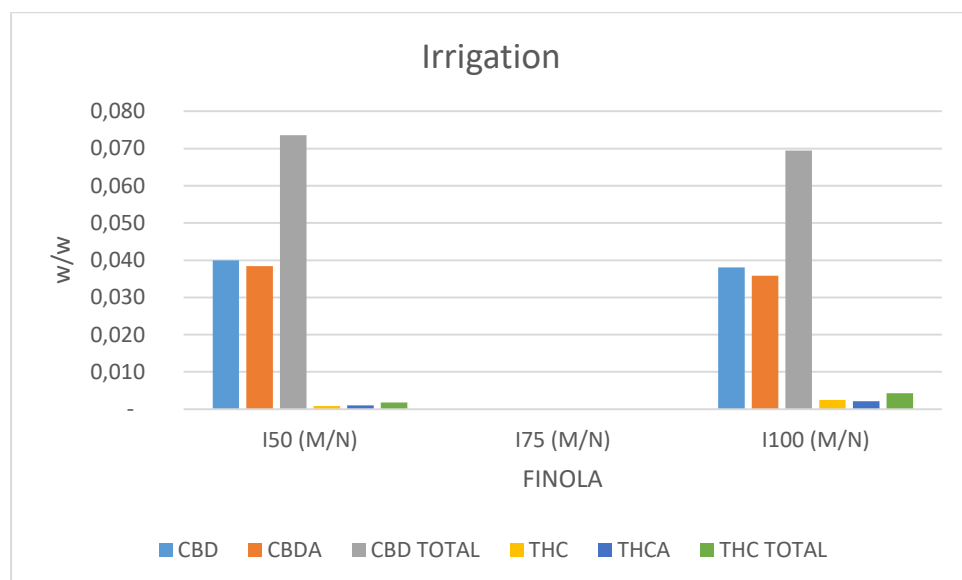
Και σε αυτή την ποικιλία όπως και στις προηγούμενες η εφαρμογή λίπανσης, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα, (Διάγραμμα 26), στα φυτά παίζει καθοριστικό ρόλο αφού οι σπόροι από τα φυτά στα οποία έγινε εφαρμογή λίπανσης είχαν μεγαλύτερη ποσότητα κανναβινοειδών σε σύγκριση με τους σπόρους που συλλέχθηκαν από φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε λίπανση. Όσο αναφορά τα υπόλοιπα κανναβινοειδή παρατηρείται πως η ποσότητα είναι μηδαμινή πράγμα που σημαίνει πως και εδώ η λίπανση δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο.



Διάγραμμα 26 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FUTURA 75 ανά λίπανση

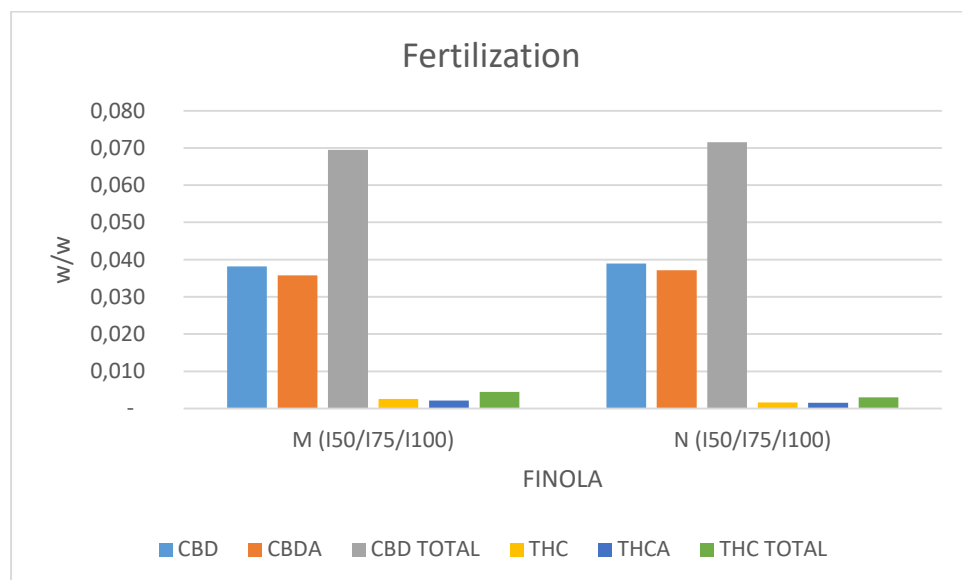
Στην ποικιλία FINOLA από το διάγραμμα 27 φαίνεται πως στους σπόρους που προέρχονταν από φυτά στα οποία εφαρμόστηκε η μικρότερη ποσότητα νερού η συνολική ποσότητα του CBD ήταν υψηλότερη από τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε η μεγαλύτερη ποσότητα νερού όμως τόσο το CBD όσο και το CBDA ήταν σχεδόν στα ίδια επίπεδα. Όσο αναφορά τα υπόλοιπα

κανναβινοειδή φαίνεται πως και στις δύο περιπτώσεις άρδευσης η συγκέντρωση είναι πολύ μικρή. Στην συγκεκριμένη ποικιλία δεν υπήρχαν δείγματα σπόρων από φυτά στα οποία εφαρμόστηκε η ενδιάμεση ποσότητα νερού (I75).



Διάγραμμα 27 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FINOLA ανά άρδευση

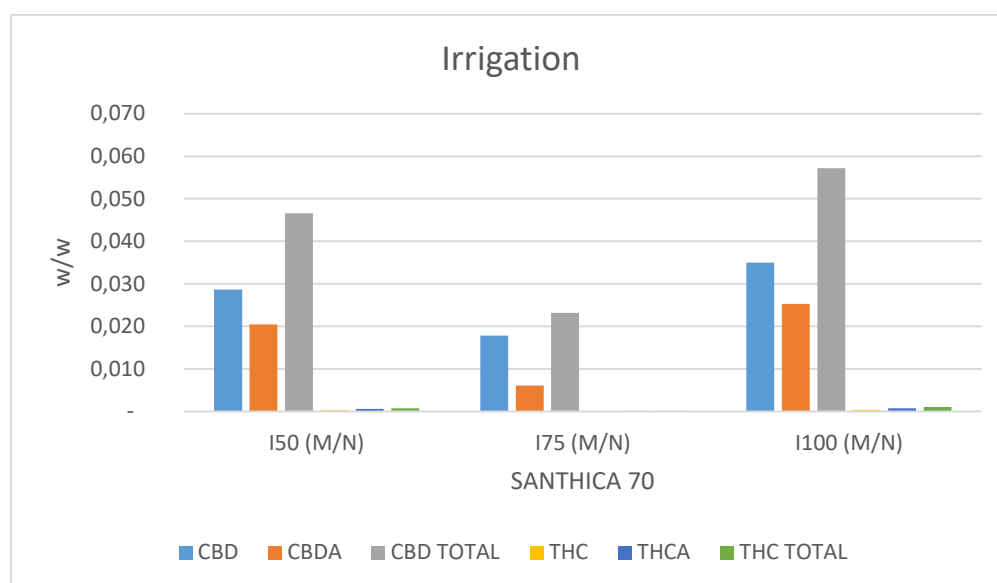
Όσο αναφορά την λίπανση από το διάγραμμα 28 φαίνεται πως στην ποικιλία FINOLA δεν παίζει ιδιαίτερο ρόλο και αυτό διότι η διαφορά στη συγκέντρωση των κανναβινοειδών στους σπόρους κάνναβης στα φυτά που εφαρμόστηκε λίπανση αλλά και στα φυτά που δεν εφαρμόστηκε δηλαδή στους μάρτυρες είναι πολύ μικρό.



Διάγραμμα 28 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FINOLA ανά λίπανση

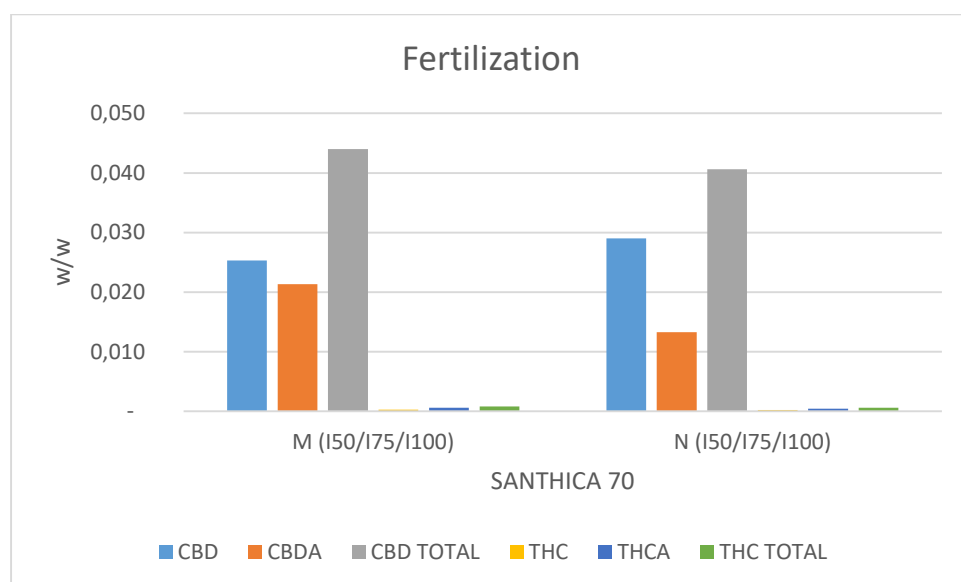
Όπως και στην περίπτωση της ποικιλίας FUTURA 75 έτσι και εδώ η συγκέντρωση του CBD, CBDA αλλά και του CBD TOTAL είναι λίγο μεγαλύτερη στα σπόρους όπου εφαρμόστηκε η μεγαλύτερη ποσότητα νερού ενώ στην ενδιάμεση άρδευση (I75) είχαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση. Οπότε εδώ η άρδευση παίζει ρόλο στη συγκέντρωση των παραπάνω

κανναβινοειδών. Στα υπόλοιπα κανναβινοειδή η άρδευση δε παίζει ρόλο αφού και στις τρεις περιπτώσεις η συγκέντρωση είναι απειροελάχιστη (Διάγραμμα 29)



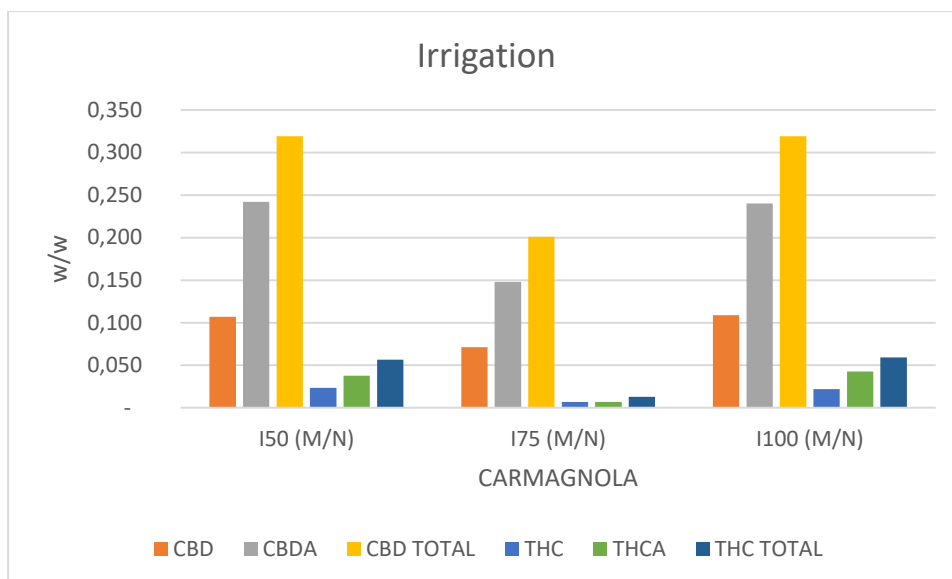
Διάγραμμα 29 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA 70 ανά άρδευση

Όσο αναφορά τη λίπανση από το διάγραμμα 30 φαίνεται πως η συγκέντρωση του CBD είναι μεγαλύτερη στα φυτά που εφαρμόστηκε λίπανση ενώ η συγκέντρωση του CBDA αλλά και του CBD TOTAL είναι μεγαλύτερη έστω και με μικρή διαφορά στους μάρτυρες.



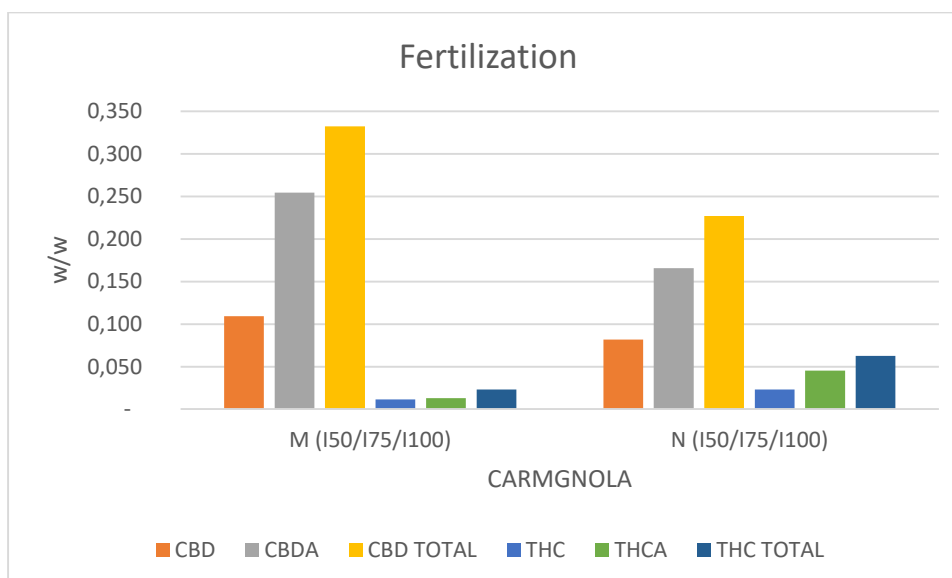
Διάγραμμα 30 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας SANTHICA 70 ανά λίπανση

Στη ποικιλία CARMAGNOLA από το διάγραμμα 31 φαίνεται πως τόσο την μικρότερη δόση νερού όσο και στη μεγαλύτερη δόση νερού η συγκέντρωση όλων των κανναβινοειδών είναι ίδια ενώ στην ενδιάμεση ποσότητα νερού (175) η συγκέντρωση είναι μικρότερη.



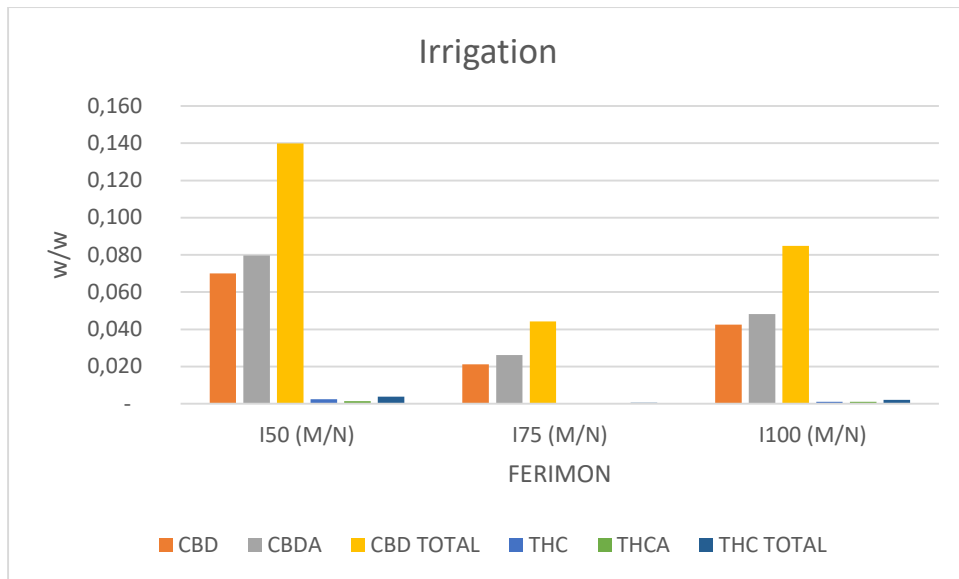
Διάγραμμα 31 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας CARMAGNOLA ανά άρδευση

Σε αυτή την ποικιλία η λίπανση δε διαδραματίζει κανένα ρόλο αφού υψηλότερη συγκέντρωση του CBD και CBDA παρατηρείτε στους σπόρους που προέρχονται από φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε λίπανση δηλαδή στους μάρτυρες σε σύγκριση με τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε λίπανση (Διάγραμμα 32).



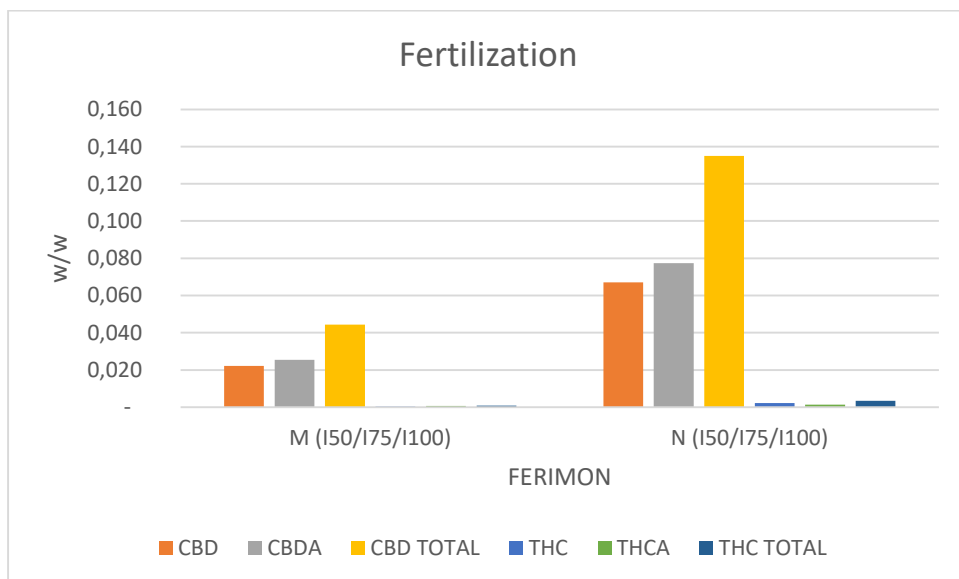
Διάγραμμα 32 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας CARMAGNOLA ανά λίπανση

Στη ποικιλία FERIMON τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε η μεγαλύτερη δόση νερού και τη τριπλάσια από τα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε η ενδιάμεση δόση νερού (Διάγραμμα 33).



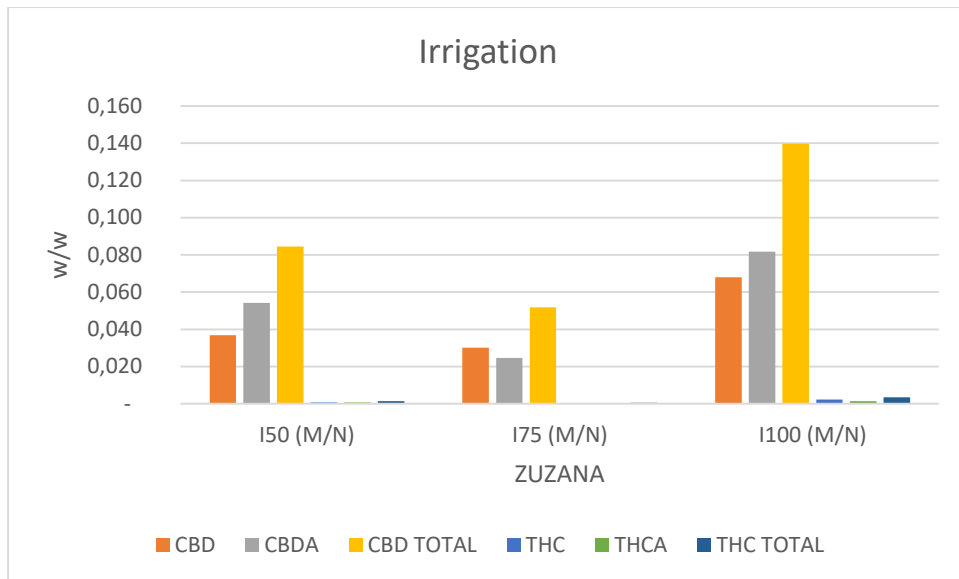
Διάγραμμα 33 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FERIMON ανά άρδευση

Η λίπανση όπως και σε άλλες ποικιλίες βοηθάει σημαντικά στην ανάπτυξη του φυτού και μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης των κανναβινοειδών ενώ στους μάρτυρες ενδεχομένως να μην υπήρξε η αντίστοιχη ανάπτυξη των φυτών με αποτέλεσμα αυτά τα φυτά να είχαν και χαμηλότερη συγκέντρωση κανναβινοειδών (Διάγραμμα 34).



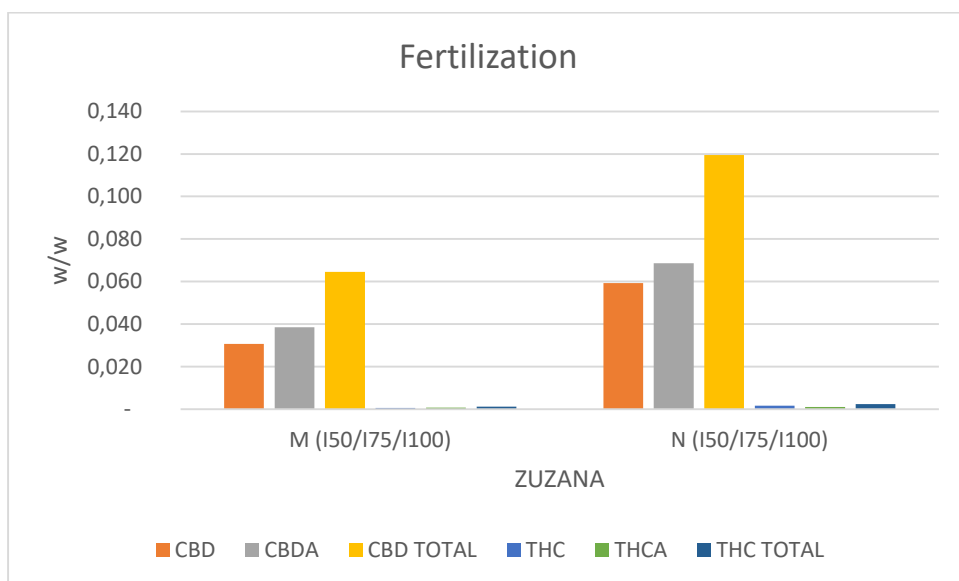
Διάγραμμα 34 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FERIMON ανά λίπανση

Η ποικιλία ZUZANA είναι μια από τις ελάχιστες περιπτώσεις στην οποία η υψηλότερη ποσότητα νερού επιδρά θετικά στην αύξηση των κανναβινοειδών στους σπόρους των φυτών σε σχέση με τη χαμηλότερη δόση νερού όπως προέκυψαν στις περισσότερες περιπτώσεις ενώ όπως συμβαίνει σε όλες τις ποικιλίες η ενδιάμεση δόση νερού έχει τη χαμηλότερη συγκέντρωση σε κανναβινοειδή (Διάγραμμα 35).



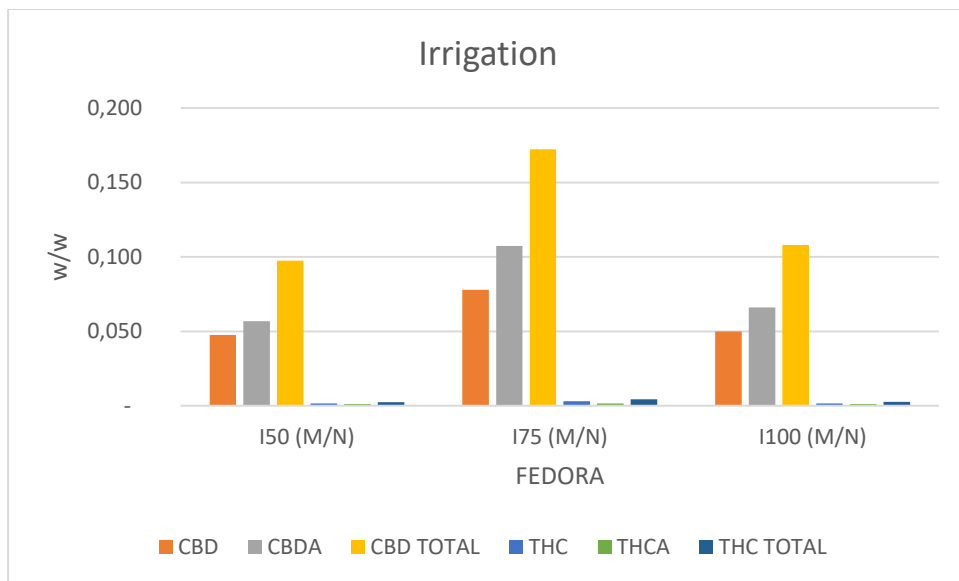
Διάγραμμα 35 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας ZUZANA ανά άρδευση

Και εδώ η λίπανση συμβάλει σημαντικά στην ανάπτυξη των φυτών με αποτέλεσμα οι σπόροι που συλλέγονται να έχουν διπλάσια συγκέντρωση σε κανναβινοειδή σε σύγκριση με τους αντίστοιχους σπόρους που συλλέγονται από φυτά στα οποία δεν εφαρμόστηκε η λίπανση (Διάγραμμα 36).



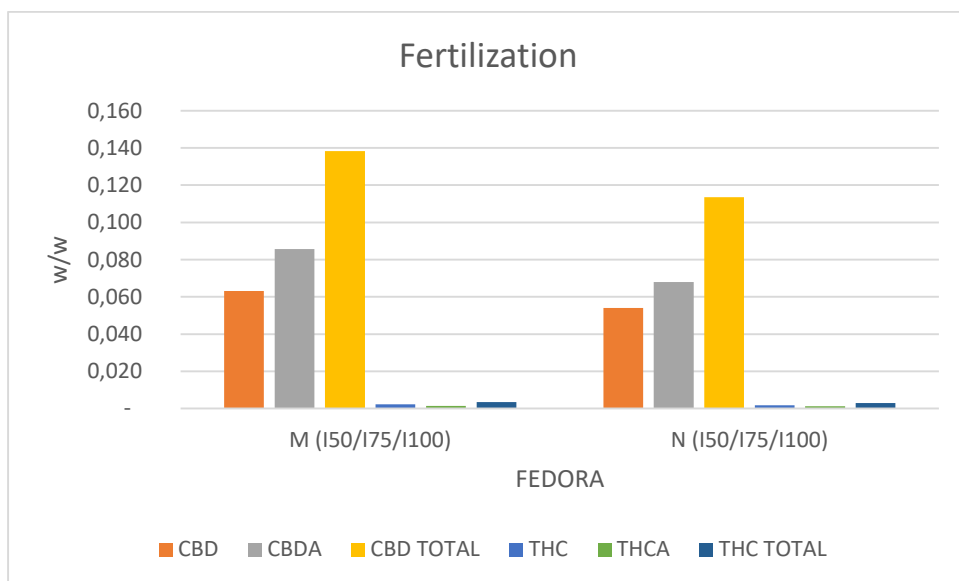
Διάγραμμα 36 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας ZUZANA ανά λίπανση

Η ποικιλία FEDORA είναι η μοναδική περίπτωση κατά την οποία παρατηρείται πως η ενδιάμεση ποσότητα νερού δηλαδή 175 παρουσιάζει σχεδόν διπλάσια συγκέντρωση σε κανναβινοειδή σε σύγκριση με τις άλλες δύο δόσεις 150 και 1100 στις οποίες η συγκέντρωση είναι σχεδόν ίδια με μικρές αποκλίσεις (Διάγραμμα 37).



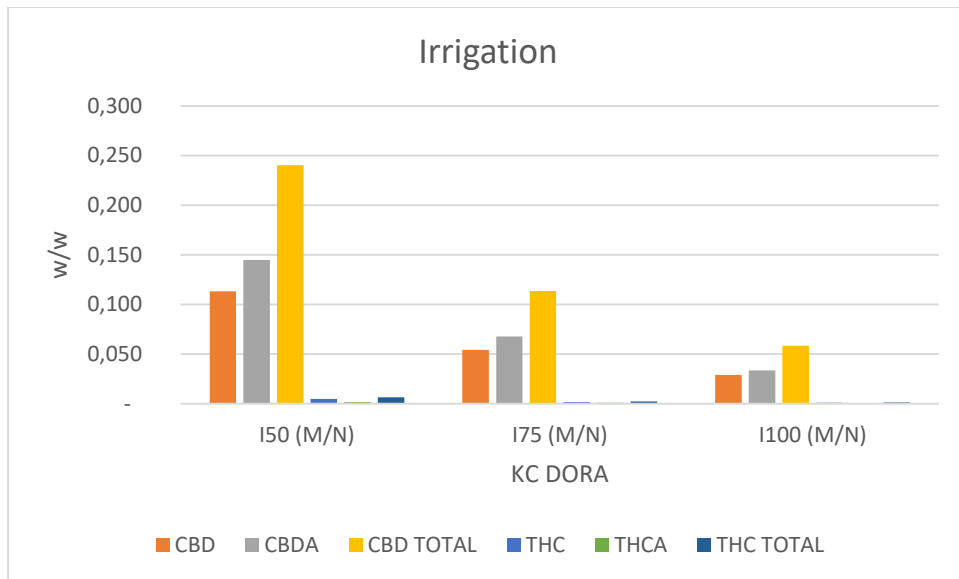
Διάγραμμα 37 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FEDORA ανά άρδευση

Και εδώ όπως και σε άλλες ορισμένες περιπτώσεις η λίπανση δε παίζει ρόλο αφού σε φυτά στα οποία εφαρμόστηκε λίπανση είχαν χαμηλότερη συγκέντρωση σε κανναβινοειδή σε σχέση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 38).



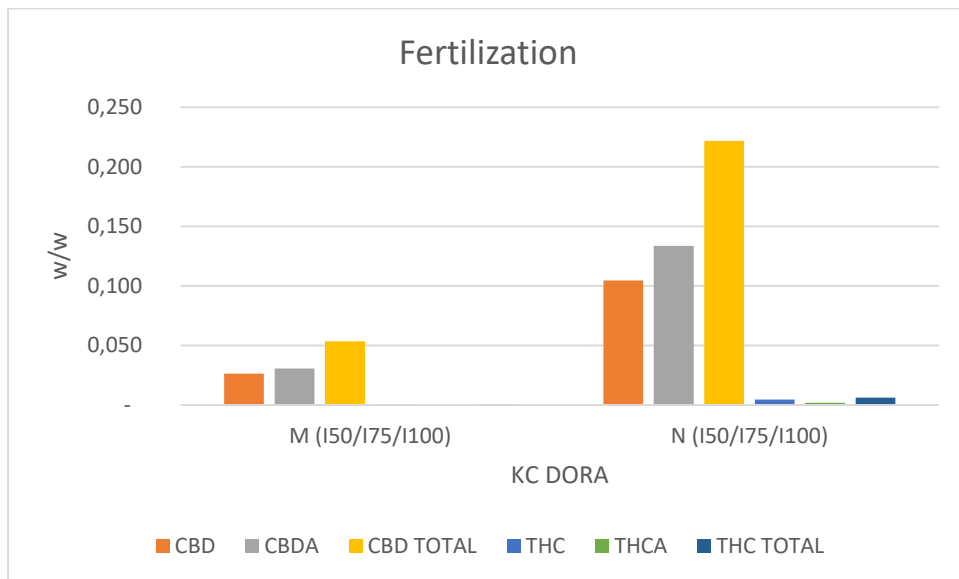
Διάγραμμα 38 - Συγκέντρωση κανναβινοειδών ποικιλίας FEDORA ανά λίπανση

Τέλος, στην ποικιλία KC DORA φαίνεται πως η συγκέντρωση των κανναβινοειδών CBD και CBDA άρα και του CBD TOTAL είναι μεγαλύτερη στα φυτά στα οποία εφαρμόστηκε η μικρότερη ποσότητα νερού (I50) σε σύγκριση με εκείνα στα οποία εφαρμόστηκαν οι άλλοι τύποι άρδευσης (I75 και I100). Αντίθετα, όσο αναφορά τα υπόλοιπα κανναβινοειδή (THC, THCA άρα και THC TOTAL) φαίνεται πως ο τύπος άρδευσης δεν επηρέασε σημαντικά την συγκέντρωσή τους αφού και στις τρεις περιπτώσεις είναι ελάχιστη (Διάγραμμα 39).



Διάγραμμα 39 - Συγκέντρωση κανναβιοειδών ποικιλίας KC DORA ανά άρδευση

Και σε αυτή την περίπτωση φαίνεται πως η λίπανση παίζει πάρα πού σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και αυτό διότι η συγκέντρωση των κανναβιοειδών είναι σχεδόν τετραπλάσια με την αντίστοιχη που παρατηρείται στους μάρτυρες (Διάγραμμα 40).



Διάγραμμα 40 - Συγκέντρωση κανναβιοειδών ποικιλίας KC DORA ανά λίπανση

Εξετάζοντας όμως τους δύο παράγοντες που είναι η άρδευση και η λίπανση από άποψη επιπέδου κανναβιοειδών παρατηρείται πως ο παράγοντας άρδευση διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στη συγκέντρωση των κανναβιοειδών σε σχέση με εκείνον της λίπανσης. Όποτε στα τελικά διαγράμματα η σύγκριση των κανναβιοειδών στους σπόρους των ποικιλιών κάνναβης θα γίνει με βάση τον παράγοντα της άρδευσης.

Γενικά, οι διαφορές που παρατηρούνται στις αποδόσεις των ελαίων ενδέχεται να προκύπτουν, συνεπώς και να αιτιολογούνται, από παράγοντες σχετιζόμενους με περιβαλλοντικές, κλιματολογικές, γεωγραφικές και εδαφολογικές συνθήκες, καλλιεργητικές συμπεριφορές (λίπανσης, άρδευσης κ.α.), τακτικές συλλογής (περίοδος, βαθμός ωρίμανσης, φυτικό τμήμα κ.α.), καλλιεργουμένων ποικιλιών. Φαίνεται επίσης η συγκέντρωση κανναβινοειδών να επηρεάζεται από το μέσο και τη διαδικασία εκχύλισης. Οι διαπιστώσεις αυτές επιβεβαιώνονται τόσο από αρκετές ερευνητικές εργασίες (Holler et al., 2008; Παπακώστα – Τασοπούλου, 2013; Small, 2015; Naz et al., 2017; Μουντάκης – Κρητικός, 2018; Δημητρακοπούλου, 2020; Glivar et al., 2020) όσο και από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας. Σύμφωνα με τους Chang et al. (2017), η μέθοδος εκχύλισης με μικροκύματα (MAE) φαίνεται μια σύγχρονη, αποτελεσματική διαδικασία με υψηλή εκχυλιστική απόδοση σε κανναβινοειδή, η οποία ακολουθείται και στην παρούσα εργασία δίνοντας ακριβή αποτελέσματα. Όσον αφορά το φυτικό τμήμα, οι Namdar et al. (2018) και οι Glivar et al. (2020), διευκρινίζουν ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση κανναβινοειδών εντοπίζεται στο ανώτερο τμήμα της ταξιανθίας συγκριτικά με το κατώτερο., οι Glivar et al. (2020) παρατηρούν ότι και το φυτικό τμήμα (βράκτια) επηρεάζει τη συγκέντρωση της ολικής κανναβιδιόλης (CBD) και της τετραυδροκανναβινόλης (THC). Συνεχίζοντας δε οι Glivar et al. (2020), συσχετίζουν τις περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας με την παραγωγή κανναβιδιόλης (CBD), θεωρώντας πως οι ευνοϊκές συνθήκες καλλιέργειας συμβάλλουν καθοριστικά στην υψηλότερη παραγωγή και περιεκτικότητα της κανναβιδιόλης (CBD). Οι συνθήκες και ανωτέρω παράγοντες λαμβάνονται υπόψη, δια την ορθότερη και εγκυρότερη αποτελεσματικότητα εκχύλισης και απόδοσης σε έλαιο.

Γενικά, αναφέρεται ότι η βιομηχανική κάνναβη θεωρείται χαμηλής περιεκτικότητας σε τετραυδροκανναβινόλης (THC), σε ποσοστό μικρότερο του 1% και υψηλής σε κανναβιδιόλη (CBD) και κανναβιγερόλη (CBG) (Chandra et al., 2017). Σε δημοσιευμένες έρευνες της IHEMP FARMs σημειώνεται η περιεκτικότητα κανναβιδιόλης (CBD) και τετραυδροκανναβινόλης (THC) για τις ποικιλίες Futura 75 και Fedora 17, με κατ' αντιστοιχία τιμές 1.0 – 2.0 (%) και (<0.07), ενώ οι αντίστοιχες περιεκτικότητες για την ποικιλία Santhica 27 φθάνουν σε ποσοστά (<0.5) και (<0.01). Συνεπώς δύναται να θεωρηθεί μια σχετική τάση εξάρτησης των συγκεντρώσεων και των καλλιεργουμένων ποικιλιών.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα της Δημητρακοπούλου (2020), ανιχνεύεται σε υψηλές συγκεντρώσεις η κανναβιδιόλη (CBD), σε τρεις διαφορετικές ποικιλίες κάνναβης (Fedora, Felina, Futura). Στην εν λόγω εργασία φαίνεται ότι οι παράγοντες ποικιλία και λίπανση δεν συμμετέχουν σημαντικά στον καθορισμό της συγκεντρώσεως της CBD στα αιθέρια έλαια, ενώ όσον αφορά την άρδευση, φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο την συγκέντρωση της CBD. Παρ' όλα αυτά, η εφαρμοζόμενη λίπανση και το είδος της (ως καλλιεργητικός παράγοντας) ενδέχεται να επηρεάζουν τα επίπεδα κανναβιδιόλης, ανεξαρτήτως ποικιλίας. Η λίπανση σε αυτήν την εργασία δε θεωρείται σημαντικός παράγοντας ελέγχου της συγκεντρώσεως CBD στα αιθέρια έλαια ανά εξεταζόμενη ποικιλία. Σε αντίθεση με τις παραπάνω έρευνες, οι Naz et al. (2017) δεν καταγράφουν συγκέντρωση κανναβιδιόλης (CBD) στα δείγματά των ελαίων, τα οποία εξετάζονται με την μέθοδο αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών. Επομένως, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές επιβεβαιώνεται ότι καλλιεργητικοί παράγοντες λίπανσης και άρδευσης μπορούν να επηρεάσουν την συγκέντρωση κανναβιδιόλης (CBD) στο φυτικό υλικό και στο αιθέριο έλαιο ανεξαρτήτως ή όχι της καλλιεργουμένης ποικιλίας.

Ερευνητικά αποτελέσματα των Petrovic et al. (2015), καταγράφουν ως υψηλής σημαντικότητας την συγκέντρωση της τετραυδροκανναβινόλης (THC) και κανναβιδιόλης (CBD) σε εκχύλισμα σπόρων κάνναβης. Κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας παρουσιάζεται χαμηλή περιεκτικότητα (ανεξαρτήτως άρδευσης ή

λίπανσης) σε THC, γεγονός το οποίο ενδέχεται να αιτιολογείται από την απουσία της, στις υπό εξέταση ποικιλίες. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από την παρατήρηση των Petrovic et al. (2015), όπως η περιεκτικότητα των κανναβινοειδών, και ειδικότερα της THC, βρίσκεται ισχυρά εξαρτώμενη από την ποικιλία. Επιπλέον, σε διάφορες ερευνητικές προσπάθειες εξετάζεται το μεγάλο εύρος τιμών που ακολουθεί η THC (Lachenmeier et al., 2004; Pellegrini et al., 2005), ενώ και στο πείραμα αυτό εμφανίζονται κάποιες παρόμοιες διακυμάνσεις οι οποίες σχετίζονται κατά το μάλλον ή ήττον με τους παράγοντες, ποικιλία και άρδευση.

Ιδιαίτερη σημασίας εμφανίζουν τα αποτελέσματα των Glivar et al. (2020), αναφερόμενα στα εξαιρετικά υψηλά επίπεδα total THC (ολική τετραϋδροκανναβινόλη) για την ποικιλία Carmagnola, τα οποία ταυτίζονται σχετικά με τα αντίστοιχα του παρόντος συγγράμματος (στους σπόρους κάνναβης). Μια πιθανή αιτία της είναι η ύπαρξη ανομοιομορφου γενετικού υλικού, το οποίο προκαλεί υψηλές τιμές της total THC (ολική τετραϋδροκανναβινόλη), αλλά και στη ίδια την καλλιεργούμενη ποικιλία και τα χαρακτηριστικά της η οποία εμφανίζει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε THC συγκριτικά με άλλες ποικιλίες. Πέραν τούτου, παρουσιάζονται στοιχεία και για την total CBD (ολική κανναβιδιόλη) και τη CBD (κανναβιδιόλη), οι οποίες καταγράφουν υψηλές συγκεντρώσεις στα αποτελέσματα και των δύο πειραμάτων για την ποικιλία Carmagnola, ενώ χαμηλές στις περιπτώσεις των ποικιλιών Santhica 27 και Uso. Επίσης, φαίνεται από την παρούσα εργασία ότι η άρδευση δύναται να επηρεάσει την συγκέντρωση κανναβιδιολικού οξέος (CBDA) της εκάστοτε καλλιεργουμένης ποικιλίας κατά τρόπο σημαντικό ή όχι, με αποτέλεσμα αντίστοιχες αλλαγές στην total CBD (ολική κανναβιδιόλη). Το γεγονός ότι η ποικιλία φαίνεται να παρουσιάζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των συγκεντρώσεων των κανναβινοειδών, επιβεβαιώνεται τόσο από τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος όσο και από την εργασία των Glivar et al. (2020) με τη χαμηλή περιεκτικότητα της ποικιλίας Santhica 27 σε ολική τετραϋδροκανναβινόλη (THC) και ολική κανναβιδιόλη (CBD) και ως εκ τούτου να θεωρείται λιγότερο κατάλληλη για την παραγωγή κανναβιδιόλης (CBD) και λοιπών κανναβινοειδών. Εν πολλοίς διακριτός παράγοντας δύναται να θεωρηθεί η ομοιομορφία της εκάστοτε ποικιλίας ως προς την περιεκτικότητα σε κανναβινοειδή.

Οι Marinko Petrovic et al. (Petrovic et al. 2015) χρησιμοποίησαν 11 διαφορετικές ποικιλίες ελαίου κάνναβης εμπορικής ποιότητας από διαφορετικές χώρες του κόσμου σε αντίθεση με την παρούσα διπλωματική που τα έλαια κάνναβης ελήφθησαν από το φυτό. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πολλά και διαφορετικά αντιδραστήρια (διαλύτες) μεταξύ των οποίων είναι και το ακετονιτρίλιο όπως χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα εργασία. Και στις δύο περιπτώσεις η εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των υπερήχων στο ίδιο χρονικό διάστημα των 15 min αλλά σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Μελέτησαν κάποια κανναβινοειδή όπως το CBD, THC και CBN σε αντίθεση με την παρούσα εργασία στην οποία εξετάστηκαν το CBD και το CBDA με κοινό να αποτελεί το CBD. Παρατηρήθηκε πως η ποσότητα του CBD στα 11 δείγματα ελαίου κάνναβης κυμαίνονταν από 4.2 έως 243.7 mg/Kg (μg/g) ενώ στην παρούσα εργασία η ποσότητα στις 10 ποικιλίες κυμαίνονταν από 17.41 έως 35.99 μg/g με τις USO 31, FINOLA, FERIMON, KC ZUZANA και CARMAGNOLA να παρουσιάζουν την υψηλότερη περιεκτικότητα με 35.29, 35.06, 35.95, 35.45, 35.99 μg/g αντίστοιχα. Από τις παραπάνω μετρήσεις προκύπτει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις η παρούσα διπλωματική έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με άλλες ποικιλίες που έδωσαν οι Marinko et al. Επομένως, με βάση τα αποτελέσματα η εκχύλιση με υπερήχους και με διαλύτη το ακετονιτρίλιο θα μπορούσε να προταθεί ως μια καλή μέθοδο εκχύλισης για την ποσοτικοποίηση των κανναβινοειδών σε δείγματα κανναβελαίου.

Η μελέτη των Katarzyna Madej et al. (2020) επικεντρώθηκε στην ανάπτυξη μιας γρήγορης, απλής, φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου εκχύλισης υγρού- υγρού από δείγμα ελαίου

κάνναβης για την απομόνωση CBD και CBDA. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως η απόδοση της CBD κυμαίνονταν από 97.3 έως 109.5% και για τη CBDA η απόδοση ήταν από 69.1 έως 69.5%, ενώ οι επαναλήψεις οδήγησαν στη μείωση των αποδόσεων. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και την παρούσα εργασία. Η ποσότητα CBD στις ποικιλίες του ελαίου κάνναβης της μελέτης κυμαίνονταν από 14.41 έως 35.99 μg/g. Αντίστοιχα, η περιεκτικότητα του CBDA κυμάνθηκε από 7.92 έως 15.05 μg/g (Πίνακας 20). Συγκρινόμενες, οι δύο μελέτες οδηγούν περίπου στα ίδια αποτελέσματα ανάλογα πάντα με τον ίδιο όγκο διαλύτη και τον αριθμό των επαναλήψεων.

Όσο αναφορά τους σπόρους, υπάρχουν, επίσης, πολλές μελέτες που αναφέρονται στον προσδιορισμό των κανναβινοειδών χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές εκχύλισης μεταξύ των οποίων και τα μικροκύματα, μια τεχνική που εφαρμόστηκε και στην παρούσα διπλωματική.

Οι Chi-Wei Chang et al. για την εκχύλιση με μικροκύματα χρησιμοποίησαν 1 g σπόρων κάνναβης σε σχέση με την παρούσα εργασία που χρησιμοποιήθηκε η μισή ποσότητα (0.5 g) και 12 mL μεθανόλη μικρότερη από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμά μας (20 mL). Αυτές οι διαφορές μπορεί να επηρεάζουν τη συγκέντρωση των κανναβινοειδών στο εκχύλισμα. Στη μελέτη των Chi-Wei Chang et al. ο χρόνος εκχύλισης ήταν 30 min, θερμοκρασία 109 °C και ισχύς 375 Watt συνθήκες που διαφέρουν κατά πολύ με τις αντίστοιχες της διπλωματικής (χρόνος 30 min, θερμοκρασία 60 °C, ισχύς 1000 Watt). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χρήση της μεθανόλης έδωσε τις μεγαλύτερες αποδόσεις σε σχέση με άλλους διαλύτες (αιθανόλη, ακετονιτρίλιο, νερό, ισοπροπανόλη). Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάστηκε και στην παρούσα μελέτη, όπου χρησιμοποιώντας μεθανόλη και αιθανόλη φαίνεται ότι μεγαλύτερη συγκέντρωση ήταν στην περίπτωση της μεθανόλης. Αυτό δείχνει ότι ο συγκεκριμένος διαλύτης ήταν ο πιο κατάλληλος για την εκχύλιση των σπόρων και τον προσδιορισμό των κανναβινοειδών στις ίδιες συνθήκες. Όταν οι συνθήκες αλλάζουν τότε επηρεάζεται και η απόδοση. Αξίζει να σημειωθεί πως οι Brighenti et al. αποκάλυψαν ότι οι αλκοόλες είναι οι πιο κατάλληλοι διαλύτες εκχύλισης των κανναβινοειδών. Οι Chi-Wei Chang et al. μελέτησαν τις αποδόσεις σε διάφορες ρυθμίσεις ισχύος (100-1300 Watt) αλλά συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα σε ισχύ περίπου 1000 Watt που ήταν η ισχύς του συγκεκριμένου πειράματος. Από τη μελέτη προκύπτει ότι σε χαμηλή ισχύ (500 Watt) η συγκέντρωση των κανναβινοειδών ήταν υψηλότερη από εκείνη σε οποιαδήποτε άλλη ισχύ. Στην παρούσα διπλωματική εργασία η ποσότητα των κανναβινοειδών ήταν μικρότερη για την ποικιλία KC DORA I100 M ως προς το CBD (71.55 μg/g) και 89.44 μg/g για το CBD TOTAL ενώ για την ίδια ισχύ (1000 Watt) μεγαλύτερη ποσότητα κανναβινοειδή παρουσίασε η ποικιλία CARMAGNOLA I100 M με αποδόσεις 1447,26 μg/g για το CBD και 4771.84 μg/g για το CBD TOTAL (Πίνακας 17). Όσο αναφορά την THC η ποσότητα ήταν μικρότερη τόσο στη μελέτη των Chi-Wei Chang et al. όσο και την παρούσα εργασία.

Οι Chi-Wei Chang et al. παρατήρησαν πως σε θερμοκρασία 60 °C η THC είχε ελαφρώς μεγαλύτερη απόδοση από τη CBD. Επιπλέον, σημαντική επίδραση στις αποδόσεις έχει και ο χρόνος εκχύλισης και προκύπτει ότι στο μικρότερο χρόνο (15 min) εμφανίζεται μέγιστη απόδοση ενώ όσο αυξάνεται ο χρόνος (30 min) η απόδοση μειώνεται.

Επιπλέον, οι Chi-Wei Chang et al. χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους εκχύλισης παρατήρησαν ότι η μέθοδος με μικροκύματα (MAE) δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα το ίδιο ακριβώς που διαπιστώθηκε και στην παρούσα διπλωματική. Τελικά, η MAE προτείνεται ως η καταλληλότερη μέθοδος εκχύλισης σπόρων κάνναβης.

Αξίζει να σημειωθεί, πως οι Taja Glivan et al. εξέτασαν διάφορα κανναβινοειδή (CBG, CBD, THC) αλλά θα γίνει σύγκριση μεταξύ των CBD και THC όπου οι διαφορές μεταξύ των ποικιλιών ήταν σημαντικές. Παρατηρήθηκαν μεγαλύτερες αποδόσεις της CBD (1,5 – 2%) στη ποικιλία FEDORA 17 ενώ για την ίδια ποικιλία η συγκέντρωση της THC ήταν < 0.006%. Αντίθετα, στην παρούσα εργασία η μεγαλύτερη απόδοση της CBD παρουσιάζεται στην ποικιλία CARMAGNOLA I100 M (0.1447%) και η συγκέντρωση της CBD TOTAL είναι 0.4772%) ενώ ποικιλία GARMAGNOLA I100 N παρουσιάζει υψηλή απόδοση ως προς τη THC (0.343%) και τη THC TOTAL (0.1014%) όπως φαίνεται στον Πίνακα 16. Επιπλέον, η μικρότερη απόδοση (ίχνη) της THC παρατηρήθηκε στην ποικιλία SANTHICA I100 N με ποσοστό 0.0002% ενώ το ποσοστό της THC TOTAL ήταν 0.003% στις ποικιλίες USO I75 N και SANTHICA I75 N (Πίνακας 16). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι για όλες τις ποικιλίες το όριο < 0.2% της συνολικής THC δε θα ξεπεραστεί με τη κατάλληλη δειγματοληψία.

3 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η *Cannabis sativa* είναι ένα φυτό που παράγει μεγάλη βιομάζα με μεγάλη ποιότητα. Για αιώνες, αυτό το κοσμοπολίτικο είδος καλλιεργείται ως πηγή βιομηχανικής κάνναβης και χρησιμοποιείται μεταξύ άλλων για την παραγωγή λαδιού, χαρτιού, σχοινιών και άλλων προϊόντων. Ιδιαίτερη σημασία έχουν οι σπόροι της κάνναβης, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τροφίμων, ζωοτροφών και φαρμακευτικών προϊόντων. Επιπλέον, οι σπόροι της κάνναβης προσφέρουν οφέλη για την υγεία, μειώνοντας τα επίπεδα χοληστερόλης καθώς και την αρτηριακή πίεση. Ακόμα, βιοδραστικά πεπτίδια που προέρχονται από τους σπόρους κάνναβης αποτελούν πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Το έλαιο που προέρχεται από τους σπόρους κάνναβης χρησιμοποιείται ως υποκατάστατο βουτύρου. Ακόμα, είναι πολύ δημοφιλές στους ιατρικούς και ερευνητικούς τομείς λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του κατά διαφόρων ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια και μύκητες. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το έλαιο κάνναβης είναι πλούσιο σε βιταμίνη Α και Ε και αποτελείται από μέταλλα όπως σίδηρο, ψευδάργυρο, ασβέστιο, μαγνήσια κ.ά.

Είναι γεγονός πως υπάρχουν πολλοί τρόποι που μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση των σπόρων της κάνναβης για την παραλαβή του ελαίου. Μερικοί από αυτούς είναι η εκχύλιση με τη συσκευή Soxhlet, εκχύλιση με υπερήχους, εκχύλιση με μικροκύματα, δυναμική εκχύλιση, εκχύλιση υπό πίεση, υπερκρίσιμη εκχύλιση υγρών και δυναμική εκχύλιση σπόρων κάνναβης. Κάθε τρόπος εκχύλισης έχει κάποια πλεονεκτήματα και κάποια μειονεκτήματα. Στη συγκεκριμένη διπλωματική συγκρίθηκαν δύο ευρέως χρησιμοποιούμενοι μέθοδοι εκχύλισης, αυτή των υπερήχων και αυτή των μικροκυμάτων. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν βγαίνει το συμπέρασμα πως καλύτερη μέθοδος εκχύλιση για τους σπόρους κάνναβης είναι εκείνη των μικροκυμάτων.

Η κάνναβη είναι μια εξειδικευμένη καλλιέργεια που παρουσιάζει μεγάλες δυνατότητες στο πλαίσιο της αναπτυσσόμενης βιο-βασισμένης οικονομίας. Βραχυπρόθεσμα, αναμένεται, σημαντική βελτίωση των προϊόντων της κάνναβης και των ευρύτερων εφαρμογών τελικής χρήσης. Αυτό θα υλοποιηθεί, συνδυαστικά με το πλήρες δυναμικό της κάνναβης, όταν θα έχουν αναγνωριστεί τα γονίδια που συμβάλλουν στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του φυτού. Αυτή η γνώση θα έχει αξιοποιηθεί κατά την ανάπτυξη ποικιλιών που είναι προσαρμοσμένες σε συγκεκριμένες χρήσεις μέσω των βιοτεχνολογικών εφαρμογών (Amaducci et al. 2015).

Η αναζήτηση καλλιεργειών με προστιθέμενη αξία είναι το ζητούμενο για την ανάπτυξη της Ελληνικής Αγροτικής Οικονομίας, ενώ παράλληλα σημειώνεται πως η καλλιέργεια ιδίως της φαρμακευτικής κάνναβης είναι μια επένδυση με υψηλά κεφάλαια και εξειδικευμένη τεχνογνωσία. Η συγκεκριμένη καλλιέργεια είναι άκρως εκμεταλλεύσιμη στο σύνολο των προϊόντων, παραπροϊόντων και υποπροϊόντων που προκύπτουν από την αξιοποίησή τους. Η προοπτική της αγοράς είναι της τάξης των 50 δισεκατομμυρίων ευρώ, ενώ τομείς που μπορούν να χρηματοδοτηθούν είναι η ενέργεια, μεταποίηση, αγροδιατροφή, διαχείριση εφοδιαστικής αλυσίδας, τουρισμός, τεχνολογία, επικοινωνίες.

Σχεδόν, όλα τα μέρη του φυτού μπορούν να αξιοποιηθούν όπως άνθη, εκχύλισμα, κ.ά. Αξίζει να σημειωθεί, πως πρωτοβουλίες από νέους ανθρώπους δημιουργούν προϊόντα τυροκομικά, αλλαντικά με πρωτεΐνη κάνναβης και προϊόντα αρτοποιίας όπως μείγμα για ψωμί με αλεύρι κάνναβης, πλούσιο σε φυτικές ίνες και αλεύρι με πρωτεΐνη κάνναβης και χωρίς γλουτένη. Όλα τα παραπάνω δε θα είναι ένοχα προϊόντα. Επιπλέον, πάνω από 100 ουσίες που

περιέχονται στην κάνναβη όπως τετραϋδροκανναβινόλη και κανναβιδιόλη έχουν φαρμακευτική και βιομηχανική χρήση (Πηγή ΑΠΕ)

Η αναιτιολόγητη κατάργηση της δυνατότητας καλλιέργειας κάνναβης εκτός καταλόγου Ε.Ε, οδήγησε στον αποκλεισμό οποιασδήποτε αξιοποίησης νέων και δυναμικών ποικιλιών με πολυάριθμες δυνατότητες παραγωγής καινοτόμων προϊόντων. Επίσης, καθυστερεί, χωρίς αιτία, η θέσπιση ορίων THC στα τρόφιμα. Καθώς η βιομηχανία κάνναβης αναπτύσσεται, η τεχνολογία θα πρέπει να συμβαδίζει με τις απαιτήσεις των καταναλωτών. Μια από τις πλέον καινοτόμες ιδέες της χρήσης κάνναβης είναι οι υπερπυκνωτές (συσκευές αποθήκευσης ενέργειας μεγάλης διάρκειας) κάνναβης. Στην ανάπτυξη ταχύτερων, φθηνότερων και μικρότερων υπερπυκνωτών, θα βοηθήσουν οι μπαταρίες κάνναβης. Ακόμα επισημαίνεται, ότι θα ξεπερνούν το γραφένιο σε αποθήκευση ενέργειας περίπου κατά 200% (Karche & Singh, 2019).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες παρατηρήθηκε τεράστιο ενδιαφέρον για τις θεραπευτικές ιδιότητες της κάνναβης. Η THC, το σημαντικότερο συστατικό της κάνναβης, καθώς και άλλες ενώσεις, οδήγησαν στην επιτάχυνση της έρευνας στη δεκαετία του 1980. Ο τρόπος με τον οποίον επιδρά η κάνναβη στον εγκέφαλο άνοιξαν νέες δυνατότητες για την εκμετάλλευση προϊόντων με βάση τη κάνναβη για ιατρική χρήση. Το ανανεωμένο επιστημονικό ενδιαφέρον για τα κανναβινοειδή φαίνεται αφενός από την αύξηση των ερευνητικών εργασιών σχετικά με τη βιολογία των κανναβινοειδών και αφετέρου από τον αριθμό των φαρμάκων που βρίσκονται σε φαρμακευτική ανάπτυξη (Pacher et al. 2006).

Η θεραπεία με βάση την κάνναβη είναι ένα ισχυρό και πολλά υποσχόμενο εργαλείο, καθώς εκμεταλλεύεται ένα υπάρχον σύστημα υποδοχέων ώστε να επηρεάσει διάφορα συστήματα του σώματος και βιολογικές διεργασίες. Αν και το σύστημα των ενδοκανναβινοειδών, ένα πολύπλοκο σύστημα, συνδέεται και με το μεταβολισμό των φαρμάκων, η θεραπεία με βάση την κάνναβη πρέπει να εξετάζεται και να εφαρμόζεται προσεκτικά. Πάντα, πρέπει να εξετάζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοκανναβινοειδών και κανναβινοειδών (συνθετικών ή φυτικών) και να λαμβάνονται μέτρα για την αναθεώρηση φαρμάκων και να ακολουθούνται διαδικασίες έγκρισης.

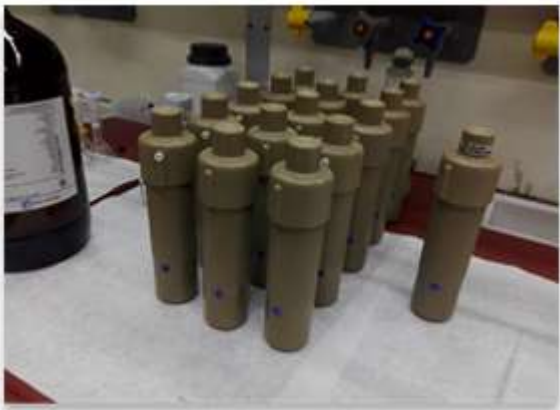
Σε διάφορα ερευνητικά εργαστήρια συνεχίζονται σημαντικές προσπάθειες προς την κατεύθυνση της αποκάλυψης των μηχανισμών και των τρόπων δράσης άλλων χημικών συστατικών που συνοδεύουν τα διάφορα κανναβινοειδή σε πολλά εκχυλίσματα όπως τερπένια και φλαβονοειδή. Προς το παρόν, οι προσπάθειες αυτές αποδεικνύονται μόνο σε κυτταρικό/ιστικό επίπεδο.

Τέλος, πιστεύεται ότι, καθώς οι προσπάθειες αυτές θα αποδώσουν καρπούς και θα αποκαλυφθεί ο τρόπος δράσης των κανναβινοειδών, η φαρμακοβιομηχανία με οδηγό τα στοιχεία αυτά θα οδηγηθεί στην ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών προϊόντων με βάση την κάνναβη.

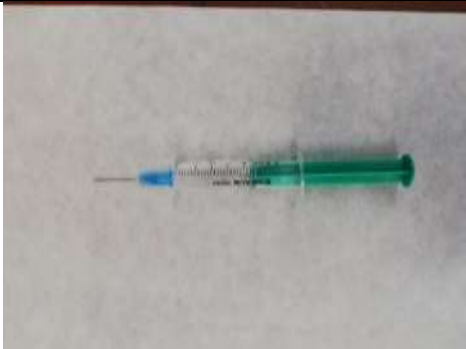
4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στον Πίνακα 21 φαίνεται ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Πίνακας 21 - Εξοπλισμός πειραματικής διαδικασίας

Ονομασία	Εικόνα
Λουτρό υπερήχων	
Ζυγός ακριβείας	
Δοχεία εκχύλισης μικροκυμάτων (closed vessel)	

Συσκευή εκχύλισης μικροκυμάτων (ΜΑΕ)	
Φιαλίδια eppendorf	
Πιπέτα ακριβείας	
Συσκευή ξήρανσης δειγμάτων (περιστροφικός εξατμιστήρας)	

Σύριγγα για παραλαβή εκχυλίσματος ελαίου	
Σύριγγα με φίλτρο	
Σύστημα UPLC	

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrams DI, Guzman M. (2015). Cannabis in cancer care
- Al-Taweel A., Perveen S. Terpenes and Terpenoids. IntechOpen London, UK: 2018. Chapter 1.
- Andre C. M., Hausman J. F., Guerriero G., 2016. Cannabis sativa: the plant of the thousand and one molecules.
- Andre C. M., Larondelle Y., and Evers D. (2010). Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: a review.
- Andre C. M., Schafleitner R., Legay S., Lefèvre I., Aliaga C. A., and Nomberto G. (2009). Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress.
- Antman E.M., Arnold J.M.O., Friedman P.L., Smith T.W. Pharmacokinetic drug interactions between digoxin and antiarrhythmic agents and calcium channel blocking agents: An appraisal of study methodology. Cardiovasc. Drugs Ther. 1987
- Audu B.S., Ofojekwu P.C., Ujah A., Ajima M.N.O. Phytochemical, proximate composition, amino acid profile and characterization of Marijuana (Cannabis sativa L.) [(accessed on 26 July 2020)]; J. Phytopharm. 2014
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed, A., Sahena F., . . . Omar, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering. 2013
- Barrett M.L., Gordon D., Evans F.J. Isolation from Cannabis sativa L. Of cannflavin—A novel inhibitor of prostaglandin production. Biochem. Pharm. 1985
- Bimakr M., Rahman R. A., Taip F. S., Ganjloo A., Salleh, L. M., Selamat J., . . . Zaidul, I. S. M.). Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (Mentha spicata L.) leaves. Food and Bioproducts Processing. 2011
- Brenneisen R. (2007). "Chemistry and analysis of phytocannabinoids and other cannabis constituents," in Marijuana and the Cannabinoids Forensic Science and Medicine, ed. M. ElSohly (New York, NY: Humana Press)
- Brujan E.A., P.R. Williams, Chemical Engineering Research and Design, 2006
- Burstein, S. (2015). Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation.
- Chandra S., Lata H. & El – Sohly, M. A. (2017). Cannabis sativa L., botany and biotechnology. Edition I, Springer
- Chang C. – W., Ching – Chi Y., Ming – Tsang W., Mei – Chich H. & Yu – Tse W. (2017). Microwave – assisted extraction of cannabinoids in hemp nut using response surface methodology, optimization, and comparative study.
- Colón LA, Cintrón JM, Anspach JA, Fermier AM, Swinney KA. Very high pressure HPLC with 1 mm id columns, Analyst. 2004
- De Petrocellis L., Ligresti A., Moriello A. S., Allarà M., Bisogno T., and Petrosino S. (2011). Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes.

- Di Marzo V., and Piscitelli F. (2015). The endocannabinoid system and its modulation by Phytocannabinoids.
- Duke JA, 1985. CRC Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- ElSohly M. A., and Slade D. (2005). Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. Life Sci.
- F.O. Schmitt, C.H. Johnson, A.R. Olson, Journal of the American Chemical Society 51, 1929
- Flores-Sanchez I. J., and Verpoorte R. (2008). Secondary metabolism in Cannabis. Phytochem.
- Fukumoto S., Sawasaki E., Okuyama S., Miyake Y., and Yokogoshi H. (2006). Flavor components of monoterpenes in citrus essential oils enhance the release of monoamines from rat brain slices.
- Gagne S. J., Stout J. M., Liu E., Boubakir Z., Clark S. M., and Page J. E. (2012). Identification of olivetolic acid cyclase from Cannabis sativa reveals a unique catalytic route to plant polyketides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
- Gertsch J., Pertwee R. G., and Di Marzo V. (2010). Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant – do they exist?
- Glivar T., Erzen J., Kreft S., Zagozen M., Cerenak A., Ceh B. & Benkovic T. E. (2020). Cannabinoid content in industrial hemp (Cannabis sativa L.) varieties grown in Slovenia. Industrial Crops & Products
- Guerriero G., Sergeant K., Hausman J. F. (2014). Wood biosynthesis and typologies: a molecular rhapsody.
- Guzman M. (2003). Cannabinoids: potential anticancer agents. Nat. Rev. Cancer
- Hao X. M., Yang Y., An L. X., Wang J. M., and Han L. (2014). Study on antibacterial mechanism of hemp fiber.
- Hazekamp A., Fisedick J., Llano-Diez M., Lubbe A., Ruhaak L. Comprehensive Natural Products Chemistry II. 2nd ed. Elsevier Ltd.; Oxford, UK: 2010. Chemistry of Cannabis.
- Hill A. J., Williams C. M., Whalley B. J., and Stephens G. J. (2012). Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in {CNS} disorders. Pharmacol.
- Holler M. J., Bosy Z. T., Dunkley S. C., Levine B., Past R. M. & Jacobs A. (2008). Δ^9 – Tetrahydrocannabinol content of commercially available hemp products. Journal of Analytical Toxicology
- Jang H., Park S., Nam J. The Effects of Heat Treatment on the Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Hempseed (Cannabis sativa L.) J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 2018
- Jerkovich AD, Mellors JS, Jorgenson JW. The use of micrometer-sized particles in ultrahigh pressure liquid chromatography, LC-GC North America. 2003
- Jin D., Dai K., Xie Z., Chen J. Secondary metabolites profiled in Cannabis inflorescences, leaves, stem barks, and roots for medicinal purposes. Sci. Rep. 2020.
- Karus M, Kaup M, Lohmeyer D, 2000. Study on markets and prices for natural fibres. Nova Institute Report for Bioresource Hemp Conference
- Kempinski C., Jiang Z., Bell S., and Chappell J. (2015). Metabolic engineering of higher plants and algae for isoprenoid production. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.

- Khan M. K., Abert-Vian M., Fabiano-Tixier A-S., Dangles O., & Chemat F. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange peel. Food Chemistry, 2010
- Kiprono P. C., Kaberia F., Keriko J. M., and Karanja J. N. (2000). The in vitro anti-fungal and anti-bacterial activities of beta-sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). Z. Naturforsch.
- Lachenmeier D. W., Kroener L., Musshoff F. & Madea B. (2004). Analysis and toxicological evaluation of cannabinoids in hemp food products, a review. Analytical and Bioanalytical Chemistry
- Leizer C., Ribnicky D., Poulev A., Dushenkov S., and Raskin I. (2000). The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. J. Nutraceutical. Funct. Med.
- Lydon J, Teramura AH, Coffman CB, 1987. UV-B radiation effects on photosynthesis, growth and cannabinoid production of two *Cannabis sativa* chemotypes. Photochemistry & Photobiology
- M. Vinatoru, COPERNICUS research program ERB-CIPA-CT94-0227-1995. 2000.
- M. Vinatoru, M. Toma, O. Radu, P.I. Filip, D. Lazurca, T.J. Mason, Ultrasonics Sonochemistry 4, 1997
- M. Vinatoru, T.J. Mason, I. Calinescu, Ultrasonically Assisted Extraction (UAE) and Microwave Assisted Extraction (MAE) of Functional Compounds from Plant Materials, 2017
- McPartland J. M., 2017. *Cannabis sativa* and *Cannabis indica* versus "Sativa" and "Indica". Switzerland, Springer International Publishing AG
- Meier, C., and Mediavilla, V. (1998). Factors influencing the yield and the quality of hemp (*Cannabis sativa* L.) essential oil.
- Meijer E. P. M., de Hammond K. M., and Micheler M. (2009). The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. (III): variation in cannabichromene proportion.
- Mignoni G, 1997. *Cannabis* as a licit crop: recent developments in Europe. Bulletin on Narcotics
- Munson A.E., Harris L.S., Friedman M.A., Dewey W.L. & Carchman, R.D (1975). Antineoplastic activity of cannabinoids. JNCI.
- Namdar D., Mazuz M., Ion A. & Koltai H. (2018). Variation in the compositions of cannabinoid and terpenoids in *Cannabis sativa* derived from inflorescence position along the stem and extraction methods. Industrial Crops & Products
- Naz S., Hanif M., Bhatti H. N. & Ansari T. M. (2017). Impact of supercritical fluid extraction and traditional distillation on the isolation of aromatic compounds from *Cannabis indica* and *Cannabis sativa*. Journal of Essential Oil-Bearing Plants
- Newman A.P., J.P. Lorimer, T.J. Mason, K.R. Hunt, Ultrasonics Sonochemistry 4, 1997
- Ngwa W., Kumar R., Thompson D., Lyerly W., Moore R., Reid T., Toyang N. Potential of flavonoid-inspired phytomedicines against COVID-19. Molecules. 2020
- Novakova L, Matysova L, Solich P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis, Talanta. 2006

- Osburn L. Hemp seed: The most nutritionally complete food source in the world. Hemp. Line J. 1992
- Pacifico D., Miselli F., Carboni A., Moschella A., and Mandolino G. (2008). Time course of cannabinoid accumulation and chemotype development during the growth of *Cannabis sativa* L.
- Pellegrini M., Marchie E., Pacifici R. & Pichini S. (2005). A rapid and simple procedure for the determination of cannabinoids in hemp food products by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*
- Petrovic M., Debeljak Z., Kezic N. & Dzidara P. (2015). Relationship between cannabinoids content and composition of fatty acids in hempseed oils. *Food Chemistry*
- Pollastro F., Minassi A., Fresu L. Cannabis phenolics and their bioactivities. *Curr. Med. Chem.* 2018
- Ross S. A., ElSohly M. A., Sultana G. N. N., Mehmedic Z., Hossain C. F., and Chandra, S. (2005). Flavonoid glycosides and cannabinoids from the pollen of *Cannabis sativa* L. *Phytochem.*
- Ross S. A., Mehmedic Z., Murphy T. P., and ElSohly M. A. (2000). GC-MS analysis of the total Δ^9 -THC content of both drug- and fiber-type *Cannabis* seeds. *J. Anal. Toxicol*
- Sánchez-Duffhues G., Calzado M.A., de Vinuesa A.G., Caballero F.J., Ech-Chahad A., Appendino G., Krohn K., Fiebich B.L., Muñoz E. Denbinobin, a naturally occurring 1,4-phenanthrenequinone, inhibits HIV-1 replication through an NF- κ B-dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2008
- Schultes RE, Klein WM, Plowman T, Lockwood TE, 1974. Cannabis: an example of taxonomic neglect. *Bot. Mus. Leaflet. Harv. Univ.*
- Shinjyo N., and Di Marzo V. (2013). The effect of cannabichromene on adult neural stem/progenitor cells.
- Small E, Cronquist A, 1976. A practical and natural taxonomy for Cannabis
- Small, E. (2015). Evolution and classification of *Cannabis sativa* (marijuana, hemp) in relation to human utilization. *The Botanical Review*
- Stout J. M., Boubakir Z., Ambrose S. J., Purves R. W., and Page J. E. (2012). The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *Plant J.*
- Swartz ME. Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction, Separation Science Re-Defined, LC-GC Supplement, 2005
- T.J. Mason, Sonochemistry, Oxford University Press, 1999
- Taura F., Sirikantaramas S., Shoyama Y., Shoyama Y., and Morimoto, S. (2007). Phytocannabinoids in *Cannabis sativa*: recent studies on biosynthetic enzymes.
- Tolley L, Jorgenson JW, Mosely MA. Very High-Pressure Gradient LC/MS/MS, *Anal Chem.* 2001
- van Demeter JJ, Zuiderweg EJ, Klinkenberg A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as cause of no ideality in chromatography, *Chem Eng Sci.* 1965

- Vázquez L. H., Palazon J., and Navarro-Ocaña A. (2012). The pentacyclic triterpenes α -, β -amyrins: a review of sources and biological activities.
- Yan X., Tang J., Passos C., Nurisso A., Simões-Pires C., Ji M., Lou H., Fan P. Characterization of lignanamides from hemp (*Cannabis sativa* L.) seed and their antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities. *J. Agric. Food Chem.* 2015
- Δημητρακοπούλου, Ο. (2020). Μελέτη της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου και των εκχυλισμάτων διαφορετικών ποικιλιών του είδους *Cannabis sativa* L. MSc, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
- Μουντάκης – Κρητικός, Π. (2018). Η επίδραση της οργανικής λίπανσης στην ανάπτυξη και παραγωγή ποικιλιών βιομηχανικής βιομηχανικής κάνναβης (*Cannabis sativa* L.). MSc, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Γεωργίας
- Παπακώστα – Τασοπούλου, Δ. (2013). Βιομηχανικά φυτά. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Έκδοση II, Θεσσαλονίκη